

单纯性肝囊肿酒精硬化治疗的进展

钱林学, 贵玉, 冯彦红

钱林学, 贵玉, 冯彦红, 首都医科大学附属北京友谊医院超声科 北京市 100050

钱林学, 主任医师, 博士, 硕士生导师, 擅长B超引导下肝脏疾病的诊断及放射介入治疗。担任职位: 中国医学影像技术研究会超声介入专业委员会常委兼秘书长, 中国医学影像研究会超声分会常委, 中国超声医学工程学会肌骨学会常委, 中华医学会北京超声分会委员, 中国医师协会超声分会委员, 世界华人消化杂志、中国医学影像技术杂志编委, 中华临床医师杂志常务编委, 中华现代影像杂志常务编委等。

通讯作者: 钱林学, 100050, 北京市, 首都医科大学附属北京友谊医院超声科。qianlinxue2002@yahoo.com.cn

电话: 010-63138576/63139826

收稿日期: 2007-03-23 修回日期: 2007-08-20

Research progress in alcohol sclerotherapy for simple liver cysts

Lin-Xue Qian, Yu Gui, Yan-Hong Feng

Lin-Xue Qian, Yu Gui, Yan-Hong Feng, Department of Ultrasound, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China

Correspondence to: Lin-Xue Qian, Department of Ultrasound, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China. qianlinxue2002@yahoo.com.cn

Received: 2007-03-23 Revised: 2007-08-20

Abstract

Ultrasound-guided alcohol sclerotherapy is the first-line treatment for simple hepatic cysts, having a history of 22 years. However, there are no guidelines for hepatic cysts either in China or abroad. The cure rate differs significantly between medical institutions. Therefore, it is necessary to write guidelines for standardizing treatment programs to increase the efficacy of alcohol sclerotherapy. The key issues include the choice of therapy, minimal alcohol concentration for curing cysts, and maximal alcohol doses within safe limits, etc.

Key Words: Liver cyst; Alcohol; Interventional therapy

Qian LX, Gui Y, Feng YH. Research progress in alcohol sclerotherapy for simple liver cysts. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(31): 3253-3256

摘要

单纯性肝囊肿酒精硬化治疗已有22年的历史,

目前已成为治疗单纯性肝囊肿的一线方案。然而, 至今国内外一直没有肝囊肿治疗标准方案(Guideline), 致使不同医疗机构囊肿治愈率明显不同。目前有必要规范囊肿治疗方案, 提高囊肿治愈率。规范方案目前存在的主要问题包括囊肿酒精硬化治疗方法的选择、治愈囊肿的最低有效酒精浓度、最大酒精用量及安全性等。

关键词: 肝囊肿; 酒精; 介入治疗

钱林学, 贵玉, 冯彦红. 单纯性肝囊肿酒精硬化治疗的进展. 世界华人消化杂志 2007;15(31):3253-3256

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3253.asp>

0 引言

自1985年Bean首先报道在超声引导下肝囊肿置管引流酒精硬化治疗以来^[1], 目前, 酒精硬化治疗已成为治疗单纯性肝囊肿的一线方案。国外多采用囊肿置管保留酒精方法^[2-5], 而国内多采用细针穿刺短时间保留酒精法及酒精反复冲洗置换囊液法(即: 冲洗法)^[6-7]。上述方法的优缺点如何? 哪一种方法较好? 另外, 肝囊肿酒精硬化治疗疗效的关键在于保证囊腔内有较高的酒精浓度且囊壁均能接触到酒精。那么, 囊腔内酒精浓度多高才能够治愈囊肿? 治愈囊肿需要多少酒精? 多长时间? 及其对人的安全性如何? 酒精硬化治疗肝囊肿的确切机制是什么? 这些都是治愈肝囊肿的关键问题。本文将对以上问题逐一探讨。

1 酒精硬化治疗肝囊肿的机制

囊肿腔内的囊液是由囊壁上皮细胞所分泌, 上皮细胞不断分泌, 囊肿不断增大。Bean^[8]1981年的试验证明950 mL/L酒精与囊肿壁上皮接触1-3 min, 就可使上皮细胞固定、失活, 但未见其确切的病理报道。酒精使囊壁上皮细胞脱水, 蛋白凝固变性, 势必降低或消除膜蛋白的功能, 改变生物膜蛋白和脂质的比例, 使之转运氨基酸的能力降低和钙的内流异常, 导致细胞死亡, 不再

背景资料

乙醇硬化治疗肝囊肿已有22年的历史, 是一种微创、经济、简便、安全、有效的治疗方法, 目前已被广泛应用并成为单纯性肝囊肿的一线治疗方法。

研发前沿
如何规范囊肿治疗方法, 提高囊肿治愈率, 特别是在治疗方法的选择、治愈囊肿的最低有效乙醇浓度、最大酒精用量及安全性方面, 目前尚无定论, 成为亟待解决的问题。

分泌囊液, 并产生无菌性炎症使囊壁黏连, 纤维组织增生, 从而囊腔闭合, 囊肿消失^[9]。目前国内外对囊肿上皮细胞变性、坏死的过程, 期间上皮细胞胞膜、细胞器的超微结构的改变等未见报道。

2 酒精硬化治疗肝囊肿的方法及其疗效、优缺点和适应征

超声引导下酒精硬化治疗肝囊肿的方法较多, 大体可分为保留法和冲洗法2类。保留法: 在超声引导下借助Seldinger技术, 将6-8 F猪尾巴导管置入囊腔内(或细针直接穿刺), 注入造影剂, 证实囊腔与胆道系统及腹腔不相通, 抽尽囊液, 向囊内注入20 mL/L利多卡因5-10 mL后, 再注入囊腔容积1/5-1/3的950或990 mL/L的酒精, 最多不超过100 mL, 保留20 min。期间置管者应变换体位, 每个体位保持5 min, 以确保囊壁与酒精充分接触。硬化完毕, 抽尽酒精结束治疗(即: 单次保留法)。若囊肿较大, 可即刻或隔日重复硬化(即: 多次保留法)。冲洗法: 在超声引导下置管或插入PTC针后, 抽尽囊液, 用20-50 mL(或用抽出囊液量1/5-1/3)的990 mL/L酒精冲洗, 再反复注入酒精直至囊液澄清, 拔针, 即单阶段(single-session)冲洗法。囊肿较大者, 亦可隔日重复上述治疗, 即多阶段(multiple-sessions)冲洗法。

目前国外治疗囊肿策略: 小囊肿采取置管后单次或2次保留囊腔容积1/5-1/3的酒精20 min, 大囊肿采取多次保留法^[1,10-13], 治愈率71%-100%^[14-15], 有效率83%-100%^[14,16-17]。国内多主张冲洗法治疗囊肿, 治愈率在58.5%-81.5%, 有效率97.7%-100%^[6-7]。

国外采取的保留法需要置管, 其优势在于可将囊液抽尽, 减少因残液稀释酒精而降低疗效。同时还可让患者来回侧身, 让所有囊壁均能接触到酒精, 保证所有囊壁上皮的变性。但该方法较置入PTC针冲洗法创伤大, 出血率高, 需要住院治疗, 增加了医疗费用。而后者虽不能完全抽尽囊液, 但经反复冲洗后囊腔酒精浓度基本可达到990 mL/L。其还可使囊内沉淀的蛋白及时抽出, 防止因蛋白贴壁而影响硬化。此外加压冲洗可冲开皱缩的囊壁, 使酒精与囊壁上皮接触更充分, 硬化显著。该法创伤小, 简便易行, 无需住院, 门诊术后观察数小时即可回家, 费用低, 更易推广。

崔屹 *et al*^[18]用单阶段冲洗法治疗141例非寄生虫性肝囊肿, 结果发现囊径 ≤ 10 cm, 治愈率

59%, 有效率95%; >10 cm者治愈率18%, 有效率76%, 并提出此法治疗囊径在10 cm以内者, 疗效好。黄敏 *et al*^[7]对于 ≥ 10 cm的肝囊肿采取多阶段冲洗法治疗, 冲洗2次/d, 治疗2-3 d, 并未使得疗效有所改善。分析其原因, 可能与囊肿较大时, 单纯冲洗不侧身, 无法保证所有囊壁均能接触到酒精及硬化时间短有关。而用多次保留法治疗巨大肝囊肿(囊径 ≥ 10 cm), 治愈25个(86.2%), 有4例未闭合, 其中2例为注射4次后导管脱落, 2例为直径20和23 cm的特大囊肿, 但此4例囊肿经治疗后均 <5 cm且症状消失^[19]。由此可见, 酒精单阶段冲洗法对10 cm以内的肝囊肿有较好的疗效, 而多次保留法对10 cm以上者疗效较好。目前治疗的肝囊肿以直径 ≤ 10 cm的多见, 故单阶段冲洗法更值得推广, 其治愈率高, 即使有个别未治愈的, 因其最终直径 <5 cm, 亦无临床症状, 无需治疗。

3 影响酒精硬化治疗肝囊肿疗效的因素

3.1 酒精硬化治疗肝囊肿的有效浓度 目前常用950-990 mL/L酒精作为硬化剂治疗囊肿, 均有较好疗效。因囊液常无法抽尽, 使得注入的酒精被稀释, 故最终治疗囊肿的有效酒精浓度常不得而知。Okano *et al*^[20]用990 mL/L酒精治疗8例巨大肝囊肿(直径10-16 cm, 容积350-1590 mL), 每次保留20-100 mL, 平均保留1.4次, 结果有5例囊肿直径缩小一半以上, 6例症状消失。经公式推算后发现, 这5例患者囊内酒精浓度 $>40\%$ 。因此提出囊内酒精浓度 $>40\%$ 时即可取得最佳疗效且副作用少。但此试验例数少, 最终酒精浓度是推算得出, 且以囊腔缩小一半以上作为最佳疗效的标准, 值得怀疑, 故尚需大规模的、精确的临床试验验证。

3.2 囊肿大小 文献报道囊肿直径愈小, 硬化效果愈好。据报道^[18], 肝囊肿囊径 <6 cm, 6-10 cm, >10 cm的治愈率分别为80%, 44.5%, 18.2%; 有效率分别为100%, 92.1%, 75.8%。俞同福 *et al*^[21]研究亦显示 <5 cm组与5-8 cm及 >8 cm组疗效有显著性差异, 囊肿直径愈小, 治疗后消失率愈高。因此肝囊肿符合适应征者应尽早治疗, 以获得最佳疗效。

3.3 硬化次数 据报道, 多次硬化有效率(95%)显著高于单次硬化有效率(57%; $P<0.001$)^[22], 且2次酒精硬化复发率(0%)较1次硬化复发率(32%)低^[23]。李宗狂 *et al*^[19]采用多次硬化治疗29个巨大肝囊肿, 11个注射4次, 8个注射5次, 6个注射6次,

4个注射7次, 使巨大肝囊肿的治愈率增至86.2%, 这也证实多次硬化的有效性。

3.4 硬化时间 酒精硬化治疗囊肿的时间, 依囊肿大小和方法而定。保留法治疗小囊肿时, 多采用单次保留20-60 min, 而大囊肿则采用多阶段保留, 曾有220 min的报道^[12], 有较好疗效。而Larssen *et al*^[24]采用单次保留酒精10 min治疗肝囊肿, 平均随访23 mo, 结果囊肿平均容积缩小95% ($P < 0.005$)。Yang *et al*^[25]分别用950 mL/L酒精保留4或2 h治疗肝囊肿, 结果表明两组间疗效无差异。而冲洗法以冲洗至囊液完全澄清为标准, 不强调冲洗时间。因此, 不同疗法治疗囊肿的最佳时间有待于进一步研究。

4 肝囊肿二次治疗时机的选择

较多报道显示, 在囊肿硬化后的短时间内(1 wk-3 mo)会有囊液的再次产生, 随后经长期随访发现其逐渐消失或缩小^[10,26-28]。分析其原因可能是酒精致囊肿炎症反应, 炎性渗出所致, 而非治疗无效。此时酒精已使囊壁上皮变性、失活, 不再分泌囊液。随着炎症的吸收, 囊腔最终闭塞^[27]。Larssen从细胞学和生化学角度, 研究肝囊肿经酒精硬化前后囊液成分的变化, 结果表明硬化后, 细胞学和生化学参数均支持有炎症反应参与^[29]。因此, 酒精初次硬化治疗肝囊肿后, 其疗效评价和二次治疗至少应在3 mo后进行。

5 酒精硬化治疗肝囊肿安全性的探讨

酒精治疗囊肿时, 因囊壁对酒精的吸收和渗漏等原因, 常出现醉酒反应: 口中呼出酒味、恶心、面色潮红、头晕、呼吸和心率加快等。郑怀竞 *et al*^[30], 报道急性乙醇饮用者全血中乙醇达1 g/L时即为法定醉酒, 达2 g/L时即为中毒量, 达5 g/L时为致死量。为防止出现严重的神经毒性反应, 现认为单次注入囊腔内的酒精不能超过100 mL。经临床试验验证, 该剂量较安全, 仅少数患者在治疗后有醉酒反应, 经对症治疗或休息后可缓解。Larssen保留不超过100 mL的酒精10-20 min, 术后1 h血酒精浓度为0-0.3 g/L^[28]。Kairaluoma *et al*^[10]将保留时间增至40-60 min, 结果术后20 min平均血酒精浓度为 0.43 ± 0.38 g/L, 最高达1.02 g/L; 术后80 min平均血酒精浓度为 0.38 ± 0.32 g/L, 最高达0.92 g/L。

Yang *et al*^[25]尝试用单次保留囊腔容积30%-40%的950 mL/L酒精2或4 h治疗27例巨大肝囊肿(8-23 cm), 平均酒精用量为138.3 mL, 最

多用200 mL。有7例血压下降(26%), 25例出现醉酒反应(93%)。检测的9例患者术后每小时血酒精浓度显示: 血酒精浓度在3或4 h时达到高峰, 0.6-1.99 g/L(平均1.28 g/L), 其副反应大, 血酒精浓度高可能与其酒精用量大及保留时间长有关。这与Kairaluoma *et al*^[10]报道注入酒精的总量与每公斤体质量血中酒精含量的增加显著相关一致。但Akinci *et al*^[31]硬化治疗肾囊肿97例, 单次最多用酒精200 mL, 取得良好疗效且无并发症。Bozkurt *et al*^[32]在成功治愈1例20 cm×25 cm×16 cm的肾囊肿时, 单次最多用酒精350 mL, 随访8 mo亦无并发症。因此选择单次保留超过100 mL的酒精治疗囊肿时应谨慎, 其安全性还有待于探讨。

以上我们介绍了国内外对肝囊肿酒精硬化治疗的研究现状和进展, 而肝囊肿酒精硬化治疗的确切机制等还需进一步研究, 我们建议, 对酒精硬化治疗肝囊肿方法进行一项多中心、随机对照研究, 比较保留法和冲洗法的临床疗效, 有助于规范囊肿治疗方法。建议囊肿直径<10 cm建议行单阶段冲洗法, 囊肿直径>10 cm行多次保留法。囊肿越小, 治疗效果越好, 因此建议肝囊肿>5 cm或有明显的因囊肿引起的压迫症状者即可治疗。当然, 囊肿硬化治疗还有许多没有解决的问题, 如治愈肝囊肿的最低有效治愈囊肿的囊内酒精浓度, 以及该浓度下酒精最短保留时间、最佳注入囊内酒精量, 人体对酒精的最大耐受量, 酒精对正常肝细胞的影响, 囊壁上皮细胞的坏死过程等, 都有待于进一步研究。

总之, 超声引导下无水酒精硬化治疗肝囊肿是一种微创、经济、简便、安全、有效的方法。

6 参考文献

- 1 Bean WJ, Rodan BA. Hepatic cysts: treatment with alcohol. *AJR Am J Roentgenol* 1985; 144: 237-241
- 2 Ferris JV. Serial ethanol ablation of multiple hepatic cysts as an alternative to liver transplantation. *AJR Am J Roentgenol* 2003; 180: 472-474
- 3 Blonski WC, Campbell MS, Faust T, Metz DC. Successful aspiration and ethanol sclerosis of a large, symptomatic, simple liver cyst: case presentation and review of the literature. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2949-2954
- 4 Larssen TB, Jensen DK, Viste A, Horn A. Single-session alcohol sclerotherapy in symptomatic benign hepatic cysts. Long-term results. *Acta Radiol* 1999; 40: 636-638
- 5 Kimura F, Miyazaki M, Itoh H, Suwa T, Sugiura T, Shinoda T. Repeated instillation of a limited volume of ethanol for the treatment of symptomatic hepatic cysts. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1147-1150
- 6 张云山, 贺声, 朱世华, 辛红, 沈燕华, 贾文凯, 余泽辉,

创新盘点
先前学者对乙醇硬化治疗肝囊肿的报道, 大多侧重于疗效、适应症、有效浓度、硬化次数、保留时间及安全性中某一方面的研究。本文对于硬化治疗肝囊肿的诸多方面文献进行综述, 寻求其结合点, 以求探讨一种最佳治疗方案。

应用要点
高浓度乙醇硬化治疗肝囊肿已成为囊肿治疗的一线方案, 但其最佳治疗方案尚待研究, 如何能最大发挥其微创、安全的优势, 同时又提高治愈率减少复发, 必将成为新的研究方向。

同行评价

本文引用文献较全面, 撰写简明扼要, 有条理, 对临床医师有较重要的参考价值。

- 任贺. 彩色多普勒超声导向硬化剂治疗肝肾囊肿的疗效. *中国介入影像与治疗学* 2005; 2: 200-202
- 7 黄敏, 郭建峰, 邓学东, 严禹, 孙勤, 金秋龙, 顾军, 周一群, 徐颖. 超声引导肝肾囊肿介入治疗的方法再探. *中国介入影像与治疗学* 2006; 3: 112-114
- 8 Bean WJ. Renal cysts: treatment with alcohol. *Radiology* 1981; 138: 329-331
- 9 史宇恒, 周华. 超声引导下肾囊肿无水酒精固化疗法临床分析. *临床超声医学杂志* 2002; 4: 113-114
- 10 Kairaluoma MI, Leinonen A, Stahlberg M, Paivansalo M, Kiviniemi H, Siniluoto T. Percutaneous aspiration and alcohol sclerotherapy for symptomatic hepatic cysts. An alternative to surgical intervention. *Ann Surg* 1989; 210: 208-215
- 11 Conzo G, Bicchetti F, Vacca R, Campione M, Di Marzo M, Ruotolo E, Santini L. Role of ultrasound-guided percutaneous alcohol administration in the treatment of solitary cysts of the liver. *G Chir* 2001; 22: 37-40
- 12 vanSonnenberg E, Wroblecka JT, D'Agostino HB, Mathieson JR, Casola G, O'Laoide R, Cooperberg PL. Symptomatic hepatic cysts: percutaneous drainage and sclerosis. *Radiology* 1994; 190: 387-392
- 13 Mohsen T, Gomha MA. Treatment of symptomatic simple renal cysts by percutaneous aspiration and ethanol sclerotherapy. *BJU Int* 2005; 96: 1369-1372
- 14 Montorsi M, Torzilli G, Fumagalli U, Bona S, Rostai R, De Simone M, Rovati V, Mosca F, Filice C. Percutaneous alcohol sclerotherapy of simple hepatic cysts. Results from a multicentre survey in Italy. *HPB Surg* 1994; 8: 89-94
- 15 Kakizaki K, Yamauchi H, Teshima S. Symptomatic liver cyst: special reference to surgical management. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 1998; 5: 192-195
- 16 Pozniczek M, Wysocki A, Bobrzynski A, Krzywon J, Kostarczyk W, Budzynski P. Sclerosant therapy as first-line treatment for solitary liver cysts. *Dig Surg* 2004; 21: 452-454
- 17 Tikkakoski T, Makela JT, Leinonen S, Paivansalo M, Merikanto J, Karttunen A, Siniluoto T, Kairaluoma MI. Treatment of symptomatic congenital hepatic cysts with single-session percutaneous drainage and ethanol sclerosis: technique and outcome. *J Vasc Interv Radiol* 1996; 7: 235-239
- 18 崔屹, 叶远红. 超声引导下治疗非寄生性肝囊肿141例疗效分析. *医学影像学杂志* 2001; 11: 329-330
- 19 李宗狂, 刘金新, 崔培元, 谈焱, 鲁正. 分次注射无水酒精治疗巨大肝囊肿的临床观察. *肝胆外科杂志* 2002; 10: 264-265
- 20 Okano A, Hajiro K, Takakuwa H, Nishio A. Alcohol sclerotherapy of hepatic cysts: its effect in relation to ethanol concentration. *Hepatol Res* 2000; 17: 179-184
- 21 俞同福, 王德杭, 陈家荣. 肾囊肿穿刺硬化治疗及疗效观察. *临床放射学杂志* 1999; 18: 50-52
- 22 Chung BH, Kim JH, Hong CH, Yang SC, Lee MS. Comparison of single and multiple sessions of percutaneous sclerotherapy for simple renal cyst. *BJU Int* 2000; 85: 626-627
- 23 Hanna RM, Dahniya MH. Aspiration and sclerotherapy of symptomatic simple renal cysts: value of two injections of a sclerosing agent. *AJR Am J Roentgenol* 1996; 167: 781-783
- 24 Larssen TB, Rosendahl K, Horn A, Jensen DK, Rorvik J. Single-session alcohol sclerotherapy in symptomatic benign hepatic cysts performed with a time of exposure to alcohol of 10 min: initial results. *Eur Radiol* 2003; 13: 2627-2632
- 25 Yang CF, Liang HL, Pan HB, Lin YH, Mok KT, Lo GH, Lai KH. Single-session prolonged alcohol-retention sclerotherapy for large hepatic cysts. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: 940-943
- 26 黄丽英. 改良式超声引导下无水酒精治疗腹内囊肿的探讨. *影像诊断与介入放射学* 2004; 13: 176-177
- 27 李文燕, 张澍田, 于中麟, 杨成奎. 超声导向注射无水酒精治疗肝囊肿33例次对照观察. *中级医刊* 1998; 33: 22-24
- 28 Larssen TB, Viste A, Jensen DK, Sondenaa K, Rokke O, Horn A. Single-session alcohol sclerotherapy in benign symptomatic hepatic cysts. *Acta Radiol* 1997; 38: 993-997
- 29 Larssen TB, Rorvik J, Horn A, Karwinski B, Skadberg O, Pedersen OM, Rosendahl K. Biochemical and cytologic analysis of cystic contents in benign non-parasitic symptomatic hepatic cysts before and after ethanol sclerotherapy. *Acta Radiol* 2004; 45: 504-509
- 30 郑怀竞, 李金明. 实验室血中乙醇浓度的检测. *中华肝病学会肝脏病杂志* 1995; 3: 237-238
- 31 Akinci D, Akhan O, Ozmen MN, Karabulut N, Ozkan O, Cil BE, Karcaaltincaba M. Percutaneous drainage of 300 intraperitoneal abscesses with long-term follow-up. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2005; 28: 744-750
- 32 Bozkurt FB, Boyvat F, Tekin I, Aytekin C, Coskun M, Ozkardes H. Percutaneous sclerotherapy of a giant benign renal cyst with alcohol. *Eur J Radiol* 2001; 40: 64-67

编辑 程剑侠 电编 何基才

慢性胰腺炎诊治的进展

许元鸿, 郭克建

许元鸿, 郭克建, 中国医科大学附属第一医院胃肠胰外科 辽宁省沈阳市 110001

许元鸿, 副教授, 副主任医师, 主要从事胰腺疾病的诊断和治疗.
通讯作者: 许元鸿, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院胃肠胰外科. yuanhongxu@hotmail.com
电话: 024-83283330

收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2007-08-20

Progress in the diagnosis and treatment of chronic pancreatitis

Yuan-Hong Xu, Ke-Jian Guo

Yuan-Hong Xu, Ke-Jian Guo, Department of Pancreatic and Gastroenterology Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dr Yuan-Hong Xu, Department of Pancreatic and Gastroenterology Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yuanhongxu@hotmail.com

Received: 2007-05-28 Revised: 2007-08-20

Abstract

Traditionally, the diagnosis of chronic pancreatitis (CP) requires confirmation by tests that measure perturbations of either pancreatic structure or function. The diagnostic criteria from the 2000 Survey in the Asia-Pacific Region are accepted internationally. The distinction between big- and small-duct CP has both diagnostic and therapeutic implications. Autoimmune pancreatitis (AIP) is recognized as one special type of CP. Endoscopic therapy is appealing because it may offer an alternative to surgical procedures for CP. Furthermore, endoscopic therapy does not preclude subsequent surgery if it is necessary. Operations for CP are varied, and there is no single operation for all patients. Malignancy must be excluded in the preoperative evaluation.

Key Words: Chronic pancreatitis; Endoscopic therapy

Xu YH, Guo KJ. Progress in the diagnosis and treatment of chronic pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3257-3260

摘要

传统的慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)诊断着眼于胰腺形态和功能的异常, 2000年亚太共识会确定的标准是目前国际上较为公认的标准。“大导管”、“小导管”胰腺炎的确定对CP的诊断和治疗具有双重价值。自身免疫性胰腺炎作为CP的一个特殊类型越来越受到临床医生的关注。CP内镜治疗是另外一种很有前途的外科处理手段, 而且内镜手段并不排斥随后必须要进行的手术治疗。CP的手术方式多样化, 没有统一的单一术式适合所有CP患者, 在术前排除恶性病变是必须的。

关键词: 慢性胰腺炎; 内镜治疗

许元鸿, 郭克建. 慢性胰腺炎诊治的进展. 世界华人消化杂志 2007;15(31):3257-3260

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3257.asp>

0 引言

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis, CP)是由多种原因所致的胰腺弥漫性或局限性炎症。由于炎症持续不断地发展, 导致腺体发生一系列复杂、不可逆的损害, 并在临床上表现出进行性的内、外分泌功能衰退及多种临床症状。

1 诊断

CP由于多种致病因素相互影响, 使临床表现变得复杂、多样。基于不同的角度, CP有不同的分类法, 诊断标准不一。传统上CP的诊断方法着眼于发现胰腺形态和功能异常(表1)。根据检查方法组合和敏感度的不同, CP的诊断标准也经历了不同的阶段。1963-1984年马赛, 1988年的马赛、罗马, 1996年瑞士苏黎世几次国际研讨会将CP基本上分为两大类, 即以病理形态学改变为主要依据的马赛分类法和以临床表现为主要依据的苏黎世分类法。至今病理形态学的改变仍是诊断CP的金标准, 但临床上又很难以胰腺组织作为疾病的诊断依据。1995年日本制定的CP诊断标准也接纳了马赛以病理形态学为主要依据的分类法。2000年的亚太共识会上确定的

背景资料

慢性胰腺炎(CP)是一种良性疾病, 其自然病程显示他是一个进行性的炎症过程。目前有关CP的诊断还是一种经验性诊断, 哪种诊断是诊断CP的“金标准”还未达成共识。针对CP, 内镜治疗是近年来发展起来一种治疗手段, 他适合CP某些固定的指征; CP的手术方式多样化, 没有统一的单一术式适合所有CP患者, 手术效果也存在个体差异。

研发前沿
本文就国际上流行的主流理论和治疗方式,并结合自己的体会,对慢性胰腺炎的诊断和治疗最新进展加以简要的介绍。

CP的诊断标准为:有临床症状和体征,并具备下列之一者:(1)内镜逆行胰胆管造影(ERCP)显示胰管有改变,(2)促胰泌素试验阳性,(3)胰腺钙化,(4)提示CP的内镜超声(EUS)异常^[1]。尽管这种分类法存在着一些问题,但也是国际上较公认的CP诊断标准。

有些患者的胰腺炎症主要累及腺体和胰管的细小分支,而主胰管无明显的改变。如按上述诊断标准则难以对此类患者做出诊断。针对此种情况,有人提出按炎症主要累及的部位,将CP分为“大导管”(big-duct)和“小导管”(small-duct)两种炎症类型^[2],并发现各自的临床表现及辅助检查结果均呈现不同特征(表2)。大导管病变意味着胰管和腺体出现常规影像学检查可发现的明显异常,这些改变包括超声(US)、CT或ERCP可发现的主胰管扩张、胰腺萎缩或弥漫性钙化;而小导管病变意味着没有上述的异常表现。这个区别具有诊断和治疗上的双重价值,大导管病变出现明显形态的异常,且常伴有内、外分泌功能不全,诊断相对简单;而小导管病变的影像学检查可能是正常的,而且通常还没有出现功能异常,诊断相对困难。目前小导管CP仍是诊断的难点。

近年CP的一个特殊类型自身免疫性胰腺炎(autoimmune pancreatitis, AIP)越来越受到临床医生的关注。1961年Sarles首先报道一种与自身免疫有关的特殊类型的CP,1995年Yoshida在总结先前报道的基础上提出AIP的概念和诊断标准,其特点为高 γ 球蛋白血症、自身抗体阳性、胰腺增大,组织学上以胰管周围淋巴细胞和浆细胞严重浸润性炎症为特征,并出现腺叶萎缩和严重纤维化,尤为重要的是其对皮质类固醇治疗敏感^[3]。

据报道,干燥综合症、原发性硬化性胆管炎、原发性胆汁性肝硬化、自身免疫性肝炎、炎症性肠病、I型糖尿病和免疫性血小板减少症等自身免疫疾病均与AIP有联系^[4]。据统计,临床上近2%接受ERCP的CP患者被证实为AIP,患者通常没有症状或仅有轻微的上腹部不适症状,影像学检查显示胰腺增大,因胰头肿大或纤维化所致的胆总管远端狭窄而引起梗阻性黄疸,近期出现的糖尿病以及疑似胰腺癌的单个或多个胰腺肿块。该疾病一般没有急性胰腺炎发作的病史。

AIP自然病程方面的资料很少,有些患者因怀疑胰腺癌或淋巴瘤而接受手术治疗,大多数

表 1 CP的诊断方法

形态检测	功能检测
超声内镜(EUS)	促胰泌素或促胰泌素-CCK试验
经内镜逆行胰胆管造影(ERCP)	粪便弹性蛋白酶
计算机体层摄影(CT)	血清胰蛋白酶
磁共振成像/磁共振胆胰管成像(MRI/MRCP)	粪便脂肪
腹部超声	血糖
腹部X光平片	

按敏感性的降密次排列, CCK: 胆囊收缩素。

表 2 “大导管”和“小导管”CP的特征

特征	大导管	小导管
性别	男	女
辅助检查		
胰泌素试验	异常	异常
血清胰蛋白酶原	多为异常	正常
影像检查		
胰腺弥漫钙化	常见	罕见
ERCP	多为明显异常	轻度异常或正常
症状		
脂肪泻	常见	罕见
疼痛治疗		
胰酶制剂	无明显效果	疗效明显
手术治疗	有效	无效

患者接受皮质激素的治疗。据报道, *po*皮质激素可取得很好的治疗效果。通常一个疗程的皮质激素治疗可以纠正或明显改善黄疸、糖尿病、高 γ 球蛋白血症、胰腺增大、胰管狭窄和胰腺功能不全的症状,但一些胰管不规则改变可能持续存在。大多数患者停用激素后无复发,但也有少数患者出现复发。

2 内镜治疗

近十余年,随着纤维十二指肠镜的普及与应用,为CP的治疗开辟了一个新的途径。尤其近年来内镜治疗CP新技术的出现和进一步成熟,如胰管支架置放术和胰管内镜取石(包括或不包括体外冲击波碎石),使得内镜治疗CP指征逐渐扩大^[5]。导致CP患者腹痛的胰管和十二指肠乳头狭窄、胰石、假性囊肿及胰腺分裂、Oddi括约肌功能异常等均可以选用内镜治疗。与外科手术相比,内镜疗法具有创伤小、并发症和死亡率低、安全、费用低等优点。因此可作为外科手

术的一种替代疗法。此外, 内镜治疗并不排斥随后必须要进行的手术治疗。而且通过内镜手段减低胰管内压的结果可预测外科引流的效果。近年有关内镜治疗CP的报道已达几千例, 但目前尚缺乏内、外科和内镜治疗大样本的随机、对照研究, 故无法得出不同个体应选择何种疗法的确切适应证, 内镜治疗CP的远期疗效有待进一步提高。下面就内镜治疗涉及到的指征简介如下。

(1) 内镜下胆、胰管括约肌切开术: 括约肌切开后, 可消除胆、胰管开口的狭窄, 降低胰管内压。同时, 也是胰管支架术、胰管活检、胰管狭窄扩张和取石等后续治疗的先决条件。(2) 胰管扩张术: 单纯扩张后, 多数患者症状复发故胰管扩张均与支架置入、取石等疗法联合应用。(3) 胰管支架术: 该方法是内镜治疗慢性胰腺炎的最主要措施。十二指肠乳头周围及胰头部胰管狭窄, 伴远端胰管扩张者是胰管支架术的最主要适应证^[6]。关于胰管支架管放置与更换支架的时间也存有争议。一种意见为如无症状或并发症, 支架可一直放置, 而无需更换; 另一种意见为每3个月更换支架, 以保持引流通畅。目前多数人认为待胰性腹痛复发时更换支架较定期更换更为恰当^[9]。近年的研究发现, 移出支架后, 有些患者的胰管狭窄虽持续存在, 但腹痛症状却可明显缓解。推测其原因可能与内镜治疗时的括约肌切开、胰管扩张、取石等多种措施不同程度地改变了胰液的流出有关^[7]。(4) 胰腺结石取除术: 该方法主要适用于主胰管内的结石。对于管壁粘连的胰管结石, 可先用导管推动结石, 使其游离再将其套出。对于胰管内小结石, 可通过冲洗将其排出。对于结石过大、过硬者可附加液电碎石(EHL)将结石粉碎后取出或进行体外冲击波碎石(ESWL)后取石, 对有结石残留且症状明显者应行手术治疗^[8]。(5) 胰腺假性囊肿的治疗: 对于临床上有明显症状、囊肿逐渐增大和出现感染、出血、破裂及消化道梗阻者需进行干预, 并可首先选用内镜治疗^[9]。内镜治疗是通过在囊肿与消化道之间制造一引流通道, 使囊液经过通道流至消化道内, 而达到治愈囊肿的目的。根据囊肿与胰管是否相通, 可选用经十二指肠乳头的间接引流和经胃或十二指肠壁的直接引流。(6) 胆道梗阻的治疗: 胆道内支架置入可使慢性胰腺炎合并胆道梗阻者的黄疸减轻, 胆汁淤滞状态得到改善, 胆管炎易于控制, 但远

期疗效不佳。目前, 胆道内支架置入仅适于一些高危患者以及为减轻黄疸、控制胆道感染的临时措施。(7) 胰痿的治疗: 慢性胰腺炎时并发的胰痿多为胰液从假性囊肿、破裂胰管漏出而形成的内痿。多数患者需行ERCP检查方可确定胰液漏出的部位。对内科治疗无效的患者或作为综合治疗手段之一, 可经内镜向胰管内置入支架或鼻胰管引流, 通常引流管的先端应置于胰痿口远端。对内镜治疗失败者应行手术治疗。

3 外科治疗

虽然不同病因所致的CP形态学上略有差别, 但其基本改变大致类似。这些形态学改变, 在临床上既引起内、外分泌功能的变化, 又导致一些器质性并发症。因此CP的治疗是一项多学科的工作, 其中包括去除病因、改善胰腺内外分泌功能、消除腹痛等内科措施及处理器质性并发症和难以控制腹痛的外科治疗。

CP的外科治疗是在内科治疗无效的前提下进行的。外科治疗有以下3个目的: (1) 消除或缓解难以控制的腹痛, (2) 处理CP末期相关并发症(胆道梗阻、假性囊肿的形成等), (3) 排除胰腺癌的存在。

对于CP患者而言, 具备下面3种形态学变化, 适合外科手术治疗: (1) 局域性(远端或近端)纤维化, (2) 弥散性胰管扩张(胰管扩张的长度大于10 cm, 直径大于5-7 mm), (3) 相关或相邻器官的梗阻和闭塞(胆道梗阻、十二指肠梗阻或假性囊肿的压迫)。这些解剖学变化可被CT和/或ERCP确定。如果患者无法进行上述指标的评价, 而直接进行外科手术治疗, 则很难预见其手术效果及疼痛的缓解情况。CP手术方式共分两大类: 胰管减压手术和胰腺切除手术。(1) 胰管减压手术: 此类手术仅限于“大导管”CP。胰管梗阻致内压增高是此类CP患者腹痛的主要原因, 如能有效地降低胰管压力, 大多数患者的腹痛可以得到明显的缓解。胰管减压手术既可缓解症状, 又能最大限度地保留胰腺组织, 被认为是比较理想的术式之一。有些患者手术后症状复发, 可能与胰头部或钩突胰管阻塞及疾病进展有关^[10]。

在各类胰管减压引流术中, 胰管空肠侧吻合术减压效果最充分, 且操作比较简单, 并发症少, 是近20年应用最广泛的一种胰管减压手术。(2) 胰腺切除术: 根据病变部位、程度与范围, 选择胰头或远侧(尾侧)胰腺切除术。胰头切除术包括胰十二指肠切除、保留幽门的胰十二指肠切除

同行评价
本文介绍了慢性胰腺炎诊治的进展, 有一定的参考价值和应用价值。

及保留十二指肠的胰头切除术。前两种术式可用于胰头部炎性肿块较大、多发性胰石或囊肿,与周围脏器粘连严重,合并胆总管、十二指肠梗阻的患者。但因手术创伤大,合并症多等问题而引起争议。

保留十二指肠的胰头切除术是由Beger率先倡导的一种新的术式。该手术仅切除病变的胰头,保留了胃、十二指肠及胆道正常的连续性。通过实践,已证实技术上是可行的。此后Warren、Frey、梁英树、今泉俊秀 *et al*以该术式为基础,施行了若干改进。

胰头肿块的定性诊断是选择术式的前提,也是目前胰腺外科的一个难点。术中穿刺细胞学及冰冻活检是确定诊断最可靠的根据。因胰腺癌癌灶周围伴有炎症改变,切取表层胰腺组织常难以得到阳性结果。切取活检组织前,应将胰头充分游离,仔细观察胰头前后有无凸起的结节,认真触诊肿块内最硬的部份,选择距病灶最近的路径,从胰头的前方或后方切取病变组织。对细胞学及术中冰冻阴性,而临床仍不能排除的恶性者,应将病变组织大块切除再次送检。如证实为恶性,行胰十二指肠切除;若仍未证实为癌,可以选择保留十二指肠的胰头切除术(Frey法)来终止手术。

CP是一种良性疾病,其自然病程显示他是一个进行性的炎症过程。目前有关CP的诊断还是一种经验性诊断,哪种诊断是诊断CP的“金标准”还未达成共识。针对CP,内镜治疗是近年来发展起来一种治疗手段,他适合CP某些固定的指征。CP的手术方式多样化,没有统一的单一术式适合所有CP患者,手术效果也存在个体差异。所以,必须全面、仔细了解每一个患者的具体情况,选择最合适的治疗方法和时机,遵循个体化的原则,才能获得满意的疗效。

参考文献

- 1 Garg PK, Tandon RK. Survey on chronic pancreatitis in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 998-1004
- 2 Forsmark CE. The diagnosis of chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 293-298
- 3 Procacci C, Carbognin G, Biasiutti C, Frulloni L, Bicego E, Spoto E, el-Khalidi M, Bassi C, Pagnotta N, Talamini G, Cavallini G. Autoimmune pancreatitis: possibilities of CT characterization. *Pancreatology* 2001; 1: 246-253
- 4 Taniguchi T, Seko S, Okamoto M, Hamasaki A, Ueno H, Inoue F, Nishida O, Miyake N, Mizumoto T. Association of autoimmune pancreatitis and type 1 diabetes: autoimmune exocrinopathy and endocrinopathy of the pancreas. *Diabetes Care* 2000; 23: 1592-1594
- 5 Jacob L, Geenen JE, Catalano MF, Geenen DJ. Prevention of pancreatitis in patients with idiopathic recurrent pancreatitis: a prospective nonblinded randomized study using endoscopic stents. *Endoscopy* 2001; 33: 559-562
- 6 Rosch T, Daniel S, Scholz M, Huibregtse K, Smits M, Schneider T, Ell C, Haber G, Riemann JF, Jakobs R, Hintze R, Adler A, Neuhaus H, Zavoral M, Zavada F, Schusdziarra V, Soehendra N. Endoscopic treatment of chronic pancreatitis: a multicenter study of 1000 patients with long-term follow-up. *Endoscopy* 2002; 34: 765-771
- 7 Farnbacher MJ, Muhldorfer S, Wehler M, Fischer B, Hahn EG, Schneider HT. Interventional endoscopic therapy in chronic pancreatitis including temporary stenting: a definitive treatment? *Scand J Gastroenterol* 2006; 41: 111-117
- 8 Farnbacher MJ, Schoen C, Rabenstein T, Benninger J, Hahn EG, Schneider HT. Pancreatic duct stones in chronic pancreatitis: criteria for treatment intensity and success. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 501-506
- 9 Baron TH, Harewood GC, Morgan DE, Yates MR. Outcome differences after endoscopic drainage of pancreatic necrosis, acute pancreatic pseudocysts, and chronic pancreatic pseudocysts. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 7-17
- 10 Warshaw AL, Banks PA, Fernandez-Del Castillo C. AGA technical review: treatment of pain in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1998; 115: 765-776

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

全反式维甲酸对酒精性肝损伤大鼠肝脏retinoids含量和CYP2E1表达的影响

潘志红, 但自力, 龚发良, 郑宗军

潘志红, 龚发良, 郑宗军, 宜昌市第一人民医院消化内科 湖北省宜昌市 443000
但自力, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030
潘志红, 硕士, 主要从事肝脏疾病的研究。
通讯作者: 但自力, 430030, 湖北省武汉市, 武汉市汉口解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。
danzili@msn.com
电话: 027-83663611
收稿日期: 2007-06-26 修回日期: 2007-09-24

Effect of all-trans retinoic acid on retinoid concentrations and expression of CYP2E1 in the livers of ethanol-fed rats

Zhi-Hong Pan, Zi-Li Dan, Fa-Liang Gong, Zong-Jun Zheng

Zhi-Hong Pan, Fa-Liang Gong, Zong-Jun Zheng, Department of Gastroenterology, Yichang First People's Hospital, Yichang 443000, Hubei Province, China
Zi-Li Dan, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Professor Zi-Li Dan, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province, China. danzili@msn.com
Received: 2007-06-26 Revised: 2007-09-24

Abstract

AIM: To investigate the effects of low-dose all-trans-retinoic acid (ATRA) supplementation on the concentrations of hepatic retinoids, formation of polar retinoid metabolites (PRMs), expression of microsomal cytochrome P4502E1 (CYP2E1) and liver injury in ethanol-fed rats.

METHODS: A rat model of alcoholic liver disease (ALD) was induced by intragastric infusion of ethanol. Thirty male SD rats were randomly assigned to four groups: group A was a control group, rats of groups B, C and D were received intra-gastric infusion of alcohol (8 g/kg) for 8 weeks, and rats of groups C and D were administered all-trans-RA at two different doses (150 µg/kg body wt in group C and 1.5 mg/kg body

wt in group D), by intragastric infusion, for 4 weeks. The concentrations of retinoids in rat liver were detected using high-performance liquid chromatography (HPLC), the levels of CYP2E1 were measured by Western blotting, and pathological changes in the livers were observed under light microscope.

RESULTS: Retinoid (vitamin A, RA, retinyl palmitate) concentrations in the livers of ethanol-fed rats were markedly diminished (8.13 ± 1.379 nmol/g, 0.077 ± 0.029 nmol/g and 132.6 ± 6.472 nmol/g, respectively, *vs* 21.43 ± 2.944 nmol/g, 0.183 ± 0.037 nmol/g and 221.1 ± 10.35 nmol/g; $P < 0.01$) in group B animals compared with those in group A animals. Furthermore, obvious peaks representing PRMs were observed in extracts from the livers of group B animals. In group C animals, the RA and vitamin A concentrations were raised to control levels and the retinyl palmitate concentrations were partially restored ($P < 0.05$). In group D animals, RA and retinyl palmitate concentrations were completely restored. However, the vitamin A concentrations were higher than those of controls (27.26 ± 3.149 nmol/g *vs* 21.43 ± 2.944 nmol/g, $P < 0.05$). Histological observation of liver tissues indicated that ATRA treatment notably reduced hepatocellular swelling and steatosis, but the expression of CYP2E1 was not affected by ATRA.

CONCLUSION: Low-dose ATRA treatment can restore retinoid concentrations and abolish PRMs formation in the livers of ALD rats, and eventually ameliorates liver injury.

Key Words: Alcoholic liver disease; All-trans retinoic acid; Retinoids; CYP2E1; High-performance liquid chromatography; Western blotting

Pan ZH, Dan ZL, Gong FL, Zheng ZJ. Effect of all-trans retinoic acid on retinoid concentrations and expression of CYP2E1 in the livers of ethanol-fed rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3261-3266

摘要

目的: 研究补充小剂量全反式维甲酸(ATRA)

背景资料
酒精是世界范围内被广泛滥用的成瘾性物质, 长期大量饮酒可导致酒精性肝病(包括酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和肝硬化)及一些与酒精相关的疾病(酒精性心脏病、癌症等)。因此, 探讨这些疾病的病理生理机制和寻求有价值的治疗措施显得尤为重要。

研发前沿

不论在酗酒者还是在动物模型中,长期大量摄入酒精可导致肝脏维生素A及RA缺乏,肝脏中PRMs形成及CYP2E1表达增加。RA和CYP2E1在ALD发病中起重要作用,PRMs在ALD肝损害中所发挥的作用还未被阐明。维生素A缺乏和过量都有肝毒性,且乙醇可增强维生素A的毒性作用。

对酒精喂养大鼠肝脏维生素A类物质(retinoids, 主要是维生素A和RA)含量、维生素A类物质极性代谢产物(PRMs)形成,细胞色素P4502E1(CYP2E1)表达和肝细胞损伤的影响。

方法: 将30只SD大鼠随机分为A组(正常对照组)、B组(单纯乙醇组)、C组(无水乙醇8 g/kg ig 8 wk+150 μ g/kg ATRA)、D组(无水乙醇8 g/kg ig 8 wk+1.5 mg/kg ATRA ig 4 wk)四组。光镜下观察肝组织病理变化,高效液相色谱(HPLC)技术测定肝组织中Vitamin A类物质(retinoids)的含量,Western blotting检测肝脏CYP2E1的表达。

结果: B组大鼠肝脏RA、维生素A(Retinol)和维生素A棕榈酸酯(retinyl palmitate)与A组相比含量显著降低(0.077 ± 0.029 nmol/g vs 0.183 ± 0.037 nmol/g, 8.13 ± 1.379 nmol/g vs 21.43 ± 2.944 nmol/g, 132.6 ± 6.472 nmol/g vs 221.1 ± 10.35 nmol/g, $P < 0.01$),且肝脏中出现明显的PRMs。C组RA和Retinol含量恢复至A组水平,retinyl palmitate含量也部分恢复。D组RA和retinyl palmitate完全恢复至正常水平,而Retinol水平较A组升高(27.26 ± 3.149 nmol/g vs 21.43 ± 2.944 nmol/g, $P < 0.05$)。两种剂量的ATRA均可完全阻止PRMs形成。病理组织学检查显示补充ATRA可明显减轻肝细胞肿胀、脂肪变性,但对CYP2E1的表达没有明显影响。

结论: 小剂量ATRA能恢复酒精性肝病(ALD)大鼠肝脏retinoids含量,阻止PRMs产生,从而减轻肝细胞损伤。

关键词: 酒精性肝病; 全反式维甲酸; Retinoids; CYP2E1; 高效液相色谱; 免疫印迹

潘志红, 但自力, 龚发良, 郑宗军. 全反式维甲酸对酒精性肝损伤大鼠肝脏retinoids含量和CYP2E1表达的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(31):3261-3266

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3261.asp>

0 引言

长期大量饮酒可改变肝脏维生素A代谢,导致肝脏维生素A及维甲酸(RA)缺乏^[1],肝脏中PRMs形成及CYP2E1表达增加^[2],PRMs可能在ALD的发病机制中起重要作用。RA是维生素A最具有生物活性的代谢物,他在控制细胞增殖、分化及正常功能发挥中起重要调节作用^[1]。但自力 *et al* 研究证实PRMs通过诱导肝细胞凋亡而对肝细

胞产生毒性作用。Chung *et al*^[4]研究发现小剂量ATRA可抑制乙醇导致的大鼠肝细胞过度增生。本实验通过建立酒精性肝损伤模型,观察小剂量ATRA对肝脏retinoids和PRMs含量、CYP2E1表达及肝脏损伤的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠30只,体质量180-220 g,由本校实验动物学部提供。标准品(色谱级)视黄醇(Retinol)、视黄醇棕榈酸酯(retinyl palmitate)、RA和内标视黄醇醋酸酯(retinyl acetate)均购自Sigma公司,甲醇(色谱纯)和正己烷(分析纯)为天津市标准科技有限公司产品。无水乙醇(分析纯)由上海振兴化工一厂生产。CYP2E1多克隆抗体由德国埃尔兰根-纽伦堡大学医学部肝病实验室友情赠送,增强化学发光(ECL)试剂为Pierce公司产品,免疫组化SP试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。高效液相色谱仪HPLC为美国Waters公司生产: 2690型分离单元,996型二极管阵列检测器,自动进样装置,Millennium 3.20版本数据工作站。色谱柱: Eurospher C 18反相色谱柱,250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m(产自德国KNAUER公司)。

1.2 方法 将30只SD大鼠随机分为4组(A、B、C、D组),正常对照组(A组)6只,实验组(B、C、D组)各8只。B、C、D组用无水乙醇和生理盐水配制的500 mL/L乙醇溶液ig,开始剂量为4 g/kg体质量,经过2 wk的适应期,剂量逐渐加大到8 g/kg体质量,分早晚两次ig。A组以等量生理盐水ig,其余条件相同。8 wk后,C、D组开始同时给予ATRA ig,剂量分别为150 μ g/kg、1.5 mg/kg,持续4 wk。实验期间各组大鼠自由进食全价营养颗粒饲料及饮用水。每周记录大鼠体质量一次。造模结束后,各组大鼠禁食过夜,然后用60 g/L水合氯醛0.5 mL/100 g ip麻醉,心脏取血2份。一份肝素抗凝,3000 r/min离心15 min获取血浆;另一份直接3000 r/min离心15 min获得血清。取出肝脏,取部分肝组织固定制作光镜切片,其余肝脏速冻于液氮中,随后放入-80 $^{\circ}$ C冰箱储存以待检测。

1.2.1 肝脏标本retinoids提取: 参照Liu *et al*^[2]所述方法,取肝组织约0.3 g,加入冰上预冷的HEPES Buffer 1 mL和甲醇0.5 mL,冰上匀浆后取1 mL匀浆液,依次加入0.5 mol/L KOH乙醇溶液150 μ L、无水乙醇50 μ L、内标溶液100 μ L,再加入4 mL正己烷,旋涡振荡1 min,然后4 $^{\circ}$ C下4000 r/min离心10 min,将上清正己烷层转移至另一试

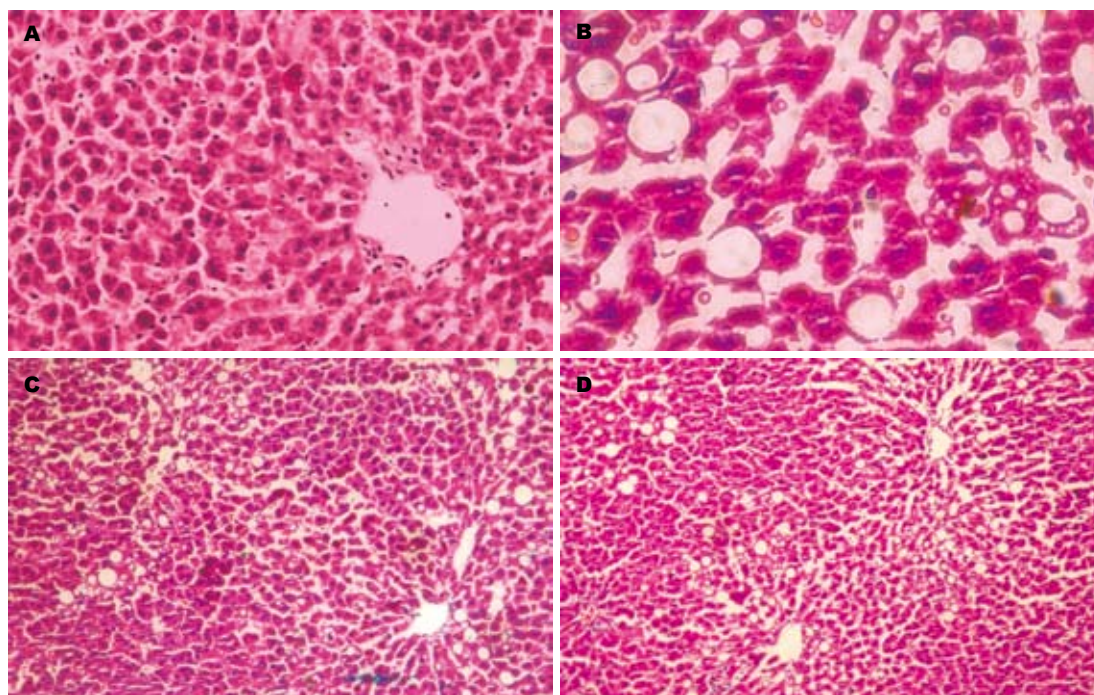


图 1 大鼠肝脏病理组织学变化. A: 对照组; B: 单纯乙醇ig组; C: 乙醇ig+ATRA 150 µg/kg; D: 乙醇ig+ATRA 1.5 mg/kg; A-B放大倍数($\times 200$); C-D放大倍数($\times 100$).

创新盘点
本实验使用小剂量ATRA对酒精灌胃大鼠进行干预, 采用HPLC检测大鼠肝脏retinoids含量的变化, 进一步证实了PRMs形成在酒精性肝损害发病中有重要作用, 小剂量ATRA对酒精性肝损害起保护作用.

管, 剩余物中加入6 mol/L盐酸100 µL, 再次用4 mL正己烷提取. 把两次提取物混合, 氮气流吹干正己烷, 无水乙醇重新溶解干燥物待用. 上述动物处死取标本和retinoids的提取过程均在避光条件下进行, 以防retinoids遇光分解.

1.2.2 HPLC分析: (1)HPLC流动相: 溶液A: 甲醇-水(70:30, V/V, 水中含10 g/L醋酸铵), 溶液B: 甲醇. (2)流动相梯度设置: 1000 mL/L溶液A持续8 min, 接着10 min的线性梯度至300 mL/L溶液A和700 mL/L溶液B, 然后20 min的线性梯度至1000 mL/L溶液B, 并持续20 min, 最后2 min的梯度回至1000 mL/L溶液A^[2]. (3)流速: 1 mL/min. (4)检测波长: 340 nm. (5)RA、Retinol、retinyl acetate和retinyl palmitate的洗脱时间分别是22.3 min、27.6 min、32.2 min和46.7 min. (6)retinoids各成分含量的计算是以内标retinyl acetate的HPLC峰面积为基础.

1.2.3 Western blot: 肝组织约0.2 g, 加入匀浆液(100 mmol Tris, pH7.4, 0.1 mmol EDTA, 0.32 mol蔗糖, 0.1 mmol DDT和蛋白酶抑制剂PMSF, Aprotinin, Leupeptin)冰上匀浆, 然后进行低温差速离心: 4600 r/min离心5 min, 取上清, 8200 r/min离心5 min, 取上清, 275 000 r/min离心60 min. 将沉淀物混悬于此缓冲液: 100 mmol Tris, pH7.4, 0.1 mmol EDTA, 0.1 mmol DDT, 1.15%(W/V)KCl和20%(V/V)甘油^[5]. Bradford比

色法测定蛋白浓度, 进行SDS-PAGE电泳(4%浓缩胶, 12%分离胶), 电转移法将蛋白质转移至醋酸纤维素膜(NC膜), 50 g/L脱脂牛奶封闭1 h, 兔抗人多克隆CYP2E1抗体(1:1800)37℃孵育1.5 h, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG(1:2000)37℃孵育1 h, 增强化学发光法(ECL)显色, X光片曝光显影.

统计学处理 使用SPSS11.5统计软件包进行统计学处理. 试验数据以mean±SD表示, 计量资料采用单因素方差分析, 各处理组间用最小显著性差数法(LSD)进行多重比较.

2 结果

2.1 肝组织石蜡切片HE染色结果 对照组肝组织结构完整, 肝细胞索排布规则. 单纯乙醇ig组肝细胞出现明显脂肪变性, 主要位于肝小叶中心带, 胞体肿大甚至成球形, 胞质透明, 胞核被挤至胞质边缘, 肝窦受压, 肝索紊乱. 有散在肝细胞点状坏死, 坏死灶区和汇管区有炎性细胞浸润. 乙醇ig+RA 150 µg/kg组和乙醇ig+RA 1.5 mg/kg组肝细胞脂肪变性较单纯乙醇灌胃组减轻, 胞体肿大但无球形, 胞质网状, 无肝细胞点状坏死. 肝索排列欠整齐(图1).

2.2 HPLC肝脏retinoids含量 乙醇ig 3 mo后, 与正常对照组相比, 单纯乙醇ig组大鼠肝脏RA含量降低了58%($P<0.01$), 而肝脏Retinol和retinyl

应用要点

尽管ALD患者肝脏维生素A及RA含量明显减少,但补充维生素A常加重酒精性肝损伤,故临床应用时需谨慎考虑其狭窄的治疗窗。因此探索RA治疗ALD的最适剂量,以达到最大治疗效果最小毒性作用具有重要的临床意义。

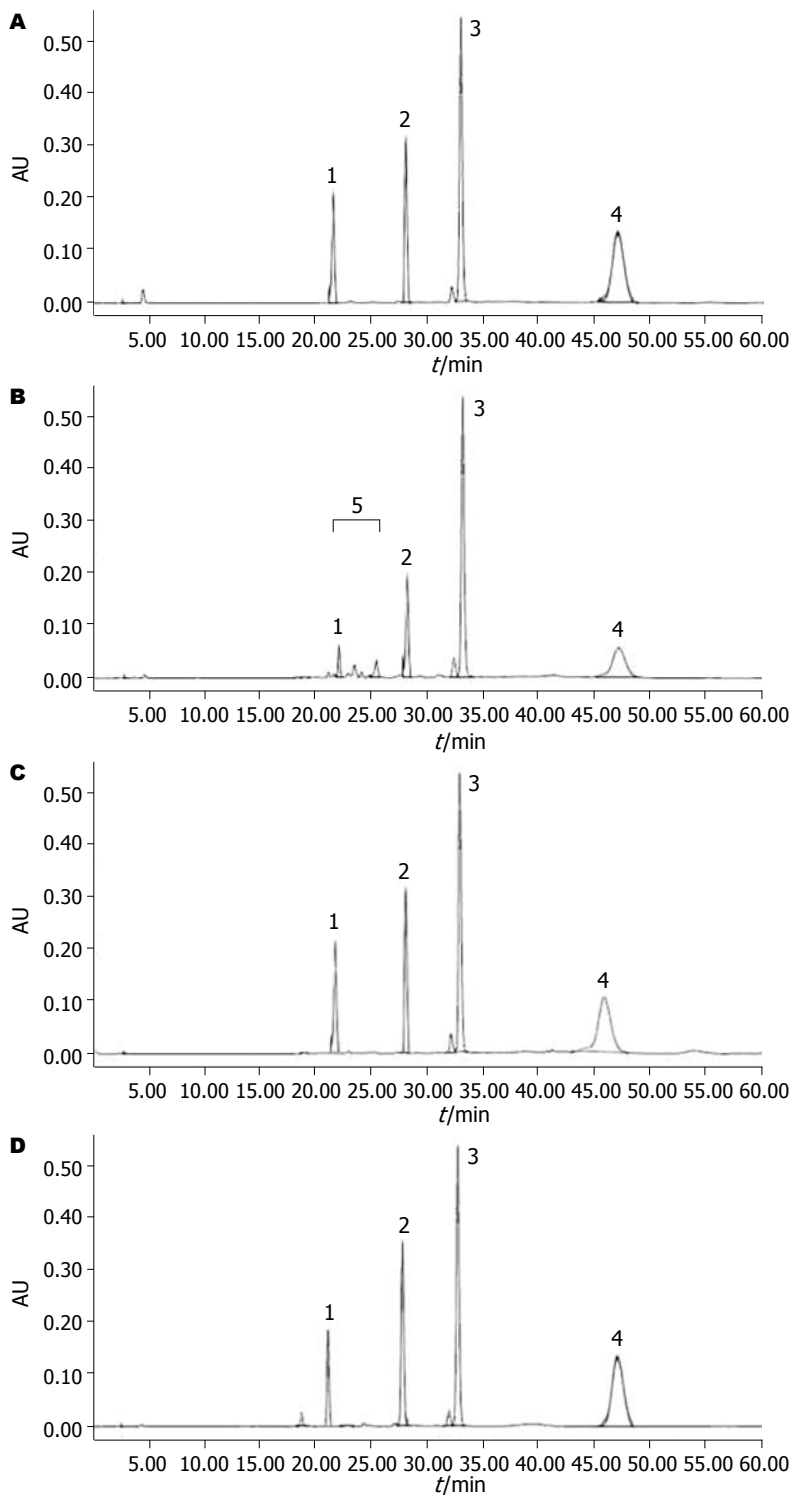


图2 肝组织retinoids提取物高效液相色谱图。A: 正常对照组; B: 单纯乙醇ig组; C: 乙醇ig+ATRA 150 µg/kg; D: 乙醇ig+ATRA 1.5 mg/kg; 1: RA; 2: 维生素A; 3: 内标, 视黄醇醋酸酯; 4: 视黄醇棕榈酸酯; 5: PRMs。

palmitate含量分别减少了60%及40% ($P < 0.01$)。然而与单纯乙醇ig组相比, 对乙醇ig的大鼠给予两种不同剂量(150 µg/kg和1.5 mg/kg体质量)的RA均可恢复肝脏RA含量至正常水平。补充RA 150 µg/kg使肝脏Retinol含量恢复至对照组水平, 补充RA 1.5 mg/kg则使肝脏Retinol含量高于对照组水平, 两者差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。与对照组和单纯乙醇ig组比较, 给予RA 150 µg/kg可部分恢复肝脏retinyl palmitate水平 ($P < 0.05$), RA 1.5 mg/kg则

完全恢复肝脏retinyl palmitate至正常水平(表1)。

从HPLC色谱图(图2)可看出, 在单纯乙醇ig组大鼠肝脏, 21 min至26 min处出现明显乙醇诱导的肝脏retinoids极性代谢产物(PRMs), 而两种剂量的RA补充均可阻止该极性产物的产生。

2.3 Western blot结果 对照组大鼠肝脏CYP2E1表达低下, 在乙醇的诱导下, CYP2E1的表达显著升高 ($P < 0.01$), 灰度值约为对照组的4倍。乙醇ig后给予RA补充, 150 µg/kg和1.5 mg/kg均未明显

表 1 各组大鼠肝脏retinoids含量(mean \pm SD, $n = 6$)

浓度 (nmol/g肝组织)	正常对照组	单纯乙醇ig组	乙醇ig+ RA(150 μ g/kg)	乙醇ig+ RA(1.5 mg/kg)
RA	0.183 \pm 0.037 ^d	0.077 \pm 0.029	0.181 \pm 0.027 ^d	0.179 \pm 0.023 ^d
Retinol	21.43 \pm 2.944 ^d	8.13 \pm 1.379	22.05 \pm 2.977 ^d	27.26 \pm 3.149 ^{ad}
retinyl palmitate	221.1 \pm 10.35 ^d	132.6 \pm 6.472	175.3 \pm 18.16 ^{bd}	212.9 \pm 15.51 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^d $P < 0.01$ vs 单纯乙醇ig组.

降低CYP2E1的表达($P > 0.05$)(图3).

3 讨论

大量研究发现, 酒精性肝病患者的肝脏维生素A含量明显降低. 甚至当肝损伤只是中度(脂肪肝), 血液中维生素A、视黄醇结合蛋白(RBP)等未受影响时, 肝脏中维生素A就已显著降低. 本研究发现, 大鼠长期大量摄入乙醇后, 肝脏维生素A、RA和retinyl palmitate及血浆中RA大幅度降低, 但血浆中retinyl palmitate不受明显影响. 此与Wang *et al*^[9]和Chung *et al*^[10]报道一致. 乙醇干扰retinoids在肝脏的代谢主要有以下3种机制: (1)乙醇是维生素A氧化代谢成RA的一种竞争性抑制剂, 正常情况下乙醇在体内主要由乙醇脱氢酶(ADH)氧化成乙醛接着由乙醛脱氢酶(ALDH)氧化成乙酸排出体外. 维生素A与乙醇共同拥有ADH、ALDH这条代谢途径. 乙醇可竞争性抑制ADH和ALDH, 阻止维生素A氧化为RA^[11]. (2)乙醇诱导肝微粒体细胞色素P450 2E1(CYP2E1)表达显著增加, 使维生素A和RA代谢成各种极性产物明显增多^[8]. (3)乙醇促进视黄醇酯(维生素A的储存形式)从肝脏转移到肝外组织器官增多^[11].

PRMs是一类物质的总称, 包括4-oxo-RA, 18-OH-RA和一些未被确认的产物^[7,16]. PRMs在ALD肝损害中所发挥的作用还未被阐明. Dan *et al*^[3]已从细胞水平证实PRMs具有肝细胞毒性. 他们从酒精ig的大鼠肝脏中将PRMs提取出来, 作用于HepG2细胞和大鼠原代肝细胞, 结果证明PRMs以浓度依赖和时间依赖方式通过诱导凋亡导致肝细胞死亡. 本实验结果显示, PRMs在大鼠酒精性肝损伤中明显增高, 给酒精ig大鼠补充ATRA 4 wk后, 2种剂量的ATRA处理组均无PRMs产生. 同时, 150 μ g/kg组大鼠肝脏的维生素A、RA和血浆中RA完全恢复到正常对照组水平, 肝脏中retinyl palmitate得到部分恢复; 1.5

名词解释

PRMs: 维生素A类物质极性代谢产物, 是一类物质的总称, 包括4-oxo-RA, 18-OH-RA和一些未被确认的产物. 通过CYP2E1, 维生素A和RA被生物转化为PRMs, PRMs可能是促进酒精性肝损害的毒性物质.

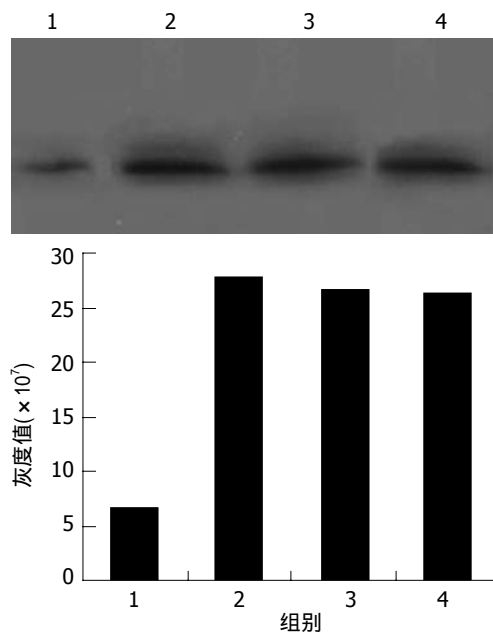


图 3 各组大鼠肝脏CYP2E1表达. 1: 正常对照组; 2: 单纯乙醇ig组; 3: 乙醇ig+ATRA 150 μ g/kg; 4: 乙醇ig+ATRA 1.5 mg/kg.

mg/kg组大鼠肝脏retinyl palmitate可完全回复至正常水平, 但是维生素A的水平却高于对照组, 此可能与RA反馈抑制维生素A的氧化和促进维生素A酯化有关. 故推测ATRA阻滞PRMs的形成可能是由于ATRA补充可恢复肝脏维生素A代谢平衡, 使维生素A和RA含量正常.

CYP2E1是微粒体呼吸链上的一种氧化酶, 在ALD发病中起非常重要的作用, 长期大量乙醇摄入可以使其含量增加10倍之多^[13]. CYP2E1可将许多小分子物质代谢活化成毒性产物, 如将乙醇代谢成具有毒性的乙醛, 并产生氧自由基, 促进脂质过氧化等^[15]. 通过CYP2E1, 维生素A和RA被生物转化为PRMs, CYP2E1抑制剂氯美噻唑可以有效阻止PRMs产生^[7]. 本试验结果显示, 补充ATRA不能明显降低CYP2E1的表达, 但却能阻止PRMs产生. 此可能是由于CYP2E1的活性受到抑制, 也可能是另有途径阻止PRMs

同行评价
本文结构合理, 方法先进, 分析有据, 图文并茂, 有一定的可读性和科学性.

的产生.

本研究证明小剂量ATRA补充可能通过恢复乙醇导致的肝脏维生素A和RA缺乏, 阻止PRMs产生, 从而减轻酒精性肝损伤. 本实验进一步证实了PRMs形成在酒精性肝损害发病中的作用, 但是其具体作用机制以及高剂量ATRA对酒精性肝病的影响还不十分清楚, 有待我们进一步研究.

4 参考文献

- 1 Seitz HK, Stickel F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 599-612
- 2 Liu C, Russell RM, Seitz HK, Wang XD. Ethanol enhances retinoic acid metabolism into polar metabolites in rat liver via induction of cytochrome P4502E1. *Gastroenterology* 2001; 120: 179-189
- 3 Dan Z, Popov Y, Patsenker E, Preimel D, Liu C, Wang XD, Seitz HK, Schuppan D, Stickel F. Hepatotoxicity of alcohol-induced polar retinol metabolites involves apoptosis via loss of mitochondrial membrane potential. *FASEB J* 2005; 19: 845-847
- 4 Chung J, Chavez PR, Russell RM, Wang XD. Retinoic acid inhibits hepatic Jun N-terminal kinase-dependent signaling pathway in ethanol-fed rats. *Oncogene* 2002; 21: 1539-1547
- 5 Howard LA, Micu AL, Sellers EM, Tyndale RF. Low doses of nicotine and ethanol induce CYP2E1 and chlorzoxazone metabolism in rat liver. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 542-550
- 6 Sundaresan PR, Collins TF, Whitby KE, Welsh JJ, Black TN, Shackelford M, Flynn T, Newell RF, O'Donnell MW. Effect of ethanol and vitamin A excess on vitamin A status in the liver, plasma and fetuses of pregnant rats. *Food Chem Toxicol* 1994; 32: 247-254
- 7 Liu C, Chung J, Seitz HK, Russell RM, Wang XD. Chlormethiazole treatment prevents reduced

hepatic vitamin A levels in ethanol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 1703-1709

- 8 Leo MA, Lieber CS. Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 1071-1085
- 9 Wang XD, Liu C, Chung J, Stickel F, Seitz HK, Russell RM. Chronic alcohol intake reduces retinoic acid concentration and enhances AP-1 (c-Jun and c-Fos) expression in rat liver. *Hepatology* 1998; 28: 744-750
- 10 Chung J, Liu C, Smith DE, Seitz HK, Russell RM, Wang XD. Restoration of retinoic acid concentration suppresses ethanol-enhanced c-Jun expression and hepatocyte proliferation in rat liver. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1213-1219
- 11 Wang XD. Chronic alcohol intake interferes with retinoid metabolism and signaling. *Nutr Rev* 1999; 57: 51-59
- 12 Leo MA, Kim C, Lieber CS. Increased vitamin A in esophagus and other extrahepatic tissues after chronic ethanol consumption in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 1986; 10: 487-492
- 13 Lieber CS. Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)--a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 991-1007
- 14 Kessova I, Cederbaum AI. CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3: 509-518
- 15 Mishin VM, Rosman AS, Basu P, Kessova I, Oneta CM, Lieber CS. Chlorzoxazone pharmacokinetics as a marker of hepatic cytochrome P4502E1 in humans. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2154-2161
- 16 Wang XD, Krinsky NI, Russell RM. Retinoic acid regulates retinol metabolism via feedback inhibition of retinol oxidation and stimulation of retinol esterification in ferret liver. *J Nutr* 1993; 123: 1277-1285
- 17 Shimada T, Ross AC, Muccio DD, Brouillette WJ, Shealy YF. Regulation of hepatic lecithin:retinol acyltransferase activity by retinoic acid receptor-selective retinoids. *Arch Biochem Biophys* 1997; 344: 220-227

编辑 程剑侠 电编 何基才

环孢素A对顺铂诱导肝癌细胞凋亡的影响

曾兆林, 崔云甫, 彭威

曾兆林, 崔云甫, 彭威, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086

曾兆林, 1989年哈尔滨医科大学学士, 2005年哈尔滨医科大学外科学博士, 副主任医师, 主要从事普通外科的临床工作。

黑龙江省自然科学基金资助项目, No. 0331

通讯作者: 曾兆林, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科. zengzhaolin@sina.com
电话: 0451-86605356

收稿日期: 2006-12-29 修回日期: 2007-10-14

Effect of cyclosporine A on cisplatin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells

Zhao-Lin Zeng, Yun-Fu Cui, Wei Peng

Zhao-Lin Zeng, Yun-Fu Cui, Wei Peng, Department of General Surgery of the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by: the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. 0331

Correspondence to: Dr. Zhao-Lin Zeng, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 246 Xuefu Road, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zengzhaolin@sina.com

Received: 2006-12-29 Revised: 2007-10-14

Abstract

AIM: To investigate the effect of cyclosporine A (CsA) on cisplatin (CDDP)-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma (HCC) cells.

METHODS: SMMC 7721 HCC cells were cultured (re-cultured every 3 d) and divided into six groups: A (control), B (10 mg/L CsA), C (40 mg/L CsA), D (20 mg/L CDDP), E (10 mg/L CsA + 20 mg/L CDDP), and F (40 mg/L CsA + 20 mg/L CDDP). Morphological changes were observed by fluorescence microscopy, cell growth was assessed with the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay at 24 and 48 h, and apoptosis was assessed by flow cytometry.

RESULTS: The number of necrotic cells in groups E and F was more and the number of apoptotic HCC cells was significantly lower in groups E and F than in group D. The apoptotic rate was significantly lower in groups E (22.7% ± 2.4%) and F (22.8% ± 2.8%) than in group D (32.7%

± 2.8%, $P = 0.008$). The rate of apoptosis in groups A, B and C was the lowest, although there were no obvious differences between the groups.

CONCLUSION: CsA decreases the rate of CD-DP-induced apoptosis in HCC cells.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Cyclosporine A; Cisplatin; Apoptosis; Methyl thiazolyl tetrazolium assay; Flow cytometry

Zeng ZL, Cui YF, Peng W. Effect of cyclosporine A on cisplatin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3267-3271

摘要

目的: 探讨免疫抑制剂环孢素A(cyclosporine A, CsA)对顺铂(cisplatin, CDDP)诱导的肝癌细胞(hepatocellular carcinoma cells, HCC)凋亡的影响及可能机制。

方法: 采用SMMC7721肝癌细胞进行培养, 3 d传一代。分成A组(空白对照)、B组(加入10 mg/L的CsA)、C组(加入40 mg/L的CsA)、D组(加入20 mg/L的CDDP)、E组(加入10 mg/L的CsA+20 mg/L的CDDP)、F组(加入40 mg/L的CsA+20 mg/L的CDDP), 在荧光显微镜下观察各组细胞的形态学变化, 采用噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法测定细胞24 h及48 h存活率, 并用流式细胞仪检测各组细胞在24 h的凋亡率。

结果: E, F组在倒置光学显微镜下呈现多量细胞坏死, 凋亡小体较D组明显减少。D组凋亡率最高, 为32.7%±2.8%; 而E, F组凋亡率分别为22.7%±2.4%及22.8%±2.8%; A, B, C组凋亡率最低且组间差异不明显。E, F组与D组相比差异显著($P = 0.008$)。

结论: CsA可以抑制CDDP诱导的肝癌细胞凋亡。

关键词: 肝癌; 环孢素; 顺铂; 凋亡; 噻唑蓝比色法; 流式细胞仪

曾兆林, 崔云甫, 彭威. 环孢素A对顺铂诱导肝癌细胞凋亡的影响

背景资料

环孢素和顺铂都有较强的广谱抗癌作用, 并且与多种抗肿瘤药有协同作用, 且无交叉耐药等特点, 为当前联合化疗中最常用的药物之一。关于环孢素应用于移植后排异反应, 各方说法不一, 有人认为可增加癌症的复发率, 有人认为无影响。本实验设计了几种不同的方案来验证CsA对肝癌细胞凋亡的影响。

研发前沿

本文的热点在于不同浓度的CsA对肝癌细胞凋亡的影响是不同的,关于此方面的争论一直是临床中不断的话题。Caspase家族与凋亡的关系近年越来越受到大家的重视,CsA与凋亡的关系及对caspase-3的影响一直是本研究领域中亟待解决的问题,而顺铂与凋亡的关系近年来也成为研究的重点。

响. 世界华人消化杂志 2007;15(31):3267-3271
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3267.asp>

0 引言

肝移植后常规应用免疫抑制剂环孢素A(cyclosporine A, CsA),但是对于肝癌患者,肝移植后应用CsA是否会导致肿瘤的高复发及CsA对肝癌细胞凋亡的影响仍存在争议。顺铂(cisplatin, CDDP)属细胞周期非特异性药物,可抑制癌细胞的DNA复制过程,并损伤其细胞膜上结构,有较强的广谱抗癌作用,并且与多种抗肿瘤药有协同作用,且无交叉耐药等特点,为当前联合化疗中最常用的药物之一。我们通过体外实验观察CsA对CDDP诱导的肝癌细胞凋亡产生的影响及探讨可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系SMMC7721,由本院实验中心刘伟老师培养并提供,在含有100 mL/L胎牛血清、青霉素(100 kU/L)及链霉素(100 kU/L)的高糖DMEM培养基中37℃、50 mL/L CO₂条件下培养,每3 d传一代。优级胎牛血清、高糖DMEM培养基购自Hyclone公司,Annexin-V凋亡检测试剂盒购自晶美生物工程公司,caspase-3活性检测试剂盒购自BioVision公司,3,4-甲基-2-噻唑基-2,5-二苯基溴化四氮唑(MTT)为Ameresco公司产品,环孢素-A(甲醇溶解)、DMSO(二甲基亚砜)为Sigma公司产品,CDDP购自齐鲁制药厂。

1.2 方法

1.2.1 细胞存活率检测:将处于对数期的SMMC7721细胞接种于96孔板200 μL完全培养基中,每孔细胞数为 1×10^5 。分别加终浓度为10, 20, 30, 40, 50 mg/L的CsA,对照组加入等体积的PBS溶液,每组设3个复孔。培养48 h,每24 h检测1次细胞存活率,方法:加入20 μL MTT (5 mg/L),孵育4 h,终止培养,1500 r/min离心5 min,弃去上清,每孔加入DMSO 200 μL,充分振荡混匀,于酶标仪SLT spectra, Austria上测定450 nm的吸光度A值。按下列公式计算细胞存活率 = (实验组吸光度/对照组吸光度) × 100%。

1.2.2 细胞凋亡的诱导:取对数生长期细胞,分成6组:A组(对照组)加入与实验组等量的甲醇(无CsA)及PBS稀释液(无CDDP),B组(单纯加入mg/L/mL的CsA),C组(单纯加入40 mg/L的CsA),D组(单纯加入20 mg/L的CDDP),E组(同时加入10 mg/L的CsA及20 mg/L的CDDP),F组(同时加入40 mg/L的CsA及20 mg/L的CDDP)。以上各组

均作用24 h,以诱导细胞凋亡。

1.2.3 caspase-3的活性检测:收集上述各组细胞,1000 r/min离心10 min,用预冷的PBS液洗涤1次;加入caspase-3活性检测试剂盒提供的细胞裂解液50 μL置于冰上反应10 min,10 000 g离心1 min;将裂解物分离出来加入96孔板,每孔加入4 mmol/L的DEVD-pna 5 μL在37℃反应1-2 h;于酶标仪SLT spectra, Austria上测定450 nm的吸光度A值。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡:收集上述各组细胞,总数为 1×10^6 以上,1000 r/min离心10 min,用预冷的含PBS液洗涤2次,然后制成500 μL细胞悬液,经过300目尼龙滤网过滤后加入Annexin-V FITC 10 μL及20 g/L的碘化丙啶(propidine iodide, PI) 5 μL,4℃下避光反应15 min后送流式细胞室进行肝癌细胞早期凋亡的流式细胞仪(BD FACSsort, USA)检测,软件系统为Cell Quest 3.0,流式细胞数据分析使用WinMDI 2.8。

收集上述各组细胞,在倒置光学显微镜下观察各组细胞的形态学变化。

统计学处理 所有数据采用mean ± SD表示,数据处理使用统计软件进行t检验和方差分析。统计软件使用SPSS13.0,显著性水平为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞形态的变化 对照组细胞贴壁生长良好,边界清楚,呈上皮样细胞形态,可见较多的核分裂相。单纯CsA组作用48 h后可见细胞形态基本与对照组相同,核分裂相略少,边界稍模糊,但细胞贴壁生长良好。单纯CDDP组作用48 h后可见大部分细胞凋亡,细胞褶皱为圆形,折光率减弱,细胞间距变大,可见凋亡小体,少部分细胞坏死。CDDP联合CsA组作用48 h后可见多量细胞坏死,细胞肿大,细胞膜破裂,贴壁能力下降,多数脱落漂浮于培养液中,部分细胞可见凋亡形态特征(图1)。

2.2 SMMC7721细胞生长抑制率 结果显示,CsA在10-50 mg/L的范围内对肝癌细胞的生长抑制呈减弱趋势,浓度越高,作用时间越长,对肝癌细胞生长的影响越小。10 mg/L组对肝癌细胞生长抑制作用最强,其他各组在48 h后抑制作用明显减弱,与空白对照组比较无差异(表1)。

2.3 SMMC7721细胞凋亡及坏死 检测结果显示,D组诱导细胞凋亡率最高,为 $32.7\% \pm 2.8\%$ 。E、F组细胞凋亡率较D组低,分别为 $22.7\% \pm 2.4\%$ 和 $22.8\% \pm 2.8\%$ 。两组之间无明显差异($P > 0.05$),但

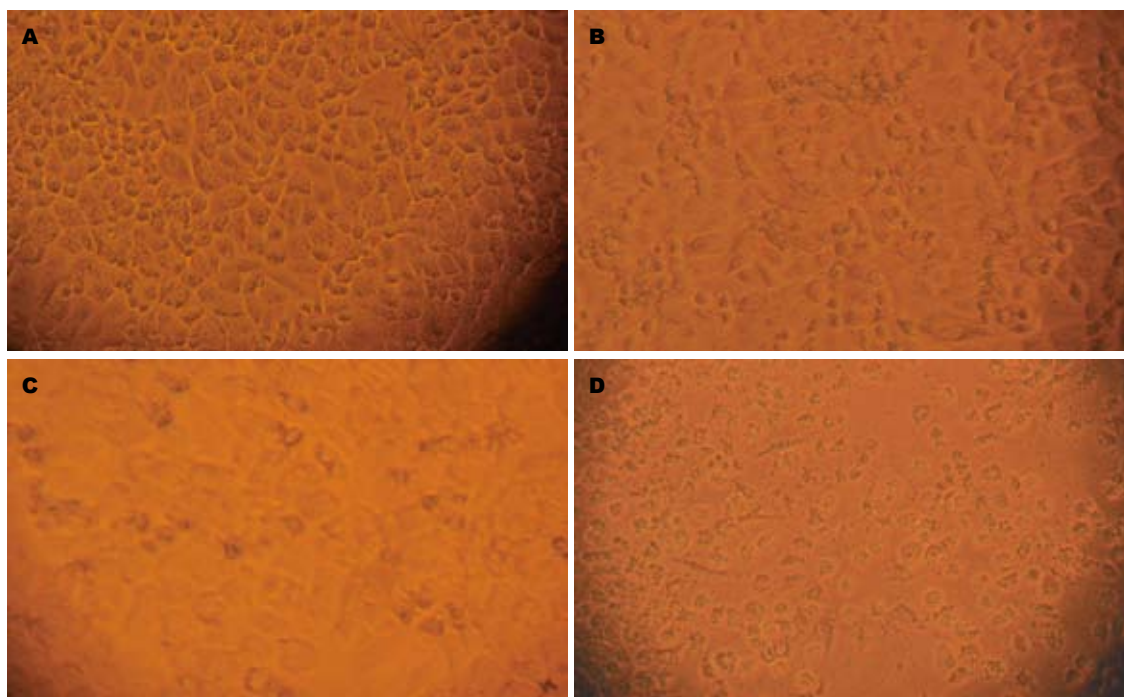


图1 SMMC7721细胞形态学变化(倒置显微镜×100). A: 对照组; B: CsA; C: CDDP; D: CDDP+CsA.

与D组相比差异显著($P = 0.008$). A, B, C 3组凋亡率及坏死率最低, 组间差异不明显(表2).

2.4 caspase-3活性的检测 A组与B组各时段与单纯裂解液空白对照组比较无变化, C组作用24 h后无变化, 48 h后变化较明显. 其他各组作用24 h效果即很明显, E, F组作用48 h后效果最好(表2).

3 讨论

CsA是肝移植术后常规应用的免疫抑制剂, 但是肝癌患者行肝移植术后是否应用CsA, 用量多少始终是临床经常争论的一个话题. Freise *et al*^[1]通过动物实验证明, 在不应用抗癌药物的情况下, CsA对细胞凋亡呈抑制作用, 并且在某种程度上增加肝癌的复发率和肺部的转移率. Vivarelli *et al*^[2]根据82个肝癌肝移植患者的回顾性调查发现, 对于HCC的肝移植患者, 术后CsA的剂量高低对生存率有一定的影响. 因此, 国外有学者建议, 对于患恶性肿瘤的器官移植患者, 应尽量减少CsA的应用. 但随着对凋亡研究的深入, Hartel *et al*^[3]报道, CsA与细胞凋亡的关系呈双向性, 当浓度低时, 促进凋亡, 当浓度高时, 抑制凋亡^[4-5]. 国内也有CsA对肝癌细胞增殖和凋亡的影响及联合应用抗癌药物后肝癌细胞增殖、凋亡变化的报道^[6]. 从表1可以看出, CsA作用24 h后细胞的存活率明显增加, 证明凋亡率和坏死率降低, 说明CsA对细胞凋亡有抑制作用. 本研究没有观察48 h以后各组的存活

表1 MTT法测定CsA对肝癌细胞存活率的影响(mean ± SD, %)

t/h	CsA(mg/L)				
	10	20	30	40	50
24	23.3 ± 5.1 ^b	60.5 ± 8.2 ^b	57.4 ± 9.1 ^b	62.8 ± 8.5 ^b	65.5 ± 9.4 ^b
48	24.3 ± 4.7 ^b	92.0 ± 7.0	94.0 ± 5.1	93.0 ± 6.4	91.9 ± 8.0

^b $P < 0.01$ vs 对照组; 对照组存活率为100%.

率, 但根据以往的研究结果可以推测各组肝癌细胞的存活率可能进一步增加^[7-9]. 而表2的结果表明, CsA对肝癌细胞增殖的影响随着浓度的增加而减弱, 20 mg/L以上浓度的CsA对肝癌细胞的增殖几乎没有影响, 而20 mg/L以下浓度对肝癌细胞的增殖有抑制作用. 并且从表1的结果可以看出, CsA对肝癌细胞的增殖存在时效性, 时间越长, 抑制的效果越差^[7-8]. 众所周知, CsA对细胞凋亡的抑制作用主要体现在对线粒体渗透性转换孔存在特异性抑制, 通过与钙调磷酸酶结合而阻止线粒体膜电位下降, 进而抑制细胞色素C的释放而抑制细胞凋亡^[10-12]. 我们发现B, C组的凋亡率和坏死率与空白对照组相比没有统计学差异, 说明此剂量下的CsA对细胞凋亡的影响不大, 该结果与高金亭 *et al*^[7]的研究结果一致^[8-9, 13-15]. 这个结果同时也说明, 对于患恶性肿瘤的器官移植患者, 应用低浓度的CsA是安全可靠的, 不会引起肿瘤的复发和转移^[16-17]. 我们

创新盘点
本文中设计了不同浓度梯度的CsA, 并研究各种浓度下其对凋亡的影响, 以及用各种不同的方法研究CsA及CDDP的相互作用和可能的机制.

应用要点

本文结果表明, CsA对肝癌细胞增殖的影响随着浓度的增加而减弱, 20 mg/L以上浓度的CsA对肝癌细胞的增殖几乎没有影响。而20 mg/L以下浓度对肝癌细胞的增殖有抑制作用。CsA对CDDP诱导的凋亡发挥了抑制作用, 分析原因可能与其直接造成细胞坏死和其他因素有关, 所以临床中应用CsA抑制排斥反应时不应使用大剂量的CsA, 以免造成肿瘤的复发。

表 2 流式细胞仪检测SMMC7721细胞24 h的凋亡率及坏死率和caspase-3活性测定结果(mean ± SD)

		A组	B组	C组	D组	E组	F组
A ₄₅₀	%						
	凋亡率	10.8 ± 3.1	9.4 ± 2.6	10.7 ± 3.5	32.7 ± 2.8 ^b	22.7 ± 2.4 ^b	22.8 ± 2.8 ^b
	坏死率	20.8 ± 2.2	22.7 ± 2.6	19.8 ± 3.4	57.9 ± 5.8 ^b	70.3 ± 4.5 ^b	70.0 ± 4.0 ^b
	24 h	0.096 ± 0.019	0.088 ± 0.025	0.078 ± 0.018	0.143 ± 0.019 ^c	0.201 ± 0.039	0.256 ± 0.055
	48 h	0.078 ± 0.021	0.080 ± 0.023	0.101 ± 0.036 ^c	0.275 ± 0.040 ^d	0.377 ± 0.044	0.504 ± 0.043

^bP<0.01 vs A组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 对照组(24 h: 0.051 ± 0.031; 48 h: 0.054 ± 0.029)。

同样发现单纯CsA组与空白组的caspase-3活性变化没有统计学差异, 说明CsA虽然可以抑制细胞色素C释放, 但却不能阻止caspase-3的激活^[18-22], 而CsA对caspase-3下游酶活性的影响如何在国内外还没有相关的报道, 本实验亦没有涉及, 尚需日后进一步研究。CDDP是国内外比较常用的抗肿瘤药物, 可抑制癌细胞的DNA复制过程, 并损伤其细胞膜上结构^[23-25]。其对癌细胞的作用随着剂量的不同而改变, 小剂量引起细胞凋亡, 大剂量则主要引起细胞坏死^[26-30]。本实验中顺铂的剂量为临床常用剂量, 在此剂量下的顺铂主要通过诱导细胞凋亡而杀伤肝癌细胞, 而加入CsA后其诱导凋亡作用减弱了, 可以看出E、F两组的caspase-3活性虽然远远高于CDDP组, 但是流式细胞仪测定凋亡的结果却显示E、F组的凋亡率要小于单纯CDDP组, 说明CsA对于CDDP诱导的凋亡发挥了抑制作用。分析原因可能与其直接造成细胞坏死和其他因素有关, 其具体作用机制尚需进一步的研究证明。

4 参考文献

- Freise CE, Ferrell L, Liu T, Ascher NL, Roberts JP. Effect of systemic cyclosporine on tumor recurrence after liver transplantation in a model of hepatocellular carcinoma. *Transplantation* 1999; 67: 510-513
- Vivarelli M, Bellusci R, Cucchetti A, Cavrini G, De Ruvo N, Aden AA, La Barba G, Brillanti S, Cavallari A. Low recurrence rate of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: better patient selection or lower immunosuppression? *Transplantation* 2002; 74: 1746-1751
- Hartel C, Hammers HJ, Schlenke P, Fricke L, Schumacher N, Kirchner H, Muller-Steinhardt M. Individual variability in cyclosporin A sensitivity: the assessment of functional measures on CD28-mediated costimulation of human whole blood T lymphocytes. *J Interferon Cytokine Res* 2003; 23: 91-99
- Gabryel B, Chalimoniuk M, Stolecka A, Waniek K, Langfort J, Malecki A. Inhibition of arachidonic acid release by cytosolic phospholipase A2 is involved in the antiapoptotic effect of FK506 and cyclosporin A on astrocytes exposed to simulated ischemia in vitro. *J Pharmacol Sci* 2006; 102: 77-87
- Pompeo A, Baldassare M, Luini A, Buccione R. Cyclosporin A, but not FK506, increases arachidonic acid release and inhibits proliferation of pituitary corticotrope tumor cells. *Life Sci* 1999; 64: 837-846
- 张俊峰, 陈规划, 陆敏强, 李华, 蔡常洁, 杨扬, 陈伟. 环孢素A与他克莫司对阿霉素治疗肝癌影响的实验研究. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 425-426
- 高金亭, 郑树森, 梁廷波, 吴丽花, 余松峰, 金晶, 吴李鸣, 徐世国. 环孢素A或他克莫司联合表阿霉素对肝癌细胞增殖、凋亡的影响. *中华医学杂志* 2006; 86: 345-347
- Graziadei IW, Sandmueller H, Waldenberger P, Koenigsrainer A, Nachbaur K, Jaschke W, Margreiter R, Vogel W. Chemoembolization followed by liver transplantation for hepatocellular carcinoma impedes tumor progression while on the waiting list and leads to excellent outcome. *Liver Transpl* 2003; 9: 557-563
- Goldman B. Multidrug resistance: can new drugs help chemotherapy score against cancer? *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 255-257
- Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462
- Kwon KB, Kim EK, Lim JG, Jeong ES, Shin BC, Jeon YS, Kim KS, Seo EA, Ryu DG. Molecular mechanisms of apoptosis induced by Scorpio water extract in human hepatoma HepG2 cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 943-947
- Tiu J, Li H, Rassekh C, van der Sloot P, Kovach R, Zhang P. Molecular basis of posttransplant squamous cell carcinoma: the potential role of cyclosporine A in carcinogenesis. *Laryngoscope* 2006; 116: 762-769
- Huesker M, Folmer Y, Schneider M, Fulda C, Blum HE, Hafkemeyer P. Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-MDR1 ribozymes. *Hepatology* 2002; 36: 874-884
- Guba M, Graeb C, Jauch KW, Geissler EK. Pro- and anti-cancer effects of immunosuppressive agents used in organ transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 1777-1782
- Kim JA, Kang YS, Lee YS. Role of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in the mechanism of apoptosis induced by cyclosporin A in a human hepatoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 309: 291-297
- Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, Lemasters JJ. Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM811. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 22-29
- Yoo HY, Patt CH, Geschwind JF, Thuluvath PJ. The outcome of liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States between 1988 and 2001: 5-year survival has improved significantly with time. *J Clin Oncol* 2003;

- 21: 4329-4335
- 18 Hatano E, Bradham CA, Stark A, Iimuro Y, Lemasters JJ, Brenner DA. The mitochondrial permeability transition augments Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes. *J Biol Chem* 2000; 275: 11814-11823
- 19 Kerstan A, Armbruster N, Leverkus M, Hunig T. Cyclosporin A abolishes CD28-mediated resistance to CD95-induced apoptosis via superinduction of caspase-3. *J Immunol* 2006; 177: 7689-7697
- 20 Yang B, Jain S, Ashra SY, Furness PN, Nicholson ML. Apoptosis and caspase-3 in long-term renal ischemia/reperfusion injury in rats and divergent effects of immunosuppressants. *Transplantation* 2006; 81: 1442-1450
- 21 Sutton DJ, Tchounwou PB. Mercury-induced externalization of phosphatidylserine and caspase 3 activation in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Int J Environ Res Public Health* 2006; 3: 38-42
- 22 Mueller TH, Kienle K, Beham A, Geissler EK, Jauch KW, Rentsch M. Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 1267-1273
- 23 Seki K, Yoshikawa H, Shiiki K, Hamada Y, Akamatsu N, Tasaka K. Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteosarcoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 45: 199-206
- 24 Shin EC, Seong YR, Kim CH, Kim H, Ahn YS, Kim K, Kim SJ, Hong SS, Park JH. Human hepatocellular carcinoma cells resist to TRAIL-induced apoptosis, and the resistance is abolished by cisplatin. *Exp Mol Med* 2002; 34: 114-122
- 25 Sawada S, Mese H, Sasaki A, Yoshioka N, Matsumura T. Combination chemotherapy of paclitaxel and cisplatin induces apoptosis with Bcl-2 phosphorylation in a cisplatin-resistant human epidermoid carcinoma cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 51: 505-511
- 26 Okamura M, Hashimoto K, Shimada J, Sakagami H. Apoptosis-inducing activity of cisplatin (CDDP) against human hepatoma and oral squamous cell carcinoma cell lines. *Anticancer Res* 2004; 24: 655-661
- 27 Poma P, Notarbartolo M, Labbozzetta M, Sanguedolce R, Alaimo A, Carina V, Maurici A, Cusimano A, Cervello M, D'Alessandro N. Anti-tumor effects of the novel NF-kappaB inhibitor dehydroxymethyl-epoxyquinomicin on human hepatic cancer cells: analysis of synergy with cisplatin and of possible correlation with inhibition of pro-survival genes and IL-6 production. *Int J Oncol* 2006; 28: 923-930
- 28 Iwase M, Watanabe H, Kondo G, Ohashi M, Nagumo M. Enhanced susceptibility of oral squamous cell carcinoma cell lines to FAS-mediated apoptosis by cisplatin and 5-fluorouracil. *Int J Cancer* 2003; 106: 619-625
- 29 Kinoshita H, Yoshikawa H, Shiiki K, Hamada Y, Nakajima Y, Tasaka K. Cisplatin (CDDP) sensitizes human osteosarcoma cell to Fas/CD95-mediated apoptosis by down-regulating FLIP-L expression. *Int J Cancer* 2000; 88: 986-991
- 30 Mese H, Sasaki A, Nakayama S, Alcalde RE, Matsumura T. The role of caspase family protease, caspase-3 on cisplatin-induced apoptosis in cisplatin-resistant A431 cell line. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000; 46: 241-245

同行评价
本文研究方案设计合理, 简单明了, 文字流畅, 表达准确, 是一篇较好的论文。

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与, 包括: (1) 酝酿和设计实验, (2) 采集数据, (3) 分析/解释数据。第二方面是文章撰写, 包括: (1) 起草文章, (2) 对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持, 包括: (1) 统计分析, (2) 获取研究经费, (3) 行政、技术或材料支持, (4) 指导, (5) 支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。

二步法大鼠原位全小肠移植模型的建立与改进

朱亮, 李幼生, 黎介寿

背景资料
小肠移植是治疗终末期小肠功能衰竭的理想方法, 但由于解剖、生理等方面的独特性, 使小肠移植的发展落后于肾脏、肝脏和心脏等其他器官移植。动物模型在促进小肠移植的临床应用中起重要作用。狗、猪、鼠等动物模型的建立, 已用于进行小肠移植的研究。由于大鼠遗传背景明确、饲养环境和条件容易控制, 其实验结果也具有较较强的科学性和可比性等因素, 因此大鼠是小肠移植研究的最常用的动物模型。

朱亮, 大连医科大学生理教研室 辽宁省大连市 116027
李幼生, 黎介寿, 南京军区南京总医院全军普外科研究所 江苏省南京市 210002
朱亮, 讲师, 主要从事肠黏膜的损伤和保护, 器官移植和小肠移植方面的研究。
江苏省医学领军人才资助课题, No. 200710
辽宁省教育厅青年基金资助课题, No. 2004F088
国家973资助课题, No. 2003CB515502
通讯作者: 李幼生, 210002, 江苏省南京市, 南京军区南京总医院全军普外科研究所. zhuliang2001@nju.org.cn
电话: 025-86800137
收稿日期: 2007-07-12 修回日期: 2007-10-10

Establishment of two-step orthotopic small intestinal transplantation in rats

Liang Zhu, You-Sheng Li, Jie-Shou Li

Liang Zhu, Department of Physiology, Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China
You-Sheng Li, Jie-Shou Li, Research Institute of General Surgery, Nanjing PLA General Hospital, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Supported by: Outstanding Medical Academic Leader Program of Jiangsu Province, No. 200710; Science Fund for Young Scholars of Liaoning Province Department of Education, No. 2004F088; Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2003CB515502

Correspondence to: You-Sheng Li, Research Institute of General Surgery, Nanjing PLA General Hospital, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. zhuliang2001@nju.org.cn
Received: 2007-07-12 Revised: 2007-10-10

Abstract

AIM: To establish a simple and stable model of orthotopic small intestinal transplantation in rats that minimizes mortality.

METHODS: The graft removed *en bloc* consisted of the entire small intestine, portal vein and donor aortic segment, along with the superior mesenteric artery. The graft was perfused *in situ* and the gut lumen was irrigated during the operation. Revascularization was accomplished by end-to-side anastomosis of the graft aortic segment to the prepared recipient aorta, and by the formation of a cuff anastomosis between the donor portal vein and the recipient left renal vein. In the first part of the two-stage procedure, the distal end of the graft was anastomosed to

the side of the distal ileum, and the proximal end was fixed to the abdominal wall. Seven days after heterotopic transplantation, the second procedure was performed. The native small intestine above the jejunojejunostomy was resected and the distal end was closed. The proximal end was end-to-side anastomosed to the proximal end of the graft.

RESULTS: A total of 174 intestinal transplantations were performed in rats, 44 of which were in the formal experimental group, with a survival rate of 90.9%. The time for recipient surgery was 50 ± 15 min. The average time for the arterial and venous anastomoses was 20 ± 5 min and 2 ± 1 min, respectively. The average time for the two-stage surgical procedure was approximately 35 ± 15 min. Four rats died within 5 d of the first operation. These technical failures were due to anesthesia complications, intestinal fistula and intestinal obstruction. No rats died after the second operation. Forty animals survived for > 3 mo.

CONCLUSION: The two-stage orthotopic intestinal transplantation technique used in this study allows graft recovery from ischemic damage, the avoidance of life-threatening intestinal anastomotic complications, and increases survival rate.

Key Words: Intestinal transplantation; Animal models; Orthotopic; Heterotopic transplantation

Zhu L, Li YS, Li JS. Establishment of two-step orthotopic small intestinal transplantation in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3272-3277

摘要

目的: 建立一种简单稳定、死亡率低的二步法大鼠原位小肠移植模型。

方法: 整块获取带肠系膜上动脉的腹主动脉和门静脉的全小肠, 血管重建采用供体腹主动脉和受体腹主动脉端侧吻合、供体门静脉和受体左肾静脉端套吻合。受体第一步手术时, 供肠远端端侧吻合于受体的末端回肠, 已

结扎的供肠近端固定于右侧腹壁(不做腹壁造口)。7 d后行第2步手术, 自Tritze韧带下1 cm到回肠吻合口上1 cm切除受体小肠, 受体空肠残端侧吻合于供肠近端。

结果: 共进行二步法大鼠原位小肠移植手术174次, 正式实验44次, 手术成功率90.9%。受体第1次手术时间约 50 ± 15 min, 其中动脉吻合时间约为 20 ± 5 min, 静脉吻合时间 2 ± 1 min, 受体第2次手术时间约 35 ± 15 min。4只大鼠死于第一次手术后5 d内, 2只死于肠瘘, 1只死于麻醉意外, 1只死于肠梗阻。第2次术后没有大鼠死亡, 40只大鼠均长期存活(超过3 mo)。

结论: 二步法大鼠原位小肠移植方法安全可靠, 并发症少, 生存率高。

关键词: 小肠移植; 动物模型; 原位移植; 异位移植

朱亮, 李幼生, 黎介寿. 二步法大鼠原位全小肠移植模型的建立与改进. 世界华人消化杂志 2007;15(31):3272-3277
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3272.asp>

0 引言

小肠移植是治疗终末期小肠功能衰竭(不能维持中心静脉营养的小肠功能不全)的理想方法^[1-3]。由于小肠为体内最大的淋巴库和细菌库, 移植免疫反应较其他脏器移植更为剧烈和复杂, 在排斥移植物的同时肠源性感染时有发生, 从而严重制约小肠移植应用^[4-5]。动物模型在促进小肠移植的临床应用中起重要作用^[6-7]。大鼠是最常用的动物模型, 大鼠异位小肠移植模型(heterotopic intestinal transplantation HIT)首先由Monchik *et al*^[8]于1971年建立, 用于移植小肠的免疫学研究。手术操作简单, 死亡率低是这种模型的主要优点, 不足之处是不符合生理解剖, 存在废用性的移植肠黏膜萎缩和吸收功能低下。一步法大鼠原位小肠移植模型(orthotopic intestinal transplantation OIT)由Kort *et al*^[9]于1973年建立, 是移植小肠生理学研究的最佳模型。这种模型的高死亡率使他的应用远不及HIT。我们建立了一种简单、安全的二步法大鼠原位全小肠移植模型, 同传统的一步法OIT相比, 二步法OIT可减少手术并发症和死亡率, 有利于移植小肠从缺血再灌注损伤中恢复, 使OIT的手术成功显著提高。

1 材料和方法

1.1 材料 供、受体均选用健康成年♂近交系清

洁级Wister大鼠, 体质量220-260 g, 由中国科学院上海实验动物中心提供, 术前经过至少5 d时间适应环境并单独喂养水和食物。手术时按照供体质量略小于受体的原则配对。术前供受体均置于代谢笼内禁食过夜, 自由饮水。术前采用戊巴比妥40 mg/kg和阿托品0.1 mg/kg ip麻醉, 术中动物如苏醒, 可追加戊巴比妥初始剂量的1/2。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制作及标本采集: 供体手术: 供体麻醉后于背部皮下注射葡萄糖生理盐水10 mL, 术中不予静脉补液, 取腹部大“十”字形切口入腹, 在髂血管分叉以上血管夹夹闭腹主动脉和下腔静脉, 游离带肠系膜上动脉的腹主动脉段, 至回肠末端1 cm以下切除全部结肠, 结扎并切断脾静脉、幽门静脉, 在门静脉和肠系膜上动脉夹角间, 分离并结扎肠引流淋巴管, 门静脉的右缘缝标记线, 游离门静脉至肝门。Treitz韧带以下1 cm切断空肠, 将肠管理顺, 肠腔用含5 g/L的新霉素乳酸林格液5 mL灌洗, 两端结扎。自左肾下腹主动脉向近心端插入22GA静脉套管针直达肠系膜上动脉开口处, 结扎预置在腹主动脉上的5-0丝线, 用含 10^3 U/L肝素的冰乳酸林格氏液5 mL灌洗血管床, 速度用微量泵(B.Braun, Melsungen AG, Germany)控制在40 mL/h, 将碎冰屑倒在小肠上快速降温, 紧贴肝脏下缘剪断门静脉以便灌洗液流出, 至小肠系膜苍白, 门静脉断端流出液清亮, 迅速取下供肠及带肠系膜上动脉段、门静脉置于4℃乳酸林格氏液中。结扎腹主动脉远端, 修整好腹主动脉近端, 将预先做好的cuff管套于门静脉上并将门静脉末段翻转覆盖在cuff管上, 调整好两者的位置, 使静脉套管的柄部恰好位于门静脉的背侧, 用7-0丝线妥善结扎固定。

1.2.2 受体手术: 在供体手术结扎幽门静脉后, 助手进行受体手术, 取腹部正中直切口, 进腹后将小肠推向右上方, 钝性分离并游离出肾下腹主动脉约1 cm以备吻合, 将左侧输尿管结扎切断, 分离、结扎左肾动脉, 用显微血管夹夹闭左肾静脉起始部, 靠近肾门用7-0缝线将肾静脉间隔120度缝3针作牵引, 于3针以远剪断左肾静脉移去肾脏。此时, 术者已将供肠修整完毕, 术者用改良李氏钳^[27]纵形夹闭肾下腹主动脉, 剪出一椭圆形缺口, 大小与供肠腹主动脉动脉口径相似。将供肠调整好血管方向后置于自制的保存袋中移入术野, 行带肠系膜上动脉的腹主动脉与受体腹主动脉的端侧吻合, 先将供肠用置于

研发前沿
自Mo-nchik于1971年首先建立大鼠小肠移植模型以来, 出现了各种各样模型, 这些模型能简化手术操作, 缩短了移植肠冷保存时间, 减少血管吻合口和肠吻合口并发症, 提高手术成功率, 减少早期死亡率, 保证移植术后功能, 是小肠移植模型研究的热点、重点。

相关报道

1973年Kort建立的经典一步法OIT由于受体的手术创伤大,致死性肠道并发症多(20%),死亡率高达32.5%,大大限制了这种模型的应用。Yoo *et al*研究异位移植术后3 d行原位移植,一步法OIT和二步法OIT的长期存活率分别为40%和70%。

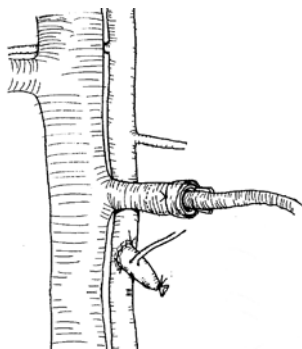


图1 血管吻合示意图。供肠带肠系膜上动脉的腹主动脉段与受体的腹主动脉端侧吻合,供肠门静脉套入受体左肾静脉。



图2 开放血流后的供肠,血供良好,肠系膜内动静脉清晰可见,右上可见静脉套管。

术者的右侧,9-0医用无损伤缝线缝合动脉吻合口上、下两端,然后连续缝合吻合动脉吻合口的左侧,再将供肠用置于术者的左侧,吻合动脉吻合口的右侧,共约16-18针,吻合口周围用生物蛋白胶封闭。动脉吻合完毕后,将供肠门静脉插入受体左肾静脉,检查确认血管无扭曲后用7-0丝线结扎妥善固定(图1)。依次打开肾静脉止血夹、李氏钳,检查动静脉吻合口无渗血后,剪去保存袋,依次开放左肾静脉、供肠腹主动脉恢复供肠血液灌注,即见肠系膜上动脉搏动明显,移植肠迅速恢复红润(图2),立即用温盐水行移植肠复温。理顺供肠肠管顺序,将其置于受体右侧腹腔,用7-0丝线将供肠末端回肠端侧吻合于受体回肠末段,将末端已经结扎的供肠近端固定在左侧腹壁上,不做腹壁造口(图3)。异位移植1 wk后行二步法大鼠原位小肠移植第2步,再次入腹后,自Tritze韧带下1 cm远端至距回肠吻合口上1 cm将受体大部分空回肠切除近端,受体回肠残端结扎,空肠残端和已结扎的供肠近端行端侧吻合(图4)。

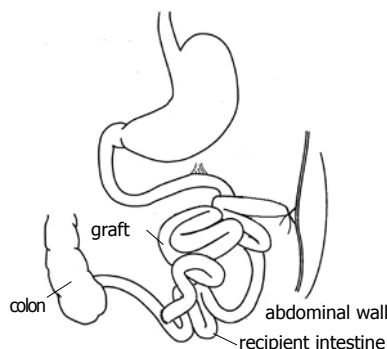


图3 二步法大鼠原位小肠移植第一步手术肠吻合示意图。供肠远端和受体末段回肠端侧吻合,供肠近端结扎固定于左侧腹壁,无腹壁造口。

创新盘点

大鼠异位小肠移植的模型技术简单、死亡率低,但不符合生理,长时间异位将导致黏膜萎缩、细菌移位和吸收功能下降。经典的一步法原位小肠移植受体的手术创伤大,致死性肠道并发症多,死亡率高。本研究创新的建立了一种改进的,更加安全的二步法大鼠原位小肠移植模型,即可保证原位移植,又使受体手术创伤减少,而且在暂时性异位移植期间,移植小肠有时间从缺血再灌注等损伤中恢复,因此术后严重的肠吻合并发症减少,提高了原位小肠移植的成功率(90.9%)。

1.2.3 术后管理: 第1步手术后,大鼠苏醒后自由进水、进食;第2步手术后,术后24 h内大鼠进食糖盐水,次日流质饮食,3 d后恢复正常饮食,术后不用免疫抑制剂,存活超过7 d者视为手术成功。术后观察一般状况及体质量。两次手术后大鼠均单笼饲养,室温控制在25℃左右。

2 结果

共进行大鼠异位全小肠移植手术174次。其中预实验阶段行130次,正式实验阶段44次,手术成功率分别为48.6%和90.9%。在预实验阶段动物的死亡原因主要是麻醉意外,动脉吻合口血栓,大出血,肠痿,肠梗阻等。正式实验中4例动物分别死于麻醉意外1例,吻合口痿2例,肠梗阻1例。大鼠小肠移植手术由两人配合完成,耗时约175±15 min。其中供体手术时间约60±10 min;供肠修整8±3 min;受体第1次手术时间约50±15

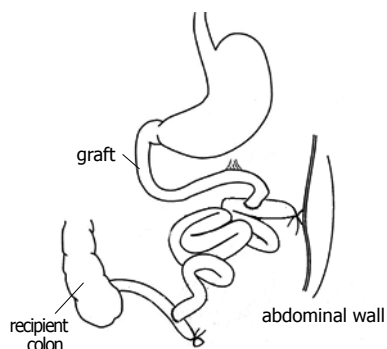


图4 二步法大鼠原位小肠移植第二步手术肠吻合示意图。受体小肠已大部切除,受体回肠残端结扎,受体空肠残端吻合于供肠近端。

min,其中移植肠冷缺血时间(动脉冷灌注开始至恢复血液供应的时间)约为30±5 min,动脉吻合时间约为20±5 min,静脉吻合时间2±1 min,受体第2次手术时间约35±15 min。

3 讨论

自Monchik于1971年首次建立大鼠小肠移植模型以来,先后建立了各种各样模型,但均分成异位小肠移植(HIT)和原位小肠移植(OIT)。HIT模型由于死亡率低(19.7%)被广泛用于移植小肠的

免疫学研究^[10-11]。但一些研究显示HIT的移植肠, 通透性高、运动功能减低, 加重排斥反应^[12-14]。Schroeder *et al*^[15-16]发现移植小肠长时间异位将导致黏膜萎缩和吸收功能下降。Schweizer *et al*^[17]发现HIT后移植小肠黏膜明显萎缩, 隐窝深度及绒毛高度减少。将异位小肠移植于原位后, 结果所有关于黏膜的指标都恢复到正常。HIT导致移植小肠萎缩和吸收功能低下的原因是由于缺乏胃肠道内营养素的刺激。异位小肠移植由于没有消化液的刺激, 存在明显的废用性萎缩, 而且异位小肠移植至少需要一个腹壁造口, 通常两个腹壁造口, 易发生粪便污染。在肠黏膜萎缩的基础上存在细菌污染, 使HIT细菌易位明显多于OIT^[18]。细菌易位会导致肠源性感染, 进而刺激细胞因子的产生, 从而诱发或加重排斥反应, 而排斥反应发生又会加重感染, 形成恶性循环。因此即使用于免疫学方面的研究, HIT也有明显缺陷^[19]。近来国外有关小肠移植免疫学方面的研究也趋向都采用OIT模型^[20-21], 而有关移植小肠生理学方面的研究大多采用OIT模型^[22-24]。

OIT恢复肠道的连续性, 有利于肠黏膜修复, 减少细菌移位, 从生理角度看OIT是最好的模型。1973年Kort *et al*建立的经典一步法OIT由于受体的手术创伤大, 致死性肠道并发症多(20%), 死亡率高达32.5%, 大大限制了这种模型的应用。随着显微外科的进步和围手术期循环维持技术的提高, 很多学者对一步法OIT进行了改进^[25-27], 死亡率得以下降。但在实验研究中, 一步法OIT仍被高吻合口并发症和早期死亡率所困扰。因此, 一些学者采用二步法大鼠原位小肠移植模型, 同传统的一步法OIT相比, 二步法OIT能减少致死性的肠道并发症和手术创伤, 并有利于移植小肠从缺血再灌注损伤中恢复, 使OIT的手术成功显著提高^[28-30]。Yoo *et al*^[31]异位移植术后3 d行原位移植, 一步法OIT和二步法OIT的长期存活率分别为40%和70%。Kitagawa *et al*^[32]认为二步法OIT和一步法OIT肠功能恢复没有显著差异, 但二步法OIT死亡率显著低于一步法OIT。我们为进一步提高生存率(90.9%), 保证移植术后功能, 减少并发症, 对二步法原位小肠移植技术做了如下改进: (1)手术行2人操作。冷缺血时间控制在40 min以内, 这部分受体术后均能顺利存活下来。冷缺血时间超过60 min则受体术后难以苏醒。说明冷缺血时间过长是影响手术成功率的主要因素。冷缺血时间过长影响供肠质量和移植术后功能的恢复, 同时影

响受体下肢血液循环。在恢复血流后热缺血期间组织内积聚的大量代谢产物和再灌注时产生的大量炎性介质、溶酶体酶进入血液循环, 对心脏泵血机能和血管调节机能均产生不利影响。我们在手术时采用2人操作, 加快了分离结扎操作时的速度, 减少了手术时间, 更重要的是在术者进行供体手术后半程时, 助手可进行受体开始阶段的手术; 而单人操作时则必须先取下供肠放入冷保存液中再进行受体手术。2人操作能显著的减少供肠的冷缺血保存时间(减少20 min), 缩短至30±5 min。(2)肠吻合行端侧吻合。移植小肠由于去神经和缺血再灌注损伤, 术后运动功能变化明显, 移植小肠和受体残余小肠运动不协调, 这是OIT肠吻合口并发症高于HIT的原因。Kort报道吻合口瘘和梗阻达20%。我们在肠吻合时供肠上下均采用端侧吻合技术(图3-4), 使肠运动不协调时吻合口产生的张力减小。另外在每次关腹前均将肠吻合口置于腹腔最上面, 保证出现吻合口并发症时大网膜可包裹吻合口。上述这些措施减少了OIT后至死性的肠吻合口并发症(正式实验时致死性肠道并发症5%)。(3)动脉吻合口应用生物蛋白胶。大鼠的血容量约为70 mL/kg体重, 一次性失血达15 mL/kg即可发生低血容量性休克。受体大鼠在血管吻合前不会有太多出血, 但是在血管吻合完成、开放移植肠血供之后, 由于吻合口出血和移植肠血管床开放将造成血容量相对不足。动脉吻合口出血虽可通过温盐水棉球压迫止血, 但由于实际操作中动脉开放前静脉已吻合, 操作较困难, 效果不确实, 压迫过程中(1-2 min)受体亦有失血。吻合口出血可能和吻合前血管用肝素冲洗有关, 而压迫止血的原理是在缝针处形成小的血栓。基于上述原因, 本研究在动脉吻合后应用生物蛋白胶(可对抗肝素, 促进止血)封闭动脉吻合口1 wk, 结果发现开放血流后动脉吻合口周围无渗血和漏血, 不必压迫止血。(4)血管吻合时应用自制的保存袋放置移植肠。在进行血管吻合时, 通常用冰盐水纱布保护移植肠置入腹腔。为防止腹腔升高冰盐水纱布的温度, 需更换冰盐水纱布或间歇给予冰盐水。这一方面增加手术时间, 同时也难以保证整个吻合过程中移植肠各处始终处于4℃以下, 加之冰盐水会降低受体体温增加手术创伤, 而且较大的冰盐水纱布也会妨碍手术操作。我们在血管吻合时, 供肠放置在自制的保存袋当中(图5), 保存袋中有未溶解的冰块使供肠始终处于低温保存状

应用要点
本文建立的二步法大鼠原位小肠移植, 符合生理, 可缩短移植肠冷保存时间, 减少血管吻合口和肠吻合口并发症, 提高了手术成功率, 是进行小肠移植研究的简单、安全、可靠的动物模型。

名词解释

冷缺血时间: 动脉冷灌注开始至恢复血液供应的时间。温缺血时间, 移植肠离开冷保存液之后到血供恢复之间的时间。



图5 血管吻合前供肠已置于自制的保存袋中, 其下可见纱布, 保证吻合过程中供肠的低温状态和防止受体腹腔温度的下降, 周围可见自制的腹腔拉勾。



图6 修整后待移植的供肠, 可见门静脉上的套管和其内的冲洗用套管针。

态, 几乎没有(2 ± 1 min)温缺血时间(移植肠离开冷保存液之后到血供恢复之间的时间), 而温缺血时间同移植肠术后功能的恢复是相关的, 同时保存袋同腹腔之间隔以纱布也防止了受体体温的下降。另外, 由于供肠在保存袋中, 吻合中移动供肠方便并可保证移动中无触摸技术。(5)其他改进。供体手术时, 进入腹腔后首先同时夹闭髂血管以上的主动脉和下腔静脉, 可改善内脏器官的血液灌注。供体手术时, 在门静脉、肠系膜上动脉夹角内寻找和结扎肠引流淋巴管, 有利于减少术后肠淋巴瘘。供体主动脉穿刺置管时, 使用静脉套管针代替头皮针或硅胶管, 可减少血管内皮损伤, 开始灌注时在拔出管芯可防止置管时的血液反流。血管冲洗时应用套管针代替平针头可减少内皮损伤, 并可避免平针头刺破很薄的门静脉和肾静脉(图6)。在两步法大鼠原位小肠移植第1步(暂时性异位小肠移植期间)采用无腹壁造口技术(供肠近端结扎固定于腹壁, 远端和受体回肠端侧吻合), 可减少造口相关的并发症和粪便对移植肠的污染(图3)。(6)血管重建采用供体门静脉和受体左肾静脉端端套管吻合。这种静脉回流方式可避免阻断下

腔静脉导致的对受体血流动力学的影响, 但这种方法须切除左肾, 体循环回流不符合生理解剖^[33-35], 也是这种模型的不足之处。

总之, 本试验建立的二步法大鼠原位小肠移植, 可缩短移植肠冷保存时间, 减少血管吻合口和肠吻合口并发症, 能提高手术成功率, 是进行小肠移植研究的简单、安全、可靠的动物模型。

4 参考文献

- 1 Ruiz P, Kato T, Tzakis A. Current status of transplantation of the small intestine. *Transplantation* 2007; 83: 1-6
- 2 Beath SV. Closure and summary of Ninth International Small Bowel Transplantation Symposium. *Transplant Proc* 2006; 38: 1657-1658
- 3 张喜平, 封光华. 小肠移植研究新进展. *世界华人消化杂志* 2005; 8: 1008-1010
- 4 Braun F, Broering D, Faendrich F. Small intestine transplantation today. *Langenbecks Arch Surg* 2007; 392: 227-238
- 5 朱亮, 李宁, 李幼生, 李元新, 李维勤, 朱维铭, 刘放南, 倪小东, 曹斌, 李为苏, 罗开, 黎介寿. 肝肠移植术后的代谢调控治疗. *肠外与肠内营养* 2004; 11: 143-146
- 6 Li Y, Zhu L, Li J. Absorption of orthotopically transplanted intestine in rats: evaluation of amino acid absorption. *Transplant Proc* 2006; 38: 1827-1829
- 7 Yin ZY, Ni XD, Jiang F, Li N, Li YS, Li JS. Modified technique for combined liver-small bowel transplantation in pigs. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1625-1628
- 8 Monchik GJ, Russell PS. Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations. *Surgery* 1971; 70: 693-702
- 9 Kort WJ, Westbroek DL, MacDicken I, Lameijer LD. Orthotopic total small bowel transplantation in the rat. *Eur Surg Res* 1973; 5: 81-89
- 10 Fandrich F, Schroder J, Jahnke T, Waaga AM, Pawaresch MR, Wacker HH. Migration and activation pattern of specialized dendritic cells after heterotopic small bowel transplantation in a graft-versus-host model of the rat. *Front Biosci* 1997; 2: b1-11
- 11 Gasser M, Prange K, Schroeder P, Stoffregen C, Eckstein V, Deltz E. Host vs graft and graft vs host reactions after allogeneic heterotopic small bowel transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1992; 24: 1128-1129
- 12 Li Y, Li J, Jiang J, Li N, Wang X, Wang Z, Wu B, Liu F. Glycyl-glutamine-supplemented long-term total parenteral nutrition selectively improves structure and function in heterotopic small-bowel autotransplantation in the pig. *Transpl Int* 2003; 16: 866-871
- 13 Nakao A, Tahara K, Inoue S, Tanaka N, Kobayashi E. Experimental models of small intestinal transplantation in rats: orthotopic versus heterotopic model. *Acta Med Okayama* 2002; 56: 69-74
- 14 Grant D, Zhong R, Hurlbut D, Garcia B, Chen HF, Lamont D, Wang PZ, Stiller C, Duff J. A comparison of heterotopic and orthotopic intestinal transplantation in rats. *Transplantation* 1991; 51: 948-954
- 15 Schroeder P, Deltz E, Seifert J, Sandforth F, Thiede A. Absorptive capacity of the transplanted small

- bowel. *Gut* 1987; 28 Suppl: 275-279
- 16 Schroeder P, Sandforth F, Gundlach M, Deltz E, Thiede A. Functional adaptation of small intestinal mucosa after syngeneic and allogeneic orthotopic small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1989; 21: 2887-2889
- 17 Schweizer E, Gundlach M, Gassel HJ, Deltz E, Schroeder P. Effects of two-step small bowel transplantation on intestinal morphology and function. *Transplant Proc* 1991; 23: 688
- 18 Guo WH, Tian L, Dallmann MJ, Tam PK. Comparative study of allograft survival of heterotopic and orthotopic small bowel transplantation in rat. *Transplantation* 2003; 75: 1895-1897
- 19 Heeckt PF, Halfter WM, Schurer B, Schraut WH, Beger HG, Bauer AJ. Heterotopic intestinal transplantation aggravates the insult of chronic rejection. *Transplantation* 1998; 65: 354-362
- 20 Chen Y, Li X, Tian L, Lui VC, Dallman MJ, Lamb JR, Tam PK. Inhibition of sonic hedgehog signaling reduces chronic rejection and prolongs allograft survival in a rat orthotopic small bowel transplantation model. *Transplantation* 2007; 83: 1351-1357
- 21 Koshiba T, Van Damme B, Kitade H, Rutgeerts O, Tanaka K, Waer M, Pirenne J. Induction of tolerance by donor-specific blood transfusion in a model of intestinal transplantation: technical and immunological aspects. *Transplant Proc* 2002; 34: 1033-1039
- 22 Salehi P, Zhu LF, Sigurdson GT, Jewell LD, Churchill TA. Nutrient-related issues affecting successful experimental orthotopic small bowel transplantation. *Transplantation* 2005; 80: 1261-1268
- 23 Kastl S, Muller V, Kotschenreuther U, Radespiel-Troeger M, Hohenberger W, Erben RG. Effect of orthotopic small bowel transplantation on mineral metabolism in an experimental model. *Br J Surg* 2005; 92: 764-771
- 24 Syzmula von Richter TP, Baumeister RG. Clinical observation of intestinal transplantation with microsurgical lymphatic vessel and nerve reconstruction in the allogeneic orthotopic rat model. *Transplant Proc* 1998; 30: 2607-2608
- 25 Nakao A, Ogino Y, Tahara K, Uchida H, Kobayashi E. Orthotopic intestinal transplantation using the cuff method in rats: a histopathological evaluation of the anastomosis. *Microsurgery* 2001; 21: 12-15
- 26 Soin AS, Friend PJ. A modification to improve technical success rate of small bowel transplantation in rats. *Transplant Proc* 1996; 28: 2722
- 27 Zhong R, Grant D, Sutherland F, Wang PZ, Chen HF, Lo S, Stiller C, Duff J. Refined technique for intestinal transplantation in the rat. *Microsurgery* 1991; 12: 268-274
- 28 Nakai K, Hamada Y, Kato Y, Kitagawa K, Hioki K, Ito S, Okumura T. Further evidence that epidermal growth factor enhances the intestinal adaptation following small bowel transplantation. *Life Sci* 2004; 75: 2091-102
- 29 Anveden-Hertzberg L, Sonnino RE. Impaired survival and growth in immunosuppressed young rats with lethal short gut syndrome and a small bowel transplant: an effect of cyclosporine. *J Pediatr Surg* 1995; 30: 1004-1008; discussion 1008-1009
- 30 Galvao FH, Bacchella T, Cerqueira Machado M. Teaching intestinal transplantation in the rat for medical student. *Microsurgery* 2007; 27: 277-281
- 31 Yoo CH, Suh KW, Kim JH. Experimental orthotopic intestinal transplantation with temporary heterotopic implantation in the rat. *Transplant Proc* 1998; 30: 3443-3445
- 32 Kitagawa K, Hamada Y, Nakai K, Kato Y, Okumura T. Comparison of one- and two-step procedures in a rat model of small bowel transplantation. *Transplant Proc* 2002; 34: 1030-1032
- 33 Galvao FH, Santos RM, Neto AB, Machado MA, Bacchella T, Machado MC. Small bowel and colon transplantation in rats using porto-portal cuff anastomosis. *Transplant Proc* 2006; 38: 1842-1843
- 34 Hernandez F, Zou Y, Lopez G, Romero M, Martinez L, Gonzalez-Reyes S, Garcia A, Pena P, Lopez Santamaria M, Tovar JA. Is portal venous outflow better than systemic venous outflow in small bowel transplantation? Experimental study in syngeneic rats. *J Pediatr Surg* 2005; 40: 336-340
- 35 Berney T, Kato T, Nishida S, Tector AJ, Mittal NK, Madariaga J, Nery JR, Cantwell GP, Ruiz P, Tzakis AG. Portal versus systemic drainage of small bowel allografts: comparative assessment of survival, function, rejection, and bacterial translocation. *J Am Coll Surg* 2002; 195: 804-813

同行评价
本文选题新颖, 设计合理, 动物试验工作量大, 结果提出了一些改进动物模型的体会, 对小肠移植动物实验研究具有参考价值。

编辑 何燕 电编 郭海丽

应用real-time PCR测定幼兔肠道内双歧杆菌和乳杆菌的变化

陈津津, 蔡 威

背景资料
双歧杆菌(*bifidobacteria*)和乳杆菌(*lactobacilli*)是恒温动物肠道内重要的原籍菌群, 而长期肠外营养(parenteral nutrition, PN)会导致肠道原籍菌群失调, 损害肠屏障。

陈津津, 上海交通大学医学院附属新华医院急救中心 上海市 200092
蔡威, 上海交通大学医学院附属新华医院临床营养中心 上海市 200092
陈津津, 2007年上海交通大学医学院博士生毕业, 副主任医师, 主要从事胃肠道微生态的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30271350
通讯作者: 蔡威, 200092, 上海市控江路1665号, 上海交通大学医学院附属新华医院营养中心. caiw204@yahoo.com.cn
电话: 021-65790000
收稿日期: 2007-03-11 修回日期: 2007-10-09

Quantification of bifidobacteria and lactobacilli in feces of PN rabbits by real-time PCR

Jin-Jin Chen, Wei Cai

Jin-Jin Chen, Emergency Center, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Wei Cai, Clinical Nutrition Center, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30271350

Correspondence to: Dr. Wei Cai, Clinical Nutrition Center, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, 1665 Kongjiang Road, Shanghai 200092, China. caiw204@yahoo.com.cn

Received: 2007-03-11 Revised: 2007-10-09

Abstract

AIM: To quantitatively detect *bifidobacteria* and *lactobacilli* in feces of Parenteral nutrition (PN) rabbits by real-time quantitative PCR.

METHODS: Sixteen New Zealand white rabbits weighing 200-250 g were divided into two experimental groups: control group and PN group. On day 10, we obtained fresh feces from the rectum. Whole bacterial DNA was extracted from the feces, genus-specific primers of *bifidobacterium* and *lactobacillus* were synthesized, and the specificities of the primers were evaluated by conventional PCR.

RESULTS: The detection limit of the method used in this study was found to be 100 per PCR.

Standard curves obtained for the strains *bifidobacterium adolescentis* and *lactobacillus plant* were in good agreement. These two kinds of genus-specific primers were proved to be species-specific by agarose gel electrophoresis. The population of bifidobacteria and lactobacilli in the wet feces (0.05 g) of PN rabbits was significantly lower than that in the control group (4.62 ± 0.24 and 4.29 ± 0.49 vs 5.84 ± 0.92 and 5.14 ± 1.07 ; $P < 0.01$).

CONCLUSION: The real-time PCR procedure described here is a specific, accurate, rapid, and easy method for the quantification of bifidobacteria and lactobacilli in feces of infant rabbits. Dysfunction of the intestinal barrier induced by long-time PN-fed may be related to the decreasing number of bifidobacteria and lactobacilli in the intestine.

Key Words: Bifidobacteria; Lactobacilli; Real-time PCR; Parenteral nutrition

Chen JJ, Cai W. Quantification of bifidobacteria and lactobacilli in feces of PN rabbits by real-time PCR. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3278-3283

摘要

目的: 通过研究PN过程中肠道双歧杆菌和乳杆菌的变化, 探讨PN导致肠屏障功能障碍的机制。

方法: 将新西兰种白兔16只, 分成对照组(正常兔食饲养)和PN组(幼兔完全肠外营养)。10 d后自直肠取出新鲜粪便, 抽提所有细菌DNA, 常规PCR检测合成的双歧杆菌和乳杆菌属引物的特异性。应用青春双歧杆菌和植物乳杆菌作外标准品, 梯度稀释制作标准曲线, 作灵敏度测定。应用SYBR Green I Real-time PCR法, 定量检测粪便中双歧杆菌和乳杆菌含量。

结果: 琼脂糖凝胶电泳显示两种引物特异性良好, 灵敏度达到 10^2 个菌。溶解曲线显示单一

峰形, 说明没有引物二聚体形成. 粪便细菌定量结果显示, PN组幼兔湿粪(0.05 g)中双歧杆菌和乳杆菌含量显著低于对照组(4.62 ± 0.24 , 4.29 ± 0.49 vs 5.84 ± 0.92 , 5.14 ± 1.07 ; $P < 0.01$).

结论: Real-time PCR法能准确迅速地对幼兔粪便双歧杆菌和乳杆菌进行定量检测. 长期肠外营养导致的肠屏障障碍可能与肠内双歧杆菌和乳杆菌的数量减少有关.

关键词: 双歧杆菌; 乳杆菌; 实时荧光定量PCR技术; 肠外营养

陈津津, 蔡威. 应用real-time PCR测定幼兔肠道内双歧杆菌和乳杆菌的变化. 世界华人消化杂志 2007;15(31): 3278-3283
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3278.asp>

0 引言

双歧杆菌(*bifidobacteria*)和乳杆菌(*lactobacilli*)作为恒温动物肠道内重要的原籍菌群, 发挥维持微生态平衡、生物拮抗、免疫调节、营养等多方面的生理作用. 而长期的肠外营养(parenteral nutrition, PN)会导致肠道菌群失调, 损害肠屏障, 进而导致肠菌移位和内毒素血症^[1]. 因此我们, 通过研究PN过程中肠道双歧杆菌和乳杆菌的变化, 探讨PN导致肠屏障功能障碍的机制. 由于双歧杆菌和乳杆菌属厌氧菌, 其传统的培养计数法存在送检条件苛刻、培养难度大, 检测结果受细菌离体时间、外界环境因素和培养基性能的影响大等诸多缺点, 使精确定量分析难以进行. 实时荧光定量PCR技术(real-time PCR)利用细菌基因组的核酸序列为鉴别基础, 不受上述条件的限制, 为厌氧菌的定量检测提供了新的途径. 因此我们采用目前最新的real-time PCR方法对幼兔粪便标本进行双歧杆菌和乳杆菌计数.

1 材料和方法

1.1 材料 生后2 wk的新西兰种白兔16只, 雌雄不限, 体质量200-250 g, 分为2组, 对照组7只, PN组9只. 双歧杆菌冻干菌粉为青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*), 乳杆菌冻干菌粉为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*), 由上海交通大学生命科学技术学院杭晓敏博士惠赠. 大肠杆菌菌株来自本院细菌室.

1.2 方法

1.2.1 分组: PN组幼兔行颈静脉插管, 使用旋转输液装置, 微泵持续24 h输注营养液[240

mL/(kg·d)], 根据体质量增长情况调节输液量, 营养液配方见文献[2]. 对照组正常免食饲养. 幼兔单笼饲养, 设定室内环境12 h明暗交替, 室温20-24℃. PN组幼兔PN持续10 d后, 停用静脉营养液, 持续输注生理盐水2 h后称质量, 与对照组一起过量麻醉, 开腹取直肠内粪便.

1.2.2 粪便标本收集和细菌DNA抽提: 均取直肠内粪便, 立即置入无菌离心管, -20℃冻存, 24 h内抽提粪便内细菌基因组DNA. 用QIAamp DNA stool kit (Qiagen, Hilden, Germany)抽提粪便内细菌基因组DNA, 具体操作依照说明书进行. 由于双歧杆菌菌壁较厚, 故对部分步骤稍作改动.

1.2.3 双歧杆菌和乳杆菌属特异性引物设计: 双歧杆菌和乳杆菌属特异性引物(genium-specific primers)分别参照文献[3-4]. 上下游引物序列见表1, 引物对由中国科学院闪晶生物有限公司合成.

1.2.4 实验用菌株及基因组DNA抽提: 分别取青春双歧杆菌冻干菌粉0.05 g、植物乳杆菌冻干菌粉0.05 g、大肠杆菌菌株培养液1 mL, 细菌DNA抽提步骤同1.2.2, -20℃保存.

1.2.5 引物对特异性检测: 取菌株基因组DNA抽提液进行常规PCR反应: 50 μL标准PCR反应体系, 10×PCR Buffer 5 μL, 25 mmol/L Mg^{2+} 3 μL, 10 mmol/L dNTPs 1 μL, 25 μmol/L上下游引物各1 μL, DNA模板1 μL, 5×10^6 U/L Taq DNA polymerase (Promega) 0.5 μL, ddH₂O 37.5 μL. 反应条件: 94℃变性3 min, 循环35次: 94℃变性40 s, 55℃退火20 s, 72℃延伸1 min 15 s, 72℃延伸5 min. 所有常规PCR反应于PTC-100TM programmable thermal controller(MJ Research INC.)上进行. 用11 g/L的琼脂糖凝胶电泳分析PCR扩增产物, 以DNA marker DL2000(TaKaRa)为分子量标准.

1.2.6 外标准品制备和标准曲线制作: 外标准品制备: 以青春双歧杆菌和植物乳杆菌的PCR产物经割胶回收后作为目的DNA片段, 连接至TaKaRa pMD18-T(大连宝生物)载体上, 重组质粒转化至DH-5α宿主细胞中, 克隆后分离质粒DNA. 经A值测定, 换算青春双歧杆菌和植物乳杆菌的拷贝数, 制作标准曲线. **标准曲线制作:** 将外标准品做10倍系列稀释, 使其形成 10^7 - 10^2 拷贝/L, 按下列条件进行real-time PCR反应, 反应体系20 μL: 10×PCR Buffer 2 μL, 25 mmol/L Mg^{2+} 2 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 25 μmol/L上下游引物各0.25 μL, DNA模板1 μL, 5×10^6 U/L Taq酶(Promega) 0.25 μL, $20 \times$

研发前沿
本文通过研究PN过程中肠道双歧杆菌和乳杆菌的变化, 对PN导致肠屏障功能障碍的机制进行了初步的探索. 由于双歧杆菌和乳杆菌属厌氧菌, 传统培养计数法存在送检及培养条件苛刻, 培养存活率低, 计数不准确, 因此目前应用分子生物学技术对其进行定量分析成为该研究领域的热点.

应用要点

本文所采用的实时荧光定量PCR技术(real-time Q-PCR), 利用细菌基因组的核酸序列为鉴别基础, 不受上述条件的限制, 为双歧杆菌和乳杆菌的定量检测提供了新的途径, 为后续研究的开展和临床应用进行了有益地探索。

表 1 双歧杆菌和乳杆菌属特异性引物

Bacterium	Primer	Primer sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)
<i>Bifidobacterium</i>	Im26-f	GAT TCT GGC TCA GGA TGA ACG	1428
	Im3-r	CGG GTG CTI CCC ACT TTC ATG	
<i>Lactobacillus</i>	L159-f	GGA AAC AG(A/G) TGC TAA TAC CG	600
	L677-r	CAC CGC TAC ACA TGG AG	

SYBR Green I 0.5 μ L, ddH₂O 13.25 μ L. 双歧杆菌反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性3 min, 循环40次: 95 $^{\circ}$ C 变性40 s→61 $^{\circ}$ C 退火25 s→72 $^{\circ}$ C 延伸1 min 20 s, 融解95 $^{\circ}$ C 0 s(20 $^{\circ}$ C/s)→71 $^{\circ}$ C 15 s(20 $^{\circ}$ C/s→95 $^{\circ}$ C 0 s(0.1 $^{\circ}$ C/s), 冷却40 $^{\circ}$ C 30 s(20 $^{\circ}$ C/s); 乳杆菌反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性3 min; 循环40次: 95 $^{\circ}$ C 变性40 s→61 $^{\circ}$ C 退火25 s→72 $^{\circ}$ C 延伸1 min, 融解95 $^{\circ}$ C 0 s(20 $^{\circ}$ C/s)→71 $^{\circ}$ C 15 s(20 $^{\circ}$ C/s→95 $^{\circ}$ C 0 s(0.1 $^{\circ}$ C/s), 冷却40 $^{\circ}$ C 30 s(20 $^{\circ}$ C/s). 所有荧光定量PCR反应均在LightCycler (Roche)上进行。

1.2.7 Real-time PCR法检测幼兔粪便双歧杆菌和乳杆菌含量: 将待测样品DNA抽提液按与制备标准曲线相同的反应体系和反应条件进行real-time PCR反应, 每次实验都设阴性对照和标准品校正, 每个样品都做3个平行复孔, 以保证实验数据的有效性和可重复性. 扩增完毕后, 进行溶解曲线分析。

统计学处理 采用SPSS for Windows 10.0统计软件. 计量数据以mean \pm SD表示, 采用Student *t*检验比较组间差别, $P<0.05$ 差别有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR产物鉴定 用11 g/L的琼脂糖凝胶电泳分析菌株基因组DNA常规PCR扩增产物, 青春双歧杆菌和植物乳杆菌基因组DNA分别在1428 bp和600 bp处显示了单一扩增物区带(图1), 而大肠杆菌基因组DNA未见扩增物区带。

2.2 扩增曲线与灵敏度测定 不同拷贝数的模板随循环数的增加, 其荧光强度逐渐增强, 在经过一段指数扩增期后曲线趋于平行, 即出现“平台效应”, 指数扩增期模板拷贝数与荧光累积值的一一对应关系形成了双歧杆菌和乳杆菌定量的基础. 从扩增曲线图可见少至100个菌仍有特征性曲线生长, 说明该real-time PCR具有较好的灵敏度(图2)。

2.3 双歧杆菌和乳杆菌标准曲线 以不同拷贝数的阳性模板的对数为横坐标, 以PCR反应过程中

表 2 兔粪双歧杆菌和乳杆菌含量^M

分组	<i>n</i>	双歧杆菌 ^N (SD)	乳杆菌 ^N (SD)
对照组	7	5.84(0.92)	5.14(1.07)
PN组	9	4.62(0.24) ^b	4.29(0.49) ^b
<i>P</i> 值		0.004	0.006

M: 0.05 g湿粪含量; N: 对数值(log₁₀); ^b $P<0.01$ vs 对照组。

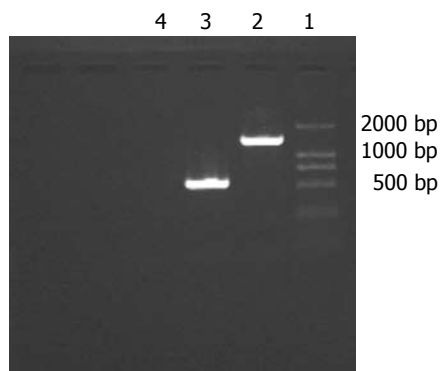


图 1 菌株基因组DNA常规PCR扩增产物. 1: Marker; 2: 植物乳杆菌; 3: 青春双歧杆菌; 4: 大肠杆菌。

到达荧光阈值的初始循环数(Ct)为纵坐标得到双歧杆菌和乳杆菌的标准曲线(图3), 为待测样品的双歧杆菌和乳杆菌定量提供了参照标准。

2.4 溶解曲线与假阳性 阳性模板在荧光定量PCR反应的后期, 产物经融解、冷却后得到溶解曲线(图4), 可见融解曲线成单峰, 说明扩增产物单一. 与SYBRGreen I荧光染料结合的片段为目标DNA片段, 基线附近的浅棕色曲线为阴性对照反应物的溶解曲线, 可见无产物单峰出现, 说明该反应条件较好地避免了定量检测过程中假阳性结果的出现。

2.5 样品双歧杆菌和乳杆菌定量 每份样品所含拷贝数都可通过Ct值与标准曲线比较得到, 荧光定量PCR仪可通过微机内的LightCyclerSoftware处理直接给出定量结果. 由于粪便内双歧杆菌和乳杆菌绝对值不呈正态分布, 故取其对数值(log₁₀)进行Student *t*检验. 结果显示, PN组双歧杆菌和乳杆菌含量显著低于对照组($P<0.01$, 表2)。

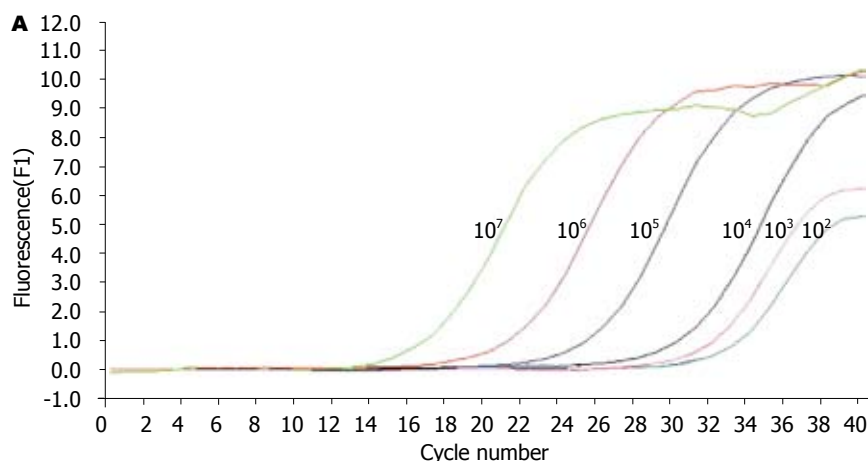


图 2 杆菌模板循环数与荧光强度关系图. A: 双歧杆菌; B: 乳酸菌.

同行评价
本文设计合理, 结论中肯, 是一篇较好的基础研究论文.

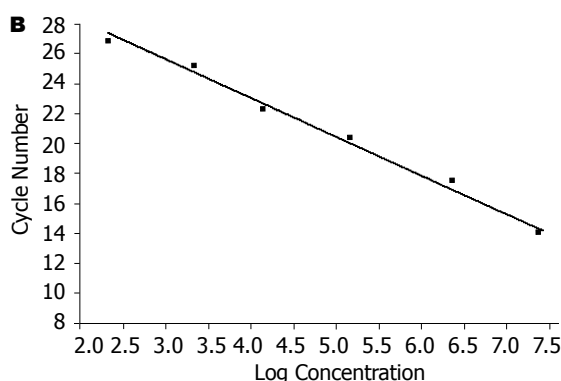
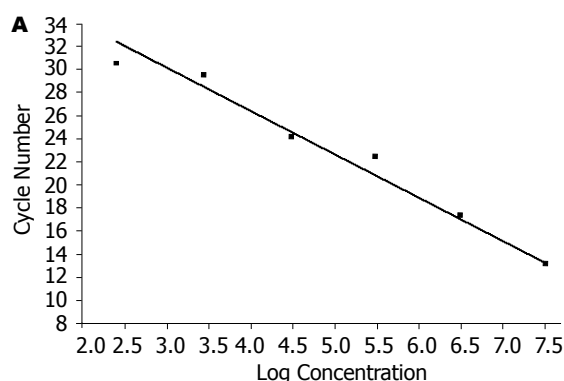
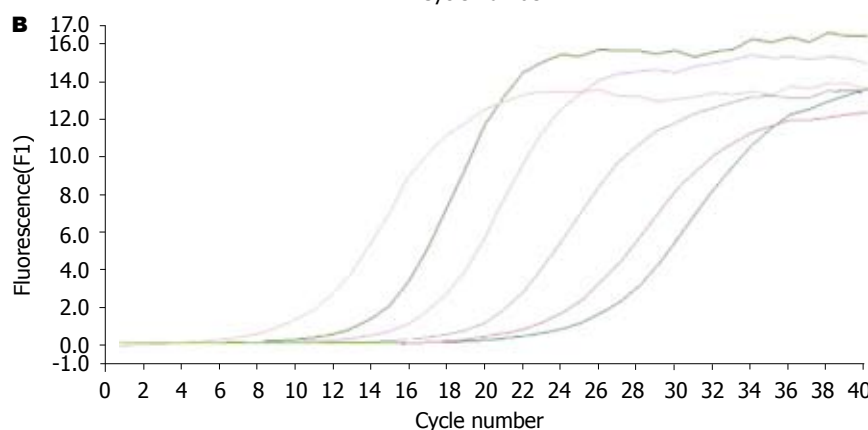


图 3 标准曲线. A: 双歧杆菌; B: 乳酸菌.

3 讨论

双歧杆菌和乳杆菌不仅是人类肠道内主要的共栖微生物, 在健康家兔中也是优势菌群. 国内牛钟相 *et al*^[5-6] 曾对健康成年家兔消化道中双歧杆菌和乳杆菌进行研究, 发现二者均为优势菌群. 但采用传统培养方法作双歧杆菌和乳杆菌的定量分析费时费力, 其过程易受细菌离体时间、外界环境因素、培养基性能和非特异性菌落混杂等多种因素影响, 检测失败率高, 结果缺乏稳定性、可靠性, 计数不精确, 属半定量检测; 而且由于个别菌种难以培养, 故不能准确地反应消化道内的细菌含量^[7]. 因此, 拥有一种能对双

歧杆菌、乳杆菌进行快速、准确定量的方法变得尤为必要.

近年来, 一种方便、快速、准确的非培养细菌定量方法逐渐受到青睐, 即real-time PCR法. Real-time PCR技术是以双歧杆菌16S rRNA编码基因特异区的核酸序列为鉴别基础, 设计引物, 经PCR扩增, 扩增产物与荧光染料结合, 再通过荧光信号的测定实现实时定量分析的. 其融会了PCR的灵敏性和光谱技术定量精确的优点, 使定量分析结果更精确、敏感、省时, 同时具有较好的重复性^[8]. 不仅可以避免传统检测方法的缺陷, 而且由于PCR扩增和产物分析的全过程均

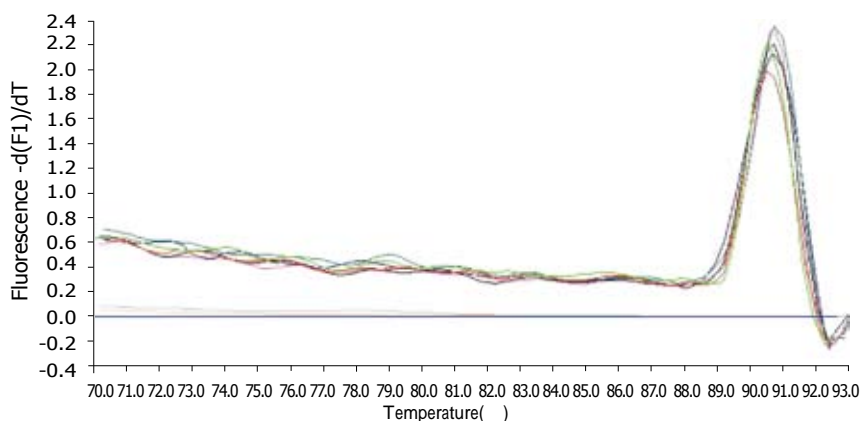


图4 扩增产物溶解曲线图.

在单管封闭条件下进行,并由微机控制,因此可消除产物污染,提高检测效率.该方法既有荧光原位杂交(FISH)的特异性,又有PCR的敏感性^[9]. Martsuki *et al*研究发现应用PCR方法检测双歧杆菌,比传统培养法灵敏10-100倍^[10]. Real-time PCR是基于对PCR过程中荧光变化的连续监测,和常规PCR的终点检测不同, real-time PCR定量发生于扩增的指数期,可以避免常见于PCR由于模板产物比率不同导致的偏倚^[11].

由于本研究目的是对幼兔直肠粪便内全部双歧杆菌和乳杆菌进行定量检测,故使用此两种细菌的属特异性引物.参照文献[3-4]合成的引物和从双歧杆菌、乳杆菌、大肠杆菌菌株中抽提的DNA作常规PCR,可见双歧杆菌扩增产物大小为1428 bp,乳杆菌扩增产物大小约为600 bp,阴性对照大肠杆菌未见电泳条带,说明此两种属特异性引物能准确地鉴别双歧杆菌和乳杆菌.

同时, real-time PCR反应条件的选择和优化对于反应成功与否非常关键.其中荧光染料SYBRGreen I的使用浓度是非常关键的因素,如果SYBRGreen I的浓度过低会使荧光信号的变化降低,这意味着低拷贝的样品可能无法检出;而SYBRGreen I的浓度过高时,又将抑制PCR反应,降低PCR反应效率.通过对浓度递减的方法确定SYBRGreen I在该体系中的最佳终浓度为0.5×,从以梯度稀释的外标准品为模板所做的扩增曲线可见少至100个菌仍有阳性曲线生长,即灵敏度可达10²个菌.同时,由于SYBRGreen I与DNA双链呈非特异性结合,为减少引物二聚体双链与SYBRGreen I结合而产生的假阳性结果,实验将退火温度通过递增的方式最终确定为61℃,并通过融解曲线分析验证了产物的单一性.

标准曲线是样品定量的参照标准,而外标准品浓度的精确测定是标准曲线制作的基础,也是精确定量的关键.既往采用常规PCR产物直接梯

度稀释的方法虽然简便但存在不准确、不稳定的缺点.本实验是将常规PCR产物克隆到载体上,然后抽提质粒,经嵌含目标片段质粒的浓度测量和拷贝数换算,实现了准确定量;且模板稳定性高,可较长时间保存.这对real-time PCR每次检测样品时均需有已知浓度模板做校正参考,显然是有利的,同时也利于标准曲线的重复性检验.

本研究结果显示,对照组幼兔湿粪(0.05 g)中双歧杆菌对数值为5.84±0.92,乳杆菌对数值为5.14±1.07. PN组幼兔粪便中双歧杆菌和乳杆菌含量分别为4.62±0.24和4.29±0.49,显著低于对照组.由于双歧杆菌和乳杆菌是菌膜屏障的主要成分,而菌膜屏障又是肠屏障的重要组成部分,因此我们推测,长期肠外营养导致的肠菌移位和内毒素血症等肠屏障障碍的表现和双歧杆菌和乳杆菌的数量减少有关,提示我们饲料外源性益生菌可能成为改善PN导致肠道菌群失调、维护肠屏障功能的新途径,但需要我们在今后的干预研究中进一步验证. Real-time PCR技术实现了对双歧杆菌、乳杆菌等难培养菌的实时定量分析,为进一步研究实验动物和人肠道菌群的组成及其动态变化^[12-14]提供了有效的检测手段,具有较好的实验研究和临床应用前景.

4 参考文献

- 1 Nakasaki H, Mitomi T, Tajima T, Ohnishi N, Fujii K. Gut bacterial translocation during total parenteral nutrition in experimental rats and its countermeasure. *Am J Surg* 1998; 175: 38-43
- 2 吴江, 徐远飞, 蔡威, 傅爱芬, 殷敏智, 张凤英. 全肠外营养相关胆汁淤积幼兔模型的建立. *临床儿科杂志* 2004; 22: 107-109
- 3 Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 504-513
- 4 Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans AD, de Vos WM. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria

- in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68: 114-123
- 5 牛钟相, 朱瑞良, 常维山, 唐珂心, 徐海花. 兔胃肠道中双歧杆菌的初步研究. *微生物学报* 1996, 36: 307-309
- 6 常维山, 牛钟相, 朱瑞良, 唐珂心, 张绍学, 徐海花, 柴家前. 兔肠道正常微生物群的研究. *中国微生物学杂志* 1996; 8: 14-16
- 7 Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon JJ, Gibson GR, Collins MD, Dore J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4799-4807
- 8 Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 504-513
- 9 Gueimonde M, Tolkkio S, Korpimäki T, Salminen S. New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 4165-4169
- 10 Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, Fukuda M, Oyaizu H. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 4506-4512
- 11 Suzuki MT, Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 625-630
- 12 Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Variation in human intestinal microbiota with age. *Dig Liver Dis* 2002; 34 Suppl 2: S12-18
- 13 McCracken VJ, Simpson JM, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. *J Nutr* 2001; 131: 1862-1870
- 14 陈津津, 蔡威. 实时荧光定量PCR方法检测幼兔粪便双歧杆菌的实验研究. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1367-1371

编辑 何燕 电编 马文华

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

• 消息 •

关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

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

HER-2基因靶向RNA干扰重组表达载体的构建及序列分析

韩明阳, 吴爱国, 郭爱林, 李 鹏, 纪术峰, 刘 铮

背景资料
HER-2分子是表皮生长因子受体家族的第2位成员, 对细胞的生长、分化及存活起重要的调节作用。HER-2在结直肠癌中阳性表达与肿瘤浸润转移密切相关, 在大肠癌中其过表达与患者预后的重要指标。研究表明他与表皮生长因子受体家族其他3位成员形成异二聚体, 通过多种信号转导途径促进肿瘤的增殖、转移、耐药性的产生, 是肿瘤基因治疗的重要靶位点。

韩明阳, 吴爱国, 李鹏, 纪术峰, 南方医科大学珠江医院普通外科 广东省广州市 510280
郭爱林, 广东省人民医院医学研究中心 广东省广州市 510080
刘铮, 南方医科大学病理生理实验室 广东省广州市 510515
韩明阳, 南方医科大学珠江医院普通外科硕士生, 主要从事大肠癌的RNA干扰研究。
广东省科技计划项目, No. 2005B31201011
通讯作者: 吴爱国, 510280, 广东省广州市工业大道中253号, 南方医科大学珠江医院普通外科. yang07641@126.com
收稿日期: 2007-06-15 修回日期: 2007-09-13

Cloning of recombinant plasmid affecting HER-2 in gene translation by RNA interference

Ming-Yang Han, Ai-Guo Wu, Ai-Lin Guo, Peng Li, Shu-Feng Ji, Zheng Liu

Ming-Yang Han, Ai-Guo Wu, Peng Li, Shu-Feng Ji, Department of Surgery, Zhujiang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China

Ai-Lin Guo, Medical Research Center, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Zheng Liu, Pathophysiology and Key Laboratory, Nanfang Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by: Science and Technique Program of Guangdong Province, No. 2005B31201011

Correspondence to: Ai-Guo Wu, Department of Surgery, Zhujiang Hospital, Nanfang Medical University, 253 Industrial Road, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China. yang07641@126.com

Received: 2007-06-15 Revised: 2007-09-13

Abstract

AIM: To clone the recombinant plasmid affecting HER-2 gene translation by RNA interference, and to analyze the nucleic acid sequence of the recombinant plasmid for tumor gene therapy.

METHODS: Two DNA sequences containing a small hairpin structure were designed and synthesized. The complement form was obtained by annealing and cloning into vector pGPU6/GFP/Neo, and the recombinant plasmid was transformed into strain DH5 α . The plasmid identified by restriction enzyme analysis was used for se-

quencing. Human colon cancer HT29 cells were transfected with plasmid vector, and then fluorescence photographs were taken and selected according to G418.

RESULTS: The recombinant plasmid was cloned, and the sequence was obtained.

CONCLUSION: Successful cloning of the recombinant plasmid may help to discover new gene therapies for tumors.

Key Words: Human epidermal-growth-factor receptor-2 gene; RNA interfering; Recombinant plasmid; Short hairpin RNA

Han MY, Wu AG, Guo AL, Li P, Ji SF, Liu Z. Cloning of recombinant plasmid affecting HER-2 in gene translation by RNA interference. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3284-3288

摘要

目的: 利用RNA干扰(RNAi)技术, 以HER-2为靶基因, 设计构建重组表达载体, 并进行测序鉴定。

方法: 设计具有短发夹结构的两条DNA序列, 经退火成互补双链, 再克隆至载体pGPU6/GFP/Neo中构建重组表达载体, 转化DH5 α 菌株, 提取质粒行酶切鉴定后, 并进行序列测定。再转染人大肠癌HT29细胞, 进行荧光摄像和G418抗性筛选。

结果: 将合成的DNA序列退火后克隆到载体上, 经酶切和测序鉴定确实为所需序列。

结论: HER-2靶向RNA干扰重组表达载体的构建成功, 并可以进行稳定筛选。

关键词: HER-2基因; RNA干扰; 重组表达载体; 短发夹RNA

韩明阳, 吴爱国, 郭爱林, 李鹏, 纪术峰, 刘铮. HER-2基因靶向RNA干扰重组表达载体的构建及序列分析. *世界华人消化杂志* 2007;15(31):3284-3288

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3284.asp>

0 引言

HER-2(human epidermal-growth-factor receptor 2)分子是表皮生长因子受体家族(human epidermal-growth-factor receptor)的第2位成员,对细胞的生长、分化及存活起重要的调节作用。HER-2在结直肠癌中阳性表达与肿瘤浸润转移密切相关,在大肠癌中其过表达与否是患者预后的重要指标^[1-2]。研究表明他与表皮生长因子受体家族其他3位成员形成异二聚体,通过多种信号转导途径促进肿瘤的增殖、转移、耐药性的产生,是肿瘤基因治疗的重要靶位点^[3]。

自从RNA干扰技术被《Science》杂志评选为2002年度世界十大科学成就之首以来, RNA干扰在结直肠癌的应用方面有了长足的进步。针对细胞信号转导、细胞凋亡、细胞周期调控分子、端粒酶、细胞因子及其受体基因等不同位点而设计的小干扰RNA对结肠癌细胞均有明显的阻抑作用^[4-5]。RNAi技术具有特异性和高效性,已经成为研究基因功能的重要工具^[6]。RNAi技术是通过导入细胞19 nt-23 nt的小分子干扰RNA(small interference RNA, siRNA),降解同源mRNA, 高效、特异性阻断目的基因表达^[7]。但是,裸siRNA导入机体和细胞,转染效率低,抑制时间短。有研究表明,短发卡状RNA(short hairpin RNA, shRNA)对靶基因的抑制效果优于siRNA^[8]。我们构建了针对HER-2基因的短发夹结构RNA(short hairpin RNA, shRNA)重组表达载体^[9],期望通过重组表达载体有效感染和表达HER-2-shRNA发挥RNAi作用。

1 材料和方法

1.1 材料 含有人U6启动子的pGPU6/GFP/Neo质粒购买于上海吉玛公司,克隆用大肠杆菌DH5 α 购买于大连宝生物公司,限制性内切酶(*Bam*H I, *Pst* I, *Bbs* I)及T4 DNA连接酶购买于美国NEB公司,核酸分子质量标准Lambda DNA/*Eco*130 I购买于Fermentas公司,质粒小量抽提试剂盒为天为时代公司产品,胶回收试剂盒购买于广州美津生物公司,HT29细胞由广东省人民医院中心实验室赠送, DH5 α 大肠杆菌感受态细胞冻存于-70℃备用。根据GenBank中报道的HER-2基因核苷酸序列(No. M11730),参考shRNA设计原则进行设计,使用BLAST将选定的序列和相应的人基因组数据库进行比较,排除和其他编码序列/EST同源的序列。最后选择出两条

片段作为HER-2基因干扰片段,一条是位于395-415 bp的GCTACGTGCTCATCGCTCACA,另一条是位于2184-2204 bp的序列GCAGCAGAAGATCCGGAAGTA。loop结构选用了TTCAAGAGA以避免形成终止信号。反义片段以后接TTTTTT,以终止转录。正义链模板的5'端添加了CACC,与*Bbs* I酶切后形成的黏端互补;反义链模板的5'端添加了GATC,与*Bam*H I酶切后形成的黏端互补;并将其送上海生工公司合成。shRNA1正义链: 5'CACCGCTACGTGCTCATCGCTCACATTCAAGAGATGTGAGCGATGAGCACGTAGCTTTTTTG3'。shRNA1反义链: 5'CGATGCACGAGTAGCGAGTGTAAGTTCTCTACTCGCTACTCGTGCATCGAAAAAACC TAG3'。shRNA2正义链: 5'CACC GCAGCAGAA GATCCGGAAGTATTCAAGAGATACTTCCGG ATCTTCTGCTGC TTTTTTG3'。shRNA2反义链: 5'CGTCGTCTTCTAGGCCTTCATAAGTTCTCT ATGAAGGCCTAGAAGAGGACGAAAAAACC TAG3'。

1.2 方法 pGPU6/GFP/Neo-shRNA表达载体的构建。将DNA Oligo分别用TE(pH8.0)溶解,浓度为100 μ mol/L。取相应的正义链和反义链Oligo溶液,退火体系: 50 μ L = 5 μ L(正义链)+5 μ L(反义链)+5 μ L退火Buffer+35 μ L无菌水,在PCR仪上按照如下程序进行退火处理: 95℃ 5 min, 85℃ 5 min, 75℃ 5 min, 70℃ 5 min, 4℃保存。退火处理后得到浓度为10 μ mol的shRNA模板。将所得模板溶液稀释500倍,终浓度为20 nmol/L,用于连接反应。载体pGPU6/GFP/Neo经*Bam*H I和*Bbs* I双酶切,琼脂糖电泳,使用胶回收试剂盒回收。将退火片段与经酶切后的载体按摩尔比3:1的比例进行连接反应,置16℃过夜。将连接产物分别接种于100 μ L的DH5 α 感受态细胞中进行转化,涂布于含Kanamycin抗性(终浓度为20 mg/L)的LB平板上,37℃恒温箱培养过夜。从每个培养皿上各挑取3个单克隆菌落接种于3 mL含Kanar抗性(终浓度为20 mg/L)的LB培养液中,37℃恒温摇床培养过夜。用质粒小量抽提试剂盒小量提取质粒后,分别用限制性内切酶*Pst* I和*Bam*H I做单酶切鉴定,得到的重组质粒分别命名pGPU6/GFP/Neo-shRNA1, pGPU6/GFP/Neo-shRNA2。将鉴定证实后的两个重组质粒各取1管菌液送上海英骏公司测序。所用引物为5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'。以含100 mL/L小牛血清的RPMI1640培养基培养人大肠

相关报道

2004年Yang *et al*应用逆转录病毒载体介导siRNA引起乳腺癌和卵巢癌HER2/neu沉默,导致G₀/G₁期细胞增加,认为其与细胞周期蛋白D1降低、p27增加有关,与下游信号分子PI3K、pAkt表达降低有关。

创新盘点

本文中构建了HER-2 siRNA载体,并建立了稳定转染细胞株,为进一步研究HER-2基因在大肠癌中的作用以及探索大肠癌的基因治疗奠定基础。

癌HT29细胞株,胰酶消化传代。细胞铺6孔板,用Opti-MEM[®] I无血清培养基(购自Invitrogen公司),分别以250 μ L稀释4 μ g质粒载体和10 μ L脂质体Lipofectamine[®] 2000进行转染,6-7 h后更换完全培养基。转染后的细胞加入600 mg/L G418筛选,经14 d后形成阳性克隆,扩增培养备用。

2 结果

2.1 单酶切鉴定重组质粒 将合成的shDNA序列片段连入质粒pGPU6/GFP/Neo(图1)后,用BamH I和Pst I内切酶分别单酶切,质粒pGPU6/GFP/Neo的BamH I和Bbs I酶切位点之间是Pst I的酶切位点。而插入目的基因片段之后,Pst I酶切位点被取代,故不能被Pst I所酶切。Pst I酶切结果显示有2条带,第1条为超螺旋的SC构型,第2条为质粒的松弛开环的OC构型,可显示重组体不能被Pst I所酶切。重组体被BamH I单酶切而线性化,条带在5100 bp左右(图2)。

2.2 重组质粒测序鉴定 2个重组质粒shRNA编码序列与设计的片段完全一致,表明载体构建正确(图3)。

2.3 成功转染和稳定筛选重组质粒 编码shRNA的带绿色荧光蛋白的重组载体转染入HT29细胞后在绿色荧光激发波长下细胞应显示为绿色(图4),转染后24 h荧光显微镜摄片证实转染成功,G418稳定筛选出阳性克隆。

3 讨论

目前在研究哺乳动物细胞的基因功能方面,产生RNAi效应主要应用的方法有两类:一类为体外转录或化学合成siRNA经脂质体或逆转录病毒载体等转染细胞后介导RNAi,另一类为发夹式siRNA表达载体转染细胞后表达的发夹式siRNAs诱导RNAi。化学合成的siRNAs抑制作用时间短,合成成本昂贵,并且易于污染RNA酶而降解,因此限制其应用。而发夹式siRNAs表达载体转染细胞后表达发夹式siRNAs成本较低,可以在细胞内RNA酶的作用下被切割成与体外合成的siRNA相同的序列与结构,诱导RNAi。同时,他可以稳定持续地表达发夹式siRNA,使RNAi作用时间更长、更稳定^[10-11]。Brummelkamp *et al*^[8]研究发现将表达载体导入细胞内在U6启动子的作用下转录产生shRNA,其发卡环结构被切除后产生siRNA,具有表达量多、持续时间久的优点,并且还证实以9个核苷酸序列环为发卡的shRNA产生的抑制效应最

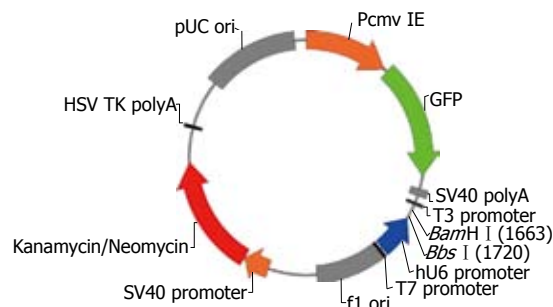


图1 pGPU6/GFP/Neo质粒载体图谱。

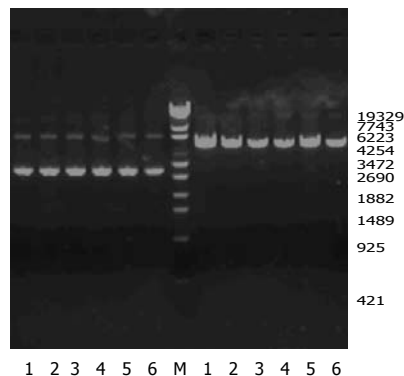


图2 质粒重组载体的酶切鉴定。M: Lamda/Eco130 ; 左1-3: pshRNA1 Pst I 酶切; 4-6: pshRNA2 Pst I 酶切; 右1-3: pshRNA1 BamH I 酶切; 4-6: pshRNA2 BamH I 酶切。

强^[12]。Willmore *et al*^[13]应用免疫组化法检测结直肠癌恶性病变erbB-2表达水平。结果显示,HER-2基因表达与Duke分期、生存期有关,HER-2表达强阳性者术后较早发生肝转移,HER-2表达水平是影响预后的独立因素。目前HER-2/neu蛋白产物P185neu所引起的肿瘤细胞内在的对化疗药物耐药的机制仍不清楚。Pietras *et al*^[14-15]研究提示P185neu过表达的肿瘤细胞对损伤的修复能力增强,是HER-2/neu诱导化疗药物耐药性的关键。如能设法阻断癌细胞内HER-2基因的表达,定会大大减弱癌细胞增殖能力同时减弱凋亡抑制。阐明HER-2基因在肿瘤细胞凋亡抑制和增殖中的作用,可为肿瘤治疗提供新的靶点,具有重要的理论意义和实际应用前景^[16]。

RNAi作为一种高效的序列特异性基因敲除技术在恶性肿瘤基因治疗领域发展必定更加迅速。如今RNA干扰已经成为药物开发的一种关键技术。2004年,RNAi首次作为评估药物靶标的一种技术进入应用,RNAi开发药物也将会进入临床试验。siRNA技术对于药物发展的一个主要优点是在最短的时间,以相对较小的经济发展代价来为任何一个目的基因设计一个特异siRNA复合物,同其他传统的小

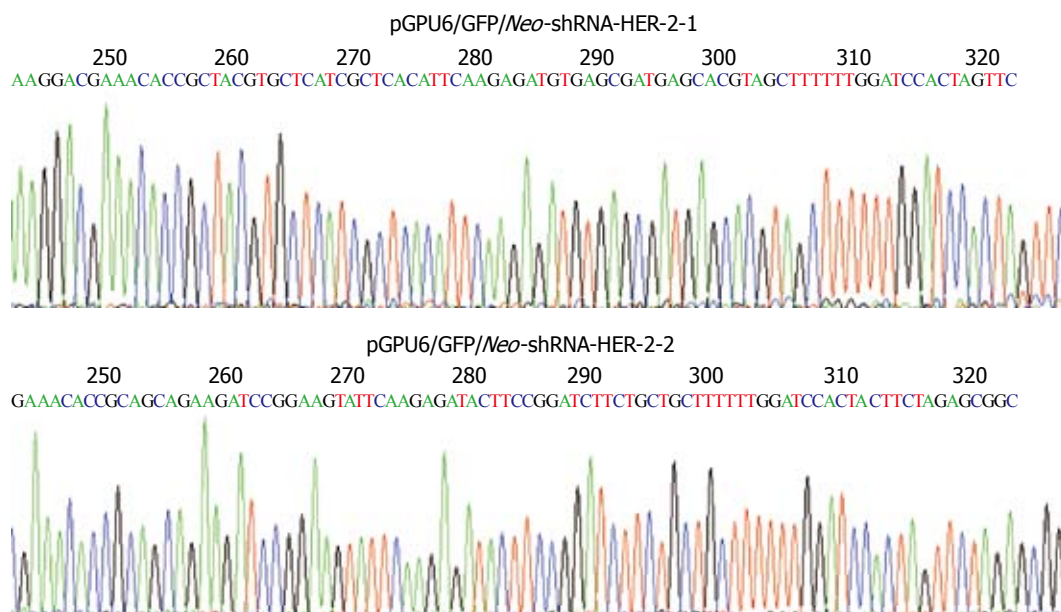


图 3 重组质粒pGPU6/GFP/Neo-shRNA1, pGPU6/GFP/Neo-shRNA2测序鉴定。

应用要点

本文利用带有绿色荧光蛋白的质粒构建靶向HER-2基因的shRNA表达载体,不仅可以检测转染效率,也可以为进一步体外和体内实验,探索抑制HER-2表达在大肠癌治疗中的作用奠定基础。

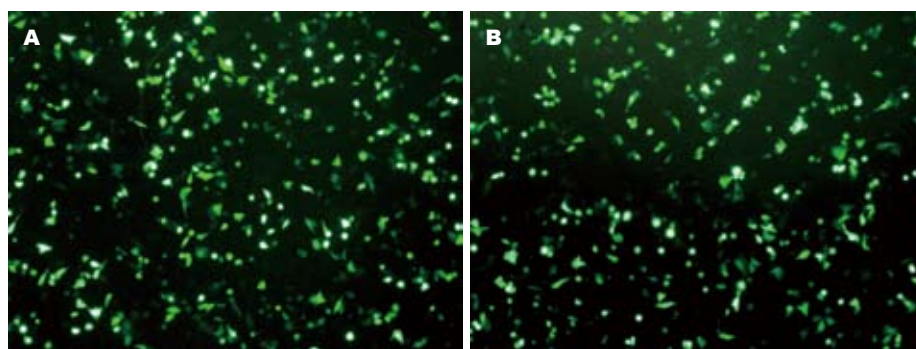


图 4 重组质粒转染HT29细胞后绿色荧光蛋白的表达($\times 100$)。A: pGPU6/GFP/Neo-shRNA1; B: pGPU6/GFP/Neo-shRNA2。

分子为基础的治疗相比有明显的灵活性^[17]。质粒pGPU6/GFP/Neo包括一种人U6 RNA聚合酶III启动子,利用相对单一的启动子和终止序列产生大量的小RNA。同时,位于启动子下游的shRNA是为了在RNAi质粒进入宿主表达后,单链的RNA配对形成短的dsRNA,引发RNA干扰。而且,该载体中含有可供筛选的卡那耐药基因,利于阳性重组子的克隆筛选。在本实验所构建的载体含有GFP基因,在细胞内,GFP基因的表达产物-绿色荧光蛋白,可以方便地通过荧光显微镜或流式细胞仪检测,确定载体转染效率。因此,我们根据GenBank中报道的HER-2基因核苷酸序列,参考shRNA设计原则设计出了两条阻断HER-2基因表达的RNAi序列,并成功克隆至载体pGPU6/GFP/Neo,通过抗性辅助筛选,重组体被整合到宿主细胞基因组后,RNA干扰(RNAi)效应可以实现传代^[18]。为下一步检测其对HER-2mRNA的抑制效率和抑制HER-2蛋白表达情况^[19],进一步研究HER-2基因在大

肠癌中的作用以及探索大肠癌基因治疗奠定基础。

4 参考文献

- 1 Zhao J, Zhang LH, Jia LT, Zhang L, Xu YM, Wang Z, Yu CJ, Peng WD, Wen WH, Wang CJ, Chen SY, Yang AG. Secreted antibody/granzyme B fusion protein stimulates selective killing of HER2-overexpressing tumor cells. *J Biol Chem* 2004; 279: 21343-21348
- 2 李巍, 田素礼, 李季. 癌基因C-erbB-2在结直肠癌中的表达及其与浸润转移的相关性. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3206-3211
- 3 Faltus T, Yuan J, Zimmer B, Kramer A, Loibl S, Kaufmann M, Strebhardt K. Silencing of the HER2/neu gene by siRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells. *Neoplasia* 2004; 6: 786-795
- 4 靳西凤, 冉志华. RNA干扰技术与结肠癌. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2003-2008
- 5 Perrimon N, Mathey-Prevot B. Applications of high-throughput RNA interference screens to problems in cell and developmental biology. *Genetics* 2007; 175: 7-16
- 6 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured

同行评价
本文是一篇方法
学的研究, 有一定
的参考价值.

- 7 mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494-498
- 8 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418: 244-251
- 9 Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002; 296: 550-553
- 10 刘明社, 王兰, 赵中夫, 张国英, 张芸, 封江南. 干扰Fas受体表达的串联shRNA表达载体的构建. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2174-2179
- 11 Paul CP, Good PD, Winer I, Engelke DR. Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 505-508
- 12 Wadhwa R, Kaul SC, Miyagishi M, Taira K. Know-how of RNA interference and its applications in research and therapy. *Mutat Res* 2004; 567: 71-84
- 13 Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002; 16: 948-958
- 14 Willmore C, Holden JA, Layfield LJ. Correlation of HER2 gene amplification with immunohistochemistry in breast cancer as determined by a novel monoplex polymerase chain reaction assay. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13: 333-341
- 15 Pietras RJ, Fendly BM, Chazin VR, Pegram MD, Howell SB, Slamon DJ. Antibody to HER-2/neu receptor blocks DNA repair after cisplatin in human breast and ovarian cancer cells. *Oncogene* 1994; 9: 1829-1838
- 16 Arteaga CL, Winnier AR, Poirier MC, Lopez-Larraz DM, Shawver LK, Hurd SD, Stewart SJ. p185c-erbB-2 signal enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human breast carcinoma cells: association between an oncogenic receptor tyrosine kinase and drug-induced DNA repair. *Cancer Res* 1994; 54: 3758-3765
- 17 Levkowitz G, Waterman H, Ettenberg SA, Katz M, Tsygankov AY, Alroy I, Lavi S, Iwai K, Reiss Y, Ciechanover A, Lipkowitz S, Yarden Y. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol Cell* 1999; 4: 1029-1040
- 18 Cejka D, Losert D, Wacheck V. Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clin Sci (Lond)* 2006; 110: 47-58
- 19 宁寒冰, 李继昌, 刘志国, 樊代明. TRF2小干扰RNA载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1044-1047
- 20 高利利, 吴本俨, 王孟薇, 黄海力, 伍银桥, 尤纬绵, 王卫华. 胃癌相关基因GCRG213正反义真核表达载体的构建及鉴定. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1453-1457

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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

• 消息 •

欢迎订阅 2008 年《世界华人消化杂志》

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

《世界华人消化杂志》报道消化疾病的评论及临床和基础研究, 包括消化肿瘤学、消化感染病学、消化内科学、消化外科学、消化内镜学、消化影像学、消化介入治疗学、消化中医药、中西医结合学、消化基础研究、消化病理学、消化循证医学等内容。

《世界华人消化杂志》2008年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023, 北京市2345信箱。联系电话: 010-85381901-638; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; <http://www.wjgnet.com>。

小鼠心脏移植后穿孔素及颗粒酶B表达水平与急性排斥反应的关系

朱 鹏, 陈义发, 李 丹, 陈孝平

朱鹏, 陈义发, 李丹, 陈孝平, 华中科技大学同济医学院附属
同济医院肝胆外科中心 湖北省武汉市 430030
朱鹏, 2005年华中科技大学同济医学院硕士研究生毕业, 博士
生, 主要从事肝胆外科及器官移植方面的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30571754
通讯作者: 陈孝平, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 武
汉同济医院肝胆外科中心. chenxp@medmail.com.cn
电话: 027-83662851 传真: 027-83662851
收稿日期: 2007-05-14 修回日期: 2007-09-24

Relationship between acute rejection after heart transplantation and protein expression of perforin and granzyme B

Peng Zhu, Yi-Fa Chen, Dan Li, Xiao-Ping Chen

Peng Zhu, Yi-Fa Chen, Dan Li, Xiao-Ping Chen, Hepatic
Surgery Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College,
Huazhong University of Science and Technology, Wuhan
430030, Hubei province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of
China, No. 30571754

Correspondence to: Prof. Xiao-Ping Chen, Hepatic Sur-
gery Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Hua-
zhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang
Avenue, Wuhan 430030, Hubei Province,
China. chenxp@medmail.com.cn

Received: 2007-05-14 Revised: 2007-09-24

Abstract

AIM: To investigate the relationship between acute rejection after heart transplantation and protein expression of perforin and granzyme B in organ recipients.

METHODS: All ventral heterotopic cardiac transplantation models were divided into three groups: rejection, treated, and isograft (20 recipients in each). Mean survival time (MST), histopathological changes, and protein expression of perforin and granzyme B in spleen lymphocytes were measured by Western blotting. Immuno-fluorescence techniques were used to determine the graft expression of perforin and granzyme B.

RESULTS: MST of heart allografts in the rejection and treated groups was 7.8 ± 0.77 d and

14.80 ± 1.01 d, respectively. Graft survival time in the isograft group was > 28 d. The differences between the three groups were statistically significant. The number of infiltrating cells in the rejection group, most of which were positive for perforin and granzyme B protein expression, was much higher than that in the other groups, as was the extent of the histopathological changes. Seven days after transplantation, compared with those in the treated group and isograft group, perforin protein expression in recipient spleen lymphocytes in the rejection group increased by 3.02-fold and 4.13-fold, while granzyme B protein expression increased by 3.44-fold and 2.50-fold, respectively.

CONCLUSION: Perforin and granzyme B can serve as a diagnostic index for acute rejection after transplantation.

Key Words: Perforin; Granzyme; Transplantation; Western blotting; Immuno-fluorescence techniques

Zhu P, Chen YF, Li D, Chen XP. Relationship between acute rejection after heart transplantation and protein expression of perforin and granzyme B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3289-3293

摘要

目的: 研究穿孔素和颗粒酶B蛋白在心脏移植后表达水平变化与心脏移植急性排斥反应的关系。

方法: 采用小鼠腹部心脏移植模型, 分为移植排斥组、实验处理组和同系移植组, 每组20对。观察移植物存活时间、供心病理改变。采用Western blot法检测受鼠脾脏淋巴细胞穿孔素及颗粒酶B蛋白表达水平, 免疫荧光方法观察心脏移植体内穿孔素及颗粒酶B的表达情况。

结果: 移植排斥组及实验处理组移植物平均存活时间分别为 7.8 ± 0.77 d、 14.80 ± 1.01 d, 同系移植组移植物存活均超过28 d, 三组差异有显著性。移植排斥组与实验组及同系移植组相比较, 移植体内心肌细胞变性坏死严重并有

背景资料

免疫排斥反应是影响同种异体器官移植疗效的主要障碍之一。急性排斥反应对机体和移植器官危害极大, 其机制较为复杂。穿孔素及颗粒酶B主要是由细胞毒性T淋巴细胞分泌的一系列颗粒物质, 在细胞免疫为主的急性排斥反应中起重要作用。

研发前沿
本文采用小鼠腹部异位心脏移植模型进行相关研究,探讨穿孔素及颗粒酶B在小鼠脾脏淋巴细胞及心脏移植植物内的表达及其在排斥反应中的意义。

大量炎性细胞浸润。移植术后7 d,移植排斥组与实验处理组和同系移植组相比,受鼠脾脏淋巴细胞穿孔素蛋白表达分别增加3.02倍、4.13倍,颗粒酶B蛋白表达分别增加3.44倍、2.50倍,差异有显著性。与另外两组相比,移植排斥组心脏移植植物冠状动脉分支内充填大量穿孔素与颗粒酶B阳性细胞,组织间隙内也有较多双阳性细胞浸润。

结论:穿孔素与颗粒酶B蛋白表达增加与急性排斥反应相关,可作为急性排斥反应的早期诊断指标。

关键词:穿孔素;颗粒酶;移植;免疫印迹;免疫荧光方法

朱鹏,陈义发,李丹,陈孝平.小鼠心脏移植后穿孔素及颗粒酶B表达水平与急性排斥反应的关系.世界华人消化杂志 2007;15(31):3289-3293

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3289.asp>

0 引言

免疫排斥反应是影响同种异体器官移植疗效的主要障碍之一,可导致移植物的结构损害和功能衰竭^[1-2]。急性排斥反应对机体和移植器官危害极大,其机制较为复杂^[3-7]。穿孔素及颗粒酶B主要是由细胞毒性T淋巴细胞(Tc)分泌的一系列颗粒物质,可以直接杀伤靶细胞^[8-10]。我们采用小鼠腹部异位心脏移植模型进行相关研究,探讨穿孔素及颗粒酶B在小鼠脾脏淋巴细胞及心脏移植植物内的表达及其在排斥反应中的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 近交系C57BL/6小鼠60只及近交系Balb/c小鼠80只,♂,6-8 wk龄,15-20 g,购于同济医学院器官移植研究所。供、受体质量无显著性差异,手术前后不禁饮食。将实验动物分为3组:A:移植排斥组,B:实验处理组和C:同系移植组,分别为20对。A组供体为C57BL/6小鼠,受体为Balb/c小鼠,无特殊处理,B组供体为C57BL/6小鼠,受体为Balb/c小鼠,受鼠在术前1 d经尾静脉行特异性供体脾细胞输注,术前1 d及术后1 wk联合应用环孢素A(5 μg/g)。C组供受体均为Balb/c小鼠,无特殊处理。动物模型采用小鼠腹部异位心脏移植模型,将供心主动脉与受体腹主动脉、供心肺动脉与受体下腔静脉分别行端侧吻合。双人双目手术显微镜一台(购于上海医用光学仪器厂),显微手术包(购于上海医疗器械有限公司手术器械厂),12-0带线缝合针

(购于宁波医用缝线厂),5-0医用丝线(上海医用缝合厂),戊巴比妥钠(同济医学院职业医学研究所惠赠),小鼠脾脏淋巴细胞分离液(深圳达科为公司),大鼠抗穿孔素抗体FITC标记(Abcam, ab16075),兔抗颗粒酶B抗体(Abcam, ab4059),兔抗beta-actin抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔及羊抗鼠二抗、羊抗兔荧光二抗试剂盒(晶美公司),激光共聚焦显微镜(Olympus)。脾细胞悬液制备:采用10 g/L戊巴比妥钠ip麻醉C57BL/6小鼠(0.01 mL/g),无菌条件下切取脾脏,放入盛有少量D-Hanks液培养皿内,将之剪成小块,转移至200目钢网上,用灭菌针芯轻轻研磨,经网过滤,即制成单细胞悬液。1000 r/min离心10 min,弃上清,加入适当红细胞裂解液,吹打混匀,2-3 min后加入D-Hanks液10 mL终止反应,1000 r/min离心10 min,洗2次,用DMEM培养基调整细胞浓度至 5×10^{10} 个/L备用,采用台盼蓝溶液染色计算活细胞百分率。

1.2 方法 术后每日手指触诊受鼠腹部,如供心不再搏动或仅有细微颤动均视为排斥终点,并设定28 d为观察终点。移植后7 d分别随机从3组中挑选受鼠各5只,断颈处死后取供心和脾组织,锡箔纸包裹后冻存于液氮中,保存备用。其中2只供心于40 g/L甲醛溶液内固定24 h后,石蜡包埋制成切片HE染色后于光学显微镜下观察。术后7 d,采用小鼠淋巴细胞分离液分出受鼠脾脏淋巴细胞,提取蛋白,采用lowry法调蛋白浓度一致,用Western blot方法检测穿孔素及颗粒酶B的表达水平,采用Beta-actin作为内参。其中一抗(1:2000)37℃孵育2 h, PBS洗15 min,重复3次, HRP标记二抗(1:1000)37℃孵育1 h, PBS洗3次,于暗室中进行ECL化学发光法显影。Western blot蛋白条带采用Gel-pro软件进行灰度扫描分析,并计算相对灰度值。相对灰度值 = IOD(目的条带)/IOD(内参)。另将移植物取出,置于样品托,制成冰冻切片,约7 μm厚,采用预冷丙酮固定30 min,含10 mL/L小牛血清的PBST室温封闭30 min(以下均为避光操作),加入穿孔素抗体(1:100)室温作用1 h, PBS清洗5 min×3,羊血清封闭30 min后加入颗粒酶B抗体室温下作用1 h, PBS清洗5 min×3,羊抗兔CY3荧光素标记二抗室温作用1 h, PBS清洗5 min×3,封片后于激光共聚焦显微镜下观察。免疫荧光采用Image-pro Plus软件进行分析。

统计学处理 实验数据采用mean±SD表示,统计学方法采用单因素方差分析及Pearson相关

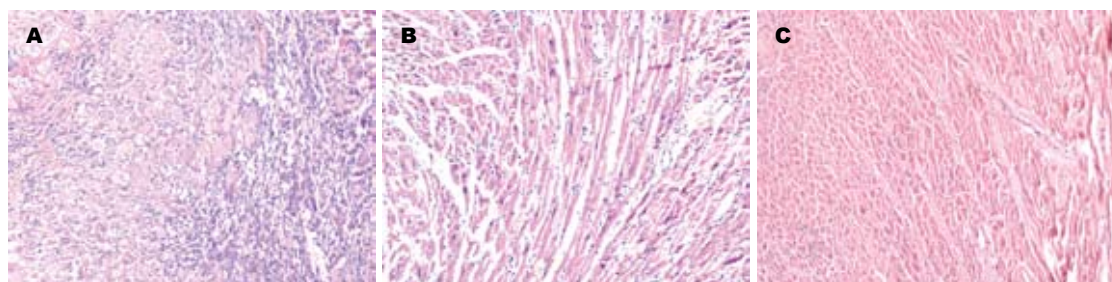


图 1 移植心脏组织学改变(HE × 100). A: 移植排斥组; B: 实验处理组; C: 同系移植组.

分析, 用SPSS10.0软件进行统计分析.

2 结果

2.1 移植心脏存活时间 移植排斥组(A组)移植心脏平均存活时间为 7.8 ± 0.77 d, 实验处理组(B组)移植心脏平均存活时间为 14.80 ± 1.01 d, 所有同系移植组(C组)移植植物在观察终点28 d时均存活, 3组存活时间比较, 差别有显著性意义($F = 2763.28, P < 0.01$).

2.2 移植心脏组织学改变 移植术后7 d, 移植排斥组为典型细胞免疫性损伤病理改变, 心肌细胞变性坏死、大量炎性细胞浸润, 以淋巴细胞和单核细胞为主, 病理分级为3级, 实验处理组只有少量炎性细胞浸润, 心肌细胞变性坏死较轻, 病理分级为1A级, 同系移植组几乎无炎性细胞浸润, 心肌细胞无变性坏死, 病理分级为0级(图1).

2.3 受鼠脾脏淋巴细胞内穿孔素及颗粒酶B蛋白表达 移植排斥组受鼠脾脏淋巴细胞穿孔素蛋白表达最强, 与实验处理组及同系移植组相比, 分别增强3.02倍和4.13倍, 差异有显著性($F = 355.31, P < 0.01$). 3组淋巴细胞颗粒酶B蛋白表达相比, 移植排斥组分别是实验处理组和同系移植组的4.44倍和3.50倍, 差异有显著性($F = 325.92, P < 0.01$, 图2, 表1). 将两种蛋白表达的相对灰度值与相应组别移植植物存活时间及病理分级行相关分析, 提示受鼠脾脏淋巴细胞穿孔素及颗粒酶B蛋白表达水平与移植植物存活时间存在明显负相关($r = -0.710, r = -0.808$), 而与病理分级存在明显正相关($r = 0.915, r = 0.965$).

2.4 3组受鼠心脏移植植物内穿孔素及颗粒酶B的表达 移植术后7 d, 移植排斥组心脏移植植物冠状动脉分支内充填大量穿孔素与颗粒酶B阳性细胞, 组织间隙内也有较多双阳性细胞浸润, 单视野内双阳性细胞数为 5424 ± 213 个. 实验处理组心脏移植植物冠状动脉分支及组织间隙内, 此类双阳性细胞明显减少, 单视野内双阳性细胞数为 54 ± 18

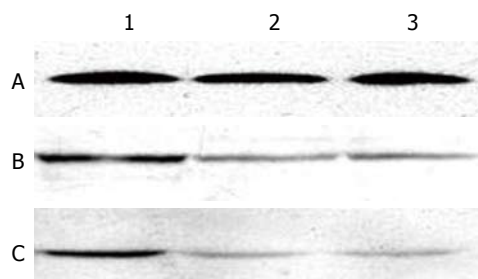


图 2 受鼠脾脏淋巴细胞内穿孔素及颗粒酶B蛋白表达. 1: 移植排斥组; 2: 实验处理组; 3: 同系移植组. A: β -actin; B: 穿孔素; C: 颗粒酶B.

个, 而同系移植组移植植物内, 冠状动脉分支及组织间隙内仅有极少量此类双阳性细胞存在, 单视野内双阳性细胞数为 4 ± 4 个. 3组细胞数比较, 差异显著($F = 10408.42, P < 0.01$, 图3). 移植植物内双阳性细胞数与相应组别移植植物存活时间及病理分级行相关分析, 提示移植植物内浸润的双阳性细胞数与移植植物存活时间呈明显负相关($r = -0.771$), 与病理分级呈明显正相关($r = 0.948$).

3 讨论

同种异体移植物的识别和排斥, 是涉及免疫效应细胞及调节因子在内的多种细胞间相互复杂作用的结果^[11]. 激活的 $CD4^+$ 辅助性T细胞分化为Th1和Th2亚群, 通过他们分泌不同细胞因子而参与不同免疫应答^[12-18]. Th1亚群分泌IFN- γ , TNF- β 和IL2等, 主要介导细胞毒(CTL)和迟发性超敏反应(DTH), Th2亚群分泌IL4, IL5, IL6, IL10, 主要功能是刺激B细胞增生并产生抗体, 参与体液免疫应答^[19-21].

以细胞免疫为主的排斥反应, 始终是影响器官移植效果的主要障碍之一, 其主要效应机制是由Tc介导的细胞毒作用^[22-27], 其机制主要有两种: (1)分泌型杀伤, 主要释放一些颗粒性物质, 如穿孔素、颗粒酶等. 颗粒酶经穿孔素在细胞膜上形成的小孔进入细胞内, 激活核酸内切酶系统, 使靶细胞DNA断裂, 引起靶细胞凋亡, 直接杀伤靶

创新盘点
有关穿孔素与颗粒酶研究主要集中于外周血淋巴细胞或移植浸润细胞的基因表达水平, 蛋白水平研究较少. 本研究结合Western blot和免疫荧光等蛋白检测方法, 并在小鼠心脏移植模型上对急性排斥反应过程中穿孔素及颗粒酶B蛋白表达进行探讨.

应用要点
本文结果对于急性排斥反应早期诊断的发展有重要意义。

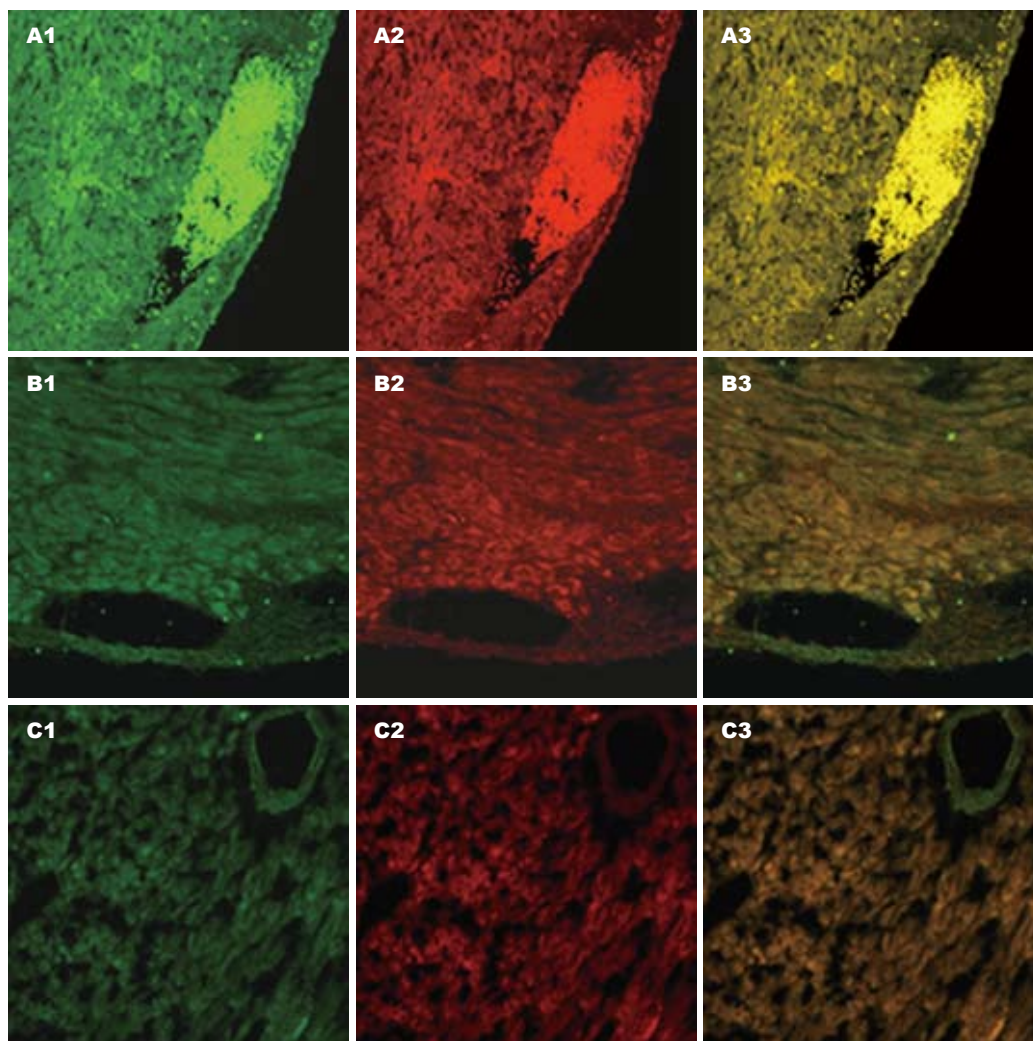


图 3 移植物内穿孔素及颗粒酶B蛋白的表达($\times 200$)。A: 移植排斥组; B: 实验处理组; C: 同系移植组。1: 穿孔素阳性(FITC标记); 2: 颗粒酶B阳性(PE标记); 3: 双阳性(融合图像)。

细胞。(2)非分泌型杀伤,主要通过FasI和TNF途径起作用。穿孔素又称孔形成蛋白、细胞溶素、C9相关蛋白。他是一种蛋白酶,以能在靶细胞膜上形成孔道,破坏靶细胞膜的完整性而得名,含534个氨基酸。在静止的细胞毒性前体细胞内穿孔素表达水平非常低,一旦激活,其穿孔素表达水平显著升高。颗粒酶,又名丝氨酸蛋白酶,已发现鼠的颗粒酶有7种,人的颗粒酶有3种,其中最主要的是A、B两类。颗粒酶B具有门冬氨酸酶的活性,能迅速引起靶细胞DNA的断裂,作用强于颗粒酶A,是主要的效应分子^[28-30]。

目前,有关穿孔素与颗粒酶研究主要集中于外周血淋巴细胞或移植物浸润细胞的基因表达水平,蛋白水平研究较少。我们发现,移植急性排斥组受鼠脾脏淋巴细胞穿孔素蛋白表达与实验处理组和同系移植组相比,分别增强3.02倍、4.13倍,颗粒酶B蛋白表达分别增加3.44

表 1 受鼠脾脏淋巴细胞穿孔素及颗粒酶B蛋白表达相对灰度值(mean \pm SD)

(I/OD/IOD)	移植排斥组	实验处理组	同系移植组
穿孔素	0.48 ± 0.06	0.12 ± 0.03	0.09 ± 0.03
颗粒酶B	0.42 ± 0.05	0.09 ± 0.03	0.12 ± 0.04

倍、2.50倍,差异有显著性,二者表达水平与移植物存活时间存在明显负相关,而与病理分级存在明显正相关。另外,移植排斥术后7 d,移植物冠状动脉分支内充填大量穿孔素与颗粒酶B阳性细胞,组织间隙内也有较多双阳性细胞浸润,显著高于实验处理组及同系移植组。单视野内浸润的双阳性细胞数与移植物存活时间呈明显负相关,与病理分级呈明显正相关。急性排斥反应时,脾脏淋巴细胞内穿孔素及颗粒酶B蛋白水平上调或移植物内穿孔素与颗粒酶B双阳性

的浸润细胞数明显增加, 有助于我们早期诊断急性排斥反应的发生. 另外, 结果还表明特异性供体脾细胞输注联合环孢素能明显抑制淋巴细胞内穿孔素与颗粒酶B蛋白表达, 并抑制其向移植体内浸润, 从而延长移植存活时间.

有关特异性供体脾细胞输注联合环孢素如何有效抑制Tc激活, 颗粒酶如何引起靶细胞凋亡的具体机制还需进一步研究. 这些机制的阐明对于有效减少排斥反应的发生, 提高移植物的存活率, 延长移植存活时间均有重要的意义.

4 参考文献

- Heslan JM, Renaudin K, Thebault P, Josien R, Cuturi MC, Chiffolleau E. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation* 2006; 82: 1185-1193
- Burton JR Jr, Rosen HR. Acute rejection in HCV-infected liver transplant recipients: The great conundrum. *Liver Transpl* 2006; 12: S38-47
- Caballero A, Fernandez N, Lavado R, Bravo MJ, Miranda JM, Alonso A. Tolerogenic response: allorecognition pathways. *Transpl Immunol* 2006; 17: 3-6
- Brook MO, Wood KJ, Jones ND. The impact of memory T cells on rejection and the induction of tolerance. *Transplantation* 2006; 82: 1-9
- Glott D, Lucchiari N, Pegaz-Fiornet B, Suberbielle-Boissel C. Endothelial cells as targets of allograft rejection. *Transplantation* 2006; 82: S19-21
- Wilczynski JR. Immunological analogy between allograft rejection, recurrent abortion and pre-eclampsia - the same basic mechanism? *Hum Immunol* 2006; 67: 492-511
- Hornick P. Direct and indirect allorecognition. *Methods Mol Biol* 2006; 333: 145-56
- Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 32-41
- Yannaraki M, Rebibou JM, Ducloux D, Saas P, Duperrier A, Felix S, Rife G, Chalopin JM, Herve P, Tiberghien P, Ferrand C. Urinary cytotoxic molecular markers for a noninvasive diagnosis in acute renal transplant rejection. *Transpl Int* 2006; 19: 759-768
- Olive C, Cheung C, Falk MC. Apoptosis and expression of cytotoxic T lymphocyte effector molecules in renal allografts. *Transpl Immunol* 1999; 7: 27-36
- 汪艳, 高毅. 肝脏移植耐受及其抗原递呈细胞相关作用的研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 600-606
- Colantonio L, Recalde H, Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Modulation of chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness during differentiation of human naive T cells into Th1 or Th2 cells. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1264-1273
- Spellberg B, Edwards JE Jr. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 76-102
- Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 2000; 14: 1693-1711
- Dong C, Flavell RA. Th1 and Th2 cells. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 47-51
- Tau GZ, von der Weid T, Lu B, Cowan S, Kvatyuk M, Pernis A, Cattoretti G, Braunstein NS, Coffman RL, Rothman PB. Interferon gamma signaling alters the function of T helper type 1 cells. *J Exp Med* 2000; 192: 977-986
- Zhou M, Ouyang W. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol Res* 2003; 28: 25-37
- Smeltz RB, Chen J, Hu-Li J, Shevach EM. Regulation of interleukin (IL)-18 receptor alpha chain expression on CD4(+) T cells during T helper (Th)1/Th2 differentiation. Critical downregulatory role of IL-4. *J Exp Med* 2001; 194: 143-153
- Smeltz RB, Chen J, Shevach EM. Transforming growth factor-beta1 enhances the interferon-gamma-dependent, interleukin-12-independent pathway of T helper 1 cell differentiation. *Immunology* 2005; 114: 484-492
- Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 933-944
- Kita Y, Li XK, Ohba M, Funeshima N, Enosawa S, Tamura A, Suzuki K, Amemiya H, Hayashi S, Kazui T, Suzuki S. Prolonged cardiac allograft survival in rats systemically injected adenoviral vectors containing CTLA4Ig-gene. *Transplantation* 1999; 68: 758-766
- Schulz M, Schuurman HJ, Joergensen J, Steiner C, Meerloo T, Kagi D, Hengartner H, Zinkernagel RM, Schreier MH, Burki K. Acute rejection of vascular heart allografts by perforin-deficient mice. *Eur J Immunol* 1995; 25: 474-480
- Alexander DZ, Pearson TC, Hendrix R, Ritchie SC, Larsen CP. Analysis of effector mechanisms in murine cardiac allograft rejection. *Transpl Immunol* 1996; 4: 46-48
- 丁小明, 刘晓东, 田普训, 薛武军. 穿孔素和颗粒酶B的表达与肾移植术后急性排斥反应的关系. *中华器官移植杂志* 2005; 6: 344-346
- Voskoboinik I, Trapani JA. Addressing the mysteries of perforin function. *Immunol Cell Biol* 2006; 84: 66-71
- Satterwhite T, Chua MS, Hsieh SC, Chang S, Scandling J, Salvatierra O, Sarwal MM. Increased expression of cytotoxic effector molecules: different interpretations for steroid-based and steroid-free immunosuppression. *Pediatr Transplant* 2003; 7: 53-58
- Shin GT, Kim SJ, Lee TS, Oh CK, Kim H. Gene expression of perforin by peripheral blood lymphocytes as a marker of acute rejection. *Nephron Clin Pract* 2005; 100: c63-70
- Dugre FJ, Gaudreau S, Belles-Isles M, Houde I, Roy R. Cytokine and cytotoxic molecule gene expression determined in peripheral blood mononuclear cells in the diagnosis of acute renal rejection. *Transplantation* 2000; 70: 1074-1080
- Graziotto R, Del Prete D, Rigotti P, Anglani F, Baldan N, Furian L, Valente M, Antonello A, Marchini F, D'Angelo A, Gambaro G. Perforin, Granzyme B, and fas ligand for molecular diagnosis of acute renal-allograft rejection: analyses on serial biopsies suggest methodological issues. *Transplantation* 2006; 81: 1125-1132
- Muthukumar T, Ding R, Dadhanian D, Medeiros M, Li B, Sharma VK, Hartono C, Serur D, Seshan SV, Volk HD, Reinke P, Kapur S, Suthanthiran M. Serine proteinase inhibitor-9, an endogenous blocker of granzyme B/perforin lytic pathway, is hyperexpressed during acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 2003; 75: 1565-1570

同行评价
本文选题新颖, 采用方法技术成熟, 设计合理, 实验证据充足, 有一定的创新性, 可读性及应用价值.

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

老年胃癌术后患者118例的预后分析

张煜, 马力文, 梁莉

背景资料
胃癌仍是全球发病率较高的癌症之一, 2002年全球新诊断胃癌934 000例, 死亡700 000例。中国及日本属高发国家。手术是目前胃癌唯一可治愈的手段, 但近2/3的胃癌确诊时分期较晚, 多属姑息性治疗, 并且胃癌术后复发及转移率较高。目前正进行大量临床试验, 试图通过辅助治疗来提高生存期。主要的辅助治疗措施包括: 术后辅助化疗与放疗、术前化疗及放疗等。美国目前针对胃癌的手术方式多为D0及D1, 并根据INT0116试验确立了术后同步放化疗为筛选患者的最佳治疗措施。尽管如此, 目前我国胃癌治疗的现状并不乐观, 手术方式尚未标准及规范化, 辅助化疗方案及放疗也未取得共识。老年患者占据胃癌中相当大的一部分, 关注老年胃癌患者的健康显得非常重要。

张煜, 马力文, 梁莉, 北京大学第三医院肿瘤治疗中心 北京市 100083
张煜, 2006年毕业于北京大学医学部, 硕士, 主要从事肿瘤研究。
通讯作者: 马力文, 100083, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院肿瘤治疗中心。 maliwen@sohu.com
电话: 010-52075516
收稿日期: 2007-07-27 修回日期: 2007-09-27

Prognostic factors analysis of 118 elderly postoperative patients with gastric cancer

Yu Zhang, Li-Wen Ma, Li Liang

Yu Zhang, Li-Wen Ma, Li Liang, Department of Medical Oncology, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China

Correspondence to: Li-Wen Ma, Department of Medical Oncology, the Third Hospital of Peking University, 49 Huayuan North Road, Haidian District, Beijing 100083, China. maliwen@sohu.com

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

Abstract

AIM: To study the relationship between clinical characteristics, postoperative chemotherapy and prognosis in elderly patients with gastric cancer.

METHODS: One hundred and eighteen elderly postoperative patients with gastric cancer were retrospectively analyzed from January 1997 to January 2006 in our hospitals, using Kaplan-Meier and Cox regression analysis to evaluate candidate prognosis factors, such as gender, clinical stage, differentiation, invasion depth, lymph node metastasis, distant metastasis, lymph-vascular space invasion, number of surgical resection lymph nodes, tumor residual and postoperative chemotherapy.

RESULTS: In univariate survival analysis, clinical stage, invasion depth, lymph node metastasis, distant metastasis, postoperative chemotherapy and tumor residual were obviously correlated with the prognosis ($P < 0.05$). In multivariable analysis, postoperative chemotherapy, tumor residual and clinical stage were confirmed to be independent factors ($P = 0.000$, $P = 0.000$ and $P = 0.002$).

CONCLUSION: Postoperative chemotherapy, tumor residual and clinical stage are independent prognostic factors in elderly postoperative gastric cancer patients, with stage and elderly patients that accept postoperative chemotherapy having an obvious survival advantage. However, postoperative chemotherapy does not improve survival in stage and elderly patients.

Key Words: Gastric cancer; Elderly patients; Prognosis; Multivariable analysis

Zhang Y, Ma LW, Liang L. Prognostic factors analysis of 118 elderly postoperative patients with gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3294-3298

摘要

目的: 研究老年胃癌患者的临床因素以及术后化疗对预后产生的影响。

方法: 对1997-01/2006-01我院收治的老年胃癌术后患者118例进行回顾性分析, 采用Kaplan-Meier和Cox回归分析评价性别、临床分期、组织学分化、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、脉管癌栓、手术切除淋巴结数量、术后肿瘤残留及术后化疗等因素对预后的影响。

结果: 单因素分析显示临床分期、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、术后化疗和肿瘤残留情况与预后明显相关($P < 0.05$)。多因素分析证实, 术后化疗、肿瘤残留情况及临床分期为预后的独立因素($P = 0.000$, $P = 0.000$ 和 $P = 0.002$)。

结论: 术后化疗、肿瘤残留情况及临床分期是老年胃癌术后患者预后的独立危险因素, 期及期老年患者接受术后化疗具有明显的生存优势, 但是, 术后化疗并未改善期及期老年患者的生存期。

关键词: 胃癌; 老年患者; 预后; 多因素分析

张煜, 马力文, 梁莉. 老年胃癌术后患者118例的预后分析. *世界华人消化杂志* 2007;15(31):3294-3298
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3294.asp>

0 引言

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 居消化道肿瘤死亡原因的第一位, 具有发病率高, 早期诊断率低, 手术切除率低, 死亡率高等特点, 是严重危害人民健康的疾病。文献报道胃癌预后主要与浸润深度、淋巴结转移、远处转移、病理类型及分化程度、手术方式和术后肿瘤残留情况等多种因素有关^[1]。该病多发于老年人, 胃癌发病率从40岁以后明显升高, 60岁以上是胃癌高发人群。胃癌死亡率在30-59岁年龄组中呈下降趋势, 60岁以上年龄组呈上升趋势, 人口老化是胃癌死亡率上升的重要因素^[2]。因此进一步探讨老年胃癌的临床特点以及术后化疗的疗效具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料 1997-01/2006-01我院接受手术治疗的老年胃癌患者118例, 术后ECOG评分均为0-2分, 男97例, 女21例, 平均年龄71(65-86)岁。全部病例均经病理证实为胃腺癌, 分期按照1997年UICC修订后的第5版TNM分期标准。因为胃癌具有异质性, 同一胃癌患者的病理标本中可能含有多种成分, 如同时包括低分化腺癌及印戒细胞癌, 病理类型以该患者胃癌标本内分化最差的成分为准。

1.2 方法 按照临床特点, 包括性别、临床分期、组织学分化、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、脉管癌栓、手术切除淋巴结数量、术后肿瘤残留以及治疗情况(术后是否接受化疗)分组, 并对比分析其对生存期的影响。随访时间1997-01/2007-04, 中位随访时间68.0(15-123) mo。至随访结束时死亡68例, 存活50例。

统计学处理 采用SPSS13.0统计分析软件分析。生存分析采用Kaplan-Meier和Cox回归分析, 生存率比较采用Log rank检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

共入选病例118例, 利用Kaplan-Meier计算总的中位生存期30.5 mo, 1年总生存率77.1%, 3年总生存率45.4%, 5年总生存率33.3%。

2.1 单因素分析

2.1.1 临床因素与预后的关系: 临床因素包括性别、临床分期、组织学分化、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、脉管癌栓、手术切除淋巴结数量、术后肿瘤残留。Kaplan-Meier寿命表分析结果显示, 临床分期、浸润深度、淋巴结转

移、远处转移、手术后肿瘤残留与生存期相关($P < 0.05$), 而其他因素与生存期无关(表1)。

2.1.2 术后化疗与生存期的关系: 将入选病例按手术后是否接受化疗分为两组并加以分析, 2组的ECOG评分状况大致相同。118例术后胃癌患者中接受化疗者共56例, 主要以铂类加5-FU为主; 3/4级骨髓抑制共19例(33.9%), 3/4级非血液毒性反应共13例(23.2%), 以消化道反应为主。62例患者因经济原因及畏惧化疗副作用而未接受化疗。有5例患者因化疗副反应而未能完成第1周期化疗, 1例在化疗时突发猝死。结果表明胃癌术后化疗具有统计学意义的生存优势, 中位生存期37.8对比25.6 mo($P = 0.045$)(表1, 图1F)。

2.2 多因素分析 将单因素分析中显示与预后相关的临床分期、术后肿瘤残留情况、是否接受化疗引入Cox回归模型进行分析。结果表明临床分期、是否接受化疗及肿瘤残留情况均是预后的独立危险因素($P = 0.000$ 、 $P = 0.000$ 和 $P = 0.002$, 表2)。

2.3 不同临床分期患者化疗对生存期的影响 为了解不同分期患者接受化疗的受益情况, 我们根据临床分期做了进一步的分层分析(表1)。结果显示, III、IV期胃癌老年患者接受化疗组具有明显的生存优势($P < 0.05$), 可以使总生存期明显提高; 而I、II期接受术后化疗的老年患者并不具备生存优势。这可能与I、II期老年患者生存期较长, 化疗获益程度相对被抵消所致。

3 讨论

胃癌术后易出现转移复发, 5年生存率较低, 国内文献一般在50%以下。詹友庆 *et al*^[3]分析了405例胃癌根治术后患者的预后情况, I、II、III、IV期患者术后5年生存率分别为75.6%、58.7%、28.0%及17%, 总的5年生存率为43.4%。Hejna *et al*^[4]统计了5个meta分析的结果, 5年生存率为12%-91.2%, 中位生存期为13-60 mo。影响胃癌预后的因素很多, 较为公认的是临床分期、肿瘤大小、浸润深度、病理类型、淋巴结转移、是否行根治手术等因素。肿瘤直径、脉管癌栓、年龄、性别、肿瘤部位及血小板增多在部分文献中也显示对预后有影响。一些肿瘤标记物的表达水平, 如VEGF、P53、HER-2、MSI、COX-2、E-钙黏蛋白及转移抑制基因nm23等^[5-6]也在部分文献中被认为对预后有影响。日本国立癌中心分析了6112例胃癌切除病例的资料, 其中以肿瘤的浸润深度(RR: 4.76)对胃癌预后的影响因素最大, 其次为淋巴结转

研发前沿 在我国, 以D2为主或包括更大范围的根治性手术正逐渐被外科医师所接受。国外通过多个meta分析认为辅助化疗具备一定的生存优势, 但并不显著。我国关于胃癌术后化疗对生存期的报道较少, 目前正进行临床回顾性分析及随机对照试验来证实辅助化疗的疗效。而关于辅助放疗、术前放疗及化疗、术中放疗及化疗的研究正在进行。S1单药或联合顺铂作为辅助化疗方案的疗效也在接受进一步评定。基础研究中, VGF受体抗体2DC101和西妥昔单抗注射给胃癌的裸鼠移植模型, 发现联合治疗能有效抑制肿瘤细胞生长。肿瘤标记物用于化疗疗效判断及预测预后的研究也成为热点之一。

创新盘点

本文主要应用Cox多因素分析来判断老年胃癌患者的预后因素,着重于确定不同分期的胃癌患者接受术后化疗对生存期的影响。资料详实,分析较为准确,对于临床指导老年胃癌的术后化疗具有一定价值。

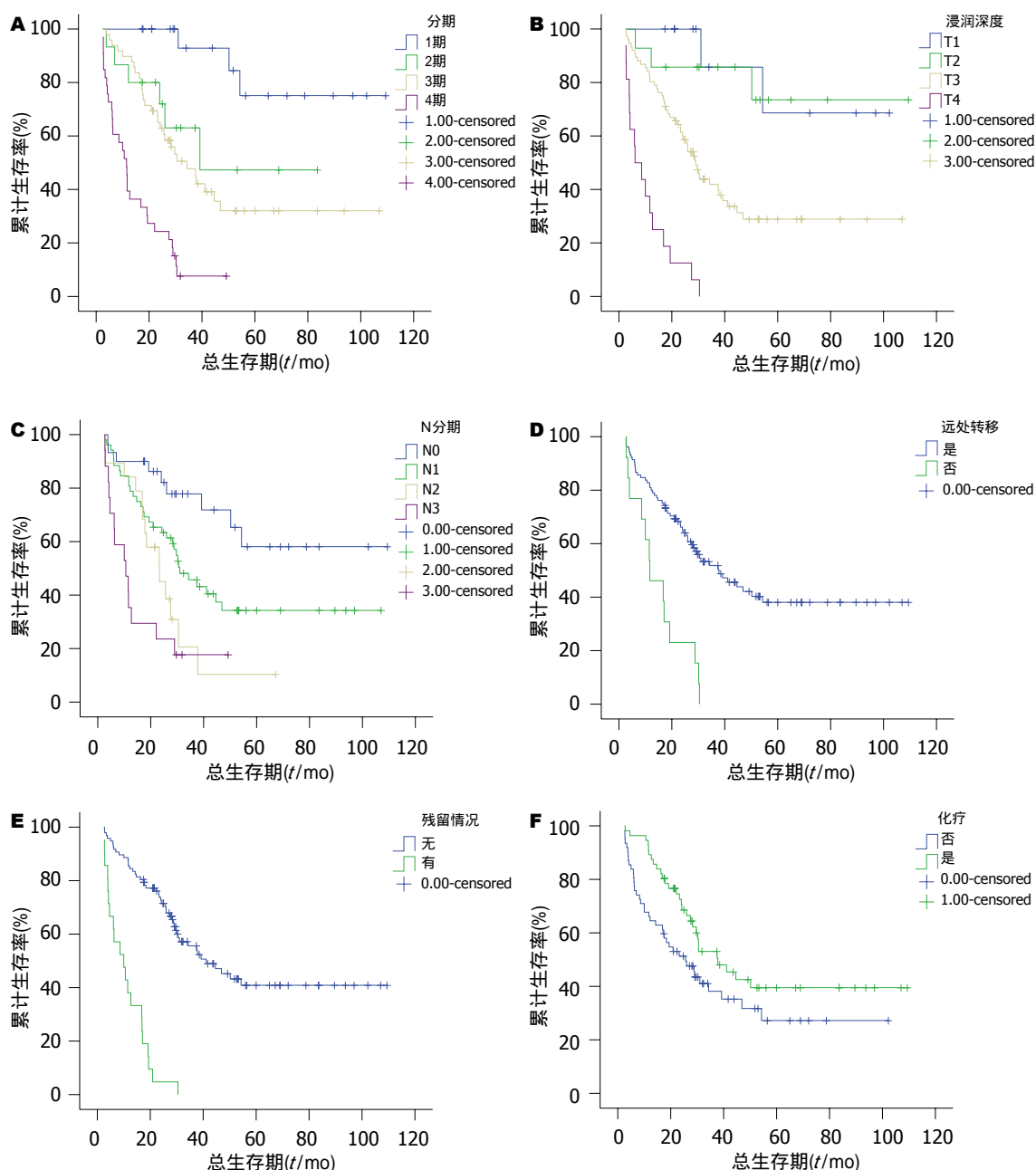
表 1 临床因素与生存期的关系

临床因素		<i>n</i>	1年生 生存率(%)	3年生 生存率(%)	5年生 生存率(%)	MST(mo)	<i>P</i> 值
性别	男	97	76.3	41.8	30.3	28.8	0.152
	女	21	81.0	62.6	47.0	41.1	
临床分期		21	100	92.9	75.0	?	0.000 (图1A)
		15	86.7	63.0	47.3	39.2	
		49	89.8	47.7	32.0	34.3	
		33	39.4	7.6	0	11.5	
组织学分化	印戒细胞癌	26	76.9	47.4	41.5	29.0	0.145
	低分化腺癌	52	75.0	39.7	21.0	28.3	
	中分化腺癌	36	80.6	54.8	43.8	44.6	
	高分化腺癌	1					
	黏液腺癌	3					
浸润深度	T1	12	100	85.7	68.6		0.0000 (图1B)
	T2	14	92.9	85.7	73.5		
	T3	76	80.3	41.9	28.9	29.0	
	T4	16	31.3	0	0	6.1	
淋巴结转移	0	30	90	77.8	58.0		0.000 (图1C)
	1-6	52	80.8	45.7	34.2	31	
	7-15	19	84.2	20.6	0	23.3	
	16	17	35.3	0	0	10.6	
远处转移	(+)	13	46.2	0	0	11.7	0.000 (图1D)
	(-)	105	88.6	69.4	57.2	37.8	
脉管癌栓	(+)	18	72.2	36.5	36.5	26	0.612
	(-)	100	78.0	46.7	33.3	30.5	
切除淋巴结数	15	62	82.3	45.0	36.1	30.5	0.535
	>15	56	71.4	46.8	27.4	30.2	
肿瘤残留	(-)	97	85.6	55.6	40.8	41.1	0.000 (图1E)
	(+)	21	38.1	0	0	10	
化疗组		56	66.1	38.1	27.1	37.8	0.045
未化疗组		62	89.3	53.0	39.5	25.6	(图1F)
I期	化疗	6	100	100	75		0.983
	未化疗	15	100	90	75		
II期	化疗	7	100	62.5	62.5		0.365
	未化疗	8	75	62.5	31.3		
III期	化疗	28	100	61.2	42.4	41.1	0.019
	未化疗	21	76.2	27.8	13.9	23.2	
IV期	化疗	15	60.0	16.7	0	19.2	0.003
	未化疗	18	22.2	0	0	6.1	

移(RR: 4.39)、远处转移(RR: 2.33)、淋巴清除(RR: 2.06)、年龄(RR: 1.94)、癌的组织学类型(RR: 1.55)以及肿瘤的大小(RR: 1.40)^[7]。我们入选的临床因素为性别、临床分期、组织学分化、浸润深度、淋巴结转移、远处转移、脉管癌栓、手术切除淋巴结数量、术后肿瘤残留情况。研究分析显示,临床分期、肿瘤浸润深度、淋巴结转移、远处转移及术后肿瘤残留均与预后明显相关,与多数文献报导相一致。而组织分化程度、脉管癌栓并未证实与预后

有关。

姑息性化疗优于最佳支持治疗的结论已经基本达成共识,单药的有效率为10%-30%左右,联合化疗有效率为30%-60%左右,中位生存期延长6 mo左右^[8]。但是胃癌术后辅助化疗是否对生存有益一直存在争议。在过去的30年中,相关的研究一直没有停止过。在1993年以前,对胃癌辅助化疗基本没有系统性大样本的研究^[9]。直到1993年, Hermans *et al*^[10]首次进行了胃癌辅助化疗的meta分析,共收录了11项研究,收录



应用要点
本文进一步明确、期老年胃癌术后患者接受化疗的益处, 并建议、期老年胃癌术后患者(不合并高危因素)可不接受化疗。

图 1 临床因素与生存期的关系: A: 临床分期; B: 浸润深度; C: 淋巴结转移; D: 远处转移; E: 术后肿瘤残留; F: 术后化疗。

了2096名患者, 结论并没有证实辅助化疗对生存有益(RR: 0.88)。Earle *et al*^[11]在1999年发表的meta分析结果说明了辅助化疗可以使患者轻度受益(RR: 0.80), 同样2000年Mari *et al*^[12]的研究也得出基本相似的结论: 胃癌根治术后患者行辅助化疗轻度有益(RR: 0.82)。2002年时, Panzini *et al*^[13]的meta分析结果说明胃癌患者接受辅助化疗明显受益(RR: 0.72), 可明显延长生存期。然而Janunger *et al*^[14]在2002年的研究不支持将辅助化疗作为胃癌的标准治疗(RR: 0.84)。总之, 虽然目前不能将辅助化疗作为胃癌的标准治疗, 但多数研究的结论均支持术后辅助化疗对生活质

表 2 胃癌预后的多因素分析

参数	分级	P值	RR	95%可信区间
临床分期	1期	0.000	0.047	0.013-0.071
	2期	0.005	0.248	0.093-0.659
	3期	0.003	0.390	0.211-0.720
	4期			
术后肿瘤残留	有残留	0.027	2.474	1.488-4.111
	无残留			
术后化疗	化疗	0.002	0.344	0.176-0.672
	未化疗			

量及总生存期有益, 多个meta分析的结果也支持

同行评价
本文分析方法成熟, 结果可信, 图表清晰, 有一定的临床指导意义.

上述观点. 但是由于meta分析本身就存在出版偏倚等严重缺陷, 使得目前胃癌辅助化疗的效果仍难以确定, 这个观点也得到了Sastre *et al*^[8]的支持.

老年胃癌患者占有胃癌人数的50%左右. 因老年人的身体机能衰退, 合并症多, 化疗的副作用更值得注意, 对生存期的影响也需要慎重评价. Trumper *et al*^[15]的分析结果显示, 257例70岁以上的老年食管及胃癌患者接受化疗的毒性反应对比非老年组(823例)无显著性差异, 提示老年患者也可较好的耐受化疗. 在本组回顾性分析研究中, 约10%的老年患者因化疗的副作用而选择中断治疗, 1例患者猝死. 但从整体来说, III、IV期胃癌老年患者接受化疗组具有明显的生存优势, 较大的提高了生存质量及生存期, 应当予以肯定; 而I期及II期老年患者的术后化疗作用尚未明确, 需要进一步研究来证实.

4 参考文献

- 董志伟, 乔友林, 李连弟, 陈育德, 王润田, 雷通海, 饶克勤, 王汝宽, 赵平, 游伟程, 鲁凤珠, 戴旭东, 王国清, 罗贤懋, 周海城. 中国癌症控制策略研究报告. 中国肿瘤 2002; 11: 250-260
- 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连弟, 鲁凤珠, 乔友林. 中国胃癌死亡率20年变化情况分析及其发展趋势预测. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 4-9
- 詹友庆, 孙晓卫, 李威, 陈映波, 徐立, 关远祥, 李元方, 徐大志. 影响根治术后胃癌预后的多因素分析. 癌症 2005; 24: 596-599
- Hejna M, Wohrer S, Schmidinger M, Raderer M. Postoperative chemotherapy for gastric cancer. *Oncologist* 2006; 11: 136-145
- Zheng L, Wang L, Ajani J, Xie K. Molecular basis of gastric cancer development and progression. *Gastric Cancer* 2004; 7: 61-77
- Yasui W, Oue N, Aung PP, Matsumura S, Shutoh M, Nakayama H. Molecular-pathological prognostic factors of gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 2005; 8: 86-94
- Okajima K, Sasako M, Kinoshita T. Important prognostic factors for gastric cancer patients, change of significance in 6112 patients treated in 30 years period. 35th World congress of international society of surgery. 1993; 593
- Sastre J, Garcia-Saenz JA, Diaz-Rubio E. Chemotherapy for gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 204-213
- Agboola O. Adjuvant treatment in gastric cancer. *Cancer Treat Rev* 1994; 20: 217-240
- Hermans J, Bonenkamp JJ, Boon MC, Bunt AM, Ohyama S, Sasako M, Van de Velde CJ. Adjuvant therapy after curative resection for gastric cancer: meta-analysis of randomized trials. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1441-1447
- Earle CC, Maroun JA. Adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer in non-Asian patients: revisiting a meta-analysis of randomised trials. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1059-1064
- Mari E, Floriani I, Tinazzi A, Buda A, Belfiglio M, Valentini M, Cascinu S, Barni S, Labianca R, Torri V. Efficacy of adjuvant chemotherapy after curative resection for gastric cancer: a meta-analysis of published randomised trials. A study of the GISCAD (Gruppo Italiano per lo Studio dei Carcinomi dell'Apparato Digerente). *Ann Oncol* 2000; 11: 837-843
- Panzini I, Gianni L, Fattori PP, Tassinari D, Imola M, Fabbri P, Arcangeli V, Drudi G, Canuti D, Fochessati F, Ravaioli A. Adjuvant chemotherapy in gastric cancer: a meta-analysis of randomized trials and a comparison with previous meta-analyses. *Tumori* 2002; 88: 21-27
- Janunger KG, Hafstrom L, Glimelius B. Chemotherapy in gastric cancer: a review and updated meta-analysis. *Eur J Surg* 2002; 168: 597-608
- Trumper M, Ross PJ, Cunningham D, Norman AR, Hawkins R, Seymour M, Harper P, Iveson T, Nicolson M, Hickish T. Efficacy and tolerability of chemotherapy in elderly patients with advanced oesophago-gastric cancer: A pooled analysis of three clinical trials. *Eur J Cancer* 2006; 42: 827-834

编辑 何燕 电编 郭海丽

肝癌组织中14-3-3基因差异表达的意义

刘娟, 姚树坤, 殷飞

刘娟, 姚树坤, 殷飞, 河北医科大学第四医院消化内科 河北省石家庄市 050011

刘娟, 2007届河北医科大学博士研究生, 医师, 主要从事消化系统疾病的研究。

河北省卫生厅科研基金自助项目, No. 07122

通讯作者: 殷飞, 050011, 河北省石家庄市健康路12号, 河北医科大学第四医院消化内科. yinfei_4y@sina.com

电话: 0311-86033941-342 传真: 0311-86077634

收稿日期: 2007-06-06 修回日期: 2007-10-10

Significance of differentially expressed gene 14-3-3 in hepatocellular carcinoma

Juan Liu, Shu-Kun Yao, Fei Yin

Juan Liu, Shu-Kun Yao, Fei Yin, Department of Gastroenterology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China

Supported by: the Scientific Research Foundation of the Healthy Department in Hebei Province, No. 07122

Correspondence to: Dr. Fei Yin, Department of Gastroenterology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, 12 Jiankang Road, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China. yinfei_4y@sina.com

Received: 2007-06-06 Revised: 2007-10-10

Abstract

AIM: To detect the expression of 14-3-3 gene family members in hepatocellular carcinoma (HCC) by GeneChip and determine its clinical significance.

METHODS: Total RNA was isolated from tissue of HCC, liver cirrhosis and normal liver, purified into mRNA by Oligotex, and reverse-transcribed to synthesize two kinds of fluorescently labeled cDNA probes (Cy3-dUTP, Cy5-dUTP). The targets were mixed together and hybridized by GeneChip. The expression of 14-3-3 gene family members among different liver tissues was detected based on signal-to-noise ratios by using GenePix Pro3.0 software, the outcome was verified by semi-quantitative RT-PCR, and the clinical significance of differentially expressed genes was explored.

RESULTS: 14-3-3 gene family members were expressed differently in HCC, 14-3-3 γ was down-regulated and closely related to the integrity

of the envelope of the tumor. 14-3-3 η was up-regulated in HCC and had a close relationship to the clinical stage of HCC. A negative correlation was found between 14-3-3 γ and 14-3-3 η mRNA expression ($r = -0.403$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Dysfunction of the regulatory mechanism of the 14-3-3 gene family may play a crucial role in the development of HCC. 14-3-3 γ and 14-3-3 η are closely related to HCC.

Key Words: 14-3-3; Hepatocellular carcinoma; Cirrhosis; GeneChip

Liu J, Yao SK, Yin F. Significance of differentially expressed gene 14-3-3 in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3299-3304

摘要

目的: 检测肝癌组织中14-3-3基因家族成员表达差异的临床意义。

方法: 用TRIzol一步法提取肝癌组织、硬化肝组织及正常肝组织的总RNA并纯化mRNA。逆转录合成荧光分子(Cy3/Cy5)标记的cDNA探针与含有14-3-3基因家族成员的基因芯片杂交, 用GenePix Pro3.0图像分析软件分析不同病变肝组织中该基因家族成员的表达差异, 行半定量RT-PCR对结果进行验证并探讨差异表达基因的临床意义。

结果: 在肝癌组织中14-3-3基因家族成员呈差异表达, 其中14-3-3 γ 在肝癌组织中明显下调, 与肿瘤包膜的完整性相关。14-3-3 η 在肝癌组织中明显上调, 与肿瘤患者的临床分期相关。14-3-3 γ 与14-3-3 η mRNA的表达强度呈负相关($r = -0.403$, $P < 0.05$)。

结论: 14-3-3基因家族调控机制的紊乱参与肝癌的发生、发展, 其中14-3-3 γ 和14-3-3 η 与肝癌的关系最为密切。

关键词: 14-3-3基因; 肝癌; 肝硬化; 基因芯片

刘娟, 姚树坤, 殷飞. 肝癌组织中14-3-3基因差异表达的意

背景资料

14-3-3是一个高度保守的基因家族, 普遍存在于真核细胞, 参与细胞许多重要的生理过程, 并在其中起至关重要的作用, 如细胞信号转导、细胞周期调控、细胞凋亡、恶性肿瘤的形成等。近年来, 14-3-3在肿瘤组织中的表达情况及与肿瘤间的关系已受到极大的关注, 已有学者将其定义为潜在的致癌基因。

相关报道

Qi *et al* 研究发现 14-3-3 基因家族成员在肺癌、乳腺癌等肿瘤组织中异常表达, 认为 14-3-3 调节失控在肿瘤的发生、发展中发挥重要的作用。有研究发现在多种肿瘤细胞中 14-3-3 σ 基因的“CpG 岛”发生高频率的甲基化, 使 14-3-3 σ 基因沉默或低表达, 从而引起 G₂ 期检控点损伤, 导致基因缺陷积累, 细胞发生恶性转化。Qi *et al* 研究发现, 肺癌组织中 14-3-3 β 、14-3-3 γ 、14-3-3 σ 和 14-3-3 θ 基因的表达均明显上调, 并且抑制 14-3-3 ζ 的表达能增强肿瘤对放疗的敏感性, 认为可以将 14-3-3 作为肺癌的诊断标志物 and 治疗的靶点。

义. 世界华人消化杂志 2007;15(31):3299-3304
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3299.asp>

0 引言

14-3-3 是一个高度保守的基因家族, 普遍存在于真核细胞, 参与细胞许多重要的生理过程, 并在其中起至关重要的作用, 如细胞信号转导、细胞周期调控、细胞凋亡、恶性肿瘤的形成等^[1]。14-3-3 在肿瘤组织中的表达情况及与肿瘤间的关系已受到极大的关注。国外研究发现 14-3-3 基因家族成员在肺癌^[2]、乳腺癌^[3]等肿瘤组织中异常表达, 认为 14-3-3 调节失控在肿瘤的发生、发展中发挥重要的作用。我们用基因芯片技术比较了 14-3-3 基因家族成员在肝癌、肝硬化和正常肝组织中的表达情况, 筛选出与肝癌发生、发展密切相关的基因, 为肝癌的诊断和治疗提供一个新的靶点。

1 材料和方法

1.1 材料 单发无转移的原发性肝细胞癌(HCC)标本4例(表1), 肝硬化标本1例, 肝血管瘤周边正常肝组织标本1例, 均为河北医科大学第四医院肝胆外科手术切除, 并经病理学检查证实。手术切除后迅速液氮冷冻, 置于-80℃超低温冰箱中保存。所用芯片为上海博星基因芯片公司提供的人表达谱芯片BiostarH40s。另对HCC组织19例(表2), 癌旁硬化肝组织11例及肝血管瘤周边正常肝组织7例(术前均未进行任何形式的治疗)作半定量RT-PCR。

1.2 方法

1.2.1 芯片流程: 按RNA抽提步骤用TRIzol试剂抽提HCC、肝硬化及正常肝组织的总RNA, 分离纯化mRNA, 紫外分光光度计测定和电泳分析总RNA和mRNA的质量。基因芯片的杂交步骤按博星实验室表达谱芯片实验操作流程进行, 用Cy3-dUTP标记正常肝组织mRNA, 用Cy5-dUTP分别标记HCC和肝硬化组织mRNA, 逆转录成cDNA探针, 乙醇沉淀后将标记的两种探针混合溶解在杂交液中, 置于95℃水浴中变性2 min。芯片置于95℃水浴中变性30 s, 取出后浸无水乙醇30 s, 取出后立即置于冰上, 将探针置于芯片上, 用盖玻片覆盖, 置于杂交箱中, 用Parafilm密封, 放入42℃杂交箱内杂交过夜(16-18 h), 洗片室温凉干后, 用ScanArray4000扫描仪扫描芯片, 用GenePix Pro3.0软件分析Cy3和Cy5两种荧光信号的强度和比值。对原始数据进

行标准化处理。基因显著性差异表达的判定标准为: (1)该基因点的Cy3, Cy5信号值皆大于200, 或其中之一大于800; (2)该基因点的Cy5信号值/Cy3信号值的比值>2或<0.5。

1.2.2 半定量RT-PCR: 将RNA逆转录合成cDNA。PCR扩增, 引物序列为: 内参 β -actin: F: 5'-A CACTGTGCCCATCTACGAGG-3'; R: 5'-CATACTGCTCAGGCCCGGGA-3', 片段长度为621 bp。14-3-3 γ : F: 5'-GGCTAAATGAGAATGAAAGCGACT-3'; R: CGATCCATGACATACAGACCTGA-3', 片段长度为191 bp。14-3-3 η : F: 5'-AGAAGATTGAGAAGGAGCTGGAGA-3'; R: 5'-AAACACCTTGCTCTCATACTGGAAA-3', 片段长度为107 bp。PCR反应条件: 95℃预变性5 min, 95℃变性30 s, 50-56℃复性30 s, 循环30-35个周期, 最后72℃延伸5 min。PCR反应时同时扩增 β -actin作为内参照, 复性温度及循环次数根据不同引物及模板进行调整。25 g/L琼脂糖凝胶电泳检测并进行灰度扫描成像。用目的基因和内参基因两电泳条带的单位面积内的灰度比值来反映目的基因的相对表达水平, 计算公式为: 目的基因相对表达水平 = (目的基因灰度值-背景灰度值)/(内参基因灰度值-背景灰度值)。

统计学处理 对半定量RT-PCR结果应用SPSS11.5软件统计, 两两比较用 t 检验, 多组比较采用单因素方差分析, 两因素的相关分析用直线相关分析(Pearson相关系数)。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 抽提RNA 电泳18S, 28S条带清晰, 且28S带的宽度和亮度是18S的2倍(图1), A_{260}/A_{280} 在1.7-2.2之间, 显示得到了高质量的总RNA。

2.2 芯片结果 各组扫描结果经计算机数据叠加后产生的图像, 绿色代表该基因与正常肝组织相比较下调, 红色代表上调, 黄色代表表达丰度相似(图2)。14-3-3基因家族成员在HCC组织中的差异表达, 其中14-3-3 γ 在HCC组织中均明显下调, 14-3-3 η 在HCC组织中均明显上调(表3, 图2)。

2.3 半定量RT-PCR HCC组织中14-3-3 γ mRNA的表达显著低于癌旁硬化组织和正常肝组织($P<0.01$), HCC组织中14-3-3 η mRNA的表达显著高于癌旁硬化肝组织和正常肝组织($P<0.05$, 表4)。并且, 14-3-3 γ mRNA的表达水平在包膜不完整的癌组织中要显著低于包膜完整的癌组织($P<0.05$), 而14-3-3 η mRNA在临床分期越晚的HCC患者中的表达水平显著升高($P<0.05$, 表5,

表 1 男性原发性肝癌4例的临床特征

No.	年龄	HBsAg	HBeAg	HBeAb	HBcAb	AFP(μ g/L)	肿瘤大小(cm)	肿瘤分化
1	57	(+)	(-)	(-)	(+)	1647	20 × 20	低
2	48	(+)	(-)	(-)	(+)	3000	8 × 7	低
3	56	(+)	(-)	(-)	(+)	1800	8 × 7 × 5	中度
4	35	(+)	(-)	(+)	(+)	3000	10 × 6	低

表 2 肝癌患者19例的临床特征

No.	年龄	性别	HBV	HCV	AFP(μ g/L)	肿瘤大小(cm)	包膜	癌栓	播散灶	病理诊断
1	57	男	(+)	(-)	1647	20 × 20	无	有	无	HCC, III
2	49	男	(+)	(-)	3.44	8 × 6	完整	无	无	HCC, II
3	48	男	(+)	(-)	3000	8 × 7	部分	有	无	HCC, III
4	58	男	(+)	(-)	3000	20 × 10 × 10	无	有	有	HCC, II
5	56	男	(+)	(-)	1800	8 × 7 × 5	完整	无	有	HCC, II
6	63	男	(+)	(-)	164.8	7 × 5 × 5	完整	无	无	HCC, III
7	53	男	(+)	(-)	397.9	12 × 15	部分	无	有	HCC, III
8	71	男	(+)	(-)	9.37	13 × 10	部分	无	无	HCC, III
9	50	男	(-)	(-)	974.9	15 × 10 × 10	无	有	无	HCC, IV
10	50	男	(+)	(-)	3000	20 × 20	无	有	无	HCC, II
11	60	女	(+)	(-)	195.1	6 × 5 × 5	部分	有	无	HCC, III
12	37	男	(+)	(-)	408	5 × 5	完整	无	无	HCC, II
13	47	女	(+)	(-)	1522.1	10 × 10	部分	无	无	HCC, III
14	49	男	(+)	(-)	3000	4 × 4 × 4	完整	无	多发	HCC, III
15	49	女	(+)	(-)	40.63	4 × 5 × 4	部分	无	有	HCC, IV
16	66	男	(+)	(-)	1144	8 × 6 × 6	完整	无	无	HCC, II
17	60	男	(+)	(-)	1389	10 × 6 × 6	完整	无	无	HCC, III
18	63	男	(+)	(-)	3000	10 × 10	部分	无	有	HCC, II
19	35	男	(+)	(-)	3000	10 × 10	部分	无	有	HCC, III

表 3 肝癌组织中14-3-3基因家族成员的表达水平

全称	基因 ID	肝癌			
		1	2	3	4
下调基因					
14-3-3 γ Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan-5-Monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	Hs.520974	0.08	0.21	0.48	0.41
上调基因					
14-3-3 η Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan-5-Monooxygenase activation protein, eta polypeptide	Hs.226755	3.15	3.20	2.82	3.51
其他基因					
14-3-3 τ Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan-5-Monooxygenase activation protein, theta polypeptide	Hs.74405	0.63	0.98	1.04	1.05
14-3-3 ζ Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan-5-Monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Hs.492407	2.62	1.99	3.25	1.14
14-3-3 β Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan-5-Monooxygenase activation protein, beta polypeptide	Hs.592135	0.89	1.01	1.98	2.11
14-3-3 ϵ Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan-5-Monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	Hs.513851	0.38	1.31	0.52	0.78
14-3-3 σ Stratifin	Hs.523718	1.29	2.33	0.95	1.67

图3A-B). HCC组织中14-3-3 γ 与14-3-3 η mRNA的表达强度呈负相关($r = -0.403, P < 0.05$).

3 讨论

14-3-3广泛分布于真核生物细胞中, M_r 30×10^3 ,

创新盘点
到目前为止, 尚无有关14-3-3基因家族成员在各种肝组织中的分布情况以及与HCC之间关系的报道。我们利用基因芯片技术一次性平行比较了14-3-3基因家族成员在不同肝组织中的表达情况, 筛选出与肝癌发生、发展密切相关的基因, 分析其与肝癌患者临床参数间的关系, 为肝癌的诊断和治疗提供一个新的靶点。

应用要点

本文研究发现, 14-3-3基因家族调控机制的紊乱参与了肝癌的发生、发展, 其中14-3-3 γ 和14-3-3 η 与肝癌的关系最为密切. 选择性的增强14-3-3 γ 基因的表达和抑制14-3-3 η 基因的过度活化能够抑制因乙醇、病毒感染和各种理化因素引发的肝细胞损伤和过度增殖, 为HCC的治疗提供一个新的靶点, 而14-3-3基因在肝癌组织中的差异表达, 也使得14-3-3 γ 基因和14-3-3 η 基因有可能成为区分肝癌和其他肝组织、HCC和其他癌组织的标志物, 为HCC的诊断提供一个新的选择.

表 4 肝组织中14-3-3 γ 和14-3-3 η mRNA的表达水平(mean \pm SD, A)

分组	n	14-3-3 γ mRNA	14-3-3 η mRNA
肝癌	19	0.707 \pm 0.159 ^b	0.570 \pm 0.121 ^a
癌旁硬化	11	0.854 \pm 0.105	0.447 \pm 0.133
正常对照	6	0.885 \pm 0.092	0.425 \pm 0.202

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 癌旁硬化和正常对照.

表 5 肝癌中14-3-3 γ 和14-3-3 η mRNA表达与临床参数的关系(mean \pm SD, A)

临床参数	n	14-3-3 γ mRNA	14-3-3 η mRNA
年龄(岁)			
≥50	12	0.725 \pm 0.100	0.544 \pm 0.084
<50	7	0.674 \pm 0.235	0.615 \pm 0.164
性别			
男	16	0.725 \pm 0.147	0.569 \pm 0.113
女	3	0.608 \pm 0.219	0.576 \pm 0.189
肿瘤直径(cm)			
<5	17	0.800 \pm 0.014	0.444 \pm 0.100
≥5	2	0.695 \pm 0.165	0.585 \pm 0.116
癌灶个数			
1	12	0.742 \pm 0.149	0.583 \pm 0.093
≥2	7	0.645 \pm 0.168	0.548 \pm 0.165
门脉瘤栓			
无	13	0.701 \pm 0.186	0.589 \pm 0.132
有	6	0.718 \pm 0.088	0.530 \pm 0.088
AFP(μ g/L)			
<400	6	0.763 \pm 0.101	0.573 \pm 0.132
≥400	13	0.680 \pm 0.177	0.563 \pm 0.102
包膜			
无	4	0.725 \pm 0.106	0.515 \pm 0.102
不完整	8	0.622 \pm 0.189 ^a	0.606 \pm 0.149
完整	7	0.793 \pm 0.099	0.561 \pm 0.094
病理分级			
II	7	0.734 \pm 0.098	0.553 \pm 0.120
III	10	0.667 \pm 0.198	0.606 \pm 0.115
IV	2	0.816 \pm 0.022	0.449 \pm 0.108
临床分期			
I+II	10	0.683 \pm 0.204	0.503 \pm 0.086 ^a
III	9	0.732 \pm 0.093	0.630 \pm 0.119

^aP<0.05.

共有7种(β , γ , ϵ , ζ , η , σ 和 τ)亚型, 主要以同源或异源二聚体的形式存在. 他们的组织分布具有很大的差异, 14-3-3 β , γ 在脑组织中表达广泛, 14-3-3 τ 主要表达在T细胞和睾丸, 14-3-3 σ 则主要表达于上皮细胞中. 不同类型的14-3-3在不同组织或细胞中表达的差异提示不同的14-3-3同

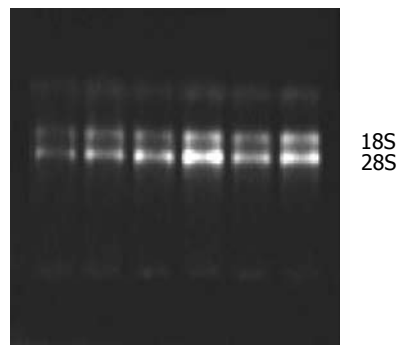
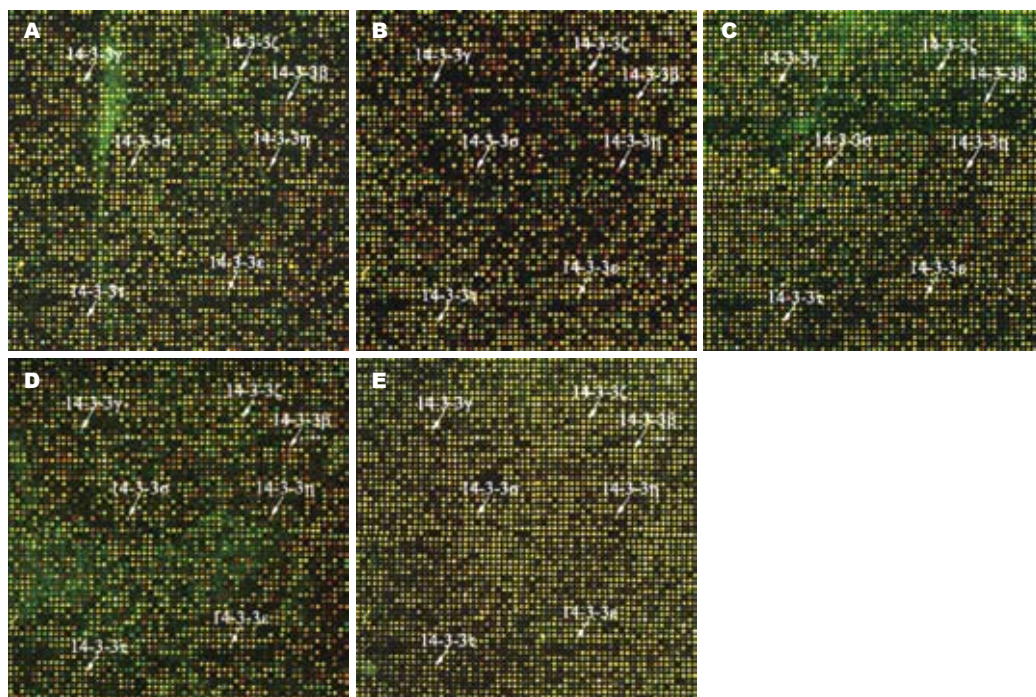


图 1 各例肝组织提取的RNA凝胶电泳图.

工蛋白可能具有其独特的作用^[4-5]. 已经证实, 有200种蛋白与14-3-3蛋白有关联, 14-3-3蛋白与靶蛋白结合后改变靶蛋白的催化活性、细胞定位以及对蛋白酶和磷酸酶的敏感性^[6], 而这些靶蛋白的功能涉及到细胞周期调控、细胞内信号传导, 应激反应、凋亡、转录调节、细胞代谢和细胞骨架的完整等诸多方面. 由于14-3-3蛋白在细胞生理功能中发挥着如此重要的作用, 并且能够结合和调节所有与癌症发生进程有关的蛋白^[7-12], 如Raf, Bcr, p53, p130Cas, p27和Ron等. 其在肿瘤发生、发展中所起的作用日益受到重视, 人们已经将其定义为潜在的致癌基因^[13], 进而研究其在肿瘤组织中的表达情况, 以期对肿瘤诊断和治疗提供新的帮助. 已有研究发现在多种肿瘤细胞中14-3-3 σ 基因的“CpG岛”发生高频率的甲基化, 使14-3-3 σ 基因沉默或低表达, 从而引起G₂期检控点损伤, 导致基因缺陷积累, 细胞发生恶性转化^[14-15]. Qi et al^[2,16]研究发现, 肺癌组织中14-3-3 β 、14-3-3 γ 、14-3-3 σ 和14-3-3 θ 基因的表达均明显上调, 并且抑制14-3-3 ζ 的表达能增强肿瘤对放疗的敏感性, 认为可以将14-3-3蛋白作为肺癌的诊断标志物 and 治疗的靶点.

到目前为止, 有关14-3-3基因家族成员在各种肝组织中的分布情况以及与HCC之间关系尚无系统的研究. 我们利用基因芯片技术一次性平行比较了14-3-3基因家族成员在不同肝组织中的表达情况, 首次发现, 14-3-3基因家族成员在HCC组织中差异表达, 而在硬化肝组织和正常肝组织间的表达无显著差别. 在诸多成员中, 14-3-3 γ 基因在HCC组织中的表达较正常肝组织及硬化肝组织明显降低, 14-3-3 η 基因在肝癌组织中的表达则明显上调, 其余14-3-3基因成员在各种肝组织中的表达无明显差别, 提示14-3-3基因家族调控机制的紊乱在HCC的发生、发展中发挥重要的作用, 其中14-3-3 γ 和14-3-3 η 与HCC的关系最为密切. RT-PCR研究进一步发现, 包膜



同行评价
本文选题新颖, 语句通顺, 图表清晰, 对相关的基础研究有一定参考价值。

图 2 不同组织样本双色荧光标记叠加图. A-D: 癌组织与正常肝组织; E: 硬化肝组织与正常肝组织.

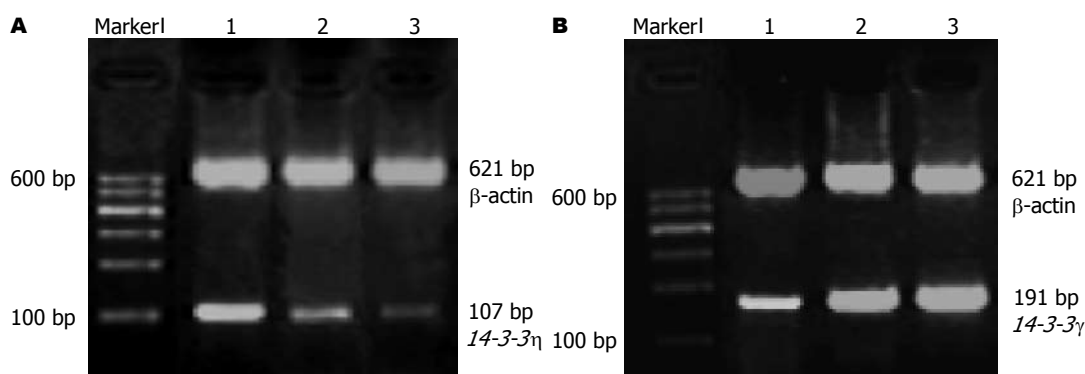


图 3 肝组织14-3-3 η mRNA和14-3-3 γ mRNA的表达. A: 14-3-3 η ; B: 14-3-3 γ ; 1: 肝癌组织; 2: 癌旁硬化肝组织; 3: 正常肝组织.

不完整的癌组织中14-3-3 γ mRNA的表达水平显著低于包膜完整的癌组织, 提示14-3-3 γ 基因的失活可能增强HCC的侵袭性; 而14-3-3 η mRNA在临床分期越晚的HCC患者中表达水平越高, 提示14-3-3 η 能够反映患者的临床进程. 已有研究表明, 14-3-3 η 基因在DNA损伤引发的细胞周期停滞中发挥重要的调节作用, 其编码产物14-3-3 η 与转录因子miz1结合后, 促使因DNA受损而引发细胞周期停滞的细胞重新进入增殖周期, 进而导致细胞的异常增殖、恶变^[17]. 因此, 选择性的增强14-3-3 γ 基因的活性和抑制14-3-3 η 基因的过度活化能抑制因乙醇、病毒感染和各种理化因素引发的肝细胞损伤和过度增殖, 为HCC的治疗提供一个新的靶点. 而14-3-3基因在肝癌组织中的差异表达, 也使得14-3-3 γ 基因和

14-3-3 η 基因有可能成为区分肝癌和其他肝组织、HCC和其他癌组织的标志物, 为HCC的诊断提供一个新的选择.

4 参考文献

- 1 Yaffe MB. How do 14-3-3 proteins work?--Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett* 2002; 513: 53-57
- 2 Qi W, Liu X, Qiao D, Martinez JD. Isoform-specific expression of 14-3-3 proteins in human lung cancer tissues. *Int J Cancer* 2005; 113: 359-363
- 3 Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 2002; 417: 871-875
- 4 Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000; 40: 617-647
- 5 Berg D, Holzmann C, Riess O. 14-3-3 proteins in the

- nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4: 752-762
- 6 van Heusden GP. 14-3-3 proteins: regulators of numerous eukaryotic proteins. *IUBMB Life* 2005; 57: 623-629
- 7 Wilker E, Yaffe MB. 14-3-3 Proteins--a focus on cancer and human disease. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37: 633-642
- 8 Masters SC, Subramanian RR, Truong A, Yang H, Fujii K, Zhang H, Fu H. Survival-promoting functions of 14-3-3 proteins. *Biochem Soc Trans* 2002; 30: 360-365
- 9 Pendergast AM. Stress and death: breaking up the c-Abl/14-3-3 complex in apoptosis. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 213-214
- 10 Okamoto K, Kashima K, Pereg Y, Ishida M, Yamazaki S, Nota A, Teunisse A, Migliorini D, Kitabayashi I, Marine JC, Prives C, Shiloh Y, Jochemsen AG, Taya Y. DNA damage-induced phosphorylation of MdmX at serine 367 activates p53 by targeting MdmX for Mdm2-dependent degradation. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 9608-9620
- 11 Sekimoto T, Fukumoto M, Yoneda Y. 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1). *EMBO J* 2004; 23: 1934-1942
- 12 Briknarova K, Nasertorabi F, Havert ML, Eggleston E, Hoyt DW, Li C, Olson AJ, Vuori K, Ely KR. The serine-rich domain from Crk-associated substrate (p130cas) is a four-helix bundle. *J Biol Chem* 2005; 280: 21908-21914
- 13 Tzivion G, Gupta VS, Kaplun L, Balan V. 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 203-213
- 14 Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 931-943
- 15 Ferguson AT, Evron E, Umbricht CB, Pandita TK, Chan TA, Hermeking H, Marks JR, Lambers AR, Futreal PA, Stampfer MR, Sukumar S. High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6049-6054
- 16 Qi W, Martinez JD. Reduction of 14-3-3 proteins correlates with increased sensitivity to killing of human lung cancer cells by ionizing radiation. *Radiat Res* 2003; 160: 217-223
- 17 Wanzel M, Kleine-Kohlbrecher D, Herold S, Hock A, Berns K, Park J, Hemmings B, Eilers M. Akt and 14-3-3eta regulate Miz1 to control cell-cycle arrest after DNA damage. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 30-41

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

2007 年国家继续学习教育项目 “ 小肠疾病诊治进展及双气囊小肠镜临床应用 ” 讲习班通知

本刊讯 经国家继续医学教育委员会批准, 由南昌大学医学院第三附属医院(南昌市第一医院)主办、《世界华人消化杂志》协办的2007年国家继续医学教育项目“小肠疾病诊治进展及双气囊小肠镜临床应用”学习班[项目编号: 2007-03-03-045(国)]定于2007-11-14/17在英雄城南昌举办。

1 授课内容

本讲习班采取理论讲授与操作演示相结合的方式进行, 届时将邀请全国著名消化专家、上海交通大学附属瑞金医院消化科主任、博士生导师吴云林教授与会授课, 青年专家、国内双气囊小肠镜技术第一人钟捷教授进行操作演示, 并请江西省消化学会主任委员、南昌大学一附院副院长吕农华教授作专题演讲。讲习班重点介绍小肠疾病诊治的历史、现状及最新进展, 传授双气囊电子小肠镜操作技术及诊治知识。学员可亲身体验双气囊电子小肠镜操作技巧, 接受专家手把手教导。学习结束将授予国家I类继续教育学分8分。

2 联系方式

叶华曦, 330008, 江西省南昌市象山北路128号南昌市第一医院消化内科; 付峻林, 330008, 南昌大学第三附属医院消化内科; 电话: 0791-8862387 8862213/13576061294(付峻林); E-mail: fusuolin@163.com.

3 收费标准

讲习班会务费、资料费共计400元, 住宿费80-100元/天, 交通费自理。报到日期: 2007-11-14

规则性肝切除术治疗原发性肝癌的分析

朱新华, 仇毓东, 吴亚夫, 周建新, 徐庆祥, 丁义涛

朱新华, 仇毓东, 吴亚夫, 周建新, 徐庆祥, 丁义涛, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008
朱新华, 2003-07南京大学博士研究生毕业, 主治医师, 主要从事原发性肝癌及肝脏移植的临床和基础研究工作。
通讯作者: 仇毓东, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科. yudongqiu510@hotmail.com
电话: 025-83304616 传真: 025-83317016
收稿日期: 2007-06-11 修回日期: 2007-10-08

Clinical study of anatomical liver resection for hepatocellular carcinoma

Xin-Hua Zhu, Yu-Dong Qiu, Ya-Fu Wu, Jian-Xin Zhou, Qing-Xiang Xu, Yi-Tao Ding

Xin-Hua Zhu, Yu-Dong Qiu, Ya-Fu Wu, Jian-Xin Zhou, Qing-Xiang Xu, Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yudongqiu510@hotmail.com
Received: 2007-06-11 Revised: 2007-10-08

Abstract

AIM: To evaluate the therapeutic efficacy and safety of anatomical liver resection for hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: Thirty-eight patients who underwent liver resection for HCC were randomly divided into two groups: anatomical liver resection group ($n = 15$) and non-anatomical liver resection group ($n = 23$). The amount of intraoperative bleeding and blood transfusion, time of operation, postoperative complications, liver function recovery, recurrence and survival rate were compared between the two groups.

RESULTS: No operative death was found in this study, and there was no significant difference in the amount of intraoperative bleeding, postoperative complication and hospital-stay between the two groups. The rate of satisfactory resection margin (> 2 cm) was higher in anatomical resection group, and the recurrent rate during one year was decreased significantly. Anatomic

resection could also elevate the tumor-free one-year survival rate.

CONCLUSION: Anatomic liver resection is safe and effective, and it is more suitable to hepatocellular carcinoma patients with operative indication than nonanatomic resection.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Anatomical liver resection; Treatment

Zhu XH, Qiu YD, Wu YF, Zhou JX, Xu QX, Ding YT. Clinical study of anatomical liver resection for hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3305-3309

摘要

目的: 随机对照观察规则性肝切除术治疗原发性肝癌的安全性以及临床疗效, 探讨治疗肝癌合理的手术方式。

方法: 将38例肝切除术治疗原发性肝癌的患者随机分为2组: 规则性肝切除术15例, 非规则性肝切除术23例, 对两组病例的手术和随访情况进行分析评价。

结果: 两组均无手术死亡, 术中出血、并发症发生率、住院时间无显著差异。规则性肝切除标本切缘满意率(大于2 cm)较高, 术后近期复发率显著降低, 一年无瘤生存率高于非规则性肝切除。

结论: 规则性肝切除是治疗原发性肝癌安全有效的术式, 对有适应证的病例应尽可能采用此种手术方式, 有望获得较好的疗效。

关键词: 原发性肝癌; 规则性肝切除术; 治疗

朱新华, 仇毓东, 吴亚夫, 周建新, 徐庆祥, 丁义涛. 规则性肝切除术治疗原发性肝癌的分析. *世界华人消化杂志* 2007; 15(31):3305-3309
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3305.asp>

0 引言

肝切除术是公认的治疗原发性肝癌的首选方

背景资料
非规则性肝切除容易导致切除范围不足, 产生切缘癌残留, 不能达到根治性切除的标准。随着术前肝功能检测方法和手术器械的进步以及对肝脏解剖和肝癌生物学特性的深入了解, 规则性肝切除目前日益得到临床重视。

研发前沿
规则性切除供应肿瘤所在部分肝脏血流的门静脉及其分支所涉及的区域是较合理的手术方法。采用CT测定余肝体积联合吲哚菁绿15 min滞留率(ICG15)进行术前肝功能评估,以决定具体的肝切除手术方式。

法。以前常采用非规则性肝切除,其主要缺点是切除范围往往不足。这种手术常在手指触摸指导下完成,对肿瘤范围(尤其是深度肿瘤)估计不足,容易造成切缘癌残留,不能达到根治性切除的标准。近年来随着术前肝功能检测方法和手术器械的进步以及对肝脏解剖和肝癌生物学特性的深入了解,规则性肝切除目前日益得到临床重视。本研究选择我院近年来行肝切除术治疗原发性肝癌的病例,将规则性肝切除与非规则性肝切除进行前瞻性对比研究,评价规则性肝切除术的安全性以及临床疗效。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-03/2005-12在南京大学医学院附属鼓楼医院施行肝切除术的原发性肝癌49例(包括复发性肝癌6例)。男39例,女10例,年龄 49.4 ± 14.3 (30-73)岁。术前检查:HBsAg阳性38例(77.6%),AFP阳性35例(71.4%)。肿瘤小于5 cm的小肝癌13例,5-10 cm的大肝癌26例,大于10 cm的巨大肝癌10例,单发病灶35例,两个以上多发病灶14例,合并门静脉二级分支癌栓6例。临床肝功能分级:Child-pugh A级42例,Child-pugh B级7例。其中,解剖性肝切除组21例,非解剖性肝切除组28例。术前签署手术同意书和临床研究同意书。术后病理检查:45例(91.8%)为肝细胞性肝癌,3例(6.1%)为胆管细胞性肝癌,1例(2.1%)为混合型肝癌。其中34例合并结节性肝硬化,23例镜下脉管内发现癌栓(46.9%)。

1.2 方法

1.2.1 规则性肝切除术(anatomical hepatectomy, ANH):取双侧肋缘下“人”形切口(Mercedes切口),配合框架悬吊式Cray拉钩以使肝脏得到良好的暴露。经初步探查肿瘤可以切除,游离肝周韧带,以显露病侧肝脏。结合术中超声,按Couinaud五叶八段法确定肿瘤的大小、数目、位置以及和周围血管、胆管的关系,确定拟切除的肝叶或肝段。解剖第一肝门,根据肝切除的范围,结扎、切断需切除肝叶的肝动脉、门静脉。按照解剖平面切肝采用钳夹法,即用血管钳钳夹切面肝组织,暴露管道,分别用电灼、结扎、缝扎等方法来处理不同粗细的断面所遇管道。门静脉癌栓连同病侧肝叶一同切除。常规在切肝时胆管与Glissonian鞘一起结扎、切断,不预先在肝门处游离。对半肝切除和(或)合并胆囊切除病例,通过胆囊管或左肝管断端插管注入美蓝溶液来检测肝断面是否有胆漏。肝断面不予缝合,热盐水纱布垫敷3-5 min后,小针线8字或U字形缝合大的

出血点及胆漏,小的渗血处可用电刀或氩气凝固器处理,于创面处放置腹腔引流。

1.2.2 非规则性肝切除术(atypical hepatectomy, ATH):切口可同样采用双侧肋缘下“人”形切口,肿瘤主要位于右半肝也可选用右侧肋缘下切口。探查和暴露步骤同解剖性肝切除,根据肿瘤位置选择不同的血流阻断方法。本组全部采用Pringle入肝血流阻断法。距离肿瘤边界1-2 cm,用电刀预先设定切除线,沿切除线用指捏、钳夹法切除肿瘤。并有门静脉癌栓可自肝断面将癌栓取出,开放血流约50 mL,冲净残余癌栓后再缝合。肝断面用肝针对拢缝合,引流放置及其他处理同规则性肝切除术。

1.2.3 术中情况的比较和术后处理:比较规则性肝切除和非规则性肝切除术中出血量,输血量。检查切除的肿瘤标本,以切缘大于2 cm为满意,比较两组的切缘满意率。术后常规监测生命体征,吸氧。采用保肝、制酸、抗生素预防感染,以及营养支持等治疗。患者术后不进行预防性TACE治疗。出院后6 mo内1 mo随访1次,6 mo至26 mo随访1次,两年以上3 mo随访1次。随访内容包括一般情况、肝功能、AFP、腹部B超、CT或MRI等。统计总生存率,1年无瘤生存率和肿瘤复发时间,1年复发率等。

统计学处理 将所有统计资料结果输入Excel表格。计量资料用mean \pm SD表示,分类变量资料用率表示。计量资料分析采用 t 检验、Cochran近似 χ^2 检验或Wilcoxon秩和检验。定性资料分析采用卡方检验或Fisher精确概率检验,以双侧 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。全部统计分析采用SAS8.0软件实现。

2 结果

2.1 手术情况 本组规则性肝切除术21例,分别为:右半肝切除术11例,左半肝切除术6例,右三叶切除2例,左三叶切除术1例,中肝叶切除术1例。非规则性肝切除术28例(合并5例门静脉取栓术)。经统计学处理,两组患者在年龄、性别、病程、病情等方面符合均衡性标准。

2.2 术中情况 两组均无术中死亡,术中未发生不可控制的出血。两组病例的术中失血量,输血量无显著差异。规则性肝切除手术时间显著延长,标本切缘满意率显著提高(表1)。

2.3 术后情况 术后3 d,两组肝功能指标对比结果见表2。规则性肝切除组术后3 d血清ALT较非解剖肝切除显著降低($P < 0.05$),两组间总胆红素、白蛋白和胆碱酯酶比较无显著差异。

表 1 规则性和非规则性肝切除手术中相关指标比较

分组	手术时间(h)	失血量(mL)	输血量(mL)	切缘满意率(%)
ANH(<i>n</i> = 21)	4.89 ± 2.61 ^a	513.30 ± 346.57	695.56 ± 243.14	85.71%(18/21) ^a
ATH(<i>n</i> = 28)	3.22 ± 1.48	446.58 ± 268.43	592.46 ± 175.70	64.28%(18/28)

^a*P* < 0.05 vs ATH组.

表 2 规则性和非规则性肝切除术后3 d肝功能指标比较(mean ± SD)

分组	ALT(IU/L)	TBL(μmol/L)	ALB(g/L)	CHE(μmol/L)
ANH(<i>n</i> = 15)	274.35 ± 142.21 ^a	15.47 ± 14.67	35.24 ± 4.68	1.84 ± 2.47
ATH(<i>n</i> = 23)	593.43 ± 535.43	13.38 ± 12.24	33.68 ± 6.75	1.42 ± 1.73

^a*P* < 0.05 vs ATH组.表 3 规则性和非规则性肝切除术后并发症比较(*n*)

分组	肝功能衰竭	胆汁漏	胸腔积液	腹腔积液	肺不张	出血
ANH	0	1	4	6	0	0
ATH	1	1	4	5	1	0
合计	1	2	8	11	1	0

表 4 规则性和非规则性肝切除患者复发率和生存率比较(%)

分组	1年复发率	1年总生存率	1年无瘤生存率
ANH(<i>n</i> = 15)	23.81 ^b	80.95	76.19 ^a
ATH(<i>n</i> = 23)	53.57	75.00	46.42

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs ATH组.

2.4 手术并发症 全组无手术死亡. 规则性肝切除术后并发症发生率为52.4%(11/21), 均为轻微并发症. 非规则性肝切除术后并发症发生率为42.9%(12/28), 2例严重并发症. 两组比较无统计学差异. 两组并发症经保守治疗后均痊愈出院(表3), 全组患者均康复出院. 规则性肝切除组和非规则性肝切除组总住院时间分别为26.5 d和27.0 d, 其中术后平均住院时间分别为16.8 d和18.0 d. 两组比较无显著差异.

2.5 随访结果 本组48例患者获得随访, 非规则性肝切除术后1例失访, 随访率97.96%, 平均随访时间为20 mo. 随访结果: 规则性肝切除术后患者有5例在1年内复发, 复发率为23.81%, 其中4例患者在术后1年内死亡, 1年生存率为80.95%. 非规则性肝切除术后患者有10例在6 mo内复发, 有15例在1年内复发, 复发率为53.57%(15/28), 有7例患者在1年内死亡, 1年生存率为75.00%. 规则性肝切除术后肿瘤1年复发率较非规则性肝切除组显著降低(*P* < 0.01), 患者1年无瘤生存率延长(*P* < 0.05)(表4).

3 讨论

规则性肝切除术也称解剖性肝切除术, 是相

对于非规则性或局部切除而言, 指预先切断病侧肝叶的入肝血流后, 按外科解剖的肝段、肝叶、半肝或肝三叶的范围切除肝组织. 规则性肝切除术的要求是预先结扎、切断病侧肝蒂管道, 在解剖平面上离断肝实质. 非规则性肝切除基本采用Pringle法进行全肝入肝血流阻断, 方法简便, 手术时间较短. 在我国, 原发性肝癌绝大多数在乙肝肝硬化背景下发生, 术前就存在或手术操作引起肿瘤的肝内播散是影响预后的一项重要指标^[1-2]. 绝大多数肝内转移都是通过门静脉血行转移播散^[3-6]. 因此, 规则性切除供应肿瘤所在部分肝脏血流的门静脉及其分支所涉及的区域应是较合理的方法, 可改善肝癌患者的预后^[7-8]. 以往认为规则性肝切除操作复杂、费时, 术中出血多, 术后死亡率和并发症发生率较非规则性肝切除高. 近年来, 随着肝脏外科技术的提高和围手术处理方法的完善, 规则性肝切除正日益受到临床重视.

研究表明, 手术失血量的多少与术后并发症的发生率相关^[9-11]. 术中失血少, 术后并发症明显减少, 而同时因为减少术中输血则可以防止因抑制自身免疫系统而导致的术后肿瘤复

创新盘点
开展CT测定余肝体积联合吲哚菁绿15 min滞留率(ICG15)进行术前肝功能评估, 以决定具体的手术方式. 对于无肝硬化或仅合并有轻度的肝硬化, 肝功能及肝储备功能基本正常, 可考虑行规则性肝切除. 而非规则性肝切除术适用于合并有严重肝硬化, 肝功能储备能力较差的病例, 以及位于肝脏边缘的小肿瘤.

应用要点
随着肝脏外科技术的提高和围手术期处理方法的完善, 规则性肝切除正日益受到临床重视, 具有广阔的临床应用前景.

名词解释

规则性肝切除术:也称解剖性肝切除术,是相对于非解剖性或局部切除而言,指预先切断病侧肝叶的入肝血流后,按外科解剖的肝段、肝叶、半肝或肝三叶的范围切除肝组织。规则性肝切除术的要求是预先结扎、切断病侧肝蒂管道,在解剖平面上离断肝实质。

发。因此减少术中出血,尽量做到不输血是肝切除术的关键^[12-13]。本组资料中,规则性肝切除术组的平均失血量为513.30 mL,非规则性肝切除术组的平均失血量为446.58 mL,两者无显著性差别($P>0.05$)。规则性肝切除术组有8例术中输血,输血率38.09%;非规则性肝切除术组有9例术中输血,输血率为32.14%。两者无显著性差别($P>0.05$)。规则性肝切除的平均输血量695.56 mL,而非规则性肝切除为592.46 mL,两者也无显著性差别($P>0.05$)。由于规则性肝切除术断肝时基本上是通过无血管界面,需要离断的血管胆管旁支很少,因此熟练掌握断肝技巧后,术中出血应该更少,安全性应更高^[14-16]。

术后3 d检测肝功能指标结果表明,规则性肝切除组术后谷丙转氨酶(ALT)升高水平较非规则性肝切除组显著降低($P<0.05$),提示肝细胞损伤程度比非规则性肝切除术轻,手术创伤较小。传统认为,规则性肝切除术技术复杂,手术创伤大。事实上,按照Couinaud提出的8段分肝法,每1段都是解剖和功能的独立单元,都可以行单独的肝段甚至亚肝段切除。因此,规则性肝切除术也可以是小范围肝切除。另外,由于离断肝实质时不会破坏大血管和胆管,故可减少术中出血,尤其是能保留健侧肝组织完整的血供,避免术后残肝发生缺血、坏死,减少术后发生肝功能衰竭的可能^[17-18]。

本组病例中,规则性肝切除组术后并发症发生率为52.4%(11/21),非规则性肝切除组术后并发症发生率为42.9%(12/28),两者无统计学意义($P>0.05$)。以胸腔积液,膈下积液和腹水等轻微并发症为主,出血、肝功能衰竭等严重并发症比较少见。规则性肝切除组与非规则性肝切除组的,住院时间、术后恢复时间均相当,住院总费用也没有明显的增加,因此从时间和经济两方面来比较,两组也无明显差异。规则性肝切除术对于患者而言是可以接受的。

保证手术切缘干净无瘤是根治性肝切除术的主要目的,也是预防术后复发的基本条件^[19-20]。规则性肝切除术因为是以肝段为基本的切除单元,因而不但能够保证足够的切缘而且还能最大限度的保留非肿瘤肝组织^[21-22]。此外,术中应用B超引导下对肿瘤组织所在的肝段、肝区进行解剖分离,术中暴露管道清晰,切缘确切安全。非规则性肝切除的主要缺点是切除范围往往不足。这种手术常在手指触摸指导下完成,对肿瘤范围(尤其是深度肿瘤)估计不足,容易造成切缘

癌残留,不能达到根治性切除的标准。据报道,非规则性肝切除术如仅仅在手法探查的基础上完成,术后统计病理结果约有1/3的患者切缘阳性,即便是利用术中超声定位仍有1/7切缘癌残留^[23],因此往往会出现术后近期复发转移的情况。在本组资料中,规则性肝切除和非规则性肝切除切缘满意率分别为85.71%和64.28%,统计学处理有显著性差异,说明规则性肝切除在肿瘤根治性方面有较大的优势。

肝细胞性肝癌有多中心发生的情况,肝切除术无法从根本上解决肿瘤转移复发的问题^[24-25]。但是,规则性肝切除术可以保证切缘,由于整块切除了包含门静脉分支的肝段、肝区,根治性阻断了肝内肿瘤播散的途径,可以减少术后近期复发^[26-29]。本组资料中,规则性肝切除术组1年复发率为23.81%,生存率为80.95%;非规则性肝切除术组1年复发率为53.57%,生存率为75.00%。由此可见,规则性肝切除术具有较为满意的近期效果。但由于本组资料例数和随访时间的限制,远期效果尚待进一步观察。

虽然规则性肝切除目前得到重视,但对具体患者行规则性或非规则性肝切除应综合考虑,应建立在熟练掌握肝切除技术、熟悉肝脏解剖的基础上。规则性肝切除术要求更加严格的术前评估。对手术适应证的准确把握,除患者的一般状况和肿瘤情况外,肝功能是决定治疗方案的重要指标。Child分级系统可满足常规肝切除术的要求,为避免出现术后肝功能衰竭,对术前常规方法判断手术风险较大的病例,如肿瘤巨大或肝硬变较重病例,我们正在开展CT测定余肝体积联合吲哚氰绿15 min滞留率(ICG15)进行术前肝功能评估,以决定具体的手术方式。

我们认为,对于无肝硬化或仅合并有轻度的肝硬化,肝功能及肝储备功能基本正常者,可考虑行规则性肝切除。而非规则性肝切除术可适用于合并有严重肝硬化,肝功能储备能力较差的病例,以及位于肝脏边缘的小肿瘤。总之,我们认为,规则性肝切除术是一种治疗原发性肝癌安全有效的理想术式,但对于不同的病例应选择个体化的手术方式,以达到最佳疗效。

4 参考文献

- 1 Park JH, Koh KC, Choi MS, Lee JH, Yoo BC, Paik SW, Rhee JC, Joh JW. Analysis of risk factors associated with early multinodular recurrences after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 2006; 192: 29-33
- 2 Matsumata T, Kanematsu T, Takenaka K, Yoshida Y, Nishizaki T, Sugimachi K. Patterns of intrahepatic

- recurrence after curative resection of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1989; 9: 457-460
- 3 Li WC, Ye SL, Sun RX, Liu YK, Tang ZY, Kim Y, Karras JG, Zhang H. Inhibition of growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma by antisense oligonucleotide targeting signal transducer and activator of transcription 3. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 7140-7148
- 4 Tralhao JG, Dagher I, Lino T, Roudie J, Franco D. Treatment of tumour recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. Analysis of 97 consecutive patients. *Eur J Surg Oncol* 2007; 33: 746-751
- 5 Yang Y, Nagano H, Ota H, Morimoto O, Nakamura M, Wada H, Noda T, Damdinsuren B, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Dono K, Umeshita K, Nakamori S, Wakasa K, Sakon M, Monden M. Patterns and clinicopathologic features of extrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Surgery* 2007; 141: 196-202
- 6 Adachi E, Maehara S, Tsujita E, Taguchi K, Aishima S, Rikimaru T, Yamashita Y, Tanaka S. Clinicopathologic risk factors for recurrence after a curative hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Surgery* 2002; 131: S148-152
- 7 Chen XP, Qiu FZ, Wu ZD, Zhang BX. Hepatectomy for huge hepatocellular carcinoma in 634 cases. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4652-4655
- 8 Kosuge T, Makuuchi M, Takayama T, Yamamoto J, Shimada K, Yamasaki S. Long-term results after resection of hepatocellular carcinoma: experience of 480 cases. *Hepatogastroenterology* 1993; 40: 328-332
- 9 Benzoni E, Molaro R, Cedolini C, Favero A, Cojutti A, Lorenzin D, Intini S, Adani GL, Baccarani U, Bresadola F, Uzzacu A. Liver resection for HCC: analysis of causes and risk factors linked to postoperative complications. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 186-189
- 10 Benzoni E, Lorenzin D, Favero A, Adani G, Baccarani U, Molaro R, Zompicchiatti A, Saccomano E, Avellini C, Bresadola F, Uzzau A. Liver resection for hepatocellular carcinoma: a multivariate analysis of factors associated with improved prognosis. The role of clinical, pathological and surgical related factors. *Tumori* 2007; 93: 264-268
- 11 Capussotti L, Muratore A, Amisano M, Polastri R, Bouzari H, Massucco P. Liver resection for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: analysis of mortality, morbidity and survival--a European single center experience. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 986-993
- 12 Ercolani G, Grazi GL, Ravaioli M, Del Gaudio M, Gardini A, Cescon M, Varotti G, Cetta F, Cavallari A. Liver resection for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: univariate and multivariate analysis of risk factors for intrahepatic recurrence. *Ann Surg* 2003; 237: 536-543
- 13 Eguchi S, Ijtsma AJ, Slooff MJ, Porte RJ, de Jong KP, Peeters PM, Gouw AS, Kanematsu T. Outcome and pattern of recurrence after curative resection for hepatocellular carcinoma in patients with a normal liver compared to patients with a diseased liver. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 592-596
- 14 Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Kaneko K, Cruz PV, Akazawa K, Hatakeyama K. Anatomic resection independently improves long-term survival in patients with T1-T2 hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1356-1365
- 15 Shimozawa N, Hanazaki K. Longterm prognosis after hepatic resection for small hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg* 2004; 198: 356-365
- 16 Nagino M, Kamiya J, Arai T, Nishio H, Ebata T, Nimura Y. "Anatomic" right hepatic trisectionectomy (extended right hepatectomy) with caudate lobectomy for hilar cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 2006; 243: 28-32
- 17 Hasegawa K, Kokudo N, Imamura H, Matsuyama Y, Aoki T, Minagawa M, Sano K, Sugawara Y, Takayama T, Makuuchi M. Prognostic impact of anatomic resection for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 2005; 242: 252-259
- 18 Kubo S, Taukamoto T, Hirohashi K, Tanaka H, Shuto T, Takemura S, Kawai S, Wakasa K, Kinoshita H. Appropriate surgical management of small hepatocellular carcinomas in patients infected with hepatitis C virus. *World J Surg* 2003; 27: 437-442
- 19 Ibrahim S, Roychowdhury A, Hean TK. Risk factors for intrahepatic recurrence after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 2007; 194: 17-22
- 20 Shah SA, Cleary SP, Wei AC, Yang I, Taylor BR, Hemming AW, Langer B, Grant DR, Greig PD, Gallinger S. Recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: risk factors, treatment, and outcomes. *Surgery* 2007; 141: 330-339
- 21 Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Kaneko K, Cruz PV, Akazawa K, Hatakeyama K. Anatomic resection independently improves long-term survival in patients with T1-T2 hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007; 14: 1356-1365
- 22 Poon RT, Fan ST, Lo CM, Ng IO, Liu CL, Lam CM, Wong J. Improving survival results after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study of 377 patients over 10 years. *Ann Surg* 2001; 234: 63-70
- 23 Scheele J. Anatomical and atypical liver resections. *Chirurg* 2001; 72: 113-124
- 24 Cha C, Fong Y, Jarnagin WR, Blumgart LH, DeMatteo RP. Predictors and patterns of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *J Am Coll Surg* 2003; 197: 753-758
- 25 Shah SA, Greig PD, Gallinger S, Cattral MS, Dixon E, Kim RD, Taylor BR, Grant DR, Vollmer CM. Factors associated with early recurrence after resection for hepatocellular carcinoma and outcomes. *J Am Coll Surg* 2006; 202: 275-283
- 26 Ochiai T, Sonoyama T, Kikuchi S, Okayama T, Konishi H, Kitagawa M, Tagi T, Ueda Y, Otsuji E. Anatomic wide hepatectomy for treatment of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 563-569
- 27 Capussotti L, Muratore A, Amisano M, Polastri R, Bouzari H, Massucco P. Liver resection for hepatocellular carcinoma on cirrhosis: analysis of mortality, morbidity and survival--a European single center experience. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 986-993
- 28 Shah SA, Cleary SP, Wei AC, Yang I, Taylor BR, Hemming AW, Langer B, Grant DR, Greig PD, Gallinger S. Recurrence after liver resection for hepatocellular carcinoma: risk factors, treatment, and outcomes. *Surgery* 2007; 141: 330-339
- 29 Yamamoto M, Takasaki K, Ohtsubo T, Katsuragawa H, Fukuda C, Katagiri S. Effectiveness of systematized hepatectomy with Glisson's pedicle transection at the hepatic hilus for small nodular hepatocellular carcinoma: retrospective analysis. *Surgery* 2001; 130: 443-448

同行评价
本文选题新颖, 资料可靠, 分析有据, 为临床研究采用规则性肝切除术治疗原发性肝癌提供了一定的参考价值。

肝细胞癌组织SOCS1和STAT3蛋白的表达意义

张荣贵, 臧国庆, 汤正好, 冯洁, 余永胜

背景资料
我国是肝癌的高发区, 对其发病机制的研究是热点、重点和难点。研究表明, 肝细胞癌(HCC)的发生与STAT3蛋白的磷酸化密切相关, 同时SOCS1作为一种新的候选抑癌基因也发生甲基化。但是STAT3和SOCS1蛋白在HCC组织中的表达情况及其关系未见报道。

张荣贵, 苏州大学05级消化病学硕士生 江苏省苏州市215213
臧国庆, 汤正好, 冯洁, 余永胜, 上海市第六人民医院感染科上海市200233
张荣贵, 苏州大学消化病学硕士生, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤的基础研究和临床诊治。
通讯作者: 余永胜, 200233, 上海市宜山路600号, 上海市第六人民医院感染科。yuyongsheng@medmail.com.cn
电话: 021-64030482
收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2007-10-10

Expression of SOCS1 and STAT3 in hepatocellular carcinoma tissues and its significance

Rong-Gui Zhang, Guo-Qing Zang, Zheng-Hao Tang, Jie Feng, Yong-Sheng Yu

Rong-Gui Zhang, Graduate Student of Digestive Medicine in Suzhou University, Suzhou 215213, Jiangsu Province, China
Guo-Qing Zang, Zheng-Hao Tang, Jie Feng, Yong-Sheng Yu, Department of Infectious Diseases, the Sixth Peoples' Hospital, Shanghai 200233, China
Correspondence to: Yong-Sheng Yu, Department of Infectious Diseases, the Sixth Peoples' Hospital, 600 Yishan Road, Shanghai 200233, China. yuyongsheng@medmail.com.cn
Received: 2007-05-18 Revised: 2007-10-10

Abstract

AIM: To investigate the expression of SOCS1 and STAT3 in hepatocellular carcinoma (HCC), as well as their significance in the occurrence and development of HCC.

METHODS: The expression of SOCS1 and STAT3 proteins were examined by immunohistochemistry in 48 tissue specimens from HCC and their para-carcinoma tissues, 11 from liver cirrhosis tissues, and 11 from normal liver tissues.

RESULTS: The positive rate of SOCS1 expression was significantly higher in the para-carcinoma tissues than in the HCC tissues ($P < 0.001$), but its expression in liver cirrhosis and normal liver tissues was negative. While the positive rate of STAT3 expression was markedly higher in HCC than in para-carcinoma tissues ($P < 0.001$), its expression in the latter was higher

than that in liver cirrhosis and normal liver tissues ($P < 0.001$). Expression of SOCS1 was significantly correlated with tumor size ($P < 0.01$). Expression of STAT3 was correlated with the expression of alpha fetoprotein (AFP) in HCC tissues ($P < 0.05$). There was a positive correlation between the expressions of SOCS1 and STAT3 in HCC ($r_s = 0.431$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Expression of SOCS1 and STAT3 is closely correlated with the development of HCC. A markedly positive correlation exists between SOCS1 and STAT3 expressions.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Suppressors of cytokine signaling; Signal transducers and activators of transcription 3; Immunohistochemistry

Zhang RG, Zang GQ, Tang ZH, Feng J, Yu YS. Expression of SOCS1 and STAT3 in hepatocellular carcinoma tissues and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3310-3314

摘要

目的: 探讨SOCS1和STAT3蛋白在HCC组织中的表达、相互关系及在HCC发生发展中的意义。

方法: 应用免疫组化方法检测48例HCC组织和癌周肝组织、肝硬化(liver cirrhosis, LC)组织($n = 11$)及正常肝组织中($n = 11$)SOCS1和STAT3的表达水平。

结果: 癌周肝组织中SOCS1蛋白表达强度显著高于HCC组织, SOCS1蛋白在LC组织及正常肝组织中全部呈阴性表达。HCC组织和癌周肝组织STAT3蛋白阳性表达率显著高于LC组织和正常肝组织; SOCS1在瘤体大小间的表达有显著性差异($P < 0.01$)。STAT3在表达AFP阴性和阳性癌组织组间有显著性差异($P < 0.05$)。HCC组织中SOCS1和STAT3表达具有显著等级正相关($r_s = 0.431$, $P < 0.01$)。

结论: SOCS1和STAT3表达与HCC的发生密切相关, 且两者之间的表达强度具有显著等级正相关。

关键词: 肝细胞癌; 细胞因子信号转导抑制因子1;

信号转导子与转录激活子家族3; 免疫组化

张荣贵, 臧国庆, 汤正好, 冯洁, 余永胜. 肝细胞癌组织SOCS1和STAT3蛋白的表达意义. 世界华人消化杂志 2007;15(31): 3310-3314

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3310.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生发展机制是涉及多基因调控、多信号通路参与的复杂网络体系, 是同时牵涉时间和空间概念的四维概念, 其根源是基因表达的异常. 现代分子生物学研究表明, HCC的发生、发展与原癌基因的激活和/或表达增加, 抑癌基因失活和/或表达减少及信号转导通路的异常等有关^[1]. 细胞因子受体介导的JAK/STAT(janus kinase/signal transducer and activator of transcription)信号传导途径是目前细胞因子研究领域的热点. JAKs/STATs信号转导通路的异常活化与肿瘤、免疫相关疾病的病理过程密切相关^[2]. 研究表明, SOCS1基因和STAT3基因分处于该信号转导通路的上下游, 在多种肿瘤的发生进展中起一定作用. 细胞因子信号转导抑制因子(suppressors of cytokine signaling, SOCS)家族为多种细胞因子、生长因子和激素的信号传导途径的负向调节者, SOCS1为SOCS家族中的重要成员. SOCS1定位在16p12-p13.1, 人类SOCS1基因编码211个氨基酸^[3]. SOCS1不仅是细胞因子的调节者, 而且在控制T细胞分化和决定细胞命运方面起重要作用, 与自身免疫、免疫耐受等多种免疫反应以及肿瘤发生亦有重要关系^[4]. SOCS1在HCC中广泛甲基化和表达明显降低, 提示SOCS1可能是一抑癌基因^[5-7]. 人类STAT3基因定位于第12号染色体, STAT3蛋白是信号转导子与转录激活子家族(signal transducers and activators of transcription, STAT)的重要成员. STAT3是EGFR, IL-6/JAK, Src等多个致癌性酪氨酸激酶信号通道汇聚的焦点, 在多种肿瘤细胞和组织中都有过度激活, 如乳腺癌、卵巢癌、头颈部鳞状细胞癌、前列腺癌、恶性黑色素瘤、多发性骨髓瘤、淋巴瘤、脑瘤、非小细胞肺癌和各种白血病等. 由于持续性激活的STAT3能够促使培养细胞发生恶性转化并能在裸鼠中形成肿瘤, STAT3已被认为是一种癌基因^[8-9]. 为了研究癌基因和抑癌基因的异常表达及信号转导通路改变在HCC发生发展过程中的分子机制, 我们应用免疫组化方法检测了正常

肝组织及HCC组织中SOCS1和STAT3的表达, 并探讨其在HCC发生、发展中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 肝细胞癌、肝硬化及正常肝组织标本取自2006-01/2006-11手术切除标本及肝穿刺. HCC标本48例, 男39例, 女9例, 年龄32-78(平均51.5)岁. 所有组织标本均经术后病理检查证实为HCC, 所选病例全部包含有癌旁肝组织, 术前未予放化疗. 肿瘤分化程度采用Edmondson 4级分级法. 肝硬化(LC)组织和正常组织各11例, 所有HCC及LC病例血清HBsAg均为阳性. 标本取出后立即以40 g/L中性多聚甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 5 μ m的连续切片, 备作免疫组织化学检测. SOCS1多克隆抗体(兔抗)为北京博奥森生物技术有限公司产品, STAT3多克隆抗体(猫抗)为Neomarkers公司产品.

1.2 方法 免疫组织化学染色技术的具体操作步骤采用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶法(SP法)进行. SOCS1阳性细胞染色定位于细胞质, 以细胞质中呈浅黄、棕黄、或更深的棕褐色的细小颗粒作为阳性细胞(图1). STAT3的阳性细胞染色定位于细胞质, 以细胞质中呈浅黄、棕黄、或更深的棕褐色的细小颗粒作为阳性细胞(图2), 以PBS代替一抗作为阴性对照. 采用3个参数(即染色强度、阳性细胞数和两者记分的乘积)的半定量的计数方法. 着色强度记分标准: 无着色为0分, 浅黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分. 光镜下随机观察10个高倍视野, 记录5个高倍视野中染色阳性细胞的百分率. 记分标准: 0%为0分, 1%-25%为1分, 26%-50%为2分, 51%-75%为3分, >75%为4分. 染色强度记分与阳性细胞数记分之积为最后得分: 0分为(-), 1-2分为(+), 3-4分为(++), >4分为(+++).

统计学处理 应用SPSS11.5统计软件包进行统计分析, 组间采用非参数两个或多个独立样本检验, 两指标间采用有序分组资料的等级相关检验. $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肝组织SOCS1和STAT3的表达 SOCS1蛋白在HCC组织的表达为(-)6例, (+)30例, (++)12例, (+++)0例; 在癌旁组织的阳性表达为(-)1例, (+)11例, (++)30例, (+++)6例; 在LC组织和正常肝组织的表达全部为阴性. 经统计学检验SOCS1蛋白的表达差异有显著性意义(表1,

研发前沿
近来细胞因子受体介导的JAK/STAT(janus kinase/signal transducer and activator of transcription)信号传导途径是目前细胞因子研究领域的热点, SOCS1和STAT3分处于此通路的上下游, 在HCC的发生过程中起着重要作用, 但是其确切的作用机制有待进一步阐明.

相关报道

Yoshikawa *et al* 和 Nagai *et al* 研究了HCC细胞系和组织中SOCS1基因的甲基化和mRNA表达情况; Yoshikawa *et al* 在HCC细胞系SNU-387和HuH-1中发现甲基化诱发的SOCS1沉默引起JAK2的磷酸化和STAT3的持续激活, STAT3的激活可能是SOCS1沉默导致HCC发生的一个重要因素。

$P<0.01$). STAT3蛋白在HCC组织的表达为(-)3例, (+)18例, (++)19例, (+++)8例; 在癌旁组织的阳性表达为(-)0例, (+)22例, (++)21例, (+++)5例; 在肝硬化组织的阳性表达为(-)4例, (+)7例, (++)0例, (+++)0例; 在正常肝组织的阳性表达为(-)5例, (+)6例, (++)0例, (+++)0例. 经统计学检验STAT3蛋白的表达差异有显著性意义(表1, $P<0.01$).

2.2 SOCS1和STAT3表达与HCC临床生物学的关系 SOCS1和STAT3的阳性表达在各性别组和各年龄组之间无显著差异, SOCS1表达在瘤体大小间(瘤体 <5 cm, ≥ 5 cm)有显著性差异($P<0.001$), 而在肿瘤分化程度及癌组织中AFP, HBsAg表达间无显著性差异(表2, $P>0.05$). STAT3表达在癌组织AFP表达(阴性和阳性表达)组间有显著性差异($P<0.05$), 而表达在肿瘤分化程度、瘤体大小及癌组织HBsAg表达组间无显著性差异(表2, $P>0.05$). 经等级相关检验表明, HCC组织中SOCS1和STAT3表达具有显著正相关(表3, $r_s = 0.431$, $P<0.01$).

3 讨论

肿瘤发生和进展的机制至今还未完全阐明, 一般认为与原癌基因的激活和(或)表达增加, 抑癌基因失活和(或)表达减少及信号转导通路的异常等有关, 是一个多因素、多步骤复杂过程. 细胞因子信号转导抑制因子家族为多种细胞因子、生长因子和激素的信号传导途径的负向调节者. SOCS1为SOCS家族中的重要成员, 最早于1997年由3个不同的研究小组分别用不同的方法发现的^[10-12]. SOCS1的mRNA通常以低水平存在于未受到刺激的细胞内, 但可以在15-30 min内被许多细胞因子、激素及生长因子所诱导. Tannapfel *et al*^[5]用蛋白微阵列方法检测32种蛋白在HCC中的表达, 发现SOCS1蛋白减少. Nagai *et al*^[6]发现SOCS1基因在HCC中有50%(4/8)的SOCS1mRNA表达水平被明显抑制, CpG岛甲基化分析可显示基因的超甲基化. Yoshikawa *et al*^[7]在HCC细胞系的SOCS1的CpG岛中鉴别出与其转录沉默相关的异常甲基化, 发生率为65%(17/26). 本实验SOCS1蛋白在癌旁肝组织的表达显著高于HCC组织中的表达, 在HCC组织显著高于呈阴性表达的LC组织和正常肝组织, 说明SOCS1基因在HCC发生的早期被多种细胞因子激活, 而并没有发生完全失活. 同时发现SOCS1蛋白的表达在瘤体 ≥ 5 cm组显著低于 <5 cm组($P<0.001$), 表明SOCS1随HCC的生长、进展而表达减少, 可能

表 1 肝组织SOCS1和STAT3蛋白的表达

分组	n	SOCS1的蛋白表达				STAT3的蛋白表达			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
肝细胞癌	48	6	30	12	0 ^b	3	18	19	8 ^b
癌旁肝组织	48	1	11	30	6	0	22	21	5
肝硬化组织	11	11	0	0	0	4	7	0	0
正常肝组织	11	11	0	0	0	5	6	0	0

^b $P<0.01$.

表 2 SOCS1和STAT3表达与HCC临床生物学行为的关系

项目	n	SOCS1蛋白表达				STAT3蛋白表达			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
男	39	5	26	8	0	3	16	13	7
女	9	1	4	4	0	0	2	6	1
年龄(岁)									
<45	13	2	7	4	0	1	4	5	3
45-59	26	4	14	8	0	3	8	11	4
60	9	0	9	0	0	0	4	4	1
瘤体大小									
>5 cm	33	1	20	12	0 ^b	1	11	15	6
5 cm	15	5	10	0	0	2	7	4	2
肿瘤分化									
级	3	0	3	0	0	1	2	0	0
级	34	6	17	11	0	2	11	16	5
级	11	0	10	1	0	0	5	3	3
AFP									
阳性	23	3	16	4	0	1	13	7	2 ^a
阴性	19	3	11	5	0	1	4	10	4
HBsAg									
阳性	31	4	21	6	0	1	12	13	5
阴性	9	1	5	3	0	0	4	4	1

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$.

表 3 HCC组织中SOCS1和STAT3表达之间的关系

SOCS1	STAT3				合计
	-	+	++	+++	
-	1	3	2	0	6
+	2	14	10	4	30
++	0	1	7	4	12
+++	0	0	0	0	0
合计	3	18	19	8	48

$r_s = 0.431$, $P = 0.002$.

与SOCS1基因随HCC的进展而逐步失活有关. 进一步证明SOCS1表达与HCC的发生和进展有关, 所以SOCS1的检测对于HCC的早期诊断和预后判断都有十分重要的意义.

Yu *et al*^[13]在研究饲喂3'Me-DAB建立的大

创新盘点

对于SOCS1和STAT3与HCC的关系, 目前主要集中于SOCS1的基因甲基化和STAT3的蛋白磷酸化. 本文首次全面研究了SOCS1和STAT3蛋白在HCC组织的表达情况, 并发现二者表达存在正相关关系.

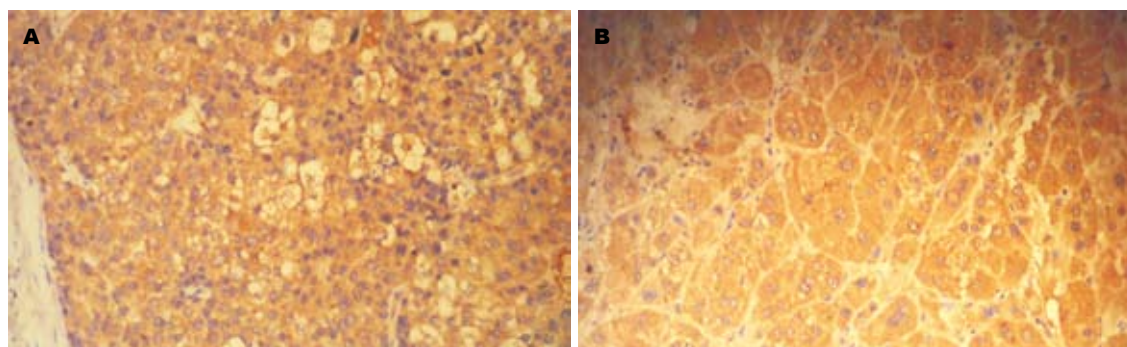


图 1 肝组织SOCS1蛋白表达(胞质棕黄色, SP × 200). A: HCC组织; B: 癌旁组织.

应用要点
本文发现癌周组织中存在SOCS1和STAT3蛋白的高表达, 检测其血清和组织表达能够为HCC的早期诊断和鉴别诊断提供有力证据; 以SOCS1和STAT3基因为靶点可以为包括HCC在内的恶性肿瘤的治疗提供新途径.

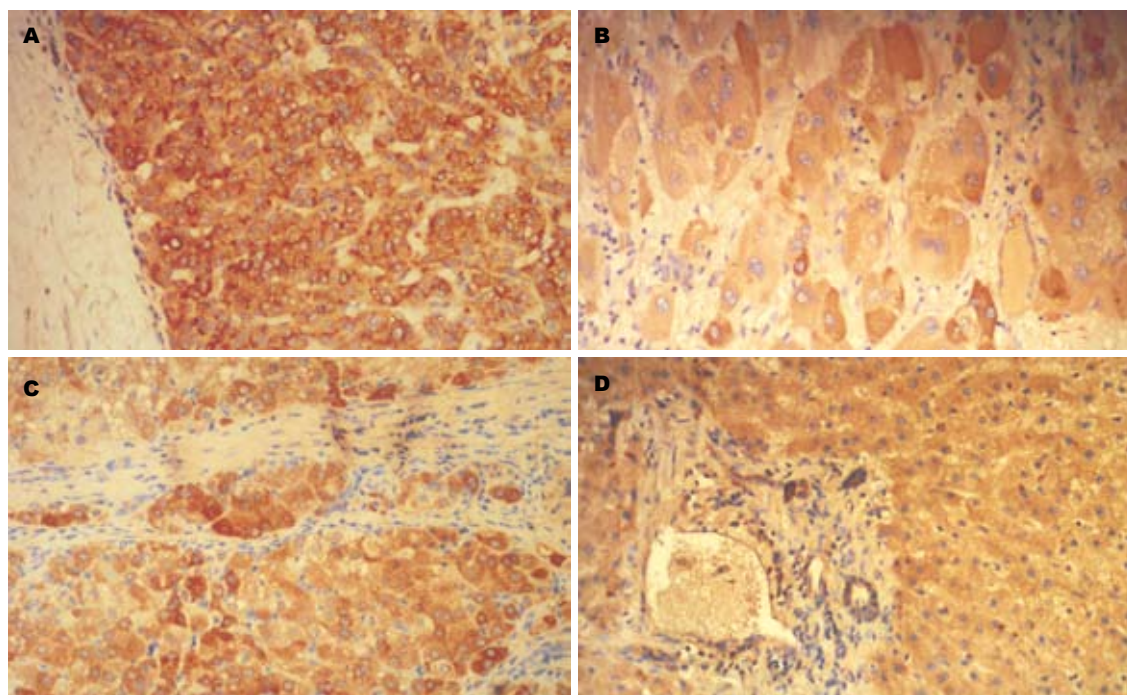


图 2 肝组织STAT3蛋白表达(胞质棕黄色, SP × 200). A: HCC组织; B: 癌旁组织; C: LC组织; D: 正常肝组织.

鼠HCC模型时, 用免疫组化方法发现STAT3在HCC发生的再生和LC期表达增加(与对照组相比 $P < 0.05$). 用蛋白印迹法检测显示STAT3呈强阳性表达($P < 0.05$). Feng *et al*^[14]发现HCC中P-STAT3的阳性率为74.5%(41/55), 明显高于癌周肝组织(23.6%, 13/55, $P < 0.01$), 认为STAT3的激活可能是HCC发生的早期事件. 本实验中的STAT3的表达在HCC组织显著高于癌周肝组织, 癌周肝组织显著高于LC组织, 提示STAT3基因与HCC的发生发展密切相关, 并且在HCC的发生发展过程中除了STAT3蛋白发生磷酸化之外, 还可能存在STAT3基因的扩增. STAT3蛋白表达在HCC组织AFP阴性表达组显著高于阳性表达组, 而且在病理分化组间差别无显著意义, 可能与我们所用抗体不能反映蛋白磷酸化有关.

JAK/STAT通路代表的是一条极其快速的从

细胞外到细胞核的信号转导通路. 近年来发现JAK/STAT途径的激活, 对于细胞的生长, 增殖和转化产生重要影响. Yoshikawa *et al*^[7]在HCC细胞系SNU-387和HuH-1中发现甲基化诱发的SOCS1沉默引起JAK2的磷酸化和STAT3的持续激活, STAT3的激活可能是SOCS1沉默导致HCC发生的一个重要因素.

SOCS1能与JAKs(JAK1-JAK3、TYK2)的JH1区结合并抑制其激酶活性, 从而抑制JAK/STAT通路的信号传导. SOCS1可能是通过其激酶抑制区作为一种假底物妨碍JAK的底物与JAK的结合, 从而抑制JAK的激酶活性^[12,15], 进而抑制STAT3的表达和激活. SOCS1基因的启动子含有STAT3的结合位点, STAT3可通过与SOCS1基因的启动子结合而调节其表达. 为了进一步探讨信号转导通路的异常及癌基因和抑

同行评价
本文选题新颖,但
技术方法一般,对
肝癌的基础研究
有一定的参考意
义。

癌基因相对表达异常在HCC发生发展中的作用,我们观察了HCC组织中SOCS1和STAT3蛋白表达之间的关系。经等级相关检验表明HCC组织中SOCS1和STAT3表达具有显著正相关($r_s = 0.431$, $P < 0.005$),提示STAT3的表达可能反馈调节SOCS1的表达,从而促进SOCS1发挥抗癌作用。HCC的发生、发展是一个多因素逐渐演变的复杂过程。SOCS1和STAT3在HCC中的作用机制有待进一步研究,二者之间的相互关系有待深入探讨。

4 参考文献

- 1 Feitelson MA, Sun B, Satiroglu Tufan NL, Liu J, Pan J, Lian Z. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Oncogene* 2002; 21: 2593-2604
- 2 Terrell AM, Crisostomo PR, Wairiuko GM, Wang M, Morrell ED, Meldrum DR. Jak/STAT/SOCS signaling circuits and associated cytokine-mediated inflammation and hypertrophy in the heart. *Shock* 2006; 26: 226-234
- 3 Yandava CN, Pillari A, Drazen JM. Radiation hybrid and cytogenetic mapping of SOCS1 and SOCS2 to chromosomes 16p13 and 12q, respectively. *Genomics* 1999; 61: 108-111
- 4 Trop S, De Sepulveda P, Zuniga-Pflucker JC, Rottapel R. Overexpression of suppressor of cytokine signaling-1 impairs pre-T-cell receptor-induced proliferation but not differentiation of immature thymocytes. *Blood* 2001; 97: 2269-2277
- 5 Tannapfel A, Anhalt K, Hausermann P, Sommerer F, Benicke M, Uhlmann D, Witzigmann H, Hauss J, Wittekind C. Identification of novel proteins associated with hepatocellular carcinomas using protein microarrays. *J Pathol* 2003; 201: 238-249
- 6 Nagai H, Kim YS, Konishi N, Baba M, Kubota T, Yoshimura A, Emi M. Combined hypermethylation and chromosome loss associated with inactivation of SSI-1/SOCS-1/JAB gene in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Lett* 2002; 186: 59-65
- 7 Yoshikawa H, Matsubara K, Qian GS, Jackson P, Groopman JD, Manning JE, Harris CC, Herman JG. SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 2001; 28: 29-35
- 8 Burke WM, Jin X, Lin HJ, Huang M, Liu R, Reynolds RK, Lin J. Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene* 2001; 20: 7925-7934
- 9 Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, Dyer KF, Xi S, Mai JC, Robbins PD, Gadiparthi S, Burke NA, Watkins SF, Grandis JR. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 4138-4143
- 10 Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997; 387: 917-921
- 11 Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 1997; 387: 924-929
- 12 Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997; 387: 921-924
- 13 Yu XT, Zhu SN, Xu ZD, Hu XQ, Zhu TF, Chen JQ, Lu SL. Roles of EGFR-Stat3 signal pathway in carcinogenesis of experimental hepatoma in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133: 145-152
- 14 Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 33-36
- 15 Giordanetto F, Kroemer RT. A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1). *Protein Eng* 2003; 16: 115-124

编辑 何燕 电编 郭海丽

辣椒素对胃动力的影响及其机制

吴天军, 彭燕

吴天军, 彭燕, 泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000

通讯作者: 吴天军, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院消化内科. wutj21@163.com

电话: 0830-3165331

收稿日期: 2007-08-23 修回日期: 2007-10-24

Effect and mechanism of action of capsaicin on gastric motility

Tian-Jun Wu, Yan Peng

Tian-Jun Wu, Yan Peng, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China

Correspondence to: Tian-Jun Wu, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. wutj21@163.com

Received: 2007-08-23 Revised: 2007-10-24

Abstract

Capsaicin has multiple pharmacological actions, and research has been centered on its effect on gastric motility. Most relevant studies have shown that low doses of capsaicin can accelerate, mediate, and high doses can inhibit gastric motility. The mechanism of action of capsaicin on gastric motility may involve vanilloid receptor subtype 1 (VR1), substance P, acetylcholine, neurokinin A, ghrelin and calcium ions. Capsaicin has promise as a new drug for gastric motility disorders.

Key Words: Capsaicin; Gastric motility; Mechanism of action

Wu TJ, Peng Y. Effect and mechanism of action of capsaicin on gastric motility. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3315-3319

摘要

辣椒素(capsaicin, CAP)药理作用广泛, 其对胃动力的影响已引起消化学者的关注. 多数研究认为小剂量的CAP可促进胃动力, 一定剂量范围的CAP可调节胃动力, 而大剂量CAP对胃动力可能有抑制作用. CAP对胃动力的作用机制

可能与CAP受体(vanilloid receptor subtype 1, VR1)、P物质(SP)、乙酰胆碱、神经激肽A、生长激素释放肽和钙离子等有关. CAP可能成为一种有前景的胃动力新药.

关键词: 辣椒素; 胃动力; 机制

吴天军, 彭燕. 辣椒素对胃动力的影响及其机制. *世界华人消化杂志* 2007;15(31):3315-3319

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3315.asp>

背景资料

辣椒素是一种常用的香料, 传统观念认为辣椒素对胃黏膜有刺激作用, 近年研究发现辣椒素可能对胃肠黏膜有保护作用. 辣椒素对胃动力的影响及其机制研究尚少, 对其进行深入研究具有重要的临床应用意义.

0 引言

胃肠动力疾病、功能性胃肠病是近年来导致消化疾病谱变化的主要因素, 此两类疾病在病因、发病机制、治疗等方面有许多相似之处, 关键环节均在于胃肠动力障碍^[1-5]. 目前临床上改善胃肠动力的药物很少, 且作用尚不理想, 对胃肠动力疾病、功能性胃肠病的治疗面临新的挑战^[6-9]. 辣椒素(capsaicin, CAP)对胃肠动力的作用已受到越来越多的关注^[9-12], 本文就CAP对胃动力的研究进展进行综述.

1 CAP和CAP受体

CAP是从辣椒果实中提取的主要活性成分, 其化学名称为反8-甲基-N-香草基-6-壬烯基酰胺. 它是一种常用的香料, 但大量研究显示CAP具有镇痛、止痒、抗炎和抗氧化等重要药理作用, 已经用于临床皮肤病和神经系统疾病等的治疗^[13-14]. 近年研究发现CAP对消化功能有重要影响, CAP对胃肠动力的作用已引起高度重视. Fukushima *et al*^[15]研究显示, (1-10) mg/kg的CAP能减轻盐酸/乙醇诱导的鼠胃黏膜损伤. Holzer *et al*^[16]报道, 10 mg/kg的CAP ig后30 min内可促进大鼠的胃排空, 具有改善胃动力的作用.

CAP通过刺激初级传入神经元末梢和细胞膜上特殊的受体而产生作用, 此类传入神经称为CAP敏感传入神经(capsaicin-sensitive afferent nerves, CSANs), 这一受体即为CAP受体, 又称之为香草醛受体亚型1(vanilloid receptor subtype 1, VR1)^[17-18]. VR1广泛分布在脊髓背根神经节、三

研发前沿
胃肠动力疾病、功能性胃肠病是近年来消化领域研究的热点。辣椒素作用于胃肠道的辣椒素受体后引起神经递质如P物质(SP)、胆囊收缩素、神经激肽A、降钙素基因相关肽(CGRP)、血管活性肠肽(VIP)等的改变,从而调节胃肠动力。

叉神经节、迷走神经节和有神经节的感觉神经的中、小神经元上。传统观念认为VR1是一种神经系统特异的受体^[17]。近来研究发现一些非神经组织和上皮细胞也有VR1的分布,如胃上皮细胞、喉部上皮细胞、支气管上皮细胞、膀胱上皮细胞、唾液腺和泪腺等^[19-20]。VR1由六个跨膜蛋白组成,为非选择性阳离子通道,他可被辣椒素类似物(如辣椒素酯、树脂毒素)和伤害性热刺激(>43℃)激活,从而减轻膀胱逼尿肌的过激疼痛,促进脂代谢及介导细胞凋亡等^[18,21-24]。CAP对胃肠道神经及胃肠黏膜上皮VR1的刺激可能对胃肠动力及胃酸分泌产生一定的生理及病理作用。

2 CAP对胃动力的作用

目前国内CAP对胃动力的影响罕见报道,仅有研究认为一定剂量的CAP可能抑制胃动力。叶美红 *et al*^[25]报道,100 g/L和400 g/L的辣椒煎剂(1 mL/鼠)可能通过CSANs抑制无水乙醇诱导的胃黏膜损伤大鼠的胃运动,并参与胃黏膜保护作用。徐晶华^[26]认为,CAP对胃黏膜的保护作用可能与抑制胃蠕动有关。

国外关于CAP与胃动力的关系研究较多,多数报道显示小剂量的CAP可促进胃动力。Holzer-Petsche *et al*^[27]报道,0.0015 mg/kg的CAP可诱导大鼠的胃体收缩。Shibata *et al*^[28]在狗的上消化道和近端结肠安置应力传感器,经消化道灌注CAP 0.1 mg/kg、0.3 mg/kg和0.5 mg/kg,结果显示CAP ig 15 min内可引发胃窦、十二指肠、近端空肠和结肠的收缩,且随剂量的增大,收缩效应增强。Debrececi *et al*^[29]采用¹³C标记的辛酸呼气试验,检测健康人0.4 mg的CAP一次po后的胃排空时间,结果显示胃排空时间从112±15 min下降到99±14 min,说明CAP能明显加快胃排空。

据报道,一定剂量的CAP可协调胃的容受性舒张,增加胃容量。Lee *et al*^[30]用恒压器研究发现CAP通过VR1通路调节人的感觉、运动功能,减弱胃头区的位相性收缩,增加对胃扩张的敏感性和顺应性。Holzer-Petsche *et al*^[27]报道0.015 mg/kg的CAP可诱导大鼠胃体的舒张。Lefebvre *et al*^[31]研究发现0.003 mg/kg的CAP可诱导鼠胃底的舒张,增加胃容量。Sekiguchi *et al*^[32]应用0.09 mg/kg的CAP使CSANs“脱敏”后可显著抑制蛋白酶激活受体-1和蛋白酶激活受体-2诱导的鼠胃纵形平滑肌的收缩。

研究显示,大剂量的CAP对胃动力产生抑制

作用。Takeuchi *et al*^[33]运用置于大鼠胃部的微型气囊连于压力传感器记录胃运动,发现给大鼠30 mg/kg的CAP ig能抑制乙醇/盐酸诱导的胃黏膜损伤大鼠的胃运动,在给药30 min后胃电波的收缩幅度抑制70%。Shibata *et al*^[34-35]对狗进行试验,经十二指肠以1 mL/min的速度持续10 min分别灌注1 mg、2 mg、5 mg和10 mg等不同剂量的CAP,能够抑制胃自发的或胃动素诱导的消化间期的移行性复合运动,且随CAP剂量增大抑制效应增强,同时观察到经回肠灌注CAP 5-10 mg,亦能以剂量依赖的方式抑制餐后的胃肠收缩和消化间期的胃运动。Evangelista^[36]的实验显示,经sc或im CAP 100 mg/kg,使CSANs“去神经”,醋酸诱导的胃溃疡大鼠的胃排空率在24 h及1 wk后明显降低,显著抑制了胃动力。Fukuda *et al*^[37]研究发现,使CSANs“去神经”剂量的CAP能抑制生长激素释放肽促发的胃排空。

另有报道称,不同时间施用相同剂量的CAP对胃动力可产生不同的影响。Zittel *et al*^[38]用缝合于大鼠胃壁的应力传感器来记录胃动力指数,于肠梗阻手术前2 d和2 h分别ip小剂量的CAP 0.03 mg/kg,结果显示手术前2 d的CAP组术后30-45 min的胃动力指数明显高于对照组,而手术前2 h的CAP组术后30-45 min的胃动力指数较对照组下降,胃动力降低了大约50%-60%。

3 CAP对胃动力的作用机制

CAP的药理作用特殊,不同剂量和不同时期给药可以产生四种不同的效应。初次或小剂量的CAP作用于CSANs末梢,可使该神经纤维产生一时性的兴奋,释放某些神经递质,向上级神经元传递信号,称为刺激兴奋。当继续或反复使用CAP,可使兴奋的CSANs耗竭大量的神经递质而对刺激无反应,出现“脱敏”现象,又称为CAP的感觉阻滞作用。大剂量的CAP在引起原初级刺激兴奋作用后,可引起神经递质的过量释放,导致CSANs受到严重损害,失去其信息传入功能,此为CAP选择性神经毒性损害,甚至不可逆性细胞破坏,亦称为CAP的化学“去神经”作用^[39-40]。Mozsik *et al*^[39]报道,小剂量的CAP 0.005 mg/kg ig就能阻止幽门结扎鼠的胃黏膜损害,而50-100 mg/kg的大剂量CAP ig却引起胃黏膜损伤加剧。Brzozowski *et al*^[41]报道,sc总量达125 mg/kg的CAP达到“去神经”作用。Bobryshev *et al*^[42]的研究显示sc 100 mg/kg的大剂量CAP可使CSANs“去神经”,而反转保护效应不能减轻胃黏膜

相关报道
大量研究显示,辣椒素具有镇痛、止痒、抗炎和抗氧化等药理作用,已经用于神经系统疾病及皮肤病的治疗,但辣椒素对胃动力的作用机制不清,国外报道不一,国内相关研究较少。

损伤. 关于CAP的确切剂量, 如产生刺激兴奋、感觉阻滞及化学“去神经”作用的剂量范围尚在进一步研究之中. 剂量、时程、使用途径与效应的关系正是迫切需要解决的问题.

CAP对胃动力的作用机制非常复杂, 至今尚不完全清楚, 涉及到神经胃肠病学病理生理机制的参与. 大量研究显示, 消化道内有很丰富的CSANs及VR1分布^[20,43-45]. Kechagias *et al*^[20]用免疫组化的方法研究显示人胃窦部活化的G细胞上有VR1免疫活性的表达, 其黏膜固有层上靠近血管的轴突样结构亦有VR1的表达; Patterson *et al*^[43]用免疫组化的方法发现大约50%的迷走传入神经支配的鼠胃肠道有VR1的表达. 其背根神经节要比腹侧神经节上VR1的免疫活性高. Ward *et al*^[44]亦用免疫组化的方法检测到人的胃黏膜肌层有VR1的分布. Faussone *et al*^[45]应用免疫组化及西氏斑点法研究显示胃黏膜层、黏膜下层以及壁细胞的神经末梢有VR1的分布, 并发现在胃壁细胞浆线粒体上也有VR1分布.

辣椒素激活胃肠道的VR1后钙离子通道开放, 引起神经元及其纤维释放神经递质如P物质(SP)、胆囊收缩素、神经激肽A、降钙素基因相关肽(CGRP)、血管活性肠肽(VIP)和兴奋性氨基酸(如天门冬氨酸)等, 从而调节胃肠动力^[16]. Domotor *et al*^[46]的研究显示, 慢性胃炎患者中的胃黏膜中表达VR1, 可检测到CGRP、SP的表达. Kadowaki *et al*^[11]用免疫组化的方法检测到鼠空肠肌间神经丛的神经纤维上有VR1的表达, 其中多数VR1表达CGRP, 极少数VR1表达SP. Holzer-Petsche *et al*^[27]研究认为, 0.0015 mg/kg的CAP诱导的大鼠胃平滑肌收缩是通过刺激胃黏膜上的VR1及CSANs途径介导SP释放而实现的. Shibata *et al*^[28]报道, 阿托品可抑制小剂量的CAP ig引发的上胃肠道平滑肌的收缩, 推测胆碱能中间神经元释放乙酰胆碱参与小剂量的CAP介导胃体平滑肌的收缩. Lu *et al*的实验显示, 胰泌素及低剂量的内毒素抑制的胃运动是通过CSANs通路作用实现的^[47-48]. Chua *et al*^[49]发现, CAP敏感迷走神经通路参与胆囊收缩素对胃近端和幽门舒缩的影响而抑制胃排空.

Sekiguchi *et al*^[32]研究显示, 初次小剂量的CAP可刺激CSANs介导神经激肽A促进胃动力, 使CSANs“脱敏”剂量的CAP通过CSANs和蛋白酶激活受体相互作用耗竭大量的神经激肽A从而抑制蛋白酶激活受体-1和蛋白酶激活受体-2诱导的大鼠胃纵形平滑肌纤维的收

缩. Fukuda *et al*^[37]研究发现, 小剂量的CAP通过CSANs介导生长激素释放肽加速胃排空, 但是使CSANs“去神经”剂量的CAP能阻断生长激素释放肽促发的胃排空. 推断使CSANs“去神经”剂量的CAP可引起生长激素释放肽的过量释放, 导致CSANs受到神经毒性损害, 失去其信息传入功能, 从而抑制胃排空. Dedov *et al*^[50]研究发现, 小剂量的CAP激活大鼠背根神经节细胞膜上的VR1后, 主要是初期数秒内大量的Ca²⁺内流和随后长时间(几十分钟)的Ca²⁺复位. 在这一过程中线粒体对细胞内的Ca²⁺起缓冲作用, Ca²⁺的复位延迟和CAP使CSANs“脱敏”有关. 而Sim *et al*^[51]报道, 在无神经影响的状态下, 小剂量的CAP通过阻断细胞内在的电压依从性钙通道激发胃窦环形平滑肌细胞的舒张延长, 以剂量依赖的方式阻止胃窦环形平滑肌细胞的自发收缩(半数有效量为0.018 mg/kg). Shibata *et al*^[34]发现, 经十二指肠灌注小剂量的CAP能抑制狗胃自发的或胃动素诱导的消化间期的移行性复合运动, 推测小肠内灌注小剂量的CAP可能通过小肠黏膜上的VR1参与抑制消化间期的胃肠运动. 一定剂量范围的CAP可协调胃的容受性舒张, 而不同时间施用相同剂量的CAP对胃动力可产生不同的影响, 其发生机制都未见报道.

总之, CAP对胃动力的影响国内外研究结果尚不统一. 多数研究认为小剂量的CAP可能促进胃动力, 一定剂量范围的CAP可调节胃动力, 而大剂量CAP对胃动力可能有抑制作用. 进一步探索CAP与胃动力的量效关系、时效关系, 对开发CAP的新用途和对功能性胃肠病、胃肠动力疾病的治疗具有重要的意义.

4 参考文献

- 1 Drossman DA. Rome III: the new criteria. *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 181-185
- 2 罗金燕, 牛春燕. 功能性胃肠病与胃肠动力疾病的新概念. *中华消化杂志* 2002; 22: 554-557
- 3 Bouin M, Plourde V, Boivin M, Riberdy M, Lupien F, Laganier M, Verrier P, Poitras P. Rectal distention testing in patients with irritable bowel syndrome: sensitivity, specificity, and predictive values of pain sensory thresholds. *Gastroenterology* 2002; 122: 1771-1777
- 4 Wood JD. Neuropathophysiology of irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: S11-S22
- 5 Camilleri M, Bueno L, de Ponti F, Fioramonti J, Lydiard RB, Tack J. Pharmacological and pharmacokinetic aspects of functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 2006; 130: 1421-1434
- 6 Delvaux M. Role of visceral sensitivity in the pathophysiology of irritable bowel syndrome. *Gut*

应用要点
近年来的实验及临床研究提示, 辣椒素可以调节胃动力, 对胃肠动力疾病、功能性胃肠病具有潜在的应用价值, 辣椒素可能成为一种有前景的胃动力新药.

名词解释

- 1 辣椒素: 是一种常用的香料, 辣椒果实中提取的主要活性成分, 其化学名称为反-8-甲基-N-香草基-6-壬烯基酰胺。
- 2 辣椒素受体: 辣椒素通过刺激初级传入神经元末梢和细胞膜上特殊的受体而产生作用, 此受体即为辣椒素受体, 又称香草醛受体亚型1。
- 3 化学“去神经”作用: 大剂量的辣椒素在引起原初级传入神经兴奋作用后, 可引起神经递质的过量释放, 导致初级传入神经失去其信息传入功能, 称为辣椒素的化学“去神经”作用。
- 2002; 51 Suppl 1: i67-i71
- 7 Saruc M, Ozden N, Turkel N, Ayhan S, Demir MA, Tuzcuoglu I, Akarca US, Yuceyar H. Functional dyspepsia: relationship between clinical subgroups and *Helicobacter pylori* status in Western Turkey. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 747-751
- 8 Grundy D, Al-Chaer ED, Aziz Q, Collins SM, Ke M, Tache Y, Wood JD. Fundamentals of neurogastroenterology: basic science. *Gastroenterology* 2006; 130: 1391-1411
- 9 Fajardo NR, Cremonini F, Talley NJ. Frontiers in functional dyspepsia. *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7: 289-296
- 10 Grossi L, Cappello G, Marzio L. Effect of an acute intraluminal administration of capsaicin on oesophageal motor pattern in GORD patients with ineffective oesophageal motility. *Neurogastroenterol Motil* 2006; 18: 632-636
- 11 Kadowaki M, Kuramoto H, Takaki M. Combined determination with functional and morphological studies of origin of nerve fibers expressing transient receptor potential vanilloid 1 in the myenteric plexus of the rat jejunum. *Auton Neurosci* 2004; 116: 11-18
- 12 Agarwal MK, Bhatia SJ, Desai SA, Bhure U, Melgiri S. Effect of red chillies on small bowel and colonic transit and rectal sensitivity in men with irritable bowel syndrome. *Indian J Gastroenterol* 2002; 21: 179-182
- 13 朱亦赤, 刘志敏. 辣椒素类物质的测定、提取及应用研究进展. *辣椒杂志* 2007; 25-28
- 14 林绮雯, 杨得坡, 黄世亮, 胡海燕. 辣椒素的药理与临床研究概况. *广东药学* 2000; 10: 5-8
- 15 Fukushima K, Aoi Y, Kato S, Takeuchi K. Gastro-protective action of lafutidine mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons without interaction with TRPV1 and involvement of endogenous prostaglandins. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3031-3037
- 16 Holzer P, Painsipp E, Schuligoi R. Differential effects of intragastric acid and capsaicin on gastric emptying and afferent input to the rat spinal cord and brainstem. *BMC Neurosci* 2005; 6: 60
- 17 郭峰, 姜晓钟, 赵云富. 辣椒素的作用机制及其镇痛应用. *第二军医大学学报* 2002; 23: 96-98
- 18 衡立君, 高国栋, 陈军. 辣椒素受体VR1在局部炎症状态下的敏化机制. *神经解剖学杂志* 2004; 20: 315-318
- 19 陈敏, 张陆勇, 严明. 辣椒素受体研究进展. *中国临床药理学与治疗学* 2006; 11: 126-130
- 20 Kechagias S, Botella S, Petersson F, Borch K, Ericson AC. Expression of vanilloid receptor-1 in epithelial cells of human antral gastric mucosa. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 775-782
- 21 Ferrer-Montiel A, Garcia-Martinez C, Morenilla-Palao C, Garcia-Sanz N, Fernandez-Carvajal A, Fernandez-Ballester G, Planells-Cases R. Molecular architecture of the vanilloid receptor. Insights for drug design. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1820-1826
- 22 Haramizu S, Mizunoya W, Masuda Y, Ohnuki K, Watanabe T, Yazawa S, Fushiki T. Capsiate, a nonpungent capsaicin analog, increases endurance swimming capacity of mice by stimulation of vanilloid receptors. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70: 774-781
- 23 Haferkamp A, Hohenfellner M. Intravesical treatment of overactive bladder syndrome. *Urologe A* 2006; 45: 1283-1288
- 24 Hail N Jr. Mechanisms of vanilloid-induced apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8: 251-262
- 25 叶美红, 王竹立, 李林, 周文钰, 徐菲, 温红艳, 张静琳. 辣椒素敏感神经元介导地黄提取物A的胃粘膜保护作用. *广东医学* 2000; 21: 14-15
- 26 徐晶华. 辣椒辣素在胃损伤和治愈过程中的作用. *黑龙江医药* 2003; 16: 478
- 27 Holzer-Petsche U, Seitz H, Lembeck F. Effect of capsaicin on gastric corpus smooth muscle of the rat in vitro. *Eur J Pharmacol* 1989; 162: 29-36
- 28 Shibata C, Sasaki I, Naito H, Ueno T, Matsuno S. Intragastric capsaicin stimulates motility of upper gut and proximal colon via distinct pathways in conscious dogs. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1083-1089
- 29 Debreceni A, Abdel-Salam OM, Figler M, Juricskay I, Szolcsanyi J, Mozsik G. Capsaicin increases gastric emptying rate in healthy human subjects measured by ¹³C-labeled octanoic acid breath test. *J Physiol Paris* 1999; 93: 455-460
- 30 Lee KJ, Vos R, Tack J. Effects of capsaicin on the sensorimotor function of the proximal stomach in humans. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 415-425
- 31 Lefebvre RA, De Beurme FA, Sas S. Relaxant effect of capsaicin in the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol* 1991; 195: 131-137
- 32 Sekiguchi F, Hasegawa N, Inoshita K, Yonezawa D, Inoi N, Kanke T, Saito N, Kawabata A. Mechanisms for modulation of mouse gastrointestinal motility by proteinase-activated receptor (PAR)-1 and -2 in vitro. *Life Sci* 2006; 78: 950-957
- 33 Takeuchi K, Niida H, Matsumoto J, Ueshima K, Okabe S. Gastric motility changes in capsaicin-induced cytoprotection in the rat stomach. *Jpn J Pharmacol* 1991; 55: 147-155
- 34 Shibata C, Naito H, Ueno T, Jin XL, Funayama Y, Fukushima K, Matsuno S, Sasaki I. Intraduodenal capsaicin inhibits gastric migrating motor complex via an extrinsic neural reflex in conscious dogs. *Neurogastroenterol Motil* 2002; 14: 543-551
- 35 Shibata C, Jin XL, Naito H, Matsuno S, Sasaki I. Intraileal capsaicin inhibits gastrointestinal contractions via a neural reflex in conscious dogs. *Gastroenterology* 2002; 123: 1904-1911
- 36 Evangelista S. Role of sensory neurons in restitution and healing of gastric ulcers. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2977-2984
- 37 Fukuda H, Mizuta Y, Isomoto H, Takeshima F, Ohnita K, Ohba K, Omagari K, Taniyama K, Kohno S. Ghrelin enhances gastric motility through direct stimulation of intrinsic neural pathways and capsaicin-sensitive afferent neurones in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 1209-1214
- 38 Zittel TT, Meile T, Jehle EC, Becker HD. Intraperitoneal capsaicin treatment reduces postoperative gastric ileus in awake rats. *Langenbecks Arch Surg* 2001; 386: 204-211
- 39 Mozsik G, Vincze A, Szolcsanyi J. Four response stages of capsaicin-sensitive primary afferent neurons to capsaicin and its analog: gastric acid secretion, gastric mucosal damage and protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1093-1097
- 40 李林, 王竹立, 叶美红, 赖晓嵘. 辣椒辣素敏感神经元介导地黄胃粘膜保护效应. *中山医科大学学报* 2000; 21: 133-136
- 41 Brzozowski T, Konturek PC, Sliwowski Z, Drozdowicz D, Kwiecien S, Pawlik M, Pajdo R, Konturek SJ, Pawlik WW, Hahn EG. Neural aspects of ghrelin-induced gastroprotection against mucosal injury induced by noxious agents. *J Physiol*

- Pharmacol* 2006; 57 Suppl 6: 63-76
- 42 Bobryshev PIu, Podvigina TT, Bagaeva TR, Filaretova LP. Compensatory gastroprotective action of glucocorticoid hormones in the rats with ablation of capsaicin-sensitive neurons. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* 2006; 92: 1006-1015
- 43 Patterson LM, Zheng H, Ward SM, Berthoud HR. Vanilloid receptor (VR1) expression in vagal afferent neurons innervating the gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 2003; 311: 277-287
- 44 Ward SM, Bayguinov J, Won KJ, Grundy D, Berthoud HR. Distribution of the vanilloid receptor (VR1) in the gastrointestinal tract. *J Comp Neurol* 2003; 465: 121-135
- 45 Fausone-Pellegrini MS, Taddei A, Bizzoco E, Lazzeri M, Vannucchi MG, Bechi P. Distribution of the vanilloid (capsaicin) receptor type 1 in the human stomach. *Histochem Cell Biol* 2005; 124: 61-68
- 46 Domotor A, Kereskay L, Szekeres G, Hunyady B, Szolcsanyi J, Mozsik G. Participation of capsaicin-sensitive afferent nerves in the gastric mucosa of patients with *Helicobacter pylori*-positive or negative chronic gastritis. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 411-417
- 47 Lu Y, Owyang C. Secretin at physiological doses inhibits gastric motility via a vagal afferent pathway. *Am J Physiol* 1995; 268: G1012-1016
- 48 Quintana E, Garcia-Zaragoza E, Martinez-Cuesta MA, Calatayud S, Esplugues JV, Barrachina MD. A cerebral nitrenergic pathway modulates endotoxin-induced changes in gastric motility. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 325-332
- 49 Chua AS, Keeling PW. Cholecystokinin hyper-responsiveness in functional dyspepsia. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2688-2693
- 50 Dedov VN, Roufogalis BD. Mitochondrial calcium accumulation following activation of vanilloid (VR1) receptors by capsaicin in dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 2000; 95: 183-188
- 51 Sim JH, Kim YC, Kim SJ, Lee SJ, Suh SH, Jun JY, So I, Kim KW. Capsaicin inhibits the voltage-operated calcium channels intracellularly in the antral circular myocytes of guinea-pig stomach. *Life Sci* 2001; 68: 2347-2360

同行评价
本文题目简洁明晰, 文章结构完整, 条理清晰, 有较好的可读性, 具有一定的先进性。

编辑 李军亮 电编 何基才

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

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2007)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2006年从6500种统计刊源析出的290余万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2006-01/12全文下载记录(2.1亿篇次)的大样本数据统计分析得到: 世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床医学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2611, 影响因子为0.460, 5年影响因子为0.482, 即年指标为0.148, 他引总引比为0.80, 被引期刊数为585, 被引半衰期为4.6, 2006载文量为696, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为17.7. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].

干细胞移植在肝脏损伤修复中作用的研究进展

金世柱, 韩明子, 曲波

背景资料
急性肝损伤病死率高, 其治疗始终是一较为棘手的问题. 干细胞及其“横向分化”特性的发现为各种疾病的治疗提供了一种新的手段. 近年来干细胞移植作为一种治疗肝脏损伤的有效方法正得到日益广泛应用.

金世柱, 韩明子, 曲波, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086
黑龙江省自然科学基金资助项目, No. D200536
通讯作者: 韩明子, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科. hanmingzi@medmail.com.cn
电话: 0451-86605143
收稿日期: 2007-07-30 修回日期: 2007-10-17

关键词: 干细胞; 肝脏损伤

金世柱, 韩明子, 曲波. 干细胞移植在肝脏损伤修复中作用的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(31):3320-3323
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3320.asp>

Advances in stem cell transplantation for liver injury

Shi-Zhu Jin, Ming-Zi Han, Bo Qu

Shi-Zhu Jin, Ming-Zi Han, Bo Qu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation in Heilongjiang Province

Correspondence to: Ming-Zi Han, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. hanmingzi@medmail.com.cn
Received: 2007-07-30 Revised: 2007-10-17

Abstract

The treatment of liver injury is very difficult, and the case fatality rate is high. A new approach to treatment is presented by stem cells and their characteristics of transversal differentiation. Recently, stem cell transplantation has been widely used for liver injury. This article reviews the advances in the field of stem cell transplantation.

Key Words: Stem cell; Liver injury

Jin SZ, Han MZ, Qu B. Advances in stem cell transplantation for liver injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3320-3323

摘要

急性肝损伤病死率高, 其治疗始终是较为棘手的问题. 干细胞及其“横向分化”特性的发现为各种疾病的治疗提供了一种新的手段. 近年来干细胞移植作为一种治疗肝脏损伤的有效方法正得到日益广泛应用. 本文旨在对干细胞移植治疗急性肝损伤的新进展作一综述.

0 引言

干细胞是指一类具有自我更新和分化能力的细胞^[1-2], 干细胞的增殖及定向分化具有广泛的应用潜能. 大量研究^[3-5]表明, 在肝损伤及肝细胞再生过程中, 干细胞起着重要作用. 干细胞在特定的环境下可分化成为肝脏干细胞及肝细胞, 从而参与损伤肝脏的修复和重构. 特别是近年来随着干细胞分离、培养、鉴定及增殖技术的发展和成熟, 将多种来源的干细胞用作干细胞移植的种子细胞已经引起广泛的关注. 目前, 干细胞研究已在医学领域取得了令人瞩目的成就, 也为各种原因导致的急性肝损伤的治疗提供了新的思路.

1 干细胞移植的理论基础

干细胞移植修复损伤肝脏的理论基础源于干细胞的自身特性, 即肝脏干细胞的“多源性”和“可塑性”, 是干细胞移植治疗急性肝损伤的理论基础. 近年来, 成年个体多潜能祖细胞(multipotent adult progenitor cells, MAPCs)的发现^[6]是干细胞研究领域令人鼓舞的发现之一. 肝脏干细胞不仅可以来源于肝脏自身, 同时发现非肝源性干细胞也可以分化成为肝脏干细胞, 甚至分化成有功能的肝细胞. Schwartz *et al*^[7]发现, 离体的骨髓干细胞在体外可被诱导成肝脏干细胞和肝细胞. 有学者^[8]也证实, 接受骨髓移植的患者和动物模型肝组织中可以发现带有供体基因标记的肝细胞. 大量的基础及临床研究^[6,9]均证实, 骨髓造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)及骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cells, BMSCs)均可以分化成为肝细胞. 细胞转化最重要的是功能转化, 细胞形态转化及细胞表面标志或基因表达尚不足以证明干

研发前沿
各种原因导致的急性肝损伤中, 如肝脏的基本构架尚存, 利用干细胞无限增殖的特点及其可向肝细胞和胆管细胞分化的潜力, 干细胞移植技术可望应用于临床实践中来救治患者.

细胞真正意义上的转化. 这就需要鉴定分化后的干细胞有无合成白蛋白(albumin, ALB)、甲种胎儿球蛋白(alphafetoprotein, AFP)等肝脏干细胞的特异性标志物. 这一问题在许多文献中均有相关报道^[10-12], 认为干细胞不仅发生了形态上的分化, 同时也证实有功能上的分化.

2 干细胞移植治疗肝损伤的基础研究

2.1 移植干细胞不同来源

2.1.1 骨髓间充质干细胞: 有研究^[13]将健康♀ Wistar大鼠随机分为正常组、对照组和实验组. 对照组和实验组腹腔注射150 mL/kg的四氯化碳石蜡油溶液建立肝硬化模型. 实验组经尾静脉输入用BrdU(Bromodeoxyuridine)标记的健康♂大鼠BMSCs, 分别在不同时间点检测♂性别决定基因SRY、BrdU的表达及血清肝功能、AFP等指标. 结果发现BMSCs可以植入肝脏汇管区、肝细胞索, 植入细胞最早见于移植后约7 d, 植入的BMSCs能够部分代替肝细胞的功能. 与Chen *et al*^[14]通过实验证实得到的结论相一致. 国内王帅 *et al*^[15]采集肝硬化患者骨髓应用Ficoll分离液分离培养其骨髓间充质干细胞, 应用人肝细胞生长因子对骨髓间充质干细胞进行定向诱导分化, 通过细胞形态及其白蛋白和角蛋白18的表达等指标确定骨髓间充质干细胞可以向肝样细胞分化.

2.1.2 血脐带血来源的间充质干细胞: 近年来发现脐带血来源的间充质干细胞与骨髓来源的间充质干细胞有许多相类似的特性, 例如所含干细胞的增殖与分化力强, 易在体外扩增, 移植后较少发生排斥反应等优点, 从而越来越受到重视. 许多研究^[16-17]均证实, 可以通过各种不同的方法在体外成功诱导脐血来源的MSC向肝细胞转化. Kakinuma *et al*^[18]将人的脐带血来源的间充质干细胞体外培养后移植入大鼠, 在移植后6 wk检测到人白蛋白的表达, 并观察到移植细胞的存活. 国内张卫光 *et al*^[19]将人胚胎脐带血分离的MSCs植入肝硬化的大鼠体内, 发现移植大鼠的体质量明显增加和肝纤维化的程度显著减轻, 认为人胚胎脐带血分离的MSCs可能在肝硬化大鼠体内分化成为具有肝细胞功能的细胞, 进而改善外周血的生生化指标和肝脏的组织学结构, 为今后的临床应用提供实验依据.

2.1.3 造血干细胞: 近年来研究发现^[9], 骨髓或脐血来源的造血干细胞可以向肝系细胞转化, 进一步研究^[20]表明, CD34⁺造血干细胞亚群具有更

为良好的向肝系细胞定向分化的潜能, 有望成为生物人工肝或干细胞移植新的供体细胞来源. 造血干细胞的可塑性开辟了干细胞移植新方向. Lagasse *et al*^[9]纯化正常小鼠的HSCs, 经静脉移植给有代谢肝病(酪氨酸血症I型)的小鼠, 发现能改善病鼠的肝功能并延长其寿命. Yang *et al*^[21]研究显示, 将肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)质粒通过尾静脉快速输入小鼠体内, 在早期HGF水平有较大的提高, 与范焯 *et al*^[22]的研究结果相一致. 同时范焯 *et al*通过实验发现, HGF可以促进干细胞进一步向肝样细胞系的转化.

2.1.4 胚胎干细胞: 胚胎干细胞起源于腹侧前肠内胚层, 并在中胚层与早期横膈信号控制下由早期肝上皮发育而成^[23], 特别是在小鼠的肝脏发育过程中显得更为明显. Jones *et al*^[24]将未分化鼠胚胎干细胞置于无菌培养皿中培养, 5 d后形成胚胎样小体(mbryonic stem, ES)后将EB接种在经甘油处理的24孔板中, 细胞分化后, 在第3天和第7天分别能检测到AFP和ALB, 说明此时胚胎干细胞已向肝细胞分化. Teratani *et al*^[25]成功地将胚胎干细胞分化为肝细胞, 并且认为这种肝细胞治疗小鼠肝硬化模型效果显著. Hu *et al*^[2]发现ES能够经过诱导分化形成为有功能的胆管内皮细胞, 认为ES将是肝组织工程中的一种新的细胞来源.

2.1.5 其他细胞: 因干细胞自身的特性的缘故, 移植细胞的来源非常广泛, 除常用的胚胎干细胞、外周血干细胞、骨髓间充质干细胞外唾液腺上皮细胞^[26]、神经干细胞^[27]、胰腺上皮细胞^[28]也用于干细胞移植研究.

2.2 干细胞植入的不同移植途径

2.2.1 肝动脉植入: 姚鹏 *et al*^[29]在无菌条件下, 从患者自身髂后上棘抽取骨髓30-50 mL, 分离纯化骨髓干细胞, 在局部麻醉下行肝动脉插管, 将分离的骨髓干细胞移植于肝脏. 结果发现自体骨髓干细胞移植治疗后, 患者肝功能和凝血机制明显改善, 生存率提高, 临床症状好转, 表明自体骨髓干细胞移植对肝衰竭患者治疗有效、安全, 不良反应少. 北京军区总院张强 *et al*^[30]对经肝动脉行自体骨髓干细胞移植进行了一系列探索, 取得可喜成绩. 但这一技术的远期临床效果还有待进一步研究.

2.2.2 门静脉植入: 有学者^[31]研究表明, 经脾穿刺肝细胞移植后, 受体脾脏、肝脏、肺、脑、肾脏均发现DiI标记细胞, 与王平 *et al*^[32]将MSC经

相关报道
Shu *et al*分离了小鼠的骨髓间充质干细胞, 通过诱导发现骨髓间充质干细胞可分化为肝细胞. Lagasse *et al*将纯化的造血干细胞移植重建了一型酪氨酸血症模型大鼠肝脏的生化功能, 使受体鼠病情得到基本改善.

创新盘点
在干细胞移植过程中, 如何提取、分离干细胞来获得较高纯度的干细胞, 如何选择干细胞的移植途径, 如何促进干细胞的迁移、分化等问题是目前研究的重点。本文重点介绍干细胞的来源、干细胞的移植途径以及近年来临床研究的结果。

门静脉注入大鼠的发现有所差别。即细胞主要分布于受体肝脏, 在肝脏内分布呈现由门静脉小分支逐渐向肝实质内移行的过程, 并与肝细胞紧密结合呈索状排列。在一定程度上提示经过门静脉途径移植细胞可以起到良好的细胞选择性分布的作用, 因为假如有大量的细胞通过肝静脉回流, 那也一定首先在肺内发现。王平 *et al* 认为, MSC在体内横向分化的过程中, 必须有肝脏再生微环境的存在, 而经过介入的选择性血管内细胞移植技术, 可以将MSC直接注入门静脉, 最大限度地使MSC停留在肝脏, 为MSC在体内诱导提供充分保障。但门静脉植入可以导致门静脉压力短暂而明显的升高, 重者导致严重肝损伤和广泛肝坏死。因此这种途径是否为最好的移植途径亟待评估^[33]。

2.2.3 鼠尾静脉植入: 鼠尾静脉植入干细胞是目前动物研究较为常用的干细胞植入方法, 具有损伤小、操作简单、污染机率小等优点。穆丽雅 *et al*^[34]以红色荧光染料PKH26标记从小鼠骨髓中分离出的干细胞, 分别从小鼠的尾静脉和门静脉注入同种异体的四氯化碳-2-乙酰氨基苄(CCL4-AAF)造成肝损伤的小鼠体内, 移植2 wk后分别取肝组织, 通过荧光显微镜观察两种移植途径对小鼠骨髓干细胞向肝脏迁移的影响。结果发现骨髓干细胞向肝脏迁移的细胞数与移植途径无关。

2.2.4 肠系膜上静脉植: 文献报道^[19], 经肠系膜上静脉移植MSC, 可明显改善四氯化碳诱导性肝硬化大鼠的肝纤维化程度, 为肝硬化的治疗提供实验依据。此方法创伤大, 感染机率较高, 对移植成功率的影响较大。

3 干细胞移植治疗肝损伤的临床研究

实验骨髓间充质干细胞在体内外均可转化为肝细胞样细胞, 且在体内能够部分替代肝细胞的功能。国内姚鹏 *et al*^[29]已经将骨髓干细胞移植应用于临床。他们用自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化30例, 在X射线透视下, 经股动脉插管至肝固有动脉, 将分离好的骨髓干细胞注入肝内, 移植后大多数患者临床症状有明显改善, 多数患者血清学检测明显好转, 同时30例患者中均没有发现严重不良反应及并发症。Strom *et al*^[35]指出, 在肝功能不全时将干细胞移植到肝脏或其他部位例如脾脏, 能够及时地起到支持肝功能的作用。同时他们还指出, 临床上已经应用干细胞移植技术作为整体器官移植的桥梁或

替代治疗。新近Kumar *et al*^[36]对1例原发性淀粉样变性病患者进行了肝移植, 手术后10-14 mo复发, 并出现肝功能衰竭, 然后对该患者进行干细胞移植, 患者临床症状很快消失而获得治愈。Sokal *et al*^[37]报道1例患有Reum病的幼儿在接受了干细胞移植后, 血液生化指标得到明显改善, 提示干细胞移植为代谢性肝病的治疗提供了新的方法。

4 结论

干细胞移植在基础研究及动物实验方面取得了许多理想的结果, 因此被认为是最具前景的细胞源^[38]。但干细胞移植真正应用于临床还有一些问题需要解决。如移植细胞的剂量、移植细胞的时间点的选择、如何提高干细胞的转化率、体外培养体系的如何建立、移植后的远期效果观察, 特别是移植后的干细胞是否会分化为肿瘤细胞等方面, 均需要大样本的资料来回答。

5 参考文献

- 1 Yao P, Zhan Y, Xu W, Li C, Yue P, Xu C, Hu D, Qu CK, Yang X. Hepatocyte growth factor-induced proliferation of hepatic stem-like cells depends on activation of NF-kappaB. *J Hepatol* 2004; 40: 391-398
- 2 Hu AB, He XS, Cai JY, Zheng QC, Lei TN, Guo ZG. Hepatic differentiation of mouse ES cells into BE cells in vitro. *Cell Biol Int* 2006; 30: 459-465
- 3 Snykers S, De Kock J, Vanhaecke T, Rogiers V. Differentiation of neonatal rat epithelial cells from biliary origin into immature hepatic cells by sequential exposure to hepatogenic cytokines and growth factors reflecting liver development. *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 1325-1331
- 4 Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141-148
- 5 Cantz T, Sharma AD, Jochheim-Richter A, Arseniev L, Klein C, Manns MP, Ott M. Reevaluation of bone marrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant* 2004; 13: 659-666
- 6 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49
- 7 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302
- 8 Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102: 3483-3493
- 9 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M,

名词解释
横向分化: 骨髓中的干细胞在特点的环境下可分化为多种无关的组织细胞, 这种跨胚层分化现象称为“横向分化”, 这种“横向分化”潜能也称为干细胞的“可塑性”。

- Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234
- 10 Sun Y, Xiao D, Zhang RS, Cui GH, Wang XH, Chen XG. Formation of human hepatocyte-like cells with different cellular phenotypes by human umbilical cord blood-derived cells in the human-rat chimeras. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 1160-1165
- 11 Snykers S, Vanhaecke T, De Becker A, Papeleu P, Vinken M, Van Riet I, Rogiers V. Chromatin remodeling agent trichostatin A: a key-factor in the hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells derived of adult bone marrow. *BMC Dev Biol* 2007; 7: 24
- 12 Zhao WJ, Chen YJ, Zhao ZG, Liu W, Liu SR, Sun QG, Chen X. A study of AFP and ALB expression in human mesenchymal stem cells induced by hepatopathy patient serum. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2006; 14: 300-301
- 13 王蒙勋, 马军, 段芳龄, 程香普, 梅雪, 唐笑爱, 郑鹏远, 薛乐勋. 骨髓间充质干细胞治疗肝硬化的动物实验研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2006; 15: 365-368
- 14 Chen Y, Dong XJ, Zhang GR, Shao JZ, Xiang LX. In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes. *J Cell Biochem* 2007; 102: 52-63
- 15 王帅, 胡大荣, 姚鹏, 周一鸣, 李杨. 肝硬化患者骨髓间充质干细胞诱导分化为肝样细胞的实验. *中国临床康复* 2006; 10: 1-4
- 16 Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, Han H, Kim H. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 1153-1161
- 17 Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, Yu XJ. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7461-7465
- 18 Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, Watanabe M, Shimizu-Saito K, Hara Y, Teramoto K, Arii S, Sato C, Takase K, Yasumizu T, Teraoka H. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 2003; 21: 217-227
- 19 张卫光, 俞敏俊, 田琰, 马瑞琼, 张书永, 沈丽. 人间充质干细胞移植改善四氯化碳诱导性肝硬化大鼠的肝纤维化. *解剖学报* 2006; 37: 158-162
- 20 Nava S, Westgren M, Jaksch M, Tibell A, Broome U, Ericzon BG, Sumitran-Holgersson S. Characterization of cells in the developing human liver. *Differentiation* 2005; 73: 249-60
- 21 Yang J, Chen S, Huang L, Michalopoulos GK, Liu Y. Sustained expression of naked plasmid DNA encoding hepatocyte growth factor in mice promotes liver and overall body growth. *Hepatology* 2001; 33: 848-59
- 22 范辉, 王学浩, 张峰, 李湘成, 钱晓峰. HGF质粒体内表达诱导脐血干细胞向肝系细胞分化. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 767-771
- 23 Zaret KS. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 499-512
- 24 Jones EA, Tosh D, Wilson DI, Lindsay S, Forrester LM. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 2002; 272: 15-22
- 25 Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H, Asari A, Quinn G, Sasaki H, Terada M, Ochiya T. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology* 2005; 41: 836-846
- 26 Hisatomi Y, Okumura K, Nakamura K, Matsumoto S, Satoh A, Nagano K, Yamamoto T, Endo F. Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology* 2004; 39: 667-675
- 27 Wang X, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Liver repopulation and correction of metabolic liver disease by transplanted adult mouse pancreatic cells. *Am J Pathol* 2001; 158: 571-579
- 28 Dabeva MD, Hwang SG, Vasa SR, Hurston E, Novikoff PM, Hixson DC, Gupta S, Shafritz DA. Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 7356-7361
- 29 姚鹏, 胡大荣, 王帅, 闻炜, 周一鸣, 龚丽娟. 自体骨髓干细胞移植治疗慢性肝衰竭研究. *肝脏* 2005; 10: 171-173
- 30 张强, 李京雨, 徐力扬, 刘明, 姚鹏, 王帅. 经肝动脉骨髓干细胞移植治疗肝硬化的初步临床应用. *中国介入影像与治疗学* 2005; 2: 261-263
- 31 周小民, 钱世昆, 高良辉, 张天顺, 刘勇, 张水生, 卢胜祁. SD大鼠脾内肝细胞移植的迁移与生存研究. *中华外科杂志* 2001; 10: 741
- 32 王平, 王建华, 颜志平, 胡美玉, 王艳红, 李文涛, 林根来. 大鼠骨髓基质细胞分离培养和经门静脉途径移植的初步研究. *中华放射学杂志* 2004; 38: 129-132
- 33 Fisher RA, Bu D, Thompson M, Tisnado J, Prasad U, Sterling R, Posner M, Strom S. Defining hepatocellular chimerism in a liver failure patient bridged with hepatocyte infusion. *Transplantation* 2000; 69: 303-307
- 34 穆丽雅, 韩明子, 祁金锋. 门静脉和尾静脉注入小鼠骨髓干细胞向肝脏迁移的比较. *世界华人消化杂志* 2007; 14: 1408-1411
- 35 Strom S, Fisher R. Hepatocyte transplantation: new possibilities for therapy. *Gastroenterology* 2003; 124: 568-571
- 36 Kumar KS, Lefkowitz J, Russo MW, Hesdorffer C, Kinkhabwala M, Kapur S, Emond JC, Brown RS Jr. Successful sequential liver and stem cell transplantation for hepatic failure due to primary AL amyloidosis. *Gastroenterology* 2002; 122: 2026-2031
- 37 Sokal EM, Smets F, Bourgeois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, Bernard Otte J, Evrard V, Latinne D, Vincent MF, Moser A, Soriano HE. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* 2003; 76: 735-738
- 38 Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004; 39: 1477-1487

同行评价
本文层次清楚, 语言精炼, 内容较好, 有很好的可读性.

编辑 何燕 电编 李军亮

脑肠肽Obestatin与Ghrelin的研究进展

唐胜球, 江青艳, 张永亮, 朱晓彤, 束刚, 高萍

背景资料
Ghrelin是一种具有多功能的肽, 国内外目前已有大量研究。Obestatin是新近发现的可调节食欲的多肽, 被认为是Ghrelin的对立面, 二者在生物体内相互平衡和协调, 发挥重要生理功能。

唐胜球, 江青艳, 张永亮, 朱晓彤, 束刚, 高萍, 华南农业大学动物科学学院 广东省广州市 510642
国家自然科学基金资助项目, No. 30471268
国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目资助项目, No. 2004CB117500
通讯作者: 江青艳, 510642, 广东省广州市, 华南农业大学动物科学学院. qyjiang@scau.edu.cn
电话: 020-85285469
收稿日期: 2007-09-08 修回日期: 2007-10-25

Research progress on brain-gut peptide obestatin and ghrelin

Sheng-Qiu Tang, Qing-Yan Jiang, Yong-Liang Zhang, Xiao-Tong Zhu, Gang Shu, Ping Gao

Sheng-Qiu Tang, Qing-Yan Jiang, Yong-Liang Zhang, Xiao-Tong Zhu, Gang Shu, Ping Gao, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471268 and the Special Funds of the National Basic Research Program of China (973 Program), No. 2004CB117500
Correspondence to: Qing-Yan Jiang, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China. qyjiang@scau.edu.cn
Received: 2007-09-08 Revised: 2007-10-25

Abstract

Obestatin and ghrelin are two important brain-gut peptides that can combine with their receptors and exert important biological functions. Obestatin is a 76-98 amino acid polypeptide segment of proghrelin that binds to the orphan G-protein-coupled receptor GPR39, which can suppress food intake, inhibit jejunal contraction, and decrease body-weight gain. Ghrelin is a 24-51 amino acid peptide segment of proghrelin that binds to receptor GHS-R, which can enhance appetite and body weight, promote the release of GH, and affect cardiovascular and immune functions. Obestatin is regarded as on biological antagonist, or a Yin and Yang activated polypeptide of ghrelin.

Key Words: Obestatin; Ghrelin; Brain-gut peptide; Receptor; Biological functions

Tang SQ, Jiang QY, Zhang YL, Zhu XT, Shu G, Gao P. Research progress on brain-gut peptide obestatin

and ghrelin. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(31): 3324-3331

摘要

Obestatin与Ghrelin是两种重要的脑肠肽(brain-gut peptide, BGP), 与其受体结合后发挥重要的生物学功能。Obestatin位于胃生长素前体原的76-98片段, 可以结合孤儿G蛋白GPR39受体, 抑制食物摄取、空肠的蠕动和体质量的增加。而Ghrelin则位于胃生长素前体原的24-51肽段, 可以结合蛋白受体GHS-R, 增加食欲和体质量, 促进GH的释放, 影响心血管功能和免疫机能等。Obestatin被认为是Ghrelin的生物学拮抗剂或阴阳活性多肽。

关键词: Obestatin; Ghrelin; 脑肠肽; 受体; 生物学功能

唐胜球, 江青艳, 张永亮, 朱晓彤, 束刚, 高萍. 脑肠肽Obestatin与Ghrelin的研究进展. 世界华人消化杂志 2007; 15(31): 3324-3331

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3324.asp>

0 引言

为了寻找研制新型药物的新途径, 斯坦福大学的Zhang *et al*对人类基因数据库和其他机体组织进行了详细研究。在研究过程中, 他们将注意力放在了那些数百万年的进化过程中保留下来的在生物进化过程中发挥非常重要作用的基因片段上。结果在胃生长素前体(proghrelin)基因序列的末端, 科学家们找到了一种新的蛋白质, 并将其命名为肥胖抑制素(Obestatin), 其中“obe”是拉丁文来源词“obedere”的缩写, 表示大量摄食, 而“statin”则表示“抑制”。接着Zhang *et al*成功从大鼠的胃组织中成功分离出这种能够抑制饥饿感的激素。除了人类之外, 在其他10多种哺乳动物的组织中也发现了此激素。Zhang *et al*^[1]的研究同时也证实Obestatin与已发现的胃生长素Ghrelin之间存在密切的联系, 在维持机体的代谢平衡中起重要的生物学作用。本文主

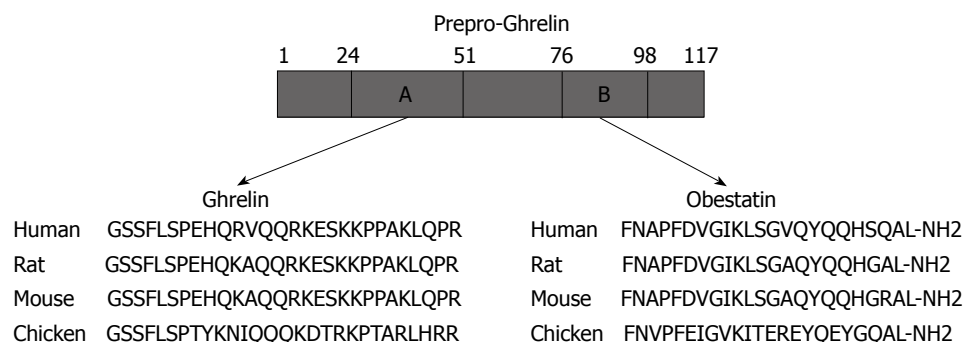


图1 不同动物Obestatin和Ghrelin的氨基酸序列. A: Ghrelin氨基酸片段; B: Obestatin氨基酸片段.

要就Obestatin与Ghrelin结构与分布、受体的分子结构、生理功能及二者的关系作一综述.

1 Obestatin与Ghrelin的结构与分布

1.1 Obestatin的结构与分布 研究证实Obestatin产生于胃部, 位于胃生长素前体原的76-98多肽段, 由23个氨基酸残基所组成^[1]. 这个氨基酸区域在种属间具有高度保守性, 表明他在不同种属间有相关的生物功能. 从大鼠胃组织和血液中纯化出这种分泌肽, 与所预测的肽段大小和氨基酸序列相同. 与Ghrelin类似, 其翻译形成的前体原在剪切后, 他的C末端需经过酰胺化修饰后才能形成有活性的功能肽. 该激素可与孤儿G蛋白受体GPR39结合.

1.2 Ghrelin的结构与分布 Ghrelin的分子质量为3370.9, 颗粒直径为90-150 nm, 是含有28个氨基酸残基的多肽. Proghrelin N端的前23个氨基酸残基具有分泌信号肽特征, 从第24位的甘氨酸到第51位的28个氨基酸残基为Ghrelin序列, 基因序列见图1. Ghrelin的C末端的P-R结构(脯氨酸-精氨酸)为其识别部位. 对Ghrelin的组成和结构分析表明, Ghrelin主要有两种分子存在形式, 即第3位丝氨酸残基N端辛酰基化和去N端辛酰基化. 第3位丝氨酸残基N端辛酰基化, 则具有生物活性, 去N端辛酰基化后, 则失去生物活性^[2]. Ghrelin主要由胃底分泌, 下丘脑、肠道、肾脏和胎盘也有少量分泌^[3].

2 Obestatin与Ghrelin受体的分子结构与基因表达

Obestatin受体GPR39与Ghrelin受体GHS-R (Growth hormone secretagogue receptor, GHS-R) 来源于同一家族. GPR39由452个氨基酸残基构成, 具有7个跨膜域. GPR39是与G蛋白耦联的受体, 定位于人2号染色体, 在空肠、回肠、十二指肠、胃、肝脏及垂体中高度表达^[4], 其表达部

位是调节能量平衡的主要器官^[5].

Ghrelin受体GHS-R有Ia和Ib两种亚型, GHS的促分泌效应主要是通过Ia型GHS-R结合而发挥的. GHS-R Ia含366个氨基酸残基, 有7个跨膜域; 而GHS-R Ib仅含289个氨基酸残基, 有5个跨膜域. Ghrelin的功能性受体GHS-R Ia mRNA主要在垂体、下丘脑弓状核、腹内侧核、漏斗核、睾丸组织、Leydig细胞和Sertoli细胞内表达, 而在甲状腺、胰腺、脾脏、脂肪组织及肾上腺表达水平很低; 而非功能性GHS-R Ib mRNA在组织器官中广泛表达. GHS-R在一些正常组织中常缺乏表达, 但在肿瘤组织中却呈高浓度表达. 比如在乳腺癌组织中有GHS-R表达, 但在正常乳腺组织或乳腺纤维腺瘤中不表达^[6].

3 Obestatin与Ghrelin的生理功能

3.1 Obestatin的生理功能 为了研究Obestatin所发挥的生理作用, Zhang及其研究小组在实验室人工合成了Obestatin激素, 并在体质量正常的大鼠身上进行了实验, 每天三次采用酰胺化的Obestatin腹腔内(1 μmol/kg体质量)或脑室内(8 nmol/kg体质量)注射成年小鼠. 结果发现, 实验鼠胃部的排空过程变慢, 食物在肠道中的运动速度减缓, 鼠的进食量平均下降了一半, 体质量在8 d内减轻了20%^[1]. 可能是因为Obestatin抑制了Ghrelin的活性, 使胃的排空和空肠的收缩受到抑制, 促使传入迷走神经传入信号, 使中枢产生过饱应答. 而未被酰胺化的Obestatin则没有这种效果. Zhang *et al*的实验研究同时也证明, 注射Obestatin的公鼠血浆内瘦素的水平没有受影响, 说明Obestatin缺乏分解脂肪的功能, 也不能确定Obestatin是否有降血脂的功能. Obestatin的作用可能主要是调节胃肠的过饱和, 通过刺激机体, 产生反胃或内脏的不适感来抑制食欲. 近来在判断减肥药的药效时, 研究者强调, 应排除

创新盘点
本文将最新的Obestatin与Ghrelin研究结果进行比较综述, 对了解Obestatin或Ghrelin的研究有指导作用.

应用要点
Obestatin和Ghrelin的生理功能及其关系的深入研究有助于大家了解机体对生长轴的调节作用。Obestatin和Ghrelin在某些疾病中的变化对于应用其进行诊断和治疗疾病具有临床价值。

那些对实验对象的食欲产生非特异性抑制的因素^[7]。尽管啮齿类动物和人的Obestatin的序列同源性达到87%, GPR39的达到93%^[8-9], 但是从啮齿类动物实验得到的结果也不总与人的结果吻合。Obestatin与人的肥胖症及其他疾病之间的联系尚需进一步探讨。

随着Obestatin的深入研究, 目前大多数研究者的结论认为, 采用脑室、腹腔和静脉注射不同浓度Obestatin并不影响鼠的摄食或体质量变化^[10-15]。Obestatin (300 mg/kg)与胆囊收缩素(CCK)(1 mg/kg)一起腹腔注射大鼠不会改变CCK引起的摄食量降低, 也不会影响摄食、迷走神经活力和CCK引起的饱感信号^[10]。基于Obestatin对摄食和体质量影响的不同实验结果, Lagaud *et al*^[16]进行了更深入的探讨。他们采用宽量程的Obestatin对小鼠和大鼠进行了研究, 实验结果显示Obestatin抑制摄食与剂量有关, 低剂量和高剂量对摄食量都无影响, 这也是其他研究者未发现Obestatin该作用效果的原因之一。

其他研究者证实, Obestatin影响大鼠记忆和学习, 有抗焦虑的作用, 但和Ghrelin一样可以提高记忆力^[17]。Obestatin可抑制渴感^[18], 影响睡眠^[19], 促进人视网膜上皮细胞^[20]和猪卵巢颗粒细胞增殖, 并且有剂量依赖性^[21]。

根据本课题组最近研究发现, Obestatin对长白仔猪原代培养肝细胞也有一定的促增殖作用, 10 nmol Obestatin 能抑制IGF-I的分泌, 对Apo-B也有一定下调作用。

3.2 Ghrelin的生理功能

3.2.1 对食欲和脂肪合成的影响: Ghrelin是一种促进食欲和脂肪合成的强效激素^[22-24]。研究表明, 禁食48 h后大鼠胃中Ghrelin mRNA的表达增加, 血清Ghrelin浓度升高, 当给予食物后, Ghrelin浓度又恢复原来水平, 说明禁食可刺激Ghrelin合成, 促进胃内分泌细胞分泌Ghrelin^[25]。在白天或晚上给活动大鼠脑室注射Ghrelin, 均发现Ghrelin具有强烈的促食欲的生理效应。此外, 给GH基因缺陷型大鼠脑室注射Ghrelin, 同样促进大鼠采食, Ghrelin的促食欲效应不依赖GH的信号转导途径^[22]。Tschop *et al*^[23]报道, 皮下或脑室注射Ghrelin增加小鼠与大鼠的采食、减少体脂利用并增加体质量。对小鼠脑室和外周注射Ghrelin后发现, Ghrelin可强烈刺激小鼠食欲, 减少能量消耗, 增加体质量, 甚至改善由于生长激素缺乏引起的食欲减退症状^[26]。给健康

人静脉注射Ghrelin, 可增加能量摄入量, 促进食欲^[27]。大量实验表明, 高Ghrelin水平可以增加体质量, 引起机体肥胖^[23,27-29]。禽类的研究结果却不同, Furuse *et al*^[30]给雏鸡脑室注射大鼠Ghrelin或GH释放因子, 结果发现2 h内两者都强烈地抑制雏鸡的采食。对于预先禁食3 h的雏鸡, 脑室注射Ghrelin仍可引起剂量依赖性的采食下降。

3.2.2 Ghrelin对胃肠道功能的影响: 研究证实Ghrelin的结构与胃动素相类似, Ghrelin在外周或中枢参与下对胃肠生理活动进行调节。他可通过下丘脑刺激食欲, 增加胃酸分泌^[31], 提高胃肠蠕动^[32]。

给大鼠静脉注射Ghrelin引起剂量依赖性的胃酸分泌增多, 胃运动频率增快、幅度增大^[33-34]。但该效应可被迷走神经切断或阿托品处理所阻断, 但不被组胺受体阻断剂所阻断^[34], 说明Ghrelin通过迷走神经调节机体胃功能^[34]。给麻醉大鼠脑室注射Ghrelin, 同样刺激胃酸分泌, 该效应也可被迷走神经切断或阿托品预处理所阻断^[35]。然而, 以GHS和Ghrelin中枢处理清醒大鼠, 均能抑制其胃酸的分泌^[36]。这两种完全相反的结果可能与大鼠是否麻醉有关。但这些结果都表明Ghrelin通过迷走神经对胃酸的分泌发挥调节作用。外周Ghrelin被认为可以通过血脑屏障进入脑部发挥作用, 然而, 给完全切断迷走神经的小鼠腹腔注射Ghrelin, 并未引起采食增加^[37]。通过手术或化学方法阻滞迷走神经传入纤维, 可消除静脉注射Ghrelin引起的采食与激活NPY神经元和GHRH神经元的效应^[38]。

3.2.3 对心血管功能的影响: Ghrelin对心血管系统发挥多种生理功能, 包括对心力衰竭的保护。给健康人静脉注射Ghrelin, 显著降低平均动脉血压, 增加心输出量, 并不影响心率^[39], 且对患慢性心衰患者也有同样的生理效应^[40]。Ghrelin对心血管系统的调节作用与他促生长激素分泌作用无关。Ghrelin可影响血液动力学指标, 给人静脉内注射Ghrelin, 血清生长激素浓度明显增加, 平均动脉压明显下降, 心脏指数增加16%, 每搏输出量增加22%^[41]。对结扎盲肠而引起休克的大鼠进行研究也发现, 与未经处理的休克组大鼠相比, 腿静脉注射10 nmol/kg剂量的Ghrelin可明显改善休克大鼠的左心室功能, 增加心输出量与平均动脉压、心脏指数和每搏输出量^[42]。

3.2.4 促进GH的分泌: 动物实验和临床研究都表明, Ghrelin有可重复刺激GH释放的作用, 且大剂

量给药无明显副作用, 并与其他激素的分泌有密切关系. Nagaya *et al*^[41]给人静脉注射Ghrelin发现循环血中GH水平明显升高, Ghrelin具有强烈的刺激GH释放的作用, 并且呈剂量依赖性反应^[31]. 对自由活动大鼠的研究发现, 不同剂量Ghrelin(3、12、60 nmol/kg)可引起剂量依赖性GH释放增加. 虽然3 nmol/kg Ghrelin与3 nmol/kg GHRH对GH分泌作用相似, 但12 nmol/kg Ghrelin远比同剂量的GHRH促GH分泌作用强^[35].

迷走神经参与垂体释放GH的调节. 迷走神经传入纤维将胃肠道和后脑的孤束核相连^[42], 大约90%的膈下迷走神经纤维是传入神经纤维, 一些迷走传入纤维末梢存在于胃肠道黏膜和黏膜下层中, 直接感受胃肠腔中的各种刺激. 通过化学或手术的方法选择性地阻滞胃迷走神经, 将减弱Ghrelin外周处理引起的GH释放效应, 表明Ghrelin还可通过迷走神经生理性调节GH的释放^[20].

3.2.5 对免疫系统的影响: 已发现B细胞和T细胞能够识别乳腺癌、肺癌、肾癌等肿瘤细胞表达的肿瘤抗原, 进而介导免疫反应. 在健康人血液B细胞、T细胞和中性粒细胞中发现有Ghrelin表达^[43]. Dixit *et al*^[44]研究人员发现, 人类T细胞分泌的Ghrelin通过抑制T细胞分泌细胞因子, 从而调节由此引起的厌食症, 并进一步提出Ghrelin可能通过同T细胞膜上的GHS-R结合来调节机体免疫反应. 睾丸癌组织中淋巴细胞所表达的Ghrelin有可能同肿瘤所致的厌食症和机体肿瘤免疫有关. 在高浓度下, Ghrelin能抑制乳腺癌、肺癌、甲状腺癌细胞株的增殖^[45].

3.2.6 对甲状腺功能的影响: Caminos *et al*^[46]的研究观察到甲亢患者血清Ghrelin水平明显降低, 而甲减患者血清Ghrelin水平明显升高. 有资料报道, 肥胖个体血Ghrelin水平低下^[47], 厌食和节食等负能量平衡状态时升高^[48]. 但甲亢的消瘦和负能量平衡却导致血清Ghrelin水平降低, 甲减时能量消耗和摄食减少却显示血清Ghrelin水平升高. 这些研究结果提示, 甲状腺功能异常时血清Ghrelin水平的变化并非是体质量、体脂量和能量代谢变化所致. 甲状腺激素可能对中枢或外周Ghrelin的产生和分泌具有直接的调控作用. 又因甲状腺功能减退伴血清Ghrelin水平的显著增高, 而摄食明显减少, 提示Ghrelin的促摄食作用需甲状腺激素的协同参与, 或甲状腺激素水平低下机体产生Ghrelin抵抗, 导致血清

Ghrelin水平代偿性升高. 血清Ghrelin和胖素-A (orexin-A)不是甲亢和甲减患者摄食改变的直接调节因子. 血清Ghrelin水平随甲状腺功能改变而变化的机制尚需进一步研究^[45].

3.2.7 Ghrelin对能量代谢的影响: Ghrelin通过促进GH的释放, 增加胰岛素抵抗, 刺激糖原生成, 从而调节机体血糖水平. 综合近年研究结论, Ghrelin对胰岛素分泌的影响效应并不一致. 有报道指出, 给人静脉注射Ghrelin, 即使在血糖浓度升高的情况下仍能抑制胰岛素的分泌^[49], 在其他实验动物上也有相似效应. 但也有研究发现, Ghrelin可以促进胰岛素的分泌. Ghrelin在大鼠胰岛 α 细胞中和胰高血糖素共存, 同时发现Ghrelin能增加胰岛 α 细胞内 Ca^{2+} 浓度, 刺激胰岛素分泌^[50]. 最近有报道表明, 缺乏重要的核转录因子Nkx2.2或Pax4会导致小鼠胰岛 β 细胞发育分化受阻, 并被Ghrelin细胞替代. 正常小鼠胰腺也存在一小类细胞能产生Ghrelin, 称为胰岛 ϵ 细胞, 揭示胰岛 β 细胞和 ϵ 细胞具有共同的前体细胞. 该前体细胞在某些转录因子的调节下发生不同的分化, 从而维持胰岛内胰岛素和Ghrelin的平衡, 进而调节机体的葡萄糖代谢^[51].

下丘脑是控制机体食欲与能量稳态的调节中枢, 与胃肠道生理功能的调控密切相关, 并在参与机体采食、GH释放和能量稳态方面发挥重要作用^[52]. 在啮齿类动物中, 机体主要通过Ghrelin和Leptin分别传递外周饥饿和饱食信号, 在下丘脑能量平衡中枢进行整合, 然后通过各种途径对食欲进行调节, 从而维持机体的能量稳态^[29]. 研究发现, Ghrelin能减弱Leptin对NPY/AgRP神经元的抑制效应, 促进促食欲神经肽NPY和AgRP的表达和产生, 从而促进采食, 增加体质量^[53-54]. 因而, 通过激活NPY/Y1受体信号转导通路, Ghrelin作为Leptin的天然拮抗剂发挥调节食欲与能量稳态的生理作用^[22,24,28,55].

3.2.8 其他: Ghrelin的mRNA可以在人的所有组织中找到^[56], Ghrelin还具有调节心脏、肾、胰腺、脂肪组织和性腺功能的作用^[57]. 研究发现, Ghrelin能抑制由HCG和cAMP介导的大白鼠体外细胞睾酮分泌或直接影响LH的促睾酮分泌功能^[58]. Furuta *et al*^[59]报道, 卵巢切除大鼠脑室内注射Ghrelin可明显抑制黄体生成素(LH)的分泌. Ghrelin及其受体参与人和大白鼠睾丸组织促性腺激素轴系统的调控, 因此Ghrelin可能还是维持体内激素平衡的一个重要因子. 另据报道,

名词解释
脑肠肽(brain-gut peptide, BGP): 是一类具有多种生理功能的多肽, 在生长轴的调节中发挥至关重要的作用.

同行评价
本文综述较全面,能体现较新的研究成果,对人体肥胖和食欲、体质量调节的研究有一定的指导价值。

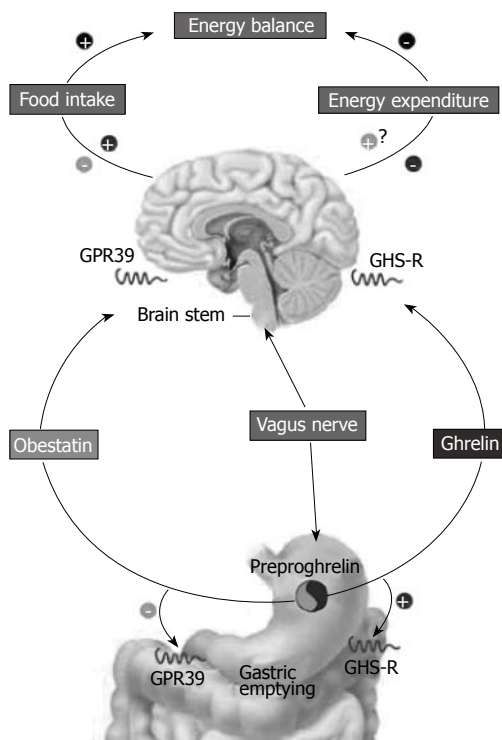


图2 Obestatin与Ghrelin之间的关系^[66]。

胰岛细胞瘤、前列腺癌、甲状腺癌和胃肠道类癌细胞中Ghrelin和GHSR水平升高,提示Ghrelin的内分泌机制在肿瘤发病中可能起作用。Volante *et al*^[60]报道,在甲状腺癌细胞系中Ghrelin抑制细胞生长,其抑制作用呈量效相关。Shimizu *et al*^[61]发现,肺癌患者血浆中Ghrelin水平高于对照组,而化疗后患者的血浆中Ghrelin水平明显升高。

此外, Ghrelin还具有改善睡眠与记忆^[62]、调节内分泌^[63-64]等生理功能。

4 Obestatin与Ghrelin的阴阳关系

Zhang *et al*^[1]研究报道, Obestatin是一种与Ghrelin有诸多相似之处的脑肠激素,由胃部产生,是由激素前导物质Proghrelin的蛋白质衍生而来。Proghrelin翻译后还存在不同剪切方式,经过翻译后的不同片段剪切和不同类型的修饰产生不同的物质。Ghrelin是该前体蛋白经乙酰化修饰后形成, Obestatin则经该前体C末端酰胺化修饰产生。Ghrelin能够刺激机体增加对食物的摄入,使体质量增加^[27];而Obestatin可以抑制Ghrelin对食欲增加和空肠收缩的刺激作用,说明Obestatin是Ghrelin的拮抗肽,而将其称为“反Ghrelin”激素^[1]。Lagaud *et al*^[16]的研究证实,腹腔注射Ghrelin 100 nmol/kg大鼠和小鼠皆显著增加摄

食量, Obestatin(100 nmol/kg)则抑制摄食。Ghrelin(100 nmol/kg)和Obestatin(100 nmol/kg)一同注射时互相抵消彼此的作用,与Zhang *et al*的结论一致。Obestatin和Ghrelin两种调节肽在同物种中睡眠的影响中也发挥了截然相反的作用^[65]。这些结果都表明, Ghrelin和这个同源的肽段Obestatin之间存在拮抗或阴阳关系。但胃肠道里众多的小分子肽激素是如何进入血液系统,从而激活中枢神经系统行使某些既定功能的。图2采用了“肠-脑反射轴”的概念回答了这个问题,科学分析了Obestatin与Ghrelin之间关系。该模型是一个由激素和神经信号通路组成的复杂网络,神经信号系统的作用是维持体内平衡和调节机体行为过程。

5 结论

Obestatin和Ghrelin的生理功能及其关系的深入研究有助于我们了解机体对生长轴的调节作用。Obestatin和Ghrelin在某些疾病中的变化对于应用其进行诊断和治疗疾病具有重要意义。专家分析对能量稳态和体质量控制微妙平衡中Ghrelin和Obestatin作用,也许是成功治疗肥胖症的关键,但Obestatin和Ghrelin的发现仍给研究者留下许多尚未弄清的问题。Obestatin和Ghrelin作为在人体内新发现的两种脑肠肽,二者的拮抗关系对体质量调节的研究有重要价值,但其病理生理意义目前尚不完全清楚。因此,关于这两个基因的研究仍将继续和深入。

6 参考文献

- 1 Zhang JV, Ren PG, Avsian-Kretchmer O, Luo CW, Rauch R, Klein C, Hsueh AJ. Obestatin, a peptide encoded by the ghrelin gene, opposes ghrelin's effects on food intake. *Science* 2005; 310: 996-999
- 2 Hattori N, Saito T, Yagyu T, Jiang BH, Kitagawa K, Inagaki C. GH, GH receptor, GH secretagogue receptor, and ghrelin expression in human T cells, B cells, and neutrophils. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4284-4291
- 3 Gualillo O, Caminos J, Blanco M, Garcia-Caballero T, Kojima M, Kangawa K, Dieguez C, Casanueva F. Ghrelin, a novel placental-derived hormone. *Endocrinology* 2001; 142: 788-794
- 4 Guan XM, Yu H, Palyha OC, McKee KK, Feighner SD, Sirinathsinghji DJ, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 48: 23-29
- 5 Bagnol D. G protein-coupled receptors in hypothalamic circuits involved in metabolic diseases. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2004; 7: 665-682
- 6 Cassoni P, Papotti M, Ghe C, Catapano F, Sapino

- A, Graziani A, Deghenghi R, Reissmann T, Ghigo E, Muccioli G. Identification, characterization, and biological activity of specific receptors for natural (ghrelin) and synthetic growth hormone secretagogues and analogs in human breast carcinomas and cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 1738-1745
- 7 Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD, Feighner SD, Cheng K, Hickey GJ, Wyvratt MJ Jr, Fisher MH, Nargund RP, Patchett AA. Peptidomimetic regulation of growth hormone secretion. *Endocr Rev* 1997; 18: 621-645
- 8 Peeters TL. Ghrelin: a new player in the control of gastrointestinal functions. *Gut* 2005; 54: 1638-1649
- 9 McKee KK, Palyha OC, Feighner SD, Hreniuk DL, Tan CP, Phillips MS, Smith RG, Van der Ploeg LH, Howard AD. Molecular analysis of rat pituitary and hypothalamic growth hormone secretagogue receptors. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 415-423
- 10 Gourcerol G, Million M, Adelson DW, Wang Y, Wang L, Rivier J, St-Pierre DH, Tache Y. Lack of interaction between peripheral injection of CCK and obestatin in the regulation of gastric satiety signaling in rodents. *Peptides* 2006; 27: 2811-2819
- 11 Holst B, Egerod KL, Schild E, Vickers SP, Cheetham S, Gerlach LO, Storjohann L, Stidsen CE, Jones R, Beck-Sickingler AG, Schwartz TW. GPR39 signaling is stimulated by zinc ions but not by obestatin. *Endocrinology* 2007; 148: 13-20
- 12 Nogueiras R, Pfluger P, Tovar S, Arnold M, Mitchell S, Morris A, Perez-Tilve D, Vazquez MJ, Wiedmer P, Castaneda TR, DiMarchi R, Tschop M, Schurmann A, Joost HG, Williams LM, Langhans W, Dieguez C. Effects of obestatin on energy balance and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 2007; 148: 21-26
- 13 Tremblay F, Perreault M, Klamann LD, Tobin JF, Smith E, Gimeno RE. Normal food intake and body weight in mice lacking the G protein-coupled receptor GPR39. *Endocrinology* 2007; 148: 501-506
- 14 Yamamoto D, Ikeshita N, Daito R, Herningtyas EH, Toda K, Takahashi K, Iida K, Takahashi Y, Kaji H, Chihara K, Okimura Y. Neither intravenous nor intracerebroventricular administration of obestatin affects the secretion of GH, PRL, TSH and ACTH in rats. *Regul Pept* 2007; 138: 141-144
- 15 Zizzari P, Longchamps R, Epelbaum J, Bluet-Pajot MT. Obestatin partially affects ghrelin stimulation of food intake and growth hormone secretion in rodents. *Endocrinology* 2007; 148: 1648-1653
- 16 Lagaud GJ, Young A, Acena A, Morton MF, Barrett TD, Shankley NP. Obestatin reduces food intake and suppresses body weight gain in rodents. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 264-269
- 17 Carlini VP, Schioth HB, Debarioglio SR. Obestatin improves memory performance and causes anxiolytic effects in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 352: 907-912
- 18 Samson WK, White MM, Price C, Ferguson AV. Obestatin acts in brain to inhibit thirst. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: R637-R643
- 19 Szentirmai E, Krueger JM. Obestatin alters sleep in rats. *Neurosci Lett* 2006; 404: 222-226
- 20 Samson JP, Campos JF, Caminos JE, Dieguez C, Casanueva FF. Obestatin-mediated proliferation of human retinal pigment epithelial cells: regulatory mechanisms. *J Cell Physiol* 2007; 211: 1-9
- 21 Meszarosova M, Sirotkin AV, Grossmann R, Darlak K, Valenzuela F. The effect of obestatin on porcine ovarian granulosa cells. *Anim Reprod Sci* 2007
- 22 Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K, Matsukura S. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194-198
- 23 Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407: 908-913
- 24 Wren AM, Small CJ, Ward HL, Murphy KG, Dakin CL, Taheri S, Kennedy AR, Roberts GH, Morgan DG, Ghatei MA, Bloom SR. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000; 141: 4325-4328
- 25 Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Upregulation of Ghrelin expression in the stomach upon fasting, insulin-induced hypoglycemia, and leptin administration. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 1220-1225
- 26 Takaya K, Ariyasu H, Kanamoto N, Iwakura H, Yoshimoto A, Harada M, Mori K, Komatsu Y, Usui T, Shimatsu A, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4908-4911
- 27 Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG, Dhillo WS, Ghatei MA, Bloom SR. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5992
- 28 Shintani M, Ogawa Y, Ebihara K, Aizawa-Abe M, Miyanaga F, Takaya K, Hayashi T, Inoue G, Hosoda K, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway. *Diabetes* 2001; 50: 227-232
- 29 Kojima M, Kangawa K. Ghrelin, an orexigenic signaling molecule from the gastrointestinal tract. *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 665-668
- 30 Furuse M, Tachibana T, Ohgushi A, Ando R, Yoshimatsu T, Denbow DM. Intracerebroventricular injection of ghrelin and growth hormone releasing factor inhibits food intake in neonatal chicks. *Neurosci Lett* 2001; 301: 123-126
- 31 Masuda Y, Tanaka T, Inomata N, Ohnuma N, Tanaka S, Itoh Z, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K. Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 905-908
- 32 Wren AM, Small CJ, Fribbens CV, Neary NM, Ward HL, Seal LJ, Ghatei MA, Bloom SR. The hypothalamic mechanisms of the hypophysiologic action of ghrelin. *Neuroendocrinology* 2002; 76: 316-324
- 33 Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 2002; 143: 717-725
- 34 Date Y, Nakazato M, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 904-907
- 35 Sibilia V, Pagani F, Guidobono F, Locatelli V,

- Torsello A, Deghenghi R, Netti C. Evidence for a central inhibitory role of growth hormone secretagogues and ghrelin on gastric acid secretion in conscious rats. *Neuroendocrinology* 2002; 75: 92-97
- 36 Asakawa A, Inui A, Kaga T, Yuzuriha H, Nagata T, Ueno N, Makino S, Fujimiya M, Nijima A, Fujino MA, Kasuga M. Ghrelin is an appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001; 120: 337-345
 - 37 Date Y, Murakami N, Toshinai K, Matsukura S, Nijima A, Matsuo H, Kangawa K, Nakazato M. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology* 2002; 123: 1120-1128
 - 38 Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Date Y, Nakazato M, Okumura H, Hosoda H, Shimizu W, Yamagishi M, Oya H, Koh H, Yutani C, Kangawa K. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation* 2001; 104: 2034-2038
 - 39 Nagaya N, Miyatake K, Uematsu M, Oya H, Shimizu W, Hosoda H, Kojima M, Nakanishi N, Mori H, Kangawa K. Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5854-5859
 - 40 Nagaya N, Kojima M, Uematsu M, Yamagishi M, Hosoda H, Oya H, Hayashi Y, Kangawa K. Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 280: R1483-R1487
 - 41 Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, Ikeda Y, Yoshihara F, Shimizu W, Hosoda H, Hirota Y, Ishida H, Mori H, Kangawa K. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation* 2001; 104: 1430-1435
 - 42 Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberatore PA, Rosenblum CL, Hamelin M, Hreniuk DL, Palyha OC, Anderson J, Paress PS, Diaz C, Chou M, Liu KK, McKee KK, Pong SS, Chaung LY, Elbrecht A, Dashkevich M, Heavens R, Rigby M, Sirinathsinghji DJ, Dean DC, Melillo DG, Patchett AA, Nargund R, Griffin PR, DeMartino JA, Gupta SK, Schaeffer JM, Smith RG, Van der Ploeg LH. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science* 1996; 273: 974-977
 - 43 Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, Collins GD, Sakthivel SK, Palaniappan R, Lillard JW Jr, Taub DD. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells. *J Clin Invest* 2004; 114: 57-66
 - 44 Murata M, Okimura Y, Iida K, Matsumoto M, Sowa H, Kaji H, Kojima M, Kangawa K, Chihara K. Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 5667-5674
 - 45 Soriano-Guillen L, Barrios V, Campos-Barros A, Argente J. Ghrelin levels in obesity and anorexia nervosa: effect of weight reduction or recuperation. *J Pediatr* 2004; 144: 36-42
 - 46 Caminos JE, Seoane LM, Tovar SA, Casanueva FF, Dieguez C. Influence of thyroid status and growth hormone deficiency on ghrelin. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 159-163
 - 47 Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP, Purnell JQ. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2002; 346: 1623-1630
 - 48 Broglio F, Arvat E, Benso A, Gottero C, Muccioli G, Papotti M, van der Lely AJ, Deghenghi R, Ghigo E. Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5083-5086
 - 49 Date Y, Nakazato M, Hashiguchi S, Dezaki K, Mondal MS, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Arima T, Matsuo H, Yada T, Matsukura S. Ghrelin is present in pancreatic alpha-cells of humans and rats and stimulates insulin secretion. *Diabetes* 2002; 51: 124-129
 - 50 Prado CL, Pugh-Bernard AE, Elghazi L, Sosa-Pineda B, Sussel L. Ghrelin cells replace insulin-producing beta cells in two mouse models of pancreas development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 2924-2929
 - 51 Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB, Korbonits M. The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2988
 - 52 Shuto Y, Shibasaki T, Otagiri A, Kuriyama H, Ohata H, Tamura H, Kamegai J, Sugihara H, Oikawa S, Wakabayashi I. Hypothalamic growth hormone secretagogue receptor regulates growth hormone secretion, feeding, and adiposity. *J Clin Invest* 2002; 109: 1429-1436
 - 53 Tschöp M, Statnick MA, Suter TM, Heiman ML. GH-releasing peptide-2 increases fat mass in mice lacking NPY: indication for a crucial mediating role of hypothalamic agouti-related protein. *Endocrinology* 2002; 143: 558-568
 - 54 Ishii S, Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Sugihara H, Oikawa S. Role of ghrelin in streptozotocin-induced diabetic hyperphagia. *Endocrinology* 2002; 143: 4934-4937
 - 55 Kamegai J, Tamura H, Shimizu T, Ishii S, Sugihara H, Wakabayashi I. Central effect of ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, on hypothalamic peptide gene expression. *Endocrinology* 2000; 141: 4797-4800
 - 56 van der Lely AJ, Tschöp M, Heiman ML, Ghigo E. Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev* 2004; 25: 426-457
 - 57 Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, Gaytan F, Zhang FP, Caminos JE, Pinilla L, Casanueva FF, Dieguez C, Aguilar E. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 2002; 143: 717-725
 - 58 Furuta M, Funabashi T, Kimura F. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 780-785
 - 59 Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasetto C, Epelbaum J, Bluett-Pajot MT. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats. *Endocrinology* 2002; 143: 1353-1361
 - 60 Volante M, Allia E, Fulcheri E, Cassoni P, Ghigo E, Muccioli G, Papotti M. Ghrelin in fetal thyroid and follicular tumors and cell lines: expression and effects on tumor growth. *Am J Pathol* 2003; 162:

- 645-654
- 61 Shimizu Y, Nagaya N, Isobe T, Imazu M, Okumura H, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Kohno N. Increased plasma ghrelin level in lung cancer cachexia. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 774-778
- 62 Carlini VP, Varas MM, Cragolini AB, Schioth HB, Scimonelli TN, de Barioglio SR. Differential role of the hippocampus, amygdala, and dorsal raphe nucleus in regulating feeding, memory, and anxiety-like behavioral responses to ghrelin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 313: 635-641
- 63 Ishizaki S, Murase T, Sugimura Y, Kakiya S, Yokoi H, Tachikawa K, Arima H, Miura Y, Oiso Y. Role of ghrelin in the regulation of vasopressin release in conscious rats. *Endocrinology* 2002; 143: 1589-1593
- 64 Barreiro ML, Pinilla L, Aguilar E, Tena-Sempere M. Expression and homologous regulation of GH secretagogue receptor mRNA in rat adrenal gland. *Eur J Endocrinol* 2002; 147: 677-688
- 65 Szentirmai E, Krueger JM. Obestatin alters sleep in rats. *Neurosci Lett* 2006; 404: 222-226
- 66 Nogueiras R, Tschop M. Biomedicine. Separation of conjoined hormones yields appetite rivals. *Science* 2005; 310: 985-986

编辑 程剑侠 电编 李军亮

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

• 消息 •

世界华人消化杂志个性化服务订购活动

本刊讯 为了满足读者的多样化需求, 解决一些作者因为资金不足而导致订阅印刷版的困难, 自2007年开始, 世界华人消化杂志(WCJD), 推出以下个性化服务策略来为广大读者服务.

1 精彩专家述评专辑印刷版杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail发送精彩专家述评PDF; (2)2007年底将精彩专家述评专辑一本挂号邮寄用户收. 定价: 50元/年.

2 WCJD电子杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒PDF电子杂志(1-36期). 定价: 180元/年.

3 WCJD网络版杂志

WCJD旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒网络版杂志(1-36期). 定价: 160元/年.

4 WCJD印刷版杂志

WCJD印刷版1-36期. 定价: 864元/年.

5 订购信息

邮政编码, 姓名, 地址, 部门, 机构名称, E-mail, 手机号.

6 汇款的方式

邮局汇款: 世界胃肠病学杂志社收, 100023, 北京市2345信箱. 附言注明订购的内容.

银行汇款: 户名: 北京百世登生物医学科技有限公司; 开户银行: 中国工商银行北京商务中心区支行国贸大厦分理处; 账号: 0200041609020180741. 附言注明: 订购的内容和发票的抬头.

总之, WCJD将尽自己的最大努力, 满足广大读者的需求, 同时欢迎更多个性化服务的意见和建议E-mail发至: h.n.zhang@wjgnet.com. 谢谢! (世界胃肠病学杂志社 2007-09-30).

一种新的基因灭活工具——甲基化寡核苷酸技术

翟荣林, 王国斌, 蔡开琳

背景资料
DNA甲基化与人类胚胎发育和恶性肿瘤有密切的关系。研究DNA甲基化与肿瘤的关系成为当前分子生物学的热点之一。

翟荣林, 王国斌, 蔡开琳, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022
国家自然科学基金资助课题, No. 30500488
通讯作者: 翟荣林, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科. zhaironglin@yahoo.com.cn
电话: 027-85351661
收稿日期: 2007-08-30 修回日期: 2007-09-28

Application of methylated oligonucleotides: A new strategy for gene inactivation

Rong-Lin Zhai, Guo-Bin Wang, Kai-Lin Cai

Rong-Lin Zhai, Guo-Bin Wang, Kai-Lin Cai, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30500488

Correspondence to: Rong-Lin Zhai, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. zhaironglin@yahoo.com.cn
Received: 2007-08-30 Revised: 2007-09-28

Abstract

The study of gene functions, including activation and inactivation, has become a hotspot in molecular biology since entering the postgenomic phase. To achieve gene inactivation, there are four methods: gene knock out, antisense oligonucleotides, RNA interference and methylated oligonucleotides. Here, we emphasize the technology of methylated oligonucleotides via backgrounds, mechanism, method, current status and perspective.

Key Words: Methylation; Methylated oligonucleotides; Gene inactivation

Zhai RL, Wang GB, Cai KL. Application of methylated oligonucleotides: A new strategy for gene inactivation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3332-3337

摘要

后基因组时代的分子生物学研究重点转向了基因功能的研究。基因功能研究中涉及到对过度表达的基因进行抑制或者灭活。本文简要回

顾和评价了基因敲除、反义寡核苷酸技术和RNA干扰技术等常用的基因灭活工具,着重对有可能成为第四代基因灭活工具的甲基化寡核苷酸技术,从产生背景、作用机制、技术路线、应用现状及前景等方面进行了详细的论述,以期引起注意和重视。

关键词: 甲基化; 甲基化寡核苷酸; 基因灭活

翟荣林, 王国斌, 蔡开琳. 一种新的基因灭活工具——甲基化寡核苷酸技术. *世界华人消化杂志* 2007; 15(31): 3332-3337
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3332.asp>

0 引言

肿瘤和遗传性疾病往往涉及多个基因功能的改变。进入后基因组时代,分子生物学研究的重点转向了基因的功能以及与相关疾病的关系上。基因功能的研究包括两个方面:表达激活和表达灭活。尤其是对肿瘤原癌基因和某些胚胎发育过程中的关键基因来说,通过抑制或灭活他们的表达,可以了解这些基因在肿瘤和遗传性疾病发病过程中所扮演的角色。灭活基因的方法有很多,本文简要回顾了基因功能研究中的常见工具,如基因敲除(gene knock out)、反义寡核苷酸技术和RNA干扰技术,着重对新近出现的甲基化寡核苷酸技术,从产生背景、作用机制、技术路线、应用现状和存在的问题等方面进行了详细的阐述。

1 基因灭活手段

基因功能研究中出现最早最成熟的技术就是基因敲除。他是根据同源重组的原理,利用分子生物学技术增强和减弱甚至灭活某特定靶基因表达水平,然后观察实验动物整体功能状态的变化,推测靶基因的功能^[1]。基因敲除技术可在整体动物水平研究基因功能,但是完全基因敲除使小鼠所有细胞基因组上都存在基因的缺失或突变,有些重要的靶基因敲除或导入会严重影响动物胚胎的发育,导致胚胎早期死亡或严重的发育缺陷,使得突变无法传代,不利于在小鼠

各个发育阶段进行该基因功能的分析. 条件基因敲除技术(conditional gene knock out)的建立为此难题找到了解决的办法. 1994年, Gu *et al*^[2]应用Cre/loxP重组酶系统实现了外源基因的时间特异性表达, 在此基础上条件基因敲除技术得以形成. 条件基因敲除技术是在基因敲除基础上结合Cre/loxP系统而形成的, 他可以在特定时间, 组织, 细胞中将靶基因敲除, 从而可以真实的反映特定组织或细胞中靶基因被敲除或修饰后的结果, 避免在发育早期所有细胞和组织中完全敲除目的基因后可能产生的胚胎早期死亡或严重的发育障碍^[3-5]. 基因敲除的优点是基因灭活效果确切可靠, 缺点是技术复杂, 费时费力.

反义寡核苷酸技术是指采用一类经人工合成或构建的反义表达载体表达的寡核苷酸片段, 长度多为15-30个核苷酸, 导入细胞或者个体体内, 根据碱基互补原理, 通过与靶DNA或者mRNA结合形成双链杂交体激活核酸酶H, 裂解靶mRNA阻断蛋白质的翻译, 或者与DNA结合成三链结构或与单链DNA结合成双链结构以阻止靶基因的复制或转录, 以及与mRNA AP位点结合干扰其剪接、加工和运输, 在mRNA水平上发挥作用, 从而干扰其表达, 阻止其翻译成蛋白质^[6]. 具体的作用机制目前尚未完全清楚. 反义寡核苷酸因为是针对特定的靶mRNA(DNA)的序列设计合成, 因此具有极高的特异性, 并且容易设计和体外大量合成. 另外反义寡核苷酸不含病毒序列, 不会产生免疫反应, 也不会整合入宿主染色体, 这都为其作为药物应用于临床提供了可能. 1998年, 第1个反义药物Vitravene(Fomivirsen)被美国FDA批准通过, 用以治疗由巨细胞病毒(cytomegalovirus)引起的艾滋患者的视网膜炎^[7]. 目前反义寡核苷酸技术在动物体内外的应用已经非常普遍^[8-9]. 今后要注意的是, 如何对反义寡核苷酸进行更加有效的化学修饰以提高其稳定性, 延长其半衰期, 增加其作用时间和如何定点作用于特定部位, 使靶组织最大效率地吸收反义核酸, 提高其作用效果, 减轻毒副作用^[10].

RNA干扰(RNA interference, RNAi)为第3代抑制哺乳动物细胞基因表达的有效方法. 他主要是指由外源或内源性的双链RNA(double strand RNA, dsRNA)导入细胞而引起的与dsRNA同源的mRNA降解, 进而抑制相应的基因表达. dsRNA前体进入细胞后, 由核酸酶III

-Dicer处理为21-23个碱基的小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA). 这些小干扰RNA分子能与解螺旋酶、核酸酶等结合形成RNA诱导的沉默复合物(RNA inducing silencing complex, RISC), 并与靶基因的互补mRNA结合, 将mRNA降解, 在转录后水平抑制靶基因的表达, 因而又称为转录后基因沉默(post-transcriptional gene silencing, PTGS)^[11-12]. RNA干扰出现的时间不长, 从1998年的初次报道开始^[13], 短短几年中, RNAi的研究取得了突飞猛进的发展^[14-15], 并被美国科学界评为2002年度最重要的科技成果之一. 2006年Andrew Fire和Craig Mello也正是凭借在RNA干扰领域所做出的杰出贡献而被授予诺贝尔医学奖^[16]. 目前正在进行的基因组siRNA文库的建立必将为从全基因组水平对高等动物基因功能进行高通量RNAi研究打下坚实的基础^[17]. 相对基因敲除, 反义寡核苷酸技术, RNA干扰技术在操作上相对简单, 基因沉默灭活效果可靠, 有望开发出新药应用于临床^[18], 尤其是在肝炎和艾滋病等顽固性病毒性疾病的治疗中有可喜的应用前景^[19-22]. 缺点是无法局限作用于特定组织和细胞, 这有赖于载体靶向系统研究的进展.

2 甲基化寡核苷酸技术

2.1 产生的背景 表观遗传学(epigenetics)是与遗传学(genetics)相对应的概念. 遗传学是指基于基因序列改变所致基因表达水平变化, 包括基因突变、基因杂合丢失和微卫星不稳定性等; 而表观遗传学则是指基于非基因序列改变所致基因表达水平变化, 包括DNA甲基化、组蛋白脱乙酰化和染色质构象变化等; 表观基因组学(epigenomics)则是在基因组水平上对表观遗传学改变的研究, 以抑癌基因为代表的CpG岛甲基化所致基因转录失活已经成为肿瘤表观基因组学研究的重点内容^[23-25]. 所谓DNA甲基化是指在DNA甲基化转移酶的作用下, 基因组5'端CpG二核苷酸的胞嘧啶第5位碳原子上共价结合一个甲基基团. 由于DNA甲基化与人类发育和肿瘤疾病的密切关系, 特别是CpG岛甲基化所致抑癌基因转录失活, DNA甲基化已经成为表观遗传学和表观基因组学的重要研究内容, 研究DNA甲基化与肿瘤的关系成为当前分子生物学的热点之一. 目前的研究已经表明: 肿瘤细胞和组织中存在异常的DNA甲基化状态, 表现为基因组整体甲基化水平降低, 导致遗传不稳定性增加;

研发前沿
目前甲基化寡核苷酸技术的应用主要集中在体外肿瘤细胞株的研究上, 国内外相关的文献报道不多, 尚未引起研究者的注意和重视.

创新盘点
本文简要回顾了基因敲除等常规基因灭活手段,着重介绍了新近出现的尚未引起重视的甲基化寡核苷酸技术,并指出其不可被替代的独特之处。

组织特异性基因的启动子区域出现从头甲基化从而导致基因被关闭;原癌基因多为低甲基化或不充分甲基化,低甲基化使原癌基因活化,导致重新开放或异常表达,形成突变热点,增加染色体的不稳定性;抑癌基因多为过度甲基化,过度甲基化导致表达失活^[26-27]。这些因素综合起来导致基因表达异常,引起细胞恶变,最终导致肿瘤的发生^[28-30]。

2.2 作用机制 在哺乳动物中,甲基化仅影响DNA链上鸟嘌呤前的胞嘧啶(CpG)。通常细胞中CpG二核苷酸的甲基化分布并不是均一的,大约50%的基因在启动子区域有CpG二核苷酸的富集现象,一般该区域的长度从0.5-2 kb不等。该区域与基因的转录有密切的关系,通常处于非甲基化状态。处于非甲基化状态的启动子,环绕的染色质呈现为开放的构象,允许转录因子和其他的激活物靠近。此外,转录因子的占据也使其他的转录抑制因子和染色质重塑蛋白等难以接近启动子,最终表现为启动基因表达^[31-33]。相反,CpG岛高甲基化的启动子则呈现为关闭的构象,不但使转录因子无法靠近,而且还有助于甲基胞嘧啶结合蛋白、转录辅阻遏蛋白、DNA甲基转移酶等对转录有抑制作用的蛋白结合于启动子区,启动子失去功能,结果基因转录灭活而沉默^[34-35]。很多资料表明,基因启动子异常高甲基化可以导致其转录灭活^[36-39]。Zhu *et al*^[40]通过甲基化寡核苷酸诱导ER β 基因启动子区和外显子区CpG岛特异性甲基化发现,在前列腺癌细胞中,是ER β 基因启动子区(而不是外显子区)CpG岛的高甲基化导致了ER β 基因转录失活。去甲基化试剂作用前列腺癌细胞后,ER β mRNA恢复表达。

甲基化寡核苷酸技术是利用针对靶基因合成的甲基化寡核苷酸片段(methylated oligonucleotides, MON)与基因的其中一条链互补结合形成半甲基化DNA。半甲基化DNA表现为复制叉样结构,为DNA甲基化转移酶1(DNA methyltransferase-1, DNMT1)的优先底物, DNMT1使第1链迅速甲基化。MON与结合点分离,甲基化的第一链与未甲基化的互补链退火形成第2个半甲基化DNA底物,同样表现为复制叉样结构,为DNMT1作用的优先底物。结果两条链均发生甲基化,随后,同样的道理,甲基化扩布到邻近的CpG二核苷酸中,最后整个基因的靶位点(如启动子)发生完全甲基化^[41]。如上所述,基因启动子甲基化可以导致其转录失活,因此通过甲基化

寡核苷酸技术,我们就可以对所要研究的目的基因进行特异的灭活^[42-43]。此外,尚有资料表明,CpG岛甲基化表型(CIMP)能够改变染色体的构象,产生微卫星不稳定性(MSI)现象,引起靶基因突变失活^[44-49]。这种有趣的现象使遗传学和表观遗传学之间建立起了桥梁,为研究两者之间的联系提供了思路^[50]。基因CpG岛的这种甲基化修饰具有可遗传性,能够对发育、生理、环境、病理等不同的信号作出反映,使遗传信息的表达按一定程序发生变化,参与完成细胞的时空调控和适应调控,在胚胎发育障碍等先天性疾病以及恶性肿瘤发病机制中起至关重要的作用。

2.3 实施路线 甲基化寡核苷酸技术的实施路线包括:(1)MON的设计与合成: MON是包含20余个碱基的一小段寡核苷酸片段,与目的基因启动子区对应位置的碱基序列完全相同,不同的是MON片段中的5'端CpG二核苷酸中的胞嘧啶环5位碳原子发生甲基化(m5CpG)。而GenBank数据库中原有的目的基因启动子区的CpG二核苷酸并未发生甲基化修饰(CpG)。MON片段设计时应注意至少包含3个CpG二核苷酸,理论上MON片段中所含的m5CpG越多越好,这样才能达到更好的甲基化诱导效果。为了防止在细胞中被酶降解,寡核苷酸片段还需进行硫代磷酸化等修饰,此外还可以标记荧光来示踪,同时还需要设计非甲基化寡核苷酸片段(unmethylated oligonucleotides, UMON)作为对照。UMON碱基序列与MON完全相同,不过没有进行CpG二核苷酸甲基化修饰。MON的合成与引物合成一样,可由DNA自动合成仪来完成,价格比较低廉。(2)MON的作用: 针对体外细胞的应用,通常采用的是脂质体介导的基因转染,体内实验的资料目前不多。目前把MON导入体内外的基因转染方法主要有两大类:一类为病毒介导法,即利用去掉了致病基因的病毒序列作为载体,将外源靶基因导入靶细胞内,常用的有逆转录病毒、疱疹和腺病毒等改建的病毒载体;另一类为非病毒介导法,包括物理法(显微注射、气溶胶、基因枪和缝线等)、化学法(磷酸钙沉淀法、脂质体法和葡聚糖法等)和生物学法(细胞融合法和受体法等)。(3)效果评价: 提取基因组DNA和总RNA以及蛋白质,采用甲基化特异性PCR(MSP)、亚硫酸氢盐测序(BSP)、RT-PCR、Western blot等手段进行相关的分析。其中, MSP法可以了解是否发生了特异性的甲基化诱导, BSP可以对那些发生了甲基化的CpG进行精确

定位^[51-53]. RT-PCR、Western blot则可以从不同分子水平判断基因灭活的效果及其他相关分析.

2.4 应用现状和前景 特别要指出的是, 我们所说的“甲基化寡核苷酸”和国内外某些同行已经报道的“甲基化寡核苷酸”名称虽一样, 但却有着本质的区别^[54-56]. 这些研究者报道的甲基化寡核苷酸本质上是一种修饰的反义RNA片段, 所说的甲基是指用甲基取代核苷酸间的磷酸酯上的氧原子, 目的是为了保持在细胞内稳定性, 不被核酸酶降解. 而我们所说的甲基化寡核苷酸中的甲基, 是指在寡核苷酸的5'端CpG二核苷酸的胞嘧啶第5位碳原子上共价结合一个甲基基团, 目的是为了特异性地诱导同源靶基因启动子甲基化致转录沉默^[57-59]. 两者的甲基锚着位点和作用原理是不同的.

目前甲基化寡核苷酸技术的应用多集中在肿瘤细胞系^[60-61], 这实际上就是把他作为一种基因沉默的工具应用到过度表达的肿瘤相关基因的研究中, 借此观察这些靶基因的功能. 甲基化寡核苷酸技术在此所起的作用可以用前述的其他基因沉默工具代替. 然而, 甲基化寡核苷酸技术尚具有基因敲除等技术所不能代替的优点. 例如, 针对肿瘤细胞中抑癌基因启动子发生甲基化而失活, 我们就可以将正常的组织细胞或动物模型作为研究对象, 采用甲基化寡核苷酸技术来诱导其发生甲基化而失活, 模拟肿瘤细胞和组织中该基因的甲基化行为, 从而生动地再现肿瘤细胞和组织中抑癌基因甲基化灭活的过程, 达到相关研究的目的. 这主要是基于甲基化寡核苷酸技术的作用机制和肿瘤细胞中的抑癌基因的基因型. 实际上肿瘤相关基因启动子高甲基化导致转录沉默, 甚至发生MSI突变方面的文献数不胜数^[44-49]. 因此, 甲基化寡核苷酸技术的应用大有前景, 而这正是其他基因沉默工具所不能比拟的. 目前甲基化寡核苷酸技术应用于体内实验的资料不多, 毒副作用的研究很少, 和反义寡核苷酸技术以及干扰RNA技术等其他基因治疗手段存在的问题一样. 如何高效、靶向、安全地把这种神奇的甲基化寡核苷酸片段应用到个体体内是目前存在的问题之一, 这有赖于靶向载体研究的进展.

3 结论

人类表观基因组协会于2003/01正式宣布开始投资和实施人类表观基因组计划(Human

Epigenome Project, HEP)^[62]. HEP的提出和实施, 标志着与人类发育和肿瘤疾病密切相关的表现遗传学和表观基因组研究又跨上了一个新的台阶^[63-64]. HEP不仅可进一步完善人类基因组注释, 而且对于进一步了解人类发育机制本质, 探寻与人类发育和肿瘤疾病相关的表现遗传学机制具有重要而深远的意义, HEP最终目标就是要确认这些DNA甲基化位点在人类基因组的分布与频率^[65-66]. 利用甲基化寡核苷酸技术, 我们可以有效地灭活特定的靶基因, 便捷地在细胞和动物体内生动地再现抑癌基因甲基化导致转录失活的过程. 因此, 甲基化寡核苷酸技术的出现不仅为基因功能研究提供了一个有力的工具, 而且为表现遗传学和表观基因组学的研究提供了一个非常良好的平台.

4 参考文献

- 1 Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; 51: 503-512
- 2 Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 1994; 265: 103-106
- 3 Schmidt-Suppran M, Rajewsky K. Vagaries of conditional gene targeting. *Nat Immunol* 2007; 8: 665-668
- 4 Nolden L, Edenhofer F, Haupt S, Koch P, Wunderlich FT, Siemen H, Brustle O. Site-specific recombination in human embryonic stem cells induced by cell-permeant Cre recombinase. *Nat Methods* 2006; 3: 461-467
- 5 Haupt S, Edenhofer F, Peitz M, Leinhaas A, Brustle O. Stage-specific conditional mutagenesis in mouse embryonic stem cell-derived neural cells and postmitotic neurons by direct delivery of biologically active Cre recombinase. *Stem Cells* 2007; 25: 181-188
- 6 Dias N, Stein CA. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 347-355
- 7 Roehr B. Fomivirsen approved for CMV retinitis. *J Int Assoc Physicians AIDS Care* 1998; 4: 14-16
- 8 So A, Rocchi P, Gleave M. Antisense oligonucleotide therapy in the management of bladder cancer. *Curr Opin Urol* 2005; 15: 320-327
- 9 Smith RA, Miller TM, Yamanaka K, Monia BP, Condon TP, Hung G, Lobsiger CS, Ward CM, McAlonis-Downes M, Wei H, Wancewicz EV, Bennett CF, Cleveland DW. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest* 2006; 116: 2290-2296
- 10 Gebiski BL, Errington SJ, Johnsen RD, Fletcher S, Wilton SD. Terminal antisense oligonucleotide modifications can enhance induced exon skipping. *Neuromuscul Disord* 2005; 15: 622-970-973
- 11 Verma NK, Dey CS. RNA-mediated gene silencing: mechanisms and its therapeutic applications. *J Clin Pharm Ther* 2004; 29: 395-404
- 12 Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra

同行评价
本文研究领域新,
论述全面, 文笔流
畅, 值得注意和重
视.

- P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 657-685
- 13 Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811
 - 14 McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002; 418: 38-39
 - 15 Lenz G. The RNA interference revolution. *Braz J Med Biol Res* 2005; 38: 1749-1757
 - 16 Bernards R. The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2006 for the discovery of RNA interference. *Ned Tijdschr Geneesk* 2006; 150: 2849-2853
 - 17 Shah JK, Garner HR, White MA, Shames DS, Minna JD. siR: siRNA Information Resource, a web-based tool for siRNA sequence design and analysis and an open access siRNA database. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 178
 - 18 Mamidipalli S, Palakal M, Li S. OligoMatcher: analysis and selection of specific oligonucleotide sequences for gene silencing by antisense or siRNA. *Appl Bioinformatics* 2006; 5: 121-124
 - 19 Bagasra O. RNAi as an antiviral therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2005; 5: 1463-1474
 - 20 Rossi JJ. RNAi as a treatment for HIV-1 infection. *Biotechniques* 2006; Suppl: 25-29
 - 21 Watanabe T, Umehara T, Kohara M. Therapeutic application of RNA interference for hepatitis C virus. *Adv Drug Deliv Rev* 2007
 - 22 Ma Y, Chan CY, He ML. RNA interference and antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 5169-5179
 - 23 Novik KL, Nimmrich I, Genc B, Maier S, Piepenbrock C, Olek A, Beck S. Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Curr Issues Mol Biol* 2002; 4: 111-128
 - 24 Jones PA, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001; 293: 1068-1070
 - 25 Kiefer JC. Epigenetics in development. *Dev Dyn* 2007; 236: 1144-1156
 - 26 Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 107-116
 - 27 Hatada I. Emerging technologies for genome-wide DNA methylation profiling in cancer. *Crit Rev Oncog* 2006; 12: 205-223
 - 28 Esteller M. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *J Pathol* 2005; 205: 172-180
 - 29 Plass C, Smiraglia DJ. Genome-wide analysis of DNA methylation changes in human malignancies. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 310: 179-198
 - 30 Herman JG. Epigenetic changes in cancer and preneoplasia. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005; 70: 329-333
 - 31 Ballestar E, Esteller M. The impact of chromatin in human cancer: linking DNA methylation to gene silencing. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1103-1109
 - 32 Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-428
 - 33 Nephew KP, Huang TH. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett* 2003; 190: 125-133
 - 34 Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 687-692
 - 35 Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* 2001; 20: 3156-3165
 - 36 Maeda G, Chiba T, Aoba T, Imai K. Epigenetic inactivation of E-cadherin by promoter hypermethylation in oral carcinoma cells. *Odontology* 2007; 95: 24-29
 - 37 Mueller W, Nutt CL, Ehrich M, Riemenschneider MJ, von Deimling A, van den Boom D, Louis DN. Downregulation of RUNX3 and TES by hypermethylation in glioblastoma. *Oncogene* 2007; 26: 583-593
 - 38 Ferres-Marco D, Gutierrez-Garcia I, Vallejo DM, Bolivar J, Gutierrez-Avino FJ, Dominguez M. Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* 2006; 439: 430-436
 - 39 Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, Garcia JM, Munoz A, Esteller M, Gonzalez-Sancho JM. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 2006; 25: 4116-4121
 - 40 Zhu X, Leav I, Leung YK, Wu M, Liu Q, Gao Y, McNeal JE, Ho SM. Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis. *Am J Pathol* 2004; 164: 2003-2012
 - 41 Szyf M, Detich N. Regulation of the DNA methylation machinery and its role in cellular transformation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001; 69: 47-79
 - 42 Ishii T, Fujishiro M, Masuda M, Teramoto S, Matsuse T. A methylated oligonucleotide induced methylation of GSTP1 promoter and suppressed its expression in A549 lung adenocarcinoma cells. *Cancer Lett* 2004; 212: 211-223
 - 43 Yao X, Hu JF, Daniels M, Shiran H, Zhou X, Yan H, Lu H, Zeng Z, Wang Q, Li T, Hoffman AR. A methylated oligonucleotide inhibits IGF2 expression and enhances survival in a model of hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 2003; 111: 265-273
 - 44 Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Ohnishi M, Fuchs CS. 18q loss of heterozygosity in microsatellite stable colorectal cancer is correlated with CpG island methylator phenotype-negative (CIMP-0) and inversely with CIMP-low and CIMP-high. *BMC Cancer* 2007; 7: 72
 - 45 Goel A, Nagasaka T, Arnold CN, Inoue T, Hamilton C, Niedzwiecki D, Compton C, Mayer RJ, Goldberg R, Bertagnolli MM, Boland CR. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* 2007; 132: 127-138
 - 46 Ogino S, Kawasaki T, Ogawa A, Kirkner GJ, Loda M, Fuchs CS. TGFBR2 mutation is correlated with CpG island methylator phenotype in microsatellite instability-high colorectal cancer. *Hum Pathol* 2007; 38: 614-620
 - 47 Kang S, Lee JM, Jeon ES, Lee S, Kim H, Kim HS, Seo SS, Park SY, Sidransky D, Dong SM. RASSF1A hypermethylation and its inverse correlation with

- BRAF and/or KRAS mutations in MSI-associated endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 2006; 119: 1316-1321
- 48 Noda H, Kato Y, Yoshikawa H, Arai M, Togashi K, Nagai H, Konishi F, Miki Y. Microsatellite instability caused by hMLH1 promoter methylation increases with tumor progression in right-sided sporadic colorectal cancer. *Oncology* 2005; 69: 354-362
- 49 Park HW, Kang HC, Kim IJ, Jang SG, Kim K, Yoon HJ, Jeong SY, Park JG. Correlation between hypermethylation of the RASSF2A promoter and K-ras/BRAF mutations in microsatellite-stable colorectal cancers. *Int J Cancer* 2007; 120: 7-12
- 50 Murrell A, Rakyan VK, Beck S. From genome to epigenome. *Hum Mol Genet* 2005; 14: R3-R10
- 51 Beier V, Mund C, Hoheisel JD. Monitoring methylation changes in cancer. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2007; 104: 1-11
- 52 Yan PS, Wei SH, Huang TH. Methylation-specific oligonucleotide microarray. *Methods Mol Biol* 2004; 287: 251-260
- 53 Kim B, Kim H, Song BJ, Cha SH, Lee MO, Park SH. Oligonucleotide DNA chips are useful adjuncts in epigenetic studies of glioblastomas. *Neuropathology* 2006; 26: 409-416
- 54 廖锦民. 甲基化寡聚核苷酸作为靶基因抑制剂的研究进展. *生命科学* 1993; 5: 17-19
- 55 Miller PS. Oligonucleoside methylphosphonates as antisense reagents. *Bio/technology* 1991; 9: 358-362(熊克勇. 用甲基化的寡聚核苷酸做反义制剂. *生物工程进展* 1992; 12: 15-19)
- 56 Hashimoto S, Sakai M, Muramatsu M. 2'-O-methylated oligonucleotides in ribosomal 18S and 28S RNA of a mouse hepatoma, MH 134. *Biochemistry* 1975; 14: 1956-1964
- 57 Butler JS, Lee JH, Skalik DG. PAGE separation of hemi-methylated or unmethylated oligonucleotide substrates to distinguish between maintenance and de novo DNA methyltransferase activity. *J Biochem Biophys Methods* 2006; 68: 195-199
- 58 Gonzalgo ML, Liang G. Methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE) for quantitative measurement of DNA methylation. *Nat Protoc* 2007; 2: 1931-1936
- 59 Gonzalgo ML, Jones PA. Quantitative methylation analysis using methylation-sensitive single-nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Methods* 2002; 27: 128-133
- 60 于海文, 吴泰璜, 穆庆龄, 郑海涛, 陈军. HGF甲基化寡核苷酸对肝癌细胞系BEL-7402作用的研究. *中国现代普通外科进展* 2004; 7: 93-97
- 61 李文欢, 崔屹, 朱菊人. 甲基化寡核苷酸抑制MRP2表达逆转人肝癌细胞HepG2多药耐药的研究. *癌症* 2004; 23: 900-904
- 62 Bradbury J. Human epigenome project--up and running. *PLoS Biol* 2003; 1: E82
- 63 Rauscher FJ 3rd. It is time for a Human Epigenome Project. *Cancer Res* 2005; 65: 11229
- 64 Callinan PA, Feinberg AP. The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet* 2006; 15: R95-101
- 65 Esteller M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 2006; 27: 1121-1125
- 66 Eckhardt F, Beck S, Gut IG, Berlin K. Future potential of the Human Epigenome Project. *Expert Rev Mol Diagn* 2004; 4: 609-618

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评价

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

食管鳞癌组织中S100A4和MMP2蛋白表达与临床病理学特征的关系

郑献召, 李珊珊, 轩小燕, 李娜, 王丰

背景资料
食管癌是目前世界范围内死亡率很高的恶性肿瘤之一。中国尤以河南更为常见。经过几代人的努力, 对食管癌的病因及发病机制有了一些认识, 但到目前为止食管癌的发生机制并没有从根本上阐明。食管癌仍然严重威胁人们的生命健康。因此探讨食管癌的发生及演进机制, 对于降低其发生率及寻找新的防治途径都非常重要。

郑献召, 李珊珊, 轩小燕, 李娜, 王丰, 郑州大学第一附属医院病理科 河南省肿瘤病理重点实验室 河南省郑州市450052
河南省科技攻关基金资助项目, No. 072102310042
通讯作者: 李珊珊, 450052, 河南省郑州市二七区建设东路1号, 郑州大学第一附属医院病理科, 河南省肿瘤病理重点实验室。lsspath@yahoo.com.cn
电话: 0371-61550369
收稿日期: 2007-06-06 修回日期: 2007-10-09

Expression of S100A4 and matrix metalloproteinase 2 and their correlations with clinicopathological features in esophageal squamous cell carcinoma

Xian-Zhao Zheng, Shan-Shan Li, Xiao-Yan Xuan, Na Li, Feng Wang

Xian-Zhao Zheng, Shan-Shan Li, Xiao-Yan Xuan, Na Li, Feng Wang, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Key Laboratory of Tumor Pathology of He'nan Province, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China

Supported by: the Key Science and Technology Program of He'nan Province, No. 072102310042

Correspondence to: Professor Shan-Shan Li, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Key Laboratory of Tumor Pathology of He'nan Province, 1 Jianshe East Road, 27 District, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China. lsspath@yahoo.com.cn

Received: 2007-06-06 Revised: 2007-10-09

Abstract

AIM: To investigate the expression of S100A4 and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in esophageal squamous cell carcinoma and adjacent normal mucosa, and their correlation with clinicopathological features.

METHODS: SP immunohistochemistry was used to detect the expression of S100A4 and MMP2 proteins in 100 cases of esophageal squamous cell carcinoma and adjacent normal mucosa.

RESULTS: The positive rates of S100A4 and MMP2 protein expression were 52.00% and 67.00%, respectively, in esophageal squamous

cell carcinoma, while only 26.00% and 31.00% in normal mucosa. The positive rates of S100A4 and MMP2 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma were significantly higher than those in normal mucosa ($P < 0.01$). The expression of S100A4 and MMP2 protein was significantly associated with differentiation, depth of tumor invasion and lymph node metastasis ($P < 0.05$). A positive correlation was observed between S100A4 and MMP2 protein in esophageal squamous cell carcinoma.

CONCLUSION: The overexpression of S100A4 protein may produce a marked effect in the genesis, development and progression of esophageal squamous cell carcinoma through regulation of MMP2 protein overexpression. S100A4 may be a potential marker for evaluating the prognosis of esophageal carcinoma.

Key Words: Esophageal squamous cell carcinoma; S100A4; Matrix metalloproteinase 2; immunohistochemistry

Zheng XZ, Li SS, Xuan XY, Li N, Wang F. Expression of S100A4 and matrix metalloproteinase-2 and their correlations with clinicopathological features in esophageal squamous cell carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3338-3342

摘要

目的: 探讨食管鳞癌组织和癌旁正常黏膜组织中S100A4和MMP2的表达及其与食管鳞癌临床病理因素之间的关系。

方法: 应用SP免疫组织化学技术检测100例食管鳞癌及其癌旁正常黏膜组织中S100A4和MMP2蛋白的表达。

结果: 食管鳞癌组织中S100A4和MMP2蛋白阳性率分别为52.00%和67.00%, 明显高于癌旁正常黏膜组织26.00%和31.00% ($P < 0.01$)。二者在食管鳞癌中的表达呈正相关, 且与癌组织的分化程度、浸润深度、淋巴结转移密切相关 ($P < 0.05$)。

结论: S100A4可能通过对MMP-2蛋白的调控在食管鳞癌的发生、发展及食管鳞癌的早期侵袭转移中起关键作用, 有望成为评估食管癌预后的一个新的标志物。

关键词: 食管鳞癌; S100A4蛋白; 基质金属蛋白酶2; 免疫组织化学技术

郑献召, 李珊珊, 轩小燕, 李娜, 王丰. 食管鳞癌组织中S100A4和MMP2蛋白表达与临床病理学特征的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(31):3338-3342
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3338.asp>

0 引言

食管癌(esophageal cancer, EC)是世界上最常见的恶性肿瘤之一, 并因侵袭与转移使临床进展迅速而且预后很差. 因此找到食管癌早期发生侵袭与转移的主要调控因素, 将直接影响食管癌的治疗与预后. S100A4蛋白是最近通过cDNA文库基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)筛选出的与多种恶性肿瘤生长密切相关的分子, 在恶性肿瘤的侵袭与转移中起到不可替代的作用^[1]. 恶性肿瘤的侵袭与转移包括血管增生、细胞黏附、侵袭和细胞扩增等一系列步骤. 其中基质金属蛋白酶2(matrix metallo proteinases 2, MMP-2)通过降解基底膜和包绕肿瘤的基质, 突破基质屏障及促进新生血管生成在肿瘤的侵袭与转移中起重要作用. 本文用免疫组化SP法检测了100例食管鳞癌组织中和癌旁正常黏膜组织中S100A4蛋白的表达, 探讨其在食管癌发生、发展中的作用; 统计分析S100A4蛋白与MMP-2蛋白表达的相关性, 探讨其在食管鳞癌侵袭转移中的作用, 可望进一步揭示食管癌早期侵袭与转移的分子生物学机制, 为防治食管癌, 改善预后提供新的思路 and 理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 郑州大学第一附属医院2001-2004年手术切除100例食管癌标本, 男58例, 女42例, 年龄37-79(57.8±6.2)岁. 按组织分化程度: 高分化25例, 中分化64例, 低分化11例. 其中淋巴结转移23例, 无淋巴结转移77例, 侵及浅层(黏膜下层或浅肌层)36例, 侵及深层(深肌层或外膜)64例. 兔抗人S100A4(AP-9003)多克隆抗体为美国Neomarker公司产品, 兔抗人MMP-2多克隆抗体和免疫组化SP试剂盒购自北京中杉生物公司.

1.2 方法 免疫组织化学染色采用链酶卵白素-生物素过氧化物酶法(streptavidin peroxidase, SP). S100A4和MMP-2抗体稀释倍数分别为1:400和1:600, DAB显色, 苏木素复染, 染色步骤严格按照说明书进行. 实验中同时作阳性对照及阴性对照, 扁桃体组织切片作阳性对照, 用PBS代替一抗作阴性对照. 细胞质或细胞核中呈现棕黄色染色颗粒为阳性细胞, 计数10个高倍视野中阳性细胞的百分比计算阳性率. S100A4: 阳性细胞数<2%为阴性(-), 阳性细胞数≥2%为(+); MMP-2: 阳性细胞数≤30%为阴性(-), 阳性细胞数>30%为(+).

统计学处理 利用SPSS13.0软件, 率的比较采用 χ^2 检验, 相关分析采用kendall相关分析法, 检验标准取 $\alpha=0.05$.

2 结果

2.1 S100A4蛋白的表达 S100A4在正常食管黏膜细胞的胞质表达弱, 可见胞核着色; 在食管鳞癌细胞中有中等强度的胞质着色, 偶见胞核着色, 间质中可见大量血管平滑肌细胞、内皮细胞着色; 间质淋巴细胞、纤维细胞的胞质着色较强(图1A-B). 在食管鳞癌组织中的阳性率为52.0%, 明显高于食管正常黏膜组织中的表达率26.0%($P<0.01$). 在不同分化程度的食管鳞癌组织中, S100A4蛋白表达率有显著差异. 高、中、低分化鳞癌中的阳性率分别为36.0%, 51.6%和90.9%. 随癌细胞浸润深度增加S100A4蛋白阳性率增高. 浸润至深层(深肌层和外膜)的食管鳞癌组织中S100A4蛋白阳性表达率为59.4%, 明显高于浸润至浅层(黏膜和浅肌层)的阳性率38.9%($P<0.05$). 有淋巴结转移组中S100A4蛋白的阳性表达率(69.5%)高于无淋巴结转移组(40.0%), 差异具有统计学意义($P<0.05$)(表1).

2.2 MMP-2蛋白的表达 MMP-2阳性表达定位于胞质(图1C-D). 在食管鳞癌组织中的阳性率67.0%, 明显高于食管正常黏膜组织中的表达率31.0%($P<0.01$). MMP-2蛋白阳性表达率和癌组织的分化程度、浸润深度及有无淋巴结转移密切相关($P<0.05$), 和患者的年龄、性别无关(表1).

2.3 S100A4蛋白和MMP-2蛋白表达的相关性 食管鳞癌组织中S100A4蛋白的表达和MMP-2蛋白的表达呈明显正相关($P<0.01$, 表2).

3 讨论

S100A4蛋白是由101个氨基酸组成的多肽, 分子

研发前沿 侵袭与转移是恶性肿瘤最主要生物学特性之一, 是导致各种治疗失败, 提示预后不良, 致患者死亡的最主要因素. 大量文献证实, S100A4蛋白在多种恶性肿瘤中高表达, 且同时存在于肿瘤细胞和细胞间质, 与肿瘤的生长、侵袭与转移密切相关. S100A4蛋白促肿瘤形成的机制、调控肿瘤侵袭与转移的途径与方式是目前研究的热点.

相关报道

Ninomiya *et al*对52例食管癌患者进行研究,证实S100A4蛋白在食管癌组织中表达高于正常黏膜,且提示预后不良. Makiko Moriyama-Kita *et al*对41例口腔鳞癌患者进行研究,证实S100A4蛋白是促进肿瘤侵袭与转移的重要因子.

表 1 食管癌组织中S100A4蛋白和MMP-2蛋白的表达与临床病理学特征的关系

临床病理特征	n	S100A4				MMP-2			
		-	+	阳性率(%)	χ^2	-	+	阳性率(%)	χ^2
正常黏膜	100	74	26	26.0	14.208 ^b	69	31	31.0	25.930 ^b
鳞癌	100	48	52	52.0		33	67	67.0	
性别									
男	58	30	28	48.3	0.767	21	37	63.8	0.642
女	42	18	24	57.1		12	30	71.4	
年龄									
60	53	23	30	56.6	0.958	14	39	73.6	3.054
<60	47	25	22	46.8		19	28	59.6	
分化程度									
高	25	16	9	36.0		13	12	48.0	
中	64	31	33	51.6	6.440 ^a	19	45	70.3	7.330 ^a
低	11	2	9	90.9		1	10	90.9	
浸润深度									
浅层	36	22	14	38.9	3.874 ^a	19	17	47.2	9.952 ^a
深层	64	26	38	59.4		14	50	78.1	
淋巴结转移									
有	23	5	18	69.5	8.253 ^a	3	20	87.0	5.380 ^a
无	77	43	34	40.0		30	47	61.0	

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$.

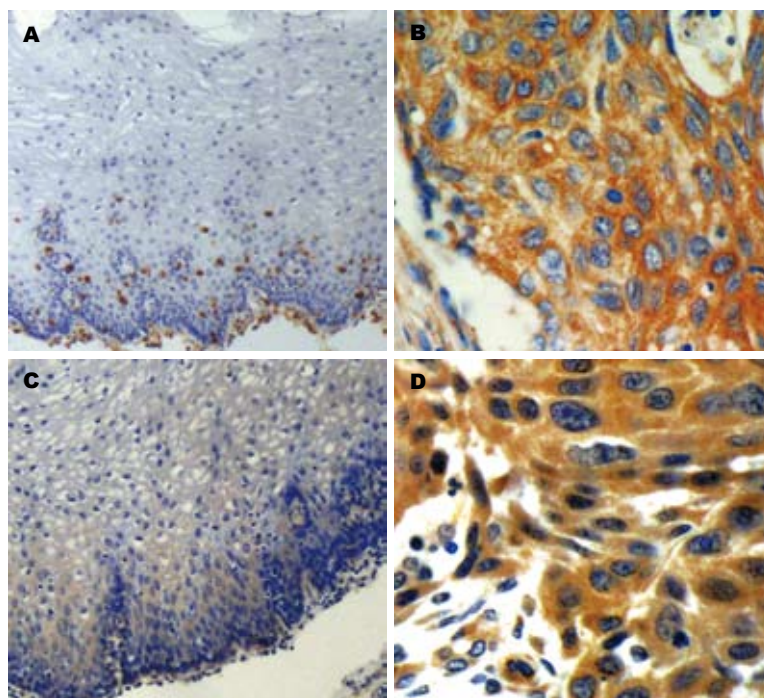


图 1 S100A4和MMP-2免疫组化染色. A: S100A4食管黏膜(SP法 × 200); B: S100A4食管鳞癌(SP法 × 400); C: MMP-2食管黏膜(SP法 × 200); D: MMP-2食管鳞癌(SP法 × 400).

量约为11.5 kDa, 属于钙结合蛋白家族成员. 很多研究表明其与多种肿瘤的发生、发展及侵袭转移有关^[2-3]. 本研究结果显示, S100A4蛋白在食管正常黏膜组织中的表达明显低于其在食管鳞癌组织中的表达, 且阳性细胞多集中在基底细胞层; 在食管鳞癌组织中尤其较强表达于纤维

细胞、间质淋巴细胞的胞质. 间质中可见大量血管平滑肌细胞、内皮细胞着色, 说明S100A4蛋白不仅存在于肿瘤细胞内, 还同时存在于肿瘤细胞外. S100A4通过发挥细胞内和细胞外作用, 影响肿瘤细胞的黏附、酶解、运动、增殖与凋亡和血管生成而促进肿瘤细胞的浸润和转移^[4-5].

表 2 S100A4蛋白和MMP-2在食管鳞癌组织中表达

S100A4	MMP-2		合计	<i>r</i>	<i>P</i>
	+	-			
+	41	11	52	0.262	0.009
-	26	22	48		
合计	67	33	100		

目前已发现S100A4在乳腺癌、结直肠肿瘤、胃肿瘤、肺癌、膀胱癌、前列腺癌、胆囊癌、卵巢癌、胰腺癌、骨肉瘤等肿瘤中高表达^[6-15]。S100A4与细胞分化及肿瘤的发生、发展及预后密切相关^[2,16]。S100A4影响细胞周期,进而使细胞恶性变。Lee *et al*^[17]研究了92例早期乳腺癌患者,并进行了14年的跟踪随访,也发现S100A4蛋白阳性的患者发生远期转移率明显升高,且10年生存率显著降低,说明S100A4阳性的肿瘤患者预后较差。本研究结果表明,在食管鳞癌组织中,随着癌分化程度的降低,S100A4蛋白的表达显著增强,表明S100A4的表达与食管癌的恶性程度有关。随癌细胞侵袭能力的增强,S100A4蛋白阳性率增高。浸润至深层(深肌层和外膜)的食管鳞癌组织中S100A4蛋白阳性表达率明显高于浸润至浅层(黏膜和浅肌层)的食管鳞癌组织,伴有淋巴结转移的食管鳞癌组织中S100A4的表达显著增高,提示S100A4可能与食管癌的高侵袭力和高转移力有关。

肿瘤发生侵袭转移时,基底膜是主要的天然屏障,MMPs及TIMPs在细胞外基质(ECM)的动态平衡中起重要作用。癌细胞与基底膜黏附后,释放或激活蛋白水解酶降解基底膜和细胞外基质然后定向运动穿过缺损的空间。MMPs为一组锌离子依赖性内肽酶,几乎能降解ECM的所有成分,在肿瘤侵袭转移中具有重要意义^[18]。MMPs家族中的明胶酶是唯一能降解ECM和基底膜(basement men, BM)中IV胶原三螺旋结构的酶,可分为MMP-2和MMP-9两个亚型。MMP-2作为降解基底膜和细胞外基质主要结构的关键酶,对恶性肿瘤的发展及间质血管生成起重要作用。本研究结果证实了在食管鳞癌组织中存在MMP-2蛋白的过表达,其阳性率和癌组织的分化程度、浸润深度及伴有淋巴结转移密切相关。不同年龄组及性别的阳性率无明显差异。

有文献报道^[13],S100A4可以通过改变TIMP-2与黏附于细胞膜上的膜型金属蛋白酶-1(mem-berane-type matrix metallo-

proteinase-1, MT1-MMP)的结合来诱导MMP-2酶原的激活。还有资料显示,S100A4可通过激活NF- κ B通路诱导MMP-2的合成^[19],说明S100A4可直接调节MMP-2的合成。本实验结果证实S100A4和MMP-2两种蛋白呈正相关。由此可见,S100A4可能通过对MMP-2蛋白的调控在食管鳞癌的发生、发展及食管鳞癌的早期侵袭转移中起关键作用。将其作为判断食管癌恶性程度及预后的一种生物学指标,有可能成为食管鳞癌及其他肿瘤治疗的新靶点。

4 参考文献

- 1 Taylor S, Herrington S, Prime W, Rudland PS, Barraclough R. S100A4 (p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes. *Br J Cancer* 2002; 86: 409-416
- 2 Sherbet GV, Lakshmi MS. S100A4 (MTS1) calcium binding protein in cancer growth, invasion and metastasis. *Anticancer Res* 1998; 18: 2415-2421
- 3 Takenaga K, Nakamura Y, Sakiyama S. Expression of antisense RNA to S100A4 gene encoding an S100-related calcium-binding protein suppresses metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells. *Oncogene* 1997; 14: 331-337
- 4 Schmidt-Hansen B, Ornas D, Grigorian M, Klingelhofer J, Tulchinsky E, Lukanidin E, Ambartsumian N. Extracellular S100A4(mts1) stimulates invasive growth of mouse endothelial cells and modulates MMP-13 matrix metalloproteinase activity. *Oncogene* 2004; 23: 5487-5495
- 5 Semov A, Moreno MJ, Onichtchenko A, Abulrob A, Ball M, Ekiel I, Pietrzynski G, Stanimirovic D, Alakhov V. Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem* 2005; 280: 20833-20841
- 6 Cabezon T, Celis JE, Skibshoj I, Klingelhofer J, Grigorian M, Gromov P, Rank F, Myklebust JH, Maeldansmo GM, Lukanidin E, Ambartsumian N. Expression of S100A4 by a variety of cell types present in the tumor microenvironment of human breast cancer. *Int J Cancer* 2007; 121: 1433-1444
- 7 Cho YG, Kim SW, Nam SW, Yoon SH, Lee SH, Yoo NJ, Lee JY, Park WS. Overexpression of S100A4 is closely associated with progression of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4852-4856
- 8 Chen XL, Zhang WG, Chen XY, Sun ZM, Liu SH. Correlations of S100A4 protein expression to invasion and metastasis of non-small cell lung cancer. *Ai Zheng* 2006; 25: 1134-1137
- 9 Agerbaek M, Alsner J, Marcussen N, Lundbeck F, Von der Maase H. Focal S100A4 protein expression is an independent predictor of development of metastatic disease in cystectomized bladder cancer patients. *Eur Urol* 2006; 50: 777-785
- 10 Gupta S, Hussain T, MacLennan GT, Fu P, Patel J, Mukhtar H. Differential expression of S100A2 and S100A4 during progression of human prostate adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2003; 21: 106-112
- 11 Kikuchi N, Horiuchi A, Osada R, Imai T, Wang C, Chen X, Konishi I. Nuclear expression of S100A4

应用要点

本文研究结果表明,S100A4及MMP-2蛋白的表达与食管癌的恶性程度、高侵袭力和高转移力有关,且两种蛋白呈明显正相关。S100A4可能通过对MMP-2蛋白的调控在食管鳞癌的发生、发展及食管鳞癌的早期侵袭转移中起关键作用。联合监测两种蛋白的表达,对判断食管癌恶性程度及预后更有意义,为防治食管癌,改善预后提供新的思路和理论依据,有望成为食管鳞癌及其他肿瘤治疗的新靶点。

同行评价
本文内容新颖, 书写流畅, 分析有据, 具有一定的临床意义.

- is associated with aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma: an important autocrine/paracrine factor in tumor progression. *Cancer Sci* 2006; 97: 1061-1069
- 12 Oida Y, Yamazaki H, Tobita K, Mukai M, Ohtani Y, Miyazaki N, Abe Y, Imaizumi T, Makuuchi H, Ueyama Y, Nakamura M. Increased S100A4 expression combined with decreased E-cadherin expression predicts a poor outcome of patients with pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2006; 16: 457-463
- 13 Mathisen B, Lindstad RI, Hansen J, El-Gewely SA, Maelandsmo GM, Hovig E, Fodstad O, Loennechen T, Winberg JO. S100A4 regulates membrane induced activation of matrix metalloproteinase-2 in osteosarcoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2003; 20: 701-711
- 14 Yonemura Y, Endou Y, Kimura K, Fushida S, Bandou E, Taniguchi K, Kinoshita K, Ninomiya I, Sugiyama K, Heizmann CW, Schafer BW, Sasaki T. Inverse expression of S100A4 and E-cadherin is associated with metastatic potential in gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4234-4242
- 15 Chen H, Fernig DG, Rudland PS, Sparks A, Wilkinson MC, Barraclough R. Binding to intracellular targets of the metastasis-inducing protein, S100A4 (p9Ka). *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286: 1212-1217
- 16 Cajone F, Sherbet GV. Stathmin is involved in S100A4-mediated regulation of cell cycle progression. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 865-871
- 17 Lee WY, Su WC, Lin PW, Guo HR, Chang TW, Chen HH. Expression of S100A4 and Met: potential predictors for metastasis and survival in early-stage breast cancer. *Oncology* 2004; 66: 429-438
- 18 Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 161-174
- 19 Han YP, Tuan TL, Wu H, Hughes M, Garner WL. TNF-alpha stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-(kappa)B mediated induction of MT1-MMP. *J Cell Sci* 2001; 114: 131-139

编辑 何燕 电编 何基才

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

• 消息 •

第二届科技信息资源共享促进国际研讨会在京召开

本刊讯 第二届科技信息资源共享促进国际研讨会于2007-10-30在北京中苑宾馆召开, *World Journal of Gastroenterology(WJG)*应邀参加了此次研讨会.

本届研讨会是由中国科学技术信息研究所与万方数据共同主办的, 继2006年“首届科技信息资源共享促进国际研讨会”成功举办后的又一次以Digital Object Identifier(数字对象唯一标识符, 以下简称“DOI”)为主题展开的国际研讨会. 会议上由DOI国际基金会主任Norman Paskin博士、万方数据技术研究院副院长张旭、中国出版科学研究所张书卿、万方数据技术研究院郭晓峰以及中国科学信息研究所共享促进中心主任彭洁先后介绍了DOI的发展现状、中文DOI的标准化进程、中文DOI平台系统以及国内科学技术与DOI发展的情况, 并由Norman Paskin博士与日本Soichi Kubota先生分别对德国国家图书馆(TIB)及日本J-STAGE的DOI应用情况进行了系统的分析和讲述, 并回答了列席者的提问.

会议就中文DOI对出版商、对数据集成商、对图书馆的利益与作用进行了详细的解说与讨论, 使国内相关行业对DOI的认识更进一步, 对信息的国际化共享提供了一个交流的平台. 相关人士对万方数据开发中文DOI的举措进行了赞赏, 并就DOI同以往同类产品中的优势加以讨论与交流.

对出版行业而言, 实现引文到其他出版商全文的动态、持久链接和提高出版业服务质量、提升行业整体竞争力量达作用, 对WJG今后的发展有一定的价值, 我们会以此为参考逐步提升我们的服务质量和竞争力, 争取在国际同行业中利于更加领先的地位, 为更多的读者与学者提供更高水平的文章与医学数据. (电子编辑: 李海寅 2007-10-31)

林州市贲门癌P53和PCNA与癌旁肠上皮化生的关系

高社干, 王立东, 冯笑山, 马宝根, 范宗民, 高珊珊, 郭花芹

高社干, 郑州大学基础医学院癌症研究室 河南省食管癌重点开放实验室 河南省郑州市 450052; 河南科技大学第一附属医院肿瘤科 河南省洛阳市 471003

王立东, 范宗民, 高珊珊, 郭花芹, 郑州大学基础医学院癌症研究室 河南省食管癌重点开放实验室 河南省郑州市 450052

冯笑山, 河南科技大学第一附属医院肿瘤科 河南省洛阳市 471003

马宝根, 河南省人民医院肿瘤科 河南省郑州市 450003

国家杰出青年科学基金资助项目, No. 30025016

国家自然科学基金资助项目, No. 30670956

河南省医学科技创新人才工程基金资助项目, No. 20040055

河南省自然科学基金资助项目, No. 0511043200

河南省食管癌重点开放实验室开放基金资助项目,

No. 20050227

通讯作者: 王立东, 450052, 河南省郑州市大学路40号, 郑州大学基础医学院癌症研究室, 河南省食管癌重点开放实验室.

ldwang@zzu.edu.cn

电话: 0371-66658335

收稿日期: 2007-07-08 修回日期: 2007-10-09

P53 and proliferating cell nuclear antigen in patients with gastric cardiac adenocarcinoma with and without paracancerous intestinal metaplasia in Linzhou city

She-Gan Gao, Li-Dong Wang, Xiao-Shan Feng, Bao-Gen Ma, Zong-Min Fan, Shan-Shan Gao, Hua-Qin Guo

She-Gan Gao, Henan Key Laboratory for Esophageal Cancer, Laboratory for Cancer Research, Basic Medical college, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China; Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, He'nan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China

Li-Dong Wang, Zong-Min Fan, Shan-Shan Gao, Hua-Qin Guo, Henan Key Laboratory for Esophageal Cancer, Laboratory for Cancer Research, Basic Medical College, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Xiao-Shan Feng, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, He'nan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China

Bao-Gen Ma, Department of Oncology, People's Hospital of He'nan Province, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Supported by: the National Outstanding Young Scientist Award of China, No. 30025016; National Natural Science Foundation of China, No. 30670956; Medicine Science and Technology Foundation for Innovative Persons with Ability Project of Henan Province, China, No. 20040055; the Natural Science Foundation of Henan Province, China, No. 0511043200; Open Foundation of Henan Key Laboratory

for Esophageal Cancer, No. 20050227

Correspondence to: Li-Dong Wang, Henan Key Laboratory for Esophageal Cancer, Laboratory for Cancer Research, Basic Medical college, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. ldwang@zzu.edu.cn

Received: 2007-07-08 Revised: 2007-10-09

Abstract

AIM: To characterize the expression of P53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) proteins in gastric cardiac adenocarcinoma (GCA) with and without paracancerous intestinal metaplasia (IM).

METHODS: Immunohistochemical analysis (ABC method) was performed on tissues resected from 70 cases of GCA with and without paracancerous IM.

RESULTS: The high positive expression rate for P53 protein in GCA tissues with paracancerous IM (33.33%) was significantly higher than that in GCA tissues without paracancerous IM (4.65%) ($P < 0.01$), and the high positive expression rate for PCNA protein did not significantly differ between the two groups (74.07% and 79.07%).

CONCLUSION: The high positive expression rate for P53 protein in GCA with paracancerous IM is significantly higher than without paracancerous IM, suggesting the possibility of a different molecular basis in the two types of GCA with similar morphology.

Key Words: P53; Proliferating cell nuclear antigen; Gastric cardiac adenocarcinoma; Intestinal metaplasia; Immunohistochemistry

Gao SG, Wang LD, Feng XS, Ma BG, Fan ZM, Gao SS, Guo HQ. P53 and proliferating cell nuclear antigen in patients with gastric cardiac adenocarcinoma with and without paracancerous intestinal metaplasia in Linzhou city. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3343-3346

摘要

目的: 探讨贲门腺癌(gastric cardia adenocarcinoma, GCA)的P53和PCNA分子学特征与

背景资料

近年来研究表明, 贲门癌是所有恶性肿瘤中发病率增长速度最快的一种, 其原因尚不十分清楚. 王立东 *et al* 对贲门癌高发区人群的初步研究提示, 贲门黏膜肠上皮化生可能是贲门癌变早期的重要组织学特征, 是GCA的演变过程中不可缺少的环节, 但其演进的分子机制仍然不清楚.

研发前沿

该研究领域中的研究热点是贲门癌早期诊断的指标和手段, 以及高效特异的防治措施, 重点是探索高度敏感和早期、特异性的生物学诊断指标以及亟待研究的问题, 即贲门腺癌与肠上皮化生的关系.

相关报道

从1998-2002年Hamilton、赖少清、张军先后报道贲门肿瘤与肠化具有相关性。然而Sharma认为尽管贲门癌与肠化有潜在的联系,但目前仍然不明确。王立东 *et al*对贲门癌高发区人群的初步研究提示,河南林州市贲门癌高发区人群贲门黏膜肠上皮化生的检出率明显高于低发区人群。

癌旁肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)的关系。

方法: 采用ABC免疫组织化学分析(immunohistochemistry, IHC)法研究了70例癌旁含IM和不含IM的贲门癌P53和PCNA蛋白表达变化的特征。

结果: 癌旁含IM的GCA中P53蛋白阳性高表达率明显高于癌旁不含IM的GCA(33.33% vs 4.65%, $P < 0.01$), 而PCNA蛋白在两组中的阳性高表达率(74.07%和79.07%)比较无显著性差异($P > 0.05$)。

结论: 癌旁含IM和不含IM的GCA形态相似,但可能具有不同的分子基础。

关键词: P53; 细胞增殖核抗原; 贲门癌; 肠上皮化生; 免疫组化

高社干, 王立东, 冯笑山, 马宝根, 范宗民, 高珊珊, 郭花芹. 林州市贲门癌P53和PCNA与癌旁肠上皮化生的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(31):3343-3346

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3343.asp>

0 引言

近年来研究表明, 贲门癌(gastric cardia adenocarcinoma, GCA)的发生率每年以大于20%的速率递增^[1], 是所有恶性肿瘤中发病率增长速度最快的一种^[2-7], 其原因尚不十分清楚^[8]。王立东 *et al*对GCA高发区人群的初步研究提示, 河南林州市GCA高发区人群贲门黏膜肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)的检出率明显高于低发区人群^[9-11], 提示IM可能是贲门癌变早期的重要组织学特征, 是GCA的演变过程中不可缺少的环节^[12], 但是其演进的分子机制仍然不清楚。本研究通过检测河南GCA高发区(high incidence area, HIA)癌旁含IM和不含IM的GCA组织中P53和细胞增殖核抗原(PCNA)蛋白表达变化, 将有助于了解IM和GCA之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 2001年河南省GCA高发区林州市人民医院, 林州市中心医院和林州市姚村食管癌医院术前均未接受放化疗的GCA患者手术切除组织标本70例, 男59例, 女11例, 平均年龄58.85±9.12(46-79)岁。鼠抗人P53 mAb为美国Oncogene产品, 鼠抗人PCNA mAb为丹麦Dako公司产品, 马抗鼠抗体为美国Vector Laboratories公司产品, ABC试剂盒和DAB底物试剂盒为美国Vector公

司产品, 20 g/L小牛冻干血清蛋白(BSA)为美国Sigma公司产品。

1.2 方法 所有标本经900 mL/L乙醇固定, 常规脱水。每例手术标本均在癌旁1-15 cm处连续取材10-15块, 同GCA标本一样均经石蜡包埋后, 连续切片5-8张, 每张切片厚5 μ m。1张组织切片HE染色, 用于核实组织病理学诊断, 其他用于免疫组织化学染色。根据IM的分型标准中所有IM均含有杯状细胞这一标准, 对所有GCA的癌旁组织进行病理组织学观察, 按其是否含有IM对70例GCA标本进行分类。另取2张GCA标本, 分别做P53、PCNA免疫组织化学染色(卵白素-生物素-辣根过氧化氢酶复合物法)^[11]。每一批实验均设阳性对照、阴性对照和空白对照。采用已知阳性的贲门癌组织切片作阳性对照, 已知阴性的贲门癌组织切片作阴性对照, 已知阳性的贲门癌组织切片, 以PBS代替一抗作空白对照。P53染色阳性判定标准: 以细胞核出现棕黄色染色而胞质不着色为阳性。每例切片随机记数5个高倍视野($\times 400$ 倍), 按阳性细胞所占的百分比, 将P53核阳性病例分为4级^[11]: 其中, “-”、“+”和“++”为低表达, “+++”为高表达。PCNA染色阳性判定标准: 以细胞核出现棕黄色染色而胞质不着色为阳性。每例切片随机记数10个高倍视野($\times 400$ 倍), 共记数1000个癌细胞中PCNA阳性细胞数, 取均值以“%”表示, 再换算成四级增殖指数^[9]: 其中, “+”和“++”为低表达, “+++”和“++++”为高表达。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件处理, 用卡方检验比较各指标之间的相互关系, 显著性水准 α 定为0.05。

2 结果

对70例GCA组织进行免疫组织化学分析, 发现癌旁含IM(图1)的GCA中P53蛋白阳性(图2A)高表达率(+++)(33.33%)明显高于癌旁不含IM的GCA(4.65%), 而癌旁含IM的GCA中PCNA蛋白阳性(图2B)高表达率(+++~++++)(74.07%)则低于癌旁不含IM的GCA(79.07%), 但无显著性差异(表1)。

3 讨论

我们在以前的研究中发现^[12], GCA癌旁IM检出率高于无症状人群, GCA癌旁IM组织中P53蛋白高表达率高于无症状人群IM, 认为贲门黏膜的IM改变是GCA发病率升高的基础, IM发生的

创新盘点

本文发现癌旁含肠化的贲门癌中P53蛋白阳性高表达率明显高于癌旁不含肠化的贲门癌, 提示, 这两种贲门癌起源可能存在本质区别, 癌旁含肠化的贲门癌可能是从肠化转化发展而来, 尤其可能是从含硫化黏蛋白的肠化演变而来。

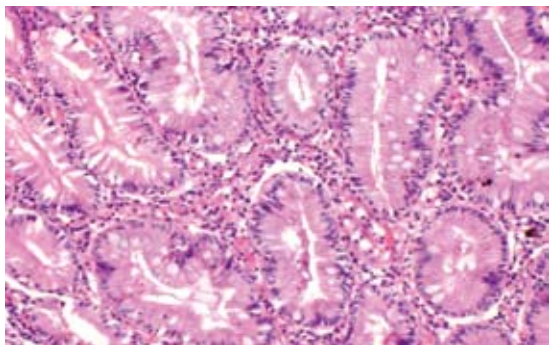


图 1 杯状细胞(HE).

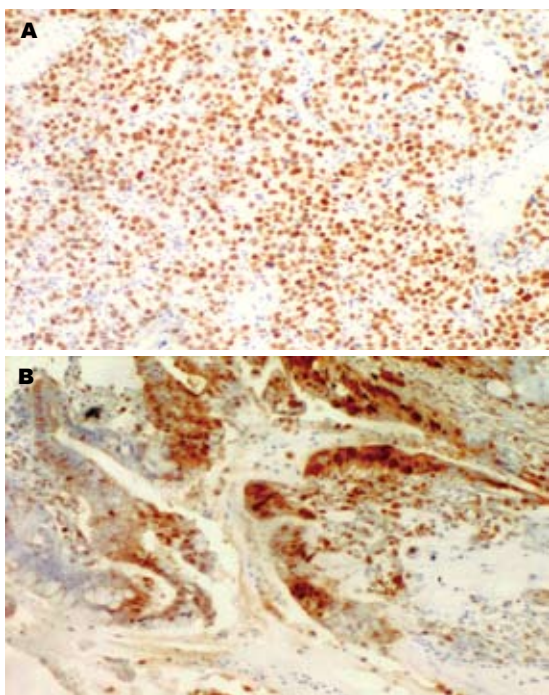


图 2 GCA组织免疫组织化学. A: P53; B: PCNA.

区域在其他致癌因素的共同作用下为GCA的发生、发展提供了位点, IM可能是贲门腺癌发生的先决条件^[13].

本研究的重要发现是, 癌旁含IM的GCA中P53蛋白阳性高表达率明显高于癌旁不含IM的GCA, 提示癌旁含IM的GCA和不含IM的GCA不仅组成不一样, 而且可能具有不同的分子学变化特征. 说明癌旁含IM的GCA与不含IM的GCA起源可能存在本质区别, 癌旁含IM的GCA可能是从IM转化发展而来, 尤其可能是从含硫化黏蛋白的IM演变而来, 而不含IM的GCA的发生、发展可能另有途径, 其发生机制以及生物学意义尚需进一步探讨.

本研究在免疫组化中的另一个发现是, 癌旁含IM的GCA中PCNA蛋白阳性高表达率低于

表 1 GCA的P53和PCNA蛋白高表达与癌旁IM的关系 $n(\%)$

GCA	P53 (+++)	P53 (-~++)	PCNA (+++~++++)	PCNA (+~++)
癌旁含IM	9(33.33) ^b	18(66.67)	20(74.07)	7(25.93)
癌旁不含IM	2(4.65)	41(95.35)	34(79.07)	9(20.93)

^b $P < 0.01$ vs 癌旁不含IM.

癌旁不含IM的GCA, 但无显著性差异. PCNA即细胞增殖核抗原, 又称周期素, 是一种很好的判断细胞增殖状况的标志物, 因此已用于肿瘤细胞的增殖动力学研究^[14-18]. PCNA不仅可以反应癌细胞的增殖状况, 还与肿瘤细胞的恶性度、复发和转移有关, 而且对判断患者预后具有重要价值^[19-22]. 癌旁含IM的GCA中PCNA蛋白的检出率与不含IM的GCA比较无显著性差异, 提示两者之间的增殖能力没有本质区别, 可能两者之间的恶性度、复发、转移和预后也没有区别, 进一步说明PCNA蛋白可能不是区别两者之间差异的敏感指标. 关于这方面的问题, 尚需以后进一步研究.

总之, 通过对癌旁含IM和不含IM的GCA进行P53和PCNA分子学变化的研究, 不仅加深了对IM与GCA之间关系的了解, 为进一步阐明贲门癌变机制打下了基础, 而且初步了解到不同的GCA可能起源不同, 其发生机制以及生物学意义也可能不同. 下一步工作应结合临床, 探讨各型GCA之间的恶性程度、淋巴转移等有无差异, 可能有助于对预后的判断. 探讨各型GCA之间对放疗、化疗的敏感性, 可能有助于对治疗方案的选择.

4 参考文献

- 1 Li JY, Ershow AG, Chen ZJ, Wacholder S, Li GY, Guo W, Li B, Blot WJ. A case-control study of cancer of the esophagus and gastric cardia in Linxian. *Int J Cancer* 1989; 43: 755-761
- 2 Guanrei Y, Sunglian Q. Incidence rate of adenocarcinoma of the gastric cardia, and endoscopic classification of early cardiac carcinoma in Henan Province, the People's Republic of China. *Endoscopy* 1987; 19: 7-10
- 3 贺宇彤, 侯浚, 陈志峰, 乔翠云, 宋国慧, 孟凡书, 冀洪新, 陈超. 食管癌高发区贲门癌流行趋势分析. *中国公共卫生* 2006; 22: 1434
- 4 张立玮, 温登瑰, 王士杰, 李英赛, 于卫芳, 王晓玲, 王俊和, 李素平, 李永伟, 王顺平, 尔立绵, 丛庆文, 马彩芬. 食管癌高发区贲门癌、胃癌流行强度分析及其对内镜筛查的启示. *肿瘤防治研究* 2005; 32: 792-795
- 5 Victor T, Du Toit R, Jordaan AM, Bester AJ, van Helden PD. No evidence for point mutations in

应用要点
本文通过对癌旁含肠化和不含肠化的贲门癌进行P53和PCNA分子学变化的研究, 初步了解到不同的贲门癌可能起源不同, 各型贲门癌之间的恶性程度、淋巴转移等也可能不同, 有助于对预后的判断和治疗方案的选择.

同行评价
本文内容丰富, 论证有据, 有一定的可读性和学术价值.

- codons 12, 13, and 61 of the ras gene in a high-incidence area for esophageal and gastric cancers. *Cancer Res* 1990; 50: 4911-4914
- 6 Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S. Cancer statistics, 1994. *CA Cancer J Clin* 1994; 44: 7-26
- 7 王立东, 刘宾, 冯常炜, 张延瑞, 张彦霞, 李苹娟, 常扶保, 李吉林, 高福生, 冯笑山, 高珊珊, 何欣, 范宗民, 狄霞, 吴会芳, 焦新英, 常志伟, 王俊宽, 刘小莉, 邵珊, 吕晓东, 王蓓, 孙哲, 周建伟, 江亚南, 杜芳, 郭涛, 李琮宇, 刘卫娜, 秦豫培, 王能超, 李韶华, 周丽, 温巍, 张广平, 郜大余, 樊宇靖, 杜娟娟. 山西长治林州移民与河南林州居民食管、贲门和胃窦内镜病理结果比较. *郑州大学学报(医学版)* 2006; 41: 5-9
- 8 Powell J, McConkey CC. Increasing incidence of adenocarcinoma of the gastric cardia and adjacent sites. *Br J Cancer* 1990; 62: 440-443
- 9 刘贵生, 龚均, 张军, 常英, 强磊, Barrett食管、贲门部与胃窦部肠上皮化生的比较研究. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 223-226
- 10 陈虹, 王立东, 范宗民, 高社干, 郭花芹, 郭梅. 贲门肠上皮化生三种组织化学染色方法的比较研究. *河南医学研究* 2003; 12: 10-13
- 11 Gao SG, Wang LD, Fan ZM, Li JL, He X, Guo RF, Xie DL, He XW, Gao SS, Guo HQ, Wang JK, Feng XS, Ma BG. Histochemical studies on intestinal metaplasia adjacent to gastric cardia adenocarcinoma in subjects at high-incidence area in Henan, north China. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4634-4637
- 12 高社干, 冯笑山, 马保根, 范宗民, 高珊珊, 何欣, 郭花芹, 王启鸣, 郭瑞锋, 吴会芳, 王立东. 贲门癌癌旁和无症状人群贲门黏膜活检组织肠上皮化生检测. *郑州大学学报(医学版)* 2006; 41: 41-44
- 13 Ruol A, Parenti A, Zaninotto G, Merigliano S, Costantini M, Cagol M, Alfieri R, Bonavina L, Peracchia A, Ancona E. Intestinal metaplasia is the probable common precursor of adenocarcinoma in barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2000; 88: 2520-2528
- 14 柳曦, 周乃康, 张锦明, 梁朝阳, 郑昕. ^{18}F -FLT摄取与肺癌细胞增殖的相关性. *癌症* 2006; 25: 1512-1516
- 15 张金梅, 朱尤庆. CK20、PCNA在胃癌组织中的表达及临床意义. *武汉大学学报(医学版)* 2006; 27: 573-576
- 16 张京伟, 魏蕾, 李华, 彭小春, 袁宏银. 大肠腺癌组织中VASP和PCNA的表达. *肿瘤防治研究* 2006; 33: 431-436
- 17 徐凤琳, 于秀文, 臧劲松, 戚基萍, 张晓杰. 胃肠道间质瘤中PCNA和Ki-67的表达及其意义. *齐齐哈尔医学院学报* 2006; 27: 1426-1427
- 18 杨培, 罗亿治. 增殖相关核抗原的研究进展. *重庆医科大学学报* 1998; 23: 327-328
- 19 施红旗, 楼善贤, 刘庆伟. PCNA, CEA, CA50和E-cad在胆囊癌中的表达及意义. *肿瘤研究与临床* 2006; 18: 102-105
- 20 邹继彬, 黄广恩, 陈鸿莲. 食管癌Survivin和PCNA的表达及其临床意义. *中国医师杂志* 2005; 7: 898-900
- 21 黄应桂, 吴冬梅, 曹军. 食管癌组织中p16、nm23、PCNA和p53表达及其临床意义的研究. *宁夏医学杂志* 2003; 25: 328-330
- 22 王波, 杨志宏, 阮水良, 殷新光, 曹宁殊. 胃癌及胃癌前病变p53蛋白、PCNA表达及其临床意义的研究. *实用肿瘤学杂志* 2005; 19: 7-9

编辑 何燕 电编 何基才

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

• 消息 •

世界华人消化杂志在线办公系统

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

回顾性分析溃疡性结肠炎232例

潘政, 黄晓俊

潘政, 黄晓俊, 兰州大学第二医院消化内科 甘肃省兰州市 730030

通讯作者: 潘政, 730030, 甘肃省兰州市, 兰州大学第二医院消化内科. panzh05@lzu.cn

电话: 0931-8942615

收稿日期: 2007-08-29 修回日期: 2007-10-18

Colonoscopy of 232 cases of ulcerative colitis

Zheng Pan, Xiao-Jun Huang

Zheng Pan, Xiao-Jun Huang, Division of Gastroenterology, the 2nd Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Correspondence to: Zheng Pan, Division of Gastroenterology, the 2nd Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. panzh05@lzu.cn

Received: 2007-08-29 Revised: 2007-10-18

Abstract

AIM: To explore the colonoscopic and related features of ulcerative colitis, with a view to improve recognition of ulcerative colitis (UC).

METHODS: According to UC diagnostic code, 232 cases of UC were collected from 4994 cases diagnosed by colonoscope over 18 years. We carried out retrospective and statistical analyses of the endoscopic data from all cases.

RESULTS: Two hundred and thirty-two cases of UC were detected, with an average detection rate of 4.65%. There were 134 male and 98 female cases, with a male to female ratio of 1.37 : 1. The mean age was 44.11 years, with most patients between 20 and 69 years. There were two age peaks: 66 cases (28.45%) between 30 and 39 years, and 51 (21.98%) between 50 and 59 years. The urban population comprised 70.26% of cases, and was higher than the rural population (29.74%). Among patients with UC, 13.4% had proctitis, 27.2% had proctosigmoiditis, 18.6% had left-side colitis, and 40.8% had pan-colitis.

CONCLUSION: There have been an increasing number of patients hospitalized with UC in recent years, and the endoscopic detection rate for this condition is higher than for others. The

lesions of UC are commonly located in the left colon.

Key Words: Ulcerative colitis; Colonoscopy; Detection rate

Pan Z, Huang XJ. Colonoscopy of 232 cases of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(31): 3347-3349

摘要

目的: 探讨溃疡性结肠炎结肠镜检出率以及相关特点, 以提高对此病的认识。

方法: 按照UC诊断标准, 回顾18年中4994次结肠镜检出的232例UC内镜资料, 进行分析与统计学处理。

结果: 共检出232例溃疡性结肠炎, 18年平均检出率为4.65%。男134例, 女98例, 平均年龄44.11岁, 患者主要集中于20-69岁之间, 可见两个高峰, 30-39岁之年龄段患者最多, 为66例, 占28.45%; 其次为50-59岁之年龄段, 为51例, 占21.98%。城市居住人口(70.26%)较农村居住人口(29.74%)比率高。在UC患者中, 13.4%为直肠炎, 27.2%为直乙状结肠炎, 18.6%为左半结肠炎, 全结肠炎为40.8%。

结论: 本地区溃疡性结肠炎发病人数逐渐增加; 内镜检出率较高。

关键词: 溃疡性结肠炎; 结肠镜; 检出率

潘政, 黄晓俊. 回顾性分析溃疡性结肠炎232例. 世界华人消化杂志 2007;15(31):3347-3349

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3347.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是一种原因不明的慢性结肠炎, 属于非特异性炎症性肠病(IBD), 近年来在我国发病率呈上升趋势, 但与西方等国相比仍低得多^[1]。随着我们对此病认识的提高和结肠镜检查的广泛应用, 检出率有增高之势。以下回顾性分析总结我院近18年经结肠

背景资料

关于溃疡性结肠炎的发病特点及内镜下特点的报道屡见不鲜, 该病在一定程度上存在地域的差别。本文就兰州大学第二医院18年来统计的结肠镜检查的总人数中诊断UC患者的一般状况及内镜特点进行总结, 从而有助于对该病的进一步认识。

研发前沿
溃疡性结肠炎的病因、发病机制、内镜下表现及分型、分度、分期与临床治疗和预后的关系一直是大家探讨的热点,在此方面已有众多研究与报道。

镜检出的UC患者232例。

1 材料和方法

1.1 材料 1989-01/2006-12经结肠镜检查的所有患者及经结肠镜检出的溃疡性结肠炎(UC)患者。诊断标准参照2000年成都全国炎症性肠病学术会议制定的UC诊断标准^[2]。

1.2 方法 所有患者均行全结肠镜检查,记录患者的一般情况:性别、年龄、职业、住址及肠镜诊断结果,对资料进行回顾性分析。

统计学处理 资料统计分析方法使用 χ^2 检验或Fisher精确检验,用SPSS11.0软件分析。

2 结果

2.1 病例数及检出率 1989-2006年经结肠镜检查的总人数共4994例,检出溃疡性结肠炎232例,占结肠镜检查总数4.65%,其中每年检查人数及检出率见表1。近几年病例数较前明显增加,最高年检出率为8.85%,最低年检出率为2.01%,18年平均检出率为4.65%。经统计学分析,各年检出率之间差别无显著性差异。

2.2 性别比 行结肠镜检查的总人数中,男2998例,女1996例,男女之比1.5:1。UC中男134例,女98例,男女之比1.37:1。男女性别检出率分别为4.47%和4.91%,差别无显著性(表1)。

2.3 年龄分布 UC患者年龄分布范围为5-87(平均年龄44.11)岁,患者主要集中于20-69岁之间。最多的年龄段为30-39岁患者,为66例,占28.45%;其次为50-59岁之年龄段,为51例,占21.98%(图1)。

2.4 职业构成 干部、工人与其他职业的患者分别为77例,56例,30例,总共163例。农民为69例(图2)。

2.5 病变分布 UC患者中13.4%为直肠炎,27.2%为直乙状结肠炎,18.6%为左半结肠炎,全结肠炎为40.8%。

3 讨论

从我院统计结果来看,UC患者的病例逐年增加,这与文献报道的我国溃疡性结肠炎的整体发病趋势相一致^[3]。UC患者的平均内镜检出率为4.65%,低于西方学者报告的7.34%和6.7%^[4-5],而高于国内文献报道的2.45%^[6]和1.92%^[7]。虽然病例数逐年增加,但每年检出率并无此增长趋势,且统计学分析,每年检出率差别无显著性。由此分析,本地区UC发病率并没有逐年增加的趋势,病例数的增加可能与结肠镜检查人数的增加,

表 1 232例UC患者年检出率

时间 (年)	年结肠镜检 查总数(n)	年检出UC 患者(n)	年检 出率(%)
1989	192	9	4.69
1990	199	4	2.01
1991	135	9	6.67
1992	177	9	5.09
1993	113	10	8.85
1994	117	4	3.42
1995	118	9	7.63
1996	189	10	5.29
1997	154	9	5.84
1998	231	12	5.20
1999	346	18	5.20
2000	312	17	5.45
2001	337	15	4.45
2002	329	15	4.56
2003	334	22	6.59
2004	550	17	3.09
2005	651	23	3.53
2006	510	20	3.92
总计	4994	232	4.65
	(男2998)	(男134)	(男4.47)
	(女1996)	(女98)	(女4.91)

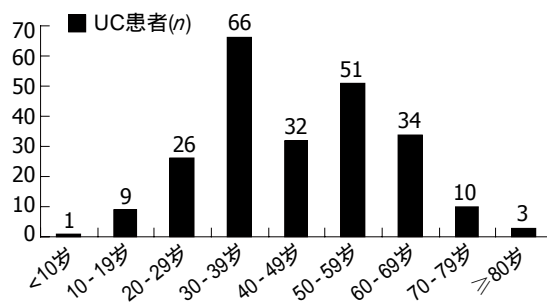


图 1 UC患者各年龄阶段构成分布图。

与患者对健康体检意识的提高以及与医务人员对此病认识程度的提高有关。

患者的男女性别为1.37:1,略高于文献报道的1.09:1^[3],与国内报道的1.34:1^[8]基本相一致,而国外多报道男女无差别。但男女各自性别检出率分别为4.47%与4.91%,女略高于男,其原因有待进一步研究分析。

患者年龄阶段是5-87岁,各年龄阶段均可发病,与国内外文献报道相一致。但以30-39岁为最多,与西方报道的30岁高峰基本相一致^[3]。50-59岁为第二小高峰,平均年龄为44.11岁,与国内外报道有不同之处。平均年龄较文献报道^[9]偏大,说明不同地区间存在发病的差异。

创新盘点
本文较突出的是所搜集资料年限长,病例数较多,资料准确可靠,在一定程度上能客观反映本地区UC的发病特点。本文对职业与溃疡性结肠炎患病的相关性作了较为详细的总结与分析。

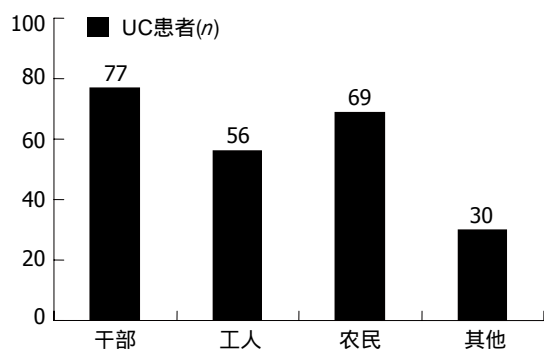


图 2 UC患者职业构成分布图.

UC患者职业分布中以干部为最多, 城镇居住者总共163例, 占70.26%; 农村居住者为69例, 占29.74%. 由此可见城市居住人口比农村居住人口检出率高. 以城镇居住者占大多数, 与国内文献报道^[10]基本相符, 提示可能与人们的生活水平、生活方式、工作性质以及环境因素等有关.

UC病变部位以直肠、乙状结肠及左半结肠最多见. 本组占59.2%, 全结肠炎占40.8%, 与国内报道基本相符^[11], 但低于国外学者Le-chart报道^[12]的49.6%, 说明不同种族间存在发病部位差异.

总之, 本文通过对本院18年来经结肠镜检查出的232例UC患者的一般情况及内镜特点进行总结, 明确了本地区UC的发病特点, 进一步提高对UC的认识, 从而提高对该病的诊断水平. 当然尽管结肠镜是诊断UC的最重要手段, 一般肠镜

肉眼诊断率为90.1%-96.4%^[13], 但仍然要结合病理检查及临床, 以提高诊断准确性. 同时, 需要增加病例数量以更准确把握其特点, 提高对该病的认识.

4 参考文献

- 1 郑红斌. 溃疡性结肠炎全球发病情况比较. 中华消化杂志 2001; 21: 242-243
- 2 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. 中华消化杂志 2001; 21: 236-239
- 3 江学良, 崔惠斐. 中国溃疡性结肠炎10 218例的特点. 世界华人消化杂志 2001; 9: 869-873
- 4 Banche M, Rossini FP, Ferrari A, Roatta L, Gilli E, Cirillo R. The role of colonoscopy in the differential diagnosis between idiopathic ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. *Am J Gastroenterol* 1976; 65: 539-545
- 5 Fruhmorgen P, Laudage G, Matek W. Ten years of colonoscopy. *Endoscopy* 1981; 13: 162-168
- 6 张素娟, 刘思德, 张亚历, 白杨. 454例溃疡性结肠炎的临床及内镜检查分析. 现代消化及介入诊疗 2006; 11: 136-139
- 7 丁一娟, 于皆平, 罗和生, 周中银, 刘军. 186例溃疡性结肠炎结肠镜检查的评价和分析. 中国内镜杂志 2005; 11: 930-934
- 8 中国炎症性肠病协作组. 3100例溃疡性结肠炎住院病例回顾分析. 中华消化杂志 2006; 26: 368-372
- 9 曹建彪, 李雅君, 张红光, 晨智敏. 128例溃疡性结肠炎内镜资料分析. 中国内镜杂志 2000; 6: 21-22
- 10 中国炎症性肠病协作组. 3100例溃疡性结肠炎住院病例回顾分析. 中华消化杂志 2006; 26: 368-372
- 11 曹倩, 胡伟玲, 高敏, 周刚, 姚健敏. 379例炎症性肠病临床特征分析. 中华消化杂志 2005; 25: 222-225
- 12 Monsen U, Brostrom O, Nordenvall B, Sorstad J, Hellers G. Prevalence of inflammatory bowel disease among relatives of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 1987; 22: 214-218
- 13 钟慧闽, 姚萍, 杨杰. 结肠镜检查对溃疡性结肠炎早期诊断的价值. 中国内镜杂志 2003; 9: 68-69

同行评价
本文资料可靠, 数据可信, 有一定的临床参考价值和意义.

编辑 程剑侠 电编 何基才