

胃肠平滑肌起搏功能研究的最新动态

王佐妤, 许文燮

王佐妤, 许文燮, 上海交通大学医学院生理学 上海市 200240
许文燮, 教授, 博士生导师, 主要从事胃肠动力疾病的基础研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 10672103

通讯作者: 许文燮, 教授, 200240, 上海市闵行区东川路800号,
上海交通大学医学院生理学. wenxiexu@sjtu.edu.cn
电话: 021-34205639

收稿日期: 2009-12-16 修回日期: 2009-12-30
接受日期: 2010-01-04 在线出版日期: 2010-02-08

Advances in research on pacemaking function of gastrointestinal smooth muscle cells

Zuo-Yu Wang, Wen-Xie Xu

Zuo-Yu Wang, Wen-Xie Xu, Department of Physiology,
Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shang-
hai 200240, China

Supported by: National Natural Science Foundation of
China, No. 10672103

Correspondence to: Professor Wen-Xie Xu, Department
of Physiology, Shanghai Jiao Tong University School of
Medicine, 800 Dongchuan Road, Minhang District, Shang-
hai 200240, China. wenxiexu@sjtu.edu.cn

Received: 2009-12-16 Revised: 2009-12-30

Accepted: 2010-01-04 Published online: 2010-02-08

Abstract

Gastrointestinal smooth muscle has spontaneous contractile activity, which is very important to digestion and absorption function. However, the pacemaking mechanism in gastrointestinal smooth muscle is still not clear. In this article, we review the recent advances in research on the mechanisms underlying gastrointestinal pacemaker activity. We summarize the classification, function and pacemaking mechanisms of pacemaker cells, and the relationship between pacemaker cells and gastrointestinal motility dysfunction. As abnormal pacemaking activity is often associated with gastrointestinal motility dysfunction, it is of great clinical significance to clarify the pacemaking mechanisms in the gastrointestinal tract.

Key Words: Gastrointestinal tract; Interstitial cell of Cajal; Pacemaker current; Gastrointestinal motility disease

Wang ZY, Xu WX. Advances in research on pacemaking function of gastrointestinal smooth muscle cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(4): 319-323

摘要

胃肠道平滑肌具有自动节律性收缩的特性, 对消化和吸收功能具有十分重要的生理意义, 但目前尚未明确胃肠道平滑肌的起搏机制. 本文综述了近几年关于胃肠道起搏机制研究的最新进展, 从起搏细胞的分类、功能、起搏机制以及其与胃肠动力障碍性疾病的关系等方面做了阐述. 胃肠道平滑肌起搏活动的异常是引发胃肠动力障碍性疾病的重要原因之一, 因此, 胃肠起搏机制的相关基础研究具有重要的临床意义.

关键词: 胃肠道; Cajal间质细胞; 起搏电流; 胃肠动力障碍性疾病

王佐妤, 许文燮. 胃肠平滑肌起搏功能研究的最新动态. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 319-323

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/319.asp>

0 引言

胃肠道平滑肌具有自发性、节律性蠕动的特性, 类似心脏节律性的起搏活动, 这种自发节律性运动由慢波(slow wave), 即基本电节律(basic electric rhythm)控制. 胃肠道平滑肌的自发节律性运动对机体的消化和吸收功能具有非常重要的生理意义. 目前, 消化系平滑肌的起搏机制以及起搏功能异常导致的动力障碍性疾病的发病机制还有许多问题需要解决. 近十年来, Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)成为胃肠起搏功能机制和一些胃肠动力障碍性疾病研究的热点细胞, 从而引起基础和临床研究领域学者的广泛关注. 本文以基础和临床研究的最新科研成果为背景阐述了胃肠平滑肌起搏功能机制以及相关疾病的研究进展.

1 胃肠道起搏细胞的分类及功能

Ambache等^[1]首次发现慢波电节律控制小肠收

■背景资料

关于胃肠Cajal间质细胞的研究已有一百多年的历史. ICC作为胃肠起搏细胞不仅产生慢波电活动, 将电信号传递给平滑肌, 还参与胃肠动力功能的调节, 因此日益得到学者们的广泛重视. 近年来, 有关胃肠ICC的分布以及形态学的研究已较清楚, 但关于ICC起搏功能的研究还存在多种争议和无法解释的现象.

■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

■研究前沿

胃肠动力相关疾病一直是临床常见病、多发病,因其复杂多样给临床治疗带来一定困难。对ICC的研究使人们逐渐意识到ICC的结构和功能异常是导致胃肠动力疾病的关键因素,因此ICC将成为胃肠动力疾病治疗的关键和靶点。

缩活动,并发现慢波的产生与存在于肠道平滑肌间的ICC有关。从此,ICC与慢波之间的关系得到深入研究。根据所在部位不同,将存在于胃肠道内的ICC分为4类^[2], (1)ICC-MY: 位于环形肌和纵形肌之间; (2)ICC-IM: 位于肌束间; (3)ICC-DMP: 位于环形肌深肌层内的ICC-IM, 只存在于小肠; (4)ICC-SM: 位于黏膜下层, 只存在于结肠。现有的研究表明, ICC-MY和ICC-IM两种细胞与胃肠道平滑肌的自发性收缩活动有关。ICC-MY是主要的起搏细胞, 具有自动产生节律性去极化的功能, 从而产生慢波^[3,4]。ICC-MY作为起搏细胞产生的自发性内向电流称之为起搏电流。ICC-IM同样能够产生一种持续性放电活动, 称之为单位电位(unitary potentials), 依靠这种电位的存在, ICC-IM可将ICC-MY产生的起搏信号传递给ICC-IM形成紧密连接的平滑肌^[5], 从而完成自发性收缩过程, 除此之外, ICC-IM在神经信号传递过程中还具有调节作用^[6]。由此可见, ICC-MY和ICC-IM在胃肠道慢波的产生、传递及神经肌肉信号传递的过程中承担着不同的功能。

2 起搏电位产生的机制

“起搏单位”是ICC-MY产生自动去极化的关键结构, 由IP₃敏感的钙库、线粒体及钙敏感的通道三部分组成^[7-10], 即首先发生IP₃ I型受体的激活, 使IP₃敏感的钙库释放钙^[9,10], 随后引发线粒体摄取钙的过程, 从而导致胞内一定区域的钙离子浓度降低, 最终激活低钙敏感的通道开放, 离子流动引发电位改变, 由此周而复始即形成了规律性的电位变化。虽然目前关于胃肠道起搏机制的研究已取得一定进展, 但在这个领域中还有许多有争议的学说, 例如起搏通道究竟是氯通道还是非选择性阳离子通道的争论就一直存在, 另外ryanodine敏感的钙库以及胃肠道其他类型ICC是否也参与起搏过程等许多问题尚未明了, 这说明ICC还需要大量深入的研究。

2.1 非选择性阳离子通道 如前所述, ICC-MY和ICC-IM两种细胞与胃肠道平滑肌的自发性收缩活动都有关, 都能产生自发性的电活动, 但ICC-MY产生的起搏电位和ICC-IM产生的单位电位机制有所不同。Takeda发现参与ICC-MY起搏电位的电流可被 $[Ca^{2+}]_i$ 增加而阻断, 具有低钙敏感性, 根据反转电位和对Na⁺具有通透性的特点, 鉴定这种电流是非选择性阳离子通道(non-selective cation channel, NSCC)开放产生的, 在

过去的研究中, 多数学者的数据都支持这一结论^[10-13]。ICC-IM产生的单位电位是一种基础电流, 并有瞬间自发性内向电流(spontaneous transient inward currents, STICs)叠加于其上, 有CaM依赖性, $[Ca^{2+}]_i$ 增加对电流具有促进作用, 这种电流同样对Na⁺通透, 反转电位接近0 mV, 并能被Ga³⁺阻断, 因此鉴定这种高钙激活的电流也是非选择性阳离子通道。因为调整氯离子平衡电位(ECl)对两种细胞产生的电流都没有影响, 所以排除了有氯离子参与起搏电位和单位电位的可能性。Takeda等^[13]认为在不同种类的ICC中表达不同机制的非选择性阳离子通道是ICC在胃肠起搏活动中行使不同功能的基础。

有研究表明, 参与胃肠道ICC-MY起搏活动的非选择性阳离子通道是一类特殊的瞬间受体电位(transient receptor potential, TRP)通道, 这种通道的特殊之处在于存在多种门控机制, 在视、触、嗅、听等感觉产生的机制中具有重要作用^[14]。TRP通道是一类六次跨膜的非选择性阳离子通道, 包括7个亚型, 在TRP家族中至少两类亚型与胃肠道ICC-MY起搏电流相关: TRPC4^[15]和TRPM7^[16], 在HEK293细胞上异源表达这两种通道都会产生一种类似于ICC起搏电流的内向电流, 说明起搏通道有可能属于TRP通道家族。

2.2 氯通道 Tokutomi等^[17]于1995年发现从小鼠小肠分离出的ICC起搏电流的翻转电位接近氯离子的翻转电位, 而且氯通道的阻断剂SITS抑制起搏电流, 因此他们认为, 起搏电流的产生与氯离子有关, 随后的许多研究结果也支持这一结论^[18-21]。Kito等通过组织原位记录方法发现ICC-MY产生的起搏电位包括两个时相, 分别由不同电流参与: 第一时相是电位的快速上升期, 由电压依赖的钙通道开放造成; 第二时相是平台期, 由钙激活氯通道开放所致^[19,20]。虽然在培养的ICC上已发现高电导性、内向整流性和容积敏感性等氯通道^[17,18,22], 但对氯通道为起搏通道这一观点持有异议的学者认为, 在新鲜分离的c-kit阳性ICC上并未发现钙激活氯通道, 只发现存在NSCCs通道^[13]; 另外, 氯通道阻断剂缺乏特异性^[23,24], 不仅能够阻断氯通道也能够阻断非选择性阳离子通道^[12,25], 因此他们认为氯通道阻断剂能够阻断起搏电流的依据不足以说明起搏通道就是氯通道^[13]。但最新研究发现, 在胃肠道间质肿瘤(gastrointestinal stromal tumors, GIST)中存在一种特异性的ANO1蛋白(anoctamin 1/TMEM16A), 即钙激活氯通道蛋白, 这种蛋白不

仅是胃肠道ICC的特异性标志蛋白, 也参与慢波的产生过程^[26-28], 这一结果有力地支持了氯通道参与起搏活动的结论. 最近Parsons等^[21]还发现ICC-MY存在一种由ATP和PKA激活的外向整流氯电流(PKA- and ATP-activated chloride channel, PACC), 这种氯通道产生一种尾电流, 只参与ICC-MY起搏活动的后除极化过程. 因此可以认为, 胃肠道起搏细胞存在有多种氯通道, 与其他种类的通道共同参与起搏活动的产生和调节.

2.3 其他离子通道 除了前面所讲的非选择性阳离子通道和氯通道, 已经证实存在在胃肠道ICC上还存在钠、钾和钙等通道, 这些通道也参与调节ICC起搏活动, 对胃肠道的自发性收缩功能具有一定的影响. 在新鲜分离的狗近端结肠^[29]和豚鼠胃窦^[30]分别发现了IKCa的存在, 这种电流有可能参与胃肠道自发性内向电流的再去极化调节过程. 在鼠类和狗的小肠以及结肠发现了T型钙通道的存在^[31-33], Gibbons等^[34]研究表明, T型 $\alpha 1H$ 钙通道的阻断剂能够阻断小鼠小肠ICC起搏电位的上升支, 因此推测T型 $\alpha 1H$ 钙通道参与小鼠小肠起搏电位的产生, 但T型 $\alpha 1H$ 钙通道不参与人小肠ICC的起搏活动^[35]. 钠通道一直被认为在心脏起搏中起到关键作用, 而只有在最近几年才在胃肠ICC中发现SCN5A编码的NaV1.5钠通道, 这种钠通道参与慢波上升支的形成, 具有机械敏感性, 当细胞膜受到牵拉时, 内向钠电流峰值的幅度增加^[36], 因此可以看出虽然钠通道并不是起搏通道, 但在胃肠动力的调节中起到重要的作用.

2.4 钙库和线粒体 钙离子在胃肠ICC起搏活动中扮演极其重要的角色, 钙离子从钙库中释放是激活起搏活动的起始机制^[37,38], 已明确IP3敏感的钙库是胃肠道ICC产生起搏活动的关键结构^[9,10], 但ryanodine敏感的钙库在胃肠道起搏活动中的作用还有争议. 有学者发现ryanodine对胃肠道慢波的电活动没有影响, 因此认为ryanodine敏感的钙库不参与起搏过程^[7,38,39], 但Aoyama等则发现ryanodine能完全阻断胃肠ICC钙振荡, 因此认为ryanodine与IP3敏感的钙库应该是共同参与引起ICC起搏电流的钙振荡^[40], 而且Aoyama等和Liu等也进一步发现胃肠ICC上存在ryanodine3受体(RyR3), 并对起搏活动有调节作用, 这一数据为ryanodine敏感的钙库参与起搏过程提供了有力的支持^[40,41].

3 胃肠起搏功能与运动障碍

早在1995年Huizinga等^[42]学者就发现胃肠道ICC

网络消失会导致慢波消失, 从此人们逐渐发现胃肠道多种疾病与ICC有关. 已有证据表明, ICC网络的受损、异常、缺失或增生都会导致胃肠道慢波异常, 从而引起动物^[43]或人^[44,45]胃肠动力障碍或疾病, 如糖尿病性胃肠动力失调^[46]; 功能性消化不良^[47]; 假性肠梗阻^[48]; 贲门失弛缓症^[49]; 幽门狭窄^[49]等. 甚至一些肿瘤也与ICC有关, 如GIST是一种常见的胃肠道间质肉瘤, 特征性地过量表达由*c-kit*原癌基因编码的酪氨酸激酶受体CD117^[50-52]. 因此, 与ICC相关疾病的研究日益得到重视.

关于胃肠动力疾病的治疗, 多数学者认为, ICC可以成为治疗的靶向目标^[53,54]. 一些能够影响ICC功能的药物已应用于临床或正在研究当中. *c-kit*原癌基因的过度表达是导致GIST发生的主要原因, 一直以来因为其对放疗和化疗不为敏感, 手术治疗成为唯一的手段, 但治疗效果不佳. 自从2001年Joensuu等^[55]首次报道酪氨酸激酶受体阻断剂imatinib应用于治疗GISTs以后, imatinib逐渐在临床得到应用, 并收到良好的治疗效果^[50-52]. 目前与ICC有关的促胃动力药物的研究也有所进展. DA-9701是一种由牵牛种子和延胡索块茎合成的中草药型促运动剂, 可通过激活ICC的起搏活性加速胃排空速度, 增加胃顺应性, 其促进胃肠动力的效果强于莫沙必利和西沙必利^[56,57], 目前在韩国已用于治疗功能性消化不良病的临床III期试验阶段^[56]. 最新的治疗胃肠动力疾病的方法显示, 对于一些因ICC的缺失或功能异常所导致胃肠动力疾病, 可以采用骨髓移植的方法植入具有多种分化潜能的多能干细胞, 进而促使其转分化为ICC, 从而恢复胃肠动力^[58]. 与ICC有关的临床用药及治疗方法为胃肠动力疾病的治疗开辟了新的方向.

4 结论

多数学者的研究结果已证实胃肠道的起搏活动与ICC的自发节律性电活动相关, 细胞内自发性钙震荡是引起ICC起搏活动的重要机制, 其中IP3介导的钙库对钙离子节律性的钙释放是关键环节; 多种胃肠道疾病, 尤其是动力障碍性疾病与ICC的损伤或缺失具有密切的关系. 然而, 关于胃肠平滑肌的起搏功能研究还有许多问题尚待解决, 如起搏电流的离子机制、疾病过程中引起ICC损伤并缺失的机制等. 总之, 为明确胃肠动力障碍性疾病的发病机制, 研究ICC起搏活动的产生机制以及其在胃肠疾病发生发展过程

■名词解释

TRP通道: 是一类六次跨膜的非选择性阳离子通道, 分为7大类: TRPC、TRPV、TRPM、TRPA、TRPN、TRPP和TRPML, 存在于不同种类的生物中, 包括蠕虫、植物、鱼类、鼠类和人类. TRP通道在可兴奋和非兴奋细胞中具有多种功能. 其中, TRP通道最重要的作用是具有感觉功能, 作为最古老的细胞感受装置, TRP通道不仅感受外界刺激, 如视觉、听觉、触觉、温度觉、味觉和嗅觉等, 同时也感受内环境的变化, 如酸碱度或激素水平的变化等.

同行评价

本文系统阐述了平滑肌运动机制和起搏机制研究的历史及现状,文献引用合理,比较全面,能够反映当前该领域的研究现状。

中所起的作用具有重要的临床意义。

参考文献

- Ambache N. The electrical activity of isolated mammalian intestines. *J Physiol* 1947; 106: 139-153
- Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of Cajal: primary targets of enteric motor innervation. *Anat Rec* 2001; 262: 125-135
- Dickens EJ, Hirst GD, Tomita T. Identification of rhythmically active cells in guinea-pig stomach. *J Physiol* 1999; 514 (Pt 2): 515-531
- Ordög T, Ward SM, Sanders KM. Interstitial cells of cajal generate electrical slow waves in the murine stomach. *J Physiol* 1999; 518 (Pt 1): 257-269
- Edwards FR, Hirst GD, Suzuki H. Unitary nature of regenerative potentials recorded from circular smooth muscle of guinea-pig antrum. *J Physiol* 1999; 519 Pt 1: 235-250
- Sanders KM. A case for interstitial cells of Cajal as pacemakers and mediators of neurotransmission in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1996; 111: 492-515
- Malysz J, Donnelly G, Huizinga JD. Regulation of slow wave frequency by IP(3)-sensitive calcium release in the murine small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G439-G448
- Sanders KM, Koh SD, Ward SM. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 307-343
- Suzuki H, Takano H, Yamamoto Y, Komuro T, Saito M, Kato K, Mikoshiba K. Properties of gastric smooth muscles obtained from mice which lack inositol trisphosphate receptor. *J Physiol* 2000; 525 Pt 1: 105-111
- Ward SM, Ordög T, Koh SD, Baker SA, Jun JY, Amberg G, Monaghan K, Sanders KM. Pacemaking in interstitial cells of Cajal depends upon calcium handling by endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol* 2000; 525 Pt 2: 355-361
- Goto K, Matsuoka S, Noma A. Two types of spontaneous depolarizations in the interstitial cells freshly prepared from the murine small intestine. *J Physiol* 2004; 559: 411-422
- Koh SD, Jun JY, Kim TW, Sanders KM. A Ca(2+)-inhibited non-selective cation conductance contributes to pacemaker currents in mouse interstitial cell of Cajal. *J Physiol* 2002; 540: 803-814
- Takeda Y, Koh SD, Sanders KM, Ward SM. Differential expression of ionic conductances in interstitial cells of Cajal in the murine gastric antrum. *J Physiol* 2008; 586: 859-873
- Venkatachalam K, Montell C. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 387-417
- Walker RL, Koh SD, Sergeant GP, Sanders KM, Horowitz B. TRPC4 currents have properties similar to the pacemaker current in interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: C1637-C1645
- Kim BJ, Lim HH, Yang DK, Jun JY, Chang IY, Park CS, So I, Stanfield PR, Kim KW. Melastatin-type transient receptor potential channel 7 is required for intestinal pacemaking activity. *Gastroenterology* 2005; 129: 1504-1517
- Tokutomi N, Maeda H, Tokutomi Y, Sato D, Sugita M, Nishikawa S, Nishikawa S, Nakao J, Imamura T, Nishi K. Rhythmic Cl⁻ current and physiological roles of the intestinal c-kit-positive cells. *Pflugers Arch* 1995; 431: 169-177
- Huizinga JD, Zhu Y, Ye J, Molleman A. High-conductance chloride channels generate pacemaker currents in interstitial cells of Cajal. *Gastroenterology* 2002; 123: 1627-1636
- Kito Y, Fukuta H, Suzuki H. Components of pacemaker potentials recorded from the guinea pig stomach antrum. *Pflugers Arch* 2002; 445: 202-217
- Kito Y, Suzuki H. Properties of pacemaker potentials recorded from myenteric interstitial cells of Cajal distributed in the mouse small intestine. *J Physiol* 2003; 553: 803-818
- Parsons SP, Sanders KM. An outwardly rectifying and deactivating chloride channel expressed by interstitial cells of cajal from the murine small intestine. *J Membr Biol* 2008; 221: 123-132
- Zhu Y, Mucci A, Huizinga JD. Inwardly rectifying chloride channel activity in intestinal pacemaker cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G809-G821
- Dick GM, Kong ID, Sanders KM. Effects of anion channel antagonists in canine colonic myocytes: comparative pharmacology of Cl⁻, Ca²⁺ and K⁺ currents. *Br J Pharmacol* 1999; 127: 1819-1831
- Welsh DG, Nelson MT, Eckman DM, Brayden JE. Swelling-activated cation channels mediate depolarization of rat cerebrovascular smooth muscle by hyposmolarity and intravascular pressure. *J Physiol* 2000; 527 Pt 1: 139-148
- Koh SD, Sanders KM, Ward SM. Spontaneous electrical rhythmicity in cultured interstitial cells of cajal from the murine small intestine. *J Physiol* 1998; 513 (Pt 1): 203-213
- Gomez-Pinilla PJ, Gibbons SJ, Bardsley MR, Lorincz A, Pozo MJ, Pasricha PJ, Van de Rijn M, West RB, Sarr MG, Kendrick ML, Cima RR, Dozois EJ, Larson DW, Ordög T, Farrugia G. Ano1 is a selective marker of interstitial cells of Cajal in the human and mouse gastrointestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G1370-G1381
- Hwang SJ, Blair PJ, Britton FC, O'Driscoll KE, Hennig G, Bayguinov YR, Rock JR, Harfe BD, Sanders KM, Ward SM. Expression of anoctamin 1/TMEM16A by interstitial cells of Cajal is fundamental for slow wave activity in gastrointestinal muscles. *J Physiol* 2009; 587: 4887-4904
- Zhu MH, Kim TW, Ro S, Yan W, Ward SM, Koh SD, Sanders KM. A Ca(2+)-activated Cl(-) conductance in interstitial cells of Cajal linked to slow wave currents and pacemaker activity. *J Physiol* 2009; 587: 4905-4918
- Langton P, Ward SM, Carl A, Norell MA, Sanders KM. Spontaneous electrical activity of interstitial cells of Cajal isolated from canine proximal colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 7280-7284
- Kim YC, Suzuki H, Xu WX, Choi W, Kim SH, Lee SJ. Ca²⁺-activated K⁺ current in freshly isolated c-Kit positive cells in guinea-pig stomach. *J Korean Med Sci* 2009; 24: 384-391
- Kim YC, Koh SD, Sanders KM. Voltage-dependent inward currents of interstitial cells of Cajal from murine colon and small intestine. *J Physiol* 2002; 541: 797-810
- Koh SD, Monaghan K, Ro S, Mason HS, Kenyon JL, Sanders KM. Novel voltage-dependent non-selective cation conductance in murine colonic

- myocytes. *J Physiol* 2001; 533: 341-355
- 33 Lee HK, Sanders KM. Comparison of ionic currents from interstitial cells and smooth muscle cells of canine colon. *J Physiol* 1993; 460: 135-152
 - 34 Gibbons SJ, Strege PR, Lei S, Roeder JL, Mazzone A, Ou Y, Rich A, Farrugia G. The α_1H Ca^{2+} Channel Subunit is Expressed in Mouse Jejunal Interstitial Cells of Cajal and Myocytes. *J Cell Mol Med* 2008 Dec 24. [Epub ahead of print]
 - 35 Farrugia G. Ca^{2+} handling in human interstitial cells of Cajal. *Gastroenterology* 2007; 132: 2057-2059
 - 36 Strege PR, Ou Y, Sha L, Rich A, Gibbons SJ, Szurszewski JH, Sarr MG, Farrugia G. Sodium current in human intestinal interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G1111-G1121
 - 37 Nose K, Suzuki H, Kannan H. Voltage dependency of the frequency of slow waves in antrum smooth muscle of the guinea-pig stomach. *Jpn J Physiol* 2000; 50: 625-633
 - 38 van Helden DF, Imtiaz MS, Nurgaliyeva K, von der Weid P, Dosen PJ. Role of calcium stores and membrane voltage in the generation of slow wave action potentials in guinea-pig gastric pylorus. *J Physiol* 2000; 524 Pt 1: 245-265
 - 39 Ward SM, Baker SA, de Faoite A, Sanders KM. Propagation of slow waves requires IP_3 receptors and mitochondrial Ca^{2+} uptake in canine colonic muscles. *J Physiol* 2003; 549: 207-218
 - 40 Aoyama M, Yamada A, Wang J, Ohya S, Furuzono S, Goto T, Hotta S, Ito Y, Matsubara T, Shimokata K, Chen SR, Imaizumi Y, Nakayama S. Requirement of ryanodine receptors for pacemaker Ca^{2+} activity in ICC and HEK293 cells. *J Cell Sci* 2004; 117: 2813-2825
 - 41 Liu HN, Ohya S, Wang J, Imaizumi Y, Nakayama S. Involvement of ryanodine receptors in pacemaker Ca^{2+} oscillation in murine gastric ICC. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 640-646
 - 42 Huizinga JD, Thuneberg L, Klüppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995; 373: 347-349
 - 43 Sanders KM, Ördög T, Ward SM. Physiology and pathophysiology of the interstitial cells of Cajal: from bench to bedside. IV. Genetic and animal models of GI motility disorders caused by loss of interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G747-G756
 - 44 Geraldino RS, Ferreira AJ, Lima MA, Cabrine-Santos M, Lages-Silva E, Ramirez LE. Interstitial cells of Cajal in patients with chagasic megacolon originating from a region of old endemicity. *Pathophysiology* 2006; 13: 71-74
 - 45 Pardi DS, Miller SM, Miller DL, Burgart LJ, Szurszewski JH, Lennon VA, Farrugia G. Paraneoplastic dysmotility: loss of interstitial cells of Cajal. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1828-1833
 - 46 Yamamoto T, Watabe K, Nakahara M, Ogiyama H, Kiyohara T, Tsutsui S, Tamura S, Shinomura Y, Hayashi N. Disturbed gastrointestinal motility and decreased interstitial cells of Cajal in diabetic db/db mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 660-667
 - 47 Zhang H, Xu X, Wang Z, Li C, Ke M. Correlation between gastric myoelectrical activity recorded by multi-channel electrogastrography and gastric emptying in patients with functional dyspepsia. *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 797-804
 - 48 Isozaki K, Hirota S, Miyagawa J, Taniguchi M, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Deficiency of c-kit⁺ cells in patients with a myopathic form of chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 332-334
 - 49 Vanderwinden JM, Rumessen JJ. Interstitial cells of Cajal in human gut and gastrointestinal disease. *Microsc Res Tech* 1999; 47: 344-360
 - 50 Annaberdyev S, Gibbons J, Hardacre JM. Dramatic response of a gastrointestinal stromal tumor to neoadjuvant imatinib therapy. *World J Surg Oncol* 2009; 7: 30
 - 51 Dagher R, Cohen M, Williams G, Rothmann M, Gobburu J, Robbie G, Rahman A, Chen G, Staten A, Griebel D, Pazdur R. Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3034-3038
 - 52 Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD, Van den Abbeele AD, Eisenberg B, Roberts PJ, Heinrich MC, Tuveson DA, Singer S, Janicek M, Fletcher JA, Silverman SG, Silberman SL, Capdeville R, Kiese B, Peng B, Dimitrijevic S, Druker BJ, Corless C, Fletcher CD, Joensuu H. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002; 347: 472-480
 - 53 Farrugia G. Interstitial cells of Cajal in health and disease. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20 Suppl 1: 54-63
 - 54 Huizinga JD, Thuneberg L, Vanderwinden JM, Rumessen JJ. Interstitial cells of Cajal as targets for pharmacological intervention in gastrointestinal motor disorders. *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18: 393-403
 - 55 Joensuu H, Roberts PJ, Sarlomo-Rikala M, Andersson LC, Tervahartala P, Tuveson D, Silberman S, Capdeville R, Dimitrijevic S, Druker B, Demetri GD. Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 2001; 344: 1052-1056
 - 56 Choi S, Choi JJ, Jun JY, Koh JW, Kim SH, Kim DH, Pyo MY, Choi S, Son JP, Lee I, Son M, Jin M. Induction of pacemaker currents by DA-9701, a prokinetic agent, in interstitial cells of Cajal from murine small intestine. *Mol Cells* 2009; 27: 307-312
 - 57 Lee TH, Choi JJ, Kim DH, Choi S, Lee KR, Son M, Jin M. Gastroprokinetic effects of DA-9701, a new prokinetic agent formulated with Pharbitis Semen and Corydalis Tuber. *Phytomedicine* 2008; 15: 836-843
 - 58 Ishii S, Tsuji S, Tsujii M, Nishida T, Watabe K, Iijima H, Takehara T, Kawano S, Hayashi N. Restoration of gut motility in Kit-deficient mice by bone marrow transplantation. *J Gastroenterol* 2009; 44: 834-841

编辑 李军亮 电编 何基才

肠促胰岛素在减肥手术治疗肥胖2型糖尿病患者中的作用

侯文芳, 刘国强, 洪天配

■背景资料

近年来, 减肥手术得到了越来越广泛的关注。多项临床研究显示, 减肥手术不仅可使患者的体质量平稳下降, 而且对于其他相关疾病如糖尿病、高脂血症、高血压及癌症等也有显著的疗效。本文对减肥手术的术式、疗效、安全性及治疗糖尿病的可能机制进行讨论。

侯文芳, 刘国强, 洪天配, 北京大学第三医院内分泌科 北京市 100191

洪天配, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事糖尿病、干细胞分化研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30771032, No. 30700879
国家973、863重大项目子课题基金资助项目, No.

2006CB503900, No. 2006AA02A112

北京市自然科学基金资助项目, No. 7062067

作者贡献分布: 本文设计和指导由洪天配完成; 写作由侯文芳与刘国强完成。

通讯作者: 洪天配, 教授, 主任医师, 100191, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院内分泌科, tpho66@bjmu.edu.cn

电话: 010-82266688 传真: 010-62017700

收稿日期: 2009-10-16 修回日期: 2009-12-25

接受日期: 2009-12-29 在线出版日期: 2010-02-08

Remission of type 2 diabetes in obese patients after bariatric surgery: the role of incretins

Wen-Fang Hou, Guo-Qiang Liu, Tian-Pei Hong

Wen-Fang Hou, Guo-Qiang Liu, Tian-Pei Hong, Department of Endocrinology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 30771032 and 30700879; the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2006CB503900; the National High Technology Research and Development Program of China (863 program), No. 2006AA02A112; and the Beijing Natural Science Foundation, No. 7062067

Correspondence to: Professor Tian-Pei Hong, Department of Endocrinology, Peking University Third Hospital, 49 Huayuan North Road, Haidian District, Beijing 100191, China. tpho66@bjmu.edu.cn

Received: 2009-10-16 Revised: 2009-12-25

Accepted: 2009-12-29 Published online: 2010-02-08

Abstract

The prevalence of obesity and type 2 diabetes has increased over recent decades. Bariatric surgery has been widely used in clinical practice. There are three categories of bariatric surgery: restrictive surgery, malabsorptive surgery, and combined restrictive and malabsorptive surgery. Bariatric surgery causes not only weight loss but also a remarkable and durable remission of type 2 diabetes mellitus. However, the mechanism of diabetes resolution remains unclear. In addition to weight loss and food intake restriction, incretins also seem to contribute to the resolution of type 2 diabetes following bariatric surgery.

In this article, we will review the efficacy and safety of various bariatric procedures and the mechanism of diabetes resolution resulting from bariatric surgery.

Key Words: Bariatric surgery; Type 2 diabetes mellitus; Incretin

Hou WF, Liu GQ, Hong TP. Remission of type 2 diabetes in obese patients after bariatric surgery: the role of incretins. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 324-328

摘要

肥胖和2型糖尿病的患病率呈逐年增高的趋势。减肥手术作为减轻体质量的有效方法, 近年来逐渐得到广泛的应用。其主要分为限制型手术、吸收不良型手术及联合型手术。减肥手术在减轻体质量的同时也使肥胖患者的糖尿病得到了缓解, 但其缓解糖尿病的机制目前尚不完全清楚。除了体质量减轻、摄食减少外, 关于肠促胰岛素在减肥手术中的作用也受到了越来越多的重视。本文对减肥手术的术式、疗效、安全性及治疗糖尿病的可能机制进行讨论。

关键词: 减肥手术; 2型糖尿病; 肠促胰岛素

侯文芳, 刘国强, 洪天配. 肠促胰岛素在减肥手术治疗肥胖2型糖尿病患者中的作用. *世界华人消化杂志* 2010; 18(4): 324-328
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/324.asp>

0 引言

糖尿病与肥胖密切相关, 约有80%的2型糖尿病患者是肥胖或体质量超质量者^[1]。减肥手术作为减轻体质量的有效治疗方法, 近年来得到了越来越广泛的应用。相关研究还显示, 接受减肥手术的患者在减轻体质量的同时, 由肥胖引起的其他疾病如糖尿病、高血压、高脂血症、脂肪肝等也相应得到改善。

1 减肥手术的分类

减肥手术从原理上大致可以分为3类, 即限制型手术、吸收不良型手术以及联合型手术。

■同行评议者

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

1.1 限制型手术 该类手术可在最大程度上减少胃容积, 由此减少食物摄取, 形成早饱. 常见的术式为可调式胃束带术(adjustable gastric banding, AGB). 该术式可形成一个小的胃囊和一个可调节的出口, 通过限制患者的进食而达到减质量的效果. 经腹腔镜进行的可调式胃束带术(laparoscopic adjustable gastric banding, LAGB)是一种改良型手术, 于1993年设计成功, 1994年正式在欧洲用于临床, 并逐渐推广至全世界, 2001年被美国FDA批准使用.

1.2 吸收不良型手术 小肠旁路手术是将小肠上端40 cm处直接接到末端50 cm处, 可以迅速减轻体质量, 但因术后患者出现慢性腹泻、电解质紊乱、肝硬化等严重的并发症而被弃用^[2]. 此后提出的胆胰旁路术(biliopancreatic diversion, BPD)类似于Billroth II胃大部切除术, 先行胃窦切除, 然后将胃连接至远端250 cm处的小肠, 旷置的小肠再与末端50 cm处的回肠吻合, 这样将小肠消化液与食物首先分流, 到远端小肠才汇合. Marceau和Hess改良了此术式, 即胃大部被切除, 保留胃小弯和胃窦, 十二指肠第一部被切断并连接至远侧250 cm小肠, 胆胰袢吻合至远侧100 cm回肠, 使得共同通路更长, 吸收面积增加, 此术式被称为胆胰旁路-十二指肠转位术^[3].

1.3 联合型手术 该术式是限制型与吸收不良型手术相结合的术式, 1967年由Mason首先报道, 其将胃隔出容量为15-30 mL的小胃囊, 并与空肠做吻合口, 类似胃大部分切除手术的Billroth II的术式, 其后因吻合口溃疡、逆行性反流等, 故不断进行了改良. 直至1977年, Griffen等应用胃旁路手术(Roux-en-Y Gastric Bypass, GBP)使胃-空肠吻合, 大大减少了反流的发生率, 目前已逐渐成为美国减肥手术的首选术式.

2 减肥手术治疗糖尿病的有效性与安全性

近年来, 减肥手术得到了越来越广泛的关注. 多项临床研究显示, 减肥手术不仅可使患者的体质量平稳下降, 而且对于其他相关疾病如糖尿病、高脂血症、高血压及癌症等也有显著的疗效.

Dixon等^[4]完成的1项随机对照研究将60例合并新诊断2型糖尿病(病程<2年)、体质量指数(BMI)30-40 kg/m²的肥胖患者随机分为行LAGB的手术治疗组和改变生活方式的传统治疗组, 比较两组的疗效, 其中糖尿病缓解被定义为在不用药的情况下空腹血糖<7.0 mmol/L、糖化血红蛋白(HbA1C)<6.2%. 2年后手术组的平均BMI

从36.9 kg/m²下降到29.5 kg/m², 体质量减轻达20%, 糖尿病缓解率达到73%(22/30); 而传统组的平均BMI只从37.1 kg/m²下降到36.6 kg/m², 糖尿病缓解率也只有13%(4/30). Ramos等^[5]对20例BMI介于20-30 kg/m²的2型糖尿病患者行腹腔镜下十二指肠-空肠旷置术的疗效进行了观察, 发现术后3 mo平均BMI从27.1 kg/m²明显下降到25 kg/m², 并且至术后6 mo一直维持稳定降低; 与此同时, 空腹血糖和HbA1C水平也出现了明显的下降, 术后6 mo仅有2例患者还需要使用口服降糖药治疗. 尽管如此, 减肥手术在BMI<30 kg/m²的患者中的研究数据仍然非常有限. Lee等^[6]对820例行腹腔镜下GBP的肥胖患者中合并有2型糖尿病或空腹血糖受损的201例患者进行随访发现, 术后1年时患者体质量平均下降32.1%, 术前BMI>35 kg/m²的患者中有98.5%血糖恢复正常, 而BMI<35 kg/m²的患者则有89.5%血糖恢复正常; 术后5年, 患者体质量和平均血糖水平依然保持平稳.

2004年, Buchwald等^[7]对136项研究进行Meta分析发现, 基线平均BMI为46.9 kg/m², AGB组患者的额外体质量下降平均为47.5%, GBP组为61.6%, 而BPD组可达到70.1%; 3种不同术式的糖尿病缓解率分别为47.9%、83.7%及98.9%. 除此之外, ≥70%的患者的高脂血症得到改善, 61.7%的患者的高血压得以纠正, 85.7%的患者的阻塞性睡眠呼吸暂停综合征消失. 2009年, Buchwald等^[8]进一步对621项研究进行Meta分析显示, 基线平均BMI为47.9 kg/m², 总体的额外体质量减轻55.9%, 总体的糖尿病缓解率78.1%, 额外体质量减轻和糖尿病缓解率按照幅度大小依次为BPD、GBP及AGB, 并且在术后<2年与≥2年时的效果几乎没有差别.

除了减轻体质量、改善血糖和血脂等效应外, 减肥手术还可能降低患者的死亡风险. 美国的1项关于GBP长期疗效的回顾性队列研究显示, 在术后随访平均7.1年内, 手术组因冠心病、糖尿病及癌症的死亡风险较对照组分别下降56%、92%及60%. 进一步分析提示, BMI≥45 kg/m²亚组患者的全因死亡风险显著高于BMI<45 kg/m²亚组患者, 手术可使BMI≥45 kg/m²亚组患者的死亡风险明显降低, 但未能显著降低BMI<45 kg/m²亚组患者的死亡风险^[9]. 另1项来自瑞典的前瞻性对照研究通过平均10.9年的随访发现, 减肥手术组在术后1-2年的体质量减轻最为明显, 并且在术后10年仍然可保持稳

■研发前沿

减肥手术对于肥胖2型糖尿病患者远期疗效、获益-风险比以及成本-效益比尚需进行仔细的评估, 相关机制方面的研究仍有待深入开展.

■相关报道

Dixon等对50例肥胖2型糖尿病患者接受LAGB术后1年的疗效观察发现, 体质量减轻越明显的患者中糖尿病缓解的几率越高. Ponce等的研究同样证实, 在LAGB术后2年患者中糖尿病的缓解与体质量减轻明显相关.

定, 而常规治疗组体质量下降不足2%. 与常规治疗组相比, 减肥手术组可显著降低累计死亡率, 尤其是心肌梗死和癌症所致的死亡^[10].

有趣的是, Service等^[11]观察了6例GBP术后出现餐后神经低血糖症(neuroglycopenia)的患者, 所有患者均有高胰岛素血症, 除了1例患者存在可疑胰岛素瘤的影像学证据外, 其余患者未见胰岛素瘤的放射学改变. 每位患者行选择性动脉钙刺激试验均为阳性, 并根据试验结果进行胰腺部分切除术, 所有患者术后低血糖症状均消失. 每位患者术后组织学检查均发现胰岛细胞增生症, 其中1例还存在多发性胰岛素瘤. 切除胰腺的免疫组织化学染色可见5例患者在胰腺导管中出现胰岛素阳性细胞. 上述结果提示, GBP可促进胰岛细胞增殖和(或)新生.

尽管减肥手术为糖尿病患者带来了巨大的益处, 但其潜在风险也是不容忽视的. Papasavas等^[12]对接受腹腔镜下GBP的116名患者进行随访发现, 术后肠梗阻的发生率为10.3%, 上消化道出血为3.4%, 吻合口狭窄3.4%, 残胃穿孔为0.9%. 此外, 其他不良事件还可能有消化性溃疡、吻合口瘘、急性胃扩张等. 甚至有1例患者在术后第1天就因为呼吸循环衰竭而死亡.

减肥手术后另一种常见并发症是倾倒综合征, 可表现为腹痛、腹泻、恶心、呕吐, 甚至头晕、休克, 这可能是由于手术后胃内食物骤然倾倒至十二指肠或空肠所致. 值得注意的是, 这种并发症在糖尿病患者中更容易出现. Padoin等^[13]对103名接受GBP的肥胖患者进行的1项回顾性研究发现, 49名合并2型糖尿病的肥胖患者术后倾倒综合征的发生率为44.9%, 而54名非糖尿病的肥胖患者则仅为5.6%. 此外, GBP术后还可长期出现多种维生素的缺失^[14], 应积极予以补充.

3 减肥手术缓解2型糖尿病的机制

3.1 体质量减轻 2型糖尿病的发生与肥胖密切相关, 故体质量减轻最初被认为是减肥术后导致糖尿病缓解的最重要原因. 最明显的例子是LAGB术后患者, 该项手术并没有改变胃肠道的解剖结构, 只是限制了上胃部的容积. Dixon等^[15]对50例肥胖2型糖尿病患者接受LAGB术后1年的疗效观察发现, 体质量减轻越明显的患者中糖尿病缓解的几率越高. Ponce等^[16]的研究同样证实, 在LAGB术后2年患者中糖尿病的缓解与体质量减轻明显相关.

另有许多研究显示, 在减肥手术后数天之

内血糖和血清胰岛素水平就可恢复正常, 远远早于体质量减轻的出现时间. Pories等^[17]于1995年报道了608例病理性肥胖患者行GBP的治疗效果, 其中术前146例患者伴有2型糖尿病, 152例为糖耐量受损; 术后4 mo内, 在体质量下降之前, 83%的2型糖尿病患者和98.7%的糖耐量受损患者在不需任何药物治疗和特殊饮食情况下血糖、血清胰岛素及HbA1C水平恢复正常. Schauer等^[18]的研究也同样显示, 在接受腹腔镜下GBP的肥胖2型糖尿病患者中, 其空腹血糖和HbA1C水平的下降均明显早于体质量的改变. 上述结果提示, 合并2型糖尿病的肥胖患者行GBP术后出现糖尿病的缓解或治愈, 并不是继发于重度肥胖的减重效果, 而是一种原发的特异性作用.

3.2 摄食减少 在两种不同的减肥手术方式中, AGB对于限制摄食的作用显著强于GBP, 但是AGB术后糖尿病缓解率并不优于GBP. Rubino等^[19]在GK糖尿病大鼠的研究中发现, 十二指肠-空肠旁路手术(duodenal-jejunal bypass, DJB)并不影响碳水化合物或脂肪的摄入, 但却可以减轻糖尿病; 与行假手术的对照组相比, 在同等摄食和体质量减轻的条件下, DJB手术组仍然显示出了更有效控制血糖的优势. 此外, 张士虎等^[20]观察GBP对非肥胖型糖尿病大鼠的降糖作用及其与术后饮食量改变的关系同样发现, GBP能显著降低实验大鼠的血糖, 但与GBP术后饮食减少无关. 以上研究说明, 在减肥手术后, 摄食减少和体质量下降与2型糖尿病缓解有关, 但可能却不是糖尿病缓解的最根本原因.

3.3 肠道神经内分泌的变化 胃肠道是重要的内分泌器官, 可以分泌多种胃肠道激素. GBP术后食物绕过转流区较早地刺激远端空肠和回肠, 胃肠道内分泌激素改变对糖代谢的调节作用是减肥手术治疗糖尿病的重要机制之一. 因此, 目前认为远端空肠和回肠过早接触食物和(或)胃、十二指肠和空肠上段旷置与糖尿病病情的改善相关, 由此出现了后肠道假说(hindgut hypothesis)和前肠道假说(foregut hypothesis)两种理论.

3.3.1 后肠道假说: 食物快速接触下段小肠, 营养物质刺激肠道内分泌激素的合成和(或)分泌增加, 通过肠道-胰岛轴调控胰岛β细胞功能, 增加胰岛素的合成和(或)释放, 并可改善外周组织对胰岛素敏感性. 其中研究较多的是胰升糖素样肽-1(GLP-1), GLP-1是一种重要的肠促胰岛素(incretin), 主要由末端空肠、回肠及结肠的L细

胞分泌. 已经证实, GLP-1的受体在人类和啮齿动物的 β 细胞中均有表达, GLP-1可诱导胰岛素的合成和释放. GLP-1和GLP-1受体激动剂不仅可以促进胰岛 β 细胞的增殖和新生, 还可以抑制 β 细胞的凋亡, 从而增加糖尿病动物的 β 细胞总量(β cell mass), 改善 β 细胞的功能. GLP-1除了葡萄糖依赖性促进胰岛素分泌外, 还具有抑制胰升糖素分泌、延迟胃排空、抑制食欲、改善胰岛素敏感性等多种生物学功能^[21]. 抑胃肽或称葡萄糖依赖性促胰岛素多肽(GIP)是另一种重要的肠促胰岛素. GIP由十二指肠和空肠的K细胞分泌, 具有强烈的葡萄糖依赖性促胰岛素分泌作用. 研究显示, GIP不仅可以促进第一时相胰岛素分泌、改善胰岛素敏感性, 还具有促进GLP-1的分泌、抑制胃酸分泌等作用^[22].

2007年, Laferrère等^[23]观察了8例合并2型糖尿病的肥胖妇女患者在行GBP术后1 mo, 不仅口服葡萄糖刺激的GLP-1和GIP分泌水平增加, 口服葡萄糖耐量试验与相同血糖水平的静脉注射葡萄糖耐量试验的胰岛素曲线下面积差值也恢复到正常水平, 提示减肥手术可使肠促胰岛素效应恢复正常. 另有研究表明, GBP术后高胰岛素钳夹试验显示胰岛素抵抗并未明显改善或仅有轻微改善^[24,25], 因此推断GBP改善2型糖尿病的机制是通过增加胰岛素分泌来克服胰岛素抵抗^[26]. 高宏凯^[27]的研究显示, 保留全胃的GBP手术具有较好的控制血糖水平作用; 食物转流的效应部位是远段空肠和回肠; GBP手术可能通过刺激小肠L细胞, 增加回肠胰升糖素原mRNA合成, 提高血清GLP-1水平, 通过肠道-胰岛轴调控血糖水平. 关于减肥手术后GIP水平变化的报道相对较少, 且结论不一. Clements等^[28]的报道显示, 在GBP术后数月GIP的水平并无明显变化, 这与Laferrère等报道的GIP水平增高不一致.

其他非肠促胰岛素的肠道神经内分泌激素在减肥手术后也有变化. 如多肽YY(peptide YY, PYY), 其同样是在进餐后由远端小肠的L细胞分泌, 可以抑制食欲, 促进早饱, 延缓胃排空. Morínigo等^[29]发现重度肥胖患者(BMI $47.4 \text{ kg/m}^2 \pm 6.1 \text{ kg/m}^2$)在接受GBP术前, GLP-1和PYY对摄食的反应明显下降. 术后6 mo, 尽管患者仍为肥胖状态(BMI $43.6 \text{ kg/m}^2 \pm 7.8 \text{ kg/m}^2$), 但其GLP-1和PYY对标准餐刺激的反应明显加强. Ghrelin主要由胃底和近端小肠分泌, 可以促进食欲, 增加食物摄入, 抑制胰岛素分泌. 关于GBP术后Ghrelin的变化, 目前的研究结果不一^[30,31].

因此, 有关PYY、Ghrelin等其他胃肠道激素在减肥手术后糖尿病缓解中的作用, 尚待进一步阐明.

3.3.2 前肠道假说: 手术使食物绕过十二指肠和近侧空肠, 阻止未知的“抗肠促胰岛素因子”或“胰岛素抵抗因子”从前肠道的释放. 为了证实前肠道假说, Rubino等^[19]将12周龄的2型糖尿病动物模型GK大鼠随机分为两组, 分别实施十二指肠-空肠旁路术(duodenal-jejunal bypass, DJB)和胃空肠吻合术(gastrojejunostomy, GJ). 术后每天监测体质量的变化, 并在术后10 d进行口服葡萄糖耐量试验. 第1次手术后4 wk时进行第2次手术, 即GJ组将胃与十二指肠分离, 使近端小肠旷置; 而GJB组将胃与十二指肠吻合, 使旷置的近端小肠再开放. 第2次手术后1 wk再次行口服葡萄糖耐量试验. 结果发现, 与对照组相比, 手术组的大鼠摄食和体质量增加均较少, DJB组大鼠第1次手术后有更好的血糖控制, 而GJ组大鼠的血糖则无明显改善. 第2次手术后惊奇地发现, GJ组大鼠近端小肠再旷置后, 其糖耐量异常情况得到了明显的改善; 而DJB组大鼠近端小肠再开放后则出现了糖耐量的再次恶化. 上述结果提示, 近端小肠在血糖调节中可能起着重要作用, 近端小肠可能存在某些尚未阐明的“抗肠促胰岛素因子”.

4 结论

肥胖和2型糖尿病的患病率均呈逐年增加的趋势, 与其相关的各种并发症严重影响了患者的生活质量和生存机会. 在治疗性生活方式改变和降糖药物治疗不能达到满意疗效的情况下, 减肥手术为重度肥胖的2型糖尿病患者提供了一种治疗的选择. 有关减肥手术缓解糖尿病的机制, 除了体质量减轻、摄食减少外, 肠促胰岛素可能发挥重要的作用. 然而, 减肥手术对于肥胖2型糖尿病患者的远期疗效、获益-风险比以及成本-效益比尚需进行仔细的评估, 相关机制方面的研究仍有待深入开展.

5 参考文献

- 1 Bloomgarden ZT. American Diabetes Association Annual Meeting, 1999: diabetes and obesity. *Diabetes Care* 2000; 23: 118-124
- 2 Hocking MP, Duerson MC, O'Leary JP, Woodward ER. Jejunoileal bypass for morbid obesity. Late follow-up in 100 cases. *N Engl J Med* 1983; 308: 995-999
- 3 Marceau P, Hould FS, Simard S, Lebel S, Bourque RA, Potvin M, Biron S. Biliopancreatic diversion

■应用要点

在治疗性生活方式改变和降糖药物治疗不能达到满意疗效的情况下, 减肥手术为重度肥胖的2型糖尿病患者提供了一种治疗的选择.

同行评价

本文行文简洁, 参考价值较好, 若能对减肥手术治疗肥胖2型糖尿病患者获益-风险作更深入讨论, 将对读者更有裨益。

- with duodenal switch. *World J Surg* 1998; 22: 947-954
- 4 Dixon JB, O'Brien PE, Playfair J, Chapman L, Schachter LM, Skinner S, Proietto J, Bailey M, Anderson M. Adjustable gastric banding and conventional therapy for type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 299: 316-323
- 5 Ramos AC, Galvão Neto MP, de Souza YM, Galvão M, Murakami AH, Silva AC, Canseco EG, Santamaría R, Zambrano TA. Laparoscopic duodenal-jejunal exclusion in the treatment of type 2 diabetes mellitus in patients with BMI<30 kg/m² (LBMJ). *Obes Surg* 2009; 19: 307-312
- 6 Lee WJ, Wang W, Lee YC, Huang MT, Ser KH, Chen JC. Effect of laparoscopic mini-gastric bypass for type 2 diabetes mellitus: comparison of BMI>35 and <35 kg/m². *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 945-952
- 7 Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrbach K, Schoelles K. Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004; 292: 1724-1737
- 8 Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, Bantle JP, Sledge I. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2009; 122: 248-256.e5
- 9 Adams TD, Gress RE, Smith SC, Halverson RC, Simper SC, Rosamond WD, Lamonte MJ, Stroup AM, Hunt SC. Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2007; 357: 753-761
- 10 Sjöström L, Narbro K, Sjöström CD, Karason K, Larsson B, Wedel H, Lystig T, Sullivan M, Bouchard C, Carlsson B, Bengtsson C, Dahlgren S, Gummesson A, Jacobson P, Karlsson J, Lindroos AK, Lönnroth H, Näslund I, Olbers T, Stenlöf K, Torgerson J, Agren G, Carlsson LM. Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med* 2007; 357: 741-752
- 11 Service FJ, Thompson GB, Service FJ, Andrews JC, Collazo-Clavell ML, Lloyd RV. Hyperinsulinemic hypoglycemia with nesidioblastosis after gastric-bypass surgery. *N Engl J Med* 2005; 353: 249-254
- 12 Papasavas PK, Hayetian FD, Caushaj PF, Landreneau RJ, Maurer J, Keenan RJ, Quinlin RF, Gagné DJ. Outcome analysis of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity. The first 116 cases. *Surg Endosc* 2002; 16: 1653-1657
- 13 Padoin AV, Neto MG, Moretto M, Barancelli F, Schroer CE, Mottin CC. Obese Patients with Type 2 Diabetes Submitted to Banded Gastric Bypass: Greater Incidence of Dumping Syndrome. *Obes Surg* 2009; 19: 1481-1484
- 14 Dalcanale L, Oliveira CP, Faintuch J, Nogueira MA, Rondó P, Lima VM, Mendonça S, Pajek D, Mancini M, Carrilho FJ. Long-Term Nutritional Outcome After Gastric Bypass. *Obes Surg* 2009 Aug 25. [Epub ahead of print]
- 15 Dixon JB, O'Brien PE. Health outcomes of severely obese type 2 diabetic subjects 1 year after laparoscopic adjustable gastric banding. *Diabetes Care* 2002; 25: 358-363
- 16 Ponce J, Haynes B, Paynter S, Fromm R, Lindsey B, Shafer A, Manahan E, Sutterfield C. Effect of Lap-Band-induced weight loss on type 2 diabetes mellitus and hypertension. *Obes Surg* 2004; 14: 1335-1342
- 17 Pories WJ, Swanson MS, MacDonald KG, Long SB, Morris PG, Brown BM, Barakat HA, deRamon RA, Israel G, Dolezal JM. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg* 1995; 222: 339-350; discussion 350-352
- 18 Schauer PR, Burguera B, Ikramuddin S, Cottam D, Gourash W, Hamad G, Eid GM, Mattar S, Ramanathan R, Barinas-Mitchel E, Rao RH, Kuller L, Kelley D. Effect of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass on type 2 diabetes mellitus. *Ann Surg* 2003; 238: 467-484; discussion 84-85
- 19 Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D, Mingrone G, Castagneto M, Marescaux J. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg* 2006; 244: 741-749
- 20 张士虎, 苗毅. 胃旁路术对非肥胖型糖尿病大鼠的降糖作用. *南京医科大学学报(自然科学版)* 2006; 26: 176-179
- 21 Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 2007; 87: 1409-1439
- 22 Meier JJ, Nauck MA, Schmidt WE, Gallwitz B. Gastric inhibitory polypeptide: the neglected incretin revisited. *Regul Pept* 2002; 107: 1-13
- 23 Laferrère B, Heshka S, Wang K, Khan Y, McGinty J, Teixeira J, Hart AB, Olivan B. Incretin levels and effect are markedly enhanced 1 month after Roux-en-Y gastric bypass surgery in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 1709-1716
- 24 Muscelli E, Mingrone G, Camastra S, Manco M, Pereira JA, Pareja JC, Ferrannini E. Differential effect of weight loss on insulin resistance in surgically treated obese patients. *Am J Med* 2005; 118: 51-57
- 25 Gastaldi G, Russell A, Golay A, Giacobino JP, Habicht F, Barthassat V, Muzzin P, Bobbioni-Harsch E. Upregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator gene (PGC1A) during weight loss is related to insulin sensitivity but not to energy expenditure. *Diabetologia* 2007; 50: 2348-2355
- 26 Mingrone G. Role of the incretin system in the remission of type 2 diabetes following bariatric surgery. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; 18: 574-579
- 27 高宏凯. 胃转流手术治疗2型糖尿病. *药品评价* 2008; 5: 172-174
- 28 Clements RH, Gonzalez QH, Long CI, Wittert G, Laws HL. Hormonal changes after Roux-en-Y gastric bypass for morbid obesity and the control of type-II diabetes mellitus. *Am Surg* 2004; 70: 1-4; discussion 4-5
- 29 Morínigo R, Moizé V, Musri M, Lacy AM, Navarro S, Marín JL, Delgado S, Casamitjana R, Vidal J. Glucagon-like peptide-1, peptide YY, hunger, and satiety after gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1735-1740
- 30 Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2002; 346: 1623-1630
- 31 Faraj M, Havel PJ, Phélis S, Blank D, Sniderman AD, Cianflone K. Plasma acylation-stimulating protein, adiponectin, leptin, and ghrelin before and after weight loss induced by gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1594-1602

氯吡格雷对人胃黏膜上皮细胞株GES-1增殖作用的影响

孙沂, 樊宏伟, 王书奎, 何帮顺, 张振玉

孙沂, 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

樊宏伟, 南京医科大学附属南京第一医院临床药理科 江苏省南京市 210006

王书奎, 何帮顺, 南京医科大学附属南京第一医院中心实验室 江苏省南京市 210006

孙沂, 在读硕士, 主要从事非甾体类抗炎药和抗血小板药物相关性胃肠道损伤机制和防治的研究。

作者贡献分布: 张振玉与孙沂对此文所作贡献均等; 本研究由张振玉、樊宏伟及孙沂设计; 实验操作由孙沂、王书奎及何帮顺完成; 数据分析由孙沂完成; 论文写作由孙沂、张振玉及樊宏伟完成。

通讯作者: 张振玉, 副教授, 主任医师, 210006, 江苏省南京市, 南京医科大学附属南京第一医院消化科. sunyi1128@126.com
电话: 025-52271261

收稿日期: 2009-11-06 修回日期: 2009-12-28

接受日期: 2009-12-29 在线出版日期: 2010-02-08

Clopidogrel suppresses the proliferation of human gastric epithelial GES-1 cells

Yi Sun, Hong-Wei Fan, Shu-Kui Wang, Bang-Shun He, Zhen-Yu Zhang

Yi Sun, Zhen-Yu Zhang, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Hong-Wei Fan, Department of Clinical Pharmacology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Shu-Kui Wang, Bang-Shun He, Central Laboratory, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Associate Professor Zhen-Yu Zhang, Department of Gastroenterology, Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. sunyi1128@126.com

Received: 2009-11-06 Revised: 2009-12-28

Accepted: 2009-12-29 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of clopidogrel on the proliferation of human gastric epithelial GES-1 cells.

METHODS: GES-1 cells were cultured *in vitro*. After GES-1 cells were incubated with clopidogrel at concentrations of 0.01, 0.1, 0.5 and 1 mmol/L for 24, 48 and 72 h, the reduced proliferation rates of GES-1 cells were examined using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. A dose-response curve was established by plotting the reduced cell proliferation rates against the

concentrations of clopidogrel. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) and safe concentration (IC_{90} , concentration that achieves 90% inhibition) of clopidogrel were calculated using the Bliss method. The morphology changes of GES-1 cells treated with clopidogrel were observed under an inverted phase contrast microscope. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis after GES-1 cells were incubated with clopidogrel for 24 h.

RESULTS: Clopidogrel induced GES-1 cell injury in a concentration-dependent manner ($F = 11.546$, $P = 0.002$), but not in an obvious time-dependent manner ($F = 13.455$, $P = 0.003$). The IC_{50} and IC_{90} of clopidogrel at 24, 48 and 72 h were 0.36 and 0.51, 0.35 and 0.08, and 0.16 and 0.08 mmol/L, respectively. After clopidogrel treatment, the number of adherent cells was reduced, cells became round and suspended, and some cells showed nuclear condensation. Flow cytometry analysis indicated that the apoptosis rates of cells treated with clopidogrel at concentrations of 0, 0.01, 0.1, 0.5 and 1 mmol/L were 4.7%, 5.3%, 14.7%, 51.0% and 60.5%, respectively. The apoptosis rate of GES-1 cells rose with the increase in drug concentration.

CONCLUSION: Clopidogrel can inhibit the proliferation and induce the apoptosis of GES-1 cells in a concentration-dependent manner.

Key Words: Clopidogrel; GES-1 cell; Methyl thiazolyl tetrazolium assay; Apoptosis

Sun Y, Fan HW, Wang SK, He BS, Zhang ZY. Clopidogrel suppresses the proliferation of human gastric epithelial GES-1 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 329-334

摘要

目的: 探讨氯吡格雷(Clopidogrel)对人胃黏膜上皮细胞株GES-1增殖的影响。

方法: 体外培养人胃黏膜上皮细胞株GES-1, 将含不同浓度氯吡格雷(0.01、0.1、0.5和1 mmol/L)的培养液与GES-1细胞共同培养24、

■背景资料

氯吡格雷作为新型噻吩吡啶类药物, 其应用于心脑血管疾病的治疗已逾十年。最近, 随着质子泵抑制剂(PPI)在预防氯吡格雷相关的胃肠道损害中心血管事件发生率和死亡率的升高, 氯吡格雷对胃肠道的损害引起了临床医师的广泛关注。

■同行评议者

李勇, 副教授, 上海中医药大学附属中医医院消化科

■研究前沿

氯吡格雷对人胃肠道黏膜损害的资料报道不多。氯吡格雷是具有独立的损害胃肠道黏膜作用,还是仅影响出血黏膜的修复,目前尚不明确。

48及72 h,采用MTT比色法计算细胞生长抑制率。以药物不同浓度对GES-1细胞生长抑制率作图,得到剂量反应曲线。依据Bliss法,利用SPSS15.0软件求出氯吡格雷的半数抑制浓度 IC_{50} 和安全浓度 IC_{90} (存活率 $\geq 90\%$ 的药物浓度)。倒置相差显微镜观察各浓度组氯吡格雷与GES-1细胞共同培养24 h后细胞形态学变化,用流式细胞术膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素-碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)双染法检测各浓度组氯吡格雷与GES-1细胞共同培养24 h后对细胞凋亡的影响。

结果:氯吡格雷对GES-1细胞的损伤呈浓度依赖性($F = 11.546, P = 0.002$),无时间依赖性($F = 13.455, P = 0.003$)。氯吡格雷作用24 h、48 h和72 h的 IC_{50} 分别为0.36、0.51和0.35 mmol/L, IC_{90} 分别为0.08、0.16和0.08 mmol/L。光镜下可见药物作用后贴壁细胞数量减少,细胞变圆,悬浮,部分细胞核浓缩,细胞损害随药物浓度增加而增大。流式细胞术显示:空白对照组及0.01、0.1、0.5、1 mmol/L氯吡格雷组凋亡率为4.7%、5.3%、14.7%、51.0%、60.5%。随着氯吡格雷药物浓度增加,GES-1细胞的凋亡率亦随之增加。

结论:氯吡格雷可抑制人胃黏膜上皮细胞的增殖,具有剂量依赖性,诱导细胞发生凋亡。

关键词:氯吡格雷; GES-1细胞; MTT法; 凋亡

孙沂, 樊宏伟, 王书奎, 何帮顺, 张振玉. 氯吡格雷对人胃黏膜上皮细胞株GES-1增殖作用的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 329-334

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/329.asp>

0 引言

氯吡格雷作为新型噻吩吡啶类药物,其应用于心脑血管疾病的治疗已逾10年。CAPRIE^[1]和CURE^[2]实验证实,氯吡格雷可显著减少各类缺血事件的发生,效果优于阿司匹林。CURE、PCI-CURE^[3]及CREDO^[4]试验显示,在非ST段抬高的急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)中,阿司匹林和氯吡格雷联合治疗能使血管事件的发生率降低20%,在经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)中降低30%,确定了氯吡格雷在ACS和PCI中的应用价值。近来,在质子泵抑制剂(proton pump inhibitor, PPI)预防氯吡格雷相关的胃肠道损伤中,心血管事件的发生率和死亡率升高^[5-9],氯吡格雷对胃肠道的损伤引起了临床医师的广泛

关注。氯吡格雷是具有独立的损伤胃肠道黏膜作用,还是仅影响出血黏膜的修复,目前尚不明确^[10]。本研究拟采用人胃黏膜上皮细胞株GES-1与氯吡格雷共培养,通过MTT法及流式细胞术研究氯吡格雷对GES-1细胞的损伤作用。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃黏膜上皮细胞株GES-1由江苏省人民医院消化科实验室馈赠。氯吡格雷购自北京诺德恒信化工技术有限公司(批号: NDS0060513),用PBS溶解配成10 mmol/L的母液,调pH值为7.4,用0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}C$ 存放,用时以无血清DMEM稀释成所需浓度。DMEM高糖培养液为美国Hyclone公司生产,新生小牛血清为杭州四季青公司生产,噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)购自美国Sigma公司,Annexin V FITC/PI凋亡检测试剂盒购自美国BD公司。Bio-Rad 680全自动酶标仪为美国Bio-Rad公司产品。Olympus IX51倒置相差显微镜为日本Olympus公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:将GES-1细胞置于细胞培养瓶内,以DMEM为培养液,(含15%小牛血清, pH7.4),置37 $^{\circ}C$, 50 mL/L CO_2 温箱中培养,隔天更换培养液,每3 d按1:3比例传代,实验时取对数生长期细胞。

1.2.2 细胞生长抑制实验:人胃黏膜上皮细胞株GES-1用含15%小牛血清的DMEM培养液常规培养。应用MTT比色法,将处于对数生长期的人胃黏膜上皮细胞以每孔 2×10^5 加入96孔培养板中,每孔200 μL ,培养24 h贴壁后分别加入不同浓度(0.01、0.1、0.5和1 mmol/L)的氯吡格雷,每组设4个复孔。分别连续培养24、48和72 h后,加入5% MTT 10 μL ,继续培养4 h。小心吸出培养液,每孔加入DMSO 100 μL ,室温震荡10 min溶解。同时设不加药物的阴性对照组以及只加DMEM培养液的空白对照组。以490 nm为测定波长,用酶标仪检测吸光度(A值),计算抑制率。抑制率 = (阴性对照孔A值-加药孔A值)/(阴性对照组A值) $\times 100\%$ 。以药物的不同浓度对GES-1细胞生长抑制率作图,可得到剂量反应曲线。根据Bliss法,利用SPSS15.0软件^[11]求出药物的半数抑制浓度 IC_{50} 和安全浓度 IC_{90} 。

1.2.3 倒置相差显微镜观察细胞形态:将含不同浓度氯吡格雷(浓度分别为0、0.01、0.1、0.5和1 mmol/L)的培养液与对数生长期GES-1细胞共

表 1 氯吡格雷作用GES-1细胞后 4_{490nm} 值 ($n=4$, mean $\pm$ SD)

氯吡格雷 浓度(mmol/L)	24 h	48 h	72 h
0	0.725 $\pm$ 0.036	1.506 $\pm$ 0.051	2.115 $\pm$ 0.180
0.01	0.658 $\pm$ 0.030	1.295 $\pm$ 0.084	1.857 $\pm$ 0.186
0.1	0.565 $\pm$ 0.055	1.203 $\pm$ 0.063	1.593 $\pm$ 0.230
0.5	0.261 $\pm$ 0.074	0.672 $\pm$ 0.144	0.717 $\pm$ 0.162
1	0.134 $\pm$ 0.014	0.277 $\pm$ 0.076	0.299 $\pm$ 0.008

同培养24 h后, 在倒置相差显微镜下观察细胞形态学变化。

1.2.4 流式细胞术膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素-碘化丙啶双染法检测药物对GES-1细胞凋亡的影响: 将氯吡格雷(浓度分别为0, 0.01, 0.1, 0.5和1 mmol/L)与对数生长期的GES-1细胞作用24 h后, 0.25%胰酶消化, 2 000 r/min离心5 min, 弃去上清及细胞碎片, 收集细胞悬液; 冷PBS液洗涤两遍, 调整细胞浓度至 1×10^9 cell/L; 加入Annexin V-FITC和PI各5 μ L; 漩涡混匀, 避光室温孵育15 min后立即用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。正常活细胞Annexin V及PI均低染(Annexin V⁻PI⁻), 分布在流式细胞分析图的左下区; 凋亡早期细胞Annexin V高染而PI低染(Annexin V⁺PI⁻), 分布在图的左上区; 凋亡晚期细胞或死亡细胞Annexin V及PI均高染(Annexin V⁺PI⁺), 分布在图的右上区^[12]。

统计学处理 实验数据用mean $\pm$ SD表示, 多组间比较采用One-way ANOVA分析; SPSS15.0软件进行数据处理及分析, $P < 0.05$ 有显著性差异。

2 结果

2.1 不同浓度氯吡格雷对GES-1细胞作用不同时间对细胞的抑制作用 细胞生长抑制试验显示氯吡格雷对GES-1细胞具有损伤作用, 并且具有剂量依赖性, 但未显示有时间依赖性($F_{\text{药物浓度}} = 11.546$, $P = 0.002$; $F_{\text{时间}} = 13.455$, $P = 0.003$, 表1, 图1)。根据Bliss法, 氯吡格雷作用24、48和72 h的 IC_{50} 分别为0.36 mmol/L(95%CI: 0.26-0.46)、0.51 mmol/L(95%CI: 0.30-0.64)和0.35 mmol/L(95%CI: 0.24-0.44); 氯吡格雷作用24、48和72 h的 IC_{90} 分别为0.08 mmol/L(95%CI: 0.03-0.13)、0.16 mmol/L(95%CI: 0.03-0.28)和0.08 mmol/L(95%CI: 0.03-0.13)。

2.2 GES-1细胞损害的光镜检查 对照组GES-1细胞呈长梭形, 均一贴壁生长。不同浓度氯吡格雷

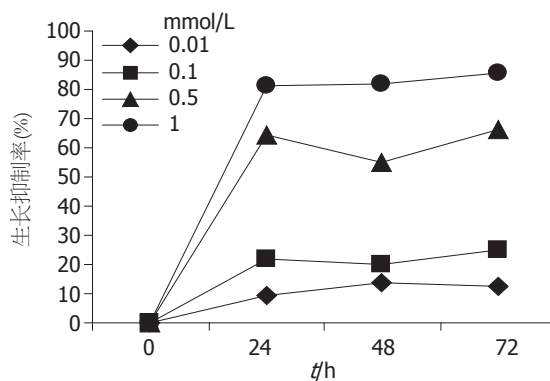


图 1 不同浓度氯吡格雷对GES-1细胞的生长抑制率。

(0.01, 0.1, 0.5和1 mmol/L)作用于GES-1细胞24 h后贴壁细胞数量减少, 细胞变圆, 悬浮, 部分细胞核浓缩, 且随药物浓度增大, 悬浮细胞数量增多(图2)。

2.3 氯吡格雷对GES-1细胞凋亡的影响 流式细胞术显示: 对照组凋亡率为4.7%(早期凋亡率为3.2%, 晚期凋亡率为1.5%); 0.01 mmol/L氯吡格雷组凋亡率为5.3%(早期凋亡率为2.0%, 晚期凋亡率为3.3%); 0.1 mmol/L氯吡格雷组凋亡率为14.7%(早期凋亡率为7.3%, 晚期凋亡率为7.4%); 0.5 mmol/L氯吡格雷组凋亡率为51.0%(早期凋亡率为32.7%, 晚期凋亡率为18.3%); 1 mmol/L氯吡格雷组凋亡率为60.5%(早期凋亡率为33.7%, 晚期凋亡率为26.8%)。随着药物浓度增加, GES-1细胞凋亡率亦随之增加(图3, 4)。

3 讨论

氯吡格雷作为新型抗血小板药物, 具有抗血小板聚集及抗血栓形成作用^[13]。其作用机制为, 通过选择性地与血小板表面腺苷酸环化酶偶联的二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)受体结合, 阻断ADP对腺苷酸环化酶的抑制作用, 促进血管舒张剂刺激磷蛋白(vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP)的磷酸化, 抑制纤维蛋白原与其血小板受体GP II b/IIIa结合而发挥作用^[14]。此外, 氯吡格雷还能阻断ADP释放后引起的血小板活化扩增, 从而抑制其他激动剂诱导的血小板聚集。氯吡格雷对血栓素A2(thromboxane A2, TXA2)、前列环素合成及磷脂酶活性没有影响^[15], 因此氯吡格雷对于有阿司匹林抵抗的患者同样有效。

阿司匹林因抑制前列腺素的生成而导致胃肠道黏膜的损害, 已为临床医师所熟知。但是氯吡格雷对人胃肠道黏膜损害的资料报道不多。氯吡格雷是具有直接的损害胃肠道黏膜作

■ 相关报道

Lanas等的1项临床病例对照研究发现, 使用氯吡格雷75 mg/d者胃肠道出血风险(校正危险比为2.8, 95%CI: 1.9-4.2)与使用阿司匹林100 mg/d者出血风险(校正危险比为2.7, 95%CI: 2.0-3.6)相当。Chan等的1项前瞻性、随机、双盲临床试验显示阿司匹林联合埃索美拉唑组与氯吡格雷组相比, 再发上消化道事件的比率显著降低(0.7% vs 8.6%)。

■创新盘点

本研究从细胞水平证实氯吡格雷对人胃黏膜上皮细胞具有直接损害作用,呈剂量依赖性,诱导细胞发生凋亡。

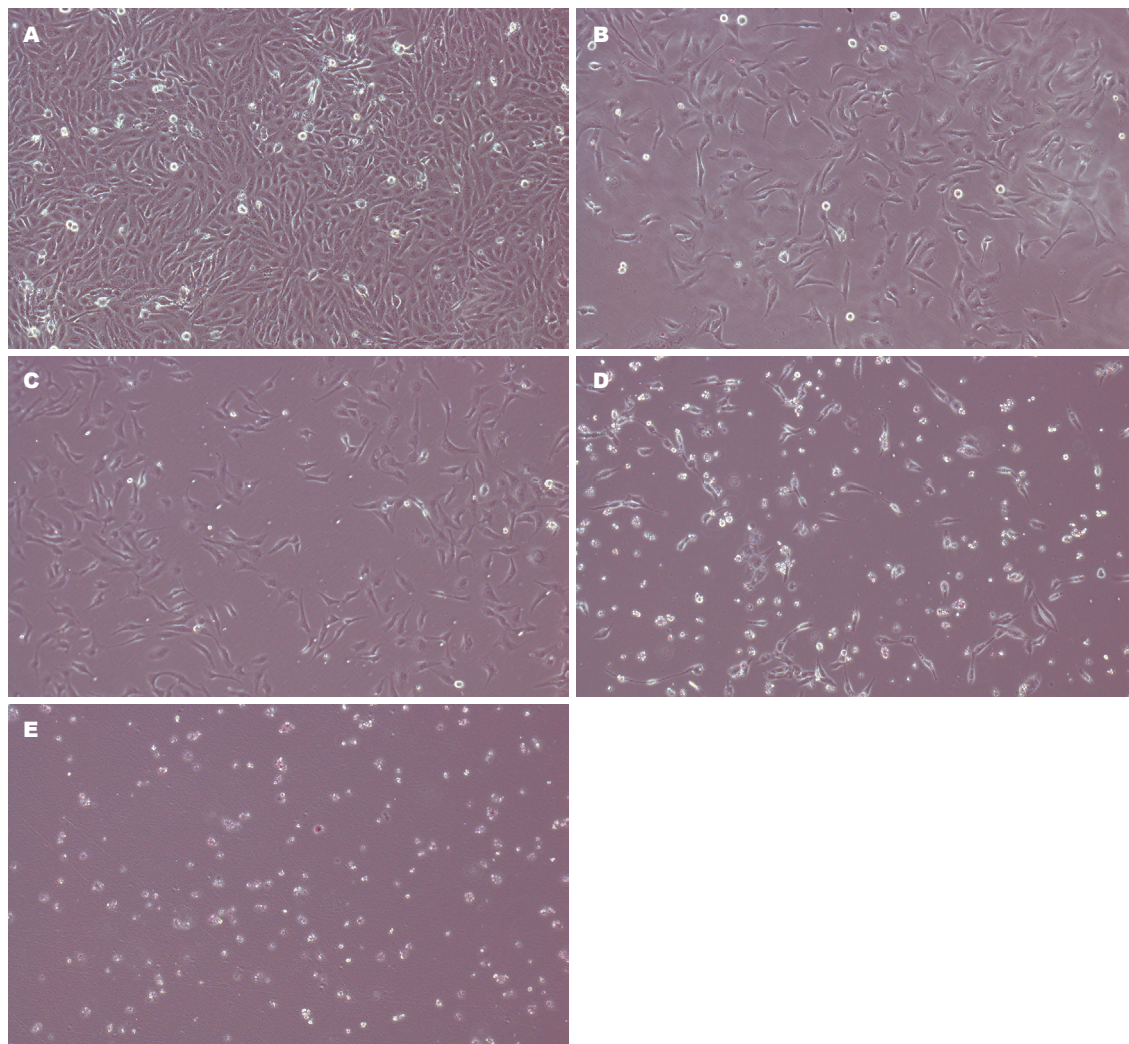


图2 不同浓度氯吡格雷与GES-1细胞作用24 h后倒置相差显微镜下细胞形态($\times 100$)。A: 对照组; B: 0.01 mmol/L组; C: 0.1 mmol/L组; D: 0.5 mmol/L组; E: 1 mmol/L组。

用,还是仅影响损伤黏膜的修复,目前尚不明确。2008年美国心脏学会和美国心脏病学会基金会联合美国胃肠学会共同发布的减少抗血小板药物和非甾体类消炎药物导致胃肠道并发症的专家共识指出^[16],氯吡格雷为ADP受体拮抗剂,可抑制血管内皮生长因子的释放,从而延迟了胃溃疡的修复。氯吡格雷的这种抗血管生长作用可能抑制了胃黏膜糜烂和其他药物或者*H.pylori*感染所致的小溃疡的愈合。在酸存在的情况下,这可能会导致一些较轻的没有临床症状的胃黏膜损害的延迟愈合,甚至加重成为有明显临床症状的溃疡和出血。

本研究从细胞水平研究氯吡格雷对人胃黏膜上皮细胞是否具有直接损害作用。利用MTT比色方法了解氯吡格雷对GES-1细胞的剂量及时间毒性情况。实验结果显示氯吡格雷对GES-1细胞增殖具有明显抑制作用,并且具有剂量依

赖性,但无时间依赖性。目前,国外诸多有关氯吡格雷相关性胃肠道损害的临床病例对照研究^[17-20]中,患者所服氯吡格雷药物剂量通常为75 mg/d。氯吡格雷对上消化系损害的剂量及时间毒性情况,尚需要更多大规模多中心随机对照临床研究,以补充循证医学的证据。 IC_{50} ^[21]是指在用药后存活的细胞数量减少一半时所需的药物浓度。安全浓度 IC_{90} 是指用药后细胞的存活率 $\geq 90\%$ 的药物浓度。根据Bliss创建的加权机率单位法,采用SPSS软件计算得出氯吡格雷作用24、48和72 h的 IC_{50} 分别为0.36、0.51和0.35 mmol/L,此浓度与临床常规负荷给药剂量(300 mg)后血药浓度大致相当。根据氯吡格雷的药代动力学,多次口服氯吡格雷75 mg以后,其羧酸盐衍生物血药浓度约在1 h后达峰(3 mg/L)。由Bliss法求出氯吡格雷作用24、48和72 h安全浓度 IC_{90} 分别为0.08、0.16和0.08 mmol/L,与临床

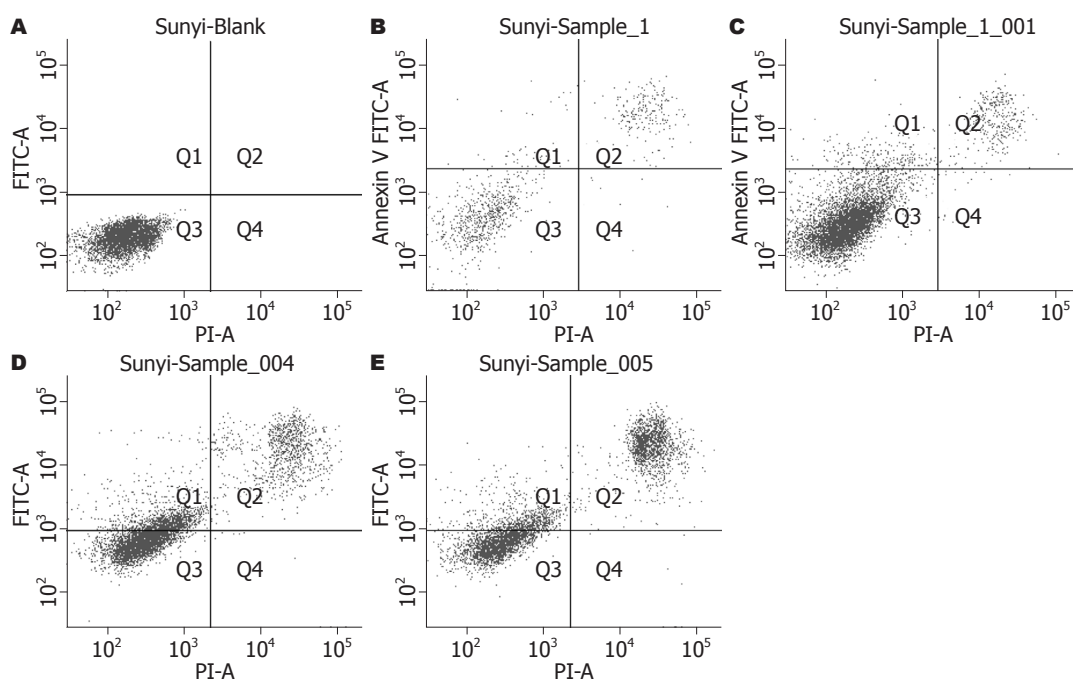


图 3 Annexin V FITC/PI双标记检测不同浓度氯吡格雷与GES-1细胞作用24 h后细胞的凋亡情况. A: 对照组; B: 0.01 mmol/L组; C: 0.1 mmol/L组; D: 0.5 mmol/L组; E: 1 mmol/L组.

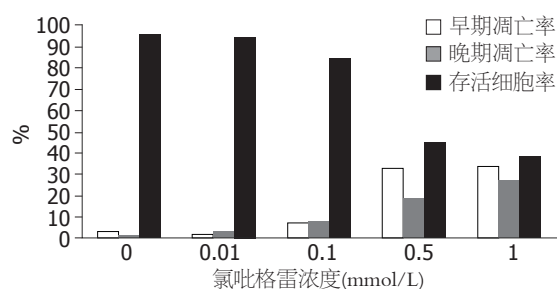


图 4 不同浓度氯吡格雷对GES-1细胞凋亡的影响.

常规口服剂量(75 mg)下的血药浓度相符. 实验从细胞学角度证实氯吡格雷推荐剂量75 mg/d, 绝大多数患者耐受良好, 在达到抗栓疗效的同时, 最大可能地降低出血等副作用风险. 为了研究氯吡格雷对GES-1细胞凋亡的影响, 我们对药物作用后的细胞进行流式细胞仪Annexin V FITC/PI双染法检测. 结果显示随着药物浓度增加, GES-1细胞凋亡率亦随之增加.

本研究证明, 氯吡格雷对人胃黏膜上皮细胞具有直接损害作用, 呈剂量依赖性, 诱导细胞发生凋亡. 因此, 临床医师应提高对氯吡格雷相关性上消化道出血等并发症的认识, 对需要服用氯吡格雷等抗血小板药物的患者, 应首先评估胃肠道损害风险, 且事先预防优于事后补救.

4 参考文献

1 Durand-Zaleski I, Bertrand M. The value of clopidogrel

versus aspirin in reducing atherothrombotic events: the CAPRIE study. *Pharmacoeconomics* 2004; 22 Suppl 4: 19-27

2 Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001; 345: 494-502

3 Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 2001; 358: 527-533

4 Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT 3rd, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002; 288: 2411-2420

5 Ho PM, Maddox TM, Wang L, Fihn SD, Jesse RL, Peterson ED, Rumsfeld JS. Risk of adverse outcomes associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors following acute coronary syndrome. *JAMA* 2009; 301: 937-944

6 Juurlink DN, Gomes T, Ko DT, Szmitko PE, Austin PC, Tu JV, Henry DA, Kopp A, Mamdani MM. A population-based study of the drug interaction between proton pump inhibitors and clopidogrel. *CMAJ* 2009; 180: 713-718

7 Gilard M, Arnaud B, Le Gal G, Abgrall JF, Bosch J. Influence of omeprazol on the antiplatelet action of clopidogrel associated to aspirin. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 2508-2509

8 Fontana P, Senouf D, Mach F. Biological effect of increased maintenance dose of clopidogrel in cardiovascular outpatients and influence of the cytochrome P450 2C19*2 allele on clopidogrel

■应用要点

临床医师应提高对氯吡格雷相关性上消化道出血等并发症的认识, 对需要服用氯吡格雷等抗血小板药物的患者, 应首先评估胃肠道损害风险, 且事先预防优于事后补救.

■同行评价

本文思路清晰, 实验设计合理, 技术手段以及统计学方法使用恰当, 具有一定的科学性.

- responsiveness. *Thromb Res* 2008; 121: 463-468
- 9 Small DS, Farid NA, Payne CD, Weerakkody GJ, Li YG, Brandt JT, Salazar DE, Winters KJ. Effects of the proton pump inhibitor lansoprazole on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of prasugrel and clopidogrel. *J Clin Pharmacol* 2008; 48: 475-484
- 10 孙沂, 樊宏伟, 张振玉. 氯吡格雷对胃肠道的损害及其防治. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1849-1854
- 11 周一平. 用SPSS软件计算新药的LD₅₀. *药学进展* 2003; 27: 314-316
- 12 韩向晖, 陈珺明, 张莉, 王淼, 王磊, 郑培永, 季光. 清肝活血方对酒精性肝损伤大鼠内质网应激反应性凋亡基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 1279-1285
- 13 Cavusoglu E, Cheng J, Bhatt R, Kunamneni PB, Marmur JD, Eng C. Clopidogrel in the management of ischemic heart disease. *Heart Dis* 2003; 5: 144-152
- 14 D'Sa S, Machin SJ. Clopidogrel: a novel antiplatelet agent. *Hosp Med* 1999; 60: 362-363
- 15 Vane JR, Botting RM. The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res* 2003; 110: 255-258
- 16 Bhatt DL, Scheiman J, Abraham NS, Antman EM, Chan FK, Furberg CD, Johnson DA, Mahaffey KW, Quigley EM, Harrington RA, Bates ER, Bridges CR, Eisenberg MJ, Ferrari VA, Hlatky MA, Kaul S, Lindner JR, Moliterno DJ, Mukherjee D, Schofield RS, Rosenson RS, Stein JH, Weitz HH, Wesley DJ. ACCF/ACG/AHA 2008 expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1502-1517
- 17 Lanas A, García-Rodríguez LA, Arroyo MT, Gomollón F, Feu F, González-Pérez A, Zapata E, Bástida G, Rodrigo L, Santolaria S, Güell M, de Argila CM, Quintero E, Borda F, Piqué JM. Risk of upper gastrointestinal ulcer bleeding associated with selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors, traditional non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs, aspirin and combinations. *Gut* 2006; 55: 1731-1738
- 18 Hallas J, Dall M, Andries A, Andersen BS, Aalykke C, Hansen JM, Andersen M, Lassen AT. Use of single and combined antithrombotic therapy and risk of serious upper gastrointestinal bleeding: population based case-control study. *BMJ* 2006; 333: 726
- 19 Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, Leys D, Matias-Guiu J, Rupprecht HJ. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; 364: 331-337
- 20 Bhatt DL, Topol EJ. Clopidogrel added to aspirin versus aspirin alone in secondary prevention and high-risk primary prevention: rationale and design of the Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management, and Avoidance (CHARISMA) trial. *Am Heart J* 2004; 148: 263-268
- 21 R.I. 弗雷谢尼. 动物细胞培养基本技术指南(分子克隆实验指南系列). 第4版. 北京: 科学出版社, 2004: 398-400

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》按时完成2009年度出版任务

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

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

沉默Bmi-1基因表达对胃癌细胞BGC823衰老和转移的作用

高凤兰, 刘春灵, 李维山, 赵国强

高凤兰, 赵国强, 郑州大学基础医学院 河南省郑州市 450001
高凤兰, 刘春灵, 李维山, 漯河医学高等专科学校 河南省漯河市 462002

高凤兰, 郑州大学在读硕士, 教授, 主要从事消化系统肿瘤病理研究。
作者贡献分布: 高凤兰、刘春灵及李维山对此文贡献均等; 此课题由赵国强指导, 高凤兰、刘春灵及李维山设计; 研究过程、论文撰写由高凤兰、刘春灵及李维山共同完成; 赵国强提供实验仪器、试剂及数据分析工具, 指导论文撰写。

通讯作者: 高凤兰, 教授, 462002, 河南省漯河市, 漯河医学高等专科学校病理检验研究中心. lhyzgao@126.com

收稿日期: 2009-11-06 修回日期: 2009-12-06

接受日期: 2009-12-21 在线出版日期: 2010-02-08

ShRNA-mediated silencing of the Bmi-1 gene promotes senescence and inhibits migration in human gastric cancer cell line BGC823

Feng-Lan Gao, Chun-Ling Liu, Wei-Shan Li, Guo-Qiang Zhao

Feng-Lan Gao, Guo-Qiang Zhao, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China

Feng-Lan Gao, Chun-Ling Liu, Wei-Shan Li, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China

Correspondence to: Professor Feng-Lan Gao, Pathological Examination and Research Center, Luohe Medical College, Luohe 462002, Henan Province, China. lhyzgao@126.com

Received: 2009-11-06 Revised: 2009-12-06

Accepted: 2009-12-21 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To investigate the effects of B-cell-specific Moloney murine leukaemia virus insertion site 1 (Bmi-1) gene knock-down on cell senescence and migration in human gastric cancer cell line BGC823.

METHODS: Two pairs of complementary small hairpin RNA (shRNA) oligonucleotides targeting the Bmi-1 gene were devised, synthesized, annealed and cloned into the pRNAT-U6.2 vector. After DNA sequencing to verify the correct insertion of the shRNA sequences, the recombinant plasmids were transfected into BGC823 cells. The expression of Bmi-1 mRNA and protein was examined by reverse transcrip-

tion-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. The effects of Bmi-1 knockdown on cell senescence and migration were determined by β -Gal activity assay and Boyden chamber assay, respectively.

RESULTS: The double-stranded shRNA oligonucleotides targeting the Bmi-1 gene were successfully cloned into the pRNAT-U6.2 vector. DNA sequencing results verified the correct insertion of the shRNA sequences. RT-PCR and Western blot analyses indicated that the expression levels of Bmi-1 mRNA and protein were significantly downregulated in cells transfected with the recombinant plasmids. Particularly, Bmi-1 protein expression was almost completely abolished in cells transfected with the recombinant vector harboring shRNA targeting the sequence GGAGGAGGTGAATGATAAA (nt 1 104-1 122). Compared with untransfected cells and cells transfected with the empty vector, the average percentage of senescent cells increased and the number of cells passing through the Matrigel decreased in cells transfected with the recombinant vectors.

CONCLUSION: ShRNA-mediated silencing of the Bmi-1 gene can effectively promote cell senescence and reduce migration in human gastric cancer cell line BGC823.

Key Words: Bmi-1; siRNA; Gastric cancer; Senescence; Metastasis

Gao FL, Liu CL, Li WS, Zhao GQ. ShRNA-mediated silencing of the Bmi-1 gene promotes senescence and inhibits migration in human gastric cancer cell line BGC823. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 335-339

摘要

目的: 研究靶向Bmi-1 siRNA对胃癌BGC823细胞衰老和转移的作用。

方法: 设计Bmi-1的siRNA靶序列, 分别合成两条互补的寡核苷酸链, 退火后重组入

■背景资料

胃癌的浸润及转移是影响预后的重要因素, 其浸润与转移受多因素与多基因调控。目前, 发现与胃癌发病有关的癌基因主要有c-Myc、Ras、hst、c-erbB-2等。Bmi-1基因可与c-Myc协同对恶性细胞逃逸于凋亡有重要作用, 引起细胞转化和肿瘤形成。

■同行评议者

唐世刚, 教授, 中南大学湘雅三医院内科

■研发前沿

国内外文献报道Bmi-1基因在多种肿瘤中均有表达,且与肿瘤的侵袭、转移密切相关。RNA干扰因其可在胞质中导致同源的mRNA特异性降解从而特异性抑制基因表达已成为人们研究的热点。

pRNAT-U6.2载体,转化扩增后进行序列测定。用脂质体包裹转染人胃癌BGC823细胞,采用RT-PCR和Western blot分别检测Bmi-1基因mRNA和蛋白表达的变化。SA- β -Gal染色检测和细胞体外侵袭实验检测分析对细胞衰老和侵袭、转移的影响。

结果:靶向Bmi-1基因的siRNA的双链寡核苷酸片段克隆入pRNAT-U6.2载体,经测序分析,插入片段正确;RT-PCR和Western blot检测显示,Bmi-1基因的表达水平明显降低,其中以1104-1122 nt(GGAGGAGGTGAATGATAAAA)为靶序列的siRNA沉默作用最佳,Bmi-1 mRNA和蛋白表达几乎完全抑制。转染siRNA组的衰老细胞百分率显著升高、穿透Matrigel的细胞数显著下降,与未转染和转染空载体组比较差异有显著性($P<0.01$)。

结论:抑制胃癌BGC823细胞Bmi-1基因表达,可以增加细胞的衰老和降低细胞侵袭、转移的能力。

关键词: Bmi-1; siRNA; 胃癌; 细胞衰老; 细胞转移

高凤兰, 刘春灵, 李维山, 赵国强. 沉默Bmi-1基因表达对胃癌细胞BGC823衰老和转移的作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 335-339

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/335.asp>

0 引言

原癌基因Bmi-1(B-cell specific moloney leukemia virus insertion site-1, Bmi-1)是多梳基因家族(polycomb group, PcG)家族的一员,属于转录抑制因子,在许多肿瘤中存在Bmi-1基因的高表达^[1-3], Bmi-1高表达提示预后不良^[4,5]。研究表明Bmi-1是通过作用于INK4a/ARF基因位点而影响细胞增殖及衰老的,且Bmi-1基因的表达水平还与肿瘤的侵袭、转移密切相关^[6,7]。黄丽芳等^[8]利用RNA干扰技术抑制Bmi-1在慢性髓性白血病K562细胞中的过表达,从而抑制K562细胞的增殖。因此,本实验拟利用RNA干扰技术,沉默胃癌BGC823细胞Bmi-1基因的表达,观察对胃癌BGC823细胞生长和转移的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 siRNA载体pRNAT-U6.2购自GeneScript公司; *Bgl* II和*Hind* III、T4 DNA连接酶购自Promega公司; Bmi-1抗体(sc-10745)美国Santa Cruz公司; 人胃癌细胞系BGC823购自上海中科院细胞库; RPMI 1640、胎牛血清购自Gibco公

司; 脂质体Lipofectamine™2000, G418, TRIzol试剂、RT-PCR试剂盒购自Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 针对Bmi-1的siRNA靶序列的筛选: 利用Promega siRNA靶序列分析设计系统, 扫描人Bmi-1基因序列(NM_005180), 依据siRNA靶序列设计原则, 经BLAST同源性分析, 最终选择2个确定19个碱基的siRNA靶序列1104-1122 nt(GGAGGAGGTGAATGATAAAA)和1356-1374 nt(GAGAGATGGACTGACAAAT)为靶序列。分别合成2对发卡样DNA寡核苷酸单链(1104F、1104R和1356F、1356R), 两端分别加上*Bam*HI和*Xho*I内切酶残基, 上海生工公司合成。1104F 5'-GATCCGGAGGAGGTGAATGATAAA TTCAAGAGATTTATCATTACCTCCTCC TTTTTC-3'; 1104R 5'-TCGAGAAAAAAGGAGGAGGTGAATGATAAAATCTCTTGAATTTAT CATTACCTCCTCCG-3'; 1356F 5'-GATCCGAGAGATGGACTGACAAATTTCAAGAGAAT TTGTCAGTCCATCTCTCTTTTTC-3'; 1356R 5'-TCGAGAAAAAAGAGAGATGGACTGACA AATTCTCTTGAAATTTGTCAGTCCATCTCTC G-3'。

1.2.2 siRNA载体质量组: 常规方法退火2对发卡样DNA寡核苷酸单链(1104F、1104R和1356F、1356R), 成为双链DNA(si1104和si1356)。然后重组连接, 2×连接反应缓冲液5 μ L, 黏末端线性pRNAT-U6.2载体1 μ L, T4连接酶1 μ L, 退火产物(si1104和si1356)3 μ L, 4 $^{\circ}$ C过夜, 常规操作方法转化感受态细胞DH5 α 。

1.2.3 重组子的筛选鉴定: 随机挑取转化菌用通用引物PRNA-U6.2 FORWARD、PRNA-U6.2 REVERSE PCR扩增法鉴定重组子。取少量菌重悬于50 μ L去离子水中100 $^{\circ}$ C煮沸裂解细菌为模板, PCR扩增体系为5 μ L 10×Buffer, 2 μ L 4×dNTP, PRNA-U6.2 FORWARD和PRNA-U6.2 REVERSE各0.5 μ L, 0.5 μ L Taq DNA聚合酶, 5 μ L模板DNA, 去离子H₂O补足50 μ L。94 $^{\circ}$ C预变性3 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35个反应循环。2%琼脂糖凝胶电泳分析扩增结果。对阳性重组子的插入序列进行DNA序列分析, 得到pRNAT-U6.2-si1104和pRNAT-U6.2-si1356。

1.2.4 脂质体介导siRNA转染BGC823细胞: 转染方法参照Lipofectamine™2000说明书进行。转染选择质粒的终浓度为2 mg/L, 分别转染pRNAT-U6.2-si1104和pRNAT-U6.2-si1356为实验1组和

■相关报道

黄丽芳等利用RNA干扰技术抑制Bmi-1在慢性髓性白血病K562细胞中的过表达,从而抑制K562细胞的增殖,本文利用RNA干扰技术,沉默胃癌BGC823细胞Bmi-1基因的表达,观察分析对胃癌细胞衰老和侵袭、转移的影响,为胃癌治疗寻求新的靶点。

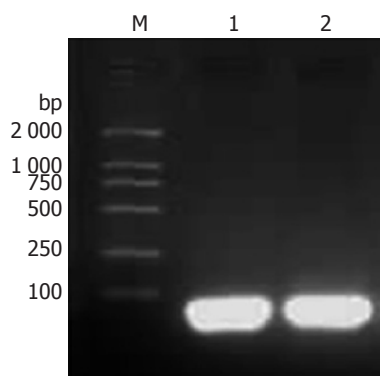


图1 siRNA发卡DNA的退火电泳结果。M: DNA Marker (DL2000); 1: 1104F、1104R发卡样单链DNA退火产物; 2: 1356F、1356R发卡样单链DNA退火产物。

实验2组, 同时转染空pRNAT-U6.2质粒作为空载体对照组, 以未转染的BGC823细胞为空白对照组。转染6 h换用含有800 mg/L G418完全培养基, 筛选培养后进行相关检测。

1.2.5 RT-PCR检测: 按照RT-PCR试剂盒说明书进行操作; Bmi-1引物Forward 5'-GGAGACCAGC AAGTATTGTCC-3'; Reverse 5'-GACCATTCTT CTCCAGGTAT-3', 扩增片段为517 bp; 同时扩增β-actin作为内参照。

1.2.6 免疫印迹: 收集各组细胞, 超声破碎细胞, 测定蛋白的含量, 取适量样品, 进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳; 电转到PVDF膜上用含50 g/L脱脂奶粉4℃封闭6 h; 加入1:200兔抗人(Bmi-1)多克隆抗体, 4℃下孵育过夜; 再用1:2000山羊抗兔IgG二抗, 孵育1 h。化学发光法分别检测PVDF膜上Bmi-1蛋白的表达量。

1.2.7 细胞衰老染色: 将各组转染后的细胞接种6孔板, 24 h细胞贴壁后, 使用美国Cell Biolabs公司细胞衰老β-半乳糖苷酶染色试剂盒, 按照说明书步骤进行染色, 后随机选取5个视野进行拍照(×100), 计数每个视野下衰老细胞百分率。

1.2.8 细胞体外侵袭实验: 采用Boyden Chamber Assay方法, 含有Matrigel(美国BD公司)的无血清1640培养基加到上层小室的滤膜上, 37℃放置2 h使Matrigel形成凝胶备用。下室用无血清培养基培养的NIH3T3细胞的上清液200 μL作为趋化因子。400 μL 1×10⁶/L细胞加入上室。37℃ 50 mL/L CO₂条件下培养24 h。HE染色, 显微镜下(×100)随机计数6个视野滤膜背面的细胞数。每组设5个平行实验。

2 结果

2.1 siRNA发卡DNA的退火结果 1104F、1104R

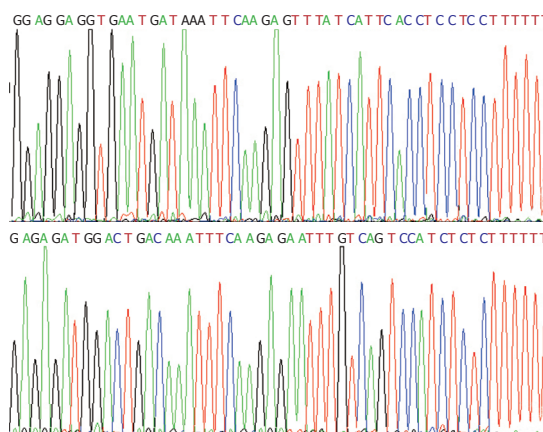


图2 转化菌重组质粒插入序列测序结果。上图为重组质粒pRNAT-U6.2-si1104插入序列测序结果; 下图为重组质粒pRNAT-U6.2-si1356插入序列测序结果; 2个重组质粒的插入序列与对应的设计序列完全一致。

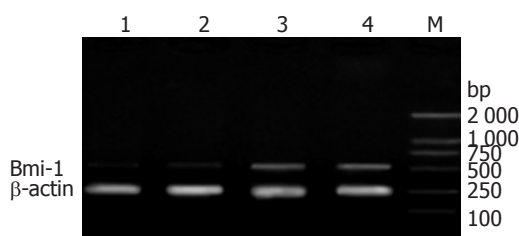


图3 RT-PCR检测细胞中Bmi-1 mRNA表达水平。M: DNA Marker(DL2000); 1: 转染pRNAT-U6.2-si1104的实验1组细胞, 扩增检测Bmi-1 mRNA表达水平; 2: 转染pRNAT-U6.2-si1356的实验2组细胞, 扩增检测Bmi-1 mRNA表达水平; 3: 转染pRNAT-U6.2空载体的空载体对照组细胞, 扩增检测Bmi-1 mRNA表达水平; 4: 未转染的空白对照组细胞, 扩增检测Bmi-1 mRNA表达水平。

和1356F、1356R发卡样寡核苷酸DNA单链退火后, 电泳可见明亮条带, 位于100 bp下, 接近100 bp处, 与设计完全一致, 见图1。

2.2 针对Bmi-1 siRNA载体的鉴定 2个发卡样单链DNA退火产物(si1104和si1356)与pRNAT-U6.2双黏质粒连接后, 转化DH5α, 在Amp+LB平板上培养, 都长出10多个转化菌落。随机各挑选2个克隆, 对插入片段进行DNA序列测定, 均得到与设计一致的阳性重组子(pRNAT-U6.2-si1104和pRNAT-U6.2-si1356)(图2)。

2.3 RT-PCR检测Bmi-1 mRNA的表达 转染pRNAT-U6.2-si1104和pRNAT-U6.2-si1356的实验1、2组胃癌BGC823细胞中Bmi-1 mRNA表达都受到抑制, 其中实验1组的抑制效果优于实验2组; 而两个对照组(空载体组和空白对照组)的细胞中都存在较高水平的Bmi-1 mRNA表达(图3)。

2.4 Bmi-1的表达 未转染的胃癌BGC823细胞和转染空载体pRNAT-U6.2的细胞中Bmi-1蛋白

■创新盘点

本研究成功构建了Bmi-1真核表达质粒, 并转染了人胃癌BGC823细胞, 利用RNA干扰技术, 沉默胃癌BGC823细胞Bmi-1基因的表达, 观察对胃癌BGC823细胞生长和转移的影响, 结果发现抑制胃癌BGC823细胞Bmi-1基因表达, 可以增加细胞的衰老和降低细胞侵袭、转移的能力。

■应用要点

本研究利用RNA干扰技术, 沉默胃癌BGC823细胞Bmi-1基因的表达, 观察分析对胃癌细胞衰老和侵袭、转移的影响, 为胃癌治疗寻求新的靶点。

表 1 细胞衰老染色实验和细胞体外侵袭实验结果 ($n = 5$)

分组	转染质粒	衰老染色实验视野内 平均细胞衰老率(%)	体外侵袭实验 视野内平均细胞数(个)
实验1组	pRNAT-U6.2-si1104	28.3 ± 3.9^b	22.4 ± 4.2^b
实验2组	pRNAT-U6.2-si1356	25.9 ± 4.3^b	33.6 ± 5.5^b
空载体对照组	pRNAT-U6.2	15.6 ± 2.7	74.7 ± 9.3
空白对照组	—	17.2 ± 3.1	68.9 ± 10.1

$^b P < 0.01$ vs 对照组。

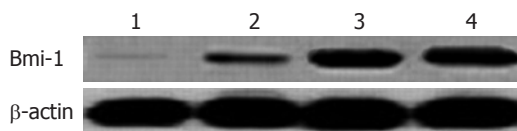


图 4 Western blot检测Bmi-1的表达。1: 转染pRNAT-U6.2-si1104的实验1组; 2: 转染pRNAT-U6.2-si1356的实验2组; 3: 转染pRNAT-U6.2空载体的空载体对照组; 4: 未转染的空白对照组。

呈现高表达; 而转染靶向Bmi-1(pRNAT-U6.2-si1104和pRNAT-U6.2-si1356)的实验组胃癌细胞中, Bmi-1蛋白被显著抑制, 其中转染pRNAT-U6.2-si1104的细胞中Bmi-1蛋白几乎完全抑制(图4)。

2.5 细胞衰老染色实验和细胞体外侵袭实验结果 细胞衰老染色实验和细胞体外侵袭实验数据见表1。转染pRNAT-U6.2-si1104和pRNAT-U6.2-si1356的实验1、2组的平均细胞衰老率, 与2个对照组相比显著增加, 差异有显著性($P < 0.01$); 实验1、2组穿透Matrigel的平均细胞数, 与2个对照组相比显著减少, 差异有显著性($P < 0.01$)。说明抑制胃癌BGC823细胞Bmi-1基因表达, 可以增加细胞的衰老和降低细胞侵袭和转移的能力。

3 讨论

胃癌是消化系常见的恶性肿瘤, 占全球癌症死亡原因的第2位^[9]。胃癌的浸润及转移是影响预后的重要因素。其浸润与转移受多因素与多基因调控。目前, 发现与胃癌发病有关的癌基因主要有c-Myc、Ras、hst、c-erbB-2等^[10]。Bmi-1基因属于PcG成员, 首次被提出是在转基因鼠的淋巴瘤细胞传代中, 可与c-Myc协同作用引起细胞转化和肿瘤形成^[1]。人类Bmi-1基因定位于10p11.23, 由10个外显子组成, cDNA全长3 568 bp, 位于640-1 620 bp的开放阅读框编码一个含326个氨基酸, 相对分子质量45 kDa的核蛋白质。序列同源性对比显示, 人和小鼠的Bmi-1在

DNA水平和氨基酸水平上同源性分别为86%和98%^[7]。Bmi-1蛋白有氨基端环指结构和中心区H-T-H结构域, 这对细胞复制寿命的延长和对抑制p16 INK4a是必须的。Jacobs等^[11]通过小鼠和体外实验证实INK4a/ARF位点是Bmi-1基因的下游调控位点, 直接受Bmi-1的负调控而影响细胞增殖和衰老。在不同启动子的作用下, INK4a编码p16 INK4a与p19ARF两种蛋白。在细胞周期中, 由于cyclinD/CDK4/6复合物的作用, pRB是高度磷酸化的, 使他不能结合并抑制E2F转录因子, 允许E2F靶基因转录, 使细胞由G₁期进入S期, 促进细胞生长和增殖。当Bmi-1高表达时, p16 INK4a表达下调, 促进cyclinD与CDK4/6形成复合物, 通过p16 INK4a/cyclinD/Rb通路, 促进细胞的生长和增殖; Bmi-1高表达还抑制p19ARF, 通过p19ARF/MDM2/P53通路, 阻止细胞周期停滞和细胞凋亡^[7]。肿瘤细胞中Bmi-1基因表达失调间接对pRb和P53的异常调控可能是pRb和P53肿瘤抑制途径频阻的重要原因。国外有研究^[12]表明, Bmi-1基因是一种转录抑制因子, 一旦被激活可高表达于肿瘤细胞中, 其核蛋白产物在INK4a-ARF位点, 即多梳应答元件形成复合物介导相邻基因沉默, 在转录水平来调控细胞的衰老和增殖, 引起一系列的细胞生物学改变。此外, Bmi-1基因可间接激活人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)的活性而永生生化人乳腺上皮细胞^[13], 这可能是Bmi-1基因参与肿瘤形成的另一途径。

有研究提示胃癌组织中Bmi-1存在高表达现象, 并且Bmi-1的表达水平与肿瘤的大小和淋巴结转移有高度的相关性^[4,7]。黄开红等^[14]用RT-PCR方法测定42例胃癌手术切除标本, 结果发现Bmi-1 mRNA表达与胃肿瘤大小、淋巴结转移及浸润深度密切相关($P < 0.05$), 并且, Bmi-1 mRNA阳性表达者生存率明显低于阴性者, Bmi-1的过表达与肿瘤发展及预后密切相关。因此, 本

课题利用RNA干扰技术, 设计了2个针对Bmi-1的siRNA靶序列1 104-1 122 nt和1 356-1 374 nt, 构建出2个重组siRNA载体pRNAT-U6.2-si1104和pRNAT-U6.2-si1356, 转染入胃癌BGC823细胞. RT-PCR和Western blot检测结果显示, 以1 104-1 122 nt(GGAGGAGGTGAATGATAAA)靶序列构建的siRNA载体pRNAT-U6.2-si1104转染的细胞, Bmi-1基因在mRNA和蛋白水平的表达被非常有效的抑制; 细胞衰老染色实验结果显示, 该组细胞的平均细胞衰老率最高 $28.3\% \pm 3.9\%$; 同时体外侵袭实验结果显示, 该组细胞穿透Matrigel的平均细胞数最少 22.4 ± 4.2 . 说明抑制胃癌BGC823细胞Bmi-1基因表达, 可以增加胃癌BGC823细胞的衰老和降低细胞侵袭和转移能力. 本实验结果与文献报道相似, 胃癌的发生与发展受多因素影响、多基因调控, 多步骤逐渐演进的过程, Bmi-1在胃癌的发生发展、浸润侵袭转移过程中起着重要的作用, 通过进一步的深入研究和探索, Bmi-1有望成为胃癌基因治疗的靶点.

4 参考文献

- 1 van Kemenade FJ, Raaphorst FM, Blokzijl T, Fieret E, Hamer KM, Satijn DP, Otte AP, Meijer CJ. Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2001; 97: 3896-3901
- 2 Vonlanthen S, Heighway J, Altermatt HJ, Gugger M, Kappeler A, Borner MM, van Lohuizen M, Betticher DC. The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression. *Br J Cancer* 2001; 84: 1372-1376
- 3 Kim JH, Yoon SY, Kim CN, Joo JH, Moon SK, Choe IS, Choe YK, Kim JW. The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins. *Cancer Lett* 2004; 203: 217-224
- 4 赵晶, 罗祥东, 达春丽, 辛彦. Bmi-1在正常胃组织和胃癌及其癌前病变中的表达及意义. *中国肿瘤临床* 2009; 36: 42-45
- 5 Wang H, Pan K, Zhang HK, Weng DS, Zhou J, Li JJ, Huang W, Song HF, Chen MS, Xia JC. Increased polycomb-group oncogene Bmi-1 expression correlates with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134: 535-541
- 6 Glinsky GV. Stem cell origin of death-from-cancer phenotypes of human prostate and breast cancers. *Stem Cell Rev* 2007; 3: 79-93
- 7 Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest* 2004; 113: 175-179
- 8 黄丽芳, 李君君, 孔卫红, 颜家运. RNA干扰PCGF4 Bmi-1抑制白血病K562细胞系增殖. *陕西医学杂志* 2007; 36: 296-299
- 9 Shah MA, Schwartz GK. Treatment of metastatic esophagus and gastric cancer. *Semin Oncol* 2004; 31: 574-587
- 10 Ketchum LD, Cohen IK, Masters FW. Hypertrophic scars and keloids. A collective review. *Plast Reconstr Surg* 1974; 53: 140-154
- 11 Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, van Lohuizen M. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 1999; 397: 164-168
- 12 Haupt Y, Alexander WS, Barri G, Klinken SP, Adams JM. Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell* 1991; 65: 753-763
- 13 Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ, Keblusek P, Itahana K, Van Lohuizen M, Campisi J, Wazer DE, Band V. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2002; 62: 4736-4745
- 14 黄开红, 刘建化, 李学先, 宋立兵, 曾木圣. Bmi-1基因过度表达与胃癌分化、转移及预后的关系. *南方医科大学学报* 2007; 27: 975-979

■同行评价

本文以siRNA干扰技术, 沉默Bmi-1基因, 从而发现其基因和蛋白表达水平降低, 可以导致胃癌细胞的衰老加速和转移能力下降, 对胃癌的基因治疗和靶点选择提供了实验依据, 实验结果有一定的说服力.

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》栏目设置

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

牡蛎肝宝对大鼠酒精性肝病的抗脂质过氧化作用

张博, 张翠萍, 江月萍, 田字彬, 牛庆慧

■背景资料

酒精是西方国家导致肝病的首要原因, 近年来随着我国经济的发展, 酒精性肝病已经成为我国仅次于乙型肝炎的第二大肝脏疾病, 而且发病率有逐年上升的趋势。进一步研究其相关的发病及防治机制有利于国民的健康事业的发展。

张博, 张翠萍, 江月萍, 田字彬, 牛庆慧, 青岛大学医学院附属医院消化科 山东省青岛市 266003

张博, 在读硕士, 主要从事肝脏疾病的研究。

作者贡献分布: 张翠萍与张博对此文所作贡献均等; 此课题由张翠萍与张博设计; 研究过程由张博与牛庆慧操作完成; 研究所用工具由江月萍与田字彬提供; 数据分析由张博与牛庆慧完成; 论文写作由张翠萍、江月萍及张博完成。

通讯作者: 张翠萍, 教授, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院消化科, jianyulu16@yahoo.com.cn
电话: 0532-82911304

收稿日期: 2009-10-31 修回日期: 2009-12-13

接受日期: 2009-12-21 在线出版日期: 2010-02-08

Anti-lipid peroxidation effects of taurine ganbo in rats with alcoholic liver disease

Bo Zhang, Cui-Ping Zhang, Yue-Ping Jiang, Zi-Bin Tian, Qing-Hui Niu

Bo Zhang, Cui-Ping Zhang, Yue-Ping Jiang, Zi-Bin Tian, Qing-Hui Niu, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Professor Cui-Ping Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. jianyulu16@yahoo.com.cn

Received: 2009-10-31 Revised: 2009-12-13

Accepted: 2009-12-21 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To observe the protective and therapeutic effects and anti-lipid peroxidation effects of taurine ganbo in rats with alcoholic liver disease.

METHODS: A rat model of alcoholic liver disease was established by intragastric infusion of alcohol. Seventy-five male Wistar rats were randomly divided into five groups: normal control group, model group, low-dose taurine ganbo group, middle-dose taurine ganbo group, and high-dose taurine ganbo group. The model group was given dehydrated alcohol (500 mL/L) once a day for 8 weeks. The three taurine ganbo groups were treated as the model group and additionally given taurine ganbo once a day for 8 weeks. The normal control group was given equal volumes of distilled water for the same duration. After treatment, all the rats were

killed. Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), triglyceride (TG), total cholesterol (T-CHO), glucose (GLU), and circulating IgG against malondialdehyde-modified human serum albumin (MDA-HSA) were measured. Hepatic pathological changes were observed.

RESULTS: The levels of serum ALT, AST, TG, T-CHO, and GLU were significantly higher in the model group than in the normal control group, the middle- and high-dose taurine ganbo groups (all $P < 0.0$). The levels of serum ALT, AST and GLU in the low-dose taurine ganbo group were lower than those in the model group ($63.67 \text{ U/L} \pm 6.89 \text{ U/L}$ vs $81.53 \text{ U/L} \pm 22.85 \text{ U/L}$, $131.2 \text{ U/L} \pm 11.63 \text{ U/L}$ vs $156.47 \text{ U/L} \pm 32.23 \text{ U/L}$, and $6.38 \text{ mmol/L} \pm 0.66 \text{ mmol/L}$ vs $6.86 \text{ mmol/L} \pm 0.67 \text{ mmol/L}$, respectively; all $P < 0.01$ or 0.05). The level of circulating IgG against MDA-HSA in the model group was higher than those in the normal control group and the middle- and high-dose taurine ganbo groups (all $P < 0.01$). Compared to the normal control group, the model group had a much heavier lipid accumulation ($P < 0.01$). The hepatic pathological changes were milder in the middle- and high-dose groups than in the model group (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Taurine ganbo can attenuate alcohol-mediated increase in serum ALT, AST, TG and T-CHO levels and exert anti-lipid peroxidation effects in rats with alcoholic liver disease.

Key Words: Taurine ganbo; Alcoholic liver disease; Alcohol; Lipid peroxidation

Zhang B, Zhang CP, Jiang YP, Tian ZB, Niu QH. Anti-lipid peroxidation effects of taurine ganbo in rats with alcoholic liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 340-345

摘要

目的: 观察牡蛎肝宝对大鼠酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)的防治作用及其抗脂质过氧化效应。

■同行评议者

李军祥, 教授, 北京中医药大学附属东方医院消化内科; 范建高, 教授, 上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

方法:采用给予乙醇灌胃制造酒精肝模型的方法,75只♂Wistar大鼠随机均分为空白组、模型组以及牡蛎肝宝低剂量、中剂量、高剂量5组。模型组仅给予500 mL/L的乙醇灌胃8 wk,治疗组给予同等量乙醇灌胃,同时还给分别给予低剂量、中剂量和高剂量牡蛎肝宝8 wk。空白对照组每天仅给予等量蒸馏水灌胃8 wk。治疗结束后,抽取大鼠腹主动脉血液,检测血清ALT、AST、TG、TC、GLU及丙二醛加合物抗体IgG,同时取大鼠肝脏做冰冻切片,用苏丹Ⅲ染色,观察各组脂肪变程度。

结果:空白组及牡蛎肝宝中、高剂量组血清ALT、AST、TG、TC、GLU均明显低于模型组(均 $P<0.01$),牡蛎肝宝中、高剂量组血清丙二醛加合物抗体IgG浓度低于模型组($P<0.01$),牡蛎肝宝低剂量组血清ALT、AST和GLU低于模型组($63.67\text{ U/L}\pm 6.89\text{ U/L}$ vs $81.53\text{ U/L}\pm 22.85\text{ U/L}$, $131.2\text{ U/L}\pm 11.63\text{ U/L}$ vs $156.47\text{ U/L}\pm 32.23\text{ U/L}$, $6.38\text{ mmol/L}\pm 0.66\text{ mmol/L}$ vs $6.86\text{ mmol/L}\pm 0.67\text{ mmol/L}$, $P<0.01$ 或 0.05);模型组肝脏病理改变的程度高于空白对照组($P<0.01$);牡蛎肝宝中、高剂量组肝脏病理改变的程度均低于模型组($P<0.05$)。

结论:牡蛎肝宝可以降低ALD的肝脏脂质蓄积,抗脂质过氧化,有保肝降酶作用。

关键词:牡蛎肝宝;酒精性肝病;乙醇;脂质过氧化

张博,张翠萍,江月萍,田宇彬,牛庆慧.牡蛎肝宝对大鼠酒精性肝病的抗脂质过氧化作用.世界华人消化杂志 2010; 18(4): 340-345
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/340.asp>

0 引言

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是因长期过量饮酒引起的中毒性肝脏疾病,包括酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝硬化等5种类型^[1]。ALD是西方国家导致肝硬化的最主要原因^[2,3],在我国ALD的发病率也逐年上升,酒精已成为继病毒性肝炎后导致肝损害的第二大病因^[4]。酒精所致肝病,除轻微病理改变者外,最常见的是甘油三酯在肝内堆积形成脂肪肝,影响肝脏功能,并可发展为肝硬化。牡蛎肝宝是从海洋生物牡蛎、扇贝、蛤蜊等提炼出的有效生物活性成分,是卫生部审批公布的药食同源名单中的食品,含有丰富动物性糖原、牛磺酸、B族维生素、微量元素锌等,具有广泛的生物学作用,对乙醇所致小鼠肝损伤有一定的防治作用^[5]。

本实验通过建立实验性乙醇肝损伤大鼠动物模型,进一步探讨牡蛎肝宝对ALD的防治作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 75只健康Wistar大鼠,♂,体质量 $232.8\text{ g}\pm 19.9\text{ g}$,购自华中科技大学同济医学院实验动物学部。所需辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠IgG购自北京博奥森生物技术有限公司,其余试剂均购自青岛沃尔森生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及灌胃:参考林红等,采用酒精灌胃方法制造大鼠酒精性肝病模型^[6-9]。75只健康♂Wistar大鼠,按每组15只,随机分为空白组、模型组和3个实验组,即牡蛎肝宝低剂量组、中剂量组、高剂量组,采用灌胃的方法,从小剂量开始,模型组和实验组分别给予500 mL/L的乙醇 $8\text{ mL}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 2 wk、 $10\text{ mL}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 2 wk增加到 $15\text{ mL}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 4 wk,此外实验组还分别给予牡蛎肝宝 $0.04\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 、 $0.13\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 、 $0.40\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 各2 wk、 $0.08\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 、 $0.26\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 、 $0.8\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 各2 wk增加到 $0.12\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 、 $0.4\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 、 $1.2\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 各4 wk(相当于人体推荐剂量的3.3、10、30倍),各组自由饮水与进食,空白对照组每天仅给予模型组体积相当的蒸馏水灌胃。灌胃8 wk,禁食12 h后处死。用0.3%戊巴比妥钠按照 $1\text{ mL}/\text{kg}$ 对大鼠行腹腔注射麻醉,麻醉成功后,从大鼠腹主动脉抽取血液,静置0.5 h,以 $3\ 000\text{ r}/\text{min}$ 离心10 min,吸取上层血清,用 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 离心管分装放置 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 深低温冰箱备用,行血生化检查;同时取大鼠肝脏左叶放 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 深低温冰箱备用,做冰冻切片,用苏丹Ⅲ染色,观察脂肪变性。

1.2.2 指标检测:(1)采用日立7600-210全自动生化分析仪检测各组血清中ALT、AST、TG、T-CHO、GLU的含量;(2)用ELISA法,参考Vidali等对血清中丙二醛蛋白加合物(malondialdehyde-modified human serum albumin, MDA-HSA)抗体浓度进行比较^[10-13]。在酸性条件下水解丙二醛二甲缩醛得到丙二醛(malondialdehyde, MDA)^[14],将其与白蛋白反应,制得MDA-HSA并包被于聚乙烯板上,然后按照ELISA的常规步骤进行封闭、加入血清标本、加入辣根过氧化物酶标记的兔抗大鼠IgG、加入显色液、最后加终止液,用美国BIO-RAD伯乐酶标仪(型号:550)在 450 nm 处检测吸光度值。

■ 研发前沿

对酒精性肝病的研究,目前较多的集中在氧化应激和免疫相关机制方面,而氧化应激可以引起脂质过氧化,引发机体的免疫反应,可以说脂质过氧化在酒精性肝病的发病中起了非常重要的作用,进一步研究脂质过氧化的机制将有助于酒精性肝病的防治。

■相关报道

Zhou等分别用锌在动物实验中治疗酒精性肝病,取得了较好效果,而Wu等则用牛磺酸在大鼠酒精性肝病模型中取得了较好的效果,不排除将来开发出以锌或牛磺酸治疗酒精性肝病的可能。

表 1 各组血清生化值 (mean ± SD, $n = 15$)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)	TG(mmol/L)	T-CHO(mmol/L)	GLU(mmol/L)
空白组	55.20 ± 3.76 ^b	118.13 ± 8.64 ^b	0.55 ± 0.07 ^b	1.16 ± 0.11 ^b	6.28 ± 0.21 ^b
模型组	81.53 ± 22.85	156.47 ± 32.23	1.26 ± 0.44	1.42 ± 0.11	6.86 ± 0.67
低剂量组	63.67 ± 6.89 ^b	131.20 ± 11.63 ^b	1.07 ± 0.36	1.33 ± 0.25	6.38 ± 0.66 ^a
中剂量组	58.40 ± 6.37 ^b	119.20 ± 5.28 ^b	0.90 ± 0.33 ^b	1.20 ± 0.24 ^b	6.36 ± 0.37 ^b
高剂量组	61.87 ± 8.17 ^b	123.60 ± 7.78 ^b	0.79 ± 0.15 ^b	1.21 ± 0.17 ^b	6.29 ± 0.50 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组。

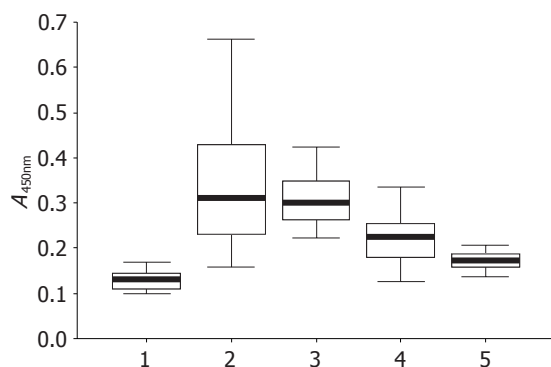


图 1 MDA-HSA抗体IgG吸光度值(A_{450nm})。1: 空白组; 2: 模型组; 3-5: 牡蛎肝宝低、中、高剂量组。

(4) (除了加入显色剂孵育以后不洗涤直接加终止液以外, 其余每一步操作完成后都要用含0.25% Trion-X-100的PBS严格洗涤); (3) 乙醇中毒大鼠肝脏病理组织学变化与评分标准^[5]: 对每张病理切片全面进行观察(不得遗漏任何视野), 观察脂肪滴在肝脏的分布、范围和面积, 并根据病变程度进行量化, 按“- (0分)、+(1分)、++ (2分)、+++ (3分)、++++ (4分)”量化积分。

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件, 对所获得各组生化值数据及用ELISA法所测MDA-HSA抗体IgG吸光度值(mean ± SD)进行One-way ANOVA检验, 对各组肝脏病理脂肪变(各组不同阳性值个数 n)进行Mann-Whitney Test非参数秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差别有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况 实验期间大鼠活动正常, 精神状态、进食以及排便情况未见异常, 75只大鼠进入结果分析。

2.2 大鼠血清GLU、ALT、AST、TG、TC含量的变化 模型组ALT、AST、TG、T-CHO均明显高于空白组($P < 0.01$), GLU高于空白组($P < 0.01$), 说明模型建立成功; 与模型组相比, 牡蛎肝宝

表 2 各组肝脏病理变 ($n = 15$)

分组	病变程度				
	-	+	++	+++	++++
空白组	8	5	2	0	0 ^b
模型组	1	3	5	4	2
低剂量组	1	5	5	3	1
中剂量组	2	7	4	2	0 ^a
高剂量组	2	8	3	2	0 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型组。

低、中、高药物组ALT、AST及高剂量组TG均降低($P < 0.01$), 中、高剂量组T-CHO(均 $P < 0.01$)、GLU(均 $P < 0.01$)及中剂量组TG($P < 0.01$)明显降低, 低剂量组GLU比模型组降低($P < 0.05$, 表1)。

2.3 大鼠血清MDA-HSA抗体浓度 模型组明显高于空白组、中剂量组和高剂量组($P < 0.01$, 图1)。

2.4 肝脏病理变化 与空白组比较, 模型组肝脏出现明显脂肪变($P < 0.01$); 与模型组相比, 牡蛎肝宝中、高剂量组脂肪变均减轻($P < 0.05$, $P < 0.05$, 表2, 图2)。

3 讨论

人体摄入的酒精经胃肠道吸收后, 大部分经肝脏氧化分解, 在代谢过程中, 乙醇被氧化成乙醛, 有10%-20%被肝细胞微粒体乙醇氧化系统(microsomal ethanol oxidizing system, MEOS)催化, 产生大量自由基作用于细胞膜上的不饱和脂肪酸而诱导肝脏脂质过氧化产生MDA^[15,16], 与肝内蛋白反应生成MDA-HSA, 该加合物不需使用佐剂就具有免疫原性, 能诱发外周血T细胞的增殖反应^[17], 引发机体产生针对MDA-HSA的抗体IgG, 抗体可以直接对这些蛋白加合物和载体蛋白发生免疫作用, 从而进一步诱发机体对肝脏的自身免疫反应, MDA还能与乙醛和蛋白反应生成丙二醛-乙醛蛋白

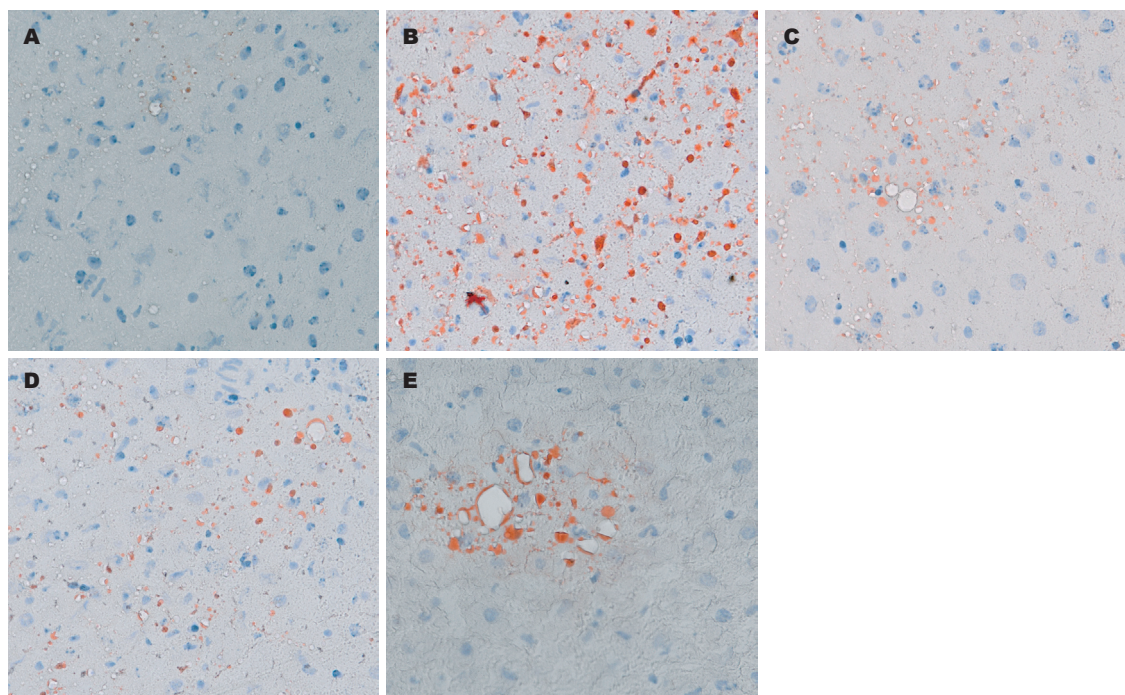


图2 各组大鼠肝组织病理学变化(苏丹Ⅲ染色 $\times 400$, 图中橘黄色为脂肪颗粒). A: 空白组; B: 模型组; C-E: 牡蛎肝宝低、中、高剂量组.

■创新盘点

本文将酒精性肝病转氨酶变化、血脂变化、血糖及针对丙二醛加合物抗体的IgG联合进行检测, 取得了较理想的效果, 但牡蛎肝宝是否对胰岛素抵抗有一定的治疗作用还有待于进一步的研究.

加和物, 导致新的不同的偶合物的形成^[18-25]. 研究提示, 丙二醛加合物抗体IgG和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)浓度的高低影响到疾病的预后, 浓度越高, 肝损伤越严重^[10,12], 同时, 脂质过氧化还可以导致线粒体功能障碍, 影响DNA的功能, 并且能促进肝脏肿瘤基因的激活^[26-28].

正常肝内存在具有保护性的抗氧化反应物, 如谷胱甘肽(GSH)等. 长期饮酒者, 肝细胞内GSH含量明显降低或耗竭, 肝中GSH减少在线粒体最为明显, 从而加剧对线粒体结构和功能的损害, 研究显示^[5], 在给予牡蛎肝宝的小鼠肝脏内GSH的含量明显增加、MDA的含量明显下降. 本实验模型组大鼠血清MDA-HSA抗体IgG浓度明显增高, 这与Vidali等^[10]结果相一致, 而给予牡蛎肝宝组IgG浓度、ALT、AST、TG、T-CHO均较模型组有不同程度降低, TG的降低则可以降低脂肪肝的相关危险^[29], 说明该药具有较好的抗脂质过氧化和保肝功效.

肝脏病理结果也显示, 给予牡蛎肝宝的大鼠肝脏脂肪变明显低于模型组, 说明该药对ALD有较好的降低肝脏脂肪蓄积的作用. 牡蛎肝宝含有天然牛磺酸(含量在4%以上), 以及丰富B族维生素、微量元素锌等, 牛磺酸可以逆

转ALD的脂肪变性和脂质过氧化, 给予牛磺酸可以降低血清AST、TNF- α 等, 增加肝脏总蛋白, 降低肝脏内MDA含量^[30-32], 补充锌可以使肝脏肝细胞核因子-4 α 和过氧化物酶体增生物激活受体- α 的活性得到恢复, 使肝脏脂肪酸氧化和极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)分泌相关基因上调, 增加肝脏游离脂肪酸的氧化和VLDL的分泌, 减轻由酒精引起的肝脏脂类蓄积, 降低脂质过氧化产物MDA的含量, 减少TNF- α 在肝脏的mRNA的水平的升高, 减轻肝脏的炎症反应, 抑制酒精引起的肝细胞凋亡^[33,34].

本实验结果还显示, 模型组血糖高于空白组、牡蛎肝宝中、高剂量组. 酒精摄入可抑制细胞代谢、变型和更新所需的胰岛素反应基因, 降低胰岛素与受体的结合, 导致胰岛素抵抗^[27,35], 给予牡蛎肝宝的药物组血糖则较模型组有不同程度的降低, 但由于尚未检测空腹胰岛素和计算胰岛素抵抗指数, 因此该药是否对ALD的胰岛素抵抗有一定的治疗作用, 仍有待进一步研究.

本实验结果显示, 牡蛎肝宝可以促进酒精代谢, 降低低肝脏脂肪蓄积, 降低脂质过氧化的损害, 能从多个途径保护肝脏, 减轻酒精对肝脏的损害, 对ALD的治疗有一定辅助价值.

■同行评价

本研究设计合理,方法先进,数据准确,分析恰当,学术价值较好。

志谢: 青岛大学医学院附属医院中心实验室对本实验提供的帮助。

4 参考文献

- 1 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊断标准. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 72
- 2 Diehl AM. Liver disease in alcohol abusers: clinical perspective. *Alcohol* 2002; 27: 7-11
- 3 Mann RE, Smart RG, Govoni R. The epidemiology of alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 209-219
- 4 庄辉. 酒精性肝病的流行病学. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 698
- 5 张翠萍, 李英兰, 张民生, 田字彬, 孔心娟. 牡蛎肝宝对乙醇所致小鼠肝损伤的保护作用及其抗脂质过氧化效应. 中国临床康复 2006; 10: 82-84
- 6 林红, 吕淼, 张义侠, 王炳元, 傅宝玉. 酒精性肝病大鼠模型的建立. 世界华人消化杂志 2001; 9: 24-28
- 7 赵初环, 卢中秋, 李惠萍, 吴斌, 李景荣, 胡国新. 大鼠酒精性肝病模型的建立. 浙江临床医学 2007; 9: 435-436
- 8 伏建峰, 史清海, 岳新华, 张东辉. 改进的酒精灌胃法建立大鼠酒精性肝病模型. 解放军预防医学杂志 2006; 24: 336-338
- 9 French SW. Intragastric ethanol infusion model for cellular and molecular studies of alcoholic liver disease. *J Biomed Sci* 2001; 8: 20-27
- 10 Vidali M, Hietala J, Occhino G, Ivaldi A, Sutti S, Niemelä O, Albano E. Immune responses against oxidative stress-derived antigens are associated with increased circulating tumor necrosis factor- α in heavy drinkers. *Free Radic Biol Med* 2008; 45: 306-311
- 11 Xu D, Thiele GM, Beckenhauer JL, Klassen LW, Sorrell MF, Tuma DJ. Detection of circulating antibodies to malondialdehyde-acetaldehyde adducts in ethanol-fed rats. *Gastroenterology* 1998; 115: 686-692
- 12 Rigamonti C, Mottaran E, Reale E, Rolla R, Cipriani V, Capelli F, Boldorini R, Vidali M, Sartori M, Albano E. Moderate alcohol consumption increases oxidative stress in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 42-49
- 13 Rolla R, Vay D, Mottaran E, Parodi M, Traverso N, Aricó S, Sartori M, Bellomo G, Klassen LW, Thiele GM, Tuma DJ, Albano E. Detection of circulating antibodies against malondialdehyde-acetaldehyde adducts in patients with alcohol-induced liver disease. *Hepatology* 2000; 31: 878-884
- 14 Tinahones FJ, Gómez-Zumaquero JM, Garrido-Sánchez L, García-Fuentes E, Rojo-Martínez G, Esteva I, Ruiz de Adana MS, Cardona F, Soriguer F. Influence of age and sex on levels of anti-oxidized LDL antibodies and anti-LDL immune complexes in the general population. *J Lipid Res* 2005; 46: 452-457
- 15 金武丕, 权修权, 孟繁平, 崔香丹, 朴海今. 大鼠酒精性肝病细胞凋亡与细胞色素P4502E1和氧化应激的关系. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2181-2185
- 16 Fernández A, Colell A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Cholesterol and sphingolipids in alcohol-induced liver injury. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23 Suppl 1: S9-S15
- 17 Stewart SF, Vidali M, Day CP, Albano E, Jones DE. Oxidative stress as a trigger for cellular immune responses in patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 2004; 39: 197-203
- 18 Viitala K, Makkonen K, Israel Y, Lehtimäki T, Jaakkola O, Koivula T, Blake JE, Niemelä O. Autoimmune responses against oxidant stress and acetaldehyde-derived epitopes in human alcohol consumers. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24: 1103-1109
- 19 Mottaran E, Stewart SF, Rolla R, Vay D, Cipriani V, Moretti M, Vidali M, Sartori M, Rigamonti C, Day CP, Albano E. Lipid peroxidation contributes to immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 38-45
- 20 Duryee MJ, Klassen LW, Thiele GM. Immunological response in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4938-4946
- 21 Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 303-308
- 22 Tuma DJ, Casey CA. Dangerous byproducts of alcohol breakdown--focus on adducts. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 285-290
- 23 Kharbada KK, Todero SL, Shubert KA, Sorrell MF, Tuma DJ. Malondialdehyde-acetaldehyde-protein adducts increase secretion of chemokines by rat hepatic stellate cells. *Alcohol* 2001; 25: 123-128
- 24 Niemelä O. Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1533-1538
- 25 Thiele GM, Worrall S, Tuma DJ, Klassen LW, Wyatt TA, Nagata N. The chemistry and biological effects of malondialdehyde-acetaldehyde adducts. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 218S-224S
- 26 Yan M, Zhu P, Liu HM, Zhang HT, Liu L. Ethanol induced mitochondria injury and permeability transition pore opening: role of mitochondria in alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2352-2356
- 27 Yao XH, Chen L, Nyomba BL. Adult rats prenatally exposed to ethanol have increased gluconeogenesis and impaired insulin response of hepatic gluconeogenic genes. *J Appl Physiol* 2006; 100: 642-648
- 28 Wang Y, Millonig G, Nair J, Patsenker E, Stickel F, Mueller S, Bartsch H, Seitz HK. Ethanol-induced cytochrome P4502E1 causes carcinogenic etheno-DNA lesions in alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009; 50: 453-461
- 29 向国卿, 孟宪云, 张浩, 台文霞, 孟晓丹, 王炳元. 脂肪肝相关危险因素的评估. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1038-1041
- 30 Wu G, Yang J, Sun C, Luan X, Shi J, Hu J. Effect of taurine on alcoholic liver disease in rats. *Amino Acids* 2009; 36: 457-464
- 31 Kerai MD, Waterfield CJ, Kenyon SH, Asker DS, Timbrell JA. Reversal of ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation by taurine: a study in rats. *Alcohol Alcohol* 1999; 34: 529-541
- 32 Bleich S, Degner D. Reversal of ethanol-induced hepatic steatosis and lipid peroxidation by taurine: a study in rats. *Alcohol Alcohol* 2000; 35: 215
- 33 Kang X, Zhong W, Liu J, Song Z, McClain CJ, Kang YJ, Zhou Z. Zinc supplementation reverses alcohol-induced steatosis in mice through reactivating hepatocyte nuclear factor-4 α and peroxisome proliferator-activated receptor- α . *Hepatology* 2009; 50: 1241-1250
- 34 Zhou Z, Liu J, Song Z, McClain CJ, Kang YJ. Zinc supplementation inhibits hepatic apoptosis in mice

subjected to a long-term ethanol exposure. *Exp Biol Med* (Maywood) 2008; 233: 540-548
 35 de la Monte SM, Yeon JE, Tong M, Longato L,

Chaudhry R, Pang MY, Duan K, Wands JR. Insulin resistance in experimental alcohol-induced liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: e477-e486

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

2008 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	7	41	-0.99	0.043	41	-0.92
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	5432	1	3.71	0.792	6	0.52
G803	肝脏	586	25	-0.49	0.594	11	0.14
G938	国际呼吸杂志	645	22	-0.44	0.294	34	-0.43
G415	国际内分泌代谢杂志	663	20	-0.43	0.379	28	-0.27
G501	临床肝胆病杂志	582	27	-0.50	0.441	22	-0.15
G658	临床荟萃	1709	8	0.48	0.356	32	-0.32
G257	临床内科杂志	875	16	-0.24	0.412	24	-0.21
G855	临床消化病杂志	314	32	-0.73	0.294	34	-0.43
G261	临床心血管病杂志	836	17	-0.28	0.371	29	-0.29
G293	临床血液学杂志	408	31	-0.65	0.329	33	-0.37
G491	岭南心血管病杂志	161	39	-0.86	0.158	40	-0.70
G662	内科急危重症杂志	308	34	-0.73	0.279	36	-0.46
G523	内科理论与实践	34	40	-0.97	0.171	39	-0.67
G746	实用肝脏病杂志	312	33	-0.73	0.562	14	0.08
G190	世界华人消化杂志	2480	6	1.15	0.547	17	0.05
G800	胃肠病学	619	23	-0.46	0.621	10	0.19
G326	胃肠病学和肝病杂志	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.

胞外基质Matrilin-2在肝再生中与大鼠卵圆细胞的关系

陈中, 黄亮, 晏建军, 严以群

■背景资料

近年来, 肝脏胞外基质对卵圆细胞激活和增殖的影响引起了越来越多研究者的关注. 肝脏胞外基质调控卵圆细胞的分化, 支持卵圆细胞的自我更新, 在正常生理状态下抑制其分化, 而在损伤时促进其增殖分化. Matrilin-2是新发现的非胶原型细胞外基质蛋白的新家族成员之一, 目前对其功能的认识还很不明确.

陈中, 黄亮, 晏建军, 严以群, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院肝外一科 上海市 200438

陈中, 主治医师, 主要从事肝脏干细胞的研究.

作者贡献分布: 此课题由陈中与严以群设计; 研究过程由陈中、黄亮及晏建军操作完成; 数据分析及论文写作由陈中完成.

通讯作者: 严以群, 教授, 200438, 上海市长海路228号, 中国人民解放军第二军医大学东方肝胆外科医院肝外一科.

yiqunyan@21cn.com

收稿日期: 2009-10-27 修回日期: 2009-12-13

接受日期: 2009-12-21 在线出版日期: 2010-02-08

Involvement of extracellular matrix protein matrilin-2 in oval cell-mediated rat liver regeneration

Zhong Chen, Liang Huang, Jian-Jun Yan, Yi-Qun Yan

Zhong Chen, Liang Huang, Jian-Jun Yan, Yi-Qun Yan, Department of Hepatic Surgery (Division I), Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China

Correspondence to: Professor Yi-Qun Yan, Department of Hepatic Surgery (Division I), Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China. yiqunyan@21cn.com

Received: 2009-10-27 Revised: 2009-12-13

Accepted: 2009-12-21 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To investigate possible involvement of extracellular matrix (ECM) protein matrilin-2 in oval cell-mediated liver regeneration in rats.

METHODS: A rat model of hepatic oval cell proliferation was established using the modified Soft-Farber protocol. The control group was fed normal saline. On days 2, 4, 6, 9, 12 and 15 after partial hepatectomy (PH), rat liver tissue samples were collected. The dynamic relationship between matrilin-2 protein expression and oval cell distribution during the proliferation and differentiation of oval cells was analyzed using immunohistochemistry and Western blot.

RESULTS: On day 2 after PH, oval cells began to proliferate around the portal area, and matrilin-2 deposition was observed in the hepatic sinusoids in the periportal area. On day 9, proliferating oval cells were present in the hepatic acini, and matrilin-2 upregulation was noted.

On day 12, as oval cells differentiated to form hepatocellular nodules, matrilin-2 was distributed mainly in the periphery of the nodules, and little protein was present in the nodules. The expression level of matrilin-2 protein began to be upregulated on day 2 after PH, and reached the peak on day 9. After day 12, the protein level returned to physiological level.

CONCLUSION: The close relationship between matrilin-2 expression and oval cell distribution suggests a role for the protein in stem cell-fed liver regeneration.

Key Words: Oval cell; Partial hepatectomy; Liver regeneration; Matrilin-2

Chen Z, Huang L, Yan JJ, Yan YQ. Involvement of extracellular matrix protein matrilin-2 in oval cell-mediated rat liver regeneration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 346-349

摘要

目的: 探讨肝脏胞外基质Matrilin-2在肝再生中与卵圆细胞的关系及作用.

方法: 采用改良的Soft-Farber建立大鼠肝脏卵圆细胞增殖模型, 对照组灌喂生理盐水. 分别取术后2、4、6、9、12、15 d大鼠肝组织, 采用免疫组织化学以及Western blot的方法动态观察大鼠卵圆细胞增殖模型中肝脏胞外基质成分Matrilin-2的变化与卵圆细胞的关系.

结果: 肝脏部分切除术(partial hepatectomy, PH)后第2天, 卵圆细胞开始向门静脉周围区域增殖, Matrilin-2主要出现在门静脉周围的肝窦状隙内; 术后第9天, 卵圆细胞进一步向肝实质内增殖, Matrilin-2表达增加; 术后第12天, 随着卵圆细胞分化为小肝细胞结节, 大多数Matrilin-2位于结节周边, 少数出现在结节内. Matrilin-2的含量自肝切除后第2天开始升高, 第9天达到高峰, 第12天后逐步恢复生理水平.

结论: 肝脏胞外基质成分Matrilin-2与卵圆细胞介导的肝脏再生存在紧密联系并发挥重要

■同行评议者

朱亮, 副教授, 大连医科大学生理教研室

的调控作用.

关键词: 卵圆细胞; 肝脏部分切除; 肝再生; Matrilin-2

陈中, 黄亮, 晏建军, 严以群. 胞外基质Matrilin-2在肝再生中与大鼠卵圆细胞的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 346-349
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/346.asp>

0 引言

近年来, 肝脏胞外基质对卵圆细胞激活和增殖的影响引起了越来越多研究者的关注. 肝脏胞外基质调控卵圆细胞的分化, 支持卵圆细胞的自我更新, 在正常生理状态下抑制其分化, 而在损伤时促进其增殖分化. Matrilin-2是新发现的非胶原型细胞外基质蛋白的新家族成员之一, 目前对其功能的认识还很不明确. 但是基于他广泛的组织分布以及对多种组织起到重塑作用, 本研究动态观察卵圆细胞增殖分化过程中, Matrilin-2与卵圆细胞的关系以及对卵圆细胞增殖分化的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠20只, ♂, 体质量120-150 g, 由中国人民解放军第二军医大学动物中心提供. Matrilin-2兔抗人多克隆抗体, 购自武汉华美生物工程有限公司, BCA蛋白定量试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, β -actin购自Santa Cruz公司等.

1.2 方法

1.2.1 大鼠肝卵圆细胞增殖模型的建立: 采用改良的Soft-Farber模型, 将2-乙酰氨基苄(购自Sigma公司)配成1%浓度, 通过胃管按每天15 mg/kg对实验大鼠灌喂连续4 d, 第5天停喂, 在氯胺酮麻醉下行肝脏2/3切除, 切除肝左叶和肝中叶, 第6天继续灌喂, 连续1 wk. 对照组灌喂生理盐水. 分别于术后2、4、6、9、12、15 d断颈处死大鼠, 每个时间点2只. 迅速取肝组织液氮冻存后至-80 °C冰箱保存备用, 剩下肝组织以100 g/L甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 5 μ m连续切片备用.

1.2.2 免疫组织化学染色: 连续石蜡切片经常规脱蜡后, 以3%过氧化氢溶液浸泡10 min后灭活内源性过氧化物酶; 抗原热修复后以正常兔血清封闭, 然后分别加1:150稀释的抗Matrilin-2第一抗体(兔抗人多克隆抗体, 购自武汉华美生物工程有限公司)工作液4 °C过夜; 以PBS代替

第一抗体作为阴性对照. 加生物素标记的兔抗鼠第二抗体(购自Dako公司)室温30 min; 加结合过氧化物酶链霉亲和素37 °C, 45 min; 加新鲜配制的DAB显色, 苏木素复染, 脱水、透明和封片. 显微镜下观察结果.

1.2.3 Western blot检测Matrilin-2在肝组织中的表达: 组织蛋白裂解, 在等量的肝组织各(0.1 g)在液氮中碾磨后加入裂解缓冲液中冰浴30 min, 超声破碎细胞至4 °C恒温离心机内8 000 r/min离心15 min, 取上清, BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量, 分装后-80 °C冻存. 分别取等量蛋白裂解液, 加入上样缓冲液煮沸5 min变性, 经SDS-PAGE凝胶电泳, 电泳后将蛋白转至硝酸纤维素膜上, 50 g/L脱脂奶粉(脱脂奶粉2.5 g溶于50 mL TBST中)封闭12 h, 将膜置于Matrilin-2多抗(用TBST 1:1 000稀释, 内含50 g/L脱脂奶粉和0.02% Na_3N)5 mL盒中, 室温2 h. 将膜置于抗兔二抗5 mL(用TBST 1:2 000稀释, 内含50 g/L脱脂奶粉), 室温1 h. 用ECL显色液A和B各500 μ L混匀后放入膜曝光、显影和定影, X光胶片扫描后在医学图形分析系统上进行分析.

2 结果

2.1 Matrilin-2在大鼠肝卵圆细胞增殖过程中的表达 Matrilin-2在灌喂2-AAF之前的正常大鼠肝脏组织表达于胆管血管周围以及肝窦状隙内. PH后第2天, Matrilin-2主要在门静脉周围的肝窦状隙内放射状分布(图1A). 在卵圆细胞增殖的过程中, Matrilin-2染色在PH后第9天到达顶峰, 随后下降, 包含Matrilin-2的基底膜始终围绕未分化的卵圆细胞(图1B). PH后第12天由卵圆细胞分化的小肝细胞结节内(虚线部分)缺乏Matrilin-2的表达, 结节周围Matrilin-2表达逐渐减少(图1C). 15 d后, 卵圆细胞进一步减少, 小肝细胞与血管之间的联系开始重建, 肝脏结构开始恢复. 在尚未完全形成窦状隙和胞外基质的门静脉周围小肝细胞结节内出现Matrilin-2的表达(图1D).

2.2 肝卵圆细胞活化过程中肝组织内Matrilin-2的表达变化 在正常肝组织中未见Matrilin-2, 肝切除后第2天即可见Matrilin-2表达, 到第9天达到高峰, 第12天后逐步恢复生理水平(图2).

3 讨论

本研究采用2-AAF/PH建立卵圆细胞增殖模型, 运用免疫组织化学以及Western blot的方法动态分析了肝脏胞外基质成分Matrilin-2与卵圆细胞之间的相互关系, 观察了在卵圆细胞介导的肝

■研究前沿

Matrilin-2是由卵圆细胞产生的重要的胞外基质成分, 并且参与由卵圆细胞介导的肝脏再生过程. 胞外基质的重塑可能对于调控卵圆细胞的迁移、增殖、分化以及肝再生过程有重要作用. Matrilin-2在卵圆细胞增殖中的确切作用机制需要进一步研究.

■创新视点

本研究采用2-AAF/PH建立卵圆细胞增殖模型,运用免疫组织化学以及Western blot的方法动态分析了肝细胞外基质成分Matrilin-2与卵圆细胞之间的相互关系,观察了在卵圆细胞介导的肝再生中Matrilin-2的变化。

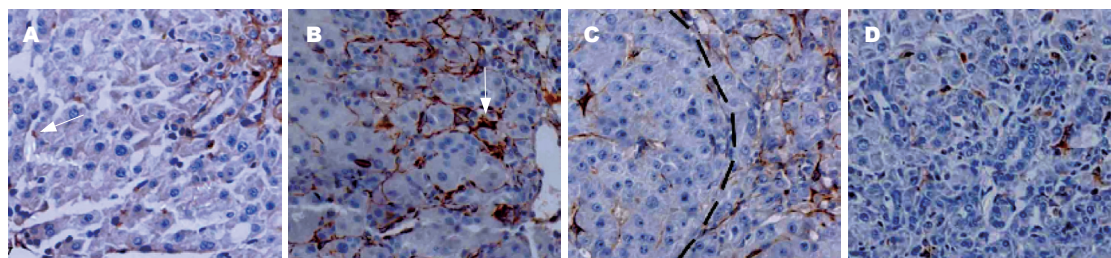


图1 Matrilin-2在大鼠PH后肝卵圆细胞增殖过程中的表达($\times 200$)。A: 第2天; B: 第9天; C: 第12天; D: 第15天。

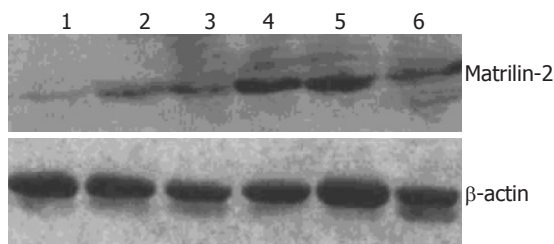


图2 各组大鼠肝组织Matrilin-2水平蛋白印迹图。1: 对照组(正常肝组织); 2-6模型组(2-AAF/PH组: PH后2、4、6、9、12 d, β -actin作为内参照)。

再生中Matrilin-2的变化,研究表明,在卵圆细胞增殖和分化的重建过程中,卵圆细胞与肝细胞外基质成分Matrilin-2具有紧密的解剖学关系。这些结果说明胞外基质的重建对于卵圆细胞介导的肝再生具有重要作用。肝细胞外基质是一个动态的大分子复合物,包括胶原、非胶原结构糖蛋白以及蛋白多糖,在维持肝脏正常结构和细胞的增殖、迁移分化方面具有重要作用^[1]。

Matrilins为近年发现的一个新的细胞外基质蛋白家族,有4个呈现出大致相同结构的家族成员。唯独不同的是,Matrilin-2包含一个位于第2个vWFA域和寡聚反应域之间的片段,和其他任何已知的蛋白序列不具有同源性^[9-31]。已知生物细胞的一个基本特征就是他们与邻近细胞及ECM间有着规律性的相互作用,这种相互间的接触和作用主要通过“ECM-黏附分子-细胞骨架”的介导途径,进行着跨膜联系,并决定着生物细胞的形态。现证实ECM不仅具有连接和支持细胞、组织的作用,而且可以影响细胞形态,调控细胞迁移、增殖、分化、代谢及功能,并与人类胚胎形态发生密切相关。肝脏具有很强的再生能力,但肝细胞的增殖受抑制,而肝脏又有再生需求时,卵圆细胞即活化。2-AAF处理后可以抑制肝细胞DNA合成而抑制增殖,然而卵圆细胞不受抑制,开始活化。基底膜在由卵圆细胞参与的肝脏再生过程中发挥了重要作用,卵圆细胞在成熟肝细胞不能再生形成肝结

节时被激活,而且成熟的肝细胞周围缺乏基底膜,而未分化的卵圆细胞具有完整的基底膜结构,分化为成熟肝细胞后基底膜消失^[2-7]。由于抗基底膜抗体可诱导卵圆细胞快速分化,可以推断基底膜和卵圆细胞之间的这种关系可以阻止细胞分化程序的启动。这对于研究该分子抑制作用机制具有重要意义。层粘连蛋白被证明是由卵圆细胞形成的胆管基底膜重要组成部分。Matrilin-2蛋白表达与层粘连蛋白表达类似^[8],表明Matrilin-2可能也是干细胞起源肝脏再生过程中产生的重要的细胞外基质成分。充分认识基底膜组成对于研究如何启动和抑制的卵圆细胞分化机制具有重要意义。

我们通过免疫组织化学研究结果清楚地表明了Matrilin-2存在于卵圆细胞周围的基底膜区域,Matrilin-2在灌喂2-AAF之前的正常大鼠肝脏组织表达于胆管血管周围以及肝窦状隙内。PH后第2天,Matrilin-2出现在门静脉周围的肝窦状隙内放射状分布,而且随着卵圆细胞的增殖分化,这种蛋白几乎从小叶胆管和肝静脉基底膜消失。同时我们通过Western blot方法比较了不同时段2-AAF/PH组的肝组织总蛋白中Matrilin-2的量,发现肝切除后第2天即可见Matrilin-2表达,到第9天达到高峰,第15天后逐步恢复生理水平。这意味Matrilin-2参与卵圆细胞介导的肝再生。本研究动态观察了胞外基质成分Matrilin-2与卵圆细胞有紧密联系,我们推测其可能在早期肝脏再生阶段提供卵圆细胞增殖必须的生长因子,随着卵圆细胞向肝细胞分化,围绕在卵圆细胞周围的基底膜逐渐减少最后消失,胞外基质成分可能影响卵圆细胞的分化状态,并且影响卵圆细胞的黏附、迁移和增殖。这种不同的生物学特性和潜在的分子机制需要进一步阐明。

总之,本研究结果表明,在卵圆细胞增殖模型中,Matrilin-2是由卵圆细胞产生的重要的胞外基质成分,并且参与由卵圆细胞介导的肝脏

再生过程. 胞外基质的重塑可能对于调控卵圆细胞的迁移、增殖、分化以及肝再生过程有重要作用. Matrilin-2在卵圆细胞增殖中的确切作用机制需要进一步研究.

4 参考文献

- 1 Tarlá MR, Ramalho FS, Ramalho LN, Silva Tde C, Brandão DF, Ferreira J, Silva Ode C, Zucoloto S. A molecular view of liver regeneration. *Acta Cir Bras* 2006; 21 Suppl 1: 58-62
- 2 Deák F, Wagener R, Kiss I, Paulsson M. The matrilins: a novel family of oligomeric extracellular matrix proteins. *Matrix Biol* 1999; 18: 55-64
- 3 Wagener R, Ehlen HW, Ko YP, Kobbe B, Mann HH, Sengle G, Paulsson M. The matrilins--adaptor proteins in the extracellular matrix. *FEBS Lett* 2005; 579: 3323-3329
- 4 Klatt AR, Paulsson M, Wagener R. Expression of matrilins during maturation of mouse skeletal tissues. *Matrix Biol* 2002; 21: 289-296
- 5 Korpos E, Molnár A, Papp P, Kiss I, Orosz L, Deák F. Expression pattern of matrilins and other extracellular matrix proteins characterize distinct stages of cell differentiation during antler development. *Matrix Biol* 2005; 24: 124-135
- 6 Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39: 1477-1487
- 7 Forbes S, Vig P, Poulson R, Thomas H, Alison M. Hepatic stem cells. *J Pathol* 2002; 197: 510-518
- 8 Paku S, Nagy P, Kopper L, Thorgeirsson SS. 2-acetylaminofluorene dose-dependent differentiation of rat oval cells into hepatocytes: confocal and electron microscopic studies. *Hepatology* 2004; 39: 1353-1361
- 9 陈耀凯, 王宇明, 李俊刚, 郎松. 大鼠肝卵圆细胞增殖模型的建立与优化. *中华肝脏病杂志* 2002; 10: 185-188
- 10 Zhang Y, Bai XF, Huang CX. Hepatic stem cells: existence and origin. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 201-204
- 11 Braun KM, Thompson AW, Sandgren EP. Hepatic microenvironment affects oval cell localization in albumin-urokinase-type plasminogen activator transgenic mice. *Am J Pathol* 2003; 162: 195-202
- 12 Vessey CJ, de la Hall PM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology* 2001; 33: 130-141
- 13 Ma X, Qiu DK, Peng YS. Immunohistochemical study of hepatic oval cells in human chronic viral hepatitis. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 238-242
- 14 Piecha D, Wiberg C, Mörgelin M, Reinhardt DP, Deák F, Maurer P, Paulsson M. Matrilin-2 interacts with itself and with other extracellular matrix proteins. *Biochem J* 2002; 367: 715-721
- 15 Frank S, Schulthess T, Landwehr R, Lustig A, Mini T, Jenő P, Engel J, Kammerer RA. Characterization of the matrilin coiled-coil domains reveals seven novel isoforms. *J Biol Chem* 2002; 277: 19071-19079
- 16 Wiberg C, Klatt AR, Wagener R, Paulsson M, Bateman JF, Heinegård D, Mörgelin M. Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J Biol Chem* 2003; 278: 37698-37704
- 17 Whittaker CA, Hynes RO. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 3369-3387
- 18 Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: D192-D196
- 19 Ko YP, Kobbe B, Paulsson M, Wagener R. Zebrafish (Danio rerio) matrilins: shared and divergent characteristics with their mammalian counterparts. *Biochem J* 2005; 386: 367-379
- 20 Ohno S, Murakami K, Tanimoto K, Sugiyama H, Makihiro S, Shibata T, Yoneno K, Kato Y, Tanne K. Immunohistochemical study of matrilin-1 in arthritic articular cartilage of the mandibular condyle. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 237-242
- 21 Pullig O, Weseloh G, Klatt AR, Wagener R, Swoboda B. Matrilin-3 in human articular cartilage: increased expression in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 253-263
- 22 Aszódi A, Bateman JF, Hirsch E, Baranyi M, Hunziker EB, Hauser N, Böse Z, Fässler R. Normal skeletal development of mice lacking matrilin 1: redundant function of matrilins in cartilage? *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7841-7845
- 23 Mátés L, Nicolae C, Mörgelin M, Deák F, Kiss I, Aszódi A. Mice lacking the extracellular matrix adaptor protein matrilin-2 develop without obvious abnormalities. *Matrix Biol* 2004; 23: 195-204
- 24 Ko Y, Kobbe B, Nicolae C, Miosge N, Paulsson M, Wagener R, Aszódi A. Matrilin-3 is dispensable for mouse skeletal growth and development. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 1691-1699
- 25 Huang X, Birk DE, Goetinck PF. Mice lacking matrilin-1 (cartilage matrix protein) have alterations in type II collagen fibrillogenesis and fibril organization. *Dev Dyn* 1999; 216: 434-441
- 26 Makihiro S, Yan W, Ohno S, Kawamoto T, Fujimoto K, Okimura A, Yoshida E, Noshiro M, Hamada T, Kato Y. Enhancement of cell adhesion and spreading by a cartilage-specific noncollagenous protein, cartilage matrix protein (CMP/Matrilin-1), via integrin alpha1beta1. *J Biol Chem* 1999; 274: 11417-11423
- 27 陈耀凯, 王宇明, 李俊刚, 郎松. 大鼠肝卵圆细胞的生物学特征. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 430-433
- 28 Deák F, Piecha D, Bachrati C, Paulsson M, Kiss I. Primary structure and expression of matrilin-2, the closest relative of cartilage matrix protein within the von Willebrand factor type A-like module superfamily. *J Biol Chem* 1997; 272: 9268-9274
- 29 Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* 1995; 9: 1401-1410
- 30 Wagener R, Kobbe B, Paulsson M. Primary structure of matrilin-3, a new member of a family of extracellular matrix proteins related to cartilage matrix protein (matrilin-1) and von Willebrand factor. *FEBS Lett* 1997; 413: 129-134
- 31 Wagener R, Kobbe B, Paulsson M. Matrilin-4, a new member of the matrilin family of extracellular matrix proteins. *FEBS Lett* 1998; 436: 123-127

■同行评价

肝再生过程中, 当肝实质细胞增殖被抑制时, 肝脏微环境对卵圆细胞激活, 是该领域的热点研究之一. 有关非胶原型细胞外基质蛋白 Matrilin-2与卵圆细胞的关系, 相关研究较少, 体现了该研究的创新性. 免疫组织化学和 Western blot的动态观察, 较好地描述了 Matrilin-2与卵圆细胞参与的肝脏再生之间的紧密联系, 有很好的启发意义和科学研究价值.

维药西帕依溃结安在大鼠溃疡性结肠炎模型中对iNOS基因表达的影响

黄静静, 库热西·玉努斯, 贺捷, 倪群, 陈艳, 马文静, 哈木拉提·吾甫尔

■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)被世界卫生组织列为难治病之一, 近年来发病率有明显增加趋势。而新疆维吾尔医药西帕依溃结安在治疗肠道炎症方面疗效确切, 但机制不清。故通过进行药物干预的动物实验研究来探讨该药的作用机制十分必要。

黄静静, 库热西·玉努斯, 新疆医科大学基础医学院生物化学教研室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

贺捷, 新疆医科大学基础医学院机能中心 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

倪群, 陈艳, 马文静, 新疆医科大学厚博学院 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

哈木拉提·吾甫尔, 新疆地方病分子生物学实验室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011

黄静静, 2007新疆医科大学生物化学与分子生物学硕士, 讲师, 主要从事维吾尔医药与分子生物学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30460163

作者贡献分布: 此课题由库热西·玉努斯设计; 研究过程由黄静静、贺捷、倪群、陈艳及马文静共同完成; 哈木拉提·吾甫尔提供维医药的理论指导; 研究所用新试剂及分析工具由库热西·玉努斯提供; 数据分析由黄静静完成; 本论文写作由黄静静与贺捷完成。

通讯作者: 哈木拉提·吾甫尔, 教授, 830011, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆地方病分子生物学实验室, halmurat@263.net
电话: 0991-4366176

收稿日期: 2009-12-01 修回日期: 2009-12-30

接受日期: 2010-01-04 在线出版日期: 2010-02-08

Xipayi Kui Jie'an downregulates iNOS expression in rat ulcerative colitis

Jing-Jing Huang, Kurexi·Yunusi, Jie He, Qun Ni, Yan Chen, Wen-Jing Ma, Hamulati·Wufuer

Jing-Jing Huang, Kurexi·Yunusi, Department of Biochemistry, Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Jie He, Center of Medical Functional Experiment, Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Qun Ni, Yan Chen, Wen-Jing Ma, Houbo College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Hamulati·Wufuer, Xinjiang Laboratory of Molecular Biology of Endemic Diseases, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30460163

Correspondence to: Professor Hamulati·Wufuer, Xinjiang Laboratory of Molecular Biology of Endemic Diseases, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. halmurat@263.net

Received: 2009-12-01 Revised: 2009-12-30

Accepted: 2010-01-04 Published online: 2010-02-08

■同行评议者

许玲, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科

Abstract

AIM: To investigate the effects of Uygur

medicine Xipayi Kui Jie'an on the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene in rat ulcerative colitis and explore possible mechanisms involved.

METHODS: A rat model of ulcerative colitis was established using 2, 4-dinitrochlorobenzene (DNCB) and acetic acid. The UC rats were divided into four groups: normal saline (NS) group and low-, medium- and high-dosage Xipayi Kui Jie'an treatment groups. The expression of iNOS mRNA and protein was detected using semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: No significant differences were noted in the expression levels of iNOS mRNA between the Xipayi Kui Jie'an treatment groups and the NS group. In contrast, the expression level of iNOS protein was down-regulated in the high-dosage Xipayi Kui Jie'an treatment group when compared to the NS group (0.44 ± 0.40 vs 1.00 ± 0.07 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Xipayi Kui Jie'an exerts therapeutic action against UC in rats perhaps by downregulating iNOS expression at the post-transcription level.

Key Words: Xipayi Kui Jie'an; Ulcerative colitis; Inducible nitric oxide synthase

Huang JJ, Yunusi K, He J, Ni Q, Chen Y, Ma WJ, Wufuer H. Xipayi Kui Jie'an downregulates iNOS expression in rat ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 350-354

摘要

目的: 检测维药西帕依溃结安对大鼠溃疡性结肠炎模型中诱导型一氧化氮合酶(iNOS)基因表达的影响, 探讨药物的可能作用机制。

方法: 采用2, 4-二硝基氯苯(DNCB)复合乙酸法构建溃疡性结肠炎大鼠模型, 建立维药西

帕依溃结安大、中、小剂量干预组及生理盐水阴性对照组(NS组), 应用半定量RT-PCR和Western blot方法检测各组中iNOS mRNA和蛋白质的表达水平。

结果: 与NS组相比, 维药西帕依溃结安各干预组iNOS mRNA表达水平无统计学意义, iNOS蛋白表达水平下调, 差异有统计学意义(0.44 ± 0.40 vs 1.00 ± 0.07 , $P < 0.05$)。

结论: 维药西帕依溃结安治疗溃疡性结肠炎可能是通过在转录后水平上调节iNOS的表达而发挥作用。

关键词: 维药西帕依溃结安; 溃疡性结肠炎; 诱导型一氧化氮合酶

黄静静, 库热西·玉努斯, 贺捷, 倪群, 陈艳, 马文静, 哈木拉提·吾甫尔. 维药西帕依溃结安在大鼠溃疡性结肠炎模型中对iNOS基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 350-354
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/350.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)也称慢性非特异性溃疡性结肠炎, 是一种病因不明的慢性肠道炎症, 病变主要累及黏膜层及黏膜下层, 以溃疡、糜烂为主, 多累及直肠和远端结肠。临床上以腹泻、腹痛、黏液脓血便和里急后重等为主要表现。该病病程长, 病情轻重不一, 呈反复发作, 近年来发病率有明显增加趋势^[1,2], 并与结肠癌关系密切, 已被世界卫生组织列为难治病之一。新疆维吾尔医药西帕依溃结安在治疗肠道炎症方面疗效确切^[3], 但其作用机制尚不清楚。我们在前期研究中已应用2, 4-二硝基氯苯(2, 4-dinitrochlorobenzene, DNCB)与乙酸复合法诱导了大鼠溃疡性结肠炎模型, 其症状、结肠黏膜损伤指数(CMDI)评分和组织病理学改变都表明模型建立成功, 同时半定量RT-PCR结果显示模型中炎症相关因子核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的mRNA表达水平均有增高^[4-6], 提示他们可能参与了UC的发生发展, 与众多文献报道相一致^[7-9]。为明确药物作用的分子机制, 本研究在前期研究基础上应用维药西帕依溃结安对溃疡性结肠炎大鼠进行干预, 以iNOS为候选基因, 检测药物对iNOS的mRNA及蛋白质表达水平的影响从而探讨药物的可能作用机制, 为临床治疗提供理论及实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SPF级Wistar大鼠, δ , 体质量200-250 g, 由新疆医科大学实验动物中心提供。RNA提取试剂TRIzol购自Invitrogen公司, 异丙醇、乙醇购自MERCK公司, 氯仿为国产光谱纯, 逆转录试剂盒、PCR试剂盒均购自上海生工生物工程技术服务有限公司, 引物借助Primer 5.0软件设计, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。iNOS一抗和 β -actin一抗均购自Santa Cruz公司, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗为北京中杉金桥公司产品。DNCB、丙酮、乙酸等试剂均为国产分析纯。维药西帕依溃结安由新疆维吾尔医研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 动物处理及分组: 参照文献构建UC模型^[10]: 大鼠先适应性喂养1 wk, 颈背部脱毛, 每天用2%的DNCB丙酮液滴背, 每次5滴, 连用14 d, 于第15天用直径3 mm的导管(导管头端3 cm打孔, 使液体均匀分布于结肠)经肛门插入大鼠结肠内8 cm左右注入0.1%的DNCB乙醇液0.25 mL, 第16天同法灌体积分数为5%的乙酸2 mL, 作用15 s后立即注入生理盐水5 mL冲洗, 以消除乙酸的作用(灌肠前禁食24 h, 自由饮水)。灌肠7 d后按完全随机法将大鼠分为生理盐水阴性对照、维药西帕依溃结安大、中、小剂量干预共4组, 分笼喂养, 开始药物干预, 用直径3 mm的导管经肛门插入大鼠结肠内5-8 cm左右分别注入: 生理盐水2.25 mL/(100 g·d)、维药西帕依溃结安225 mg/(kg·d)、150 mg/(kg·d)、75 mg/(kg·d), 治疗20 d后脱颈椎处死大鼠, 取距肛门5-8 cm的结肠组织, 分别留取RT-PCR和Western blot标本, 液氮冷冻后-80 °C冰箱冻存。

1.2.2 半定量RT-PCR检测iNOS mRNA表达水平: 总RNA的提取采用经典的TRIzol法, 经琼脂糖凝胶电泳、浓度和纯度鉴定后, 取1.0 μ g总RNA以Oligo-(dT)₁₈为引物将mRNA逆转录成cDNA, 反应体系20 μ L, 操作按试剂盒说明书进行。以1 μ L cDNA做模板, 对大鼠iNOS基因进行扩增, PCR反应体系50 μ L, 以 β -actin为内参照, 引物序列: iNOS^[11]上游5'-CCACATCTGGCAGGATGAGA-3', 下游5'-AGGCACAGAACTGAGGGTACA-3', β -actin上游5'-GAGGGAAATCGTGCGTGA-3', 下游5'-CTGGAAGGTGGACAGTGAG-3', 扩增产物长度分别为416 bp和445 bp。PCR反应参数: 94 °C预变性4min; 94 °C变性40 s、56 °C iNOS(61 °C β -actin)复性30 s、72 °C延伸45 s, 循

■ 研发前沿

众多文献表明iNOS参与了溃疡性结肠炎的发生发展甚至癌变过程, 他已成为众多药物研究的靶点。

■ 相关报道

众多研究证实维药西帕依溃结安确实具有很强的抗炎、清除氧自由基、调节免疫、抗血小板聚集、抗菌等作用, 在治疗肠道炎症方面疗效确切。

■应用要点

本文结果提示维药西帕依溃结安对iNOS蛋白有调节作用,提示iNOS可能是维药西帕依溃结安治疗UC的作用靶点,为药物的治疗作用提供了一定的理论依据,并为进一步研究奠定基础。

表 1 各实验组中iNOS mRNA及蛋白的表达 (mean ± SD)

分组	n	iNOS mRNA	iNOS蛋白
NS组	18	0.651 ± 0.383	1.00 ± 0.07
大剂量干预组	21	0.613 ± 0.180	0.44 ± 0.40 ^a
中剂量干预组	19	0.494 ± 0.223	0.56 ± 0.49
小剂量干预组	22	0.867 ± 0.310	0.87 ± 0.36

^aP<0.05 vs NS组。

环35次; 72 °C总延伸7 min. 将PCR产物在含溴化乙锭的2%琼脂糖凝胶上电泳, 采用Bio-Rad凝胶成像仪分析系统根据电泳条带的面积和亮度计算出每个条带的积分光密度. 以待测因子iNOS的光密度对同一标本β-actin(内参照)光密度的比值表示iNOS mRNA的表达水平。

1.2.3 半定量Western blot检测iNOS蛋白表达水平: 将结肠组织标本按1:5质量比例加入细胞裂解液, 冰上匀浆, 裂解后离心, 取上清. 用BCA(bicinchoninic acid)比色法检测样品蛋白浓度后进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(上样60 μg), 电泳结束后将蛋白电转移至NC膜上, 丽春红S染色鉴定, 根据Marker剪下相应的iNOS(130 kDa)和β-actin(43 kDa)蛋白条带, 洗去丽春红, 以50 g/L脱脂奶粉4 °C封闭过夜, 洗膜后分别加入iNOS的兔mAb(1:100)、β-actin的山羊mAb(1:200)4 °C孵育12 h, 洗膜后分别加入结合有HRP标记的抗兔二抗(1:4 000)、抗山羊二抗(1:5 000)4 °C孵育12 h, 洗膜后于暗室中将杂交膜放入已混匀的ECM化学发光剂中, 反应1 min后曝光、显影、定影, 使目的蛋白印迹于X光胶片上. 采用Image Tool凝胶图像分析系统对X光胶片扫描分析, 根据蛋白条带的面积和灰度计算出每个条带的积分光密度. 以每组iNOS表达的面积灰度值对同一标本β-actin(内参照)表达的面积灰度值的比值表示iNOS蛋白表达水平。

统计学处理 数据采用SPSS15.0统计软件处理. 半定量RT-PCR结果: 数据方差齐, 进行完全随机设计资料的方差分析, 采用Dunnett法比较药物干预组与NS阴性对照组间iNOS mRNA的表达差异; 半定量Western blot结果: 数据方差不齐, 经数据变换后仍采用上述方法比较药物干预组与NS阴性对照组间iNOS蛋白的表达差异, 检验标准α=0.05。

2 结果

2.1 iNOS mRNA的表达 与NS组相比, 维药西帕

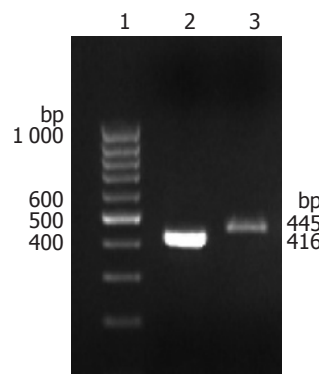


图 1 结肠组织中iNOS mRNA的表达. 1: DNA Marker; 2: iNOS(416 bp); 3: β-actin(445 bp).

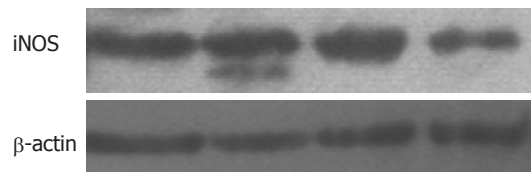


图 2 结肠组织中iNOS、β-actin蛋白的表达。

依溃结安各干预组iNOS mRNA表达差异未显示出统计学意义(图1, 表1)。

2.2 iNOS蛋白的表达 与NS组相比, 维药西帕依溃结安大剂量干预组iNOS蛋白表达水平有下调, 差异有统计学意义(图2, 表1)。

3 讨论

溃疡性结肠炎属炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)中的一种, 其病因和发病机制尚不清楚, 一般认为是由遗传、环境、免疫等因素相互作用而引起的一种以肠道炎症为主要表现的慢性疾病, 其中炎症介质起重要作用^[12], 尤其是炎症前因子与抗炎因子之间的平衡失调被视为溃疡性结肠炎的一个重要发病机制^[13,14]。

维吾尔医学理论认为结肠炎的病变产生是由于浅黄色胆液质所致^[3], 即体液失衡, 这不仅与上述免疫失衡机制相吻合, 而且其治疗UC的药物(维药西帕依溃结安)一方面可调节体液失衡, 另一方面他的主要成分没食子(turkish galls)历来被视为是治疗各种急、慢性炎症的良药. 没食子所含的没食子鞣质和没食子酸具有固涩、收敛、燥湿、止血、消炎、镇痛、抗免疫、抗腹泻等作用, 主要用于大肠虚滑、泻痢不止、习惯性肠炎、便血、牙龈松弛、牙周炎等的治疗^[15]. 众多研究也已证实维药西帕依溃结安确实具有很强的抗炎、清除氧自由基、调节免疫、抗血小板聚集、抗菌等作用^[16,17], 在治疗肠道炎症方面疗效确切^[3]。

NO作为一种新型免疫分子和炎症介质, 同

时也是一种自由基, 具有活泼的生化性质, 在消化、循环、免疫等多系统的生理、病理过程中起重要作用, 是目前研究的热点。他由精氨酸分解产生, 体内催化此反应的一氧化氮合酶(NOS)有四种同工酶: 神经型NOS(nNOS)、内皮型NOS(eNOS)、诱导型NOS(iNOS)和新发现的线粒体型NOS(mtNOS)^[18], 其中与炎症关系密切的是iNOS。iNOS本身是一个静止的基因, 正常情况下不表达, 在免疫反应或炎症时可被一些细胞因子(NF- κ B、IL-1、IFN- γ 、TNF- α)和内毒素(LPS)等激活合成过量的NO, 有促炎、促氧化、促自由基生成、促DNA损伤的作用^[19]。对于肠道组织, NO是近年来发现的重要的气体信号分子和神经递质, 他不仅能通过趋化作用削弱肠黏膜的屏障功能、启动炎症反应, 而且能降低肠道平滑肌的兴奋性, 使肠道内容物在肠道长时间滞留引起肠梗阻、肠炎^[20-22]。同时, 众多研究表明NO与UC的发生、发展、甚至癌变过程密切相关^[23,24]。

鉴于维药西帕依溃结安的抗炎、抗氧化及清除自由基作用与NO的作用相拮抗, 同时由于NO在生物体内含量低、半衰期极短, 他的结构也不稳定, 很难准确测定其含量, 所以本研究将维药与动物模型相结合, 通过检测药物对iNOS mRNA和蛋白表达水平的影响反映药物对NO合成的影响, 探讨药物的可能作用机制。研究结果显示维药西帕依溃结安大剂量干预组与NS组相比iNOS蛋白表达水平有下调, 差异有统计学意义(0.44 ± 0.40 vs 1.00 ± 0.07 , $P < 0.05$)。提示维药西帕依溃结安治疗溃疡性结肠炎可能是通过在转录后水平上调iNOS的表达发挥作用的。

与溃疡性结肠炎相关的炎症因子、炎症介质有很多种, 他们之间存在着错综复杂的关系, 许多细胞因子在调节NO合成的同时其本身的分泌又受NO水平的调节^[25,26]。我们正在以与UC密切相关的因子为靶点进行研究^[27], 期望为阐明维药西帕依溃结安治疗溃疡性结肠炎的作用机制奠定基础。

4 参考文献

- 1 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-161
- 2 欧阳钦, 梁红亮. 溃疡性结肠炎. 继续医学教育 2006; 20: 30-34
- 3 哈木拉提·吾甫尔, 阿不都热依木·卡地尔. 维吾尔医药及其他传统医学研究与应用. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 2003: 39-40
- 4 贺捷, 阿孜古力·克热木, 勾小玉, 苟萍, 库热西·玉

- 努斯. 维药西帕依溃结安对大鼠溃疡性结肠炎的实验研究. *新疆医科大学学报* 2008; 31: 1651-1654
- 5 黄国虹, 黄静静, 哈木拉提·吾甫尔, 贺捷, 陈蓉, 库热西·玉努斯. 大鼠溃疡性结肠炎组织中c-fos与iNOS mRNA的表达. *新疆医科大学学报* 2007; 30: 938-941
- 6 郭霞, 吴桂霞, 哈木拉提·吾甫尔, 黄国虹, 武贵臻, 库热西·玉努斯. 大鼠溃疡性结肠炎实验模型中核因子- κ Bp65、COX-2的表达研究. *新疆医科大学学报* 2007; 30: 921-924
- 7 Menchén L, Colón AL, Madrigal JL, Beltrán L, Botella S, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Menchén P, Cos E, Lorenzo P. Activity of inducible and neuronal nitric oxide synthases in colonic mucosa predicts progression of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1756-1764
- 8 Karban AS, Okazaki T, Panhuysen CI, Gallegos T, Potter JJ, Bailey-Wilson JE, Silverberg MS, Duerr RH, Cho JH, Gregersen PK, Wu Y, Achkar JP, Dassopoulos T, Mezey E, Bayless TM, Novet FJ, Brant SR. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 35-45
- 9 刘慧荣, 施达仁, 吴焕淦, 钟芸诗, 李双. 隔药灸对溃疡性结肠炎患者结肠黏膜COX-2 TNF- α 表达的影响. *中医药学刊* 2005; 23: 989-992
- 10 江学良, 权启镇, 王东, 孙自勤, 王要军. 复合法建立大鼠溃疡性结肠炎模型及其免疫和超微结构变化. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 381
- 11 周国庆, 陈光辉, 张隽, 周孝达. 帕金森病大鼠模型诱导型一氧化氮合酶基因表达的研究. *医学研究生学报* 2000; 13: 224-227
- 12 Dong WG, Liu SP, Yu BP, Wu DF, Luo HS, Yu JP. Ameliorative effects of sodium ferulate on experimental colitis and their mechanisms in rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2533-2538
- 13 Xia B, Crusius J, Meuwissen S, Peza A. Inflammatory bowel disease: definition, epidemiology, etiologic aspects, and immunogenetic studies. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 446-458
- 14 Anand AC, Adya CM. Cytokines and inflammatory bowel disease. *Trop Gastroenterol* 1999; 20: 97-106
- 15 江苏新医学院. 中药大词典. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 1169
- 16 张芳艳, 毛新民, 哈木拉提·吾甫尔, 白丽, 易民, 张锋. 肝郁脾虚型溃疡性结肠炎大鼠的免疫学研究. *新疆医科大学学报* 2004; 27: 367-369
- 17 武鸿莉, 毛新民, 张芳艳, 哈木拉提·吾甫尔. 溃结安对兔及溃疡性结肠炎模型大鼠血小板聚集的影响. *新疆医科大学学报* 2005; 28: 28-30
- 18 Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345: 41-52
- 19 Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004; 75: 639-653
- 20 周燕红, 何小飞, 白育庭, 高卉. 银杏叶提取物对大鼠实验性结肠炎肿瘤坏死因子- α 表达的影响. *中国药理学通报* 2007; 23: 1605-1609
- 21 Dufour JF, Turner TJ, Arias IM. Nitric oxide blocks bile canalicular contraction by inhibiting inositol trisphosphate-dependent calcium mobilization. *Gastroenterology* 1995; 108: 841-849
- 22 汪长东, 胡还忠, 刘子龙, 马立群, 田秦, 余承高, 王晓敏. 一氧化氮抑制大鼠空肠平滑肌收缩. *胃肠病学和肝病杂志* 2004; 13: 588-591
- 23 Siegert A, Rosenberg C, Schmitt WD, Denkert C, Hauptmann S. Nitric oxide of human colorectal adenocarcinoma cell lines promotes tumour cell invasion. *Br J Cancer* 2002; 86: 1310-1315
- 24 Jaiswal M, LaRusso NF, Gores GJ. Nitric oxide

■同行评价

本研究立题明确, 实验方法可行, 结论可信, 文章有可读性, 有参考价值。希望在今后的研究中进一步阐明iNOS基因在mRNA水平与蛋白水平表达不同的原因。

- in gastrointestinal epithelial cell carcinogenesis: linking inflammation to oncogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G626-G634
- 25 章朋, 张琳珊. 细胞因子和一氧化氮在溃疡性结肠炎发病中的作用. *现代康复* 2000; 4: 46-47
- 26 Pérez-Sala D, Lamas S. Regulation of cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide in cells. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 231-248
- 27 勾晓玉, 库热西·玉努斯, 黄静静, 黄国虹, 杨梅, 哈木拉提·吾甫尔. 维药西帕依溃结安对大鼠溃疡性结肠炎模型COX-2表达的影响. *第四军医大学学报* 2009; 30: 501-504

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》出版流程

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

肿瘤-睾丸抗原MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA在胃肠间质瘤中的表达

赖斌, 朱培谦, 朱胜昌, 罗洪亮

赖斌, 朱培谦, 罗洪亮, 南昌大学第二附属医院胃肠外科 江西省南昌市 330006

朱胜昌, 宜春市人民医院普外科 江西省宜春市 336000

赖斌, 南昌大学医学院硕士, 主要从事胃肠外科基础与临床研究。
作者贡献分布: 赖斌与朱培谦对此文所作贡献均等; 此课题在朱培谦指导下由赖斌设计; 实验过程由赖斌与罗洪亮共同完成; 数据分析由赖斌、罗洪亮及朱胜昌完成; 本文撰写由赖斌与朱培谦完成。

通讯作者: 朱培谦, 教授, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院胃肠外科。zhupeiqlan@163.com

电话: 0791-6298907

收稿日期: 2009-11-25 修回日期: 2009-12-27

接受日期: 2009-12-29 在线出版日期: 2010-02-08

Clinical implications of expression of MAGE-1 and NY-ESO-1 mRNAs in gastrointestinal stromal tumors

Bin Lai, Pei-Qian Zhu, Sheng-Chang Zhu, Hong-Liang Luo

Bin Lai, Pei-Qian Zhu, Hong-Liang Luo, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital to Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Sheng-Chang Zhu, Department of General Surgery, the People's Hospital of Yichun City, Yichun 336000, Jiangxi Province, China

Correspondence to: Professor Pei-Qian Zhu, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital to Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. zhupeiqlan@163.com

Received: 2009-11-25 Revised: 2009-12-27

Accepted: 2009-12-29 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To evaluate the possibility of using melanoma antigen-1 (MAGE-1) and New York-esophageal-1 (NY-ESO-1) antigens as specific targets for immunotherapy of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) and using MAGE-1 and NY-ESO-1 mRNA levels as auxiliary parameters for risk classification of GISTs.

METHODS: The expression of MAGE-1 and NY-ESO-1 mRNAs was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in 30 GIST tissue specimens. The cor-

relation of MAGE-1 and NY-ESO-1 mRNA expression with pathological parameters was analyzed in GISTs.

RESULTS: The positive rates of MAGE-1 and NY-ESO-1 mRNA expression in GIST specimens were 30% and 47%, respectively. At least one of these two cancer-testis antigens (CTAs) was detected in 18 GIST tissue specimens. The expression of MAGE-1 and NY-ESO-1 mRNAs was not correlated with age, sex or pathologic type ($P > 0.05$), but correlated with tumor site, tumor diameter and risk grade (all $P < 0.05$). The expression levels of MAGE-1 and NY-ESO-1 mRNAs in GISTs of high risk grade were significantly higher than those in GISTs of low risk grade ($P < 0.05$). No negative correlation was noted between the expression of MAGE-1 and NY-ESO-1 mRNAs in GISTs ($r = 0.018$, $P > 0.05$).

CONCLUSION: MAGE-1 and NY-ESO-1 mRNAs are expressed specifically in GIST tissue and may be potentially promising targets for antigen-specific immunotherapy of GISTs. The expression of MAGE-1 and NY-ESO-1 mRNAs is correlated with the risk grade of GISTs. MAGE-1 and NY-ESO-1 mRNA levels are promising auxiliary parameters for risk classification of GISTs.

Key Words: Gastrointestinal stromal tumors; Cancer-testis antigen; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Melanoma antigen-1; New York-esophageal-1

Lai B, Zhu PQ, Zhu SC, Luo HL. Clinical implications of expression of MAGE-1 and NY-ESO-1 mRNAs in gastrointestinal stromal tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 355-360

摘要

目的: 探讨肿瘤-睾丸抗原(CTA)MAGE-1和NY-ESO-1作为胃肠间质瘤(GISTs)免疫治疗特异性靶点及MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA作为辅助GISTs危险度分级指标的可能性, 及其

■背景资料

近年来许多研究表明, 肿瘤睾丸抗原基因编码的肿瘤相关抗原在多种肿瘤中均有较高的表达, 同时在除睾丸和胎盘外的正常组织中不表达, 是特异性免疫治疗的理想靶分子, 因此肿瘤睾丸抗原已成为多肽疫苗研发的最有希望的一类抗原。

■同行评议者

田晓峰, 教授, 大连医科大学附属第二医院普通外科; 李淑德, 主任医师, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

■ 研发前沿

肿瘤-睾丸抗原在多种恶性肿瘤中的表达情况,国内外有大量文献报道,但在胃肠道间质瘤中的表达,国内外报道罕见。

与GISTs生物学行为的关系。

方法:采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术,检测30例GISTs中MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA的表达,并取正常胃肠道组织作为阴性对照组,同时分析MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA表达与病理特征的关系。

结果:正常对照组中无阳性表达,30例GISTs中,18例至少表达一种CTA, MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA在GISTs中的表达率分别为30%和47%。MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA表达与患者年龄、性别和病理类型无关,而与肿瘤生长部位、肿瘤大小及危险度分级有关($P<0.05$)。MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA在低危、中危、高危三个组中表达量随着危险度分级的升高而增高,三组间差异有统计学意义($P<0.05$)。MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA在GISTs中的表达不存在相关性($r = 0.018$, $P>0.05$)。

结论:MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA在GISTs中的高特异性表达,其抗原有望成为GISTs免疫治疗特异性的靶点;MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA表达与GISTs危险度分级有关, MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA有望成为辅助GISTs危险度分级的诊断指标。

关键词:胃肠道间质瘤;肿瘤-睾丸抗原;逆转录-聚合酶链反应;MAGE-1;NY-ESO-1

赖斌, 朱培谦, 朱胜昌, 罗洪亮. 肿瘤-睾丸抗原MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA在胃肠间质瘤中的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 355-360

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/355.asp>

0 引言

胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GISTs)是一种具有恶性潜能,同时也是消化系统最常见的间叶源性肿瘤。近年研究发现, GISTs可能起源于胃肠道Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal, ICC)或胃肠道ICC与平滑肌细胞共同起源的原始细胞,其特征性改变是原癌基因*c-kit*功能获得性改变和蛋白产物CD117的表达^[1,2]。肿瘤-睾丸抗原(cancer-testis antigen, CTA)在多种肿瘤组织中表达,但在正常组织中表达仅限制于睾丸和胎盘组织^[3]。由于CTA这种与肿瘤相关的特异性表达方式,使其成为特异性免疫治疗的理想靶分子。CTA在GISTs中的表达情况,国内尚未见文献报道。我们应用RT-PCR法检测CTA在

GISTs中的表达,旨在为GISTs的特异性免疫治疗提供分子理论依据,并探讨其作为辅助GISTs危险度分级指标的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-2009年南昌大学第二附属医院胃肠外科提供的资料完整、诊断明确的GISTs新鲜肿瘤标本30例,其中男17例,女13例,发病年龄31-78(平均 55.7 ± 3.6)岁;胃间质瘤18例,肠间质瘤12例;梭形细胞型19例,上皮细胞型7例,混合细胞型4例;按肿瘤最大径可分为 <5.0 cm组6例, $5.0-10.0$ cm组10例, >10.0 cm组14例;按NIH推荐的Fletcher分级标准^[4]分为低危组6例,中危组10例,高危组14例。所有患者均经手术切除治疗,且术前均未接受化疗和放疗。同时收取正常胃肠道组织作为阴性对照组,收取南昌大学第二附属医院泌尿外科提供的睾丸组织作为阳性对照组。引物由江西省南昌东湖生物公司设计并合成, TRIzol及RT-PCR试剂盒购于Fermentas公司。

1.2 方法 总RNA提取按照TRIzol试剂说明书的操作步骤进行, RNA提取后均经电泳鉴定。逆转录步骤按试剂盒进行,合成cDNA后以内参照 β -actin进行PCR反应。PCR反应条件及引物序列见表1。PCR产物全部加入10 g/L低熔点琼脂糖凝胶进行电泳检测。利用Bandleader 3.0软件分析PCR产物条带密度。基因表达值以(目的基因密度值/ β -actin基因密度值) $\times 100\%$ 表示,进行半定量数据分析处理。

统计学处理 所有数据采用SPSS13.0统计软件进行统计分析。计量资料以 $\text{mean} \pm \text{SD}$, 采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA在GISTs组织中的表达 正常对照组中无阳性表达,阳性率为0%(0/20),30例GISTs中,18例至少表达一种CTA,阳性表达率为60%(18/30),两者具有显著性差异($P<0.01$),说明MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA在GISTs组织中高度表达。其中MAGE-1 mRNA阳性表达率为30%(10/30),与正常对照组有显著差异($P<0.01$), NY-ESO-1 mRNA阳性表达率为47%(14/30),与正常对照组有显著差异($P<0.01$)。

2.2 MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA的表达与GISTs病理特征的关系 MAGE-1 mRNA表达与性别、年龄和病理类型无关($P>0.05$,表2)。与肿瘤生长

表 1 CTA基因扩增引物序列及PCR反应条件

基因	引物序列3'-5'	PCR反应条件						循环 产物(bp)	
		T(°C)	t(min)	T(°C)	t(min)	T(°C)	t(min)		
NY-ESO-1	CAGGGCTGAATGGATGCTGCAGA GCGCCTCTGCCCTGAGGGAGG	94	1	60	1	72	1	35	332
MAGE-1	CTGTTCTGTATCCTCACC GACTCACACTACCTCCAC	94	1	72	1	72	2	35	171
β-actin	GGTACGGGTGTAGTGCGGGACCACGGACC CTGAAGCTCGTTCTCTACCGGTGC	94	1	56	1	72	1	24	580

■ 相关报道

Perez等在2008年首次报道了肿瘤-睾丸抗原在胃肠道间质瘤中的表达情况, 并指出肿瘤-睾丸抗原可作为一个新的独立指示预后的指标。

表 2 MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA的表达与GISTs病理特征的关系

病理特征	n	MAGE-1的表达			NY-ESO-1的表达		
		阳性n(%)	χ ² 值	P值	阳性n(%)	χ ² 值	P值
性别			0.068	1.000		0.002	0.961
男	17	6(35)			8(47)		
女	13	4(31)			6(46)		
年龄(岁)			0.000	1.000		0.089	0.765
<55	12	4(33)			6(50)		
≥55	18	6(33)			8(44)		
病理类型			2.729	0.255		0.062	0.969
梭形细胞型	19	8(42)			9(47)		
上皮细胞型	7	2(29)			3(43)		
混合细胞型	4	0(0)			2(50)		
部位			5.625	0.045		6.451	0.011
胃	18	3(17)			5(28)		
肠	12	7(58)			9(75)		
肿瘤大小(cm)			7.371	0.025		6.735	0.034
<5	6	0(0)			1(17)		
5-10	10	2(20)			3(30)		
>10	14	8(57)			10(71)		
危险度分级			7.371	0.025		6.735	0.034
低危组	6	0(0)			1(17)		
中危组	10	2(20)			3(30)		
高危组	14	8(57)			10(71)		

部位、肿瘤大小和危险度分级有关($P<0.05$, 表2). NY-ESO-1 mRNA表达与性别、年龄和病理类型无关($P>0.05$, 表2). 与肿瘤生长部位、肿瘤大小和危险度分级有关($P<0.05$, 表2).

2.3 MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA表达的半定量结果 MAGE-1和NY-ESO-1的RT-PCR产物电泳结果示扩增片段分别为171 bp和332 bp, 与预期设计的目的片段相同, MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA在GISTs组织中均有高度表达, 而在正常组织中未发现其表达, 且MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA表达均与GISTs危险度分级有关(图1). MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA在低危、中危、高危3个组中表达量随着危险度分级的升高而增

高, 3组间差异有统计学意义($P<0.05$, 表3).

2.4 MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA在GISTs组中表达的相关性 30例GISTs组织中MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA共阳性表达6例(6/30), 两者表达不存在明显相关性($r = 0.018$, $P>0.05$, 表4).

3 讨论

目前GISTs的治疗倾向于外科治疗与甲磺酸伊马替尼的联合应用. 其中外科手术切除是其主要治疗方法. 完整切除肿瘤及切缘阴性是外科切除治疗的基本标准. 此外以甲磺酸伊马替尼为代表的靶向治疗药物开启了GISTs治疗新时代. 甲磺酸伊马替尼治疗GISTs的主要适应证是

■创新盘点

目前尚未见运用RT-PCR法检测胃肠道间质瘤中肿瘤-睾丸抗原表达情况的报道,本研究不仅分析肿瘤-睾丸抗原表达与临床病理的关系,还运用RT-PCR半定量分析胃肠道间质瘤各危险度分级组间表达的差异情况。

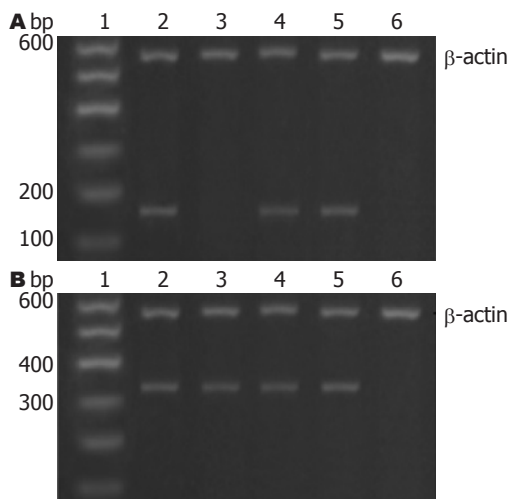


图1 GISTs各危险度分级组中MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA表达。A: MAGE-1 mRNA; B: NY-ESO-1 mRNA; 1: Marker; 2: 阳性对照组; 3: 低危组; 4: 中危组; 5: 高危组; 6: 正常对照组。

*c-kit*基因突变和CD117阳性的病例,尤其是*c-kit*基因11号外显子突变者,而对PDGFRA 18号外显子有突变者,则效果不佳^[5-7]。但甲磺酸伊马替尼最大的问题是相当一部分病例服药3年以上均出现不同程度耐药,当出现耐药时是继续服药,还是加量或改用多靶点药物,或继续寻求外科手术,目前尚无统一的意见。

除了手术和甲磺酸伊马替尼,免疫治疗在肿瘤综合治疗中同样占有重要地位,这是因为免疫治疗除了可以直接杀伤已有的肿瘤细胞外,还可以通过提高机体免疫能力来及时杀灭新产生的肿瘤细胞。CTA抗原基因编码的肿瘤相关抗原能在多种肿瘤组织中表达,但在正常组织中表达仅限于睾丸和胎盘组织。虽然Chen等^[8]的研究发现CTA的异位表达能引发自体免疫反应。但精原细胞不表达位于细胞表面的HLA I类和II类抗原,所以CTA引发的自体免疫反应不会造成自身的损伤^[9]。由于CTA的这个优点,使CTA成为特异性免疫治疗的理想靶点。CTA是包含MAGE、NY-ESO-1、SSX、LAGE等的一个基因大家族。MAGE由van der Bruggen等^[10]于1991年首次在黑色素瘤细胞中成功分离出,并通过特异性细胞毒性T细胞识别MAGE基因的表达产物,特异性杀伤肿瘤细胞。而NY-ESO-1由Chen等^[11]在1997年在一食管鳞状细胞癌患者中发现。随后的一系列研究显示NY-ESO-1可能是目前已发现的免疫原性最强的抗原之一,使其成为NY-ESO-1阳性肿瘤最有效的免疫治疗靶点^[12-16]。我们的研究发现:在GISTs

表3 GISTs各危险度分级组中MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA表达量 (mean ± SD)

分组	n	MAGE-1 mRNA	NY-ESO-1 mRNA
低危组	6	0.10 ± 0.01 ^a	0.41 ± 0.01 ^c
中危组	10	0.50 ± 0.02	0.60 ± 0.01
高危组	14	0.81 ± 0.01	0.89 ± 0.01

^a*P* < 0.05, *t* = 2.331; ^c*P* < 0.05, *t* = 1.706 vs 中危组, 高危组。

表4 GISTs组中MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA表达的关系

MAGE-1	NY-ESO-1		<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
	+	-		
+	6	4	0.189	0.317
-	8	12		

组织中, MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA基因均有高度表达, 表达率分别达到30%和47%。因此以MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA为靶点的多肽疫苗开发, 有望使特异性免疫治疗成为继手术和甲磺酸伊马替尼外, GISTs重要的辅助治疗手段。

GISTs被普遍认为是具有不同恶性潜能的肿瘤, 因此对GISTs危险程度的准确分级, 不仅关系到预后的判断, 更为重要的是, 还能指导术后如何正确联合甲磺酸伊马替尼进行辅助治疗。目前对于GISTs危险程度的准确分级, 尚无统一意见。现在广泛采用的是美国国立卫生研究院(NIH)推荐的Fletcher分级标准^[4]: 即按肿瘤的大小和核分裂相数将GISTs分为极低危、低危、中危和高危4个等级。但史恩溢等^[17]认为按此标准, 一方面过高地评估了约4%的非恶性患者, 另一方面又过低地评估了约17%的恶性患者, 且对恶性GISTs的分级也欠准确。同时美国陆军研究所(AFIP)的1项研究表明: 在肿瘤大小和核分裂相数相似的情况下, 小肠间质瘤恶性生物学潜能明显比胃间质瘤更高^[18,19]。因此GISTs治疗指南(2007版)关于GISTs危险因素分级新增了肿瘤部位的因素, 认为上消化系的肿瘤较下消化系肿瘤的危险程度低, 即Miettinen新分级标准^[20,21]。尽管Miettinen新分级标准比Fletcher分级标准更能准确反应GISTs危险程度, 但实际工作中, 仍有一小部分GISTs不能按此标准准确分级。能否引入一特异性高, 又方便检测的临床指标辅助GISTs危险因素分级值得研究。Perez等^[22]应用免疫组织化学方法检测了CTA在35例GISTs中的表达, 结果显示: 高危组CTA的表达明显高于中、

低危组, 并认为CTA能作为一个新的独立指示预后的指标. 我们的研究同样发现: MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA在GISTs组织中有高度表达, 且MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA表达均与GISTs危险度分级有关. MAGE-1 mRNA的表达由低危组的无表达, 上升到中危组的20%和高危组的57%, 同样, NY-ESO-1 mRNA的表达由低危组的17%, 上升到中危组的30%和高危组的71%, 说明MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA抗原可能参与了疾病的发展. 同时经RT-PCR半定量检测, MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA在各危险度分级组中表达量均随危险程度升高而增高, 这使MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA有望成为辅助GISTs危险因素分级的检测指标. 在12例肠间质瘤中, MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA的表达分别达到了58%和75%, 两者均高于其在胃间质瘤中的表达(17%, 28%), 这也在一定程度上说明肠间质瘤的恶性程度高于胃间质瘤. 此外, 在MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA同时表达的6例GISTs中, 5例属于高危组, 说明随着疾病的发展, MAGE-1和NY-ESO-1表现出聚集表达的趋势, CTA抗原的这种聚集表达为研究CTA抗原疫苗的应用提供了可能性. 但我们也发现, MAGE-1和NY-ESO-1 mRNA的表达率略高于Perez等的免疫组织化学结果. CTA基因与蛋白在GISTs中的表达关系及其在GISTs发生、发展中的作用有待于我们进一步的研究与证实.

4 参考文献

- 1 Ray-Coquard I, Le Cesne A, Michallet V, Boukovinas I, Ranchere D, Thiesse P, Baty V, Blay JY. [Gastro-intestinal stromal tumors: news and comments] *Bull Cancer* 2003; 90: 69-76
- 2 He HY, Fang WG, Zhong HH, Li Y, Zheng J, Du J, Heng WJ, Wu BQ. [Status and clinical implication of c-kit and PDGFRA mutations in 165 cases of gastrointestinal stromal tumor (GIST)] *Zhonghua Binglixue Zazhi* 2006; 35: 262-266
- 3 Hudolin T, Kastelan Z, Derezić D, Basić-Jukić N, Cesare Spagnoli G, Juretić A, Jezek D. Expression of MAGE-A1, MAGE-A3/4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in fetal testis. *Acta Dermatovenerol Croat* 2009; 17: 103-107
- 4 Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Int J Surg Pathol* 2002; 10: 81-89
- 5 Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, Blanke CD, von Mehren M, Joensuu H, McGreevey LS, Chen CJ, Van den Abbeele AD, Druker BJ, Kiese B, Eisenberg B, Roberts PJ, Singer S, Fletcher CD, Silberman S, Dimitrijevic S, Fletcher JA. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003; 21: 4342-4349
- 6 王彦丽, 赵向荣, 白辰光, 杨蕾, 马大烈. 胃肠道间质瘤组织中PDGFR α 和C-kit基因突变和蛋白表达的关系. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2300-2305
- 7 Bixby D, Talpaz M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009: 461-476
- 8 Chen YT, Boyer AD, Viars CS, Tsang S, Old LJ, Arden KC. Genomic cloning and localization of CTAG, a gene encoding an autoimmunogenic cancer-testis antigen NY-ESO-1, to human chromosome Xq28. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 79: 237-240
- 9 Jassim A, Ollier W, Payne A, Biro A, Oliver RT, Festenstein H. Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *Eur J Immunol* 1989; 19: 1215-1220
- 10 van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991; 254: 1643-1647
- 11 Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 1914-1918
- 12 吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛. 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原SSX-1及NY-ESO-1 mRNA的表达意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1673-1678
- 13 Milne K, Barnes RO, Girardin A, Mawer MA, Nesslinger NJ, Ng A, Nielsen JS, Sahota R, Tran E, Webb JR, Wong MQ, Wick DA, Wray A, McMurtrie E, Köbel M, Kalloger SE, Gilks CB, Watson PH, Nelson BH. Tumor-infiltrating T cells correlate with NY-ESO-1-specific autoantibodies in ovarian cancer. *PLoS One* 2008; 3: e3409
- 14 Isobe M, Eikawa S, Uenaka A, Nakamura Y, Kanda T, Kohno S, Kuzushima K, Nakayama E. Correlation of high and decreased NY-ESO-1 immunity to spontaneous regression and subsequent recurrence in a lung cancer patient. *Cancer Immun* 2009; 9: 8
- 15 Okada Y, Fujiwara Y, Yamamoto H, Sugita Y, Yasuda T, Doki Y, Tamura S, Yano M, Shiozaki H, Matsuura N, Monden M. Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with gastric carcinoma by multiple-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer* 2001; 92: 2056-2064
- 16 Mou DC, Cai SL, Peng JR, Wang Y, Chen HS, Pang XW, Leng XS, Chen WF. Evaluation of MAGE-1 and MAGE-3 as tumour-specific markers to detect blood dissemination of hepatocellular carcinoma cells. *Br J Cancer* 2002; 86: 110-116
- 17 史恩溢, 侯英勇, 谭云山, 周晓燕, 蔡旭, 陆永明, 朱雄增. 局限性胃肠道间质瘤危险度分级标准的应用与评价. *中华病理学杂志* 2007; 36: 649-653
- 18 Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 52-68
- 19 Miettinen M, Makhlof H, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the jejunum and

■应用要点

以肿瘤-睾丸抗原MAGE-1和NY-ESO-1为靶点的多肽疫苗开发, 有望使特异性免疫治疗成为继手术和甲磺酸伊马替尼外, GISTs重要的辅助治疗手段. 此外, MAGE-1和NY-ESO-1基因在各危险度分级组中表达量均随危险程度升高而增高, MAGE-1和NY-ESO-1有望成为辅助GISTs危险因素分级的检测指标.

■同行评价

本文新颖性强, 具有较好的临床参考价值.

- 20 Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: review on morphology, molecular pathology, prognosis, and differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 1466-1478
- 21 Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006; 23: 70-83
- 22 Perez D, Herrmann T, Jungbluth AA, Samartzis P, Spagnoli G, Demartines N, Clavien PA, Marino S, Seifert B, Jaeger D. Cancer testis antigen expression in gastrointestinal stromal tumors: new markers for early recurrence. *Int J Cancer* 2008; 123: 1551-1555

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

肝缺氧诱导因子-1 α 与肝癌发生、发展及治疗研究新进展

李姗姗, 姚登福, 董志珍

李姗姗, 姚登福, 南通大学附属医院临床医学研究中心 江苏省南通市 226001

董志珍, 南通大学诊断学教研室 江苏省南通市 226001

江苏省南通市社会发展计划基金资助项目, No. S2009027

作者贡献分布: 本文由李姗姗与姚登福设计; 由李姗姗撰写, 由董志珍与姚登福审定完成。

通讯作者: 姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院临床医学研究中心. yaodf@ahnmcc.com

电话: 0513-85052523 传真: 0513-85052413

收稿日期: 2009-11-29 修回日期: 2009-12-31

接受日期: 2010-01-04 在线出版日期: 2010-02-08

Advances in understanding the relationship between hepatic hypoxia-inducible factor-1 alpha and hepatocellular carcinoma

Shan-Shan Li, Deng-Fu Yao, Zhi-Zhen Dong

Shan-Shan Li, Deng-Fu Yao, Clinical Medical Research Center, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zhi-Zhen Dong, Department of Diagnostic Medicine, Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Supported by: the Project of Nantong Municipal Society Development, China, No. S2009027

Correspondence to: Professor Deng-Fu Yao, Clinical Medical Research Center, the Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. yaodf@ahnmcc.com

Received: 2009-11-29 Revised: 2009-12-31

Accepted: 2010-01-04 Published online: 2010-02-08

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is characterized by hypoxia due to robust cell proliferation. Hypoxia can promote tumor cell proliferation, metastasis and neovasculogenesis, inhibit differentiation and apoptosis, and decrease chemosensitivity and radiosensitivity. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) is a key mediator of physiological and pathological hypoxia response and controls the transcription of numerous genes that are of pivotal importance for angiogenesis and cellular metabolism. Therefore, HIF-1 α is closely related with the proliferation, metastasis and apoptosis of HCC cells. Recently, HIF-1 α -based gene therapy has become a novel adjunctive strategy for the management of HCC. This review focuses on the relationship between HIF-1 α and the progression and therapy of HCC.

Key Words: Hypoxia-inducible factor-1 alpha; Hepatocellular carcinoma; Gene therapy

Li SS, Yao DF, Dong ZZ. Advances in understanding the relationship between hepatic hypoxia-inducible factor-1 alpha and hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 361-367

摘要

失控的增殖导致缺氧(hypoxia)是肝细胞癌(HCC)形成的特征性微环境。缺氧可促进细胞增殖、转移、血管新生、抑制癌细胞分化、凋亡以及对放化疗耐受。缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)是介导生理性和病理性低氧反应的关键转录因子,在转录水平上调控百余种靶基因,参与调节血管新生及糖代谢等过程,与HCC生长、浸润、转移和预后等密切相关。近年来以HIF-1 α 为靶点的基因疗法如RNA干扰、反义技术和自杀基因技术等,成为HCC辅助治疗的新策略。本文综述了HIF-1 α 转录水平异常与HCC发生、发展及靶向HIF-1 α 基因治疗HCC的新进展。

关键词: 缺氧诱导因子-1 α ; 肝细胞癌; 基因治疗

李姗姗, 姚登福, 董志珍. 肝缺氧诱导因子-1 α 与肝癌发生、发展及治疗研究新进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(4): 361-367

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/361.asp>

0 引言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是以血供丰富、进展迅速及化疗耐药著称的恶性肿瘤^[1]。HCC由肝炎病毒(HBV、HCV)的慢性感染或在肝硬化基础上发展而来,因肝内纤维化破坏脉管系统及癌基因激活/抑癌基因失活等使癌细胞增殖失控导致缺氧。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 alpha, HIF-1 α)是调节氧稳态的重要转录因子,通过下游靶基因调控肿瘤能量代谢、血管生成和转移等环节,促进HCC发生与发展。他可通过上调I型纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor, PAI-1)、肾上腺髓质素-1(adrenomedullin-1,

■背景资料

缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)是介导生理性和病理性低氧反应的关键转录因子。在转录水平上调控百余种靶基因,参与调节血管新生及糖代谢等过程,与HCC生长、浸润、转移和预后等密切相关。

■同行评议者

黄志勇, 教授, 华中科技大学同济医院普外科

■研究前沿

肝癌细胞缺氧,核内HIF-1 α 积聚,诱导多种生长因子表达上调,诱发肝癌形成,以HIF-1 α 为靶点的基因疗法如RNA干扰、反义技术和自杀基因技术等,成为HCC辅助治疗的新策略。

ADM-1)和肾上腺髓质素-2(adrenomedullin-2, ADM-2)促肝纤维化形成^[2]. HCC患者HIF-1 α 转录水平上呈高表达者,总体生存率和无病生存率较低表达者明显减低,且静脉及淋巴结转移率较高. 在肝癌等多种肿瘤中HIF-1 α 过表达,缺氧和HIF-1 α 转录异常共同促进HCC进展,并对传统疗法耐受. 随着RNA干扰、自杀基因等技术日趋成熟,已开展了靶向HIF-1 α 基因治疗HCC的研究,本文就HIF-1 α 转录水平上异常与HCC发生发展及靶向HIF-1 α 基因治疗的研究进展作一综述.

1 HIF-1 α 转录机制及在肝细胞恶性转化时的表达

HIF-1是由氧调节的 α 亚基和组成性表达的 β 亚基(芳香烃受体核转运蛋白, ARNT)构成的异二聚体转录因子. α 亚基具有结合DNA及异二聚体化的bHLH/PAS结构域,一个氧依赖降解区域(oxygen-dependent domain, ODD)和两个转录激活区域(N-TAD和C-TAD). 常氧下,脯氨酸羟化酶(PHD1、PHD2和PHD3)羟化HIF-1 α ODD区402位和564位脯氨酸残基,经pVHL-E3泛素连接酶-S26蛋白酶体途径降解, HIF抑制因子FIH羟化803位天冬氨酸残基,阻止其与共转录因子环腺苷酸反应元件结合蛋白p300/CBP结合,抑制转录启动;缺氧下,羟化作用消除, C-TAD与p300/CBP结合, α 亚基稳定后转入核内,与 β 亚基异二聚体化,作用于缺氧反应基因启动子区域的缺氧反应元件(hypoxia-response element, HRE),激活下游靶基因转录. β 亚基缺少ODD区域,且只含有一个TAD区,不受氧浓度的调节. 除了氧分压,生长因子刺激、癌基因激活、抑癌基因失活、Ca²⁺信号和ROS等均可在常氧下诱导HIF-1 α 产生^[3]. HIF-1 α 的活性调节与HIF-1 α 稳定性、磷酸化和氧化还原条件的改变、共辅助激活蛋白的相互作用有关. PI3K/Akt/FRAP/mTOR/4E-BP、MEK1/ERK/MAPK等信号通路,在调节HIF-1 α 中也起重要作用. 羟化、泛素化、乙酰化、甲基化和磷酸化也均参与调节HIF-1 α 的半衰期和转录活性^[4],可作为一种细胞缺氧状态下的防御机制^[5,6].

肝内实体瘤存在缺氧微环境,癌细胞增殖、浸润对缺氧的适应性调节即依赖于HIF-1 α . 人HCC及癌周组织中HIF-1 α 分布主要定位于胞质,部分位于胞核. 癌灶组织HIF-1 α 表达均匀,肿瘤坏死区周围及肿瘤浸润边缘HIF-1 α 表达增多;癌旁组织中靠近肿瘤边缘被压扁的肝组织

条索中及中央静脉周围HIF-1 α 表达明显,癌周组织表达明显强于其癌灶组织,表明HIF-1 α 表达增强与癌周组织的增生活跃密切相关,且HIF-1 α 表达强度与分化程度负相关,表达率与肿瘤直径正相关,与HBsAg、肿瘤数目间未见明显相关^[7]. 在鼠肝癌发生发展过程中,肝癌形成的早期阶段,即变性期, HIF-1 α 在转录水平和蛋白水平上既已过表达,表现为肝细胞变性、癌前和癌变组HIF-1 α 在基因和蛋白表达上呈动态梯度增高,且外周血中亦可检测到HIF-1 α 的表达变化,同时基因序列与GenBank中基因源序列同源性分析完全一致^[8].

2 肝炎病毒慢性感染与HIF-1 α 表达

HBV感染在我国肝癌病因中居首. HBx,即HBV编码蛋白,可诱导HIF-1 α ODD的氨基酸残基去乙酰化, PHD和VHL与HIF-1 α 分离,从而稳定HIF-1 α 表达. 在HBx转基因小鼠和HBV感染的HCC患者中,转移相关蛋白-1(metastasis-associated 1, MTA1)和组蛋白去乙酰酶(histone deacetylase 1, HDAC1)蛋白水平增高,且癌组织与周围非肿瘤硬化结节相比, MTA1和HDAC1蛋白水平也明显升高, HBx上调MTA1/HDAC1复合体的表达, MTA1通过HDAC1去乙酰化HIF-1 α ,中和乙酰基转移酶(acetyltransferase 1, ARD1)的作用,两者协调一致促进HIF-1 α 稳定表达,在HBV相关肝癌血管新生和转移中发挥重要作用^[9,10]. HBx稳定HIF-1 α 后,可诱导核转录因子C/EBP- β ,转录激活多重耐药相关基因(multi-drug resistance protein 1, MDR1),增强其活性,使肝癌治疗从化疗敏感转变为化疗耐受^[11]. 体外研究也表明HBx过表达上调HIF-1 α ,两者显著相关, HIF-1 α 可作为HBV相关肝癌患者的预后指标^[12].

HCV感染极易致慢性化是肝硬化和HCC发生的主要原因之一. HCV活化NF- κ B、STAT-3、PI3K/AKT和P42/P44丝裂酶原蛋白激酶,稳定HIF-1 α ,促进HCV感染的细胞释放促血管生成因子,诱导血管新生及肝细胞恶性转化^[13]. HCV阳性患者中其TGF- β 2、VEGF和CD34表达较阴性患者显著升高. HCV核心蛋白可激活HIF-1 α 、E2F1、ASK1、JNK/P38、ERK、AP-1、ATF-2和CREB等多种途径上调TGF、VEGF和CD34,诱导血管新生. HCV通过影响线粒体呼吸链活性产生一系列氧化应激反应,导致线粒体氧化应激磷酸化受损,转向依赖于非氧化应

激糖代谢, 而不影响细胞增殖. HCV感染的细胞和慢性丙型肝炎患者肝活检均证实HCV可上调HIF-1 α , 并转录激活HIF-1 α 的靶基因如糖代谢相关基因等, 参与HCC的发生发展, 使患者对抗氧化应激治疗敏感性下降^[14].

HCV核心蛋白转染HepG2细胞后激活NF- κ B, 进而增强TGF- α 转录活性, 最终活化MAPK/ERK通路刺激细胞增殖. 核心蛋白能直接和P53、P73和pRb等肿瘤抑制蛋白结合, 调节Cyclin-依赖激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)抑制因子P21/Waf的表达, 而P21/Waf是P53的转录调控靶位, 核心蛋白通过直接调节Cyclin/CDK复合物的功能, 参与细胞周期异常改变和肿瘤的发生. 此外, 核心蛋白还能与LZIP蛋白、hnRNP K蛋白和RNA解旋酶DEADbox DDX3蛋白等结合. 在表达核心蛋白的细胞和转基因小鼠模型中证实core能与线粒体蛋白伴侣分子Prohibitin结合, 破坏Prohibitin与线粒体DNA编码的细胞色素C氧化酶(cytochrome oxidase, COX)的相互作用, 导致COX活性下降, 线粒体功能障碍, 肝细胞氧化应激损伤.

3 HIF-1 α 表达与多种信号通路间关系

3.1 NF- κ B NF- κ B信号途径的活化在HCC发生发展过程中起重要作用. 缺氧激活IKK β , 使I κ B磷酸化, NF- κ B与其分离并活化^[15]. 但HIF-1 α 与NF- κ B的关系不甚明了. 资料报道不一, 如HIF-1 α 可激活NF- κ B, NF- κ B可调控HIF-1 α 的转录, HIF-1 α 的激活与NF- κ B的抑制可共存^[16-18]. NF- κ B抑制因子I κ B- α , 可作用于FIH, 使其与HIF-1 α 分离, 减少803位天冬氨酸羟基化, 增强其转录活性^[19]. NF- κ B结合于HIF-1 α 距起始位点-197/188 bp的启动子区, 调节常氧HIF-1 α mRNA和蛋白基础水平, 进而上调VEGF、GLUT1、GLUT2^[20,21]等.

3.2 MicroRNA 缺氧除通过HIF-1 α 介导的经典途径促进HCC发生发展, 近来研究发现还可通过作用于缺氧调节的MicroRNA(HRMs)扩大其促血管新生、细胞增殖、糖酵解、DNA损伤、抗凋亡等靶效应. 缺氧条件下HIF-1 α 上调或下调许多HRMs, 如上调MicroRNA-21、MicroRNA-155等, 下调MicroRNA-26、MicroRNA-101、MicroRNA-122等, 均与HCC有密切关系^[22]. MicroRNA-21、MicroRNA-155通过下调PTEN和C/EBP β 促肝癌形成^[23,24]. MicroRNA-26水平下降可活化NF- κ B信号通路促HCC形成^[25]. MicroRNA-101在肝癌

组织及肝癌细胞中表达均减少, 异位表达的MicroRNA-101通过抑制Mcl-1发挥促凋亡效应, 明显抑制肝癌细胞集落和裸鼠HCC形成^[26]. MicroRNA-122在体内体外研究中均可敲除靶基因ADAM-17, 抑制血管生成、瘤体形成、肝内转移、侵袭等, 而在HCC患者中其表达明显下调^[27].

3.3 MIF 巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibition factor, MIF)不仅是炎症因子, 而且具有内分泌和酶的活性, 被认为是胞内信号分子, 参与血管生成, 肿瘤进展. 缺氧条件下HIF-1 α 上调MIF的表达, MIF又可通过P53途径稳定HIF-1 α , 进一步促进癌细胞增殖、生长、侵袭等^[28]. 人MIF在5'-非翻译区域含有HRE, 定位于转录起始位点+25区域附近, cAMP反应元件CRE, 即转录因子CREB结合位点, 定位于-20区域附近, 常氧下CREB抑制HIF-1 α 活性, 而缺氧时CREB降解, 允许HIF-1 α 转录激活启动子, 促使MIF在肝癌中过表达, 下调P27水平^[29]. HBx可借助MIF促进HBV感染者发展为肝癌^[30,31]. MIF单抗作用于HepG2细胞后, 阻断细胞周期G₀/G₁期, 减少CyclinD1、VEGF和IL-6分泌, 抑制细胞增殖.

3.4 其他 肝细胞缺氧, 核内HIF-1 α 积聚, 诱导多种生长因子及I型胶原纤维表达上调, 而在HIF-1 α 缺陷小鼠上述表达均降低, HIF-1 α 作为促肝纤维化因子调节剂, 诱发肝癌形成^[2,32]. Rac和1d-1稳定HIF-1 α , 上调VEGF表达, 诱导血管新生, 促进癌细胞侵袭^[33,34]. 缺氧时组蛋白脱甲基酶JMJD1A、JMJD2B HRE结合丰富的HIF, 且启动子区域募集了大量RNA聚合酶II, HIF可直接靶向jumonji蛋白, 使之去甲基化, 促进肝癌发生与发展^[35]. HCC中HIF-1 α 上调FoxM1表达, 降低P21核内水平, 升高CyclinB1和CyclinD1, 使其获得易感性表型, 参与癌细胞增生、血管生成、凋亡抵抗^[36,37]. HIF-1 α 转录激活多种糖酵解相关基因, 且HIF-1 α 高表达者癌侵袭率高, 生存率低^[38]. HIF靶基因自分泌活动因子vimentin, fibronectin, keratins 14、18和19, MMP2, uPAR, cathepsin D, uPAR, c-Met和CXCR4均参与肝癌浸润转移^[39].

4 HIF-1 α 表达与肝癌基因治疗

缺氧条件下, HIF-1 α 转染5-FU处理的HepG2细胞后, MDR1、MRP1和LRP表达上调, 参与耐药形成^[40]. 放疗后瘤细胞再氧和, 活性氧刺激HIF-

■创新盘点

肝癌组织内广泛低氧, HIF-1 α 表达调节下游基因, 促血管生成、癌细胞增殖、转移和凋亡等过程, 对传统放、化疗耐受, 抗血管疗法易致缺氧. HIF-1 α 过表达是监测肝癌复发的良好指标.

■应用要点

靶向HIF-1 α 或HRE的基因治疗,敲除目的基因后,导致基因功能性缺失,故抑制HIF-1 α 过表达,阻断对下游基因的激活,对肝癌治疗具有新的应用前景。

1 α 核内积聚,翻译增加,抑制内皮细胞凋亡,降低血管损伤,增加放疗抵抗,抑制放疗后HIF-1 α 活性,可加强血管破坏,显著提高放疗敏感性^[41]。兔VX2肝癌模型表明TAE显著激活HIF-1 α ,靶向促血管生成因子,推动残余癌复发^[42]。HIF-1 α 常导致单一治疗失败,故以HIF-1 α 或HRE为靶点的基因治疗可作为HCC治疗的辅助手段。

4.1 siRNA与shRNA 外源性双链RNA结合同源互补靶mRNA引发的转录后基因沉默。HIF-1 α siRNA转染HepG2细胞后, HIF-1 α 及其靶基因VEGF在mRNA和蛋白水平均下调,缺氧下发挥抗肝癌血管生成效应^[43]。HSP70-2缺氧下高表达,加强对缺氧诱导凋亡的抵抗, HIF-1 α siRNA转染HCC细胞后, HSP70-2表达减少^[44,45]。体外研究表明HIF-1 α siRNA转染依托泊甙处理的HepG2细胞,上调Bak的表达,活化P53和caspase,增加缺氧下细胞凋亡,恢复药物敏感性^[45]。腺病毒介导的HIF-1 α shRNA转染人外周血祖细胞,可显著下调HIF-1 α 及VEGF的表达,抑制其克隆形成、分化、增殖、迁移^[46]。HIF-1 α siRNA可消除缺氧刺激下Hep3B的迁移能力^[47]。VEGF siRNA可使Ang、单核细胞化学吸引蛋白(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、IL-6、IL-8和TGF- β 1下调,而靶向HIF-1 α siRNA虽可使VEGF、Ang和TGF- β 1减少,但上调IL-6、IL-8、MCP-1,故两者联合更有效抑制血管新生^[48]。靶向HIF-1 α 和VEGF的siRNA共转染入人脐静脉内皮细胞和视网膜局部缺血C57BL/6J鼠模型中发现HIF-1 α siRNA联合VEGF siRNA显著下调两者mRNA及蛋白水平的表达,体内体外研究均最大效应的抑制了VEGF的表达^[49]。经腹腔腔内注射siRNA(HIF-1 α)/PEI, HIF-1 α 及PAI-1表达下调,同时降低PAI-1活性,减少术后腹部黏附^[50]。

4.2 MicroRNA MicroRNA是内源性的大小与siRNA相仿的非编码RNAs,通过与靶mRNA3'-端非翻译区结合发挥调节作用。现仅发现唯一直接靶向HIF-1 α 的microRNA,即miR-17-92,位于13q31.3。经等量标记试剂iTRAQ联合生物信息靶向预测的质谱分析, HIF-1 α 是miR-17-92的直接靶点,可被其负性调节。但miR-17-92仅在常氧下负性调节HIF-1 α ,缺氧条件下miR-17-92表达,均不影响其过表达^[51]。对miR-17-92负性调节肝癌HIF-1 α 的研究有待探讨。

4.3 反义DNA或反义RNA 利用DNA或RNA分子通过碱基配对原则与目的基因的mRNA互补

结合,通过各种机制使其降解或抑制其编码蛋白的翻译,从而抑制目的基因表达。HIF-1 α 反义寡核苷酸技术可抑制肝癌细胞增殖,降低HIF-1 α mRNA和蛋白质表达^[52]。体内研究证实,反义HIF-1 α 可协同多柔比星下调VEGF的表达,抑制肿瘤生长,血管生成,细胞增殖,诱导凋亡,增强多柔比星抗肝癌疗效^[53]。反义寡核苷酸靶向VEGF启动子区HIF-1 α 结合位点,下调VEGF RNA及蛋白水平,显著抑制VEGF表达,抗血管新生,抑制癌细胞生长^[54]。反义HIF-1 α 下调HIF-1 α 表达,增加X线诱导的缺氧细胞凋亡,增强放疗敏感性^[55]。

缺氧不仅反式激活端粒逆转录酶基因(hTERT)启动子活性,增加内源性hTERT表达, HIF-1 α 反义寡核苷酸下调hTERT表达,表明缺氧条件下HIF-1 α 介导hTERT上调,端粒酶活性增高,为肝癌治疗抵抗的原因之一^[56]。经门静脉注入腺相关病毒介导的反义HIF-1 α ,在鼠肝中长期局限性表达,可逆转TAE致缺氧引起的HIF-1 α 、VEGF、GLUT-1、LDH-A和增殖核抗原升高,控制血管新生和癌细胞增殖,抑制瘤体生长,加强TAE疗效^[57]。

4.4 核酶 核酶为具有酶活性的分子,可定点切割目的基因,有效阻断其表达。靶向HIF-1 α 的核酶基因真核表达载体转染肝癌细胞Hep3B,低氧条件诱导后HIF-1 α 表达明显下降,转录活性下调^[58]。靶向hTERT启动子、AFP等核酶基因对肝癌研究较多^[59,60],而靶向HIF-1 α 核酶基因真核表达载体研究较少。

4.5 自杀基因 酶/前体药物治疗(GDEPT)即将自杀基因导入肿瘤细胞,介导无活性前体或低毒性药物代谢为毒性产物,杀伤肿瘤细胞。自杀基因体系包括单纯疱疹病毒-胸苷激酶基因(HSV-TK)、水痘带状疱疹病毒-胸苷激酶基因(VZV-TK)、大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶(EC-CD)等。整合HRE的嘌呤核苷酸磷酸化酶(PNP)/9-6-甲基嘌呤(Mep-dR)自杀基因体系具有明显抗肝癌效应^[61]。整合HRE的Bax自杀基因,缺氧诱导下,上调Bax表达,增强其介导的细胞凋亡,抑制瘤体生长。胞嘧啶脱氨酶(CD),是一种前体药物激活酶,可将无活性的5-氟胞嘧啶转化为有活性的5-氟尿嘧啶(5-FU), HIF上调启动子序列插入HRE的可编码CD的自杀基因表达,克服缺氧诱导对5-FU耐药性产生,可用于肝癌治疗研究。构建受VEGF启动子调控的,融合HIF-1 α ODD区的白喉毒素表达载体(DT-A),其下游含有EPO mRNA

结合蛋白(ERBP)序列, 常氧下DT-A经pVHL和氧介导途径降解, 缺氧下ERBP结合序列稳定mRNA. 体内研究表明缺氧下其可诱导凋亡, 抑制肿瘤生长, 而对常氧正常组织损伤较小^[62].

5 结论

肝癌实体瘤内广泛低氧, HIF-1 α 过表达, 调节百余种下游靶基因, 编码EPO、VEGF、HO-1和iNOs、GLUT-1、糖酵解酶和3-磷酸甘油醛脱氢酶、IGF-II、IGF结合蛋白和酪氨酸羟化酶等, 调控血管生成、细胞代谢、癌细胞增殖、转移、凋亡等过程, 促进肿瘤的发生发展及对传统放、化疗耐受, 导致预后不良. TAE/TACE导致缺氧, 促进血管形成, 而抗血管疗法更进一步导致缺氧, 从而形成恶性循环, 利于肝癌复发. 肝癌切除术后, HIF-1 α 伴或不伴有Ang-2过表达的患者无病生存期较低表达长, 是监测肝癌复发的良好指标^[63]. 靶向HIF-1 α 或HRE的基因治疗, 敲除目的基因后, 导致基因功能性缺失. 故抑制HIF-1 α 过表达, 阻断对下游基因的激活, 对肝癌治疗具有新的应用前景.

6 参考文献

- 1 Daskalow K, Pfander D, Weichert W, Rohwer N, Thelen A, Neuhaus P, Jonas S, Wiedenmann B, Benckert C, Cramer T. Distinct temporospatial expression patterns of glycolysis-related proteins in human hepatocellular carcinoma. *Histochem Cell Biol* 2009; 132: 21-31
- 2 Copple BL, Bustamante JJ, Welch TP, Kim ND, Moon JO. Hypoxia-inducible factor-dependent production of profibrotic mediators by hypoxic hepatocytes. *Liver Int* 2009; 29: 1010-1021
- 3 Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology* (Bethesda) 2009; 24: 97-106
- 4 Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1 α requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal* 2005; 17: 1-9
- 5 Tan M, Gu Q, He H, Pamarthy D, Semenza GL, Sun Y. SAG/ROC2/RBX2 is a HIF-1 target gene that promotes HIF-1 α ubiquitination and degradation. *Oncogene* 2008; 27: 1404-1411
- 6 李月明, 姚登福. 缺氧诱导因子-1分子组成、活化机制及肝癌靶向治疗. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3070-3076
- 7 姜华, 姚登福, 吴信华, 顾文静, 邱伟伟, 吴玮. 缺氧诱导因子1 α 异常表达与肝细胞癌发展及预后的关系. 江苏医药 2008; 34: 463-465
- 8 Yao DF, Jiang H, Yao M, Li YM, Gu WJ, Shen YC, Qiu LW, Wu W, Wu XH, Sai WL. Quantitative analysis of hepatic hypoxia-inducible factor-1 α and its abnormal gene expression during the formation of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009; 8: 407-413
- 9 Yoo YG, Na TY, Seo HW, Seong JK, Park CK, Shin

YK, Lee MO. Hepatitis B virus X protein induces the expression of MTA1 and HDAC1, which enhances hypoxia signaling in hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 2008; 27: 3405-3413

- 10 Yoo YG, Kong G, Lee MO. Metastasis-associated protein 1 enhances stability of hypoxia-inducible factor-1 α protein by recruiting histone deacetylase 1. *EMBO J* 2006; 25: 1231-1241
- 11 Han HK, Han CY, Cheon EP, Lee J, Kang KW. Role of hypoxia-inducible factor- α in hepatitis-B-virus X protein-mediated MDR1 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 567-573
- 12 Xie H, Song J, Liu K, Ji H, Shen H, Hu S, Yang G, Du Y, Zou X, Jin H, Yan L, Liu J, Fan D. The expression of hypoxia-inducible factor-1 α in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: correlation with patients' prognosis and hepatitis B virus X protein. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 3225-3233
- 13 Nasimuzzaman M, Waris G, Mikolon D, Stupack DG, Siddiqui A. Hepatitis C virus stabilizes hypoxia-inducible factor 1 α and stimulates the synthesis of vascular endothelial growth factor. *J Virol* 2007; 81: 10249-10257
- 14 Ripoli M, D'Aprile A, Quarato G, Sarasin-Filipowicz M, Gouttenoire J, Scrima R, Cela O, Boffoli D, Heim MH, Moradpour D, Capitanio N, Piccoli C. Hepatitis C virus-linked mitochondrial dysfunction promotes hypoxia-inducible factor 1 α -mediated glycolytic adaptation. *J Virol* 2010; 84: 647-660
- 15 Cummins EP, Berra E, Comerford KM, Ginouves A, Fitzgerald KT, Seeballuck F, Godson C, Nielsen JE, Moynagh P, Pouyssegur J, Taylor CT. Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase- β , giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 18154-18159
- 16 Carbia-Nagashima A, Gerez J, Perez-Castro C, Paez-Pereda M, Silberstein S, Stalla GK, Holsboer F, Arzt E. RSUME, a small RWD-containing protein, enhances SUMO conjugation and stabilizes HIF-1 α during hypoxia. *Cell* 2007; 131: 309-323
- 17 Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, Sobolewski A, Condliffe AM, Cowburn AS, Johnson N, Chilvers ER. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *J Exp Med* 2005; 201: 105-115
- 18 Belaiba RS, Bonello S, Zähringer C, Schmidt S, Hess J, Kietzmann T, Görlach A. Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor κ B in pulmonary artery smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 4691-4697
- 19 Shin DH, Li SH, Yang SW, Lee BL, Lee MK, Park JW. Inhibitor of nuclear factor- κ B α derepresses hypoxia-inducible factor-1 during moderate hypoxia by sequestering factor inhibiting hypoxia-inducible factor from hypoxia-inducible factor 1 α . *FEBS J* 2009; 276: 3470-3480
- 20 van Uden P, Kenneth NS, Rocha S. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF- κ B. *Biochem J* 2008; 412: 477-484
- 21 Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, Nizet V, Johnson RS, Haddad GG, Karin M. NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional

同行评价

本文主要总结了HIF-1 α 转录水平异常与HCC发生、发展及靶向HIF-1 α 基因治疗HCC的研究进展, 对指导下一步研究方向具有一定的意义, 内容上有一定的新颖性.

- regulation of HIF-1 α . *Nature* 2008; 453: 807-811
- 22 Kulshreshtha R, Davuluri RV, Calin GA, Ivan M. A microRNA component of the hypoxic response. *Cell Death Differ* 2008; 15: 667-671
 - 23 Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; 133: 647-658
 - 24 Wang B, Majumder S, Nuovo G, Kutay H, Volinia S, Patel T, Schmittgen TD, Croce C, Ghoshal K, Jacob ST. Role of microRNA-155 at early stages of hepatocarcinogenesis induced by choline-deficient and amino acid-defined diet in C57BL/6 mice. *Hepatology* 2009; 50: 1152-1161
 - 25 Ji J, Shi J, Budhu A, Yu Z, Forgues M, Roessler S, Ambis S, Chen Y, Meltzer PS, Croce CM, Qin LX, Man K, Lo CM, Lee J, Ng IO, Fan J, Tang ZY, Sun HC, Wang XW. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 1437-1447
 - 26 Su H, Yang JR, Xu T, Huang J, Xu L, Yuan Y, Zhuang SM. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Res* 2009; 69: 1135-1142
 - 27 Tsai WC, Hsu PW, Lai TC, Chau GY, Lin CW, Chen CM, Lin CD, Liao YL, Wang JL, Chau YP, Hsu MT, Hsiao M, Huang HD, Tsou AP. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009; 49: 1571-1582
 - 28 Oda S, Oda T, Nishi K, Takabuchi S, Wakamatsu T, Tanaka T, Adachi T, Fukuda K, Semenza GL, Hirota K. Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor in a p53-dependent manner. *PLoS One* 2008; 3: e2215
 - 29 Baugh JA, Gantier M, Li L, Byrne A, Buckley A, Donnelly SC. Dual regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in hypoxia by CREB and HIF-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347: 895-903
 - 30 Zhang S, Lin R, Zhou Z, Wen S, Lin L, Chen S, Shan Y, Cong Y, Wang S. Macrophage migration inhibitory factor interacts with HBx and inhibits its apoptotic activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 671-679
 - 31 Hira E, Ono T, Dhar DK, El-Assal ON, Hishikawa Y, Yamanoi A, Nagasue N. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis and deteriorates prognosis after radical resection for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 588-598
 - 32 Moon JO, Welch TP, Gonzalez FJ, Copple BL. Reduced liver fibrosis in hypoxia-inducible factor-1 α -deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2009; 296: G582-G592
 - 33 Lee TK, Poon RT, Yuen AP, Ling MT, Wang XH, Wong YC, Guan XY, Man K, Tang ZY, Fan ST. Regulation of angiogenesis by Id-1 through hypoxia-inducible factor-1 α -mediated vascular endothelial growth factor up-regulation in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6910-6919
 - 34 Lee TK, Poon RT, Yuen AP, Man K, Yang ZF, Guan XY, Fan ST. Rac activation is associated with hepatocellular carcinoma metastasis by up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5082-5089
 - 35 Beyer S, Kristensen MM, Jensen KS, Johansen JV, Staller P. The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF. *J Biol Chem* 2008; 283: 36542-36552
 - 36 Xia LM, Huang WJ, Wang B, Liu M, Zhang Q, Yan W, Zhu Q, Luo M, Zhou ZZ, Tian DA. Transcriptional up-regulation of FoxM1 in response to hypoxia is mediated by HIF-1. *J Cell Biochem* 2009; 106: 247-256
 - 37 Calvisi DF, Pinna F, Ladu S, Pellegrino R, Simile MM, Frau M, De Miglio MR, Tomasi ML, Sanna V, Mironi MR, Feo F, Pascale RM. Forkhead box M1B is a determinant of rat susceptibility to hepatocarcinogenesis and sustains ERK activity in human HCC. *Gut* 2009; 58: 679-687
 - 38 Hamaguchi T, Iizuka N, Tsunedomi R, Hamamoto Y, Miyamoto T, Iida M, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Takashima M, Tamesa T, Oka M. Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor 1 α is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2008; 33: 725-731
 - 39 Büchler P, Reber HA, Tomlinson JS, Hankinson O, Kallifatidis G, Friess H, Herr I, Hines OJ. Transcriptional regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor by hypoxia-inducible factor 1 is crucial for invasion of pancreatic and liver cancer. *Neoplasia* 2009; 11: 196-206
 - 40 Zhu H, Chen XP, Luo SF, Guan J, Zhang WG, Zhang BX. Involvement of hypoxia-inducible factor-1 α in multidrug resistance induced by hypoxia in HepG2 cells. *J Exp Clin Cancer Res* 2005; 24: 565-574
 - 41 Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell* 2004; 5: 429-441
 - 42 Rhee TK, Young JY, Larson AC, Haines GK 3rd, Sato KT, Salem R, Mulcahy MF, Kulik LM, Paunesku T, Woloschak GE, Omary RA. Effect of transcatheter arterial embolization on levels of hypoxia-inducible factor-1 α in rabbit VX2 liver tumors. *J Vasc Interv Radiol* 2007; 18: 639-645
 - 43 潘克俭, 罗凤鸣, 刘小菁, 王玉明, 李亚. HIF-1基因RNA干扰对肝癌HepG2细胞VEGF表达的抑制. *生物医学工程学杂志* 2007; 24: 1133-1136, 1166
 - 44 Huang WJ, Xia LM, Zhu F, Huang B, Zhou C, Zhu HF, Wang B, Chen B, Lei P, Shen GX. Transcriptional upregulation of HSP70-2 by HIF-1 in cancer cells in response to hypoxia. *Int J Cancer* 2009; 124: 298-305
 - 45 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
 - 46 Jiang M, Wang B, Wang C, He B, Fan H, Guo TB, Shao Q, Gao L, Liu Y. Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 α and endothelial progenitor cell differentiation by adenoviral transfer of small interfering RNA in vitro. *J Vasc Res* 2006; 43: 511-521
 - 47 Forooghian F, Das B. Anti-angiogenic effects of ribonucleic acid interference targeting vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible

- factor-1 α . *Am J Ophthalmol* 2007; 144: 761-768
- 48 Shin DH, Kim JH, Jung YJ, Kim KE, Jeong JM, Chun YS, Park JW. Preclinical evaluation of YC-1, a HIF inhibitor, for the prevention of tumor spreading. *Cancer Lett* 2007; 255: 107-116
- 49 Jiang J, Xia XB, Xu HZ, Xiong Y, Song WT, Xiong SQ, Li Y. Inhibition of retinal neovascularization by gene transfer of small interfering RNA targeting HIF-1 α and VEGF. *J Cell Physiol* 2009; 218: 66-74
- 50 Segura T, Schmokel H, Hubbell JA. RNA interference targeting hypoxia inducible factor 1 α reduces post-operative adhesions in rats. *J Surg Res* 2007; 141: 162-170
- 51 Taguchi A, Yanagisawa K, Tanaka M, Cao K, Matsuyama Y, Goto H, Takahashi T. Identification of hypoxia-inducible factor-1 α as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer Res* 2008; 68: 5540-5545
- 52 WeiXing C, Tiantian H, Qun N, Chaohui Y, Ping X. Inhibitory effect of hypoxia inducible factor-1 antisense oligonucleotide on growth of human hepatocellular carcinoma cells. *Med Oncol* 2008; 25: 88-92
- 53 Liu F, Wang P, Jiang X, Tan G, Qiao H, Jiang H, Krissansen GW, Sun X. Antisense hypoxia-inducible factor 1 α gene therapy enhances the therapeutic efficacy of doxorubicin to combat hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99: 2055-2061
- 54 Ding L, Chen X, Jing K, Wang H, Zhang W. Inhibition of the VEGF expression and cell growth in hepatocellular carcinoma by blocking HIF-1 α and Smad3 binding site in VEGF promoter. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2006; 26: 75-78
- 55 Yasui H, Ogura A, Asanuma T, Matsuda A, Kashiwakura I, Kuwabara M, Inanami O. Inhibition of HIF-1 α by the anticancer drug TAS106 enhances X-ray-induced apoptosis in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 2008; 99: 1442-1452
- 56 Nishi H, Nakada T, Kyo S, Inoue M, Shay JW, Isaka K. Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol Cell Biol* 2004; 24: 6076-6083
- 57 Sun X, Jiang H, Jiang X, Tan H, Meng Q, Sun B, Xu R, Krissansen GW. Antisense hypoxia-inducible factor-1 α augments transcatheter arterial embolization in the treatment of hepatocellular carcinomas in rats. *Hum Gene Ther* 2009; 20: 314-324
- 58 Song MS, Jeong JS, Ban G, Lee JH, Won YS, Cho KS, Kim IH, Lee SW. Validation of tissue-specific promoter-driven tumor-targeting trans-splicing ribozyme system as a multifunctional cancer gene therapy device in vivo. *Cancer Gene Ther* 2009; 16: 113-125
- 59 Won YS, Lee SW. Targeted retardation of hepatocarcinoma cells by specific replacement of alpha-fetoprotein RNA. *J Biotechnol* 2007; 129: 614-619
- 60 Cai X, Zhou J, Chang Y, Sun X, Li P, Lin J. Targeting gene therapy for hepatocarcinoma cells with the E. coli purine nucleoside phosphorylase suicide gene system directed by a chimeric alpha-fetoprotein promoter. *Cancer Lett* 2008; 264: 71-82
- 61 Nardinocchi L, Puca R, Sacchi A, D'Orazi G. Inhibition of HIF-1 α activity by homeodomain-interacting protein kinase-2 correlates with sensitization of chemoresistant cells to undergo apoptosis. *Mol Cancer* 2009; 8: 1
- 62 Koshikawa N, Takenaga K. Hypoxia-regulated expression of attenuated diphtheria toxin A fused with hypoxia-inducible factor-1 α oxygen-dependent degradation domain preferentially induces apoptosis of hypoxic cells in solid tumor. *Cancer Res* 2005; 65: 11622-11630
- 63 Wada H, Nagano H, Yamamoto H, Yang Y, Kondo M, Ota H, Nakamura M, Yoshioka S, Kato H, Damdinsuren B, Tang D, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Umeshita K, Nakamori S, Sakon M, Dono K, Wakasa K, Monden M. Expression pattern of angiogenic factors and prognosis after hepatic resection in hepatocellular carcinoma: importance of angiopoietin-2 and hypoxia-induced factor-1 α . *Liver Int* 2006; 26: 414-423

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选《中国学术期刊评价研究报告—RCCSE 权威、核心期刊排行榜与指南》

本刊讯 《中国学术期刊评价研究报告-RCCSE权威、核心期刊排行榜与指南》由中国科学评价研究中心、武汉大学图书馆和信息管理学院联合研发,采用定量评价和定性分析相结合的方法,对我国万种期刊大致浏览、反复比较和分析研究,得出了65个学术期刊排行榜,其中《世界华人消化杂志》位居396种临床医学类期刊第45位。(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)

三苯氧胺抗胆管癌机制的研究进展

沈东炎, 陈清西, 李文岗

■背景资料

近年来,胆管癌的发病率越来越高,由于其早期诊断困难,临床疗效差和5年生存率低,研究和开发新型有效化疗药物成为当务之急。

沈东炎, 厦门大学附属第一医院中心实验室 福建省厦门市 361003

陈清西, 厦门大学生命科学学院生物化学与分子生物学系 福建省厦门市 361005

李文岗, 厦门大学附属第一医院肝胆胰血管外科 福建省厦门市 361003

作者贡献分布: 本综述由沈东炎完成, 陈清西修改, 李文岗审校。

通讯作者: 李文岗, 副教授, 361003, 福建省厦门市, 厦门大学附属第一医院肝胆胰血管外科. lwg11861@163.com

电话: 0592-6593246 传真: 0592-2137280

收稿日期: 2009-12-05 修回日期: 2009-12-25

接受日期: 2009-12-29 在线出版日期: 2010-02-08

Advances in research on the mechanisms of tamoxifen therapy for cholangiocarcinoma

Dong-Yan Shen, Qing-Xi Chen, Wen-Gang Li

Dong-Yan Shen, Central Laboratory, the First Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian Province, China

Qing-Xi Chen, Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, China

Wen-Gang Li, Department of Hepato-Biliary-Pancreatic-Vascular Surgery, the First Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian Province, China

Correspondence to: Associate Professor Wen-Gang Li, Department of Hepato-Biliary-Pancreatic-Vascular Surgery, the First Hospital Affiliated to Xiamen University, Xiamen 361003, Fujian Province, China. lwg11861@163.com

Received: 2009-12-05 Revised: 2009-12-25

Accepted: 2009-12-29 Published online: 2010-02-08

Abstract

Cholangiocarcinoma (CCA) is a kind of malignancy arising from the epithelial cells lining the intrahepatic and extrahepatic bile ducts. Because of the difficulty in early diagnosis and poor therapeutic effect, the five-year survival rate for CCA patients is low. Therefore, there is an urgent need to develop new effective chemotherapy drugs for CCA. Tamoxifen (TAM), as a nonsteroidal antiestrogen mainly used for therapy of breast cancer, also exhibits antitumor activity against other tumors, including CCA. However, the exact mechanisms of tamoxifen therapy for CCA have not been completely elucidated yet. This paper reviews the recent advances in research on the mechanisms of TAM

therapy for CCA.

Key Words: Cholangiocarcinoma; Tamoxifen; Anti-estrogen; Tumor

Shen DY, Chen QX, Li WG. Advances in research on the mechanisms of tamoxifen therapy for cholangiocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 368-372

摘要

胆管癌(cholangiocarcinoma, CCA)是一种来源于肝内或肝外胆管上皮细胞的恶性肿瘤。早期诊断困难,临床疗效差和5年生存率低等特点使之成为临床重点攻坚肿瘤。因此,需要研究和开发新型有效的化疗药物。三苯氧胺(tamoxifen, TAM)是一种非甾体类抗雌激素药物,临床上主要用于乳腺癌的治疗,对其他肿瘤包括CCA也有抑制活性,但具体机制尚不完全清楚。本文主要阐述TAM抗CCA机制的研究进展。

关键词: 胆管癌; 三苯氧胺; 抗雌激素; 肿瘤

沈东炎, 陈清西, 李文岗. 三苯氧胺抗胆管癌机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2010; 18(4): 368-372

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/368.asp>

0 引言

全球范围内,胆管癌占全部胃肠道肿瘤的3%,占肝胆恶性肿瘤的10%-15%,是继肝癌之后第二大肝胆系恶性肿瘤^[1]。目前胆管癌的发病率和死亡率全球各不相同,东南亚地区的发病率最高,在日本及我国的发病率以每年递增5%的速度上升,是消化系肿瘤中上升速度最快的肿瘤^[2]。胆管癌临床疗效差,虽然手术切除是其最有效疗法,但手术体征少且术后复发率高,要延长存活期和提高生存质量很大程度上依赖于化疗药物的治疗^[3]。然而,胆管癌对化疗药物不敏感且极易产生耐药性,临床上还没有理想的化疗药物^[4]。因此,研究胆管癌耐药产生的分子机制并开发新型有效的化疗药物是目前研究治疗胆管癌的热点。三苯氧胺又称他莫昔芬

■同行评议者

邵升, 副教授, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

(tamoxifen, TAM), 是一种非甾体类抗雌激素药物。临床上, TAM已作为绝经前后妇女乳腺癌治疗的首选药物, 其不良反应小, 可长期应用, 且不用考虑分期因素, 同时也应用于子宫内膜癌和卵巢癌等妇科肿瘤的治疗^[5]。本文主要阐述TAM抗胆管癌所涉及的信号通路, 旨在为临床制定胆管癌治疗策略提供新思路。

1 TAM与肿瘤的关系

近年来, 国内外对TAM的临床和实验研究进展很快, 发现TAM不仅在妇科肿瘤中的应用具有一定疗效, 而且对肝癌、胰腺癌、结肠癌、肺癌、恶性神经胶质瘤、黑色素瘤、前列腺癌和肾癌等肿瘤也具有一定的治疗作用^[6-8], 同时还能提高肿瘤对化疗药物的敏感性而逆转肿瘤的耐药性^[9]。TAM的抗肿瘤机制可分为雌激素受体(estrogen receptor, ER)介导和非ER介导途径两种, 其中非ER介导途径主要涉及蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)、钙调蛋白(calmodulin, CaM)、c-Myc、神经酰胺、c-Jun激酶(c-Jun NH2-terminal kinase, JNK)和P38等蛋白所参与的信号途径^[8]; 另外, TAM在抗肿瘤机制方面可能还跟线粒体通透性的转变、氧化应激、转化生长因子以及细胞膜的流动性改变等有关^[8]。总之, TAM抗肿瘤机制在细胞及分子水平上存在着多条介导细胞凋亡的信号途径, 但这些途径尚需进一步的研究证实, 以增加对TAM介导肿瘤细胞凋亡信号途径机制的认识。

2 胆管癌耐药性

化疗是目前治疗肿瘤最有力最常用的手段, 耐药现象却是造成肿瘤治疗失败的主要因素。胆管癌对各种化疗药物不敏感且极易产生耐药性, 然而其耐药产生机制目前还不清楚。已有研究显示多种蛋白参与胆管癌耐药性的产生: 谷胱甘肽S转移酶-1(glutathione S-transferase- π , GSTP1-1)的抑制剂可以提高胆管癌细胞内阿霉素和顺铂的药物浓度, 逆转胆管癌细胞对这两种药的耐药性^[10,11]; 下调细胞半乳糖凝集素-3(galectin-3, Gal-3)的表达水平可以提高胆管癌细胞对化疗药物的敏感性^[12]; 多药耐药蛋白(multidrug resistance protein, MRP1)和GSTP1-1在未经过化疗的胆管癌组织中均有不同程度的高表达, 提示胆管癌的原发性多药耐药可能与MRP1和GSTP1-1有关^[13]; 胸腺嘧啶核苷酸合酶(thymidylate synthase, TS)活性的升高会导致胆

管癌细胞对5-氟尿嘧啶产生耐药^[14]; 转染突变型I κ B α 可致使胆管癌细胞对多种化疗药物产生耐药性^[15]。目前针对胆管癌耐药机制的研究尚处于初级阶段, 这些耐药蛋白参与的上下游信号通路将是以后研究的重点。

3 TAM具有抑制胆管癌细胞增殖的作用

目前国内外关于TAM抗胆管癌作用的研究报道较少。TAM可以在体外抑制胆管癌细胞系SK-ChA-1、MZ-ChA-1和QBC939的生长, 并诱导细胞凋亡, 其抑制率和凋亡率呈时间和剂量依赖性^[16-21]; 在异种移植胆管癌细胞系SK-ChA-1的裸鼠体内, TAM可使肿瘤体积减小80%^[20]; TAM对QBC939的增殖抑制率明显高于5-氟尿嘧啶和顺铂等临床常用化疗药物, QBC939对TAM的敏感性也明显高于肝癌细胞和卵巢癌细胞^[21]; TAM还可提高QBC939胞内阿霉素和顺铂的药物浓度, 从而提高阿霉素和顺铂的细胞毒性^[19]。可见, TAM在胆管癌细胞和动物模型上具有明显的抗胆管癌作用, 其具体机制报道如下。

4 TAM抗胆管癌的机制

4.1 TAM通过ER介导胆管癌细胞凋亡

人类正常的胆管细胞不表达ER, 但在发生胆管炎、多囊性肝病时, 胆管细胞可表达ER- α 及ER- β , 雌激素可促进胆管细胞的增殖^[22]。国内有研究报道称临床胆管癌组织中有ER的表达, 其表达阳性率在40%-50%, 明显比癌旁组织高, 其ER的高表达与胆管癌的恶性程度和预后有关, 提示胆管癌可能是一种性激素依赖性肿瘤^[23,24]。国外研究也显示在肝内胆管癌组织和胆管癌细胞系HuH-28均有表达ER- α 和ER- β 两种ER, 而在胆管癌细胞系TFK-1和Mz-ChA-1只表达ER- β , 17 β -雌二醇(17 β -estradiol, 17 β -E2)均可刺激这3种胆管癌细胞的生长, 17 β -E2可通过ER诱导胆管癌细胞系HuH-28高表达血管内皮生长因子及其受体从而促进肿瘤细胞的生长, ER拮抗剂可抑制这种作用^[25,26]。Sampson等^[16]采用RT-PCR技术在胆管癌细胞株SK-ChA-1检查到ER mRNA的存在, 并且用Northern blot技术证实存在着全长6.5 kb的ER mRNA片段, 另外他也用免疫共沉淀技术证明了ER蛋白的存在。同时Sampson等还发现TAM可以拮抗17 β -E2诱导胆管癌细胞的生长, 因此, 他们提出TAM展现出这种抗胆管癌作用可能是通过ER途径介导的, 但不排除存在其他途径。由此看来, 胆管癌组织和多种胆管癌细胞系可能

■研发前沿

TAM是一种广谱的抗肿瘤药物, 对胆管癌细胞也具有明显的增殖抑制作用, 但具体机制尚不完全清楚。TAM与CaM关系密切, CaM所涉及的信号通路是TAM抗胆管癌机制研究的热点。

■相关报道

Pawar等所在实验室对TAM抗胆管癌机制有系统的研究,特别是对CaM所涉及的信号通路有深入的研究报道。

存在ER的表达,TAM可能通过ER介导胆管癌细胞凋亡,但是也有不少研究发现,TAM在不表达ER的胆管癌细胞系也具有抗胆管癌活性,因此,TAM抗胆管癌可能还存在其他机制。

4.2 TAM通过调节Fas信号通路介导胆管癌细胞凋亡 Fas属于肿瘤坏死因子 α 受体家族成员,广泛分布于各种正常或病态组织的细胞表面,Fas/FasL系统参与细胞凋亡过程^[27]。CaM是一种重要的Ca²⁺结合蛋白,当细胞内Ca²⁺升高,CaM可以与多种蛋白结合,从而参与细胞增殖、分化和凋亡等多条信号途径^[27]。Pan等^[17]研究发现,TAM能明显抑制Fas表达阳性的SK-ChA-1的生长并诱导细胞凋亡,而对Fas表达阴性组或是Fas抗体预处理的阳性组没有明显的效果,而且在Fas阳性和阴性组均没有表达ER,这提示TAM可能通过非ER依赖的Fas介导细胞凋亡。Vickers等^[18]发现 γ 干扰素(γ -IFN)可以增强TAM对Fas表达阳性的SK-ChA-1细胞的生长抑制效果,但具体机制还不清楚。两者联合的抑制率比单独用TAM或 γ -IFN有明显的提高,提示两种药物具有协同作用,因此提出 γ -IFN和TAM两种药的联合可为临床胆管癌的治疗提供一个新思路。Ahn等^[27]发现Fas可以直接与CaM结合,Fas上的CaM结合位点位于胞质段的死亡结构域DD,当Fas活化后,CaM在30 min内迅速与Fas结合,2 h后慢慢脱离Fas。CaM与Fas的结合可能延缓Fas介导细胞凋亡的起始,当钙调蛋白拮抗剂TAM加入时,TAM可能与CaM结合而促进CaM离开Fas,从而促进Fas介导细胞凋亡。但具体的机制还有待于进一步研究。

4.3 TAM通过调节AKT/c-FLIP信号通路介导胆管癌细胞凋亡 最近研究发现TAM抗胆管癌机制还存在其他信号途径。Pawar等^[20]在研究胆管癌细胞系SK-ChA-1中发现,TAM可在细胞和动物模型中抑制丝/苏氨酸蛋白激酶AKT的磷酸化和下调细胞凋亡抑制蛋白(cellular FLICE like inhibitory protein, c-FLIP)的表达。AKT是一种调控细胞生长的蛋白激酶,在多种恶性肿瘤中高表达^[28]。AKT可直接与CaM结合促使自身磷酸化,活化的AKT胞膜易位磷酸化相关蛋白,进而调控细胞生长信号途径^[29]。TAM可能是通过抑制CaM与AKT的结合而抑制AKT的磷酸化,从而阻滞胆管癌细胞的生长。c-FLIP是一种抑制起始凋亡蛋白酶活化的凋亡抑制蛋白,在多种恶性肿瘤中高表达,并与肿瘤的耐药性相关,包括

胆管癌^[30-32]。最近发现c-FLIP也可与CaM结合^[32]。Pawar等报道^[20],诱导SK-ChA-1细胞高表达野生型c-FLIP可降低细胞对TAM的敏感性,而细胞转染c-FLIP显性突变体(敲除c-FLIP与CaM的结合位点)则可明显提高TAM的细胞毒性。但是,在没有表达c-FLIP的胆管癌细胞HuCCT-1,TAM不能发挥抑制肿瘤生长的作用。可见,c-FLIP的表达及其CaM结合位点是TAM发挥抗胆管癌活性的重要决定因子。当TAM与c-FLIP竞争结合CaM,c-FLIP无法活化而失去抗凋亡作用,而如果使c-FLIP高表达,TAM诱导细胞凋亡的作用将被减弱。由此可见,TAM发挥抗胆管癌作用不管是抑制AKT活化还是下调c-FLIP的表达都是通过CaM信号通路实现的。据文献^[33,34]报道,在多种恶性肿瘤中AKT活性抑制和c-FLIP表达下调常同时出现,但具体的机制并不清楚。在Pawar等报道的实验中^[20],TAM促使AKT活性抑制和c-FLIP表达下调是发生在转录水平还是在蛋白翻译后水平还不清楚,但至少可以说明一点,AKT和c-FLIP都可与CaM结合,作为钙调蛋白拮抗剂的TAM可能通过CaM信号通路诱导胆管癌细胞凋亡。

4.4 其他途径 Liu等^[9]报道在表达多药耐药蛋白P糖蛋白的胆管癌细胞系QBC939中,TAM可与阿霉素和顺铂竞争结合P糖蛋白结合位点,从而提高阿霉素和顺铂的胞内浓度,增加其细胞毒性。可见,TAM可以在一定程度上逆转胆管癌的耐药性,提高胆管癌对抗肿瘤药物的敏感性。另外,Han等^[21]报道TAM可能通过上调P53蛋白的表达量而实现诱导QBC939细胞周期阻滞和细胞凋亡,具体机制还有待深入研究。

5 结论

TAM对胆管癌细胞具有抑制增殖和诱导凋亡作用,在动物模型体内也可明显抑制肿瘤的生长。目前研究TAM抗胆管癌机制主要涉及到CaM、Fas、AKT、FLIP和P53,以及逆转胆管癌的耐药性,但这几种信号途径具体机制和彼此间的联系以及哪种信号途径起主要作用还有待于深入。TAM因其抗癌性强且广谱、不良反应小和价格便宜等优点已成为临床热衷的化疗药物。相信随着研究的深入,TAM抗胆管癌的机制将被逐步阐明,并借此认识理清胆管癌发病的分子机制,以期寻找抗胆管癌的主要基因靶点,制定胆管癌靶向分子基因治疗。

6 参考文献

- 1 Khan SA, Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Beck A, Elliott P, Thomas HC. Changing international trends in mortality rates for liver, biliary and pancreatic tumours. *J Hepatol* 2002; 37: 806-813
- 2 Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 115-125
- 3 Sirica AE. Cholangiocarcinoma: molecular targeting strategies for chemoprevention and therapy. *Hepatology* 2005; 41: 5-15
- 4 Anderson CD, Pinson CW, Berlin J, Chari RS. Diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma. *Oncologist* 2004; 9: 43-57
- 5 Gelmann EP. Tamoxifen for the treatment of malignancies other than breast and endometrial carcinoma. *Semin Oncol* 1997; 24: S165-S170
- 6 Lu YS, Hsu C, Li CC, Kuo SH, Yeh KH, Yang CH, Hsu CH, Wu CY, Cheng AL. Phase II study of combination doxorubicin, interferon-alpha, and high-dose tamoxifen treatment for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2004; 51: 815-819
- 7 Taylor OM, Benson EA, McMahon MJ. Clinical trial of tamoxifen in patients with irresectable pancreatic adenocarcinoma. The Yorkshire Gastrointestinal Tumour Group. *Br J Surg* 1993; 80: 384-386
- 8 Mandlekar S, Kong AN. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 2001; 6: 469-477
- 9 王宝成, 李志, 毕经旺, 韩少荣, 狄剑时, 刘欣, 史杰. 大剂量他莫昔芬逆转晚期结肠癌多药耐药性的临床研究. *肿瘤防治杂志* 2005; 12: 1636-1638
- 10 Nakajima T, Takayama T, Miyanishi K, Nobuoka A, Hayashi T, Abe T, Kato J, Sakon K, Naniwa Y, Tanabe H, Niitsu Y. Reversal of multiple drug resistance in cholangiocarcinoma by the glutathione S-transferase-pi-specific inhibitor O1-hexadecyl-gamma-glutamyl-S-benzylcysteinyl-D-phenylglycine ethylester. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 861-869
- 11 Tepsiri N, Chaturat L, Sripa B, Namwat W, Wongkham S, Bhudhisawasdi V, Tassaneeyakul W. Drug sensitivity and drug resistance profiles of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2748-2753
- 12 Wongkham S, Junking M, Wongkham C, Sripa B, Chur-In S, Araki N. Suppression of galectin-3 expression enhances apoptosis and chemosensitivity in liver fluke-associated cholangiocarcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100: 2077-2084
- 13 刘伟, 安杰, 崔忠, 焦喜林, 赵增顺. 胆管癌组织中MRP1/GST- π 的表达及临床意义. *中国现代普通外科进展* 2009; 12: 672-675
- 14 Habara K, Ajiki T, Kamigaki T, Nakamura T, Kuroda Y. High expression of thymidylate synthase leads to resistance to 5-fluorouracil in biliary tract carcinoma in vitro. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 1127-1132
- 15 Chen RF, Li ZH, Kong XH, Chen JS. Effect of mutated IkappaB α transfection on multidrug resistance in hilar cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 726-728
- 16 Sampson LK, Vickers SM, Ying W, Phillips JO. Tamoxifen-mediated growth inhibition of human cholangiocarcinoma. *Cancer Res* 1997; 57: 1743-1749
- 17 Pan G, Vickers SM, Pickens A, Phillips JO, Ying W, Thompson JA, Siegal GP, McDonald JM. Apoptosis and tumorigenesis in human cholangiocarcinoma cells. Involvement of Fas/APO-1 (CD95) and calmodulin. *Am J Pathol* 1999; 155: 193-203
- 18 Vickers SM, Jhala NC, Ahn EY, McDonald JM, Pan G, Bland KI. Tamoxifen (TMX)/Fas induced growth inhibition of human cholangiocarcinoma (HCC) by gamma interferon (IFN-gamma). *Ann Surg* 2002; 235: 872-878
- 19 Liu ZH, He YP, Qin H. The growth-inhibition effect of tamoxifen in the combination chemotherapeutics on the human cholangiocarcinoma cell line QBC939. *Mol Biol Rep* 2009 Sep 13. [Epub ahead of print]
- 20 Pawar P, Ma L, Byon CH, Liu H, Ahn EY, Jhala N, Arnoletti JP, McDonald JM, Chen Y. Molecular mechanisms of tamoxifen therapy for cholangiocarcinoma: role of calmodulin. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1288-1296
- 21 Han P, Kang JH, Li HL, Hu SX, Lian HH, Qiu PP, Zhang J, Li WG, Chen QX. Antiproliferation and apoptosis induced by tamoxifen in human bile duct carcinoma QBC939 cells via upregulated p53 expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385: 251-256
- 22 Alvaro D, Mancino MG, Onori P, Franchitto A, Alpini G, Francis H, Glaser S, Gaudio E. Estrogens and the pathophysiology of the biliary tree. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3537-3545
- 23 范正军, 吴阳, 王志军. 雌、孕激素受体在肝门部胆管癌中的表达及意义. *中华医学杂志* 2005; 85: 2651-2653
- 24 雷元卫, 陈廷喧. 胆管癌性激素受体的表达及其临床病理学意义. *湖北省卫生职工医学院学报* 2004; 17: 5-7
- 25 DeMorrow S. Cholangiocarcinoma: estrogen-induced autocrine effects of VEGF on cell proliferation. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 164-165
- 26 Mancino A, Mancino MG, Glaser SS, Alpini G, Bolognese A, Izzo L, Francis H, Onori P, Franchitto A, Ginanni-Corradini S, Gaudio E, Alvaro D. Estrogens stimulate the proliferation of human cholangiocarcinoma by inducing the expression and secretion of vascular endothelial growth factor. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 156-163
- 27 Ahn EY, Lim ST, Cook WJ, McDonald JM. Calmodulin binding to the Fas death domain. Regulation by Fas activation. *J Biol Chem* 2004; 279: 5661-5666
- 28 Schmitz KJ, Otterbach F, Callies R, Levkau B, Hölscher M, Hoffmann O, Grabellus F, Kimmig R, Schmid KW, Baba HA. Prognostic relevance of activated Akt kinase in node-negative breast cancer: a clinicopathological study of 99 cases. *Mod Pathol* 2004; 17: 15-21
- 29 Dong B, Valencia CA, Liu R. Ca(2+)/calmodulin directly interacts with the pleckstrin homology domain of AKT1. *J Biol Chem* 2007; 282: 25131-25140
- 30 Rogers KM, Thomas M, Galligan L, Wilson TR, Allen WL, Sakai H, Johnston PG, Longley DB. Cellular FLICE-inhibitory protein regulates chemotherapy-induced apoptosis in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1544-1551
- 31 Ullenhag GJ, Mukherjee A, Watson NF, Al-Attar AH, Scholefield JH, Durrant LG. Overexpression of FLIPL is an independent marker of poor prognosis in colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 2007;

■创新盘点

本文阐述的TAM抗胆管癌机制所涉及的信号通路与其他综述报道的TAM抗肿瘤机制有所不同,可为研究胆管癌药物作用靶点提供新的思路。

■同行评价

本文立意新颖独特,内容详实,文献充分,可读性较好.

- 13: 5070-5075
- 32 Pawar PS, Micoli KJ, Ding H, Cook WJ, Kappes JC, Chen Y, McDonald JM. Calmodulin binding to cellular FLICE-like inhibitory protein modulates Fas-induced signalling. *Biochem J* 2008; 412: 459-468
- 33 Chen Y, Xu J, Jhala N, Pawar P, Zhu ZB, Ma L, Byon CH, McDonald JM. Fas-mediated apoptosis

in cholangiocarcinoma cells is enhanced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of AKT signaling and FLICE-like inhibitory protein. *Am J Pathol* 2006; 169: 1833-1842

34 Panka DJ, Mano T, Suhara T, Walsh K, Mier JW. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activity regulates c-FLIP expression in tumor cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 6893-6896

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 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 $37.6^{\circ}\text{C} \pm 1.2^{\circ}\text{C}$, $45.6\text{岁} \pm 24\text{岁}$, $56.4\text{ d} \pm 0.5\text{ d}$. $3.56 \pm 0.27\text{ pg/ml}$ 应为 $3.56\text{ ng/L} \pm 0.27\text{ ng/L}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或 $\mu\text{mol/L}$ 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 $10\text{ cm} \times 6\text{ cm} \times 4\text{ cm}$. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_2 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 $1 \times 10^{-3}\text{ g}$ 与 $5 \times 10^{-7}\text{ g}$ 之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

经腹超声在炎症性肠病诊察中的应用

张杰, 王胰, 曹晓沧

张杰, 曹晓沧, 天津医科大学总医院 天津市 300052
王胰, 天津医科大学 天津市 300200
中国博士后科学基金资助项目, No. 200902280
作者贡献分布: 本文由张杰与王胰综述; 曹晓沧审校.
通讯作者: 曹晓沧, 副主任医师, 300052, 天津市和平区鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化科. doccaoxc@163.com
电话: 022-60363615
收稿日期: 2009-12-10 修回日期: 2009-12-31
接受日期: 2010-01-04 在线出版日期: 2010-02-08

Application of transabdominal ultrasound in the detection of inflammatory bowel disease

Jie Zhang, Yi Wang, Xiao-Cang Cao

Jie Zhang, Xiao-Cang Cao, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China
Yi Wang, Tianjin Medical University, Tianjin 300200, China
Supported by: the China Postdoctoral Science Foundation, No. 200902280
Correspondence to: Xiao-Cang Cao, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, 154 Anshan Road, Tianjin 300052, China. doccaoxc@163.com
Received: 2009-12-10 Revised: 2009-12-31
Accepted: 2010-01-04 Published online: 2010-02-08

Abstract

As the incidence of inflammatory bowel disease (IBD) increases in recent years, accurate diagnosis of the disease becomes much more important. Moreover, the wide use of new targeted drugs requires precise evaluation of their therapeutic effects. Transabdominal ultrasound, as a newly emerging noninvasive method, plays an important role in diagnosing IBD, evaluating disease activity, and observing therapeutic effects. In this article, we will review the application of transabdominal ultrasound in the detection of IBD.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Crohn's disease; Ulcerative colitis; Ultrasound

Zhang J, Wang Y, Cao XC. Application of transabdominal ultrasound in the detection of inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 373-378

摘要

随着炎症性肠病(inflammatory bowel disease,

IBD)近年来发病率的增加及新的靶向药物的应用, 对于其诊断及药物疗效随访越来越受到重视. 经腹超声(transabdominal ultrasound, US)作为一种无创的新兴检查方法疾病诊断、病变活动性的评估、药物疗效的随访观察等方面有重要作用, 成为研究热点. 现本文将其在炎症性肠病诊察中的应用做一综述.

关键词: 炎症性肠病; 克罗恩病; 溃疡性结肠炎; 超声

张杰, 王胰, 曹晓沧. 经腹超声在炎症性肠病诊察中的应用. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 373-378
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/373.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一类病因尚不明确的以肠道免疫功能紊乱为主的慢性非特异性炎症疾病, 主要包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC). 之前认为本病好发于北美及欧洲等西方国家, 但近年来国内多家医院的数据显示, IBD就诊病例逐年增多, 可能与人们生活方式改变有关, 也可能对该病的认识水平提高有关. 目前对IBD的诊断手段较多^[1], 但主要依靠临床表现、内镜及组织病理学检查等. 此外, 近年来关于靶向药物(如单克隆抗体)治疗IBD的疗效评估也成为学者研究的热点, 由于各种超声设备及技术的进步, 其作为一种实时、无创、便捷、廉价的检查方法已越来越多地受到临床的关注, 经腹超声在对IBD诊察中显示出较好的应用价值.

1 检查方法

20年前, 经腹肠道超声(transabdominal ultrasound, US)已开始应用于临床辅助诊断肠道炎症性疾病, 近年来随着超声设备及技术的发展, 临床超声检查方法也有显著进步. 目前超声对IBD的诊断方法主要包括传统肠道超声、口服对比剂的肠道超声、静脉注射对比剂超声造影、能量多普勒及门静脉和肠系膜动脉的彩色多普勒超声检测^[2-4].

1.1 传统肠道超声 传统US检查前患者准备各家

■背景资料

进几十年来, 随着炎症性肠病发病率的持续增高, 多种新的治疗方法及检查方法也逐渐应用于临床并成为研究热点. 而经腹超声作为一种无创、简便、安全、实时的检查方法在炎症性肠病的诊断、活动性评估及药物疗效随访方面已显示出较好的应用价值.

■同行评议者

江学良, 主任医师, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

■研发前沿

在传统经腹超声的基础上,近年来逐渐被广泛使用的静脉注射对比剂的超声造影成为关注焦点,而新的造影剂及量化分析软件的出现对IBD的诊断也增添了亮点。

报道不一,但通常情况下检查前至少禁食4 h,有的则要求检查前一晚开始禁食^[5],以减少肠蠕动和肠腔内气体,一般不使用肠道对比剂。由于结肠内气体含量较多, Limberg等^[6]报道使用轻泻剂、肠道清洗及服用解痉剂(如东莨菪碱)可以获得较好的观察效果。肠道超声检查探头频率为3.5-14 MHz。通常,检查者先用3.5-5 MHz的探头经腹常规扫查总揽全局,然后采用7.5-14 MHz凸阵或线阵探头对可疑病变段肠管进行细节扫查,能获得更好的对比度分辨率,可以观察肠壁厚度、分层、腔内情况、有无狭窄及扩张、肠管蠕动等。但传统肠道超声也有其缺点,即使能做好肠道准备工作,仍可能因为肠腔内残余内容物及肠管空虚而影响对肠壁结构的观察。传统肠道超声是观察诊断肠道炎症性疾病的基础检查方式,很多新的超声检查方法皆在此方法上改进以更有利于诊断。

1.2 口服对比剂的肠道超声 近期有报道采用口服不可吸收的无回声对比剂如聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG),可以将肠腔充盈,更好的显示肠壁结构,降低不同观察者间对IBD诊断的差异率^[7]。Válek等^[8]通过鼻-空肠灌肠管注入阴性对比剂进行经腹超声检查,该方法的灵敏性与传统超声、小肠造影等方法相比无统计学差异,并且避免了辐射,对需长期监测病变的患者价值颇大。Valette等^[9]也认为经直肠注入温水即所谓超声水造影能充盈扩张肠道,减少气体干扰,从而更清晰的评估细小病变。具体扫查方法与传统肠道超声无异,但其对肠壁层次结构的观察显著优于传统肠道超声,对传统肠道超声显示不明确的病灶,其诊断更明确、可靠,但如果采用灌肠等方法又受到患者耐受程度的限制,因此常常选择性应用于能耐受的患者。

1.3 静脉注射对比剂超声造影 超声造影检查采用的造影剂有由氟碳类物质制成的微球、乳剂和脂质体(如Sono Vue)及包裹空气或氟碳类气体的多聚体(如Sonavist),这些造影剂中的微泡直径约2.5 μm ,在血液中平均存在约12 min后溶解,通过呼吸呼出。通常先进行传统肠道超声扫查,定位病变段肠管,然后将造影剂注入静脉内,采用色彩编码的多普勒超声(colour coded doppler sonography, CCDS)观察感兴趣区的血流灌注情况,同时使用量化分析软件(如Qontrast),获得感兴趣区超声信号强度变化图,计算出时间强度曲线,再转化为各种参数曲线,得到多种参数,如信号峰值强度(peak of the signal

intensity, PEAK)、达峰时间(time-to-peak, TTP)及局部血流量(regional blood volume, RBV),最后定量评估各种参数变化来评估病情^[10]。由于静脉注射对比剂超声造影采用特定软件分析,更客观,更易对多个指标进行量化而越来越多地被使用。

1.4 能量多普勒 与静脉超声造影有异曲同工之处,由于不用注射对比剂免除了患者痛苦及一些副作用,比较容易在临床工作中开展,能量多普勒能观察肠壁微小血流,不受流速、血管方位、声速角度的影响,有利于末梢血流、低速血流信号的显示,从而评估肠壁血管密度。除了观察肠壁血管化程度,能量多普勒也可以评估IBD患者的一些并发症情况,如确定瘘管走行,区分脓肿和腹腔肿块等^[11]。但能量多普勒也有一定局限性,如不能显示血流方向、速度快慢及性质,如果能量阈值调节不当会引起伪像,阈值过高致使一些低流量低速血管不能显示,过低则可能出现非血流性的着色,而且其相对静脉超声造影,能早期发现IBD复发或指示疾病进入非活动期的灵敏度较低,且对病变段肠管只能半定量分析,缺少标准化参数。

1.5 门静脉和肠系膜动脉的彩色多普勒超声检测 患者检查前常隔夜空腹以减少肠道内气体干扰,然后沿着肠系膜动脉或门静脉的纵轴扫查,在其起始部取样获得血流动力学参数,如收缩期峰流速、舒张末期流速、平均流速、搏动指数、阻力指数等,通过对这些参数进行量化比较,进而判断IBD是否处于活动期及治疗效果^[12-14]。

由此可见,传统肠道超声是基石,在进一步的超声检查前定位病变肠段,然后根据患者和临床实际情况采用口服对比剂的肠道超声以便更细致观察病变肠段或者可以用能量多普勒或彩色多普勒半定量及定量分析肠壁血管化程度,门静脉和肠系膜动脉的彩色多普勒则选择性使用以获得血管的血流动力学参数。

2 IBD的超声表现

2.1 CD的超声表现 CD和UC均属于炎性肠病,两者的超声表现有一定的共通之处,但由于其病理特点的不同,在超声上也有其不同点。CD最常用的诊断指标之一为肠壁增厚,肠壁僵硬,这主要是由于炎症水肿及纤维化造成。其他一些主要征象包括: (1)肠壁层次改变或消失: 正常肠壁超声下分5层,最内为强回声黏膜层,向外依次

为低回声黏膜肌层, 强回声黏膜下层, 低回声肌层, 强回声的浆膜层. CD急性期由于水肿及炎症浸润而各层界限消失, 主要表现为低回声. 慢性期, 肠壁分层可以出现, 但层次减少, 主要表现为强回声, 提示纤维化^[8,15]; (2)深溃疡形成: 黏膜下层的强回声界限中断^[11]; (3)肠壁微血管增多: 在能量多普勒和超声造影上能观察到肠壁信号较正常肠管增强; (4)肠蠕动改变及结肠袋消失: 急性期肠蠕动亢进, 慢性期则减弱, 慢性期纤维组织增生使结肠袋消失^[7]; (5)肠腔狭窄: 急性期和慢性期均可有狭窄, 超声可见狭窄近端肠腔扩张; (6)肠系膜改变: 肠系膜因纤维脂肪组织增生而增厚, 回声增强, 肠壁外缘不规则, 并可见多个无回声或低回声反应性增生淋巴结肿大; (7)脓肿、瘘管形成.

2.2 UC的超声表现 和CD相同, UC最常见的表现也是肠壁增厚, 可能由于CD是全肠壁炎症, 其肠壁厚度可以超过6 mm, 而UC肠壁超过6 mm罕见^[16], 其他CD与UC的鉴别点包括: (1)肠壁的层次在超声图像中仍然存在, 因为UC的病理改变主要是表浅黏膜的炎症而不是跨肠壁病变^[5]; (2)肠管外壁不规则并有较多强回声的脂肪组织多见于CD, 这与CD患者促结缔组织生长因子增多有很好的相关性; (3)使用彩色多普勒或能量多普勒观察肠壁血流信号在CD上更丰富^[10]; (4)CD患者肠系膜淋巴结肿大更多更常见^[10].

总之, 无论是UC还是CD, 二者均有一些超声表现的共同点, 如肠壁增厚, 肠壁层次消失或减少, 溃疡形成, 肠壁微血管增多而致血流信号增加, 肠腔狭窄或扩张, 结肠袋消失使肠管显示僵硬, 肠蠕动改变, 肠系膜回声增强, 肠壁外缘淋巴结肿大等. 但就不同的方面而, UC和CD因其各自的病理特点不同, 而评估标准各不相同, 应仔细鉴别.

3 评估体系

传统经腹超声可以观察肠壁厚度、肠壁分层情况、肠壁可压缩性、肠壁彩色多普勒信号强度及其腹膜增厚程度(与肠系膜纤维化相关)等, 从而判断IBD患者是否处于活动期并进行分级. 近年来学者们逐步建立起更为详尽和具有可操作性的量化指标系统.

就肠壁厚度而言, 较常用的指标为厚度大于3 mm. Fraquelli等^[17]关于US诊断CD的Meta分析指出, 将肠壁增厚大于4 mm作为分界点, 诊断的敏感性由88%降为75%, 但特异性从93%提高

为97%, 认为在初次诊断时用4 mm作为参考值比较敏感, 而随诊病例则应以3 mm作为疾病复发的界限. Drews等^[18]通过将肠壁厚度、血管化程度的组织学与US表现相比较发现, 慢性期炎症局限于黏膜层, 所以肠壁可以无增厚, 且无可探及的血流信号, 以此评估病变活动性, 观察随访药物治疗效果. 肠壁厚度最容易观察进而评价病变情况, 可操作性及客观性强, 易于被临床超声诊断医师掌握.

另外, 通过彩色多普勒观察肠系膜上动脉、肠系膜下动脉的血流动力学变化, 可以评估IBD是否处于活动期. CD活动期肠系膜上动脉的血供增加, 血流量明显高于正常人及缓解期患者, 有的学者^[7]认为可以将500 mL/min作为判断是否处于活动的阈值, 尽管如此, 血流量也存在“灰色地带”(450-600 mL/min), 在这一范围内, 健康人群、轻度活动期CD患者及缓解期患者可有重叠^[11,19], 很难对疾病活动性做出正确评估. 另外肠系膜上动脉收缩期峰流速在不同时期患者基本无异, 但是舒张末期流速、平均流速在活动期患者较高, 而阻力指数则较低. 同样这些变化在UC主要表现在肠系膜下动脉^[20,21], 这与肠系膜上下动脉供血区域不同相关. 由于肠系膜血管血流动力学变化受多种因素(肌源性、局部代谢因素、自主神经等)影响, 检查前需要排除如此多因素的影响较困难, 因此彩色多普勒观察肠系膜动脉并不能应用于所有患者(约60%-70%患者可行)而且操作起来比较耗时, 使得这一技术不能在临床常规使用.

能量多普勒及静脉注射对比剂的超声造影对判断IBD是否处于活动期的方法很多. Migaleddu等^[22,23]观察发现病变肠壁可以出现3种不同的强化方式: 黏膜下层为主的强化, 从黏膜下层开始的全肠壁强化以及从浆膜外血管开始的由外向内的全肠壁强化. 这3种强化方式与CD处于活动性息息相关, 且与CDAI有较好的相关性. 国外学者还通过建立半定量肠壁血管化程度观察IBD的活动性. Heyne等及Drews等运用Limberg分型将能量多普勒观察到的肠壁厚度联合其血管化程度分为5型: Limberg 0: 正常肠壁; Limberg 1: 肠壁增厚; Limberg 2: 肠壁增厚并有较短的血管出现; Limberg 3: 肠壁增厚并出现较长的血管; Limberg 4: 肠壁增厚且出现能与肠系膜相连的长血管, 分级越高, 表示疾病越活跃^[18,24]. 也有学者采用软件定量分析造影后各项参数, 如PEAK(即扩散末期信号强度的最大

■相关报道

Girlich等通过对4名志愿者与20名证实为CD的患者进行静脉注射对比剂的超声造影检查, 运用定量分析软件, 发现病变的与正常的肠壁间多种灌注参数均有显著的统计学差异, 使定量评估肠壁血管化程度及炎症活动性成为可能.

■创新盘点

国内尚无较全面的关于经腹超声诊断炎症性肠病的相关综述,本文总结了多种超声检查方法在此类疾病中的应用价值,特别是结合了超声造影及能量多普勒等研究热点,有一定的新颖性。

值)、TTP(即造影剂达到最大扩散程度的时间)及RBV(与曲线下面积成正比)变化情况判断IBD肠壁血管化程度^[10],在CD患者以上3种参数均显著高于正常志愿者,研究者认为这种定量方法在判断肠壁血管化程度上更精确,能排除不同观察者间经验等主观因素影响,可操作性及重复性强。能量多普勒及静脉注射对比剂的超声造影能观察到与炎症活动度息息相关的血管化情况,这是所有评估方式中最直接的一种途径。

总之,肠壁厚度作为判断IBD活动性最简单的方法目前为临床广泛采用,根据初发或随诊选择不同的指标(4 cm或3 cm),彩色多普勒观察的肠系膜上、下动脉的血流动力学参数影响因素较多,目前尚无统一阈值,且操作耗时,临床使用受限,能量多普勒及静脉注射对比剂的超声造影是最直观、最直接评估IBD活动性的方式,随着造影剂、技术及仪器的发展,这一评估方式越来越多的为广大超声诊断医师采用。

4 诊断准确性及局限性

对于IBD的US诊断灵敏性和特异性各家报道不一,Pascu等^[25]通过观察肠壁厚度、肠壁分层情况、肠壁可压缩性、肠壁彩色多普勒信号强度及其腹膜增厚程度,建立起超声活动指数来量化IBD活动性,并显示出与临床有较好的相关性,且超声评估UC活动性与临床指标间的相关性高于CD。Rispo等^[26]认为US诊断IBD的灵敏度为92%,特异性为96.7%。而Calabrese等^[27]认为其诊断特异性较低为66.7%,灵敏度较高为96.2%。这可能与大家所选取的诊断标准阈值不一无关,如前所述将肠壁厚度阈值由3 cm提高到4 cm,诊断的灵敏性下降但特异性提高。但Horsthuis等^[28]的Meta分析发现尚无有关实验证实这种阈值差异到底有无统计学意义。而且,采用不同的超声检查方法,对IBD诊断的敏感性、特异性、准确性均不相同,De Pascale等^[29]的研究结果表明静脉注射对比剂的超声造影诊断IBD的敏感性、特异性、准确性分别为96%、90%、94%,均明显高于彩色能量多普勒及通过肠壁厚度判断IBD,另外一些研究^[30,31]也同样认为静脉注射对比剂的超声造影在诊断IBD方面也更有优势。

另外,CD患者不同肠段,US诊断的准确性也不一,大多数文献均认为末段回肠病变最易检查,敏感性为95%,而横结肠及左半结肠病变的显示敏感性则为82%和88%,空肠最难诊断,其敏感性为72%^[32]。对于CD的并发症,Maconi等^[33]

和Gasche等^[34]发现,以CT或手术病理作为判定标准,US能诊断出83%和100%的CD相关腹腔脓肿。而UC,通过将US与内镜或X线钡餐造影作比较发现降结肠和乙状结肠是US最易诊断的肠段,其敏感性为97.6%,而升结肠和横结肠病变的诊断敏感性分别为76.6%,71.7%,国内学者的相关数据与以上研究结果也基本一致,但认为对于横结肠病变的定位符合率较低,可能与横结肠位置变化较大有关,直肠由于其位置比较深在及受气体影响最难观察^[32,35],位于直肠及肛周的病变,也许内镜超声更有优势^[36,37]。与内镜和X线钡餐造影检查一样,检查的诊断准确度也与检查者经验有相关性。相关文献报道对于一个经验丰富者而言,其诊断敏感性从76%-92%不等^[32,36,38],诊断特异性也较高。

近年来,MRI也作为IBD的一种无辐射检查方法越来越多地被临床工作者重视,有的学者^[39]通过把MRI及US分别与内镜相比较发现对终末段回肠炎症性肠病的诊断,MRI与内镜及US具有较高的一致性。但也有的学者^[40]将MRI与US评估CD范围及活动性分别做了对比,认为US相对于每段肠管而言,其诊断敏感性(91%)、特异性(98%)及准确性(95%)均高于MRI(分别为83%,97%,91%),两种检查方法均显示出对回盲部病变显示的较好的敏感性(分别为100%和93%),对于瘘管的检测,US的敏感性、特异性、准确性分别为82%、100%、90%,而MRI则为70%、92%、80%,另外本研究还表明通过肠壁厚度判断CD活动性US明显优于MRI。

由此可见,随着检查方式及技术的发展,超声诊断IBD的敏感性、特异性及准确性逐步提高,横向比较可以与X线钡餐造影、内镜及MRI等方法相媲美,甚至更有优势。单从超声本身来讲,其诊断UC和CD的准确性各不相同,对不同病变段肠管,诊断的敏感性、特异性及准确性也不同,对于检查盲区,可适当选用其他检查方式。

US检查也有一定局限性,如其常常会漏诊十二指肠和空肠病变,直肠、肛管和部分乙状结肠则由于其本身的解剖位置较深,探头不足以穿透到达此深度和其内气体干扰,很难对病变进行观察。另外,US空间分辨率不够高,难以发现早期表浅的病变^[5]等。

5 结论

US作为一种非侵入性的、实时、快捷、性价比高的检查方法,通过采用不同的检查方法,如传

统肠道超声、能量多普勒及静脉注射对比剂的超声造影、门静脉和肠系膜动脉的彩色多普勒超声检测等方法来观察肠壁厚度、分层情况、肠壁多普勒信号强度、肠蠕动情况、肠系膜情况及相应的并发症等可以初步确定IBD的诊断。当然,该项技术目前还不够成熟,受检查者熟练程度、仪器设备情况、受检查肠道情况等多种因素影响,应用于临床对疾病的诊断还不是十分准确。但随着技术进步,特别是彩色多普勒和能量多普勒的应用,使之在评估病变的活动性,动态观察病情变化情况方面能有效替代内镜和X线钡餐造影检查,尤其对临床进行个体化治疗、判断疗效、确定治疗方案方面有一定的指导作用。为此还需要进一步的更广泛的临床资料和经验的积累。

6 参考文献

- Vucelic B. Inflammatory bowel diseases: controversies in the use of diagnostic procedures. *Dig Dis* 2009; 27: 269-277
- Ignée A, Jedrejczyk M, Schuessler G, Jakubowski W, Dietrich CF. Quantitative contrast enhanced ultrasound of the liver for time intensity curves-Reliability and potential sources of errors. *Eur J Radiol* 2009 Jan 19. [Epub ahead of print]
- Dietrich CF. Comments and illustrations regarding the guidelines and good clinical practice recommendations for contrast-enhanced ultrasound (CEUS)--update 2008. *Ultraschall Med* 2008; 29 Suppl 4: S188-S202
- Dietrich CF, Jedrejczyk M, Ignée A. Sonographic assessment of splanchnic arteries and the bowel wall. *Eur J Radiol* 2007; 64: 202-212
- Horsthuis K, Stokkers PC, Stoker J. Detection of inflammatory bowel disease: diagnostic performance of cross-sectional imaging modalities. *Abdom Imaging* 2008; 33: 407-416
- Limberg B, Osswald B. Diagnosis and differential diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's disease by hydrocolonoscopy. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: 1051-1057
- Parente F, Greco S, Molteni M, Anderloni A, Bianchi Porro G. Imaging inflammatory bowel disease using bowel ultrasound. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 283-291
- Válek V, Kysela P, Vavříková M. Crohn's disease at the small bowel imaging by the ultrasound-enteroclysis. *Eur J Radiol* 2007; 62: 153-159
- Valette PJ, Rioux M, Pilleul F, Saurin JC, Fouque P, Henry L. Ultrasonography of chronic inflammatory bowel diseases. *Eur Radiol* 2001; 11: 1859-1866
- Girlich C, Jung EM, Iesalnieks I, Schreyer AG, Zorger N, Strauch U, Schacherer D. Quantitative assessment of bowel wall vascularisation in Crohn's disease with contrast-enhanced ultrasound and perfusion analysis. *Clin Hemorheol Microcirc* 2009; 43: 141-148
- Cammarota T, Sarno A, Robotti D, Bonenti G, Deboni P, Versace K, Astegiano M, Pera A. US evaluation of patients affected by IBD: how to do it, methods and findings. *Eur J Radiol* 2009; 69: 429-437
- Sigirci A, Baysal T, Kutlu R, Aladağ M, Saraç K, Harputluoğlu H. Doppler sonography of the inferior and superior mesenteric arteries in ulcerative colitis. *J Clin Ultrasound* 2001; 29: 130-139
- Sjekavica I, Barbarić-Babić V, Krznarić Z, Molnar M, Cuković-Cavka S, Stern-Padovan R. Assessment of Crohn's disease activity by doppler ultrasound of superior mesenteric artery and mural arteries in thickened bowel wall: cross-sectional study. *Croat Med J* 2007; 48: 822-830
- Homann N, Klarmann U, Fellermann K, Brüning A, Klingenberg-Noftz R, Witthöft T, Stange EF, Ludwig D. Mesenteric pulsatility index analysis predicts response to azathioprine in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 126-132
- Nylund K, Ødegaard S, Hausken T, Folvik G, Lied GA, Viola I, Hauser H, Gilja OH. Sonography of the small intestine. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1319-1330
- Hagiu C, Badea R. Applicability of abdominal ultrasonography in inflammatory bowel diseases. *J Gastrointest Liver Dis* 2007; 16: 205-209
- Fraquelli M, Colli A, Casazza G, Paggi S, Colucci A, Massironi S, Duca P, Conte D. Role of US in detection of Crohn disease: meta-analysis. *Radiology* 2005; 236: 95-101
- Drewe BH, Barth TF, Hänle MM, Akinli AS, Mason RA, Muche R, Thiel R, Pauls S, Klaus J, von Boyen G, Kratzer W. Comparison of sonographically measured bowel wall vascularity, histology, and disease activity in Crohn's disease. *Eur Radiol* 2009; 19: 1379-1386
- van Oostayen JA, Wasser MN, Griffioen G, van Hogeand RA, Lamers CB, de Roos A. Diagnosis of Crohn's ileitis and monitoring of disease activity: value of Doppler ultrasound of superior mesenteric artery flow. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 88-91
- Lukić-Kostić L, Jović J, Sekulović S. [Significance of ultrasonography of the terminal ileum in moderate Crohn's disease] *Vojnosanit Pregl* 2006; 63: 787-792
- Byrne MF, Farrell MA, Abass S, Fitzgerald A, Varghese JC, Thornton F, Murray FE, Lee MJ. Assessment of Crohn's disease activity by Doppler sonography of the superior mesenteric artery, clinical evaluation and the Crohn's disease activity index: a prospective study. *Clin Radiol* 2001; 56: 973-978
- Migaleddu V, Quaia E, Scano D, Virgilio G. Inflammatory activity in Crohn disease: ultrasound findings. *Abdom Imaging* 2008; 33: 589-597
- Migaleddu V, Scanu AM, Quaia E, Rocca PC, Dore MP, Scanu D, Azzali L, Virgilio G. Contrast-enhanced ultrasonographic evaluation of inflammatory activity in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2009; 137: 43-52
- Heyne R, Rickes S, Bock P, Schreiber S, Wermke W, Lochs H. Non-invasive evaluation of activity in inflammatory bowel disease by power Doppler sonography. *Z Gastroenterol* 2002; 40: 171-175
- Pascu M, Roznowski AB, Müller HP, Adler A, Wiedenmann B, Dignass AU. Clinical relevance of transabdominal ultrasonography and magnetic resonance imaging in patients with inflammatory bowel disease of the terminal ileum and large bowel. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 373-382
- Rispo A, Imbriaco M, Celentano L, Cozzolino A,

■应用要点

经腹超声,特别是彩色多普勒和能量多普勒的应用能有效替代内镜和X线钡餐造影检查,实现动态、实时观察,对于炎症性肠病的诊断、活动性评估、指导确定治疗方案及判断疗效方面有一定的应用价值。

■同行评价

本文综述了经腹超声在炎症性肠病诊断中的应用,内容比较全面,思路清楚。但该项技术应用于临床还不够成熟,受检查者熟练程度、仪器设备情况、受检查肠道情况等多种因素影响,对疾病诊断、活动性评估等还不够准确。

- Camera L, Mainenti PP, Manguso F, Sabbatini F, D'Amico P, Castiglione F. Noninvasive diagnosis of small bowel Crohn's disease: combined use of bowel sonography and Tc-99m-HMPAO leukocyte scintigraphy. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 376-382
- 27 Calabrese E, La Seta F, Buccellato A, Virdone R, Pallotta N, Corazziari E, Cottone M. Crohn's disease: a comparative prospective study of transabdominal ultrasonography, small intestine contrast ultrasonography, and small bowel enema. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 139-145
- 28 Horsthuis K, Bipat S, Bennink RJ, Stoker J. Inflammatory bowel disease diagnosed with US, MR, scintigraphy, and CT: meta-analysis of prospective studies. *Radiology* 2008; 247: 64-79
- 29 De Pascale A, Garofalo G, Perna M, Priola S, Fava C. Contrast-enhanced ultrasonography in Crohn's disease. *Radiol Med* 2006; 111: 539-550
- 30 Schmidt T, Hohl C, Haage P, Honnef D, Mahnken AH, Krombach G, Piroth W, Günther RW. Phase-inversion tissue harmonic imaging compared to fundamental B-mode ultrasound in the evaluation of the pathology of large and small bowel. *Eur Radiol* 2005; 15: 2021-2030
- 31 Guidi L, De Franco A, De Vitis I, Armuzzi A, Semeraro S, Roberto I, Papa A, Bock E, Gasbarrini G, Fedeli G. Contrast-enhanced ultrasonography with SonoVue after infliximab therapy in Crohn's disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2006; 10: 23-26
- 32 Parente F, Greco S, Molteni M, Cucino C, Maconi G, Sampietro GM, Danelli PG, Cristaldi M, Bianco R, Gallus S, Bianchi Porro G. Role of early ultrasound in detecting inflammatory intestinal disorders and identifying their anatomical location within the bowel. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 1009-1016
- 33 Maconi G, Bollani S, Bianchi Porro G. Ultrasonographic detection of intestinal complications in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1643-1648
- 34 Gasche C, Moser G, Turetschek K, Schober E, Moeschl P, Oberhuber G. Transabdominal bowel sonography for the detection of intestinal complications in Crohn's disease. *Gut* 1999; 44: 112-117
- 35 刘东屏, 陶春梅, 张艳梅, 王雪梅. 63例炎症性肠病经腹超声检查与结肠镜的对比分析. *实用诊断与治疗杂志* 2008; 22: 177-179
- 36 夏璐, 刘慧黎. 内镜超声检查在炎症性肠病中的应用. *诊断学理论与实践* 2008; 7: 595-598
- 37 殷坪, 张亚利, 唐志鹏. 大肠超声内镜检查在炎症性肠病中的应用. *中国消化内镜* 2007; 1: 1-5
- 38 Hollerbach S, Geissler A, Schiegl H, Kullmann F, Lock G, Schmidt J, Schlegel J, Schoelmerich J, Andus T. The accuracy of abdominal ultrasound in the assessment of bowel disorders. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 1201-1208
- 39 董洋, 黄力. 小儿口服甘露醇后小肠MRI成像与小肠内镜及超声内镜检查对比. 第一届全球华人消化内镜学术大会资料汇编(一), 2005: 103
- 40 Martínez MJ, Ripollés T, Paredes JM, Blanc E, Martí-Bonmatí L. Assessment of the extension and the inflammatory activity in Crohn's disease: comparison of ultrasound and MRI. *Abdom Imaging* 2009; 34: 141-148

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 •

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)

TIMP3、E-Cadherin基因在食管癌细胞系EC1和EC9706中的甲基化及蛋白表达

赵璇, 李沛, 马俊芬, 赵继敏, 杨洪艳, 董子明

赵璇, 李沛, 马俊芬, 赵继敏, 杨洪艳, 董子明, 郑州大学基础医学院病理生理教研室 河南省郑州市 450052
河南省高校科技创新人才支持计划基金资助项目, No. 2009HAST1T001
郑州大学优秀研究生培育基金资助项目, No. A121
作者贡献分布: 赵璇与李沛对此文所作贡献均等; 此课题由李沛与董子明设计; 研究过程由赵璇与李沛操作完成; 实验中得到马俊芬、赵继敏及杨洪艳技术支持; 数据分析及论文写作由李沛、赵璇及董子明完成。
通讯作者: 董子明, 教授, 450052, 河南省郑州市科学大道100号, 郑州大学基础医学院病理生理教研室. dongzm@zzu.edu.cn
电话: 0371-67781957
收稿日期: 2009-11-06 修回日期: 2009-12-13
接受日期: 2009-12-21 在线出版日期: 2010-02-08

Methylation and protein expression of the TIMP-3 and E-cadherin genes in human esophageal carcinoma cell lines EC1 and EC9706

Xuan Zhao, Pei Li, Jun-Fen Ma, Ji-Min Zhao, Hong-Yan Yang, Zi-Ming Dong

Xuan Zhao, Pei Li, Jun-Fen Ma, Ji-Min Zhao, Hong-Yan Yang, Zi-Ming Dong, Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Supported by: the Program for Science & Technology Innovation Talents in Universities of Henan Province, No. 2009HAST1T001; and the Outstanding Graduate Student Training Fund of Zhengzhou University, No. A121
Correspondence to: Professor Zi-Ming Dong, Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, 100 Kexue Avenue, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. dongzm@zzu.edu.cn
Received: 2009-11-06 Revised: 2009-12-13
Accepted: 2009-12-21 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To investigate the methylation and protein expression of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) and E-cadherin genes in human esophageal carcinoma cell lines EC1 and EC9706 untreated or treated with the demethylating agent 5-Aza-CdR.

METHODS: Methylation-specific PCR (MSP) and immunocytochemistry were used to detect the methylation and protein expression

of TIMP-3 and E-cadherin genes in EC1 and EC9706 cells untreated or treated with 5 μ mol/L of 5-Aza-CdR.

RESULTS: The TIMP-3 gene was not methylated, and the TIMP-3 protein was weakly expressed in both EC1 and EC9706 cells. The E-cadherin gene was hypermethylated in EC1 cells but semi-methylated in EC9706 cells. The E-cadherin protein expression was undetectable in both cell types. After treatment with 5-Aza-CdR, the TIMP-3 gene remained non-methylated, and the expression of the TIMP-3 protein was slightly upregulated in the two cell types. In contrast, E-cadherin gene methylation was reversed, and the protein expression was strongly upregulated in both cell types.

CONCLUSION: E-cadherin gene methylation occurs in both EC1 and EC9706 cells, and 5-Aza-CdR can effectively reverse such methylation. TIMP-3 gene inactivation seems unrelated to methylation as 5-Aza-CdR can only slightly up-regulate the expression of TIMP-3 protein.

Key Words: Esophageal carcinoma; Methylation; 5-Aza-CdR; Tissue inhibitor of metalloproteinase-3; E-cadherin

Zhao X, Li P, Ma JF, Zhao JM, Yang HY, Dong ZM. Methylation and protein expression of the TIMP-3 and E-cadherin genes in human esophageal carcinoma cell lines EC1 and EC9706. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 379-383

摘要

目的: 观察食管癌细胞系EC1和EC9706中TIMP3、E-Cadherin基因甲基化的水平及蛋白表达, 以及去甲基化药物5-Aza-CdR对其的影响。

方法: 应用甲基化特异性PCR(MSP)和免疫细胞化学的方法, 分别检测体外培养的食管癌细胞系EC1和EC9706中TIMP3和E-Cadherin基因甲基化水平及蛋白表达。用5 μ mol/L 5-Aza-CdR处理两种细胞系后, 用同

■背景资料

原发性食管癌是我国最常见的恶性肿瘤, 严重威胁人类健康。近几年随着研究甲基化手段的进步, 使更多的食管癌相关基因的甲基化情况得以明确, 但迄今为止尚未见临床上利用上述食管癌相关基因甲基化状态的变化, 进行食管癌的早期诊断及干预甲基化的基因治疗来防治食管肿瘤的发生。

■同行评议者

张志坚, 教授, 中国人民解放军福州总医院消化内科

■研究前沿

食管癌的表遗传研究对于食管癌的发病机制、细胞免疫与防御、细胞分化以及预防治疗等方面具有十分重要的意义。弄清楚食管癌中基因甲基化状态的改变及其作用方式并建立相应的筛查技术,将为食管癌的研究带来更深入的发展。

样的方法检测其甲基化水平及蛋白表达,观察药物的影响。

结果: TIMP3基因在食管癌细胞系EC1和EC9706中均表现为非甲基化,蛋白呈现弱表达;而E-Cadherin基因在EC1中发生甲基化,EC9706中发生半甲基化,蛋白表达均缺失。5-Aza-CdR作用后的两种细胞系中, TIMP3基因仍为非甲基化,而蛋白表达似有所增强;但E-Cadherin基因甲基化得到了逆转,蛋白表达由原来的不表达,转变为强表达。

结论: 5-Aza-CdR能够有效逆转E-Cadherin基因甲基化,并使其蛋白恢复表达; TIMP3基因的失活似与甲基化机制无关, 5-Aza-CdR对其蛋白表达的恢复作用微弱。

关键词: 食管癌; 甲基化; 5-Aza-CdR; TIMP3; E-Cadherin

赵璇, 李沛, 马俊芬, 赵继敏, 杨洪艳, 董子明. TIMP3、E-Cadherin基因在食管癌细胞系EC1和EC9706中的甲基化及蛋白表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 379-383
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/379.asp>

0 引言

在肿瘤发生过程中, 甲基化模式发生逆转、相关基因的甲基化紊乱发生率很高, 是肿瘤发生中基因表达沉默的主要机制, 尤其表现在肿瘤抑制基因和错配修复基因。近年来随着肿瘤甲基化状态研究的深入, 越来越多基因的甲基化被认为与肿瘤的发生、发展及预后有关^[1-3]。但基因的甲基化能否作为临床的相关判定指标, 去甲基化药物能否作为临床用药, 存在着争议^[1], 因此我们选定与食管癌发生、发展有关的一些基因: 细胞凋亡相关基因TIMP3及与肿瘤远端转移有关的E-Cadherin基因, 在体外培养的食管癌细胞系EC1、EC9706中研究这两种基因的甲基化状态, 并对比使用去甲基化药物5-Aza-CdR作用后其甲基化逆转的情况及蛋白表达的改变, 为甲基化指标及去甲基化药物的临床应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人食管癌细胞株EC1和EC9706(本室留存); 5-Aza-CdR购自Sigma公司; Methylamp One-Step DNA Modification Kit购自EPIGENTEK公司; Taq酶购自TaKaRa公司; CpG甲基转移酶购自NEB公司; 引物均为Invitrogen公司合成;

E-Cadherin抗体购自Santa Cruz公司; TIMP3抗体、免疫组织化学染色、DAB显色试剂盒购自北京博奥森公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人食管癌细胞株EC1和EC9706, 于RPMI 1640(Gibco公司)培养液(内含100 g/L胎牛血清, 100 kU/L青霉素和100 kU/L链霉素)中贴壁培养(37℃, 50 mL/L CO₂)。隔天换液, 取对数生长期细胞进行后续实验。

1.2.2 甲基化特异性PCR(MSP): EC1和EC9706分别按照 5×10^5 细胞数接种到培养瓶中, 在培养基中培养24 h, 细胞贴壁后, 加药组在2种细胞中分别加入含有5 μmol/L的5-Aza-CdR的培养基^[4], 未加药组在正常的完全培养基中, 培养72 h后, 分别按试剂盒详细说明提取细胞DNA(基因组DNA提取试剂盒, 天根公司), 紫外分光光度计检测DNA浓度和纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性。用CpG甲基转移酶(*M.Sss I*)处理正常食管上皮DNA作为阳性对照, 未处理的作为阴性对照, 按Methylamp One-Step DNA Modification Kit说明采用亚硫酸氢钠法修饰DNA。引物序列如表1, 反应条件为: 95℃预变性10 min, 95℃ 30 s, Tm℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35个循环, 72℃延伸2 min。反应结束后取产物5 μL进行20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 使用凝胶成像分析系统分析电泳结果。其中出现甲基化条带, 而没有非甲基化条带的, 判定为甲基化; 出现非甲基化条带而没有甲基化条带的判定为非甲基化; 同时出现甲基化和非甲基化条带的, 判定为半甲基化。

1.2.3 免疫细胞化学: 用免疫细胞化学方法分别检测TIMP3和E-Cadherin基因蛋白表达。将细胞接种在底部放有盖玻片的24孔板中, 用1.2.2中的方法处理加药组和未加药组, 72 h后, 40 g/L多聚甲醛固定细胞后取出盖玻片, 分别使用TIMP3和E-Cadherin基因的一抗, 按照试剂盒说明进行染色。结果依据阳性细胞所占百分比及着色深浅进行判定^[5], 阳性细胞数计: <5%为0分; 5%-25%为1分; 26%-50%为2分; 51%-75%为3分; >76%为4分。细胞着色强度计分: 无显色: 0分; 淡黄色: 1分; 棕黄色: 2分; 棕褐色: 3分。2项评分总和为总积分, 0-1分为阴性(-), 2-3分为弱阳性(+), ≥4分为阳性(++).

2 结果

2.1 MSP检测甲基化的水平 TIMP3基因在食管

表 1 甲基化分析的引物序列及温度

基因	正向引物	反向引物	大小(bp)	T(°C)
TIMP3	M 5'-CGTTTCGTTATTTTGTTCGGTTTC-3'	5'-CCGAAAACCCCGCCTCG-3'	116	59
	U 5'-TTTTGTTTGTATTTTGTTCGGTTTC-3'	5'-CCCCCAAAAACCCACCTCA-3'	122	
E-cad	M 5'-TTAGGTTAGAGGGTATCGCGT-3'	5'-TAATTTTAGGTTAGAGGGTATTGT-3'	116	57
	U 5'-TAACTAAAAATTCACCTACCGAC-3'	5'-CACAACCAATCAACAACACA-3'	97	53

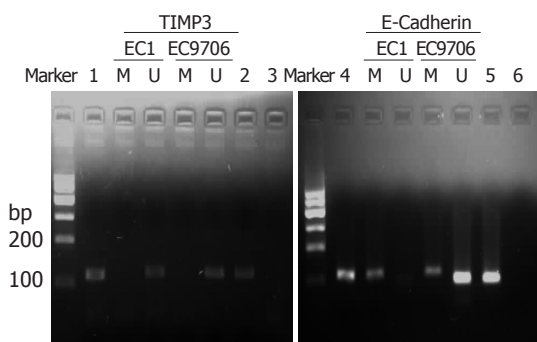


图 1 TIMP3、E-Cadherin基因在食管癌细胞系EC1和EC9706中的甲基化状态. 1, 4: 阳性对照; 2, 5: 阴性对照; 3, 6: 空白对照; M: 甲基化产物; U: 非甲基化产物.

癌细胞系EC1和EC9706中都出现非甲基化条带, 即发生了非甲基化. E-Cadherin基因在EC1中出现甲基化条带, 发生了甲基化, 而在EC9706中甲基化条带和非甲基化条带都出现, 说明发生了半甲基化. 使用去甲基化药物5-Aza-CdR分别处理2组细胞后, TIMP3基因结果仍为非甲基化, 与用药物刺激前没有差别. 而E-Cadherin基因使用5-Aza-CdR后, 2种细胞中只出现了去甲基化条带, 说明其甲基化的情况得到了逆转(图1, 2).

2.2 免疫细胞化学检测蛋白表达 结果见图3, TIMP3基因在食管癌细胞系EC1和EC9706中都表现为弱阳性(+), 经5-Aza-CdR处理仍为弱阳性(+), 表达稍见增强; E-Cadherin基因在食管癌细胞系EC1和EC9706中都表现为阴性, 经5-Aza-CdR处理后, 表达均增强, 为阳性(+++).

3 讨论

Costello等^[5]总结了甲基化与癌症的发生关系, 认为个别基因的甲基化与肿瘤的发生密切相关, 因此特殊肿瘤组织应有特异性, 且特异性基因的甲基化与肿瘤化疗反应及患者的生存有直接的关联, 故异常的DNA甲基化模式可能是有用的分子标志. 近年来, 人们通过对几种癌、癌旁组织和正常组织DNA的分析, 确定某些癌基因

(H-Ras、c-Myc)低甲基化和抑癌基因(Rb、p16)的高甲基化改变是细胞癌变的一个重要特征^[1-3]. 且甲基化水平与肿瘤的生物学特性密切相关, 不同肿瘤的不同期, 发生状态不同.

TIMP3是一种抑癌基因^[6,7], 他可以抑制肿瘤生长、血管生成和侵袭转移, 而且可以促进凋亡. 而TIMP3表达降低或缺失往往是肿瘤发生的重要因素. 大量的文献表明^[8,9], 在胃癌、乳腺癌等肿瘤中, 该基因的沉默都与自身甲基化相关. 我们对食管癌细胞系EC1和EC9706中TIMP3基因甲基化和蛋白表达的情况进行研究, 发现TIMP3基因在两种细胞中均未发生甲基化, 但其蛋白表达呈弱阳性, 可也有研究认为在食管癌腺癌中有部分出现甲基化^[7].

E-Cadherin基因为钙依赖性的跨膜黏附分子, 主要参与同源细胞间的连接, 是上皮细胞间相互黏附和维持组织结构稳定的重要蛋白, E-Cadherin基因表达降低或缺失, 与肿瘤的分化、侵袭及远处转移密切相关^[11,12]. 对胃癌、结直肠癌、乳腺癌及前列腺癌的研究均表明, E-Cadherin启动子区CpG岛的甲基化与该基因的表达降低有关^[10,11]. 也有研究认为, 该基因的甲基化在部分食管癌患者中存在, 与食管癌分化有关^[12]. 我们研究证实, 食管癌细胞系EC1中

■ 相关报道

Costello等总结了甲基化与癌症的发生关系, 认为个别基因的甲基化与肿瘤的发生密切相关, 因此特殊肿瘤组织应有特异性, 且特异性基因的甲基化与肿瘤化疗反应及患者的生存有直接的关联, 故异常的DNA甲基化模式可能是有用的分子标志.

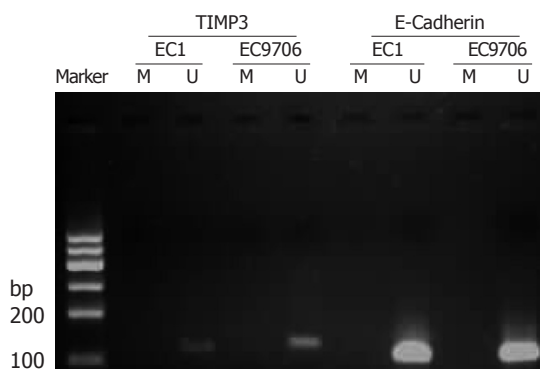


图 2 经5-Aza-CdR处理后的TIMP3、E-Cadherin基因甲基化状态. M: 甲基化产物; U: 非甲基化产物.

■应用要点

随着首张人类表观基因组图谱绘制成功,用基因的甲基化进行诊断和治疗越来越成为可能。肿瘤临床治疗的目标之一就是找到早期诊断的标志物和针对患者的高效、低毒性的疗法。研究基因的甲基化在食管癌发病中的作用以及干预后效果,探讨食管癌中基因甲基化状态的改变及其作用方式,将为食管癌的分子机制研究及其临床治疗和预后提供了新的思路。

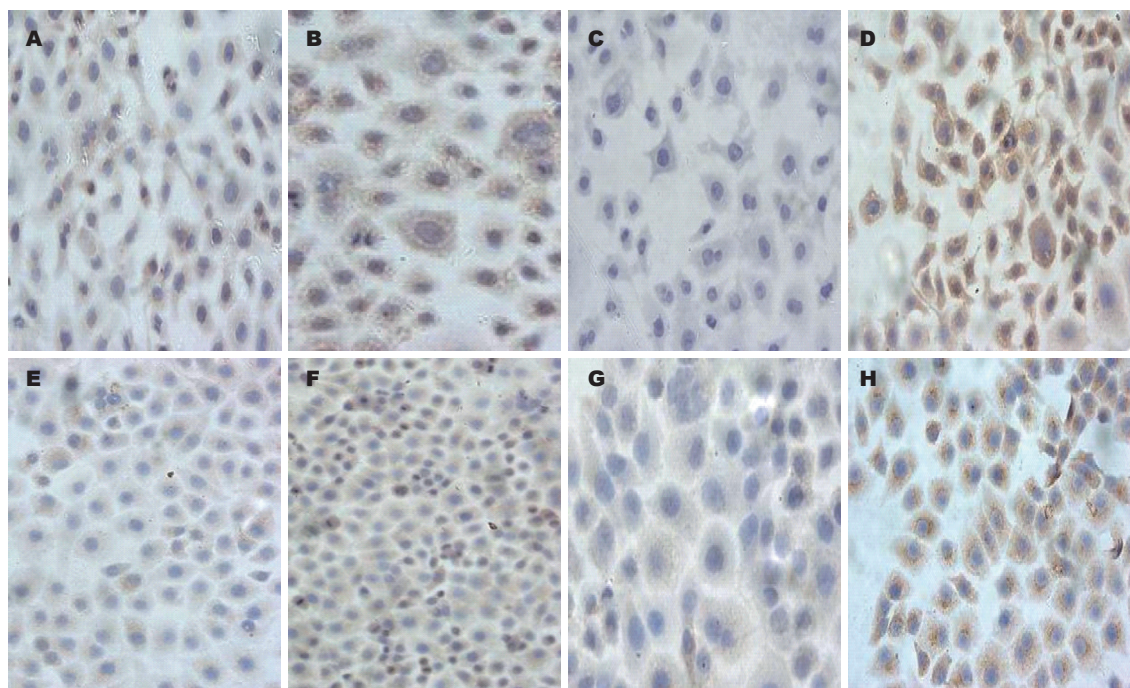


图3 食管癌细胞系EC1和EC9706中TIMP3、E-Cadherin基因的表达。A: EC1-TIMP3; B: EC1-TIMP3-5-Aza-CdR; C: EC1-E-Cadherin; D: EC1-E-Cadherin-5-Aza-CdR; E: EC9706-TIMP3; F: EC9706-TIMP3-5-Aza-CdR; G: EC9706-E-Cadherin; H: EC9706-E-Cadherin-5-Aza-CdR。

出现甲基化,而EC9706中为半甲基化,其蛋白表达均缺失。

甲基化抑制剂5-Aza-CdR是一种竞争性核苷酸类甲基转移酶抑制剂,已广泛应用于各种肿瘤的甲基化逆转^[13,14],其应用于食管癌的效果并不确定。我们经过此药物作用于两种食管癌细胞,发现5-Aza-CdR对于已发生甲基化的E-Cadherin基因有很好的逆转作用,而对非甲基化的TIMP3无明显影响,相应的免疫细胞化学检测的蛋白表达也得出同样的结论。

无论哪种基因作为食管癌甲基化的诊断和预后的指标,其敏感性一定要充分考虑,因此,筛选肿瘤发生的特异性甲基化基因,用DNA甲基化诊断食管癌还需要进一步研究。使用去甲基化药物对恶性肿瘤的治疗效果是否优于传统的化疗药、食管癌治疗的合理用药、5-Aza-CdR自身的不稳定性和高选择性都要充分的考虑。所以,去甲基化药物广泛应用于临床食管癌治疗还需要更深入的研究。

4 参考文献

- 1 Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; 21: 5427-5440
- 2 Wong ML, Tao Q, Fu L, Wong KY, Qiu GH, Law FB, Tin PC, Cheung WL, Lee PY, Tang JC, Tsao GS, Lam KY, Law S, Wong J, Srivastava G. Aberrant promoter hypermethylation and silencing of the

critical 3p21 tumour suppressor gene, RASSF1A, in Chinese oesophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2006; 28: 767-773

- 3 Fang JY, Lu R, Mikovits JA, Cheng ZH, Zhu HY, Chen YX. Regulation of hMSH2 and hMLH1 expression in the human colon cancer cell line SW1116 by DNA methyltransferase 1. *Cancer Lett* 2006; 233: 124-130
- 4 朱新江, 孟春风, 彭过, 戴冬秋. 5-Aza-dc和TSA对胃癌细胞系p16和hMLH-1基因甲基化水平及表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1837-1841
- 5 Costello JF, Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001; 38: 285-303
- 6 Anand-Apte B, Bao L, Smith R, Iwata K, Olsen BR, Zetter B, Apte SS. A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem Cell Biol* 1996; 74: 853-862
- 7 Gu P, Xing X, Tänzer M, Röcken C, Weichert W, Ivanauskas A, Pross M, Peitz U, Malferteiner P, Schmid RM, Ebert MP. Frequent loss of TIMP-3 expression in progression of esophageal and gastric adenocarcinomas. *Neoplasia* 2008; 10: 563-572
- 8 Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 2847-2851
- 9 Bachman KE, Herman JG, Corn PG, Merlo A, Costello JF, Cavennee WK, Baylin SB, Graff JR. Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggest a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res* 1999; 59: 798-802
- 10 Chan AO, Lam SK, Wong BC, Wong WM, Yuen MF, Yeung YH, Hui WM, Rashid A, Kwong YL. Promoter methylation of E-cadherin gene in

- gastric mucosa associated with *Helicobacter pylori* infection and in gastric cancer. *Gut* 2003; 52: 502-506
- 11 Yuecheng Y, Hongmei L, Xiaoyan X. Clinical evaluation of E-cadherin expression and its regulation mechanism in epithelial ovarian cancer. *Clin Exp Metastasis* 2006; 23: 65-74
- 12 Corn PG, Heath EI, Heitmiller R, Fogt F, Forastiere AA, Herman JG, Wu TT. Frequent hypermethylation of the 5' CpG island of E-cadherin in esophageal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2765-2769
- 13 Wijermans P, Lübbert M, Verhoef G, Bosly A, Ravoet C, Andre M, Ferrant A. Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *J Clin Oncol* 2000; 18: 956-962
- 14 李洪利, 张伟栋, 李文通, 尹崇高. 5-氮杂脱氧胞苷对肝癌细胞HepG2中抑癌基因FHIT表达的影响. *癌症* 2009; 28: 967-971

■同行评价

本文具有一定的科学性、创新性和可读性,能从一定程度上反映国内外这一领域的研究近况。

编辑 李瑞敏 电编 吴鹏朕

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

• 消息 •

汤姆森—路透公布 2008 年 WJG 影响因子 2.081

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

巢式MSP法检测胃癌患者血浆 $p16$ 、MGMT基因甲基化

王燕, 周力, 陈晓琴, 张维, 王岚

■背景资料

$p16$ 基因是目前甲基化研究较多的肿瘤抑制基因, 已有研究显示胃癌组织中存在 $p16$ 基因启动子区甲基化, 相比之下, 对胃癌患者MGMT基因启动子甲基化状态的研究较少。在恶性肿瘤患者血清或血浆中存在外周血循环DNA, 这种细胞外游离DNA来源于肿瘤细胞, 已有研究证实肿瘤患者血清或血浆DNA与原发性组织存在一致的基因改变, 为应用外周血进行分子诊断提供了可能。

王燕, 周力, 陈晓琴, 张维, 王岚, 贵州省贵阳医学院附属医院消化内科 贵州省贵阳市 550001
贵州省卫生厅基金资助项目, No. 2007856
贵阳医学院青年基金资助项目, No. K2007-91
作者贡献分布: 本课题由王燕设计, 周力指导; 陈晓琴、张维及王岚参与课题完成。
通讯作者: 王燕, 副主任医师, 550001, 贵州省贵阳市, 贵州省贵阳医学院附属医院消化内科. gy-wangyan@163.com
电话: 0851-6855119-3026
收稿日期: 2009-11-20 修回日期: 2009-12-30
接受日期: 2010-01-04 在线出版日期: 2010-02-08

Detection of $p16$ and MGMT promoter methylation in gastric carcinomas by nested methylation-specific polymerase chain reaction

Yan Wang, Li Zhou, Xiao-Qin Chen, Wei Zhang, Lan Wang

Yan Wang, Li Zhou, Xiao-Qin Chen, Wei Zhang, Lan Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550001, Guizhou Province, China
Supported by: the Foundation of Health Department of Guizhou Province, No. 2007856; and the Youth Foundation of Guiyang Medical University, No. K2007-91
Correspondence to: Yan Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical University, Guiyang 550001, Guizhou Province, China. gy-wangyan@163.com
Received: 2009-11-20 Revised: 2009-12-30
Accepted: 2010-01-04 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To analyze aberrant promoter methylation of the $p16$ and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) genes in serum DNA samples from patients with gastric carcinoma.

METHODS: Nested methylation-specific polymerase chain reaction (nMSP) was adopted to detect the promoter methylation of the $p16$ and MGMT genes in serum DNA samples from 69 patients with gastric carcinoma. Serum DNA samples from 16 healthy individuals were used as normal controls.

RESULTS: The frequencies of $p16$ and MGMT promoter methylation in patients with gastric

carcinoma were 30.4% and 17.4%, respectively. In contrast, no $p16$ and MGMT promoter methylation was detected in normal controls. The frequencies of $p16$ and MGMT promoter methylation were significantly higher in patients with gastric carcinoma than in normal controls (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: Detection of $p16$ and MGMT promoter methylation in serum DNA samples can provide valuable information for molecular diagnosis of early gastric carcinoma.

Key Words: $p16$; MGMT; Methylation; Gastric carcinoma; Nested methylation-specific PCR

Wang Y, Zhou L, Chen XQ, Zhang W, Wang L. Detection of $p16$ and MGMT promoter methylation in gastric carcinomas by nested methylation-specific polymerase chain reaction. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 384-387

摘要

目的: 探讨胃癌患者血浆 $p16$ 和MGMT基因启动子区甲基化状态。

方法: 采用巢式甲基化特异性PCR法(nested methylation-specific PCR, nMSP)对69例胃癌患者血浆中 $p16$ 和MGMT基因启动子区甲基化状态进行研究。同时以16例健康体检作为对照。

结果: 在受检的69例胃癌患者中, $p16$ 、MGMT基因启动子区甲基化率分别为30.4%(21/69)、17.4%(12/69)。对照组未见 $p16$ 、MGMT基因启动子区甲基化。胃癌患者血浆中存在 $p16$ 和MGMT基因启动子区甲基化, 其中 $p16$ 基因启动子区甲基化与对照组相比差异显著, 具有统计学意义。

结论: 检测血浆循环DNA中 $p16$ 、MGMT基因启动子区的甲基化状态, 可为胃癌的早期分子诊断提供了有用信息。

关键词: $p16$; MGMT; 甲基化; 胃癌; 巢式甲基化特异性PCR法

王燕, 周力, 陈晓琴, 张维, 王岚. 巢式MSP法检测胃癌患者血

■同行评议者

崔立红, 副教授, 中国人民解放军海军总医院消化内科

浆p16、MGMT基因甲基化. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 384-387
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/384.asp>

0 引言

p16基因是机体重要的抑癌基因,通过抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinases 4/6, CDK4/6)活性,使细胞周期停滞于G₁/S期,对细胞周期起着负性调控作用。MGMT基因编码的O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)是一种高效的DNA直接修复酶,可修复由烷化剂引起的DNA损伤,在DNA修复中发挥重要作用。启动子区高甲基化是引起基因沉默的主要机制之一,可能影响基因功能的正常发挥^[1]。p16基因是目前甲基化研究较多的肿瘤抑制基因,已有研究显示胃癌组织中存在p16基因启动子区甲基化^[2],相比之下,对胃癌患者MGMT基因启动子甲基化状态的研究较少。在恶性肿瘤患者血清或血浆中存在外周血循环DNA,这种细胞外游离DNA来源于肿瘤细胞^[3],已有研究证实肿瘤患者血清或血浆DNA与原发灶组织存在一致的基因改变,为应用外周血进行分子诊断提供了可能。为了解胃癌患者外周血中p16和MGMT基因启动子区甲基化状态,本研究采用巢式甲基化特异性PCR法(nested methylation-specific PCR, nMSP)对胃癌患者进行血浆p16、MGMT基因启动子区甲基化状态研究,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2008-06/2009-09贵阳医学院附属医院收治的经确诊的胃癌患者69例,其中男49例,女20例,年龄23-72(平均年龄51)岁,所有患者诊断标准参照《实用内科学》^[4]。同时以16例体检者为对照,其中男7例,女5例,年龄24-57(平均年龄41)岁。亚硫酸氢钠(Sigma)、对苯二酚(Sigma)、矿物油(Sigma)、Wizard DNA Clean-Up System(Promega公司)、CpG甲基转移酶M.Sss I (New England Biolabs)、琼脂糖(西班牙分装)、Taq酶(TaKaRa)、100 bp DNA Marker(天根)、Tris饱和酚(天津灏洋生物制品有限责任公司)、蛋白酶K(德国Merck)、DSHZ-300多用途水浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂)、TU-1810紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)、梯度PCR扩增仪(德国Eppendorf 5330型)、DNA成像分析仪(美国Bio-Rad公司)。引物合成参考文献[5-7],由上海捷瑞生物工程有限公司合成(表1)。

1.2 方法

1.2.1 标本收集:采集受检者外周血2 mL,经EDTA抗凝,分离血浆,-80℃保存备用。

1.2.2 常规酚-氯仿法提取血浆DNA:提取的血浆DNA经紫外可见分光光度计定量,选择A_{260/280}>1.7的DNA样本进行后续试验, DNA样本保存于-20℃。

1.2.3 nMSP法检测胃癌患者p16、MGMT基因启动子区甲基化状态: (1)基因组DNA的亚硫酸盐修饰:参考Herman等^[8]的方法,取约1.5 μg DNA,加入超纯水至50 μL;加入5.5 μL新鲜配制的3 mol/L NaOH, 37℃水浴30 min后加入30 μL 10 mmol/L氢醌和520 μL 3 mol/L亚硫酸氢钠(pH5.0),轻柔混匀后加入100 μL石蜡油覆盖液面, 55℃避光水浴16 h;次日取出样本,按照Promega Wizard Cleanup System说明进行DNA纯化,收集50洗脱液,加入5.5 μL新鲜配制的3 mol/L NaOH,室温放置15 min,加入33 μL 10 mol/L乙酸铵、1 μL 10 g/L糖原及165 μL冰无水乙醇沉淀DNA, -20℃过夜;次日取出后离心弃上清,再用100 μL 700 mL/L乙醇洗涤2次,离心弃上清,室温干燥后,加入35 μL超纯水溶解, -20℃保存备用。(2)n-MSP法检测p16、MGMT基因启动子甲基化状态:以亚硫酸盐修饰后的DNA样本为模板,分别以p16启动子区引物(p16-ff、p16-fr)和MGMT启动子区引物(MGMT-ff、MGMT-fr)进行第1轮PCR,扩增p16、MGMT基因启动子区,反应体系:10×PCR缓冲液2.5 μL、2 mmol/L Mg²⁺、200 μmol/L dNTPs、引物10 pmol、Taq DNA聚合酶1 U、硫化处理DNA 3 μL,用ddH₂O补齐25 μL。扩增程序:95℃预变性5 min; 95℃45 s,退火45 s(p16基因60℃、MGMT基因52℃), 72℃45 s,扩增35个循环;再经72℃延伸10 min。以第1轮PCR扩增出p16、MGMT基因启动子区目的条带的PCR产物经30倍稀释后取2 μL为模板,用p16基因甲基化引物(p16-mf、p16-mr)和非甲基化引物(p16-uf、p16-ur)以及MGMT基因甲基化引物(MGMT-mf、MGMT-mr)和非甲基化引物(MGMT-uf、MGMT-ur)进行第2轮PCR,反应体系同第1轮PCR,扩增程序:95℃预变性5 min; 95℃, 15 s,退火15 s(p16基因甲基化引物为65℃,非甲基化引物为62℃;MGMT基因甲基化引物、非甲基化引物为66℃), 72℃, 15 s,扩增28个循环;再经72℃延伸10 min。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测,紫外成像仪下观察结果并拍照。每批标本均同时扩增甲基化酶Sss I修饰

■研究前沿

p16和MGMT基因高甲基化与其表达的相关性及在临床上的运用价值尚需深入研究。

■相关报道

在本课题组前期对胃癌患者外周血*p16*基因的相关研究中,结果显示*p16*基因第1、2外显子缺失率为8.7%(6/69),所有检测样本未见点突变。

表 1 *p16*和MGMT基因的n-MSP引物

名称	引物序列	产物大小(bp)	退火温度(°C)
<i>p16</i> -ff	5'-GAAGAAAGAGGAGGGGTTGG-3'	280	60
<i>p16</i> -fr	5'-CTACAAACCTCTACCCACC-3'		
<i>p16</i> -mf	5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'	150	67
<i>p16</i> -mr	5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'		
<i>p16</i> -uf	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'	151	62
<i>p16</i> -ur	5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3'		
MGMT-ff	5'-GGATATGTTGGGATAGTT-3'	289	52
MGMT-fr	5'-CCAAAAACCCCAAAACCC-3'		
MGMT-mf	5'-TTTCGACGTTCTAGGTTTTTCGC-3'	81	66
MGMT-mr	5'-GCACTCTCCGAAAACGAAACG-3'		
MGMT-uf	5'-TTTGTGTTTTGATGTTGTAGGTTTTGT-3'	93	66
MGMT-ur	5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3'		

表 2 nMSP检测胃癌患者*p16*、MGMT基因甲基化结果 %/n

分组	n	<i>p16</i> 基因	MGMT基因
对照组	16	0.0(0/0)	0.0(0/0)
病例组	69	30.4(21/69) ^a	17.4(12/69) ^a

^a*P*<0.05 vs 对照组。

的胎盘DNA作为甲基化阳性对照,以去离子水为模板的反应体系作为阴性对照。

统计学处理 采用SPSS统计学软件进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 结果判断 以甲基化处理的胎盘DNA为阳性对照经甲基化引物扩增后出现相应片段,双蒸水作空白对照经甲基化引物扩增无相应片段出现,同时甲基化引物与非甲基化引物扩增必出现任一条或两条均扩增出相应条带时,满足以上条件时判为结果有效。仅非甲基化引物扩增出相应片段为甲基化阴性,仅有甲基化引物扩增出相应片段即为完全甲基化,甲基化引物与非甲基化引物均扩增出相应片段为不完全甲基化,完全甲基化和不完全甲基化均计为甲基化检测阳性。

2.2 *p16*、MGMT基因nMSP扩增结果 结果显示,在受检的69例胃癌患者中,*p16*、MGMT基因启动子区甲基化率分别为30.4%(21/69)、17.4%(12/69)。对照组未见*p16*、MGMT基因启动子区甲基化。差异显著,具有统计学意义(图1,表2)。

3 讨论

DNA甲基化可通过不改变基因序列而引起基因表达失活,是肿瘤形成过程中基因沉默的重要

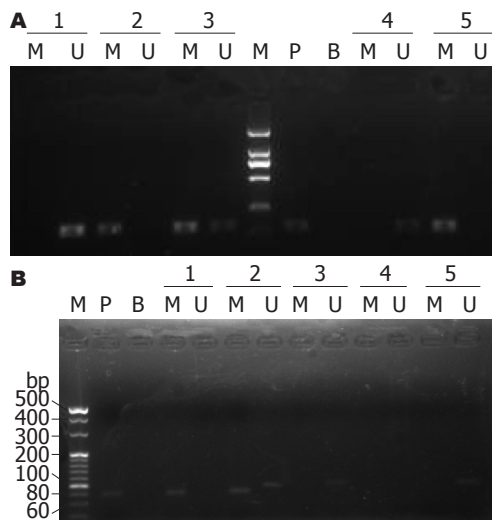


图 1 nMSP检测*p16*和MGMT基因启动子区甲基化。A: *p16*; B: MGMT; M: DNA Marker(DNA Marker I、20 bp DNA Ladder Marker); P: 阳性对照; B: 空白对照; M: 甲基化引物扩增; U: 非甲基化引物扩增; 1-5: 部分检测样本。

机制之一^[1]。DNA甲基化状态改变往往出现在细胞恶性增殖早期,并随恶性肿瘤的发生、发展而变化。循环DNA存在于血液(血清或血浆)、滑膜液等体液中^[3]。应用血清或血浆进行人类肿瘤某些抑癌基因甲基化状态的研究报道已见于胶质瘤^[9]、乳腺癌^[10]、胃癌^[11,12]等。由于外周血循环DNA的水平较肿瘤组织中相应DNA水平低,且基因组DNA在进行硫化处理过程中存在降解,因此本研究中采用较普通较甲基化特异性PCR法(MSP)具有更高灵敏度的巢式甲基化特异性PCR法(nMSP)进行相关研究^[13]。结果显示胃癌患者血浆样本中存在*p16*和MGMT基因启动子区高甲基化改变。

*p16*基因作为机体重要的抑癌基因,其启动

子区甲基化已被证实存在于多种人类肿瘤中。以往研究认为基因纯合性缺失或点突变是基因表达失活的主要机制,在本课题组前期对胃癌患者外周血p16基因的相关研究中,结果显示p16基因第1、2外显子缺失率为8.7%(6/69),所有检测样本未见点突变。本研究对69例胃癌患者外周血基因组p16基因启动子区甲基化状态进行检测,结果显示p16基因启动子区存在甲基化,甲基化率为30.4%,与对照组相比差异具有统计学意义。Ikoma等^[12]采用MSP法检测到48%(52/109)的胃癌患者外周血中存在包括p16基因在内的至少一个基因高甲基化异常。以上研究结果表明p16基因启动子区甲基化是胃癌中p16基因失活的主要机制。由于p16基因启动子甲基可能引起表达失活,失去对细胞周期正常的负性调控作用,致细胞过度增殖,细胞周期加速,使未修复的DNA过早进入S期,从而导致肿瘤的发生。

MGMT是机体重要的DNA修复基因。国内段家华等^[14]和雷晓华等^[15]分别应用加强型原位杂交三相寡核苷酸探针高效标记技术和免疫组织化学法检测胃癌组织中MGMT基因和蛋白表达,结果显示胃癌组织中MGMT低表达或表达不足。本研究对69例胃癌患者血浆中MGMT基因启动子区甲基化状态研究,结果显示甲基化发生率为17.4%(12/69)。以上研究提示胃癌中MGMT基因低表达不足可能与MGMT基因高甲基化有关。

肿瘤发生过程较为复杂,往往涉及多种基因^[16,17]的异常改变。本研究证实胃癌患者血浆中p16和MGMT基因存在启动子区高甲基化表现,其中p16基因甲基化率与Ksiao等^[16]采用胃癌组织进行研究所得甲基化率相似(29.4%)。本研究中MGMT基因甲基化率(17.4%)低于Ksiao等报道(36.8%),但Zhao等^[17]研究也显示胃癌组织中较低的MGMT甲基化率(6.9%),以上研究结果不一致与所用受检样本及检测方法有关,因此尚需进一步研究以证实胃癌患者中MGMT基因甲基化状态。

基因表达的调控机制较为复杂,本研究成功运用nMSP法对胃癌患者外周血p16和MGMT基因甲基化状态研究,但p16和MGMT基因高甲基化与其表达的相关性及在临床上的运用价值尚需深入研究。

4 参考文献

- 1 Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylation. *Hum Mol Genet* 2007; 16

- Spec No 1: R50-R59
- 2 Zou XP, Zhang B, Zhang XQ, Chen M, Cao J, Liu WJ. Promoter hypermethylation of multiple genes in early gastric adenocarcinoma and precancerous lesions. *Hum Pathol* 2009; 40: 1534-1542
- 3 Sunami E, Vu AT, Nguyen SL, Hoon DS. Analysis of methylated circulating DNA in cancer patients' blood. *Methods Mol Biol* 2009; 507: 349-356
- 4 陈灏珠. 实用内科学. 第12版. 上海: 人民卫生出版社, 2005: 1886
- 5 Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000; 60: 5954-5958
- 6 Abbaszadegan MR, Moaven O, Sima HR, Ghafarzadegan K, A'rabi A, Forghani MN, Raziee HR, Mashhadinejad A, Jafarzadeh M, Esmaili-Shandiz E, Dadkhah E. p16 promoter hypermethylation: a useful serum marker for early detection of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2055-2060
- 7 Bae SI, Lee HS, Kim SH, Kim WH. Inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter CpG island hypermethylation in gastric cancers. *Br J Cancer* 2002; 86: 1888-1892
- 8 Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-9826
- 9 Wakabayashi T, Natsume A, Hatano H, Fujii M, Shimato S, Ito M, Ohno M, Ito S, Ogura M, Yoshida J. p16 promoter methylation in the serum as a basis for the molecular diagnosis of gliomas. *Neurosurgery* 2009; 64: 455-461; discussion 461-462
- 10 Shukla S, Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta SD, Ralhan R. Detection of RASSF1A and RARBeta hypermethylation in serum DNA from breast cancer patients. *Epigenetics* 2006; 1: 88-93
- 11 Leung WK, To KF, Chu ES, Chan MW, Bai AH, Ng EK, Chan FK, Sung JJ. Potential diagnostic and prognostic values of detecting promoter hypermethylation in the serum of patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 2005; 92: 2190-2194
- 12 Ikoma H, Ichikawa D, Daito I, Nobuyuki T, Koike H, Okamoto K, Ochiai T, Ueda Y, Yamagishi H, Otsuji E. Clinical application of methylation specific-polymerase chain reaction in serum of patients with gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 946-950
- 13 Carless M. Investigation of genomic methylation status using methylation-specific and bisulfite sequencing polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 2009; 523: 217-234
- 14 段家华, 孙幼芳, 曾桃英, 王君. 胃癌MGMT基因表达的临床病理意义. *华中科技大学学报(医学版)* 2006; 35: 807-809
- 15 雷晓华, 朱润庆. DNA修复基因MGMT表达不足与胃癌细胞增殖的关系. *世界肿瘤杂志* 2007; 6: 22-24
- 16 Ksiao F, Ziadi S, Amara K, Korbi S, Trimeche M. Biological significance of promoter hypermethylation of tumor-related genes in patients with gastric carcinoma. *Clin Chim Acta* 2009; 404: 128-133
- 17 Zhao YF, Zhang YG, Tian XX, Juan Du, Jie Zheng. Aberrant methylation of multiple genes in gastric carcinomas. *Int J Surg Pathol* 2007; 15: 242-251

■同行评价

本研究用nMSP法对胃癌患者外周血p16和MGMT基因甲基化状态进行观察,发现了一些倾向,但基因表达的调控机制较为复杂,p16和MGMT基因高甲基化与其表达的相关性及在临床上的运用价值尚需深入研究。本文有一定研究价值,可增加例数继续观察总结,但不宜过早下结论。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

酒精性肝病患者淋巴细胞染色体损伤与氧化应激的关系

王毕娟, 王沁, 张志强

■背景资料

酒精滥用和酒精依赖已成为当今世界日益严重的公共卫生问题, 而且ALD是发达国家肝硬化的重要病因(占80%-90%), 也是青壮年死亡的主要原因, 酗酒者患肝硬化是正常人的6.8倍。在亚洲各国, 尽管病毒性肝炎占主要地位, 但随着社会经济条件的好转和生活水平的提高, ALD有日渐增多趋势。

王毕娟, 王沁, 张志强, 兰州大学第一医院消化科 甘肃省兰州市 730000

甘肃省科技攻关基金资助项目, No. 2GS054-A43-014-26
作者贡献分布: 王毕娟与王沁对此文所作贡献均等; 此课题由王毕娟与王沁设计; 研究过程由王毕娟与张志强操作完成; 研究所用试剂及分析工具由王沁提供; 数据分析由王毕娟与张志强完成; 本文写作由王毕娟与王沁完成。

通讯作者: 王沁, 主任医师, 教授, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学第一医院消化科, chenqp@lzu.edu.cn
电话: 0931-8625200-6205

收稿日期: 2009-11-25 修回日期: 2009-12-25

接受日期: 2009-12-29 在线出版日期: 2010-02-08

Relationship between chromosome damage in lymphocytes and oxidative stress in patients with alcoholic liver disease

Bi-Juan Wang, Qin Wang, Zhi-Qiang Zhang

Bi-Juan Wang, Qin Wang, Zhi-Qiang Zhang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Research and Development Program of Gansu Province, No. 2GS054-A43-014-26

Correspondence to: Professor Qin Wang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. chenqp@lzu.edu.cn

Received: 2009-11-25 Revised: 2009-12-25

Accepted: 2009-12-29 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To explore the relationship between chromosome damage in peripheral blood lymphocytes and oxidative stress in patients with alcoholic liver disease (ALD).

METHODS: Thirty-one ALD patients (experimental group) and 22 healthy volunteers (control group) were included in the study. Chromosome damage in peripheral blood lymphocytes was detected by cytokinesis-block micronucleus test. Plasma malondialdehyde (MDA) content was determined by the thiobarbituric acid (TBA) method, and superoxide dismutase (SOD) activity was measured by the xanthine oxidase method.

RESULTS: The content of plasma MDA was

significantly higher in the experimental group than in the control group ($5.88 \mu\text{mol/L} \pm 2.62 \mu\text{mol/L}$ vs $2.89 \mu\text{mol/L} \pm 1.33 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$), while the activity of SOD was significantly lower in the experimental group than in the control group ($49.28 \text{ kU/L} \pm 6.03 \text{ kU/L}$ vs $57.35 \text{ kU/L} \pm 4.96 \text{ kU/L}$, $P < 0.01$). A negative correlation was noted between the content of plasma MDA and SOD activity ($r = -0.454$, $P < 0.05$) in both groups. The rate of micronucleus formation was significantly higher in the experimental group than in the control group ($P < 0.01$). A positive correlation between the content of MDA and the rate of micronucleus formation ($r = 0.493$, $P < 0.01$), and a negative correlation between SOD activity and the rate of micronucleus formation were found in the experimental group ($r = -0.422$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Oxidative stress plays an important role in chromosome damage in peripheral blood lymphocytes in patients with alcoholic liver disease, suggesting that oxidative stress is one of the mechanisms causing chromosome damage in peripheral blood lymphocytes in these patients.

Key Words: Alcoholic liver disease; Chromosome aberration; Oxidative stress; Malondialdehyde; Superoxide dismutase

Wang BJ, Wang Q, Zhang ZQ. Relationship between chromosome damage in lymphocytes and oxidative stress in patients with alcoholic liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 388-391

摘要

目的: 探讨酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)患者外周血淋巴细胞染色体损伤与体内氧化应激之间的关系。

方法: 采用胞质分裂阻滞法微核实验、硫代巴比妥酸显色法和黄嘌呤氧化酶法分别检测31例ALD患者和22例健康体检者外周血淋巴细胞染色体损伤情况、血浆丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性。

结果: 病例组与对照组血浆MDA含量分别

■同行评议者

迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院
消化内科

为 $5.88 \mu\text{mol/L} \pm 2.62 \mu\text{mol/L}$ 和 $2.89 \mu\text{mol/L} \pm 1.33 \mu\text{mol/L}$, SOD活性分别为 $49.28 \text{ kU/L} \pm 6.03 \text{ kU/L}$ 和 $57.35 \text{ kU/L} \pm 4.96 \text{ kU/L}$, 血浆MDA含量随着SOD活性的降低而增高, 两组各指标之间有显著性差异($P < 0.01$), 且病例组MDA含量与SOD活性变化之间呈负相关($r = -0.454$, $P < 0.05$). 此外, 病例组微核率高于对照组, 两组相比有显著性差异($P < 0.01$). 病例组MDA含量与微核率存在正相关($r = 0.493$, $P < 0.01$), 而SOD活性与微核率存在负相关($r = -0.422$, $P < 0.05$).

结论: ALD患者体内氧化应激在外周血淋巴细胞染色体损伤中起重要作用, 提示ALD患者体内的氧化应激是其外周血淋巴细胞染色体损伤的机制之一.

关键词: 酒精性肝病; 染色体畸变; 氧化应激; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

王毕娟, 王沁, 张志强. 酒精性肝病患者淋巴细胞染色体损伤与氧化应激的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 388–391
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/388.asp>

0 引言

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是由于长期大量饮酒导致的肝脏疾病. ALD包括轻症ALD、酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化五种临床分型^[1]. 目前在我国ALD发病率呈上升趋势, 其已成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病病因^[2]. ALD的发病机制复杂, 可能与酒精及其代谢产物对肝脏的毒性作用、氧化应激、免疫反应、细胞凋亡、内毒素、遗传多态性及与病毒的叠加作用等多种因素有关^[3]. 在这些因素中, 自由基介导的氧化应激逐渐成为关注焦点. 许多研究表明酒精有明显的遗传毒性作用^[4-7], 其机制还不太清楚, 包括氧化应激、脂质过氧化产物和乙醛^[8], 一般认为自由基的生成在酒精的遗传毒性中起着重要作用^[7]. 本课题通过胞质分裂阻滞法微核实验检测ALD患者外周血淋巴细胞染色体损伤情况、硫代巴比妥酸显色法检测血浆丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平及黄嘌呤氧化酶法检测血浆超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性, 探讨ALD患者外周血淋巴细胞染色体损伤与其体内氧化应激之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2009-03/2009-11在兰州大学第一医院

消化科住院和门诊就诊的ALD患者31例(病例组), 诊断标准依据2006年酒精性肝病诊疗指南^[1], 平均年龄 $53.58 \text{ 岁} \pm 9.99 \text{ 岁}$, 每天饮酒量 $90.6 \text{ g} \pm 55.2 \text{ g}$, 饮酒史 $22.2 \text{ 年} \pm 8.5 \text{ 年}$, 其中酒精性脂肪肝11例、酒精性肝炎10例、酒精性肝硬化10例. 同一时期在兰州大学第一医院体检中心体检的健康志愿者22例(对照组), 平均年龄 $52.82 \text{ 岁} \pm 9.92 \text{ 岁}$, 不吸烟、不饮酒. 两组之间年龄无显著性差异($P > 0.05$). 所有研究对象半年内无射线及各种有害毒物接触史, 都排除肝炎病毒感染、自身免疫性肝病、药物性肝病及代谢性肝病. SOD、MDA试剂盒均购自南京建成生物制品公司, 二甲基亚砜、细胞松弛素B均购自美国Sigma公司, 1640混合培养基购自北京易世盛达科技发展有限公司. BB16UV/BB506OUV CO₂培养箱, 分光光度计, L80-2离心沉淀机, Beckman. LX. 20全自动生化分析仪.

1.2 方法 每人抽取静脉血4.5 mL, 其中2.5 mL (EDTA抗凝)用于微核试验、血浆MDA含量和SOD活性的检测, 2 mL静脉血离心后血清用于ALT、AST检测. 用硫代巴比妥酸比色法测定MDA含量, 黄嘌呤氧化酶法测定SOD活性, LX. 20全自动生化分析仪检测ALT, AST. 胞质分裂阻滞法微核实验见文献^[9], 用于检测外周血淋巴细胞微核率. 胞质分裂阻滞法微核实验方法具体包括: (1)细胞培养(需无菌操作): EDTA抗凝血0.5 mL, 在采血后24 h内种入1640混合培养基, 混匀后置 $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱内避光培养44 h后, 加终浓度为4.5 mg/L细胞松弛素B继续避光培养28 h; (2)制片和染色: 终止培养后将细胞液吸入离心管中1 000 r/min离心5 min后, 加入7 mL $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下预冷的 0.075 mol/L KCl低渗后, 立即离心8 min, 弃上清. 用固定液(甲醇: 冰醋酸 = 3: 1)快速固定, 离心8 min, 弃上清, 再重复固定2次. 滴片后用Giemsa染色. (3)镜检: 在油镜下计数1 000个双核细胞, 计算其微核细胞率(%).

统计学处理 结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 用SPSS11.0统计学软件进行 t 检验、Mann-Whitney检验及Spearman等级相关分析, $P < 0.05$ 为两者之间有显著性差异.

2 结果

2.1 外周血淋巴细胞微核的细胞学特征 游离于胞质中, 与主核完全分开, 重叠或相切时, 能看到各自的完整核膜, 呈圆形或椭圆形, 结构与主核相同, 着色与主核一致或略浅, 不折光, 大小

■ 研发前沿

ALD的致病因素单一, 即长期大量的乙醇摄入, 但其发病机制较为复杂, 目前尚不完全清楚. 可能与乙醇及其代谢产物对肝脏的毒性作用、氧化应激、免疫反应、细胞凋亡、内毒素、遗传多态性及与病毒的叠加作用等多种因素有关. 近年来, 自由基的过量产生导致的氧化应激在酒精性肝病中的作用逐渐受到重视. 乙醇有明显的遗传毒性作用其机制还不太清楚, 包括氧化应激、脂质过氧化产物和乙醛, 一般认为自由基的生成在乙醇的遗传毒性中起着重要作用.

■ 相关报道

Michael等有很多关于胞质分裂阻滞法微核实验的报道, 从他的报道中可以了解胞质分裂阻滞法微核实验操作不断完善的过程及应用的范围.

■应用要点

ALD患者外周血淋巴细胞DNA损伤与氧化应激存在相关性,则氧化应激可能是酒精诱导的DNA损伤机制之一,可以为DNA损伤的治疗提供依据,而微核也可作为遗传损伤的敏感指标之一。

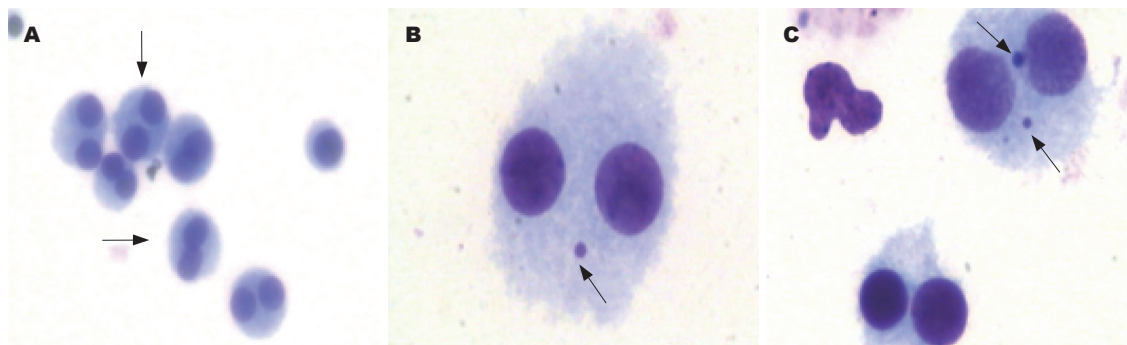


图1 外周血淋巴细胞微核图(姬姆萨染色). A: 多个双核淋巴细胞($\times 40$); B: 一个双核细胞出现一个微核($\times 100$); C: 一个双核细胞出现两个微核($\times 100$). A中箭头: 双核淋巴细胞; B、C: 微核。

表1 ALT、AST、MDA、SOD及微核率变化 (mean $\pm$ SD)

指标	病例组	对照组
ALT(U/L)	57.52 $\pm$ 40.23 ^b	23.32 $\pm$ 6.67
AST(U/L)	69.1 $\pm$ 15.64 ^b	30.68 $\pm$ 6.69
SOD(kU/L)	49.28 $\pm$ 6.03 ^b	57.35 $\pm$ 4.96
MDA(μ mol/L)	5.88 $\pm$ 2.62 ^b	2.89 $\pm$ 1.33
微核率(‰)	25.47 $\pm$ 5.14 ^b	12.50 $\pm$ 5.40

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

为主核1/3以下的小核,即为微核(图1)。在一个视野中,连续出现多个双核淋巴细胞(图1A),在一个双核淋巴细胞中出现一个微核(图1B),在一个双核淋巴细胞中也可同时出现两个微核(图1C)。

2.2 ALT、AST、MDA、SOD及微核率变化 由表1可以看出病例组血清ALT、AST与对照组相比均升高,两组相比有显著性差异($P < 0.01$);血浆MDA含量随着SOD活性的降低而增高,经统计学分析,病例组和对照组两指标之间都有显著性差异($P < 0.01$),且病例组MDA含量与SOD活性变化之间呈负相关($P < 0.05$, $r = -0.454$)。此外,病例组微核率高于对照组,两组相比有显著性差异($P < 0.01$)。

2.3 MDA含量和SOD活性与微核率变化的比较 行Spearman等级相关分析,病例组血浆MDA含量与外周血淋巴细胞微核率存在正相关($P < 0.01$, $r = 0.493$),SOD活性与外周血淋巴细胞微核率存在负相关($P < 0.05$, $r = -0.422$)。

3 讨论

酒精滥用和酒精依赖已成为当今世界日益严重的公共卫生问题,而且ALD是发达国家肝硬化的重要病因(占80%-90%),也是青壮年死亡的主要原因,酗酒者患肝硬化是正常人的6.8倍。

在亚洲各国,尽管病毒性肝炎占主要地位,但随着社会经济条件的好转和生活水平的提高,ALD有日渐增多趋势^[10]。2007年全国ALD的多中心调查分析显示我国ALD基本呈逐年上升趋势^[11]。ALD的致病因素单一,即长期大量的乙醇摄入,但其发病机制较为复杂,目前尚不完全清楚。近年来,自由基的过量产生导致的氧化应激在ALD中的作用逐渐受到重视。

在正常情况下,自由基的产生和清除之间存在着动态平衡。但在某些病理情况下,机体的自由基过量生成和(或)抗氧化防御系统受损,自由基产生和清除的动态平衡遭到破坏,导致氧化应激(oxidative stress)的出现^[12],由氧诱发的自由基称为活性氧族(reactive oxygen species, ROS),这包括过氧化氢(H_2O_2)、羟基自由基($OH\cdot$)和超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)等^[13]。肝脏线粒体、细胞色素P450酶、中性粒细胞和激活的枯否细胞是自由基的重要来源^[14]。生物膜富含脂质和蛋白质,膜脂是膜的基本骨架,在维持细胞的正常结构和功能方面起重要作用,膜脂的主要成分是多聚不饱和脂肪酸(PUFA)^[15]。自由基对细胞的损伤作用,主要是引起生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,MDA作为氧自由基与生物膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应的代谢产物,其含量的变化间接反映了组织中氧自由基含量和组织损伤程度^[16]。SOD是生物体内最为重要的抗氧化酶之一,是清除ROS的第一道防线^[2]。他的变化与体内自由基的变化呈负相关,其含量高低间接反映了清除自由基能力,对机体的氧化和抗氧化平衡起着至关重要的作用,能清除自由基和过氧化物,当体内自由基产生增多时,他与超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)反应产生过氧化氢,再由谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶作用产生水,这样使自由基得以清除,从而降低

脂质过氧化物的生成并加速其清除, 减少其对细胞和组织的损伤^[17,18]。因此, 可以通过测定MDA含量和SOD活性, 评估ALD患者体内氧自由基水平。本实验结果显示病例组MDA含量明显高于对照组, 而SOD活性明显低于对照组($P<0.01$), 且MDA含量与SOD活性变化呈负相关性($P<0.05$, $r = -0.454$), 提示ALD患者体内存在氧化应激。

微核是由细胞分裂后期滞后的染色体断片、一个或多个染色体组成的小体。微核游离于胞质中, 与主核完全分开, 重叠或相切时, 必须看到各自的完整核膜, 呈圆形或椭圆形, 结构与主核相同, 着色与主核一致或略浅, 不折光, 大小为主核1/3以下的小核^[19]。微核的形成是细胞受遗传毒物作用后的一种遗传学终点, 故凡能使染色体发生断裂, 并延迟到细胞分裂后期, 或使染色体和纺锤体联结遭到破坏的遗传损伤, 都可用微核实验来检测^[20]。各种理化因素作用于细胞染色体, 影响其正常功能, 使细胞的DNA的复制和染色体的分裂受到破坏。其中氧自由基中的 O_2 或OH可攻击DNA及合成DNA所需的酶, 使DNA链发生断裂, 碱基损伤, DNA-DNA、DNA-蛋白质发生交联, 染色体断裂, 这样DNA复制转录功能不能正常进行, 从而影响蛋白质合成。由于蛋白质合成受阻, SOD含量减少, 酶活性减弱或丧失, 自由基不能有效清除。由于自由基积累, 脂质过氧化反应进一步加强, 导致MDA和 O_2^- 浓度升高。大量的MDA和 O_2^- 又可反作用于细胞的DNA, 则更进一步加剧了遗传物质的损伤, 结果导致畸变频率升高^[21]。本实验结果显示ALD患者外周血淋巴细胞微核率明显高于对照组($P<0.01$), 血浆MDA含量与外周血淋巴细胞微核率存在正相关($P<0.01$, $r = 0.493$), SOD活性与外周血淋巴细胞微核率存在负相关($P<0.05$, $r = -0.422$), 提示ALD患者体内氧化应激在外周血淋巴细胞染色体损伤中起重要作用。

总之, ALD患者体内氧化应激与外周血淋巴细胞损伤有明显相关性, 提示ALD患者体内的氧化应激可能是其外周血淋巴细胞染色体损伤的机制之一。

4 参考文献

- 1 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 164-166
- 2 金武丕, 权修权, 孟繁平, 崔香丹, 朴海今. 大鼠酒精性肝病细胞凋亡与细胞色素P4502E1和氧化应激的关系. 世界华人消化杂志 2007; 15: 2181-2185
- 3 孙艳, 吴阳, 刘兵, 刘凯, 白靓, 迟宝荣. 酒精性肝病的研究进展. 吉林大学学报(医学版) 2006; 32: 733-736
- 4 Gattás GJ, Saldanha PH. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of abstinent alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 238-243
- 5 Fedeli D, Fedeli A, Luciani F, Massi M, Falcioni G, Polidori C. Lymphocyte DNA alteration by sub-chronic ethanol intake in alcohol-preferring rats. *Clin Chim Acta* 2003; 337: 43-48
- 6 Maffei F, Forti GC, Castelli E, Stefanini GF, Mattioli S, Hrelia P. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutat Res* 2002; 514: 49-58
- 7 Guo L, Yang JY, Wu CF. Oxidative DNA damage induced by ethanol in mouse peripheral leucocytes. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103: 222-227
- 8 Brooks PJ. DNA damage, DNA repair, and alcohol toxicity--a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 1073-1082
- 9 Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2007; 2: 1084-1104
- 10 王麟士, 裴琇. 酒精性肝病. 临床荟萃 2001; 16: 1141-1143
- 11 全国酒精性肝病调查协作组. 全国酒精性肝病的多中心调查分析. 中华消化杂志 2007; 27: 231-234
- 12 郝志敏, 赵洁, 巨名飞. 氧化应激在心血管疾病中的作用. 中西医结合心脑血管病杂志 2008; 6: 959-960
- 13 胡文琴, 王恬, 孟庆利. 动物中活性氧的产生及清除机制. 家畜生态 2004; 25: 64-67
- 14 Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1-10
- 15 王万铁, 王卫, 徐正祚, 林丽娜, 李东. 肝缺血-再灌注损伤中脂质过氧化反应及左旋精氨酸的干预作用. 中国危重病急救医学 2003; 15: 91-93
- 16 许荣家, 范红, 任旭东, 蔡春玲, 汪颖. 急性脑梗塞病人和正常不同年龄组血清MDA及SOD含量测定. 现代康复 1997; 1: 98-99
- 17 苏世标, 仲恒高, 张卫, 聂继华, 杨鲁静, 童建. 氨及其子体对职业人群和大鼠外周血SOD及MDA的影响. 工业卫生与职业病 2006; 32: 143-146
- 18 尹蓉, 王沁, 富翠芹. 姜黄素对酒精诱导的大鼠脂质过氧化反应的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16: 1383-1387
- 19 李秀芹, 赵进沛, 任庆余, 杨睿峰, 魏刚. 淋巴细胞微核培养方法及其在生物剂量估算中的应用. 实用预防医学 2005; 12: 1249-1250
- 20 许重洁, 张艳芬, 杨保胜, 张光谋, 刘小学. 阿霉素对小鼠骨髓微核和染色体的影响. 新乡医学院学报 2008; 25: 357-359
- 21 康朝英, 黄辰, 陈萍, 宋士生, 倪磊, 司晓娥. 人淋巴细胞微核形成率、SOD活性及MDA浓度变化间的关系. 西安交通大学学报(医学版) 1995; 16: 128-131

■同行评价

本文探讨酒精性肝病患者淋巴细胞染色体损伤与氧化应激的关系, 具有一定创新性。

编辑 李军亮 电编 何基才

肝硬化患者Child-Pugh分级与血小板生成素的关系

刘鹏亮, 孙杰生, 王炳元, 秦永军

■背景资料

血小板生成素在肝脏合成, 是介导血小板产生的最主要的细胞因子, 血小板生成素合成减少可能是肝硬化患者血小板减少症的重要原因, 研究Child-Pugh各级肝硬化患者血小板生成素与血小板的关系有重要的临床意义。

刘鹏亮, 孙杰生, 王炳元, 秦永军, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001

辽宁省科技攻关基金资助项目, No. 2007225011-1

作者贡献分布: 刘鹏亮与王炳元对此文所作贡献均等; 本研究设计由刘鹏亮与王炳元完成; 资料由刘鹏亮、孙杰生及秦永军收集整理; 数据统计分析由刘鹏亮完成; 本文写作由刘鹏亮与王炳元共同完成。

通讯作者: 王炳元, 教授, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院消化内科。

wangby@medmail.com.cn

电话: 024-83282554

收稿日期: 2009-10-27 修回日期: 2009-12-05

接受日期: 2009-12-14 在线出版日期: 2010-02-08

Relationship between serum thrombopoietin level and Child-Pugh grade in patients with liver cirrhosis

Peng-Liang Liu, Jie-Sheng Sun, Bing-Yuan Wang, Yong-Jun Qin

Peng-Liang Liu, Jie-Sheng Sun, Bing-Yuan Wang, Yong-Jun Qin, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Program of Liaoning Province, No. 2007225011-1

Correspondence to: Professor Bing-Yuan Wang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. wangby@medmail.com.cn

Received: 2009-10-27 Revised: 2009-12-05

Accepted: 2009-12-14 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To assess the relationship between serum thrombopoietin (TPO) level and Child-Pugh grade in patients with liver cirrhosis.

METHODS: One hundred and nineteen liver cirrhotic patients (experimental group) and 30 healthy volunteers (control group) were included in the study. Serum TPO level was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Meanwhile, routine blood tests, blood biochemistry tests, detection of hepatitis virus markers, and color Doppler ultrasound examination of the liver were performed.

RESULTS: Based on clinical manifestations and

laboratory examinations, 43 patients were classified as having Child-Pugh class A cirrhosis, 63 as having Child-Pugh class B cirrhosis, and 13 as having Child-Pugh class C cirrhosis. No significant difference was noted in serum TPO level between the control group and the experimental group. Patients with Child-Pugh class A cirrhosis had higher serum TPO level than normal controls ($P = 0.19$), while those with Child-Pugh class B or C cirrhosis had significantly lower serum TPO levels ($43.44 \text{ ng/L} \pm 33.51 \text{ ng/L}$ and $45.16 \text{ ng/L} \pm 30.04 \text{ ng/L}$, respectively; $P = 0.001$ and 0.048 , respectively) than normal controls. Platelet counts (PLT) in patients with Child-Pugh class A, B or C cirrhosis were significantly lower than that in normal controls (all $P < 0.001$). Serum TPO was negatively correlated with PLT in normal controls ($r = -0.363$, $P = 0.048$). Although no correlation was noted between serum TPO and PLT in patients with Child-Pugh class A or C cirrhosis, a positive correlation was found between serum TPO and PLT in patients with Child-Pugh class B cirrhosis ($r = 0.383$, $P = 0.002$).

CONCLUSION: Reduced hepatic synthesis of TPO is important for the development of thrombocytopenia in cirrhotic patients. Serum TPO and PLT can be used as parameters for evaluation of liver function.

Key Words: Liver cirrhosis; Thrombopoietin; Platelet count; Thrombocytopenia; Child-Pugh grade

Liu PL, Sun JS, Wang BY, Qin YJ. Relationship between serum thrombopoietin level and Child-Pugh grade in patients with liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 392-396

摘要

目的: 探讨肝硬化患者Child-Pugh分级与血小板生成素(TPO)的关系。

方法: 选取肝硬化患者119例, 另选取与肝硬化组性别和年龄相匹配的30例健康人作为对照组; 晨起空腹采血, 离心分离血清, 检测血液常规、血液生化、血离子、肝炎病毒标志物,

■同行评议者

赵桂鸣, 主任医师, 天津市肝病研究所天津市传染病医院慢性肝炎科

肝脾B超检查; 用ELISA法检测血清TPO含量。

结果: 肝硬化患者中Child-Pugh A、B、C级分别为43例、63例和13例。与对照组相比, 肝硬化患者平均TPO水平无显著性差异, A级TPO水平有升高的趋势, 但无统计学意义, 而B级(43.44 ng/L $\pm$ 33.51 ng/L)和C级(45.16 ng/L $\pm$ 30.04 ng/L)则明显降低($P=0.001, 0.048$); 血小板计数(PLT)在A级、B级和C级逐渐下降, 与对照组相比, 均有显著性差异(均 $P<0.001$); TPO与PLT在对照组呈负相关($r=-0.363, P=0.048$), 在Child-Pugh A级和C级两者无相关性, 在B级呈正相关且有统计学意义($r=0.383, P=0.002$)。

结论: 肝脏合成TPO减少是晚期肝硬化患者血小板减少的重要原因; TPO和PLT可以作为反应肝脏功能的指标。

关键词: 肝硬化; 血小板生成素; 血小板; 血小板减少症; Child-Pugh分级

刘鹏亮, 孙杰生, 王炳元, 秦永军. 肝硬化患者Child-Pugh分级与血小板生成素的关系. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 392-396

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/392.asp>

0 引言

血小板减少症是肝硬化患者非常常见的并发症^[1], 在慢性肝病中发生率为15%-70%, 甚至高达76%^[2]。其原因可能与脾脏功能亢进^[3,4]和肝脏功能减退^[5]有关。血小板生成素(thrombopoietin, TPO)主要由肝细胞合成, 肝脏功能减退, 肝脏合成TPO受损可能是导致肝硬化患者血小板减少的主要原因^[6,7]。但肝脏功能不同程度的肝硬化患者血小板生成素和血小板(platelet, PLT)之间关系的研究较少, 对Child-Pugh各级TPO和PLT进行相关性检验的研究更少。本研究通过对Child-Pugh各级TPO和PLT关系的研究, 探讨在不同程度肝脏功能的肝硬化患者TPO与血小板减少症的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究由中国医科大学附属第一医院医学伦理委员会审查通过, 并征得所有受试者的知情同意。收集2008-08/2009-06在中国医科大学附属第一医院消化内科住院, 临床诊断明确的肝硬化患者119例, 诊断符合2000-09西安会议修订的《病毒性肝炎防治方案》中的诊断标

准^[8], 并排除合并恶性肿瘤、营养不良、血液系统疾病、急性药物性和中毒性肝损伤及入院前输血的患者。另收集30例性别和年龄与实验组相匹配、同期在本院体检的无肝炎病史, 肝炎病毒标志物阴性, 肝脏酶学指标正常, 肝脏彩色多普勒超声检查正常的健康人作为对照组。

1.2 方法

1.2.1 TPO检测: 所有受试者采晨起空腹血液5 mL, 室温放置30 min, 1 000 g, 15 min离心后, 分离血清于两个EP管中, -20℃保存备用。TPO检测用酶联免疫吸附(ELISA)法, 试剂盒购自美国R&D公司(R&D Systems, McKinley, Minneapolis, MN, USA), 检测灵敏度为7.45 ng/L。酶标仪为Bio-Rad Model 550 Microplate Reader系美国Bio-Rad公司产品。实验步骤: (1)将试剂和标本于室温放置30 min以上, 充分融化至室温; (2)TPO标准品倍比稀释, 浓度依次为2 000、1 000、500、250、125、62.5、31.2、0 ng/L; (3)微孔板标记标准品组, 实验组和对照组, 每孔加Assay Diluent RD1-1 50 μ L; (4)分别加TPO标准品, 实验组标本和对照组标本200 μ L于相应微孔, 覆盖封板膜, 室温孵育3 h; (5)弃去孔内液体, 向每孔加洗液(25倍稀释, 即20 mL浓缩洗液加500 mL双蒸水稀释)400 μ L, 弃去孔内液体, 甩干, 共洗5次; (6)向各孔加TPO结合物200 μ L, 覆盖封板膜, 室温孵育1 h; (7)弃去孔内液体, 向每孔加洗液400 μ L, 弃去孔内液体, 甩干, 共洗5次; (8)每孔加底物溶液(显色剂A+显色剂B等体积混匀)200 μ L, 室温避光孵育30 min; (9)每孔加终止液50 μ L; (10)于30 min内测量吸光度, 测量波长450 nm, 校正波长540 nm。

1.2.2 血细胞分析: 所有受试者采晨起空腹血液2 mL, 采用日本希森美康公司生产的XE-2100全自动血液分析仪进行血细胞分析。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行数据的统计分析。实验数据采用mean $\pm$ SD表示, 实验组和对照组组间均数比较采用两个独立样本的 t 检验, 多组间均数比较采用单因素方差分析; 相关性检验用Pearson相关分析; 性别采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料 本研究共入选肝硬化患者119例, 其中男84例, 女35例, 平均年龄53.97岁 $\pm$ 11.89岁, Child-Pugh A、B、C级分别为43例、63例和13例。对照组30例, 其中男20例, 女10例, 平均年

■研发前沿

在肝硬化患者中, 有关血小板生成素与血小板的关系仍存在争议, 部分学者认为两者存在正相关关系, 尚有学者认为两者没有关系, 因为研究方法和对象不同, 其结果各异。有学者研究血小板生成素类似物对改善血小板减少症有临床效果。

■相关报道

Li等研究认为TPO与PLT正相关。Rios等只分析了肝硬化合并血小板减少的患者, 未分析肝硬化血小板正常的患者。Eissa等分析了血吸虫性肝硬化患者, 均认为TPO与PLT减少没有关系。

■创新盘点

对Child-Pugh各级血小板生成素和血小板进行相关性检验的研究至今尚未见详细报道。

表 1 肝硬化组与对照组TPO和PLT比较

分组	<i>n</i>	PLT($\times 10^9/L$)	TPO(ng/L)
肝硬化组	119	87.70 $\pm$ 58.99	57.61 $\pm$ 42.93
对照组	30	201.30 $\pm$ 57.45	70.32 $\pm$ 33.80
<i>t</i> 值		-0.947	-1.506
<i>P</i> 值		<0.000	0.134

表 2 Child-Pugh各级TPO和PLT的关系

Child-Pugh分级	<i>n</i>	<i>r</i> 值	<i>P</i> 值
对照组	30	-0.363	0.048
A级	43	-0.011	0.943
B级	63	0.383	0.002
C级	13	0.120	0.695

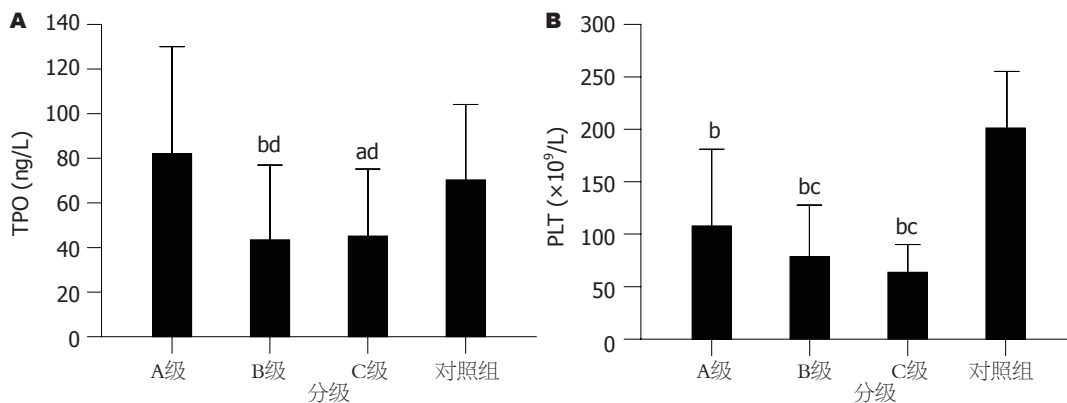


图 1 Child-Pugh各级TPO与PLT的方差分析结果。^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs 对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs A级。

龄57.90岁 $\pm$ 13.23岁。两组间性别和年龄没有显著性差异(*P*值分别为0.663和0.116)。

2.2 Child-Pugh各级TPO方差分析结果 对照组血清TPO为70.32 ng/L $\pm$ 33.80 ng/L。与对照组相比,实验组平均血清TPO无统计学意义(表1); TPO在实验组Child-Pugh A级为82.14 ng/L $\pm$ 47.93 ng/L,与对照组相比有升高趋势,但无统计学意义(*P* = 0.19); Child-Pugh B级(43.44 ng/L $\pm$ 33.51 ng/L)和C级(45.16 ng/L $\pm$ 30.04 ng/L)血清TPO水平较对照组显著下降(*P* = 0.001, 0.048); Child-Pugh B级、C级与A级相比, TPO显著下降(*P* = 0.000, 0.003); Child-Pugh B级、C级之间没有统计学意义(*P* = 0.88, 图1A)。

2.3 Child-Pugh各级PLT方差分析结果 对照组PLT为(201.30 $\pm$ 57.45) $\times 10^9/L$ 。Child-Pugh A级、B级、C级分别为(107.95 $\pm$ 72.92) $\times 10^9/L$ 、(78.82 $\pm$ 49.00) $\times 10^9/L$ 、(63.77 $\pm$ 26.38) $\times 10^9/L$,与对照组相比呈进行性减少,且有统计学意义(均*P*<0.001); B级和C级与A级相比, PLT显著减少,有统计学意义(*P*值分别为0.011和0.016), B级和C级之间无显著性差异(*P* = 0.39, 表1, 图1B)。

2.4 Child-Pugh各级TPO与PLT的Pearson相关分析结果 对照组TPO与PLT呈负相关(*r* = -0.363, *P* = 0.048); 而Child-Pugh A级(*r* = -0.011)和C级(*r* = 0.120)两者无相关性(*P*值分别为0.943和0.695); 在B级(*r* = 0.383)呈正相关且有统计学意义(*P* =

0.002, 表2)。

3 讨论

TPO是巨核细胞增殖、分化、成熟和介导血小板产生的最主要的细胞调节因子^[9], 主要由肝细胞合成^[10], 肝脏功能受损时, TPO的合成下降, PLT的产生就会减少^[11]。但TPO是否是肝硬化患者血小板减少的原因尚存在争议, 可能因研究人群和方法不同, TPO与PLT关系的研究报道并不一致^[12-15]。Aref等的研究主要分析了HCV感染(合并和未合并肝硬化)的患者^[12], Rios等和Español等只分析了肝硬化合并血小板减少的患者, 未分析肝硬化血小板正常的患者^[13,14], Eissa等分析了血吸虫性肝硬化患者^[15], 均认为TPO与PLT减少没有关系。Li等研究认为TPO与PLT呈正相关关系, Child-Pugh分级中, A、B级TPO水平升高, C级降低^[16,17]; Kujovich等研究认为, TPO合成减少是肝硬化血小板减少症的主要原因^[7], 但以上研究均未做不同分级间的相关性检验。本研究纳入了肝硬化血小板减少和血小板正常的患者, 进行Child-Pugh分级, 对各级TPO和PLT进行比较及相关性检验, 尚无研究报道。

本研究结果提示, 与对照组相比, 肝硬化Child-Pugh A级血清TPO水平有升高趋势(*P* = 0.19), PLT轻度下降, 有统计学意义(*P*<0.001)。在Child-Pugh A级, 肝脏功能尚属代偿期, 有较强

的储备能力, 由于血小板分布异常和破坏增加导致的血小板减少^[16], 机体负反馈调节后使肝脏合成TPO增加^[18], TPO作用于骨髓巨核细胞, 使血小板的合成代偿性增加^[19]. 循环PLT虽比对照组下降, 但仍大于 $100 \times 10^9/L$ ^[20,21], 属生理调节范畴, 故统计学意义不显著.

与对照组相比, Child-Pugh B级和C级血清TPO水平显著下降(P 值分别为0.001和0.048); 循环PLT显著减少(均 $P < 0.001$). 说明在Child-Pugh B级和C级的患者, 肝脏功能损伤严重, 肝脏合成TPO减少^[22]. 有报道, 与无肝硬化的对照组相比, 肝硬化组肝脏总TPO mRNA减少30%-40%^[23]; Osada等研究认为, 如果TPO缺乏, 未成熟的巨核细胞就会凋亡, 血小板的产生就会减少^[24]. de Sauvage等报道, 基因敲除鼠TPO mRNA降低50%, 循环PLT下降67%^[25]. 可以证实B、C级的患者, TPO合成减少导致了循环PLT下降. 但两组比较, TPO没有差异, 说明当肝脏功能下降到一定程度时, 肝脏合成TPO严重减少, 超过了肝脏的代偿范围, 提示晚期肝硬化患者, TPO合成受损是PLT减少的重要原因. 在肝硬化血小板减少症的发生中, 脾功能亢进是另一个重要原因^[26,27], 但本研究未进行脾脏功能与血小板减少症及与TPO关系的研究, 这方面有待于进一步的研究.

在生理条件下, PLT对TPO具有负反馈调节作用, 本研究结果与文献报道一致, 对照组TPO与PLT呈负相关关系^[28]. 在Child-Pugh A级, 肝脏功能维持在相对正常水平, TPO与PLT仍呈负相关关系; 在B级和C级肝脏功能损害加重, 血清TPO含量明显减低, 与PLT下降呈正相关. TPO和PLT的关系随着肝功能损害程度发生相应的改变. 有研究报道, 血清TPO与肝功能指标如白蛋白、凝血酶原时间、凝血酶原活动度等均有相关性^[13,17], TPO与反应肝功能的¹³C氨基比林呼吸试验正相关^[29], 提示TPO和PLT可以作为反应肝脏功能的指标.

总之, 在Child-Pugh A级, 血清TPO水平比健康对照组高, PLT也处于较高水平; 在Child-Pugh B、C级, 血清TPO水平明显下降, PLT下降也更明显, 说明肝硬化患者, 肝脏功能在一定范围内(Child-Pugh A级)时, TPO对血小板的生成具有调节作用, 在晚期肝硬化(Child-Pugh B、C级)患者, TPO合成减少是血小板减少的重要原因. 当肝功能较好时, 血清TPO水平较高, PLT维持在正常水平; 肝脏功能损伤严重时, 血清TPO水平

下降, PLT进行性减少, 其相关关系由负相关逐步转变成正相关, 进一步说明TPO和PLT可以作为反应肝脏功能的指标.

志谢: 感谢检验科巴静老师, 消化内科石田老师和李异玲老师对本研究的支持和指导.

4 参考文献

- 1 Nomura T, Kubota Y, Kitanaka A, Kurokouchi K, Inage T, Saigo K, Iseki K, Baba N, Yamaoka G, Arai T, Taminato T. Immature platelet fraction measurement in patients with chronic liver disease: a convenient marker for evaluating cirrhotic change. *Int J Lab Hematol* 2009 Aug 19. [Epub ahead of print]
- 2 Afdhal N, McHutchison J, Brown R, Jacobson I, Manns M, Poordad F, Weksler B, Esteban R. Thrombocytopenia associated with chronic liver disease. *J Hepatol* 2008; 48: 1000-1007
- 3 李璐, 曾争, 尹彪, 蔺小红, 万华, 霍娜, 徐京杭, 徐小元. 部分脾动脉栓塞术治疗肝硬化脾功能亢进39例. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1297-1301
- 4 秦建平, 蒋明德, 汪庆华, 李小安, 曾维政, 徐辉, 顾明. 部分脾栓塞治疗肝硬化并发门脉高压及脾功能亢进症. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 860-861
- 5 Yoshiuchi K, Takimoto Y, Moriya J, Inada S, Akabayashi A. Thrombopoietin and thrombocytopenia in anorexia nervosa with severe liver dysfunction. *Int J Eat Disord* 2009 Oct 6. [Epub ahead of print]
- 6 Peck-Radosavljevic M. Thrombocytopenia in liver disease. *Can J Gastroenterol* 2000; 14 Suppl D: 60D-66D
- 7 Kujovich JL. Hemostatic defects in end stage liver disease. *Crit Care Clin* 2005; 21: 563-587
- 8 中华医学会传染病与寄生虫病学分会, 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- 9 Fukushima-Shintani M, Suzuki K, Iwatsuki Y, Abe M, Sugawara K, Hirayama F, Kawasaki T. AKR-501 (YM477) in combination with thrombopoietin enhances human megakaryocytopoiesis. *Exp Hematol* 2008; 36: 1337-1342
- 10 Erickson-Miller CL, Delorme E, Tian SS, Hopson CB, Landis AJ, Valoret EI, Sellers TS, Rosen J, Miller SG, Luengo JL, Duffy KJ, Jenkins JM. Preclinical activity of eltrombopag (SB-497115), an oral, nonpeptide thrombopoietin receptor agonist. *Stem Cells* 2009; 27: 424-430
- 11 Witters P, Freson K, Verslype C, Peerlinck K, Hoylaerts M, Nevens F, Van Geet C, Cassiman D. Review article: blood platelet number and function in chronic liver disease and cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 1017-1029
- 12 Aref S, Mabed M, Selim T, Goda T, Khafagy N. Thrombopoietin (TPO) levels in hepatic patients with thrombocytopenia. *Hematology* 2004; 9: 351-356
- 13 Rios R, Sangro B, Herrero I, Quiroga J, Prieto J. The role of thrombopoietin in the thrombocytopenia of patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1311-1316
- 14 Español I, Hernández A, Muñoz-Díaz E, Ayats R, Pujol-Moix N. Usefulness of thrombopoietin in

■应用要点

本文探讨血小板生成素在不同肝脏功能的肝硬化患者血小板减少症中的作用, 为进一步研究血小板生成素的临床应用奠定基础.

■同行评价

本研究方法合理, 结论明确, 实验证据充足, 文章具有科学性、创新性和可读性较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平。

- the diagnosis of peripheral thrombocytopenias. *Haematologica* 1999; 84: 608-613
- 15 Eissa LA, Gad LS, Rabie AM, El-Gayar AM. Thrombopoietin level in patients with chronic liver diseases. *Ann Hepatol* 2008; 7: 235-244
- 16 Li Q, Sun GZ, Wang BE, Jia JD, Ma H, Wei YX, Cong YL, Shen J. [The relationship among the counts of platelet, thrombopoietin and spleen index in patients with liver cirrhosis] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; 12: 210-212
- 17 El-Barbary MA, Saad AE, Attia FM, Mandour MI, Haidara MA, Dallak MM, Isenovic ER. Thrombocytopenia in Patients With Chronic Hepatitis C: A Possible Role of HCV on Platelet Progenitor Cell Maturation. *Angiology* 2009 Aug 18. [Epub ahead of print]
- 18 Sungaran R, Markovic B, Chong BH. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood* 1997; 89: 101-107
- 19 Kuter DJ, Begley CG. Recombinant human thrombopoietin: basic biology and evaluation of clinical studies. *Blood* 2002; 100: 3457-3469
- 20 李琴, 孙桂珍, 王宝恩, 贾继东, 马红, 魏玉香, 丛玉隆, 沈静. 肝硬化患者血小板计数与血小板生成素及脾脏指数间的关系. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 210-212
- 21 孙素珍, 师水生, 刘俊. 慢性肝病患者血清血小板生成素与血小板计数的关系. *临床医药实践杂志* 2007; 16: 15-17
- 22 Jiang XH, Xie YT, Tan DM. [Study on the influencing factors of thrombocytopenia in viral hepatitis] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; 12: 734-736
- 23 Okubo M, Shiota G, Kawasaki H. Thrombopoietin levels in serum and liver tissue in patients with chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Clin Sci (Lond)* 2000; 99: 207-214
- 24 Osada M, Komeno T, Todokoro K, Takizawa M, Kojima H, Suzukawa K, Ninomiya H, Abe T, Nagasawa T. Immature megakaryocytes undergo apoptosis in the absence of thrombopoietin. *Exp Hematol* 1999; 27: 131-138
- 25 de Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh SM, Ryan A, Dowd M, Eaton DL, Moore MW. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med* 1996; 183: 651-656
- 26 Ohira M, Ishifuro M, Ide K, Irei T, Tashiro H, Itamoto T, Ito K, Chayama K, Asahara T, Ohdan H. Significant correlation between spleen volume and thrombocytopenia in liver transplant patients: a concept for predicting persistent thrombocytopenia. *Liver Transpl* 2009; 15: 208-215
- 27 Akyüz F, Yekeler E, Kaymakoglu S, Horasanli S, Ibrşim D, Demir K, Aksoy N, Poturoglu S, Badur S, Okten A. The role of thrombopoietin and spleen volume in thrombocytopenia of patients with noncirrhotic and cirrhotic portal hypertension. *Turk J Gastroenterol* 2007; 18: 95-99
- 28 Weksler BB. Review article: the pathophysiology of thrombocytopenia in hepatitis C virus infection and chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 26 Suppl 1: 13-19
- 29 Giannini E, Botta F, Borro P, Malfatti F, Fumagalli A, Testa E, Podestà E, Chiarbonello B, Polegato S, Mamone M, Testa R. Relationship between thrombopoietin serum levels and liver function in patients with chronic liver disease related to hepatitis C virus infection. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2516-2520

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

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

本刊讯 《中国期刊引证报告(扩刊版)》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统, 在“万方数据-数字化期刊群”基础上, 结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD), 以我国正式出版的各项学科16108种中英文期刊为统计源期刊。对全部期刊的引文数据, 严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后, 进行规范化处理和有效链接, 经统计分析, 编制而成。2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3683次, 影响因子0.729, 即年指标0.142, 引用期刊数732, 学科扩散指标0.533, 被引半衰期4.303, H指数8。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)

BMP2在原发性肝癌患者血清中的表达

温彪, 米俊杰, 侯桃华, 郭晓红, 白春爱, 许翠萍

温彪, 米俊杰, 侯桃华, 山西医科大学 山西省太原市 030001
郭晓红, 山西医科大学第一医院科研实验中心 山西省太原市 030001
白春爱, 山西医科大学第一医院科技处 山西省太原市 030001
许翠萍, 山西医科大学第一医院消化内科 山西省太原市 030001
山西省归国留学人员基金资助项目, No. 200568, No. 2009103
作者贡献分布: 此课题由许翠萍与温彪设计; 研究过程由温彪、米俊杰、侯桃华及郭晓红操作完成; 白春爱给予行政、技术支持; 研究所用试剂及分析工具由许翠萍提供; 数据分析由温彪完成; 在许翠萍指导下, 论文由温彪完成。
通讯作者: 许翠萍, 主任医师, 030001, 山西省太原市解放南路85号, 山西医科大学第一医院消化内科, cui ping xu@hotmail.com
电话: 0351-4639511
收稿日期: 2009-11-18 修回日期: 2009-12-10
接受日期: 2009-12-14 在线出版日期: 2010-02-08

Expression of serum bone morphogenetic protein 2 in patients with primary hepatic carcinoma

Biao Wen, Jun-Jie Mi, Tao-Hua Hou, Xiao-Hong Guo, Chun-Ai Bai, Cui-Ping Xu

Biao Wen, Jun-Jie Mi, Tao-Hua Hou, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Xiao-Hong Guo, Department of Experimental Center of Science and Research, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Chun-Ai Bai, Office of Science and Technology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Cui-Ping Xu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Supported by: the Foundation for Returned Overseas Chinese Scholars, Shanxi Province, No. 200568 and No. 2009103
Correspondence to: Cui-Ping Xu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Shanxi Medical University, 85 Jiefang South Road, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. cui ping xu@hotmail.com
Received: 2009-11-18 Revised: 2009-12-10
Accepted: 2009-12-14 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To investigate the diagnostic value of serum bone morphogenetic protein 2 (BMP2) in patients with primary hepatic carcinoma (PHC) by measuring serum BMP2 levels in patients with chronic liver disease.

METHODS: Seventy serum samples, including

20 from patients with chronic hepatitis, 20 from those with hepatic cirrhosis and 30 from those with PHC, were detected in the study. Seventeen serum samples from normal donors were used as normal controls. The serum level of BMP2 was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The content of serum alpha-fetoprotein (AFP) was determined by radioimmunoassay.

RESULTS: The level of serum BMP2 in PHC patients was significantly lower than those in chronic hepatitis patients, hepatic cirrhosis patients and normal controls (all $P < 0.05$). The sensitivity, specificity and accuracy of serum BMP2 measurement in diagnosis of PHC were 90%, 100% and 96.55%, respectively. The sensitivity of serum BMP2 measurement in diagnosis of PHC was higher than that of serum AFP measurement ($\chi^2 = 22.78, P = 0.001$).

CONCLUSION: Serum BMP2 level has appreciable value in the diagnosis of PHC.

Key Words: Bone morphogenetic protein 2; Hepatic carcinoma; Diagnosis

Wen B, Mi JJ, Hou TT, Guo XH, Bai CA, Xu CP. Expression of serum bone morphogenetic protein 2 in patients with primary hepatic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 397-399

摘要

目的: 探讨血清骨形态发生蛋白2(BMP2)对原发性肝癌(PHC)的诊断价值。

方法: 对70例慢性肝病患者及17例正常对照者血清进行检测, 并按临床诊断或病理诊断分组, 其中慢性病毒性肝炎20例, 肝炎后肝硬化20例, PHC 30例。分别用酶联免疫法检测血清BMP2, 用放射免疫法测定血清甲胎蛋白(AFP)。

结果: 肝癌组患者血清BMP2较正常对照组、肝炎组、肝硬化组降低, 且差异均有统计学意义($P < 0.05$); BMP2诊断PHC的敏感性是90%, 特异性是100%, 准确率是96.55%; BMP2诊断

■背景资料

原发性肝癌是一种恶性程度高, 进展快, 侵袭性强, 预后差的肿瘤, 临床上确诊的肝癌多数属于中晚期, 已失去有效的治疗机会, 因此, 对PHC的早期诊断极为重要。AFP是目前临床应用最广泛的肝癌肿瘤标志物, 但其敏感性仅为39%-65%。因此寻找敏感性较高的肝癌标志物仍是目前研究的热点。

■同行评议者

李文岗, 副教授, 福建医科大学附属厦门第一医院肝胆胰血管外科

■相关报道

黄河等用免疫组织化学法发现肝癌细胞中BMP2的表达强度明显低于肝癌癌旁组织,提示PHC发生可能与肝细胞中BMP2的含量减少有关。

PHC的敏感性高于AFP($\chi^2 = 22.78, P = 0.001$).

结论: 血清BMP2对PHC的诊断具有一定的价值。

关键词: 骨形态发生蛋白2; 原发性肝癌; 诊断

温彪, 米俊杰, 侯桃华, 郭晓红, 白春爱, 许翠萍. BMP2在原发性肝癌患者血清中的表达. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 397-399

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/397.asp>

0 引言

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是一种恶性程度高, 进展快, 侵袭性强, 预后差的肿瘤, 临床上确诊的肝癌多数属于中晚期, 已失去有效的治疗机会, 因此, 对PHC的早期诊断极为重要. 血清甲胎蛋白(AFP)是目前临床应用最广泛的肝癌肿瘤标志物, 但其敏感性仅为39%-65%^[1]. 因此寻找敏感性较高的肝癌标志物仍是目前研究的热点. 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是TGF- β 超家族成员中一族, 广泛存在于人体组织细胞、血液中, 其在胚胎的发生、发育以及在组织细胞的增殖、分化、凋亡等方面都起着重要作用^[2]. BMP2是BMPs家族中的重要成员, 其在胚胎肝中均有表达, 且在胚胎肝的发育、分化中起重要作用^[3,4]. 肝癌的发生、发展和胚胎肝的发育在分子机制上极其相似^[5], 因此, BMP2可能与肝癌的发生、发展有关, 并已得到一些研究证实^[6-9]. 本研究旨在通过检测慢性肝病患者血清BMP2, 探讨其在PHC诊断中的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 病例来自山西医科大学第一医院2009-05/2009-09经确诊的住院患者, 其中慢性病毒性肝炎20例, 肝炎后肝硬化20例, PHC 30例. 病毒性肝炎和肝炎后肝硬化病例的诊断均符合2000年第六次全国传染病与寄生虫学术会议修订的病毒性肝炎诊断标准^[10]. PHC诊断符合中国抗癌协会肝癌专业委员会2001年修订的原发性肝癌诊断标准^[11]. 正常对照组17例, 均为同期健康体检者. BMP2人血清单克隆抗体、PBS缓冲液(博士德生物工程有限公司); AFP试剂盒(天津协和医学科技有限公司); BIO-TEK(ELX-800)全自动酶标仪(美国宝特公司); 全自动洗板仪(美国宝特公司); SN-697型全自动双探头放射免疫 γ 计数器(上海核所日环光电公司).

■应用要点

骨形态发生蛋白2具有抑制肿瘤细胞增殖的作用, 原发性肝癌患者血清BMP2降低, 通过检测血清BMP2, 从而早期诊断PHC的发生。

1.2 方法

1.2.1 标本采集: 取清晨空腹静脉血, 立即离心后取血清, 于-20℃冰箱中保存、待测。

1.2.2 检测方法: 用酶联免疫吸附法检测血清BMP2, 用放射免疫法测定AFP. 严格按说明书进行操作。

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件进行分析, 数据用M(QR)表示, 多组间的比较采用Kruskal-Wallis检验, 选用最小显著差值法(least-significant difference, LSD法)法进行各组间的多重比较, 相关性分析采用Spearman等级相关分析法, 计数资料用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组血清BMP2的检测 PHC组血清BMP2较其他组低, 且差异均有统计学意义($P < 0.05$), 其余各组间差异均无统计学意义($P > 0.05$, 表1)。

2.2 BMP2和肿瘤标志物AFP在诊断PHC中的临床评价 以非肝癌患者血清BMP2含量下限148.95 ng/L为阳性临界值时, PHC组中有28例低于此数值, 其他组中无样本低于此数值, 因此, BMP2在诊断PHC的敏感性为90%(27/30), 特异性为100%(57/57), 准确率为96.55%(84/87); AFP以20 μ g/L为阳性临界值时, PHC组中有20例高于此数值, 其他组中有40例高于此数值, 因此, 在诊断PHC的敏感性为66.67%(20/30), 特异性为70.18%(40/57), 准确率为68.97%(60/87)。

2.3 BMP2和AFP在诊断PHC中的敏感性 用 χ^2 检验比较各指标在诊断PHC中的敏感性, 将BMP2和AFP进行比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 22.78, P = 0.001$, 表2)。

2.4 BMP2和AFP的相关性 采用Spearman等级相关分析法对各组血清BMP2和AFP进行相关性分析, 结果发现BMP2和AFP无相关性($r = 0.315, P = 0.235$)。

3 讨论

BMP2是天然骨形态发生蛋白提取物中的最主要的形式, 位于第20号染色体p12区^[12], 具有抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡的作用^[13]. 有学者发现其在消化系统肿瘤中也具有相应的作用, Hardwick等^[14]通过检测BMP2对结肠癌细胞的生物学行为的影响, 发现BMP2在体外能够抑制结肠癌细胞的生长、增殖, 促进细胞凋亡和分化. 有研究发现BMP2能促进肝癌细胞系HepG2中抑癌因子PTEN蛋白的表达^[6], 并可直

表 1 BMP2在慢性肝病患者血清中的水平

分组	n	BMP2 (ng/L) M(QR)
正常对照组	17	379.51(274.83)
慢性肝炎组	20	318.05(153.59)
肝硬化组	20	278.76(174.52)
原发性肝癌组	30	239.51(115.23) ^{ab}

^a $P \leq 0.05$ vs 慢性肝炎组和肝硬化组; ^b $P \leq 0.01$ vs 正常对照组.

表 2 BMP2和AFP诊断PHC的敏感性比较

AFP	n	BMP2	
		阳性	阴性
阳性	54	52	2
阴性	33	30	3
总计	87	82	5

接促进肝癌细胞系HepG2的凋亡^[7]及抑制肝癌细胞系Huh7的生长^[9]. 黄河等^[8]用免疫组织化学法发现肝癌细胞中BMP2的表达强度明显低于肝癌癌旁组织, 提示PHC发生可能与肝细胞中BMP2的含量减少有关. BMPs为一种分泌性蛋白, 当BMP2由组织细胞分泌释放入血后, 就可在血清中检测到BMP2. 1984年, Urist等^[15]首次用放射免疫法检测到了血清中BMPs. 目前临床上检测血清BMP2的报道尚少见, 尚未见定量检测肝癌患者血清BMP2的报道.

本实验研究发现PHC组血清BMP2水平较正常对照组、肝炎组、肝硬化组低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 而正常对照组、肝炎组、肝硬化组间差异无统计学意义. Xu等^[9]应用部分肝切除大鼠模型观察术后不同时间点BMP2的动态变化, 发现BMP2在肝大部切除术后再生肝组织中的表达强度明显低于正常肝组织, 提示BMP2有抑制肝细胞再生的作用. 而BMP2具有抑制肿瘤细胞增殖的作用^[13]. 因此推测, 本实验中PHC组BMP2较其他组降低, 可能是由于肝癌细胞大量增殖, BMP2失去其抑制肿瘤的作用. 所以, 通过检测血清BMP2, 可以早期诊断PHC的发生. 本实验中, BMP2在诊断PHC中有较高的敏感性(90%). 同时, BMP2诊断PHC的敏感性显著高于传统肿瘤标志物AFP($P < 0.01$). 因此,

BMP2在PHC的诊断中具有广泛的前景, 值得我们进一步深入研究.

4 参考文献

- 1 Daniele B, Bencivenga A, Megna AS, Tinessa V. Alpha-fetoprotein and ultrasonography screening for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: S108-S112
- 2 Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; 10: 1580-1594
- 3 Danesh SM, Villasenor A, Chong D, Soukup C, Cleaver O. BMP and BMP receptor expression during murine organogenesis. *Gene Expr Patterns* 2009; 9: 255-265
- 4 Rossi JM, Dunn NR, Hogan BL, Zaret KS. Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev* 2001; 15: 1998-2009
- 5 Maegdefrau U, Amann T, Winklmeier A, Braig S, Schubert T, Weiss TS, Schardt K, Warnecke C, Hellerbrand C, Bosserhoff AK. Bone morphogenetic protein 4 is induced in hepatocellular carcinoma by hypoxia and promotes tumour progression. *J Pathol* 2009; 218: 520-529
- 6 李秀青, 王琦. 肝癌中骨形成蛋白2对PTEN蛋白水平影响的研究. *中国药物与临床* 2007; 7: 24-26
- 7 唐四元. 骨形成蛋白2诱导肝癌细胞凋亡及其机制. *中国普通外科杂志* 2008; 17: 34-36
- 8 黄河, 伍赶球, 祝继明, 陈庆林. 肝细胞癌及癌旁组织中骨形态发生蛋白的免疫组织化学研究. *中国医师杂志* 2002; 4: 378-380
- 9 Xu CP, Ji WM, van den Brink GR, Peppelenbosch MP. Bone morphogenetic protein-2 is a negative regulator of hepatocyte proliferation downregulated in the regenerating liver. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7621-7625
- 10 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001; 19: 56-62
- 11 中华抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌的临床诊断与分期标准. *现代实用医学* 2002; 14: 213
- 12 Tabas JA, Zasloff M, Wasmuth JJ, Emanuel BS, Altherr MR, McPherson JD, Wozney JM, Kaplan FS. Bone morphogenetic protein: chromosomal localization of human genes for BMP1, BMP2A, and BMP3. *Genomics* 1991; 9: 283-289
- 13 Glozak MA, Rogers MB. Specific induction of apoptosis in P19 embryonal carcinoma cells by retinoic acid and BMP2 or BMP4. *Dev Biol* 1996; 179: 458-470
- 14 Hardwick JC, Van Den Brink GR, Bleuming SA, Ballester I, Van Den Brande JM, Keller JJ, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology* 2004; 126: 111-121
- 15 Urist MR, Hudak RT. Radioimmunoassay of bone morphogenetic protein in serum: a tissue-specific parameter of bone metabolism. *Proc Soc Exp Biol Med* 1984; 176: 472-475

■同行评价

文章采用BMP-2作为诊断原发性肝癌的标志物, 具有一定的创新性, 为诊断肝癌提供了一个新的标志物.

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

胆总管结石对血清CA19-9的影响

谢华平, 问明瑶

■背景资料

CA19-9是临床常用的肿瘤标志物,对引起阻塞性黄疸的胰腺癌、胆管癌等均有一定的诊断价值。但一些良性疾病合并阻塞性黄疸时,也可以引起CA19-9升高。本文结合胆总管结石患者相关临床资料,分析治疗前的肿瘤标志物CA19-9、CEA与总胆红素、直接胆红素的关联性,以及治疗前后CA19-9变化与总胆红素、直接胆红素变化的关联性。

谢华平, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科
湖北省武汉市 430030

问明瑶, 华中科技大学同济医学院附属同济医院耳鼻喉-头
颈外科 湖北省武汉市 430030

作者贡献分布: 此课题由谢华平设计; 研究过程由谢华平与问明瑶完成; 分析工具部分由谢华平提供; 数据分析由谢华平与问明瑶完成; 本论文写作由谢华平完成。

通讯作者: 谢华平, 主治医师, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。rainexie@126.com

收稿日期: 2009-11-21 修回日期: 2009-12-15

接受日期: 2009-12-21 在线出版日期: 2010-02-08

Elevated serum CA19-9 levels in patients with common bile duct stones

Hua-Ping Xie, Ming-Yao Wen

Hua-Ping Xie, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Ming-Yao Wen, Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Hua-Ping Xie, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. rainexie@126.com

Received: 2009-11-21 Revised: 2009-12-15

Accepted: 2009-12-21 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To observe changes in serum carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) and carcinoembryonic antigen (CEA) levels in patients with common bile duct stones.

METHODS: A total of 68 patients with surgically confirmed common bile duct stones were included in the study. The correlations of serum CEA and CA19-9 with total bilirubin and direct bilirubin were analyzed. For 20 patients whose serum CA19-9 levels were twice more than the upper limit of normal values, a consistent follow-up was conducted to analyze the correlations of the difference between preoperative and postoperative serum CA19-9 levels with total bilirubin and direct bilirubin.

RESULTS: Significant correlations were noted

between serum CA19-9 and total bilirubin and direct bilirubin ($r = 0.813$ and 0.786 , respectively; both $P = 0.000$) in patients with common bile duct stones. No significant correlations were noted between serum CEA and total bilirubin and direct bilirubin. The difference between preoperative and postoperative serum CA19-9 levels has significant correlations with total bilirubin and direct bilirubin ($r = 0.787$ and 0.806 , respectively; both $P = 0.000$).

CONCLUSION: Elevated serum CA19-9 levels are noted in patients with concurrent common bile duct stones and obstructive jaundice. In these patients, serum CA19-9 as a tumor marker has a poor specificity.

Key Words: Common bile duct stone; Obstructive jaundice; CA19-9

Xie HP, Wen MY. Elevated serum CA19-9 levels in patients with common bile duct stones. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 400-403

摘要

目的: 探讨胆总管结石对血清CEA、CA19-9的影响。

方法: 回顾经ERCP或手术证实、治疗的胆总管结石患者68例,分析血清CEA,特别是血清CA19-9与胆总管结石患者总胆红素、直接胆红素的相关性;并对20例血清CA19-9值超过正常上限两倍以上患者统一时间进行随访,分析治疗前后血清CA19-9变化值与总胆红素、直接胆红素变化值的相关性。

结果: 血清CA19-9与总胆红素、直接胆红素存在明显相关性($r = 0.813, 0.786$, 均 $P = 0.000$);血清CEA与总胆红素、直接胆红素不存在相关性;治疗前后血清CA19-9变化值与总胆红素、直接胆红素变化值存在明显相关性($r = 0.787, 0.806$, 均 $P = 0.000$)。

结论: 胆总管结石合并阻塞性黄疸时,可导致血清CA19-9升高,此时血清CA19-9作为肿瘤标志物的特异性差。

■同行评议者

黄恒青, 主任医师, 福建省第二人民医院消化内科

关键词: 胆总管结石; 阻塞性黄疸; CA19-9

谢华平, 问明瑶. 胆总管结石对血清CA19-9的影响. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 400-403
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/400.asp>

0 引言

糖类抗原CA19-9在上消化系统肿瘤细胞中普遍表达^[1], 其测定是临床上诊断恶性胰胆疾病的可靠手段^[2]. 但是, 很多的良性疾病也可以导致血清CA19-9升高^[3-9]. 本文结合胆总管结石患者接受ERCP或手术治疗前后的情况, 对胆总管结石导致血清CA19-9升高进行分析.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2004-01/2009-08华中科技大学同济医学院附属同济医院经ERCP或者外科手术治疗的胆总管结石患者68例, 其中男40例, 女28例, 年龄17-83(平均54)岁. 所用病例均无肿瘤病史及罹患肿瘤的依据. 术前均进行相关的影像学检查(包括腹部超声、CT或者MRI检查)提示存在胆总管结石, 再经ERCP或者手术证实及治疗.

1.2 方法 术前检查此类患者的胆红素等生化指标、血清CEA(本院参考值: 0-5 $\mu\text{g/L}$)及CA19-9(本院参考值: 0-37 kU/L)等肿瘤标志物. 对血清CA19-9升高超过正常值上限两倍以上(CA19-9>74 kU/L)的患者进行随访. 根据血清总胆红素的水平, 将所有患者分成3组: 重度黄疸组(总胆红素大于170 $\mu\text{mol/L}$)、轻-中度黄疸组(总胆红素介于34-170 $\mu\text{mol/L}$)、无明显黄疸组(总胆红素小于34 $\mu\text{mol/L}$), 并统计患者的血清总胆红素、直接胆红素、CEA、CA19-9值.

统计学处理 应用统计软件包SPSS18.0, 计量资料数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 进行近似 t 检验或配对 t 检验及相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 血清CA19-9、CEA与血清总胆红素、直接胆红素的关系 血清CA19-9与血清总胆红素、直接胆红素明显相关($r = 0.813$, $P = 0.000$; $r = 0.786$, $P = 0.000$). 血清CEA与血清总胆红素、直接胆红素不相关($r = 0.061$, $P = 0.622$; $r = 0.109$, $P = 0.378$, 表1).

2.2 黄疸程度不同组间血清CA19-9、CEA值的比较 重度黄疸组与轻-中度黄疸组、重度黄疸组与无明显黄疸组、轻-中度黄疸组与无明显黄

疸组之间血清CA19-9的水平均有统计学意义($t = 4.415$, $P = 0.003$; $t = 4.894$, $P = 0.002$; $t = 2.326$, $P = 0.028$). 重度黄疸组与轻-中度黄疸组、重度黄疸组与无明显黄疸组、轻-中度黄疸组与无明显黄疸组血清CEA的水平均无统计学意义($t = 0.701$, $P = 0.504$; $t = 1.111$, $P = 0.302$; $t = 1.378$, $P = 0.175$).

2.3 治疗前、后血清CA19-9变化分析 治疗后, 随着血清总胆红素及直接胆红素的下降, 血清CA19-9值也明显下降, 血清CA19-9的变化值($640.69 \text{ kU/L} \pm 709.00 \text{ kU/L}$)与总胆红素变化值($144.45 \mu\text{mol/L} \pm 92.71 \mu\text{mol/L}$)、直接胆红素变化值($93.93 \mu\text{mol/L} \pm 62.30 \mu\text{mol/L}$)存在明显相关($r = 0.078$, 0.806 , 均 $P = 0.000$).

3 讨论

CA19-9属于I型糖类抗原, 主要分布于正常胎儿胰腺、胆囊、肝、肠等组织, 成人则存在于胰、胆管上皮处, 以唾液黏蛋白形式存在于血清中, 含量甚微. 自从Korproski等^[10]发现人类结肠肿瘤细胞产生CA19-9以来, 血清CA19-9作为临床常用的肿瘤标志物, 应用于胰腺癌、胆管癌、结肠癌、胃癌等恶性疾病的诊断、治疗、预后和复发的判断^[11-22]. 但也发现, 临床上很多良性疾病可以引起CA19-9升高^[3-9]. 原因可能是与半抗原结合的载体, 在组织损伤或破坏时, 神经苷脂增加, 进入血液循环, 这时单克隆抗体只识别抗原, 导致假阳性增加^[23]. 本文的资料显示, 胆总管结石引起CA19-9升高, 与总胆红素及直接胆红素明显相关, 而且总体趋势而言, 这种CA19-9的升高随着黄疸的程度增加而增加, 又随着黄疸的下降而下降. 这说明阻塞性黄疸可引起CA19-9值的升高, 这与有关文献^[3,8,9,24-29]提示良性疾病引起阻塞性黄疸可导致CA19-9升高的报道相符. 因而在阻塞性黄疸时, 血清CA19-9作为肿瘤标志物的特异性差, 这与相关文献^[16,19,30,31]报道CA19-9作为胰腺癌、胆管癌等的肿瘤标志物特异性不高相符. 在解除阻塞性黄疸后, 血清CA19-9又可以恢复到正常水平, 这与Marrelli等^[28]的报道相符. 因而血清CA19-9值升高而并无黄疸或者黄疸程度不足以解释时, 或者黄疸减退后CA19-9值仍保持高值甚或有增加趋势时, 仍需警惕肿瘤的可能性.

癌胚抗原(CEA)在1965年由Gold等^[32]和Chen等^[34]进行了描述, 是临床常用的肿瘤标志物, 也应用于消化系统恶性疾病, 包括引起阻塞性

■ 研发前沿

阻塞性黄疸可引起血清CA19-9升高, 如何在阻塞性黄疸的情况下, 客观评价血清CA19-9的临床意义, 是困扰临床医生的一个难点.

■相关报道

Marrelli等报道, 良性疾病引起的阻塞性黄疸中, 61%的患者有CA19-9升高. 在解除阻塞性黄疸的患者中, 38例恶性肿瘤中有18例患者, 以及几乎所有的良性疾病患者CA19-9下降. 在成功解除阻塞性黄疸的情况下, CA19-9保持不变或者测量值大于90 kU/L, 强烈提示恶性原因所致的阻塞性黄疸.

表 1 各组患者血清CA19-9、CEA、总胆红素及直接胆红素水平

分组	n	总胆红素($\mu\text{mol/L}$)	直接胆红素($\mu\text{mol/L}$)	CEA($\mu\text{g/L}$)	CA-199(kU/L)
重度黄疸组	8	252.65 $\pm$ 60.65	172.10 $\pm$ 33.54	2.95 $\pm$ 7.05	1263.70 $\pm$ 719.73
轻-中度黄疸组	27	83.87 $\pm$ 35.83	49.86 $\pm$ 24.73	2.43 $\pm$ 0.92	123.51 $\pm$ 231.29
无明显黄疸组	33	12.83 $\pm$ 7.05	3.90 $\pm$ 3.00	2.14 $\pm$ 0.65	9.09 $\pm$ 9.41

黄疸的胰腺癌、胆管癌的诊断、治疗、预后及复发的评估^[17,22,30,33-38]. 本研究中, 即使合并明显黄疸的胆总管结石患者, 血清CEA也在正常范围, 血清CEA与总胆红素、直接胆红素也无明显关联. 鉴于CEA对引起阻塞性黄疸的恶性肿瘤有一定的灵敏性和特异性, 在阻塞性黄疸时, 血清CEA的检测, 可能有利于良、恶性疾病的鉴别.

4 参考文献

- Atkinson BF, Ernst CS, Herlyn M, Steplewski Z, Sears HF, Koprowski H. Gastrointestinal cancer-associated antigen in immunoperoxidase assay. *Cancer Res* 1982; 42: 4820-4823
- Steinberg W. The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 350-355
- Robertson AG, Davidson BR. Mirizzi syndrome complicating an anomalous biliary tract: a novel cause of a hugely elevated CA19-9. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19: 167-169
- Ito S, Gejyo F. Elevation of serum CA19-9 levels in benign diseases. *Intern Med* 1999; 38: 840-841
- Maestranzi S, Przemioslo R, Mitchell H, Sherwood RA. The effect of benign and malignant liver disease on the tumour markers CA19-9 and CEA. *Ann Clin Biochem* 1998; 35 (Pt 1): 99-103
- Mauer KR, Lopatin RN, Hoffman WA, Grossman ET, Russo RD. Decrease in a markedly elevated CA19-9 level after stenting of a benign pancreatic ductal stricture. *Gastrointest Endosc* 1995; 42: 261-263
- Ye C, Ito K, Komatsu Y, Takagi H. Extremely high levels of CA19-9 and CA125 antigen in benign mucinous ovarian cystadenoma. *Gynecol Oncol* 1994; 52: 267-271
- Murohisa T, Sugaya H, Tetsuka I, Suzuki T, Harada T. A case of common bile duct stone with cholangitis presenting an extraordinarily high serum CA19-9 value. *Intern Med* 1992; 31: 516-520
- Turtel PS, Kreel I, Israel J, Frager D, Berman D. Elevated CA19-9 in a case of Mirizzi's syndrome. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 355-357
- Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet* 1979; 5: 957-971
- Park IJ, Choi GS, Jun SH. Prognostic value of serum tumor antigen CA19-9 after curative resection of colorectal cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 4303-4308
- Formica V, Massara MC, Portarena I, Fiaschetti V, Grenga I, Del Vecchio Blanco G, Sileri P, Tosetto L, Skoulidis F, Pallone F, Roselli M. Role of CA19.9 in predicting bevacizumab efficacy for metastatic colorectal cancer patients. *Cancer Biomark* 2009; 5: 167-175
- Kim YC, Kim HJ, Park JH, Park DI, Cho YK, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Shin JH. Can preoperative CA19-9 and CEA levels predict the resectability of patients with pancreatic adenocarcinoma? *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 1869-1875
- Snozek CL, Mascarenhas RC, O'Kane DJ. Use of cyst fluid CEA, CA19-9, and amylase for evaluation of pancreatic lesions. *Clin Biochem* 2009; 42: 1585-1588
- Waraya M, Yamashita K, Katagiri H, Ishii K, Takahashi Y, Furuta K, Watanabe M. Preoperative serum CA19-9 and dissected peripancreatic tissue margin as determiners of long-term survival in pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1231-1240
- Li YG, Zhang N. Clinical significance of serum tumour M2-PK and CA19-9 detection in the diagnosis of cholangiocarcinoma. *Dig Liver Dis* 2009; 41: 605-608
- Kim HJ, Lee KW, Kim YJ, Oh DY, Kim JH, Im SA, Lee JS. Chemotherapy-induced transient CEA and CA19-9 surges in patients with metastatic or recurrent gastric cancer. *Acta Oncol* 2009; 48: 385-390
- Wong D, Ko AH, Hwang J, Venook AP, Bergsland EK, Tempero MA. Serum CA19-9 decline compared to radiographic response as a surrogate for clinical outcomes in patients with metastatic pancreatic cancer receiving chemotherapy. *Pancreas* 2008; 37: 269-274
- Zhang S, Wang YM, Sun CD, Lu Y, Wu LQ. Clinical value of serum CA19-9 levels in evaluating resectability of pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3750-3753
- Smith RA, Bosonnet L, Ghaneh P, Raraty M, Sutton R, Campbell F, Neoptolemos JP. Preoperative CA19-9 levels and lymph node ratio are independent predictors of survival in patients with resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig Surg* 2008; 25: 226-232
- Smith RA, Ghaneh P, Sutton R, Raraty M, Campbell F, Neoptolemos JP. Prognosis of resected ampullary adenocarcinoma by preoperative serum CA19-9 levels and platelet-lymphocyte ratio. *J Gastrointest Surg* 2008; 12: 1422-1428
- Qin XL, Wang ZR, Shi JS, Lu M, Wang L, He QR. Utility of serum CA19-9 in diagnosis of cholangiocarcinoma: in comparison with CEA. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 427-432
- 邓辉洲, 周载平, 陈宏, 胡泽民. 阻塞性胆道疾病中血清CA199水平分析. 中华普通外科学文献(电子版) 2008; 2: 46-47
- Principe A, Del Gaudio M, Grazi GL, Paolucci U, Cavallari A. Mirizzi syndrome with cholecystocholedocal fistula with a high CA19-9 level mimicking biliary malignancies: a case report. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1259-1262
- Mann DV, Edwards R, Ho S, Lau WY, Glazer

- G. Elevated tumour marker CA19-9: clinical interpretation and influence of obstructive jaundice. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26: 474-479
- 26 Ohshio G, Manabe T, Watanabe Y, Endo K, Kudo H, Suzuki T, Tobe T. Comparative studies of DUPAN-2, carcinoembryonic antigen, and CA19-9 in the serum and bile of patients with pancreatic and biliary tract diseases: evaluation of the influence of obstructive jaundice. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1370-1376
 - 27 Albert MB, Steinberg WM, Henry JP. Elevated serum levels of tumor marker CA19-9 in acute cholangitis. *Dig Dis Sci* 1988; 33: 1223-1225
 - 28 Marrelli D, Caruso S, Pedrazzani C, Neri A, Fernandes E, Marini M, Pinto E, Roviello F. CA19-9 serum levels in obstructive jaundice: clinical value in benign and malignant conditions. *Am J Surg* 2009; 198: 333-339
 - 29 Sheen-Chen SM, Sun CK, Liu YW, Eng HL, Ko SF, Kuo CH. Extremely elevated CA19-9 in acute cholangitis. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 3140-3142
 - 30 Ni XG, Bai XF, Mao YL, Shao YF, Wu JX, Shan Y, Wang CF, Wang J, Tian YT, Liu Q, Xu DK, Zhao P. The clinical value of serum CEA, CA19-9, and CA242 in the diagnosis and prognosis of pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 164-169
 - 31 秦兴雷, 石莉, 王林. 胆道良恶性病变中CA19-9检测的临床意义. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 814-815
 - 32 Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122: 467-481
 - 33 Klapdor R, Bahlo M, Babinsky A. Further evidence for prolongation of survival of pancreatic cancer patients by efficacy orientated sequential polychemotherapy (EOSPC) based on serial tumor marker determinations (CA 19-9/CEA). *Anticancer Res* 2005; 25: 1687-1691
 - 34 Chen CY, Shiesh SC, Tsao HC, Lin XZ. The assessment of biliary CA 125, CA 19-9 and CEA in diagnosing cholangiocarcinoma--the influence of sampling time and hepatolithiasis. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 616-620
 - 35 Charalabopoulos K, Kotsalos A, Batistatou A, Charalabopoulos A, Peschos D, Vezyraki P, Kalfakakou V, Metsios A, Charalampopoulos A, Macheras A, Agnantis N, Evangelou A. Serum and tissue selenium levels in gastric cancer patients and correlation with CEA. *Anticancer Res* 2009; 29: 3465-3467
 - 36 D'Armento G, Daniele L, Mariani S, Ottaviani D, Mussa A, Cassoni P, Sapino A, Bussolati G. Added value of combined gene and protein expression of CK20 and CEA in non-macroscopically involved lymph nodes of colorectal cancer. *Int J Surg Pathol* 2009; 17: 93-98
 - 37 Yamamoto M, Baba H, Toh Y, Okamura T, Maehara Y. Peritoneal lavage CEA/CA125 is a prognostic factor for gastric cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 471-476
 - 38 Lee IK, Kim do H, Gorden DL, Lee YS, Sung NY, Park GS, Kim HJ, Kang WK, Park JK, Ahn CH, Kim JG, Jeon HM, Oh ST. Prognostic value of CEA and CA 19-9 tumor markers combined with cytology from peritoneal fluid in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2009; 16: 861-870

■同行评价

胆总管结石合并阻塞性黄疸时,血清CA19-9升高十分常见,本文回顾分析认为血清CA19-9作为肿瘤标记物的特异性差,对临床具有一定的指导意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

《世界华人消化杂志》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)采用了被引量、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)

内镜治疗急性胆源性胰腺炎的系统评价

柴琛, 曹农, 李强, 杨克虎

■背景资料

急性胆源性胰腺炎(ABP)发病急, 进展快, 早期干预可迅速改善病情并减少复发, 系统评价内镜治疗ABP的临床疗效具有重要的指导意义。

柴琛, 曹农, 李强, 杨克虎, 兰州大学第一医院普通外科 甘肃省兰州市 730000

作者贡献分布: 柴琛与曹农对此文所作贡献两均等; 此课题由柴琛、曹农、李强及杨克虎设计; 研究过程由柴琛、曹农、李强及杨克虎操作完成; 研究所用分析工具由杨克虎提供; 数据分析由柴琛与李强完成; 本论文写作由柴琛与李强完成。

通讯作者: 柴琛, 副主任医师, 730000, 甘肃省兰州市城关区东岗西路1号, 兰州大学第一医院普通外科。

chaichen2008@yahoo.com.cn

电话: 0931-8625200-6519

收稿日期: 2009-10-16 修回日期: 2009-12-20

接受日期: 2009-12-21 在线出版日期: 2010-02-08

Endoscopic treatment of acute biliary pancreatitis: a systematic review

Chen Chai, Nong Cao, Qiang Li, Ke-Hu Yang

Chen Chai, Nong Cao, Qiang Li, Ke-Hu Yang, Department of General Surgery, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Nong Cao, Department of General Surgery, the First Hospital of Lanzhou University, 1 Donggang West Road, Chengguan District, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. chaichen2008@yahoo.com.cn

Received: 2009-10-16 Revised: 2009-12-20

Accepted: 2009-12-21 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To assess the efficacy and safety of endoscopic treatment of acute biliary pancreatitis (ABP).

METHODS: Relevant databases were searched to identify randomized controlled trials or quasi-randomized controlled trials evaluating the efficacy and safety of endoscopic treatment of acute biliary pancreatitis. The quality of the included studies was evaluated using the criteria recommended by the Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.0. Statistical analyses were performed with RevMan5.0 (Cochrane Collaboration) software.

RESULTS: Four randomized controlled trials or quasi-randomized controlled trials involving 317 patients were included. A meta-analysis showed that there were significant differences, between endoscopic treatment group and conventional treatment group, in the time to onset of ab-

dominal pain relief [odd ratio (OR) = -2.98; 95% confidence interval (CI): -4.98, -0.97], the time to recovery of white blood cells (OR = -4.63, 95%CI: -5.29, -3.97) and serum amylase (OR = -3.85; 95%CI: -4.49, -3.21), the complication rate (OR = 0.34; 95%CI: 0.18, 0.66), and the hospitalization time (OR = -7.51; 95%CI: -9.89, -5.13).

CONCLUSION: Current evidence shows that endoscopic treatment of acute biliary pancreatitis can significantly reduce the time to onset of abdominal pain relief, the time to recovery of white blood cells and serum amylase, the complication rate, and the hospitalization time.

Key Words: Endoscopy; Acute biliary pancreatitis; Systematic review

Chai C, Cao N, Li Q, Yang KH. Endoscopic treatment of acute biliary pancreatitis: a systematic review. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 404-408

摘要

目的: 评价内镜治疗急性胆源性胰腺炎的临床疗效和安全性。

方法: 通过计算机检索全面收集全世界关于内镜治疗急性胆源性胰腺炎的随机对照试验/或半随机对照试验, 并辅手工检索和其他检索。按照纳入排除标准纳入文献, 由两名研究者独立筛选并提取资料, 采用Handbook 5.0推荐的质量评价标准评价纳入研究的方法学质量, 采用RevMan 5.0软件进行统计学处理。

结果: 最终纳入4个研究, 包括317例患者。Meta分析结果显示内镜组治疗组与传统治疗组相比, 在腹痛缓解时间(OR = -2.98, 95%CI: -4.98, 0.97)、白细胞复常时间(OR = -4.63, 95%CI: -5.29, -3.97)、血淀粉酶复常时间(OR = -3.85, 95%CI: -4.49, -3.21)、并发症发生率(OR = 0.34, 95%CI: 0.18, 0.66)和住院时间(OR = -7.51, 95%CI: -9.89, -5.13)方面存在统计学差异。

结论: 当前研究显示, 与传统治疗组相比, 内镜治疗组能显著减少急性胆源性胰腺炎的腹痛

■同行评议者

刘超, 副教授, 中山大学孙逸仙纪念医院肝胆胰外科

缓解时间、白细胞及血淀粉酶复常时间,降低并发症的发生,缩短住院时间。

关键词: 内镜; 急性胆源性胰腺炎; 系统评价

柴琛, 曹农, 李强, 杨克虎. 内镜治疗急性胆源性胰腺炎的系统评价. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 404-408

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/404.asp>

0 引言

急性胆源性胰腺炎(acute biliary pancreatitis, ABP)是一种常见的外科急腹症, 占急性胰腺炎总发病率的50%以上, 该病起病急、发展快、病死率高^[1]。引起ABP的胆道病变包括胆石症、胆总管囊性扩张、先天性胰胆管汇流异常、Oddi括约肌功能紊乱等, 其中胆石症是首要原因, 共同通道是胆胰反流的解剖学基础。ABP在临床上以急性上腹痛、恶心呕吐、发热、淀粉酶升高、发现胆道结石等病变为主要特点。传统疗法是内科综合治疗和/或外科手术治疗, 但疗效欠佳。Neoptolemos等^[2]首先应用内镜治疗ABP, 认为早期行ERCP和EST可显著降低ABP并发症的发生率并缩短住院时间。随着胆道疾病内镜器械的发展, 操作技术的不断提高, 通过内镜逆行性胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatograph, ERCP)、十二指肠乳头括约肌切开术(endoscopic sphincterotomy, EST)及经内镜鼻胆管引流术(endoscopic nasobiliary drainage, ENBD)已普遍用于胆总管疾病的诊治, 并取得了明显的疗效。周如建等^[3]报道135例ABP早期行ENBD和EST安全有效, 并发症少, 是ABP理想的手术方法。为了进一步明确内镜治疗急性胆源性胰腺炎的临床疗效和安全性, 本研究利用Cochrane系统评价的方法对所纳入的随机对照试验进行系统评价, 以期为临床实践提供最佳决策。

1 材料和方法

1.1 材料 以“内镜 AND 急性胆源性胰腺炎”检索中国期刊全文数据库(1994/2009-09), 中国生物医学文献数据库(1978/2009-09), 中文科技期刊全文数据库(1989/2009-09), 数字化期刊全文数据库(1997/2009-09); 以“endoscopic AND acute biliary pancreatitis”检索PubMed(1966/2009-09), Cochrane library(2009年3期), EMBASE(1974/2009-09), SCI(1974/2009-09)。检索词分目标疾病和

干预措施两大部分, 并根据具体数据库调整, 所有检索采用主题词[MEDLINE(MeSH), EMBASE(EMTREE)]与自由词相结合的方式, 所有检索策略通过多次预检索后确定。手工检索《中华消化内镜杂志》、《中国内镜杂志》、《现代消化及介入诊疗》, 并用Google Scholar、Medical Martix等搜索引擎在互联网上查找相关文献, 追查已纳入文献的参考文献, 与本领域专家、通讯作者等联系以获取以上检索未发现的相关信息。如试验报告不详或资料缺乏, 通过信件与作者进行联系获取。初检相关文献133篇。

1.2 方法

1.2.1 纳入排除标准: (1)研究类型: 随机对照试验和/或半随机对照试验, 无论是否采用盲法, 语种不限; (2)研究对象: 符合WHO有关急性胰腺炎的诊断要点, 且B超或CT发现胆囊结石、胆总管结石、胆总管扩张, 并排除其他原因引起的胰腺炎(如酒精性、高脂血症和外伤等), 其种族、国籍、年龄、性别不限; (3)干预措施: 内镜治疗组 vs 传统治疗组; (4)观察指标: 腹痛缓解时间、白细胞复常时间、血淀粉酶复常时间和住院时间。

1.2.2 文献筛选和资料提取: 由两名研究者独立阅读所获文献题目和摘要, 在排除明显不符合纳入标准的试验后, 对可能符合纳入标准的试验阅读全文, 以确定是否符合纳入标准。两位研究者交叉核对纳入试验的结果对有分歧而难以确定其是否纳入的试验通过讨论或由第3位研究者决定其是否纳入。缺乏的资料通过电话或信件与作者进行联系予以补充。提取资料主要包括: (1)一般资料: 题目、作者姓名、发表日期和文献来源; (2)研究特征: 研究对象的一般情况、各组患者的基线可比性、干预措施; (3)结局指标: 腹痛缓解时间、白细胞复常时间、血淀粉酶复常时间和住院时间。

1.2.3 质量评价: 纳入文献的方法学质量依据Cochrane评价手册5.0^[4]随机对照试验治疗的质量评价标准进行评估: (1)采用何种随机分配方法, 方法是否正确; (2)是否进行分配隐藏, 方法是否正确; (3)是否采用盲法, 对哪些人实施了盲法; (4)有无失访和退出, 是否采用意向性分析。

统计学处理 采用Cochrane协作网提供的RevMan5.0^[5]统计软件进行Meta分析。计数资料采用相对危险度(RR)为疗效分析统计量; 计量资料采用加权均数差(WMD)或标准化均数差

■相关报道

1997年美英两国将ERCP、EST作为A级推荐列入了AP的治疗方案中; 2002年中国急性胰腺炎处理指南主张当ABP患者有可疑或已证实结石符合重症标准或同时存在胆管炎、黄疸扩张或患者症状开始较轻后来加重时, 应行ERCP+EST, 及时解除壶腹梗阻, 不但能使胰腺炎得到恢复且可预防严重并发症发生。

■创新亮点

本文首次对内镜治疗ABP进行系统评价,具有重要的临床指导意义。

表 1 纳入研究的一般情况

作者	<i>n</i>		性别(M/F)		年龄(岁)	
	内镜治疗组	传统治疗组	内镜治疗组	传统治疗组	内镜治疗组	传统治疗组
陈国和等 ^[6]	38	38	22/16	23/15	40.50 ± 2.50	41.00 ± 2.00
何剑琴等 ^[7]	46	43	22/24	21/22	47.83 ± 12.90	47.95 ± 12.48
楼晓楼等 ^[8]	42	46	22/20	24/20	66.30 ± 5.80	67.40 ± 6.60
蔡雪军等 ^[9]	36	28	38/26		21-67	

表 2 内镜治疗组与传统治疗组腹痛缓解时间

Study or Subgroup	Experimental		Control		Weight (%)	Mean Difference IV, Random, 95%CI	Mean Difference IV, Random, 95%CI
	mean ± SD	Total	mean ± SD	Total			
蔡雪军 2008	2.1 ± 0.3	36	3.5 ± 0.6	28	35.8	-1.40 [-1.64, -1.16]	■
陈国和 2006	3.5 ± 1.5	38	7.5 ± 2.5	38	33.4	-4.00 [-4.93, -3.07]	■
楼晓楼 2008	7.7 ± 2.7	42	11.4 ± 3.7	44	30.8	-3.70 [-5.06, -2.34]	■
Total (95%CI)		116		110	100.0	-2.98 [-4.98, -0.97]	◆
Heterogeneity: $\tau^2 = 2.92$; $\chi^2 = 37.40$, $df = 2$ ($P < 0.00001$); $I^2 = 95\%$							
Test for overall effect: $Z = 2.91$ ($P = 0.004$)							
						-20 -10 0 10 20	Favours experimental Favours control

(SMD), 各效应量均以95%CI表示。各纳入研究结果间的异质性采用 χ^2 检验, 若纳入研究具有足够一致性($P > 0.1$ 和 $I^2 < 50\%$)时, 采用固定效应模型进行分析, 若纳入研究存在异质性时, 分析其异质性来源, 对可能导致异质性的因素进行亚组分析。若各研究间存在统计学异质性而无临床异质性或差异无临床意义时, 采用随机效应模型。如各组间异质性过大, 则采用描述性分析。必要时, 采用敏感性分析检验结果的稳定性。

2 结果

2.1 纳入研究的概述 初检相关文献133篇, 通过阅读题目及摘要排除重复、无具体实质性相关内容、非RCT、非临床研究及非治疗性文献篇, 剩下17篇查找原文进一步确定, 最终纳入4篇文献^[6-9], 包括317例患者。纳入研究^[8-9]按入院先后顺序分组, 其余研究^[6,7]未提及具体的随机方法; 纳入研究均未描述分配隐藏和盲法, 均无失访。4篇纳入研究的特点见表1。

2.2 腹痛缓解时间 3个研究^[6,8,9]报道了腹痛缓解时间。各研究间存在统计学异质性($P < 0.00001$, $I^2 = 95\%$), 采用随机效应模型。Meta分析显示两组比较有统计学差异($OR = -2.98$, 95%CI: -4.98, -0.97), $P = 0.004$), 内镜治疗组的腹痛缓解时间短(表2)。

2.3 白细胞复常时间 3个研究^[6,8,9]报道了白细胞

复常时间。各研究间无统计学异质性($P = 0.26$, $I^2 = 26\%$), 采用固定效应模型。Meta分析显示两组比较有统计学差异($OR = -4.63$, 95%CI: -5.29, -3.97, $P < 0.00001$), 内镜治疗组的白细胞复常时间短(表3)。

2.4 血淀粉酶复常时间 4个研究^[6-9]报道了血淀粉酶复常时间。各研究间无统计学异质性($P = 0.52$, $I^2 = 0\%$), 采用固定效应模型。Meta分析显示两组比较有统计学差异($OR = -3.85$, 95%CI: -4.49, -3.21; $P < 0.00001$), 内镜治疗组的血淀粉酶复常时间短(表4)。

2.5 并发症发生率 4个研究^[6-9]报道了并发症发生率, 常见的并发症有低氧血症、急性肾功能衰竭、心动过速、休克等。各研究间无统计学异质性($P = 0.91$, $I^2 = 0\%$), 采用固定效应模型。Meta分析显示两组比较有统计学差异($OR = 0.34$, 95%CI: 0.18-0.66, $P = 0.001$), 内镜治疗组的并发症发生率低(表5)。

2.6 住院时间 4个研究^[6-9]报道了住院时间。各研究间存在统计学异质性($P = 0.004$, $I^2 = 78\%$), 采用随机效应模型。Meta分析显示两组比较有统计学差异($OR = -7.51$, 95%CI: -9.89, -5.13, $P < 0.00001$), 内镜治疗组的住院时间短(表6)。

3 讨论

急性胆源性胰腺炎的病因、发病机制尚未有统

表 3 内镜治疗组与传统治疗组白细胞复常时间

Study or Subgroup	Experimental		Control		Weight (%)	Mean Difference IV, Fixed, 95%CI	Mean Difference IV, Fixed, 95%CI
	mean $\pm$ SD	Total	mean $\pm$ SD	Total			
蔡雪军 2008	4.3 $\pm$ 0.5	36	9.2 $\pm$ 2.4	28	53.9	-4.90 [-5.80, -4.00]	
陈国和 2006	8.5 $\pm$ 2.5	38	13.5 $\pm$ 3.5	38	23.5	-5.00 [-6.37, -3.63]	
楼晓楼 2008	9.7 $\pm$ 2.6	42	13.3 $\pm$ 3.9	44	22.6	-3.60 [-5.00, -2.20]	
Total (95%CI)		116		110	100.0	-4.63 [-5.29, -3.97]	
Heterogeneity: $\chi^2 = 2.72$, df = 2 ($P = 0.26$); $I^2 = 26\%$							
Test for overall effect: $Z = 13.68$ ($P < 0.00001$)							

-10 -5 0 5 10
Favours experimental Favours control

■同行评价

本研究目的明确, 有实用价值, 研究方法可靠, 但内容较单一, 选用指标单纯, 需进一步丰富研究内容, 细化观察指标。

表 4 内镜治疗组与传统治疗组血淀粉酶复常时间

Study or Subgroup	Experimental		Control		Weight (%)	Mean Difference IV, Fixed, 95%CI	Mean Difference IV, Fixed, 95%CI
	mean $\pm$ SD	Total	mean $\pm$ SD	Total			
蔡雪军 2008	8.30 $\pm$ 2.50	36	12.30 $\pm$ 3.40	28	18.0	-4.00 [-5.50, -2.50]	
陈国和 2006	4.50 $\pm$ 1.50	38	8.50 $\pm$ 3.50	38	27.6	-5.00 [-5.21, -2.79]	
何剑琴 2007	4.58 $\pm$ 2.65	46	7.60 $\pm$ 3.46	43	24.5	-3.02 [-4.31, -1.73]	
楼晓楼 2008	8.20 $\pm$ 2.10	42	12.50 $\pm$ 3.30	44	29.9	-4.30 [-5.46, -3.14]	
Total (95%CI)		162		153	100.0	-3.85 [-4.49, -3.21]	
Heterogeneity: $\chi^2 = 2.27$, df = 3 ($P = 0.52$); $I^2 = 0\%$							
Test for overall effect: $Z = 11.86$ ($P < 0.00001$)							

-10 -5 0 5 10
Favours experimental Favours control

表 5 内镜治疗组与传统治疗组并发症发生率

Study or Subgroup	Experimental		Control		Weight (%)	Odds Ratio M-H, Fixed, 95%CI	Odds Ratio M-H, Fixed, 95%CI
	Events	Total	Events	Total			
蔡雪军 2008	5	36	7	28	20.9	0.48 [0.14, 1.73]	
陈国和 2006	5	38	13	38	34.8	0.29 [0.09, 0.92]	
何剑琴 2007	1	46	4	43	12.5	0.22 [0.02, 2.02]	
楼晓楼 2008	5	42	12	44	31.8	0.36 [0.11, 1.13]	
Total (95%CI)		162		153	100.0	0.34 [0.18, 0.66]	
Total events	16		36				
Heterogeneity: $\chi^2 = 0.53$, df = 3 ($P = 0.91$); $I^2 = 0\%$							
Test for overall effect: $Z = 3.21$ ($P = 0.001$)							

0.001 0.01 1 10 1000
Favours experimental Favours control

一的认识, 治疗仍较为棘手。目前认为, 急性胆源性胰腺炎先行非手术治疗, 待患者全身情况改善后再行手术治疗, 但不少患者未等病情稳定就出现加重, 发展为重症胆源性胰腺炎而危及生命。应用十二指肠镜技术治疗急性胆源性胰腺炎, 为近十几年来开展的一项新技术, 随着时间的推移, 此项治疗技术也越来越成熟, 取得

了明显的临床疗效。Isogai等^[10]提出了一种简易评价ABP急诊干预的指标: (1)体温 $\geq 38^\circ\text{C}$; (2)血清胆红素 $\geq 37.6\ \mu\text{mol/L}$; (3)胆管扩张 $\geq 11\ \text{mm}$; (4)B超提示胆管结石。以上4项中3项以上阳性, 应该行急诊内镜治疗。内镜技术本身可以引起并发症, 应严格掌握适应证, 治疗成功与否与操作者技术熟练程度密切相关。操作时动作应

表 6 内镜治疗组与传统治疗组住院时间

Study or Subgroup	Experimental		Control		Weight (%)	Mean Difference IV, Random, 95%CI	Mean Difference IV, Random, 95%CI	
	mean $\pm$ SD	Total	mean $\pm$ SD	Total				
蔡雪军 2008	15.70 $\pm$ 4.60	36	24.30 $\pm$ 5.70	28	23.9	-8.60 [-11.19, -6.01]	■	
陈国和 2006	18.50 $\pm$ 5.50	38	28.50 $\pm$ 7.50	38	22.0	-10.00 [-12.96, -7.04]	■	
何剑琴 2007	7.48 $\pm$ 1.97	46	12.62 $\pm$ 3.24	43	31.0	-5.14 [-6.26, -4.02]	■	
楼晓楼 2008	16.10 $\pm$ 5.10	42	23.30 $\pm$ 7.60	44	23.2	-7.20 [-9.92, -4.48]	■	
Total (95%CI)		162		153	100.0	-7.51 [-9.89, -5.13]	◆	
Heterogeneity: $\tau^2 = 4.44$; $\chi^2 = 13.55$, $df = 3$ ($P = 0.004$); $I^2 = 78\%$								
Test for overall effect: $Z = 6.18$ ($P < 0.00001$)								

-20 -10 0 10 20
Favours experimental Favours control

轻柔,力求简捷,避免出现大出血和穿孔.另外采用选择性胆管插管技术,应尽量避免反复胰管显影,以免加重胰腺炎症.

本系统评价结果显示:与传统治疗组相比,内镜治疗组在腹痛缓解时间、白细胞复常时间、血淀粉酶复常时间、并发症发生率和住院时间方面的差别均具有统计学意义. ERCP(发病后24-72 h)及EST或ENBD已成为急性胆源性胰腺炎的一种重要治疗手段,可清除胆道结石,恢复胆流,减少胆汁胰管反流,可加快患者症状缓解,能起到治疗和预防胰腺炎发展的作用.内镜治疗由于早期解除了共同通道梗阻,避免了胰腺炎向重型化的发展及早期手术对患者的再次打击.中国急性胰腺炎诊治指南^[11]中指出,当急性胰腺炎怀疑或确定存在胆源性因素或病情恶化者,应行ENBD或EST以解除胆源性梗阻因素而改善症状及降低胰腺炎的复发.

纳入4个研究,年龄、性别等基线可比.纳入研究^[8,9]按入院先后顺序分组,其余研究^[6,7]未提及具体的随机方法;纳入研究均未描述分配隐藏和盲法,均无失访.4个研究均来自中国,样本量相对于每年全世界患者样本量偏少,有可能存在选择性偏倚,影响了结果的普遍性.

在今后的研究中建议进行多中心,大样本的随机对照双盲试验,在方法学上充分随机,充分实施分配隐藏,按照Consort标准进行试验报告,以便得出更为可靠的结论指导临床应用.

当前研究显示:内镜治疗组的临床疗效和安全性与传统治疗组相比存在差异,内镜治疗组能显著减少急性胆源性胰腺炎患者的腹痛缓

解时间、白细胞复常时间及血淀粉酶复常时间,降低并发症的发生,缩短住院时间.故可以考虑在急性胆源性胰腺炎早期行内镜治疗.鉴于纳入研究质量低,使论证强度受到一定限制,有必要进一步开展高质量、大样本随机临床对照试验评价其疗效和安全性.

4 参考文献

- 1 秦炳照,史成章,陈永忠.急性胆源性胰腺炎早期内镜治疗的临床评价.临床医学 2006; 26: 15-16
- 2 Neoptolemos JP, Carr-Locke DL, London NJ, Bailey IA, James D, Fossard DP. Controlled trial of urgent endoscopic retrograde cholangiopancreatography and endoscopic sphincterotomy versus conservative treatment for acute pancreatitis due to gallstones. *Lancet* 1988; 2: 979-983
- 3 周如建,曾穗德.早期ENBD和EST治疗急性胆源性胰腺炎135例分析.广州医药 2009; 40: 15-17
- 4 Higgins JPT, Green S, editors. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.0.0 [updated February 2008]*. The Cochrane Collaboration, 2008. Available from: www.cochrane-handbook.org
- 5 Review Manager (RevMan) [Computer program]. Version 5.0. Copenhagen: The Nordic Cochrane Centre, The Cochrane Collaboration, 2008
- 6 陈国和,张放卿.内镜治疗急性重症胆源性胰腺炎的临床疗效及安全性.微创医学 2006; 1: 69-71
- 7 何剑琴,李俊达.内镜治疗急性胆源性胰腺炎的临床评价.现代消化及介入诊疗 2007; 12: 254-255
- 8 楼晓楼,刘文勇,杨建军.内镜治疗老年急性胆源性胰腺炎42例.世界华人消化杂志 2008; 16: 2065-2068
- 9 蔡雪军.内镜治疗急性胆源性胰腺炎36例疗效分析.临床和实验医学杂志 2008; 7: 57-58
- 10 Isogai M, Yamaguchi A, Harada T, Kaneoka Y, Suzuki M. Cholangitis score: a scoring system to predict severe cholangitis in gallstone pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 98-104
- 11 中华医学会消化病学分会胰腺疾病学组.中国急性胰腺炎诊治指南(草案).胰腺病学 2004; 4: 35-38

编辑 李军亮 电编 何基才

克罗恩病和肠结核活检及手术标本的病理学特征分析110例

李学锋, 周明欢, 卢放根, 邹益友, 文继舫, 刘宇, 崔熠, 刘小伟

李学锋, 卢放根, 崔熠, 刘小伟, 中南大学湘雅二医院消化科
湖南省长沙市 410011

周明欢, 湘西自治州人民医院消化科 湖南省吉首市 416000
邹益友, 中南大学湘雅医院消化科 湖南省长沙市 410008

文继舫, 刘宇, 中南大学湘雅医院病理科 湖南省长沙市
410008

湖南湘西自治州科技研发基金资助项目, No. 2009015

作者贡献分布: 李学锋与周明欢对此文所作贡献均等; 此课题由
卢放根、周明欢及李学锋共同设计; 研究过程由卢放根、周明
欢、李学锋、邹益友、文继舫及刘宇操作完成; 数据分析由李
学锋与崔熠完成; 论文写作由李学锋与刘小伟完成。

通讯作者: 卢放根, 教授, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅
二医院消化科. lufanggenyao@163.com

收稿日期: 2009-11-09 修回日期: 2009-12-14

接受日期: 2009-12-21 在线出版日期: 2010-02-08

Comparison of the pathologic characteristics of biopsy and operative specimens between Crohn's disease and intestinal tuberculosis: an analysis of 110 cases

Xue-Feng Li, Ming-Huan Zhou, Fang-Gen Lu,
Yi-You Zou, Ji-Fang Wen, Yu Liu, Yi Cui, Xiao-Wei Liu

Xue-Feng Li, Fang-Gen Lu, Yi Cui, Xiao-Wei Liu, Department
of Gastroenterology, Xiangya Second Hospital, Central
South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Ming-Huan Zhou, Department of Gastroenterology, the
People's Hospital of Xiangxi Autonomous Prefecture,
Jishou 41600, Hunan Province, China

Yi-You Zou, Department of Gastroenterology, Xiangya
Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan
Province, China

Ji-Fang Wen, Yu Liu, Department of Pathology, Xiangya
Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan
Province, China

Supported by: the Science and Technology Foundation of
Xiangxi Autonomous Prefecture, No. 2009015

Correspondence to: Professor Fang-Gen Lu, Department
of Gastroenterology, Xiangya Second Hospital, Central
South University, Changsha 410011, Hunan Province,
China. lufanggenyao@163.com

Received: 2009-11-09 Revised: 2009-12-14

Accepted: 2009-12-21 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To explore the distinctive diagnostic features of biopsy and operative specimens between Crohn's disease and intestinal tuberculosis.

METHODS: A retrospective study was per-

formed to analyze the pathological features of 110 biopsy specimens (55 from patients with Crohn's disease, and 55 from patients with intestinal tuberculosis) and 38 operative specimens (29 from patients with Crohn's disease, and 9 from patients with intestinal tuberculosis). The value of these pathological features in differential diagnosis of the two diseases was analyzed.

RESULTS: Pathologic parameters of biopsy specimens helpful in differentiating Crohn's disease from intestinal tuberculosis included broadened submucosa, fissure-like ulcer, and granuloma (37.5% vs 14.0%, 10.9% vs 0%, and 10.9% vs 43.6%, respectively; all $P < 0.05$). Pathologic parameters of operative specimens helpful in differentiating Crohn's disease from intestinal tuberculosis included broadened submucosa, fissure-like ulcer, broadened muscularis propria, cobblestone appearance, and granuloma (51.7% vs 11.1%, 34.5% vs 0%, 62.1% vs 11.1%, 37.9% vs 0%, and 20.7% vs 77.8%, respectively; all $P < 0.05$).

CONCLUSION: The pathological features of biopsy specimens have limited value in differential diagnosis of Crohn's disease and intestinal tuberculosis. The pathological features of operative specimens have appreciable value in differentiating Crohn's disease from intestinal tuberculosis. It is essential to combine clinical, endoscopic and imageologic parameters to differentially diagnose the two diseases.

Key Words: Crohn's disease; Intestinal tuberculosis; Biopsy specimen; Operative specimen; Pathology

Li XF, Zhou MH, Lu FG, Zou YY, Wen JF, Liu Y, Cui Y, Liu XW. Comparison of the pathologic characteristics of biopsy and operative specimens between Crohn's disease and intestinal tuberculosis: an analysis of 110 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 409-412

摘要

目的: 探讨克罗恩病(Crohn's disease, CD)和肠结核(intestinal tuberculosis, ITB)活检及手术标本的病理学特征在二者鉴别诊断中的价值。

方法: 选取在湘雅二医院、湘雅医院、湘西

■背景资料

克罗恩病与肠结核在临床、内镜及影像学等方面有许多相似和重叠, 尚无特异鉴别指标, 病理学特征对二者的鉴别诊断也存在争议, 有必要从活检标本及手术标本相结合对比研究。

■同行评议者

杨柏霖, 副主任医师, 南京中医药大学附属医院结直肠外科

■研发前沿

传统的病理取材仅限于病变部位,但确诊率较低,有必要加强与病理学专家的沟通与交流,有利于发掘新的特异而敏感的鉴别诊断标志物。

自治州人民医院确诊的CD和ITB患者各55例,其中活检标本各55例;手术病理标本CD 29例,手术ITB 9例。统计每例标本的病理学特征并进行比较。

结果: CD患者活检标本与ITB患者活检标本比较,黏膜下层增宽、裂隙状溃疡及肉芽肿差异均有统计学意义(37.5% vs 14.0%, 10.9% vs 0%, 10.9% vs 43.6%, 均 $P<0.05$);手术标本比较,黏膜下层增宽、裂隙状溃疡、固有肌层增厚、鹅卵石征及肉芽肿差异均有统计学意义(51.7% vs 11.1%, 34.5% vs 0%, 62.1% vs 11.1%, 37.9% vs 0%, 20.7% vs 77.8%, 均 $P<0.05$)。

结论: 活检标本的病理学特征鉴别CD和ITB价值有限,手术标本病理学特征对他们有鉴别价值,但仍需结合临床、内镜及影像学检查综合诊断。

关键词: 克罗恩病; 肠结核; 活检标本; 手术标本; 病理学

李学锋, 周明欢, 卢放根, 邹益友, 文继舫, 刘宇, 崔熠, 刘小伟. 克罗恩病和肠结核活检及手术标本的病理学特征分析110例. 世界华人消化杂志 2010; 18(4): 409-412

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/409.asp>

0 引言

近年来在结核高发区的中国等发展中国家克罗恩病发病率有升高趋势^[1-3]。克罗恩病与肠结核在临床、内镜、影像学等方面有许多相似之处,尚无特异的鉴别指标,因此,临床医生对活检或手术标本的诊断价值有巨大的依赖性。但克罗恩病和肠结核的活检标本病理学对二者的鉴别价值有很大差异^[4,5],甚至手术标本的病理学特征中,不同学者的研究结果也不一致^[4,6,7],二者的鉴别诊断仍是尚未解决的难题。为此,本研究回顾性分析已确诊克罗恩病和肠结核病例的活检和手术标本的病理学特征,旨在进一步探讨病理学在二者鉴别诊断中的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2003-06/2009-02中南大学湘雅二医院、湘雅医院、湘西自治州人民医院确诊的克罗恩病和肠结核患者的活检标本各55例;克罗恩病手术标本29例,肠结核手术标本9例。克罗恩病诊断标准根据临床表现、影像学、内镜和组织学特点并符合文献标准^[8]。肠结核诊断标准是: (1)内镜活检标本抗酸染色阳性或结核杆

菌培养阳性; (2)组织学检查发现有干酪样坏死; (3)临床表现、内镜及组织学检查高度怀疑结核,且抗结核治疗有效。

1.2 方法 先查阅收集病理取材记录,对所有研究对象的组织蜡块重新进行切片和HE染色,设计病理学分析指标,由二位病理学专家进行盲法阅片并记录。

统计学处理 采用SPSS13.0软件进行分析,资料分活检和手术标本病理学两部分,对克罗恩病和肠结核两组进行比较,记数资料采用卡方检验,小样本采用Fisher精确概率法,计量资料采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 两组活检标本的病理学特征比较 在18个病理学指标中对两者有鉴别价值的指标是: 黏膜下层增宽(37.5% vs 14.0%, $P = 0.014$)、裂隙状溃疡(10.9% vs 0.0%, $P = 0.027$)、肉芽肿(10.9% vs 43.6%, $P = 0.001$),其中肠结核组干酪性坏死、肉芽肿融合、平均肉芽肿数量均高于克罗恩病组($P = 0.006, 0.002, 0.001$, 表1)。

2.2 两组手术标本的病理学特征比较 在23个病理学指标中对两者有鉴别价值的指标是: 黏膜下层增宽(51.7% vs 11.1%, $P = 0.034$)、裂隙状溃疡(34.5% vs 0.0%, $P = 0.040$)、固有肌层增厚(62.1% vs 11.1%, $P = 0.019$)、鹅卵石征(37.9% vs 0.0%, $P = 0.038$)、肉芽肿(20.7% vs 77.8%, $P = 0.003$),其中肠结核组干酪性坏死、肉芽肿融合、平均肉芽肿数量均高于克罗恩病组($P = 0.010, 0.005, 0.001$, 表2)。

3 讨论

克罗恩病是北美、北欧等西方发达国家常见消化系统疾病^[9-11]。但随着工业化进程和环境等变化,克罗恩病在中国等发展中国家发病率呈升高趋势^[1-3,12]。肠结核在发展中国家仍维持高发状态,与克罗恩病在同一地区同人种间表现相似难以鉴别,相互误诊率日益增高。为探讨病理形态学特点在二者鉴别中的价值,本研究对确诊病例的内镜活检和手术标本病理学特征进行回顾性分析发现: 活检标本的病理学特征尚不足以鉴别克罗恩病和肠结核,手术标本对克罗恩病和肠结核诊断的敏感性增加,但仍需结合临床、内镜及影像学检查综合诊断。

长期以来,病理学检查被认为是二者诊断和鉴别诊断的金标准。本研究对克罗恩病和肠结核各55例活检标本的18个病理形态学特征进

■相关报道

有报道克罗恩病的病变可出现在肉眼观察正常的黏膜中,故内镜下多片段、多数量的病变肠黏膜组织和正常组织活检病理学检查有利于二者的鉴别。

表 1 CD与ITB活检标本病理学鉴别指标的比较结果 $n(\%)$

指标	CD($n = 55$)	ITB($n = 55$)	P 值
杯状细胞减少	6(10.9)	9(16.4)	0.405
潘氏细胞化生	7(12.7)	6(10.9)	0.768
上皮不典型增生	9(16.4)	5(9.1)	0.252
隐窝炎症或脓肿	7(12.7)	4(7.3)	0.340
黏膜肌增厚	9(16.4)	6(10.9)	0.405
黏膜层炎症	55(100.0)	55(100.0)	1.000
淋巴细胞聚集	20(36.4)	21(38.2)	0.844
黏膜下层增宽 ^a	15(37.5)	6(14.0)	0.014
黏膜下层破坏闭锁 ^a	3(7.5)	9(20.9)	0.082
肉芽肿	6(10.9)	24(43.6)	0.000
干酪性坏死	0	7(12.7)	0.006
肉芽肿融合	1(16.7)	21(87.5)	0.002
平均肉芽肿数量	2.33 ± 0.778	3.91 ± 1.562	0.001
肉芽肿位置 ^b			0.678
黏膜层	3	18	
黏膜下层及以下	4	13	
溃疡	39(70.9)	43(78.2)	0.381
裂隙状溃疡	6(10.9)	0	0.027

^a15例CD活检标本未见黏膜下层, 12例ITB活检标本未见黏膜下层; ^bCD有1例、ITB有7例在黏膜层和黏膜层以下均发现肉芽肿。

行对比观察发现: 黏膜下层增厚、裂隙样溃疡两个指标是诊断克罗恩病的重要特征; 干酪样肉芽肿、肉芽肿数目增多且相互融合是肠结核的主要病理学特点。二者在淋巴细胞聚集、隐窝炎症、黏膜下层破坏闭锁及肉芽肿位置等相比均无差异。可见活检标本用于鉴别二者的指标有限, 且敏感性差从10.9%到43.6%不等, 与国内外报道存在一定差异^[4,13,14], 分析最可能的原因是: (1)病理取材上的差异, 目前取材的部位、数量及深度均尚未规范统一; (2)一些病理指标的标准存在主观性, 不同病理医师可得出不同结果。可见加强与病理医师沟通合作, 对2007年我国炎症性肠病会议^[15]中克罗恩病诊治规范的实践实施进行规范统一, 有利于提高对克罗恩病的认识和诊断及鉴别诊断。同时本研究对29例克罗恩病、9例肠结核手术标本的病理学特点进行研究发现: 黏膜下层增厚、裂隙样溃疡、肉芽肿变化、固有肌层增厚和鹅卵石征五个指标对克罗恩病和肠结核的鉴别具有重要价值。二者在淋巴细胞聚集、黏膜下层破坏闭锁、黏膜下层炎症、肉芽肿位置、浆膜层厚度、浆膜层炎症、全层炎症等相比均无差异。五个指标的敏感性较活检标本的敏感性有提高, 从34.5%到77.8%不等。裂隙样溃疡、鹅卵石

表 2 CD与ITB手术标本病理学鉴别指标的比较结果 $n(\%)$

指标	CD($n = 29$)	ITB($n = 9$)	P 值
淋巴细胞聚集	16(55.2)	4(44.4)	0.709
息肉样增生	4(13.8)	3(33.3)	0.322
肉芽组织增生	13(44.8)	4(44.4)	1.000
纤维组织增生	22(75.9)	6(66.7)	0.673
血管、淋巴管炎	26(89.7)	8(88.9)	1.000
黏膜下层增宽	15(51.7)	1(11.1)	0.034
黏膜下层破坏闭锁	2(6.9)	3(33.3)	0.075
黏膜下层炎症	29(100.0)	9(100.0)	
肉芽肿	6(20.7)	7(77.8)	0.003
干酪性坏死	0	3(33.3)	0.010
肉芽肿融合	1(16.7)	6(85.7)	0.029
平均肉芽肿数量	2.25 ± 0.707	5.29 ± 1.512	0.000
肉芽肿位置 ^c			1.000
黏膜层	3	5	
黏膜下层及以下	4	6	
溃疡	22(75.9)	7(77.8)	1.000
裂隙状溃疡	10(34.5)	0	0.040
固有肌层增厚	18(62.1)	1(11.1)	0.019
固有肌层炎症	23(79.3)	6(66.7)	0.655
浆膜层增厚	13(44.8)	1(11.1)	0.115
浆膜层炎症	19(65.5)	5(55.6)	0.699
全层炎症	19(65.5)	5(55.6)	0.699
节段性分布	无法准确判断	无法准确判断	
鹅卵石征	11(37.9)	0	0.038

^cCD有1例、ITB有4例在黏膜层和黏膜层以下均发现肉芽肿。

征对克罗恩病诊断有高度特异性, 干酪性肉芽肿对肠结核有高度特异性, 但三者的敏感性均很低, 当病理检查未发现这些特异指标时, 就无法作出正确诊断。克罗恩病虽为肉芽肿性胃炎, 但肉芽肿检出率明显低于肠结核组, 且其在克罗恩病活检和手术标本中的检出率仅为10.9%和20.7%, 敏感性低而诊断价值受限, Carpenter等^[16]认为在临床工作中并不一定要找到肉芽肿后才作出克罗恩病诊断。临床上手术治疗后病理学仍未确诊的克罗恩病时有发生, 常玉英等^[17]总结我国1989-2003年3 397例克罗恩病患者特点发现: 16例曾因阑尾炎多次行手术治疗, 其中2例行4次手术治疗才经病理确诊, 1例5次手术后病理报告为回肠末端克罗恩病; 1例不全肠梗阻患者术后出现梗阻、肠痿, 3次手术才病理确诊。可见对手术标本病理学的金标准需动态灵活应用, 结合临床表现、内镜及影像学资料综合判断才能提高诊断的准确性, 减少漏诊和误诊。

总之, 从纯病理形态学角度要想对克罗恩病和肠结核作出较准确的鉴别, 组织活检标本

■创新盘点

本研究同时对克罗恩病与肠结核的活检和手术标本的病理学特征进行对比分析, 得出有价值的结果, 立意有新颖性。

■同行评价

本文立意有一定的新颖性, 研究设计科学, 结果客观、可信, 对指导临床克罗恩病与肠结核的鉴别诊断提供了有价值的信息。

目前基本不能满足临床诊断需要, 而手术标本的病理学特征对诊断有价值, 但仍有部分指标重叠且仅适用于手术患者而使临床应用受限。仍需寻找常规病理学指标以外的鉴别点, Kirsch等^[18]通过对25例克罗恩病18例肠结核活检标本的病理学研究发现: 肉芽肿直径大于0.05 mm的比率在肠结核组中较克罗恩病显著增多, 具有鉴别价值。有研究认为克罗恩病的病变可出现在肉眼观察正常的黏膜中, 故多片段多数量的病变肠黏膜组织和正常组织活检病理学检查有利于二者的鉴别^[5]。同时在常规病理学基础上的免疫病理学、分子病理学技术的应用对二者的鉴别带来了一些曙光^[19,20], 但与临床实际工作需要仍有差距, 进一步寻找既敏感又特异的病理诊断指标仍是今后努力的方向。

4 参考文献

- 1 Leong RW, Lau JY, Sung JJ. The epidemiology and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 646-651
- 2 Goh K, Xiao SD. Inflammatory bowel disease: a survey of the epidemiology in Asia. *J Dig Dis* 2009; 10: 1-6
- 3 Patel N, Amarapurkar D, Agal S, Baijal R, Kulshrestha P, Pramanik S, Gupte P. Gastrointestinal luminal tuberculosis: establishing the diagnosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 1240-1246
- 4 顾清, 欧阳钦, 张文燕, 李甘地. 克罗恩病与肠结核临床及病理特征的对比研究. *中华内科杂志* 2009; 48: 291-294
- 5 Pulimood AB, Peter S, Ramakrishna B, Chacko A, Jeyamani R, Jeyaseelan L, Kurian G. Segmental colonoscopic biopsies in the differentiation of ileocolic tuberculosis from Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 688-696
- 6 张芳宾, 高翔. 肠结核和克罗恩病的鉴别诊断. *胃肠病学* 2008; 13: 568-570
- 7 Tandon HD, Prakash A. Pathology of intestinal tuberculosis and its distinction from Crohn's disease. *Gut* 1972; 13: 260-269
- 8 Carter MJ, Lobo AJ, Travis SP. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 2004; 53 Suppl 5: V1-V16
- 9 Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, Jewell DP, Rachmilewitz D, Sachar DB, Sandborn WJ, Sutherland LR. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 8-15
- 10 Caprilli R, Gassull MA, Escher JC, Moser G, Munkholm P, Forbes A, Hommes DW, Lochs H, Angelucci E, Cocco A, Vucelic B, Hildebrand H, Kolacek S, Riis L, Lukas M, de Franchis R, Hamilton M, Jantschek G, Michetti P, O'Morain C, Anwar MM, Freitas JL, Mouzas IA, Baert F, Mitchell R, Hawkey CJ. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. *Gut* 2006; 55 Suppl 1: i36-i58
- 11 Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott ID, Bernstein CN, Brant SR, Caprilli R, Colombel JF, Gasche C, Geboes K, Jewell DP, Karban A, Loftus Jr EV, Peña AS, Riddell RH, Sachar DB, Schreiber S, Steinhart AH, Targan SR, Vermeire S, Warren BF. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol* 2005; 19 Suppl A: 5-36
- 12 沈志坤. 中国大陆地区克罗恩病临床误诊的汇总分析. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2460-2463
- 13 周中银, 罗和生, 丁一娟. 克罗恩病与肠结核鉴别诊断方法的评价. *中国实用内科杂志* 2005; 25: 247-249
- 14 Amarapurkar DN, Patel ND, Rane PS. Diagnosis of Crohn's disease in India where tuberculosis is widely prevalent. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 741-746
- 15 江学良, 崔慧斐. 对我国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见的解析. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1141-1143
- 16 Carpenter HA, Talley NJ. The importance of clinicopathological correlation in the diagnosis of inflammatory conditions of the colon: histological patterns with clinical implications. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 878-896
- 17 常玉英, 欧阳钦, 胡仁伟. 我国克罗恩病的漏诊误诊情况分析. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 372-375
- 18 Kirsch R, Pentecost M, Hall Pde M, Epstein DP, Watermeyer G, Friederich PW. Role of colonoscopic biopsy in distinguishing between Crohn's disease and intestinal tuberculosis. *J Clin Pathol* 2006; 59: 840-844
- 19 Gan HT, Chen YQ, Ouyang Q, Bu H, Yang XY. Differentiation between intestinal tuberculosis and Crohn's disease in endoscopic biopsy specimens by polymerase chain reaction. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1446-1451
- 20 Schmidt C, Giese T, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Marth T, Zeuzem S, Meuer SC, Stallmach A. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 16-23

编辑 李军亮 电编 何基才

慢性便秘临床特点及相关因素调查177例

肖立宁, 李桂香, 耿瑞慧, 孔祥毓, 高峻, 金震东, 李兆申

肖立宁, 李桂香, 耿瑞慧, 孔祥毓, 高峻, 金震东, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433

“十一五”国家科技支撑计划基金资助项目, No. 2007BAI04B01

作者贡献分布: 肖立宁与李桂香对此文贡献均等; 本研究由金震东与李兆申设计; 研究过程由高峻指导; 肖立宁负责长海医院数据收集, 耿瑞慧与孔祥毓负责其他医院数据收集; 李桂香负责数据录入; 数据分析及论文写作由肖立宁完成。

通讯作者: 李兆申, 主任医师, 教授, 200433, 上海市杨浦区长海路168号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科. zhaosli81890@gmail.com

电话: 021-81873188

收稿日期: 2009-11-23 修回日期: 2009-12-23

接受日期: 2009-12-29 在线出版日期: 2010-02-08

Clinical features of chronic constipation and risk factors for its aggravation: an analysis of 117 cases

Li-Ning Xiao, Gui-Xiang Li, Rui-Hui Geng, Xiang-Yu Kong, Jun Gao, Zhen-Dong Jin, Zhao-Shen Li

Li-Ning Xiao, Gui-Xiang Li, Rui-Hui Geng, Xiang-Yu Kong, Jun Gao, Zhen-Dong Jin, Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Supported by: the National Key Technology R&D Program during the “11th Five-Year Plan” Period, No. 2007BAI04B01

Correspondence to: Professor Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 168 Changhai Road, Shanghai 200433, China. zhaosli81890@gmail.com

Received: 2009-11-23 Revised: 2009-12-23

Accepted: 2009-12-29 Published online: 2010-02-08

Abstract

AIM: To analyze the clinical features of chronic constipation and the risk factors for its aggravation to provide a reference for future treatment of the disease.

METHODS: A total of 177 patients who meet the Rome III criteria for chronic constipation were selected by stratified cluster sampling to conduct a questionnaire survey. The content of the questionnaire included a total of 132 items on demographic factors and disease-related factors. The data from the survey were then input, checked and statistically analyzed.

RESULTS: A significant difference was noted in age between female and male patients with chronic constipation ($P = 0.04$). Chronic constipation had a broad spectrum of symptoms. The most common symptom was effort during defecation (82 cases, 68.9%) without medication. The percentage of female patients removing stools manually with a finger was significantly higher than that of male patients ($\chi^2 = 7.937, P = 0.005$). Decrease in stool frequency (< 3 per week), acid reflux, epigastric burning, bloating, abdominal pain and weight loss were closely related to the severity of chronic constipation (all $P < 0.05$). Drinking for men and the number of pregnancies and deliveries for women were also closely related to the severity of chronic constipation ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Chronic constipation can be prevented or eased by changing lifestyle, developing healthy bowel habits (at least three times per week), raising awareness of accompanying symptoms and warning symptoms, and regularly visiting physicians.

Key Words: Chronic constipation; Clinical analysis; Risk factor

Xiao LN, Li GX, Geng RH, Kong XY, Gao J, Jin ZD, Li ZS. Clinical features of chronic constipation and risk factors for its aggravation: an analysis of 117 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(4): 413-417

摘要

目的: 分析慢性便秘的临床特点和影响其加重程度的因素, 为进一步诊疗提供参考依据。

方法: 采用整群分层方法筛选符合罗马Ⅲ标准的慢性便秘患者, 对符合纳入标准的177例进行问卷调查, 调查内容包括一般情况和疾病相关因素等共132个项目, 调查结果经双人录入、核对后, 进行统计学分析。

结果: 慢性便秘患者中, 男女在患病年龄上有显著性差异($P = 0.04$)。慢性便秘症状谱广泛, 在不用药情况下, 最常见症状为排便费力(68.9%)。在患者性别上存在统计学差异的症

■背景资料

随着社会发展、竞争激烈、生存压力增加及饮食结构的改变, 慢性便秘的发生率呈上升趋势, 已成为影响现代人生活质量的重要因素之一。当前, 慢性便秘的病因、临床特点和影响加重的相关因素复杂, 在临床诊疗上依据不足。

■同行评议者

任粉玉, 副教授, 延边大学附属医院消化内科

■研究前沿

近年来,对慢性便秘的研究多从关注于发病率和发病相关的因素上,逐渐向慢性便秘这一世界难题的临床诊治的实用性上转变,重点是便秘机制的阐明,以求彻底解决这一难题。

状仅为用手抠便($\chi^2 = 7.937, P = 0.005$)。排便次数减少(<3 次/周)、反酸、上腹烧灼感、上腹饱胀、上腹疼痛和体质量减轻与慢性便秘的严重程度关系密切($P < 0.05$)。男性饮酒、女性妊娠次数和分娩次数与慢性便秘严重程度有密切关系($P < 0.05$)。

结论:通过改变生活方式、养成排便习惯(至少每周 >3 次),预防伴随症状和警报症状,培养就诊意识,可预防和减少慢性便秘向重度发展。

关键词:慢性便秘;临床分析;相关因素

肖立宁,李桂香,耿瑞慧,孔祥毓,高峻,金震东,李兆申.慢性便秘临床特点及相关因素调查177例.世界华人消化杂志 2010; 18(4): 413-417

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/413.asp>

0 引言

便秘(constipation)是指排便次数减少、粪便量减少、粪便干结、排便费力等为主要临床表现的一种病症。慢性便秘(chronic constipation)病程至少6 mo,其病因复杂,给患者带来许多苦恼,影响生活质量^[1]。随着社会发展、竞争激烈、生存压力增加及饮食结构的改变,便秘的发生率呈上升趋势,已成为影响现代人生活质量的重要因素之一。北京地区对18-70岁人群进行的随机、分层调查表明,慢性便秘患病率为6.07%^[2],分层调查表明,60岁以上人群慢性便秘患病率为7.3%-20.39%,且随着年龄的增长患病率明显增加^[3,4]。以往对慢性便秘的研究只限于对慢性便秘的发病率和发病相关的因素上,而对其临床表现和影响便秘的严重程度上的临床分析则论证不多。本文对当前上海地区二级和三级医院门诊患者中慢性便秘的患病情况及临床特点和影响加重的相关因素进行调查分析,为进一步诊疗提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料 2009-04/09长海医院(三级医院)消化科门诊患者2 118例及外院(二级医院)消化科门诊患者1 210例,共计3 328例,对符合罗马III标准的慢性便秘患者进行问卷调查,所有接受调查者均签署知情同意书,慢性便秘患者共收集177例,总体患病率为5.32%(177/3 328)。其中男63名,女114名,男:女=1:1.81,年龄16-88岁。

1.2 方法

1.2.1 问卷内容:参照北京协和医院的慢性便秘

调查问卷,并结合慢性便秘的临床特点,制定慢性便秘调查问卷。调查内容涵盖一般人口学特征、发病诱因、症状谱、伴随症状、既往诊疗情况、发病相关因素、精神心理状况、生活质量以及女性妊娠、分娩情况等共132个项目。慢性便秘由门诊接诊医生对前来就诊的患者接诊后进行筛查,对符合录入标准的病例,由专业的调查人员进行面对面详细的问诊和检查,针对调查表中的每1项都做到询问,并详细记录,问卷数据经双人录入,核对后,并判定重度便秘标准,按性别分组并按便秘严重程度分层进行统计分析。

1.2.2 诊断标准:按罗马III诊断标准^[5]制定调查入组标准:(1)病程至少6 mo。(2)在近3 mo中,具有以下2项或2项以上表现:至少25%的排便感到费力;至少25%的排便为干球粪或硬粪;至少25%的排便有不尽感;至少25%的排便有肛门直肠梗阻或堵塞感;至少25%的排便需用手法协助;每周排便少于3次。(3)1年内接受结肠镜或钡餐检查以及相应的检查,基本明确了便秘的诊断。重度便秘患者的筛选:根据慢性便秘的诊治指南^[6,7],在问卷中存在以下6项中任何1项,则判断为重度便秘:(1)排便次数每周 <1 次。(2)排便的费力程度为非常费力。(3)每次排便时间 >60 min。(4)经常或几乎每次都需要用手协助排便。(5)需要持续使用通便药且 ≥ 3 mo。

统计学处理 采用SPSS16.0统计分析软件进行统计学处理,两样本比较采用 t 检验,率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

共收集门诊就诊患者3 328例(男1 571例,女1 757例)中符合调查录入标准的慢性便秘患者177例,对诊断为慢性便秘患者共调查181份,有效问卷共177份,4份填写不全弃用,有效率为97.8%。符合重度便秘标准者110例,占有效问卷总数62.1%。

2.1 性别构成及发病年龄分布 177例慢性便秘患者中女114例、男63例,女:男=1.81:1。女性发病年龄高峰在50-64岁(39.5%, 45/114),而男性则在65-79岁(30.2%, 19/63),男女在患病年龄上有显著性差异($P = 0.041$)。110例重度慢性便秘患者中,女(70例):男(40例)=1.75:1,其中,女性发病年龄高峰在50-64岁(30例),而男性则在65-79岁(12例),男女在重度发病年龄上显著性差异更明显($P = 0.029$)。

表 1 慢性便秘的严重程度与伴随症状或警报症状的关系 $n(\%)$

分组	n	反酸		上腹烧灼感		上腹饱胀		上腹疼痛		体质量减轻	
		有	无	有	无	有	无	有	无	减轻	未减轻
重度慢性便秘组	110	38(34.5) ^a	72(55.5)	21(19.1) ^a	89(80.9)	54(49.1) ^a	56(50.9)	25(22.7) ^a	85(77.3)	41(37.3) ^a	69(62.7)
非重度慢性便秘组	67	10(14.9)	57(84.1)	5(7.5)	62(92.5)	22(32.8)	45(67.2)	7(10.4)	60(89.6)	15(22.4)	52(77.6)
χ^2 值		8.810		4.493		4.490		4.239		4.265	
P 值		0.004		0.034		0.034		0.040		0.039	

^a $P < 0.01$ vs 非重度组。

2.2 慢性便秘的原因 从177例慢性便秘的调查来看, 对于患者“认为的发病原因”依次为运动少(40例, 22.6%), 进食蔬菜水果少(23例, 13%), 其他(22例, 11.3%), 从小开始(18例, 10.1%), 家长有便秘和情绪紧张(各14例, 各7.9%), 分娩后(10例, 5.6%), 还有饮水少、痔疮、上厕所不方便、环境变化等, 统计学分析, 在性别上都无显著差异($P > 0.05$)。以上的其他类包括帕金森病、糖尿病和服用其他药物引起的慢性便秘。慢性便秘的患者中, 引起加重(男40例, 女70例)的原因对性别上的差异主要表现在饮酒上(男10例, 女6例, $\chi^2 = 5.527$, $P = 0.019$), 而吸烟、辛辣食物、精神紧张、情绪低落、咖啡和浓茶在男女间没有太大差异($P > 0.05$)。

2.3 慢性便秘的症状谱 177例慢性便秘患者中, 119例在近3 mo有便秘症状且不持续使用通便药, 因而可以较准确地了解到患者的便秘相关症状, 其中女77例, 男42例, 在罗马III标准的6项便秘症状中, 以排便费力最为常见(68.9%、82例/119例), 男、女患者分别为69%(29例/42例)和69%(53例/77例); 其他症状依次为大便干硬(75例, 63%), 排便次数减少(< 3 次/周)(61例, 51%), 排便不尽感(42例, 35%), 肛门直肠阻塞感(31例, 26%)和用手法协助排便(20例, 17%)。性别差异均无统计学意义。但是, 仔细分析用手协助排便, 将其分为用手按摩腹部、用手抠便、开塞露灌肠3种方式: 77例女性慢性便秘患者中需要用手法协助排便有15例(19%), 以上3种方式分别占67%(10例)、87%(13例)、47%(7例), 其中80%采取 ≥ 2 种方式协助排便; 42例男性慢性便秘患者中需用手协助排便有5例(12%), 以上3种方式分别占65%(4例)、35%(1例)、15%(2例), 其中40%采取 ≥ 2 种方式协助排便; 女性患者手抠便显著高于男性($\chi^2 = 7.937$, $P = 0.005$)。

虽然排便次数减少(< 3 次/周)症状在性别上无显著差异, 但他在110例重度慢性便秘组(62

例)和67例非重度慢性便秘组(25例)存在差异($\chi^2 = 6.046$, $P = 0.014$)。重度慢性便秘患者110名, 其中, 排便次数每周 < 1 次36例(32.7%); 排便的费力程度为非常费力35例(31.8%); 每次排便时间 > 60 min 2例(1.8%); 经常或几乎每次都需要用手协助排便18例(16.4%); 需要持续使用通便药且 ≥ 3 mo 58例(52.7%)。以上症状性别差异也均无统计学意义。其中, 有22.7%存在2项或3项上述症状, 需要持续使用通便药且 ≥ 3 mo的比例最高。

2.4 伴随症状或警报症状 本研究中, 慢性便秘患者近3 mo的伴随症状中, 反酸、上腹烧灼感、上腹饱胀、上腹疼痛与便秘的严重程度有存在一定相关性, 而警报症状中仅体质量减轻与便秘的严重程度相关(表1)。

2.5 孕产史 为使女性重度慢性便秘组与非重度慢性便秘组年龄匹配, 选取 > 30 岁女性慢性便秘患者(98例)进行分析。两组间年龄差异无统计学意义。重度慢性便秘组多次妊娠(≥ 2 次)和自然分娩(≥ 1 次)的比例均显著高于非重度慢性便秘组(表2)。

2.6 就诊意识 177例患者中, 认为便秘症状不需要看医生或特殊处理的93例(52.5%), 这部分人群只是想通过改善饮食和排便习惯调整来治疗便秘。58例(32.8%)经常自己服用一些非处方药或中药治疗。

3 讨论

本研究采用罗马III标准对177例慢性便秘患者进行调查, 就诊的患者中, 重度慢性便秘比例高, 占62.1%, 且治疗效果不佳。调查发现, 女性慢性便秘患者为男性的1.81倍, 重度慢性便秘患者中女性为男性的1.75倍, 该比例基本与国外报道接近^[8]。本研究发现女性慢性便秘患者发病年龄高峰在50-64岁, 达39.5%, 男性为65-79岁(30.2%), 女性明显早于男性。女性慢性便秘的患病率高且年龄早于男性, 分析原因, 可能主要与女性特

■相关报道

McCrea等综述了北美地区便秘发病率和特点情况, 并阐明了在此基础上性别和年龄的不同, 研究发现便秘的发病率女性比男性高, 然而在便秘的临床特点上, 存在性别差异的证据还不充分, 有待进一步验证。

■创新盘点

本研究对慢性便秘临床特点及严重程度相关因素进行分析,并着重在性别差异上进行比较,更细层面上分析了慢性便秘的原因和加重的因素,为慢性便秘的防治提供依据。

表 2 女性慢性便秘的严重程度与妊娠、自然分娩的关系 $n(\%)$

分组	n	妊娠次数		自然分娩次数	
		≥ 2 次	≤ 1 次	自然分娩 ≥ 1 次	非自然分娩
重度慢性便秘组	70	60(85.7) ^a	10(14.3)	64(91.4) ^c	6(8.6)
非重度慢性便秘组	28	18(64.3)	10(35.7)	21(75.0)	7(25.0)

$\chi^2 = 5.654$, ^a $P < 0.05$, $\chi^2 = 4.692$, ^c $P < 0.05$ vs 非重度组。

有的解剖和生理特点、精神心理因素和内分泌功能减退有关。女性多有一定的盆底解剖缺陷,如直肠前突、直肠黏膜脱垂、盆底腹膜内疝、会阴下降、子宫后倾等,多容易造成出口梗阻型便秘^[9-11]。女性慢性便秘的年龄高峰在50-64岁,正是女性处于更年期和绝经期、并向老年迈进的时期,此时,女性卵巢功能减退,特别是内分泌功能减退,精神情绪波动大,多抑郁烦躁;机体机能也减退,代谢减缓,体育锻炼减少,肠蠕动功能下降,肠道菌群和通透性改变,容易诱发便秘^[12]。

本研究发现,在慢性便秘的症状谱中,最常见的症状是排便费力,与文献[13]报道一致。女性用手协助排便方式中手抠便者明显高于男性,提示女性患者排便障碍的比例更高。但是在慢性便秘问卷调查的患者中,接受排粪造影、肛门直肠测压等检查者极少,与当前便秘,特别是排便障碍没有得到足够重视有关。在重症慢性便秘中,饮酒上存在性别差异,这主要表现在男性对酒精的摄入较多,且多为啤酒和黄酒(上海地区),所以,男性患者进行便秘治疗时更应减少酒精摄入。

另外,慢性便秘患者出现反酸、上腹烧灼感、上腹饱胀、上腹疼痛和体质量减轻症状时,应引起重视,因为这些症状警示着便秘有向重度发展的可能。需要说明的一点是,这里的体质量减轻主要是由饮食因素(如低纤维素和低热量摄入)引起的身体脂肪含量的减少和非脂肪组织含量的减少引起的身体质量量的减轻。有文献已经证实,体质量减轻可以导致并向重度便秘发展^[14]。对于排便次数减少(< 3 次/周)的症状也应重视,因为他也是导致慢性便秘加重的重要原因。所以临床上治疗慢性便秘时,控制伴随症状和警报症状,提醒患者增加排便次数也是一项必要的措施。

研究发现女性重度慢性便秘患者经阴道分娩的比例及多次妊娠的比例均高于非重度便秘

组^[15]。这可能与妊娠分娩过程对女性盆底组织器官造成的损伤有关^[16]。妊娠本身就是盆底功能障碍的致病因素^[17],经阴道分娩又不同程度地损伤会阴神经、肛提肌及盆内筋膜等盆腔支持组织,导致盆底器官脱垂,多引起排便障碍型便秘增加,且随着妊娠次数和经阴道分娩次数的增加,便秘的严重程度增加^[18]。本研究中,女性的便秘患病比例高,且重度便秘比例高,使用手法协助排便的比例也高,亦支持上述观点。

此外,本研究还发现慢性便秘的就诊率不到一半,且有约1/3的患者自行服用泻药处理,有的甚至出现了服药引起的身体的损害,如结肠黑变病,电解质紊乱等。低就诊率和非对症治疗可能也是慢性便秘加重的一个重要原因。因此,引起患者对慢性便秘的重视,提高就诊率,也是在临床上治疗慢性便秘的有效措施。

4 参考文献

- 1 Lembo A, Camilleri M. Chronic constipation. *N Engl J Med* 2003; 349: 1360-1368
- 2 郭晓峰, 柯美云, 潘国宗, 韩少梅, 方秀才, 鲁素彩, 郭慧平. 北京地区成人慢性便秘整群、分层、随机流行病学调查及其相关因素分析. *中华消化杂志* 2002; 22: 637-638
- 3 于普林, 李增金, 郑宏, 朱汉民, 李玺, 何钦成, 王静思, 袁凯瑜, 姜中央, 段春波, 高芳. 老年人便秘流行病学特点的初步分析. *中华老年医学杂志* 2001; 20: 132-134
- 4 尉秀清, 陈昊湖, 王锦辉, 胡品津. 广州市居民肠易激综合征及功能性便秘的流行病学调查. *中华内科杂志* 2001; 40: 517-520
- 5 Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390
- 6 柯美云, 罗金燕, 许国铭, 王崇文, 吕农华. 慢性便秘的诊治指南. *中华消化杂志* 2004; 24: 39-40
- 7 方秀才, 柯美云, 罗金燕, 杨新庆, 刘宝华. 中国慢性便秘的诊治指南(2007, 扬州). *中华消化杂志* 2007; 27: 619-622
- 8 McCrea GL, Miaskowski C, Stotts NA, Macera L, Varma MG. A review of the literature on gender and age differences in the prevalence and characteristics of constipation in North America. *J Pain Symptom Manage* 2009; 37: 737-745
- 9 Bradley CS, Brown MB, Cundiff GW, Goode PS, Kenton KS, Nygaard IE, Whitehead WE, Wren PA, Weber AM. Bowel symptoms in women planning

- surgery for pelvic organ prolapse. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 1814-1819
- 10 Stoker J. Anorectal and pelvic floor anatomy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2009; 23: 463-475
- 11 章蓓. 女性慢性便秘的解剖缺陷及其诊断. 南京: 妇科泌尿学及盆底重建会议文集, 2008: 64-65
- 12 Khalif IL, Quigley EM, Konovitch EA, Maximova ID. Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation. *Dig Liver Dis* 2005; 37: 838-849
- 13 Johanson JF, Kralstein J. Chronic constipation: a survey of the patient perspective. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 599-608
- 14 Amenta M, Cascio MT, Di Fiore P, Venturini I. Diet and chronic constipation. Benefits of oral supplementation with symbiotic *zif fos* (Bifidobacterium longum W11 + FOS Actilight). *Acta Biomed* 2006; 77: 157-162
- 15 吴嘉媛, 刘晓红, 刘巍, 柯美云, 方秀才, 北京慢性便秘协作组. 女性慢性便秘的特点分析: 多中心横断面临床调查. *中华医学杂志* 2009; 89: 1255-1258
- 16 Cullen G, O'Donoghue D. Constipation and pregnancy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 807-818
- 17 Tegerstedt G, Maehle-Schmidt M, Nyren O, Hammarström M. Prevalence of symptomatic pelvic organ prolapse in a Swedish population. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2005; 16: 497-503
- 18 O'Boyle AL, O'Boyle JD, Calhoun B, Davis GD. Pelvic organ support in pregnancy and postpartum. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct* 2005; 16: 69-72; discussion 72

■同行评价

本研究设计合理, 分析方法恰当, 数据可靠, 分析条理分明, 结论明确, 具有临床参考价值。

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 •

《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)