



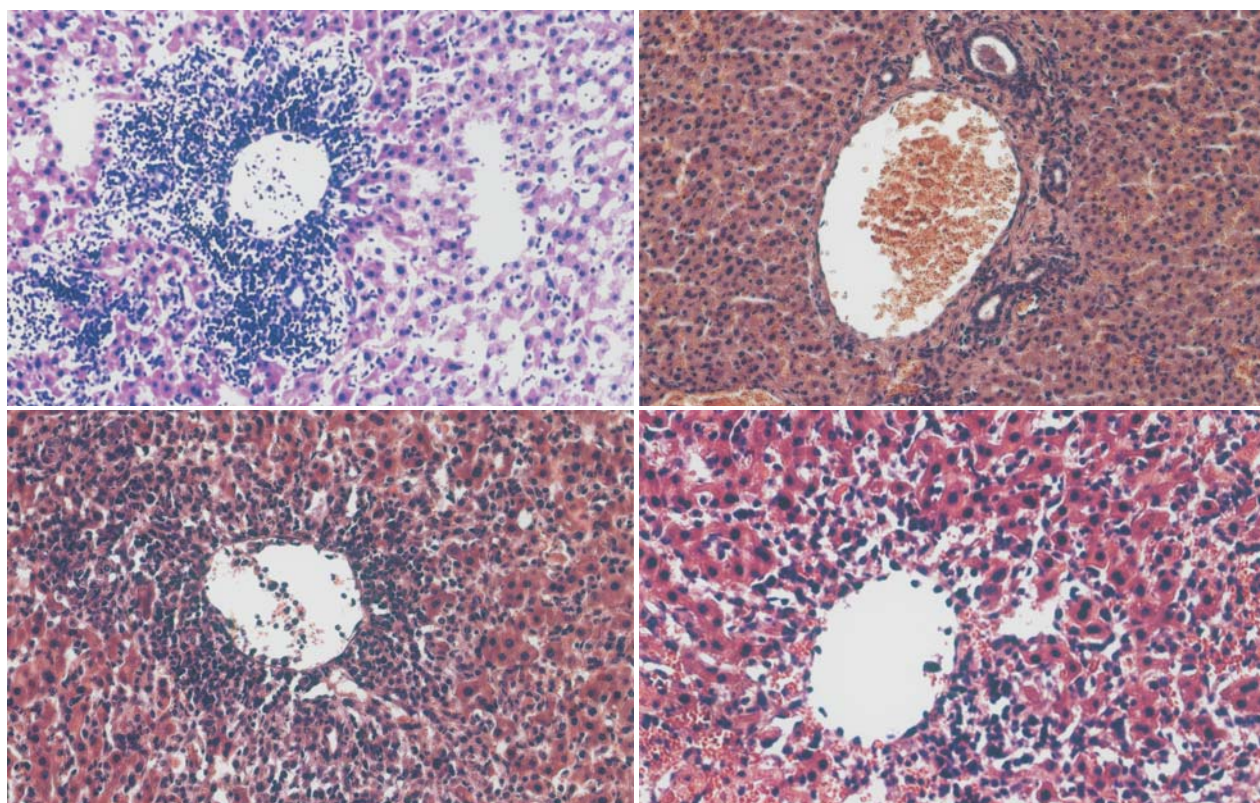
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 1 月 28 日 第 14 卷 第 3 期 (Volume 14 Number 3)



3 / 2006

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授	西安
-------	----

社长/总编辑

马连生教授	北京
-------	----

副总编辑

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

常务编委

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

编委

白爱平主治医师	广州
白文元教授	石家庄
白玉贤教授	哈尔滨

蔡淦教授	上海
曹洁副教授	上海
陈海龙教授	大连
陈红松副研究员	北京
陈积圣教授	广州
陈建荣副教授	南通
陈立波副教授	武汉
陈凇教授	北京
陈其奎教授	广州
陈强谱教授	滨州
陈仕珠主任医师	西安
陈卫昌教授	苏州
陈耀凯副教授	重庆
陈贻胜教授	福州
陈知水教授	武汉
陈治水主任医师	哈尔滨
陈祖林副教授	重庆
程爱国教授	唐山
程红岩教授	上海
迟宝荣教授	长春
崔云甫教授	哈尔滨
代文杰教授	哈尔滨
戴冬秋教授	沈阳
党双锁副教授	西安
邓长生教授	武汉
董蕾教授	西安
杜群副研究员	广州
樊红副教授	南京
范建高教授	上海
范志宁主任医师	南京
房静远教授	上海
傅春彬主任医师	吉林
高成新教授	上海
高春芳研究员	上海
高峰教授	西安
高润平教授	长春
戈之铮教授	上海
龚国忠教授	长沙
龚建平教授	重庆
谷俊朝主任医师	北京
关玉盘教授	北京
管冬元副教授	上海
郭克建教授	沈阳
郭晓钟教授	沈阳
郭新宁教授	银川

韩天权教授	上海
郝俊鸣副主任医师	北京
何超教授	杭州
何裕隆教授	广州
何振平教授	重庆
洪天配教授	北京
侯晓华教授	武汉
黄恒青主任医师	福州
黄金华副教授	广州
黄晓东副主任医师	武汉
黄颖秋教授	本溪
黄裕新教授	西安
黄志勇副教授	武汉
季国忠副教授	南京
季加孚教授	北京
姜慧卿教授	石家庄
蒋龙元副教授	广州
金瑞教授	北京
匡安仁教授	成都
兰平教授	广州
蓝宇教授	北京
劳绍贤教授	广州
李定国教授	上海
李东辉教授	厦门
李方儒教授	天津
李国威教授	西安
李继强教授	上海
李靖副教授	重庆
李奇林教授	广州
李涛主治医师	北京
李晓宇主任医师	北京
李延青教授	济南
李永哲副研究员	北京
李玉民教授	兰州
李增山副教授	西安
李兆申教授	上海
李志霞教授	北京
李宗芳教授	西安
梁力建教授	广州
林勇讲师	上海
刘宝瑞教授	南京
刘冰熔教授	哈尔滨
刘成海研究员	上海
刘平教授	上海
刘杞教授	重庆

世界华人消化杂志®

编辑委员会

刘铁夫教授	哈尔滨	孙家邦教授	北京	许文燮教授	上海
刘正稳教授	西安	孙秀发教授	武汉	严律南教授	成都
刘作金副教授	重庆	孙学英教授	哈尔滨	杨冬华教授	广州
龙致贤教授	北京	邵升副教授	哈尔滨	杨广顺教授	上海
鲁华玉研究员	北京	谭学瑞教授	汕头	杨建勇教授	广州
陆才德教授	宁波	汤展宏副教授	南宁	杨林副研究员	广州
陆云飞教授	南宁	唐芙爱教授	郑州	杨维良教授	哈尔滨
禄韶英主治医师	西安	唐霓副研究员	重庆	杨希山教授	广州
吕明德教授	广州	唐文富主治医师	成都	杨云生教授	北京
吕宁主任医师	北京	唐文皓副主任医师	上海	姚登福教授	南通
吕云福教授	海口	唐旭东主任医师	北京	姚树坤教授	石家庄
马大烈教授	上海	唐志鹏副研究员	上海	伊力亚尔·夏合丁教授	乌鲁木齐
茅爱武主任医师	上海	田素礼教授	哈尔滨	阴赅宏研究员	北京
梅林教授	北京	屠红副研究员	上海	于红刚副教授	武汉
孟庆华教授	北京	万德森教授	广州	于健春教授	北京
宁琴教授	武汉	万军教授	北京	于颖彦教授	上海
牛建昭教授	北京	汪波副主任医师	北京	郁宝铭教授	上海
欧希龙副教授	南京	王承党副教授	福州	喻荣彬副教授	南京
潘林娜教授	哈尔滨	王春友教授	武汉	张柏和教授	上海
潘兴华副主任医师	昆明	王广义教授	长春	张方信主任医师	兰州
潘秀珍教授	福州	王吉耀教授	上海	张吉翔教授	南昌
彭波副教授	西安	王鲁副教授	上海	张锦生教授	上海
彭吉润主任医师	北京	王效民教授	厦门	张军教授	西安
彭曦副研究员	重庆	王学美研究员	北京	张青云研究员	北京
彭心宇教授	石河子	王正康教授	北京	张群华教授	上海
彭志海教授	上海	王志刚副主任医师	上海	张水军教授	郑州
秦波教授	重庆	王忠裕教授	大连	张绪清副教授	重庆
秦成勇教授	济南	卫洪波教授	广州	张学教授	北京
秦环龙教授	上海	魏经国教授	西安	张宗明教授	北京
钱建民教授	上海	魏来教授	北京	赵桂珍教授	沈阳
秦仁义教授	武汉	闻勤生教授	西安	赵景民教授	北京
卿三华教授	广州	吴德全教授	哈尔滨	赵连三教授	成都
邱双健副教授	上海	吴建国教授	武汉	赵平副教授	上海
任超世研究员	天津	吴君主任医师	贵阳	郑民华教授	上海
任建安教授	南京	席启主任医师	大同	智发朝教授	广州
任建林教授	厦门	夏建川研究员	广州	周伯平教授	深圳
邵成浩讲师	上海	向德兵讲师	重庆	周丁华主任医师	北京
邵先玉教授	泰安	肖恩华教授	长沙	周士胜教授	大连
邵永孚教授	北京	谢晓华副教授	广州	周霞秋教授	上海
沈洪教授	南京	徐爱民副教授	上海	周晓东研究员	广州
沈琳副教授	北京	徐存拴教授	新乡	朱春兰主任医师	哈尔滨
沈薇教授	重庆	徐大华副主任医师	北京	朱立元教授	深圳
施瑞华教授	南京	徐德忠教授	西安	朱人敏教授	南京
石统东副教授	重庆	徐列明教授	上海	邹小明教授	哈尔滨
宋振顺教授	西安	徐小元教授	北京	左国营副主任药师	昆明
孙诚谊教授	贵阳	许玲副教授	上海		

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2006 年 1 月 28 日 第 14 卷 第 3 期 (总第155期)

述 评

- 245 原发性胆汁性肝硬化自身抗体谱研究进展
王雪松, 李永哲

基础 研究

- 250 Runx3基因在胃癌中的表达及其表达下调机制
曾超, 贺修胜, 罗桥, 赵帅, 邓敏
- 256 Ss-A/Ro核蛋白60 ku亚单位在胃癌多药耐药中的作用
韩全利, 丁杰, 张龙方, 王新, 郭长存, 乔泰东, 张学庸, 樊代明
- 261 CD4⁺CD25⁺调节性T细胞回输对大鼠肝移植急性排斥反应的影响
浦立勇, 李相成, 王学浩, 张峰, 姚爱华, 俞悦, 吕凌, 李国强
- 267 maspin、p27、skp2在大肠肿瘤的表达及意义
刘丹丹, 易永芬, 邓玮
- 273 一氧化氮对急性肺损伤发病过程中核因子- κ B活化的调节作用
李海龙, 陈海龙, 张波, 贺雪梅, 徐宏, 范奇
- 280 RT-PCR寻找大肠癌患者外周血早期分子标记物的研究
杜雅菊, 刘晓琨, 金英敏, 曲波, 李宝杰
- 287 国人肿瘤坏死因子的基因多态性与*H pylori*感染无相关性
李岚, 夏冰, 李春
- 293 选择性环氧合酶-2抑制剂对肝癌细胞侵袭力的影响
方征东, 李建生, 徐修才

临床 研究

- 299 下咽鳞癌不同方案治疗的临床结果分析
邢海杰, 曾宗渊, 陈福进, 郭朱明, 杨安奎, 张詮

文 献 综 述

- 306 PI3K-Akt信号通路与肿瘤
孙晓杰, 黄常志
- 312 幽门螺杆菌相关胃黏膜疾病炎症、凋亡与乳酸杆菌的关系
马锋振, 马洪升
- 318 药物遗传学和药物基因组学在肿瘤治疗中的应用
王立峰, 钱晓萍, 刘宝瑞
- 324 内脏感觉的检测方法
时乐, 卜平

研究 快报

- 332 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体DR4在大肠癌的表达及意义
闫庆辉, 张国建, 任鹏涛, 赵晶, 王凤安
- 336 VEGF和Angiopoietin家族在早期人胚肝发育过程中的作用
姜红心, 魏志新, 齐安东, 李翠花, 王菁, 李磊

临床 经验

- 341 原发性胆汁性肝硬化患者CD11c⁺和CD123⁺树突状细胞与肝功能损伤的关系
李永哲, 胡朝军, 佟大伟, 张蜀澜, 刘定华
- 346 瑞巴派特对门脉高压性胃病胃黏膜中瘦素表达的影响
徐可树, 李琪, 周霞
- 350 功能性消化不良患者的胃排空和胃内食物分布
唐海英, 王英德, 张延军, 解静慧
- 354 乙肝病病毒外膜大蛋白检测对于判定HBV DNA复制的意义
孙颖, 辛绍杰, 雷厉, 侯俊, 貌盼勇

致 谢	358 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	249 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 255 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知 260 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 279 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 292 首届北京地坛感染病学术会议 298 消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛征文通知 305 《现代消化及介入诊疗》杂志征稿、征订启事 311 世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊 317 更正与说明专栏 331 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知 335 专家门诊 340 技法与经验 345 我国科技论文总数连续三年世界第五 349 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知 357 第一届全国临床营养支持学术会议通知
封面故事	浦立勇, 李相成, 王学浩, 张峰, 姚爱华, 俞悦, 吕凌, 李国强. CD4 ⁺ CD25 ⁺ 调节性T细胞回输对大鼠肝移植急性排斥反应的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(3):261-266 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/261.asp
国际会议	10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006 Canadian Digestive Disease Week Conference March 4-12, 2006 www.cag-acg.org XXX pan-American congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com

世界华人消化杂志 Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊) 创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2006-01-28 原刊名 新消化病学杂志 名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁 管鑫妍 中文编辑 潘伯荣 张海宁 管鑫妍 电子编辑 张敏 张勇 李琪 本期审读 王谨晖	编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 出版 世界胃肠病学杂志社 100023, 北京市2345信箱 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部 (100023, 北京市2345信箱) 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893	《世界华人消化杂志》对所有来稿均进行同行评议, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录。 特别声明 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。 2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R	邮发代号 82-262 国外代号 M 4481	国内定价 每期24.00元 全年864.00元 广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

January 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 3

EDITORIAL	245 Advance in autoantibody profile of primary biliary cirrhosis <i>Wang XS, Li YZ</i>
BASIC RESEARCH	250 Runx3 gene expression in gastric carcinoma and its mechanism of down-regulation <i>Zeng C, He XS, Luo Q, Zhao S, Deng M</i> 256 Function of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60-ku subunit in multidrug resistance of gastric cancer <i>Han QL, Ding J, Zhang LF, Wang X, Guo CC, Qiao TD, Zhang XY, Fan DM</i> 261 Effect of infusing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell on the rejection model of DA-Lewis rat liver transplantation <i>Pu LY, Li XC, Wang XH, Zhang F, Yao AH, Yu Y, Lv L, Li GQ</i> 267 Expression and its significance of maspin, p27 and skp2 in colorectal cancer <i>Liu DD, Yi YF, Deng W</i> 273 Regulatory effects of nitric oxide on nuclear factor-kappa B activation during acute lung injury <i>Li HL, Chen HL, Zhang B, He XM, Xu H, Fan Q</i> 280 Investigation of molecular tumor markers in peripheral blood for early diagnosis of large intestinal carcinoma patients using RT-PCR technique <i>Du YJ, Liu XJ, Jin YM, Qu B, Li BJ</i> 287 No Association between polymorphism of tumor necrosis factor gene and <i>helicobacter pylori</i> infection in Han Chinese in central China <i>Li L, Xia B, Li C</i> 293 Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on invasion of human hepatocellular carcinoma cells <i>Fang ZD, Li JS, Xu XC</i>
CLINICAL RESEARCH	299 An analysis of outcomes for hypopharyngeal squamous cell carcinoma treated with different methods <i>Xing HJ, Zeng ZY, Chen FJ, Guo ZM, Yang AK, Zhang Q</i>
REVIEW	306 Relationship between PI3K-Akt signal pathway and tumors <i>Sun XJ, Huang CZ</i> 312 Correlations of <i>Helicobacter pylori</i>-related gastric mucosal inflammation and apoptosis with Lactic acid bacteria <i>Ma FZ, Ma HS</i> 318 Application of pharmacogenetics and pharmacogenomics in treatment of tumors <i>Wang LF, Qian XP, Liu BR</i> 324 Progress in examination of internal organ feelings <i>Shi L, Bu P</i>
RAPID COMMUNICATION	332 Expression and significance of TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor DR4 in large intestine carcinoma <i>Yan QH, Zhang GJ, Ren PT, Zhao J, Wang FA</i> 336 Roles of vascular endothelial growth factor and Angiopoietin family in early stage of human liver development <i>Jiang HX, Wei ZX, Qi AD, Li CH, Wang Q, Li L</i>

CLINICAL PRACTICE	341 Relations of peripheral blood CD11c⁺ and CD123⁺ dendritic cells with hepatic injury in patients with primary biliary cirrhosis <i>Li YZ, Hu CJ, Tong DW, Zhang SL, Liu DH</i> 346 Influence of Rebamipide on leptin expression in gastric mucosa with portal hypertensive gastropathy <i>Xu KS, Li Q, Zhou X</i> 350 Gastric emptying and intragastric food distribution in patients with functional dyspepsia <i>Tang HY, Wang YD, Zhang YJ, Xie JH</i> 354 Significance of hepatitis B virus large protein detection in prediction of HBV DNA replication <i>Sun Y, Xin SJ, Lei L, Hou J, Mao PY</i>
ACKNOWLEDGMENTS	358 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Pu LY, Li XC, Wang XH, Zhang F, Yao AH, Yu Y, Lv L, Li GQ.</i> Effect of infusing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell on the rejection model of DA-Lewis rat liver transplantation. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2006;14(3):261-266 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/261.asp
INTERNATIONAL MEETINGS	10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006 Canadian Digestive Disease Week Conference March 4-12, 2006 www.cag-acg.org XXX pan-American congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date January 28, 2006

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

原发性胆汁性肝硬化自身抗体谱研究进展

王雪松, 李永哲

王雪松, 李永哲, 中国医学科学院中国协和医科大学 北京协和医院检验科 北京市 100730
国家自然科学基金资助项目, No.30471617
国家高技术研究发展计划(863计划)重大专项基金资助项目, No.2002AARZ2011

通讯作者: 李永哲, 100730, 北京市, 中国医学科学院中国协和医科大学 北京协和医院检验科. yongzhelipumch@yahoo.com.cn
电话: 010-65295416 传真: 010-65295416
收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2005-12-24

摘要

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种慢性渐进性胆汁淤积性肝脏疾病, 以小胆管破坏为主要组织学特征的非化脓性炎症, 并以血清中出现特征性自身抗体为主要标志. 自身抗体对该病发病机制、诊断、治疗及预后均有重要意义. 我们就PBC自身抗体谱研究进展作简要综述.

关键词: 肝硬化; 胆汁性; 自身抗原; 自身抗体

王雪松, 李永哲. 原发性胆汁性肝硬化自身抗体谱研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(3):245-249
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/245.asp>

0 引言

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是以肝内细小胆管非化脓性进行性破坏, 伴门脉炎症性改变为主要特征, 并有长期持续性肝内胆汁淤积、最终导致纤维化和肝硬化的慢性进展性自身免疫性疾病. PBC在中老年女性中多见, 男女比例为1:8^[1]. 近年来, 该病在城市人口中有增高的趋势^[2]. 这种趋势可能与人们对疾病认识的加深和诊断技术的增高, 特别是对自身免疫性肝病相关自身抗体筛选的临床应用有关, 但也不排除该病发病率增加的可能. PBC的病因不明, 该病常合并其他器官自身免疫性疾病. 在该病中几乎所有患者均存在特异性自身抗体和自身反应性T细胞反应, 因此被称为是一种器官特异性的自身免疫性疾病. 在疾病的早期治疗选用的是熊脱氧胆酸(UDCA), 其在临床中显示了很好的治疗效果. 而在疾病的晚期通常使用的是肝移植的方法, 术后患者生活质

量较高^[3,4]. 我们就PBC主要自身抗体的特征及其临床意义进行了如下阐述.

1 抗线粒体抗体 (antimitochondrial antibody, AMA)

自从1965年人们首次发现PBC患者血清中存在抗线粒体抗体以来, 此自身抗体已成为诊断PBC的主要检查项目. 通常是在大鼠肾组织冰冻切片抗原基质上使用间接免疫荧光的方法检测此自身抗体. 1980年以后, 使用患者血清筛选表达文库, 发现这种cDNA编码的优势线粒体抗原是二氢硫辛酰胺脱氢酶的亚单位, 其主要成分为丙酮酸脱氢酶复合体. 后来使用ELISA和免疫印迹的方法证明, 其抗体主要是与丙酮酸脱氢酶复合体E2相反应, 约占PBC患者中的95%. 高滴度AMA是PBC患者的重要血清学标志^[5], 并且这种高滴度AMA可在PBC的临床、生化和组织学表现之前就出现. 因此, AMA检测成为诊断PBC的重要检测项目.

AMA可分为M1-M9共9个亚型, 其中M2为PBC特异性抗体. M2的靶抗原为线粒体上2-氧酸脱氢酶复合体(2-OADC)的一些成分^[6]. 2-OADC包括丙酮酸脱氢酶复合体E2亚单位(PDC-E2)、支链2-酮酸脱氢酶复合体E2亚单位(BCOADC-E2)、2-酮戊二酸脱氢酶复合体E2亚单位(OGDC-E2)以及二氢硫辛酰胺脱氢酶结合蛋白(E3BP), 最常见的反应是针对PDC-E2. 在一项研究中显示^[7], 83例AMA阳性的PBC患者中, 有81例与74 ku的PDC-E2和55 ku的E3BP进行反应; 仅有2例与52 ku的BCOADC相反应. PDC的抗原表位主要位于内酯酰区和部分外酯酰区, 在PBC患者血清中阳性率为95%; BCOADC和OGDC的抗原表位位于酯酰区, 阳性率分别为38%, 39%-88%^[8,9]. 三种抗原之间无交叉反应, 其联合检测阳性率可达95%-99%, 而且特异性也很高.

除M2型抗线粒体抗体外, 其他各型抗线粒体抗体(如M4、M8、M9)对PBC的检测也有重要意义. 有研究者曾用免疫荧光法检测78例PBC

■背景资料

本文对近年来国内外关于PBC自身抗体相关研究进行了综述, 分别对PBC特异性抗体抗线粒体抗体、抗核抗体及其他的PBC相关自身抗体进行了阐述, 并对抗核抗体中的抗核点抗体、抗核包膜自身抗体及抗SOX13抗体进行了分类介绍, 重点描述了抗Sp100抗体、抗早幼粒细胞性白血病(PML)抗体、抗gp210抗体、抗P62抗体及抗核板素B受体(LBR)抗体、抗核板素相关多肽(anti-LAP)抗体、抗板层素抗体(ALA).

患者^[10],有74例(94.9%)为抗M2阳性,其中30例M2阳性患者中有16例(53.3%)抗M4阳性和4例(13.3%)抗M9阳性。M2伴M4、M8阳性多见于PBC严重类型,M2伴M9阳性多见于轻型患者以及PBC患者的亲属。在检测抗M4、M8、M9抗体时使用免疫荧光方法很难检测,所以在检测抗M4和M8抗体时通常使用ELISA和补体结合实验的方法;在检测抗M9抗体时则使用ELISA或免疫印迹的方法。这些血清学指标均具有潜在临床价值,可预示其预后情况。

现已证实AMA的存在对PBC的诊断具有重要价值。据报道Dai *et al*^[5]对29例AMA M2阳性而无临床表现的患者进行肝脏穿刺病理研究,发现93%患者提示或符合PBC,经随访76%患者在2 a内出现PBC临床表现,22例发展成典型PBC患者,24例进展成为肝功能异常并伴有典型胆汁淤积。这些结果均提示,AMA阳性者虽无PBC临床表现,但其肝组织病理改变必须随诊观察。从这些研究中我们得出结论,存在AMA提示其具有PBC明显的组织学特征,甚至在无症状的患者中随着时间的流逝将进一步发展成为临床PBC患者。对于AMA监测将有利于患者在疾病早期即被诊断,因此AMA检测成为诊断PBC的重要血清学指标。

2 抗核抗体 (antinuclear antibody, ANA)

在许多研究中已证明ANA是诊断PBC的重要标志。大约50%PBC患者有ANA,尤其是在AMA呈阴性时可作为其诊断的另一重要标志^[7]。曾有研究者使用不同的方法分析96例PBC患者和283例健康对照组,结果发现其中53%的患者被检测出有ANA。其中27%抗Sp100抗体阳性、16%抗gp210抗体阳性、16%抗着丝粒抗体阳性、6%抗核板层素B受体抗体阳性、16%抗多核点型抗体阳性。在13例抗核抗体(抗Sp100、gp210和核板素B受体抗体)阳性PBC患者中有9例是AMA阴性。说明这些抗核抗体在AMA阴性者中更为常见。以下我们介绍几种常见的抗核抗体。

2.1 抗核点抗体 根据报道已经证实抗核点抗体出现在所有的哺乳动物细胞中^[11]。该抗体在AMA阴性PBC患者中有60%为阳性,而在AMA阳性患者中只有20%为阳性,提示其有助于AMA阴性PBC患者的诊断。当应用间接免疫荧光法检查时^[7],发现在抗核点抗体阳性患者的非分裂期细胞可见5-20个散在的点状颗粒,大小不同且分布在整个细胞核,细胞质无荧光。现在已

知,有两种主要的抗核点抗体,即抗Sp100抗体和抗早幼粒细胞性白血病(PML)抗体。

2.1.1 抗Sp100抗体 抗Sp100抗体是PBC特异性自身抗体,其靶抗原Sp100为可溶性酸性磷酸化核蛋白。大约20%-30%PBC患者血清中含有抗Sp100核蛋白^[12],该抗体在PBC中特异性约为97%,其敏感性为30%^[7]。通过分离、纯化该抗原,得到Sp100的cDNA序列,其开放阅读框架为1 443 bp,编码481个氨基酸,分子量为53 ku的蛋白。Sp100蛋白序列具有两个区,其中一个位于N端含40个氨基酸的区域,其与人类MHC I类分子的抗原结合部位表现高于60%的同源性。另一个区域是位于多肽的C端,与多种转录调节蛋白具有高度相似性。两个主要的抗原决定簇已经鉴定,其中一个抗原决定簇位于氨基酸的296-311位,第二个抗原决定簇位于氨基酸的332-351位。

对PBC患者进行抗Sp100自身抗体检测,结果显示其具有重要的诊断价值。据调查显示,对100例PBC患者的检测中有35例为抗Sp100抗体阳性^[13];还有研究显示,89例PBC患者中30例抗Sp100抗体为阳性^[14]。以上均说明抗Sp100自身抗体是PBC重要的诊断标志。抗Sp100抗体亦少见风湿性自身免疫病患者,但阳性率低(一般<3%),且阳性患者多与PBC密切相关。但值得注意的是,抗Sp100抗体对PBC的诊断还必须依赖于其临床的各项指标,并进行鉴别诊断^[15,16]。

2.1.2 抗早幼粒细胞性白血病(PML)抗体 PML和Sp100都是PBC中的自身抗原,PML蛋白为细胞转化和生长的抑制蛋白,异常地表达在早幼粒细胞白血病细胞中。用免疫荧光法分析过度表达的PML细胞,发现抗PML抗体主要出现在抗Sp100抗体阳性的患者中^[7]。约90%的PBC患者可同时检测到抗PML抗体和抗Sp100抗体,两者具有相同的敏感性和特异性。且出现抗Sp100抗体和抗PML抗体的PBC患者病情进展快,预后较差。以上说明,在PBC中这种特殊的抗Sp100抗体和抗PML抗体实际上预示了PBC的早期诊断,提高了PBC检出率,并且具有高度特异性,是检测PBC的重要诊断标志。

2.1.3 其他抗核点抗体 最近发现在PBC中存在一种新的自身抗原成分,他可以共价的连接Sp100和PML蛋白,被称为微小泛素相关的修饰因子(small ubiquitin-related modifiers, SUMO)^[17]。SUMO-1和SUMO-2及SUMO-3蛋白是存在于其他核点蛋白中的特殊蛋白质。他们能够通过

相似的泛素结合途径, 共价的连接到其他细胞蛋白上, 但并不形成泛素化。SUMO结合的蛋白并不会导致其降解, 而是稳定的结合靶蛋白及调节细胞的结构和功能。有研究显示^[17], 在99例抗Sp100和PML抗体阳性的PBC患者中可检测到抗SUMO-2和SUMO-1抗体, 其在PBC中的阳性率为42%和15%。但在抗核点抗体阴性的PBC患者中并没有发现抗SUMO抗体。因此认为抗SUMO抗体也是PBC的一种新型自身抗体类型。

2.2 抗核包膜自身抗体 抗核包膜自身抗体已经显示与自身免疫性疾病有一定的相关性^[18]。这种核包膜是许多自身免疫性疾病中自身免疫反应性细胞内的靶抗原。在真核生物的生物体中, 这种核膜由相互关联的区域所组成。核包膜主要包括外核膜、内核膜、核孔复合体和核板层素。外核膜是连续的内质网^[19], 有核糖体及粗面内质网附着。内核膜是完整的膜蛋白, 为调节核板层素和染色质的连接物。在外核膜与内核膜两层之间有核孔复合体组成, 核孔复合体是提供核和细胞质之间大分子运输的通道。其直径大约为120 nm, 分子量为124 ku, 由80-100个蛋白质组成, 主要受gp210和P62两种蛋白调节。核板是一直径10 nm的中间丝状结构, 与核内膜的内面连结, 组成板层结构的蛋白称为板层素(lamins), 一般分为三型: lamin A(60 ku)、B(68 ku)和C(74 ku), 新近有报道存在D型。对自身免疫性肝病的诊断具有重要临床价值的抗核包膜(被)蛋白抗体主要有: 抗gp210抗体、抗P62抗体、抗核板素抗体、抗核板素联合多肽抗体和抗核板素B受体。

2.2.1 抗gp210抗体 10%-20%PBC患者中可检出抗gp210抗体, 荧光免疫染色为点状的环形模型。gp210是一种主要的糖蛋白核孔复合体, 分子量为210 ku。这种蛋白由三个区域构成, 一个1 783个氨基酸的区域, 一个单独的20个氨基酸的疏水跨膜片段和一个短的58个氨基酸的羧基端。已证明在PBC中这些自身抗体主要与该蛋白的羧基端进行反应。调查显示^[20], 43例PBC患者中有12例可检测到抗gp210抗体。在这12例中有4例患者的血清与gp210羧基端进行反应, 另外8例患者的靶抗原表位定位于1 783个氨基酸的区段。这种抗gp210抗体识别至少两种不同的表位, 一个是与大糖基化腔N端区内的表位反应, 另一个是与胞质中C端一段15个氨基酸的序列发生反应。

抗gp210抗体是PBC中一个多克隆的高特异

性抗体。使用免疫印迹和ELISA的方法, 发现其特异性高达99%^[20], 敏感性可达10%-41%^[7]。该抗体在其他患者中如自身免疫性肝炎、风湿性疾病、多发性肌炎及干燥综合征中是很少见的。资料显示, 抗gp210自身抗体是诊断PBC的重要自身抗体。Miyachi *et al*^[21]对175例PBC患者进行研究, 结果检测出46例(25%)抗gp210自身抗体阳性。且抗gp210抗体在诊断PBC中具有高度的特异性^[22]。另外抗gp210抗体可与AMA同时出现, 其存在于20%-47% AMA阴性的PBC患者中。对于临床、生化和组织学表现疑诊PBC而AMA阴性的患者, 或AMA阳性而临床症状不典型、存在重叠综合征(如与干燥综合征重叠)的患者, 抗gp210抗体检测有重要价值^[23]。此外, 抗gp210自身抗体出现在有明显的胆汁淤积和严重的肝功能损害患者中, 提示其疾病的预后不良^[7,22]。

2.2.2 抗P62抗体 抗P62抗体在诊断PBC中具有很高的特异性, 其敏感性为23%-32%。除了干燥综合征以外, 在其他肝脏或自身免疫性疾病中未检测到此抗体。该抗体的靶抗原是一种核孔糖蛋白^[18], 分子量为62 ku。用免疫荧光法检测PBC患者, 患者的血清识别62 ku蛋白区, 此区是核孔复合体上清晰的点固定蛋白。免疫印迹法显示, 抗P62核蛋白在血清中是核孔蛋白复合体的一种功能蛋白, 是PBC的一种重要抗原。有研究调查显示, 175例PBC患者中15例(13%)为抗P62抗体阳性^[12]。抗P62抗体可能与PBC患者的病情进展有关。

2.2.3 抗核板素B受体(anti-lamina B receptor, LBR)抗体 LBR是核膜内的整合蛋白, 可以结合B型核纤层蛋白及双链DNA的核内膜蛋白。其抗体反应的抗原表位是结合在核板素B内部的60个氨基酸的氨基端区, 这些自身抗体不与跨膜区反应。现已发现LBR最小的表位是在氨基酸序列的1-60。LBR在PBC中具有很高的特异性, 但是其敏感性较低(1%-3%)^[7,20]。据调查显示^[21]175例PBC患者中16例抗LBR阳性, 其发生率为9%, 并且LBR常出现于AMA阴性的PBC患者血清中。

2.2.4 抗核板素相关多肽(anti-lamina-associated polypeptide, anti-LAP)抗体 关于此抗体在文献中记录的并不是很多, 抗LAP抗体的靶抗原是位于核内膜上的与核板层相连结的LAP成分, 分为LAP1和LAP2两种。在一项研究中曾报道抗LAP2出现在31例PBC患者中, 约占患者的16%^[20]。然而, 抗LAP抗体其特异性并不是很高。因为LAP也报道在其他的各种免疫性疾病中, 如

系统性红斑狼疮、血清反应阴性的多发性关节炎、原发性干燥综合征、风湿性多肌痛、抗磷脂综合征、视神经炎、肾病综合征及其他非自身免疫性疾病如痛风和骨关节炎等。

2.2.5 抗板层素抗体(anti-lamina antibodies, ALA)
ALA又称抗核纤层抗体, ALA染色时在细胞核分裂间期内有一个浅的、平滑的、连续的染色模型^[20]。这种ALA的染色模型仅可以在高稀释度的血清中出现,可能是由于干扰其他的低稀释的核抗原而产生。ALA可通过进一步的免疫印迹或ELISA识别其特征。曾有报道^[20]在37例PBC患者中有3例(8%)为ALA阳性。ALA虽在PBC患者中出现,但其特异性并不是很高。该抗体还出现在抗磷脂综合征、血小板减少症、硬皮病、系统性红斑狼疮、风湿性关节炎、雷诺氏综合征、干燥综合征、慢性自身免疫性肝脏疾病及少数慢性疲劳综合征患者中。

2.3 抗SOX13抗体 在PBC中还有一种核抗原是转录因子SOX13(ICA12)^[24]。SOX13最初是作为与糖尿病相联系的自身抗原。SOX13是SOX家族中的转录调节蛋白,其包含高迁移性组(HMG),基本结构为HGM1和HGM2。抗HGM1和HGM2抗体存在于自身免疫性肝脏疾病和溃疡性结肠炎中。有研究显示,通过放射性免疫沉淀方法检测抗SOX13的水平^[25],其结果为18%发生在PBC患者中,13%在自身免疫性肝炎的患者中,还有很低的频率在其他的多系统性自身免疫性疾病中。抗HGM1和HGM2发生在PBC中的频率为30%和35%。抗SOX13和抗HMG抗体在PBC中的出现也具有重要意义。

3 其他的PBC相关自身抗体

除以上自身抗体外,还有一些自身抗体也可出现在PBC患者中。如:20%-50%抗平滑肌抗体(SMA),曾有报道在PBC患者中有19%的病例为抗SMA阳性^[7];抗着丝点抗体(ACA)也是PBC中的一种自身抗体,抗着丝点抗体B主要与自身免疫性血清反应,是一种DNA结合蛋白,分子量为86 ku,在研究中显示其确定的阳性反应率为10%-20%^[24],应用间接免疫荧光法检测可以发现,PBC患者中ACA阳性常伴PBC其他相关自身抗体阳性,最常见的是AMA,PBC患者中约20%的AMA阳性伴ACA阳性。

以上我们介绍了常见的与PBC密切相关的自身抗体,及各自身抗体所针对的靶抗原。详细阐述了国内外对其研究现状及进展。从中我们

可以看到自身抗体的研究对于PBC的诊断及治疗具有重要意义。伴随免疫学及分子生物学技术的应用,应用免疫印迹法或ELISA法检测PBC各种新特异抗体,在临床上具有广阔的应用前景。

随着检测手段的提高,越来越多的新的自身抗原被发现,自身抗体检测的重要性也随之日益体现。这些自身抗体的检测成为诊断原发性胆汁性肝硬化的重要标志,我们认为对这些自身抗体的联合检测将使更多的原发性胆汁性肝硬化患者得到早期的诊断和正确的治疗。

4 参考文献

- 1 Sakauchi F, Mori M, Zeniya M, Toda G. A cross-sectional study of primary biliary cirrhosis in Japan: utilization of clinical data when patients applied to receive public financial aid. *J Epidemiol* 2005; 15: 24-28
- 2 Roblin X, Bonaz B. Primary biliary cirrhosis. *N Engl J Med* 2005; 353: 2719-2720
- 3 Duclos-Vallee JC. Recurrence of autoimmune hepatitis, primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis after liver transplantation. *Acta Gastroenterol Belg* 2005; 68: 331-336
- 4 Hasegawa K, Sugawara Y, Imamura H, Ikeda M, Kokudo N, Makuuchi M. Living donor liver transplantation for primary biliary cirrhosis: retrospective analysis of 50 patients in a single center. *Transpl Int* 2005; 18: 794-799
- 5 Dai Y, Liang YH, Xie PY, Chen BW, Liu XG. Clinical analysis of primary biliary cirrhosis: a report of 42 cases. *Beijing Daxue Xuebao* 2005; 37: 410-414
- 6 Miyakawa H, Kawaguchi N, Kikuchi K, Fujikawa H, Kitazawa E, Matsushita M. Definition of antigen specificity for antimitochondrial proteins detected by Western blotting using native mitochondrial proteins in primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 2001; 21: 101-107
- 7 Muratori P, Muratori L, Ferrari R, Cassani F, Bianchi G, Lenzi M, Rodrigo L, Linares A, Fuentes D, Bianchi FB. Characterization and clinical impact of antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 431-437
- 8 Olafsson S, Gudjonsson H, Selmi C, Amano K, Invernizzi P, Podda M, Gershwin ME. Antimitochondrial antibodies and reactivity to N. aromaticiv-orans proteins in Icelandic patients with primary biliary cirrhosis and their relatives. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2143-2146
- 9 Nakano T, Inoue K, Hirohara J, Arita S, Higuchi K, Omata M, Toda G. Long-term prognosis of primary biliary cirrhosis (PBC) in Japan and analysis of the factors of stage progression in asymptomatic PBC (a-PBC). *Hepatol Res* 2002; 22: 250-260
- 10 Yao DK, Xie WF, Chen WZ, Liu HY, Tu XQ, Fan LY. The value of antimitochondrial antibody and its subtypes in the diagnosis of primary biliary cirrhosis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 9-11
- 11 Borden KL. Pondering the promyelocytic leukemia protein (PML) puzzle: possible functions for PML nuclear bodies. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 5259-5269
- 12 Invernizzi P, Selmi C, Ranftler C, Podda M, Wesi-erska-Gadek J. Antinuclear antibodies in primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 298-310

- 13 Wichmann I, Montes-Cano MA, Respaldiza N, Alvarez A, Walter K, Franco E, Sanchez-Roman J, Nunez-Roldan A. Clinical significance of anti-multiple nuclear dots/Sp100 autoantibodies. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 996-999
- 14 Muratori P, Muratori L, Cassani F, Terlizzi P, Lenzi M, Rodrigo L, Bianchi FB. Anti-multiple nuclear dots (anti-MND) and anti-Sp100 antibodies in hepatic and rheumatological disorders. *Clin Exp Immunol* 2002; 127: 172-175
- 15 Bogdanos DP, Vergani D, Muratori P, Muratori L, Bianchi FB. Specificity of anti-sp100 antibody for primary biliary cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 405-406
- 16 Rigopoulou EI, Dalekos GN. Anti-sp100 antibodies in primary biliary cirrhosis. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 406-407
- 17 Janka C, Selmi C, Gershwin ME, Will H, Sternsdorf T. Small ubiquitin-related modifiers: A novel and independent class of autoantigens in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2005; 41: 609-616
- 18 Enarson P, Rattner JB, Ou Y, Miyachi K, Horigome T, Fritzler MJ. Autoantigens of the nuclear pore complex. *J Mol Med* 2004; 82: 423-433
- 19 Ou Y, Enarson P, Rattner JB, Barr SG, Fritzler MJ. The nuclear pore complex protein Tpr is a common autoantigen in sera that demonstrate nuclear envelope staining by indirect immunofluorescence. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 379-387
- 20 Nesher G, Margalit R, Ashkenazi YJ. Anti-nuclear envelope antibodies: Clinical associations. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 30: 313-320
- 21 Miyachi K, Hankins RW, Matsushima H, Kikuchi F, Inomata T, Horigome T, Shibata M, Onozuka Y, Ueno Y, Hashimoto E, Hayashi N, Shibuya A, Amaki S, Miyakawa H. Profile and clinical significance of anti-nuclear envelope antibodies found in patients with primary biliary cirrhosis: a multi-center study. *J Autoimmun* 2003; 20: 247-254
- 22 Nakamura M. The significance of anti-nuclear envelope (gp210) antibody in primary biliary cirrhosis. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2005; 28: 117-122
- 23 Nakamura M, Takii Y, Ito M, Komori A, Yokoyama T, Shimizu-Yoshida Y, Koyabu M, Matsuyama M, Mori T, Kamihira T, Daikoku M, Migita K, Yatsuhashi H, Nozaki N, Shimoda S, Ishibashi H. Increased expression of nuclear envelope gp210 antigen in small bile ducts in primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2005
- 24 Mackay IR, Whittingham S, Fida S, Myers M, Ikuno N, Gershwin ME, Rowley MJ. The peculiar autoimmunity of primary biliary cirrhosis. *Immunol Rev* 2000; 174: 226-237
- 25 Fida S, Myers MA, Whittingham S, Rowley MJ, Ozaki S, Mackay IR. Autoantibodies to the transcriptional factor SOX13 in primary biliary cirrhosis compared with other diseases. *J Autoimmun* 2002; 19: 251-257

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

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

●消息●

2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行

本刊讯 世界华人消化杂志主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

据中国科技期刊引证报告(潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 1-289)统计, 世界华人消化杂志2003年发表文章594篇, 地区分布25个, 机构分布191个, 基金论文比31%, 总被引频次5 249次, 影响因子2.924, 即年指标0.529, 引用期刊数260种, 被引半衰期3.06. 中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》定期公布收录的中国科技论文统计源期刊的10个科学计量指标, 并根据此指标评选出中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志获得2001年和2003年中国百种杰出学术期刊。

据《中文核心期刊要目总览2004年版》(戴龙基, 蔡蓉华主编. 北京: 北京大学出版社, 2004: 1-678), 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等7个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库有51种, 统计到的文献数量共计9 435 301篇次, 涉及期刊39 893种次. 参加核心期刊评审的学科专家达1 873位. 经过定量筛选和专家定性评审, 从中国正在出版的近1万2千种中文期刊中评选出1 800种核心期刊. 世界华人消化杂志被评为中文核心期刊要目总览。

世界华人消化杂志发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

世界华人消化杂志2006年由北京报刊发行局发行, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期8, 18, 28日, 页码160, 月价72.00. (世界胃肠病学杂志社 2006-01-28)

Runx3 基因在胃癌中的表达及其表达下调机制

曾超, 贺修胜, 罗桥, 赵帅, 邓敏

■背景资料

Li *et al* 研究表明, 45%-60% 的胃癌中 Runx3 表达均明显下调, 而与之相比, 其他胃癌相关抑癌基因与胃癌发生的相关性偏小, 因此推测 Runx3 可能是引起胃癌的关键性基因。

曾超, 贺修胜, 罗桥, 赵帅, 邓敏, 南华大学肿瘤研究所 湖南省衡阳市 421001

曾超, 男, 1979-08-08, 湖南娄底人, 汉族, 2003级南华大学硕士研究生, 主要从事肿瘤分子易感机制研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30470967

通讯作者: 贺修胜, 421001, 湖南省衡阳市, 南华大学肿瘤研究所. hexiusheng@hotmail.com

收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-12-10

Runx3 gene expression in gastric carcinoma and its mechanism of down-regulation

Chao Zeng, Xiu-Sheng He, Qiao Luo, Shuai Zhao, Min Deng

Chao Zeng, Xiu-Sheng He, Qiao Luo, Shuai Zhao, Min Deng, Oncology Institute of Nanhua University, Hengyang 421001, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30470967

Correspondence to: Xiu-Sheng He, Oncology Institute of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, 421001, China. hexiusheng@hotmail.com

Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-12-10

Abstract

AIM: To investigate level of Runx3 expression in gastric carcinoma, and to explore the main mechanism of Runx3 down-regulation.

METHODS: DNA, RNA and protein were extracted from 25 gastric carcinoma specimens. Single strand conformation polymorphism (SSCP) and microsatellites were used to detect the mutation and loss of heterozygosity (LOH) of Runx3 gene. The methylation status of Runx3 gene was examined by methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR). The Runx3 mRNA and protein were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot.

RESULTS: LOH was detected in only 1 of 25 specimens, and no mutation in exon3 of Runx3 was found. Methylation of Runx3 promoter region was confirmed in 55% (14/25) specimens and part of gastric cancer cell line MGC803. RT-PCR and western blot indicate expression of Runx3 in gastric carcinoma were lower than that

in corresponding normal stomach tissue.

CONCLUSION: The expression of Runx3 gene is down-regulated in gastric carcinoma, suggesting a possible involvement of Runx3 gene in carcinogenesis and progression of gastric cancer. The main mechanism of this down-regulation in Runx3 expression was related to the methylation of its promoter region.

Key Words: Gastric cancer; Mutation; Methylation; Runx3

Zeng C, He XS, Luo Q, Zhao S, Deng M. Runx3 gene expression in gastric carcinoma and its mechanism of down-regulation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(3):250-255

摘要

目的: 观察Runx3基因在人胃癌组织及相应正常胃组织中的表达分布特点, 并对其表达下调的机制进行初步研究。

方法: 对25例胃癌标本进行DNA、RNA和蛋白的提取, 利用单链构象多态性(SSCP)和微卫星法, 检测Runx3基因突变和缺失情况。用MSP(methylation specific PCR)检测25例胃癌标本及细胞株(MGC803, SGC7901)的甲基化状态。分别以蛋白印迹法(western blot)和逆转录聚合酶链反应(RT-PCR), 检测Runx3蛋白质和mRNA水平。

结果: 在25例胃癌标本中发现一例杂合性缺失, 未发现Runx3第三外显子突变。MSP法检测胃癌标本中55%(14/25)发生启动子区域的甲基化, 同时在胃癌细胞株MGC803中Runx3基因发生了部分甲基化。Western blot和RT-PCR发现Runx3在胃癌组织中表达明显低于相应正常胃组织(蛋白: $50\ 178 \pm 14\ 404$ vs $95\ 020 \pm 43\ 136$, $P < 0.01$; mRNA: 0.66 ± 0.31 vs 1.06 ± 0.34 , $P < 0.01$)。

结论: Runx3基因在胃癌组织中表达较正常组织明显下调, 提示该基因与胃癌的发生和发展有关。Runx3基因表达下调的机制主要是因为

启动子区域甲基化.

关键词: 胃癌; 突变; 甲基化

曾超, 贺修胜, 罗桥, 赵帅, 邓敏. Runx3基因在胃癌中的表达及其表达下调机制. 世界华人消化杂志 2006;14(3):250-255
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/250.asp>

0 引言

Runx家族成员包括Runx1、Runx2和Runx3. Runx1基因是血形成所必需的^[1], 其功能障碍与30%急性白血病有关. Runx2基因是骨形成所必需的^[2,3], 其功能异常导致常染色体显现的骨疾病, 如锁骨头发育异常. Runx3基因定位于人染色体1p36.1区域^[4], 是Runx家族重要成员之一, 其编码基因是近年来新发现的一个抑癌基因, 并且很可能是引起胃癌的关键性基因. 研究发现, 早期胃癌中Runx3基因表达下降约40%, 而在进展期胃癌细胞中, Runx3基因表达下降超过90%^[5]. 我们同时检测胃癌中Runx3基因mRNA和蛋白的表达及其与临床病理的联系, 以探讨Runx3在胃癌发生发展中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 南华大学附属第一医院2004-05/2005-03手术切除的25例胃癌及其相应正常组织. 25例标本中, 男性15例, 女性10例, 年龄45-68岁, 平均66岁. 其中细胞分化为未分化及低分化的18例, 中分化及高分化的7例, 全部标本均经病理组织学切片证实. 胃癌细胞株MGC-803、SGC-7901均取自本所.

1.2 方法

1.2.1 PCR-SSCP和LOH 对Runx3基因第三外显子进行扩增, 引物序列参照文献[6]. 第三外显子PCR反应条件为94℃ 40 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 反应35个循环. 扩增产物经99℃ 10 min变性后行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色, 通过观察泳动条带是否移位以判断突变情况(图1). PCR扩增微卫星位点D1S1460, PCR反应条件为94℃ 40 s, 56.6℃ 30 s, 72℃ 1 min, 反应35个循环, 扩增产物经99℃ 10 min变性后行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色, 观察条带有无杂合性缺失.

1.2.2 DNA提取 用酚-氯仿法提取胃癌组织及胃癌细胞株的DNA.

1.2.3 MSP分析Runx3基因甲基化状态 采用MSP法对胃癌Runx3基因甲基化状态进行了检测, 用

氢氧化钠和亚硫酸氢钠对提取的DNA进行修饰, DNA样本处理用CpGenome™ DNA Modification Kit(CHEMICON, CAD). 最后采用Runx3基因特异的甲基化引物和未甲基化引物对修饰后的DNA进行扩增, 扩增引物序列参照文献[6].

1.2.4 RT-PCR 采用Trizol总RNA提取液, 取100 mg组织提取总RNA, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析其完整性, 用紫外分光光度计测其吸光度(A)值和浓度. 鸟类成髓细胞瘤病毒(AMV)逆转录酶(Promega公司产品)进行逆转录. 取5 μL逆转录产物用于PCR反应. PCR反应的Runx3基因和作为内参照的GAPDH均由大连宝生物公司合成. Runx3产物大小258 bp, 上游引物序列TGGCAGGCAATGACGA, 下游引物序列为CAGGGAACGGCTTGGT; GAPDH产物大小393 bp, 上游引物序列为GGATTGCTCGTATTGGGCG, 下游引物序列为TACTTCTCATGGTTCACAC. Runx3与GAPDH反应同管进行, 反应终体积为50 μL, 反应条件为94℃ 1 min, 56.5℃ 45 s, 72℃ 1 min, 共34个循环. PCR产物在含0.5 mg/L溴化乙锭的10 g/L琼脂糖凝胶上电泳, 应用Alphalmager™2200凝胶成像系统对条带进行扫描分析. Runx3表达量以Runx3的A值比同管反应GAPDH的A值衡量.

1.2.5 Western blot 取200 mg的组织按组织和细胞裂解液1:5加入1 mL裂解液(0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris-HCl pH 7.6; 0.001 mol/L EDTA, pH 8.0, 1 mg/L Leupatin, 100 mg/L PMSF), 匀浆器匀浆提取总蛋白, BCA法蛋白定量. 取100 μg总蛋白变性10 min后, 以聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白电泳分离后经电转移槽转移至PVDF膜. 50 g/L脱脂奶粉室温封闭1 h, PVDF膜置于1:250稀释的一抗(羊抗人Runx3单克隆抗体, Santa Cruz公司产品)稀释液中, 4℃过夜, TBST洗膜30 min, 再置于1:4 500稀释的二抗(抗羊IgG-HRP, 北京中杉金桥生物公司产品)稀释液中, 37℃孵育1 h, TBST洗膜45 min后加入ECL发光剂显影曝光.

统计学处理 采用SPSS 11.5统计软件, 计量资料的组间比较采用t检验.

2 结果

2.1 Runx3基因的PCR-SSCP和LOH检测 对25例胃癌进行了PCR-SSCP, 均未出现异常泳动条带(图1), LOH发现1例杂合性缺失(图2).

2.2 胃癌标本及胃癌细胞株甲基化检测 对25例胃癌标本及胃癌细胞株MGC803、SGC7901进

■创新盘点

关于Runx3基因的研究国内报道较少, 本研究检测到胃癌标本中Runx3基因表达明显下调, 并发现下调机制主要是启动子区域高甲基化.

■应用要点

Runx3基因可作为一个有效的分子靶标,从而为临床治疗胃癌提供坚实的理论依据.

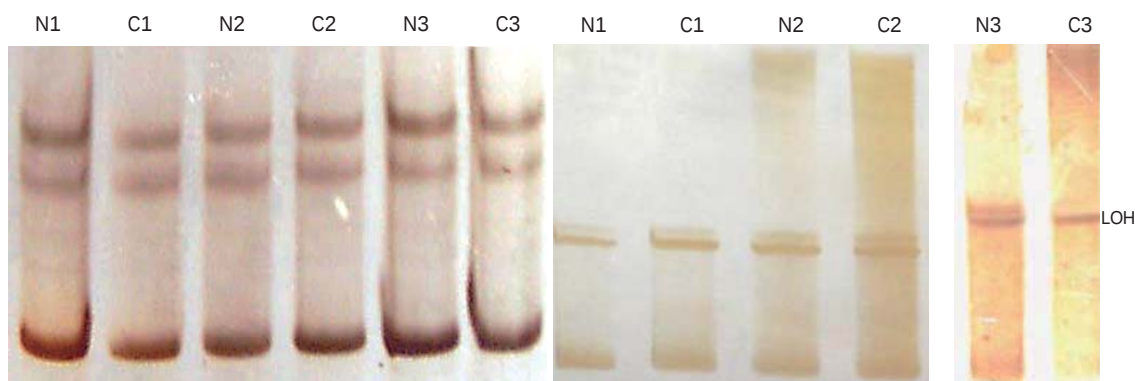


图1 胃癌PCR-SSCP检测. N1-3: 正常胃组织; C1-3: 胃癌组织.

图2 胃癌LOH检测. N1-3: 正常胃组织; C1-3: 胃癌组织.

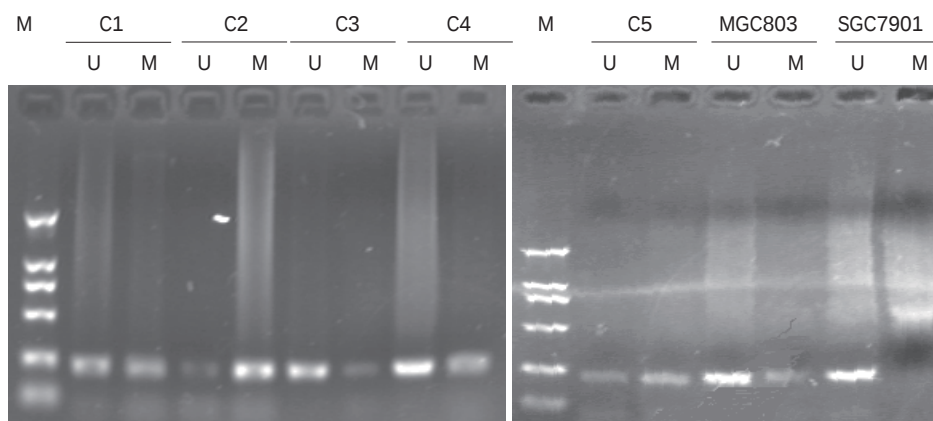


图3 MSP检测C1-C5胃癌标本. U: 未甲基化; M: 甲基化.

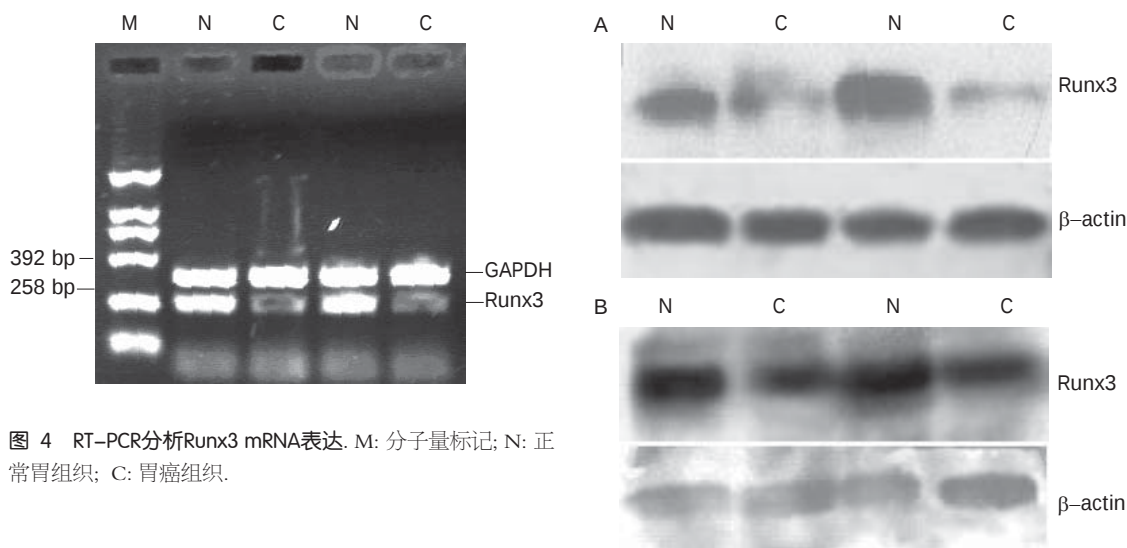


图4 RT-PCR分析Runx3 mRNA表达. M: 分子量标记; N: 正常胃组织; C: 胃癌组织.

图5 Western blot分析Runx3蛋白表达. A: 低分化胃癌; B: 高分化胃癌.

行检测, 结果发现55%(14/25)的胃癌标本有不同程度的甲基化, 并且在胃癌细胞株MGC803中检测到启动子区域部分甲基化(图3).

2.3 胃癌组织及相应正常组织(距癌原发灶10 cm以上), Runx3基因mRNA和蛋白的表达在全部的胃癌组织中均可以检测到mRNA和蛋白的表达, 胃癌组织及相应正常组织中Runx3 mRNA的表达为 0.66 ± 0.31 和 1.06 ± 0.34 ; Runx3蛋白的表达量分别为 $50\ 178 \pm 14\ 404$ 和 $95\ 020 \pm$

43 136. Runx3基因mRNA在胃癌组织中的表达均低于相应正常组织, 差异具有显著性($P < 0.01$, 图4). 低分化胃癌中, Runx3蛋白在正常胃黏膜中表达明显高于相应的胃癌组织. 高分化胃癌中, Runx3蛋白在正常胃黏膜中表达高于相应的胃癌组织, 但差异并不明显(图5).

表 1 Runx3 mRNA和蛋白的表达与胃癌临床病理特征的关系

病理特征	n	Runx3 mRNA (mean ± SD)	P值	Runx3蛋白 (mean ± SD)	P值
性别					
男性	15	0.66 ± 0.1	>0.05	47 950 ± 7 000	>0.05
女性	10	0.63 ± 0.2		47 857 ± 7 204	
进展程度					
早期	9	0.96 ± 0.1	<0.05	74 499 ± 17 372	<0.05
进展期	16	0.52 ± 0.1		40 345 ± 8 472	
分化程度					
未分化及低分化	18	0.48 ± 0.3	<0.05	48 462 ± 10 762	<0.05
中分化及高分化	7	0.86 ± 0.6		68 049 ± 19 176	

■同行评价
文章具有一定新颖性和可读性,达到国内先进水平。

2.4 胃癌组织中Runx3基因mRNA和蛋白表达相关性 直线相关分析显示胃癌组织中Runx3基因mRNA和蛋白的表达具有相关性($r = 0.820$, $P < 0.05$).

2.5 Runx3的表达与胃癌临床病理特征的关系 将胃癌按不同的临床病理特征分组比较Runx3 mRNA和蛋白的表达, 结果显示, Runx3 mRNA和蛋白的表达与胃癌的进展程度及分化程度有关($P < 0.05$), 而与性别无关(表1).

3 讨论

尽管世界上一些地区胃癌发病率在降低, 但他仍是导致癌症患者死亡的主要疾病之一^[7]. 胃癌的发生是一个多因素、多步骤、多基因参与的过程. 他涉及到基因的不稳定性, 端粒的活化, 癌基因的激活^[8-10], 抑癌基因的失活^[11-13]. 对胃癌的研究表明, 胃癌的发病是由饮食、感染、环境和遗传等各种因素所引起的^[14-16].

Li *et al*^[6]发现大约有45%-60%人胃癌细胞中有Runx3的表达下降或缺失. 与之相比, 目前虽然已经发现约10种与胃癌相关的抑癌基因如“p53”, “c-met”等^[17-18], 但他们与胃癌的相关性偏小, 而Runx3很可能是与胃癌发生相关的一个关键性基因. Levanon *et al*^[5]发现当Runx3^{+/-}小鼠配对后, 大约20%-25%新生小鼠是Runx3^{-/-}, 他的重量大小与其父母无差别. 然而, 75% Runx3^{-/-}新生小鼠由于血糖过低, 没有存活超过10 d, 并发现Runx3^{-/-}小鼠胃壁的厚度是野生型的2倍. Runx3蛋白是TGF-β信号通路下游的一个转录因子, TGF-β是许多细胞的有效抑制因子^[19](如: 上皮细胞、内皮细胞、淋巴细胞等). TGF-β信号紊乱将导致许多肿瘤的发生. 有实验表明, Smad复合物需在Runx3蛋白的指导下, 才能从胞质内转入特定的靶位点^[20], 与Runx蛋白

共同转录激活靶基因, 从而对细胞的分化、细胞周期调控、凋亡和恶性转化起作用.

我们检测了胃癌中Runx3基因mRNA和蛋白表达. 结果表明, 胃癌中Runx3 mRNA和蛋白的表达呈正相关, 这提示胃癌中Runx3 mRNA和蛋白的表达具有一致性. 同时我们发现Runx3基因mRNA和蛋白的表达在胃癌中明显低于相应正常组织, 这提示Runx3基因可能不仅与胃癌的发生有关. 在不同进展和分化程度的胃癌中, Runx3表达也明显下调, 表明Runx3基因与胃癌的演进也密切相关.

我们通过PCR-SSCP对Runx3第三外显子突变进行了检测, 未出现异常泳动条带, 表明Runx3基因表达下调不是由于突变造成的. 由于不同长度的微卫星序列标记了等位基因, 因此应用微卫星多态标记非常适用于检测杂合性缺失^[11,21,22]. 我们检测了25例胃癌组织杂合性缺失状况, 仅发现一例胃癌标本的杂合性缺失. 抑癌基因启动子区域的高甲基化可导致基因转录失活及其表达下调^[23], CpG岛甲基化在多种肿瘤中均有发生^[24-26]. Li *et al*^[6]研究发现Runx3基因失活机制是杂合性缺失和启动子区域甲基化. 我们对25例胃癌标本进行检测, 发现55%的胃癌标本发生了不同程度的甲基化, 表明在本实验组中Runx3基因表达下调主要机制是启动子区域甲基化. Oshimo *et al*^[27]研究80例胃癌标本及7例胃癌细胞株, 45例相应的正常黏膜Runx3基因的CpG岛甲基化情况. 同时用定量RT-PCR检测50例胃癌中Runx3基因表达水平, 结果证实Runx3启动子区域高甲基化在71/80例胃癌中出现, 启动子区域的高甲基化在肠型胃癌中最常见. Kim *et al*^[28]发现在慢性胃炎中Runx3甲基化为8.1%, 肠化时为28.1%, 胃腺瘤中为27.3%. Runx3基因甲基化在非肿瘤的胃黏膜中仅发生于77岁以上

的老人^[29]。因此, Runx3的甲基化可能是胃癌特异性的标记物, 可作为一种很有前途的分子诊断的标记。用去甲基化药物处理激活Runx3基因的表达, 也许可能成为临床上治疗胃癌的一种有效的策略。

4 参考文献

- Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 1996; 84: 321-330
- Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89: 755-764
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89: 765-771
- Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y. AML1, AML2, and AML3, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics* 1994; 23: 425-432
- Levanon D, Brenner O, Otto F, Groner Y, Runx3 knock out and stomach cancer. *EMBO reports* 2003; 4: 560-564
- Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Segimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Casual relationship between the loss of Runx3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124
- Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process-First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52: 6735-6740
- Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000; 35: 111-115
- Hara T, Ooi A, Kobayashi M, Mai M, Yanagihara K, Nakanishi I. Amplification of c-myc, K-sam, and c-met in gastric cancers: detection by fluorescence in situ hybridization. *Lab Invest* 1998; 78: 1143-1153
- Yu J, Miehke S, Ebert MP, Hoffmann J, Breidert M, Alpen B, Starzynska T, Stolte Prof M, Malfertheiner P, Bayerdorffer E. Frequency of TPR-MET rearrangement in patients with gastric carcinoma and in first-degree relatives. *Cancer* 2000; 88: 1801-1806
- Chan AW, Chan MW, Lee TL, Ng EK, Leung WK, Lau JY, Tong JH, Chan FK, To KF. Promoter hypermethylation of Death-associated protein-kinase gene associated with advance stage gastric cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 937-941
- Lee SW, Tomasetto C, Sager R. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2825-2829
- Li JY, Zheng HC, Yang L, Xu L, Yang XF, Gao H, Zhang YC, Xin Y. Altered expression of PTEN gene and LOH of its epigenetic microsatellite in gastric carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2004; 26: 389-392
- Sugimura T. Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 2000; 21: 387-395
- Saito D. Present state of Japanese intervention trial of *H pylori*. *Nippon Rinsho* 2003; 61: 50-55
- Berman SH, Wandersman A. Fear of cancer and knowledge of cancer: a review and proposed relevance to hazardous waste sites. *Soc Sci Med* 1990; 31: 81-90
- Kim JH, Takahashi T, Chiba I, Park JG, Birrer MJ, Roh JK, De Lee H, Kim JP, Minna JD, Gazdar AF. Occurrence of p53 gene abnormalities in gastric carcinoma tumors and cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 938-943
- Rege-Cambrin G, Scaravaglio P, Carozzi F, Giordano S, Ponzetto C, Comoglio PM, Saglio G. Karyotypic analysis of gastric carcinoma cell lines carrying an amplified c-met oncogene. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 64: 170-173
- Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci* 2003; 94: 230-234
- Zaidi SK, Sullivan AJ, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. Integration of Runx and Smad regulatory signals at transcriptionally active subnuclear sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 8048-8053
- An C, Choi IS, Yao JC, Worah S, Xie K, Mansfield PF, Ajani JA, Rashid A, Hamilton SR, Wu TT. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 656-663
- Grundeir T, Vogelsang H, Ott K, Mueller J, Scholz M, Becker K, Fink U, Siewert JR, Hofler H, Keller G. Loss of heterozygosity and microsatellite instability as predictive markers for neoadjuvant treatment in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4782-4788
- Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Yang JM, Liu HF, Peng GY, Xiao TL, Luo YH. Mutation and methylation of hMLH1 in gastric carcinomas with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 655-659
- Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999; 21: 163-167
- Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 159-164
- Leung WK, Yu J, Ng EK, To KF, Ma PK, Lee TL, Go MY, Chung SC, Sung JJ. Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. *Cancer* 2001; 91: 2294-2301
- Oshimo Y, Oue N, Mitani Y, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Ito Y, Chayama K, Yasui W. Frequent

- loss of RUNX3 expression by promoter hypermethylation in gastric carcinoma. *Pathobiology* 2004; 71: 137-143
- 28 Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, Lee M, Kim JW, Bang YJ, Kang GH. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* 2004; 84: 479-484
- Waki T, Tamura G, Sato M, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci* 2003; 94: 360-364

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

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

•消息•

2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知

本刊讯 为了加快国内肝病学术交流、促进我国肝病学科的发展,由中华医学会肝病学会、中华肝脏病杂志编辑委员会主办的"第5届全国肝脏疾病学术研讨会议"定于2006-05在辽宁省大连市召开.届时国内知名肝病专家将就国内外肝病研究的进展及热点问题进行继续教育讲座,并授予参会代表国家级继续教育 I 类学分.现将征文通知公布如下:

1 征文内容

(1)病毒性肝炎发病机制的研究进展;(2)病毒性肝炎的治疗策略;(3)乙型病毒性肝炎的长期治疗;(4)丙型肝炎的抗病毒治疗;(5)肝纤维化发病机制研究进展;(6)肝纤维化的防治;(7)肝硬化的规范化治疗;(8)肝细胞癌的病因学研究进展;(9)肝癌的发病机制研究进展;(10)肝癌的早期诊断;(11)肝癌的手术治疗及方案选择;(12)肝癌的非手术治疗;(13)肝癌的生物治疗;(14)自身免疫性肝病的发病机制;(15)自身免疫性肝病的诊断和治疗;(16)肝移植后肝炎复发的诊断预防和治疗;(17)生物人工肝的应用及进展;(18)小儿自身免疫性肝病;(19)肝肾综合征;(20)肝功能衰竭;(21)肝干细胞的研究进展及临床应用;(22)脂肪肝及酒精性肝病;(23)非酒精性脂肪性肝病.

2 征稿要求

参加会议论文要求全文(中文)及500字(词)左右中文摘要各一份,应包括目的、材料与方法、结果、讨论,并写清单位、作者姓名及邮编(请自留底稿,恕不退稿).凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文,不再受理.

3 论文寄送地址

400010, 重庆市渝中区临江路74号, 中华肝脏病杂志编辑部收.请在信封左下角注明"会议征文".欢迎用软盘和电子邮件方式投稿.电子邮件地址 zhgz@vip.163.com. 征文截稿日期: 2006-02-28(以邮戳为准).

欢迎从事肝病临床和基础研究工作的医务人员及科研工作者踊跃投稿,参加会议.

Ss-A/Ro 核蛋白 60 ku 亚单位在胃癌多药耐药中的作用

韩全利, 丁杰, 张龙方, 王新, 郭长存, 乔泰东, 张学庸, 樊代明

■背景资料

肿瘤细胞的多药耐药严重影响了肿瘤化疗的效果, 虽然导致肿瘤多药耐药的众多机制被阐明, 但仍不能完全解释肿瘤的多药耐药。本文对胃癌耐药相关分子Ro 60进行了功能研究。

韩全利, 张龙方, 空军总医院干部病房三区 北京市 100036
丁杰, 王新, 郭长存, 乔泰东, 张学庸, 樊代明, 第四军医大学
西京医院全军消化病研究所 陕西省西安市 710032
韩全利, 男, 1971-06-24生, 山西省文水县人, 汉族, 2003年第
四军医大学博士毕业, 主要从事胃癌多药耐药的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30371623

通讯作者: 丁杰, 710032, 陕西省西安市长乐西路15号, 第四军
医大学西京医院全军消化病研究所. dingjie@fmmu.edu.cn

电话: 029-83375230 传真: 029-82539041

收稿日期: 2005-11-16 接受日期: 2005-12-20

Function of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60-ku subunit in multidrug resistance of gastric cancer

Quan-Li Han, Jie Ding, Long-Fang Zhang, Xin Wang,
Chang-Cun Guo, Tai-Dong Qiao, Xue-Yong Zhang,
Dai-Ming Fan

Quan-Li Han, Long-Fang Zhang, Department of Geratology,
General Hospital of Air Force of Chinese PLA, Beijing
100036, China

Jie Ding, Xin Wang, Chang-Cun Guo, Tai-Dong Qiao,
Xue-Yong Zhang, Dai-Ming Fan, Department of Gastro-
enterology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical
University, Xian 710032, Shaanxi Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of
China, No. 30371623

Correspondence to: Dr. Jie Ding, Department of Gastro-
enterology, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical
University, Xian 710032, Shaanxi Province,
China. dingjie@fmmu.edu.cn

Received: 2005-11-16 Accepted: 2005-12-20

Abstract

AIM: To investigate the possible function of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60-ku subunit (Ro 60) in the multidrug resistance (MDR) of gastric cancer cell line.

METHODS: The Ro 60 encoding gene was cloned using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). DNA recombination technique was used to construct Ro 60 sense eukaryotic expression vector, and then the product was transfected into SGC7901 cells by Lipofectamine™2000. Drug susceptibility in the chemotherapy was analyzed by MTT assay, and IC₅₀ value of gastric cancer cells to chemotherapy drugs was calculated. The intracellular accumulation of

adriamycin in gastric cancer cells was measured using fluorescence-activated cell sorting.

RESULTS: The expression level of Ro 60 in SGC7901 was increased after transfection with sense genes. *In vitro* drug sensitivity assay showed that SGC7901 cells transfected with Ro 60 genes significantly decreased sensitivity to vincristine (IC₅₀: 2.28 ± 0.11 mg/L vs 0.45 ± 0.04, 0.65 ± 0.05 mg/L, *P* < 0.01), 5-fluorouracil (5-FU) (IC₅₀: 2.89 ± 0.14 mg/L vs 0.61 ± 0.21, 0.90 ± 0.11 mg/L, *P* < 0.01), mitomycin (IC₅₀: 1.92 ± 0.03 mg/L vs 0.54 ± 0.03, 0.75 ± 0.21 mg/L, *P* < 0.01), cisplatin (IC₅₀: 1.41 ± 0.06 mg/L vs 0.45 ± 0.03, 0.54 ± 0.03 mg/L, *P* < 0.01) and adriamycin (IC₅₀: 0.28 ± 0.03 mg/L vs 0.14 ± 0.01, 0.14 ± 0.01 mg/L, *P* < 0.01), when compared with SGC7901 and SGC7901-pcDNA3.1 cells. The intracellular accumulation of adriamycin in the cells transfected with Ro 60 gene was markedly decreased in comparison with that in SGC7901 and SGC7901-pcDNA3.1 cells (56.30 ± 2.49 mg/L vs 92.83 ± 3.63, 87.38 ± 2.94 mg/L, *P* < 0.01).

CONCLUSION: SGC7901 cells transfected with Ro 60 sense genes show some competence of MDR. Ro 60 may play a certain role in the MDR of gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Ss-A/Ro 60-ku subunit; Multidrug resistance; Gene transfection

Han QL, Ding J, Zhang LF, Wang X, Guo CC, Qiao TD, Zhang XY, Fan DM. Function of Ss-A/Ro ribonucleoprotein 60-ku subunit in multidrug resistance of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(3):256-260

摘要

目的: 对Ro 60在胃癌多药耐药中的功能进行研究。

方法: 克隆Ro 60编码基因, 构建Ro 60编码基因的正义真核表达载体, 将其转导入SGC7901细胞, 应用半定量RT-PCR技术, 对基因转染细胞进行鉴定, 通过MTT法进行体外药物敏感性分析, 借助流式细胞仪检测细胞内蓄积的阿霉素。

结果: 成功构建了Ro 60正义真核表达载体, 应用脂质体介导法将其转入SGC7901, Ro 60真核表达载体转染SGC7901细胞后其表达量明显增加, 体外药物敏感性试验提示其对长春新碱、5-氟尿嘧啶、丝裂霉素、顺铂、阿霉素的敏感性减低, SGC7901细胞的 IC_{50} 值(mg/L)与未转染细胞和转染空白载体细胞相比, 显著增加(2.28 ± 0.11 vs 0.45 ± 0.04 , 0.65 ± 0.05 ; 2.89 ± 0.14 vs 0.61 ± 0.21 , 0.90 ± 0.11 ; 1.92 ± 0.03 vs 0.54 ± 0.03 , 0.75 ± 0.21 ; 1.41 ± 0.06 vs 0.45 ± 0.03 , 0.54 ± 0.03 ; 0.28 ± 0.03 vs 0.14 ± 0.01 , 0.14 ± 0.01 ; 均 $P < 0.01$), 细胞内阿霉素蓄积显著减少(56.30 ± 2.49 mg/L vs 92.83 ± 3.63 , 87.38 ± 2.94 mg/L, $P < 0.01$).

结论: Ro 60真核表达载体转染SGC7901细胞后显示了一些多药耐药的特性, 提示Ro 60在胃癌多药耐药中发挥了一定的作用.

关键词: 胃癌; Ss-A/Ro 60 ku亚单位; 多药耐药; 基因转染

韩全利, 丁杰, 张龙方, 王新, 郭长存, 乔泰东, 张学庸, 樊代明. Ss-A/Ro核蛋白60 ku亚单位在胃癌多药耐药中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(3):256-260

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/256.asp>

0 引言

肿瘤细胞的多药耐药^[1-4]严重影响了肿瘤化疗的效果, 虽然导致肿瘤多药耐药的众多机制被阐明, 但仍不能完全解释肿瘤的多药耐药. 鉴于此, 我们应用改良DDRT-PCR法对胃癌耐药细胞中的耐药相关分子进行了研究, 从耐药胃癌细胞中克隆了与耐药相关的多个已知分子和未知分子^[5]. 其中Ss-A/Ro核蛋白60 ku亚单位(Ro 60)是在耐长春新碱的胃癌细胞系SGC7901/VCR与SGC7901的差示比较中发现的在SGC7901/VCR中高表达的基因, 并通过反向Northern杂交证实^[6]. 因此, 阐明Ro 60编码基因在胃癌多药耐药中的功能, 将有助于我们对胃癌多药耐药的产生及调节机制的理解.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞SGC7901及其耐药亚系SGC7901/VCR由第四军医大学消化病研究所保存; RPMI 1640及胰蛋白酶购自Hyclone公司; 胎牛血清购自浙江金华公司; T4 DNA连接酶、IPTG、X-gal及dNTP购自上海生工公司; DNA胶回收试剂盒购自华舜公司; Taq酶及各种限制性

DNA内切酶购自Takara公司; 质粒DNA提取试剂盒购自Omega公司; LipofectamineTM2000购自Gibco公司.

1.2 方法

1.2.1 Ss-A/Ro核蛋白60 ku亚单位编码基因的克隆 利用RNA提取试剂盒提取SGC7901/VCR的总RNA, 逆转录法制备cDNA, 以RT-PCR法克隆Ro 60编码基因, 上游引物为: 5' ATA ACG AGG GAG AGG AGA AAG G 3'; 下游引物为: 5' GTG TCC ACC TGC ACT CCA TGT C 3', 按Taq酶说明书中反应体系行PCR反应, PCR产物行10 g/L琼脂糖凝胶电泳分离, 并以DNA胶回收试剂盒回收纯化该片段.

1.2.2 Ro 60正义表达载体的构建及转染 利用DNA重组技术将Ro 60克隆至真核表达载体pcDNA3.1/V5-His, Ro 60正向连接在pcDNA3.1/V5-His载体CMV启动子的下游. 按照脂质体LipofectamineTM2000说明书的操作步骤, 将Ro 60正义表达载体和pcDNA3.1/V5-His分别转染入对数生长中期的胃癌细胞SGC7901, 并用300 mg/L G 418对转染细胞进行筛选.

1.2.3 转染细胞Ro 60基因表达的检测 应用半定量RT-PCR技术, 检测Ro 60在正反义基因转染细胞及对照细胞中的表达, 以GAPDH为内参照.

1.2.4 体外药物敏感性试验 收获对数生长中期的基因转染细胞及其对照细胞, 按照每孔 10^3 接种入96孔板, 置于细胞培养箱中按常规培养; 将阿霉素、顺铂、5-氟尿嘧啶、丝裂霉素、长春新碱按不同的浓度加入细胞中, 每个浓度设4个复孔, 继续培养72 h后, 按常规方法加入MTT及DMSO, 于490 nm处测A值, 计算细胞的存活率: 细胞存活率 = (实验组A值-空白对照组A值)/(阴性对照组A值-空白对照A值) $\times 100\%$; 同时计算细胞对每种药物的 IC_{50} 值.

1.2.5 细胞内阿霉素蓄积的检测 收获对数生长中期的细胞, 按照每孔8 000个细胞接种入6孔板中; 培养过夜后, 每孔加入阿霉素至终浓度为5 mg/L, 继续培养1 h, 收获细胞, 以PBS洗涤细胞后, 上流式细胞仪检测细胞内的阿霉素荧光强度.

统计学处理 应用SPSS 11.0统计软件包, 对各组均数进行t检验.

2 结果

2.1 Ro 60编码基因的克隆及Ro 60正义表达载体的构建 通过对来自SGC7901/VCR细胞的cDNA

■研发前沿

肿瘤细胞的多药耐药研究是目前肿瘤研究的一个热点, 目前多药耐药的研究热点是发现新的耐药机制, 阐明耐药相关分子的功能.

■创新盘点

虽然Ro 60是一个已知的分子, 但其与肿瘤耐药的关系尚未见有文献报道, 故可以认为多药耐药是Ro 60的一个新的功能.

■应用要点

本文章旨在阐明Ro 60编码基因在胃癌多药耐药中的功能,这将有助于我们对胃癌多药耐药的产生及调节机制的理解。

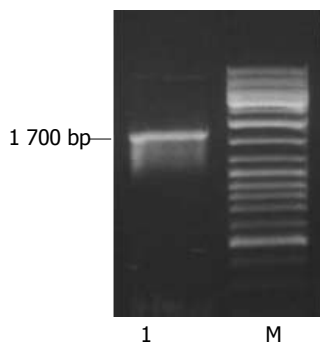


图 1 PCR产物的10 g/L琼脂糖凝胶电泳结果. 1: PCR产物; M: 100 bp DNA标记物.

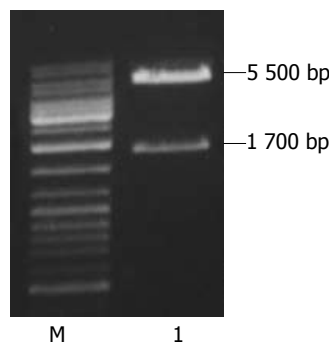


图 2 Ro 60正义表达载体的酶切鉴定结果. M: 100 bp DNA标记物; 1: pcDNA3.1-Ro 60经Not I、Xba I双酶切.

表 1 胃癌细胞对化疗药物的IC₅₀值 (mean ± SD, mg/L)

	VCR	5-FU	MMC	CCDP	ADR
SGC7901	0.45 ± 0.04	0.61 ± 0.21	0.54 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.14 ± 0.01
SGC7901-pcDNA3.1	0.65 ± 0.05	0.90 ± 0.11	0.75 ± 0.21	0.54 ± 0.03	0.14 ± 0.01
SGC7901-Ro	2.28 ± 0.11 ^b	2.89 ± 0.14 ^b	1.92 ± 0.03 ^b	1.41 ± 0.06 ^b	0.28 ± 0.03 ^b

^bP<0.01 vs SGC7901, SGC7901-pcDNA3.1细胞.

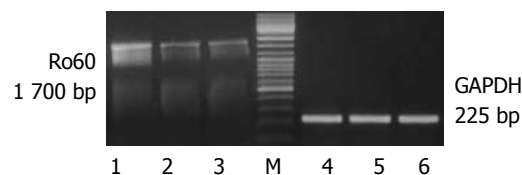


图 3 转染细胞Ro 60基因表达的半定量RT-PCR检测结果. 1: SGC7901-Ro(Ro 60); 2: SGC7901-pcDNA3.1(Ro 60); 3: SGC7901(Ro 60); M: 100 bp DNA标记物; 4: SGC7901-Ro(GAPDH); 5: SGC7901-pcDNA3.1(GAPDH); 6: SGC7901(GAPDH).

表 2 正义转染细胞内蓄积的阿霉素的平均荧光强度 (mean ± SD, mg/L)

	蓄积
SGC7901	92.83 ± 3.63
SGC7901-pcDNA3.1	87.38 ± 2.94
SGC7901-Ro	56.30 ± 2.49 ^b

^bP<0.01 vs SGC7901, SGC7901-pc细胞.

进行PCR扩增(图1), PCR产物经与pUCm-T载体连接、转化感受态细菌, 获得了重组有阳性cDNA片段的重组T载体; 重组T载体DNA序列测定, 发现了与Ss-A/Ro核蛋白60 ku亚单位编码基因的cDNA序列完全一致, 利用DNA重组技术将Ro 60从T载体亚克隆至真核表达载体pcDNA3.1/V5-His, 并通过限制酶切技术对构建的正义表达载体进行了鉴定(图2).

2.2 Ro 60正义表达载体的转染 将构建成功的Ro

60的正义表达载体和pcDNA3.1/V5-His通过脂质体介导法分别转染入对数生长中期的胃癌细胞SGC7901, 经过3 mo的G 418筛选, 获得了稳定转染的抗性细胞, 分别将其命名为SGC7901-Ro、SGC7901-pcDNA3.1.

2.3 转染细胞Ro 60基因表达的检测 应用半定量RT-PCR技术, 检测了Ro 60在正义基因转染细胞及对照细胞中的表达. 结果表明, 与SGC7901细胞和转染有空载体的SGC7901细胞相比, 转染有正义基因的SGC7901细胞中的Ro 60的表达量明显升高(图3).

2.4 体外药物敏感性试验 上调Ro 60在药敏细胞SGC7901的表达, 可降低药敏细胞对VCR、MMC、5-FU、CDDP和ADR的敏感性, 与SGC7901和SGC7901-pcDNA3.1细胞相比, P<0.01(表1).

2.5 细胞内阿霉素蓄积的检测 流式细胞仪检测结果显示, 在正义转染细胞中, 与SGC7901细胞和SGC7901-pcDNA3.1细胞相比, SGC7901-Ro细胞内蓄积的阿霉素明显减低, 与SGC7901和SGC7901-pcDNA3.1细胞相比(P<0.01, 表2).

3 讨论

胃癌细胞的多药耐药性是胃癌化疗失败的主要原因, 我们以前的研究发现, 在胃癌细胞的多药耐药中, 除了有P-gp、MRP、GST等经典的耐药分子参与外^[7-11], 凋亡基因的改变、蛋白激酶

C以及某些离子通道也参与了胃癌细胞多药耐药性的形成^[12-17]。为了深入研究胃癌细胞MDR的发生机制, 我们应用改良差示PCR技术比较了胃癌长春新碱耐药细胞SGC7901/VCR与药敏细胞SGC7901基因表达的差异, 结果表明, 与药敏细胞SGC7901相比, Ro 60在耐药细胞SGC7901/VCR中的表达明显上调, 此结果得到了反向Northern blot的证实。

Ro 60是从由人T淋巴瘤母细胞白血病(MOLT-4)细胞mRNA构建的cDNA文库中首次克隆得到的^[18], 人Ro 60基因定位于第一号染色体1q31区, 全长cDNA为1 890 bp, 编码525个氨基酸残基, 分子量为60 ku^[19]。Ro 60是多种自身免疫性疾病^[20]的自身抗原。目前Ro 60的功能一直不是很清楚^[21,22], 最近有研究表明, Ro 60在细菌以及人体内能够抵抗紫外线照射, 使细胞在由紫外线照射引起的细胞杀伤中得以幸免^[23,24]。与紫外线一样, 化疗药物对于肿瘤细胞来说也是一种导致细胞杀伤的因素, 既然我们已经证实Ro 60在胃癌耐药细胞中高表达, 那么Ro 60极有可能起到保护肿瘤细胞免受因化疗药物而导致的细胞杀伤的作用, 或者说Ro 60可能赋予了肿瘤细胞某些MDR的特性。

通过基因克隆、基因重组和转染, 我们获得了Ro 60正义基因转染的细胞, 应用半定量RT-PCR技术, 检测了Ro 60在正义基因转染细胞及对照细胞中的表达, 结果表明, SGC7901细胞转染Ro 60真核表达载体后其Ro 60表达增加, 表明我们成功构建了Ro 60表达上调的SGC7901细胞。体外药敏实验结果表明, 增强Ro 60在药敏细胞SGC7901的表达后, 细胞对VCR、5-FU、MMC、CCDP及ADR的敏感性明显降低, 表明Ro 60在SGC7901细胞表达上调后SGC7901对多种化疗药物产生了明显的耐药性。流式细胞仪检测结果表明, Ro 60正义基因转染的细胞后, 其细胞内蓄积的ADR明显减少, 提示细胞外排ADR的能力增强。Ro 60正义基因转染的细胞外排ADR的能力增强, 由此提示, Ro 60基因影响胃癌细胞耐药表型与药物在细胞内的蓄积有关。

因药物摄入减少和/或药物外排增多导致的细胞内药物蓄积减少, 是肿瘤细胞耐药产生的机制之一^[25-27], 经典耐药分子P-gp的功能就是将细胞内药物排至胞外, 造成细胞内药物蓄积减少, 那么在药物蓄积方面, Ro 60和P-gp之间的关系又如何呢? 我们知道, P-gp的编码基因是mdr1, mdr1基因的转录激活是P-gp高表达的重要原因^[28]。

在mdr1基因的转录激活方面, 锌指结构蛋白是一类较为明确的转录因子^[29]。对Ro 60蛋白的结构分析表明, 在Ro 60蛋白的第305到第325位氨基酸有一20个氨基酸的锌指结构^[30], 而锌指结构可以作为P-gp编码基因mdr1的转录因子, 因此, 我们推断Ro 60可能通过促进mdr1基因的转录激活, 导致P-gp表达增高, 而参与了胃癌细胞MDR的形成。

本研究表明, Ro 60的表达导致SGC7901细胞对化疗药物产生了部分耐药性, 提示Ro 60基因可能参与了胃癌细胞MDR的形成, 其具体参与MDR的机制尚需进一步研究。

4 参考文献

- 1 Roepe PD. The role of the MDR protein in altered drug translocation across tumor cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1241: 385-405
- 2 Deng L, Tatebe S, Lin-Lee YC, Ishikawa T, Kuo MT. MDR and MRP gene families as cellular determinant factors for resistance to clinical anticancer agents. *Cancer Treat Res* 2002; 112: 49-66
- 3 Luqmani YA. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. *Med Princ Pract* 2005; 14: 35-48
- 4 Sawicka M, Kalinowska M, Skierski J, Lewandowski W. A review of selected anti-tumour therapeutic agents and reasons for multidrug resistance occurrence. *J Pharm Pharmacol* 2004; 56: 1067-1081
- 5 Zhao Y, You H, Liu F, An H, Shi Y, Yu Q, Fan D. Differentially expressed gene profiles between multidrug resistant gastric adenocarcinoma cells and their parental cells. *Cancer Lett* 2002; 185: 211-218
- 6 Wang X, Lan M, Shi YQ, Lu J, Zhong YX, Wu HP, Zai HH, Ding J, Wu KC, Pan BR, Jin JP, Fan DM. Differential display of vincristine-resistance-related genes in gastric cancer SGC7901 cell. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 54-59
- 7 Ferte J. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur J Biochem* 2000; 267: 277-294
- 8 Boumendjel A, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Perrotton T, Di Pietro A. Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents. *Med Res Rev* 2005; 25: 453-472
- 9 Mealey KL. Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J Vet Pharmacol Ther* 2004; 27: 257-264
- 10 Mizutani T, Hattori A. New horizon of MDR1 (P-glycoprotein) study. *Drug Metab Rev* 2005; 37: 489-510
- 11 Asakura T, Ohkawa K. Chemotherapeutic agents that induce mitochondrial apoptosis. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 577-590
- 12 Xiao B, Shi YQ, Zhao YQ, You H, Wang ZY, Liu XL, Yin F, Qiao TD, Fan DM. Transduction of Fas gene or Bcl-2 antisense RNA sensitizes cultured drug resistant gastric cancer cells to chemotherapeutic drugs. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 421-425
- 13 韩英, 时永全, 曹云新, 樊代明. 蛋白激酶C的激活剂及抑制剂对胃癌耐药细胞系P-糖蛋白功能及表达的影响

■名词解释

多药耐药性(multidrug resistance, MDR)是指肿瘤细胞对某一化疗药物产生耐药后, 对其他化学结构和/或作用机制不同的化疗药物也产生交叉耐药性。

■同行评价

本文在作者单位系列研究基础上,进一步探讨了Ro 60在胃癌多药耐药中的作用,结果有一定的新意.

- 14 响. 中华消化杂志 2001; 21: 349-352
- 15 时永全, 肖冰, 苗继延, 赵燕秋, 尤涵, 樊代明. 构建fas基因真核表达载体逆转胃癌耐药细胞MDR表型. 世界华人消化杂志 1999; 7: 309-312
- 16 Zhao Y, Xiao B, Chen B, Qiao T, Fan D. Upregulation of drug sensitivity of multidrug-resistant SGC7901/VCR human gastric cancer cells by bax gene transduction. *Chin Med J* 2000; 113: 977-980
- 17 韩英, 时永全, 李玲, 樊代明. 蛋白激酶C同工酶PKC- α 及PKC- β I在胃癌及其耐药细胞中的表达和功能. 中华肿瘤杂志 2001; 23: 103-106
- 18 韩英, 时永全, 张宏博, 张森利, 王春梅, 樊代明. 肿胀激活状态下蛋白激酶C同工酶亚型在胃癌耐药细胞系的亚细胞分布变化及其意义. 中华医学杂志 2001; 81: 328-331
- 19 Ben-Chetrit E, Gandy BJ, Tan EM, Sullivan KF. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the 60-kD component of the human SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen. *J Clin Invest* 1989; 83: 1284-1292
- 20 Chan EK, Tan EM, Ward DC, Matera AG. Human 60-kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein autoantigen gene (SSA2) localized to 1q31 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 1994; 23: 298-300
- 21 von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-358
- 22 O'Brien CA, Wolin SL. A possible role for the 60-kD Ro autoantigen in a discard pathway for defective 5S rRNA precursors. *Genes Dev* 1994; 8: 2891-2903
- 23 Shi H, O'Brien CA, Van Horn DJ, Wolin SL. A misfolded form of 5S rRNA is complexed with the Ro and La autoantigens. *RNA* 1996; 2: 769-784
- 24 Chen X, Quinn AM, Wolin SL. Ro ribonucleoproteins contribute to the resistance of *Deinococcus radiodurans* to ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 2000; 14: 777-782
- 25 Chen X, Wolin SL. The Ro 60 kDa autoantigen: insights into cellular function and role in autoimmunity. *J Mol Med* 2004; 82: 232-239
- 26 Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* 1976; 455: 152-162
- 27 Gros P, Croop J, Housman D. Mammalian multidrug resistance gene: complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 1986; 47: 371-380
- 28 Dano K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 1973; 323: 466-483
- 29 Labialle S, Gayet L, Marthinet E, Rigal D, Baggetto LG. Transcriptional regulators of the human multidrug resistance 1 gene: recent views. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 943-948
- 30 McCoy C, McGee SB, Cornwell MM. The Wilms' tumor suppressor, WT1, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of the multidrug resistance-1 promoter. *Cell Growth Differ* 1999; 10: 377-386
- 31 Wahren-Herlenius M, Muller S, Isenberg D. Analysis of B-cell epitopes of the Ro/SS-A autoantigen. *Immunol Today* 1999; 20: 234-240

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

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

●消息●

欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

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

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

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期8, 18, 28日,页码160,月价72.00,年价864元.欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅.联系地址:100023 北京市2345信箱,世界胃肠病学杂志社.联系电话:010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

CD4⁺CD25⁺调节性T细胞回输对大鼠肝移植急性排斥反应的影响

浦立勇, 李相成, 王学浩, 张峰, 姚爱华, 俞悦, 吕凌, 李国强

浦立勇, 李相成, 王学浩, 张峰, 姚爱华, 俞悦, 吕凌, 李国强, 南京医科大学第一附属医院肝脏移植中心 江苏省南京市 210029

浦立勇, 男, 1973-03-22生, 江苏省盐城市人, 汉族, 博士研究生, 主治医师, 主要从事肝外科与肝脏移植免疫学研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271236

通讯作者: 王学浩, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院肝脏移植中心。 wangxh@njmu.edu.cn

电话: 025-83718836-6476 传真: 025-83724440

收稿日期: 2005-12-08 接受日期: 2005-12-31

Effect of infusing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell on the rejection model of DA-Lewis rat liver transplantation

Li-Yong Pu, Xiang-Cheng Li, Xue-Hao Wang, Feng Zhang, Ai-Hua Yao, Yue Yu, Ling Lv, Guo-Qiang Li

Li-Yong Pu, Xiang-Cheng Li, Xue-Hao Wang, Feng Zhang, Ai-Hua Yao, Yue Yu, Ling Lv, Guo-Qiang Li, Center of Liver Transplantation, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30271236

correspondence to: Dr. Xue-Hao Wang, Center of Liver Transplantation, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. wangxh@njmu.edu.cn

Received: 2005-12-08 Accepted: 2005-12-31

Abstract

AIM: To investigate the effect of infusing *ex vivo* isolated CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells on the rejection model of DA-Lewis rat liver transplantation.

METHODS: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells were isolated from Lewis (RT1^l) rat splenocytes and peripheral lymph nodes by magnetic cell sorting system (negative selection and positive selection), and co-cultured with mitomycin-C (MMC) treated dark agouti (RT1^a, DA) rat splenocytes for 3 d. The suppressive efficiency of fresh or *ex vivo* stimulated CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells on the proliferation of CD4⁺CD25⁺ T cells was evaluated by cell proliferation assay. Four groups (12 rats for each) of orthotopic liver transplants (OLT, DA into Lewis) were established by modified

Kamada two-cuff technique. Group A: without any treatment after transplantation. Group B: lavaged with FK506 [0.2 mg/(kg·d)] from 0 to 6 d after transplantation. Group C and group D: fresh or *ex vivo* stimulated CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells were injected intravenously into the penile vein of each Lewis rat, respectively. Six recipients were sacrificed 7 d after transplantation in each group, and the blood and graft samples were collected for serum biochemical (aspartate transaminase and bilirubin, AST and BIL) and histological evaluation. The other six recipients were left in each group to observe the survival time.

RESULTS: The purity of isolated CD4⁺CD25⁺ T cells was 90.2%±1.8% (86%-93%, *n* = 10), and both the fresh and *ex vivo* stimulated CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells significantly suppressed the proliferation of CD4⁺CD25⁺ T cells in mixed lymphocyte culture (7 681.7 ± 1 004.9, 6 573.3 ± 1 722.7 cpm *vs* 24 918.7 ± 2 276.3 cpm; *P* = 0.000, *P* = 0.000). The serum concentrations of AST and BIL 7 d after transplantation in group C and D were respectively lower than that in group A (AST: 8.1 ± 2.0, 8.4 ± 1.4 μkat/L *vs* 17.9 ± 3.8 μkat/L; *P* = 0.000, *P* = 0.000; BIL: 45.8 ± 9.0, 44.7 ± 12.0 μmol/L *vs* 98.4 ± 21.2 μmol/L; *P* = 0.000, *P* = 0.000). The Banff scores of grafts in group C and D were lower than that in group A (*P* < 0.05). The rats in group C and D survived longer than those in group A did (21.7 ± 1.7, 30.3 ± 1.7 d *vs* 12.8 ± 0.5 d; *P* = 0.000 1, *P* = 0.000 4). Furthermore, the rats in group D survived longer than those in group B did (*P* = 0.001 7).

CONCLUSION: Both the fresh isolated and *ex vivo* stimulated CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell have the potency to alleviate the acute rejection and prolong the survival time in the rejection model of rat liver transplantation, and the *ex vivo* stimulated CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are superior to fresh isolated CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.

Key Words: Magic cell sorting; CD4⁺CD25⁺ regula-

■背景资料

目前, 运用调节性T细胞诱导免疫耐受, 在骨髓移植, 胰岛移植和皮肤移植的研究中已有较多的文献报道, 在实质性器官移植(如心脏、肾脏)中亦有报道, 然而在肝脏移植中报道较少。已有研究发现, 回输自然耐受模型(Lewis→DA)中长期存活的大鼠脾细胞, 可使排斥模型(放射线处理后的Lewis→DA)中的受体长期存活, 从而提示调节性T细胞可能在诱导肝脏免疫耐受中起一定的作用。

■创新盘点

本研究首次报道在肝脏自然排斥模型(DA→Lewis)中,回输经供体抗原激活的CD4⁺CD25⁺调节性T细胞对急性排斥反应的影响,研究的对象更具体,采用的模型更加接近肝移植排斥反应的真实情况。

tory T cells; Liver transplantation; Acute rejection; Rats

Pu LY, Li XC, Wang XH, Zhang F, Yao AH, Yu Y, Lv L, Li GQ. Effect of infusing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell on the rejection model of DA-Lewis rat liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(3):261-266

摘要

目的:探讨回输CD4⁺CD25⁺调节性T细胞对大鼠肝移植急性排斥反应的影响。

方法:免疫磁珠阴性加阳性分选Lewis大鼠脾脏、外周淋巴结内的CD4⁺CD25⁺调节性T细胞,分离后的细胞与丝裂霉素C处理过的DA大鼠脾细胞混合培养3 d。淋巴细胞增殖实验评价新鲜分离和体外培养后的CD4⁺CD25⁺调节性T细胞对CD4⁺CD25⁺T细胞增殖的抑制作用。以DA大鼠为供体, Lewis大鼠为受体,建立4组原位肝移植模型,每组12例,共48例。A组术后不进行任何干预; B组术后0-6 d FK506 0.2 mg/(kg·d)灌胃; C组、D组术前1 d经阴茎背静脉分别向受体回输新鲜分离、体外培养后的1×10⁶的CD4⁺CD25⁺T细胞。术后7 d每组随机处死6只,收集血标本作血清天冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)、总胆红素(bilirubin, BIL)检测,取肝脏标本作病理学检查,每组各留6只观察生存期。

结果:分选后的CD4⁺CD25⁺T细胞纯度为90.2%±1.8%(86%-93%, $n=10$),淋巴细胞混合培养实验中新鲜分离和体外培养后的CD4⁺CD25⁺T细胞均可抑制CD4⁺CD25⁺T细胞的增殖($7\ 681.7\pm1\ 004.9$, $6\ 573.3\pm1\ 722.7$ cpm vs $24\ 918.7\pm2\ 276.3$ cpm; $P=0.000$, $P=0.000$)。术后7 d,新鲜细胞回输组以及体外培养细胞回输组AST低于对照组(8.1 ± 2.0 μ kat/L vs 17.9 ± 3.8 μ kat/L, $P=0.000$; 8.4 ± 1.4 μ kat/L vs 17.9 ± 3.8 μ kat/L, $P=0.000$), BIL亦低于对照组(45.8 ± 9.0 μ mol/L vs 98.4 ± 21.2 μ mol/L, $P=0.000$; 44.7 ± 12.0 μ mol/L vs 98.4 ± 21.2 μ mol/L, $P=0.000$)。四组的Banff评分比较,两组细胞回输组与对照组比较有统计学差异($P<0.05$)。两组细胞回输组生存时间均大于对照组(21.7 ± 1.7 d vs 12.8 ± 0.5 d, $P=0.0001$; 30.3 ± 1.7 vs 12.8 ± 0.5 d, $P=0.0004$),体外培养细胞回输组生存时间大于新鲜细胞回输组(30.3 ± 1.7 d vs 21.7 ± 1.7 d, $P=0.0017$)。

结论:回输新鲜分离/经供体抗原体外激活的受体CD4⁺CD25⁺调节性T细胞,可以明显减轻大鼠肝移植的急性排斥反应,延长生存期;

其中经供体抗原体外激活的CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的作用更持久。

关键词:细胞磁分离技术; CD4⁺CD25⁺调节性T细胞; 大鼠; 肝移植; 急性排斥反应

浦立勇, 李相成, 王学浩, 张峰, 姚爱华, 俞悦, 吕凌, 李国强. CD4⁺CD25⁺调节性T细胞回输对大鼠肝移植急性排斥反应的影响. *世界华人消化杂志* 2006;14(3):261-266

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/261.asp>

0 引言

肝脏移植是治疗肝脏终末期疾病的唯一有效手段,但移植后的免疫排斥反应仍是影响移植后疗效的主要障碍,因此实现对移植肝的免疫耐受是肝脏移植的最终目标。近10 a来,CD4⁺CD25⁺调节性T细胞(CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell)已被证明在维持外周免疫耐受中起着重要的作用^[1-3],随着对其体内、体外功能的研究逐渐深入,它所具备的对效应性T细胞的抑制功能,使得人们设想运用该细胞来抑制器官移植后的排斥反应、诱导器官移植后的免疫耐受^[4-8]。2002年, Cohen *et al*^[5]和 Taylor *et al*^[6]报道运用CD4⁺CD25⁺调节性T细胞回输治疗骨髓移植后的移植物排宿主反应,此后运用该类细胞干预器官移植后的排斥反应的报道逐渐增加,尤其在骨髓移植、胰岛细胞移植、皮肤移植等领域^[9,10]。近年来在大鼠肝移植耐受模型研究中发现,调节性T细胞在维持肝脏移植耐受中起重要的作用,且该类细胞维持耐受的功能需要持续的移植抗原的刺激^[11,12]。我们报道回输经体外供体抗原激活的CD4⁺CD25⁺调节性T细胞对大鼠肝移植急性排斥反应的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 12周龄雄性近交系DA大鼠(RT1^a, 体重230-250 g)为供体,购于哈尔滨医科大学动物中心。8周龄近交系Lewis大鼠(RT1^b, 体重200-220 g)为受体,购于北京维通利华实验动物有限公司。饲养于江苏省实验动物中心清洁级实验室。受体术前12 h禁食,不禁水,术后不禁食水。主要试剂有单克隆抗体(均购自BD Pharmingen)。鸡尾酒(cock tail)抗体^[13]包括: OX-7(CD90.1, IgG₁), OX-8(CD8a, IgG₁), OX-42(CD11b/c, IgG_{2a}), OX-33(CD45RA, IgG₁), 10/78(NKR-P1A, IgG₁)。荧光抗体: 抗CD4-FITC (IgG_{2a}), 抗CD25-PE(IgG₁)。抗CD3 单抗(G4.18/

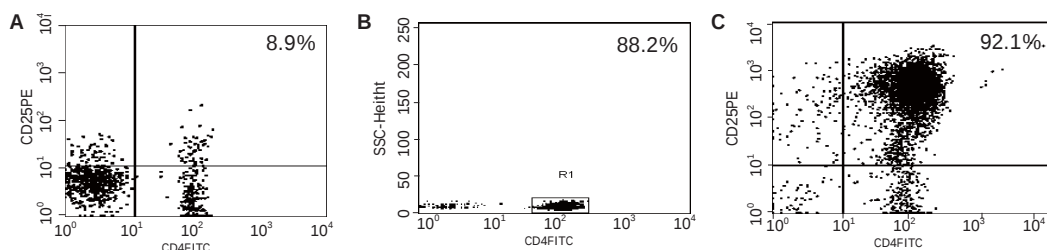


图1 细胞免疫磁珠分选前后的流式细胞仪检测结果. A: 分选前CD4⁺CD25⁺ T 细胞的比例; B: 第一步阴性分选后CD4⁺T细胞的纯度; C: 第二步阳性分选后CD4⁺CD25⁺ T 细胞的纯度.

G₁, IgG₁). 细胞磁分离系统(购自Miltenyi Biotec): Goat anti-mouse IgG(H+L) Microbead, anti-PE microbead, MidiMACS 分选器, LD、MS 分选柱. 细胞培养基为完全RPMI-1640, 含100 mL/L 胎牛血清(FBS, Hyclone), 50 mmol/L 2-巯基乙醇, 1.5 mmol/L L-谷氨酰胺, 100 kU/L青霉素, 100 g/L链霉素(购自Sigma), 重组大鼠IL-2 200 kU/L (Recombinant Rat IL-2, rR IL-2, 购自Cytolab). 丝裂霉素C (MMC, 购自Sigma).

1.2 方法 无菌条件下分离大鼠脾脏、腋下及腹股沟淋巴结, 加入缓冲液PBS溶液(pH7.2, 含5 mL/L FBS和2 mmol/L EDTA), 研磨制成细胞悬液, Ficoll-Hypaque(1.083)密度梯度离心得到单个核细胞. 单个核细胞悬液首先用"鸡尾酒"抗体标记后加入Goat anti mouse IgG磁珠, 经LD分离柱收获阴性选择后的CD4⁺ T细胞, 取10⁴用抗CD4-FITC标记后, 流式细胞仪检测分离纯度. 获得的CD4⁺T淋巴细胞, 抗CD25-PE抗体标记后加入抗PE磁珠, 经MS分离柱分离, 分别收获CD4⁺CD25⁺T细胞和CD4⁺CD25⁻ T细胞. 取10⁴用抗 CD4-FITC标记, 流式细胞仪中检测双阳性细胞的纯度. 以2 mL/L台盼蓝对获得的细胞进行染色, 观察细胞存活率. 将收集到的CD25⁺ T细胞调整到5.0×10⁹/L的浓度后, 每孔100 μL置入圆底96孔板中, 每孔加入5.0×10⁹/L MMC处理的DA鼠的脾细胞100 μL, 共培养3 d. 培养结束后, 以PBS溶液洗3遍, 每1×10⁶重悬于1 mL的PBS中, 于移植前1 d经阴茎静脉回输受体体内. 采用混合淋巴细胞培养实验, 对新鲜分离和体外培养后的细胞体外抑制CD4⁺CD25⁻ T细胞(效应性T细胞)增殖的能力进行鉴定. 将2×10⁴ CD4⁺CD25⁻ T细胞加入圆底96孔培养板中, 加入可溶性抗CD3单抗(5 mg/L)和1.0×10⁵经MMC处理的脾细胞, 分别加入2×10⁴的新鲜分离或体外培养的CD4⁺CD25⁺T细胞, 每份标本设3复孔, 结果取其平均值. 各组的阴性对照组同样设3个复孔. 各组加样后置于含50 mL/L CO₂ 的37℃

孵箱中培养3 d, 每孔加入1μCi ³H-TdR, 继续培养18 h后使用玻璃纤维滤纸收集细胞,干燥后用液闪仪(Beckman LS 600)测定cpm值. 采用改良Kamada双袖套法建立大鼠原位肝移植模型^[14,15]. 术中和术后3 d 内死亡按技术原因处理, 不做统计. 供受体随机分为四组: A组(对照组, *n* = 12)术后不用免疫抑制剂, B组(FK506处理组, 普乐可复, Fujisawa公司, *n* = 12)术后0-6 d用FK506 0.2 mg/(kg·d)灌胃, C组(新鲜分离细胞回输组, *n* = 12)和D组(体外培养后细胞回输组, *n* = 12)术前1 d经阴茎静脉回输1×10⁶ CD4⁺CD25⁺T细胞. 术后7 d每组随机处死6只, 收集血标本作血清AST、BIL浓度检测, 取新鲜肝组织一份以40 g/L中性甲醛固定作病理学检查, 评估排斥情况. 病理学诊断标准参照人肝移植排斥反应Banff标准^[16-18]. 每组各留6只观察生存期.

统计学处理 数据用统计软件STATA 7.0 软件进行统计学处理. 细胞增殖实验中的cpm值, 血清ALT值、BIL值的比较用秩变换检验, Scheffe法分析组间差异; 各组病理学急性排斥反应Banff评分的比较采用秩和检验, 采用Nemenyi法进行两两比较; 生存分析用乘积极限法(Kaplan-Meier 法)作生存曲线, 用Log-rank法进行显著性检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 CD4⁺CD25⁺T细胞的体外分离纯度及体外功能评估 Lewis大鼠脾脏及外周淋巴结中的单个核细胞, 经细胞磁分离系统(magic cell sorting system, MACS)阴性加阳性两次分选后, 获得的CD4⁺CD25⁺T细胞纯度为90.2%±1.8% (86%-93%, *n* = 10), 图1为其中一次流式细胞仪检测结果. 细胞增殖实验中, 新鲜分离和体外培养后的CD4⁺CD25⁺T细胞均可明显抑制CD4⁺CD25⁻T细胞的增殖(24 918.7±2 276.3 cpm vs 7 681.7±1 004.9 cpm, *P*=0.000<0.01; 24 918.7±22 76.3 cpm vs 6 573.3±1 722.7

■应用要点

本研究的结果和经放射线处理的排斥模型中的结果相比, 仍有较大的差距, 说明在运用调节性T细胞诱导肝移植免疫耐受的研究中, 还有许多问题需要解决, 仍需要更广泛更深入的探索.

■ 相关报道

- 1 Asakura H, Takayashiki T, Ku G, Flye MW. The persistence of regulatory cells developing after rat spontaneous liver acceptance. *Surgery* 2005; 138: 329-334
- 2 Asakura H, Ku G, Kataoka M, Flye MW. Regulatory cells develop after the spontaneous acceptance of rat liver allografts. *Surgery* 2004; 136: 532-536

表1 术后血清生化检测

组别	n	AST ($\mu\text{kat/L}$)		BIL ($\mu\text{mol/L}$)	
		means $\pm$ SD	95%可信区间 (%)	means $\pm$ SD	95%可信区间 (%)
对照组	6	17.9 $\pm$ 3.8	13.9–21.9	98.4 $\pm$ 21.2	75.9–120.9
FK506组	6	7.1 $\pm$ 1.1	5.9–8.2	6.8 $\pm$ 0.8	6.0–7.6
新鲜细胞回输组 ^a	6	8.1 $\pm$ 2.0 ^a	5.9–10.2	45.8 $\pm$ 9.0 ^a	36.3–55.2
培养细胞回输组 ^{ab}	6	8.4 $\pm$ 1.4 ^{ab}	6.9–9.8	44.7 $\pm$ 12.0 ^{ab}	32.1–57.3

^a $P < 0.01$ vs 对照组; ^b $P < 0.01$ vs 新鲜细胞回输组。

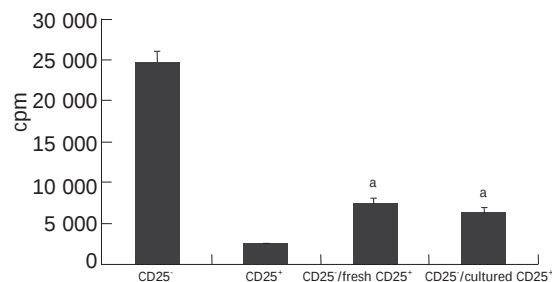
图2 混合淋巴细胞培养细胞增殖实验。^a $P < 0.05$ vs CD25⁻。

表2 各组移植后7 d 的移植物病理切片的排斥反应Banff评分的比较

组别	n	I 级	II 级	III 级
对照组	6	0	1	5
Fk506组	6	6	0	0
新鲜细胞分离组 ^a	6	1	5	0
体外培养细胞组 ^a	6	2	4	0

^a $P < 0.01$ vs 对照组。

cpm, $P = 0.000 < 0.01$ (图2)。

2.2 术后肝功能血清生化指标的变化(表1) 术后7 d, 新鲜细胞回输组以及体外培养细胞回输组AST低于对照组(17.9 $\pm$ 3.8 $\mu\text{kat/L}$ vs 8.1 $\pm$ 2.0 $\mu\text{kat/L}$, $P = 0.000 < 0.01$; 17.9 $\pm$ 3.8 $\mu\text{kat/L}$ vs 8.4 $\pm$ 1.4 $\mu\text{kat/L}$, $P = 0.000 < 0.01$), BIL亦低于对照组(98.4 $\pm$ 21.2 $\mu\text{mol/L}$ vs 45.8 $\pm$ 9.0 $\mu\text{mol/L}$, $P = 0.000 < 0.01$; 98.4 $\pm$ 21.2 $\mu\text{mol/L}$ vs 44.7 $\pm$ 12.0 $\mu\text{mol/L}$, $P = 0.000 < 0.01$)。

2.3 两组术后肝脏病理组织学观察 对照组术后7 d病理表现为汇管区大量单个核细胞浸润, 并累及胆管、血管, 肝小叶结构消失, 伴有局灶性的出血、坏死。FK506处理组的汇管区出现少量的单核细胞浸润, 但未侵及肝实质, 未累及胆管和血管。两组回输组的病理学表现介于对照组与FK506处理组之间(图3)。四组的Banff评分比较(表2), 两组细胞回输组与对照组比较均有统计学差异($P < 0.05$)。

2.4 生存期的观察 共建立肝移植模型51例, 受体鼠术后3 d内死亡判定为技术原因死亡共3只(3/51; 腹腔内出血 $\times$ 2, 胆漏 $\times$ 1), 不纳入统计^[16], 共获得满意的受体鼠48只。四组的生存时间分析(表3)。两组细胞回输组生存时间均大于对照组(21.7 $\pm$ 1.7 d vs 12.8 $\pm$ 0.5 d, $P = 0.000$ 1 < 0.01 ; 30.3 $\pm$ 1.7 vs 12.8 $\pm$ 0.5 d, $P = 0.000$ 4 < 0.01), 体外培养细胞回输组生存时间大于新鲜细胞回输组(30.3 $\pm$ 1.7 d vs 21.7 $\pm$ 1.7 d, $P = 0.001$ 7 < 0.01)。

3 讨论

实现对移植物的特异性耐受, 即受体对移植物产生类似于自身耐受的状态, 是器官移植的最终目标。1995年Sakaguchi^[1]报道CD4⁺CD25⁺T细胞在维持周围耐受中起重要的作用。随后, 在器官移植的耐受模型中也证实该细胞在维持移植免疫耐受中起重要作用^[12,19]。目前的研究认为CD4⁺CD25⁺调节性T细胞对于自身抗原或同种异体抗原激活的CD4⁺、CD8⁺T细胞有明确的抑制功能^[3,7,20]。在器官移植动物模型中, 肝脏是唯一在不同的大鼠品系组合中, 既存在排斥模型, 又存在耐受模型的器官^[21]。如: DA $\rightarrow$ Lewis组合是急性排斥模型, 而Lewis $\rightarrow$ DA组合则是自然耐受模型。在Lewis $\rightarrow$ DA模型中发现, 在移植前用一定剂量的放射线照射Lewis大鼠, 再将其肝脏移植给DA大鼠, 移植肝被排斥。而回输长期存活的Lewis $\rightarrow$ DA受体的脾细胞可逆转这种排斥, 从而提示调节性T细胞在诱导肝脏免疫耐受中起着一定的作用^[11,12]。基于以上的报道, 我们在DA $\rightarrow$ Lewis急性排斥模型中, 采用经供体脾细胞共培养激活的CD4⁺CD25⁺调节性T细胞, 在移植前1 d输入受体的体内, 设想被移植物抗原激活的效应性T细胞, 可被CD4⁺CD25⁺调节性T细胞识别为自身反应性T细胞, 因而被抑制。同时在受体体内获得长期存在的, 针对移植抗原的记忆性CD4⁺CD25⁺调节性T细胞, 形成类似于自身耐受的耐受模式, 从而诱导受体的长期存

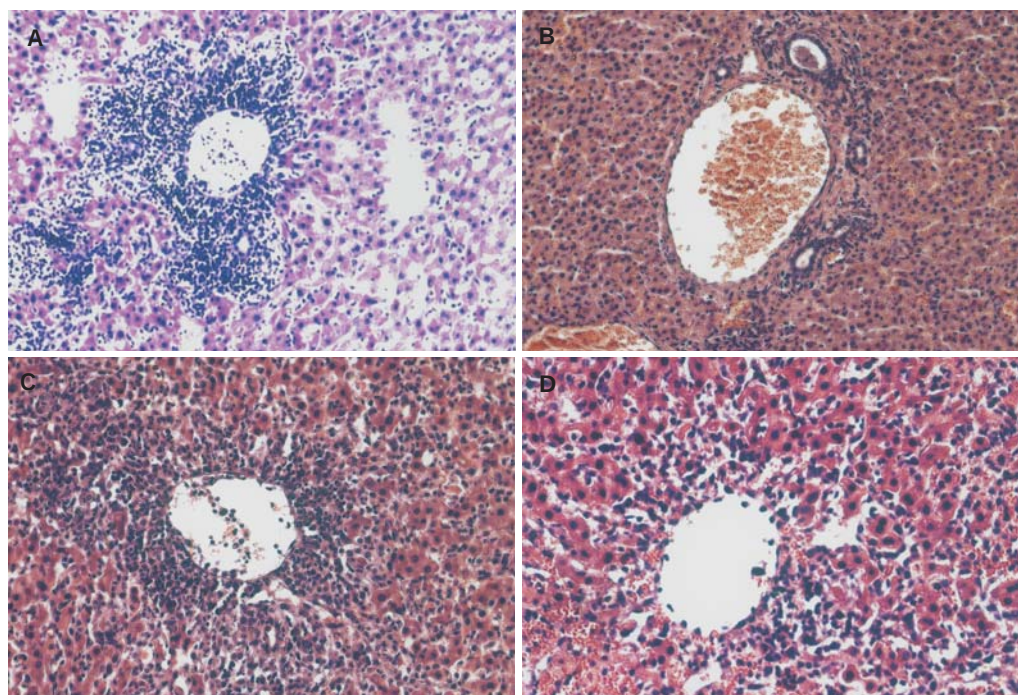


图3 各组术后7 d 肝脏标本病理 (HE染色, 200倍). A: 对照组; B: FK506 处理组; C: 新鲜分离细胞回输组; D: 体外激活细胞回输组.

■应用要点

本文的探索性较强, 有一定的创新性, 特别是体内实验部分, 意义更为突出. 不足之处是CD4⁺CD25⁺调节性T细胞的作用已有较多报道. 本文中其对肝移植排斥反应的作用有限, 特别是与FK506组相比, 文中需进一步阐述.

表3 各组术后生存时间

组别	生存时间 (d)	中位生存时间 (d)	95%可信区间 (%)
对照组	12,12,12,12,14,15	12	11.8–13.9
FK506处理组	65,67,69,76,79,89	79	74.2–83.8
新鲜细胞回输组 ^a	15,18,22,22,24,26	22	17.5–26.5
培养细胞回输组 ^{a,b}	25,27,28,32,34,36	28	22.0–34.0

^a $P<0.01$ vs 对照组; ^b $P<0.01$ vs 新鲜细胞回输组.

活^[22-24]. 然而本组的结果显示: 虽然新鲜分离和体外激活的细胞, 在混合淋巴细胞培养中均有抑制CD4⁺CD25⁺ T细胞增殖的作用, 回输后可以在一定程度上减轻移植排斥反应, 延长移植物的存活时间, 但和放射线处理的Lewis→DA排斥模型中的结果相比, 两组均不能在自然排斥模型中诱导受体的长期存活, 其主要原因可能是: (1)调节性T细胞主要通过抑制间接识别途径(indirect allo-recognition)来实现移植物的耐受^[8,22,24], 而在急性排斥反应的早期, 由过路细胞(passage cell)介导的直接识别途径(direct allo-recognition)是诱发急性排斥反应的主要机制, 随着移植体内过路细胞逐渐为宿主的抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)所替代, 间接识别模式才逐渐发挥主要的作用. 在放射线处理的排斥模型中, 移植体内的过路细胞被放射线清除, 回输调节性T细胞可使移植体长期存活. 而本组的调节

性T细胞回输后, 在急性排斥反应的早期, 虽然可通过非特异性的免疫抑制作用来抑制效应性T细胞的激活, 但是其抑制作用有限; 在急性反应的中后期(>7 d), 则可特异性抑制宿主APC激活的效应性T细胞. 因此在移植术后7 d, 两组细胞回输组肝功能、病理学评分的比较中无统计学差异, 而在生存期的观察中, 经体外供体抗原激活的调节性T细胞回输组的存活期长于新鲜细胞回输组, 这可能与经体外激活的细胞的免疫抑制功能, 较新鲜分离的细胞更特异, 更持久有关^[11]. (2) CD4⁺CD25⁺调节性T细胞功能发挥是通过细胞间的直接接触实现的^[20,22,23], 体外的研究证明其抑制功能在一定的范围内与其数量成正比, 因此要达到理想的干预效果需要一定的数量. 目前常用的调节性T细胞回输的数量级一般都在10⁶以上, 而获得该数量级的CD4⁺CD25⁺ T细胞一般需要牺牲一只受体, 因此寻找理想的扩增

条件,实现该细胞体外功能性扩增,是运用此类细胞进行干预性研究的关键^[25,26]。在本组的研究基础上,增加回输细胞的数量级,是否可以进一步延长受体的生存期,为此本组对该细胞的体外扩增进行了初步的探索。我们用MMC处理后的供体脾细胞,联合大剂量的重组大鼠IL-2 (rR IL-2, 200 kU/L)的方法对CD4⁺CD25⁺T细胞进行活化、扩增。该细胞在体外增长的速度与CD4⁺CD25⁺T细胞相比要慢得多,从活化到彻底静息所需时间比CD4⁺CD25⁺T细胞要长。在4 w的培养时间内反复刺激4次,每次1/1 扩孔。最终的扩增效率在16倍以上,扩增后的细胞具有稳定的细胞表型和免疫功能(数据待发表)。由于目前对调节性T细胞回输后的生物学行为的了解还很有限,回输后的细胞是否能在体内进一步扩增?是否可以保留一部分记忆性T细胞?回输后的细胞是否有一定的半衰期,是否需要连续回输这样的细胞,需多长时间回输一次^[5]?联合运用免疫抑制剂是否可以协同该细胞的免疫调节功能?是否可以在减少免疫抑制剂剂量的基础上使得移植实现长期存活?这些问题现在尚未得到解决,因此在探索回输调节性T细胞诱导移植免疫耐受的过程中,还需更广泛深入的研究。

致谢: 南京医科大学第一附属医院动物实验中心杨定国主任,中国活体肝脏移植研究所高云硕士、邓蕾硕士,南京医科大学公共卫生学院王璐硕士,江苏大学病理学教研室王永忠副教授在本研究过程中给予了极大的帮助,在此表示衷心感谢。

4 参考文献

- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164
- Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998; 10: 1969-1980
- Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998; 160: 1212-1218
- Ermann J, Szanya V, Ford GS, Paragas V, Fathman CG, Lejon K. CD4⁺CD25⁺ T cells facilitate the induction of T cell anergy. *J Immunol* 2001; 167: 4271-4275
- Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2002; 196: 401-406
- Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of *ex vivo* activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002; 99: 3493-3499
- Camara NO, Seville F, Lechler RI. Human CD4⁺CD25⁺ regulatory cells have marked and sustained effects on CD8⁺ T cell activation. *Eur J Immunol* 2003; 33: 3473-3483
- Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* 2001; 193: 1311-1318
- Feng NH, Wu HF, Wu J, Zhang W, Sui YG, He HG, Zhang CL, Zheng JS. Transplantation tolerance mediated by regulatory T cells in mice. *Chin Med J* 2004; 117: 1184-1189
- Zeng D, Lan F, Hoffmann P, Strober S. Suppression of graft-versus-host disease by naturally occurring regulatory T cells. *Transplantation* 2004; 77: S9-S11
- Asakura H, Takayashiki T, Ku G, Flye MW. The persistence of regulatory cells developing after rat spontaneous liver acceptance. *Surgery* 2005; 138: 329-334
- Asakura H, Ku G, Kataoka M, Flye MW. Regulatory cells develop after the spontaneous acceptance of rat liver allografts. *Surgery* 2004; 136: 532-536
- Stephens LA, Barclay AN, Mason D. Phenotypic characterization of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in rats. *Int Immunol* 2004; 16: 365-375
- 孙倍成, 王学浩, 胡建平, 张浩, 李相成. 大鼠肝移植技术改进及免疫排斥初步观察. 南京医科大学学报(自然科学版) 2001; 21: 282-283
- Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 1979; 28: 47-50
- 姜明山, 韩德恩. 不同品系大鼠之间原位肝移植的实验观察. 中华实验外科杂志 2004; 21: 428-429
- Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant* 2004; 4: 1562-1566
- Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology* 1997; 25: 658-663
- Graca L, Cobbold SP, Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J Exp Med* 2002; 195: 1641-1646
- Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001; 194: 629-644
- Kamada N. The immunology of experimental liver transplantation in the rat. *Immunology* 1985; 55: 369-389
- Blazar BR, Taylor PA. Regulatory T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11: S46-S49
- Walsh PT, Taylor DK, Turka LA. Tregs and transplantation tolerance. *J Clin Invest* 2004; 114: 1398-1403
- Strom TB. Is transplantation tolerable? *J Clin Invest* 2004; 113: 1681-1683
- Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Edinger M. Large-scale *in vitro* expansion of polyclonal human CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells. *Blood* 2004; 104: 895-903
- Jiang S, Camara N, Lombardi G, Lechler RI. Induction of allopeptide-specific human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells *ex vivo*. *Blood* 2003; 102: 2180-2186

maspin、p27、skp2在大肠肿瘤的表达及意义

刘丹丹, 易永芬, 邓玮

刘丹丹, 易永芬, 邓玮, 重庆医科大学病理教研室 重庆市 400016

刘丹丹, 女, 1980-05-28生, 四川省彭州市人, 汉族, 2003年重庆医科大学硕士研究生在读, 主要从事消化系统肿瘤方向的研究。重庆市教委资助项目, No. 040310

通讯作者: 易永芬, 400016, 重庆市医学院路1号, 重庆医科大学病理科。

收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-11-24

Expression and its significance of maspin, p27 and skp2 in colorectal cancer

Dan-Dan Liu, Yong-Fen Yi, Wei Deng

Dan-Dan Liu, Yong-Fen Yi, Wei Deng, Department of Pathology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China

Supported by the Fund from Chongqing Committee of Education, No.040310

Correspondence to: Yong-Fen Yi, Department of Pathology, Chongqing University of Medical Science, Chongqing 400016, China

Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-11-24

Abstract

AIM: To explore the expression of maspin, p27, skp2 in colorectal adenocarcinoma as well as their roles in the tumorigenesis and progression of colorectal carcinoma.

METHODS: SP immunohistochemistry was used to detect the expression of maspin, p27 and skp2 in tissues of colorectal tubular adenocarcinoma ($n = 30$), colorectal polypoid adenoma ($n = 20$) and normal controls ($n = 20$).

RESULTS: Of 30 cases of tubular adenocarcinoma, the positive rates of maspin, p27 and skp2 expression were 83.3%(25/30), 50%(15/30), and 36.7%(11/30), respectively; of 20 cases of polypoid adenoma, the positive rates of maspin, p27 and skp2 were 95%(19/20), 80%(16/20), and 10%(2/20), respectively; of 20 cases of normal colorectal tissues, the corresponding positive rates were 95%(19/20), 90%(18/20), and 5%(1/20). The expression of maspin was significantly correlated with lymph node metastasis ($P = 0.04$) and Duke's staging ($P = 0.014$). The expression of p27 and skp2 showed a marked

correlation with the differentiation of carcinoma ($P = 0.014$, $P = 0.001$), while no significant correlation with tumor infiltration depth, lymph node metastasis and Duke's staging. There was a positive correlation between maspin and p27 expression ($r = 0.447$, $P < 0.05$), but there was no notable correlation between maspin and skp2 expression, as well as p27 and skp2 expression.

CONCLUSION: The expression of maspin and p27 are increased, while skp2 expression is decreased in colorectal adenocarcinoma. The aberrant expression of maspin, p27 and skp2 may be indicators for reflecting the differentiation of colorectal adenocarcinoma. Maspin plays an important role in tumorigenesis and progression, especially lymph node metastasis, of colorectal adenocarcinoma.

Key Words: Colorectal adenocarcinoma; Maspin; p27; skp2; Immunohistochemistry

Liu DD, Yi YF, Deng W. Expression and its significance of maspin, p27 and skp2 in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(3):267-272

摘要

目的: 探讨大肠癌maspin、p27、skp2的表达, 并探讨其与大肠癌发生、发展的关系。

方法: 应用免疫组化SP法检测30例结肠管状腺癌、20例结肠腺瘤、20例正常大肠黏膜组织中maspin、p27、skp2的表达情况。

结果: 30例管状腺癌中maspin、p27、skp2阳性表达率分别为83.3%(25/30)、50%(15/30)、36.7%(11/30); 20例结肠腺瘤中maspin、p27、skp2的阳性表达率分别为95%(19/20)、80%(16/20)、10%(2/20), 20例正常切缘中maspin、p27、skp2的表达率分别为95%(19/20)、90%(18/20)、5%(1/20)。maspin表达与淋巴结转移($P = 0.04$)和Duke's分期相关($P = 0.014$); p27、skp2表达与分化程度相关($P = 0.014$, $P = 0.001$), 而与淋巴结转移、Duke's分期、肿瘤浸润深度无关。maspin表达与p27表达正相关($r = 0.447$, $P < 0.05$), 与skp2

■背景资料

maspin是一种新发现的丝氨酸蛋白酶抑制剂, 已在多种肿瘤中证实具有抑制肿瘤侵袭、转移的作用。但有关maspin在大肠癌中的研究, 国外报道较少, 国内尚无报道。

■创新盘点

我们进行了maspin在大肠癌中表达的研究,探讨了其表达与临床病理因素的关系,首次分析了maspin与p27、skp2表达的相关性,初步探讨了maspin可能的作用机制,为以后更深入的研究打下基础。

表达无相关性;p27表达与skp2表达无相关性。

结论: maspin、p27在大肠癌中表达降低, skp2在大肠癌中过表达,可作为反映大肠癌分化程度的指标之一。maspin可能在大肠癌的发生、发展(尤其是淋巴结转移)中起作用,有望成为诊断大肠癌及其发生淋巴结转移的分子生物学标记物之一。

关键词: 结直肠肿瘤; maspin; p27; skp2; 免疫组织

刘丹丹, 易永芬, 邓玮. maspin、p27、skp2在大肠肿瘤的表达及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(3):267-272

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/267.asp>

0 引言

maspin基因是常染色体基因,位于18q21.3-q23,编码的蛋白为一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,大量研究已证实,该基因在正常组织中高表达^[1],在肿瘤组织中表达降低,具有抑制肿瘤浸润、转移的作用^[2-4]。p27^{kip1}是一种细胞周期抑制剂, p27^{kip1}因能阻止细胞通过R点而抑制其增殖,成为一个重要的候选抑癌基因。p27^{kip1}低表达被认为与肿瘤的预后不良及高度侵袭性密切相关^[5-8]。肿瘤细胞表面黏附能力的改变是肿瘤发生浸润、转移等恶性生物学行为的前提。maspin和p27均有影响细胞表面黏附能力的作用^[9-12]。而skp2是新发现的SCF(skp1-cullin-F-box蛋白)多功能E3酶复合体中的一种F-box蛋白,通过泛素蛋白酶体途径降解p27^{kip1},在大量实体肿瘤中呈高表达,并与p27^{kip1}呈负相关^[13]。大肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤,其血供丰富、生长迅速、浸润性强、且易发生转移,大肠腺瘤是大肠癌的癌前病变。有关maspin, skp2, p27在大肠癌中的表达及相关关系的研究,国内外尚未见报道。我们采用免疫组化SP法检测maspin, skp2, p27在大肠癌、大肠腺瘤及正常组织中的表达,比较它们表达与临床病理特征的关系,并探讨了大肠癌中maspin, skp2, p27表达的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 1987/2004重庆医科大学第一附属医院手术切除的大肠肿瘤石蜡包埋标本70例,其中大肠管状腺癌30例,大肠腺瘤20例(其中大肠息肉状腺瘤6例,大肠绒毛状腺瘤14例), 20例正常大肠黏膜组织取自大肠管状腺癌手术切除标本的正常切缘,切缘经组织学观察证实无癌组织浸润、无腺瘤样结构。大肠癌的分化程度: 高分化

管状腺癌5例、中分化管状腺癌20例,低分化管状腺癌5例。大肠癌的Duke's分期: A期2例, B期22例, C期5例, D期1例。30例大肠癌中有肝转移者1例,有局部淋巴结转移者5例,无淋巴结转移者25例。按浸润深度: 未达浆膜层者6例, 侵及浆膜层者24例。

1.2 方法 采用常规SP法。maspin即用型单克隆抗体(MS-1767-R7)购自美国Neomaker公司; p27、skp2即用型单克隆抗体, SP-9 000试剂盒购自北京中杉生物公司。具体步骤按试剂说明书进行。用PBS代替一抗作阴性对照。maspin染色结果判断标准: 根据文献采用半定量积分法, 即对每张切片的阳性细胞率及阳性细胞着色强度分别进行分级记分, 然后根据两项之和确定其阳性强度^[14]。maspin阳性表达产物定位于细胞质或细胞核、细胞核同时着色, p27阳性信号定位于细胞核。染色强度阴性、中、强分别积分为0, 1, 2; 阳性细胞率0、<1%、<10%、<1/3、<2/3、>2/3分别积分为0, 1, 2, 3, 4, 5。两项之和0-2分为阴性(-), 3-5分为阳性(+), 6-8分为强阳性(++)。Skp2染色结果判断标准: 阳性细胞为棕黄色颗粒位于细胞核或细胞核伴细胞质内, 而只有细胞质内出现棕黄色为非特异性染色。以每张切片阳性细胞数超过20%为阳性切片。p27染色结果判断标准: p27阳性反应产物主要位于细胞核或细胞核与细胞质同时出现, 阳性判断标准为该位置出现了明确的棕黄色颗粒, 400倍显微镜下每张切片计数5个视野, 每个视野100个肿瘤细胞, 取阳性细胞数百分比的平均值, 小于50%为阴性表达, 大于50%为阳性表达。

统计学处理 使用SPSS11.5统计软件进行统计分析。根据资料性质, 采用 χ^2 检验及spearman等级相关分析。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 maspin, p27, skp2的表达与分布 maspin阳性染色主要是细胞质或细胞质与细胞核同时着色, 呈棕黄色弥漫分布(图1A-B)。maspin主要表达于大肠癌细胞、腺瘤和正常组织的腺上皮细胞。正常大肠黏膜组织和大肠腺瘤maspin表达率和表达强度明显高于大肠癌组织($P < 0.05$)。大肠癌p27主要位于肿瘤细胞核; 大肠腺瘤组织和正常组织p27阳性反应产物主要位于黏膜腺细胞核, 呈明显棕色细颗粒状(图2A-B)。正常大肠黏膜组织和大肠腺瘤p27表达率高于大肠癌组织($P < 0.05$)。正常大肠黏膜组织和大肠腺瘤skp2表

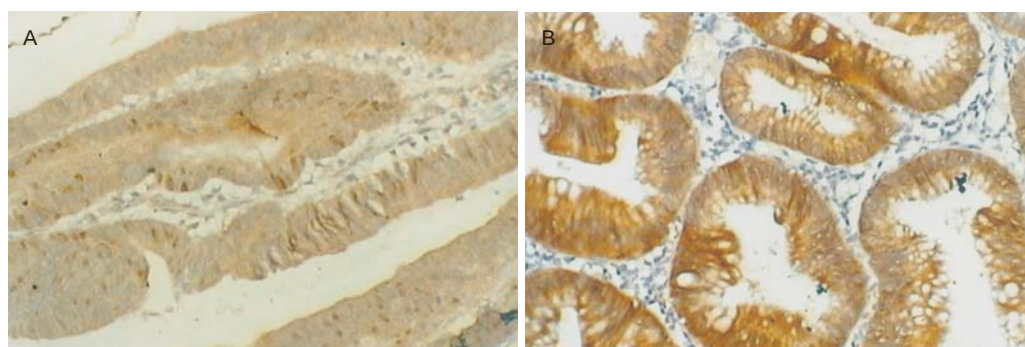


图1 maspin在大肠癌及大肠腺瘤的表达: A: 癌; B: 瘤.

表1 maspin、p27、skp2在大肠腺癌、大肠腺瘤中的表达

组别	n	maspin				P值	p27			P值	skp2			P值
		-	+	++	(%)		-	+	(%)		-	+	(%)	
管状腺癌	30	5	17	8	83.3 ^a	P=0.004	15	15	50 ^a	P=0.032	19	11	36.7 ^a	P=0.035
腺瘤	20	1	4	15	95	P=0.000	4	16	80	P=0.003	18	2	10	P=0.01
切缘	20	1	2	17	95		2	18	90		19	1	5	

^aP<0.05 vs 腺瘤组, 正常切缘组.

表2 大肠癌临床病理特征与maspin、p27、skp2表达的关系

组别	n	maspin				P值	p27		P值	skp2		P值
		-	+	~++			低表达	高表达		-	+	
浸润深度												
达浆膜层	24	5	19				12	12		15	9	
未达浆膜层	6	0	6				2	4		4	2	
淋巴结转移												
无	25	2	23 ^a		P=0.04		12	13		16	9	
有	5	3	2				3	2		3	2	
分化程度												
高、中分化	25	3	22				10	15 ^c		19	6 ^c	P=0.001
低分化	5	2	3				5	0	P=0.014	0	5	
Duke's分期												
A, B期	24	2	22 ^a		P=0.014		12	12		15	9	
C, D期	6	3	3				3	3		4	2	

^aP<0.05 vs 淋巴结转移组; ^cP<0.05 vs 低分化组; ^eP<0.05 vs Duke's C, D期组.

达率明显高于大肠癌组织($P<0.05$). skp2主要在结肠腺瘤的腺上皮细胞及结肠腺癌的肿瘤细胞胞核, 或细胞核与细胞质同时表达, 呈棕黄色颗粒状(表1, 图3A-B).

2.2 maspin、p27、skp2与大肠癌临床病理因素的关系 无淋巴结转移组的maspin阳性表达率高于有淋巴结转移组($P<0.05$); Duke's分期A、B期maspin阳性表达率高于C、D期($P<0.05$). 高、中分化的结肠癌组织p27高表达率高于低分化的结肠癌组织. 高、中分化的结肠癌组织skp2阳性表达率低于低分化的结肠癌组织(表2).

2.3 大肠癌maspin、p27、skp2表达的相关性 30例大肠管状腺癌组织中, maspin与p27表达呈正

相关($P<0.05$). 30例大肠管状腺癌组织中, maspin与skp2表达无相关性($P>0.05$). 30例大肠管状腺癌组织中, skp2与p27表达无相关性($P>0.05$)(表3).

3 讨论

maspin(mammary-serpin)基因是1994年发现的一种新的丝氨酸蛋白酶抑制剂. maspin基因定位于染色体18q21.3, 全长2 584 bp^[1]. 用质粒和反转录病毒转染乳腺癌TM40D细胞株使maspin表达上调时, 显示出maspin具有抑制肿瘤细胞生长和转移的作用^[15]. 我们研究了maspin在大肠腺癌组织、大肠腺瘤、正常大肠黏膜组织中的表达情况. 我们发现, 83.3%的大肠腺癌组织maspin

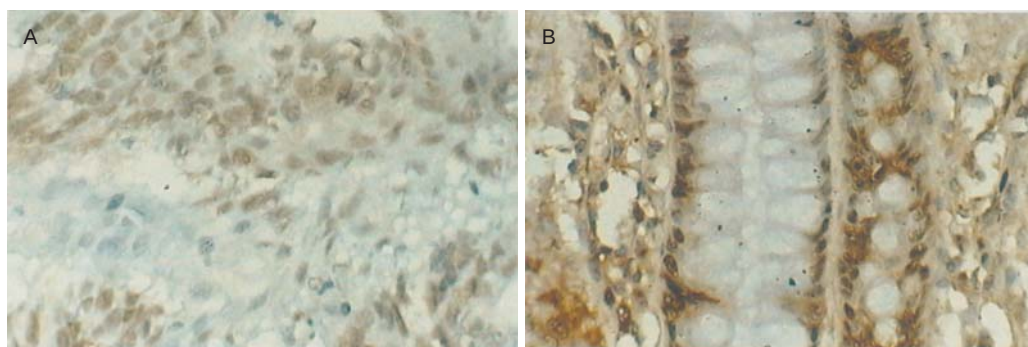


图2 p27在大肠癌及大肠腺瘤的表达: A: 癌; B: 瘤.

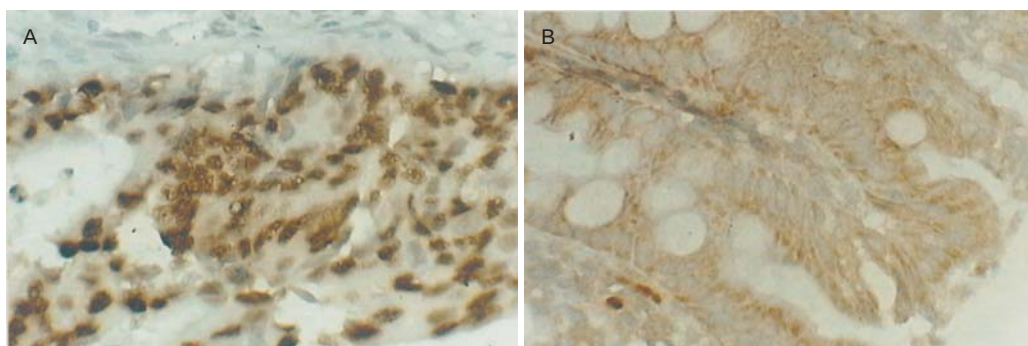


图3 Skp2在大肠癌及大肠腺瘤的表达: A: 癌; B: 瘤.

表3 大肠癌组织中maspin、p27、skp2表达的关系

项目	maspin		$r(\text{spearman}$ 等级相关系数)	P 值	skp2		$r(\text{spearman}$ 等级相关系数)	P 值
	-	+ ~ ++			-	+		
P27								
低表达	5	10	0.447	0.013	7	12	-0.346	0.061
高表达	0	15			18	3		
skp2								
-	2	17	-0.217	0.250				
+	3	5						

P 值: 组内比较.

阳性表达, 其中强阳性率26.7%, 而大肠腺瘤阳性率及强阳性率分别为95%、75%, 正常组织强阳性率为85%. 这与Song *et al*^[4]采用组织芯片技术检测到大肠腺瘤、大肠腺癌组织中maspin表达分别为91.7%、75.5%的结果相近. 此结果提示maspin表达降低可能与结肠癌的发生有关. 我们进一步探讨了maspin表达与临床病理特征的关系, 发现maspin表达率高者淋巴结转移率低 ($P < 0.05$), 这与在鳞状上皮癌、乳腺癌、胃癌等中的发现一致^[16-19], 由此表明maspin表达降低与结肠癌淋巴结转移有关, 肿瘤组织中maspin表达降低, 对其淋巴结转移有促进作用. C期结肠癌组织中maspin的阳性率高于A、B期, 提示结肠癌组织中maspin表达随结肠癌临床分期的进展而降低, 晚期结肠癌患者maspin表达较早期为

低, 在乳腺癌、前列腺癌、胃癌中也有相似结论^[20-24]. 以上结果均提示maspin表达降低可能是结肠癌具有高侵袭、转移能力的基础. maspin有望成为诊断大肠癌及其发生淋巴结转移的一项分子生物学指标.

p27基因是1994年发现并克隆的参与细胞周期调控的抑癌基因, 其表达产物KIP1是一种非特异性的、广谱的细胞周期素依赖性激酶抑制因子(CDKIs)^[25]. p27参与细胞周期调控的关键是蛋白质表达水平, 而非基因突变. p27^{kip1}表达下调或缺失, 细胞周期加速, 增殖活跃, 不仅在大肠癌早期形成中可能有一定作用, 而且还可能促进了大肠癌的发展^[5,6]. 本实验中, 结肠腺瘤组织p27表达率为80%, 而结肠癌为50%, 两者的差异有显著性, 说明结肠癌存在明显的p27缺

失或降低,证实p27的水平下降与结肠癌的发生有关.本实验中p27表达与结肠癌的浸润深度、Duke's分期、有无淋巴结转移无相关性,提示p27蛋白水平降低可能发生于结肠癌发生的早期.我们还发现,高、中分化的结肠癌p27表达率高于低分化的结肠癌组织($P<0.05$),p27蛋白的表达与肿瘤的恶性程度负相关.

在乳腺癌和前列腺癌组织中已证实,maspin具有能调节细胞凋亡、移动和血管生成等生物学功能^[18].而CDKIs除能调节细胞周期外,还能调节细胞的分化和移动等细胞活动.在细胞周期动力学中,p27^{kip1}参与N-钙黏素介导的细胞间的接触抑制^[9],p27^{kip1}还能影响微管对细胞外基质黏附的稳定性^[11].目前认为,调节p27^{kip1}表达的信号可能通过改变细胞形状或改变细胞接受胞外信号的能力而达到调节细胞间黏附的作用,例如BRAF-MEK-ERK信号通路^[12].我们发现,结肠癌中maspin与p27表达正相关,提示它们可能是大肠癌肿瘤细胞表面黏附能力改变的分子基础,在结肠癌的发生中maspin和p27共同发挥作用.同时检测maspin、p27的表达可能对大肠癌有一定的诊断意义.由于国内外尚无maspin与p27相关性的报道,还需通过进一步的实验来证实及探讨二者的关系及机制.

skp2是1995年从大量的恶变细胞中发现的一种能与S期激酶cyclinA-CDK2相互作用的蛋白.因其主要存在于恶变细胞的S期且与cyclinA-CDK2活性有关,故命名为S期激酶相关蛋白2(skp2).skp2具有调控细胞周期、参与细胞DNA的合成、转录激活等作用^[26].本研究结果显示,skp2在大肠癌组织中阳性表达率为36.7%(11/30),而大肠腺瘤组织仅为10%(2/20),二者差异有显著性($P<0.05$),这与Li *et al*^[27]采用Western blot法检测出在大肠正常黏膜一大肠腺瘤一大肠癌的转变中,skp2表达显著增加的结果一致,提示skp2与结肠癌的发生有关.我们还发现,skp2阳性表达率与结肠癌的浸润深度、Duke's分期、有无淋巴结转移无关($P>0.05$);skp2阳性表达率与结肠癌的分化程度有关($P<0.05$),尤其在低分化结肠癌组织中,其阳性表达率达到100%.该结果提示,检测skp2蛋白表达对判断结肠癌的恶性程度有一定意义.skp2作为泛素蛋白酶体途径的底物识别序列,能泛素化降解p27^{kip1}.大量研究表明,在多种恶性肿瘤中,skp2常呈高表达,p27^{kip1}则呈低表达,且两者呈负相关^[28-30].Hershko *et al*^[31]将人体大肠癌

标本经过免疫印迹和免疫组化的方法测定skp2和p27^{kip1}的表达,发现在skp2表达增高的组织中p27^{kip1}的表达水平降低,在p27^{kip1}表达增高的组织中skp2的表达水平降低.二者具有明显的负相关性($r = -0.812$; $P<0.0001$).我们也得出了skp2在癌组织中高表达,p27在癌组织中表达降低的结果,但两者的相关性无统计学意义($P>0.05$).

4 参考文献

- 1 Cao D, Wilentz RE, Abbruzzese JL, Ho L, Maitra A. Aberrant expression of maspin in idiopathic inflammatory bowel disease is associated with disease activity and neoplastic transformation. *Int J Gastrointest Cancer* 2005; 36: 39-46
- 2 Xia W, Lau YK, Hu MC, Li L, Johnston DA, Sheng S, El-Naggar A, Hung MC. High tumoral maspin expression is associated with improved survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncogene* 2000; 19: 2398-2403
- 3 Yasumatsu R, Nakashima T, Hirakawa N, Kumamoto Y, Kuratomi Y, Tomita K, Komiyama S. Maspin expression in stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001; 23: 962-966
- 4 Song SY, Lee SK, Kim DH, Son HJ, Kim HJ, Lim YJ, Lee WY, Chun HK, Rhee JC. Expression of maspin in colon cancers: its relationship with p53 expression and microvessel density. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1831-1835
- 5 Li GQ, Zhang HF. Mad2 and p27 expression profiles in colorectal cancer and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3218-3220
- 6 Fan JW, Fan PX, Wang Y, Zhang XQ. Relationship between expression of p27 and DNA ploidy in colorectal carcinoma. *Ai Zheng* 2002; 21: 54-57
- 7 Wu JT, Kakar S, Nelson RL, Mihalov ML, Hayward B, Gilbert PB, Ghosh L. Prognostic significance of DCC and p27Kip1 in colorectal cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13: 45-54
- 8 Lebe B, Sarioglu S, Sokmen S, Ellidokuz H, Fuzun M, Kupelioglu A. The clinical significance of p53, p21, and p27 expressions in rectal carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13: 38-44
- 9 Messina G, Blasi C, La Rocca SA, Pompili M, Calconi A, Grossi M. p27Kip1 acts downstream of N-cadherin-mediated cell adhesion to promote myogenesis beyond cell cycle regulation. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 1469-1480
- 10 Massarelli E, Brown E, Tran NK, Liu DD, Izzo JG, Lee JJ, El-Naggar AK, Hong WK, Papadimitrakopoulou VA. Loss of E-cadherin and p27 expression is associated with head and neck squamous tumorigenesis. *Cancer* 2005; 103: 952-959
- 11 Baldassarre G, Belletti B, Nicoloso MS, Schiappacassi M, Vecchione A, Spessotto P, Morrione A, Canzonieri V, Colombatti A. p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer Cell* 2005; 7: 51-63
- 12 Bhatt KV, Spofford LS, Aram G, McMullen M, Pumiglia K, Aplin AE. Adhesion control of cyclin D1 and p27Kip1 levels is deregulated in melanoma cells through BRAF-MEK-ERK signaling. *Oncogene* 2005; 24: 3459-3471

- 13 Lahav-Baratz S, Ben-Izhak O, Sabo E, Ben-Eliezer S, Lavie O, Ishai D, Ciechanover A, Dirnfeld M. Decreased level of the cell cycle regulator p27 and increased level of its ubiquitin ligase Skp2 in endometrial carcinoma but not in normal secretory or in hyperstimulated endometrium. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 567-572
- 14 Son HJ, Sohn TS, Song SY, Lee JH, Rhee JC. Maspin expression in human gastric adenocarcinoma. *Pathol Int* 2002; 52: 508-513
- 15 Shi HY, Zhang W, Liang R, Kittrell F, Templeton NS, Medina D, Zhang M. Modeling human breast cancer metastasis in mice: maspin as a paradigm. *Histol Histopathol* 2003; 18: 201-206
- 16 Manzotti M, Dell'Orto P, Maisonneuve P, Zurrida S, Mazzarol G, Viale G. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for multiple mRNA markers in the detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Int J Cancer* 2001; 95: 307-312
- 17 Yasumatsu R, Nakashima T, Hirakawa N, Kumamoto Y, Kuratomi Y, Tomita K, Komiyama S. Maspin expression in stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2001; 23: 962-966
- 18 Sopel M, Kasprzyk I, Berdowska I. Maspin and c-erbB-2 expression in correlation with microvessel density in invasive ductal breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2005; 43: 109-116
- 19 Xu C, Quddus MR, Sung CJ, Steinhoff MM, Zhang C, Lawrence WD. Maspin expression in CIN 3, microinvasive squamous cell carcinoma, and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Mol Pathol* 2005; 18: 1102-1106
- 20 Marioni G, Blandamura S, Giacomelli L, Calgaro N, Segato P, Leo G, Fischetto D, Staffieri A, de Filippis C. Nuclear expression of maspin is associated with a lower recurrence rate and a longer disease-free interval after surgery for squamous cell carcinoma of the larynx. *Histopathology* 2005; 46: 576-82
- 21 Maass N, Hojo T, Rosel F, Ikeda T, Jonat W, Nagasaki K. Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. *Clin Biochem* 2001; 34: 303-307
- 22 Chen Z, Fan Z, McNeal JE, Nolley R, Caldwell MC, Mahadevappa M, Zhang Z, Warrington JA, Stamey TA. Hepsin and maspin are inversely expressed in laser capture microdissectioned prostate cancer. *J Urol* 2003; 169: 1316-1319
- 23 Zheng HC, Wang MC, Li JY, Yang XF, Sun JM, Xin Y. Expression of maspin and kai1 and their clinicopathological significance in carcinogenesis and progression of gastric cancer. *Chin Med Sci J* 2004; 19: 193-198
- 24 Wang MC, Yang YM, Li XH, Dong F, Li Y. Maspin expression and its clinicopathological significance in tumorigenesis and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 634-637
- 25 Schmider-Ross A, Pirsig O, Gottschalk E, Denkert C, Lichtenegger W, Reles A. Cyclin-dependant kinase inhibitors CIP1 (p21) and KIP1 (p27) in ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132: 163-170
- 26 Ma XM, Liu JH, Guo JW, Liu Y, Zuo LF. Correlation of Skp2 Expression in Gastric Carcinoma to Expression of P27 and PTEN. *Ai Zheng* 2006; 25: 56-61
- 27 Li JQ, Wu F, Masaki T, Kubo A, Fujita J, Dixon DA, Beauchamp RD, Ishida T, Kuriyama S, Imaida K. Correlation of Skp2 with carcinogenesis, invasion, metastasis, and prognosis in colorectal tumors. *Int J Oncol* 2004; 25: 87-95
- 28 Shibahara T, Onishi T, Franco OE, Arima K, Sugimura Y. Down-regulation of Skp2 is correlated with p27-associated cell cycle arrest induced by phenylacetate in human prostate cancer cells. *Anticancer Res* 2005; 25: 1881-1888
- 29 Li H, Jiang X, Zhou X. Expression of Skp2 and p27 proteins in laryngeal squamous cell carcinoma and their significances. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2005; 19: 409-411
- 30 Heng WQ, Zheng JM, Ma R, Meng FF, Ni CR. Relationship between levels of Skp2 and P27 in breast carcinomas and possible role of Skp2 as targeted therapy. *Steroids* 2005; 70: 770-774
- 31 Hershko D, Bornstein G, Ben-Izhak O, Carrano A, Pagano M, Krausz MM, Hershko A. Inverse relation between levels of p27(Kip1) and of its ubiquitin ligase subunit Skp2 in colorectal carcinomas. *Cancer* 2001; 91: 1745-1751

电编 李琪 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

一氧化氮对急性肺损伤发病过程中核因子- κ B活化的调节作用

李海龙, 陈海龙, 张波, 贺雪梅, 徐宏, 范奇

李海龙, 陈海龙, 大连医科大学附属第一医院普外科 辽宁省大连市 116011

张波, 徐宏, 范奇, 大连生物技术研究所在辽宁省大连市 116027
贺雪梅, 大连医科大学中山学院生理教研室 辽宁省大连市 116023

李海龙, 男, 1976-09-25生, 辽宁省海城市人, 汉族, 大连医科大学中西医结合专业博士, 主要从事全身炎症反应综合征发病过程中有关分子机制方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No.30271667

通讯作者: 陈海龙, 116011, 辽宁省大连市, 大连医科大学附属第一医院普外科, hailong_chen@x263.net

电话: 0411-83600680 传真: 0411-83600680

收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-09-30

Regulatory effects of nitric oxide on nuclear factor-kappa B activation during acute lung injury

Hai-Long Li, Hai-Long Chen, Bo Zhang, Xue-Mei He, Hong Xu, Qi Fan

Hai-Long Li, Hai-Long Chen, Department of Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Bo Zhang, Hong Xu, Qi Fan, Dalian Institute of Biotechnology, Dalian 116027, Liaoning Province, China

Xue-Mei He, Department of Physiology, Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30271667

Correspondence to: Dr. Hai-Long Chen, Department of Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. hailong_chen@x263.net

Received: 2005-09-10 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To further present the double-function of nitric oxide (NO) on acute lung injury (ALI) induced by severe acute pancreatitis (SAP) as well as its relation with the activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B).

METHODS: Sprague Dawley rats were averagely divided into five groups (6 for each): sham operation (control), model, sodium nitroprusside (SNP), L-Arg, and aminoguanidine (AG) treatment group. Sodium deoxycholate (15 g/L) was injected retrogradely into the common bilio-

pancreatic duct of rats to establish the model of SAP. Meanwhile, *in vitro* stimulation experiment (using lipopolysaccharide, LPS) was also performed. The activity of NF- κ B and the amount of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA in alveolar macrophages were determined by electrophoretic mobility shift assay and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), then the levels of tumor necrosis factor α (TNF- α), NO and iNOS expression were also measured respectively.

RESULTS: The levels of NF- κ B, iNOS mRNA, TNF- α , NO, iNOS in alveolar macrophages and serum of model group were significantly higher than those in control group ($P = 0.02$). Other indexes about ALI and pathological examination of lung tissue showed obvious pathogenic changes in model group. SNP and AG decreased the NF- κ B activity (213.47 ± 12.34 , 222.98 ± 17.69 vs 327.13 ± 13.46 , $P < 0.05$), reduced iNOS mRNA expression (SNP: 2.35 ± 0.34 vs 3.1 ± 0.38 , $P < 0.05$), TNF- α (0.38 ± 0.034 , 0.45 ± 0.043 μ g/L vs 0.76 ± 0.045 μ g/L) and NO (168.2 ± 0.78 , 146.4 ± 0.59 mmol/L vs 229.3 ± 0.98 mmol/L) level and alleviated the degree of lung injury, but no significant effect was shown in L-arg group. The results of LPS stimulation experiment were consistent with those in rat model experiment *in vivo* above.

CONCLUSION: Exogenous NO can suppress NF- κ B activation, down-regulate iNOS mRNA expression, and alleviated the release of NO and TNF- α . Similarly, the selective inhibiting reagent of iNOS can also regulate the over-responses of inflammation through depressing endogenous nitric oxide.

Key Words: Nuclear factor kappa B; Nitric oxide; Acute lung injury; Acute severe pancreatitis; Inducible nitric oxide synthase

Li HL, Chen HL, Zhang B, He XM, Xu H, Fan Q. Regulatory effects of nitric oxide on nuclear factor-kappa B activation during acute lung injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(3):273-279

■背景资料

NO是一种内皮衍生的血管舒张因子,他参与细胞内信号传导,具有舒张动脉、降低血小板黏滞性和抗炎作用,但过量NO及其代谢产物则可致机体损伤。诱生性一氧化氮合酶(iNOS)属于NOS的一种,只有在病理条件下才出现,其产生的NO不但量大,而且作用持久,对机体有损害^[5-8]。NF- κ B是一种可以调控多种炎症因子基因表达的核因子,他在急性胰腺炎急性肺损伤中的作用已经成为研究方面的热点。

■研究前沿

目前,关于NO和NOS在ALI的发病过程中的作用尚存争议.由于NO与损伤机制的多个环节有关,因此其作用表现为“双刃剑”.研究表明,在缺乏iNOS基因的大鼠肺损伤较轻,证明由iNOS表达产生大量的内源性NO是导致肺损伤的主要发病机制.核因子- κ B(NF- κ B)在急性肺损伤的发病过程中,可以启动多种炎症因子、炎症介质的基因表达,是全身炎症反应过度失控的关键环节.

摘要

目的:探讨一氧化氮(NO)在急性重症胰腺炎急性肺损伤大鼠发病中的作用及肺泡巨噬细胞核因子- κ B(NF- κ B)活化的关系.

方法:健康雄性SD大鼠随机分为:假手术组、模型组、硝普钠(SNP)组、左旋精氨酸组、氨基胍组,每组6只.经胰管逆行注入去氧胆酸钠复制大鼠急性重症胰腺炎急性肺损伤模型.采用凝胶电泳迁移率方法检测肺泡巨噬细胞中NF- κ B活性,RT-PCR分析iNOS mRNA的表达,同时亦检测NO、TNF- α 、iNOS的水平和肺组织病理学的改变.

结果:模型组中NF- κ B活性、iNOS mRNA表达及TNF- α 、NO、iNOS的含量均显著高于假手术组($P = 0.02$).肺组织病理学显示严重损害.NO的供体硝普钠及iNOS选择性抑制剂氨基胍可降低NF- κ B活性(213.47 ± 12.34 , 222.98 ± 17.69 vs 327.13 ± 13.46 , $P < 0.05$),下调iNOS mRNA表达(SNP: 2.35 ± 0.34 vs 3.1 ± 0.38 , $P < 0.05$)以及TNF- α (0.38 ± 0.034 , 0.45 ± 0.043 μ g/L vs 0.76 ± 0.045 μ g/L)、NO(168.2 ± 0.78 , 146.4 ± 0.59 mmol/L vs 229.3 ± 0.98 mmol/L)的水平,减轻肺组织病理学损伤.而左旋精氨酸组则无明显调节作用.离体实验结果与体内试验一致.

结论:外源性NO可抑制NF- κ B活化,降低iNOS mRNA的表达,进而减少NO、TNF- α 的释放.同样,经iNOS选择性抑制剂抑制内源性NO的产生,也可控制机体的过度炎症反应.

关键词:核因子- κ B; 一氧化氮; 急性肺损伤; 急性重症胰腺炎; 诱生性一氧化氮合酶

李海龙, 陈海龙, 张波, 贺雪梅, 徐宏, 范奇. 一氧化氮对急性肺损伤发病过程中核因子- κ B活化的调节作用. 世界华人消化杂志 2006;14(3):273-279

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/273.asp>

0 引言

NO是一种内皮衍生的血管舒张因子,他参与细胞内信号传导,具有舒张动脉、降低血小板黏滞性和抗炎作用,但过量NO及其代谢产物则可致机体损伤^[1-4].诱生性一氧化氮合酶(iNOS)属于NOS的一种,只有在病理条件下才出现,其产生的NO不但量大,而且作用持久,对机体有损害^[5-8].NF- κ B是一种可以调控多种炎症因子基因表达的核因子,他在急性胰腺炎急性肺损伤中

的作用已经成为研究方面的热点^[9-12].故我们分别从离体细胞和大鼠模型两方面,观察外源性NO、NO的前体和iNOS选择性抑制剂对NF- κ B活化和相关炎症因子释放的影响,以进一步探讨NO调节作用的确切机制,为临床治疗提供新的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 低温冷冻超速离心机,日本;PCR仪,美国;凝胶扫描分析系统,美国;垂直电泳槽、电泳仪、凝胶干燥仪,美国BIO-RAO;电热真空干燥箱,日本;二氧化碳培养箱,美国;北京中山TNF- α 放免检测试剂盒;南京建成NO和NOS检测盒;日本Takara公司总RNA提取及PCR扩增试剂盒,所用PCR引物由Takara公司合成,iNOS引物:5'-GTG TTC CAC CAG GAG ATG TTG-3'(上游),5'-CTC CTG CCC ACT GAG TTC GTC-3'(下游),扩增产物长576 bp; β -actin引物:5'-GTT CGC CAT GGA TGA CGA TAT C-3'(上游),5'-GCC AGA TCT TCT CCA TGT CGT C-3'(下游),扩增产物长265 bp;二硫苏糖醇(DTT),NP-40,苯甲基磺酰氟(PMSF),Sigma公司; P^{50} 、 P^{65} 多克隆抗体(Santa Cruz USA); $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (北京亚辉);含通用 κ B序列的双链寡核苷酸探针:5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'(P₁);3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'(P₂).核因子- κ B活性检测试剂盒(Promega公司).

健康SD大鼠,体质量180-220 g,♂(由大连医科大学实验动物中心提供).随机分为:假手术组、模型组、硝普钠组、左旋精氨酸组、氨基胍组,每组6只.

1.2 方法

1.2.1 模型制备 参照文献[13]方法进行.术前动物禁食12 h,自由饮水,用40 g/L水合氯醛(7.5 mL/kg)腹腔注射麻醉.无菌条件下,腹壁正中切口入腹,显露出十二指肠乳头开口,在十二指肠乳头对侧肠壁插入1 mL小注射器针头经胆胰管十二指肠乳头开口入胆胰管,同时在胆管出肝门处用小动脉夹夹闭,逆行注入15 g/L去氧胆酸钠(1 mL/kg),30 s注完,对照组则开腹后翻动胰腺数次,关腹.大鼠稍有活动即行治疗,硝普钠组、左旋精氨酸组、氨基胍组治疗剂量均为0.5 mg/100 g.各治疗组于造模后立即一次和造模后12 h 2次给药,24 h后采取标本做病理检查和各项指标检测.

1.2.2 造模后大鼠支气管肺泡灌洗分离肺泡巨

噬细胞 参照文献[14]方法进行. 大鼠用40 g/L水合氯醛(7.5 mL/kg, ip)麻醉, 放血活杀, 将PBS(37℃)进行支气管肺泡灌洗共3次, 4 mL/次. 收集支气管肺泡灌洗液, 800 r/min离心, 4℃, 10 min. PBS洗涤细胞3次, 悬于DMEM(含100 mL/L小牛血清)中. 将细胞于24孔培养板, 培养37℃, 50 mL/L CO₂, 1 h, PBS洗涤细胞, 去除未贴壁的非肺泡巨噬细胞, 换新的无血清RPMI 1640培养液(贴壁细胞瑞氏染色纯度90%, 台盼蓝计数活细胞率95%)调至细胞浓度 1×10^6 /L, 孵育箱中培养6 h, 检测上清液中TNF- α 和NO. 细胞用于检测iNOS、iNOS mRNA及NF- κ B活性.

1.2.3 离体肺泡巨噬细胞的体外实验 分离纯化的肺泡巨噬细胞以 5×10^5 的细胞浓度, 接种于24孔培养板. 加入脂多糖(LPS)和各种药物, 分为对照组、刺激组(LPS 10 mg/L)、硝普钠组(LPS+硝普钠, 2 mmol/L)、左旋精氨酸组(LPS+左旋精氨酸, 2 mmol/L)、氨基胍组(LPS+氨基胍, 2 mmol/L), 于作用后3, 5, 6和24 h分别检测NF- κ B活性、iNOS mRNA含量、TNF- α 浓度和NO含量.

1.2.4 RT-PCR 分离后的肺泡巨噬细胞用日本Takara公司总RNA提取试剂盒提取细胞中的总RNA, 以紫外分光光度计测定 $A_{260} : A_{280}$ 比值, 重复3次, 测得该比值稳定于1.8-2.0, 计算总RNA浓度. 取1 μ g总RNA, 依次加入 $5 \times$ Buffer(250 mmol/L Tris-HCl, 250 mmol/L KCl, 20 mmol/L MgCl₂, 50 mmol/L DTT), dNTPMixture, AMV, RNase inhibitor, Random Primer, 以DEPC水补至总反应体积为20 μ L, 逆转录的反应温度分别为30℃, 42℃和95℃, 反应时间分别为10, 30, 5 min, 循环一次, 结束反应. 取3 μ L反转录产物, 分别加入dNTP, 20 pmol寡核苷酸引物, Taq DNA聚合酶, $10 \times$ 缓冲液, 去离子水补至15 μ L, PCR反应的变性、退火和延伸温度分别为: 94℃, 55℃和72℃, 反应时间分别为45, 55 s和1 min, 循环35次后, 72℃延伸10 min. 产物取10 μ L, 8 g/L琼脂糖凝胶电泳. 经凝胶扫描分析系统行吸光度扫描, 计算iNOS基因表达量与 β -actin表达量的比值.

1.2.5 肺泡巨噬细胞核蛋白的提取 参照文献[15]方法进行. 倒去细胞培养液, 用PBS洗两次, 用刮板将细胞刮下, 收集于适当体积离心管, 4℃离心5 min, 使细胞沉淀, 弃上清, 加入200 μ L冷缓冲液A(10 mmol/L HEPES-KOH pH 7.9, 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L

dithiothreitol, 0.2 mmol/L PMSF), 冰浴10 min, 振荡10 s, 混匀, 离心10 s, 上清即为胞质提取物, 分装后-70℃保存. 沉淀中加入20 μ L冷缓冲液B(20 mmol/L HEPES-KOH pH 7.9, 250 mL/L glycerol, 420 mmol/L NaCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L dithiothreitol, 0.2 mmol/L PMSF), 冰浴20 min. 4℃离心2 min, 弃沉淀. 上清即为核提取物, 分装后-80℃保存.

1.2.6 凝胶电泳迁移率实验 参照文献[16]方法进行. 取2 μ L含通用 κ B序列的双链寡核苷酸探针, 依次加入 $[\gamma$ -³²P]dATP, T4 Polynucleotide kinase $10 \times$ Buffer, T4 Polynucleotide Kinase, Nuclease-Free Water, 总体积16 μ L. 反应10 min后, 通过G-25 spin-column去除游离的³²P. 取5 μ g细胞抽提液, 依次加入电泳 $5 \times$ Buffer、Nuclease-Free Water、2 μ L标记探针, 在结合缓冲液中充分结合后, 进行60 g/L非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束凝胶在干燥仪中烘干, -80℃放射自显影24 h. 经凝胶扫描分析系统行吸光度扫描, 计算核因子- κ B的活性值.

1.2.7 TNF- α 、NO和iNOS的检测方法 测定采用放免法, 单位 μ g/L; NO和iNOS测定采用南京建成检测试剂盒, 单位mmol/L和mmol/g pro.

统计学处理 数据采用SPSS 10.0统计软件分析, 以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 各组之间比较采用方差分析和 q 检验.

2 结果

2.1 大鼠外周血、肺泡灌洗液及肺泡巨噬细胞中TNF- α 、NO、iNOS的检测结果 造模后24 h, 采取标本检测发现, 模型组血清和肺泡灌洗液中TNF- α 、NO及肺泡巨噬细胞内iNOS蛋白水平显著高于假手术组($P < 0.01$); 除左旋精氨酸组外, 分别给予硝普钠和氨基胍治疗后, TNF- α (表1)、NO(表1)及iNOS蛋白(表3)的表达与模型组相比明显降低($P < 0.05$). 同时, 经分离纯化正常大鼠肺泡巨噬细胞, 并离体培养给予LPS刺激后, 检测培养上清中TNF- α (表2)、NO(表2)水平及细胞内iNOS蛋白发现都显著高于对照组($P < 0.01$); 除左旋精氨酸组外, 硝普钠和氨基胍处理组上述炎症介质的表达也都出现不同程度的减低. 炎症时, 由于诱生性一氧化氮合酶的活化导致了大量内源性NO的产生, 而后者对机体有明显的损害作用. 因此, 我们对iNOS mRNA表达的情况进行了检测. 实验中发现, 模型组和经体外LPS刺激的肺泡巨噬细胞中iNOS mRNA

■ 相关报道

- 1 Abraham E. NF- κ B activation. *Crit Care Med* 2000; 28: N100-N104
- 2 Marriott HM, Ali F, Read RC, Mitchell TJ, Whyte MK, Dockrell DH. Nitric oxide levels regulate macrophage commitment to apoptosis or necrosis during pneumococcal infection. *FASEB J* 2004; 18: 1126-1128
- 3 Mehta S. The effects of nitric oxide in acute lung injury. *Vascul Pharmacol* 2005; 43: 390-403

■创新盘点

目前关于NO的正反两方面的认识,其原因是由于内源性NO与外源性NO作用的不同而引起的。而内、外源性NO在机体内的信号识别系统和信号传导途径也各不相同,就决定了二者功能上的差异。

表 1 造模后大鼠血清和BALF中TNF- α 、NO水平

组别	n	TNF- α (μ g/L)		NO (mmol/L)	
		血清	BALF	血清	BALF
假手术组	6	0.86 $\pm$ 0.13	0.12 $\pm$ 0.06	91.75 $\pm$ 0.97	464.29 $\pm$ 1.32
模型组	6	2.34 $\pm$ 0.53 ^b	1.19 $\pm$ 0.13 ^b	308.24 $\pm$ 25.20 ^b	720.71 $\pm$ 15.68 ^b
硝普钠组	6	1.56 $\pm$ 0.42 ^a	0.46 $\pm$ 0.25 ^a	174.23 $\pm$ 3.71 ^a	592.14 $\pm$ 1.72 ^a
左旋精氨酸组	6	2.25 $\pm$ 0.62	1.08 $\pm$ 0.21	286.08 $\pm$ 6.25	687.14 $\pm$ 7.65
氨基胍组	6	1.68 $\pm$ 0.37 ^a	0.52 $\pm$ 0.32 ^a	185.23 $\pm$ 4.58 ^a	542.14 $\pm$ 2.58 ^a

^a P <0.05 vs 模型组; ^b P <0.01 vs 假手术组。

表 2 离体细胞经LPS刺激后TNF- α 、NO水平

组别	n	TNF- α (μ g/L)	NO (mmol/L)
对照组	6	0.02 $\pm$ 0.004	54.7 $\pm$ 0.88
刺激组	6	0.76 $\pm$ 0.045 ^b	229.3 $\pm$ 0.98 ^b
硝普钠组	6	0.38 $\pm$ 0.034 ^a	168.2 $\pm$ 0.78 ^a
左旋精氨酸组	6	0.75 $\pm$ 0.052	220.5 $\pm$ 0.43
氨基胍组	6	0.45 $\pm$ 0.043 ^a	146.4 $\pm$ 0.59 ^a

^a P <0.05 vs 刺激组; ^b P <0.01 vs 对照组。

表达比对照组均显著升高(P <0.01); 给予硝普钠治疗后, 其表达情况受到明显抑制(P <0.05), 而左旋精氨酸组和氨基胍则没有显著的调节作用(表3)。

2.2 肺泡巨噬细胞中NF- κ B活性的检测 众所周知, 炎症过程中iNOS的表达以及多种细胞因子的大量产生都是与NF- κ B活化密切相关的。随后, 应用凝胶电泳迁移率实验的方法我们检测了NF- κ B的活化情况, 证实NF- κ B的活性状态与TNF- α 、NO及iNOS的表达呈现明显正相关。当给予外源性NO或是iNOS选择性抑制剂氨基胍后, 上述炎症相关指标均出现不同程度的降低, 并且在大鼠模型和体外实验都得到了相同的结论(表4)。

2.3 肺损伤的指标 造模后24 h, 采取大鼠肺组织分别进行肺损伤相应指标的检测和制作石蜡切片行病理检查。结果显示, 模型组肺组织病理损害显著, 肺损伤程度重, 肺间质高度充血, 大部肺泡间明显增宽, 肺泡腔部分融合成肺大泡, 部分萎缩; 肺间质大量中性粒细胞浸润, 由以小静脉和小支气管上皮细胞脱落, 腔内有红细胞, 可见微血栓形成。硝普钠和氨基胍治疗后, 可不同程度的减轻其受损程度(表5)(图1)。

3 讨论

目前, 关于NO和NOS在ALI的发病过程中的作

用尚存争议。由于NO与损伤机制的多个环节有关, 因此其作用表现为“双刃剑”^[1,2]。一方面, NO具有调节血管张力、炎性细胞与内皮细胞间的相互作用, 减少血小板聚集, 抑制血小板、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞与内皮细胞的黏附, 还抑制中性粒细胞在肺组织聚集, 维护肺血管内皮依赖性舒张功能^[17-19], 能抑制中性粒迁移并在减轻急性肺损伤时起有益作用。但是, 另有研究发现, 在脓毒血症并发急性肺损伤时, 许多类型的肺细胞iNOS表达, 产生大量的NO使肺损伤加重或在肺损伤的发病过程中起重要作用。注入iNOS抑制剂可减轻由内毒素血症导致的肺损伤和微血管渗漏, 因而认为NO和iNOS是有害的^[20-25]。另据研究表明, 在缺乏iNOS基因的大鼠肺损伤较轻, 证明由iNOS表达产生大量的内源性NO是导致肺损伤的主要发病机制^[26-29]。近来研究揭示了三型NOS的基因定位, 并提出了由cNOS合成的NO在正常机体就存在, 主要起生理调节作用, 对机体有益; 而由炎性因子LPS活化巨噬细胞后产生的iNOS, 进而合成的大量NO则对机体有害, 可加重肺损伤^[2]。NO是炎症反应中炎性介质瀑布连锁反应的最终共同介质之一, 也是导致感染性休克的关键介质。国外研究表明, 核因子- κ B(NF- κ B)在急性肺损伤的发病过程中, 可以启动多种炎性因子、炎症介质的基因表达, 是全身炎症反应过度失控的关键环节^[30-32]。

基于以上关于NO作用的不同认识, 我们采用经胰管逆行注入去氧胆酸钠复制大鼠急性重症胰腺炎急性肺损伤大鼠模型和经LPS刺激肺泡巨噬细胞复制离体情况的途径, 并分别给予NO的供体硝普钠(SNP)、NO的前体左旋精氨酸(L-Arg)及iNOS选择性抑制剂氨基胍(AG)处理。结果发现, 外源性NO可以明显抑制NF- κ B活化、降低iNOS mRNA的表达、减少NO、

■应用要点

基于此方面的大量基础及临床研究, 深入细致地阐明抑制内源性NO产生的机体损害和合理的应用外源性NO对调节肺血管张力等的有益作用机制, 将会成为今后临床研究的重点和关键环节。

表 3 肺泡巨噬细胞中iNOS及iNOS mRNA表达水平

组别	n	iNOS含量		iNOS mRNA水平	
		造模后	离体刺激	造模后	离体刺激
假手术组/对照组	6	3.018 ± 0.019	1.755 ± 0.26	0.851 ± 0.17	0.214 6 ± 0.09
模型组/刺激组	6	4.329 ± 0.025 ^b	9.89 ± 0.56 ^b	3.1 ± 0.38 ^b	1.55 ± 0.11 ^b
硝普钠组	6	3.173 ± 0.023 ^a	6.04 ± 0.22 ^a	2.35 ± 0.34 ^a	1.07 ± 0.12 ^a
左旋精氨酸组	6	4.063 ± 0.052	9.46 ± 0.35	3.03 ± 0.40	1.54 ± 0.15
氨基胍组	6	4.151 ± 0.021	9.37 ± 0.13	3.06 ± 0.27	1.46 ± 0.23

^aP<0.05 vs 模型组/刺激组; ^bP<0.01 vs 假手术组/对照组.表 4 大鼠肺泡巨噬细胞中NF- κ B活性

组别	n	NF- κ B活性	
		造模后	离体刺激
假手术组/对照组	6	45.18 ± 5.32	39.75 ± 10.15
模型组/刺激组	6	327.13 ± 13.46 ^b	279.40 ± 32.75 ^b
硝普钠组	6	213.47 ± 12.34 ^a	144.52 ± 35.7 ^a
左旋精氨酸组	6	322.48 ± 20.18	274.38 ± 25.1
氨基胍组	6	222.98 ± 17.69 ^a	146.56 ± 17.2 ^a

^aP<0.05 vs 模型组/刺激组; ^bP<0.01 vs 假手术组/对照组.

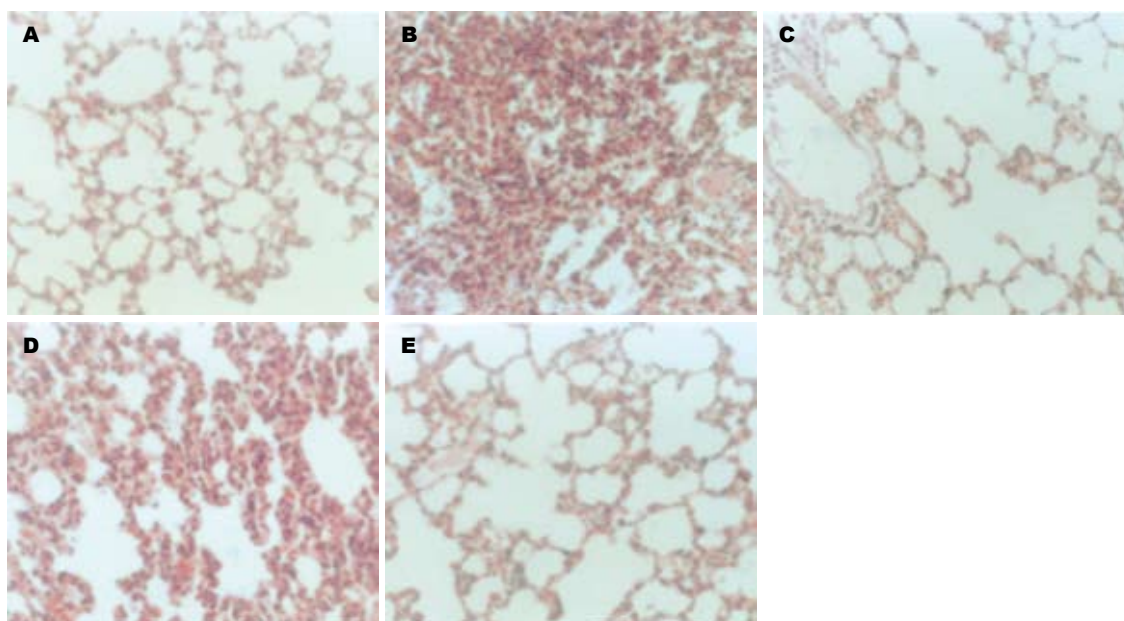
表 5 大鼠肺组织湿/干比值和肺泡通透性指数的变化

组别	n	肺组织湿/干比值	肺泡通透性指数
假手术组	6	1.082 ± 0.13	0.294 ± 0.06
模型组	6	1.931 ± 0.24 ^b	1.177 ± 0.57 ^b
硝普钠组	6	1.73 ± 0.18 ^a	0.515 ± 0.19 ^a
左旋精氨酸组	6	1.925 ± 0.12	1.049 ± 0.26
氨基胍组	6	1.76 ± 0.099 ^a	0.527 ± 0.17 ^a

^aP<0.05 vs 模型组; ^bP<0.01 vs 假手术组.

■名词解释

急性肺损伤: 是急性呼吸窘迫综合征的早期阶段, 其诊断标准为: 急性起病; 氧合指数 ≤ 40 kPa(无论PaCO₂是否正常或是否应用呼气末正压通气); 肺部X线片显示有双肺弥漫性浸润; PCWP ≤ 18 mmHg或无心源性肺水肿的临床证据; 存在诱发ARDS的危险因素.

图 1 大鼠肺组织病理变化 (HE染色, $\times 10$). A: 假手术组; B: 模型组; C: 硝普钠组; D: L-精氨酸组; E: 氨基胍组.

TNF- α 的释放, 减轻模型大鼠的肺组织的病理损害. 同时, 外源性NO还可以降低经LPS刺激活化离体培养肺泡巨噬细胞中的NF- κ B活性, 减轻上述指标的水平. 这说明外源性NO对机体是有益的. 而且Raychaudhuri *et al*^[33]的研究表明, NO可以通过多个环节产生影响作用. 本实验中, 给予iNOS选择性抑制剂氨基胍(AG)后, 可明显抑制内源性NO的释放, 降低由于内源性NO引发

的NF- κ B活化上调. 但氨基胍对iNOS mRNA的表达无影响, iNOS蛋白的生成也无变化. 说明氨基胍只能影响经iNOS催化生成的大量NO, 对iNOS的基因表达无作用, 但由于内源性NO显著下降, NF- κ B的继续活化受到控制, 进而减轻了肺组织的进一步损伤. 而给予NO的前体左旋精氨酸后, 由于NF- κ B活化导致iNOS mRNA高表达, 可经iNOS催化生成大量NO, 后者对机体可

同行评价

本文方法科学, 统计学合理, 结果可靠, 结论合理, 整篇文章有一定的独创性和新颖性, 可读性良好。

产生过氧化损伤等多种损害, 本实验的结果也恰恰证实了这一点。

我们认为, 目前关于NO的正反两方面的认识, 其原因是由于内源性NO与外源性NO作用的不同而引起的。而内、外源性NO在机体内的信号识别系统和信号传导途径也各不相同, 就决定了二者功能上的差异。那么如何能有效的抑制内源性NO产生的机体损害和合理的应用外源性NO对调节肺血管张力等的有益作用将会成为今后临床研究的重点和关键环节。

参考文献

- Chen Y, Yang L, Lee TJ. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 1445-1457
- Harinantenaina L, Quang DN, Takeshi N, Hashimoto T, Kohchi C, Soma G, Asakawa Y. Bis(benzyls) from liverworts inhibit lipopolysaccharide-induced inducible NOS in RAW 264.7 cells: a study of structure-activity relationships and molecular mechanism. *J Nat Prod* 2005; 68: 1779-1781
- Chen LW, Chang WJ, Wang JS, Hsu CM. Thermal injury-induced peroxynitrite production and pulmonary inducible nitric oxide synthase expression depend on JNK/AP-1 signaling. *Crit Care Med* 2006; 34: 142-150
- Kim SF, Huri DA, Snyder SH. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science* 2005; 310: 1966-1970
- Wang CC, Huang YJ, Chen LG, Lee LT, Yang LL. Inducible nitric oxide synthase inhibitors of Chinese herbs III. *Rheum palmatum*. *Planta Med* 2002; 68: 869-874
- Karuri AR, Huang Y, Bodreddigari S, Sutter CH, Roebuck BD, Kensler TW, Sutter TR. 31,2-Dithiole-3-thione targets nuclear factor {kappa}B to block expression of inducible nitric oxide synthase, prevents hypotension, and improves survival in endotoxemic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2005
- Baumgarten G, Knuefermann P, Schuhmacher G, Vervolgyi V, von Rappard J, Dreiner U, Fink K, Djoufack C, Hoeft A, Grohe C, Knowlton AA, Meyer R. Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock* 2006; 25: 43-49
- Schaue D, Jahns J, Hildebrandt G, Trott KR. Radiation treatment of acute inflammation in mice. *Int J Radiat Biol* 2005; 81: 657-667
- Grigoryev DN, Finigan JH, Hassoun P, Garcia JG. Science review: searching for gene candidates in acute lung injury. *Crit Care* 2004; 8: 440-447
- Abraham E. NF-kappaB activation. *Crit Care Med* 2000; 28: N100-N104
- Puneet P, Moomchala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L3-L15
- Schwartz MD, Moore EE, Moore FA, Shenkar R, Moine P, Haenel JB, Abraham E. Nuclear factor-kappa B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 1996; 24: 1285-1292
- 李海龙, 陈海龙, 张波. 清胰汤对急性胰腺炎时急性肺损伤防治作用的实验研究. *中华中西医临床杂志* 2003; 3: 1480-1483
- Pheng LH, Francoeur C, Denis M. The involvement of nitric oxide in a mouse model of adult respiratory distress syndrome. *Inflammation* 1995; 19: 599-610
- Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 6419
- Peng HB, Libby P, Liao JK. Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem* 1995; 270: 14214-14219
- Lundin S, Mang H, Smithies M, Stenqvist O, Frostell C. Inhalation of nitric oxide in acute lung injury: results of a European multicentre study. The European Study Group of Inhaled Nitric Oxide. *Intensive Care Med* 1999; 25: 911-919
- 姜勇. 内毒素激活内皮细胞的信号机制的研究进展. *中华医学杂志* 1999; 79: 76-79
- Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutsky J. Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes *in vitro*. *Am J Pathol* 1998; 153: 17-23
- Bloomfield GL, Holloway S, Ridings PC, Fisher BJ, Blocher CR, Sholley M, Bunch T, Sugerman HJ, Fowler AA. Pretreatment with inhaled nitric oxide inhibits neutrophil migration and oxidative activity resulting in attenuated sepsis-induced acute lung injury. *Crit Care Med* 1997; 25: 584-593
- Chakraborty PD, Bhattacharyya D, Pal S, Ali N. *In vitro* induction of nitric oxide by mouse peritoneal macrophages treated with human placental extract. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 100-107
- Mehta S. The effects of nitric oxide in acute lung injury. *Vascul Pharmacol* 2005; 43: 390-403
- Banan A, Zhang LJ, Shaikh M, Fields JZ, Farhadi A, Keshavarzian A. Novel effect of NF-kappaB activation: carbonylation and nitration injury to cytoskeleton and disruption of monolayer barrier in intestinal epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C1139-C1151
- Marriott HM, Ali F, Read RC, Mitchell TJ, Whyte MK, Dockrell DH. Nitric oxide levels regulate macrophage commitment to apoptosis or necrosis during pneumococcal infection. *FASEB J* 2004; 18: 1126-1128
- Lu MP, Du LZ, Gu WZ, Chen XX. Nitric oxide inhalation inhibits inducible nitric oxide synthase but not nitrotyrosine formation and cell apoptosis in rat lungs with meconium-induced injury. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 1123-1129
- Iuvone T, D'Acquisto F, Carnuccio R, Di Rosa M. Nitric oxide inhibits LPS-induced tumor necrosis factor synthesis *in vitro* and *in vivo*. *Life Sci* 1996; 59: PL207-PL211
- Razavi HM, Wang le F, Weicker S, Rohan M, Law C, McCormack DG, Mehta S. Pulmonary neutrophil infiltration in murine sepsis: role of inducible nitric oxide synthase. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 227-233
- Kaur G, Hamid H, Ali A, Alam MS, Athar M. Anti-

- inflammatory evaluation of alcoholic extract of galls of *Quercus infectoria*. *J Ethnopharmacol* 2004; 90: 285-292
- 29 Hashimoto N, Kawabe T, Imaizumi K, Hara T, Okamoto M, Kojima K, Shimokata K, Hasegawa Y. CD40 plays a crucial role in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30: 808-815
- 30 Mikawa K, Nishina K, Takao Y, Obara H. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits. *Anesth Analg* 2003; 97: 1751-1755
- 31 Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, Sato M, Shimada A, Morita T, Sawada M, Nakamura K, Sanbongi C, Yoshikawa T. Protective role of metallothionein in acute lung injury induced by bacterial endotoxin. *Thorax* 2004; 59: 1057-1062
- 32 Jeyaseelan S, Chu HW, Young SK, Worthen GS. Transcriptional profiling of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Infect Immun* 2004; 72: 7247-7256
- 33 Raychaudhuri B, Dweik R, Connors MJ, Buhrow L, Malur A, Drazba J, Arroliga AC, Erzurum SC, Kavuru MS, Thomassen MJ. Nitric oxide blocks nuclear factor-kappaB activation in alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21: 311-316

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

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

•消息•

《世界华人消化杂志》欢迎投稿

本刊讯 《世界华人消化杂志》2006年重点报道消化内科, 肝、胆、胰、胃肠外科, 介入、中医、中西医结合治疗, 内镜, 护理, 医学影像, 检验, 预防医学, 误诊误治, 康复, 微创, 肿瘤等相关内容的文章. 欢迎各位踊跃投稿, 促进我国消化临床研究的快速发展. 为适应我国消化病学研究领域的飞速发展, 从2006-01-01起《世界华人消化杂志》改为旬刊出版发行, 160页, 每月8、18、28出版.

2006年, 《世界华人消化杂志》在线办公系统正式开通(<http://www.wjgnet.com/wjg/index.jsp>), 从投稿到出版所有环节一律在网上实现, 将会大大缩短从投稿到出版的时间.

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 我们对所有来稿均进行同行评议. 采用匿名方式, 通常每篇文章邀请3位专家进行同行评议. 至少二位同行评议人通过为录用, 否则为退稿. 每期的最后一页致谢本期所有的同行评议人(包括退稿). 每期在印刷版和电子版固定位置刊登全体《世界华人消化杂志》的同行评议专家的名单.

据中国科技期刊引证报告(潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 1-304)统计, 《世界华人消化杂志》2004年发表文章834篇, 地区分布28个, 机构分布255个, 基金论文比43%, 总被引频次3 353次, 影响因子1.769, 即年指标0.211, 引用期刊数229种, 被引半衰期2.8. 中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》定期公布收录的中国科技论文统计源期刊的10个科学计量指标, 并根据此指标评选出中国百种杰出学术期刊. 《世界华人消化杂志》获得2001年和2003年中国百种杰出学术期刊.

据《中文核心期刊要目总览2004年版》(戴龙基, 蔡蓉华主编. 北京: 北京大学出版社, 2004: 1-678), 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等7个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库有51种, 统计到的文献数量共计9 435 301篇次, 涉及期刊39 893种次. 参加核心期刊评审的学科专家达1 873位. 经过定量筛选和专家定性评审, 从中国正在出版的近1万2千种中文期刊中评选出1 800种核心期刊. 《世界华人消化杂志》入选中文核心期刊要目总览.

《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录. 2005年, 《世界华人消化杂志》正式向The National Library of Medicine for MEDLINE递交申请, 计划在2006年初进入MEDLINE, 以进一步实现国际索引.

总之, 《世界华人消化杂志》将始终贯彻质量第一的方针, 满足广大作者和读者的需求. 在此, 我们热烈欢迎再次投稿.

RT-PCR 寻找大肠癌患者外周血早期分子标记物的研究

杜雅菊, 刘晓璐, 金英敏, 曲波, 李宝杰

■背景资料

早期大肠癌预后较好, 因此在无症状人群中筛查大肠癌患者, 是大肠癌重要防治策略之一。有学者提出, 在患者外周血中寻找分子标记物可能成为易被接受的大肠癌早期检测手段。本文应用RT-PCR的方法, 检测大肠癌患者外周血中CK-20, GST- π , hTERT, Survivin及Skp2的mRNA表达, 以探求大肠癌患者外周血的早期分子标记物。

杜雅菊, 刘晓璐, 金英敏, 曲波, 李宝杰, 哈尔滨医科大学附属二院消化科, 黑龙江省哈尔滨市 150086

杜雅菊, 女, 1964-09-25生, 黑龙江省哈尔滨市人, 汉族, 2003年哈尔滨医科大学消化专业博士, 副主任医师, 主要从事肿瘤临床及基础研究。

黑龙江省科学技术厅攻关项目, No. GB02C146-01

通讯作者: 杜雅菊, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路246号, 哈尔滨医科大学附属二院消化科, duyaju@medmail.com.cn

电话: 0451-86605143 89576751

收稿日期: 2005-11-15 接受日期: 2005-11-24

Investigation of molecular tumor markers in peripheral blood for early diagnosis of large intestinal carcinoma patients using RT-PCR technique

Ya-Ju Du, Xiao-Jun Liu, Ying-Min Jin, Bo Qu, Bao-Jie Li

Ya-Ju Du, Xiao-Jun Liu, Ying-Min Jin, Bo Qu, Bao-Jie Li, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by the Project of Science and Technology Department of Heilongjiang Province, No. GB02C146-01

Correspondence to: Ya-Ju Du, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. duyaju@medmail.com.cn

Received: 2005-11-15 Accepted: 2005-11-24

Abstract

AIM: To search for molecular tumor markers in the peripheral blood from patient with early stage of large intestinal carcinoma, and to offer early, reliable and simple methods for the early diagnosis of large intestinal carcinoma.

METHODS: The expression of CK-20, GST- π , hTERT, survivin and skp2 mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in the peripheral blood from patients with large intestinal carcinoma ($n = 28$), adenoma accompanied by moderate and severe atypical hyperplasia ($n = 8$), adenoma accompanied by light atypical hyperplasia ($n = 18$), and inflammatory polypus ($n = 11$) as well as normal controls ($n = 10$).

RESULTS: The positive rate of hTERT mRNA expression was 82.1% (23/28), 87.5% (7/8), 27.8% (5/11), 9.1% (1/11), and 10% (1/10) in large intestinal carcinoma, adenoma accompanied by moderate and severe atypical hyperplasia, adenoma accompanied by light atypical hyperplasia, inflammatory polypus and normal controls, respectively, and there existed significant differences between the former two and the latter three ($P < 0.05$). The positive rate of survivin mRNA expression was 64.2% (18/28), 50% (4/8), and 11.1% (2/18) in large intestinal carcinoma, adenoma accompanied by moderate and severe atypical hyperplasia, and adenoma accompanied by light atypical hyperplasia, respectively, and there was no significant difference between the former two, while there existed marked differences between and former two and the latter ($P < 0.05$). The expression of survivin mRNA was not found in inflammatory polypus and normal controls. There were no significant differences between all the groups in the expression of CK-20, GST- π , and skp2 mRNA (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: It is meaningful to detect the expression of hTERT and survivin mRNA in peripheral blood using RT-PCR technique for early diagnosis of large intestinal carcinoma, and hTERT and survivin may be the molecular tumor markers for early diagnosis.

Key Words: RT-PCR; Molecular tumor marker; Early diagnosis; Peripheral blood; Carcinoma of large intestine

Du YJ, Liu XJ, Jin YM, Qu B, Li BJ. Investigation of molecular tumor markers in peripheral blood for early diagnosis of large intestinal carcinoma patients using RT-PCR technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(3):280-286

摘要

目的: 探求大肠癌患者早期诊断的外周血分子标记物, 为大肠癌临床筛查提供早期、可靠、简便易行的有效方法。

方法: 采用RT-PCR检测28例大肠癌、8例腺

瘤中重度不典型增生、18例腺瘤轻度不典型增生、11例炎性息肉患者和10例正常对照者的外周血中CK-20, GST- π , hTERT, survivin及skp2的mRNA表达情况。

结果: 大肠癌、腺瘤中重度不典型增生、腺瘤轻度不典型增生、炎性息肉组和正常对照组hTERT mRNA表达的阳性率分别为82.1%(23/28)、87.5%(7/8)、27.8%(5/11)、9.1%(1/11)、10%(1/10), 大肠癌组及腺瘤中重度不典型增生组与其他各组之间差别显著($P<0.05$); survivin mRNA在大肠癌、腺瘤中重度不典型增生组、腺瘤轻度不典型增生组的阳性率分别是64.2%(18/28)、50%(4/8)、11.1%(2/18), 炎性息肉组及正常组未见表达, 大肠癌组与腺瘤中重度不典型增生组无差别, 与腺瘤轻度不典型增生组、炎性息肉及正常组之间差别显著($P<0.05$); 而CK-20, GST- π , skp2 mRNA在各组之间表达无统计学意义(均 $P>0.05$)。

结论: RT-PCR检测大肠癌患者外周血hTERT, survivin mRNA的表达对大肠癌的早期诊断有意义, 可望成为早期诊断的分子标记物。

关键词: RT-PCR; 分子标记物; 早期诊断; 外周血; 大肠癌

杜雅菊, 刘晓璐, 金英敏, 曲波, 李宝杰. RT-PCR寻找大肠癌患者外周血早期分子标记物的研究. 世界华人消化杂志 2006;14(3):280-286

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/280.asp>

0 引言

大肠癌是人类最为主要的恶性肿瘤之一, 其发病率呈逐年上升趋势。早期大肠癌预后较好, 然而早期大肠癌往往无症状或症状不明显, 易被忽视。因此, 在无症状人群中筛检大肠癌, 达到早发现、早诊断、早治疗, 是大肠癌重要防治策略之一。有学者^[1]提出, 在患者外周血中寻找分子标记物可能成为易被接受的大肠癌早期检测手段。我们应用RT-PCR的方法, 检测大肠癌患者外周血中CK-20, GST- π , hTERT, survivin及skp2的mRNA表达, 以探求大肠癌患者外周血的早期分子标记物。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2004/2005哈尔滨医科大学附属二院腔镜中心大肠黏膜活检诊断为: 大肠癌28例(男20例, 女8例, 平均年龄58.6岁)、腺瘤中重度

不典型增生8例(男5例, 女3例, 平均年龄59岁, 重度不典型增生3例)、腺瘤轻度不典型增生18例(男13例, 女5例, 平均年龄56.7岁)、炎性息肉11例(平均年龄39.7岁)、正常黏膜10例(平均年龄32岁, 4例健康志愿者, 6例为肠易激综合征患者), 患者的血样5 mL, 抗凝, 用淋巴细胞分离液分离单核细胞, 提取总RNA, -70°C 保存。淋巴细胞分离液为天津市川页生化制品有限公司产品; TRIZOL[®] Reagent购于Gibco BRL公司; 三氯甲烷、异丙醇分别由北京化工厂和天津市凯通化学试剂公司提供; dNTP, DNA Marker购自宝生物工程(大连)有限公司; M-MLV Reverse Transcriptase, Tag DNA聚合酶为Primerase产品; 引物由上海生工合成。仪器包括冰冻高速离心机, PTC-100热循环仪, GE-100电泳仪, 全自动凝胶成像系统, 紫外分光光度计等。

1.2 方法

1.2.1 病理分型 腺瘤分级采用Morson提出的3级分类法即凡腺瘤均有不典型增生, 在此基础上再分为轻、中、重3级。轻度不典型增生(I级)以细胞学的异型性为主, 腺管内杯状细胞减少, 核呈笔杆状, 紧挤, 复层排列, 但高度不超过细胞的1/2, 腺管稍延长; 中度不典型增生(II级)表现为细胞异型加重并出现组织学异型性, 胞核复层, 占据上皮细胞的2/3, 细胞顶端仍存在, 腺管延长并扭曲, 大小不一, 部分可见共壁及背靠背现象; 重度不典型增生(III级)表现为两种异型均较显著, 胞核复层, 占据整个上皮细胞的胞质, 杯状细胞罕见或消失, 上皮细胞极性紊乱, 腺管延长、扭曲、大小不一, 腺管共壁及背靠背多见, 有的并出现筛状结构。炎性息肉病理特点为肉芽组织形成或有炎性细胞浸润, 表面是正常上皮或再生上皮, 细胞分化良好, 无不典型增生。

1.2.2 总RNA提取 在经淋巴细胞分离液分离所得的单核细胞中, 加入1 mL TRIZOL试剂, 按说明书提取总RNA。10 g/L琼脂糖凝胶电泳显示28 s和18 s亚基; 紫外分光光度计测定总RNA含量及纯度, A_{260}/A_{280} 比值为1.8-2.0, 说明提取RNA质量较好。

1.2.3 cDNA合成 反应体系: $5\times\text{Buffer}$ 5 μL , dNTP(2.5 mmol/L) 5 μL , OligodT(10 pmol/L) 1 μL , M-MLV 1 μL , 总RNA 2 μg , DEPC水补足总体积25 μL ; 反应参数: 42°C 1 h, 70°C 15 min。

1.2.4 PCR扩增 参照文献[2-6]设计引物, 并在GenBank上进行核对, 设置 β -actin为阳性参照, 同时设 H_2O 为阴性对照(表1)。CK20第1轮PCR、

■创新盘点

本文应用RT-PCR的方法, 检测大肠癌患者外周血中CK-20, GST- π , hTERT, Survivin及Skp2的mRNA表达, 以探求大肠癌患者外周血的早期分子标记物。

表 1 扩增基因序列

基因	引物序列	扩增片段长度 (bp)
CK20	A: 5'-CAGACACACGGTGAACATATGG-3'	370
	B: 5'-GATCAGCTTCCACTGTTAGACG-3'	
	C: 5'-CTGTTTGTGGCAATGAGAAAATGG-3'	303
	D: 5'-GTATTCCTCTCTCAGTCTCATACT-3'	
GST- π	F: 5'-CAGGAGGGCTCACTCAAAG-3'	354
	R: 5'-CAGGTTGTAGTCAGCGAAG-3'	
hTERT	F: 5'-TTCCTGCACTGGCTGATGAGTGT-3'	329
	R: 5'-CGCTCGGCCCTCTTTCTCTG-3'	
survivin	F: 5'-GGACCACCGCATCTCTACAT-3'	350
	R: 5'-GCACTTTCTTCGCAGTTTCC-3'	
skp2	F: 5'-AGTCTCTATGGCAGACCTTAGACC-3'	500
	R: 5'-TTTCTGGAGATTCTTCTGTAGCC-3'	
β -actin	F: 5'-CGAGAAGATGACCCAGATCA-3'	240
	R: 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATAC-3'	

GST- π 、survivin反应体系: 10×Buffer 2.5 μ L, dNTP(2.5 mmol/L)2 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L)2 μ L, 上、下游引物(10 pmol/L)各1 μ L, Tag DNA聚合酶0.5 μ L, cDNA 2 μ L, 水补足体系至25 μ L; 反应条件: 95℃预变性5 min, 94℃ 45 s, 58℃ 45 s, 72℃ 60 s, 32个循环, 72℃ 7 min. 取CK20第1轮PCR产物2 μ L进行第2轮反应, 体系及条件同上. hTERT反应体系: 10×Buffer 2.5 μ L, dNTP(2.5 mmol/L)2 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L)1.8 μ L, 上、下游引物(10 pmol/L)各0.75 μ L, Tag DNA聚合酶0.4 μ L, cDNA 2 μ L, 水补足体系至25 μ L; 反应条件: 95℃预变性5 min, 94℃ 45 s, 60℃ 45 s, 72℃ 60 s, 32个循环, 72℃ 7 min. skp2、 β -actin反应体系: 10×Buffer 2.5 μ L, dNTP(2.5 mmol/L)2 μ L, $MgCl_2$ (25 mmol/L)2 μ L, 上、下游引物(10 pmol/L)各1 μ L, Tag DNA聚合酶0.5 μ L, cDNA 2 μ L, 水补足体系至25 μ L; 反应条件: 95℃预变性5 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35个循环, 72℃ 10 min. 产物于20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色(10 mg/L)后, 通过凝胶成像系统对目的电泳条带进行分析.

统计学处理 所有数据采用SPSS 10.0软件处理, 采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 外周血CK20 mRNA表达 大肠癌组阳性率为89.3%(25/28), 腺瘤中重度不典型增生组阳性率75%(6/8), 腺瘤轻度不典型增生组阳性率为

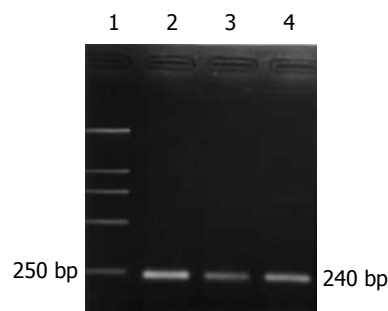
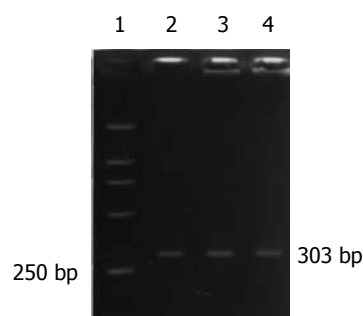
图 1 β -actin.

图 2 CK20 mRNA表达. 1: Marker; 2, 3, 4: 大肠癌患者.

61.1%(11/18), 炎性息肉阳性率为63.6%(7/11), 正常组2例表达($P>0.05$)(表2, 图1, 2).

2.2 外周血GST- π mRNA表达 大肠癌组阳性率为75%(21/28), 腺瘤中重度不典型增生组阳性率是62.5%(5/8), 腺瘤轻度不典型增生组阳性率66.7%(12/18), 炎性息肉组54.5%阳性, 正常组40%表达($P>0.05$)(表2, 图3).

2.3 外周血hTERT mRNA表达 28例大肠癌患者有23例外周血hTERT mRNA表达, 阳性率为82.1%; 腺瘤中重度不典型增生组阳性率为87.5%(7/8); 腺瘤轻度不典型增生组和炎性息肉组阳性表达率分别是27.8%、9.1%; 正常组有1例表达. 大肠癌组及腺瘤中重度不典型增生组与其他各组之间差别显著($P<0.005$)(表2, 图4).

2.4 外周血survivin mRNA表达 大肠癌组阳性率是64.2%(18/28); 腺瘤中重度不典型增生组有4例表达survivin mRNA, 阳性率50%; 腺瘤轻度不典型增生组阳性表达率为11.1%, 炎性息肉组及正常组未见表达, 经统计学分析大肠癌组与腺瘤中重度不典型增生组无差别, 与腺瘤轻度不典型增生、炎性息肉及正常组之间有差别(表2, 图5).

2.5 外周血skp2 mRNA表达 本次实验有53.6%大肠癌患者外周血表达skp2 mRNA, 腺瘤中重度不典型增生及腺瘤轻度不典型增生组阳性率分

表 2 外周血mRNA表达情况

分组	n	CK20		GST- π		hTERT		survivin		skp2	
		阳性数	阳性率 (%)	阳性数	阳性率 (%)	阳性数	阳性率 (%)	阳性数	阳性率 (%)	阳性数	阳性率 (%)
大肠癌	28	25	89.3	21	75	23	82.1	18	64.2	15	53.6
腺瘤中重度不典型增生	8	6	75	5	62.5	7	87.5	4	50	3	37.5
腺瘤轻度不典型增生	18	11	61.1	12	66.7	5	27.8	2	11.1	6	33.3
炎性息肉	11	7	63.6	6	54.5	1	9.1	0	0	3	27.3
正常	10	2	20	4	40	1	10	0	0	3	30

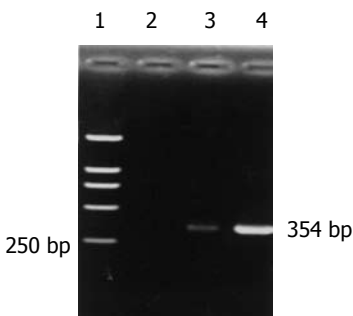


图 3 GST- π mRNA表达. 1: Marker; 2, 3: 正常组; 4: 大肠癌组.

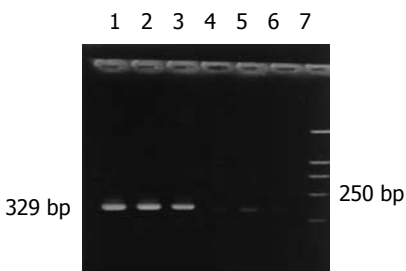


图 4 hTERT mRNA表达. 1, 2: 大肠癌; 3: 高级别腺瘤; 4, 5: 低级别腺瘤; 6: 炎性息肉; 7: Marker.

别是37.5%、33.3%, 炎性息肉患者和正常人阳性表达率为27.3%和30%($P>0.05$)(表2, 图6).

3 讨论

大肠癌的发生、发展是一个多步骤、多阶段演进的复杂过程. 国内外学者^[1,7,8]证实在这个过程中伴随着外周血的某些基因表达的变化, 并认为在大肠癌形成过程中这可能是一个早期事件, 对大肠癌的早期诊断有重要意义. 应用RT-PCR可扩增出肿瘤细胞“标志性”靶RNA. 因此, 选择适当的靶RNA是决定检测结果是否准确可靠的重要因素. 作为肿瘤细胞“标志”的靶RNA应具有肿瘤特异性或组织特异性.

细胞角蛋白(cytokeratins, CKs)是分布于上皮细胞的中间纤维, 包含多个成员, CK20 mRNA作为一种组织特异性基因, 首先被Soeth *et al*^[9]

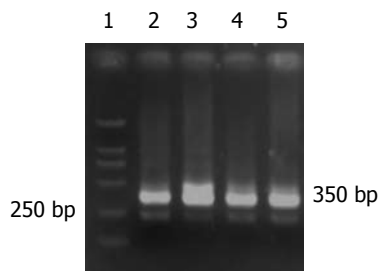


图 5 survivin mRNA表达. 1: Marker; 2, 3, 4, 5: 大肠癌.

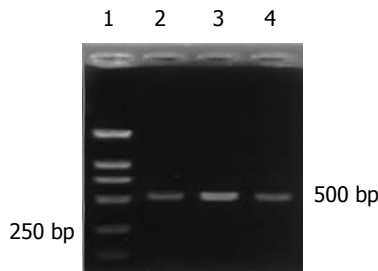


图 6 skp2 mRNA表达. 1: Marker; 2, 3, 4: 大肠癌.

用于检测大肠癌患者骨髓的癌细胞, 且证明具有高度特异性. Funaki *et al*^[10]以CK20 mRNA为靶基因检测外周血中的大肠癌细胞, 认为有较高的灵敏度. Zhang *et al*^[11,12]通过RT-PCR测定了58例大肠癌和47例胃癌患者外周血, 结果单次实验CK20 mRNA阳性率分别为44.8%(26/58)和42.6%(20/47), 重复实验阳性率提高到69.0%和74.5%, 而6例正常人外周血未见表达, 认为用RT-PCR检测外周血胃肠道肿瘤细胞CK20 mRNA表达是敏感的、特异的、方便和可靠的, 具有重要的临床意义. 然而, 我们的实验结果是大肠癌患者外周血CK20 mRNA阳性率为89.3%(25/28), 腺瘤中重度不典型增生阳性率75%(6/8), 腺瘤轻度不典型增生组和炎性息肉组阳性率为61.1%和63.6%, 正常组有2例表达, 并且排除了实验本身问题的干扰. 大肠癌组CK20 mRNA表达与腺瘤中重度不典型增生、腺瘤轻度不典型增生及炎性息肉组之间没有明显差别,

与正常组间有差别. 我们认为CK20作为大肠癌分子标记物的证据不够充分, 但对大肠癌及增生性疾病的监测尚有一定意义. Bustin *et al*^[13]检出健康志愿者, 肠道良性疾病患者和大肠癌患者术前及术后外周血CK20 mRNA全部阳性表达, 因此, 得出CK20作为大肠癌患者监测的分子标记是无意义的, 也不足以成为肠组织特异性指标物的结论. Schuster *et al*^[14]也提出还不能满意区分CK20 mRNA标记信号是来自于肿瘤细胞还是发自血液系统那些非正常转录的造血细胞, 那些被分析的循环肿瘤细胞标记物的单一拷贝数是不足以检测到的, 或更大可能末梢血是不适合检测结肠癌肿瘤细胞的.

谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST)是机体中催化谷胱甘肽(glutathione, GSH)与亲电子物质结合的一类酶系, GST- π 被认为与肿瘤关系最密切. 研究显示^[15]伴有不典型增生的大肠腺瘤及大肠癌组织中GST- π 表达明显高于腺瘤和息肉组, 说明随着肠腺上皮细胞的增生和异型性的明显, 组织内GST- π 也逐渐升高, 认为GST- π 是一种较好的肠癌及癌前病变标志物. 有学者^[16]发现GST- π 蛋白表达在大肠正常黏膜、移行黏膜(transitional mucosa, TM)、癌组织有递增趋势, 可见GST- π 对大肠癌早期诊断的意义. 一般认为GST- π 含量增高与转录水平mRNA表达增高有关, GST- π 受基因控制, 当致癌物作用于机体细胞引起细胞变异时, 同时诱导GST- π 基因表达, 表明GST- π 的表达在转录发生起始阶段就已决定, 故可作为早期癌变的标志酶^[17]. 龙延滨 *et al*^[18]用比色法对结肠癌患者外周血淋巴细胞内GST活性进行测定, 结果表明结肠癌患者外周血淋巴细胞内及癌组织内GST活性不仅较正常组织明显升高, 而且淋巴细胞内与癌组织内GST活性变化呈正相关. 我们用RT-PCR检测大肠癌患者外周血GST- π mRNA表达, 阳性率较其他各组高, 但没有明显差别. 可是, 我们发现正常组4例阳性表达的PCR产物条带强度较弱, 设想应用定量PCR是否有意义将有待进一步研究. 由于GST- π 在体内广泛存在, 缺乏器官组织特异性, 也使在大肠癌诊断中的应用受到限制.

端粒酶(telomerase)是一种核糖核蛋白复合体, 由RNA单链和结合的蛋白成分共同构成, 能以其自身RNA为模板合成端粒的DNA重复序列, 本质属逆转录酶. 人端粒酶至少由3个亚单位组成, 即端粒酶RNA(hTR)、端粒酶相关

蛋白(telomerase associated protein 1, TP1)和端粒酶催化活性亚单位(human telomerase reverse transcriptase, hTERT). 细胞永生化的基础, 引起肿瘤无限增殖的关键是端粒酶的上调和再表达, 而hTERT被认为是端粒酶活性的限制性因素^[19-21]. 国内外研究表明, 端粒酶活力的出现与hTERT的表达有一个近乎平行的关系^[22-25]. 近年实验显示, hTERT与消化道肿瘤关系密切, 并且在癌前病变、癌组织中的表达呈递增趋势, 因此, 推断hTERT的表达是消化道黏膜癌变过程中的早期事件^[26-29]. Lledo *et al*^[30]应用qRT-PCR(real-time quantitative RT-PCR)对50例大肠癌患者和50例健康志愿者外周血血浆hTERT基因表达进行定量分析, 结果差异显著. 此方法用于结直肠癌患者检测的敏感性和特异性分别是98%和64%. 这为结直肠癌的非侵入性诊断提供了新方法. Shin *et al*^[31]用RT-PCR在胃癌患者外周血中检测hTERT mRNA表达, 同样认为外周血hTERT mRNA可以作为胃癌诊断的分子标记物. 本组研究显示, 大肠癌及腺瘤中重度不典型增生患者外周血hTERT mRNA的表达明显高于腺瘤轻度不典型增生、炎症息肉和正常组, 而两者之间没有差别. hTERT mRNA在腺瘤轻度不典型增生组中已有增高, 在腺瘤中重度不典型增生中明显高表达, 进一步证实这是大肠癌发生过程中的一个极早事件. 我们的结论是RT-PCR检测外周血hTERT mRNA表达对大肠癌早期诊断有意义. 我们知道, 在正常人造血细胞及淋巴细胞有一定量的hTERT mRNA表达, 因此, 作为大肠癌细胞分子标记物的证据还不够充分.

生存素(survivin)是新近发现的一种细胞凋亡抑制因子, 主要分布于胚胎及分化未成熟的组织中, 在成人体内除胸腺、生殖腺中有微量表达外, 所有分化成熟的组织, 包括外周血白细胞、淋巴结均无表达. 学者应用免疫组化和PCR检测常见肿瘤的survivin表达, 发现基本存在肿瘤特异性表达的特点, 在恶性肿瘤组织中survivin表达的阳性率为34%-100%不等^[32,33]. survivin的表达在大肠癌的发生中有一定作用, 同时, 也与I-III期大肠癌患者的生存状态显著相关^[34]. 我们观察了28例大肠癌患者, 有18例外周血表达survivin mRNA, 阳性率为64.2%; 腺瘤中重度不典型增生组有50%阳性; 腺瘤轻度不典型增生组阳性率是11.1%; 而炎症息肉组及正常组无survivin mRNA表达, 经统计学分析大肠癌

组与腺瘤中重度不典型增生组无差别, 与腺瘤轻度不典型增生组、炎性息肉及正常组之间差别显著. Kawasaki *et al*^[35]对直肠组织从增生到癌变不同时期标本的survivin表达情况进行研究, 结果发现增生息肉、低度增生不良性腺瘤、高度增生不良性腺瘤、腺癌的survivin表达阳性率分别为0, 2.3%, 52.4%, 63.3%. 可见, survivin在癌组织中的表达是一个渐进的过程, 随着肿瘤细胞恶性程度的增加, 其表达也逐渐升高, 说明survivin具有对肿瘤进行早期诊断的潜在价值. 董燕 *et al*^[36]发现在人外周血活化淋巴细胞有survivin基因的转录激活. 那么, 本组实验大肠癌患者外周血高表达的survivin mRNA是来自于循环肿瘤细胞, 还是来自于肿瘤患者免疫机制启动后被活化的淋巴细胞, 需要进一步验证.

细胞S期激酶相关蛋白2(S-phase kinase associated protein 2, skp2)作为人类F-box蛋白家族的一员, 在许多细胞周期调控因子的泛素依赖蛋白水解途径中起到特异性识别底物的作用, 从而参与细胞周期的调控. 目前国内外许多研究都发现恶性肿瘤组织中skp2的表达呈不同程度增高, 且与肿瘤的发生、发展及预后密切相关^[37,38], 有癌基因的潜能. 我们在前期工作中发现, 大肠癌组织中skp2蛋白及mRNA表达增高. 此次实验, 在大肠癌患者外周血中skp2 mRNA的表达增高不明显, 正常人外周血中亦有表达, 可能是维持正常细胞生物学功能所需.

在大肠癌患者外周血中寻找分子生物学标记物是一项困难而有实际意义的工作. 我们通过实验初步认为, 利用RT-PCR检测外周血hTERT和survivin mRNA的表达对大肠癌的早期诊断有意义. 但hTERT和survivin能否成为大肠癌早期诊断的分子生物学标记物将有待进一步研究.

4 参考文献

- Solmi R, De Sanctis P, Zucchini C, Ugolini G, Rosati G, Del Governatore M, Coppola D, Yeatman TJ, Lenzi L, Caira A, Zanotti S, Taffurelli M, Carinci P, Valvassori L, Strippoli P. Search for epithelial-specific mRNAs in peripheral blood of patients with colon cancer by RT-PCR. *Int J Oncol* 2004; 25: 1049-1056
- Wylid DK, Selby P, Perren TJ, Jonas SK, Allen-Mersh TG, Wheeldon J, Burchill SA. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. *Int J Cancer* 1998; 79: 288-293
- 陈高明, 李春海, 王尧河, 冯东晓, 孙丽亚, 朱运峰. RT-PCR定量检测GST- π mRNA的表达. *中国肿瘤临床* 1998; 25: 858-861
- Yan P, Saraga EP, Bouzourene H, Bosman FT, Benhattar J. Expression of telomerase genes correlates with telomerase activity in human colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 2001; 193: 21-26
- Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46: 645-650
- 王小中, 冯文莉, 涂植光, 曾建明, 史梅, 曹唯希, 黄宗干. 慢性粒细胞白血病细胞中Skp2的表达及其临床意义. *临床检验杂志* 2003; 21: 54-56
- Ahmed FE, Vos P. Molecular markers for human colon cancer in stool and blood identified by RT-PCR. *Anticancer Res* 2004; 24: 4127-4134
- 卿笃桔, 李汉贤. 大肠癌患者外周血淋巴细胞P16和cyclin D1表达的临床意义. *南华大学学报·医学版* 2005; 33: 9-12
- Soeth E, Roder C, Juhl H, Kruger U, Kremer B, Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer* 1996; 69: 278-282
- Funaki NO, Tanaka J, Itami A, Kasamatsu T, Ohshio G, Onodera H, Monden K, Okino T, Imamura M. Detection of colorectal carcinoma cells in circulating peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction targeting cytokeratin-20 mRNA. *Life Sci* 1997; 60: 643-652
- Zhang XW, Fan P, Yang HY, Yang L, Chen GY. Significance of detecting disseminated tumor cells in peripheral blood of gastric and colorectal cancer patients. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2003; 25: 66-69
- Zhang XW, Yang HY, Fan P, Yang L, Chen GY. Detection of micrometastasis in peripheral blood by multi-sampling in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 436-438
- Bustin SA, Gyselman VG, Siddiqi S, Dorudi S. Cytokeratin 20 is not a tissue-specific marker for the detection of malignant epithelial cells in the blood of colorectal cancer patients. *Int J Surg Investig* 2000; 2: 49-57
- Schuster R, Max N, Mann B, Heufelder K, Thilo F, Grone J, Rokos F, Buhr HJ, Thiel E, Keilholz U. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *Int J Cancer* 2004; 108: 219-227
- 张海燕, 方军, 高宝辉, 谢小志, 谢丽微. 肠道肿瘤和增生性病变中GST- π 与p53蛋白表达的关系. *临床与实验病理学杂志* 2002; 18: 517-518
- 任景丽, 王宪远, 周志强, 范毅凯, 祝庆蕃, 李玉华. 大肠癌旁黏膜CEA及GST- π 抗原表达. *新消化病学杂志* 1996; 4: 312-313
- Morrow CS, Goldsmith ME, Cowan KH. Regulation of human glutathione S-transferase pi gene transcription: influence of 5'-flanking sequences and trans-activating factors which recognize AP-1-binding sites. *Gene* 1990; 88: 215-225
- 龙延滨, 韩希望, 王建华, 陈秀生. 结肠癌患者外周血淋巴细胞内GST活性变化的临床价值研究. *中国肿瘤临床* 2000; 27: 356-358
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission

- yeast and human. *Science* 1997; 277: 955-959
- 20 Horikawa I, Barrett JC. Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1167-1176
- 21 Hahn WC, Meyerson M. Telomerase activation, cellular immortalization and cancer. *Ann Med* 2001; 33: 123-129
- 22 Colgin LM, Reddel RR. Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9: 97-103
- 23 方向明, 于皆平, 罗和生. 大肠癌hTERT和P16表达与端粒酶活性的关系. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 12-14
- 24 Niiyama H, Mizumoto K, Sato N, Nagai E, Mibu R, Fukui T, Kinoshita M, Tanaka M. Quantitative analysis of hTERT mRNA expression in colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1895-1900
- 25 Nowak J, Januszkiewicz D, Lewandowski K, Nowicka-Kujawska K, Pernak M, Rembowska J, Nowak T, Wysocki J. Activity and expression of human telomerase in normal and malignant cells in gastric and colon cancer patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 75-80
- 26 Suzuki K, Kashimura H, Ohkawa J, Itabashi M, Watanabe T, Sawahata T, Nakahara A, Muto H, Tanaka N. Expression of human telomerase catalytic subunit gene in cancerous and precancerous gastric conditions. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 744-751
- 27 李娟, 王沁, 容渭德. 食管癌及癌前病变组织中hTERT基因的表达式. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2280-2282
- 28 Yao XX, Yin L, Sun ZC. The expression of hTERT mRNA and cellular immunity in gastric cancer and precancerosis. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 586-590
- 29 李峰, 孟荣贵, 傅传刚, 金国祥, 喻德洪. 大肠癌及腺瘤中端粒酶催化亚单位的检测及其临床意义. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 787-788
- 30 Lledo SM, Garcia-Granero E, Dasi F, Ripoli R, Garcia SA, Cervantes A, Alino SF. Real time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in patients with colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2004; 6: 236-242
- 31 Shin JH, Chung J, Kim HO, Kim YH, Hur YM, Rhim JH, Chung HK, Park SC, Park JG, Yang HK. Detection of cancer cells in peripheral blood of stomach cancer patients using RT-PCR amplification of tumour-specific mRNAs. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 137-144
- 32 Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31: 1080-1085
- 33 Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, Mitsui A, Nishiwaki T, Moriyama S, Kudo J, Fujii Y. Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer* 2001; 95: 92-95
- 34 Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut* 2000; 46: 645-650
- 35 Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, Tenjo T, Tanigawa N. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 2001; 91: 2026-2032
- 36 董燕, 梅柱中, 宋宜, 孙国敬, 钱俊杰, 刘斌, 刘华, 孙志贤. 人外周血活化淋巴细胞survivin基因的转录激活和表达相关的信号转导通路研究. *生物化学与生物物理进展* 2004; 31: 924-929
- 37 Shapira M, Ben-Izhak O, Linn S, Futerman B, Minkov I, Hershko DD. The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 1336-1346
- 38 Li JQ, Wu F, Masaki T, Kubo A, Fujita J, Dixon DA, Beauchamp RD, Ishida T, Kuriyama S, Imaida K. Correlation of Skp2 with carcinogenesis, invasion, metastasis, and prognosis in colorectal tumors. *Int J Oncol* 2004; 25: 87-95

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

国人肿瘤坏死因子的基因多态性与 *H pylori* 感染无相关性

李岚, 夏冰, 李春

李岚, 夏冰, 李春, 武汉大学医学院中南医院综合医疗科、消化疾病研究中心, 武汉大学医学院过敏与免疫相关疾病重点实验室 湖北省武汉市 430071

李岚, 女, 1980-12-31生, 贵州省天柱县人, 苗族, 武汉大学医学院综合医疗科在读硕士研究生, 主要从事胃肠疾病的免疫遗传学机制研究。

湖北省自然科学基金资助项目, No.2000J047

通讯作者: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市东湖路169号, 武汉大学中南医院综合医疗科. bingxia2004@yahoo.com.cn

电话: 027-67812985-2985 传真: 027-87330795

收稿日期: 2005-11-15 接受日期: 2005-11-24

No Association between polymorphism of tumor necrosis factor gene and *helicobacter pylori* infection in Han Chinese in central China

Lan Li, Bing Xia, Chun Li

Lan Li, Bing Xia, Chun Li, Department of Internal Medicine and Geriatrics, Research Center of Digestive Diseases, Zhongnan Hospital; Key Lab of Allergy and Immune-Related Diseases, Wuhan University School of Medicine, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Hubei Province, No. 2000J047

Correspondence to: Dr. Bing Xia, Department of Internal Medicine and Geriatrics, Zhongnan Hospital, Wuhan University School of Medicine, 169 Donghu Road, Wuhan 430071, Hubei Province, China. bingxia2004@yahoo.com.cn

Received: 2005-11-15 Accepted: 2005-11-24

Abstract

AIM: To investigate the association of gene polymorphism of tumor necrosis factor- α (TNF- α) 308, lymphotoxin- α (LT- α) with *H pylori* infection in Han Chinese in central China.

METHODS: Specific polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (RFLP) were used to detect the genotypes of leukocyte genome DNA, TNF- α 308 and LT- α gene in the peripheral blood of 264 healthy volunteers from Wuhan, China. *H pylori* infection status was determined by a validated serological test.

RESULTS: The positive rate of *H pylori* infection was 62.1% (164/264) in the healthy volunteers. There was no significant difference in allele frequencies of TNF- α 308, LT- α AspH I, and LT- α

Nco I between *H pylori* positive and negative group. In comparison with Spanish Caucasian, the frequency of TNF- α 308 allele was not significantly different in Chinese, but the allele frequencies of LT- α AspH I GG and Nco I AA were markedly lower ($P < 0.0001$, OR = 0.207, 95% CI: 0.104-0.4096; $P = 0.0001$, OR = 0.3963, 95% CI: 0.2471-0.6357). However, the frequencies of LT- α AspH I CC and Nco I GG were notably higher ($P = 0.0057$, OR = 2.043, 95% CI: 1.241-3.366; $P = 0.0004$, OR = 3.644, 95% CI: 1.677-7.915).

CONCLUSION: The polymorphisms of TNF- α 308, LT- α Nco I, and LT- α AspH I are not correlated with the susceptibility of *H pylori* infection in healthy Han Chinese in central China.

Key Words: Tumor necrosis Factor- α ; Lymphotoxin- α ; *Helicobacter pylori*; Gene polymorphism

Li L, Xia B, Li C. No Association between polymorphism of tumor necrosis factor gene and *helicobacter pylori* infection in Han Chinese in central China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(3):287-292

摘要

目的: 探讨肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)和淋巴毒素- α (lymphotoxin- α , LT- α , 即TNF- β)基因多态性与国人幽门螺杆菌(*H pylori*)感染的相关性, 探讨宿主遗传因素对*H pylori*感染易感性的相关性。

方法: 采用序列特异性聚合酶链式反应方法分析264例武汉健康正常人外周血白细胞基因组DNA、TNF- α 308、LT- α Nco I、LT- α AspH I基因多态性。

结果: 健康正常人*H pylori*阳性率62.1% (164/264), TNF- α 308、LT- α AspH I、LT- α Nco I基因多态性在*H pylori*感染组(即*H pylori*⁺组)和无*H pylori*感染组(即*H pylori*⁻组)间分布无显著性差异。中国人TNF- α 308的基因型和等位基因频率分布与西班牙高加索人接近, 但LT- α AspH I GG型明显低

■背景资料

*H pylori*自发现以来受到了多方面的关注, 其与胃癌之间的密切相关性已得到各界承认。虽然全球有超过50%的人有*H pylori*感染, 但是仍然存在非感染者, 或者是一些人在经过*H pylori*根除治疗后很快又出现再次感染或*H pylori*的复燃。这些现象都提醒我们: 是否*H pylori*感染存在着易感人群?

这一观点近年来得到了相关文献的支持, 如本文参考文献7, 8, 9, 21等。故本次研究为受此启发, 进而研究健康志愿者中其TNF基因多态性与*H pylori*感染之间是否存在相关性。人SNP位点众多, 本次研究只为初步的研究和为将来的深入研究提供参考信息。不足之处请各位专家指点。

■创新盘点

本文通过对武汉地区汉族人群TNF基因多态性的检测,发现其与*H pylori*感染无相关性。

于高加索人($P < 0.0001$, $OR = 0.207$, 95%CI: 0.104 6-0.409 6), 而CC型却显著高于对方($P = 0.0057$, $OR = 2.043$, 95%CI: 1.241-3.366); LT- α Nco I GG型比高加索人明显增高($P = 0.0004$, $OR = 3.644$, 95%CI: 1.677-7.915), AA却低于高加索人($P = 0.0001$, $OR = 0.3963$, 95%CI: 0.2471-0.6357)。

结论: 中国人TNF- α 308、LT- α Nco I、LT- α AspH I 基因多态性与*H pylori*的感染无相关性。

关键词: 肿瘤坏死因子- α ; 淋巴毒素- α ; 幽门螺杆菌; 基因多态性

李岚, 夏冰, 李春. 国人肿瘤坏死因子的基因多态性与*H pylori*感染无相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(3):287-292
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/287.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter Pylori*, *H pylori*)感染作为慢性胃炎、消化性溃疡的主要病因已经得到医学界的认可,与胃癌及胃黏膜相关淋巴瘤的关系也引起广泛关注^[1,2]。大多数研究均支持*H pylori*感染与胃癌发生率之间存在显著的相关性,并可促进胃癌的发生发展^[2-6]。*H pylori*的感染率在发展中国家和发达国家间存在着差异,并且不同种族、出生地方或社会经济地位的人感染情况也不同。另外,即使暴露相同的*H pylori*水平仍然存在非感染者^[7],这提示*H pylori*感染除了可能与细菌数量、毒力以及环境因素有关外,与宿主的易感性、胃肠黏膜内环境也可能存在一定的关系。近年来有研究发现人类干扰素 γ 受体和白细胞介素1基因多态性可影响*H pylori*感染^[8,9],提示*H pylori*感染可能存在遗传易感性。

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是体内具有多种生物活性的促炎细胞因子,与抗感染、抗肿瘤以及参与免疫激活等有关。TNF包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和淋巴毒素 α (lymphotoxin α , LT- α , 亦称TNF- β)2型。已有报道TNF- α 的表达或产量受到TNF基因多态性的影响以及基因转录水平的调控^[10-13],然而,鲜见TNF基因多态性与*H pylori*感染的相关性研究。TNF基因位于HLA III类区域,长约750 kb,其中启动子-308位点A/G置换研究的最多。Yea *et al*^[14]研究显示TNF- α 308等位基因A与*H pylori* CagA感染有关。故我们此次随机选取了部分武汉地区健康人群做为我们的研究对象来探讨我国汉族人TNF基因多态性与*H pylori*感染易感性之间

是否存在相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 随机选取自武汉大学中南医院正常健康体检者264例,男180例,女84例,平均年龄 48.1 ± 12.4 岁。均为无血缘关系的湖北汉族人,没有胃肠疾病史。抽取静脉EDTA抗凝血4 mL,蛋白酶K消化,常规氯仿/酚法抽提基因组DNA。所有研究对象均采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA),检测*H pylori*感染, Dtect-ELISA试剂盒由香港大学玛利亚医院惠赠。

1.2 方法 TNF基因型检测:^[15] TNF- α 308 PCR扩增引物TNF- α (+)5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3', TNF- α (-)5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3'(genbank number AY274901)。扩增条件: 94℃预变性5 min; 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共33个循环; 继后72℃延伸5 min。取10 μ L PCR扩增产物,加入66.68 nkat Nco I 限制性内切酶, 37℃水浴消化4 h。消化产物用80 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳, 硝酸银染色。PCR扩增产物经标准分子质量检测,证实为107 bp。经Nco I 酶切后形成87 bp和20 bp二个片段,为TNF- α 308 G/G纯合子; 107 bp产物片段未被酶切,为TNF- α 308 A/A纯合子; 酶切后形成107 bp, 87 bp和20 bp三个片段,为TNF- α 308 G/A杂合子(图1)。LT- α PCR引物LT- α (+)5'-CCGTGCTTCGTGCTTTG-GACTA-3', LT- α (-)5'-AGAGCTGGTGGGGA-CATGTCTG-3'(genbank number M55913)。扩增条件: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min总共33个循环; 72℃ 5 min。取10 μ L PCR扩增产物, Nco I 多态性用66.68 nkat Nco I 限制性内切酶37℃消化4 h, AspH I 多态性用66.68 nkat BsiHKA1内切酶(AspH I 酶的同工酶)65℃消化4 h。消化产物用20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色,在紫外线检测仪下观察。阳性DNA由荷兰阿姆斯特丹自由大学惠赠。PCR扩增产物为740 bp, 经Nco I 酶切后形成555 bp和185 bp二个片段,为LT- α Nco I *G/G 纯合子; 740 bp产物片段未被酶切,为LT- α Nco I *A/A 纯合子; 酶切后形成740 bp, 555 bp和185 bp三个片段,为LT- α Nco I *G/A杂合子。扩增产物经BsiHKA1酶切后,形成425 bp和315 bp二个片段,为LT- α AspH I *G/G 纯合子; 仅740 bp一个片段,为LT- α AspH I *C/C纯合子; 酶切后形成740 bp,

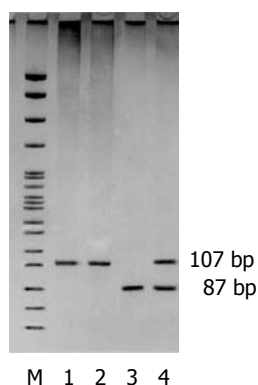


图 1 TNF- α 酶切产物80 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳. M: PBR 322 DNA/MSP I Marker (Sabc); 1: TNF- α 未被酶切的原产物; 2: TNF- α Nco I A/A纯合子; 3: TNF- α Nco I G/G纯合子; 4: TNF- α Nco I G/A杂合子.

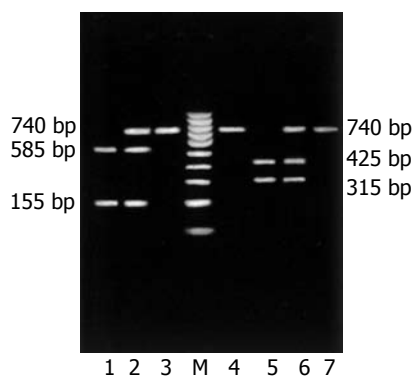


图 2 LT- α 酶切产物80 g/L聚丙烯酰胺凝胶电泳. M: 100 bp DNA Ladder (Sabc); 1: LT- α Nco I G/G纯合子; 2: LT- α Nco I G/A杂合子; 3: LT- α Nco I A/A纯合子; 4: LT- α AspH I C/C纯合子; 5: LT- α AspH I G/G纯合子; 6: LT- α AspH I G/C杂合子; 7: LT- α PCR产物.

应用要点

本文虽然没有提供任何阳性研究结果,但是他有可能为我们将来研究H pylori的感染提供了一个线索,和为我们将来进一步寻找其他的SNP位点分析提供参考信息.

表 1 H pylori感染组和非感染组TNF- α 308、LT- α Nco I 和AspH I 基因型、等位基因频率分布n (%)

	TNF- α 308					LT- α Nco I					LT- α AspH I				
	基因型频率			等位基因频率		基因型频率			等位基因频率		基因型频率			等位基因频率	
	G/G	G/A	A/A	G	A	G/G	G/A	A/A	G	A	G/G	G/C	C/C	G	C
H pylori ⁺ n = 164	144(88)	18(11)	2(1)	306(93)	22(7)	41(25)	76(46)	47(29)	158(48)	170(52)	10(6)	81(49)	73(45)	101(31)	227(69)
H pylori ⁻ n = 100	84(84)	16(16)	0(0)	184(92)	16(8)	22(22)	49(49)	29(29)	93(54)	107(46)	6(6)	51(51)	43(43)	63(32)	137(68)
合计	228	34	2			63	125	76			16	132	116		

表 2 H pylori感染组和非感染组TNF- α 308、LT- α Nco I 和AspH I 等位基因携带者频率分布n

	TNF- α 308		LT- α Nco I		LT- α AspH I	
	G携 带者	A携 带者	G携 带者	A携 带者	G携 带者	C携 带者
H pylori ⁺ 组	162	20	117	123	91	154
H pylori ⁻ 组	100	16	71	78	57	94

425 bp和315 bp三个片段, 为LT- α AspH I *G/C杂合子(图2).

统计学处理 数据输入SPSS 11.5统计软件包, 组间基因型、等位基因频率以及基因携带者频率比较采用 χ^2 检验和精确概率法检验. $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

H pylori⁺组和H pylori⁻组TNF- α 308、LT- α Nco I、LT- α AspH I 基因型和等位基因频率组间比较没有显著性差异, 这3个位点的基因多态性与H pylori的感染不存在基因连锁关系(TNF- α 308GG、GA、AA基因型H pylori⁺组和H pylori⁻组组间比较, P 值分别为: 0.460 0, 0.259 0, 0.527 6; LT- α Nco I GG、GA、AA基

因型H pylori⁺组和H pylori⁻组组间比较, P 分别为0.168 48, 0.769 8, 0.952 6; LT- α AspH I GG、GC、CC基因型H pylori⁺组和H pylori⁻组组间比较, P 值分别为1.0, 0.899 1, 0.898 4)(表1). H pylori⁺组和H pylori⁻组TNF- α 308、LT- α Nco I、LT- α AspH I 基因携带者组间比较没有显著性差异(TNF- α 308 $\chi^2 = 0.293$ 7, $P = 0.587$ 9; LT- α Nco I $\chi^2 = 0.011$ 34, $P = 0.915$ 2; LT- α AspH I $\chi^2 = 0.000$ 197 1, $P = 0.974$ 5)(表2). 湖北武汉汉族人群LT- α Nco I GG型比高加索人明显增高 $P = 0.000$ 4, $OR: 3.644$, 95%CI: 1.677-7.915, AA型却显著低于对方 $P = 0.000$ 1, $OR = 0.396$ 3, 95%CI: 0.247 1-0.635 7; 湖北武汉汉族人群中LT- α AspH I GG型明显低于高加索人 $P < 0.000$ 1, $OR = 0.207$, CI: 0.104 6-0.409 6, CC型却显著高于对方 $P = 0.005$ 7, $OR = 2.043$, 95%CI: 1.241-3.366 (表3).

3 讨论

H pylori感染是胃癌的主要病因之一, 研究证明H pylori的感染率与社会经济地位是密切相关的. 发达国家的感染率明显低于发展中国家, 其成人的感染率 $< 40\%$ ^[16]. 我国的H pylori平均感染率为58.07%, 其中10-20岁者平均感染率为50%^[17], 上

表 3 中国人与西班牙高加索人TNF- α 308、LT- α Nco I 和AspH I 基因型和等位基因频率分布 n (%)

	中国武汉地区汉族人		西班牙高加索人	
	基因型	等位基因频率	基因型	等位基因频率
TNF- α 308 G/G	228 (86)	490 (93)	83 (82)	182 (0.91)
TNF- α 308 G/A	34 (13)		16 (16)	
TNF- α 308 A/A	2 (1)	38 (7)	2 (2)	20 (9)
LT- α Nco I G/G	63 (24) ^a	251 (48)	8 (8)	58 (29)
LT- α Nco I G/A	125 (47)		42 (42)	
LT- α Nco I A/A	76 (29) ^a	277 (52)	51 (50)	144 (71)
LT- α AspH I G/G	16 (6) ^a	164 (31)	24 (24)	97 (48)
LT- α AspH I G/C	132 (50)		49 (48)	
LT- α AspH I C/C	116 (44) ^a	364 (69)	28 (28)	105 (52)

^a $P < 0.01$ vs 高加索人.

海地区人群中*H pylori*感染率为66.4%^[18].

*H pylori*的持续感染与机体细胞因子的基因多态性密切相关^[19]如: IL-1A, IL-1B, IL-1RN, IL-8, IL-10, TNF- α 和TNF- β 等, 并有报道指出TNF基因多态性不仅与*H pylori*感染有关^[20], 而且与胃癌亦存在相关性^[21].

TNF包括TNF- α 和LT- α , LT- α 是由淋巴细胞合成和分泌的一种细胞因子, 可作用于血管内皮细胞, 诱导释放炎症递质, 提高黏附分子表达, 可增强T淋巴细胞产生细胞因子, 促进B淋巴细胞产生抗体, 增加HLA- I、II类抗原表达, 具有广泛的诱导炎症和调节免疫功能.

TNF- α 是一种具有重要免疫调节功能、参与炎症反应的细胞因子. *H pylori*感染导致慢性胃炎黏膜TNF- α 水平上升, 与胃炎活动性和黏膜中性粒细胞的浸润有关. 在宿主抵抗微生物(如:*H pylori*)感染的过程中, TNF是重要的保护因素, 因为胃酸分泌降低, 胃内pH降低有利于消除*H pylori*的感染, 而泌酸黏膜的炎症是引起酸分泌减低的主要因素^[22], 其原因在于当*H pylori*感染胃黏膜时, 活跃的炎症反应使IL-1-B和TNF- α 分泌增加, 炎症反应尤其是胃体的炎症反应和此两种细胞因子均有抑制胃酸分泌的特性^[23-26].

我们分析了湖北省武汉市264名汉族健康体检者外周血白细胞TNF- α 308、LT- α Nco I、LT- α AspH I 基因型分布, 发现武汉地区健康汉族人无论是TNF- α 308或LT- α Nco I 或LT- α AspH I 位点的基因多态性在*H pylori*和*H pylori*组分布的均无显著性差异. 说明中国正常人中*H pylori*感染与以上3个位点基因的多态性可能不存在基因连锁关系. 中国汉族与西班牙高加索健康正常人^[27]就以上3个位点的多态性

分布进行比较. 我们发现TNF- α 308位点3种基因型在两人种中的分布无显著性差异. 中国人TNF- α 308 A等位基因频率为7%, 与西班牙高加索人^[27](9%)、韩国人群^[28](7%)在该等位基因频率分布上无显著性差别, 但与巴西人^[29](10.89%)在该等位基因频率分布上存在显著性差异; 湖北武汉汉族人群中的LT- α AspH I 位点GG型明显低于高加索人^[16], 而CC型却显著高于对方, GC型在二者分布无显著性差异; 对于LT- α Nco I 位点, 杂合子分布在二者分布基本接近(0.473/0.416), GG型比高加索人^[27]明显增高, AA型却显著低于对方.

我们研究中发现武汉正常人群中TNF- α 308、LT- α Nco I 和LT- α AspH I 位点多态性与*H pylori*的感染间无相关性, 我们分析原因有如下可能: (1)样本选取的偏倚, 我们选取的为武汉市汉族人, 为一个地区的一个民族, 可能出现了假阳性结果, 因此我们在以后可进一步扩大样本含量在不同民族进行研究; (2)由于*H pylori*感染率在不同国家、地区、种族间都存在着明显差异, *H pylori*的患病率与个人的社会经济地位的关系最为密切, 一般来说经济条件好者感染率偏低, 我们调查的主要是武汉市的人, 经济条件偏好, 因此可能使我们的研究结果出现偏差, 出现了假阴性结果; (3)有可能这几个位点确实在正常人感染*H pylori*不存在基因连锁关系; (4)据报道*H pylori*感染最敏感的诊断方法是PCR^[30], 而我们采用的血清学试验检测*H pylori*抗体, 此试验快速、简便、敏感性高, 适合于流行病学调查来检测是否有*H pylori*感染, 此检测方法在中国人群中诊断敏感性为96.4%, 特异性为92.7%^[31]. 但是血清学方法仅适用于筛查, 主

要是因为*H pylori*感染数周后血液才会出现特异性抗体, 且无*H pylori*感染者血中也存在交叉反应性抗体, *H pylori*根除后其血中抗体可较长时间(大于6 mo)维持阳性水平。

总之, *H pylori*的感染是一个环境与宿主间相互作用的结果, 除了宿主的遗传因素外, 其他的因素如: 饮食习惯、居住条件、饮水水源、地理因素等也有关系, 基因的易感性只是其中的一方面, 对于其是否起决定性的作用尚无确切报道。现在大多数报道都指出*H pylori*相关性疾病者, 其*H pylori*的感染与某种基因存在联系, 但是关于与正常人*H pylori*感染相关的基因的报道比较少见, Hamajima *et al*^[7]曾在其研究中报道携带IL-1 β -31 T/T基因型与*H pylori*持续感染相关。本次研究是关于*H pylori*感染宿主遗传易感性方面的初步研究, 虽然没有提供任何阳性研究结果, 但是他有可能为我们将来研究*H pylori*的感染提供了一个线索, 和为我们将来进一步寻找其他的SNP位点分析提供参考信息。

4 参考文献

- Wundisch T, Kim TD, Thiede C, Morgner A, Alpen B, Stolte M, Neubauer A. Etiology and therapy of *Helicobacter pylori*-associated gastric lymphomas. *Ann Hematol* 2003; 82: 535-545
- Wang RT, Wang T, Chen K, Wang JY, Zhang JP, Lin SR, Zhu YM, Zhang WM, Cao YX, Zhu CW, Yu H, Cong YJ, Zheng S, Wu BQ. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: evidence from a retrospective cohort study and nested case-control study in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1103-1107
- Luo HZ, Mi DH, Jing TZ, Xu Q, Yang WS, Yang GQ, Wang SZ, Liu GH, Su CY. Risk factors of gastric cancer in Wuwei City-an endemic region of gastric cancer. *Aizheng* 2005; 24: 563-566
- Zhan N, Xiong YY, Lan J, Wang BC, Tian SF, Yu SP. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and expression of c-myc, Bcl-2, and Bax protein in different gastric mucosa lesions. *Aizheng* 2003; 22: 1034-1037
- Nozaki K, Tsukamoto T, Tatematsu M. Effect of high salt diet and *Helicobacter pylori* infection on gastric carcinogenesis. *Nippon Rinsho* 2003; 61: 36-40
- Tokudome S, Samsuria WD, Triningsih FX, Suzuki S, Hosono A, Triono T, Wijaya I, Miranti IP, Ghadimi R, Moore MA. *Helicobacter pylori* infection appears essential for stomach carcinogenesis: Observations in Semarang, Indonesia. *Cancer Sci* 2005; 96: 873-875
- Hamajima N, Matsuo K, Saito T, Tajima K, Okuma K, Yamao K, Tominaga S. Interleukin 1 polymorphisms, lifestyle factors, and *Helicobacter pylori* infection. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 383-389
- Thye T, Burchard GD, Nilis M, Muller-Myhsok B, Horstmann RD. Genomewide linkage analysis identifies polymorphism in the human interferon-gamma receptor affecting *Helicobacter pylori* infection. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 448-453
- El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer. *Nature* 2000; 404: 398-402
- Rudwaleit M, Siebert S, Yin Z, Eick J, Thiel A, Radbruch A, Sieper J, Braun J. Low T cell production of TNF α and IFN γ in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 36-42
- Jeong P, Kim EJ, Kim EG, Byun SS, Kim CS, Kim WJ. Association of bladder tumors and GA genotype of -308 nucleotide in tumor necrosis factor- α promoter with greater tumor necrosis factor- α expression. *Urology* 2004; 64: 1052-1056
- Temple SE, Cheong KY, Almeida CM, Price P, Waterer GW. Polymorphisms in lymphotoxin α and CD14 genes influence TNF α production induced by Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Genes Immun* 2003; 4: 283-288
- Cuenca J, Perez CA, Aguirre AJ, Schiattino I, Aguilon JC. Genetic polymorphism at position-308 in the promoter region of the tumor necrosis factor (TNF): implications of its allelic distribution on susceptibility or resistance to diseases in the Chilean population. *Biol Res* 2001; 34: 237-241
- Yea SS, Yang YI, Jang WH, Lee YJ, Bae HS, Paik KH. Association between TNF- α promoter polymorphism and *Helicobacter pylori* cagA subtype infection. *J Clin Pathol* 2001; 54: 703-706
- Bouma G, Xia B, Crusius JB, Bioque G, Koutroubakis I, Von Blomberg BM, Meuwissen SG, Pena AS. Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1996; 103: 391-396
- Perez-Perez GI, Rothenbacher D, Brenner H. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2004; 9: 1-6
- Wang KJ, Wang RT. Meta-analysis on the epidemiology of *Helicobacter pylori* infection in China. *Zhonghua LiuXingBingXue ZaZhi* 2003; 24: 443-446
- Chen SY, Liu TS, Fan XM, Dong L, Fang GT, Tu CT, Gu XY, Wang JY. Epidemiological study of *Helicobacter pylori* infection and its risk factors in Shanghai. *Zhonghua YiXue ZaZhi* 2005; 85: 802-806
- Hamajima N. Persistent *Helicobacter pylori* infection and genetic polymorphisms of the host. *Nagoya J Med Sci* 2003; 66: 103-117
- Zambon CF, Basso D, Navaglia F, Belluco C, Falda A, Fogar P, Greco E, Gallo N, Rugge M, Di Mario F, Plebani M. Pro- and anti-inflammatory cytokines gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: interactions influence outcome. *Cytokine* 2005; 29: 141-152
- Basso D, Plebani M. *H. pylori* infection: bacterial virulence factors and cytokine gene polymorphisms as determinants of infection outcome. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004; 41: 313-337
- McColl KE, el-Omar E, Gillen D. *Helicobacter pylori* gastritis and gastric physiology. *Gastroenterol Clin North Am* 2000; 29: 687-703
- Takashima M, Furuta T, Hanai H, Sugimura H, Kaneko E. Effects of *Helicobacter pylori* infection on

- gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Gut* 2001; 48: 765-773
- 24 Mahr S, Neumayer N, Gerhard M, Classen M, Prinz C. IL-1beta-induced apoptosis in rat gastric enterochromaffin-like cells is mediated by iNOS, NF-kappaB, and Bax protein. *Gastroenterology* 2000; 118: 515-524
- 25 Xiao F, Furuta T, Takashima M, Shirai N, Hanai H. Effects of cyclooxygenase-2 inhibitor on gastric acid secretion in *Helicobacter pylori*-infected C57BL/6 mice. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 577-583
- 26 Watanabe T, Higuchi K, Tominaga K, Fujiwara Y, Arakawa T. Acid regulates inflammatory response in a rat model of induction of gastric ulcer recurrence by interleukin 1beta. *Gut* 2001; 48: 774-781
- 27 Lanás A, García-González MA, Santolaria S, Crusius JB, Serrano MT, Benito R, Peña AS. TNF and LTA gene polymorphisms reveal different risk in gastric and duodenal ulcer patients. *Genes Immun* 2001; 2: 415-421
- 28 Lee JY, Kim HY, Kim KH, Kim SM, Jang MK, Park JY, Lee JH, Kim JH, Yoo JY. Association of polymorphism of IL-10 and TNF-A genes with gastric cancer in Korea. *Cancer Lett* 2005; 225: 207-214
- 29 Araujo F, Pereira AC, Mota GF, Latorre Mdo R, Krieger JE, Mansur AJ. The influence of tumor necrosis factor -308 and C-reactive protein G1059C gene variants on serum concentration of C-reactive protein: evidence for an age-dependent association. *Clin Chim Acta* 2004; 349: 129-134
- 30 Wan Y, Xu YY, Jiang JH, Kong FS, Xue FB, Bai YX, Pan BR, Ren J, Fan DM. Chinese literature associated with diagnosis of *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 231-233
- 31 Xia HH, Wong BC, Wong WM, Tang VS, Cheung HK, Sham FN, Fung FM, Lai KC, Hu WH, Chan CK, Lam SK. Optimal serological tests for the detection of *Helicobacter pylori* infection in the Chinese population. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 521-526

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

•消息•

首届北京地坛感染病学术会议

本刊讯 为庆祝建院60周年,北京地坛医院决定于2006-03-02/04在北京召开全国性的"首届北京地坛感染病学术会议",预计全国的同行500人参加这次重要的会议.会议邀请了40余位我国德高望重、年富力强的感染病专家作专题学术讲演.

1 会议征稿内容

这次感染病学术会议征文的内容包括病毒性肝炎、HIV/AIDS、各种传染性疾病和感染性疾病,抗生素的合理使用,也包括新发/复燃的传染病.论文全文和摘要请发到电子信箱: cj@genetherapy.com.cn; 或 hy@genetherapy.com.cn.

2 与会专家名单

首届北京地坛感染病学术会议邀请的专题报告专家(按照汉语拼音排序)有:白雪帆,陈智,陈志海,成军,段钟平,窦晓光,范小玲,高志良,郭利民,侯金林,贾继东,郎振为,李长青,李兰娟,李太生,李兴旺,刘沛,刘庄,伦文辉,毛羽,缪晓辉,穆毅,宁琴,牛俊奇,任红,施光峰,斯崇文,谭德明,唐红,唐小平,万谟彬,王风水,王福生,王贵强,王磊,王玲,王宇明,王宪波,魏红山,魏来,翁心华,谢青,谢雯,谢尧,邢卉春,徐道振,杨东亮,杨钧,袁正宏,赵红心,庄辉.

3 联系方式

首届北京地坛感染病学术会议组织委员会主席为成军教授.地址:北京市东城区安外大街地坛公园13号,邮编:100011;电话:010-64481639;传真:010-64481639. Email: cj@genetherapy.com.cn.

欢迎全国感染病学界的各位专家和同仁来北京参加这次盛会.

选择性环氧化酶-2抑制剂对肝癌细胞侵袭力的影响

方征东, 李建生, 徐修才

方征东, 李建生, 安徽医科大学附属医院普外科 安徽省合肥市 230001

徐修才, 安徽医科大学附属医院中心实验室 安徽省合肥市 230001

方征东, 男, 1974-08-23生, 安徽潜山县人, 汉族, 2003级安徽医科大学硕士研究生, 主治医师, 主要从事肝肿瘤的研究。

通讯作者: 方征东, 230001, 安徽省合肥市庐江路9号, 安徽省立医院普外科. fangzhengdong@126.com

电话: 0551-2283280

收稿日期: 2005-12-08 接受日期: 2005-12-31

Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on invasion of human hepatocellular carcinoma cells

Zheng-Dong Fang, Jian-Sheng Li, Xiu-Cai Xu

Zheng-Dong Fang, Jian-Sheng Li, Department of General Surgery, the Affiliated Anhui Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China
Xiu-Cai Xu, Department of Central Laboratory, the Affiliated Anhui Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001, Anhui Province, China

correspondence to: Zheng-Dong Fang, Department of General Surgery, the Affiliated Anhui Provincial Hospital of Anhui Medical University, 9 Lujiang Road, Hefei 230001, Anhui Province, China. fangzhengdong@126.com
Received: 2005-12-08 Accepted: 2005-12-31

Abstract

AIM: To investigate the effects of Nimesuli, a selective cyclooxygenase inhibitor, on the invasion of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 and its mechanism.

METHODS: Human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 was divided into control (C) and Nimesuli (N) group. The cells in group N were treated with Nimesuli (25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$) and those in group C were treated with dimethylsulfoxide (DMSO). MTT reduction assay was used to evaluate the inhibitory rate, and Transwell chamber assay was performed to determine the effect of Nimesuli on the invasion of SMMC-7721 cells. The expression of matrix metalloproteinase (MMP) mRNA and enzymatic activity of SMMC-7721 cells were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and gelatin zymography, respectively.

RESULTS: Nimesuli inhibited the proliferation of SMMC-7721 cells in a time- and concentration-dependent manner. In comparison with those in the group C, the expression of MMP mRNA and enzymatic activity in group N were obviously lower after 25, 50, 100, 200, and 400 $\mu\text{mol/L}$ Nimesuli treatment (MMP2 mRNA: 0.968, 0.545, 0.330, 0.158, 0.083 vs 1.063, $P < 0.05$ or $P < 0.01$; MMP-9 mRNA: 1.005, 0.758, 0.465, 0.208, 0.103 vs 1.075, $P < 0.01$ except the result of 25 $\mu\text{mol/L}$ Nimesuli treatment). The invasion of SMMC-7721 cells was significantly inhibited in group N ($P < 0.05$), and the inhibitory rates of the cells' penetrating polycarbonates were 7.8%, 28.0%, 35.6%, 53.6%, 61.4% for 25, 50, 100, 200, and 400 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

CONCLUSION: The selective cyclooxygenase inhibitor, Nimesuli, can inhibit the growth and invasion of SMMC-7721 cells and the possible mechanism may be involved in the down-regulation of MMP level.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Prostaglandin-endoperoxide synthase; Matrix metalloproteinase

Fang ZD, Li JS, Xu XC. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on invasion of human hepatocellular carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(3):293-298

摘要

目的: 研究选择性环氧化酶-2抑制剂尼美舒利(Nimesuli, Nim)对肝癌细胞SMMC-7721增殖和侵袭力的影响并探讨其作用机制。

方法: 应用Nim作用于SMMC-7721细胞, 并设对照组和实验组(Nim 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$), MTT法检测Nim作用24、48、72 h后, 对SMMC-7721细胞增殖的影响; 用Transwell小室检测Nim作用24 h后对SMMC-7721细胞侵袭能力的影响, 并用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、明胶酶谱法分析Nim对SMMC-7721细胞分泌的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) mRNA和酶活性的影响。

■背景资料

近年来研究表明, COX-2参与了肿瘤的发生发展, 在许多肿瘤中过度表达, 其中包括胃肠道肿瘤、前列腺癌、肺癌、乳腺癌等, 而其抑制剂则具有防治肿瘤的作用。

■研究前沿

许多研究提示COX-2与肝癌的发生、发展有很大关系,在肝癌的基础研究中发现COX-2抑制剂可以通过抑制细胞增殖和促进细胞凋亡来抑制肝癌生长。

结果: Nim对SMMC-7721细胞的增殖有抑制作用,且呈剂量和时间依赖性; Nim 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$ 作用后,与对照组比较Nim能降低SMMC-7721细胞分泌的MMP mRNA和酶的活性(MMP-2 mRNA: 0.968, 0.545, 0.330, 0.158, 0.083 vs 1.063, $P<0.05$ 或 $P<0.01$; MMP-9 mRNA: 1.005, 0.758, 0.465, 0.208, 0.103 vs 1.075, 除25 $\mu\text{mol/L}$ 作用外,其余 $P<0.01$); Nim作用后SMMC-7721细胞穿透聚碳酸酯膜的能力显著降低(SMMC-7721细胞穿透聚碳酸酯膜抑制率为7.8%, 28.0%, 35.6%, 53.6%, 61.4%),与对照组比较有显著差异($P<0.05$)。

结论: 选择性环氧化酶-2抑制剂Nim可以抑制肝癌细胞的生长和其侵袭力, Nim抑制肝癌细胞侵袭力的作用机制与通过降低MMP水平有关。

关键词: 肝肿瘤; 前列腺素内源性过氧化物合酶; 基质金属蛋白酶

方征东, 李建生, 徐修才. 选择性环氧化酶-2抑制剂对肝癌细胞侵袭力的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(3):293-298
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/293.asp>

0 引言

近年来研究发现^[1,2], 环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)与多种恶性肿瘤的生成、生长有密切关系. 流行病学、体内外实验研究表明^[3,4], 非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID)对消化道肿瘤有防治作用, 选择性COX-2抑制剂可以抑制肿瘤的生长. 随着COX-2与肿瘤关系的研究进展, COX-2与肝癌的关系作用也逐渐受到人们关注, 近年来有研究表明, COX-2的表达与肝癌的临床病理分期和预后有关^[5], Huang *et al*^[6]研究认为, COX-2抑制剂可以通过诱导细胞凋亡、抑制肝癌细胞增殖来抑制肝癌细胞的生长, 但COX-2抑制剂对肝癌侵袭的影响研究不多. 我们研究了选择性环氧化酶抑制剂尼美舒利(Nimesuli, Nim)对肝癌细胞SMMC-7721生长及侵袭力的影响, 并探讨Nim对肝癌细胞SMMC-7721分泌的基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)活性的影响, 分析选择性环氧化酶-2抑制剂对肝癌细胞侵袭力的影响及可能的作用机制, 为肝癌转移的预防和治疗开辟新的途径。

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞SMMC-7721购自中国科学院

上海细胞生物研究所, 尼美舒利、二甲基亚砜(DMSO)、胰蛋白酶为Sigma公司产品, 新生牛血清为杭州四季青公司产品, 明胶为Amersco公司产品, Trizol总RNA提纯试剂盒、RPMI 1640培养基为Gibco公司产品, MMLV逆转录酶为Promega公司产品, MMP-2、MMP-9、 β -actin引物由上海生工公司合成, 人工基质Matrigel为BD公司产品, Transwell小室为Costar公司产品。

1.2 方法 人肝癌细胞SMMC-7721用含100 mL/L新生牛血清+100 kU/L青霉素、100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养基, 置37°C、50 mL/L CO₂培养箱中培养, 细胞换液时间为1-2 d, 传代3-5 d, 传代前用2.5 g/L胰酶消化. 实验分组: 对照组(只含100 mg/L DMSO), 实验组(每组加入终浓度分别为25、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 的Nim)。

1.2.1 MTT检测Nim对SMMC-7721细胞生长的影响 取对数生长期SMMC-7721细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{L}$, 接种于96孔培养板, 每孔加液量200 μL . 24 h后换液, 按上述试验分组, 并设空白调零孔, 每组设4个复孔, 37°C、50 mL/L CO₂培养箱中培养24、48、72 h后, 每孔加入5 g/L MTT 20 μL , 继续培养4 h, 吸去孔内培养液, 分别加DMSO溶液150 μL , 振荡溶解10 min, 酶标仪测490 nm波长每孔吸光度(空白孔调零), 记录各孔吸光度(A). 计算细胞生长抑制率, 抑制率=(1-实验组A平均值/对照组A平均值) $\times 100\%$ 。

1.2.2 细胞侵袭重建基底膜实验 SMMC-7721细胞体外侵袭能力的测定在Transwell小室中进行, 具体试验方法参考文献[7]: 于4°C融解Matrigel, 每孔50 μL 加入预冷的Transwell侵袭小室各孔的上室中, 将培养板置于37°C孵育1 h, 少量PBS清洗各孔. 根据上述实验分组, 用无血清培养液和含不同浓度Nim的无血清培养液制备SMMC-7721细胞悬液, 使细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{L}$, 分别加入各孔上室中, 每孔200 μL , 在下室分别加入预先制备的SMMC-7721细胞培养上清液600 μL 作为趋化因子, 每个孔重复3次. 37°C、50 mL/L CO₂孵育24 h. 弃去上室液体, 取出聚碳酸酯膜, 擦净膜上的基底膜胶及未穿过的细胞, 经40 g/L多聚甲醛固定30 min、常规HE染色, 随机于200倍光镜下取上、下、左、右、中心5个视野, 计数穿过聚碳酸酯膜的细胞数, 取每个视野的平均数表示肿瘤细胞的侵袭能力, 并计算抑制率. 重复试验3次. 抑制率=(对照组侵袭细胞数-实验组侵袭细胞数)/对照组侵袭细胞数 $\times 100\%$ 。

表1 扩增片段使用的引物序列和长度

名称	引物	扩增片段长度
MMP-2	正义链5' - CCACGTGACAAGCCCATGGGGCCCC -3' 反义链5' - GCAGCCTAGCCAGTCGGATTTGATG -3'	480 bp
MMP-9	正义链5' - GCCACTTGTGCGGCGATAAGG -3' 反义链5' - CACTGTCCACCCCTCAGAGC -3'	243 bp
β -actin	正义链5' - TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA -3' 反义链5' - CTAGAAGCATTGCGGTGGACAATGGAGGG -3'	610 bp

1.2.3 Nim对SMMC-7721细胞MMP mRNA的影响 取对数生长期SMMC-7721细胞 1×10^6 接种于培养瓶中, 按上述实验分组, 药物作用24 h后常规收集细胞, 各组均重复3瓶. 选用 β -actin为内参照, MMP-2, MMP-9, β -actin引物序列(表1). 按Trizol试剂盒说明一步法提取总RNA, 紫外分光光度仪测RNA纯度并定量. 取总RNA进行逆转录, 反应体系20 μ L: 含Oligo(dT)₁₅ 1 μ L, MMLV逆转录酶1 μ L, RNA 1.0 μ g, 10 mmol/L dNTPs 2 μ L, RNasin 1 μ L, 42℃温浴60 min, 将反应混合物加热至70℃、10 min以终止反应. PCR反应体系40 μ L: cDNA 4 μ L, 10 mmol/L dNTPs 2 μ L, 10 $\times$ buffer(含MgCl₂) 0.8 μ L, 上、下游引物各1 μ L, TaqDNA合成酶0.5 μ L. PCR扩增的循环条件为: 96℃ 3 min后, 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 60 s, 35个循环, 72℃延伸10 min, 同时对内对照 β -actin进行扩增. 在20 g/L琼脂糖凝胶上进行电泳, 经UV-300紫外分析仪OHM026(珠海黑马)及其软件分别计算MMP-2、MMP-9与 β -actin吸光度的比值表示MMP-2, MMP-9 mRNA的相对含量.

1.2.4 采用明胶酶谱法测定细胞上清液中的MMP的活性 明胶酶谱实验方法参照文献[8]: 取对数生长期SMMC-7721细胞, 调整细胞密度为 1×10^5 /L, 接种于24孔培养板, 换用无血清培养液培养, 按上述实验分组加入药物, 继续培养24 h后收集培养液并活细胞计数. 所收集的培养液经1 200 r/min, 4℃离心10 min 0.22 μ m滤膜过滤, 以细胞数为依据调整体积, 分装后立刻进行酶谱分析. 将细胞条件培养液上样(按 10^6 个细胞量折算培养上清的电泳上样量)与等体积的2 $\times$ SDS凝胶上样缓冲液混合, 上样于80 g/L SDS聚丙烯酰胺凝胶(含1 g/L明胶), 4℃电泳, 电压为12 V/cm, 直至溴酚蓝跑至凝胶底部. 以复性缓冲液(25 g/L Triton-X 100)于室温下洗胶2次, 每次30 min. 凝胶置于孵育缓冲液(含50 mmol/L Tris HCl, 1 μ mmol/L ZnCl₂, 0.5 g/L叠氮钠, pH7.6)中, 37℃恒温摇床缓慢摇动18 h. 以染色液(10g/L的考马斯亮蓝R250、100 mL/L乙酸、100 g/L异丙

■创新亮点

本文主要是通过细胞侵袭重建基底膜实验, 探讨COX-2抑制剂对肝癌细胞侵袭力的影响; 并检测COX-2抑制剂对肝癌细胞分泌的MMP有无影响, 探讨COX-2抑制剂产生这种作用的机制.

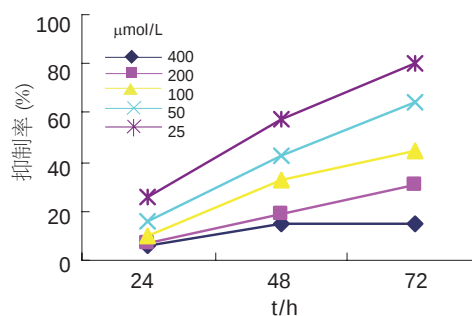


图1 Nim对SMMC-7721细胞生长的抑制作用.

醇)染色30 min, 以脱色液(100 mL/L乙酸、100 g/L异丙醇)脱色至合适. 胶原酶呈现为蓝色背景下的透明条带, 分别位于 M_r 72 000和92 000位置处. 应用凝胶成像分析系统测定各条带的平均吸光度 (A 值)及其面积, 以电泳条带的积分吸光度值代表酶活性进行定量分析, 计算各条带的积分 V 值 (V 值 = 平均 A 值 $\times$ 面积).

统计学处理 数据采用平均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD)表示, 利用SPSS11.0统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 Nim对SMMC-7721细胞生长的影响 25 μ mol/L Nim作用24 h后, 细胞生长抑制率为5.6% ($P > 0.05$), 对SMMC-7721细胞生长抑制作用无差异, 但其余各组与对照组相比Nim对SMMC-7721细胞生长抑制作用均有显著性意义 ($P < 0.01$, 图1). 随着时间和剂量增加, 药物对肝癌细胞的抑制率逐渐上升, 呈时间、剂量依赖性. 在24 h, 25、400 μ mol/L Nim的细胞生长抑制率分别为5.6%、26.5%, 而在72 h, 同等药物浓度的抑制率分别为15.2%、79.9%, 为减少因药物抑制细胞生长造成的侵袭能力降低因素影响, 故在侵袭实验中选用药物作用24 h.

2.2 Nim对SMMC-7721体外侵袭能力的影响 各种不同药物浓度作用24 h后, 检测SMMC-7721细胞穿透基底膜成分Matrigel发现, 25 μ mol/L Nim作用后, 与对照组相比其抑制率为7.8% (P

■应用要点

本实验初步证实了COX-2抑制剂可以降低肝癌细胞的侵袭能力,从而抑制肝癌的转移和复发,这为COX-2抑制剂防治肝癌提供了一定的理论依据,其有可能成为肝癌的防治手段之一。

表2 Nim对SMMC-7721细胞侵袭能力的影响

组别	下室细胞数	抑制率 (%)
对照组	58.60 ± 6.95	
实验组		
25 μmol/L	54.00 ± 3.28	7.8 ^a
50 μmol/L	42.2 ± 3.96	28.0 ^b
100 μmol/L	35.4 ± 3.91	35.6 ^b
200 μmol/L	27.2 ± 1.92	53.6 ^b
400 μmol/L	22.6 ± 2.70	61.4 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

表3 SMMC-7721细胞MMP-2, MMP-9 mRNA的定量分析 (mean ± SD)

Nim	MMP-2m RNA	MMP-9m RNA
0(对照)	1.063 ± 0.062	1.075 ± 0.039
25 μmol/L	0.968 ± 0.033 ^a	1.005 ± 0.021
50 μmol/L	0.545 ± 0.062 ^b	0.758 ± 0.059 ^b
100 μmol/L	0.330 ± 0.032 ^b	0.465 ± 0.037 ^b
200 μmol/L	0.158 ± 0.025 ^b	0.208 ± 0.036 ^b
400 μmol/L	0.083 ± 0.017 ^b	0.103 ± 0.015 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

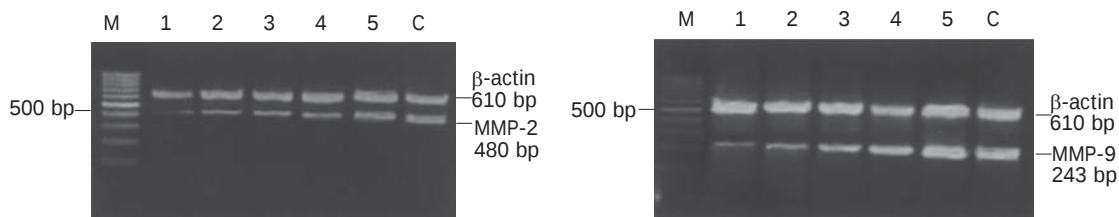


图2 SMMC-7721细胞MMP-2、MMP-9 mRNA表达的RT-PCR结果.

<0.05), 抑制SMMC-7721细胞穿膜的能力有统计学意义, 而其余各组对SMMC-7721细胞穿膜能力的抑制作用均有显著统计学意义($P < 0.01$), 最高抑制率达61.3%(表2). 结果表明, Nim对SMMC-7721体外侵袭能力有明显的抑制作用, 且呈剂量依赖性.

2.3 Nim对SMMC-7721细胞MMP mRNA的影响 在SMMC-7721细胞中可以检测到MMP mRNA的表达. 各种不同药物浓度作用24 h后, MMP-2, MMP-9表达均有下降(图2, 表3), 与对照组比较下降程度有显著差异.

2.4 Nim对SMMC-7721细胞MMP酶活性的影响 SMMC-7721分泌的上清夜中能够检测到MMP-2, MMP-9的表达, 通过积分V值可以看出MMP-2的活性明显高于MMP-9. 不同浓度Nim作用于SMMC-7721细胞24 h后, MMP-2, MMP-9表达均下降, 与对照组比较, 实验组V值下降具

有显著性差异(图3, 4). 其抑制作用随药物浓度的增大而增强, 呈剂量依赖性.

3 讨论

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是催化花生四烯酸转化为前列腺素(prostaglandins, PGs)的关键酶, 目前认为, COX有COX-1和COX-2两种同功异构体^[9]. COX-1是一种组成型酶, 在许多组织中表达, 并参与细胞正常的生理功能; 而COX-2为一种诱导型酶, 静息时不表达, 只有在细胞因子、肿瘤剂及癌基因等促分裂剂刺激下才产生. 越来越多的研究提示, COX-2的表达与肿瘤的发生和发展密切相关^[10]. 近来发现, COX-2能诱导肿瘤产生侵袭与转移, 在胃、结肠癌的研究中表明^[11,12], COX-2的表达与淋巴结受侵呈正相关, 然而, COX-2引起肿瘤侵袭、转移的机制仍不明确.

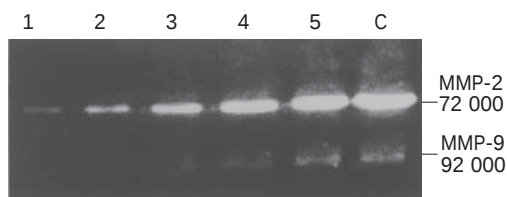


图3 SMMC-7721细胞分泌的MMP-2, MMP-9的酶谱分析
1-5: 400, 200, 100, 50, 25 $\mu\text{mol/L}$ Nim; C: 对照组.

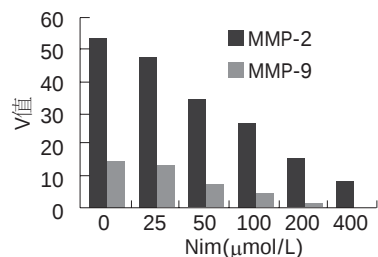


图4 SMMC-7721细胞分泌的MMP-2, MMP-9各条带积分V值比较.

肿瘤侵袭、转移是恶性肿瘤的重要生物学行为, 肿瘤细胞在侵袭转移过程中必须破坏由细胞间基质和基底膜组成的细胞外基质. 肿瘤细胞通过自身或诱导宿主细胞产生多种基质蛋白溶解酶, 如基质金属蛋白酶、纤溶酶原激活物、胱氨酸蛋白酶等, 使细胞间基质的主要成分被降解, 形成局部缺损区, 然后肿瘤细胞穿过细胞间基质及基底膜, 进入血液循环进一步形成转移灶. 在参与破坏细胞外基质的酶类中基质金属蛋白酶是主要的直接作用者. MMP是一组锌离子依赖性内肽酶, 根据底物的不同, 可分为不同的种类, 其中明胶酶类(包括MMP-2和MMP-9)的作用底物是IV/V型胶原. 大量研究表明, 明胶酶与肿瘤侵袭转移的关系甚为密切^[13], 因为明胶酶不但可以酶解细胞间基质成分还能酶解基底膜主要成分- IV型胶原^[14]. McKenna *et al*^[15]的实验表明, 高转移性肝癌组织MMP的表达及活性升高, 与肝癌的高转移、高复发性有直接的关系. 最近的实验表明, COX-2的高表达可以引起MMP-2和MMP-9的活性的增强. 因此, 我们探讨了COX-2抑制剂能否通过明胶酶来降低肝癌的侵袭和转移. 我们通过MTT法检测显示: Nim可以使SMMC-7721细胞生长受到抑制, 与对照组比较差异有显著性, 说明Nim能抑制SMMC-7721细胞生长. Transwell小室是目前测定肿瘤细胞体外侵袭能力比较理想的实验模型, 本研究提示: Nim可以显著降低SMMC-7721细胞的侵袭能力, 且随药物作用浓度的增加, 其抑制作用逐渐增强, 在一定范

围内呈剂量依赖性. RT-PCR及明胶酶谱检测显示, 在SMMC-7721细胞中能够检测到MMP-2, MMP-9的表达, Nim能够抑制SMMC-7721细胞分泌MMP-2, MMP-2的表达及降低其活性, 从而说明Nim可以通过影响肝癌细胞MMP来降低其侵袭能力.

总之, 本实验初步证实了选择性COX-2抑制剂可以通过MMP途径, 降低肝癌细胞的侵袭能力, 从而抑制肝癌的转移和复发. 这为选择性COX-2抑制剂防治肝癌提供了一定的理论依据, 其有可能成为肝癌的防治手段之一.

4 参考文献

- 1 Lagorce C, Paraf F, Vidaud D, Couvelard A, Wendum D, Martin A, Flejou JF. Cyclooxygenase-2 is expressed frequently and early in Barrett's oesophagus and associated adenocarcinoma. *Histopathology* 2003; 42: 457-465
- 2 Mann JR, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 and gastrointestinal cancer. *Cancer J* 2004;10: 145-152
- 3 Kune GA. Colorectal cancer chemoprevention: aspirin, other NSAID and COX-2 inhibitors. *Aust NZ J Surg* 2000; 70: 452-455
- 4 Yao M, Lam EC, Kelly CR, Zhou W, Wolfe MM. Cyclooxygenase-2 selective inhibition with NS-398 suppresses proliferation and invasiveness and delays liver metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 90: 712-719
- 5 Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-696
- 6 Huang DS, Shen KZ, Wei JF, Liang TB, Zheng SS, Xie HY. Specific COX-2 inhibitor NS398 induces apoptosis in human liver cancer cell line HepG2 through BCL-2. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 204-207
- 7 Arya M, Patel HR, McGurk C, Tatoud R, Klocker H, Masters J, Williamson M. The importance of the CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor interaction in prostate cancer metastasis. *J Exp Ther Oncol* 2004; 4: 291-303
- 8 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994; 218: 325-329
- 9 Fitzpatrick FA. Cyclooxygenase enzymes: regulation and function. *Curr Pharm Des* 2004;10: 577-588
- 10 Joo YE, Oh WT, Rew JS, Park CS, Choi SK, Kim SJ. Cyclooxygenase-2 expression is associated with well-differentiated and intestinal-type pathways in gastric carcinogenesis. *Digestion* 2002; 66: 222-229
- 11 Leung WK, To KF, Ng YP, Lee TL, Lau JY, Chan FK, Ng EK, Chung SC, Sung JJ. Association between cyclo-oxygenase-2 overexpression and mis-sense p53 mutations in gastric cancer. *Br J Cancer* 2001; 84: 335-339
- 12 Sankhasard S, Lertprasertsuk N, Vinitketkumnuen U, Cressey R. Expression of cyclooxygenase-1 and

同行评价

本文对选择性环氧化酶-2抑制剂Nimesuli对肝癌细胞SMMC-7721侵袭力的影响进行了探讨, 立题新颖, 实验设计较系统规范, 文笔较流畅, 具有一定的指导意义, 但要支持Nimesuli具有抗侵袭作用还需更多的实验数据

- 2 and clinicopathologic features of colorectal cancer in northern Thailand. *Asian Pac J Cancer Prev* 2004; 5: 44-49
- 13 Edwards JG, McLaren J, Jones JL, Waller DA, O'Byrne KJ. Matrix metalloproteinases 2 and 9 (gelatinases A and B) expression in malignant mesothelioma and benign pleura. *Br J Cancer* 2003; 88: 1553-1559
- 14 Lynch CC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* 2002; 70: 561-573
- 15 McKenna GJ, Chen Y, Smith RM, Meneghetti A, Ong C, McMaster R, Scudamore CH, Chung SW. A role for matrix metalloproteinases and tumor host interaction in hepatocellular carcinomas. *Am J Surg* 2002; 183: 588-594

电编 张勇 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

•消息•

消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛征文通知

本刊讯 《中华胃肠外科杂志》与浙江省人民医院定于2006-04-21/25在杭州共同举办“消化道肿瘤外科治疗专题”高级论坛,主要探讨消化道肿瘤手术治疗的有关问题,包括不同术式的选择及手术的规范化问题、腹腔镜下进行各种手术的选择及相关问题。为活跃学术论坛,促进消化道肿瘤外科治疗的发展,特向广大普外科工作者征稿。

1 会议具体内容

论坛的具体内容包括: (1)肝移植手术适应证及相关问题(黄洁夫主讲); (2)肝胆系统肿瘤手术的选择(郑树森主讲); (3)消化系统肿瘤的综合治疗(樊代明主讲); (4)胰腺肿瘤外科治疗进展(赵玉沛主讲); (5)胃癌的根治性手术(詹文华主讲); (6)腹腔镜下的胃癌根治术(余佩武主讲); (7)胃癌腹膜转移的外科治疗(朱正纲主讲); (8)低位直肠癌的保肛手术(汪建平主讲); (9)腹腔镜下的结直肠癌手术(郑民华主讲); (10)规范的TME手术及相关问题(顾晋主讲); (11)胃癌外科治疗的新进展(叶再元主讲)。

2 征文要求

内容应与消化道肿瘤(以胃肠道为主)外科治疗有关。采用word文档格式,字数3 500字符左右,摘要500字左右(宋体、小四号)。

3 文章投送形式

分两种: (1)电子邮件投稿: 将征文以附件形式提交,注明“消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛”征文,文件名为会议名称加第一作者姓名; 电子信箱: zhwcwk@21cn.com. (2)邮寄: 打印稿用A4纸(附软盘),软盘请注明研讨题目、作者。

4 联系地址及截稿

截稿日期: 2006-01-31(以当地邮戳为准)。联系地址: 广州市中山二路58号(510080)中山大学附属第一医院《中华胃肠外科杂志》编辑部一室,电话: 020-87335945。

下咽鳞癌不同方案治疗的临床结果分析

邢海杰, 曾宗渊, 陈福进, 郭朱明, 杨安奎, 张 诤

邢海杰, 曾宗渊, 陈福进, 郭朱明, 杨安奎, 张诤, 华南肿瘤学国家重点实验室, 中山大学肿瘤防治中心头颈科 广东省广州市 510060

通讯作者: 曾宗渊, 510060, 广东省广州市东风东路651号, 中山大学肿瘤防治中心头颈科. tjkgzsums.edu.cn

电话: 020-87343302 传真: 020-87331906

收稿日期: 2005-10-14 接受日期: 2005-10-17

An analysis of outcomes for hypopharyngeal squamous cell carcinoma treated with different methods

Hai-Jie Xing, Zong-Yuan Zeng, Fu-Jin Chen, Zhu-Ming Guo, An-Kui Yang, Quan Zhang

Hai-Jie Xing, Zong-Yuan Zeng, Fu-Jin Chen, Zhu-Ming Guo, An-Kui Yang, Quan Zhang, State Key Laboratory of Oncology in Southern China; Department of Head and Neck Surgery, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China

Correspondence to: Dr. Zong-Yuan Zeng, State Key Laboratory of Oncology in Southern China; Department of Head and Neck Surgery, Cancer Center, Sun Yat-sen University, 651 Dongfeng East Road, Guangzhou 510060, Guangdong Province, China. tjkgzsums.edu.cn
Received: 2005-10-14 Accepted: 2005-10-17

Abstract

AIM: To analyze the outcomes of hypopharyngeal squamous cell carcinoma treated with different methods and to explore a more effective therapy for it.

METHODS: This retrospective study concerns 187 hypopharyngeal squamous cell carcinomas and their characteristics. The survival rate, recurrence rate and influence of laryngeal preservation on the survival were compared among different therapies.

RESULTS: The overall 5-year survival rate was 44.9%. The 5-year survival rates of stage I, II, III and IV were 100%, 81.8%, 47.6%, and 30.2%, respectively, and the former two were significantly higher than the latter two ($\chi^2 = 22.878, P = 0.0001$). The overall 5-year survival rate for synthetic therapy, surgery and radiotherapy alone was 60.8%, 38.7%, and 22.0%, respectively, and the survival rates of patients

at stage III and IV were 75.5% and 45.3% for synthetic therapy, 33.3% and 17.6% in surgery alone, 16.7% and 7.7% in radiotherapy alone. The survival rates of stage III and stage IV in patient received synthetic therapy were markedly higher than those in patient received surgery or radiotherapy (all $P < 0.05$). The overall recurrence rate was 44.9%. The 5-year recurrence rates of stage II, III and IV were 31.8%, 47.6% and 49.0%, respectively, and there was a significant difference between stage III, IV and stage I, II (48.4% vs 25%, $\chi^2 = 5.816, P = 0.016$). Significant differences were shown in the recurrence rate of stage III, IV between synthetic therapy (26.7%) and surgery (60.9%) or radiotherapy (80%)(all $P < 0.01$). The recurrence rates of highly, moderately and lowly differentiated carcinoma were 34.2%, 50% and 56.1%, respectively, and there was significant differences between highly and moderately or lowly differentiated carcinoma ($\chi^2 = 4.977, P = 0.026$). The 5-year survival rate was not significantly different between patients with laryngeal preservation and without laryngeal preservation at stage III or IV (all $P > 0.05$).

CONCLUSION: Synthetic therapy is superior to surgery or radiotherapy alone in the treatment of hypopharyngeal squamous cell carcinoma. Laryngeal preservation can be achieved in some of patients at stage III or IV.

Key Words: Squamous cell carcinoma; Hypopharyngeal neoplasms; Therapy; Prognosis

Xing HJ, Zeng ZY, Chen FJ, Guo ZM, Yang AK, Zhang Q. An analysis of outcomes for hypopharyngeal squamous cell carcinoma treated with different methods. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(3):299-305

摘要

目的: 分析下咽鳞癌不同方案临床治疗结果, 探讨下咽鳞癌最优治疗模式。

方法: 回顾分析187例下咽鳞癌临床资料, 比较不同方案治疗的生存率, 复发率以及喉功能保留的影响。

■背景资料

下咽鳞癌治疗方案多样, 但缺乏前瞻性多例数的对照研究, 探讨统一规范的治疗方案一直是下咽鳞癌临床治疗研究的重点之一。

■研究前沿

病理分化差、黏膜下浸润广泛、晚期病例多具有下咽鳞癌的临床特点,如何提高生存率、喉功能保留率是目前下咽鳞癌研究的重点和热点。

结果: 5 a总体生存率44.9%。I-IV期5 a生存率分别为100%, 81.8%, 47.6%和30.2%。I、II期生存率高于III、IV期($\chi^2 = 22.878, P = 0.0001$)。各治疗组的5 a总体生存率分别为综合治疗60.8%, 单纯手术治疗38.7%, 单纯放射治疗22.0%。综合治疗明显高于单纯手术治疗和单纯放射治疗($\chi^2 = 4.651, P = 0.032$; $\chi^2 = 24.248, P = 0.0001$)。III、IV期5 a生存率分别为综合治疗75.7%和45.3%, 单纯手术治疗为33.3%和17.6%, 单纯放射治疗为16.7%和7.7%。综合治疗生存率明显高于单纯手术治疗和单纯放射治疗($\chi^2 = 4.290, P = 0.038$; $\chi^2 = 22.247, P = 0.0001$; $\chi^2 = 4.149, P = 0.042$; $\chi^2 = 11.163, P = 0.001$)。总体复发率44.9%。II-IV期的5 a复发率分别为31.8%, 47.6%和49.0%。III、IV期病例复发率为48.4%, 明显高于I、II期的25%($\chi^2 = 5.816, P = 0.016$)。各治疗组中, III、IV期病例的5 a复发率分别为单纯手术治疗60.9%, 单纯放射治疗80%, 综合治疗26.7%。单纯手术治疗和单纯放射治疗的复发率明显高于综合治疗($\chi^2 = 9.425, P = 0.002$; $\chi^2 = 36.064, P = 0.0001$)。高、中和低分化鳞癌的复发率分别为34.2%, 50%和56.1%。低分化癌的复发率明显高于高分化癌($\chi^2 = 4.977, P = 0.026$)。III、IV期病例中, 喉功能保留和不保留患者的5 a生存率分别为72.4%, 46.2%和60.0%, 36.8%。两者相比差异无显著性($P > 0.05$)。

结论: 下咽鳞癌综合治疗优于单一治疗。部分III、IV期病例可行喉功能保留手术。

关键词: 鳞癌; 下咽肿瘤; 治疗; 预后

邢海杰, 曾宗渊, 陈福进, 郭朱明, 杨安奎, 张诤. 下咽鳞癌不同方案治疗的临床结果分析. 世界华人消化杂志 2006;14(3):299-305

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/299.asp>

0 引言

下咽鳞癌是上呼吸消化道(aerodigestive tract)肿瘤之一, 起病隐匿, 多数患者就诊时已属晚期, 病理以低分化癌为主, 预后较差。至今没有统一规范的临床治疗模式, 为探讨下咽鳞癌的临床治疗, 现回顾我院1985/2000年下咽鳞癌病例资料, 分析如下:

1 材料和方法

1.1 材料 187例中, 男171例, 女16例, 年龄22-80岁, 平均57.5岁。所有病例病理检查证实为鳞状细胞癌。其中, 鳞癌I级38例(20.3%), 鳞癌II级

56例(30.0%), 鳞癌III级82例(43.9%), 未分级11例(5.9%)。根据UICC2002标准, 所有病例重新分期(表1)。无远处转移病例。

1.2 方法 治疗分组: 综合治疗组97例, 包括诱导化疗+手术36例, 手术+放射治疗61例。单纯手术治疗组31例。单纯放射治疗组59例。

1.2.1 综合治疗组 诱导化疗: 特素+DDP+5-FU方案5例, DDP+5-FU+BLM方案30例, 铂尔啉+5-FU方案1例。给药途径: 铂尔啉100 mg静脉滴注, 1-3 d。特素120 mg静脉滴注, 1 d。DDP 30 mg静脉滴注, 1-5 d。5-FU 0.5 g静脉滴注, 1-5 d。BLM 8 mg静脉推注, 1 d, 3 d, 5 d。化疗期间检测血象及对症支持治疗, 间隔3 wk后重复, 化疗2-5程, 化疗结束后3-4 wk行手术治疗。手术方法: 下咽鳞癌联合根治术49例, 喉部分切除+喉咽部分切除术16例, 喉咽广泛切除术32例。术后放射治疗: 使用 C_{60} 治疗45例, 6-8 MeV直线加速器治疗16例。原发灶48-64 Gy, 平均58.2 Gy。颈部放疗47例, 40-64 Gy, 平均48.4 Gy。分割剂量2 Gy/d。

1.2.2 单纯放射治疗组: 使用 C_{60} 治疗44例, 6-8 MeV直线加速器15例。放疗剂量: 原发灶48-84 Gy, 平均68.2 Gy。颈部40-76 Gy, 平均60.4 Gy。分割剂量2 Gy/d。

1.2.3 单纯手术治疗组: 下咽鳞癌联合根治术23例, 喉部分切除+喉咽部分切除术2例, 喉咽广泛切除术6例。

1.2.4 喉咽修复方法: 直接缝合98例, 胃上提4例, 空肠代颈段食管口咽吻合13例, 胃咽吻合4例, 前臂皮瓣2例, 胸大肌皮瓣7例。

1.2.5 颈部淋巴结治疗: 颈部淋巴结清扫术93例, 共96颈侧。根治性颈清扫术48颈侧, 功能性颈清扫术21颈侧, 分区性颈清扫术25颈侧, 预防性颈清扫术2颈侧, 颈清扫术后淋巴结阳性81例。

统计学处理 使用SPSS10.0统计软件电脑分析, 率的比较使用卡方检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

随访2-183 mo, 失访5例, 随访率97.8%。

2.1 生存情况 I、II期患者28例, 占总例数的15%, III、IV期占85%。5 a总体生存率44.9%。I-IV期5 a生存率分别为100%, 81.8%, 47.6%和30.2%。各种治疗组的5 a总体生存率分别为综合治疗组60.8%, 单纯手术治疗组38.7%, 单纯放射治疗组22.0%。综合治疗组显著高于单纯手术治疗组和单纯放射治疗组, 差异有显著性($\chi^2 =$

表 1 187例下咽鳞癌临床特点 (%)

项目	治疗方案			总计 n (%)
	综合治疗组 n (%)	单纯手术组 n (%)	单纯放疗组 n (%)	
部位				
梨状窝	86 (88.7)	24 (77.4)	40 (67.8)	150 (80.2)
环后区	7 (7.2)	4 (12.9)	10 (16.9)	21 (12.6)
咽后壁	4 (4.1)	3 (9.7)	9 (15.3)	16 (8.6)
T分期				
T1	9 (9.3)	2 (6.5)	2 (3.4)	13 (7.0)
T2	15 (15.5)	9 (29.0)	25 (42.4)	49 (26.2)
T3	40 (41.2)	9 (29.0)	18 (30.5)	67 (35.8)
T4	33 (34.0)	11 (35.5)	14 (23.7)	58 (31.0)
N分期				
N0	19 (19.6)	18 (58.1)	29 (49.2)	66 (35.3)
N1	36 (37.1)	8 (25.8)	18 (30.5)	60 (32.1)
N2	41 (42.3)	5 (16.1)	12 (20.3)	58 (31.0)
N3	1 (1.0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)
TNM分期				
I	4 (4.1)	2 (6.5)	0 (0)	6 (3.2)
II	7 (7.2)	6 (19.4)	9 (15.3)	22 (11.8)
III	33 (34.0)	6 (19.4)	24 (40.7)	63 (33.7)
IV	53 (54.6)	17 (43.8)	26 (44.1)	96 (51.3)

■创新盘点

综合治疗方案的生存率较高, 不同治疗方案的第二原发癌的发生率相似. 第二原发癌的防治有利于改善下咽鳞癌的预后.

表 2 各种治疗组患者以及不同综合治疗方案的患者TNM分期和5 a生存率 (%)

分组	分期				总计
	I	II	III	IV	
综合治疗组	100 (4/4)	85.7 (6/7)	75.7 (25/33)	45.3 (24/53)	60.8 (59/97)
单纯手术组	100 (2/2)	83.3 (5/6)	33.3 (2/6)	17.6 (3/17)	38.7 (12/31)
单纯放疗组	—	77.8 (7/9)	16.7 (3/24)	7.7 (2/26)	20.3 (12/59)
总计	100 (6/6)	81.8 (18/22)	47.6 (30/63)	30.2 (29/96)	44.9 (84/187)
化疗手术组	100 (2/2)	75.0 (3/4)	66.7 (6/9)	47.6 (10/21)	58.3 (21/36)
手术放疗组	100 (2/2)	100 (3/3)	79.2 (19/24)	43.8 (14/32)	62.3 (38/61)
总计	100 (4/4)	85.7 (6/7)	75.7 (25/33)	45.3 (24/53)	60.8 (59/97)

4.651, $P = 0.032$; $\chi^2 = 24.248$, $P = 0.000$ 1). I、II期28例, III、IV期159例, 5 a总体生存率分别为85.7%(24/28)和37.1%(59/159), 两者相比, 差异有显著性($\chi^2 = 22.878$, $P = 0.000$ 1). 各治疗组中III、IV期病例5 a生存率分别为综合治疗组75.5%和45.3%, 单纯手术治疗组33.3%和17.6%, 单纯放疗治疗组16.7%和7.7%. 综合治疗组生存率显著高于单纯手术治疗组和单纯放疗治疗组($\chi^2 = 4.290$, $P = 0.038$; $\chi^2 = 22.247$, $P = 0.000$ 1和 $\chi^2 = 4.149$, $P = 0.042$; $\chi^2 = 11.163$, $P = 0.001$). 诱导化疗+手术和手术+放疗治疗的5 a生存率无差异($\chi^2 = 0.149$, $P = 0.699$)(表2).

2.2 复发和第二原发癌 本组84例复发. 原发灶复发17例, 颈部淋巴结复发38例, 远处转移15例, 原发灶+颈部淋巴结复发5例、颈部淋巴结复发+远处转移 7例, 原发灶复发+远处转移1例, 原发灶+颈部淋巴结+远处转移1例. 总体复发率44.9%(84/187). 54.8%(46/84)的病例于治疗后1 a内复发.

II-IV期的5 a复发率分别为31.8%, 47.6%和49.0%. I、II期病例复发率25%(7/28), III、IV期为48.4%(77/159), 两者相比, 差异有显著性($\chi^2 = 5.816$, $P = 0.016$). 综合治疗组, 单纯手术治疗组和单纯放疗治疗组的总体复发率分别为25.8%(25/97), 51.6%(16/31)和72.9%(43/59). 单纯手术治疗组和单纯放疗治疗组的复发率高于综合治疗组($\chi^2 = 7.205$, $P = 0.007$; $\chi^2 = 32.174$, $P = 0.000$ 1). III、IV期病例中, 综合治疗组的复发率为26.7%(23/86), 低于单纯手术治疗组(60.9%)和单纯放疗治疗组(80%), 差异有显著性($\chi^2 = 9.425$, $P = 0.002$; $\chi^2 = 36.064$, $P = 0.000$ 1)(表3).

在不同病理分化级别中, 高、中、低分化鳞癌的复发率分别为34.2%(13/38), 50%(23/46)和56.1%(46/82). 低分化鳞癌的复发率高于高分化鳞癌, 差异有显著性($\chi^2 = 4.977$, $P = 0.026$).

第二原发癌(second primary tumor, SPT)发生率5.9%(11/187). 其中, 综合治疗组6例, 单

■应用要点

综合治疗应是下咽鳞癌的首选治疗方案, 诱导化疗为主的序列综合治疗方案有利于保留喉功能, 值得深入研究, 将有良好的应用前景。

表3 各治疗组临床分期与5 a复发率 (%)

分期	I	II	III	IV	总计
综合治疗组	0 (0/4)	28.6 (2/7)	24.2 (8/33)	28.3 (15/53)	25.8 (25/97)
单纯手术组	0 (0/2)	33.3 (2/6)	66.7 (4/6)	58.8 (10/17)	51.6 (16/31)
单纯放疗组		33.3 (3/9)	75.0 (18/24)	84.6 (22/26)	72.9 (43/59)
总计	0 (0/6)	31.8 (7/22)	47.6 (30/63)	49.0 (47/96)	44.9 (84/187)

表4 喉功能保留与T、N分期 (n)

分期	保留喉功能组 (61)				不保留喉功能组 (67)			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
N0	6	13	8	5	0	0	5	0
N1	5	10	6	4	0	0	5	14
N2	0	1	3		0	0	22	20
N3								1
总计	11	24	17	9	0	0	32	35

表5 喉功能保留和不保留患者5 a生存率 (%)

治疗	I	II	III	IV	总计
保留喉功能组	100 (6/6)	84.6 (11/13)	72.4 (21/29)	46.2 (6/13)	72.1 (44/61)
不保留喉功能组	—	—	60.0 (6/10)	36.8 (21/57)	40.3 (27/67)
总计	100 (6/6)	84.6 (11/13)	69.2 (27/39)	38.6 (27/70)	55.5 (71/128)

单纯放疗组4例, 单纯手术治疗组1例, 三组相比, 差异无显著性($\chi^2 = 0.497$, $P = 0.780$). 发生时间: 0-120 mo. 平均41.6 mo. 其中, 胸段食管鳞癌7例, 平均发生时间45.5 mo. 手术+放射治疗1例, 根治性放疗1例, 放化疗2例, 姑息化疗1例, 2例放弃治疗. 治疗结果: 5例治疗后未控, 平均存活10 mo. 颈部清扫术后病理发现甲状腺乳头状腺转移癌2例, 再次手术后控制. 随访11 mo和42 mo, 仍生存.

多重癌2例, 发生时间39 mo和113 mo, 平均76 mo. 胸段食管鳞癌合并鼻咽鳞癌1例, 行化放疗后控制. 食管、鼻咽鳞癌合并甲状腺乳头状腺癌1例, 行根治性放疗. 随访6 mo和2 mo生存.

2.3 喉功能保留情况 原发灶手术治疗128例, 喉功能保留手术61例(表4). I、II期病例均行喉功能保留手术. III、IV期病例中, 喉功能保留和不保留的5 a生存率无显著性差异($\chi^2 = 0.113$, $P = 0.737$; $\chi^2 = 0.387$, $P = 0.534$)(表5).

3 讨论

3.1 下咽鳞癌的治疗选择 下咽鳞癌预后较差. I、II期病例选择手术或放射治疗效果较好. III、IV期病例多选择手术+放射治疗. 近年来,

化疗+手术, 放射+手术等治疗方案应用较多, 5 a生存率10%-67.5%^[1-5].

张宗敏 *et al*^[3]采用手术+放疗, 单纯放疗和单纯手术方案治疗下咽鳞癌, 5 a总体生存率分别为49.2%, 18.0%和22.5%. Bova *et al*^[4]采用手术+放疗和单纯放射治疗的结果为32%和7%. Ullah *et al*^[6]报道单纯手术治疗的5 a生存率为26%. 于峰 *et al*^[5]报道诱导化疗+手术治疗下咽鳞癌的5 a总体生存率为67.5%, III、IV期病例分别为72.7%和57.1%. 而III、IV期病例单纯放疗的5 a生存率为33%和5%^[7].

本组资料中, 综合治疗、单纯手术和单纯放疗的5 a总体生存率分别为60.8%, 38.7%和20.3%. III、IV期病例的各种治疗方法组中的5 a生存率分别为75.7%和45.3%, 33.3%和17.6%, 16.7%和7.7%, 与上述结果相近. 显示单纯手术和放疗对III、IV期, 尤其IV期病例几无治疗意义. 统计结果表明, 综合治疗的5 a生存率, 显著高于单一治疗. 提示选择综合治疗方案治疗下咽鳞癌, 尤其III、IV期病例, 可获得较好的治疗效果.

诱导化疗能缩小肿瘤体积, 有利于彻底切除肿瘤和保留喉功能^[8]. 但化疗方案的确立, 疗程的确定, 手术时机的选择等仍未统一^[9]. 本组早

期病例化疗3-4程后手术, 对比化疗前CT或MRI检查, 术中发现化疗不敏感病例中, 肿瘤有不同程度的进展, 其中4例手术切除困难. 在后续病例治疗中, 我们在2程化疗后进行疗效评估, 敏感病例(CR, PR)继续化疗达3-5程. 否则, 及时手术, 未见肿瘤进展病例. 因此, 我们认为2程化疗后评估疗效, 进而选择相应的治疗方法是可行的.

术前或术后放疗有不同看法^[10-12]. 我们选择术后放疗, III、IV期病例5 a生存率分别为79.2%和43.8%, 优于单一治疗. 原因是术后肿瘤负荷减少, 同时, 我们在术中常规留取手术切缘组织, 根据术后病理检查结果确定放疗部位和剂量, 利于控制局部复发. 另外, 术后放疗还可消灭术时意外散失的肿瘤细胞, 控制临床隐性(N0)淋巴结.

3.2 复发和第二原发癌 下咽鳞癌复发率较高. Chu *et al*^[2]报道的复发率为37%, Bova *et al*^[4]为41.1%, Godballe *et al*^[13]的结果达70.3%. 本组资料的复发率为44.9%, 1 a内复发者占54.8%, 显示复发是下咽鳞癌近期治疗失败的主要原因, 降低复发率是改善下咽癌预后的关键.

下咽鳞癌的复发因素较多. T、N分期、病理分化级别等均是下咽鳞癌复发的独立预测因素^[14,15]. Layland *et al*^[16]报道N0期病例的5 a无瘤生存率(57%)显著高于N+期(29.8%)($P=0.001$), T1和I、II期病例的复发率低于T2-4和III、IV期. Johansen *et al*^[17]的结果显示高分化癌的5 a控制率(48%)高于低分化癌(23%), 差异有显著性.

本组II-IV期的5 a复发率分别为31.8%, 47.6%和49.0%, 而高、中、低分化鳞癌的复发率分别为34.2%, 50%和56.1%. 显示随着临床分期上升, 病理分化级别降低, 复发风险逐步升高. III、IV期和低分化癌病例的复发率(48.4%和56.1%)显著高于I、II期(21.4%)和高分化癌病例(34.2%)($P<0.05$), 显示临床分期高, 病理分化差是下咽鳞癌复发的重要因素. 但在不同方案治疗的III、IV期病例中, 单一治疗的复发率显著高于综合治疗($P<0.05$), 提示恰当的治疗方案是降低复发率的重要环节. 本组资料表明通过手术切除肿瘤, 使用放射治疗和化疗控制残留和转移灶的综合治疗是降低复发, 提高生存的有效治疗方案.

头颈部SPT的发生率为2.1%-6%^[3,18,19], 本组资料为5.9%, 与上述结果一致. Dikshit *et al*^[20]发现60.4%的SPT发生于上呼吸消化道, 其次是肺、结肠、前列腺和膀胱. 本组资料中, 72.7%(8/11)的SPT发生于食管, 次为甲状腺27.3% (3/11)和鼻

咽18.2%(2/11), 其他部位未发现.

食管的SPT平均发生时间45.5 mo, 平均存活10 mo. 2例甲状腺乳头状腺癌为同时癌, 已平均存活超过2 a. 提示发生于甲状腺的SPT较发生于食管的预后好. 下咽癌治疗前常规检查甲状腺, 治疗后, 钡透或内窥镜定期检查上消化道, 有助于早期发现SPT. 有学者认为多重癌发生高峰持续达10 a以上^[21], 本组多重癌2例, 平均发生时间76 mo. 是否存在生存期长而多重癌高发的趋势, 仍需观察.

目前认为区域癌化(field cancerization)和转化细胞(transformed cell)迁移(migration)^[22]可能是形成SPT的重要机制, 器官差异和过量烟酒是其高危因素^[20]. SPT的治疗报道较少, 防治仍待深入研究.

3.3 下咽癌的喉功能保留 下咽鳞癌易侵犯周围组织, 黏膜下浸润广泛, 一度认为不适合保留喉功能. 随着临床研究深入和治疗技术改进, 学者们发现下咽癌患者的部分喉组织, 包括声带、杓状软骨等是正常的, 切除全喉组织不能提高生存率^[23,24]. 对选择性病例, 保留喉功能不影响生存率^[25-27]. 本组资料中, I、II期病例保留了全部或部分喉功能, 表明I、II期患者, 保留喉功能并不困难. III、IV期病例中, 喉功能保留和不保留患者的5 a生存率分别为44.3%和40.3%, $P>0.05$. 说明部分III、IV期病例保留喉功能是可行的, 但选择病例应慎重. 根据本组资料的体会: (1)下咽上区癌, 局限于会厌谷; (2)下咽后壁癌未侵及口咽; (3)梨状窝侧壁癌, 一侧声带活动未受限; (4)环后区癌未过中线可行喉功能保留手术. 环后区癌过中线或颈部淋巴结转移, 梨状窝癌对侧侵犯, 肿瘤黏膜下侵犯广泛以及高龄和低分化癌患者应选择全喉切除.

下咽鳞癌的综合治疗模式尚未统一^[28]. 近年来, 放疗后手术、诱导化疗后同时放化疗、诱导化疗后放疗或手术、放化疗后手术挽救等新治疗方案不断见诸报道^[1,29-33], 希望既彻底切除肿瘤, 提高生存率, 又能保留喉功能, 改善生活质量, 但远期疗效尚待评估. 本组资料的结果显示术前化疗和术后放射治疗的综合治疗是下咽鳞癌的较优治疗模式, 值得深入研究.

■名词解释

第二原发癌: 系指在先症癌后机体不同部位、器官同时或不同时发生第二种原发性恶性肿瘤, 包括交界肿瘤. 诊断标准(WarrenGates's标准): (1)两种肿瘤均有肯定的恶性行为; (2)组织学诊断明确, 其病理类型可相同也可不同; (3)必须除外一种肿瘤为另一种肿瘤的转移灶; (4)肿瘤间须有1.5cm以上的正常组织间隔. 第二原发癌的防治研究较少.

4 参考文献

- 1 Oueslati Z, Zeglouli I, Touati S, Gritli S, Nasr C, Benna F, Boussen H, Mokni N, Gamoudi A, El-May A, Ladgham A. Hypopharyngeal squamous cell carcinoma: retrospective study of 149 patients. *Cancer Radiother* 2004; 8: 358-363

■同行评价

本文科学性、可读性较好,创新性较差,是一篇5年临床总结,有一定的参考价值。

- 2 Chu PY, Wang LW, Chang SY. Surgical treatment of squamous cell carcinoma of the hypopharynx: analysis of treatment results, failure patterns, and prognostic factors. *J Laryngol Otol* 2004; 118: 443-449
- 3 张宗敏,唐平章,徐镇纲,李庆宏,胡郁华,徐国镇,高黎,屠规益.下咽鳞癌不同治疗方案的临床分析. *中华肿瘤杂志* 2003; 11: 1715-1719
- 4 Bova R, Goh R, Poulson M, Coman WB. Total pharyngolaryngectomy for squamous cell carcinoma of the hypopharynx: a review. *Laryngoscope* 2005; 115: 864-869
- 5 于锋,董玉礼,韩跃峰,赵慧. 290例下咽癌疗效分析. *中国肿瘤临床* 2000; 27: 835-838
- 6 Ullah R, Bailie N, Kinsella J, Anikin V, Primrose WJ, Brooker DS. Pharyngo-laryngo-oesophagectomy and gastric pull-up for post-cricoid and cervical oesophageal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol* 2002; 116: 826-830
- 7 Tombolini V, Santarelli M, Raffetto N, Donato V, Valeriani M, Ferretti A, Enrici RM. Radiotherapy in the treatment of stage III-IV hypopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res* 2004; 24: 349-354
- 8 The Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study Group. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. *N Engl J Med* 1991; 324: 1685-1690
- 9 Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 2000; 355: 949-955
- 10 Snow JB, Gelber RD, Kramer S, Davis LW, Marcial VA, Lowry LD. Comparison of preoperative and postoperative radiation therapy for patients with carcinoma of the head and neck. Interim report. *Acta Otolaryngol* 1981; 91: 611-626
- 11 Tupchong L, Scott CB, Blitzer PH, Marcial VA, Lowry LD, Jacobs JR, Stetz J, Davis LW, Snow JB, Chandler R. Randomized study of preoperative versus postoperative radiation therapy in advanced head and neck carcinoma: long-term follow-up of RTOG study 73-03. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1991; 20: 21-28
- 12 Vandenbrouck C, Sancho H, Le Fur R, Richard JM, Cachin Y. Results of a randomized clinical trial of preoperative irradiation versus postoperative in treatment of tumors of the hypopharynx. *Cancer* 1977; 39: 1445-1449
- 13 Godballe C, Jorgensen K, Hansen O, Bastholt L. Hypopharyngeal cancer: results of treatment based on radiation therapy and salvage surgery. *Laryngoscope* 2002; 112: 834-838
- 14 Shikama N, Sasaki S, Nishikawa A, Koiwai K, Yoshino F, Hirase Y, Kawakami R, Kadoya M, Oguchi M. Risk factors for local-regional recurrence following preoperative radiation therapy and surgery for head and neck cancer (stage II-IVB). *Radiology* 2003; 228: 789-794
- 15 Argiris A, Li Y, Forastiere A. Prognostic factors and long-term survivorship in patients with recurrent or metastatic carcinoma of the head and neck. *Cancer* 2004; 101: 2222-2229
- 16 Layland MK, Sessions DG, Lenox J. The influence of lymph node metastasis in the treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, larynx, and hypopharynx: N0 versus N+. *Laryngoscope* 2005; 115: 629-39
- 17 Johansen LV, Grau C, Overgaard J. Hypopharyngeal squamous cell carcinoma-treatment results in 138 consecutively admitted patients. *Acta Oncol* 2000; 39: 529-36
- 18 Raghavan U, Quraishi S, Bradley PJ. Multiple primary tumors in patients diagnosed with hypopharyngeal cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 128: 419-425
- 19 Leon X, Quer M, Diez S, Orus C, Lopez-Pousa A, Burgues J. Second neoplasm in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 1999; 21: 204-210
- 20 Dikshit RP, Boffetta P, Bouchardy C, Merletti F, Crosignani P, Cuchi T, Ardanaz E, Brennan P. Risk factors for the development of second primary tumors among men after laryngeal and hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* 2005; 103: 2326-2333
- 21 Saikawa M, Ebihara S, Yoshizumi T, Ohyama W. Multiple primary cancers in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 40-45
- 22 van Oijen MG, Leppers Vd Straat FG, Tilanus MG, Slootweg PJ. The origins of multiple squamous cell carcinomas in the aerodigestive tract. *Cancer* 2000; 88: 884-893
- 23 Urba SG, Moon J, Giri PG, Adelstein DJ, Hanna E, Yoo GH, Leblanc M, Ensley JF, Schuller DE. Organ preservation for advanced resectable cancer of the base of tongue and hypopharynx: a Southwest Oncology Group Trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 88-95
- 24 Dumich PS, Pearson BW, Weiland LH. Suitability of near-total laryngopharyngectomy in piriform carcinoma. *Arch Otolaryngol* 1984; 110: 664-669
- 25 李学忠, 张立强, 潘新良, 解光, 栾信庸, 王天铎. 保留喉功能的梨状窝癌的手术治疗. *中华耳鼻咽喉头颈外科杂志* 2005; 40: 212-216
- 26 李家喜, 高洪明, 郭志祥, 孙兴和, 赵锦荣, 崔晓峰. 保留喉功能下咽癌手术切除与修复. *中华耳鼻咽喉科杂志* 1999; 34: 311-313
- 27 王天铎, 李学忠, 于振坤, 卢永田, 许安廷, 董频, 栾信庸, 姜玉芳. 保留喉功能的下咽癌手术. *中华耳鼻咽喉科杂志* 1999; 34: 197-199
- 28 Lin DT, Cohen SM, Coppit GL, Burkey BB. Squamous cell carcinoma of the oropharynx and hypopharynx. *Otolaryngol Clin North Am* 2005; 38: 59-74, viii
- 29 Gourin CG, Terris DJ. Carcinoma of the hypopharynx. *Surg Oncol Clin N Am* 2004; 13: 81-98
- 30 Haddad R, Tishler RB, Norris CM, Mahadevan A, Busse P, Wirth L, Goguen LA, Sullivan CA, Costello R, Case MA, Posner MR. Docetaxel, cisplatin, 5-fluorouracil (TPF)-based induction chemotherapy for head and neck cancer and the case for sequential, combined-modality treatment. *Oncologist* 2003; 8: 35-44
- 31 Pfreundner L, Hoppe F, Willner J, Preisler V, Bratengeier K, Hagen R, Helms J, Flentje M. Induction chemotherapy with paclitaxel and cisplatin and CT-based 3D radiotherapy in patients with advanced laryngeal and hypopharyngeal carcinomas: a possibility for organ preservation. *Radiother Oncol* 2003; 68: 163-170

- 32 Featherstone CJ, Clarke S, Jackson MA, Shannon KF, McNeil EB, Tin MM, Clifford A, O'Brien CJ. Treatment of advanced cancer of the larynx and hypopharynx with chemoradiation. *ANZ J Surg* 2004; 74: 554-558
- 33 Saarilahti K, Kajanti M, Atula T, Makitie A, Aaltonen LM, Kouri M, Mantyla M. Biweekly escalated, accelerated hyperfractionated radiotherapy with concomitant single-dose mitomycin C results in a high rate of local control in advanced laryngeal and hypopharyngeal cancer. *Am J Clin Oncol* 2004; 27: 589-504

电编 李琪 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

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

• 消息 •

《现代消化及介入诊疗》杂志征稿、征订启事

本刊讯 《现代消化及介入诊疗》(Modern Digestion & Intervention)是国家科技部批准、广东省卫生厅主管、广东省医学会主办、南方医科大学南方医院消化病研究所承办向国内外公开发行的学术性医学期刊。

本刊宗旨是贯彻邓小平理论和“三个代表”思想,报道现代消化病与介入诊疗学的理论研究和临床经验,展示科技成果,加强学术交流,促进科技繁荣。遵循“三主三结合”原则: (1)以临床应用为主,基础理论与临床实践相结合; (2)以普及新技术新业务为主,普及与提高相结合; (3)以现代医学为主,中医与西医相结合,及时传递最新学术信息,刊载优秀论文、专题笔谈和专家读片,突出科学性、先进性和实用性,推动消化病与介入诊疗工作的开展与提高,为人类健康服务。本刊开设栏目有述评、专家论坛、论著(基础与临床)、短篇论著、综述、临床交流、诊疗技术、讲座、会议纪要、学术争鸣、病例分析与个案报道,欢迎投稿,欢迎订阅,请直接与编辑部联系。

本刊为大16开季刊,国内统一刊号: CN44-1580/R, 国际标准刊号: ISSN1672-2159, 广告经营许可证号: 4400004001080, 每期定价12元, 全年48元。地址: 广州市广州大道北1838号南方医科大学南方医院消化编辑部(邮编: 510515) 联系电话: 020-61641547; 传真: 020-87280770; E-mail: jmdi@vip.163.com.

PI3K-Akt信号通路与肿瘤

孙晓杰, 黄常志

■背景资料

PI3K-Akt信号通路调节细胞的增殖、分化、存活和迁移等功能。近年来发现, 这条通路的活性异常不仅能导致细胞恶性转化, 还与肿瘤细胞的侵袭转移行为相关。目前以这条信号通路为靶点的肿瘤治疗策略正在广泛的研究中。

孙晓杰, 齐齐哈尔医学院生化教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161042
黄常志, 中国医学科学院 中国协和医科大学肿瘤医院 北京市 100021
国家自然科学基金资助项目 No. 30171089
通讯作者: 黄常志, 100021, 北京市朝阳区潘家园, 中国医学科学院肿瘤医院. czhuang@public3.bta.net.cn
电话: 010-87788426 传真: 010-87788426
收稿日期: 2005-11-15 接受日期: 2005-12-08

摘要

磷脂酰肌醇3-激酶(PI3Ks)信号参与增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种细胞功能的调节。近年来发现, IA型PI3K和其后下游分子蛋白激酶B(PKB或Akt)所组成的信号通路与人类肿瘤的发生发展密切相关。该通路调节肿瘤细胞的增殖和存活, 其活性异常不仅能导致细胞恶性转化, 而且与肿瘤细胞的迁移、黏附、肿瘤血管生成以及细胞外基质的降解等相关, 目前以PI3K-Akt信号通路关键分子为靶点的肿瘤治疗策略正在发展中。

关键词: 磷脂酰肌醇3-激酶; 蛋白激酶B; 肿瘤

孙晓杰, 黄常志. PI3K-Akt信号通路与肿瘤. 世界华人消化杂志 2006; 14(3): 306-311

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/306.asp>

0 引言

磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)家族参与多种信号通路, 调节细胞的主要功能。正常情况下, 由其活化而产生的类脂产物3,4-二磷酸磷脂酰肌醇[PI(3,4)P₂]和3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇[PI(3,4,5)P₃]作为第二信使结合并激活多种细胞内的靶蛋白, 形成一个信号级联复合物, 最终调节细胞的增殖、分化、存活和迁移等^[1]。在PI3K家族中, IA型PI3K和其后下游分子丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Akt(或PKB)所组成的信号通路因其与肿瘤发生发展的相关性, 近年来备受瞩目。PI3K-Akt信号通路在广泛的人类肿瘤谱中失调, 该通路某些成分的突变所导致的功能获得或功能缺失能够引起细胞转化, 这条通路调节肿瘤细胞的增殖和存活, 与肿瘤的侵袭转移行为也密切相关, 目前以该通路为靶点的肿瘤治疗策略正

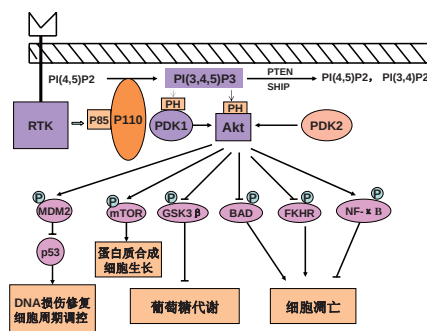


图1 PI3K-Akt信号通路。

在发展中。我们就这方面的进展加以综述。

1 PI3K-Akt信号通路

在PI3K家族中, 研究最广泛的是能被细胞表面受体所激活的I型PI3K。哺乳动物细胞中I型PI3K又分为IA和IB两个亚型, 他们分别从酪氨酸激酶连接受体和G蛋白连接受体传递信号。IA型PI3K是由催化亚单位p110和调节亚单位p85所组成的二聚体蛋白, 具有类脂激酶和蛋白激酶的双重活性^[2]。PI3K通过两种方式激活, 一种是与具有磷酸化酪氨酸残基的生长因子受体或连接蛋白相互作用, 引起二聚体构象改变而被激活; 另一种是通过Ras和p110直接结合导致PI3K的活化^[3]。PI3K激活的结果是在质膜上产生第二信使PIP₃, PIP₃与细胞内含有PH结构域的信号蛋白Akt和PDK1(phosphoinositide-dependent kinase-1)结合, 促使PDK1磷酸化Akt蛋白的Ser308导致Akt的活化。Akt还能通过PDK2(如整合素连接激酶ILK)对其Thr473的磷酸化而被激活^[4]。活化的Akt通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白Bad、Caspase9、NF-κB、GSK-3、FKHR、p21^{Cip1}和p27^{Kip1}等, 进而调节细胞的增殖、分化、凋亡以及迁移等(图1)。

PI3K-Akt信号通路的活性被类脂磷酸酶PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten)和SHIP(SH2-containing inositol 5-phosphatase)负调节, 他们分别从PIP₃的3'和5'去除磷酸而将其转变成PI(4,5)P₂和PI(3,4)P₂而降解^[5]。迄今为止, 尚未发现下调Akt活性的特异

磷酸酶, 但用磷酸酶抑制剂处理细胞后, 发现Akt的磷酸化和活性均有所增加. 最近发现Akt能被一种C末端调节蛋白(CTMP)所失活, CTMP能结合Akt并通过抑制Akt的磷酸化而阻断下游信号的传递, CTMP的过表达能够逆转v-Akt转化细胞的表型. 热休克蛋白90(HSP90)亦能结合Akt, 阻止Akt被PP2A磷酸酶的去磷酸化而失活, 因此具有保护Akt的作用^[4].

2 PI3K-Akt信号通路与肿瘤

2.1 PI3K的异常与细胞转化 PI3K的活性与乳腺癌、肺癌、黑色素瘤和淋巴瘤等多种人类肿瘤的发生相关^[6]. 据报道在人类肿瘤中, PI3K-Akt通路关键分子的编码基因在DNA水平上存在结构的变化, 如最初从人类肿瘤细胞系分离到的p85调节亚单位的突变体—截短的p65-PI3K(缺乏iSH2结构域和C末端的SH2结构域), 能引起PI3K的组成性活化和细胞转化; 大肠癌和卵巢癌中p85 α 基因在iSH2区域的缺失和突变能导致PI3K的激活^[5,7]; 在非小细胞肺癌、前列腺腺癌和肠癌中亦存在PI3K、Akt、NF- κ B/p65等持续活化以及表达量增高^[8-10]; 最近在Hodgkin's淋巴瘤分离到p85 α 基因的突变^[11], 在乳腺癌、卵巢癌和胰腺癌等多种肿瘤中发现p110和Akt2编码基因突变或扩增^[12-18], 而抑制PI3K活性后细胞的增殖明显被抑制, 表现为细胞周期阻滞、G1期相关蛋白CyclinD1和CDK4表达量减少以及Rb的磷酸化等, 这种细胞周期的阻滞能因细胞中活性Akt及其下游分子p70S6K的表达而恢复. 上述情况与乳腺癌中非突变ERBB2RTK的扩增相类似, 由此推测结构正常的蛋白过表达可能导致转化.

在对人类肿瘤PTEN基因缺失或突变的调查中发现, PTEN缺失发生在广泛的人类肿瘤中^[2], PTEN功能的缺失可以通过转录沉默或蛋白不稳定而发生. 这表明PI3K-Akt信号通路中的关键分子如p110 α 、p85 α 、Akt和PTEN等编码基因的结构改变与细胞转化相关, 这些基因目前已被证实是原癌基因或肿瘤抑制基因, 推测这些基因结构的改变使PI3K活化过程中通过正常RTK(receptor tyrosine kinase)信号对p85/p110复合物的负调节作用被解除, 从而导致PI3K的组成性活化和细胞转化. 目前已经在小鼠中建立了该通路异常的多种动物模型, 并且在有些模型中确实已经观察到该通路异常所导致的细胞转化和肿瘤发生.

2.2 Akt对肿瘤细胞存活和增殖的影响 细胞凋亡是控制过度增殖的一种正常细胞功能, 癌细胞具有多种抑制凋亡、延长其存活的机制. Akt主要作用于抗凋亡通路, 因为显性负效应Akt能阻止由类胰岛素生长因子1(IGF1)介导的存活, 持续激活Akt能够阻止由PTEN介导的凋亡. Akt通过对其下游的靶蛋白进行磷酸化而发挥其抗凋亡的作用, 如Akt能通过磷酸化Bcl-2家组成员BAD和蛋白水解酶Caspase-9而阻止凋亡; 还能磷酸化转录因子Forkhead家族成员FKHR, 通过抑制FKHR的核转位以及FKHR的基因靶点BIM和FAS配体的激活而抑制凋亡; 此外, Akt还能通过对NF- κ B和P53的间接作用影响细胞存活^[19], Akt通过磷酸化激活kB激酶(IKK)导致NF- κ B的抑制剂I κ B的降解, 从而使NF- κ B从细胞质中释放出来进行核转位, 激活其靶基因而促进细胞的存活. 最近发现, Akt能通过磷酸化P53结合蛋白MDM2影响P53的活性, 磷酸化的MDM2转位到细胞核与P53结合, 通过增加P53蛋白的降解而影响细胞存活.

细胞周期被细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)复合物和CDK抑制剂(CDIs)的协调作用所调节, Akt通过调节细胞周期影响细胞增殖. Cyclin D1的水平对细胞周期G1/S的转换至关重要, GSK3 β 通过磷酸化作用促进泛素介导的Cyclin D1的降解, Akt通过直接磷酸化抑制GSK3 β 的激酶活性从而阻止Cyclin D1的降解. Akt还对CKIs如p27^{Kip1}和p21^{Cip1}的表达具有负调节作用, 他通过影响p21^{Cip1}的磷酸化和与PCNA结合而调节p21^{Cip1}的活性, 导致细胞增殖的增加^[8]. Akt还能直接磷酸化p27^{Kip1}的Thr157, 导致p27^{Kip1}在细胞质中的滞留, 防止由p27^{Kip1}所导致的细胞周期的阻滞^[20]. 此外, Akt还能通过丝氨酸/苏氨酸激酶mTOR(the mammalian target of rapamycin)影响细胞存活和增殖, mTOR能激活核糖体激酶p70^{S6K}(ribosomal S6-kinase, RSK), p70^{S6K}通过抑制mRNA的转录后阻遏物4E-BP-1而增加mRNA的转录, 进而调节蛋白质的合成. 研究发现mTOR是Akt的直接靶点, 其活性能被PI3K的抑制剂wortmannin和LY294002所抑制, 但mTOR被Akt磷酸化是否为其活化机制还不清楚^[2]. 在肿瘤中, PI3K-Akt通路可能不是导致mTOR激活的唯一途径, 而且细胞的生长还可能通过PDK1与RSK的直接联系而不依赖于PI3K-Akt信号的调节.

2.3 PI3K-Akt信号通路与肿瘤的侵袭和转移 肿

■创新盘点

本文简要介绍了PI3K-Akt通路的组成、活化和调节, 重点阐明该通路与肿瘤细胞转化、增殖以及转移的相关性, 并对当前以该通路为靶点的抑制策略加以总结.

■应用要点

本文阐明了PI3K-Akt信号通路与肿瘤发生发展的相关性,为开发以该信号通路为靶点的小分子药物通过抑制该信号通路的活性进行肿瘤治疗提供了理论基础。

瘤细胞的迁移和黏附在肿瘤侵袭转移中起着重要的作用。PI3K能传递整合素所介导的侵袭信号,尤其对整合素 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_4$ 和 $\alpha_v\beta_3$ 的侵袭行为是必要的,如PI3K介导前列腺癌中整合素 $\alpha_v\beta_3$ 驱动的侵袭特性,在乳腺癌和卵巢癌中,Akt2的过表达能通过IV型胶原蛋白上调整合素 β_1 从而增加细胞的侵袭和转移^[21];但在c-erbB2所诱导的基质黏附和形成的破坏中,Akt显示出对整合素 $\alpha_2\beta_1$ 的功能起负调节作用^[22]。而在鳞癌细胞系中Akt的持续性表达能诱导上皮间质转变(epithelial mesenchymal transition, EMT),赋予了组织侵袭和转移所需的运动性^[23]。表明PI3K-Akt通路参与了黏附因子所介导的细胞黏附、运动和侵袭作用。

肿瘤血管生成是肿瘤发生转移的必要条件。PI3K通过与E-Cadherin、 β -Catenin和VEGFR-2形成复合物经由PI3K-Akt通路的活化参与血管内皮生长因子(VEGF)介导的内皮信号传递;而VEGFR-2与 $\alpha_v\beta_3$ 复合物也以PI3K依赖的方式介导内皮细胞的黏附和迁移^[1,24,25]。PI3K-Akt信号还能促进肿瘤坏死因子(TNF)诱导的内皮细胞迁移,调节肿瘤血管的生成^[26]。基质金属蛋白酶(MMPs)和环氧化酶-2(COX-2)均能影响肿瘤血管生成,在肿瘤的侵袭和转移中,血小板衍生生长因子(PDGF)经由PI3K介导的通路诱导MMP3的表达^[27],而上调抗凋亡蛋白Bcl-2和激活PI3K-Akt通路是COX-2刺激内皮细胞迁移和血管生成的主要机制^[28,29]。可见PI3K-Akt信号通路参与了多种因子所介导的肿瘤血管生成过程。

尿激酶型纤维蛋白酶原活性因子(uPA)是一个丝氨酸蛋白水解酶,他能引起细胞外基质和基膜的重塑而促进肿瘤转移。uPA水平的增加与肿瘤细胞的侵袭特性密切相关,如在肝细胞癌中uPA的上调与血管入侵、直接肝侵袭等密切相关,在大肠癌中uPA的表达增加了从腺瘤发展到癌变的进程^[30-33]。近年来发现,PI3K在促进uPA介导的多种肿瘤细胞侵袭中起着重要的作用,如在乳腺癌中uPA以依赖于PI3K和ERK的方式被ILGF-1上调,uPA的过表达是乳腺癌预后的强指示剂。抑制PI3K信号能够抑制uPA的分泌,导致乳腺癌的运动和迁移被抑制^[34-39]。转化生长因子 β (TGF β)能以剂量和时间依赖的方式上调uPA mRNA和蛋白的表达促进转移,而其上调uPA的作用也主要是通过PI3K/Akt/NF- κ B通路所介导的^[40]。目前已经证实,uPA是NF- κ B的靶基因,因此推测PI3K-Akt途径的活化导致NF- κ B的上调,

后者作用于其靶基因uPA导致肿瘤的转移。

3 PI3K-Akt信号通路肿瘤治疗的靶点

PI3K和其下游分子所转导的抗凋亡信号已经成为药物研究领域的焦点,目前用于抑制该信号通路的策略主要有以下几个方面:

3.1 发展和应用小分子抑制剂 目前已经发现了该信号通路中多种激酶的小分子抑制剂(small molecule inhibitors, SMIs), Wortmannin和LY294002是两种广泛应用的PI3K抑制剂,他们特异性抑制PI3Kp110亚单位的催化活性,但这两种抑制剂因其对细胞的毒性作用目前还都限于体外研究,尚未发展到临床应用。最近又发现了Akt的抑制剂1L-6-hydroxymethyl-chiro-inositol 2-(R)-2-O-methyl-3-O-octadecylcarbonate, 其选择性抑制Akt的IC₅₀值大约是5 μ m,明显小于其抑制PI3K的IC₅₀值90 μ m^[41];酪氨酸磷酸化抑制剂AG597是Bcr-Abl染色体转位基因产物的特异抑制剂,与慢性粒细胞性白血病的发展相关,研究发现AG597能导致Akt去磷酸化而失活^[42];最近发现KP372-1能够抑制甲状腺癌细胞中Akt的活化以及细胞增殖诱导细胞凋亡^[43]。p70^{S6K}是PI3K-Akt信号通路的另一可行性靶点,免疫抑制剂Rapamycin(RPM)广泛应用于临床器官移植中,研究发现,RPM能够使p70^{S6K}去磷酸化而抑制该激酶的活性,从而抑制肿瘤细胞的生长,目前正在多种PTEN突变和/或PI3K-Akt通路活性上调的人类肿瘤细胞系中观察到RPM的选择性抗肿瘤活性^[44-46]。

3.2 反义策略 用基于质粒的反义载体进行转染或用人工合成的反义寡核苷酸进行治疗,也已经用于干扰PI3K-Akt信号通路。据报道,反义cDNA的表达或用反义寡核苷酸治疗能下调p85基因的表达并消除PI3K信号,反义RNA使过表达Akt2的PCNC1细胞在裸鼠中形成肿瘤的能力明显下降。Akt1的反义寡核苷酸在癌细胞中具有使细胞在软琼脂中的生长能力下降、诱导凋亡以及增加细胞对化疗药物敏感性等多种作用,在PDK1的反义寡核苷酸研究中也得到了相似的结果^[6]。

3.3 显性负效应蛋白的表达 显性负效应(dominant negative, DN)蛋白结合和抑制内源性蛋白的功能, Sonoyama *et al*^[47]报道, p85调节亚单位的显性负效应蛋白 Δ p85的表达使Bcr-Abl转化细胞的细胞生长速度明显下降, p110显性负效应蛋白的作用亦有报道。Mabuchi *et al*^[48]报道,显性负效应Akt蛋白的表达使卵巢癌细胞对化疗

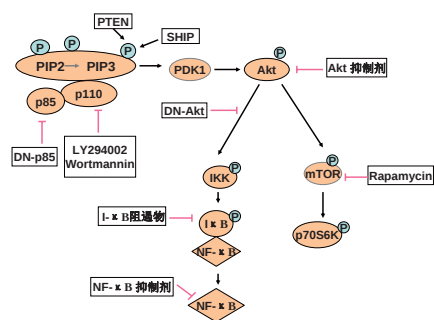


图2 PI3K-Akt信号通路的抑制位点。

药紫杉醇的敏感性增加;最近发现,显性负效应Akt能明显抑制肿瘤细胞的运动性^[49],这表明显性负效应Akt的表达能在一定程度上抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。此外,PI3K的信号还能通过提高磷酸酶PTEN或SHIP的活性而消除^[50]。抑制PI3K-Akt信号通路的策略见图2。

总之,PI3K-Akt信号通路对于细胞增殖、分化和凋亡的调节是必要的。其组成性活化与肿瘤发生及肿瘤侵袭转移的相关性,提示发展小分子药物有效抑制该通路的高活性,将有可能提高恶性肿瘤临床治疗的效果。目前,对该信号通路在肿瘤侵袭转移中的作用机制还不清楚,相信随着对这条通路分子机制研究的深入,在不久的将来,以PI3K-Akt通路为靶点的小分子药物将有望应用于肿瘤的临床治疗中。

4 参考文献

- 1 Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD. Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17: 615-675
- 2 Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 489-501
- 3 Ward SG, Finan P. Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors as therapeutic agents. *Curr Opin Pharmacol* 2003; 3: 426-434
- 4 Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer Res* 2003; 63: 2139-2144
- 5 Jimenez C, Jones DR, Rodriguez-Viciano P, Gonzalez-Garcia A, Leonardo E, Wennstrom S, von Kobbe C, Toran JL, R-Borlodo L, Calvo V, Copin SG, Albar JP, Gaspar ML, Diez E, Marcos MA, Downward J, Martinez-A C, Merida I, Carrera AC. Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J* 1998; 17: 743-753
- 6 Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, Franklin RA, McCubrey JA. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia*

- 2003; 17: 590-603
- 7 Philp AJ, Campbell IG, Leet C, Vincan E, Rockman SP, Whitehead RH, Thomas RJ, Phillips WA. The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res* 2001; 61: 7426-7429
- 8 Lee SH, Kim HS, Park WS, Kim SY, Lee KY, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ. Non-small cell lung cancers frequently express phosphorylated Akt; an immunohistochemical study. *APMIS* 2002; 110: 587-592
- 9 Itoh N, Semba S, Ito M, Takeda H, Kawata S, Yamakawa M. Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 3127-3134
- 10 Shukla S, MacLennan GT, Marengo SR, Resnick MI, Gupta S. Constitutive activation of PI3K-Akt and NF-kappaB during prostate cancer progression in autochthonous transgenic mouse model. *Prostate* 2005; 64: 224-239
- 11 Jucker M, Sudel K, Horn S, Sickel M, Wegner W, Fiedler W, Feldman RA. Expression of a mutated form of the p85alpha regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in a Hodgkin's lymphoma-derived cell line(CO). *Leukemia* 2002; 16: 894-901
- 12 Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, Gray JW. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet* 1999; 21: 99-102
- 13 Gao N, Flynn DC, Zhang Z, Zhong XS, Walker V, Liu KJ, Shi X, Jiang BH. G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C281-C291
- 14 Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malmstrom PO, Mansukhani M, Enoksson J, Hibshoosh H, Borg A, Parsons R. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res* 2005; 65: 2554-2559
- 15 Levine DA, Bogomolny F, Yee CJ, Lash A, Barakat RR, Borgen PI, Boyd J. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2875-2878
- 16 Hartmann C, Bartels G, Gehlhaar C, Holtkamp N, von Deimling A. PIK3CA mutations in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol (Berl)* 2005; 109: 639-642
- 17 Wu G, Mambo E, Guo Z, Hu S, Huang X, Gollin SM, Trink B, Ladenson PW, Sidransky D, Xing M. Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 4688-4693
- 18 Ikenoue T, Kanai F, Hikiba Y, Obata T, Tanaka Y, Imamura J, Ohta M, Jazag A, Guleng B, Tateishi K, Asaoka Y, Matsumura M, Kawabe T, Omata M. Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 4562-4567
- 19 Jeong SJ, Pise-Masison CA, Radonovich MF, Park HU, Brady JN. Activated AKT regulates NF-kappaB activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells. *Oncogene* 2005; 24: 6719-6728
- 20 Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Ales-

■名词解释

显性负效应(DN): 抑癌基因突变的拷贝在另一野生型拷贝存在并表达的情况下,仍可使细胞出现恶性表型和癌变,并使野生型拷贝功能失活,这种作用称为显性负效应。

■同行评价

本文表达了PI3K-Akt信号通路的组成,信号的途径及调控网络,具有分子生物学的理论意义,文中还强调了该信号通路及肿瘤发生、发展及转移潜能的关系,提示了以信号传导异常为治疗靶点的策略及研究结论,有较为广泛的可读性及启示。

- 21 Arboleda MJ, Lyons JF, Kabbinavar FF, Bray MR, Snow BE, Ayala R, Danino M, Karlan BY, Slamon DJ. Overexpression of AKT2/protein kinase B leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 196-206
- 22 Lindberg LE, Hedjazifar S, Baeckstrom D. c-erbB2-induced disruption of matrix adhesion and morphogenesis reveals a novel role for protein kinase B as a negative regulator of alpha(2)beta(1) integrin function. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 2894-2908
- 23 Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tschlis PN, Larue L. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 2003; 63: 2172-2178
- 24 Namiecinska M, Marciniak K, Nowak JZ. VEGF as an angiogenic, neurotrophic, and neuroprotective factor. *Postepy Hig Med Dosw* 2005; 59: 573-583
- 25 Tan PH, Xue SA, Manunta M, Beutelspacher SC, Fazekasova H, Shamsul Alam AK, McClure MO, George AJ. Effect of vectors on human endothelial cell signal transduction. implications for cardiovascular gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;
- 26 Zhang R, Xu Y, Ekman N, Wu Z, Wu J, Alitalo K, Min W. Etk/Bmx transactivates vascular endothelial growth factor 2 and recruits phosphatidylinositol 3-kinase to mediate the tumor necrosis factor-induced angiogenic pathway. *J Biol Chem* 2003; 278: 51267-51276
- 27 Kanaki T, Bujo H, Mori S, Yanjuan Z, Takahashi K, Yokote K, Morisaki N, Saito Y. Functional analysis of aortic endothelial cells expressing mutant PDGF receptors with respect to expression of matrix metalloproteinase-3. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 231-237
- 28 Gately S, Kerbel R. Therapeutic potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in the management of tumor angiogenesis. *Prog Exp Tumor Res* 2003; 37: 179-192
- 29 Thiel A, Heinonen M, Rintahaka J, Hallikainen T, Hemmes A, Dixon DA, Haglund C, Ristimaki A. Expression of cyclooxygenase-2 is regulated by GSK-3beta in gastric cancer cells. *J Biol Chem* 2005;
- 30 Sliva D, Rizzo MT, English D. Phosphatidylinositol 3-kinase and NF-kappaB regulate motility of invasive MDA-MB-231 human breast cancer cells by the secretion of urokinase-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 2002; 277: 3150-3157
- 31 Hiendlmeyer E, Regus S, Wassermann S, Hlubek F, Haynl A, Dimmler A, Koch C, Knoll C, van Beest M, Reuning U, Brabletz T, Kirchner T, Jung A. Beta-catenin up-regulates the expression of the urokinase plasminogen activator in human colorectal tumors. *Cancer Res* 2004; 64: 1209-1214
- 32 Li P, Gao Y, Ji Z, Zhang X, Xu Q, Li G, Guo Z, Zheng B, Guo X. Role of urokinase plasminogen activator and its receptor in metastasis and invasion of neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 1512-1519
- 33 Chan CF, Yau TO, Jin DY, Wong CM, Fan ST, Ng IO. Evaluation of nuclear factor-kappaB, urokinase-type plasminogen activator, and HBx and their clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4140-4149
- 34 Agarwal A, Das K, Lerner N, Sathe S, Cicek M, Casey G, Sizemore N. The AKT/I kappa B kinase pathway promotes angiogenic/metastatic gene expression in colorectal cancer by activating nuclear factor-kappa B and beta-catenin. *Oncogene* 2005; 24: 1021-1031
- 35 Chandrasekar N, Mohanam S, Gujrati M, Olivero WC, Dinh DH, Rao JS. Downregulation of uPA inhibits migration and PI3k/Akt signaling in glioblastoma cells. *Oncogene* 2003; 22: 392-400
- 36 Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. Genetic down-regulation of phosphoinositide-3-kinase by bikunin correlates with suppression of invasion and metastasis in human ovarian cancer HRA cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 6371-6379
- 37 Wang M, Vogel I, Kalthoff H. Correlation between metastatic potential and variants from colorectal tumor cellline HT-29. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2627-2631
- 38 Sliva D. Signaling pathways responsible for cancer cell invasion as targets for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 327-336
- 39 Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. Genetic down-regulation of phosphoinositide 3-kinase by bikunin correlates with suppression of invasion and metastasis in human ovarian cancer HRA cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 6371-6379
- 40 Tanaka Y, Kobayashi H, Suzuki M, Kanayama N, Terao T. Transforming growth factor-beta1-dependent urokinase up-regulation and promotion of invasion are involved in Src-MAPK-dependent signaling in human ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 8567-8576
- 41 Hu Y, Qiao L, Wang S, Rong SB, Meuillet EJ, Berggren M, Gallegos A, Powis G, Kozikowski AP. 3-(Hydroxymethyl)-bearing phosphatidylinositol ether lipid analogues and carbonate surrogates block PI3-K, Akt, and cancer cell growth. *J Med Chem* 2000; 43: 3045-3051
- 42 Urbano A, Gorgun G, Foss F. Mechanisms of apoptosis by the tyrphostin AG957 in hematopoietic cells. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 689-692
- 43 Mandal M, Kim S, Younes MN, Jasser SA, El-Naggar AK, Mills GB, Myers JN. The Akt inhibitor KP372-1 suppresses Akt activity and cell proliferation and induces apoptosis in thyroid cancer cells. *Br J Cancer* 2005; 92: 1899-1905
- 44 Georgakis GV, Younes A. From Rapamycin to rapamycin: targeting PI3K/Akt/mTOR for cancer therapy. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; 6: 131-140
- 45 Takeuchi H, Kondo Y, Fujiwara K, Kanzawa T, Aoki H, Mills GB, Kondo S. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res* 2005; 65: 3336-3346
- 46 Avellino R, Romano S, Parasole R, Bisogni R, Lamberti A, Poggi V, Venuta S, Romano MF. Rapamycin stimulates apoptosis of childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood* 2005; 106:

- 1400-1406
- 47 Sonoyama J, Matsumura I, Ezoe S, Satoh Y, Zhang X, Kataoka Y, Takai E, Mizuki M, Machii T, Wakao H, Kanakura Y. Functional cooperation among Ras, STAT5, and phosphatidylinositol 3-kinase is required for full oncogenic activities of BCR/ABL in K562 cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 8076-8082
- 48 Mabuchi S, Ohmichi M, Kimura A, Hisamoto K, Hayakawa J, Nishio Y, Adachi K, Takahashi K, Arimoto-Ishida E, Nakatsuji Y, Tasaka K, Murata Y. Inhibition of phosphorylation of BAD and Raf-1 by Akt sensitizes human ovarian cancer cells to paclitaxel. *J Biol Chem* 2002; 277: 33490-33500
- 49 Okudela K, Hayashi H, Ito T, Yazawa T, Suzuki T, Nakane Y, Sato H, Ishi H, KeQin X, Masuda A, Takahashi T, Kitamura H. K-ras gene mutation enhances motility of immortalized airway cells and lung adenocarcinoma cells via Akt activation: possible contribution to non-invasive expansion of lung adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2004; 164: 91-100
- 50 Fujita T, Doihara H, Kawasaki K, Takabatake D, Takahashi H, Washio K, Tsukuda K, Ogasawara Y, Shimizu N. PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer. *Br J Cancer* 2006; 94: 247-252

电编 张勇 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

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

●消息●

世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》 2004年版内科学类的核心期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 依据文献计量学的原理和方法, 经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊, 编入《中文核心期刊要目总览》2004年版(第4版)。本版核心期刊研究, 被列为“2001年国家社会科学基金项目”。该书于2004年7月由北京大学出版社出版。

该书已于1992, 1996, 2000年出版过三版, 在社会上引起了较大反响, 图书情报界、学术界、出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高评价, 普遍认为他适应社会需要, 为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据, 促进了中文期刊编辑和出版质量的提高, 已成为具有一定权威性的参考工具书。为了及时反映中文期刊发展变化的新情况, 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 开展了新一版核心期刊的研究工作, 课题组认真总结了前三版的研究经验, 对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究, 在此基础上, 进一步改进评价方法, 使之更加科学合理, 力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况。本版核心期刊定量评价, 采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等7个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达51种, 统计文献量达到943万余篇次(1999-2001年), 涉及期刊1万2千种。本版还加大了专家评审力度, 1 873位学科专家参加了核心期刊评审工作。经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1 800种核心期刊, 分属七大编75个学科类目。该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书。

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编, 北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编, 北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学书报资料中心等相关单位的百余名专家和期刊工作人员参加了研究。

幽门螺杆菌相关胃黏膜疾病炎症、凋亡与乳酸杆菌的关系

马锋振, 马洪升

■背景资料

幽门螺杆菌对胃黏膜的致病性早已得到广泛认可, 也有很多相应的治疗措施. 最近以来, 胃肠道微生态的平衡稳定得到人们的关注, 其中乳酸杆菌对幽门螺杆菌及其相关胃黏膜疾病的作用更是引起人们的关注, 本文就此作一综述.

马锋振, 马洪升, 四川大学华西医院消化内科 四川省成都市 610041

通讯作者: 马锋振, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院消化内科. locust007@sina.com
电话: 028-85445326

收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-12-08

摘要

幽门螺杆菌与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌及胃黏膜相关淋巴样组织淋巴瘤(MALT)等疾病的发生密切相关, 后者是炎症发展以及凋亡-增殖失衡的渐进过程中不同阶段的表现形式. 乳酸杆菌具有较好的抗*H pylori*的应用前景, 能降低因以抗生素为主根治*H pylori*疗法引起的副作用, 提高患者的依从性, 调节菌群失调, 其在*H pylori*诱导的胃黏膜炎症中具有抗炎作用.

关键词: 幽门螺杆菌; 乳酸杆菌; 炎症; 凋亡

马锋振, 马洪升. 幽门螺杆菌相关胃黏膜疾病炎症、凋亡与乳酸杆菌的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(3):312-317
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/312.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)是一种微需氧的、螺旋状的革兰氏阴性杆菌, 定植于全世界半数以上人群的胃内. 他通过黏附作用、毒力因子对黏膜细胞的直接损伤以及由机体对细胞的免疫反应而导致的免疫/炎症性组织损伤等而致病, 与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌及胃黏膜相关淋巴样组织淋巴瘤(MALT)等疾病的发生密切相关. 目前常规的根治*H pylori*的方法是以抗生素为主的三联、四联疗法, 但费用的昂贵及其副作用降低了患者的依从性, 此外细菌耐药、儿童感染者及无症状者是否采取同样疗法的争论要求人们采取更安全经济有效的治疗措施, 近年来以乳酸杆菌为主的益生菌在*H pylori*相关胃黏膜炎症中的作用备受关注, 我们就此作一综述.

1 胃内微生态研究

微生态学是研究正常微生态群与其宿主相互依

赖、相互制约的边缘科学. 胃肠道正常菌群参与了人体的生理、生化、病理、病理生理和药理过程. 很多临床疾病起因于正常菌群的改变和失衡, 为恢复这种平衡, 益生菌越来越受到人们的重视.

1.1 益生菌 益生菌制剂的定义: 是无致病性的活菌和(或)死菌包括细菌成分和代谢产物的制品, 经口或其他黏膜途径给药, 旨在改善宿主黏膜表面微生物或酶的平衡, 或者刺激特异性免疫机制产生有利的影响. 其作用机制为: 优势种群原理、增强机体的免疫功能、生物夺氧作用、生物拮抗作用, 产生有益代谢产物、防止有害物质产生. 尤其是已证实益生菌可以抗幽门螺杆菌感染及改善因根治*H pylori*引起的抗生素相关性副作用^[1]. 最常用的益生菌是乳酸菌, 包括乳酸杆菌属、双歧杆菌属、链球菌属和肠球菌属等.

1.2 乳酸杆菌

1.2.1 乳酸杆菌的生物学特性 乳酸杆菌属于乳酸杆菌科, 菌体通常呈细长杆状, 大小为(0.5-1.0) μm ×(2.0-10.0) μm , 无芽孢和荚膜, 周身鞭毛或无鞭毛, 通常不运动, 兼性厌氧或严格厌氧, 生长最适温度30-43℃, 最适pH值5.0-5.5或更低. 乳酸杆菌的作用: (1)调节生态平衡, 通过营养竞争、生物夺氧、产酸、抑制和占位效应等途径遏制病原菌的生长^[2]; (2)增强机体免疫水平, 提高免疫球蛋白浓度和增加巨噬细胞的吞噬活性; (3)合成多种维生素, 促进营养物质的吸收^[3]; (4)参与膜菌群构成, 通过自身的特殊结构与肠黏膜细胞受体紧密结合, 阻止致病菌定植和入侵^[4]; (5)代谢产生大量有机酸, 刺激胃肠蠕动, 减少毒素和代谢产物吸收. 乳酸杆菌优点: 繁殖快, 对自然环境抵抗力强, 安全性好, 对青霉素类、头孢类、氨基甙类、大环内酯类、四环素类、喹诺酮类等多种抗生素具有耐药性, 而双歧杆菌比较娇嫩, 不能与抗生素配合使用.

1.2.2 乳酸杆菌的抗炎作用 乳酸杆菌能改善胃肠道的炎症, 但目前尚很难确定特定的乳酸杆

菌株在炎症反应中的作用地位, 而且文献报道尚有分歧^[5]. Maassen *et al*^[6]研究了8种不同的乳酸杆菌株在肠黏膜中的水平与炎症因子表达的关系认为随着在肠黏膜乳酸杆菌水平的下降致炎因子TNF- α 和IL-2表达升高, *L.reuteri*和*L.brevis*株表达最强, 而较少或几乎没有表达IL-1 α 、INF- γ 、IL-10和IL-1 β . 而Christensen *et al*^[7]则认为乳酸杆菌强烈诱导IL-6的表达, 相对较少表达IL-10、IL-12及TNF- α . *L.casei*株具有最强的诱导TNF- α 表达的能力, *L.reuteri*株尽管在诱导IL-10表达方面能力最强却几乎不能诱导IL-12的表达. 此外, 添加*L.reuteri*株会抑制*L.casei*诱导的IL-12、IL-6及TNF- α 的表达. 乳酸杆菌的抗炎机制可能是通过抑制NF- κ B的活性来发挥作用的^[8].

2 幽门螺杆菌感染与胃黏膜上皮细胞凋亡

2.1 正常胃黏膜上皮细胞的增殖与凋亡平衡 正常胃黏膜的凋亡细胞位于黏膜表层, 增殖细胞位于小凹腺颈部, 细胞自腺颈部向表层逐渐增生替代, 细胞凋亡与增殖保持平衡. 如果平衡因*H pylori*打破, 则可以发生相关胃疾病, 过程常为: 正常胃黏膜-浅表性胃炎(CSG)-慢性萎缩性胃炎(CAG)-肠化生(IM)-异型增生(DYS)-肠型胃癌(GCa).

2.2 幽门螺杆菌感染与胃黏膜上皮细胞增殖 国内体外研究^[9]发现*H pylori*在较低浓度($\leq 1.6 \times 10^8$ CFU/L)时对细胞增殖起促进作用, 而在较高浓度($\geq 8 \times 10^8$ CFU/L)时抑制增殖. 对胃黏膜活检标本进行免疫组化检测发现, 从正常黏膜到慢性胃炎伴萎缩和肠化再到胃癌, 细胞增殖是逐级增加的. 增殖程度差异最大的是慢性胃炎的*H pylori*感染组和非感染组之间^[10]. 所有利用患者自身对照研究结果均提示, 根除*H pylori*会使上皮细胞增殖数降低至正常水平.

2.3 幽门螺杆菌与胃黏膜上皮细胞凋亡 *H pylori*感染致胃黏膜凋亡的分布特点: CSG凋亡细胞分布于腺体顶部, 腺体底部偶见单个细胞凋亡. CAG、IM凋亡细胞主要分布在腺颈部和腺体底部. DYS和GC中凋亡细胞主要分布在异型明显或癌巢集中的区域. 从CSG-CAG、IM-DYS-早期GC-进展期GC的胃黏膜增殖恶化演变中, 凋亡指数(AI)也递增, 但只有进展期GC的AI显著高于CSG($P < 0.05$)^[11]. *H pylori*产生的许多物质, 包括尿素酶、细胞毒素(VacA)、脂多糖、氨、一氯胺(NH₂Cl)和一氧化氮(NO)等可直接诱导

凋亡. 此外, *H pylori*也可刺激/诱导宿主炎症/免疫反应而导致大量细胞因子释放, 炎症介质也能调节凋亡反应. 如INF- γ 和TNF- α 能明显增强*H pylori*所致的细胞凋亡. *H pylori*感染诱导凋亡增加主要发生于胃黏膜病变早期. 在体外*H pylori*能诱导细胞凋亡, 在培养的胃细胞中加入*H pylori*能在数小时内诱导凋亡. 高密度的*H pylori*可导致细胞坏死. 多数*H pylori*定植患者的胃黏膜凋亡细胞主要位于胃腺体的上1/3, 而且在*H pylori*根除后其凋亡细胞数可降至正常. 有研究发现, 细胞凋亡率与炎症活动性评分存在明显正相关, *H pylori*密度和凋亡率之间也存在明显的正相关^[12]. 腺体细胞持续凋亡如果得不到更替则导致黏膜腺体的丢失, 导致胃黏膜腺体萎缩. 细胞凋亡的可能传导途径: TNF受体、Fas和Fas配体系统、线粒体通透性转换系统(MPT). 在*H pylori*诱导上皮细胞凋亡时, Bak在细胞接触该细菌不久就表达, 而其他Bcl-2家族成员如Bcl-2、Bax和Bcl-x并没有明显改变.

3 幽门螺杆菌感染后炎症/免疫反应

3.1 与炎症和免疫损伤有关的致病因子 文献报道与炎症和免疫损伤有关的毒性因子很多, 以下为公认的致病因子: 黏附素、尿素酶、脂多糖、黏液酶、脂酶和磷脂酶A、溶血素、醇脱氢酶、细胞毒素有空泡细胞毒素(VacA, 其基因为vacA)和细胞毒素相关蛋白(CagA, 其基因为cagA)两种、60 ku热休克蛋白及生物胺等. 近来对热休克蛋白、过氧化氢酶、过氧化物歧化酶及iceA基因等致病因子研究也较多.

3.2 与炎症和免疫损伤有关的细胞因子 幽门螺杆菌在上皮的黏附定居激活免疫反应, 刺激局部的免疫细胞释放肿瘤坏死因子(TNF- α), INF- γ 、IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、EGF等, 这些细胞因子聚集并可激活T淋巴细胞、中性粒细胞及其他炎性细胞. 此外*H pylori*本身也可产生趋化因子, 诱导炎性细胞在感染区域的聚集^[13]. 这些细胞因子构成一个复杂的炎症免疫调节网络, 通过多种途径协同发挥作用, 在局部受损血管内皮细胞内诱导组织胺、白三烯等炎性递质释放, 使局部发生充血、水肿、渗出等炎症反应及微循环障碍. 作为趋化因子诱导中性粒细胞、单核细胞等在胃黏膜局部浸润、激活, 产生自由基、白三烯及多种蛋白酶而导致局部炎症反应. 在多种细胞因子中IL-8的作用尤为重要.

■ 研发前沿

乳酸杆菌对幽门螺杆菌及其相关胃黏膜疾病作用的具体信号传导途径以及乳酸杆菌的剂量、应用时机、株种、应用方式等是当前研究领域中的热点.

■创新盘点

本文的创新之处在于关注于乳酸杆菌对幽门螺杆菌作用的具体信号传导途径,而非如类似文章仅仅总结乳酸杆菌以往的临床治疗效果。

3.2.1 IL-8的作用 IL-8在*H pylori*感染的胃黏膜中强烈表达,使中性粒细胞持续激活并进入胃黏膜^[14]. IL-8以一种剂量和时间依赖的方式诱导中性粒细胞迁移并穿过单层培养的胃上皮细胞,造成以中性粒细胞为主的炎症细胞在局部聚集,中性粒细胞在穿膜移行过程中明显增加了钠离子的逆向扩散,损伤胃黏膜屏障。*H pylori*感染者胃黏膜IL-8水平表达明显增加且与炎症程度明显正相关^[15,16]. IL-8等细胞因子亦可刺激G细胞分泌胃泌素,产生高胃泌素血症,间接促使胃黏膜损伤。

3.2.2 NF- κ B信号传导途径 目前认为,*H pylori*与胃黏膜上皮的接触是活动性炎症反应的细胞学机制的关键一步。然后胃上皮细胞发生细胞骨架重组、酪氨酸磷酸化,进而激活NF- κ B和(或)促分裂素激活的蛋白激酶(MAPK),诱导前炎症细胞因子如IL-8的生成。IL-8是胃黏膜上皮细胞暴露于*H pylori*后分泌的强有力的中性粒细胞和淋巴细胞激活因子,感染cagA阳性的*H pylori*菌株可增强IL-8的分泌^[17]. 炎症反应中细胞因子和炎症递质的表达调控主要在基因转录水平,IL-8和COX-2的基因启动子序列上均含有NF- κ B的结合位点,细胞中NF- κ B的激活可诱导IL-8和COX-2的基因转录增强,而Seo *et al*^[18]研究显示*H pylori*感染可诱发胃上皮细胞中NF- κ B的激活。有报道^[19] NF- κ B p65, IL-8和COX-2主要表达于胃黏膜上皮细胞,固有层炎性细胞也有不同程度的表达。*H pylori*阳性胃黏膜中p65蛋白,IL-8及COX-2 mRNA和蛋白的表达较*H pylori*阴性组显著增强,三者的表达均与胃黏膜炎症程度之间具有显著相关性($P<0.01$);胃黏膜NF- κ B p65蛋白表达与IL-8及COX-2 mRNA和蛋白的表达均呈正相关关系。因此认为*H pylori*感染导致胃黏膜NF- κ B p65, IL-8及COX-2表达增加, NF- κ B可能通过调控IL-8和COX-2的表达,参与了*H pylori*相关性胃炎的病理生理过程。

3.2.3 其他细胞因子的作用 IL-1 β 作为炎性因子,参与宿主对多种抗原的反应。Yamaoka *et al*^[20]发现*H pylori*阳性患者胃黏膜IL-1 β 含量显著高于*H pylori*阴性者, IL-1 β 含量与*H pylori*密度,胃黏膜中单核细胞、多核细胞浸润度呈显著正相关,并与胃上皮的损伤密切相关。IL-6、IL-8、IL-12及IFN γ 等细胞因子可通过旁分泌、内分泌等途径作用于T、B淋巴细胞、NK细胞、单核巨噬细胞,产生特异性及非特异性免疫反应,损伤局部组织。他也可通过直接细胞毒性作用损伤胃

黏膜, TNF- α 可通过其膜型受体作用于胃上皮细胞,影响细胞的磷脂代谢,导致自由基产生及溶酶体破裂,而使细胞坏死、组织损伤。IFN γ 可调节胃上皮细胞表型,增加MHC II类分子表达,并与一些细胞因子协同作用激活、增强局部细胞毒性T淋巴细胞反应,加重细胞损伤。IFN γ 及TNF- α 还可使胃上皮细胞屏障功能减退,对胃酸、胃蛋白酶及细菌致病因子的防御作用下降。

4 乳酸杆菌防治幽门螺杆菌感染的研究进展

4.1 乳酸杆菌在防治*H pylori*感染的体外研究 大量体外试验研究发现多种乳酸杆菌及其代谢产物能抑制或杀灭*H pylori*, 这些菌株包括嗜酸乳杆菌CRL 639、LB、NAS和DDS-1株以及*L johnsonii* La1、*L.salivarius* WB 1004株等^[21]. Coconnier *et al*^[22]研究发现, 乳杆菌LB株在体外有抗菌作用, 表达一些抗菌物质能穿过细胞膜进入细胞内杀死病原菌。乳杆菌LB株的培养物上清液(LB-SCS)在体内和体外均可抑制*H pylori*和*H pylori*尿素酶活性, 从而抑制*H pylori*的繁殖和定植。同时发现乳酸杆菌对*H pylori*的拮抗不依赖于乳杆菌分泌的乳酸。一些*L.reuteri*的株种(但并非全部)能与*H pylori*共享表面糖脂连接蛋白,因此能在宿主体内竞争结合位点而抗*H pylori*感染^[23]。

4.2 乳酸杆菌在防治*H pylori*感染的体内研究 用乳杆菌感染小鼠后再喂给*H pylori*, 则*H pylori*无法在胃内定植, 而给已感染*H pylori*的小鼠服用乳杆菌则可清除*H pylori*, 血清中抗体滴度亦明显降低^[24]. 乳酸杆菌可通过抵抗*H pylori*的定植, 分泌乳酸和抗菌肽类物质来抑制和杀灭*H pylori*, 通过调节机体免疫系统减轻*H pylori*的致病性和胃炎活动度。有学者用乳酸杆菌制剂治疗*H pylori*发现*H pylori*感染密度及反映胃黏膜损伤的指标都有明显下降。乳酸杆菌具有竞争排他、抗胃酸、胆盐、胰酶的作用, 故推测乳酸杆菌可能是通过定植于黏膜胃上皮表面实现抗*H pylori*致病作用的^[25]. Michetti *et al*^[26]在一个随机双盲对照试验中发现在体外无论*H pylori*是否定植于上皮细胞嗜酸乳杆菌La1株培养上清液都会抑制*H pylori*的生长; 体内给予口服La1株培养上清液抗*H pylori*则发现呼气试验值明显下降。Kabir *et al*^[27]发现*L.salivarius* WB 1004株不仅能抑制*H pylori*与动物和人胃上皮细胞黏附, 而且能减少IL-8的分泌。还发现给予GF级小鼠服用*H pylori*菌株9 wk后出现*H pylori*定植而SPF

级小鼠在胃内发现含有大量乳酸杆菌而未发生 *H pylori* 定植。当GF级小鼠首先喂服 *L.salivarius* WB 1004则也不出现 *H pylori* 定植的现象。而且, 给已经感染 *H pylori* 的GF级小鼠喂服 *L.salivarius* 后其体内病原菌的数量减至给予乳酸杆菌之前的1%以下。

4.3 乳酸杆菌制剂在临床上的应用 无致病性的乳酸菌制剂因其有益健康且可增强机体抗感染性疾病的能力而在临床上应用了十多年^[28]。在临床运用阶段, 乳酸杆菌制剂尚不能替代抗生素根除 *H pylori*, 但可以与抗生素联合使用, 平衡胃肠道正常菌群, 降低抗生素的耐药影响及副作用。在对急性腹泻的儿童给予口服补液时加用 *Lactobacillus acidophilus* LB能有效地降低腹泻的持续时间^[29]。

乳酸杆菌并非根除 *H pylori*, 而是通过调节胃内微生态平衡和抑制 *H pylori* 致病性来达到减轻和消除胃炎的目的。Felley *et al*^[30] 在研究中发现, 给予 *H pylori* 感染者以含 *L.johnsonii* La1株的酸奶和克拉霉素使 *H pylori* 的密度下降, 减轻了炎症反应及胃炎活动度, 但是不能提高抗生素对 *H pylori* 的清除率。但也有相反的报道, 给予常规的抗生素根治 *H pylori* 疗法加上嗜酸乳杆菌可以提高 *H pylori* 的根除率^[31,32]。Sakamoto *et al*^[33] 对203种乳酸杆菌细胞株研究认为 *L.gasseri* OLL 2716(LG21)株具有最强的黏附于胃上皮和抵御胃酸侵袭的能力可用于抗人类的 *H pylori* 感染。研究还发现经血清学检查和呼气试验证实 *L.gasseri* OLL 2716抑制了 *H pylori* 感染并减轻了胃炎的程度。Lykova *et al*^[34] 发现乳杆菌和双歧杆菌的益生菌制剂与抗生素为基础的根除 *H pylori* 三联疗法联用对儿童的 *H pylori* 相关性胃十二指肠疾病的效果好, 并能改善因抗生素相关的微生态失调。

多项研究发现, 给予 *H pylori* 传统三联疗法补充加入乳杆菌制剂可以减轻腹泻、恶心等胃肠道不良反应的发生率及强度, 可提高治疗的耐受性^[35,36]。即使对无症状和消化不良的患者根除 *H pylori* 时添加乳酸杆菌制剂也可以减少便秘、腹泻、呕吐及味觉异常等副作用的发生^[37,38]。

4.4 乳酸杆菌抗 *H pylori* 感染的可能机制^[21] 在肠道内乳酸杆菌通过竞争营养物质、竞争排他作用(与病原菌竞争结合位点)、产生抑制性复合物(如乳酸盐、过氧化氢、短链脂肪酸和细菌素样物质等)以及免疫调节刺激来发挥作用。乳酸杆菌在胃内可能与在肠道内作用的机制相似。

乳酸杆菌能有效缓解抗生素方案根除 *H pylori* 引起的腹泻, 目前考虑与其纠正菌群失调有关。但乳酸杆菌降低恶心和/或呕吐以及味觉异常的发生率的机制不清。他最可能的作用机制是与 *H pylori* 竞争结合位点^[39] 单独应用乳酸杆菌仅仅是减少 *H pylori* 感染的程度, 不能根除 *H pylori*。一项动物给服发酵奶及乳酸杆菌培养上清液的试验结果显示乳酸和另外一些抑制性代谢产物对病原菌可能有直接的抑制作用。乳酸杆菌的抑制性代谢产物具有增强抗生素杀菌的作用, 既可能是其直接作用也可能是因副作用减少后患者对治疗的顺应性提高的结果。此外也可能是乳酸杆菌激活免疫系统, 从而对增强疗效起到一定作用, 灭活的益生菌也能起作用可以佐证这一观点^[31,40,41]。有动物试验表明牛乳铁蛋白浓度大于0.5 g/L可以抑制 *H pylori* 的生长^[42]。如果要用牛乳铁蛋白抑制 *H pylori*, 其在牛奶中的最低浓度不应小于0.2 g/L。牛乳中的糖配体在 *H pylori* 感染的小鼠模型中降低了 *H pylori* 在胃上皮的定植和炎症积分^[43]。Sgouras *et al*^[44] 研究发现加入经中和酸度(pH 6.8)的 *Lactobacillus johnsonii* La1株上清液后明显减少了 *H pylori* 诱导胃腺癌AGS细胞产生的IL-8的分泌, 但并不伴随 *H pylori* 活性的降低。他们总结认为, 在感染 *H pylori* 的早期阶段, 给服 *Lactobacillus johnsonii* La1能减轻 *H pylori* 诱导的胃炎症程度, 可能机制为 *Lactobacillus johnsonii* La1通过阻断趋炎症信号而减轻了在黏膜固有层的淋巴细胞和中性粒细胞的聚集。Uchida *et al*^[45] 发现服用Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716(LG21 yogurt)能明显减轻急性胃炎并有剂量依赖关系, 对胃溃疡的预防也是有效的。并且LG21 yogurt能显著增加前列腺素E2的分泌。

研究表明, 乳酸杆菌用于 *H pylori* 相关胃疾病的治疗是安全有效的, 尤其是开发应用活菌比冻干制剂是更有效的途径。但现有资料仍有限, 而且到目前为止, 国内外的研究大多集中于乳酸杆菌制剂的临床效果而对其发挥作用的机制研究较少, 仍缺乏对剂量标准、特定株的选择、应用时机、持续时间以及应用方式的了解, 需要更多研究来验证之, 例如可从乳酸杆菌能改善人群 *H pylori* 感染的症状入手在细胞和分子水平上深入研究单个特定株与 *H pylori* 之间的相互作用方式。研制安全无害并能广泛应用的特异乳酸杆菌株制剂用于疾病的预防和治疗将是未来的发展趋势。

■应用要点

大量研究证明乳酸杆菌用于幽门螺杆菌相关胃疾病的治疗是安全有效的, 研制安全无害并能广泛应用的特异乳酸杆菌株制剂是未来的发展趋势。

■名词解释

微生态: 是指微生物存在的状态, 胃内微生态是指微生物在胃内存在的状态, 微生态失衡的意思是胃内微生物存在的状态失去了平衡。

5 参考文献

- Cazzato IA, Candelli M, Nista EC, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Role of probiotics in *Helicobacter pylori* infections. *Scandinavian Journal of Nutrition* 2004; 48: 26-31
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66: 365-378
- Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL. Antagonistic activity against *helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4573-4580
- Coconnier MH, Lievin V, Bernet-Camard MF, Hudault S, Servin AL. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1046-1052
- Seegers JF. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol* 2002; 20: 508-515
- Maassen CB, van Holten-Neelen C, Balk F, den Bak-Glashouwer MJ, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJ, Claassen E. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* 2000; 18: 2613-2623
- Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 2002; 168: 171-178
- Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, Rao AS, Madara JL. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination. *Science* 2000; 289: 1560-1563
- 杨艺, 邓长生, 彭俊忠. 幽门螺杆菌对体外培养的胃上皮细胞增殖与凋亡的影响. *中华微生物学和免疫学杂志* 2002; 22: 10-12
- Cahill RJ, Kilgallen C, Beattie S, Hamilton H, O' Morain C. Gastric epithelial cell kinetics in the progression from normal mucosa to gastric carcinoma. *Gut* 1996; 38: 177-181
- 庄小强, 郑杰, 林三仁, 孙桂华, 田野. 胃癌中幽门螺杆菌感染与癌基因蛋白表达及凋亡. *临床内科杂志* 2003; 20: 105-107
- Tari A, Kodama K, Kitadai Y, Ohta M, Sumii K, Kajiyama G. Is apoptosis in antral mucosa correlated with serum nitrite concentration in Japanese *Helicobacter pylori*-infected patients? *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 498-504
- 范学工, 夏华向. 幽门螺杆菌感染-基础与临床. 第1版. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1997: 48-57
- 王继恒, 刘文忠. 细胞因子基因多态性和幽门螺杆菌相关性疾病. *中华消化杂志* 2003; 23: 685-687
- Fujiwara Y, Arakawa T, Fukuda T, Sasaki E, Nakagawa K, Fujiwara K, Higuchi K, Kobayashi K, Tarnawski A. Interleukin-8 stimulates leukocyte migration across a monolayer of cultured rabbit gastric epithelial cells. Effect associated with the impairment of gastric epithelial barrier function. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1210-1215
- Holck S, Norgaard A, Bennedsen M, Permin H, Norn S, Andersen LP. Gastric mucosal cytokine responses in *Helicobacter pylori*-infected patients with gastritis and peptic ulcers. Association with inflammatory parameters and bacteria load. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 36: 175-180
- 陈锡美, 许树长. 胃黏膜疾病基础与临床研究. 第1版. 上海: 上海科技教育出版社, 2004: 95-100
- Seo JH, Lim JW, Kim H, Kim KH. *Helicobacter pylori* in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases, AP-1, and NF-kappaB and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. *Lab Invest* 2004; 84: 49-62
- 曹萍, 张岫兰, 卢启明, 薛群基. 幽门螺杆菌相关性胃炎中核因子-kappaB与IL-8, COX-2表达的意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 91-93
- Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relation between clinical presentation, *Helicobacter pylori* density, interleukin 1beta and 8 production, and cagA status. *Gut* 1999; 45: 804-811
- Hamilton-Miller JM. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22: 360-366
- Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64: 4573-4580
- Mukai T, Asasaka T, Sato E, Mori K, Matsumoto M, Ohori H. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32: 105-110
- 袁建平, 吴凯宇. 幽门螺杆菌感染的微生态治疗. *中华微生物学杂志* 2002; 14: 117-118
- Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 2000; 130: 396S-402S
- Michetti P, Dorta G, Wiesel PH, Brassart D, Verdu E, Herranz M, Felley C, Porta N, Rouvet M, Blum AL, Cortesys-Theulaz I. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion* 1999; 60: 203-209
- Kabir AM, Aiba Y, Takagi A, Kamiya S, Miwa T, Koga Y. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* 1997; 41: 49-55
- Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nutr* 2000; 83: 167-176
- Simakachorn N, Pichaiapat V, Rithipornpaisarn P, Kongkaew C, Tongpradit P, Varavithya W. Clinical evaluation of the addition of lyophilized, heat-killed *Lactobacillus acidophilus* LB to oral rehydration therapy in the treatment of acute diarrhea in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30: 68-72
- Felley CP, Cortesys-Theulaz I, Rivero JL, Sipponen P, Kaufmann M, Bauerfeind P, Wiesel PH, Brassart D, Pfeifer A, Blum AL, Michetti P. Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 25-29
- Canducci F, Armuzzi A, Cremonini F, Cammarota G, Bartolozzi F, Pola P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 1625-1629
- Sheu BS, Wu JJ, Lo CY, Wu HW, Chen JH, Lin YS, Lin MD. Impact of supplement with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1669-1675
- Sakamoto I, Igarashi M, Kimura K, Takagi A, Miwa

- T, Koga Y. Suppressive effect of *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 (LG21) on *Helicobacter pylori* infection in humans. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47: 709-710
- 34 Lykova EA, Bondarenko VM, Sidorenko SV, Grishina ME, Murashova AO, Minaev VI, Rytikov FM, Korsunskii AA. Combined antibacterial and probiotic therapy of *Helicobacter*-associated diseases in children. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1999; 76-81
- 35 Armuzzi A, Cremonini F, Ojetti V, Bartolozzi F, Canducci F, Candelli M, Santarelli L, Cammarota G, De Lorenzo A, Pola P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on antibiotic-associated gastrointestinal side effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy: a pilot study. *Digestion* 2001; 63: 1-7
- 36 Armuzzi A, Cremonini F, Bartolozzi F, Canducci F, Candelli M, Ojetti V, Cammarota G, Anti M, De Lorenzo A, Pola P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. The effect of oral administration of *Lactobacillus* GG on antibiotic-associated gastrointestinal side-effects during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 163-169
- 37 Cremonini F, Di Caro S, Covino M, Armuzzi A, Gabrielli M, Santarelli L, Nista EC, Cammarota G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Effect of different probiotic preparations on anti-helicobacter pylori therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2744-2749
- 38 Sheu BS, Wu JJ, Lo CY, Wu HW, Chen JH, Lin YS, Lin MD. Impact of supplement with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt on triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16: 1669-1675
- 39 Koga Y. Probiotics for *H. pylori* infection. *Nippon Rinsho* 2002; 60: 756-761
- 40 de Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics and non-intestinal infectious conditions. *Br J Nutr* 2002; 88: S59-S66
- 41 McCracken VJ, Gaskins HR. Probiotics and the immune system. In: Tannock GW, editor. Probiotics, a critical review. *Wymondham: Horizon Scientific* 1999; 85-111
- 42 Dial EJ, Hall LR, Serna H, Romero JJ, Fox JG, Lichtenberger LM. Antibiotic properties of bovine lactoferrin on *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2750-2756
- 43 Wang X, Hirno S, Willen R, Wadstrom T. Inhibition of *Helicobacter pylori* infection by bovine milk glycoconjugates in a BALB/cA mouse model. *J Med Microbiol* 2001; 50: 430-435
- 44 Sgouras DN, Panayotopoulou EG, Martinez-Gonzalez B, Petraki K, Michopoulos S, Mentis A. *Lactobacillus johnsonii* La1 attenuates *Helicobacter pylori*-associated gastritis and reduces levels of pro-inflammatory chemokines in C57BL/6 mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1378-1386
- 45 Uchida M, Kurakazu K. Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716 exerts gastroprotective action against [correction of agaisnt] acute gastric lesion and antral ulcer in rats. *J Pharmacol Sci* 2004; 96: 84-90

■同行评价

本文详细地阐明了 *H. pylori* 与乳酸杆菌之间的关系, 科学性和可读性较好。

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

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

●消息●

更正与说明专栏

本报讯 《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道, 特设“更正与说明”固定专栏, 包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目, 不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明, 而且针对文章的学术水平等进行讨论。在此, 我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》, 给更正与说明栏目投稿。(世界胃肠病学杂志社 2006-01-28)

药物遗传学和药物基因组学在肿瘤治疗中的应用

王立峰, 钱晓萍, 刘宝瑞

■背景资料

近来医学科技的进步使得肿瘤治疗取得了一些进展, 尽管如此, 在全人类不同种族人群中、不同个体间仍有显著的化疗药物治疗有效率/毒性反应的异质性。随着赫赛汀(herceptin)、格列卫(gleevec)这些分子靶向药物的应用, 肿瘤学家们期望在未来5-10 a内, 分子病理学和分子诊断技术的临床应用将对药物的研究、发展带来彻底变革, 从药物的选择、剂量、给药方式及新药的应用等全方面实现真正意义上的个体化医疗。

王立峰, 钱晓萍, 刘宝瑞, 南京大学医学院附属南京市鼓楼医院肿瘤中心 江苏省南京市 210008
通讯作者: 刘宝瑞, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属南京市鼓楼医院肿瘤中心, baoruiliu@medmail.com.cn
电话: 025-83304616-21002 传真: 025-83107095
收稿日期: 2005-10-14 接受日期: 2005-10-31

摘要

人类基因组计划的顺利完成及目前正在进行的蛋白质组学研究使当今的医疗领域产生了重大变化。肿瘤分子基础知识的不断扩展使人们认识到对于包括肿瘤、心血管等多种疾病而言, 基因表达谱及某些基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNPs)可用于指导治疗。药物遗传学/药物基因组学作为肿瘤新的治疗平台受到广泛关注并使得真正意义上的个体化治疗成为可能。我们着重论述了临床上与肿瘤治疗疗效/毒性反应相关的基因多态性与基因表达谱的变化, 初步探讨了药物遗传学/药物基因组学在恶性肿瘤中的广泛应用前景与目前现状之间的差距及相关原因。

关键词: 药物遗传学; 药物基因组学; 肿瘤治疗;

王立峰, 钱晓萍, 刘宝瑞. 药物遗传学和药物基因组学在肿瘤治疗中的应用. 世界华人消化杂志 2006;14(3):318-323
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/318.asp>

0 引言

尽管目前肿瘤治疗取得了一些进展, 但在不同种族人群中、不同个体间仍有显著的化疗有效率/毒性反应的异质性。目前应用的抗肿瘤药物对至少70%的患者疗效有限, 20%-40%的患者甚至有可能接受了错误的药物治疗^[1-4]。肿瘤分子生物学领域的不断扩展使人们逐渐认识到, 分子生物学基因表达谱的显著差异是指导肿瘤个体化化疗的基础^[5,6]。药物遗传学/药物基因组学作为肿瘤新的治疗平台受到广泛关注, 肿瘤药物基因组学/遗传学的核心目的是通过对个体基因/遗传多态性的研究, 预测其对某种药物的反应性/毒性^[7-13]。我们将着重讨论一些具有重要临床意义的预测因子。

1 药物效应预测分子

1.1 5-Fu相关药物效应预测分子 5-FU进入体内后被活化为氟脲嘧啶脱氧核苷酸(5-FdUMP), 通过形成稳定的三联体复合物(胸苷酸合成酶、5, 10-甲酰四氢叶酸、5-FdUMP)抑制胸苷酸合成酶, 从而阻碍脱氧尿苷酸(dUMP)转变为脱氧胸苷酸(dTMP)。

1.1.1 胸苷酸合成酶mRNA (thymidylate synthase mRNA, TS mRNA) 的表达 TS的表达不仅与以5-Fu为基础的化疗抵抗相关, 而且与临床预后相关。Lenz *et al* ^[14]发现TS mRNA水平高的胃癌患者中位生存期6 mo, 而TS mRNA水平低者中位生存期43 mo。随后, TS mRNA水平的高低与化疗有效率、生存期之间的关系在肠癌^[15,16]、肺癌^[17]、乳癌^[18]中也得到进一步证实。综合分析若干肠癌患者5-Fu化疗有效率与TS水平相关性的文献发现^[19-24], 转移性的肠癌患者肿瘤组织内低表达TS者可从姑息性5-Fu化疗获益; 相反, 局部进展肠癌患者肿瘤组织内低表达TS者未见明显获益于辅助化疗。然而, 这些结果大多来源于以5-Fu为基础化疗的回顾性分析, 因此有必要在前瞻性研究中使用新的联合化疗方案重新进行评估。

1.1.2 胸苷酸合成酶启动子增强区域 (thymidylate synthase promoter enhancer region, TSER) TS的调节控制机制相当复杂, TSER的基因多态性在一定程度上控制着TS的表达。TSER由不同拷贝数的28 bp (base pair)三联子重复序列构成, 提高28 bp三联子重复序列数目将导致TS基因表达增加, TS酶活性提高^[25]。研究接受新辅助化疗的肠癌患者TSER遗传表型发现, 与3R纯合子相比, 携带有2R等位基因的患者病理分期程度相对较高^[26]。另一组221例肠癌患者接受辅助5-Fu+CF方案化疗的研究中更加确定了TSER多态性的临床价值: 2R纯合子和2R/3R杂合子(163/221)有显著临床生存期的提高, 而3R纯合子(58/221)无生存获益^[27]。Sarries *et al* ^[28]分析400例(100例对照, 300例肠癌、肺癌、乳腺癌)标本发现TSER多态性与TS mRNA表达相关, 3R纯合子有较高的TS mRNA表达活性。而来自日本

的报道TS遗传型与TS mRNA表达无明显关系, 同时发现TS多态性分布与欧美研究结果不同^[29]. 这表明种族的不同在很大程度上影响着TS遗传表型.

1.2 卡培他滨(xeloda)相关药物效应预测分子 由于卡培他滨具有在高表达胸苷酸磷酸化酶(thymidine phosphorylase, TP)的肿瘤细胞内释放5-Fu这一特点, 使其成为一个很有前景的肿瘤特异性药物. TP是血小板源性的内皮细胞生长因子, 也是肿瘤相关血管生成因子, 主要与肿瘤细胞的高增殖率、转移侵袭力以及肿瘤性血管生成有关, 同时有抗凋亡作用^[30,31]. 有资料表明高表达TP的肿瘤组织能更有效地激活5-氟脱氧尿苷为5-Fu^[32,33]. 因此对于准备接受卡培他滨治疗患者的遗传特性分析有必要包括TP、TS、二氢嘧啶脱氢酶(dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD)三方面以评估治疗失败的风险并判断预后^[16]. 实际上, 在转移性肠癌患者中, 低表达TS、DPD、TP基因者生存率最高^[16,21]; 同时TP/DPD基因表达的比值在化疗敏感与抵抗肿瘤中显著不同^[34].

1.3 铂类药物相关药物效应预测分子 铂类药物通过形成链内/链间DNA加合物抑制细胞复制. 对铂类药物的抵抗可通过以下机制发生: 减少药物积聚、通过共轭结合解除药物毒性, 提高对铂类药物诱导产生的DNA加合物的耐受性, 或者提高DNA修复能力^[35,36]. 核苷酸减切修复(nucleotide excision repair, NER)途径与铂类抵抗有很强的相关性, 核苷酸切除修复交叉互补组1(excision repair cross-complmenting group 1, ERCC1)、XPD(xeroderma pigmentosum complementation group D)、XPG(xeroderma pigmentosum complementation group G)等均是NER途径中的关键因子.

1.3.1 ERCC1 56例接受GP方案化疗的非小细胞肺癌(NSCLC)患者, ERCC1高表达者中位生存期仅5 mo, 而低表达者中位生存期达15 mo. 这一有显著统计学意义的结果表明ERCC1水平可作为铂类治疗一独立的预后变量, 是评价DDP抵抗的一个关键基因^[28].

1.3.2 XPD与XPG 分析73例接受5-Fu+草酸铂治疗的转移性肠癌患者的XPD基因多态性, 发现1个SNP导致XPD蛋白第751密码子上赖氨酸(Lys)转变为谷氨酰胺(Glu), 这一多态性与疗效显著相关: Lys/Lys基因型患者中位生存期17.4 mo, 而Lys/Glu杂合子12.8 mo, Glu/Glu纯合子3.3

mo; 而且, Lys/Lys基因型患者客观有效率更高($P = 0.015$)^[37]. 尽管目前对这一SNP突变导致铂类疗效异同的具体机制尚不清楚, 但并不影响这一SNP作为铂类药物效应预测因子的进一步应用. 此外, Lys突变导致DNA修复能力的变化尚在进一步研究中. 对33例接受草酸铂治疗肠癌患者, Vila *et al* ^[38]分析了与DNA修复相关的多种基因SNPs. 发现XPD第751位密码子C—A碱基的突变与草酸铂治疗毒性/有效率相关, 与XPD A/A型相比, 携带XPD C/C型等位基因患者更易发生血液学毒性(44% vs 9%); 同时发现, XPG第3位密码子C—T碱基变异与草酸铂药物有效率相关, 携带XPG C/C型等位基因的患者客观缓解率显著高于XPG C/T、T/T基因型患者(70% vs 8%, $P = 0.002$). 所以认为, XPD C/C与血液学毒性相关, 而XPG C/C可作为缓解率、TTP及生存期的预测指标.

1.3.3 XRCC1(X线修复交叉互补组1, X-ray repair cross-complementing group 1) Stoehlmacher *et al* ^[39]研究61例接受5-Fu+草酸铂治疗的进展期肠癌, 发现XRCC1基因中第399位密码子的一个SNP影响其氨基酸产物为精氨酸(Arg)或谷氨酰胺(Glu). 由于Glu可导致DNA修复能力增加, 使得铂类化疗抵抗^[40]. 故这一SNPs与治疗效果有明显关系: 73%的缓解者具有Arg/Arg遗传型, 66%无反应者具有Glu/Glu或Arg/Glu遗传型^[39].

1.3.4 谷胱甘肽-S-转移酶P1(Glutathione-S-transferase P1, GSTP1) 谷胱甘肽-S-转移酶催化谷胱甘肽与多种毒性复合物(包括铂类制剂)结合, 形成低毒高水溶性物质排出细胞外^[41]. GST家族包括5个亚型: GSTA1、GSTP1、GSTM1、GSTT1、GSTZ1. Stoehlmacher *et al* ^[42]发现GSTP1的一个SNPs与107例接受5-Fu+草酸铂化疗的转移性肠癌患者总体生存率相关. 这一SNPs导致在GSTP1蛋白密码子105位异亮氨酸(Iso)转变为缬氨酸(Val), 酶活性降低^[43], 从而产生了疗效的差异: 中位生存期Val纯合子24.9 mo, Val杂合子13.3 mo, Iso纯合子7.9 mo($P < 0.001$).

1.4 紫杉类相关药物效应预测分子 目前认为紫杉类抵抗的重要机制是微管蛋白的过度表达. 有研究表明 β 微管蛋白III表达水平与卵巢癌、前列腺癌及非小细胞肺癌细胞系中的紫杉类药物抵抗有关^[44]. Montgomery *et al* ^[45]报道在NIH3T3细胞系中, EGFR超家族成员HER2的过表达导致 β 微管蛋白IV表达水平增加3倍, 从而导致转化细胞对紫杉类药物抵抗. 因此, 对微管

■研发前沿

在肿瘤分子生物学领域知识的不断扩展使得人们逐渐认识到, 对各种实体肿瘤和血液学肿瘤, 分子生物学基因表达谱的显著不同是指导个体化化疗的基础. 药物遗传学/药物基因组学作为肿瘤新的治疗平台受到广泛关注.

■创新盘点

本文较为全面地概述了药物遗传学/基因组学在化疗中对药物疗效及毒性的预测作用,着重探讨了一些相对比较成熟的分子,并客观分析了该领域所面临的相关问题,对开展相关研究具有一定帮助。

蛋白各亚型基因突变和基因表达水平的分析在评估肿瘤细胞是否对紫杉类药物敏感中可能具有一定作用。最近研究指出乳腺癌易感基因家族 (breast cancer susceptibility gene, BRCA) 的功能失活在散发性乳腺癌、卵巢癌中也有发现, BRCA功能失活与DNA双链断裂的修复功能受损有关, 相关患者对DNA交联剂、诱导DNA双链断裂药物敏感, 而对作用于有丝分裂纺锤体的药物如紫杉类抵抗^[46]。

1.5 健择相关药物效应预测分子 核糖核苷酸还原酶M1(ribonucleotide reductase M1, RRM1): 核糖核苷酸还原酶是DNA合成途径的限速酶, 在DNA合成修复途径中发挥重要作用。它主要催化二磷酸核糖核苷酸转化为二磷酸脱氧核糖核苷酸, 包括M1、M2两种亚型。多篇文献报道RRM1过表达者健择化疗不敏感^[28,37,47]。Rosell *et al*^[47]研究了100例NSCLC, 发现RRM1与DNA合成、修复及GEM代谢有关; ERCC1与DDP活性有关, 二者的表达水平高度相关。RRM1 mRNA低表达或RRM1、ERCC1 mRNA均低表达者GP方案显著获益, 中位生存期明显延长 (13.7 mo vs 3.6 mo)。

1.6 表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)抑制剂 EGFR是一跨膜糖蛋白, 与配体交联发生二聚化作用, 从而刺激细胞增殖^[48,49]。大量研究表明EGFR信号通路涉及各种实体瘤的生成及预后。EGFR酪氨酸激酶(TK)的活化已被确认为起始细胞内信号传递的关键事件, 能调节细胞增殖、分化及细胞生存^[50,51]。肿瘤中EGFR信号途径中EGFR基因的过表达是一普遍现象, 其基因的转录起始于富含GC启动子区的多个起始位点。EGFR基因的第一个内含子能调节基因转录, 它位于转录增强子附近, 包含一具有高度遗传多态性的CA二核苷酸重复序列^[52]。Gebhardt *et al*^[53]报道CA重复序列的数目与EGFR基因转录活性呈负相关。近来一些新的药物通过胞内/胞外途径阻断EGFR功能或阻断其胞内信号通路发挥抗肿瘤作用^[54]。Lynch *et al*^[55]研究发现9例对gefitinib治疗有效患者中8例在EGFR基因酪氨酸激酶区域存在体细胞突变; 在25例未接受过gefitinib治疗的NSCLC患者中2例也存在类似突变。体外实验进一步证实EGFR突变株对EGF反应性高且对gefitinib治疗更为敏感。其他研究者也有类似报道^[56]。虽然上述研究结果有待于大样本临床试验证实, 但提示检测EGFR基因可能是一有效的筛选合适患者接受gefitinib

治疗的途径。

2 药物毒性预测分子

2.1 5-FU相关毒性预测因子 二氢嘧啶脱氢酶 (dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD) 是5-FU代谢的限速酶, 在5-FU代谢中有着重要作用。体内5-FU剂量的85%都是通过DPD代谢失活。DPD活性丧失时由于代谢清除途径受损大量活性代谢产物5-FdUMP生成, 导致发生严重的5-FU相关毒性反应。迄今为止已确定DPD有39种不同的基因突变和多态性^[57], 其中最常见的是DPD基因第1 986位发生A到G的转化(等位基因DPYD*2A)导致外显子14缺失, 形成无活性的酶。在发生严重5-FU毒副作用的患者中, 24%-28%可检测到这种突变^[58]。当然, DPYD*2A并不是发生严重5-FU毒性的唯一机制^[58]。由于体内存在复杂的分子机制调控DPD活性, 因而使得将DPD基因型的检测用于预测严重5-FU毒性的发生仍需不断深入。

2.2 CPT-11相关毒性预测因子 CPT-11是一无活性的前药, 需经羧酸酯酶的活化转变为其活性代谢产物SN-38而发挥效用^[59]。活性SN-38的主要清除途径是通过肝脏UGT1A1的糖基化作用转变为无活性的SN-38G, 后者通过尿液、胆汁排出。作为CPT-11主要的剂量限制性毒性作用, 腹泻、中性粒细胞减少均与SN-38水平增高有关^[60]。目前关于CPT-11的药物遗传学方面的研究主要集中于由UGT1A1多态性引起的SN38G变化。研究发现UGT1A1的表达是高度可变的, 由此引起不同患者间SN-38糖化反应的速率相差最高达50倍^[60-62]。UGT1A1基因启动子区具有一定多态性, 其不典型TATA盒区域中包含了5-8个TA重复序列。其中以含6个TA重复序列的基因型最为常见, 并观察到随着TA重复序列数目的增加, UGT1A1表达下降^[60,63]。UGT1A1的变异型——UGT1A1*28启动子不典型TATA盒区域包含7个TA重复序列, 该变异型与UGT1A1表达下降有关, 并导致SN-38G水平降低^[60-62,64]。在CPT-11治疗中, UGT1A1*28等位基因的存在导致活性代谢产物SN-38的显著增加, 从而发生腹泻/中性粒细胞减少的几率显著增加^[64,65]。提示UGT1A1基因型的检测可能用于临床预测与CPT-11相关的严重毒副作用的发生。

3 问题与展望

尽管药物遗传学/基因组学领域的相关研究备受瞩目且其实验证据水平高^[66,67], 但该领域在临床

中的应用却处于早期阶段. 究其原因有多种, 首先, 实验室结论的临床推广涉及实用性、可操作性、社会及伦理等多方面的因素; 其次, 早期的一些相关临床实验在实验设计时未能充分考虑到临床环境因素等多种客观因素的影响, 由此产生一些有争议的结果, 可能对药物遗传学/基因组学的临床应用产生了一些负面影响; 再次, 药物基因组学的广泛应用面临的另一个重要问题是检测的标准化问题. 当前在基因芯片技术领域存在多种微阵列技术平台, 使用不同系列的基因及不同的杂交信号、检测方法等, 为同一目的而进行的研究常常得到不同的结果. 但随着基因芯片技术及数据分析系统的不断完善, 相信这些问题在不久的将来可被解决. 毫无疑问, 在下一阶段药物遗传学/基因组学的研究中将致力于在科学证据与临床应用间建立桥梁, 这需要来自学术界、技术领域 (如计算机生物信息技术)、临床上、伦理方面、社会、法律、政府调节机构及财政上多方面的支持^[68]. 随着分子生物技术日新月异的进展, 药物遗传学/基因组学研究在近年来取得迅猛发展, 为医疗领域带来革命性变革. 在爱滋病治疗领域, 药物基因组学已用于临床以指导对爱滋病患者进行适当的抗病毒治疗, 使真正意义上的个体化治疗成为可能^[69,70]. 这一点对于艰难的肿瘤治疗尤为重要. 该领域研究的最终目标是通过个体肿瘤患者遗传状态分析, 选择最佳治疗方案, 不仅仅提高药物治疗的有效率而且避免相关严重毒性反应的发生, 从而开辟个体化化疗的新纪元.

4 参考文献

- Ross JS, Schenkein DP, Kashala O, Linette GP, Stec J, Symmans WF, Pusztai L, Hortobagyi GN. Pharmacogenomics. *Adv Anat Pathol* 2004; 11:211-220
- Bordet R, Gautier S, Le Louet H, Dupuis B, Caron J. Analysis of the direct cost of adverse drug reactions in hospitalised patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2001; 56: 935-941
- Suh DC, Woodall BS, Shin SK, Hermes-De Santis ER. Clinical and economic impact of adverse drug reactions in hospitalized patients. *Ann Pharmacother* 2000; 34: 1373-1379
- du Souich P. In human therapy, is the drug-drug interaction or the adverse drug reaction the issue? *Can J Clin Pharmacol* 2001; 8: 153-161
- Pusztai L, Ayers M, Stec J, Hortobagyi GN. Clinical application of cDNA microarrays in oncology. *Oncologist* 2003; 8: 252-258
- Macgregor PF. Gene expression in cancer: the application of microarrays. *Expert Rev Mol Diagn* 2003; 3: 185-200
- Taylor JG, Choi EH, Foster CB, Chanock SJ. Using genetic variation to study human disease. *Trends Mol Med* 2001; 7: 507-512
- Carlson CS, Newman TL, Nickerson DA. SNPping in the human genome. *Curr Opin Chem Biol* 2001; 5: 78-85
- Kallioniemi OP. Biochip technologies in cancer research. *Ann-Med* 2001; 33: 142-147
- Rusnak JM, Kisabeth RM, Herbert DP, McNeil DM. Pharmacogenomics: a clinician's primer on emerging technologies for improved patient care. *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 299-309
- Hess P, Cooper D. Impact of pharmacogenomics on the clinical laboratory. *Mol Diagn* 1999; 4: 289-298
- Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 945-954
- Meyer UA. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 2000; 356: 1667-1671
- Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Groshen S, Cohen H, Laine L, Crookes P, Silberman H, Baranda J, Garcia Y, Li J, Leichman L. Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival. *J Clin Oncol* 1996; 14: 176-182
- Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, Boswell W, Metzger R, Tan M, Danenberg PV. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol* 1997; 15: 3223-3229
- Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB, Danenberg PV. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1322-1327
- Huang CL, Yokomise H, Kobayashi S, Fukushima M, Hitomi S, Wada H. Intratumoral expression of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in non-small cell lung cancer patients treated with 5-FU-based chemotherapy. *Int J Oncol* 2000; 17: 47-54
- Nishimura R, Nagao K, Miyayama H, Matsuda M, Baba K, Matsuoka Y, Yamashita H, Fukuda M, Higuchi A, Satoh A, Mizumoto T, Hamamoto R. Thymidylate synthase levels as a therapeutic and prognostic predictor in breast cancer. *Anticancer Res* 1999; 19: 5621-5626
- Allegra CJ, Parr AL, Wold LE, Mahoney MR, Sargent DJ, Johnston P, Klein P, Behan K, O'Connell MJ, Levitt R, Kugler JW, Tria Tirona M, Goldberg RM. Investigation of the prognostic and predictive value of thymidylate synthase, p53, and Ki-67 in patients with locally advanced colon cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1735-1743
- Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, Leichman L. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 1995; 55: 1407-1412
- Lenz HJ. Pharmacogenomics in colorectal cancer. *Semin Oncol* 2003; 30(suppl): 47-53
- Tomiak A, Vincent M, Earle CC, Johnston PG, Kochar W, Taylor M, Maroun J, Eidus L, Whiston F,

■应用要点

有助于深入开展药物遗传学和药物基因组学相关的实验研究, 有助于临床开展基因指导下的个体化化疗, 以提高疗效、降低毒副反应.

■名词解释

药物遗传学(pharmacogenetics)是研究与药物反应性/毒性相关的个体间DNA序列/基因多态性的差异的一门学科,药物作用靶点、相关致病基因或药物代谢酶等多个环节的遗传变异都可被当作预测药物效应或毒性的指标。

药物基因组学(pharmacogenomics)是将全基因组技术(即基因和蛋白表达数据)用于预测一个患病个体对一个/一组药物的敏感性或抵抗性的学科。

- Stitt L. Thymidylate synthase expression in stage II and III colon cancer: a retrospective review. *Am J Clin Oncol* 2001; 24: 597-602
- 23 Etienne MC, Chazal M, Laurent-Puig P, Magne N, Rosty C, Formento JL, Francoual M, Formento P, Renee N, Chamorey E, Bourgeon A, Seitz JF, Delpiero JR, Letoublon C, Pezet D, Milano G. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *J Clin Oncol* 2002; 20: 2832-2843
- 24 Edler D, Glimelius B, Hallstrom M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I, Ragnhammar P, Blomgren H. Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1721-1728
- 25 Desai AA, Innocenti F, Ratain MJ. Pharmacogenomics: road to anticancer therapeutics nirvana? *Oncogene* 2003; 22: 6621-6628
- 26 Villafranca E, Okruchnov Y, Dominguez MA, Garcia-Foncillas J, Azinovic I, Martinez E, Illarramendi JJ, Arias F, Martinez Monge R, Salgado E, Angeletti S, Brugarolas A. Polymorphisms of the repeated sequences in the enhancer region of the thymidylate synthase gene promoter may predict downstaging after preoperative chemoradiation in rectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 1779-1786
- 27 Elsaleh H, Grieu F, Joseph D, Iacopetta B. Thymidylate synthase genotype and survival benefit from chemotherapy in patients with colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001; 20: 493
- 28 Sarries C, Haura EB, Roig B, Taron M, Abad A, Scagliotti G, Rosell R. Pharmacogenomic strategies for developing customized chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Pharmacogenomics* 2002; 3: 763-780
- 29 Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4096-4101
- 30 Kitazono M, Takebayashi Y, Ishitsuka K, Takao S, Tani A, Furukawa T, Miyadera K, Yamada Y, Aikou T, Akiyama S. Prevention of hypoxia-induced apoptosis by the angiogenic factor thymidine phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 797-803
- 31 Matsuura T, Kuratate I, Teramachi K, Osaki M, Fukuda Y, Ito H. Thymidine phosphorylase expression is associated with both increase of intratumoral microvessels and decrease of apoptosis in human colorectal carcinomas. *Cancer Res* 1999; 59: 5037-5040
- 32 Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, Shimma N, Umeda I, Ishitsuka H. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1274-1281
- 33 Schuller J, Cassidy J, Dumont E, Roos B, Durston S, Banken L, Utoh M, Mori K, Weidekamm E, Reigner B. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45: 291-297
- 34 Ishikawa T, Sekiguchi F, Fukase Y, Sawada N, Ishitsuka H. Positive correlation between the efficacy of capecitabine and doxifluridine and the ratio of thymidine phosphorylase to dihydropyrimidine dehydrogenase activities in tumors in human cancer xenografts. *Cancer Res* 1998; 58: 685-690
- 35 Johnson NP, Hoeschele JD, Rahn RO. Kinetic analysis of the *in vitro* binding of radioactive cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to DNA. *Chem Biol Interact* 1980; 30: 151-169
- 36 Tanabe M, Izumi H, Ise T, Higuchi S, Yamori T, Yasumoto K, Kohno K. Activating transcription factor 4 increases the cisplatin resistance of human cancer cell lines. *Cancer Res* 2003; 63: 8592-8595
- 37 Park DJ, Stoehlmacher J, Zhang W, Tsao-Wei DD, Groshen S, Lenz HJ. A xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 8654-8658
- 38 Vila JM, Moreno I, Monzo M, Ibeas R, Moreno J, Pinuaga M, Martinez F, Navarro A, Pou E, Monne JS. XPD, XPA, ERCC1 and XPG/ERCC5 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in oxaliplatin-treated colorectal cancer (CRC). *Journal of Clinical Oncology, 2004 ASCO. Annual Meeting Proceedings* 2004; 22(Suppl): 3677
- 39 Stoehlmacher J, Ghaderi V, Iobal S, Groshen S, Tsao-Wei D, Park D, Lenz HJ. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 3075-3079
- 40 Lunn RM, Langlois RG, Hsieh LL, Thompson CL, Bell DA. XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res* 1999; 59: 2557-2561
- 41 Zhang K, Mack P, Wong KP. Glutathione-related mechanisms in cellular resistance to anticancer drugs. *Int J Oncol* 1998; 12: 871-882
- 42 Stoehlmacher J, Park DJ, Zhang W, Groshen S, Tsao-Wei DD, Yu MC, Lenz HJ. Association between glutathione S-transferase P1, T1, and M1 genetic polymorphism and survival of patients with metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 936-942
- 43 Watson MA, Stewart RK, Smith GB, Massey TE, Bell DA. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis* 1998; 19: 275-280
- 44 Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD, Lord RV, Bepler G, Novello S, Cooc J, Crino L, Sanchez JJ, Taron M, Boni C, De Marinis F, Tonato M, Marangolo M, Gozzelino F, Di Costanzo F, Rinaldi M, Salonga D, Stephens C. Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 2003; 22: 3548-3553
- 45 Montgomery RB, Guzman J, O'Rourke DM, Stahl WL. Expression of oncogenic epidermal growth factor receptor family kinases induces paclitaxel resistance and alters beta-tubulin isotype expression. *J Biol Chem* 2000; 275: 17358-17363
- 46 Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 814-819
- 47 Rosell R, Danenberg KD, Alberola V, Bepler G, Sanchez JJ, Camps C, Provencio M, Isla D, Taron M, Diz P, Artal A. Ribonucleotide reductase messenger

- RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1318-1325
- 48 Adamson ED, Rees AR. Epidermal growth factor receptors. *Mol Cell Biochem* 1981; 34: 129-152
 - 49 Carpenter G. Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 881-914
 - 50 Porebska I, Harlozinska A, Bojarowski T. Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas. *Tumour Biol* 2000; 21: 105-115
 - 51 Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2958-2970
 - 52 Chrysogelos SA. Chromatin structure of the EGFR gene suggests a role for intron 1 sequences in its regulation in breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 5736-5741
 - 53 Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J Biol Chem* 1999; 274: 13176-13180
 - 54 Fry DW. Inhibition of the epidermal growth factor receptor family of tyrosine kinases as an approach to cancer chemotherapy: progression from reversible to irreversible inhibitors. *Pharmacol Ther* 1999; 82: 207-218
 - 55 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-2139
 - 56 Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-1500
 - 57 Van Kuilenburg AB. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur J Cancer* 2004; 40: 939-950
 - 58 Collie-Duguid ES, Etienne MC, Milano G, McLeod HL. Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 217-223
 - 59 Humerickhouse R, Lohrbach K, Li L, Bosron WF, Dolan ME. Characterization of CPT-11 hydrolysis by human liver carboxylesterase isoforms hCE-1 and hCE-2. *Cancer Res* 2000; 60: 1189-1192
 - 60 Iyer L, Hall D, Das S, Mortell MA, Ramirez J, Kim S, Di Rienzo A, Ratain MJ. Phenotype-genotype correlation of *in vitro* SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 1999; 65: 576-582
 - 61 Iyer L, King CD, Whittington PF, Green MD, Roy SK, Tephly TR, Coffman BL, Ratain MJ. Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J Clin Invest* 1998; 101: 847-854
 - 62 Fisher MB, Vandenbranden M, Findlay K, Burchell B, Thummel KE, Hall SD, Wrighton SA. Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 727-739
 - 63 Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1(UGT1A1) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8170-8174
 - 64 Iyer L, Das S, Janisch L, Wen M, Ramirez J, Karison T, Fleming GF, Vokes EE, Schilsky RL, Ratain MJ. UGT1A1*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J* 2002; 2: 43-47
 - 65 Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, Yokoyama A, Saitoh S, Shimokata K, Hasegawa Y. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res* 2000; 60: 6921-6926
 - 66 Relling MV, Hancock ML, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Krynetski EY, Pui CH, Evans WE. Mercaptopurine therapy intolerance and heterozygosity at the thiopurine S-methyltransferase gene locus. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 2001-2008
 - 67 van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1999-2009
 - 68 Pirazzoli A, Recchia G. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: are they still promising? *Pharmacol Res* 2004; 49: 357-361
 - 69 Durant J, Clevenbergh P, Halfon P, Delgiudice P, Porsin S, Simonet P, Montagne N, Boucher CA, Schapiro JM, Dellamonica P. Drug-resistance genotyping in HIV-1 therapy: the VIRADAPT randomised controlled trial. *Lancet* 1999; 353: 2195-2199
 - 70 Stebbing J, Bower M. What can oncologists learn from HIV? *Lancet Oncol* 2003; 4: 438-445

同行评价

药物遗传学/药物基因组学在肿瘤治疗中的作用日益受到重视, 本文综述了药物遗传学/药物基因组学在化疗中对药物疗效及毒性的预测作用。文章引用文献较全面, 基本概括了最新在这一方面研究的进展, 条理性强, 具有一定的学术水平, 对开展研究有帮助。

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

内脏感觉的检测方法

时乐, 卜平

■背景资料

近年来, 内脏感觉的异常在消化系统功能性疾病发病中的作用引起了人们的广泛重视, 与消化道运动检查方法相比, 感觉功能的检测还处于起步阶段, 有的还只是试验阶段. 目前已有不少评价内脏感觉的方法, 其中以扩张诱发感觉的试验最为常用. 恒压器技术的规范化推动了对功能性疾病发病机制的认识. 而一些神经反射抑制技术和脑成像技术以及其他一些感觉的检测技术, 都是近年来发展起来的新技术.

时乐, 卜平, 扬州大学医学院 江苏省扬州市 225001
通讯作者: 时乐, 225001, 江苏省扬州市淮海路11号, 扬州大学医学院中西医结合研究所. shi-le2003@163.com
电话: 0514-7978872 传真: 0514-7341733
收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2005-12-08

摘要

内脏敏感性在功能性胃肠病的发病机制中得到越来越多的证实, 其检测方法的研究也得到了重视. 我们简要介绍了RⅢ反射反向抑制技术、恒压器检测技术、脑显像技术、黏膜电刺激方法和温度刺激方法在检测内脏敏感性中的应用.

关键词: 内脏感觉; RⅢ反射反向抑制技术; 恒压器
脑显像; 黏膜电刺激; 温度刺激

时乐, 卜平. 内脏感觉的检测方法. 世界华人消化杂志 2006;
14(3):324-331
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/324.asp>

0 引言

近20多年来, 消化功能紊乱性疾病诊断与治疗的进步是上世纪消化领域中最令人瞩目的成就, 一些诸如腹痛、腹泻、腹胀、早饱、反酸、嗝气等症状, 除了消化道器质性疾病外, 更多见于功能性疾患. 这些疾病最初归因于胃肠动力异常, 然而随着消化道功能检查的发展, 人们发现即使是健康的个体, 强烈的情感环境或环境刺激也能使其食管、胃、小肠和结肠的运动增强; 一些胃肠功能紊乱的患者经过胃肠测压和胃电图等检查发现其并不存在胃肠动力的异常. 近来, 内脏感觉异常被认为是功能性胃肠病的主要发病机制^[1-7]. 为了更好地研究消化道的敏感性, 使之成为临床和治疗服务, 人们正在探索一些研究方法, 这些方法必须具备以下条件: (1) 能客观地、定量地评价内脏感觉; (2) 能识别痛觉的传入神经通路及其相关受体; (3) 探索控制内脏感觉的增强及抑制机制^[5-7].

1 RⅢ反射反向抑制技术

1.1 RⅢ反射的基本原理和实验方法 RⅢ反射是

指由躯体痛觉刺激引起同侧屈肌的屈曲反射, 通常是用电刺激腓肠肌神经引起同侧股二头肌屈曲反射, 反射记录需在肌肉完全松弛的前提下进行. 因为它属于RⅢ(A δ 型) 型传入纤维传导, 故称为RⅢ反射^[8].

RⅢ反射被一整套计算机系统所引发和记录, 包括Physio Labo System, Notocord System. 首先将后踝皮肤去油腻. 在后踝的踝神经分布区域表面皮肤上每隔2 cm安放一对表面电极, 按0.17 Hz的频率(10次/min) 给腓肠神经以电刺激, 每次电刺激包括5个恒定的持续1 ms的一连串电流脉冲, 内侧股二头肌的肌电反应通过上述成对的表面电极记录下来. RⅢ反射应答是指在每次刺激后90-180 ms间的多相信号, 通过放大, 再数字化, 全波整流化及整体化. 利用经过整合的平面图用来评价RⅢ反射的应答质量. 评价时首先确定反射阈值, 然后把刺激腓肠神经的强度调节到高于阈值的20%, 加以固定, 以备做进一步试验. RⅢ反射应答幅度通常使用对照期平均水平的百分数来表示^[8-13].

RⅢ反射应答与电刺激诱发的疼痛密切相关. 比如, 10 mA左右的电刺激, 其反射阈值与疼痛阈值密切相关. 此值在同一患者的不同时期都可被精确重复, 但不同个体有微小差别. 这种密切的联系已被吗啡的剂量反应所证实^[14]. 但患者痛觉有病理性减退时、缺乏或主诉有不同器官同时疼痛者, 应另当别论. 因此, RⅢ反射应答可以认为与刺激腓肠肌神经所引起痛觉敏感性有特异的、客观的生理性联系.

1.2 RⅢ反射反向抑制技术 古希腊医学家希波克拉底有句名言: "如果病人身上两个不同部位同时感到疼痛, 那么疼痛较剧烈的部位可以使疼痛较轻部位的感觉迟钝^[8]". 这句名言很好地阐述了RⅢ反射反向抑制技术的原理: 异位躯体的疼痛能有效地、特异地抑制RⅢ反射应答及其疼痛的敏感性. 其抑制程度与该条件反射刺激的强度有直接联系. 这种抑制作用与自主神经功能改变无关, 也不是情绪或应激反应的结果. 同时, 也与脊神经运动神经元的突触后抑制

无关. 一般认为与感觉神经元活性抑制有关. 值得注意的是丘脑痛觉丧失的患者, 痛觉刺激应用于其麻木的手仍可进行抑制R_{III}反射. 因此, R_{III}反射抑制并不完全涉及痛觉^[8].

在同类动物研究中, 推测疼痛刺激抑制R_{III}反射应答是通过刺激弥散的毒性抑制性调节剂 (diffuse noxious inhibitory controls, DNIC) 来完成的^[15]. 当两种有害的刺激应用在体内的不同区域时, 这些调节剂被激发了, 产生了竞争效应. 因此DNIC是反向刺激反应过程中的神经递质. 也就是说, 异位痛点掩盖了原来疼痛, 触发了DNIC, DNIC特异性地影响脊椎背侧集合神经元, 后者在感觉信号传递中起关键作用^[15,16]. DNIC在解剖上也得到了证实, 涉及脊髓及上脊髓结构的回路^[17], 与作为神经递质的阿片肽及5-羟色胺密切相关^[18-21]. 总之, 异位刺激引起R_{III}反射抑制能客观地评价躯体疼痛所触发的传入信息, 并不受痛觉经验的干扰, 这样就限制了情绪和认知因素对评价人类内脏敏感性的影响. 在内脏敏感性的检测中, 通过对扩张刺激消化道不同部位所引发的R_{III}反射抑制进行研究, 可对内脏敏感性作出客观量化的评价.

1.3 R_{III}反射反向抑制技术评估内脏敏感性 R_{III}反射反向抑制技术直到最近才应用于人类内脏敏感性的评价.

1.3.1 评价胃的敏感性 如上文所述, 异位的躯体疼痛条件刺激一样, 不同容量的胃扩张也可抑制R_{III}反射应答, Willer *et al*^[8]对9名健康志愿者给予5个不同水平的胃扩张刺激, 结果发现在200 mL、400 mL容量扩张水平上, 上腹部无不适感或感轻微不适, 反射应答无明显变化, 而在600 mL、800 mL、1 000 mL容量扩张水平上, 相应的抑制反射分别为25%、35%和55%, 抑制幅度与胃扩张水平、内脏知觉强度二者明显相关. 相隔2 wk后, 先后两次以1 000 mL容量扩张, 产生十分相似的抑制. 这一研究结果说明这项技术重复性非常好, 可对人类内脏的敏感性做出客观量化的评估.

1.3.2 评价直肠的敏感性 早期的一项研究^[22,23]发现, IBS患者对快速时相性扩张的疼痛阈值要显著低于对阶梯式扩张的疼痛阈值, 据此猜测, 不同的直肠扩张方式可能作用于不同的肠壁感受器: 缓慢倾斜式扩张可能激活黏膜受体, 而快速时相性扩张可能激活浆膜感受器.

Sabate *et al*^[24]以6名健康志愿者为研究对象, 在局部给予利多卡因或安慰剂前后分析这两类

直肠扩张方式对R_{III}反射的效应. 结果发现, 利多卡因可显著降低缓慢倾斜式扩张或快速扩张引起的R_{III}反射的抑制, 而安慰剂却无此效应. 在快速扩张的初期, 可观察到R_{III}反射的增强现象, 利多卡因或安慰剂对此均无效应. 据此认为, 直肠壁内存在两种类型的受体, 快速扩张首先活化肌肉或浆膜内的感受器, 然后才是黏膜感受器, R_{III}反射先后经历了增强和抑制的双相过程. 利多卡因作用于黏膜感受器, 降低快速扩张引起的R_{III}反射的抑制, 而对快速扩张初期R_{III}反射的增强无效应.

2 恒压器检测技术

恒压器 (barostat) 最早是由Azpiroz和Malagelada设计使用的, 最初用来评估空腔脏器的张力变化^[25]. 在过去的十多年中, 恒压器已经被广泛应用于许多研究中, 用以测定各种空腔脏器张力的变化. 为了维持器官中气囊内压力的恒定, 需不断地向气囊内注入或排出气体, 这种气体的运动可以反映器官张力的变化情况. 许多研究者利用恒压器作为一种膨胀装置, 以评估内脏的敏感性^[26].

2.1 恒压器简介 恒压器是一种由电脑控制的泵装置, 进气管连接一个气囊, 维持一定的压力. 通过不断往气囊内注气或吸气, 其容积的改变反映了肠壁的张度. 泵装置可以是风箱, 也可以是注射器. 实验前还必须对系统进行校准. 测定压力容积后, 系统会作出一些计算, 对结果中人为因素作一些补偿修改^[26-33].

恒压器作为扩张装置有许多优点: (1) 风箱的大小可由无原则扩张的脏器而定, 这样就可以使气囊快速充盈并牵拉肠壁; (2) 有了计算机控制充气系统, 分析仪能进行多种模式扩张; (3) 充盈的速度、持续时间、压力、最大扩张容量均由电脑控制, 因此实验重复性好; (4) 恒压器最大的优点是能够准确地测量气囊的压力和容积. 无论将固定参数定义为压力 (等压扩张) 或容积 (等容扩张), 另一个参数都能立即被测出^[28].

为了维持置于结肠内气囊的较低但却恒定的压力, 恒压器抽出气囊内的气体, 使气囊紧贴结肠壁. 结肠内的气囊通常是圆柱形的, 并且足够大, 使气囊任何时候都能保持顺应性, 适应恒压器所施加的变化, 不至于影响测定结果. 为此, 应该使用薄的聚乙烯气囊, 而不采用乳胶气囊, 后者会干扰恒压器对张力变化的反应. 恒压器气囊的尺寸必须适应所研究的器官. 对结肠来

■研发前沿

随着神经影像学的发展, 脑成像技术是目前内脏感觉研究的热点, 影像科和消化科的医师较为热衷, 且没有什么副作用, 随着价格的降低, 会对功能性胃肠病在感觉异常发病机制方面有较大的突破.

■创新盘点

目前对内脏感觉的研究主要集中在空腔脏器对扩张的反应,而本文将能感觉的客观反映(反射的增强或抑制、脑血流等的变化)的检测方法做了较为详细的叙述,这些检测方法在国内尚未开展,随着神经生物学等学科的发展,相信这些检测技术定会将我国的功能性胃肠病带入一个新的领域。

说,气囊的最大容积应是700 mL,最大直径为10 cm,长度约为10 cm,这样在检查时不至于干扰器官的生理活动。对于直肠来说,用的是椭圆形气囊,最大容积为600 mL,完全膨胀时气囊直径可达到12 cm。这样的尺寸也不会干扰测定结果,通常情况下,在张力研究或扩张研究中,气囊容积一般不超过最大容积的90%,以维持足够的顺应性。

在张力研究中,将气囊放置在器官内,用中等量(200 mL)的气体膨胀气囊。当受试者苏醒后(若应用了麻醉),排出结肠内过多的气体(当有结肠镜时),从平衡期开始记录肠道张力,保持压力恒定在工作压力,持续监测气囊内的容积,一直到达稳定的基础状态。在大多数文献报道中,达到基础稳定状态的时间不超过15-20 min,除特殊情况外,达到平衡后,正常的实验就可以开始了。

工作压力 (operating pressure) 指的是在研究过程气囊内的压力维持恒定时的压力。在这一压力下,研究者能够发现引起腹内压增高的各种事件(如呼吸运动、过劳或咳嗽)。此时,应记录下工作压力,以此作为每个试验组的平均水平,作为参照。但有时也采用标准化的工作压力,这个压力在对每个受试者的研究中都是固定的。不管采用什么样的压力标准,压力的范围通常在10-12 mmHg之间。气囊内的压力膨胀到10-12 mmHg是否会干扰肠道生理性动力活动,目前尚未可知。

2.2 扩张技术

2.2.1 扩张方式 不同的扩张方式会影响内脏感觉的研究结果。无论以测得的压力还是以容积两种形式的哪一种来定义内脏感觉的正常范围,得出对扩张敏感或机能亢进的定义,都会因扩张方式不同而不同^[26,28,29]。

对消化道进行腔内扩张时,首选必须确定第一参数,即确定扩张的水平是由囊内压力决定(等压扩张)还是由囊内气体容量决定(等容扩张)的。以容量为标记会带来某些问题,如容量与气囊直径或囊内压力不是线性关系。这是因为:(1) 大多数病例应用圆柱形气囊;(2) 气体的可压缩性;(3) 气囊形状和尺寸的微小变化会影响气囊容积测量结果,从而影响到压力——容积曲线;(4) 在一定程度上,容量受被测对象解剖结构的影响。而测定压力能避免影响容量测定的诸多因素:气囊形状,肠壁的顺应性和收缩度,研究对象的解剖结构等。因此人们多采用压力测定

来表示感觉阈。恒压器的反馈装置可以维持恒定的囊内压,进行等压扩张。若腔内探头使用得当,大多数情况下等容扩张和等压扩张的结果是相同的,疼痛的阈值比容量阈值更可靠且重复性好。

目前已有多种模式的扩张试验,它们主要基于两种刺激法,一种是连续、渐进、累积性的扩张(累积性扩张),另一种是在一定时间内快速的时相性扩张并突然牵拉肠壁(时相性扩张)。扩张过程必须持续60 s,扩张间期应大于或等于60 s。试验中,受试者的感觉不能被立即记录到,这是由于肠壁需3-5 s的适应,而反射性收缩在10-20 s后发生。现已证明,用不同的扩张模式诱发受试者的反应各不相同。比较两种扩张,Harraf *et al*^[34]发现,IBS患者直肠的高敏感性只能被时相性扩张所诱发。Sabate *et al*^[24]以两种方式扩张,结果发现,快速时相性扩张所诱发的痛阈明显低于阶梯性累积扩张。这些结果提示,两种扩张方式可能存在不同的传入神经通路。

2.2.2 内脏感觉阈值测定方法 在测定感觉阈值时,正确区分敏感性和反应偏差(response bias)非常重要。下面列举几项技术能尽量减少反应偏差,以正确评价受试者是否存在敏感性的异常^[29,35]。

渐至极限法(ascending method of limits): 此法指扩张强度逐渐增加,直到受试者报告疼痛,包括线性渐增、阶梯性渐增和时相性渐增的方法。此法的优点在于简便、刺激次数少,疼痛有一个明显的阈值。缺点是给予受试者的刺激是可以预见的,所以对心理偏见很敏感,容易被心理因素或既往经验所左右,测得的痛阈不可靠。

随机法(random sequence): 以随机顺序给予刺激强度,受试者评价每次刺激。优点在于较少受到心理偏见的影响,刺激程序不可预知,检查次数相对较少。但是有些刺激过于疼痛,可能出现假随机顺序,而类似于渐至极限法。

追踪法(tracking technique): 出现疼痛时,下一次随机选取与上一次相同或高的刺激,报告不痛时,下一次随机选取与上一次相同或低的刺激。这种方法刺激顺序不可预知,且阈值经过多次刺激而定。但是需要多次扩张(多达45次)。

双随机阶梯法(double random staircase): 第一阶段,每次报告疼痛后,扩张压力递减,报告不痛,压力递增,第二阶段同样操作计算机随机交叉第一二阶段。刺激顺序不可预知,且阈值经过多次测试而定。但是仍需要多次扩张(多达30次),但比追踪法少。

2.2.3 扩张反应的评价方法 所有的痛觉评估方法都要求个体把他们各自主观感觉的强度与某一尺度标准相结合. 扩张的容量或压力作为评价尺度并不充分, 最常用的2个评估感觉试验结果的方法是视觉模拟量表和语言模拟量表^[26].

视觉模拟量表 (visual analog scale, VAS): VAS是一条线, 一般长10-15 cm, 中间没有分割点, 两端是显著不同的两个描述性词语, 如"无痛"、"难以想象的剧痛"等. VAS常被视为一种比例尺, 适合进行参数统计, 具有敏感性强、不受心理偏差影响的特点.

语言模拟量表 (verbal descriptive scales): 语言模拟量表敏感性比VAS稍差. 量表中所包含的词汇越多敏感性越强. Accarino *et al* ^[36]创立了一种评估胃肠道扩张的感觉的新方法, 他们给出了7种评估尺度, 让受试者选择其中一种给他们进行感觉分级. 用于描绘胃和小肠扩张感觉的级别有"饱胀"、"不适"和"恶心"等, 而用"胀满"、"急迫"等来描述结肠和直肠的感觉.

2.3 恒压器检测技术的应用

2.3.1 评价IBS患者的内脏敏感性 1973年, Ritchie^[37]首先报道了IBS患者痛觉过敏的实验证据, 他发现将置入直肠的气囊充气60 mL后, 有56%的IBS患者报告腹痛, 而对照的健康人只有6%感觉腹痛, 表明IBS患者直肠-乙状结肠气囊扩张的感觉阈值降低. 后来有研究显示, 直肠扩张时, IBS腹泻患者比便秘者痛阈低, 提示直肠运输功能对肠知觉的影响^[38,39].

与结肠类似, 在空肠扩张试验中, IBS患者也表现超敏. Trimble *et al* ^[40]证明, IBS患者对扩张的敏感性比较弥散, 涉及整个食道、各段小肠、结肠和直肠. Houghton *et al* ^[41]的研究也发现类似的观点. 对IBS患者肠道敏感性的病理生理学目前还有争议. 以往一些观点认为, 这可能是由于肠壁松弛功能障碍导致肠收缩时张力增加, 从而刺激肠壁机械感受器所致. 这些结果提示, IBS患者肠道高敏感性的病因可能存在于内脏传入神经, 但病变的确切位置尚未明确. 对IBS患者与正常志愿者进行空肠传入神经电刺激和扩张空肠的实验, 结果发现IBS患者扩张引起的痛阈比正常组低, 而电刺激引起的感觉与正常组相同. 这个结果提示, 病变可能位于肠壁机械感受器.

2.3.2 评价其他功能性胃肠紊乱疾病的内脏敏感性 Klatt *et al* ^[42]在功能性消化不良患者中进行胃扩张试验, 发现患者的痛阈比对照组低.

Johnston *et al* ^[43]应用气囊扩张研究了食管的感觉. 研究发现在不明原因的胸痛患者中行食管内气囊扩张的阈值明显低于正常人. 此法能较好的评价食管的超敏感性, 在不明原因的胸痛检查中合用此法可以增加食管滴酸试验和腾喜龙(依酚氯铵)试验的敏感性. 但由于食管位于刚性的胸腔内, 所以与腹内脏器有很大的不同. 与IBS相比, 食管内气囊扩张多用于心源性胸痛和食管源性胸痛的鉴别.

2.3.3 评价胃肠顺应性 顺应性是指空腔脏器对扩张的容受性. 等压扩张时, 在压力-容量曲线中, 以dv/dp来表示顺应性, 其单位是mL/mmHg. 为得出顺应性, 需要在每一个压力段测定气囊容量, 制定压力-容量曲线, 计算出斜率, 从而得出顺应性. 曲线的形态可因被测脏器的不同而不同, 但容量与压力基本呈线性关系, 中间呈直线, 只在高压阶段与低压阶段有所曲折. 顺应性受许多因素影响, 包括脏器的张力、收缩性、周围的解剖结构、扩张装置的弹性(恒压器、探头和气囊)^[26].

3 脑显像技术

随着神经胃肠病学的快速发展, 人们认识到许多胃肠症状的根源在"脑"中, 脑肠轴在功能性胃肠病的发病机制中起到了重要的作用^[44-49]. 近年发展的脑显像技术可以是人们初步了解大脑皮层处理内脏感觉信息的部位, 通过与正常人的比较, 获得一些功能性胃肠病与感觉相关的发病机制^[48]. 现已开展的技术包括功能性磁共振 (fMRI)、正电子发射断层扫描技术 (PET) 和单光子发射计算机断层扫描技术 (SPECT)、皮质诱发电位 (CEP) 及脑磁图 (MEG)^[45]. 但这些技术由于检查花费时间长, 检测费用昂贵, 因而尚不能广泛开展.

3.1 功能性磁共振(fMRI) fMRI是以脱氧血红蛋白的磁敏感效应为基础的磁共振成像技术. 利用血氧水平依赖技术可测定局部脱氧/氧合血红蛋白值, 从而反映中枢局部兴奋性变化. 当中枢神经元兴奋时代谢水平的提高必然依赖于局部脑血流量的增加及更多的氧合血红蛋白, 表现为磁共振信号增强^[49].

Mertz *et al* ^[50]以16名健康志愿者和18名IBS患者为研究对象, 分别在非疼痛性及疼痛性直肠扩张期间进行fMRI检查. 结果显示, 在大多数受试者中, 直肠刺激引起活动增强的部位有扣带回前部、额前皮质、岛叶、背侧丘脑; 但与

■应用要点

脑成像技术在国内已有见报道, 但随着神经影像学的发展和检查价格的平民化, 相信会带来更多的相关报道. 神经反射技术由于对受试者和检测者的要求都比较高, 目前尚处于实验室阶段.

■名词解释

恒压器 (barostat): 一种由电脑控制的泵装置, 进气管连接一个气囊, 维持一定的压力. 通过不断往气囊内注气或吸气, 其容积的改变反映了肠壁的张度. 为了维持器官中气囊内压力的恒定, 需不断地向气囊内注入或排出气体, 气体的运动可以反映器官张力的变化情况. 顺应性 (compliance): 空腔脏器对扩张的容受性. 等压扩张时, 在压力-容量曲线中, 以 dv/dp 来表示顺应性, 其单位是 $mL/mmHg$. 为得出顺应性, 需要在每一个压力段测定气囊容量, 制定压力-容量曲线, 计算出斜率, 从而得出顺应性. 曲线的形态可因被测脏器的不同而不同, 但容量与压力基本呈线性关系, 中间呈直线, 只在高压阶段与低压阶段有所曲折.

对照组相比, IBS患者扣带回前部活化的程度要更显著. 研究认为, IBS患者对刺激的处理活化模式与正常人无明显差异, 但对痛觉的敏感性增强.

Bernstein *et al* [51] 比较了正常人、炎症性肠病和IBS患者直肠内扩张时核团活化的部位, 发现三类人在排便和疼痛感觉时的活化核团类似, 但额前皮质活化后的像素百分比正常人显著高于IBS组, 炎症性肠病又要比正常人显著. 研究认为, 这是鉴别三组人群的一个方法.

3.2 正电子发射断层扫描技术(PET)和单光子发射计算机断层扫描技术(SPECT) PET是利用放射性示踪剂探测活动脑区域中血流量增加和能量代谢的成像技术, SPECT是为单光子计数型, 以普通 γ 发射体为探测对象, 采用扫描机或闪烁照相机探测光子的原理, 探测器以不同角度探测放射性核素发出的 γ 射线, 然后由所获得的数据重新形成断层图像[52].

Ladabaum *et al* [53] 研究发现, 给15名健康志愿者扩张胃出现疼痛、恶心及饱胀等症状时, 进行PET检查, 发现丘脑、双侧岛叶、扣带回前部、尾状核、脑干导水管周围灰质、小脑及枕骨皮层的活动增强, 说明伤害性刺激胃扩张激活了内脏痛有关的中枢结构.

Berman *et al* [54] 对30例IBS患者采用PET评价直肠压力刺激引起的局部神经活动的改变. 直肠压力刺激下的脑血流增加的部位包括扣带回前部、岛叶、额叶前部、背侧丘脑和小脑. 在同样的刺激条件下, 男性的那些局部活动改变更为显著, 男性被激活的岛叶为双侧, 而女性为单侧. 研究发现, 岛叶的活动与客观内脏压力有显著的相关, 而扣带回前部则与主观的不适症状相关.

Silverman *et al* [55] 证实, IBS患者在接受到内脏疼痛性直肠扩张刺激后在大脑激活部位与健康人不同. 健康人激活部位在扣带回前部, 该部位与痛觉抑制功能有关, 而IBS患者激活部位则在额前叶, 该部位与以往伤害性事件的记忆有关. 上述IBS患者额前叶皮质在内脏疼痛性直肠扩张刺激时活动性增高表明其对痛觉的处理过程的不同, 而扣带回前部活动的缺失则表明痛觉抑制系统的失调.

Naliboff *et al* [56] 也在12例IBS患者及12例健康对照者中开展了一项研究, 以明确IBS患者和正常个体的大脑应对真实的直肠扩张刺激及预期直肠扩张刺激 (即研究者告诉患者将要施加

直肠扩张刺激, 但事实上气囊压力为0) 所发生的改变. 研究中记录受试者接受中等强度 (45 mmHg) 的扩张刺激及预刺激时局部脑血流的改变. 结果表明: 无论是真实给予的刺激, 还是其后的预刺激, IBS患者和健康个体的局部脑血流均被激活且没有明显差异; 与对照组相比, IBS患者表现为颞叶、脑干的活动减弱, 而扣带回中部和中间额前皮质被激活——也就是大脑整合情绪、注意力和痛觉的区域. 研究认为: IBS和正常人, 给予结肠刺激: 真实刺激和预期刺激, 发现都有反应, 但反应的部位是不同的. 说明中枢神经对IBS患者的影响是很大的.

3.3 皮质诱发电位(CEP) CEP是大脑对感觉刺激的电生理反应, 通过头皮上的电极记录下来, 即由脑电图反映出来.

Fukudo *et al* [57] 比较了10例IBS患者和11例健康志愿者的结肠和小肠压力, 同时分析给予心理应激和新斯的明后的脑电图能谱. 结果显示, 心理应激后, IBS患者的脑电图的 β 波和 θ 波的百分比均较对照组有显著提高, 且心理应激后结肠运动的能谱改变之间呈正相关, 给予新斯的明后两者之间也存在正相关. 这提示, IBS患者的脑和肠对于心理应激和胆碱能刺激的反应过强, 这些过强的反应之间也可能存在联系.

Sinhamahapatra *et al* [58] 评估了13名IBS患者对直肠电刺激的感知阈值, 然后用超过感知阈值50%强度对直肠进行电刺激, 在距离顶侧2 cm处记录大脑诱发电位. 研究发现, IBS患者对直肠电刺激的感知阈值要比对照组低, 直肠电刺激可引起易于辨认、重复性较好的大脑诱发电位. IBS患者的 P_1 、 N_1 、 P_2 潜伏期要比对照组短, IBS患者的 P_1/N_1 幅度要比对照组大. 我们从客观上说明了内脏传入通路的敏感性增高是IBS的一种发病机制.

3.4 脑磁图(MEG) MEG通过置于头皮外的高敏感磁力计测量由皮质传入神经活动产生的时间一变异的磁性区域. MEG主要用于评价食管的传入通路.

Schnitzler *et al* [59] 对7例健康志愿者的远端食管的传入神经、正中神经的躯体感觉传入神经进行了非疼痛性电刺激以引起皮质活动, 通过MEG检查分析发现, 正中神经的躯体感觉传入神经刺激可引起刺激侧对侧的初级躯体感觉皮质短潜伏期反应 (20-60 ms) 以及双侧的次级躯体感觉皮质长潜伏期反应 (60-160 ms). 相反, 食管传入神经刺激没有引起初级躯体感觉

皮质反应, 而双侧的次级躯体感觉皮质的反应则与正中神经引起的长潜伏期反应相类似(70-190 ms). 结果提示, 食管内脏传入神经不像躯体感觉传入神经, 主要投射至次级躯体感觉皮质, 在初级躯体感觉皮质缺乏有意义的表现.

4 黏膜电刺激方法

Rossel *et al* [60]对12名IBS患者在直肠乙状结肠交接处进行电刺激发现, IBS患者直肠乙状结肠交接处对电刺激表现出感觉阈值和疼痛阈值的显著降低, 这为IBS患者存在内脏感觉过敏提供了一个证据.

5 温度刺激方法

Villanova *et al* [61]在健康志愿者的胃和小肠内放置一个水囊, 通过恒温器调节水囊内的温度, 逐渐升高温度 (42℃、47℃、50℃) 或降低温度 (32℃、22℃、12℃) 对胃和小肠进行刺激, 每次刺激持续3 min, 同时用恒压器测定胃的张力. 冷刺激可引起受试者上腹部寒冷感觉以及胃的反射性收缩, 而热刺激则引起上腹部温暖感觉以及反射性胃松弛, 对小肠的温度刺激也引起与胃刺激相似的感觉. 但胃和小肠的反射反应具有部位的特异性, 无论是热刺激或冷刺激, 都能引起胃的反射, 但对小肠而言, 只有热刺激能引起胃肠反射, 而冷刺激则无反射效应. 研究结果表明, 沿着胃肠道分布有热、冷感受器, 胃和小肠对冷热刺激的传入神经通路存在差异.

总之, 与内脏运动功能检测方法相比, 内脏感觉的检测还处于一个初级阶段, 因为感觉的检测要排除人为和主观的因素比较困难. 以上的检测方法除了恒压器技术应用较多年外, 其他技术尚在实验阶段, 有些技术如脑成像技术由于价格十分昂贵, 故限制了其应用. 而RIII反射反向抑制技术虽能客观反映内脏的感觉变化, 但此技术需要比较专业的人员操作, 试验也比较麻烦, 国内尚未见报道. 随着神经胃肠病的发展和功能性胃肠病诊断和治疗的进展, 相信在不久的将来对内脏敏感性的检测技术一定会有突飞猛进的发展.

6 参考文献

- 1 Azpiroz F. Hypersensitivity in functional gastrointestinal disorders. *Gut* 2002; 51 Suppl 1: i25-i28
- 2 Mayer EA, Gebhart GF. Basic and clinical aspects of visceral hyperalgesia. *Gastroenterology* 1994; 107: 271-293
- 3 Camilleri M, Coulie B, Tack JF. Visceral hypersensitivity: facts, speculations, and challenges. *Gut* 2001; 48: 125-131
- 4 Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 1999; 45 Suppl 2: II43-II47
- 5 Mulak A. Testing of visceral sensitivity. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54 Suppl 4: 55-72
- 6 Mertz H. Review article: visceral hypersensitivity. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 623-633
- 7 Kuiken SD, Tytgat GN, Boeckxstaens GE. Review article: drugs interfering with visceral sensitivity for the treatment of functional gastrointestinal disorders-the clinical evidence. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 21: 633-651
- 8 Willer JC, Bouhassira D, Le Bars D. Neurophysiological bases of the counterirritation phenomenon: diffuse control inhibitors induced by nociceptive stimulation. *Neurophysiol Clin* 1999; 29: 379-400
- 9 Coffin B, Farmachidi JP, Rueegg P, Bastie A, Bouhassira D. Tegaserod, a 5-HT₄ receptor partial agonist, decreases sensitivity to rectal distension in healthy subjects. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 577-585
- 10 Bouhassira D, Sabate JM, Coffin B, Le Bars D, Willer JC, Jian R. Effects of rectal distensions on nociceptive flexion reflexes in humans. *Am J Physiol* 1998; 275: G410-G417
- 11 Plaghki L, Bragard D, Le Bars D, Willer JC, Godfraind JM. Facilitation of a nociceptive flexion reflex in man by nonnoxious radiant heat produced by a laser. *J Neurophysiol* 1998; 79: 2557-2567
- 12 Bouhassira D, Chollet R, Coffin B, Lemann M, Le Bars D, Willer JC, Jian R. Inhibition of a somatic nociceptive reflex by gastric distention in humans. *Gastroenterology* 1994; 107: 985-992
- 13 Coffin B, Bouhassira D, Chollet R, Fraitag B, De Meynard C, Geneve J, Lemann M, Willer JC, Jian R. Effect of the kappa agonist fedotozine on perception of gastric distension in healthy humans. *Aliment Pharmacol Ther* 1996; 10: 919-925
- 14 Le Bars D, Willer JC, De Broucker T. Morphine blocks descending pain inhibitory controls in humans. *Pain* 1992; 48: 13-20
- 15 Danziger N, Gautron M, Le Bars D, Bouhassira D. Activation of diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in rats with an experimental peripheral mononeuropathy. *Pain* 2001; 91: 287-296
- 16 Villanueva L, Le Bars D. The activation of bulbo-spinal controls by peripheral nociceptive inputs: diffuse noxious inhibitory controls. *Biol Res* 1995; 28: 113-125
- 17 Le Bars D, Willer JC. Pain modulation triggered by high-intensity stimulation: implication for acupuncture analgesia? *International Congress Series* 2002; 1238: 11-29
- 18 Chitour D, Dickenson AH, Le Bars D. Pharmacological evidence for the involvement of serotonergic mechanism in diffuse noxious inhibitory controls(DNIC). *Brain Res* 1982; 236: 329-337
- 19 Kraus E, Besson JM, Le Bars D. Behavioral model for diffuse noxious inhibitory controls(DNIC): potentiation by 5-hydroxytryptophan. *Brain Res* 1982; 231: 461-465
- 20 Le Bars D, Chitour D, Kraus E, Clot AM, Dickenson AH, Besson JM. The effect of systemic morphine upon diffuse noxious inhibitory controls (DNIC) in the rat: evidence for a lifting of certain descending inhibitory controls of dorsal horn convergent

- neurones. *Brain Res* 1981; 215: 257-274
- 21 Le Bars D, Dickenson AH, Besson JM. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. *Pain* 1979; 6: 283-304
 - 22 Mertz H, Naliboff B, Munakata J, Niazi N, Mayer EA. Altered rectal perception is a biological marker of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1995; 109: 40-52
 - 23 Sun WM, Read NW, Prior A, Daly JA, Cheah SK, Grundy D. Sensory and motor responses to rectal distention vary according to rate and pattern of balloon inflation. *Gastroenterology* 1990; 99: 1008-1015
 - 24 Sabate JM, Coffin B, Jian R, Le Bars D, Bouhassira D. Rectal sensitivity assessed by a reflexologic technique: further evidence for two types of mechanoreceptors. *Am J Physiol Gastroint Liverest Physiol* 2000; 279: G692-G699
 - 25 Azpiroz F, Malagelada JR. Physiological variations in canine gastric tone measured by an electronic barostat. *Am J Physiol* 1985; 248: G229-G237
 - 26 马文 M. 舒斯特. 舒斯特胃肠动力学 第2版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003: 242-252
 - 27 Kuiken SD, Lindeboom R, Tytgat GN, Boeckxstaens GE. Relationship between symptoms and hypersensitivity to rectal distension in patients with irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 157-164
 - 28 Hachet T, Caussette M. A multifunction and programmable computerized barostat. *Gastroenterol Clin Biol* 1993; 17: 347-351
 - 29 Whitehead WE, Delvaux M. Standardization of barostat procedures for testing smooth muscle tone and sensory thresholds in the gastrointestinal tract. The Working Team of Glaxo-Wellcome Research, UK. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 223-241
 - 30 Bradette M, Delvaux M, Staumont G, Fioramonti J, Bueno L, Frexinos J. Evaluation of colonic sensory thresholds in IBS patients using a barostat. Definition of optimal conditions and comparison with healthy subjects. *Dig Dis Sci* 1994; 39: 449-457
 - 31 Hachet T, Caussette M. A multifunction and programmable computerized barostat. *Gastroenterol Clin Biol* 1993; 17: 347-351
 - 32 Hammer HF, Phillips SF, Camilleri M, Hanson RB. Rectal tone, distensibility, and perception: reproducibility and response to different distensions. *Am J Physiol* 1998; 274: G584-G590
 - 33 Steadman CJ, Phillips SF, Camilleri M, Haddad AC, Hanson RB. Variation of muscle tone in the human colon. *Gastroenterology* 1991; 101: 373-381
 - 34 Harraf F, Schmulson M, Saba L, Niazi N, Fass R, Munakata J, Diehl D, Mertz H, Naliboff B, Mayer EA. Subtypes of constipation predominant irritable bowel syndrome based on rectal perception. *Gut* 1998; 43: 388-394
 - 35 Delvaux M. Role of visceral sensitivity in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Gut* 2002; 51 Suppl 1: i67-i71
 - 36 Accarino AM, Azpiroz F, Malagelada JR. Selective dysfunction of mechanosensitive intestinal afferents in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 1995; 108: 636-643
 - 37 Ritchie J. Pain from distension of the pelvic colon by inflating a balloon in the irritable colon syndrome. *Gut* 1973; 14: 125-132
 - 38 Whitehead WE, Engel BT, Schuster MM. Irritable bowel syndrome. physiological and psychological differences between diarrhea-predominant and constipation-predominant patients. *Dig Dis Sci* 1980; 25: 404-413
 - 49 Prior A, Maxton DG, Whorwell PJ. Anorectal manometry in irritable bowel syndrome: differences between diarrhoea and constipation predominant subjects. *Gut* 1990; 31: 458-462
 - 40 Trimble KC, Farouk R, Pryde A, Douglas S, Heading RC. Heightened visceral sensation in functional gastrointestinal disease is not site-specific: Evidence for a generalized disorder of gut sensitivity. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1607-1613
 - 41 Houghton LA, Whorwell PJ. Opening the doors of perception in the irritable bowel syndrome. *Gut* 1997; 41: 567-568
 - 42 Klatt S, Pieramico O, Guethner C, Glasbrenner B, Beckh K, Adler G. Gastric hypersensitivity in nonulcer dyspepsia: an inconsistent finding. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 720-723
 - 43 Johnston BT, Castel DO. Intra-oesophageal balloon distension and oesophageal sensation in humans. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 1221-1229
 - 44 Aziz Q, Thompson DG. Brain-gut axis in health and disease. *Gastroenterology* 1998; 114: 559-578
 - 45 Mulak A, Bonaz B. Irritable bowel syndrome: a model of the brain-gut interactions. *Med Sci Monit* 2004; 10: RA55-RA62
 - 46 Mertz H. Role of the brain and sensory pathways in gastrointestinal sensory disorders in humans. *Gut* 2002; 51 Suppl 1: i29-i33
 - 47 Mertz HR. Overview of functional gastrointestinal disorders: dysfunction of the brain-gut axis. *Gastroenterol Clin North Am* 2003; 32: 463-476
 - 48 Drossman DA. Brain imaging and its implications for studying centrally targeted treatments in irritable bowel syndrome: a primer for gastroenterologists. *Gut* 2005; 54: 569-573
 - 49 Bonaz B, Baciú M, Papillon E, Bost R, Gueddah N, Le Bas JF, Fournet J, Segebarth C. Central processing of rectal pain in patients with irritable bowel syndrome: an fMRI study. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 654-661
 - 50 Mertz H, Morgan V, Tanner G, Pickens D, Price R, Shyr Y, Kessler R. Regional cerebral activation in irritable bowel syndrome and control subjects with painful and nonpainful rectal distention. *Gastroenterology* 2000; 118: 842-848
 - 51 Bernstein CN, Frankenstein UN, Rawsthorne P, Pitz M, Summers R, McIntyre MC. Cortical mapping of visceral pain in patients with GI disorders using functional magnetic resonance imaging. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 319-327
 - 52 Mayer EA, Berman S, Suyenobu B, Labus J, Mandelkern MA, Naliboff BD, Chang L. Differences in brain responses to visceral pain between patients with irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. *Pain* 2005; 115: 398-409
 - 53 Ladabaum U, Minoshima S, Hasler WL, Cross D, Chey WD, Owyang C. Gastric distention correlates with activation of multiple cortical and subcortical regions. *Gastroenterology* 2001; 120: 369-376
 - 54 Berman S, Munakata J, Naliboff BD, Chang L, Mandelkern M, Silverman D, Kovalik E, Mayer EA. Gender differences in regional brain response to visceral pressure in IBS patients. *Eur J Pain* 2000; 4: 157-172
 - 55 Silverman DH, Munakata JA, Ennes H, Mandelkern

- MA, Hoh CK, Mayer EA. Regional cerebral activity in normal and pathological perception of visceral pain. *Gastroenterology* 1997; 112: 64-72
- 56 Naliboff BD, Derbyshire SW, Munakata J, Berman S, Mandelkern M, Chang L, Mayer EA. Cerebral activation in patients with irritable bowel syndrome and control subjects during rectosigmoid stimulation. *Psychosom Med* 2001; 63: 365-375
- 57 Fukudo S, Nomura T, Muranaka M, Taguchi F. Brain-gut response to stress and cholinergic stimulation in irritable bowel syndrome. A preliminary study. *J Clin Gastroenterol* 1993; 17: 133-141
- 58 Sinhamahapatra P, Saha SP, Chowdhury A, Chakrabarti SK, Ghosh A, Maiti B. Visceral afferent hypersensitivity in irritable bowel syndrome—evaluation by cerebral evoked potential after rectal stimulation. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2150-2157
- 59 Schnitzler A, Volkmann J, Enck P, Frieling T, Witte OW, Freund HJ. Different cortical organization of visceral and somatic sensation in humans. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 305-315
- 60 Rossel P, Drewes AM, Petersen P, Nielsen J, Arendt-Nielsen L. Pain produced by electric stimulation of the rectum in patients with irritable bowel syndrome: further evidence of visceral hyperalgesia. *Scand J Gastroenterol* 1999; 34: 1001-1006
- 61 Villanova N, Azpiroz F, Malagelada JR. Perception and gut reflexes induced by stimulation of gastrointestinal thermoreceptors in humans. *J Physiol* 1997; 502: 215-222

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

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

·消息·

第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知

本刊讯 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议定于2006-03在广东省深圳市召开, 本次会议由中国中西医结合学会主办, 现将有关征文事项通知如下。

1 征文内容

本次会议的征文内容包括: (1)介绍结直肠肛门基础研究的新动态、新进展、新成果; (2)结直肠肛门肿瘤疾病的诊断及治疗的新技术、新成果, 直肠癌扩大根治术式和疗效, 中低位直肠癌保肛手术方法、适应征和效果, 肛管直肠癌会阴肛门重建术的术式、方法、效果; (3)中西医结合治疗结肠慢传输型、出口梗阻型及结肠、直肠、盆腔、盆底解剖生理功能异常等便秘疾病的诊断治疗方法、适应证、临床疗效和经验教训; (4)中西医结合治疗炎症性肠病的经验及手术方式选择; (5)中西医结合预防、治疗肛肠常见疾病的新方法、新经验; (6)采用中西医结合治疗结直肠肛门疾病的临床护理及造口护理的新方法、新经验; (7)肛门、结直肠损伤及异物处理的经验; (8)介绍国内外肛肠疾病检查、治疗的新器械、新设备、新药物。

2 征文要求

文章应有临床实用性, 基础研究应具有科学性和先进性; 全文4 000字以内, 要求寄打印稿(欢迎用软盘或电子信箱投稿), 并附500字以内的摘要一份, 关键词3-5个; 征文稿件请寄: (1)广东省公安边防总队医院(深圳武警医院)肛肠外科柯玮收, 邮编518029, 电话: 0755-82699768, 手机: 13714327555, email: kewe1968@126.com; (2)深圳市第二人民医院肛肠科舒洪权收, 邮编: 518039, 电话: 0755-26250353, 手机: 13923803457, email: ssshhqqq66@163.com。

3 其他

本次会议可授予国家级继续教育I类学分6分, 会议具体日期及详细地址另行通知。欢迎广大相关领域工作及研究人员参加。

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体DR4在大肠癌的表达及意义

闫庆辉, 张国建, 任鹏涛, 赵晶, 王凤安

■背景资料

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 是肿瘤坏死因子 (TNF) 超家族成员之一, 它通过与死亡受体4 (DR4) 结合, 诱导肿瘤细胞发生凋亡而对正常细胞却无杀伤作用, 这一特点使 TRAIL 及其死亡受体 DR4 在肿瘤治疗中的作用备受关注。

闫庆辉, 张国建, 任鹏涛, 赵晶, 王凤安, 河北医科大学第二医院胃肠外科 河北省石家庄市 050000

河北省卫生厅科学基金资助项目, No.2004014

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

电话: 0311-87222983

收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2005-12-08

Expression and significance of TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor DR4 in large intestine carcinoma

Qing-Hui Yan, Guo-Jian Zhang, Peng-Tao Ren, Jing Zhao, Feng-An Wang

Qing-Hui Yan, Guo-Jian Zhang, Peng-Tao Ren, Jing Zhao, Feng-An Wang, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Supported by the Science Foundation from Health Department of Hebei Province, No. 2004014

correspondence to: Dr. Feng-An Wang, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping West Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. galaxy@sina.com
Received: 2005-11-23 Accepted: 2005-12-08

Abstract

AIM: To explore the expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor DR4 in large intestinal carcinoma and its correlation with clinical pathological characteristics.

METHODS: SP immunohistochemical technique and flow cytometry were used to detect the expression of DR4 in 41 cases of large intestinal carcinoma and 9 cases of normal tissues.

RESULTS: The positive cell membrane and cytoplasmic expression were observed in large intestinal carcinoma and normal large intestine mucosal tissues. Of large intestinal carcinoma, DR4 was positively expressed in 65.85%. However, the positive rate of DR4 in the normal tissues was 22.20%, which was significant lower than that in the cancer tissues ($P < 0.05$). The fluorescence index (FI) of DR4 protein in the

normal mucosal tissues was 1.00 ± 0.13 , while that in the cancer tissues was 1.17 ± 0.13 . There was significant difference between them ($P < 0.05$). DR4 expression in the cancer tissues was not correlated with the degree of differentiation and lymph node metastasis.

CONCLUSION: The expression of DR4 increases in large intestinal cancer tissue, but it is not correlated with differentiation.

Key Words: Large intestinal cancer; DR4; Immunohistochemistry; Flow cytometry

Yan QH, Zhang GJ, Ren PT, Zhao J, Wang FA. Expression and significance of TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor DR4 in large intestine carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(3):332-335

摘要

目的: 探讨肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体DR4在大肠癌组织中的表达情况及其与临床病理的关系。

方法: 采用免疫组化SP法和流式细胞分析方法对41例大肠癌组织和9例正常组织DR4的表达情况进行检测并比较。

结果: DR4蛋白免疫组化染色定位于细胞膜和细胞浆, 癌组织中阳性表达率为65.85%, 明显高于正常组织的22.20% ($P < 0.05$)。流式细胞分析该蛋白表达量, 癌组织平均荧光指数为 1.17 ± 0.13 , 亦明显高于正常组织的 1.00 ± 0.13 ($P < 0.05$)。不同分化程度的癌组织中DR4蛋白表达无统计学差异, 临床有淋巴结转移的癌组织与无淋巴结转移的癌组织DR4表达无统计学差异。

结论: 大肠癌组织中DR4表达上调, 与组织分化程度无关。

关键词: 大肠癌; DR4; 免疫组化; 流式细胞分析

闫庆辉, 张国建, 任鹏涛, 赵晶, 王凤安. 肿瘤坏死因子相关凋亡

诱导配体受体DR4在大肠癌的表达及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(3):332-335
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/332.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族成员之一,它通过与死亡受体4(death receptor 4, DR4)结合,诱导肿瘤细胞发生凋亡而对正常细胞却无杀伤作用,这一特点使TRAIL及其死亡受体DR4在肿瘤治疗中的作用备受关注^[1-3]. 国内外学者用细胞培养和免疫组化方法研究发现,结肠癌中DR4表达明显高于结肠腺瘤和正常结肠黏膜^[4-7],并且随着DR4表达的上调,细胞的凋亡增加.但不同分化程度的大肠腺癌中DR4表达有无不同以及其与临床病理有无关系尚未见报道.我们期望通过对这些进行研究以更好的了解大肠癌的生物特点,从而推动大肠癌的治疗.

1 材料和方法

1.1 材料 41例大肠癌患者,均经病理诊断确诊.其中男24例,女17例;年龄40-68岁,平均51.25±0.13岁.取其大肠癌组织标本,同时取9例距癌5-10 cm组织,经病理证实为正常组织的标本作为对照.按照2000年WHO新的大肠肿瘤组织学分级标准分类^[8],高分化腺癌(I级)10例,中分化腺癌(II级)15例,低分化腺癌(III级)16例.

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色 DR4单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,操作步骤严格按照说明书进行.用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗做阴性对照.以胞质和胞膜呈棕黄色或黄色为阳性表达.染色结果判定标准:光镜下观察按着色范围并结合着色强度进行分级.着色范围以阳性细胞百分率判定:未着色为0分;着色25%以下为1分;着色25%-50%为2分;着色50%以上为3分.着色强度判定:无着色为0分;浅着色为1分;棕色为2分;深棕色为3分.上述两项相加为分级标准.阴性(-):<3分;阳性(+):≥3分.

1.2.2 流式细胞分析 采用美国Beckman Coulter公司生产的Epics-XLII型流式细胞仪,激发光源为150 mW氩离子激光器,激发波长为488 nm,应用Expo32ADC进行免疫荧光数据分析.检测前以flow-check™Fluorospheres(10 μm)荧光微球

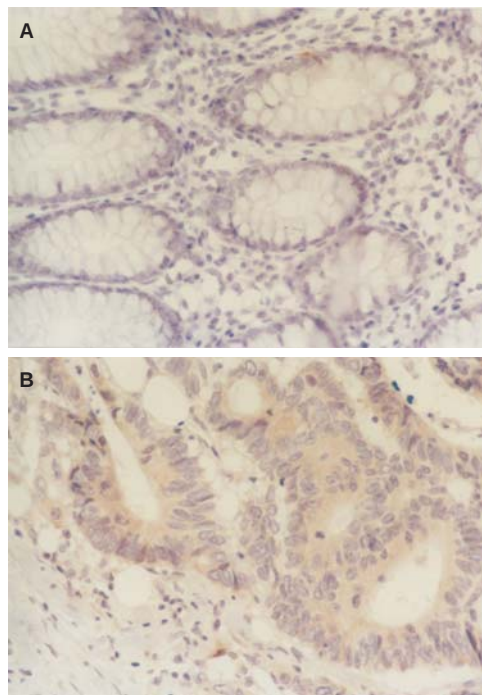


图1 DR4阳性表达(SP × 400). A: 正常大肠黏膜; B: 大肠癌.

(REF6605359.Beckman Coulter, Inc.Fullerton, CA92835)作为标准样品调整仪器CV值在2%以内.参照仪器使用说明,以荧光指数(FI)表示蛋白表达的相对含量.

统计学处理 实验数据采用 χ^2 检验及 t 检验进行处理.

2 结果

2.1 DR4在大肠癌组织和正常组织中的表达特征 DR4蛋白定位表达于上皮细胞胞质和胞膜,正常大肠黏膜组织中阳性表达2例,阳性表达率为22.2%;癌组织阳性表达27例,阳性表达率65.85%;两组比较有显著性差异($\chi^2 = 5.59, P < 0.05$)(图1).流式细胞分析(FCM)该蛋白表达量,正常大肠黏膜平均荧光指数为 1.00 ± 0.13 ,癌组织平均荧光指数为 1.17 ± 0.13 .两组比较有显著性差异($t = 3.13, P = 0.007$)(图2).

2.2 DR4表达与大肠癌临床病理特征的关系 DR4蛋白在高分化腺癌组织中阳性表达率70.0%(7/10);在中分化腺癌组织中阳性表达率73.3%(11/15);在低分化腺癌组织中阳性表达率56.3%(9/16).在腺癌组织中,DR4蛋白的表达与腺癌的组织学分化程度没有统计学差异($\chi^2 = 1.08$).临床有淋巴结转移的患者阳性表达率63.64%(14/22);无淋巴结转移的患者阳性表达率68.42%(13/19),两者之间没有统计学差异($\chi^2 = 0.11$).DR4蛋白表达与年龄、性别之间,均未发

■创新点

DR4受体与癌组织的组织学分级和淋巴结转移与否均没有统计学差异,因此DR4不能作为影响大肠癌预后判断的指标.

■应用要点

本文结果表明TRAIL受体DR4在不同大肠组织中表达是不同的, TRAIL和DR4诱导大肠癌细胞凋亡的机制是复杂的, 这些为我们进一步探讨大肠癌分子生物学异常提供了依据。

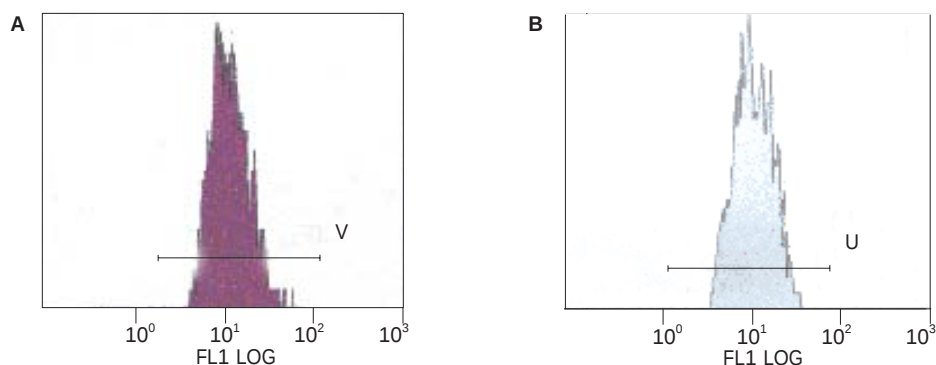


图2 DR4 FCM结果. A: 正常大肠黏膜; B: 大肠癌。

现有显著相关性。

2.3 TRAIL和DR4直线相关关系分析 TRAIL与DR4蛋白表达量进行直线相关分析, $r = 0.33$, $P > 0.05$, 二者无直线相关关系。

3 讨论

TRAIL诱导细胞凋亡机制目前认为是其与死亡受体DR4、DR5结合, 诱导细胞凋亡。DR4又称TRAIL受体1(TRAIL-R1)^[1,2]; 是有468个氨基酸的I型膜蛋白。在细胞外区域, 它有两个富含半胱氨酸的假重复序列(pseudorepeats), 胞质内区域的死亡区(death domain)与TNF-R1, DR3和Fas等的死亡区呈高度同源性。DR4与TRAIL特异结合后形成“受体三聚化”, 通过死亡结构域激发和传导凋亡信号, 激活caspase蛋白酶级联反应, 导致细胞死亡, 故又称为死亡受体。

研究发现DR4通过多种信号传导途径诱导细胞凋亡^[9-14], 但无论凋亡信号在细胞内如何传递, TRAIL要发挥诱导细胞凋亡的作用必须首先与其受体结合。因此, 细胞表面TRAIL受体表达水平及功能对TRAIL介导的细胞凋亡至关重要。然而并不是所有的人结肠癌细胞株都对TRAIL敏感, 无功能DR4的表达可能是细胞对TRAIL介导凋亡耐受的原因之一, 通过使DR4表达上调或功能增加可增加其对TRAIL的敏感性^[10,15,16]。但也有学者^[3,5,7,15]研究发现, 与正常大肠黏膜相比, TRAIL表达下调, DR4表达上调, 因此作者认为TRAIL诱导的细胞凋亡和DR4的表达并无直接关系。我们以往的研究证明大肠癌组织中TRAIL的表达明显低于正常大肠黏膜, 并且随着组织分化程度的下降呈逐步下降趋势^[15]。我们通过免疫组化和流式细胞分析两种方法从定位和定量两方面证明了DR4在癌组织中的表达明显高于正常黏膜, 这些结果和国外研究结果是一致的。我们结果还发现不同分化程度的大肠癌组织的

DR4的表达无统计学差异, 淋巴结转移与否的癌组织DR4的表达也无统计学差异, 因此DR4不能作为影响大肠癌预后因素的指标。

对大肠癌中TRAIL和DR4蛋白的表达情况做直线相关分析, 结果表明二者无直线相关关系。因此决定TRAIL和DR4抗体对大肠癌组织敏感性的因素是复杂的。有研究认为决定TRAIL治疗的敏感性与死亡受体的表达水平并不一致, 甚至有些细胞对DR4会产生耐受^[16,17], DR4过度表达可不依赖配体, 并直接诱导细胞的凋亡。本实验得出结果: 癌组织TRAIL表达下调, 而死亡受体DR4表达上调, 二者的表达并无直接关系, 二者表达的差异机制有待进一步探讨。

总之, 这些结果说明TRAIL受体DR4分布的差异以及该受体在大肠癌肿瘤细胞凋亡过程中的可能作用, 同时说明除受体调控模式外, 还可能其他的细胞内和/或细胞外因素参与。这些为我们进一步探讨大肠癌分子生物学异常提供了依据。

4 参考文献

- 1 Sheikh MS, Huang Y. Death receptors as targets of cancer therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4: 97-104
- 2 Yagita H, Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Okumura K. TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci* 2004; 95: 777-783
- 3 Hague A, Hicks DJ, Hasan F, Smartt H, Cohen GM, Paraskeva C, MacFarlane M. Increased sensitivity to TRAIL-induced apoptosis occurs during the adenoma to carcinoma transition of colorectal carcinogenesis. *Br J Cancer* 2005; 92: 736-742
- 4 Jin Z, McDonald ER 3rd, Dicker DT, El-Deiry WS. Deficient tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor transport to the cell surface in human colon cancer cells selected for resistance to TRAIL-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 35829-35839
- 5 Koornstra JJ, Jalving M, Rijcken FE, Westra J, Zwart N, Hollema H, de Vries EG, Hofstra RW, Plukker JT, de Jong S, Kleibeuker JH. Expression of tumour

- necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand death receptors in sporadic and hereditary colorectal tumours: potential targets for apoptosis induction. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1195-1202
- 6 Strater J, Hinz U, Walczak H, Mechttersheimer G, Koretz K, Herfarth C, Moller P, Lehnert T. Expression of TRAIL and TRAIL receptors in colon carcinoma: TRAIL-R1 is an independent prognostic parameter. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3734-3740
 - 7 Koornstra JJ, Kleibeuker JH, van Geelen CM, Rijcken FE, Hollema H, de Vries EG, de Jong S. Expression of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) and its receptors in normal colonic mucosa, adenomas, and carcinomas. *J Pathol* 2003; 200: 327-35
 - 8 来茂德. WHO新的结直肠癌分类的特点. *中华病理学杂志* 2003; 32: 170-172
 - 9 Delmas D, Rebe C, Micheau O, Athias A, Gamber P, Grazide S, Laurent G, Latruffe N, Solary E. Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells. *Oncogene* 2004; 23: 8979-8986
 - 10 Drosopoulos KG, Roberts ML, Cermak L, Sasazuki T, Shirasawa S, Andera L, Pintzas A. Transformation by oncogenic RAS sensitizes human colon cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating death receptor 4 and death receptor 5 through a MEK-dependent pathway. *J Biol Chem* 2005; 280: 22856-22867
 - 11 Ren YG, Wagner KW, Knee DA, Aza-Blanc P, Nasoff M, Deveraux QL. Differential regulation of the TRAIL death receptors DR4 and DR5 by the signal recognition particle. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 5064-5074
 - 12 Koornstra JJ, Rijcken FE, Oldenhuis CN, Zwart N, van der Sluis T, Hollema H, de Vries EG, Keller JJ, Offerhaus JA, Giardiello FM, Kleibeuker JH. Sulindac inhibits beta-catenin expression in normal-appearing colon of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1608-1612
 - 13 Bremer E, Samplonius DF, van Genne L, Dijkstra MH, Kroesen BJ, de Leij LF, Helfrich W. Simultaneous inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling and enhanced activation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor-mediated apoptosis induction by an scFv: sTRAIL fusion protein with specificity for human EGFR. *J Biol Chem* 2005; 280: 10025-10033
 - 14 徐彤, 李强, 郝希山. 大肠癌细胞功能性Fas配体的表达度与肿瘤免疫逃逸的关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2066-2069
 - 15 张国建, 王凤安, 闫庆辉. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体在大肠癌中的表达及意义. *中国综合临床* 2005; 21: 636-637
 - 16 Van Geelen CM, de Vries EG, de Jong S. Lessons from TRAIL-resistance mechanisms in colorectal cancer cells: paving the road to patient-tailored therapy. *Drug Resist Updat* 2004; 7: 345-358
 - 17 Zhang L, Fang B. Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 228-237

■名词解释

死亡受体4(DR4): DR4与TRAIL特异结合后形成"受体三聚化", 通过死亡结构域激活和传导凋亡信号, 激活caspase蛋白酶级联反应, 导致细胞死亡, 故又称为死亡受体。

电编 张勇 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

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

● 消息 ●

专家门诊

本报讯《世界华人消化杂志》特设"专家门诊"固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台, 邀请本刊编委为专栏撰稿, 每期1-3个专家门诊. 写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间

VEGF和Angiopoietin家族在早期人胚肝发育过程中的作用

姜红心, 魏志新, 齐安东, 李翠花, 王 箐, 李 磊

■背景资料

肝干细胞的发育过程伴随着肝内血管及造血细胞的发育。近年, 动物研究表明, 肝干细胞与血管内皮细胞之间存在相互诱导、相互作用的关系, 但这些作用通过什么因子和受体介导目前尚不清楚。在胚胎发育过程中, 造血细胞与肝脏存在着密切关系, 肝干细胞可促进造血细胞的生成。但肝实质细胞通过产生哪些信号分子来诱导造血细胞的分化不清楚, 造血细胞反过来对肝干细胞有无影响也未见报道。

姜红心, 魏志新, 齐安东, 李翠花, 王箐, 李磊, 潍坊医学院形态学实验室 山东省潍坊市 261042

通讯作者: 姜红心, 261042, 山东省潍坊市胜利东街288号, 潍坊医学院形态学实验室. hongxinjiang@163.com

电话: 0536-2602373

收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-11-24

Roles of vascular endothelial growth factor and Angiopoietin family in early stage of human liver development

Hong-Xin Jiang, Zhi-Xin Wei, An-Dong Qi, Cui-Hua Li, Qing Wang, Lei Li

Hong-Xin Jiang, Zhi-Xin Wei, An-Dong Qi, Cui-Hua Li, Qing Wang, Lei Li, Laboratory of Morphology, Weifang Medical college, Weifang 261042, Shandong Province, China

Correspondence to: Hong-Xin Jiang, Laboratory of Morphology, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China. hongxinjiang@163.com

Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-11-24

Abstract

AIM: To explore the association among hepatic stem cells, endothelial cells, and hematopoietic stem cells during liver development by observing the expression of vascular endothelial growth factor A (VEGFA), VEGFC, Angiopoietin (Ang)-1, Ang-2 and their receptors in the human embryonic liver of 3-5 wk.

METHODS: Paraffin sections were prepared from 24 embryos of 3, 4, and 5 wk. Immunohistochemistry staining was performed to observe the development of hepatic stem cells, endothelial cells and hematopoietic stem cell as well as the expression of CD34, VEGFA, VEGFC, Ang-1, Ang-2, and their receptors, and flt-1, flk-1, flt-4, and Tie-2 under light microscope.

RESULTS: Endothelial cells predominated in mesenchyme adjacent to the liver bud at 3 wk, but not in the bud. At 4 wk, the cells in the liver bud migrated into the domain of transversum mesenchyme, where endothelial cells began to form vascular structures, and branched to form a number of hepatic cords. A few hematopoi-

etic cells were seen scattered between the liver cords at 5 wk, and primitive sinusoids, which came from vitelline veins, appeared between the hepatic cords. The numbers of hematopoietic cells were increased in comparison with those at 4 wk. VEGFA was expressed by some hepatic stem cells and hematopoietic cells during 3-5 wk. At the same time, most of hepatic stem cells and endothelial cells were positive for VEGFC, while hematopoietic cells were VEGFC-negative. flt-1 and flk-1 positive reaction was found in most of hepatic stem cells and a few endothelial cells. The hematopoietic cells were negative for flt-1 and flk-1, but positive for flt-4. Hepatic stem cells expressed Ang-2, while hematopoietic cells expressed its receptor Tie-2. Meanwhile, endothelial cells expressed Ang-1 and Ang-2, but didn't express Tie-2.

CONCLUSION: Hepatic stem cells may induce the growth and differentiation of vascular endothelial cells through VEGFA signals. The development of hepatic stem cells is affected by VEGFC, angiopoietin secreted by endothelial cells and VEGFA produced by hematopoietic cells. Meanwhile, the development of hematopoietic cells depended on the VEGFC and Ang-2 produced by hepatic stem cells.

Key Words: Human embryo; Development; Liver; VEGF family; Angiopoietin family

Jiang HX, Wei ZX, Qi AD, Li CH, Wang Q, Li L. Roles of vascular endothelial growth factor and Angiopoietin family in early stage of human liver development. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(3):336-340

摘要

目的: 观察血管内皮细胞生长因子A(VEGFA)、血管内皮细胞生长因子C(VEGFC)、Angiopoietin-1(Ang-1)、Angiopoietin-2(Ang-2)及其受体在发育第3-5 wk人胚胎肝的表达, 以了解早期人胚发育过程中血管内皮细胞、造血干细胞与肝干细胞之间的相互关系。

方法: 实验用发育3, 4, 5 wk人胚胎标本各8例(共24例), 石蜡切片, 连续切片, 进行

CD34、VEGFA、VEGFC、fms样酪氨酸激酶-1(FLT-1)、胚胎肝激酶1(Flk-1)、FLT-4、Ang-1、Ang-2、Tie-2免疫组化染色, 光镜下观察。

结果: 3 wk时靠近肝芽的间充质中的血管内皮细胞多, 而肝芽内未见血管内皮细胞及造血细胞; 4 wk时, 肝索形成处可见较多正在形成的新生血管增多, 肝索间开始出现少量的造血细胞; 5 wk时肝索间出现原始的肝血窦结构, 血窦内造血细胞的数量较4 wk明显增多。发育的3-5 wk, 部分肝干细胞及血细胞中出现VEGFA阳性反应, 多数肝细胞及内皮细胞中均有VEGFC免疫反应, 而造血细胞中无。多数肝干细胞和少数血管内皮细胞呈flt-1和flk-1阳性, 造血细胞呈flt-1、flk-1免疫反应阴性, 而呈flt-4阳性。肝干细胞强表达Ang-2, 而造血细胞表达其受体Tie-2, 与此同时, 内皮细胞表达Ang-1和Ang-2, 而不表达其受体Tie-2。

结论: 来自肝干细胞的VEGFA信号可使内皮细胞分化、增殖并形成血管; 来自内皮细胞的VEGFC、Angiopoietin信号对肝干细胞的生长和分化起作用; 造血细胞分泌的VEGFA可以通过旁分泌途径调节肝干细胞的发育; 造血细胞的发育依赖于肝干细胞产生的VEGFC和Ang-2。

关键词: 人胚; 发育; 肝脏; VEGF家族; Angiopoietin家族

姜红心, 魏志新, 齐安东, 李翠花, 王菁, 李磊. VEGF和Angiopoietin家族在早期人胚肝发育过程中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(3):336-340
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/336.asp>

0 引言

肝干细胞与血管内皮细胞之间存在相互诱导、相互作用的关系^[1-3], 肝干细胞可促进造血细胞的生成^[4,5], 但这些诱导作用的分子机制目前尚不清楚, 造血细胞反过来对肝干细胞有无影响也未见报道。LeCouter *et al*^[6]发现, 外源性血管内皮细胞生长因子A(VEGFA)可促进成年小鼠内皮细胞和肝细胞的增殖, 从而启动内皮细胞与肝细胞的信息传递。但目前未见VEGF家族在肝实质细胞中表达的报道, 也不清楚Angiopoietin是否在这一诱导过程中起作用。为此, 我们对人胚胎肝干细胞的发育与血管内皮细胞、造血细胞之间的关系; VEGF和Angiopoietin家族及其受体在肝干细胞、内皮细胞及造血细胞中的表达

进行了观察, 以探索造血干细胞、血管内皮细胞与肝干细胞之间诱导作用的分子机制, 为肝干细胞的基础和临床应用研究提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 收集人工流产、受精龄为3 mo以内的新鲜人胚胎47例(其中3-5 wk各8例, 6-8 wk各5例, 9-12 wk各2例), 16 g/L多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 制5 μm厚的连续切片, 裱于APES包被的载玻片上。每10张抽片1张做HE染色, 显微镜下观察, 根据胚层形成情况、胚体的长度、体节的数目及器官发育状况确定胚胎龄。

1.2 方法 参照Jiang *et al*^[7]的研究结果, 用CD34标记造血干细胞和内皮细胞^[8], 选择3-5 wk的人胚胎标本各8例, 每10张抽1张, 行免疫组织化学染色(SABC法), 多克隆抗VEGFC、flt-1、flt-4、Ang-1、Ang-2、Tie-2抗体(1:200, Santa Cruz公司), 单克隆抗CD34、VEGFA、flk-1抗体(1:200, Santa Cruz公司)4℃孵育过夜, 羊抗兔或羊抗鼠IgG及SABC液(1:200, Santa Cruz公司)室温下分别孵育2 h, DAB显色。以PBS代替一抗作阴性对照。光学显微镜下观察、拍照。

2 结果

2.1 早期人胚肝干细胞及血窦内皮细胞的发育 胚胎发育3 wk末, 部分内胚层细胞由立方形变为高柱状, 并聚集形成一个多层的上皮细胞群即肝芽。此时肝芽内未见血管内皮细胞及造血细胞, 在靠近肝芽的间充质中的血管内皮细胞多, 并可见有的内皮细胞正在形成毛细血管, 而在远离肝芽的间充质中则很少见到内皮细胞及毛细血管(图1A)。4 wk时, 组成肝芽的细胞向横隔间充质迁移, 并在此处分支形成少量的肝细胞索, 肝索处有较多正在形成的毛细血管。此时的血管内皮细胞扁平、核大、深染, 细胞不连续。血管内的血细胞有核, 核质比较大(图1B)。5 wk时, 在肝索间出现原始的肝血窦结构, 原始肝血窦内造血细胞的数量较4 wk明显增多, 这些造血细胞和内皮细胞的形态与3-4 wk的相同, 此时肝索和肝血窦的分布无规律(图1C)。4-5 wk时肝内正在形成和已经形成的血管内皮细胞以及游离散在的血管内皮细胞均为CD34强阳性, 阳性反应主要位于内皮细胞的细胞膜(图1D)。

2.2 VEGFA、VEGFC、Ang-1、Ang-2等血管生长因子及其受体的表达 胚胎发育3-5 wk, 部分肝干细胞及造血细胞中出现VEGFA阳性反应,

■创新盘点

本文通过免疫组化技术, 原位观察了人胚胎肝干细胞与内皮细胞、造血细胞在肝脏发育过程中的位置关系以及VEGF和Angiopoietin家族及其受体的表达, 发现不同的VEGF和Angiopoietin家族的因子分别介导了肝干细胞与内皮细胞、造血细胞的相互作用。

■应用要点

通过本课题的研究,可了解肝干细胞增殖、分化的微环境及某些调控因素,阐明肝干细胞增殖分化与成熟的部分调控机制,为肝干细胞的体外培养和诱导分化提供试验依据。

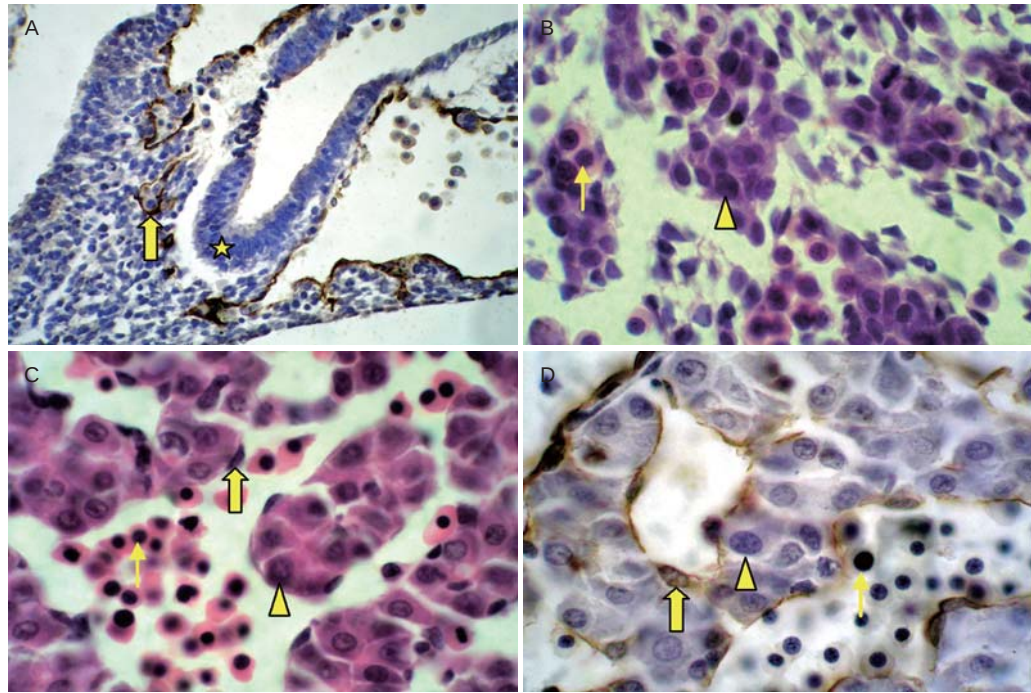


图1 早期人胚肝干细胞及血管内皮细胞的发育. ▲示肝干细胞, ↑示内皮细胞, ↑示造血细胞, ★示肝芽. A: 3 wk, CD34 ($\times 400$); B: 4 wk, HE ($\times 1\,000$); C: 5 wk, HE ($\times 1\,000$); D: 5 wk, CD34 ($\times 1\,000$).

反应产物积聚在细胞质和胞核;这些VEGFA阳性的血细胞较大,核圆形,核质比大;血管内皮细胞中无VEGFA阳性反应(图2A).多数肝干细胞及内皮细胞中均有VEGFC免疫反应,而造血细胞中无(图2B).多数肝干细胞和少数血管内皮细胞呈flt-1和flk-1阳性,虽然flt-1和flk-1免疫组化阳性反应发生的部位相似,但在肝干细胞和内皮细胞中flt-1的反应较flk-1强,此时造血细胞呈flt-1、flk-1免疫反应阴性,而呈flt-4阳性(图2C-E).

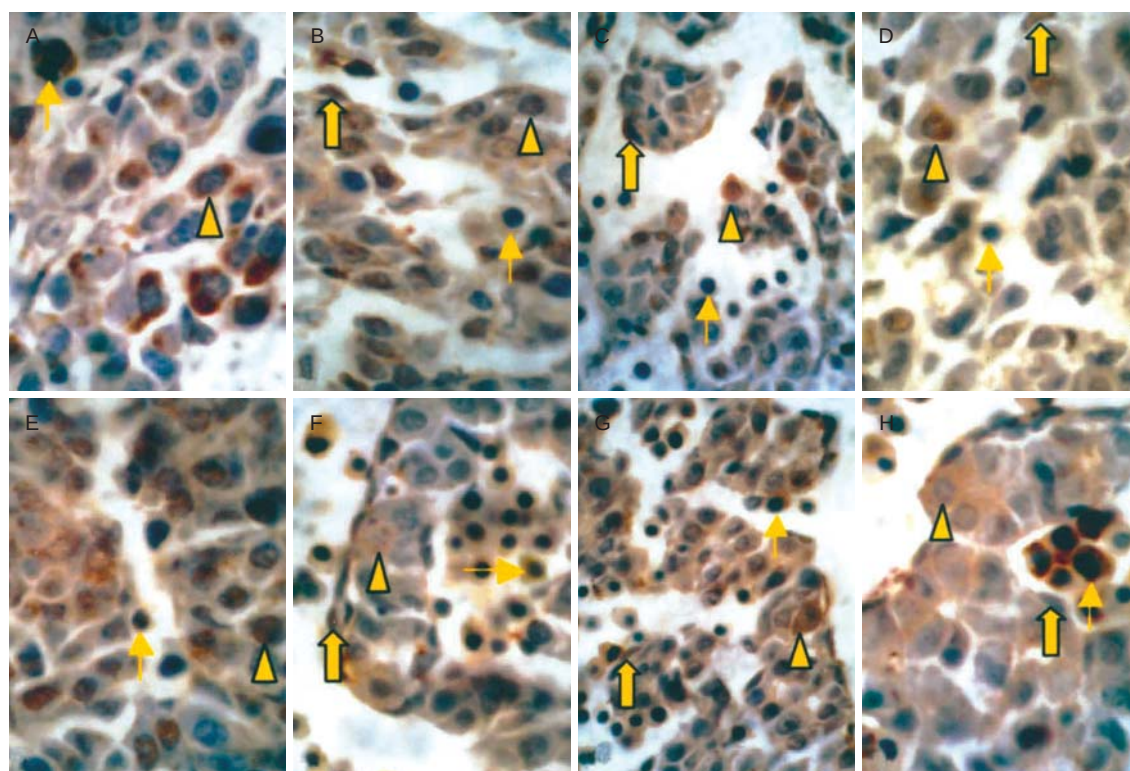
发育3-5 wk的胚胎肝血管,有Ang-1、Ang-2和Tie-2阳性反应的造血细胞,细胞形态同VEGFA阳性细胞, Tie-2免疫反应的强度超过Ang-1和Ang-2.与此同时,内皮细胞表达Ang-1和Ang-2,而不表达其受体Tie-2.肝干细胞中Ang-2的阳性反应较Ang-1和Tie-2强(图2F-H).

3 讨论

3.1 血管内皮细胞与早期人胚肝干细胞发育的关系 以往认为内皮细胞的作用主要是运送氧气,但近年研究发现,在血液循环形成前,内皮细胞还可诱导心脏、肝脏、胰腺和牙齿的胚胎发生^[9-13].在这一过程中,血管内皮细胞向组织细胞发出信号,以确定器官生长的位置、形态和分化状态^[14];另一方面,受组织细胞的影响,内皮细胞获得器官特异性的特征,以适应器

官的生长发育^[2,15-17].本文结果显示,3 wk时在靠近肝芽的间充质中的血管内皮细胞多,并可见有的内皮细胞正在形成毛细血管,而在远离肝芽的横隔间充质中则很少见到内皮细胞及毛细血管,提示内皮细胞可诱导内胚层细胞向肝细胞的特化.4 wk时,组成肝芽的细胞向正在形成毛细血管的间充质处迁移,并在此形成肝索,提示横隔间充质中的血管内皮细胞可促进肝内胚层细胞向横隔的迁移.5 wk时,组成肝索的细胞增多,并将穿越此处的卵黄静脉分隔成肝血窦样血管.以上结果均提示在早期人胚肝发育过程中,内皮细胞及新生血管可诱导肝细胞的发生.对VEGF和Angiopoietin家族及其受体的免疫组化研究表明,发育3-5 wk的肝干细胞表达VEGFA、flt-4、Tie-2等,而内皮细胞表达flt-1、flk-1、VEGFC、Ang-1、Ang-2,根据内皮细胞与肝干细胞在发育过程中的时空配布关系和VEGFA、Ang-1、Ang-2及其受体的表达,我们推测在人胚发育的3-5 wk,肝干细胞与内皮细胞之间存在相互作用,其中来自肝干细胞的VEGFA信号可使内皮细胞分化、增殖并形成血管,而来自内皮细胞的VEGFC、Ang-1、Ang-2信号亦可促进胚肝的形态发生和肝索的形成,两者相互依赖.

3.2 造血细胞与早期人胚肝干细胞发育的关系 胚胎肝是胚内造血器官,造血干细胞最早出现



■同行评价
本文研究的内容
具有一定的新颖
性.

图 2 VEGFA、VEGFC、Ang-1、Ang-2等血管生长因子及其受体在第5 Wk胚胎肝的表达. ▲示肝干细胞, ↑示内皮细胞, ↑示造血细胞, 免疫组化染色, 苏木素复染. A: VEGFA; B: VEGFC; C: flt-1; D: flk-1; E: flt-4; F: Ang-1; G: Ang-2; H: Tie-2 ($\times 1\,000$).

于卵黄囊, 之后迁移到胚胎肝, 并在此增殖、分化, 说明造血组织与肝脏存在空间上的密切关系. 已有研究表明在造血和成肝过程中有许多共同的特征, 肝干细胞激活时, 能表达几种造血干细胞的标记物(c-kit、CD34和Thy-1)^[18,19]; 肝源性有丝分裂源——HGF亦可作为造血干细胞的生长因子^[20]. 我们注意到, 3 wk肝芽内尚无造血细胞迁入, 4 wk时胚肝中开始出现少量CD34阳性的造血干细胞, 这些细胞体积大, 圆形, 核圆形, 核/质比大, 5 wk出现造血灶, 并且3-5 wk的肝索细胞几乎全部是肝干细胞^[6], 提示胎肝造血与肝干细胞的发育是同步进行的. 4 wk开始, 肝内造血细胞呈VEGFA阳性, 肝干细胞表达VEGFA受体flt-1、flk-1, 这说明造血细胞分泌的VEGFA可作用于肝干细胞; 同时, 肝干细胞表达VEGFC, 多数造血细胞不表达VEGFC而仅表达其受体flt-4, 这提示肝干细胞可通过产生VEGFC经旁分泌途径对造血细胞发挥作用. 肝干细胞强表达Ang-2, 而造血细胞表达其受体Tie-2, 表明肝干细胞可通过产生Ang-2对造血细胞发挥作用.

总之, 本文结果表明, 肝干细胞、造血细胞、肝外和肝内的间充质血管内皮细胞三者的发育存在密切的时间和空间的联系, 这为三者

相互作用奠定了基础. 来自肝干细胞的VEGFA信号可使内皮细胞分化、增殖并形成血管; 来自内皮细胞的VEGFC、Angiopoietin信号对3-5 wk肝干细胞的生长和分化起作用; 造血细胞分泌的VEGFA可以通过旁分泌途径调节肝干细胞的发育; 造血细胞的发育依赖于肝干细胞产生的VEGFC和Ang-2.

4 参考文献

- Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, Zaret KS. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 2001; 294: 559-563
- Parviz F, Matullo C, Garrison WD, Savatski L, Adamson JW, Ning G, Kaestner KH, Rossi JM, Zaret KS, Duncan SA. Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet* 2003; 34: 292-296
- Morita M, Qun W, Watanabe H, Doi Y, Mori M, Enomoto K. Analysis of the sinusoidal endothelial cell organization during the developmental stage of the fetal rat liver using a sinusoidal endothelial cell specific antibody, SE-1. *Cell Struct Funct* 1998; 23: 341-348
- Sonoda Y, Sasaki K, Suda M, Itano C. Ultrastructural studies of hepatoblast junctions and liver hematopoiesis of the mouse embryo. *Kaibogaku Zasshi* 2001; 76: 473-482
- Medlock ES, Haar JL. The liver hemopoietic environment: I. Developing hepatocytes and their role in fetal hemopoiesis. *Anat Rec* 1983; 207: 31-41
- LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH,

- Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science* 2003; 299: 890-893
- 7 Jiang J, Li A, Zhou H, Mei Y, Yang S, Hong H, Song H, Yang H. The characteristics of hepatic stem cells and the expression of growth factor and their receptors in the early embryonic human liver. *Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi* 2004; 21: 995-998
- 8 Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow CD34-cells engraft *in vivo* and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Exp Hematol* 1998; 26: 353-360
- 9 Lammert E, Cleaver O, Melton D. Role of endothelial cells in early pancreas and liver development. *Mech Dev* 2003; 120: 59-64
- 10 Lammert E, Cleaver O, Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 2001; 294: 564-567
- 11 Thesleff I, Aberg T. Tooth morphogenesis and the differentiation of ameloblasts. *Ciba Found Symp* 1997; 205: 3-12
- 12 Yoshitomi H, Zaret KS. Endothelial cell interactions initiate dorsal pancreas development by selectively inducing the transcription factor Ptf1a. *Development* 2004; 131: 807-817
- 13 Nikolova G, Lammert E. Interdependent development of blood vessels and organs. *Cell Tissue Res* 2003; 314: 33-42
- 14 Brutsaert DL. Cardiac endothelial-myocardial signaling: its role in cardiac growth, contractile performance, and rhythmicity. *Physiol Rev* 2003; 83: 59-115
- 15 Wilting J, Christ B. Embryonic angiogenesis: a review. *Naturwissenschaften* 1996; 83: 153-164
- 16 Modis L, Martinez-Hernandez A. Hepatocytes modulate the hepatic microvascular phenotype. *Lab Invest* 1991; 65: 661-670
- 17 Mochida S, Ishikawa K, Toshima K, Inao M, Ikeda H, Matsui A, Shibuya M, Fujiwara K. The mechanisms of hepatic sinusoidal endothelial cell regeneration: a possible communication system associated with vascular endothelial growth factor in liver cells. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13: S1-S5
- 18 Grompe M. The role of bone marrow stem cells in liver regeneration. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 363-372
- 19 Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2818-2822
- 20 Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 2003; 112: 160-169

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

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

• 消息 •

技法与经验

本报讯《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏,及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验.我们热烈欢迎各位作者踊跃投稿,免费刊登彩色照片.写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法

1.1 原理

1.2 适应证

1.3 器材准备

1.4 步骤

1.5 实例

2 结果

3 讨论

3.1 并发症

3.2 优点和缺点

3.3 经验与技巧

4 参考文献

原发性胆汁性肝硬化患者CD11c⁺和CD123⁺树突状细胞与肝功能损伤的关系

李永哲, 胡朝军, 佟大伟, 张蜀澜, 刘定华

李永哲, 胡朝军, 佟大伟, 张蜀澜, 刘定华, 中国医学科学院
中国协和医科大学 北京协和医院检验科 北京市 100730
国家自然科学基金资助项目, No. 30471617
国家863计划资助项目, No. 2002AA2Z2011
通讯作者: 李永哲, 100730, 北京市东城区帅府园1号, 北京协和
医院检验科. yongzhelipumch@yahoo.com.cn
电话: 010-65295416 传真: 010-65295416
收稿日期: 2005-12-29 接受日期: 2006-01-19

Relations of peripheral blood CD11c⁺ and CD123⁺ dendritic cells with hepatic injury in patients with primary biliary cirrhosis

Yong-Zhe Li, Chao-Jun Hu, Da-Wei Tong, Shu-Lan Zhang, Ding-Hua Liu

Yong-Zhe Li, Chao-Jun Hu, Da-Wei Tong, Shu-Lan Zhang, Ding-Hua Liu, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China
Supported by National Science Foundation of China, No. 30471617, and the Foundation of National 863 Program, No. 2002AA2Z2011
correspondence to: Yong-Zhe Li, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Science, 100730 Beijing, China. yongzhelipumch@yahoo.com.cn
Received: 2005-12-29 Accepted: 2006-01-19

Abstract

AIM: To investigate the levels of CD11c⁺ and CD123⁺ dendritic cells in the peripheral blood and their associations with hepatic injury in patients with primary biliary cirrhosis (PBC).

METHODS: The percentages of CD11c⁺ and CD123⁺ dendritic cells in the peripheral blood from patients with PBC ($n = 40$), other hepatic diseases ($n = 40$) and normal individuals ($n = 30$) were measured by flow cytometry.

RESULTS: The levels of CD11c⁺ and CD123⁺ dendritic cells in patients with PBC were significantly lower than that in normal controls ($0.087 2 \pm 0.008 2$ vs $0.169 0 \pm 0.011 3$, $P < 0.01$; $0.034 9 \pm 0.004 9$ vs $0.064 3 \pm 0.005 4$, $P < 0.01$). The ratios

of CD11c⁺ and CD123⁺ dendritic cells in patients with severe hepatic injury were markedly lower in comparison with that of patients without severe hepatic injury ($0.071 6 \pm 0.007 3$ vs $0.124 2 \pm 0.009 4$, $P < 0.01$; $0.042 6 \pm 0.005 9$ vs $0.061 7 \pm 0.006 1$, $P < 0.01$). Furthermore, PBC patients with AMA-M2 positive had statistically lower levels of CD11c⁺ and CD123⁺ in peripheral blood than those with AMA-M2 negative did ($0.076 1 \pm 0.005 1$ vs $0.096 5 \pm 0.008 3$, $P < 0.05$; $0.046 6 \pm 0.006 9$ vs $0.063 1 \pm 0.005 7$, $P < 0.05$). Dynamically, we found the levels of CD11c⁺ and CD123⁺ dendritic cells in the same PBC patients were increased after treatment, while CD123⁺ dendritic cells was notably increased ($0.058 3 \pm 0.004 9$ vs $0.032 1 \pm 0.004 1$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: The levels of peripheral blood CD11c⁺ and CD123⁺ dendritic cells in patients with PBC are correlated with hepatic injury and serum anti-AMA-M2 antibody production. The dendritic cell subtypes CD11c⁺ and CD123⁺, especially CD123⁺, may play crucial roles in the pathogenesis and progression of hepatic injury.

Key Words: Primary biliary cirrhosis; Dendritic cells; CD11c⁺; CD123⁺

Li YZ, Hu CJ, Tong DW, Zhang SL, Liu DH. Relations of peripheral blood CD11c⁺ and CD123⁺ dendritic cells with hepatic injury in patients with primary biliary cirrhosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(3):341-345

摘要

目的: 检测原发性胆汁性肝硬化(PBC)患者外周血树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺, 探讨其与肝功能损伤及抗线粒体抗体亚型2(AMA-M2)抗体产生的关系。

方法: 流式细胞术检测PBC患者($n = 40$)外周血树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺比例, 以40例肝脏疾病患者作为疾病对照组, 30例健康体检者作为正常对照组, 观察CD11c⁺和CD123⁺树突状细胞与患者的肝功能指标及

■背景资料

近年来由于临床经验的积累和实验室诊断技术的进步, 发现我国人群中自身免疫性肝病患者逐渐增多。研究资料显示PBC患者体内针对丙酮酸脱氢酶复合体的自身反应性T细胞直接与发病机理有关或与最初的异常免疫反应有关, 在这些自身反应性T细胞的活化过程中树突状细胞起了关键作用。近年来的研究表明DC细胞与自身免疫性疾病有重要关系, 在一些自身免疫性疾病中CD11c⁺和CD123⁺亚群有显著的改变。因此检测PBC患者外周血树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺, 可探讨其在PBC发病机制中的可能作用。

■研究前沿

树突状细胞是具有刺激初级免疫反应、调节免疫应答和诱导免疫耐受的专职抗原提呈细胞,对调节T细胞免疫反应有重要作用,它参与抗原的识别、加工处理和提呈,是免疫反应中识别自我和非我的关键环节,其与免疫激活和免疫耐受关系密切,在调控机体细胞免疫和体液免疫方面起着重要作用。近年来对树突状细胞在系统性红斑狼疮、Ⅱ型糖尿病以及自身免疫性肝炎等自身免疫性疾病发病机理中的作用的研究非常热门。本文检测原发性胆汁性肝硬化患者外周血树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺,初步探讨其与肝功能损伤及抗线粒体抗体亚型2抗体产生的关系。

AMA-M2抗体产生的关系。

结果: PBC患者外周血CD11c⁺和CD123⁺比例显著低于正常对照组($0.087\ 2\pm0.008\ 2$ vs $0.169\ 0\pm0.011\ 3$, $P<0.01$; $0.034\ 9\pm0.004\ 9$ vs $0.064\ 3\pm0.005\ 4$, $P<0.01$)。肝功严重损伤的PBC患者外周血CD11c⁺及CD123⁺比例显著低于轻度损伤者($0.071\ 6\pm0.007\ 3$ vs $0.124\ 2\pm0.0094$, $P<0.01$; $0.042\ 6\pm0.005\ 9$ vs $0.061\ 7\pm0.006\ 1$, $P<0.01$)。AMA-M2⁺患者外周血CD11c⁺和CD123⁺比例显著低于AMA-M2⁻患者($0.076\ 1\pm0.005\ 1$ vs $0.096\ 5\pm0.008\ 3$, $P<0.05$; $0.046\ 6\pm0.006\ 9$ vs $0.063\ 1\pm0.005\ 7$, $P<0.05$)。经动态观察发现,同一PBC患者经过治疗后CD11c⁺和CD123⁺比例增加,特别是CD123⁺明显高于治疗前($0.058\ 3\pm0.004\ 9$ vs $0.032\ 1\pm0.004\ 1$, $P<0.01$)。

结论: PBC患者外周血树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺比例与肝功能损伤和血清抗AMA-M2抗体产生有密切关系。CD11c⁺和CD123⁺的变化可能是导致肝功能损伤和病情发展及血清抗AMA-M2抗体产生的环节之一。

关键词: 原发性胆汁性肝硬化; 树突状细胞; CD11c⁺; CD123⁺

李永哲, 胡朝军, 佟大伟, 张蜀澜, 刘定华. 原发性胆汁性肝硬化患者CD11c⁺和CD123⁺树突状细胞与肝功能损伤的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(3):341-345

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/341.asp>

0 引言

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种与自身免疫有关的慢性炎症性肝脏疾病,其发病机制十分复杂。有研究资料显示PBC患者体内针对丙酮酸脱氢酶复合体的自身反应性T细胞直接与发病机理有关或与最初的异常免疫反应有关^[1-2]。在这些自身反应性T细胞的活化过程中树突状细胞(dendritic cells, DC)起了关键作用。树突状细胞是一种具有刺激初级免疫反应、调节免疫应答和诱导免疫耐受的专职抗原提呈细胞,也是唯一能够刺激静息型T细胞活化的细胞,对调节T细胞免疫反应有重要作用。DC参与抗原的识别、加工处理和提呈,是免疫反应中识别自我和非我的关键环节,其与免疫激活和免疫耐受关系密切,在调控机体细胞免疫和体液免疫方面起着重要作用^[3-4]。树突状细胞主要分两群,浆细胞来源的主要表达

CD123⁺,与IL-8的产生密切相关。髓细胞来源的主要表达CD11c⁺,与IL-12及IL-2- α 、IL-1 β 、IL-6和IL-10的产生有关^[5]。近年来的研究表明DC细胞与自身免疫性疾病有重要关系^[6-8],而且在一些自身免疫性疾病中CD11c⁺和CD123⁺亚群有显著的减少^[9]。我们采用流式细胞术检测PBC患者外周血CD4⁺、CD8⁺、NK、树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺细胞群比例,结合患者的肝功能指标及抗AMA-M2抗体进行分析,初步探讨树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺细胞群在PBC发病机制中可能的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 选择2004-12/2005-07北京协和医院住院和门诊PBC患者40例(女性34例,男性6例,年龄34-70岁,平均52岁),所有PBC患者均符合美国肝病学会2000年版PBC诊疗指南^[10]。为了研究所测指标与发病机理的关系,我们选择了AMA-M2⁺者23例,AMA-M2⁻者17例,把患者分为肝功能严重损伤者18例(ALP和GGT两个都 ≥ 1.5 倍正常上限值,ALP正常值 $<1\ 833.7\ \text{ngat/L}$,GGT正常值 $<833.5\ \text{ngat/L}$),肝功能无明显损伤者22例(ALP或GGT <1.5 倍正常上限值);动态观察20例。以40例其他肝脏疾病患者(甲型病毒性肝炎6例,乙型病毒性肝炎12例,丙型病毒性肝炎9,药物性肝炎4例,胆管炎4例,不明原因肝硬化5例)作为疾病对照组,30例性别年龄匹配的健康体检者作为正常对照组。均取2 mL全血,肝素钠抗凝,立即送检。

1.1.2 试剂 流式细胞术所用的抗体为: FITC-CD4/PE-CD8/PerCP-CD3; FITC-CD3/PE-CD16+CD56; FITC- Lin(CD13、CD14、CD15、CD19、CD20和CD56); PerCP-Anti-HLA-DR; PE-CD123(Anti-IL-3R α); PE- CD11c; PE- Mouse IgG2 α ; PE- Mouse IgG1。溶血素为美国BD公司。流式细胞仪为美国贝克曼公司Coulter Epics ELITE Esp。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞术检测细胞表面分子 新鲜肝素钠抗凝外周血100 μL ,加20 μL 相应抗体混匀,室温避光孵育20 min,加2 mL流式细胞仪专用红细胞裂解液,混匀,室温避光孵育10 min,1 200 r/min离心5 min,弃上清液,加2 mL磷酸盐缓冲液,混匀,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,同法洗涤2次,加500 μL 磷酸盐缓冲液,立即上机检测。树

表1 PBC患者与正常人组外周血各类细胞阳性百分率比较 (mean ± SD, %)

组别	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	NK	CD11c ⁺	CD123 ⁺
PBC患者组	4.87 ± 1.30	29.88 ± 1.36	28.77 ± 2.24 ^b	1.52 ± 0.38	13.24 ± 1.54 ^b	0.087 2 ± 0.008 2 ^b	0.034 9 ± 0.004 9 ^b
正常对照组	6.18 ± 0.84	26.75 ± 1.24	23.64 ± 1.42	0.78 ± 0.24	20.69 ± 1.38	0.169 0 ± 0.011 3	0.064 3 ± 0.005 4

^b*P* < 0.01 vs 正常对照组.

表2 PBC组与其他肝脏疾病患者外周血各类细胞阳性百分率比较 (mean ± SD, %)

组别	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	NK	CD11c ⁺	CD123 ⁺
PBC患者组	4.87 ± 1.30	29.88 ± 1.36 ^b	28.77 ± 2.24 ^b	1.52 ± 0.38	13.24 ± 1.54 ^a	0.087 2 ± 0.008 2	0.034 9 ± 0.004 9
其他肝病组	3.37 ± 1.42	21.61 ± 1.48	22.37 ± 1.56	2.12 ± 0.36	16.28 ± 1.64	0.072 6 ± 0.005 3	0.021 8 ± 0.006 4

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 其他肝脏病组.

表3 其他肝脏疾病患者与正常人组外周血各类细胞阳性百分率比较 (mean ± SD, %)

组别	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	NK	CD11c ⁺	CD123 ⁺
其他肝病组	3.37 ± 1.42 ^a	21.61 ± 1.48 ^a	22.37 ± 1.56	2.12 ± 0.36 ^b	16.28 ± 1.64 ^a	0.072 6 ± 0.005 3 ^b	0.021 8 ± 0.006 4 ^b
正常对照组	6.18 ± 0.84	26.75 ± 1.24	23.64 ± 1.42	0.78 ± 0.24	20.69 ± 1.38	0.169 0 ± 0.011 3	0.064 3 ± 0.005 4

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 正常对照组.

突状细胞亚群CD11c⁺、CD123⁺的测定: 每个标本测4管(CD11c⁺、CD11c⁺阴性对照、CD123⁺、CD123⁺阴性对照), 每管加入100 μL全血、20 μL FITC-Lin和20 μL PerCP-Anti-HLA-DR, 然后分别在4管中加入20 μL CD11c⁺、CD11c⁺对照、CD123⁺、CD123⁺对照混匀. 测定时以前向散色光(FSC)和测向散色光(SSC)设定R1排除细胞碎片, 再以Lin-设门R2, 然后分别以G2、G1作为CD11c⁺、CD123⁺阴性对照设门R3, 测定CD11c⁺、CD123⁺时, R3中即为分析的CD11c⁺、CD123⁺树突状细胞亚群.

1.2.2 ELISA法检测血清抗线粒体抗体AMA-M2亚型, 德国欧蒙实验诊断试剂公司.

1.2.3 肝功能指标的检测 采用日本Olympus AU2700全自动生化仪.

统计学处理 PBC患者与其他肝脏疾病对照组及正常组外周血细胞亚群及相关分子的表达水平差异采用Independent-Samples *t* test进行分析. 所有统计学处理均采用SPSS11.0统计软件进行分析.

2 结果

2.1 PBC患者与正常人外周血树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺比例 PBC患者外周血CD11c⁺和CD123⁺比例低于正常对照组, 差异有统计学意义(*P* < 0.01, 表1).

2.2 PBC患者与其他肝脏疾病患者外周血树突状

细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺比例分析 PBC患者外周血CD11c⁺和CD123⁺比例略高于其他肝脏疾病患者, 但差异无统计学意义(*P* > 0.05), CD4⁺和CD8⁺比例高于其他肝脏疾病患者, 差异有统计学意义(*P* < 0.01), NK细胞比例低于其他肝脏疾病患者, 差异有统计学意义(*P* < 0.05, 表2).

2.3 其他肝脏疾病与正常人外周血树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺比例 其他肝脏疾病患者外周血CD11c⁺和CD123⁺比例低于正常对照组, 差异有统计学意义(*P* < 0.01), CD4⁺CD8⁺比例高于其他肝脏疾病患者(*P* < 0.01), CD3⁺CD4⁺CD8⁺和CD4⁺比例低于正常对照组(*P* < 0.05)(表3).

2.4 树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺异常与PBC患者肝功能损伤及AMA-M2抗体产生的关系 进一步的研究结果如表4, 试验发现肝功严重损伤的PBC患者外周血树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺比例显著低于轻度损伤患者(*P* < 0.01). AMA-M2⁺患者外周血CD11c⁺和CD123⁺比例显著低于AMA-M2⁻患者(*P* < 0.05). 经动态观察20例患者(入院时和出院肝功能好转后)发现, 同一PBC患者经过治疗后CD11c⁺和CD123⁺比例增加, 特别是CD123⁺明显高于治疗前(*P* < 0.01).

3 讨论

原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种自身免疫介导的慢性进行性肝病. 近年来由于临床经验的积累和实验室诊断技术的进步, 发现我国人群

■创新点

本文检测了原发性胆汁性肝硬化患者外周血树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺, 阐明了其与肝功能损伤及抗线粒体抗体亚型抗体产生的关系.

■应用要点

本次试验为进一步阐明树突状细胞亚群在PBC发病机制中的作用打下基础。监测PBC患者外周血的树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺有助于了解PBC患者机体的免疫状态。

表4 各类PBC患者外周血CD4⁺、CD8⁺、NK、CD11c⁺、CD123⁺细胞阳性百分率 (mean ± SD, %)

组别	n	CD4 ⁺ CD8 ⁻ T	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	NK	CD11c ⁺	CD123 ⁺
肝功能严重损伤	18	4.63 ± 0.96	32.07 ± 1.42 ^b	30.64 ± 1.96	1.43 ± 0.64	10.43 ± 1.27 ^b	0.071 6 ± 0.007 3 ^b	0.042 6 ± 0.005 9 ^b
肝功能轻度损伤	22	5.79 ± 1.06	23.5 ± 1.31	28.58 ± 1.72	1.73 ± 0.58	21.25 ± 1.75	0.124 2 ± 0.009 4	0.061 7 ± 0.006 1
AMA-M2 ⁻	17	5.60 ± 0.84	27.68 ± 1.09	25.20 ± 1.76 ^a	1.83 ± 0.48	15.57 ± 1.29	0.096 5 ± 0.008 3 ^a	0.063 1 ± 0.005 7 ^a
AMA-M2 ⁺	23	4.53 ± 1.13	31.04 ± 1.27	34.08 ± 1.57	1.28 ± 0.61	12.04 ± 1.09	0.076 1 ± 0.005 1	0.046 6 ± 0.006 9
治疗前	20	3.94 ± 1.02 ^a	33.54 ± 1.41 ^b	32.73 ± 1.39 ^b	1.39 ± 0.59	11.32 ± 1.07 ^a	0.064 3 ± 0.005 3	0.032 1 ± 0.004 1 ^b
治疗后	20	5.43 ± 0.85	24.18 ± 1.11	25.42 ± 1.96	1.96 ± 0.47	19.47 ± 1.22	0.098 4 ± 0.008 5	0.058 3 ± 0.004 9

组内 vs ^aP<0.05; 组内 vs ^bP<0.01.

中PBC患者逐渐增多^[11]。PBC发病机理非常复杂,免疫紊乱发生在多个环节: T 细胞的高度活化增生,大量的自身抗体产生, Th/Ts细胞的比例失调,细胞因子的异常等多个免疫环节。但最根本的环节乃在机体对自身抗原的耐受遭到破坏,或机体免疫系统过度地递呈了某些抗原,从而使童贞T细胞发展为反应性T细胞,导致自身免疫性疾病。在本次试验中我们发现PBC患者体内CD4⁺CD8⁻双阴性T细胞比例明显降低, T细胞大量活化,特别是CD8⁺T细胞群的比例显著增加。而在这些自身反应性T细胞的活化过程中不同的DC细胞群有不同的刺激T细胞的能力^[12]。目前已明确两种不同类型的DC, 浆细胞来源的主要表达CD123⁺, 髓细胞来源的主要表达CD11c⁺^[13]。CD11c⁺活化后分泌大量IL-12及IL-2α、IL-1β、IL-6和IL-10, 驱使Th1分化, 而CD123⁺细胞活化后, 主要分泌大量IL-8, 诱导分化Th2。CD11c⁺、CD123⁺ DC在自身免疫和获得性免疫中起着决定作用, 因此检测血中这些DC细胞亚群的成熟和功能可以很好的反映机体的免疫状态。

本次研究结果表明PBC患者外周血CD11c⁺和CD123⁺细胞比例显著低于正常人, 研究结果与Hiasa *et al*^[14]研究一致。二者的降低必然导致Th1/Th2细胞群的分化比例失调, 从而使CD4⁺/CD8⁺T细胞群的比例严重紊乱, 体液免疫亢进, 产生大量抗AMA-M2抗体和针对丙酮酸脱氢酶复合体的特异性T细胞克隆的形成, 由此参与PBC患者的肝功能损伤及病情的发展。研究还发现AMA-M2⁺组PBC患者外周血树突状细胞亚群CD123⁺比例显著低于AMA-M2⁻组, 由于CD123⁺细胞亚群能诱导Th2细胞分化, 从而产生免疫耐受, 当机体内该群细胞群减少, 必然导致免疫耐受的瓦解, 从而产生大量自身抗体。由于该细胞群的减少, 使体内NK细胞不能很好地活化识别肝细胞内暴露的线粒体自身抗原, 从而导致大量针对该抗原的T细胞克隆形成导致肝功能损伤。在本研究中表现为肝功能严重受损的PBC患

者NK细胞比例显著减低, 而CD8⁺T细胞比例显著增加。对同一PBC患者进行动态观察发现经过治疗后的PBC患者外周血CD11c⁺和CD123⁺细胞比例都有一定上升, 特别是CD123⁺比例升高有统计学意义。同时治疗后NK细胞比例也有了显著升高, CD8⁺T细胞比例却比治疗前显著性降低, 患者的肝功能指标也有了很大改善。因此认为在PBC患者的肝功能损伤及病情发展和抗AMA-M2抗体产生过程中CD11c⁺和CD123⁺的变化可能起着重要作用。

由于PBC患者对自身抗原的耐受遭到破坏,或机体免疫系统过度地递呈了某些抗原, 同时DC1/DC2可以对Th1/Th2应答进行精细调控, Th1/Th2细胞通过其分泌的细胞因子IFN-γ/IL-4作用于DC1/DC2, 影响DC1/DC2的发育及比例, 通过负反馈机制对Th1/Th2平衡进行精细调节, 从而可以使机体内Th1/Th2 细胞处于稳态。因此监测PBC患者外周血的树突状细胞亚群CD11c⁺和CD123⁺有助于了解PBC患者机体的免疫状态。

4 参考文献

- 1 Nishio A, Keefe EB, Gershwin ME. Immunopathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 291-302
- 2 Ishibashi H, Nakamura M, Shimoda S. T cell immunity and primary biliary cirrhosis. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 19-24
- 3 Kita H, Lian ZX, Van de Water J. Identification of HLA-A2-restricted CD8(+) cytotoxic T cell responses in primary biliary cirrhosis: T cell activation is augmented by immune complexes cross-presented by dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195: 113-23
- 4 Akbar SM, Yamamoto K, Miyakawa H. Peripheral blood T-cell responses to pyruvate dehydrogenase complex in primary biliary cirrhosis: role of antigen-presenting dendritic cells. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 639-646
- 5 Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184: 747-752
- 6 Ishikawa S, Sato T, Abe M. Aberrant high expression of B lymphocyte chemokine (BLC/CXCL13) by

- C11b+CD11c⁺ dendritic cells in murine lupus and preferential chemotaxis of B1 cells towards BLC. *J Exp Med* 2001; 193: 1393-1402
- 7 Scheinecker C, Zwolfer B, Koller M. Alterations of dendritic cells in systemic lupus erythematosus: phenotypic and functional deficiencies. *Arthritis Rheum*, 2001; 44: 856-865
- 8 Drakesmith H, Chain B, Beverley P. How can dendritic cells cause autoimmune disease? *Immunol Today* 2000; 21: 214-217
- 9 Hiasa Y, Akbar SM, Abe M. Dendritic cell subtypes in autoimmune liver diseases; decreased expression of HLA DR and CD123 on type 2 dendritic cells. *Hepatol Res* 2002; 22: 241-249
- 10 Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases Practice Guidelines. *Hepatology* 2000; 31: 1005-1013
- 11 张焯, 林进, 唐福林. 原发性胆汁性肝硬化的临床及病理分析. *中华风湿病学杂志* 2001; 5: 98-101
- 12 Osugi Y, Vuckovic S, Hart DN. Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood* 2002; 100: 2858-2866
- 13 Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283: 1183-1186
- 14 Hiasa Y, Akbar SM, Abe M, Michitaka K, Horiike N, Onji M. Dendritic cell subtypes in autoimmune liver diseases; decreased expression of HLA DR and CD123 on type 2 dendritic cells. *Hepatol Res* 2002; 22: 241-249

■同行评价

研究原发性胆汁性肝硬化患者CD11c⁺和CD123⁺树突状细胞及其与肝功能损伤的关系对于临床诊断和治疗有参考价值。

电编 张勇 编辑 张海宁

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

• 消息 •**我国科技论文总数连续三年世界第五**

本刊讯 2004年度中国科技论文统计结果于2005-12-06在北京揭晓,与上一年度相比,我国科技论文SCI论文数增长15.2%,论文被引用篇数和次数分别增长4.4%和4.3%。更可喜的是,在过去十年间,我国论文被引用数已排在世界第14位,与上一年同一数据相比,位次提高了4位,

据介绍,2004年度《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP)共收录我国作者的论文111 356篇,比上年增加93 352篇,增长率为19.3%。我国科技论文占世界论文总数的6.3%,较上年增加1.2%,连续3年保持在世界第5位,前4位国家是美国、日本、英国和德国。根据生物医学专家的建议,今年在统计中新增加了美国《医学索引》(MEDLINE)检索系统,该系统是当今较权威的生物医学文献检索系统,我国大陆75种期刊被收录其中。

2004年度我国国内论文最多的学科仍是临床医学,基础医学名列第六。国内被引用次数最多的学科也是临床医学,基础医学名列第五。国际被引用论文篇数,基础医学与临床医学名列第八和第九。由于综合大学并校,高校论文产出前20位排名榜中已不见了医学院校,但在MEDLINE收录的高等院校排名中,仍可看到医学科技论文对综合大学论文排名的贡献。2004年排在SCI收录论文数第一的医疗机构是北京大学第一医院,解放军总医院在国内论文被引用次数、国内论文数和国际国内论文总数三个统计项目中,均名列医疗机构第一。

在同时公布的第四届中国百种杰出学术期刊中,22种医药卫生类期刊榜上有名。[摘自《健康报》(记者张荔子)]

瑞巴派特对门脉高压性胃病胃黏膜中瘦素表达的影响

徐可树, 李琪, 周霞

■背景资料

国外临床应用显示, 瑞巴派特作为一种黏膜保护剂, 对慢性肝病引起的胃黏膜病变具有一定疗效, 但其机制尚不清楚。瘦素作为一种新的胃肠激素发挥胃黏膜保护作用。我们主要通过观察瑞巴派特对门脉高压性胃病治疗的临床疗效及对胃黏膜中瘦素表达的影响, 从而探讨瑞巴派特对门脉高压性胃病胃黏膜的保护作用机制。

徐可树, 李琪, 周霞, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022

通讯作者: 徐可树, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. xuzou@medmail.com.cn
电话: 027-67119890

收稿日期: 2005-12-08 接受日期: 2005-12-31

Influence of Rebamipide on leptin expression in gastric mucosa with portal hypertensive gastropathy

Ke-Shu Xu, Qi Li, Xia Zhou

Ke-Shu Xu, Qi Li, Xia Zhou, Department of Digestive Disease, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Ke-Shu Xu, Department of Digestive Disease, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. xuzou@medmail.com.cn
Received: 2005-12-08 Accepted: 2005-12-31

Abstract

AIM: To investigate the influence of Rebamipide on the expression of leptin in gastric mucosa with portal hypertensive gastropathy, and to evaluate its role in the prevention of gastric mucosal injury.

METHODS: Thirty healthy subjects and thirty patients were involved in this study. The former were randomized into normal control and normal intervention group, and the latter into blank control and trial group (15 for each). Normal intervention and trial group were treated with Rebamipide. Endoscopy was performed and the level of leptin mRNA expression in gastric mucosa was examined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) before and after the treatment.

RESULTS: At baseline, the expression of leptin mRNA was significantly higher in blank control and trial group than that in normal control group (0.816 ± 0.132 , 0.803 ± 0.143 vs 0.344 ± 0.202 , $P < 0.05$). After 4 wk treatment with Rebamipide, the level of leptin mRNA expression in trial

group was markedly higher than that in blank control and normal intervention group (1.120 ± 0.237 vs 0.867 ± 0.170 , 0.397 ± 0.199 , $P < 0.01$). In the trial group, the endoscopic pathological appearance was alleviated in 12 of 14 patients in comparison with 0 of 12 in the blank control group.

CONCLUSION: Rebamipide may protect gastric mucosa against injury in portal hypertensive gastropathy by increasing the expression of leptin.

Key Words: Rebamipide; Leptin; Portal hypertensive gastropathy

Xu KS, Li Q, Zhou X. Influence of Rebamipide on leptin expression in gastric mucosa with portal hypertensive gastropathy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(3):346-349

摘要

目的: 观察瑞巴派特对门脉高压性胃病胃黏膜中瘦素表达的影响, 评价其对门脉高压性胃病的胃黏膜保护作用。

方法: 将患者随机分为正常对照组、正常干预组、空白对照组及试验组各15例, 其中正常干预组及试验组给予口服瑞巴派特治疗。治疗前后内镜检查对比, 用RT-PCR法分别检测治疗前后胃黏膜组织中瘦素mRNA的表达水平。

结果: 0 wk时, 正常对照组瘦素mRNA表达量为 0.344 ± 0.202 , 空白对照组 0.816 ± 0.132 , 实验组 0.803 ± 0.143 , 与正常对照组相比, 空白对照组与实验组的瘦素mRNA的表达有差异($P < 0.05$); 4 wk时, 空白对照组瘦素mRNA表达量为 0.867 ± 0.170 , 试验组为 1.120 ± 0.237 , 正常干预组为 0.397 ± 0.199 , 与空白对照组相比, 试验组瘦素mRNA的表达增多; 与正常干预组相比, 试验组在治疗后其瘦素mRNA的表达显著升高($P < 0.01$)。内镜检查前后对比: 药物治疗4 wk时试验组14例中胃黏膜的内镜表现不同程度改善12例(12/14), 而空白对照组无一例改善。

结论: 瑞巴派特可通过增加胃黏膜中的瘦素表达, 对门脉高压性胃病的胃黏膜起保护作用。

关键词: 瑞巴派特; 瘦素; 门脉高压性胃病

徐可树, 李琪, 周震. 瑞巴派特对门脉高压性胃病胃黏膜中瘦素表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(3):346-349
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/346.asp>

0 引言

门脉高压性胃病是肝硬化门脉高压的重要并发症, 也是并发上消化道出血的常见原因之一, 国外有文献报道门脉高压所致胃黏膜病变达4%-8%^[1], 国内有资料显示, 68.6%的肝硬化门脉高压患者有胃黏膜改变^[2]. 其发病机制复杂, 其中胃黏膜防御能力下降是一重要因素^[3]. 关于胃黏膜保护治疗在门脉高压性胃病中应用的文献尚不多见. 瑞巴派特是一种胃黏膜保护剂, 国外临床应用显示其对慢性肝病引起的胃黏膜病变也有一定疗效, 但机制尚不清楚. 近来研究表明瘦素对胃黏膜具有保护作用, 我们主要通过观察瑞巴派特对门脉高压性胃病治疗的临床疗效及对胃黏膜中瘦素表达的影响, 从而探讨瑞巴派特对门脉高压性胃病胃黏膜的保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 60例患者: 年龄18-75岁, 性别及住院或门诊病例不限; 肝硬化患者内镜证实有胃黏膜充血、水肿、糜烂等门脉高压性胃病; 就诊前2 wk内未行抗*H. pylori*治疗; 同意参加本试验. 患者被随机分为4组: 正常对照组、正常干预组、空白对照组及试验组各15例. 正常对照组与正常干预组均为正常健康人, 前者不服用任何药物而后者服用瑞巴派特; 空白对照组及试验组均为门脉高压性胃病患者, 前者不服用药物而后者服用瑞巴派特. 各组均不得合并应用质子泵抑制剂、H₂受体拮抗剂、生长抑素及其衍生物以及其他胃黏膜保护剂. 病例入选后, 对其症状、内镜情况进行记录, 同时在胃黏膜病变处或其周围2 cm取活检3块. 然后予患者服用瑞巴派特(商品名: 膜固思达, 由日本大冢中国天津有限公司提供), 服用方法为300 mg/d, 分三次服用, 疗程4 wk. 4 wk后进行复查, 操作同前。

1.2 方法

1.2.1 门脉高压性胃病内镜判断标准 参考McCormack *et al*^[4]的分类标准, 轻度: (1)黏膜出

现淡红色细斑点或猩红热样疹; (2)黏膜皱襞表面呈条索状发红; (3)黏膜呈mosaic样改变. 重度: 散在的樱桃红斑点及(或)弥漫性出血性病变。

1.2.2 胃黏膜病变改善, 分3级 好转: 胃黏膜皱襞红肿渗出灶完全消失; 改善: 局限于胃窦、体或底部一个区域的胃黏膜皱襞轻度细微红色样斑点灶, 无剥脱感; 无效: 胃黏膜仍无明显变化。

1.2.3 RT-PCR法检测瑞巴派特治疗前后胃黏膜组织中瘦素mRNA表达 按Trizol说明书操作提取胃组织总RNA, 将RNA用MMLV逆转录酶合成cDNA, 在25 μL反应体系中分别加入8.3 × 10⁷ nkat/L的LA Taq酶0.5 μL, 10×缓冲液2.5 μL, 4×dNTP混合物(各10 mmol/L)1 μL, 模板DNA 2 μL, MgCl₂(25 mmol/L)2.0 μL, 灭菌双蒸水16.4 μL. 瘦素特异性引物(上海博亚公司合成)各0.3 μL, 上游引物为5'-TTG TTG GGG CAG TGG TAAG-3', 下游引物为5'-AGC AGG ATG GTG GCA GAC-3', PCR反应条件: 94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 50℃退火30 s, 72℃延伸45 s, 最后72℃延伸5 min, 共35个循环. 扩增片段为431 bp, β-actin作内参照, PCR产物4 μL经1.5 g/L琼脂糖凝胶电泳检测, 以瘦素/β-actin条带的灰度比值进行半定量分析。

统计学处理 各组间数据采用χ²检验与*t*检验。

2 结果

在60例受试者中, 共有54(90%)例患者完成试验, 脱落原因为患者未按期复诊. 其中试验组14例, 空白对照组12例, 正常对照组14例, 正常干预组14例. 试验组中, 男9例, 女5例, 年龄25-65岁, 平均39.8岁; 空白对照组中, 男8例, 女4例, 年龄23-62岁, 平均41.1岁; 正常对照组中, 男8例, 女6例, 年龄17-60岁, 平均40.9岁; 正常干预组中, 男9例, 女5例, 年龄18-61岁, 平均40.2岁. 经统计学处理, 四组在性别、年龄上均无统计学差异(*P*>0.05)。

RT-PCR法检测瑞巴派特治疗前后胃黏膜组织中瘦素mRNA表达, 四组中瘦素mRNA表达情况见图1: 瘦素mRNA的长度为431 bp, β-actin的长度为194 bp. RT-PCR法半定量分析结果见表1: 0 wk时, 空白对照组及实验组与正常对照组相比, 瘦素mRNA的表达有显著性差异(*P*<0.05); 4 wk时, 试验组与正常干预组相比, 瘦素mRNA的表达有显著性差异(*P*<0.01); 试验组与空白对照组相比, 瘦素mRNA的表达有显著性差异(*P*<0.05); 试验组在治疗前后, 其瘦素mRNA的表

■研发前沿

瘦素与胃组织生理功能及胃疾患有着密切关系, 瘦素具有加速溃疡愈合, 促进损伤胃黏膜修复的作用, 但在门脉高压性胃病中瑞巴派特与胃黏膜瘦素之间的关系目前未见报道。

■创新盘点

瑞巴派特治疗门脉高压性胃病患者后, 其病变部位的瘦素表达升高, 因此推测瑞巴派特可能通过增加病变局部胃组织中的瘦素表达来发挥胃黏膜保护作用。

■应用要点

瑞巴派特是一种胃黏膜保护剂,国外临床应用显示其对慢性肝病引起的胃黏膜病变也有一定疗效。我们通过研究瑞巴派特对门脉高压性胃病胃黏膜瘦素表达的影响,探讨其对门脉高压性胃病胃黏膜的保护作用机制,为瑞巴派特在门脉高压性胃病中的临床应用提供实验依据。

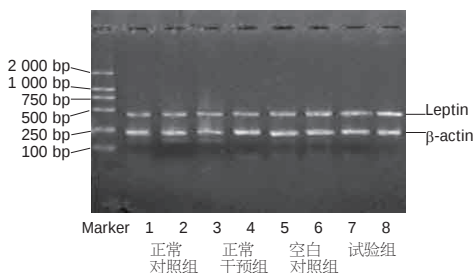


图1 RT-PCR法检测瑞巴派特治疗前后胃黏膜组织中瘦素mRNA表达。1, 3, 5, 7: 各组0 wk时瘦素mRNA表达; 2, 4, 6, 8: 各组4 wk时瘦素mRNA表达。

表1 RT-PCR法半定量分析

组别	n	瘦素mRNA	
		0 wk	4 wk
正常对照组	14	0.344 ± 0.202	0.376 ± 0.158
正常干预组	14	0.381 ± 0.200	0.397 ± 0.199
空白对照组	12	0.816 ± 0.132 ^a	0.867 ± 0.170
试验组	14	0.803 ± 0.143 ^a	1.120 ± 0.237 ^{b,c,d}

^a $P < 0.05$ vs 实验组, 正常对照组; ^b $P < 0.01$ vs 正常干预组;

^c $P < 0.05$ vs 空白对照组; ^d $P < 0.01$ vs 0 wk。

表2 瑞巴派特治疗后门脉高压性胃病胃黏膜改变

	n	胃黏膜改变		
		好转	改善	无效
试验组	14	3 ^a	9 ^a	2
空白对照组	12	0	0	12

^a $P < 0.05$ vs 空白对照组。

达有显著性差异($P < 0.01$)。

胃镜结果试验组与空白对照组胃黏膜改变情况见表2。胃镜表现: 试验组治疗前胃窦和/或胃体水肿糜烂, 甚至呈mosaic样改变, 药物治疗4 wk后胃镜下所见上述表现明显减轻或改善。

3 讨论

糜烂、充血和出血是门脉高压性胃病的常见表现, 其发病机制尚不完全清楚, 研究表明与以下因素有关: 胃部静脉向门静脉回流受阻, 造成胃部淤血并引起胃黏膜抵御有害因子攻击的能力降低, 易导致继发损伤^[5]; 多种血管活性物质增加, 包括一氧化氮、胰高血糖素、前列环素、血管活性肽、五羟色胺、组胺、血浆内皮素、肿瘤坏死因子和胃泌素等等; 肝硬变患者因肝脏功能的损害, 合成前列腺素PGE2减少, 胃黏膜防御能力降低、内毒素血症和H⁺反渗透增加^[3],

使胃黏膜易受损害。

瑞巴派特是一种胃黏膜保护剂, 研究表明瑞巴派特通过刺激胃黏膜内源性前列腺素合成^[6]、增加胃黏液糖蛋白复合物和促进损伤部位单层上皮细胞增殖; 此外能抑制*H. pylori*诱导的中性粒细胞激活, 抑制、清除胃部自由基, 从而明显改善胃黏膜损伤, 起保护胃黏膜作用^[7,8]。多年临床已证实瑞巴派特对胃溃疡、急、慢性胃炎的胃黏膜病变均有较好的疗效, 对慢性肝病引起的胃黏膜病变也有一定作用^[9-11]。我们观察了瑞巴派特对门脉高压性胃病患者内镜改善情况。用药4 wk后, 比较各组治疗前后的胃镜表现可见实验组治疗后胃黏膜的损伤情况有所减轻, 因此瑞巴派特在一定程度上也可改善门脉高压性胃病患者的胃黏膜变化, 但对正常健康人不产生作用。

瘦素是肥胖基因编码主要由脂肪细胞合成的一种多肽类激素。研究表明, 胃黏膜也可分泌瘦素, 且表达瘦素受体。瘦素存在于胃黏膜的壁细胞、主细胞和基底部内分泌细胞内, 对胃黏膜具有保护作用^[12-14]。瘦素具有拟促上皮生长因子的作用, 同时可增加黏膜血流量^[15]、促进毛细血管形成。有学者通过大鼠模型研究证实, 瘦素mRNA及蛋白质的表达水平在酒精等诱发的急性胃黏膜损害区明显增高, 而在未受累的黏膜区无明显改变^[16]。我们对胃黏膜组织中瘦素mRNA表达水平的检测发现, 0 wk时, 空白对照组及实验组瘦素mRNA的表达比正常对照组高; 用药4 wk时, 试验组瘦素mRNA比空白对照组高; 试验组在治疗前后, 其瘦素mRNA的表达明显升高。门脉高压性胃病患者胃黏膜病变部位的瘦素mRNA表达较正常健康人高, 这可能是胃黏膜组织为抵抗外来胃黏膜损伤因素而产生的一种代偿性反应。瑞巴派特治疗门脉高压性胃病患者后, 其病变部位的瘦素mRNA表达进一步升高, 推测瑞巴派特对胃黏膜保护作用可能还通过增加病变局部胃组织中的瘦素表达来发挥作用, 对比显示对正常胃组织则无此作用。至于瑞巴派特是通过何种途径促使病变局部胃组织中的瘦素表达增加, 则有待于进一步研究。

4 参考文献

- Burak KW, Lee SS, Beck PL. Portal hypertensive gastropathy and gastric antral vascular ectasia (GAVE) syndrome. *Gut* 2001; 49: 866-872
- 金瑞, 武聚山, 吕福靖, 丁惠国, 张斌. 慢性重型肝炎伴胃黏膜病变及门脉高压性胃病的研究. *中国实用内科杂志* 2003; 23: 98-99

- 3 邱香, 李传凤, 朴云峰. 门脉高压性胃病发病机制的研究进展. 临床肝胆病杂志 2004; 20: 123-124
- 4 McCormack TT, Sims J, Eyre-Brook I, Kennedy H, Goepel J, Johnson AG, Triger DR. Gastric lesions in portal hypertension: inflammatory gastritis or congestive gastropathy? *Gut* 1985; 26: 1226-1232
- 5 Ohta M, Yamaguchi S, Gotoh N, Tomikawa M. Pathogenesis of portal hypertensive gastropathy: a clinical and experimental review. *Surgery* 2002; 131: S165-S170
- 6 Arakawa T, Watanabe T, Fukuda T, Yamasaki K, Kobayashi K. Rebamipide, novel prostaglandin-inducer accelerates healing and reduces relapse of acetic acid-induced rat gastric ulcer. Comparison with cimetidine. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2469-2472
- 7 Arakawa T, Kobayashi K, Yoshikawa T, Tarnawski A. Rebamipide: overview of its mechanisms of action and efficacy in mucosal protection and ulcer healing. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 55-135
- 8 Yoshida N, Yoshikawa T, Inuma S, Arai M, Takenaka S, Sakamoto K, Miyajima T, Nakamura Y, Yagi N, Naito Y, Mukai F, Kondo M. Rebamipide protects against activation of neutrophils by *Helicobacter pylori*. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 1139-1144
- 9 Hayashi S, Sugiyama T, Amano K, Isogai H, Isogai E, Aihara M, Kikuchi M, Asaka M, Yokota K, Oguma K, Fujii N, Hirai Y. Effect of rebamipide, a novel antiulcer agent, on *Helicobacter pylori* adhesion to gastric epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1895-1899
- 10 Ogino K, Hobara T, Ishiyama H, Yamasaki K, Kobayashi H, Izumi Y, Oka S. Antiulcer mechanism of action of rebamipide, a novel antiulcer compo-und, on diethyldithiocarbamate-induced antral gastric ulcers in rats. *Eur J Pharmacol* 1992; 212: 9-13
- 11 Nebiki H, Higuchi K, Arakawa T, Ando K, Uchida T, Ito H, Harihara S, Kuroki T, Kobayashi K. Effect of rebamipide on *Helicobacter pylori* infection in patients with peptic ulcer. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 2035-2065
- 12 姚红, 郝素珍, 原素梅, 崔雪萍, 刘俊. 胃黏膜瘦素和瘦素受体的表达及信号转导. 山西医科大学学报 2004; 35: 122-125
- 13 Konturek PC, Brzozowski T, Sulekova Z, Brzozowska I, Duda A, Meixner H, Hahn EG, Konturek SJ. Role of leptin in ulcer healing. *Eur J Pharmacol* 2001; 414: 87-97
- 14 Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998; 394: 790-793
- 15 Erkasap N, Uzuner K, Serteser M, Koken T, Aydin Y. Gastroprotective effect of leptin on gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion is related to gastric histamine content in rats. *Peptides* 2003; 24: 1181-1187
- 16 Konturek PC, Brzozowski T, Sulekova Z, Meixner H, Hahn EG, Konturek SJ. Enhanced expression of leptin following acute gastric injury in rat. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50: 587-595

■同行评价

瑞巴派特是一种胃黏膜保护剂, 对任何原因所致胃炎、胃溃疡和应激性反应性损伤等均具保护作用。然而对门脉高压性胃病患者是否有作用及其与瘦素关系, 文献中尚无相关报道, 因此, 研究结论具有进一步研究和临床参考价值。

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

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

● 消息 ●

国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会 暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行。

在各方面的大力支持下, 国际肝胆胰协会中国分会第一届学术研讨会已于2004-12在武汉成功举办, 与会代表一千余人, 中国人大副委员长吴阶平院士、国际肝胆胰前主席刘允怡教授、Jim Tooli教授, 国际肝胆胰协会候任主席Büechler教授和欧洲肝胆胰协会主席Broelsch教授等亲自到会。会议受到国内外专家及到会代表的一致赞赏, 并受到国际肝胆胰协会的通报好评, 会议取得巨大成功。

第二届会议将邀请国外和国内著名专家做专题讲座, 针对国际国内肝胆胰外科进展及近年来的热点、难点问题进行讨论; 并交流诊治经验, 推广新理论、新技术、新方法, 了解国内外肝胆胰疾病诊断、治疗发展趋势; 同时放映手术录像。大会热烈欢迎全国各地肝胆胰领域的内科、外科、影像科各级医师以及科研人员积极投稿和报名参加。

会议同时召开第三届全国普外科主任论坛, 因此也欢迎从事医疗卫生管理的各级医院正、副院长及正、副主任积极投稿和报名参加。

本次会议已列入2006年国家继续医学教育项目, 参会代表均授予国家级继续医学教育学分10分。

来稿要求: 寄全文及500-800字论文摘要, 同时寄论文的软盘一份或发电子邮件。以附件的形式发送至 chenxp@medmail.com.cn, 也可将稿件打印后寄至: 武汉市解放大道1095号, 武汉华中科技大学附属同济医院肝胆胰外科研究所张志伟、黄志勇副教授(收), 邮编: 430030; 联系电话: 027-83662599。

功能性消化不良患者的胃排空和胃内食物分布

唐海英, 王英德, 张延军, 解静慧

■背景资料

功能性消化不良是一种十分常见的临床病症, 据国内统计约占胃肠专科门诊的1/3以上, 西方的统计资料表明FD的发病率高达20%-40%, 由于FD发病率高, 治疗效果差, 因而对其病因及发病机理的深入探讨成为当今国内外学者的又一研究热点。

唐海英, 王英德, 大连医科大学第一临床学院消化内科 辽宁省大连市 116011

张延军, 解静慧, 大连医科大学第一临床学院核医学科 辽宁省大连市 116011

电话: 0411-83635963-3163或2173

通讯作者: 唐海英, 116011, 辽宁省大连市西岗区中山路222号, 大连医科大学第一临床学院消化内科, dltanghaiying@sina.com

收稿日期: 2005-11-30 接受日期: 2005-12-31

Gastric emptying and intragastric food distribution in patients with functional dyspepsia

Hai-Ying Tang, Ying-De Wang, Yan-Jun Zhang, Jing-Hui Xie

Hai-Ying Tang, Ying-De Wang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Yan-Jun Zhang, Jing-Hui Xie, Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China

Correspondence to: Hai-Ying Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, 222 Zhongshan Road, Xigang District, Dalian 116011, Liaoning Province, China. dltanghaiying@sina.com

Received: 2005-11-30 Accepted: 2005-12-31

Abstract

AIM: To assess gastric emptying and intragastric distribution of food in functional dyspepsia (FD) patients, and to investigate the relationship between dysmotility and severity of symptoms.

METHODS: A standardized scintigraphic examination was performed on 60 FD patients and 27 healthy controls. Seven kinds of upper gastrointestinal symptoms were investigated using a standardized questionnaire and a score (from 0 to 3) was assigned according to the frequency and severity of symptoms.

RESULTS: In comparison with controls, 23(38%) patients had abnormal gastric emptying. The number of patients with abnormal scintigraphic patterns increased to 40 (67%) when intragastric food distribution parameters were considered. Proximal gastric half-emptying time of solid and liquid was significantly

delayed in patients with FD. Maximal solid fraction of the distal stomach was significantly increased, and the time of maximal fraction of the distal stomach was significantly delayed in FD patients. In contrast, maximal liquid fraction of the distal stomach was the same in patients as that in controls. The symptom scores were not different between the patients with normal and delayed gastric emptying, but the scores of nausea and early satiety were significantly different between the patients with normal and abnormal intragastric food distribution (nausea: 38.6 ± 3.1 vs 57.1 ± 4.5 , $P < 0.05$; early satiety: 40.1 ± 2.4 vs 54.5 ± 3.3 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Delayed gastric emptying and/or abnormal intragastric distribution exist in some patients with FD, and abnormal intragastric food distribution, but not delayed gastric emptying is associated with some upper gastrointestinal symptoms.

Key Words: Functional dyspepsia; Gastric emptying; Scintigraphy

Tang HY, Wang YD, Zhang YJ, Xie JH. Gastric emptying and intragastric food distribution in patients with functional dyspepsia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(3):350-353

摘要

目的: 探讨功能性消化不良(FD)患者的胃排空、胃内食物分布情况及其与消化不良症状之间的关系。

方法: 采用双核素标记试餐SPECT检测FD患者和正常对照组(HC)胃排空功能及胃内食物分布情况, 并对60例FD患者的症状进行分级评分。

结果: 23例(38%)FD患者的固体及液体排空时间同时延迟, 40例(67%)FD患者至少存在一项胃内固体食物分布参数异常, 液体食物近端胃半排空时间较对照组延长, 而在远端胃内的分布两组十分相似。胃排空正常和延迟的FD两组之间各症状积分相似, 而在餐后胃内食物分布异常的FD组, 恶心和早饱

两种症状积分明显高于胃内食物分布正常的FD组。

结论: 部分FD患者存在胃排空和/或胃内食物分布异常, 其中胃内食物分布异常与消化不良症状的严重程度之间存在一定的关系。

关键词: 功能性消化不良; 胃排空; 核素显像

唐海英, 王英德, 张延军, 解静慧. 功能性消化不良患者的胃排空和胃内食物分布. 世界华人消化杂志 2006;14(3):350-353
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/350.asp>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是指具有慢性或反复上腹部症状而胃镜检查无器质性病变且病因和发病机制尚未完全阐明的一种临床病症^[1]; 目前研究表明: 胃肠运动功能障碍^[2-6]是FD发病的重要机制, 本文应用核素法来测定FD患者的胃排空和餐后食物分布情况, 并进一步探索胃运动功能障碍与消化不良患者症状之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 研究组选择按罗马标准^[1]诊断的FD患者60例: 男23例、女37例, 平均年龄 42.3 ± 13.0 岁; 正常对照组(HC)27例, 男9例, 女18例, 平均年龄 40.1 ± 10.5 岁, 均无烟酒嗜好, 无消化道症状, 无系统性疾病及长期服药史; 两组的年龄和性别分布无显著差异($P > 0.05$)。

1.2 方法 采用^{99m}Tc-E₂C和¹³¹I-邻碘马尿酸记的固-液体试餐, 参照国内学者高再荣 *et al*^[7]的研究方法进行, 具体方法是: 受检者禁食12 h后进行相同条件下胃的双核素显像, 采用感兴趣区(ROI)技术, 将胃区划分为全胃、近端胃和远端胃(在胃小弯最低点划一水平线作为分界线); 从各区内获得各个时间点的相应放射性计数, 经衰变校正后计算以下指标: (1)固体延迟排空时间(Tlag); (2)全胃半排空时间($T_{1/2}$); (3)120 min全胃剩余率(R_{120}); (4)近端胃半排空时间($pT_{1/2}$); (5)远端胃内最大计数(AMF); (6)远端胃内固体达到最大计数时间(Tm)。在SPECT检测日按统一标准询问FD患者常见的各项消化不良症状并进行分级评分, 包括: 腹胀、早饱、恶心、返酸、上腹不适、上腹痛、嗝气。0分=无症状; 1分=有时有症状, 但不常引起注意; 2分=经常有症状, 轻度影响日常生活; 3分=症状持续存在, 明显影响

日常生活, 并按照 $T_{1/2}$ 及AMF的测定结果将FD组分为胃排空正常组和延迟组、餐后胃内食物分布正常组和异常组, 分别比较两组之间的各症状积分有无差别。

统计学处理 采用 t 检验、单因素方差分析和相关分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 全胃排空情况 以对照组的 $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ 作为正常值范围, 有23例(38%)FD患者的固体及液体排空同时延迟, 无一例出现单一固体或液体排空延迟, 表现为固体Tlag延迟, 固、液体的 $T_{1/2}$ 延长, R_{120} 增加。两均数比较的 t 检验发现固体及液体食物全胃排空参数(Tlag、 $T_{1/2}$ 、 R_{120})均有显著差别(均 $P < 0.05$)。FD组和正常对照组全胃排空情况(表1)。

2.2 胃内食物分布情况 FD患者的近端胃固、液体半排时间较对照组明显延迟($P < 0.05$), 并且这种延迟与全胃半排时间延迟具有高度相关性($P < 0.05$); 远端胃内固体最大计数FD组较对照组明显增加, 达最大计数时间亦明显延长(均 $P < 0.05$); 以对照组的 $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ 作为正常值范围, 有40例(67%)FD患者的远端胃内固体最大计数增加, 其中18例为胃排空延迟者, 22例为胃排空正常者; 有32例(53%)患者存在远端胃内固体达最大计数时间的延长, 其中15例为胃排空延迟者, 17例为胃排空正常者。进食后液体在远端胃内的分布情况FD组与对照组十分相似, 远端胃内液体最大计数及达最大计数时间FD组略高于对照组, 但无统计学差别($P > 0.05$)。FD组和正常对照组餐后胃内食物分布情况(表2)。

2.3 胃排空正常的FD组和胃排空延迟的FD组,应用单因素方差分析显示两组之间各症状积分并无统计学差别($P > 0.05$), 而在餐后胃内食物分布异常的FD组, 恶心和早饱两种症状积分明显高于胃内食物分布正常的FD组($P < 0.05$), 但其他各症状积分两组之间无统计学差别($P > 0.05$)。FD各组患者的症状积分(表3, 表4)。

3 讨论

FD是一种由腹痛、腹胀、早饱、嗝气、恶心等一系列上消化道症状组成的异质性综合征, 很难找到其确切的病因, 因此临床治疗也颇为困难。胃动力障碍被认为是FD的主要病理生理过程, 许多学者应用核素法、超声法、不透X线标

■ 研发前沿

随着胃肠动力学的发展和胃肠动力检测手段的改进, FD患者胃肠运动功能的研究愈来愈引起国内外学者的广泛注意。应用核素法进行胃动力功能检查是无创性的检查, 其结果准确、可靠、重复性强, 符合胃的生理状态, 至今仍被认为是胃排空检查的“金标准”。

■创新盘点

本研究根据全胃半排空时间($T_{1/2}$)和远端胃内最大计数(AMF)对FD患者进行分组,分别将两组的症状积分进行统计学分析,以此来探讨消化不良症状与胃动力异常的关系。

表1 FD组和对照组全胃排空情况

	固体		液体		
	Tlag (min)	$T_{1/2}$ (min)	R_{120} (%)	$T_{1/2}$	R_{120} (%)
对照组	2.5 ± 1.7	47.6 ± 12.0	13.0 ± 4.2	22.7 ± 4.8	7.4 ± 3.4
患者组	8.0 ± 5.2^a	75.0 ± 18.3^a	26.1 ± 11.8^a	41.1 ± 14.5^a	15.3 ± 7.1^a

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

表2 FD组和对照组胃内食物分布情况

	固体		液体		
	$pT_{1/2}$ (min)	AMF (%)	Tm (min)	$pT_{1/2}$ (min)	AMF (%)
对照组	24.2 ± 7.5	26.2 ± 4.0	10.0 ± 3.3	13.9 ± 4.3	36.0 ± 6.7
患者组	34.9 ± 15.9^a	36.2 ± 13.3^a	40.5 ± 19.4^a	30.1 ± 14.5^a	37.0 ± 11.0

^a $P < 0.05$ vs 对照组。

表3 胃排空延迟和正常的FD组患者症状积分

	腹胀	早饱	恶心	返酸	上腹不适	上腹痛	暖气
正常组	30.0 ± 2.1	44.1 ± 2.8	36.5 ± 2.9	22.1 ± 2.2	36.8 ± 2.3	27.6 ± 1.5	30.5 ± 2.8
延迟组	35.2 ± 2.8	43.2 ± 3.1	38.9 ± 3.2	25.3 ± 1.9	35.6 ± 1.9	29.5 ± 1.7	28.2 ± 1.6

单因素方差分析显示两组之间各症状积分无统计学差别 ($P > 0.05$)。

表4 餐后胃内食物分布异常和正常的FD组患者症状积分

	腹胀	早饱	恶心	返酸	上腹不适	上腹痛	暖气
正常组	33.8 ± 1.5	40.1 ± 2.4	38.6 ± 3.1	18.1 ± 0.9	38.6 ± 2.5	28.3 ± 1.7	35.3 ± 2.0
异常组	40.3 ± 2.0	54.5 ± 3.3^a	57.1 ± 4.5^a	23.1 ± 1.8	40.5 ± 2.1	24.6 ± 1.3	38.2 ± 2.5

^a $P < 0.05$ vs 胃内食物分布正常组。

志物法等测定胃的排空,设有对照组的研究已显示,FD患者有胃排空减慢,表现为固体、液体或固液混合餐的排空延迟;由于病例选择和检测的方法的不同,胃排空异常在FD患者中的发生率为24%^[8]-78%^[9];本组60例FD患者中,23例(38%)患者存在胃排空障碍,与文献报道相一致^[2,3,5,10]。尽管部分FD患者存在胃排空障碍,但目前大部分的研究^[5,8,11]表明FD患者胃排空障碍与症状及症状的严重程度间并无明显相关性,我们的研究发现,在胃排空正常和延迟的两组FD患者中,腹胀、早饱等7项消化不良症状的积分并无明显的差别,也说明胃排空障碍与各种消化不良症状之间无明显的关系,然而对于胃排空时间正常的FD患者应用促动力药物治疗仍然有效改善症状,说明FD患者可能还同时存在其他形式的胃动力障碍^[12]。

国内学者王承党 *et al*^[13]研究17例健康志愿

者后发现餐后食物在胃内重新分布,近远端胃在这种重分布中起着不同的作用。我们发现FD患者固体食物近端胃排空慢于对照组,比对照组有更多的食物滞留于胃的远端,这种胃内食物分布模式的改变可能与近端胃的容纳功能减退^[12,14]及胃底和胃窦的不协调运动有关^[15,16]。液体食物的排空是由近端胃决定的,我们的研究也发现液体食物在近端胃排空明显慢于对照组,而且这与全胃液体排空延迟高度相关,液体食物在远端胃内的分布和对照组十分相似,与文献报道一致。已有研究证实^[4,5]这种食物分布异常与消化不良症状相关,我们研究发现,早饱和恶心这两种上消化道症状的积分在胃内食物分布异常的FD组明显高于胃内食物分布正常组,从而我们推测胃内食物分布异常可能是一部分FD患者产生消化不良症状的原因。

总之,FD患者存在胃动力功能障碍,胃内食

物分布异常是FD患者胃动力障碍的另一个重要表现, 其与消化不良症状的严重程度之间存在一定的关系, 至于FD患者餐后胃内食物异常分布的原因有待于进一步的研究。

4 参考文献

- 1 Talley NJ, Stanghellini V, Heading RC, Koch KL, Malagelada JR, Tytgat GN. Functional gastroduodenal disorders. *Gut* 1999; 45: II37-II42
- 2 唐红卫, 黄裕新, 徐海峰, 高巍, 周润锁, 尚磊, 王庆莉, 高峰, 安晓丽. 功能性消化不良患者症状分型、胃排空功能、胃肠激素水平的相关性. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1715-1719
- 3 Aoki S, Haruma K, Kusunoki H, Hata J, Hara M, Yoshida S, Tanaka S, Chayama K. Evaluation of gastric emptying measured with the ¹³C-octanoic acid breath test in patients with functional dyspepsia: comparison with ultrasonography. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 662-666
- 4 Piessevaux H, Tack J, Walrand S, Pauwels S, Geubel A. Intra-gastric distribution of a standardized meal in health and functional dyspepsia: correlation with specific symptoms. *Neurogastroenterol Motil* 2003; 15: 447-455
- 5 Lorenzo M, Bucci AM, Catalano F, Muratore LA, Blasi A, Brogna A. Pattern of gastric emptying in functional dyspepsia. An ultrasonographic study. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 404-407
- 6 Lorena SL, Tinois E, Brunetto SQ, Camargo EE, Mesquita MA. Gastric emptying and intra-gastric distribution of a solid meal in functional dyspepsia: influence of gender and anxiety. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 230-236
- 7 高再荣, 张永学, 詹浩, 熊洁, 胡佳, 侯晓华. 双核素试餐对非溃疡性消化不良患者胃肠运动功能的研究. *中华核医学杂志* 1997; 17: 174-175
- 8 Talley NJ, Verlinden M, Jones M. Can symptoms discriminate among those with delayed or normal gastric emptying in dysmotility-like dyspepsia? *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1422-1428
- 9 Caballero-Plasencia AM, Muros-Navarro MC, Martin-Ruiz JL, Valenzuela-Barranco M, de los Reyes-Garcia MC, Casado-Caballero FJ, Rodriguez-Tellez M, Lopez-Manas JG. Dyspeptic symptoms and gastric emptying of solids in patients with functional dyspepsia. Role of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol* 1995; 30: 745-751
- 10 Pfaffenbach B, Adamek RJ, Bartholomaeus C, Wegener M. Gastric dysrhythmias and delayed gastric emptying in patients with functional dyspepsia. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 2094-2099
- 11 王承党, 莫剑忠, 张德中, 王少先, 张开光, 萧树东, 江绍基. 功能性消化不良患者胃排空功能与症状的相关性研究. *新消化病学杂志* 1996; 4: 637-639
- 12 Bredenoord AJ, Chial HJ, Camilleri M, Mullan BP, Murray JA. Gastric accommodation and emptying in evaluation of patients with upper gastrointestinal symptoms. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1: 264-272
- 13 王承党, 莫剑忠, 萧树东. 近远端胃在食物排空和胃内重分布的作用. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 564-566
- 14 Hou XH, Li Q, Zhu L, Xie X, Chen JD. Correlation of gastric liquid emptying with various thresholds of sensation in healthy controls and patients with functional dyspepsia. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 188-195
- 15 Suzuki T, Yamamoto Y, Abe K, Hirano M, Oka H. Sulfamethizole capsules containing contrast medium for assessment of gastric emptying in functional dyspepsia patients. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1741-1746
- 16 Caldarella MP, Azpiroz F, Malagelada JR. Antro-fundic dysfunctions in functional dyspepsia. *Gastroenterology*
- 17 Scott AM, Kellow JE, Shuter B, Cowan H, Corbett AM, Riley JW, Lunzer MR, Eckstein RP, Hoschl R, Lam SK. Intra-gastric distribution and gastric emptying of solids and liquids in functional dyspepsia. Lack of influence of symptom subgroups and *H. pylori*-associated gastritis. *Dig Dis Sci* 1993; 38: 2247-54

■应用要点

FD患者消化不良症状明显, 严重影响其生活质量, 对FD患者进一步行胃排空和食物分布检测, 有利于明确胃动力情况, 为治疗提供可靠依据和有效的指导。

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

乙肝病毒外膜大蛋白检测对于判定HBV DNA复制的意义

孙颖, 辛绍杰, 雷厉, 侯俊, 貌盼勇

■背景资料

近年来随着对
大蛋白中HBV
Pre-S1抗原在乙
型肝炎发病机
制、HBV感染与
复制等方面研究
的深入, 研究者
们逐渐认识到了
Pre-S1抗原具有
越来越重要的临
床意义。

孙颖, 解放军军医进修学院 北京市 100853
辛绍杰, 雷厉, 侯俊, 貌盼勇, 解放军302医院传染病研究所
病毒研究室 北京市 100039
通讯作者: 貌盼勇, 100039, 北京市西四环中路100号, 解放军
302医院传染病研究所病毒研究室. maopy302@yahoo.com.cn
共同通讯作者: 辛绍杰
电话: 010-66933315 传真: 010-63831874
收稿日期: 2005-11-08 接受日期: 2005-12-17

Significance of hepatitis B virus large protein detection in prediction of HBV DNA replication

Ying Sun, Shao-Jie Xin, Li Lei, Jun Hou, Pan-Yong Mao

Ying Sun, Postgraduate Medical School of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Shao-Jie Xin, Li Lei, Jun Hou, Pan-Yong Mao, Department of Virology, Institute of Infectious Disease, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China
correspondence to: Pan-Yong Mao, the Department of Virology, Institute of Infectious Diseases, 302 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China. maopy302@yahoo.com.cn
Co-correspondence to: Shao-Jie Xin
Received: 2005-11-08 Accepted: 2005-12-17

Abstract

AIM: To explore the significance of hepatitis B virus large protein (HBV-LP) in the diagnosis of viral replication.

METHODS: Serum HBV DNA level was quantitatively detected using real-time polymerase chain reaction, and HBV-LP, Pre-S1 and HBV markers expression were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in 254 cases of infected serum.

RESULTS: There was no significant difference between the levels of HBV DNA and HBV-LP ($P > 0.05$). The expression of HBV DNA and HBV-LP were not significantly different among various patterns of HBV serological markers, either ($P > 0.05$). HBV-LP expression was markedly correlated with the logarithm of HBV DNA level ($r = 0.945$, $P < 0.001$). A proportion of 89% of the logarithm of serum HBV DNA changes could be predicted by the linear regression model

with the independent variables (the levels of HBV-LP).

CONCLUSION: There is a perfect correlation between the copies of HBV DNA and the levels of HBV-LP, and HBV-LP expression can reflect the replication of HBV.

Key Words: Hepatitis B virus large protein; HBV DNA; HBV markers

Sun Y, Xin SJ, Lei L, Hou J, Mao PY. Significance of hepatitis B virus large protein detection in prediction of HBV DNA replication. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;(3):354-357

摘要

目的: 通过检测患者血清乙肝病毒外膜大蛋白(HBV-LP)、HBV DNA以及乙肝病毒标志物(HBV M), 探讨HBV-LP对于反映体内乙肝病毒复制的意义。

方法: 采用荧光定量PCR方法对254份HBV感染血清的HBV DNA进行检测, 并采用酶联免疫吸附试验(ELISA)的方法对HBV-LP、Pre-S1蛋白及HBV M进行检测。

结果: 大蛋白的检出结果与HBV DNA的检出结果无明显差异。不同HBV M模式的HBV DNA与HBV-LP的检出结果均无显著性差异。HBV DNA拷贝数的对数值与HBV-LP表达具有相关关系($r = 0.945$, $P < 0.001$), HBV DNA拷贝数的对数值变化的89%可以用HBV-LP A值为解释变量的线性回归模型来解释。

结论: HBV-LP能够反应HBV的复制情况, 血清中HBV-LP的含量与HBV DNA的拷贝数具有较好的相关性。

关键词: 乙肝病毒包膜大蛋白; 乙肝病毒DNA; 乙肝病毒标志物

孙颖, 辛绍杰, 雷厉, 侯俊, 貌盼勇. 乙肝病毒外膜大蛋白检测对于判定HBV DNA复制的意义. *世界华人消化杂志* 2006;14(3):354-357

表1 大蛋白阳性率及前S1阳性率与HBV DNA阳性率的比较

	HBV DNA	n	HBV-LP			Pre-S1		
			+	-	阳性率	+	-	阳性率
HBV 感染者	+	170	135	35	79.4%	97	73	57.1%
	-	84	44	40	52.4%	18	66	21.4%
健康对照	-	100	0	100	0	0	100	0
合计		354	179	75		115	139	

表2 HBV标志物阳性的不同模式患者的HBV DNA与HBV-LP检出情况

HBV M(+)	n	HBV DNA(+)	HBV-LP(+)
HBsAg HBeAg HBcAb	109	93 (85.32)	99 (90.83) ^a
HBsAg HBeAb HBcAb	85	45 (52.94)	46 (54.12) ^a
HBsAg HBeAg	23	19 (82.60)	18 (78.26) ^a
HBsAg HBcAb	37	13 (35.13)	16 (43.24) ^a
合计	254	170	179

^a $P>0.05$, 说明HBV-LP与HBV DNA在统计学上无显著性差异。

0 引言

HBV S基因编码合成的HBV外膜蛋白由3种蛋白组成, 包括主蛋白(即HBsAg), 中蛋白(即HBsAg和Pre-S2蛋白)和大蛋白(即HBsAg、Pre-S1蛋白和Pre-S2蛋白)^[1]。近年来随着对大蛋白中HBV Pre-S1抗原在乙型肝炎发病机制、HBV感染与复制等方面研究的深入, 研究者们逐渐认识到了Pre-S1抗原具有越来越重要的临床意义^[2-8], 如Pre-S1抗原能够反映HBV的复制情况, 可以作为预测干扰素治疗是否有效的指标, 推测急、慢性乙型肝炎的预后情况, 并可用于制备重组乙肝疫苗。但是由于大蛋白是构象蛋白, Pre-S1抗原作为大蛋白的一部分, 无法模拟其复杂的拓扑结构, 在制作单克隆抗体时其序列会被折叠, 卷曲而失去暴露表位的机会。这样的低级结构抗原制作出来的单克隆抗体在实际应用中便可能导致漏检。为了提高HBV Pre-S1抗原检测在临床应用中的意义, 我们利用构象型前S区的高亲和力、高特异性的单抗来检测由HBsAg、Pre-S1蛋白和Pre-S2蛋白3种蛋白成分组成的乙肝病毒外膜大蛋白(HBV-LP), 通过此研究来探讨HBV-LP对于反映体内乙肝病毒复制的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2005-01/2005-07 302医院的住院患者血清254份及正常体检职工血清100份。所有标本均于-20℃保存以备用。

1.2 方法 HBV DNA实时荧光聚合酶链反应(PCR)定量试剂盒购自广州中山大学达安基因公司。乙型肝炎病毒Pre-S1抗原采用ELISA方法, 试剂购自上海阿尔法生物技术有限公司, 乙型肝炎血清标志物检测试剂盒购自中山生物技术有限公司, 检测HBV-LP的单克隆抗体由热景生物技术有限公司馈赠, 该单抗为针对大蛋白Pre-S区复杂的拓扑结构制备而成。

统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行统计分析。HBV-LP及前S1阳性率与HBV DNA阳性率的比较采用配对资料的 χ^2 检验; 不同乙肝病毒血清标志物中HBV DNA阳性率与大蛋白阳性率的比较采用R×C列联表的 χ^2 检验; HBV-LP含量与HBV DNA的拷贝数的相关性分析采用频数表的相关与回归分析。

2 结果

2.1 大蛋白阳性率及前S1阳性率与HBV DNA阳性率的比较 我们检测了254份HBV感染血清, 其中HBV DNA阳性的为170份, HBV DNA阴性的为84份, 大蛋白总阳性率为79.4%, 前S1的总阳性率为57.1%, 大蛋白的检测方法与HBV DNA检测结果经配对卡方检验, 两者的检出率无明显差异($\chi^2 = 1.025$), HBV-LP比原来的前S1试剂效果大大提高, 说明大蛋白的检测比前S1更有意义(表1)。

2.2 不同乙肝病毒血清标志物中HBV DNA与大

■研究前沿

由于大蛋白是构象蛋白, Pre-S1抗原作为大蛋白的一部分, 无法模拟其复杂的拓扑结构, 在制作单克隆抗体时其序列会被折叠, 卷曲而失去暴露表位的机会, 这样的低级结构抗原制作出来的单克隆抗体在实际应用中便可能导致漏检。

■创新盘点

本研究利用构象型前S区的高亲和力、高特异性的单抗来检测乙肝病毒外膜大蛋白(HBV-LP), 研究结果显示HBV-LP能够反应HBV的复制情况, 血清中HBV-LP的含量与HBV DNA的拷贝数具有较好的相关性。

表3 大蛋白4值与HBV DNA拷贝数的相关性

组别 (HBV DNA Copies)	<i>n</i>	HBV-LP A	HBV-LP阳性 <i>n</i>	HBV-LP 阳性率(%)
<10 ⁴ (阴性)	84	0.266 ± 0.044	23	27.38
10 ⁴	43	0.416 ± 0.081	29	67.44
10 ⁵	63	0.504 ± 0.205	46	73.02
10 ⁶	24	0.898 ± 0.180	21	87.50
10 ⁷	17	1.275 ± 0.319	16	94.12
10 ⁸	23	1.428 ± 0.238	23	100.00

表4 大蛋白4值与HBV DNA拷贝数相关系数计算表

HBV DNA拷贝数的对数值(X)	HBV-LP A								HBV-LP 阳性 <i>n</i>	HBV DNA拷贝数 对数值的组中值
	0.2-	0.4-	0.6-	0.8-	1.0-	1.2-	1.4-	1.6-		
4-	23								23	4.5
5-		29							29	5.5
6-				39	7				46	6.5
7-				3	4	8	6		21	7.5
8-					2	7		7	16	8.5
各组频数	23	29	0	42	13	15	6	7	135	
HBV-LP A 的组中值	0.3	0.5	0.7	0.9	1.1	1.3	1.5	1.7		

蛋白的检测结果比较(表2)

2.3 HBV-LP与HBV DNA的相关性 HBV DNA拷贝数的对数值与HBV-LP A值的相关系数 $r=0.945$, 回归方程为 $Y=-1.134+0.312X$, $P<0.001$, $R\text{ Square}=0.894$, 这一结果说明HBV DNA拷贝数的对数值与HBV-LP A值具有相关关系, HBV DNA拷贝数的对数值变化的89%可以用HBV-LP A值为解释变量的线性回归模型来解释(表3-4)。

3 讨论

虽然目前医学界认为外周血HBV DNA是HBV复制最直接和可靠的指标, 可以用来判定患者和携带者有无传染性。但是Bruns *et al*^[9]通过研究鸭乙肝病毒发现含有嗜肝病毒的血清的感染性不仅依赖于具有感染性的病毒颗粒(Dane氏颗粒)的多少, 而且还依赖于缺乏核酸的亚病毒颗粒(SVPs, subviral particles, 包括管状颗粒和小球颗粒)的数量, 研究发现亚病毒颗粒在HBV感染过程中, 能显著增强细胞内的病毒复制和基因表达, 而这种增强作用是由pre-S蛋白的反式激活作用所触发的。此外还有研究发现, 在HBV形

成包膜的过程中需要大蛋白(即HBsAg、Pre-S1蛋白和Pre-S2蛋白)和中蛋白的参与^[10], 因此检测Pre-S蛋白的存在对于临床上判定HBV复制具有一定的意义。以往的检测是通过检测大蛋白的独有片断Pre-S1蛋白来实现的^[11,12], 但是编码pre-S蛋白的HBV-LP Pre-S区具有较为复杂的拓扑结构^[13], 导致Pre-S1抗原的检出率较低^[14,15], 不能很好的反映HBV的复制情况。我们通过对HBV感染者血清中的HBV-LP, HBV M以及HBV DNA的检测表明: HBV-LP能够反应HBV的复制情况, 血清中HBV-LP的含量与HBV DNA的拷贝数具有较好的相关性。由此可见HBV-LP在反应病毒复制方面是一个较好的指标。大蛋白的检测可以为小三阳病人的抗病毒治疗停药时间的确立提供参考。在我们检测的DNA阴性的52.4%血清标本中, 检测到了大蛋白的存在, 但其含量均较低, 通过进一步研究发现这些血清均来自处于抗病毒治疗过程中的患者, 这一现象提示我们在HBVDNA阴性的患者中, 大蛋白阳性可能是肝内病毒继续复制和抗病毒治疗不彻底的标志。但是对于这一结论还需要进一步

的研究.

4 参考文献

- 1 Bruss V, Gerhardt E, Vieluf K, Wunderlich G. Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology* 1996; 9: 23-31
- 2 何华, 张大志. 乙型肝炎病毒前S1抗原的研究进展. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 765-766
- 3 李琴, 孙桂珍, 魏玉香. 前S1蛋白与病毒DNA和核心抗原对乙型肝炎病毒复制诊断的对比. *中华肝脏病杂志* 2004; 12: 134-136
- 4 李欣华, 蒋卫平, 郑颖. 乙肝病毒前S1蛋白与HBVDNA、乙肝免疫标志物检测结果相关性分析. *临床肝胆病杂志* 2004; 20: 303-304
- 5 张雪红, 易长庚, 喻淑萍. 乙肝患者血清前S1蛋白与HBV-M、HBV-DNA检测结果的分析. *中国医师杂志* 2005; 1: 136-137
- 6 廖可育, 彭志高, 罗玲. 前S1蛋白在反映慢性乙型肝炎、HBsAg携带者病毒复制中的价值分析. *中国医师杂志* 2005; 7: 974-975
- 7 黄伟刚, 陈青龙, 张慧萍, 林津. 乙肝病毒前S1蛋白检测在诊断乙型肝炎病毒复制中的意义. *临床医学* 2005; 10: 5-7
- 8 李秀惠, 骆抗先, 田琦琦, 黄已实. 前S1抗体反映肝细胞损伤和病毒清除. *中华实验和临床病毒学杂志* 1994; 8: 120-121
- 9 Bruns M, Miska S, Chassot S, Will H. Enhancement of hepatitis B virus infection by noninfectious subviral particles. *J Virol* 1998; 76: 1462-1468
- 10 Bruss V. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res* 2004; 106: 199-209
- 11 Chen Kun. Establishment and preliminary use of hepatitis B virus preS1/2 antigen assay. *World J Gastroenterol* 1999; 11: 550-552
- 12 闵福援, 孙桂珍, 王健. 前S1蛋白在乙型肝炎诊断及判断预后中的作用. *中华检验医学杂志* 2004; 27: 224-226
- 13 Lambert C, Mann S, Prange R. Assessment of determinants affecting the dual topology of hepadnaviral large envelope proteins. *J Gen Virol* 2004; 85: 1221-1225
- 14 陈芳建, 胡雅国, 陆军. 乙型肝炎患者血清HBV-DNA与病毒复制标志物相关性探讨. *浙江预防医学* 2005; 17: 20-21
- 15 张旭, 邹焕荣, 黄衍锋. 前S1蛋白在乙型肝炎病毒检测中的临床意义. *医学文选* 2004; 23: 282-284

■应用要点

外膜大蛋白的存在与乙肝病毒的复制密切相关, 因此检测包膜大蛋白对于判断HBV感染的预后及抗病毒治疗的疗效具有较为重要的意义.

电编 张勇 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

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

•消息•

第一届全国临床营养支持学术会议通知

本刊讯 经中华医学会外科学分会批准, "第十届全国临床营养支持学术会议"将于2006-05在上海召开. 本次会议由中华医学会外科学分会营养支持学组主办、复旦大学附属中山医院承办, 主要内容为临床营养支持领域的基础和临床实践总结. 现将征文要求通知如下:

1 征文要求

请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要邮寄到上海市医学院路136号, 上海中山医院外科吴国豪收, 邮编: 200032; 同时请用Email将论文全文及摘要发送到prowugh@yahoo.com.cn, 注明上海中山医院外科吴国豪收. 征文请自留底稿, 恕不退稿.

2 截稿日期

征文截止日期: 2006-03-15.

本次会议举行优秀论文评奖活动, 欢迎踊跃投稿. 会议向正式代表颁布中华医学会继续教育学分.

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

戴冬秋 教授
沈阳中国医科大学附属第一医院肿瘤外科

党双锁 副教授
西安交通大学第二医院感染科

房殿春 教授
第三军医大学西南医院消化内科

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

纪小龙 教授
武警总医院病理科

来茂德 教授
浙江大学医学院病理学教研室

李国威 教授
西安交通大学第二医院

林菊生 教授
华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所

林勇 讲师
上海第二军医大学附属长征医院消化内科

刘银坤 教授
上海复旦大学附属中山医院肝癌研究所

卢绮萍 主任医师
广州军区武汉总医院普通外科

钱建民 教授
复旦大学附属华山医院器官移植科

秦环龙 教授
上海交通大学附属第六人民医院

任建林 教授
厦门大学中山医院

邵成浩 讲师
第二军医大学长海医院普外科

宋振顺 教授
第四军医大学西京医院肝胆外科

孙秀发 教授
华中科技大学同济医学院营养与食品卫生学教研室

孙志伟 副研究员
军事医学科学院生物工程研究所

唐承薇 教授
四川大学华西医院

唐霓 副研究员
教育部感染性疾病分子生物学重点实验室

王明荣 教授
中国医学科学院肿瘤研究所

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

王苑本 主任医师
中国人民解放军二七医院消化内科

吴梧桐 教授
中国药科大学生物制药学院

向德兵 讲师
重庆第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科

邢金良 讲师
第四军医大学细胞工程研究中心

徐小元 教授
北大医院感染科

许洪卫 教授
上海市第十人民医院

杨刚毅 副教授
重庆医科大学附属第二医院内分泌科

杨希山 教授
广州大道北云景花园云枫苑7-1001

于聪慧 副主任医师
北京军区总医院肝胆外科

于皆平 教授
湖北医科大学附属第一医院消化内科