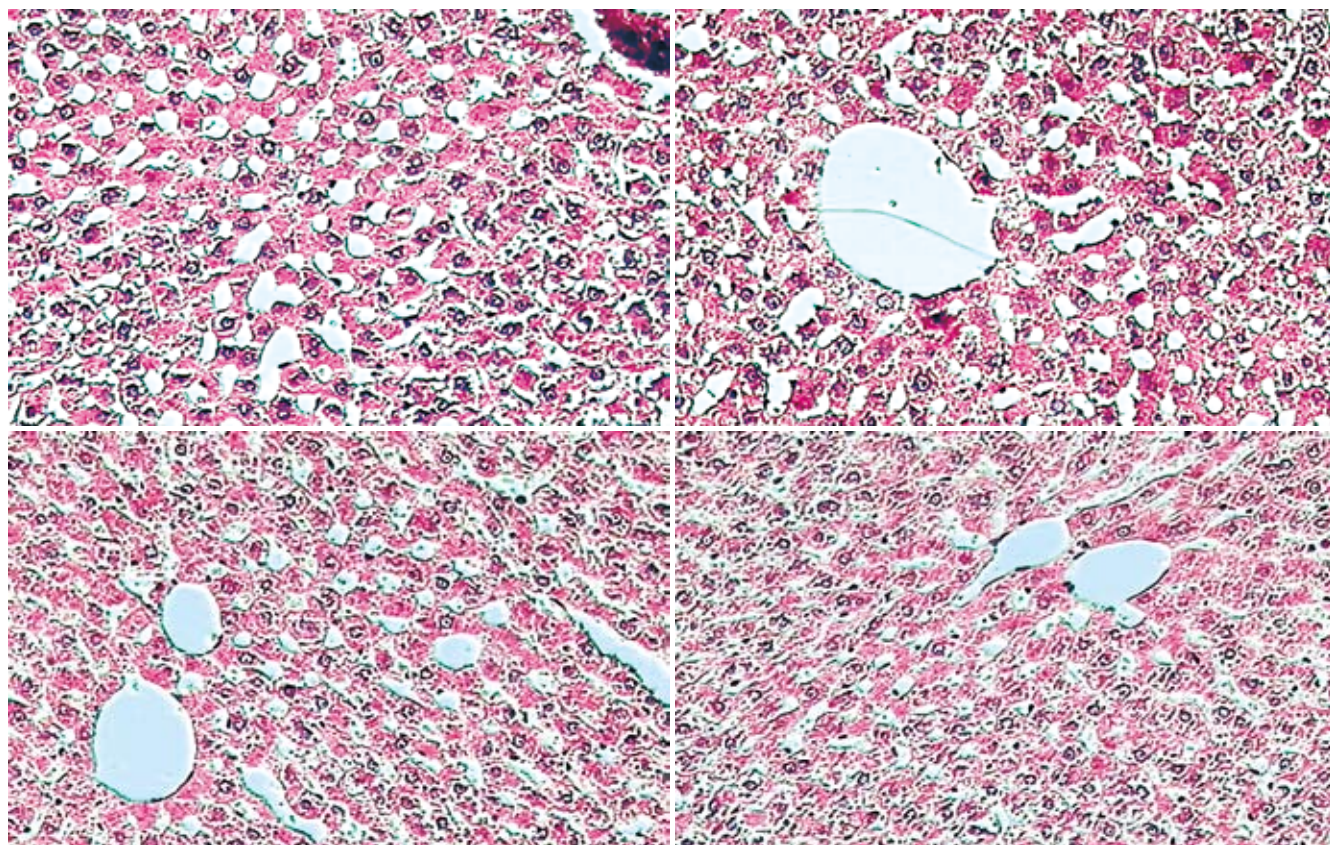


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2008年5月8日 第16卷 第13期 (Volume 16 Number 13)



13 / 2008

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

成军教授
程英升主任医师
范学工教授
高毅主任医师
江学良主任医师
李岩教授
刘连新教授
吕宾教授
罗和生教授
聂青和教授
王小众教授

编委

消化内科学

白爱平副教授
白文元教授
栾新明教授
陈洪副教授
陈军贤主任医师
陈尼维主任医师
陈其奎教授
陈卫昌教授

陈贻胜教授
陈玉林教授
程斌副教授
迟宝荣教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯红主任医师
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关晓辉主任医师
关玉盘教授
郭晓钟教授
郭新宁教授
洪天配教授
侯晓华教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄裕新教授
霍丽娟主任医师
季国忠副教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
金懋林教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李继强教授
李淑德教授
李晓宇主任医师
李延青教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李兆申教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘改芳主任医师
刘海峰教授
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授

马金城教授
马欣主任医师
毛高平主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴熙绪主任医师
朴云峰教授
秦成勇教授
曲智威副主任医师
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋于刚教授
孙富强副教授
孙侃教授
孙自勤教授
唐采白副教授
唐芙爱教授
唐丽安教授
田德安主任医师
童强主任医师
宛新建副教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王吉耀教授
王莉瑛教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
吴萍主任医师
夏时海副教授
徐秀英副教授
许春舫主任医师
许乐主任医师
许亚平副教授
杨冬华教授
杨建民教授
杨希山教授
杨幼林主任医师
杨云生教授
杨昭徐教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
于红刚副教授
于晓峰主任医师
袁伟建教授

展玉涛副主任医师
张春清教授
张方信主任医师
张国梁主任医师
张吉翔教授
张集昌主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岗教授
张筱茵副教授
张志坚教授
赵晓晏教授
郑鹏远教授
智发朝教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
朱人敏教授
邹晓平主任医师

消化外科学

别平教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师
陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈建荣副教授
陈克能主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凇教授
陈强谱教授
陈亚军主任医师
陈知水教授
陈祖林副教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
迟强教授
仇毓东副教授
崔彦教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅廷亮教授
傅志仁主任医师

高成新教授
葛海燕教授
龚建平教授
巩鹏教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
郭克建教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何生教授
何裕隆教授
何振平教授
黄志勇副教授
季加孚教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
兰平教授
黎乐群教授
李国威教授
李华山副主任医师
李靖副教授
李奇林教授
李胜研究员
李小红教授
李旭副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
刘建教授
刘颖斌副教授
刘志苏教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
吕明德教授
吕云福教授
梅铭惠教授
彭波副教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
彭志海教授
钱建民教授
乔岐禄主任医师
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦仁义教授
邱宝安主任医师
邱双健副教授

世界华人消化杂志®

编辑委员会

邱伟华副主任医师

裘正军教授
任建安教授
荣大庆教授
邵永孚教授
沈柏用副教授
沈世强教授
沈岩主任医师
师英强教授
施诚仁教授
宋世兵主任医师
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙家邦教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
谭群友副教授
汤恢焕教授
汤展宏副教授
唐文皓副主任医师
田素礼教授
田晓峰教授
万德森教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王凤山副教授
王广义教授
王济明教授
王健生副教授
王烈主任医师
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王效民教授
王要军教授
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
卫洪波教授
吴德全教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
席启主任医师
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师

徐智教授

许戈良教授
严律南教授
严以群主任医师
杨广顺教授
杨维良教授
杨尹默教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于恩达教授
于健春教授
于良副教授
于则利教授
郁宝铭教授
郁正亚副教授
曾勇教授
张柏和教授
张群华教授
张水军教授
张肇达教授
张宗明教授
赵增仁副主任医师
郑民华教授
钟德珩教授
周丁华主任医师
周伟平教授
朱立元教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松副研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈耀凯副教授
党双锁副教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师
高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
郝春秋副教授
何生松教授
江家骥教授
李智伟教授
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
孟庆华教授
宁琴教授
牛俊奇教授

钱林学主任医师

秦波教授
石统东副教授
孙殿兴主任医师
谭德明教授
唐霓副研究员
唐世刚教授
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
谢青教授
徐小元教授
宣世英教授
闫惠平研究员
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张绪清副教授
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵桂珍教授
赵连三教授
周伯平教授
周文兴教授
周霞秋教授
朱传武副主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
劳绍贤教授
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
牛建昭教授
沈洪教授
唐旭东主任医师
唐志鹏研究员
王新月教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

白玉贤教授
曹秀峰主任医师
曹志成院士
陈公琰主任医师
李璠教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
马力文主任医师
吴晴教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

陈克敏教授
程红岩教授
褚建国主任医师
官泳松教授
韩新巍教授
胡红杰主任医师
黄金华副教授
匡安仁教授
李健丁教授
鲁华玉研究员
施海彬教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
扬业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜学

崔毅主任医师
丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
沈俊教授
孙明军教授
万军教授

消化介入治疗学

卢榜裕教授
茅爱武主任医师
倪才方教授
吴硕东教授
袁友红副教授
郑加生主任医师

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授
刘鲁明教授

唐文富主治医师 王学美研究员

消化基础研究

曹洁副教授
樊红副教授
高春芳研究员
高峰教授
高英堂研究员
管冬元副教授
黄文林教授
李东辉教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
梅林教授
彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
孙秀发教授
谭学瑞教授
屠红副研究员
汪思应教授
吴晓东教授
夏建川研究员
徐存拴教授
徐德忠教授
徐宁志研究员
徐迎新研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赓宏研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周士胜教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
左国营副主任药师

消化病理学


杜祥教授
刘勇钢副主任医师
吕宁主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
阎晓初副教授
易永芬教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2008 年 5 月 8 日 第 16 卷 第 13 期 (总第237期)

述 评	1369 胰头十二指肠切除术 吴金术, 彭创
基 础 研 究	1373 shRNA干扰SMYD3对肝癌细胞c-Myc表达及凋亡的影响 刘鑫, 陈立波, 叶进, 江军, 何军, 徐鋈耀, 钱伟 1378 酵母双杂交法对HBV表面抗原主蛋白候选结合蛋白的筛选 周飞, 任建林, 卢雅丕, 陈美娅, 陈建民, 刘明, 施华秀, 张波, 董菁 1383 姜黄素对酒精诱导的大鼠脂质过氧化反应的影响 尹蓉, 王沁, 富翠芹 1388 牛磺酸对大鼠胰岛活性和功能的保护作用 张克忠, 刘永锋, 张佳林 1396 胰岛素样生长因子- 对重症急性胰腺炎大鼠小肠黏膜上皮细胞 <i>bax</i> 和 <i>bcl-2</i> mRNA表达的影响 王映珍, 王世文, 李培杰, 党登峰, 孙志江, 王先坤, 徐庆杰 1402 抗内毒素Fab'对严重烧伤早期小鼠肠道损伤的保护作用 庄颖, 张雅萍, 马思远
临 床 研 究	1407 错配修复基因hMLH1甲基化与胃癌的关系 吴安城, 刘希双, 杨堃 1412 术前化疗对hOGG1及PARP在原发性肝癌组织中表达的影响 苏智雄, 彭涛, 叶新平, 肖开银, 尚丽明, 苏铭, 黎乐群 1417 熊去氧胆酸联合通胆汤对原发性胆汁性肝硬化的治疗作用 唐海鸿, 陈英杰, 童光东, 周大桥, 贺劲松, 周小舟, 郑颖俊 1425 胰腺癌组织Survivin的表达与细胞凋亡、增殖的关系 倪金良, 陈晓星, 张国新, 郝波, 施瑞华, 王学浩 1430 不同栓塞材料行部分性脾栓塞治疗脾功能亢进的疗效及术后反应对比 肖运平, 肖恩华, 刘惕生, 罗建光, 尚全良, 颜荣华
文 献 综 述	1435 肠易激综合征脑功能成像的研究进展 曾芳, 刘旭光, 李学智, 梁繁荣 1440 丙型肝炎病毒相关适配分子的研究进展 徐冬, 曹俊娜 1446 重症急性胰腺炎预防性使用抗生素的认识和评价 夏庆, 黄伟, 杨晓楠 1452 重症急性胰腺炎早期液体复苏治疗及护理 黎贵湘, 黄才蓉, 吴灵, 万美华 1457 重症急性胰腺炎合并腹内高压的研究进展 朱林
研 究 快 报	1461 异丙酚对缺血再灌注大鼠肠黏膜的保护作用 李琳, 张丽, 赵京禹, 郝建华, 李平
临 床 经 验	1465 伊托必利在复合外伤术后患者恢复胃肠功能中的作用 王斯闻, 印春铭, 邹延红, 刘丹, 李春香, 张恒, 郭俊, 桑海泉

	1468 阿德福韦酯联合拉米夫丁治疗拉米夫丁耐药失代偿期肝硬化患者14例 王方, 张俊, 张小岗, 张静, 李德明 1471 人巨细胞病毒UL141A和B片段在黄疸和先天性巨结肠分离株中的序列分析 马艳萍, 阮强, 何蓉, 齐莹, 孙峥嵘, 吉耀华	
病例报告	1476 食管黏膜表层剥脱症1例 黎培员, 王南下, 田德安 1479 肝紫癜诊治1例 李良平, 李开艳, 肖震宇, 朱德强, 赵银锋, 陈孝平, 黄志勇	
致 谢	1482 致谢世界华人消化杂志编委	
消 息	1372 世界华人消化杂志被收录情况 1377 世界华人消化杂志投稿方式 1382 世界华人消化杂志正文要求 1387 世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标 1395 世界华人消化杂志计量单位标准 1401 世界华人消化杂作者贡献及同行评议公开策略 1424 世界华人消化杂志作者署名要求 1434 世界华人消化杂志修回稿须知 1439 世界华人消化杂志数字用法标准 1445 第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知 1451 第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会征文通知 1456 世界华人消化杂志网络版的发表前链接 1460 世界华人消化杂志栏目设置 1464 世界华人消化杂志外文字符标准 1475 世界华人消化杂志名词术语标准 1478 世界华人消化杂志英文摘要要求 1481 世界华人消化杂志标点符号用法	
封面故事	尹蓉, 王沁, 富翠芹. 姜黄素对酒精诱导的大鼠脂质过氧化反应的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1383-1387 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1383	
本期责任人	编务 江艳; 送审编辑 程剑侠; 组版编辑 何基才; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁; 英文审读 王先林; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生	
<div><div><div><div><div></div><div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div><div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名</div><div>(旬刊)</div><div>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2008-05-08 原刊名 新消化病学杂志</div></div><div>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</div></div><div><div>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div><div>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div><div>印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</div><div>订购 全国各地邮电局 邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div></div><div><div>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊。《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录。</div><div>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 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。</div><div>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。</div><div>2008年版权归世界华人消化杂志所有</div></div></div></div>		
<div><div>中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R</div><div>邮发代号 82-262</div><div>国外代号 M 4481</div><div>国内定价 每份24.00元 全年864.00元</div><div>广告经营许可证 1401004000050</div><div>www.wjgnet.com</div></div>		

World Chinese Journal of Digestology

May 2008 Contents in Brief Volume 16 Number 13

EDITORIAL	1369 Experiences in pancreatoduodenectomy <i>Wu JS, Peng C</i>
BASIC RESEARCH	<p>1373 Effects of shRNA-induced SMYD3 silence on c-Myc expression and apoptosis of HepG2 cells <i>Liu X, Chen LB, Ye J, Jiang J, He J, Xu JY, Qian W</i></p> <p>1378 Screening of hepatocyte proteins interacting with the small surface protein of hepatitis B virus using yeast-two hybrid technique <i>Zhou F, Ren JL, Lu YP, Chen MY, Chen JM, Liu M, Shi HX, Zhang B, Dong J</i></p> <p>1383 Effect of curcumin on alcohol-induced lipid peroxidation in rats <i>Yin R, Wang Q, Fu CQ</i></p> <p>1388 Protective effects of taurine on the islet viability and function in rats <i>Zhang KZ, Liu YF, Zhang JL</i></p> <p>1396 Effects of insulin-like growth factor - on <i>bax</i> and <i>bcl-2</i> mRNA expression in intestinal mucosal epithelial cells of rats with severe acute pancreatitis <i>Wang YZ, Wang SW, Li PJ, Dang DF, Sun ZJ, Wang XK, Xu QJ</i></p> <p>1402 Protective effect of Fab' in immunoglobulin Y against lipopolysaccharide on intestinal mucosa during the early stage in severely burned gut-derived endotoxemia mice <i>Zhuang Y, Zhang YP, Ma SY</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>1407 Relationship between mismatch repair gene hMLH1 promoter methylation and gastric carcinoma <i>Wu AC, Liu XS, Yang K</i></p> <p>1412 Effect of preoperative chemotherapy on the expression of human 8-oxoGuanine DNA glycosylase-1 and poly ADP-ribose polymerase in hepatocellular carcinoma <i>Su ZX, Peng T, Ye XP, Xiao KY, Shang LM, Su M, Li LQ</i></p> <p>1417 Efficacy of ursodeoxycholic acid combined with Tongdan Decoction in treatment of patients with primary biliary cirrhosis <i>Tang HH, Chen YJ, Tong GD, Zhou DQ, He JS, Zhou XZ, Zheng YJ</i></p> <p>1425 Relationship between Survivin expression and indexes of cell apoptosis and proliferation in pancreatic carcinoma <i>Ni JL, Chen XX, Zhang GX, Hao B, Shi RH, Wang XH</i></p> <p>1430 Curative effect and postoperative responses after partial splenic embolization with different embic materials for hypersplenism: a comparative analysis <i>Xiao YP, Xiao EH, Liu TS, Luo JG, Shang QL, Yan RH</i></p>
REVIEW	<p>1435 Research progress in brain function imaging of irritable bowel syndrome <i>Zeng F, Liu XG, Li XZ, Liang FR</i></p> <p>1440 Advances in research of aptamers targeting at hepatitis C virus <i>Xu D, Cao JN</i></p> <p>1446 Prophylactic use of antibiotics in treatment of severe acute pancreatitis <i>Xia Q, Huang W, Yang XN</i></p> <p>1452 Early fluid resuscitation and nursing care of patients with severe acute pancreatitis <i>Li GX, Huang CR, Wu L, Wan MH</i></p> <p>1457 Advances in intra-abdominal hypertension due to severe acute pancreatitis <i>Zhu L</i></p>

RAPID COMMUNICATION	1461 Protective effect of propofol on intestinal mucosa in rats with gut ischemia-reperfusion <i>Li L, Zhang L, Zhao JY, Hao JH, Li P</i>
CLINICAL PRACTICE	1465 Role of itopride hydrochloride in gastrointestinal function recovery of postoperative patients with compound trauma <i>Wang SW, Yin CM, Zou YH, Liu D, Li CX, Zhang H, Guo J, Sang HQ</i> 1468 Adefovir combined with lamivudine in treatment of lamivudine-resistant patients with decompensated liver cirrhosis: an analysis of 14 cases <i>Wang F, Zhang J, Zhang XG, Zhang J, Li DM</i> 1471 Sequence analysis of human cytomegalovirus UL141 A and B gene in strains isolated from infants with jaundice or Hirschsprung's disease <i>Ma YP, Ruan Q, He R, Qi Y, Sun ZR, Ji YH</i>
CASE REPORT	1476 One-case analysis of esophageal superficial mucosal exfoliation <i>Li PY, Wang NX, Tian DA</i> 1479 One-case analysis of diagnosis and therapy for hepatic peliosis <i>Li LP, Li KY, Xiao ZY, Zhu DQ, Zhao YF, Chen XP, Huang ZY</i>
ACKNOWLEDGMENT	1482 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<i>Yin R, Wang Q, Fu CQ.</i> Effect of curcumin on alcohol-induced lipid peroxidation in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(13): 1383-1387 http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1383.asp
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	Assistant Editor: <i>Yan Jiang</i> Review Editor: <i>Jian-Xia Cheng</i> Electronic Page Editor: <i>Ji-Cai He</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> English Language Reviewer: <i>Xian-Lin Wang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date May 8, 2008

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

Taiyuan Research and Treatment Center
for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie,
Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

EDITING

Editorial Board of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wcjdn.net

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China
Telephone: +86-351-4078656
E-mail: wjcd@wcjdn.net
<http://www.wcjdn.net>

OVERSEAS DISTRIBUTOR

Beijing Bureau for Distribution of Newspapers and Journals (Code No. 82-261)
China International Book Trading Corporation PO Box 399, Beijing, China (Code No. M4481)

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION

RMB 24 Yuan for each issue
RMB 864 Yuan for one year

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2008 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in this journal represent the viewpoints of the authors except where indicated otherwise.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.asp. If you do not have web access please contact the editorial office.

Copyright © 2008 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

胰头十二指肠切除术

吴金术, 彭创

吴金术, 彭创, 湖南省人民医院肝胆外科 湖南省长沙市 410005

吴金术, 1962年湖南医科大学本科, 教授, 主要从事肝胆胰外科疾病研究。

通讯作者: 吴金术, 410005, 湖南省长沙市解放西路61号, 湖南省人民医院肝胆医院. pengchuangcn@163.com

电话: 0731-2278010 传真: 0731-2278012

收稿日期: 2008-01-31 修回日期: 2008-03-20

Experiences in pancreatoduodenectomy

Jin-Shu Wu, Chuang Peng

Jin-Shu Wu, Chuang Peng, Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410005, Hunan Province, China

Correspondence to: Jin-Shu Wu, Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Hunan Province, 61 Jiefang Western Road, Changsha 410005, Hunan Province, China. pengchuangcn@163.com

Received: 2008-01-31 Revised: 2008-03-20

Abstract

Pancreatoduodenectomy may be one of the most complicated operations in general surgery. Over the past decade, performance of pancreatoduodenectomy to treat both malignant and benign disease has increased. This increase is in large part due to the decreasing perioperative mortality rate. On the one hand, recent advances in pancreatoduodenectomy have contributed to the earlier diagnosis and treatment. On the other hand, the decreasing mortality rate is also attributed to improvements in perioperative management and advances in surgical techniques. Between January 1990 and December 2006, 604 patients underwent pancreatoduodenectomy in Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Hunan Province. The operative mortality rate was only 0.3% and a successful long-term outcome was achieved. The paper aims to review retrospectively the clinic data about these patients, and introduce our experiences in several key steps during pancreatoduodenectomy.

Key Words: Pancreatoduodenectomy; Pancreatic cancer; Surgical operation

Wu JS, Peng C. Experiences in pancreatoduodenectomy.

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2008; 16(13): 1369-1372

摘要

胰头十二指肠切除术是普通外科最复杂的手术之一。近年来, 采用胰头十二指肠切除治疗良恶性病变增加。一方面, 放射学水平的进展利于病变的精确诊断和治疗; 另一方面, 也归功于围术期处理水平的提高和外科手术技术的进步。湖南省人民医院肝胆医院1990-01/2007-12施行胰头十二指肠切除术604例, 手术死亡率仅0.3%, 手术效果优良。本文以胰头癌手术为例, 介绍我们关于胰头十二指肠切除术的一些经验。

关键词: 胰头十二指肠切除术; 胰头癌; 外科手术

吴金术, 彭创. 胰头十二指肠切除术. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1369-1372

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1369.asp>

0 引言

1935年, Whipple首先施行胰头十二指肠切除术。目前此手术已在世界各地广泛开展, 手术适应症扩大, 手术数量逐年增长, 随着手术技术提高, 手术后的并发症、死亡率明显下降^[1]。湖南省人民医院肝胆医院胰头癌施行胰头十二指肠切除的切除率95%, 1990-01/2007-12先后施行胰头十二指肠切除术604例, 术中平均失血量212 mL, 术中输血率4.7%, 平均手术时间6.1 h, 手术死亡率0.3%(2/604)。胰头十二指肠切除术是一种危险、复杂而安全的手术, 现以胰头癌为例, 介绍胰头十二指肠切除术中的几个问题。

1 切除可能性的评估

胰头十二指肠切除术是腹部最复杂的手术之一, 对生理扰乱大, 应严格掌握手术指征、时机, 对此应“六亲不认”, 要尽量减少阴性剖腹探查率。因此, 术前对切除可能性的准确判断至关重要^[2]。(1)临床表现: 年龄不是手术禁忌, 而顽固性的胸背部疼痛, 尤以夜间为剧者; 腹部可扪及胰肿块者; 出现腹水者多失去根治性切除的机会。

背景资料

1935年, Whipple首先施行胰头十二指肠切除术。随着手术技术提高, 手术后的并发症、死亡率明显下降。目前, 此手术已在世界各地广泛开展, 但由于手术复杂和困难, 此手术仍然是一种危险的手术。

同行评议者
傅华群, 教授, 南昌大学第二附属医院普外科

研发前沿
过“三关”即通过胰头与下腔静脉、腹主动脉、胰头沟与肠系膜上静脉、胰头沟与门静脉的间隙。一般情况下能否通过“三关”是术中确定能否施行胰头十二指肠切除的标准。

合并肺、心、肾功能不全者,多难于承受本手术。(2)CT:是目前判断胰头癌切除的可能性常用的重要手段。以下情况提示难以切除:胰头癌肿块直径>6 cm;腹水;肝内转移灶存在,肠系膜血管周及腹主动脉旁淋巴结肿大、转移;门静脉、肠系膜上静脉变形(血管阿米巴征),受累的血管越长,血管变形越明显,手术越困难;胰头癌块巨大,门静脉、肠系膜上静脉位置推移越明显,手术难度越大。(3)十二指肠乳头腺癌多能切除,胰腺炎、胰腺结石多切除困难。

2 过“三关”

过“三关”即通过胰头与下腔静脉、腹主动脉、胰头沟与肠系膜上静脉、胰头沟与门静脉的间隙。一般情况下能否通过“三关”是术中确定能否施行胰头十二指肠切除的标准。过第一关:98%的病能顺利通过。过第二关:(1)发现肠系膜上静脉是过第二关的关键步骤,发现肠系膜上静脉的途径有5条,其中常途径2条:经右路是显露肠系膜上静脉的捷径,约85%的病例可获得满意的快速显现;结肠中静脉是显露肠系膜上静脉的指路碑。(2)敞开肠系膜上静脉鞘,是逆行沟通第二关的诀窍。(3)当逆行显露胰头沟内肠系膜上静脉困难时,可顺行沟通门静脉与胰头沟间隙,而后顺逆结合,显现胰头沟内肠系膜上静脉段。过第三关:常因肝总动脉周围淋巴结肿大、胰腺及胆管炎症致使过第三关困难。(1)循肝固有动脉显现胃十二指肠动脉,于其起始处予以结扎切断。(2)牵开或横断总胆管,显现门静脉,以直角弯钳紧贴门静脉前壁顺行沟通胃十二指肠动脉与门静脉间隙,显现游离胃十二指肠动脉。(3)术者食指置于胰头沟上凹处门静脉作引导,以大弯钳逆行沟通胰头沟。

3 出血和止血

胰头十二指肠切除术中难免出血,关键在于防止出血及出血时采用恰当方法止血。防止出血:(1)游离胰头十二指肠,术者握其于手中,是通过第二、三关的安全的手段,是防止出血的重要措施;(2)胰头“区域围堰”,即在处理难于显现或难于游离的肠系膜上静脉、门静脉之前,先将门静脉、肠系膜上静脉、脾静脉套带(图1),便于在局部形成一无血区域,使肠系膜上静脉、门静脉的显露剥离得以安全进行。彭氏称为“胰门三头控制术”^[3];(3)一旦肠系膜上静脉、门静脉破裂出血,宜先指压,而不是在血泊里盲目钳夹,否则将造成血管更大的损伤,甚至不可收拾。出血的部位

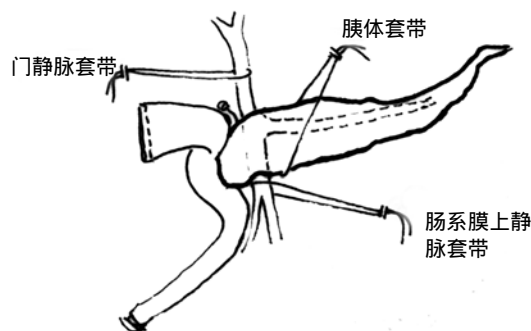


图1 胰头“围堰”。

不同,止血的方法亦不同:(1)胰钩突汇入静脉撕裂出血。胰钩突汇入静脉一般5-7支,血管壁如塑料薄膜,而且十分脆,一旦撕裂,出血较多,这些血管周围多十分疏松,宜结扎、切断。出血后立即指压,看清门静脉侧出血点,以4-0号无损伤线缝扎。胰腺侧出血点,以圆针丝线“8”字缝扎。(2)门静脉、肠系膜上静脉撕裂出血。立即指压局部,看清出血点,以血管艾利氏钳钳夹,或心耳钳钳夹,再以4-0号无损伤缝线,缝扎止血。(3)断胰颈出血。为防止出血,胰头侧胰颈宜以7号圆针丝线作贯穿缝扎,胰体尾侧分别以4号圆针丝线缝扎胰颈上下缘的胰腺背上下动脉,以电刀断胰颈,一般不出血,少数出血可电凝,亦可缝扎。(4)离断胰纤维板出血。离断胰纤维板出血主要是胰十二指肠下动脉,胰十二指肠下动脉一旦撕裂,出血较猛,而且挛缩,处理不慎,可损伤肠系膜上动脉,致全部小肠缺血、坏死。首先在于防止出血,方法是:术者(站左侧)左手握胰头向右牵拉纤维板,助手持静脉拉钩将门静脉牵向左侧,显露肠系膜上动脉并切开其动脉鞘,在直视下钳夹或缝扎胰十二指肠下动脉,再切断之;一旦出血,扪触、辨清肠系膜上动脉,局部以血管艾利氏钳钳夹,再以圆针丝线缝扎。如果止血效果不好,宜钳夹出血处肠系膜上动脉远近两端,显露肠系膜上动脉及胰十二指肠下动脉的断端,予以修补、缝扎;肠系膜上静脉或门静脉毁损的长度<2 cm,可作局部切除,端-端吻合。

4 断胰颈与纤维板

断胰颈:(1)约90%的病过“三关”后断胰颈。以圆针丝线缝扎胰颈的二侧,以大圆刀片刮切或电凝切断;95%的病胰管在胰颈的中上1/3交界处,粗大的胰管不要急于插入导管,以免妨碍术野。胰腺的导管插入的深度约为10 cm,以可吸收肠线固定。当胰管过分纤细,找不到,亦可不找。(2)胰头的良性病变。只要辨清门静脉和

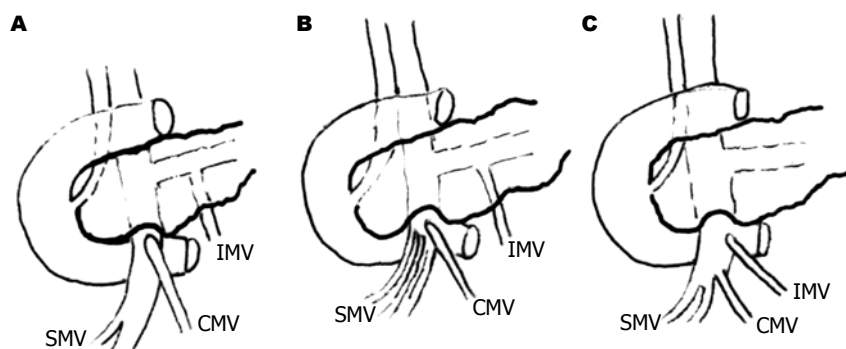


图 2 肠系膜上静脉、结肠中静脉、肠系膜下静脉变异. A: 正常; B: 肠系膜上静脉变异; C: 肠系膜下静脉变异.

应用要点
本文介绍十二指肠切除术中必须注意的一些关键问题, 为临床医生施行此手术提供借鉴.

肠系膜上静脉右侧缘, 在其联线的右侧以电凝切断, 化整为零, 再作胰颈的切除. 断胰纤维板: 显现剥离门静脉、肠系膜上静脉是断胰纤维板的前提, 断胰纤维板前一定要扣触清楚肠系膜上动脉、胰十二指肠下动脉, 离断胰纤维方法分“四边法”切断、钳夹法切断二种, 前者安全、出血少, 后者快捷.

5 脉管的变异

这里所涉及的脉管变异是指胰管、动脉、肠系膜上静脉、结肠中静脉、肠系膜下静脉的变异, 其总的发生率约为35%, 临床工作者必须熟悉这些变异情况. (1)胰管: 主要表现胰管位置的变异, 有5%(30/604)的病例胰管位于胰颈下1/3; 0.5%(3/604)胰颈部双胰管. (2)门静脉前壁为裸区, 但有3%(18/604)的患者有1支胰颈的静脉汇入门静脉前方. (3)肠系膜上静脉外科干长约3 cm, 肠系膜下静脉汇入脾静脉. 结肠中静脉于胰头沟下凹处汇入肠系膜上静脉, 约10%(61/604)的病例表现出变异(61/604): 肠系膜上静脉外科干短或消失; 肠系膜下静脉汇入肠系膜上静脉; 结肠中静脉汇入口远离胰头沟下凹(图2). (4)门静脉、肠系膜上静脉呈“弓”形, 这与胰头肿块的压迫推移相关(图3). (5)肝右动脉、胰腺动脉: 多数情况, 肝右动脉发自肝固有动脉, 胰动脉来自肝总动脉和肠系膜上动脉, 但变异很大. 临床上以肝右动脉发自肠系膜上动脉多见, 作者曾遇到一例肝固有动脉源自肠系膜上动脉的二根分支, 此二分支包绕肠系膜上静脉后合二为一行于胰颈的腹面, 于胰的上缘分为肝左动脉和肝右动脉, 术中险些将其行走于胰颈腹面的部分当胃十二指肠动脉结扎. 因此结扎、切断胃十二指肠动脉时, 一定要试夹、扣触是否继续有肝动脉的搏动存在, 弄清动脉的来龙去脉后才作处理.

6 血管骨骼化

认真彻底地血管骨骼化, 能延长患者的生存期

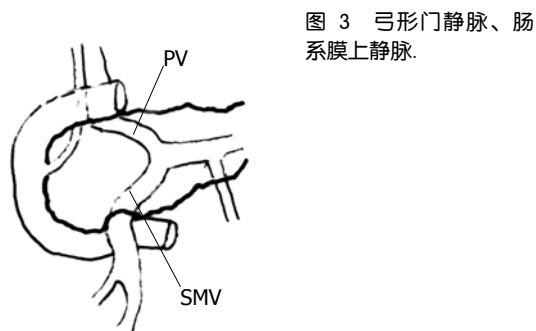


图 3 弓形门静脉、肠系膜上静脉.

已成共识^[4-7]. (1)胰头癌, 施胰头十二指肠切除. 血管骨骼化主要包括裸露门静脉、肝动脉、肠系膜上静脉外科干以及肠系膜上动脉. 剔除其周围的脂肪、淋巴结及纤维结缔组织, 甚至包括下腔静脉、腹主动脉、肝总动脉、腹腔动脉干、脾动脉的骨骼化^[8]. (2)血管骨骼化, 一定要打开血管鞘, 剥去血管的“外衣”, 骨骼化才方便易行. (3)门静脉骨骼化: 分开门静脉与肝固有动脉间的疏松结缔组织, 剥离裸露门静脉, 以线带牵开, 注意在门静脉左侧常有胃右静脉汇入, 应予以结扎、切断. (4)腹腔动脉干、肝总动脉、肝固有动脉及肝左右动脉骨骼化: 一般先打开肝固有动脉前壁的鞘膜, 紧贴血管壁剥离, 套以线带牵拉, 然后顺藤摸瓜裸露其他血管, 剔除周围的一切淋巴结、神经、脂肪组织. 注意作肝总动脉、腹腔动脉干骨骼化时, 辨清胰腺上缘, 仔细结扎淋巴结营养血管. (5)肠系膜上动脉清理: 为防止淋巴漏、乳糜腹水, 作者主张裸露肠系膜上动脉右侧. 具体操作应注意: 以静脉拉钩或线带分别将门静脉、肠系膜上静脉向左牵开, 以显露肠系膜上动脉; 切开肠系膜上动脉前壁血管鞘, 顺势剥离、裸露其右侧; 直视下看清胰十二指肠下动脉, 于起始部予以缝扎、切断.

7 消化道重建

胰头十二指肠切除后, 消化道重建的方式很多, 目前常用的方式是胰空肠或胰胃吻合、胆管空

同行评价
本文总结了1990年至今行胰十二指肠切除术的临床经验,实用性较强,对临床工作具有指导价值,但表达过于口语化。

肠吻合及胃空肠吻合。(1)胰空肠或胰胃吻合:我们1990年至今施行胰胃吻合180例、胰空肠吻合424例,胰漏发生率各为1%,两组无明显差别。胰空肠吻合又分胰空肠端-端吻合和端侧吻合、胰胃为端侧吻合,不管哪种方式吻合,其成功的关键在胰残端一定要套入空肠或胃内,胰管内置管外引流有助于防止胰漏的发生。(2)胆管空肠吻合:胆管空肠吻合为端-侧吻合,宜以无损伤缝线作一层、外翻、间断缝合,只要情况允许,胆管内无须一律放置T形管引流。湖南省人民医院一组604例胰头十二指肠切除术,胆管未放T形管者占11%(67/604)。(3)胃空肠吻合:可以吻合器进行,但目前主要用手工吻合。前者缩短手术时间,后者节省住院经费。(4)消化道重建:应注意采用微创外科技术。合理、正常使用医用创面封闭胶,可有效地降低手术的并发症。

8 扩大根治术

胰头十二指肠切除技术不断提高、完善,许多过去认为无法切除的病例,现亦可顺利进行,所谓扩大根治术、超扩大根治术。门静脉、肠系膜静脉切除吻合^[9],在适当的病例可以进行,但“扩大根治或超根治术”并不延长患者的生存期。加强科间协作,综合治疗,可延长患者的生存时间。

参考文献

- 1 苗毅. 恶性梗阻性黄疸-历史沿革对我们的启示. 中国实用外科杂志 2007; 27: 766-767
- 2 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 胰腺癌诊治指南. 中国实用外科杂志 2007; 27: 671-673
- 3 彭淑牖, 洪德飞, 许斌, 严力锋, 王建伟, 刘颖斌, 李江涛, 钱浩然, 牟一平, 蔡秀军. 简易胰门三头控制技术在困难型胰十二指肠切除术中的应用. 中华外科杂志 2007; 45: 1466-1468
- 4 Pawlik TM, Gleisner AL, Cameron JL, Winter JM, Assumpcao L, Lillemoe KD, Wolfgang C, Hruban RH, Schulick RD, Yeo CJ, Choti MA. Prognostic relevance of lymph node ratio following pancreaticoduodenectomy for pancreatic cancer. *Surgery* 2007; 141: 610-618
- 5 Doi R, Kami K, Ito D, Fujimoto K, Kawaguchi Y, Wada M, Kogire M, Hosotani R, Imamura M, Uemoto S. Prognostic implication of para-aortic lymph node metastasis in resectable pancreatic cancer. *World J Surg* 2007; 31: 147-154
- 6 Todoroki T, Koike N, Morishita Y, Kawamoto T, Ohkohchi N, Shoda J, Fukuda Y, Takahashi H. Patterns and predictors of failure after curative resections of carcinoma of the ampulla of Vater. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 1176-1183
- 7 Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Ohge H, Sueda T. Pancreatoduodenectomy for distal cholangiocarcinoma: prognostic impact of lymph node metastasis. *World J Surg* 2007; 31: 337-342; discussion 343-344
- 8 张威, 邵钦树, 叶再元, 李曙光. 胰头癌根治术后腹膜后神经、淋巴、软组织廓清的临床意义. 中华普通外科杂志 2007; 22: 233-235
- 9 苗毅, 戴存才. 胰腺癌根治联合血管切除及血管重建. 中国实用外科杂志 2007; 27: 525-527

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。(常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

shRNA干扰SMYD3对肝癌细胞c-Myc表达及凋亡的影响

刘鑫, 陈立波, 叶进, 江军, 何军, 徐肇耀, 钱伟

刘鑫, 叶进, 江军, 钱伟, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022
陈立波, 何军, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科 湖北省武汉市 430022
徐肇耀, 中山大学附属第二医院肝胆外科 广东省广州市 510120
刘鑫, 华中科技大学同济医学院在读硕士, 主要从事肝病(肝癌)研究。
作者贡献分布: 刘鑫和叶进对此文所作贡献均等; 此课题由刘鑫、陈立波、叶进、江军及何军设计; 研究过程由刘鑫、江军、何军及钱伟操作; 所用新试剂及分析工具由徐肇耀和钱伟完成; 数据分析由刘鑫、江军和何军完成; 本论文写作由刘鑫、陈立波及叶进完成。
通讯作者: 叶进, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. yejin8688@sina.com
收稿日期: 2007-11-19 修回日期: 2008-03-01

Effects of shRNA-induced SMYD3 silence on c-Myc expression and apoptosis of HepG2 cells

Xin Liu, Li-Bo Chen, Jin Ye, Jun Jiang, Jun-Yao Xu, Wei Qian

Xin Liu, Jin Ye, Jun Jiang, Wei Qian, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Li-Bo Chen, Jun He, Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Jun-Yao Xu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China
Correspondence to: Jin Ye, Department of Gastroenterology, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. yejin8688@sina.com
Received: 2007-11-19 Revised: 2008-03-01

Abstract

AIM: To observe the c-Myc gene expression and apoptosis of HepG2 cells after SET and MYND-domain containing 3 (SMYD3) silence induced by short hairpin RNA.

METHODS: Three short hairpin RNA interference plasmids targeting SMYD3 were prepared as 3 groups: Pgenesil-1-s1 (with interfering effect), Pgenesil-1-s2 (with interfering effect), and Pgenesil-1-hk (negative control plasmid, without interfering effect). Meanwhile, an empty control

group was also designed. Transfection was performed using the Lipofectamine2000 liposome. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was employed to detect the expression of SMYD3 and c-Myc gene 24, 48 and 72 h after transfection. Flow cytometry (FCM) was used to detect cell apoptosis in each group.

RESULTS: SMYD3 and c-Myc gene were strongly expressed in HepG2 cells. The expression of SMYD3 gene was significantly inhibited after 24-, 48- and 72-h transfection ($F = 67.46$, $P < 0.01$; $F = 176.79$, $P < 0.01$; $F = 175.28$, $P < 0.01$). At the same time, c-Myc gene mRNA expression was down-regulated in the Pgenesil-1 transfection group as compared with that in the Pgenesil-1-hk group ($F = 11.58$, $P = 0.009$; $F = 126.41$, $P < 0.01$; $F = 261.25$, $P < 0.01$). Moreover, the early apoptosis rate was significantly higher in the Pgenesil-1-s1 or Pgenesil-1-s2 group than that in the Pgenesil-1-hk group (LSD- $t = -13.58$, -12.62 ; both $P < 0.01$) and the empty control group (LSD- $t = -18.62$, -17.67 ; $P < 0.01$).

CONCLUSION: Short hairpin RNA interference targeting SMYD3 may inhibit the expression of c-Myc gene in HepG2 cells, thus promoting the apoptosis of HepG2 cells.

Key Words: SET and MYND-domain containing 3; c-Myc; Short hairpin RNA; Apoptosis; Hepatoma

Liu X, Chen LB, Ye J, Jiang J, He J, Xu JY, Qian W. Effects of shRNA-induced SMYD3 silence on c-Myc expression and apoptosis of HepG2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1373-1377

摘要

目的: 观察SMYD3(SET and MYND-domain containing 3)基因沉默后c-Myc的表达及对HepG2细胞凋亡的影响。

方法: 构建针对SMYD3的shRNA干扰质粒Pgenesil-1-s1、Pgenesil-1-s2和阴性对照质粒Pgenesil-1-hk, 同时设空白对照组, 采用Lipofectamine2000脂质体介导转染法转染质粒。转染后24、48、72 h, RT-PCR检测HepG2

背景资料

SMYD3是一种具有组蛋白甲基化功能的蛋白, 能够使H3K4发生2倍(di-)和3倍(tri-)的甲基化, 激活下游基因的转录。c-Myc基因是一个原癌基因, 有多种癌的发生密切相关, 但其表达调控机制不十分清楚。

同行评议者
陈建荣, 副教授,
南通大学第二附
属医院急诊医学
中心

相关报道

2004年, Hama-moto *et al*首次报道SMYD3具有组蛋白甲基酶活性, 能结合靶基因DNA启动子序列5'-CCCTCC-3'、5'-GGAGGG-3'激活靶基因的表达, 与多种肿瘤发生发展有关。

细胞SMYD3和c-Myc的表达情况. 流式细胞术法检测各组细胞的凋亡。

结果: SMYD3、c-Myc基因在HepG2细胞中强表达. RT-PCR显示Pgenesil-1-s1、Pgenesil-1-s2转染组与阴性对照质粒转染组Pgenesil-1-hk转染24、48、72 h后相比, SMYD3基因表达均明显受到抑制($F = 67.46, P < 0.01$; $F = 176.79, P < 0.01$; $F = 175.28, P < 0.01$), 同时c-Myc表达下调(三组之间: $F = 11.58, P = 0.009$; $F = 126.41, P < 0.01$; $F = 261.25, P < 0.01$). Pgenesil-1-s1、Pgenesil-1-s2转染组细胞早期凋亡率与Pgenesil-1-hk转染组(LSD- $t = -13.58, -12.62$, 均 $P < 0.01$)、空白组(LSD- $t = -18.62, -17.67$, 均 $P < 0.01$)相比有显著性差异。

结论: RNA干扰技术特异性沉默HepG2细胞SMYD3基因后, 抑制了c-Myc的表达, 促进了HepG2细胞的凋亡。

关键词: SMYD3基因; c-Myc; 短发夹RNA; 凋亡; 肝癌

刘鑫, 陈立波, 叶进, 江军, 何军, 徐莹耀, 钱伟. shRNA干扰SMYD3对肝癌细胞c-Myc表达及凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1373-1377

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1373.asp>

0 引言

组蛋白修饰指通过对组蛋白特定残基进行翻译后修饰, 如甲基化、乙酰化和磷酸化等, 调控染色体的结构、调节基因的转录激活和抑制等^[1-3]. 组蛋白甲基化是组蛋白修饰的一个重要方式, 对基因转录的调控具有重要作用. 例如组蛋白H3的第9赖氨酸残基(H3K9)的甲基化具有抑制基因转录的作用, 而组蛋白H3的第4赖氨酸残基(H3K4)的甲基化具有激活基因转录的功能^[4-6]. SMYD3是一种具有组蛋白甲基化功能的蛋白, 能够使H3K4发生2倍(di-)和3倍(tri-)的甲基化, 激活下游基因的转录, 能够抑制肿瘤细胞的凋亡、促进细胞增殖、促进细胞黏附和迁移等^[7-9]. 我们根据RNA干扰原理^[10-11], 以强表达SMYD3和c-Myc基因的HepG2细胞为研究对象, 设计、构建、筛选针对SMYD3基因的shRNA, 在体外研究肝癌细胞中SMYD3对c-Myc基因作用以及对肝癌细胞凋亡的影响, 探讨shRNA沉默SMYD3表达治疗肝癌的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞株HepG2购自中国科学院上海

细胞库, 细胞在含100 mL/L小牛血清(美国Gibco公司)的DMEM培养基、20 mL/L CO₂、37℃条件下培养. 分为Pgenesil-1-s1转染组、Pgenesil-1-s2和Pgenesil-1-hk, 空白组. 由徐莹耀博士赠送构建好并经酶切鉴定的重组质粒Pgenesil-1-s1、Pgenesil-1-s2、Pgenesil-1-hk. 重组质粒图谱请参考文献[12]. Pgenesil-1-s1、Pgenesil-1-s2分别干扰SMYD3 mRNA 302-323、267-288之间核苷酸Pgenesil-1-s1正义5'-GATCCATACTGTAGTGCTAAGTGTTC AAGACGACACACTTAGCACTACAGTATTTTGTGCGACA-3', 反义5'-AGCTTGTGCGACAAAAAATACTGTAGTGCTAAGTGTGCTCTTGAAACACTTAGCACTACAGTATG-3'; Pgenesil-1-s2正义5'-GATCCGCTGATGCGATGCTCTCAGTTCAAGACGCTGAGAGCATCGCATCAGCTTTTGTGCGACA-3', 反义5'-AGCTTGTGCGACAAAAAGCTGATGCGATGCTCTCAGCGTCTTGAAGTGAAGAGCATCGCATCAGCG-3'; Pgenesil-1-hk不针对任何SMYD3 mRNA序列, 正义: 5'-GATCCGACTTCATAAGGCGCATGCTTCAAGACGGCATGCGCCTTATGAAGTCTTTTGTGCGACA-3', 反义: 5'-AGCTTGTGCGACAAAAAGACTTCATAAGGCGCATGCCGTCTTGAAGCATGCGCCTTATGAAGTCG-3'. 采用Lipofectamine2000脂质体(美国Invitrogen公司)进行转染, 转染前调整HepG2细胞密度为 2×10^5 /L, 以每孔2 mL接种于6孔板, 待细胞增至50%时, 将质粒、脂质体复合物转染至细胞中, 具体操作参照说明书。

1.2 方法

1.2.1 HepG2细胞中SMYD3和c-Myc基因mRNA表达的测定: 用TRIzol提取HepG2细胞的总mRNA, 逆转录反应: DEPC水5.5 μ L, mRNA 2 μ g, Oligo(dt)2 μ g, dNTP(10 mmol/L)2.0 μ L, MMLV(200 MU/L)1.0 μ L, Rnasin(40 MU/L)0.5 μ L, 5 \times Buffer 4.0 μ L, 经42℃ 1 h, 95℃ 5 min反应后, 收集cDNA -20℃保存. SMYD3、c-Myc、 β -actin引物用Primer5.0设计, 由上海英俊生物技术有限公司合成. SMYD3上游: 5'-TATCCTCCA GACTCCGTTCG-3', 下游: 5'-TCCATACTTGCTCATCACCAG-3', PCR产物为562 bp; c-Myc上游: 5'-GGGGCTTTATCTAACTCGCG-3', 下游: 5'-CTATGGGCAAAGTTTCGTG-3', PCR产物为222 bp; β -actin上游: 5'-GTGGACATCCGCAAAGAC-3', 下游: 5'-AAAGGGTGTAAACGCAACTAA-3', PCR产物为192 bp. PCR反应体系为: DEPC水

创新盘点

本文首次探讨肝癌HepG2细胞SMYD3可能通过调控c-Myc基因参与肝癌的发生发展。

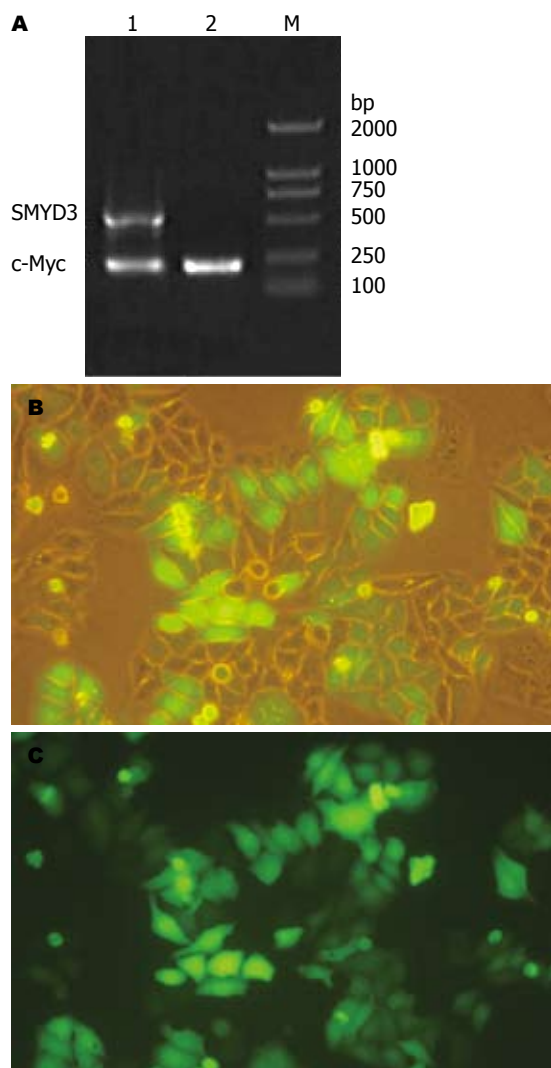


图 1 HepG2细胞中SMYD3、c-Myc的表达。A: 电泳图; 1: SMYD3、c-Myc; 2: β -actin; M: marker 2000 bp; B: 质粒转染24 h荧光倒置显微镜; C: 关闭可见光。

16.4 μ L、10 \times Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L $MgCl_2$ 2.0 μ L, dNTP(10 mmol/L)1.0 μ L, cDNA 2.0 μ L, Taq酶(83.35 mkat/L)0.5 μ L, 上游引物、下游引物(50 μ mol/L)各0.3 μ L。PCR仪进行反应, 参数设置为: 94 $^{\circ}C$ 5 min, 变性94 $^{\circ}C$ 30 s, 退火SMYD3、c-Myc均为53 $^{\circ}C$ 30 s、 β -actin为56 $^{\circ}C$ 30 s, 延伸72 $^{\circ}C$ 30 s, 循环35次, 最后72 $^{\circ}C$ 延伸7 min。分别取5 μ L PCR产物加样至12 g/L琼脂糖凝胶上电泳, 用凝胶图像成像系统拍摄并分析结果。

1.2.2 HepG2细胞凋亡率的检测: 瞬时转染24 h后, 收集各组细胞, 加Annexin V-PE和7-AAD荧光染料(晶美生物工程有限公司), 具体操作按试剂盒说明书进行。1 h内流式细胞仪(FACSsort, Becton Dickinson)检测细胞早期凋亡率。

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 采用SPSS13.0软件进行方差分析(ANOVA)LSD- t 检验。

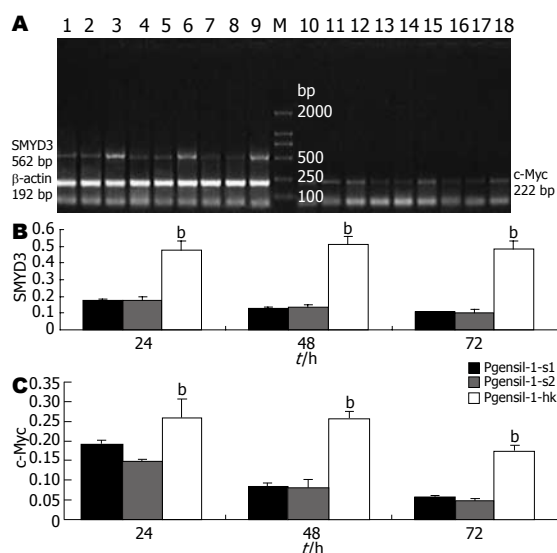


图 2 质粒转染HepG2细胞后SMYD3和c-Myc的RT-PCR结果。A: 电泳图; B: SMYD3 mRNA表达量; C: c-Myc mRNA表达量。1, 10: Pgenesil-1-s1转染24 h; 2, 11: Pgenesil-1-s2转染24 h; 3, 12: Pgenesil-1-hk转染24 h; 4, 13: Pgenesil-1-s1转染48 h; 5, 14: Pgenesil-1-s2转染48 h; 6, 15: Pgenesil-1-hk转染48 h; 7, 16: Pgenesil-1-s1转染72 h; 8, 17: Pgenesil-1-s2转染72 h; 9, 18: Pgenesil-1-hk转染72 h; M: marker 2000 bp; $^bP<0.01$ 。

2 结果

2.1 HepG2细胞中SMYD3、c-Myc的表达 RT-PCR结果显示SMYD3、c-Myc基因在HepG2细胞中强表达(图1A)HepG2细胞转染24 h后荧光(图1B-C)。

2.2 shRNA干扰SMYD3对c-Myc基因表达的影响 粒转染HepG2细胞24、48、72 h后, 分别提取RNA, 通过RT-PCR检测各组中两个基因的表达情况, 结果示: shRNA转染后, SMYD3基因表达均明显受抑, 同时c-Myc表达下调。24、48、72 h各组SMYD3 mRNA及c-Myc mRNA的光密度值/ β -actin mRNA的光密度值, 各时间点Pgenesil-1-s1组、Pgenesil-1-s2组SMYD3基因表达较Pgenesil-1-hk组均明显下调, 差异具有统计学意义(24 h: 三组之间, 总 $F = 67.46$, s1与hk组LSD- $t = -0.300$, s2与hk组LSD- $t = -0.300$, P 均 <0.01 ; 48 h: 三组之间, 总 $F = 176.79$, s1与hk组LSD- $t = -0.378$, s2与hk组LSD- $t = -0.370$, P 均 <0.01 ; 72 h: 三组之间, 总 $F = 175.28$, s1与hk组LSD- $t = -0.376$, s2与hk组LSD- $t = -0.380$, P 均 <0.01); 各时间点Pgenesil-1-s1组、Pgenesil-1-s2组c-Myc基因表达较Pgenesil-1-hk组也都明显降低, 有统计学差异(24 h: 三组之间, 总 $F = 11.58$, $P = 0.009$, s1与hk组LSD- $t = -0.068$, $P = 0.029$, s2与hk组LSD- $t = -0.113$, $P = 0.003$; 48 h: 三组之间,

应用要点
本研究表明应用RNA干扰技术下调HepG2细胞中SMYD3的表达, 可调控c-Myc基因的表达, 促进肿瘤细胞凋亡, 为将来RNA干扰技术应用提供依据, 并充实了c-Myc基因表达调控的理论基础。

名词解释

1 表观遗传学: 是指在基因的DNA序列没有发生改变的情况下, 基因功能发生了可遗传的变化, 并最终导致了表型的变化。

2 组蛋白修饰: 指通过对组蛋白特定残基进行翻译后修饰, 如甲基化、乙酰化、磷酸化等, 调控染色体的结构、调节基因的转录激活和抑制等。

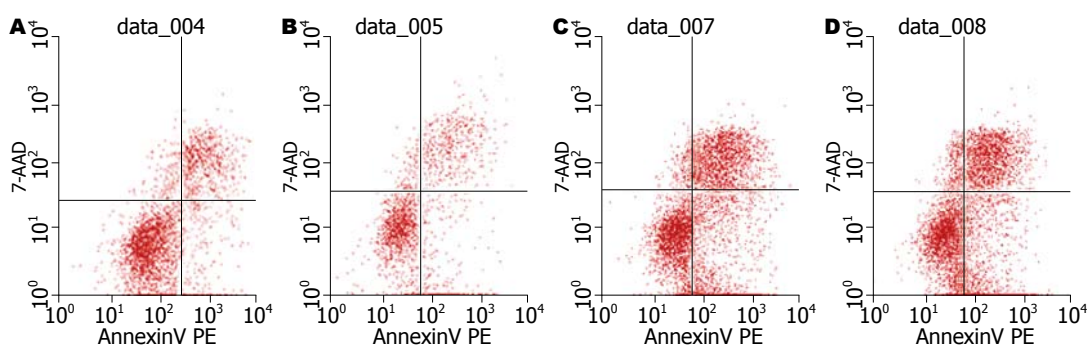


图3 shRNA干扰SMYD3后诱导HepG2细胞凋亡。A: 空白组; B: Pgenesil-1-hk转染; C: Pgenesil-1-s1转染; D: Pgenesil-1-s2转染。

总 $F = 126.41$, s1与hk组LSD- $t = -0.175$, s2与hk组LSD- $t = -0.178$, P 均 <0.01 ; 72 h: 三组之间, 总 $F = 261.25$, s1与hk组LSD- $t = -0.117$, s2与hk组LSD- $t = -0.125$, P 均 <0.01 , 图2)。

2.3 转染24h细胞凋亡的情况 Pgenesil-1-s1、Pgenesil-1-s2转染组细胞早期凋亡率分别为 $27.16\% \pm 0.57\%$ 、 $26.20\% \pm 0.71\%$ 两组间无明显差异(LSD- $t = -0.957$, $P > 0.05$), 与Pgenesil-1-hk转染组 $13.58\% \pm 0.50\%$ (LSD- t 分别为-13.58、-12.62, P 均 <0.01)和空白组 $8.53\% \pm 0.14\%$ (LSD- t 分别为-18.62、-17.67, P 均 <0.01)相比, 差异均有显著性。Pgenesil-1-s1、Pgenesil-1-s2转染组早期凋亡明显增加(图3)。

3 讨论

组蛋白甲基化转移酶能够使DNA组蛋白的氨基酸残基发生甲基化, 不但使染色质的结构发生变化, 而且更为重要的是能够从表观遗传学水平介导下游基因的转录激活或转录抑制。新近发现的SMYD3基因所编码的蛋白是一种能够催化H3K4发生2倍和3倍的甲基化, 介导下游基因的转录激活, 在胆管癌、乳腺癌和肝癌组织中高表达, 与肿瘤的发生发展关系密切^[12-14]。SMYD3基因有两个重要的结构域SET和zf-MYND, SET具有甲基化转移酶功能^[15-16], SMYD3的SET结构域能特异性催化H3K4发生甲基化, zf-MYND能够特异地与靶基因启动子区域的基因序列5'-CCCTCC-3'和5'-GGAGGG-3'相结合, zf-MYND结合靶基因后, SET结构域发挥其H3K4甲基化转移酶功能使靶基因启动子H3K4发生2倍(di-)和3倍(tri-)的甲基化, 激活靶基因转录^[17,17-18]。

c-Myc基因是一个十分重要的原癌基因, 在许多恶性肿瘤中被激活, 肿瘤组织中c-Myc基因的表达显著增加^[19]。研究发现通过shRNA干

扰肝癌细胞HepG2细胞中c-Myc基因的表达, 可以明显抑制细胞的增殖, 促进HepG2细胞的凋亡^[20-21]。但是c-Myc基因被转录激活的机制复杂, 目前研究认为, 他是Wnt/ β -catenin的靶基因之一, β -catenin与T细胞转录因子4/淋巴增强因子(TCF-4/LEF)等结合形成复合物后将c-Myc基因激活^[22-24], 但是该复合物对c-Myc基因表达的具体调控机制还不清楚。

我们通过应用短发夹RNA Pgenesil-1-s1、Pgenesil-1-s2和阴性对照质粒Pgenesil-1-hk, 成功转染HepG2细胞24、48、72 h后, 结果显示Pgenesil-1-s1组、Pgenesil-1-s2组SMYD3表达明显受抑制, 而Pgenesil-1-hk组SMYD3的表达水平没有明显改变, 各组的 β -actin没有明显变化, 说明了shRNA干扰的有效性和特异性。经Pgenesil-1-s1、Pgenesil-1-s2转染的HepG2细胞, Annexin V-PE和7-AAD荧光染料双标后, 流式细胞仪检测发现早期凋亡明显增加, 同时RT-PCR测得c-Myc基因表达明显下降, 这预示着SMYD3基因的沉默可以使肝癌细胞凋亡增加, SMYD3可能通过直接或间接激活c-Myc基因, 促进肝癌细胞的增殖和肿瘤发展。所谓直接激活指SMYD3通过其组蛋白甲基化功能使c-Myc基因的启动子区域的H3K4发生了2倍或3倍的甲基化, 从而使c-Myc基因激活, 因为在c-Myc基因的启动子区域存在5'-CCCTCC-3'和5'-GGAGGG-3'序列^[25]; 间接激活指SMYD3对c-Myc基因的上游基因进行调控, 影响c-Myc基因的表达, 其具体机制将是今后研究的重点。结果也提示设计和应用针对SMYD3的特异性shRNA治疗肝癌的可行性, 为肝癌的治疗提供新的方向。

4 参考文献

- 1 An W. Histone acetylation and methylation: combinatorial players for transcriptional regulation.

- Subcell Biochem* 2007; 41: 351-369
- 2 Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol* 2004; 14: R546-R551
 - 3 Ito T. Role of histone modification in chromatin dynamics. *J Biochem* 2007; 141: 609-614
 - 4 Peters AH, Mermoud JE, O'Carroll D, Pagani M, Schweizer D, Brockdorff N, Jenuwein T. Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin. *Nat Genet* 2002; 30: 77-80
 - 5 Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 2002; 419: 407-411
 - 6 Wang H, Cao R, Xia L, Erdjument-Bromage H, Borchers C, Tempst P, Zhang Y. Purification and functional characterization of a histone H3-lysine 4-specific methyltransferase. *Mol Cell* 2001; 8: 1207-1217
 - 7 Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 731-740
 - 8 Luo XG, Ding Y, Zhou QF, Ye L, Wang SZ, Xi T. SET and MYND domain-containing protein 3 decreases sensitivity to dexamethasone and stimulates cell adhesion and migration in NIH3T3 cells. *J Biosci Bioeng* 2007; 103: 444-450
 - 9 Xu JY, Chen LB, Xu JY, Yang Z, Wei HY, Xu RH. Inhibition of SMYD3 gene expression by RNA interference induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Ai Zheng* 2006; 25: 526-532
 - 10 Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 418: 244-251
 - 11 Devi GR. siRNA-based approaches in cancer therapy. *Cancer Gene Ther* 2006; 13: 819-829
 - 12 Xu JY, Chen LB, Xu JY, Yang Z, Xu RH, Wei HY. Experimental research of therapeutic effect on hepatocellular carcinoma of targeting SMYD3 gene inhibition by RNA interference. *Zhonghua Waike Zazhi* 2006; 44: 481-484
 - 13 Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y, Furukawa Y. Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci* 2006; 97: 113-118
 - 14 Frank B, Hemminki K, Wappenschmidt B, Klaes R, Meindl A, Schmutzler RK, Bugert P, Untch M, Bartram CR, Burwinkel B. Variable number of tandem repeats polymorphism in the SMYD3 promoter region and the risk of familial breast cancer. *Int J Cancer* 2006; 118: 2917-2918
 - 15 Qian C, Zhou MM. SET domain protein lysine methyltransferases: Structure, specificity and catalysis. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 2755-2763
 - 16 Marmorstein R. Structure of SET domain proteins: a new twist on histone methylation. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 59-62
 - 17 Kunizaki M, Hamamoto R, Silva FP, Yamaguchi K, Nagayasu T, Shibuya M, Nakamura Y, Furukawa Y. The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3. *Cancer Res* 2007; 67: 10759-10765
 - 18 Liu C, Fang X, Ge Z, Jalink M, Kyo S, Bjorkholm M, Gruber A, Sjoberg J, Xu D. The telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene is a direct target of the histone methyltransferase SMYD3. *Cancer Res* 2007; 67: 2626-2631
 - 19 Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 318-330
 - 20 Lin CP, Liu JD, Chow JM, Liu CR, Liu HE. Small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, inhibits proliferation, downregulates human telomerase reverse transcriptase and enhances chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells. *Anticancer Drugs* 2007; 18: 161-170
 - 21 许杨, 王益华, 高纪东. 干扰RNA对HepG2肝癌细胞内源性c-myc表达的抑制作用. *中华肿瘤杂志* 2004; 26: 458-460
 - 22 Cui J, Zhou X, Liu Y, Tang Z, Romeih M. Wnt signaling in hepatocellular carcinoma: analysis of mutation and expression of beta-catenin, T-cell factor-4 and glycogen synthase kinase 3-beta genes. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 280-287
 - 23 Huang WS, Wang JP, Wang T, Fang JY, Lan P, Ma JP. ShRNA-mediated gene silencing of beta-catenin inhibits growth of human colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 6581-6587
 - 24 Zhao DH, Hong JJ, Guo SY, Yang RL, Yuan J, Wen CY, Zhou KY, Li CJ. Aberrant expression and function of TCF4 in the proliferation of hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402. *Cell Res* 2004; 14: 74-80
 - 25 Desjardins E, Hay N. Repeated CT elements bound by zinc finger proteins control the absolute and relative activities of the two principal human c-myc promoters. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 5710-5724

同行评价
本研究具有一定的新颖性和先进性, 结论明确有科学价值, 能较好地反映我国基础研究的先进水平。

编辑 潘伯荣 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志投稿方式

本刊讯 本刊只接受在线投稿, 不接受其他方式的投稿, 如E-mail, 印刷版。在线投稿网址: <http://wcjd.wjgnet.com/> 无法在线提交的通过 submission@wjgnet.com, 电话: 010-8538 1892, 传真: 010-8538-1893 寻求帮助。投稿须知下载网址 <<http://www.wjgnet.com/1009-3079/tgxz.pdf>> 审稿过程平均时间需要14 d。所有的来稿均经2-3位同行专家严格评审, 2位或以上通过为录用, 否则将退稿或修改后再审。接受后的稿件作者需缴纳稿件处理费及发表费, 文章发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。(常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

酵母双杂交法对HBV表面抗原主蛋白候选结合蛋白的筛选

周 飞, 任建林, 卢雅丕, 陈美娅, 陈建民, 刘 明, 施华秀, 张 波, 董 菁

背景资料
近年来, 酵母双杂交技术被成功的引进于蛋白-蛋白相互作用领域。本研究以SHBs为研究靶蛋白, 利用酵母双杂交技术寻找其与肝细胞相互作用的蛋白, 这对于明确HBV致病机制、进入细胞机制具有着重要意义。

周飞, 任建林, 卢雅丕, 陈美娅, 陈建民, 刘明, 施华秀, 张波, 董菁, 厦门大学附属中山医院消化内科; 厦门大学消化疾病研究所; 厦门市消化疾病中心; 福建医科大学教学医院(厦门大学附属中山医院) 福建省厦门市 361004
周飞, 福建医科大学硕士在读, 主要从事乙型肝炎病毒的基础研究。厦门市首批重大疾病科研攻关资助项目, No. WKZ0501
厦门市卫生局医学科研立项资助项目, No. WSK0506
厦门大学引进人才科研启动基金资助项目, No. Z03109
福建省青年科技人才创新项目
福建省高校新世纪人才创新资助项目
作者贡献分布: 此课题设计由周飞, 任建林, 卢雅丕, 陈美娅及董菁完成; 研究过程由周飞, 卢雅丕, 陈美娅, 施华秀及张波操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由陈建民及刘明提供; 数据分析由施华秀, 张波及董菁完成; 本论文写作由周飞及董菁完成。
通讯作者: 董菁, 361004, 福建省厦门市, 厦门大学医学院附属中山医院消化内科。dj@xmzsh.com
电话: 0592-2293170
收稿日期: 2008-01-17 修回日期: 2008-03-08

Screening of hepatocyte proteins interacting with the small surface protein of hepatitis B virus using yeast-two hybrid technique

Fei Zhou, Jian-Lin Ren, Ya-Pi Lu, Mei-Ya Chen, Jian-Min Chen, Ming Liu, Hua-Xiu Shi, Bo Zhang, Jing Dong

Fei Zhou, Jian-Lin Ren, Ya-Pi Lu, Mei-Ya Chen, Jian-Min Chen, Ming Liu, Hua-Xiu Shi, Bo Zhang, Jing Dong, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital of Xiamen University; Gastroenterology Institute of Xiamen University; Gastroenterology Center of Xiamen City; Teaching Hospital of Fujian Medical University (Zhongshan Hospital of Xiamen University) Xiamen 361004, Fujian Province, China

Supported by: the Xiamen Municipal Fund for Major Diseases, No. WKZ0501; the Medical Research Foundation of Xiamen Health Bureau, No. WSK0506; the Xiamen University Scientific Research Launching Foundation for Introduced Talents, No. Z03109; the Youth Science and Technology Talent Innovation Program of Fujian Province; and the Innovation Fund for New Century Researchers in University of Fujian Province

Correspondence to: Jing Dong, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital Affiliated to Medical College of Xiamen University, Xiamen 361004, Fujian Province, China. dj@xmzsh.com

Received: 2008-01-17 Revised: 2008-03-08

Abstract

AIM: To screen candidate hepatocyte binding proteins interacting with the surface antigen

protein (SHBs) of hepatitis B virus.

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR) was used to amplify SHBs gene. The target gene of SHBs was cloned into the yeast expression plasmid pDEST32 to construct bait plasmid pDEST32-SHBs. Western blot was employed to test SHBs expression after pDEST32-SHBs was transformed into the yeast cell MaV203 by Liac-mediated method. Both pDEST32-SHBs and pDEST22-cDNA were contemporarily transformed into MaV203 cells to screen the binding protein of SHBs. MaV203 cells were plated on synthetic dropout nutrient media (SC/-Trp-Leu-His-Ura) and X-gal containing media for selection and screening. After that, the prey plasmids from true positive colonies were extracted and sequenced. The partial cDNA sequences in prey plasmids were analyzed by bioinformatics software.

RESULTS: The yeast expression vector pDEST32-SHBs was successfully constructed. After screening, 3 pieces of cDNA in prey plasmids from true positive blue colonies were sequenced. The cDNA sequences were alpha-2-macroglobulin, tubulin alpha 1a and ribosomal protein L3.

CONCLUSION: Yeast-two hybrid method is successfully used for screening out alpha-2-macroglobulin, tubulin alpha 1a and ribosomal protein L3 as candidate binding proteins of SHBs.

Key Words: Hepatitis B virus; Yeast-two hybrid technique; Surface antigen protein; Binding protein; Polymerase chain reaction

Zhou F, Ren JL, Lu YP, Chen MY, Chen JM, Liu M, Shi HX, Zhang B, Dong J. Screening of hepatocyte proteins interacting with the small surface protein of hepatitis B virus using yeast-two hybrid technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1378-1382

摘要

目的: 自肝细胞cDNA文库中筛选与HBV主蛋白(SHBs)相互作用的蛋白基因, 探讨主蛋白的生物学功能。

方法: 利用PCR扩增S主蛋白基因, 定向克隆

同行评议者
王凯, 教授, 山东大学齐鲁医院肝病科

技术将靶基因克隆到pDEST32构建出S主蛋白的诱饵质粒; Western blot方法验证转化诱饵质粒的酵母细胞表达SHBs; 将诱饵质粒与人肝cDNA文库猎物质粒共同转化MaV203酵母细胞, 在营养缺陷型培养基和X-gal上进行三重筛选阳性菌落, 提取阳性酵母菌落的猎物质粒进行DNA测序; 利用核苷酸数据库及生物信息学技术, 对于筛选结果进行分析。

结果: 构建S主蛋白及肝文库酵母细胞表达载体, 进行酵母双杂交系统筛选人肝细胞cDNA文库, 筛选出既能在缺陷培养基也能在X-gal的检测下变成蓝色的真阳性菌落3个, 分别为核糖体蛋白L3、微管蛋白 α -1a和 α -2巨球蛋白。

结论: 用酵母双杂交技术筛选出3个与SHBs相互作用的肝细胞结合蛋白编码基因, 提示SHBs可能参与到肝细胞内部的多种生物学反应。

关键词: 乙型肝炎病毒; 酵母双杂交技术; 主蛋白; 结合蛋白; 聚合酶链式反应

周飞, 任建林, 卢雅丕, 陈美娅, 陈建民, 刘明, 施华秀, 张波, 董菁. 酵母双杂交法对HBV表面抗原主蛋白候选结合蛋白的筛选. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1378-1382
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1378.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是引起病毒性肝炎、肝硬化和肝细胞癌(hepatic cell carcinoma, HCC)的重要病因^[1-3]。针对HBV基因组的研究认为HBV S区通过3个起始密码子(ATG)被人为的分为3个结构区, 前-S1, 前-S2和S区, 编码3种长度的包膜蛋白, 即大蛋白(LHBs)、中蛋白(MHBs)和主蛋白(SHBs)。我们早期的研究认为中国HBV流行株还可能存在另一起始密码子^[4], 该密码子可以同框(in frame)与下游LHBs表达。目前研究认为SHBs为3种包膜蛋白中含量最多的一种, 与HBV的感染密切相关^[5-7], 但其具体的作用机制尚未明确。本研究以SHBs为研究靶蛋白, 利用酵母双杂交技术寻找其与肝细胞相互作用的蛋白, 这对于明确HBV致病机制、进入细胞机制具有着重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料 Proquest2酵母双杂交系统、人肝细胞cDNA文库(货号10422-020)、酵母细胞感受态、醋酸锂、X- α -半乳糖苷酶(Gal)、酵母细胞质粒提取试剂盒等均购自Invitrogen公司。酵母YPAD培养基、不含氨基酸的酵母氮碱基等购自Oxoid

公司, 各种氨基酸及质粒提取试剂盒均购自北京博大泰克公司; 大肠埃希菌(DH5 α)本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒载体的构建以及靶基因表达的验证: 利用多聚酶链反应(PCR)法扩增靶基因, 根据HBV中国流行病毒株基因序列, 设计上游引物: 5'-ATGGTTCGACAACATGGAGAACACAA CATCAG-3', 下游引物5'-GTGCGGCCGCTAGG TTCTAATGTATACCCAAAGAC-3', 上游引物画线部分为*Sal* I 内切酶位点, 下游引物画线部分为*Not* I 内切酶位点; PCR扩增HBV S主蛋白编码基因; PCR条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 7 min, 35个循环; PCR产物经*Not* I /*Sal* I 双酶切后连接入酵母表达载体pDEST32中构建诱饵质粒, 经酶切及PCR鉴定后, DNA测序验证, 命名为: pDEST32-SHBs。将重组质粒在大肠埃希菌中扩增, 提取诱饵质粒。按说明书步骤, 将诱饵质粒pDEST32-SHBs转化入MaV203。在缺亮氨酸培养基上培养2 d后, 挑取培养阳性克隆, 用缺亮氨酸营养培养液培养, 酵母裂解液裂解MaV203后, 保留上清备用。

Western blot方法验证靶基因的表达: 将样品及阴性对照的酵母裂解液加入上样缓冲液后煮沸5 min, 分别经120 g/L SDS-PAGE胶电泳, 积层胶60 V, 30 min; 分离胶80 V, 90 min。60 V电转100 min将胶上的蛋白质电转移到PVDF膜。5%脱脂牛奶封闭1 h, 然后加入抗-HBs鼠mAb, 室温孵育2 h, 用TBST在室温下脱色摇床上洗脱3次, 每次10 min; 再与1:1000羊抗鼠二抗室温孵育2 h, 用TBST在室温下脱色摇床上洗脱3次, 增强化学发光法进行放射自显影。

1.2.2 酵母双杂交筛选: 首先大量扩增猎物载体, 按照文库扩增手册操作滴定肝细胞文库原液, 使其浓度达到 9×10^{12} cfu/L, 以大量质粒提取试剂盒提取猎物质粒。按照Invitrogen公司Proquest2酵母双杂交操作指南, 醋酸锂法将诱饵质粒pDEST32-SHBs与肝细胞文库(克隆在pDEST22中)共同转化酵母MaV203, 之后将酵母细胞涂布在SC-leu/-trp以及SC-leu/-trp/-his⁺ 25 mM 3AT培养基上(3AT终浓度筛选试验将另文报道)。将生长在SC-leu/-trp/-his+3AT的阳性克隆划线到SC-leu/-trp/-ura的培养基上, 最后将阳性菌落接种于YPAD培养皿影印于硝酸纤维素膜用液氮裂解后置于含X-gal的Z-buffer反应体系上检查 α -半乳糖苷酶活性, 变成蓝色的为真阳性菌落。

研发前沿
SHBs为3种包膜蛋白中含量最多的一种与HBV的感染密切相关, 但其具体机制尚未明确。

创新盘点

本研究经过严格的酵母双杂交筛选,通过对阳性克隆的测序,初步提示核糖体蛋白L3、微管蛋白 α -1a、 α -2巨球蛋白部分或全基因编码产物可能与HBV主蛋白相互作用。

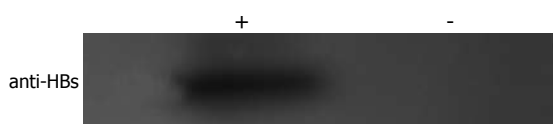


图1 pDEST32-SHBs转化MaV203后Western blot的结果。+: pDEST32-SHBs转化MaV203蛋白电泳; -: pDEST32转化MaV203蛋白电泳结果。

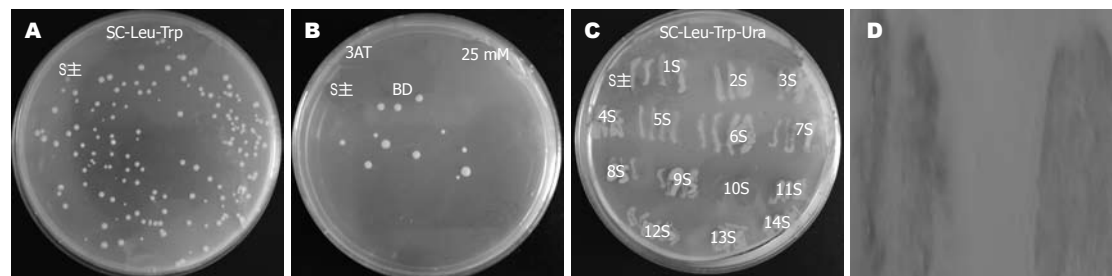


图2 报告基因表达的结果。A: 检测转化效率; B: 表达His⁺报告基因; C: 表达Ura⁺报告基因; D: 表达LacZ报告基因。

1.2.3 候选结合蛋白基因的克隆化与分析: 挑取真正的阳性集落按照Invitrogen公司酵母细胞提取试剂盒提供的操作指南提取酵母质粒。提取的质粒后验证后,利用Invitrogen公司提供的pDEST22质粒上,插入文库序列两端的引物进行PCR扩增验证,上游引物5'-TCGATGATGAA GATACCCACACC-3',下游引物5'-CTCGACGT CTTACTTACTTAGC-3'; PCR条件: 94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 58℃ 50 s, 72℃ 80 s, 72℃ 7 min经35个循环。靶片段长度约为1200 bp; PCR产物经纯化后送生物公司进行DNA测序。阳性克隆DNA测序结果提交GenBank比对,进行生物信息学分析。

2 结果

2.1 诱饵质粒构建的验证 HBV S基因为本实验室克隆并测序, GenBank号为: EU075334, C2亚基因型。将全S基因克隆到pDEST32中构建诱饵质粒pDEST32-SHBs, Western blot法验证诱饵质粒pDEST32-SHBs转化酵母后靶蛋白的表达(图1)。

2.2 SHBs酵母双杂交结果 按照Invitrogen公司Proquest2酵母双杂交操作指南方法,我们将构建并验证过的诱饵质粒pDEST32-SHBs与肝细胞文库(克隆在pDEST22中)共转化酵母MaV203,之后利用不同缺陷培养基来筛选阳性克隆,最后筛选出的阳性克隆可以表达His⁺、Ura⁺、LacZ报告基因(图2)。

2.3 SHBs的结合蛋白基因的克隆化与分析结果 利用Invitrogen公司提供的肝细胞文库载体pDEST22引物扩增结合蛋白基因片段,利用PCR方法验证并克隆酵母双杂交阳性克隆内猎物质粒

表1 酵母双杂交法获得HBV全S基因的候选结合蛋白

	GenBank	长度(aa)	结合域
核糖体蛋白L3	NP_919369	449	217-414
微管蛋白 α -1a	EAW60313	429	2-229
α -2巨球蛋白	AAA51552	643	304-558

携带的cDNA片段(图3)。

我们共挑选13个阳性克隆测序,测序结果与GenBank数据库进行初步比较,获得3个SHBs候选结合蛋白的基因序列见表1。

3 讨论

HBV慢性感染以及感染后导致肝硬化、原发性肝癌的机制一直不明确,目前研究认为HBV通过其病毒蛋白调节癌基因/抑癌基因的表达、诱导/对抗细胞凋亡、阻断细胞DNA损伤修复等方式导致病情演进^[8-11]。在上述过程中,除X基因、截短型中蛋白具有的反式激活作用外,HBV干预肝细胞功能的方式也可能是通过蛋白-蛋白相互作用完成的^[12-16]。近年来,酵母双杂交技术被成功的引进于蛋白-蛋白相互作用领域,国内成军 *et al* 探讨多种形态的表面抗原可能的结合蛋白,本研究着重探讨SHBs候选结合蛋白^[17-20]。

我们应用Proquest酵母双杂交系统对SHBs进行了结合蛋白的筛选,该系统的优点是假阳性率低,按照该系统,将我们构建的诱饵质粒pDEST32-SHBs与携带人肝cDNA文库的猎物质粒共同转化酵母细胞,只有表达His⁺、Ura⁺、LacZ报告基因的阳性克隆才被纳入进一步研究。通过该系统,我们筛选出肝细胞文库中与SHBs相互作用蛋白,共获得13个阳性克隆,经过测序分析及与GenBank数据库进行比较,其中3个阳性克隆测序结果为已知蛋白基因,分别为核糖体蛋白L3、微管蛋白 α -1a、 α -2巨球蛋白。 α -2巨球蛋白是具有多种生物活性的糖蛋白^[21-22],由肝脏、淋巴细胞、单核细胞等合成,为免疫调节

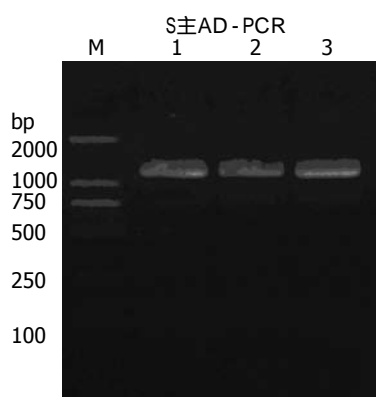


图 3 酵母双杂交阳性克隆猎物物质粒引物PCR产物的凝胶电泳. 1: AD1; 2: AD2; 3: AD3.

性蛋白, 属于正常血清中免疫反应抑制因子, 在体外能调节淋巴细胞对各种致有丝分裂原刺激和抗原性刺激反应, α -2巨球蛋白还能显著抑制自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)和抗体依赖性细胞毒素细胞(antibody dependent cellular toxin cell, ADCC)活性. 目前已经观察到临床上慢性活动性肝炎和肝硬化患者 α -2巨球蛋白血液浓度升高, 在病情迁延时 α -2巨球蛋白升高可作为急性肝炎演变为慢性的有用指标^[23-26]. 这一发现为HBV感染致肝损伤机制的研究开辟了新的思路. α -2巨球蛋白全长643 aa, S主蛋白可与该蛋白的304-558 aa相互作用, 相互作用区域位于 α -2巨球蛋白的下游. 另一个筛选出的SHBs候选结合蛋白核糖体蛋白L3是肽基转移酶中心, 能促进病毒在细胞中的繁殖^[27-29], 核糖体蛋白L3编码449 aa, 可能与SHBs的结合区域位于217-414 aa. 筛选出的第三个结合蛋白为微管蛋白 α -1a, 是一种细胞结构蛋白, 编码429 aa, 能调节微管激活及细胞的分裂有关^[30-31], 可能的与SHBs结合的区域位于微管蛋白 α -1a的羧基端2-229 aa处.

总之, 我们自肝cDNA文库中应用酵母双杂交方法筛选出3种可能与SHBs结合的蛋白基因, 研究结果提示SHBs可能与上述蛋白相互作用, 可能通过干扰上述蛋白的功能导致HBV感染的持续化, 甚至影响到肝细胞功能, 其具体的作用机制是下一步研究的重点. 这些候选结合蛋白与靶蛋白结合的可靠性需要进一步通过反向酵母双杂交、哺乳细胞双杂交、免疫共沉淀等方法研究证实.

4 参考文献

- 1 Park NH, Song IH, Chung YH. Chronic hepatitis B in hepatocarcinogenesis. *Postgrad Med J* 2006; 82: 507-515
- 2 Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Cacciola I, Raffa G, Craxi A, Farinati F, Missale G, Smedile A, Tiribelli C, Villa E, Raimondo G. Hepatitis B virus maintains its pro-oncogenic properties in the case

- of occult HBV infection. *Gastroenterology* 2004; 126: 102-110
- 3 Arbuthnot P, Kew M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol* 2001; 82: 77-100
- 4 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-S区编码基因的界定. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1091-1096
- 5 Patient R, Hourieux C, Sizaret PY, Trassard S, Sureau C, Roingeard P. Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J Virol* 2007; 81: 3842-3851
- 6 Blanchet M, Sureau C. Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J Virol* 2006; 80: 11935-11945
- 7 Bruss V, Ganem D. The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 1059-1063
- 8 Ogden SK, Lee KC, Barton MC. Hepatitis B viral transactivator HBx alleviates p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression. *J Biol Chem* 2000; 275: 27806-27814
- 9 Oishi N, Shilagardi K, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S, Murakami S. Hepatitis B virus X protein overcomes oncogenic RAS-induced senescence in human immortalized cells. *Cancer Sci* 2007; 98: 1540-1548
- 10 Ou DP, Tao YM, Tang FQ, Yang LY. The hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinoma metastasis by upregulation of matrix metalloproteinases. *Int J Cancer* 2007; 120: 1208-1214
- 11 Peng Z, Zhang Y, Gu W, Wang Z, Li D, Zhang F, Qiu G, Xie K. Integration of the hepatitis B virus X fragment in hepatocellular carcinoma and its effects on the expression of multiple molecules: a key to the cell cycle and apoptosis. *Int J Oncol* 2005; 26: 467-473
- 12 Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 74-81
- 13 Hildt E, Munz B, Saher G, Reifenberg K, Hofschneider PH. The PreS2 activator MHBs(t) of hepatitis B virus activates c-raf-1/Erk2 signaling in transgenic mice. *EMBO J* 2002; 21: 525-535
- 14 Kim DG. Differentially expressed genes associated with hepatitis B virus HBx and MHBs protein function in hepatocellular carcinoma. *Methods Mol Biol* 2006; 317: 141-155
- 15 Hildt E, Saher G, Bruss V, Hofschneider PH. The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator. *Virology* 1996; 225: 235-239
- 16 Hildt E, Hofschneider PH. The PreS2 activators of the hepatitis B virus: activators of tumour promoter pathways. *Recent Results Cancer Res* 1998; 154: 315-329
- 17 李志群, 马英骥, 成军. 酵母双杂交技术筛选肝细胞中与羧基末端截短型乙型肝炎表面抗原中蛋白MHBs^{t167}蛋白结合蛋白的研究. *胃肠病学和肝病杂志* 2006; 15: 138-140
- 18 田江克, 成军, 刘妍, 崔玉芳, 纪冬, 王琳, 程勇前, 钟彦伟, 徐东平. 乙型肝炎病毒截短型表面抗原中蛋白结合蛋白的筛选. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2382-2385
- 19 董菁, 王业东, 成军, 皇甫竞坤, 钟彦伟, 杨倩. 噬菌体表面展示技术筛选乙型肝炎病毒前S1蛋白结合蛋白基因. *解放军医学杂志* 2004; 29: 13-15
- 20 陆荫英, 李克, 王琳, 刘妍, 王业东, 成军, 张玲霞. 乙型肝炎病毒前S2蛋白结合蛋白基因的筛选. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 8-10
- 21 Zorina VN, Zorin NA, Lykova OF, Konysheva TV,

名词解释
结合蛋白: 与某种蛋白发生物理相互作用, 并可能通过该结合作用干扰、失活蛋白原本的生物学功能.

同行评价
本研究选题明确,
设计思路清晰合
理,方法简单可
靠,具有一定的可
读性。

- Zorina RM. Alpha-2-macroglobulin ligands and their biotransport mechanisms. *Biomed Khim* 2007; 53: 164-171
- 22 Meijer AB, Rohlena J, van der Zwaan C, van Zonneveld AJ, Boertjes RC, Lenting PJ, Mertens K. Functional duplication of ligand-binding domains within low-density lipoprotein receptor-related protein for interaction with receptor associated protein, alpha2-macroglobulin, factor IXa and factor VIII. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1774: 714-722
- 23 黄唯, 龚飞跃. 血清生化指标对乙型肝炎肝硬化的诊断价值. *第一军医大学学报* 2002; 22: 1034-1036
- 24 宋育林, 杨文卓, 贾一韬, 陆伦根, 茅益民, 曹爱平, 朱红音, 李恩灵, 万谟彬, 李成忠, 曾民德. 慢性肝病病理分级、分期与血清学指标关系的初步研究. *胃肠病学* 2001; 6: 78-80
- 25 Morali G, Maor Y, Klar R, Braun M, Ben Ari Z, Bujanover Y, Zuckerman E, Boger S, Halfon P. Fibrotest-Actitest: the biochemical marker of liver fibrosis--the Israeli experience. *Isr Med Assoc J* 2007; 9: 588-591
- 26 Fielden MR, Brennan R, Gollub J. A gene expression biomarker provides early prediction and mechanistic assessment of hepatic tumor induction by nongenotoxic chemicals. *Toxicol Sci* 2007; 99: 90-100
- 27 Petrov A, Meskauskas A, Dinman JD. Ribosomal protein L3: influence on ribosome structure and function. *RNA Biol* 2004; 1: 59-65
- 28 Pringle M, Poehlsgaard J, Vester B, Long KS. Mutations in ribosomal protein L3 and 23S ribosomal RNA at the peptidyl transferase centre are associated with reduced susceptibility to tiamulin in *Brachyspira* spp. isolates. *Mol Microbiol* 2004; 54: 1295-1306
- 29 Meskauskas A, Dinman JD. Ribosomal protein L3: gatekeeper to the A site. *Mol Cell* 2007; 25: 877-888
- 30 Chang W, Webster DR, Salam AA, Gruber D, Prasad A, Eiserich JP, Bulinski JC. Alteration of the C-terminal amino acid of tubulin specifically inhibits myogenic differentiation. *J Biol Chem* 2002; 277: 30690-30698
- 31 Purro SA, Bisig CG, Contin MA, Barra HS, Arce CA. Post-translational incorporation of the antiproliferative agent azatyrosine into the C-terminus of alpha-tubulin. *Biochem J* 2003; 375: 121-129

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志正文要求

本刊讯 本刊正文标题层次为 0 引言; 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法; 2 结果; 3 讨论; 4 参考文献. 序号一律左顶格写, 后空 1 格写标题; 2 级标题后空 1 格接正文. 以下逐条陈述: (1) 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系. (2) 材料和方法 应尽量简短, 但应让其他有经验的研究者能够重复该实验. 对新的方法应该详细描述, 以前发表过的方法引用参考文献即可, 有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可. (3) 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示, 在结果中应避免讨论. (4) 讨论 要简明, 应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述, 也不应是大量文献的回顾. 图表的数量要精选. 表应有表序和表题, 并有足够具有自明性的信息, 使读者不查阅正文即可理解该表的内容. 表内每一栏均应有表头, 表内非公知通用缩写应在表注中说明, 表格一律使用三线表(不用竖线), 在正文中该出现的地方应注出. 图应有图序、图题和图注, 以使其容易被读者理解, 所有的图应在正文中该出现的地方注出. 同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图, 统一用一个注解分别叙述. 如: 图 1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: ...; B: ...; C: ...; D: ...; E: ...; F: ...; G: ... 曲线图可按 ●、○、■、□、▲、△ 顺序使用标准的符号. 统计学显著性用: ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ ($P > 0.05$ 不注). 如同一表中另有一套 P 值, 则 ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$; 第 3 套为 ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字, 如 $P < 0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等, 注在表的左下方. 表内采用阿拉伯数字, 共同的计量单位符号应注在表的右上方, 表内个位数、小数点、±、- 应上下对齐. “空白”表示无此项或未测, “-”代表阴性未发现, 不能用同左、同上等. 表图勿与正文内容重复. 表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达. 黑白图请附黑白照片, 并考入磁盘内; 彩色图请提供冲洗的彩色照片, 请不要提供计算机打印的照片. 彩色图片大小 $7.5\text{ cm} \times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴. (5) 致谢 后加冒号, 排在讨论后及参考文献前, 左齐. (常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

姜黄素对酒精诱导的大鼠脂质过氧化反应的影响

尹蓉, 王沁, 富翠芹

尹蓉, 王沁, 富翠芹, 兰州大学第一医院消化科 甘肃省兰州市 730000

尹蓉, 兰州大学硕士在读, 主要从事酒精性肝病的分子机制及防治研究。

甘肃省科技攻关资助项目, No. 2GS054-A43-014-26

作者贡献分布: 尹蓉及王沁对此文所作贡献均等; 此课题由尹蓉及王沁设计; 研究过程由尹蓉与富翠芹操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王沁提供; 数据分析由尹蓉完成; 本论文写作由尹蓉与王沁完成。

通讯作者: 王沁, 730000, 甘肃省兰州市, 兰州大学第一医院消化科. floweryr142@126.com

电话: 0931-8627657

收稿日期: 2008-01-17 修回日期: 2008-03-25

Effect of curcumin on alcohol-induced lipid peroxidation in rats

Rong Yin, Qin Wang, Cui-Qin Fu

Rong Yin, Qin Wang, Cui-Qin Fu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

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

Correspondence to: Qin Wang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. floweryr142@126.com

Received: 2008-01-17 Revised: 2008-03-25

Abstract

AIM: To reproduce an experimental rat model of alcoholic liver disease, and to investigate the effect of curcumin on lipid peroxidation induced by alcohol in rats.

METHODS: Forty Sprague-Dawley rats were randomly divided into 5 groups ($n = 8$): control group, model group, and three curcumin treatment (40, 80, 160 mg/kg) groups. Rats in the control group were intragastrically infused with normal saline, and those in the other groups were intragastrically infused with 560 mL/L alcohol (6.72 g/kg per day). After 6 wk, curcumin was added to rats in the curcumin treatment groups at 40, 80, and 160 mg/kg, respectively. At the end of the 12th wk, all of the rats were killed. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) were measured. Liver samples were collected for determination

of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) contents and routine histological examination.

RESULTS: In comparison with those in the control group, the serum ALT, AST and ALP levels (86.4 ± 7.5 vs 33.5 ± 10.3 ; 201.0 ± 16.8 vs 116.5 ± 12.0 ; 205.1 ± 20.0 vs 104.6 ± 9.4 ; all $P < 0.01$) and the tissue contents of MDA and NO (3.29 ± 0.34 vs 1.35 ± 0.12 ; 4.37 ± 0.21 vs 2.72 ± 0.13 ; both $P < 0.05$) were significantly increased in the model group, but SOD activity was markedly decreased (80.21 ± 4.55 vs 180.24 ± 27.53 , $P < 0.01$). However, curcumin markedly down-regulated the levels of serum ALT, AST and ALP (40 mg/kg: 66.5 ± 9.6 , 171.4 ± 10.8 , 176.4 ± 13.7 ; 80 mg/kg: 52.4 ± 12.0 , 145.8 ± 11.9 , 146.9 ± 13.8 ; 160 mg/kg: 40.9 ± 7.9 , 135.0 ± 11.8 , 127.1 ± 12.6 ; $P < 0.05$ or $P < 0.01$), as well as the tissue contents of MDA and NO (40 mg/kg: 2.84 ± 0.27 , 4.01 ± 0.17 ; 80 mg/kg: 1.95 ± 0.23 , 3.60 ± 0.16 ; 160 mg/kg: 1.65 ± 0.08 , 3.22 ± 0.13 ; $P < 0.05$ or $P < 0.01$). Inversely, the activity of SOD was elevated (92.36 ± 6.47 , 117.69 ± 21.96 , 146.70 ± 27.36 ; $P < 0.05$ or $P < 0.01$). Histological examination showed fatty degeneration, focal necrosis and inflammatory cell infiltration in the model group, but the changes were milder in the curcumin treatment groups at variable degrees.

CONCLUSION: Curcumin can prevent alcohol-induced liver injury in rats by inhibiting lipid peroxidation.

Key Words: Alcoholic liver disease; Curcumin; Lipid peroxidation; Histopathology

Yin R, Wang Q, Fu CQ. Effect of curcumin on alcohol-induced lipid peroxidation in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1383-1387

摘要

目的: 观察姜黄素对酒精性肝病大鼠肝脏氧化应激指标SOD, MDA和NO及血清ALT, AST和ALP水平的影响, 探讨姜黄素对酒精诱导的大鼠脂质过氧化反应的影响。

方法: 将40只SD大鼠随机分为对照组、模

背景资料

长期过量饮酒可引起酒精性肝病, 包括肝脂肪变及炎症损伤, 严重者可发展为肝硬化。在西方国家, 酒精性肝病是慢性肝病的主要类型。近年来, 中国也有发病逐渐增加的趋势。其病因复杂, 机制未明。因此, 对酒精性肝病的发病机制及治疗靶点的研究势在必行。

同行评议者
范小玲, 主任医师, 北京地坛医院综合科

相关报道

Nanji *et al*发现姜黄素也可通过抑制核因子- κ B(NF- κ B)的激活及其介导的细胞因子的释放; Kang *et al*提出通过抑制胶原合成和肝星状细胞活化等作用,从而减轻肝脏炎症和纤维化的发展。

型组、姜黄素治疗组(40 mg/kg)、姜黄素治疗组(80 mg/kg)和姜黄素治疗组(160 mg/kg),每组8只。除对照组用等量生理盐水灌胃外,其他组均采用56度白酒6.72 g/(kg·d)灌胃的方法制作酒精性肝病大鼠模型,6 wk后姜黄素治疗、组分别加用姜黄素ig,至12 wk末,处死大鼠,抽取血标本测定血清ALT、AST及ALP水平;留取肝组织标本测定SOD活性、MDA及NO含量,常规HE染色观察肝脏病理变化。

结果:与对照组相比,模型组大鼠血清ALT、AST及ALP水平显著升高(86.4 ± 7.5 vs 33.5 ± 10.3 ; 201.0 ± 16.8 vs 116.5 ± 12.0 ; 205.1 ± 20.0 vs 104.6 ± 9.4 ; 均 $P < 0.01$);肝组织SOD活性明显下降(80.21 ± 4.55 vs 180.24 ± 27.53 , $P < 0.01$),MDA及NO含量显著升高(3.29 ± 0.34 vs 1.35 ± 0.12 ; 4.37 ± 0.21 vs 2.72 ± 0.13 ; 均 $P < 0.01$)。与模型组相比,各姜黄素治疗组血清ALT、AST及ALP水平(组: 66.5 ± 9.6 , 171.4 ± 10.8 , 176.4 ± 13.7 ; 组: 52.4 ± 12.0 , 145.8 ± 11.9 , 146.9 ± 13.8 ; 组: 40.9 ± 7.9 , 135.0 ± 11.8 , 127.1 ± 12.6)明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),肝组织MDA及NO含量(组: 2.84 ± 0.27 , 4.01 ± 0.17 ; 组: 1.95 ± 0.23 , 3.60 ± 0.16 ; 组: 1.65 ± 0.08 , 3.22 ± 0.13)均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而SOD活性(92.36 ± 6.47 , 117.69 ± 21.96 , 146.70 ± 27.36)明显提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中以、治疗组较为显著。模型组大鼠肝细胞出现不同程度的脂肪变性,伴有点、灶状坏死,炎性细胞浸润,各姜黄素治疗组肝脏病理变化不同程度的轻于模型组。

结论:姜黄素能抑制脂质过氧化,减轻或防治酒精诱导的肝损伤。

关键词:酒精性肝病;姜黄素;脂质过氧化;组织病理学

尹蓉,王沁,富翠芹.姜黄素对酒精诱导的大鼠脂质过氧化反应的影响.世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1383-1387
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1383.asp>

0 引言

姜黄素(curcumin)是从天然姜黄属植物根茎中提取出来的一种酚类色素,除广泛应用于食品上色和佐味外,姜黄素尚具有多种药理作用,如抗肿瘤、降脂和抗微生物等作用,尤其在抗氧化、清除自由基、抗炎和保护肝脏等方面效果显著^[1-2]。本研究通过酒精灌胃法建立慢性酒精性肝病大鼠模型,观察姜黄素对酒精性肝

病(alcoholic liver disease, ALD)大鼠肝组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和一氧化氮(NO)含量,血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)水平的影响,以探讨姜黄素的抗氧化作用及对酒精诱导的肝损伤的防治作用及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级SD大鼠40只,体质量180-220 g,雌雄各半,甘肃省中医学院SPF级动物实验室饲养。市售56度二锅头白酒,姜黄素(四川金郁金科技开发有限公司,含量95.3%)。SOD,MDA,NO试剂盒均购自南京建成生物制品公司,SOD活性用黄嘌呤氧化酶法测定,MDA含量用硫代巴比妥酸比色法测定,NO含量用硝酸还原酶法测定。UV-2401PC紫外分光光度计,低温高速离心机,Beckman-LX-20全自动生化分析仪。

1.2 方法 40只SD大鼠按体质量、性别相近原则随机分为5组($n = 8$):对照组、模型组、姜黄素治疗I组(40 mg/kg)、姜黄素治疗II组(80 mg/kg)和姜黄素治疗III组(160 mg/kg)。喂养适应1 wk后,除对照组以等量生理盐水ig外,其余4组参照李舒丹 *et al*^[3]的造模方法,以56度白酒约1.5 mL/100 g体质量(折合成乙醇为6.72 g/kg体质量)每日清晨ig 1次。6 wk后,各姜黄素治疗组在继续酒精ig的基础上,分别将姜黄素40、80、160 mg/kg加入酒中ig。各组大鼠在实验期间均予以饮用水及全价营养颗粒喂养。12 wk末,所有大鼠在末次ig 24 h后,以30 g/L戊巴比妥麻醉,股动脉采血并处死。血标本离心分装血清,Beckman-LX-20全自动生化分析仪测定ALT,AST和ALP水平;留取肝组织,部分制成100 g/L肝匀浆,测定SOD,MDA和NO,具体步骤按试剂盒说明操作;部分肝组织40 g/L甲醛固定,石蜡包埋、切片,常规HE染色并观察。

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件进行One-way ANOVA分析,组间比较用Tukey法,结果用mean \pm SD表示。

2 结果

实验期间,对照组大鼠全部存活,其余4组共有6只死亡,3只因酒精误灌入气管立即死亡,2只尸解发现胃扩张穿孔,1只因死因不明。各实验组大

表 1 各组大鼠血清酶和肝组织中SOD、MDA和NO含量 (mean ± SD)

分组	<i>n</i>	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	SOD (U/mgprot)	MDA (nmol/mgprot)	NO (μmol/gprot)
对照组	8	33.5 ± 10.3	116.5 ± 12.0	104.6 ± 9.4	180.24 ± 27.53	1.35 ± 0.12	2.72 ± 0.13
模型组	6	86.4 ± 7.5 ^a	201.0 ± 16.8 ^a	205.1 ± 20.0 ^a	80.21 ± 4.55 ^a	3.29 ± 0.34 ^a	4.37 ± 0.21 ^a
姜黄素治疗 组	6	66.5 ± 9.6 ^c	171.4 ± 10.8 ^c	176.4 ± 13.7 ^b	92.36 ± 6.47	2.84 ± 0.27 ^b	4.01 ± 0.17 ^c
姜黄素治疗 组	6	52.4 ± 12.0 ^c	145.8 ± 11.9 ^c	146.9 ± 13.8 ^c	117.69 ± 21.96 ^b	1.95 ± 0.23 ^c	3.60 ± 0.16 ^c
姜黄素治疗 组	8	40.9 ± 7.9 ^c	135.0 ± 11.8 ^c	127.1 ± 12.6 ^c	146.70 ± 27.36 ^c	1.65 ± 0.08 ^c	3.22 ± 0.13 ^c

^a*P*<0.05 vs 对照组; ^b*P*<0.05, ^c*P*<0.01 vs 模型组.

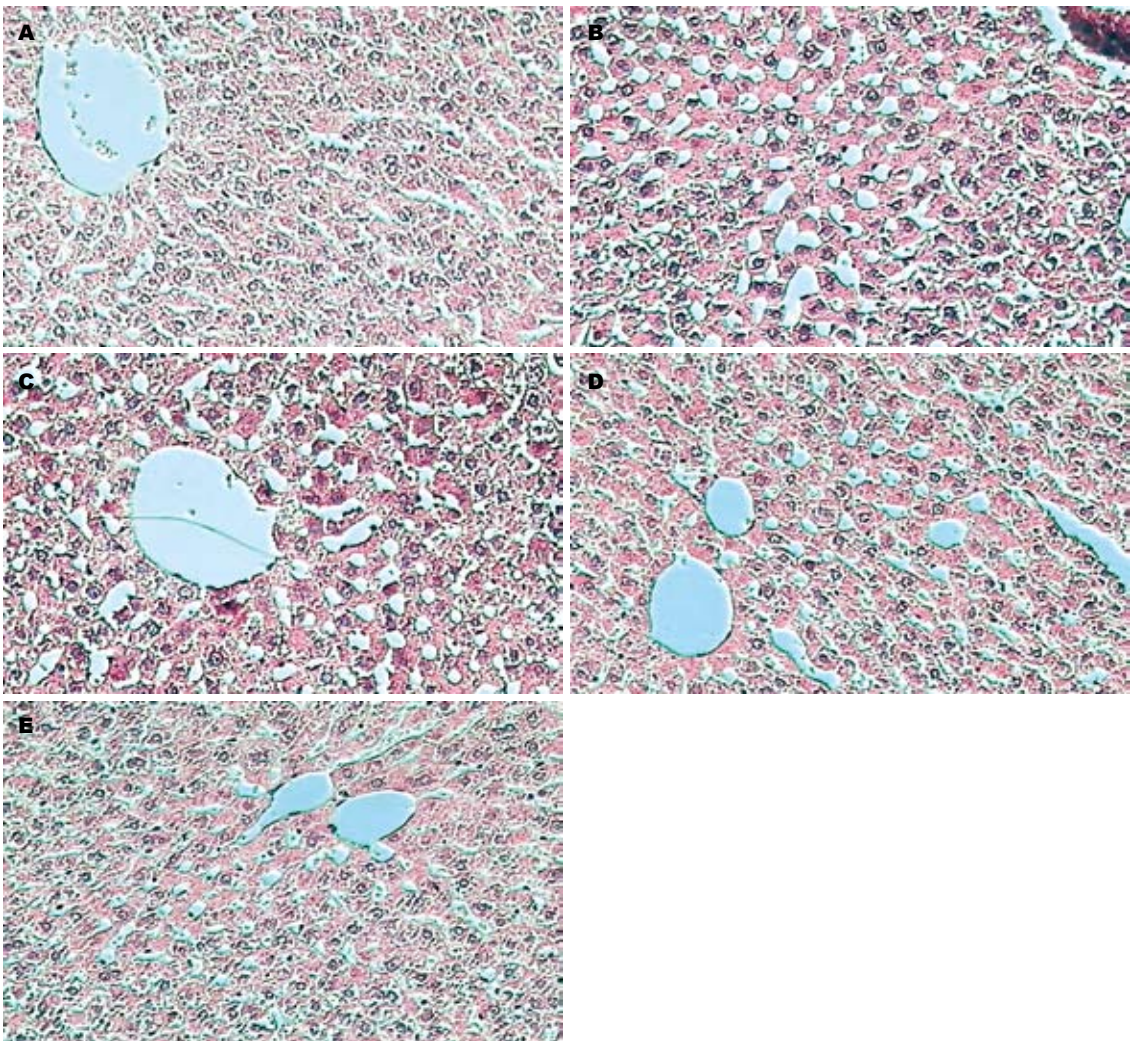


图 1 各组大鼠肝组织HE染色切片(HE × 100). A: 对照组; B: 模型组; C: 姜黄素治疗 组; D: 姜黄素治疗 组; E: 姜黄素治疗 组.

鼠较对照组, 出现不同程度毛色无光泽, 易掉毛, 食欲减退, 体质量下降, 稀便等, 尤以模型组明显.

2.1 血清酶学指标及肝脏脂质过氧化检测结果

模型组大鼠ALT, AST及ALP水平较对照组明显升高(*P*<0.01); 各姜黄素治疗组与模型组相比, 均有明显下降(*P*<0.05或*P*<0.01), 并呈剂量-效应

关系(表1). 与对照组相比, 模型组MDA、NO含量显著升高, 而SOD活性明显下降(*P*<0.01); 各姜黄素治疗组与模型组相比, 可以不同程度地抑制MDA和NO水平, 提高SOD活性(*P*<0.05或*P*<0.01), 并呈剂量-效应关系(表1).

2.2 肝脏组织病理 对照组可见正常的肝细胞以

创新盘点

本研究选用安全易得的植物提取物姜黄素作为干预药物, 基于其较强的抗氧化、抗炎特性, 研究其对肝细胞结构及功能的影响, 探讨ALD的早期防治.

应用要点
本研究为姜黄素应用于ALD的早期防治,提供了一定的理论依据,具有较好的临床应用前景。

中央静脉为中心呈放射状排列:模型组大鼠肝小叶结构紊乱,肝细胞出现大、小泡性脂肪变,以大泡性为主,病变主要见于中央静脉区及肝包膜下,伴有点、灶状坏死,炎性细胞浸润;各姜黄素治疗组大鼠肝组织脂肪变性、坏死及炎症改变较之模型组不同程度减轻(图1)。

3 讨论

ALD的发病机制,有人提出以氧应激和脂质过氧化为中心的“二次打击”假说^[4-5]。酒精可使细胞色素P4502E1(cytochrome P450 2E1, CYP2E1)活性增强,在肝脏乙醇代谢中产生大量的氧自由基(ROS),引发脂质过氧化反应,导致微粒体和肝细胞损伤^[6]。而肝脏抗氧化剂,如SOD、谷胱甘肽、维生素E等含量下降^[7]。脂质过氧化物使脂肪酸氧化受阻,甘油三酯在体内合成增加并堆积,而脂质沉积增多又能加重脂质过氧化反应,形成恶性循环,从而发生脂肪肝。MDA是最主要的脂质过氧化产物之一,因而测试MDA的量可反映体内脂质过氧化的程度,间接反映体内自由基的生成情况。SOD对机体的氧化和抗氧化平衡起着至关重要的作用,他能清除自由基和过氧化物,从而降低脂质过氧化物的生成并加速其清除,减少其对细胞和组织的损伤。本研究结果显示,模型组大鼠SOD活性较之对照组明显下降($P<0.01$),MDA含量明显增加($P<0.01$),提示肝组织中氧化应激明显,促进肝脂肪变性的发生。

乙醇可使诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性增加,催化生成过多的NO,破坏了NO与超氧阴离子(O_2^-)间的平衡,生成过量的过氧化亚硝离子(ONOO⁻)。ONOO⁻及其毒性产物可通过氧化细胞膜上的多不饱和脂肪酸及胆固醇、氧化蛋白质如SOD及GSH等多种途径增强肝脏中的氧化应激水平。另外,NO本身可抑制肝蛋氨酸腺苷转移酶活性,引起GSH合成障碍,还可降低谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化物酶活性,导致脂质过氧化物积聚^[8]。NO也可通过抑制蛋白质的合成及线粒体呼吸^[9]使ALD加重。本研究结果显示,模型组大鼠NO含量较之对照组显著增加($P<0.01$),提示NO通过参与氧化应激在ALD的发生发展中发挥重要作用。

姜黄素具有较强的抗氧化、清除自由基作用,既可以抑制ROS的产生^[10],又能清除氧化过程中产生的 O_2^- ,过氧化氢(H_2O_2),NO等多种自由基。本研究结果表明,与模型组相比,各姜黄素

治疗组均可降低血清ALT,AST,ALP水平,提高SOD活性,抑制MDA和NO的产生,减轻脂质过氧化程度,作用以II、III治疗组较为显著。一些研究显示,姜黄素可通过抑制CYP450的活性^[11],减少iNOS mRNA的产生^[12],促进NO的清除而降低NO水平^[13];抑制黄嘌呤氧化反应^[10],从而减少ROS和自由基的产生。还能增加各种抗氧化酶,如SOD、过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶等的活性,有效地清除各种自由基^[14]。上述作用可使肝组织中ROS和自由基生成减少,肝脏抗氧化能力增强,氧应激减轻,从而起到保护肝细胞的作用。此外,姜黄素可以改善脂肪酸代谢^[15],减少脂肪在肝脏的沉积,本研究结果显示各姜黄素治疗组大鼠肝脂肪变性较之模型组不同程度减轻,与文献相符。另有报道,姜黄素也可通过抑制核因子- κ B(NF- κ B)的激活及其介导的细胞因子的释放^[16],抑制胶原合成和肝星状细胞活化^[17]等作用,从而减轻肝脏炎症和纤维化的发展。一项I期临床证明,姜黄素能安全po 4 mo而无副作用^[18]。因此,基于姜黄素的多种药理作用,其有可能成为一种理想的防治ALD的药物,具有较好的临床应用前景。

4 参考文献

- 1 彭景华,胡义扬.姜黄素抗肝损伤研究进展.国际消化病杂志 2005; 25: 373-375
- 2 于冬青,邓华聪.姜黄素的药理作用研究进展.山东医药 2005; 45: 72-73
- 3 李舒丹,厉有名,虞朝辉.大鼠慢性酒精性肝损伤模型的建立.浙江医学 2002; 24: 524-525, 530
- 4 Nanji AA, Khwaja S, Tahan SR, Sadrzadeh SM. Plasma levels of a novel noncyclooxygenase-derived prostanoid (8-isoprostane) correlate with severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269: 1280-1285
- 5 Savas MC, Koruk M, Pirim I, Yilmaz O, Karakok M, Taysi S, Yilmaz A. Serum ubiquitin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 738-741
- 6 Lieber CS. New concepts of the pathogenesis of alcoholic liver disease lead to novel treatments. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6: 60-65
- 7 戴宁,曾民德,李继强,范竹萍,茅益民,彭延申,邱德凯.非酒精性脂肪肝细胞色素P450 E1的表达与氧化抗氧化的关系.中华肝病杂志 1999; 7: 104-106
- 8 消化系统疾病分册 2003; 23: 291-293
- 9 Giulivi C. Functional implications of nitric oxide produced by mitochondria in mitochondrial metabolism. *Biochem J* 1998; 332 (Pt 3): 673-679
- 10 Reddy AC, Lokesh BR. Studies on the inhibitory effects of curcumin and eugenol on the formation of reactive oxygen species and the oxidation of ferrous iron. *Mol Cell Biochem* 1994; 137: 1-8
- 11 Thapliyal R, Maru GB. Inhibition of cytochrome P450 isozymes by curcumins in vitro and in vivo.

- Food Chem Toxicol* 2001; 39: 541-547
- 12 Chan MM, Huang HI, Fenton MR, Fong D. In vivo inhibition of nitric oxide synthase gene expression by curcumin, a cancer preventive natural product with anti-inflammatory properties. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 1955-1962
- 13 Sreejayan, Rao MN. Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 105-107
- 14 Okada K, Wangpoengtrakul C, Tanaka T, Toyokuni S, Uchida K, Osawa T. Curcumin and especially tetrahydrocurcumin ameliorate oxidative stress-induced renal injury in mice. *J Nutr* 2001; 131: 2090-2095
- 15 Asai A, Miyazawa T. Dietary curcuminoids prevent high-fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and epididymal adipose tissue. *J Nutr* 2001; 131: 2932-2935
- 16 Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Thomas P, Dannenberg AJ. Curcumin prevents alcohol-induced liver disease in rats by inhibiting the expression of NF-kappa B-dependent genes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 284: G321-G327
- 17 Kang HC, Nan JX, Park PH, Kim JY, Lee SH, Woo SW, Zhao YZ, Park EJ, Sohn DH. Curcumin inhibits collagen synthesis and hepatic stellate cell activation in-vivo and in-vitro. *J Pharm Pharmacol* 2002; 54: 119-126
- 18 Sharma RA, Euden SA, Platton SL, Cooke DN, Shafayat A, Hewitt HR, Marczylo TH, Morgan B, Hemingway D, Plummer SM, Pirmohamed M, Gescher AJ, Steward WP. Phase I clinical trial of oral curcumin: biomarkers of systemic activity and compliance. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6847-6854

同行评价
本研究内容新颖, 设计较合理, 方法可靠, 对指导姜黄素的临床应用具有一定的意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志(国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*)》, 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的496位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。(常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

牛磺酸对大鼠胰岛活性和功能的保护作用

张克忠, 刘永锋, 张佳林

背景资料
糖尿病是一种自身免疫反应性疾病。胰岛移植是治疗糖尿病的最有效手段之一, 但是胰岛移植的长期疗效较差, 胰岛移植后的凋亡率是正常胰腺内胰岛的10倍, 移植胰岛很快失功。国内外研究资料表明胰岛的分离、纯化、培养、及胰岛的保存均影响胰岛活性和功能。

张克忠, 刘永锋, 张佳林, 中国医科大学附属第一医院普外一科暨器官移植科 辽宁省沈阳市 110001
张克忠, 博士, 主要从事器官移植和肝胆外科的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30672049
作者贡献分布: 张克忠与刘永锋对此文所作贡献均等; 此课题由张克忠与刘永锋设计; 研究过程由张克忠, 刘永锋及张佳林操作完成; 本论文写作由张克忠与张佳林完成。
通讯作者: 刘永锋, 110001, 辽宁省沈阳市南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院普外一科暨器官移植科。
yfliu@mail.cum.edu.cn
电话: 024-23265284 传真: 024-23252007
收稿日期: 2007-12-31 修回日期: 2008-03-14

Protective effects of taurine on the islet viability and function in rats

Ke-Zhong Zhang, Yong-Feng Liu, Jia-Lin Zhang

Ke-Zhong Zhang, Yong-Feng Liu, Jia-Lin Zhang, Department of Surgery and Organ Transplant Unit, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30672049
Correspondence to: Dr. Yong-Feng Liu, Department of Surgery and Organ Transplant Unit, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjingbei Street, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. yfliu@mail.cum.edu.cn
Received: 2007-12-31 Revised: 2008-03-14

Abstract

AIM: To investigate the protective effect of taurine on the islets during culturing and its mechanism in rats.

METHODS: Wistar rats were divided into 2 groups: RPMI-1640 group and taurine group. The percentage of active Caspase-9-positive cells or phospho-Akt 473-positive cells was determined by flow cytometry. The mRNA levels of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), nuclear factor- κ B (NF- κ B), and heme oxygenase-1 (HO-1) were evaluated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the isolated rat islets of both groups.

RESULTS: After 1-wk culture, the percentage of Caspase-9-positive cells was significantly higher in the taurine group than that in the RPMI-1640 group ($41.03\% \pm 4.46\%$ vs $23.85\% \pm 3.09\%$, $P <$

0.05). The mRNAs of TNF- α , IL-1 β , NF- κ B and HO-1 were significantly expressed after the islets were isolated and purified. However, the mRNAs of TNF- α , IL-1 β , NF- κ B expression were decreased gradually while HO-1 expression was increased with the culturing time. After 6-h, 72-h and 1-wk culture, the mRNA levels of TNF- α , IL-1 β , and NF- κ B were significantly lower in the taurine group (TNF- α : 0.34 ± 0.02 , 0.24 ± 0.01 , 0.19 ± 0.02 ; IL-1 β : 0.24 ± 0.09 , 0.09 ± 0.01 , 0.05 ± 0.01 ; NF- κ B: 1.76 ± 0.30 , 0.93 ± 0.15 , 0.37 ± 0.02) than those in the RPMI-1640 group (TNF- α : 0.57 ± 0.1 , 0.39 ± 0.02 , 0.29 ± 0.02 ; IL-1 β : 0.34 ± 0.02 , 0.24 ± 0.01 , 0.19 ± 0.02 ; NF- κ B: 2.52 ± 0.24 , 1.21 ± 0.14 , 0.76 ± 0.07) (all $P < 0.05$), but the HO-1 mRNA level was markedly higher in the taurine group (3.74 ± 0.10 , 4.33 ± 0.29 , 5.28 ± 0.29 vs 2.46 ± 0.30 , 3.13 ± 0.07 , 3.59 ± 0.22 ; all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Taurine can protect the islet cells from apoptosis by inhibiting the transcription of TNF- α , IL-1 β and NF- κ B gene or by increasing phospho-Akt activity.

Key Words: Taurine; Tumor necrosis factor- α ; Nuclear factor- κ B; Interleukin-1 β ; Heme oxygenase-1; Islet cell; Flow cytometry; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Zhang KZ, Liu YF, Zhang JL. Protective effects of taurine on the islet viability and function in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1388-1395

摘要

目的: 探讨牛磺酸(taurine, Tau)在大鼠胰岛培养过程中对胰岛的保护作用及其机制。

方法: 实验Wistar大鼠分为2组, RPMI 1640组和牛磺酸组(Tau组)。流式细胞仪检测Caspase-9和磷酸化Akt阳性细胞比例, 观察牛磺酸对Caspase-9及Akt的影响。RT-PCR检测单纯1640组和Tau组胰岛细胞的TNF- α 、IL-1 β 、NF- κ B和HO-1基因的表达。

结果: 胰岛单纯用RPMI 1640培养1 wk后激活的Caspase-9与加入牛磺酸后相比有统计学意义($41.03\% \pm 4.46\%$ vs $23.85\% \pm 3.09\%$,

同行评议者
傅志仁, 主任医师,
上海长征医院
器官移植科

$P<0.05$). 胰岛分离纯化后有明显的TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA、NF- κ B mRNA、HO-1 mRNA表达, 随着培养时间的延长TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA、NF- κ B mRNA表达逐渐减弱, HO-1 mRNA表达逐渐增强. 加入牛磺酸后胰岛TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA、NF- κ B mRNA表达明显减弱, 在6 h, 72 h及1 wk时(TNF- α : 0.34 ± 0.02 , 0.24 ± 0.01 , 0.19 ± 0.02 ; IL-1 β : 0.24 ± 0.09 , 0.09 ± 0.01 , 0.05 ± 0.01 ; NF- κ B: 1.76 ± 0.30 , 0.93 ± 0.15 , 0.37 ± 0.02)和单纯培养组(TNF- α : 0.57 ± 0.1 , 0.39 ± 0.02 , 0.29 ± 0.02 ; IL-1 β : 0.34 ± 0.02 , 0.24 ± 0.01 , 0.19 ± 0.02 ; NF- κ B: 2.52 ± 0.24 , 1.21 ± 0.14 , 0.76 ± 0.07)比较差异具有显著性(均 $P<0.05$). HO-1 mRNA的表达较单纯培养组明显增强且随着时间的延长表达更明显(3.74 ± 0.10 , 4.33 ± 0.29 , 5.28 ± 0.29 vs 2.46 ± 0.30 , 3.13 ± 0.07 , 3.59 ± 0.22 ; 均 $P<0.05$).

结论: 牛磺酸能抑制TNF- α 、IL-1 β 和NF- κ B转录并活化Akt, 抑制细胞凋亡.

关键词: 牛磺酸; 肿瘤坏死因子- α ; 核因子- κ B; 白细胞介素-1 β ; 血红素加氧酶-1; 胰岛细胞; 流式细胞术; 逆转录-聚合酶链反应

张克忠, 刘永锋, 张佳林. 牛磺酸对大鼠胰岛活性和功能的保护作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1388-1395
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1388.asp>

0 引言

糖尿病是由于自身免疫反应所导致的胰岛 β -细胞破坏所引起的一种自身免疫反应性疾病. 胰岛移植是治疗糖尿病的最有效手段之一, 但是胰岛移植的长期疗效较差, 胰岛移植后的凋亡率是正常胰腺内胰岛的10倍^[1], 移植胰岛很快失功. 多种因素影响胰岛移植的效果: 胰岛的分离、纯化、培养、及胰岛的保存均影响胰岛活性和功能. 因此, 在胰岛的分离和培养过程中加入不同的保护因素以提高胰岛的活性和功能是我们的研究目标. 牛磺酸(taurine Tau)是一种含硫氨基酸, 即2-氨基乙磺酸 $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3\text{H}$ ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$ = 111.1343). 几乎全部以游离形式存在, 细胞内外浓度比为100-50 000/1, 属于 β -氨基酸, 是一种细胞保护剂, 具有重要生物学作用: 清除氧自由基, 抗脂质过氧化损伤, 抑制细胞凋亡, 调节细胞钙稳态, 对线粒体结构和功能起稳定作用, 维持细胞内外渗透压平衡, 抑制细胞因子的产生^[2-3]. 本实验通过RT-PCR检测胰

岛分离纯化过程中及短期培养后促炎性细胞因子、核转录因子的表达以及对胰岛活性和功能的影响. 观察牛磺酸对促炎性细胞因子、核转录因子基因转录以及对体外培养胰岛的活性和功能的影响; 探讨其对胰岛的保护作用及机制.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠60只, 雌雄不限, 体质量180-220 g(购自中国医科大学动物部). 胶原酶V型(C-9263)、双硫腙(Dithizone, DTZ)、丫啶橙(Acridine Orange, AO)和溴乙啶(Ethidium Bromide, EB)均购自Sigma公司; 藻红蛋白(PE)标记的抗大鼠胰岛Caspase-9抗体(Red-LEHD-FMK)购自BioVision公司, 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的抗大鼠胰岛Akt磷酸化抗体Phospho-Akt(Ser473)及A-11070 Alexa Fluor goat anti-rabbit IgG(荧光标记的二抗)购自CST公司; 牛磺酸购自北京奥博星生物技术公司; RNA提取试剂RNAout、逆转录PCR试剂盒购于天择基因工程公司; 引物购于上海英俊生物技术公司; DNA marker购于大连宝生物公司.

1.2 方法 将实验大鼠分为2组($n=6$), 1640组: 培养基为RPMI 1640+双抗(青霉素100 U/mL、链霉素100 mg/L)+100 mL/L FCS; Tau组: 培养基为RPMI 1640+双抗(青霉素100 U/mL、链霉素100 mg/L)+100 mL/L FCS+20 mmol/L牛磺酸;

1.2.1 大鼠胰岛的分离和纯化: (1)原位灌注: 胆总管起始处插管, 冷胶原酶溶液(冷Hank's液配制, 1.0 g/L)10-12 mL以3-4 mL/min的速度逆行注入胰管内. (2)切取: 快速完整切取胰腺保持外膜完整, 并尽量少带脂肪和淋巴组织. (3)胰腺消化和胰岛纯化: 胰腺切取后 $37.5^\circ\text{C}\pm1^\circ\text{C}$ 水浴消化11-15 min. 通过肉眼观察, 消化液呈乳糜状外观不透明时迅速倒入冷的Hank's液50 mL以终止消化并且低温离心1次(800 r/min, 4°C - 8°C , 2 min). 再加入冷的Hank's液30 mL充分振荡混匀, 经80目不锈钢筛网过滤, 再次离心(800 r/min, 4°C - 8°C , 2 min). 去除沉淀以上的液体后采用Ficoll不连续密度梯度离心纯化胰岛. 浓度分别为: 270、250、230、205和110 g/L.

1.2.2 胰岛计数、活性鉴定、培养及功能检测: 将获取的胰岛用双硫腙(DTZ)染色. 胰岛细胞数 = 3次样品中DTZ阳性细胞团数/3 \times 20 \times 样本总量(mL). 用丫啶橙/溴乙啶(AO/EB)荧光染色法显示细胞活率, 活率 = 活细胞总数/(活细胞总数 + 死细胞总数) \times 100%. 胰岛分离纯化后分二组

研发前沿
牛磺酸具有清除氧自由基, 抑制细胞凋亡, 调节细胞钙稳态, 维持细胞内外渗透压平衡, 抑制细胞因子的产生等药理学作用, 在移植领域的应用正日益受到人们的关注.

相关报道
研究表明,在大器官移植领域,牛磺酸能抑制移植术后的缺血再灌注损伤和细胞因子的释放。

培养, 24孔培养板, 100 IEQ/每孔, 培养条件为: 37℃、50 mL/L CO₂、950 mL/L空气。1 d后首次换液, 为半量换液, 此后隔日换液。计数20IEQ胰岛, 用含低浓度葡萄糖(2.8 mmol/L)的Kreb's-Hank's液孵育2 h, 然后用含有高浓度葡萄糖(16.7 mmol/L葡萄糖)的Kreb's-Hank's液孵育1 h, 收集第2小时和第3小时的培养液, 采用放免法检测培养液中胰岛素含量, 计算胰岛素释放指数(SI): SI = 第3小时(高糖环境)的胰岛素含量/第2小时(低糖环境)的胰岛素含量。

1.2.3 胰岛细胞TNF-α mRNA、IL-1β mRNA、NF-κB mRNA和HO-1 mRNA的检测: 根据天泽基因公司的动物RNAout提取试剂说明提取总RNA。RT-PCR法检测TNF-α、IL-1β、NF-κB和HO-1基因的表达: (1)引物设计: 根据GenBank中TNF-α、IL-1β、NF-κB和HO-1的基因序列用引物设计软件premier5.0设计引物, 上海Invitrogen英俊生物技术有限公司合成primer, 200度: TNF-α: F-5'GTC GTA GCA AAC CAC CAA G-3', R-5'GGT ATG AAG TGG CAA ATC G-3'扩增产物长度214 bp; IL-1β: F-5'GGG ATG ATG ACG ACC TGC-3', R-5'GTC CCG ACC ATT GCT GTT-3'扩增产物长度452 bp; NF-κB: F-5'TGG ATG GAC AGG CGT TGA-3', R-5'AGA CAG GAC CTC TGA GAA AGT-3'扩增产物长度224 bp; HO-1: F-5'ACA GAA GAG GCT AAG ACC G-3', R-5'CAG GCA TCT CCT TCC ATT-3'扩增产物长度441 bp; β-actin: F-5'CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC-3', R-5'CCA CAC AGA TGA CTT GCG CTC AGG-3'扩增产物长度690 bp; (2)RT(逆转录反应): 反应体系包括RNA, Dntp, RNA酶抑制剂, 随机引物。反转录条件: 65℃, 10 min; 30℃, 5 min; 65℃, 30 min; 98℃, 5 min; 5℃, 5 min。 (3)扩增TNF-α、IL-1β、NF-κB、HO-1和β-actin建立反应体系, β-actin反应条件为: 94℃预变性3 min, 然后按94℃变性30 s、55℃退火1 min、72℃延伸1 min 30 s进行35个循环, 最后72℃延伸7 min。TNF-α反应条件为: 94℃预变性3 min, 然后按94℃变性40 s、54.5℃退火1 min、72℃延伸1 min进行35个循环, 最后72℃延伸7 min。IL-1β和HO-1反应条件为: 94℃预变性3 min, 然后按94℃变性40 s、54℃退火1 min、72℃延伸1 min进行35个循环。NF-κB反应条件为: 94℃预变性3 min, 然后按94℃变性40 s、54℃退火1 min、72℃延伸1 min进行35个循环, 最后72℃延伸7 min。 (4)PCR产物鉴定: 吸取

PCR产物10 μL与2 μL上样缓冲液混匀后, 加入凝胶梳孔内, 行20 g/L琼脂糖凝胶电泳。取DNA maker同时电泳, 作为标准分子量参照。凝胶放入G: Box(美国)成像分析系统进行分析。 (5)数据处理: 凝胶分析系统测定各条带积分吸光度值。以同一管中样品与β-actin产物条带积分吸光度值之比作数据分析, 以此反映样品的表达程度。

1.2.4 流式细胞仪检测: (1)胰蛋白酶(0.25% EDTA 0.02%)1 mL于37℃-37.5℃消化, 7 min左右, 使胰岛细胞单离; (2)Red-LEHD-FMK染色: 将胰岛用不同培养液稀释成150 μL加到EP管中, 每管中加入1 μL Red-LEHD-FMK, 孵箱中孵育1 h; 离心移去上清液(1200 r/min, 6 min); (3)Phospho-Akt(Ser473)Antibody染色: 细胞离心清洗后重新悬浮到0.5 mL PBS缓冲液, 加入40 g/L的无醇甲醛37℃固定10 min; 冰浴1 min; 加入100%甲醇(0℃-4℃)并轻轻震荡以致使细胞通透性增加; 将细胞重新悬浮到100 μL PBS缓冲液室温下孵育10 min; 加入Phospho-Akt(Ser473)Antibody(1:25稀释)室温下孵育1 h; 将细胞重新悬浮到100 μL PBS缓冲液(含5% FCS), 加入二抗Alexa Fluor488F2fragment of goat anti-rabbit IgG(1:1000稀释), 室温下孵育30 min; 将细胞重新悬浮到0.3 mL PBS缓冲液进行流式细胞仪检测。

统计学处理 数据以mean±SD表示, 采用SPSS11.5统计软件进行方差分析和t检验, P<0.05为有统计学差异。

2 结果

2.1 平均每只大鼠可获得约600-700 IEQ胰岛, 纯度在60%左右。 胰岛YO/EB荧光染色(图1A)结果显示刚分离后胰岛活率>95%。培养1 wk后的胰岛YO/EB荧光染色, RPMI 1640培养基组的胰岛较加入牛磺酸组的胰岛凋亡明显增加(图1B-C)。胰岛素释放试验表明, 单纯用RPMI 1640培养基组的胰岛素释放指数(SI)为1.64±0.28(高糖刺激的胰岛素释放量/低糖刺激的胰岛素释放量), 在培养基中加入牛磺酸后胰岛素释放指数(SI)为2.45±0.24。差异具有统计学意义(P<0.05)。

2.2 RT-PCR检测各组胰岛细胞的基因表达 胰岛分离纯化后在体外经过短暂的孵育有明显的TNF-α mRNA、IL-1β mRNA表达, 但是随着培养时间的延长TNF-α逐渐减弱, 其各时间组的差异具有显著性(P<0.05); 加入牛磺酸后TNF-α mRNA、IL-1β mRNA相对表达量明显的

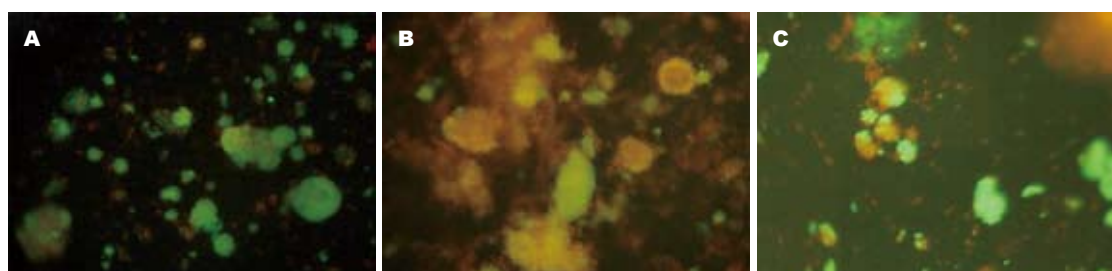


图 1 胰岛AO/EB染色($\times 200$). A: 分离纯化后胰岛染色; B: 1640组; C: Tau组.

创新盘点
本研究首次证明了在细胞分离液和培养液中加入牛磺酸后能明显抑制NF- κ B、TNF- α 及IL-1 β 的表达, 增加HO-1的表达减轻胰岛凋亡, 保护胰岛的活性和功能.

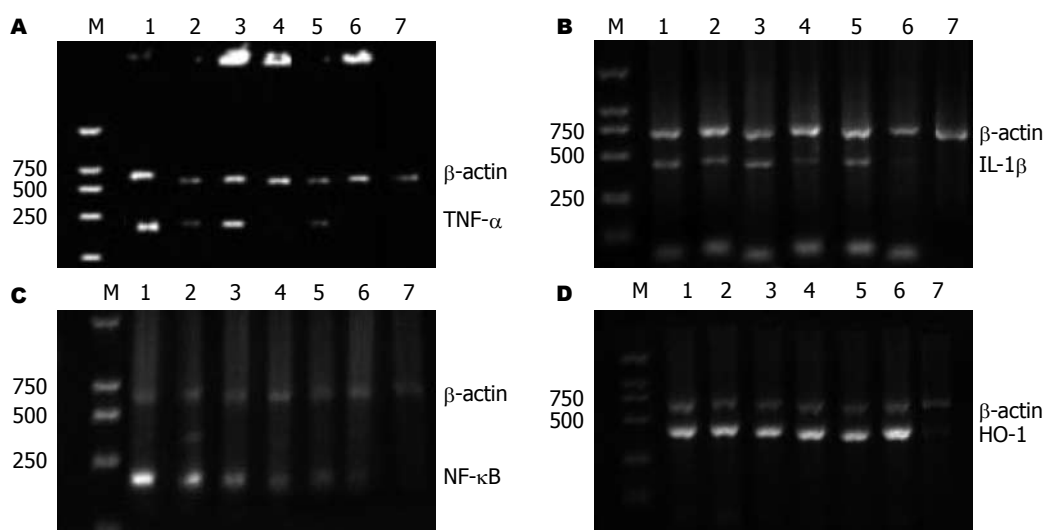


图 2 胰岛RT-PCR结果. A: TNF- α mRNA; B: IL-1 β mRNA; C: NF- κ B mRNA; D: HO-1 mRNA.

表 1 各组TNF- α mRNA和IL-1 β mRNA的表达

	TNF- α mRNA			IL-1 β mRNA		
	6 h	72 h	1 wk	6 h	72 h	1 wk
1640组	0.57 ± 0.1^a	0.39 ± 0.02^a	0.29 ± 0.02^a	0.34 ± 0.02^a	0.24 ± 0.01^a	0.19 ± 0.02^a
Tau组	0.34 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.24 ± 0.09	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.01

^a $P < 0.05$ vs 相同时点Tau组.

降低, 随着培养时间的延长TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA逐渐减弱, 其各时间组的差异具有显著性($P < 0.05$); 在相同时限点比较两组的TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA相对表达量, 差异具有显著性($P < 0.05$, 表1, 图2A-B).

单纯RPMI 1640培养组的胰岛细胞在培养6 h、72 h、1 wk的NF- κ B mRNA相对表达量分别为 2.52 ± 0.24 、 1.21 ± 0.14 、 0.76 ± 0.07 , 随着培养时间的延长NF- κ B逐渐减弱, 其各时间组的差异具有显著性($P < 0.05$); 在培养基中加入牛磺酸后各时间点的NF- κ B mRNA相对表达量分别为 1.76 ± 0.30 、 0.93 ± 0.15 、 0.37 ± 0.02 , 而且同样随着培养时间的延长NF- κ B逐渐减弱, 其各时间组的差异具有显著性($P < 0.05$); 在相同时限点比

较两组的NF- κ B mRNA相对表达量, 差异具有显著性($P < 0.05$); 可见牛磺酸能抑制NF- κ B mRNA的表达(表2, 图2C). HO-1是一种重要的细胞保护因子, 实验中我们检测单纯RPMI 1640培养组的胰岛细胞在培养6 h、72 h、1 wk的HO-1 mRNA相对表达量分别为 2.46 ± 0.30 、 3.13 ± 0.07 、 3.59 ± 0.22 , 证明胰岛分离纯化后HO-1有明显表达并且随着培养时间的延长HO-1逐渐增强, 其各时间组的差异具有显著性($P < 0.05$); 在培养基中加入牛磺酸后各时间点的HO-1 mRNA相对表达量分别为 3.74 ± 0.10 、 4.33 ± 0.29 、 5.28 ± 0.29 , 而且同样随着培养时间的延长HO-1逐渐增强, 其各时间组的差异具有显著性($P < 0.05$); 在相同时限点比较两组的HO-1 mRNA相对表达

应用要点
牛磺酸作为药物的单体成分,其化学结构、药代动力学、药效学及药理作用机制明确,副作用很小,目前已用于临床。

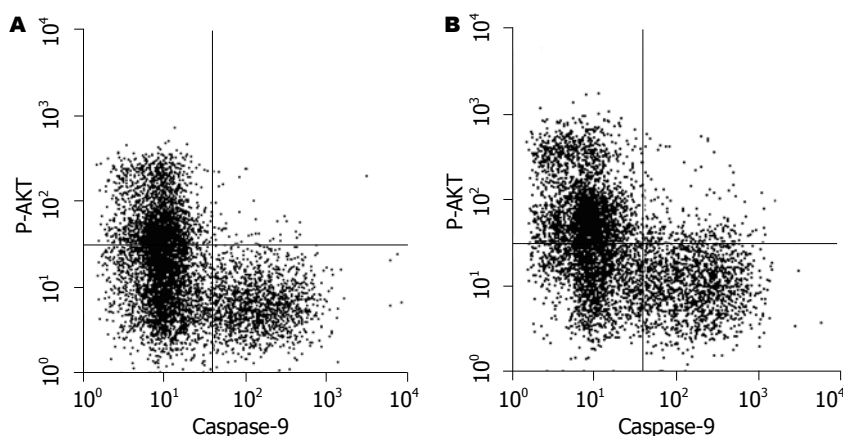


图3 流式细胞仪检测Caspase-9活性和Akt磷酸化. A: 1640组; B: Tau组.

表2 各组NF- κ B mRNA及HO-1 mRNA的表达

	NF- κ B mRNA			HO-1 mRNA		
	6 h	72 h	1 wk	6 h	72 h	1 wk
1640组	2.52 ± 0.24^a	1.21 ± 0.14^a	0.76 ± 0.07^a	2.46 ± 0.30^a	3.13 ± 0.07^a	3.59 ± 0.22^a
Tau组	1.76 ± 0.30	0.93 ± 0.15	0.37 ± 0.02	3.74 ± 0.10	4.33 ± 0.29	5.28 ± 0.29

^a $P < 0.05$ vs 相同时点Tau组.

量, 差异具有显著性($P < 0.05$); 可见牛磺酸能上调HO-1 mRNA的表达(表2, 图2D).

2.3 流式细胞仪检测 胰岛单纯用RPMI 1640培养1 wk后, 激活的Caspase-9为 $41.03\% \pm 4.46\%$, Caspase-9激活可以诱导细胞凋亡的级联放大反应导致细胞凋亡, 与此同时Akt磷酸化细胞占 $31.47\% \pm 4.08\%$, Akt磷酸化后能抑制procaspase-9激活或抑制细胞色素C释放抑制细胞凋亡; 加入牛磺酸后激活的Caspase-9为 $23.85\% \pm 3.09\%$, 较单纯培养组明显降低, 并且其差异具有统计学意义($P < 0.05$); 磷酸化Akt细胞占 $49.14\% \pm 6.73\%$, 较对照组明显的升高, 其差异具有统计学意义($P < 0.05$); 本实验结果证实了Akt磷酸化后能抑制procaspase-9激活, 保护细胞免受凋亡(图3).

3 讨论

胰岛移植是治疗糖尿病的最有效手段之一^[4], 但是, 研究表明在同基因系的胰岛移植模型中接近60%的 β -细胞经受凋亡, 其中一半发生在移植后3 d, 而且主要是非特异性炎症反应的结果^[5-6]. 胰腺的保存、胰岛分离过程中诱导的应激、将胰岛暴露于促炎性细胞因子、免疫学及非免疫学炎症应答均促成了胰岛移植后早期阶段的胰岛移植体丧失^[7]. 胰岛移植体制备过程中产生的促炎性细胞因子可以在体外导致胰岛凋亡从而影响胰岛的活性和功能, 并且在移植后

早期细胞介导的和非细胞介导的排斥反应中扮演重要角色^[8]. 导致移植胰岛细胞发生凋亡的一种重要的炎症介质是TNF- α ^[9], TNF- α 是死亡受体TNFR1的相应配体, TNF- α 同TNFR1相结合可以导致死亡受体(DR)多聚化或构象改变, 从而使Caspase-8被水解而活化诱导细胞凋亡(死亡受体途径). Caspase-8活化后还可以酶解Bid为tBid从而使后者转位至线粒体通过Bax/Bak促使细胞色素C释放入胞质, 并与凋亡蛋白酶激活因子1(Apaf-1)和Caspase-9、ATP在胞质内形成多蛋白复合物, 即凋亡体. 在凋亡体内Caspase-9的Caspase聚集域(CARD)与Apaf-1的CARD结合而活化, 继而激活效应Caspase, 最终导致细胞凋亡(线粒体途径). TNF- α 也可以与肿瘤坏死因子受体相关因子-2(TRAF2)结合通过NF- κ B诱导激酶(NIK)激活I κ B激酶(IKK)磷酸化I κ B使之降解从而活化NF- κ B使其转位到核内导致一系列的基因转录事件. IL-1 β 是造成移植胰岛失功的另外一种重要的炎症介质. 主要由激活的巨噬细胞和中性粒细胞分泌, 胰岛 β -细胞受到细胞因子的刺激后也能分泌促炎性细胞因子. IL-1 β 同胰岛细胞表面的受体IL-1 β R相结合导致一系列的基因转录事件, 使IL-1 β 受体相关激酶(IRAK)^[10]激活并由此激活TNF受体相关因子6(TRAF6)^[11-12]. IRAK及TRAF6通过NIK激活IKK后磷酸化I κ B使之从26S蛋白酶复合体上降解^[13], 导致NF- κ B从胞质易位到细胞核内. NF- κ B捆绑

到DNA调节多种基因的转录, 包括IL-1、IL-6、TNF- α 、ICAM-1^[14-15]、VCAM-1、iNOS、PGE2和EP3 mRNA^[16-17]. 可见在细胞因子网络调节系统中IL-1 β 、TNF- α 同NF- κ B互为因果, 即NF- κ B活化能够提高TNF- α 和IL-1 β 转录, 而这两种细胞因子反过来也能激活NF- κ B从而形成一种恶性循环. 另外IL-1 β 同胰岛细胞表面的受体IL-1 β R相结合激活NF- κ B转位到细胞核内上调iNOS的基因转录从而诱导NO的合成增加. NO能通过抑制三羧酸循环中的顺乌头酸酶减少胰岛素的合成, 同时通过诱导DNA条状断裂导致细胞死亡或者导致细胞凋亡^[18-19], 最终导致胰岛细胞凋亡使移植失功. 我们在实验中发现, 胰岛分离纯化后经过短时间(6 h)的培养后存在明显的TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA表达, 在培养1 wk后Caspase-9阳性细胞率为41.03% \pm 4.46%; 证实了胰岛分离纯化过程中的应激导致了TNF- α 、IL-1 β 的释放并且启动细胞凋亡过程. 在培养基中加入牛磺酸后TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA表达明显减弱, Caspase-9阳性细胞率为23.85% \pm 3.09%, 胰岛凋亡明显减少可见牛磺酸可抑制细胞凋亡. Akt是已经证实的促使细胞生存的蛋白激酶, 多种因素均可导致其激活, TNF- α 、IL-1 β 不仅可以促使NF- κ B诱导凋亡还可以磷酸化Akt使之激活^[20-21]. 活化的Akt能直接磷酸化procaspase-9的196位丝氨酸残基从而阻断其激活而抑制细胞凋亡^[22]. 我们在实验中也证实胰岛分离纯化培养1 wk后Akt磷酸化胰岛细胞数为31.47% \pm 4.08%, Caspase-9阳性细胞率为41.03% \pm 4.46%, 加入牛磺酸后激活的Caspase-9为23.85% \pm 3.09%, 较单纯培养组明显降低, 并且其差异具有统计学意义($P<0.05$); 磷酸化Akt占49.14% \pm 6.73%, 较对照组明显的升高, 其差异具有统计学意义($P<0.05$); 本实验结果说明牛磺酸能促进Akt磷酸化、抑制procaspase-9激活, 通过阻断Caspase级联放大反应抑制胰岛细胞凋亡. 胰岛素释放试验表明, 在培养基中加入牛磺酸后胰岛素释放指数(SI)明显升高. 这说明胰岛在体外经长时间的培养后对高糖刺激的胰岛素分泌活性降低, 在培养过程中加入牛磺酸能保护葡萄糖刺激的胰岛细胞分泌功能. 为了观察牛磺酸对TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA和NF- κ B mRNA转录的影响, 我们在Hank's液、RPMI 1640培养基中加入20 mmol/L的牛磺酸, 胰岛分离纯化经相同时间培养后检测胰岛TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA和NF- κ B mRNA转录水平,

发现牛磺酸明显的下调促炎性细胞因子及核因子的基因转录. 其机制可能为牛磺酸进入细胞后阻止I κ B- α 降解, 从而阻止NF- κ B从胞质向细胞核易位从而降低其活性, 减弱TNF- α 、IL-1 β mRNA和NF- κ B的转录, 减少细胞因子的表达^[23]. 牛磺酸在细胞因子网络事件中或者通过下调TNF- α mRNA、IL-1 β mRNA的转录从而抑制NF- κ B的核转位达到细胞保护功能, 或者通过下调NF- κ B mRNA转录阻断促炎性细胞因子的合成和释放达到细胞保护功能, 也可能两者都存在, 这有待于进一步验证. 胰岛分离纯化过程的各种应激导致NF- κ B、IL-1 β 和TNF- α 的转录增加从而诱导胰岛易于发生凋亡并损伤胰岛的活性和功能. 牛磺酸作为一种保护性氨基酸能进入细胞通过阻断细胞因子网络的级联放大效应; 促使Akt磷酸化并在核内对NF- κ B进行修饰促进抗凋亡基因的表达或者抑制Caspase级联放大反应抑制胰岛细胞凋亡保护胰岛的活性和功能.

胰岛在分离及培养过程中的各种应激还可以启动胰岛的内源性保护机制. 血红素加氧酶(HO)就是其中的一种应激反应蛋白^[24-25]. 其中HO-1是可诱导性的属于热休克蛋白家族成员(HSP32), 是一种膜结合酶, 能催化亚铁血红素降解. 各种应激因素如亚铁血红素及各种应激如紫外线照射、氧化应激、内毒素、激素和重金属都能诱导HO-1的表达增加. HO-1能催化血红素降解为一氧化碳、铁和胆绿素, 一氧化碳通过诱导超氧化物歧化酶的释放抑制细胞凋亡; 自有铁能刺激铁蛋白的产生, 铁蛋白能螯合细胞内的自有铁从而阻止自由基的形成, 因此防止自由基对DNA、蛋白质和脂质的损伤; 胆红素属于强抗氧化剂能抑制不饱和脂肪酸的自氧化或过氧化自由基诱导的氧化损伤, 并且还能清除单线态氧能够阻止促炎症反应基因表达的信号转导通路中的一个确定成分活性氧簇的产生从而抑制凋亡. 我们的实验表明胰岛在分离及培养过程中HO-1表达明显增加. 但不能保护胰岛免受细胞因子所导致的细胞凋亡呢? 有一种解释是HO-1的表达明显迟于细胞因子的刺激时间, 当HO-1达到其保护剂量时细胞损伤已经不可逆. IL-1 β 刺激HO-1的表达是比较缓和的, HO-1的保护效应同IL-1 β 的损伤效应不相平衡. 另外胰岛暴露于细胞因子的刺激下能表达NO和前列腺素E2(PG-E2)^[26-29], 此二者能抑制HO-1的活性. 因此, 受损的HO-1不能保护胰岛免受细胞因子引起的细胞毒性. 我们的实验

同行评价
本文对提高胰岛细胞的活性和临床胰岛细胞移植有一定的参考价值, 但有关方法可以再简洁些.

结果与此相符合, 胰岛在培养7 d后其细胞凋亡率非常高, 而且影响到葡萄糖刺激的胰岛素释放功能. 如果在培养基中加入牛磺酸则可以看到HO-1 mRNA的表达比单纯培养的胰岛明显的上调, 培养胰岛凋亡率明显减低, 胰岛的分泌功能及葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能优于对照组. 并且随着培养时间的延长HO-1 mRNA仍然在高水平表达. 表明牛磺酸能使HO-1在短时间内高强度表达, 从而实现细胞保护效应.

分离纯化后的胰岛的数量和质量是决定胰岛移植成功的关键, 胰岛在分离和纯化过程中的丢失影响了胰岛获得的数量, 我们改进了胰岛纯化过程中的Ficoll密度梯度离心方法, 分为5层密度梯度: 分别为27%、25%、23%、20.5%和11%, 保证胰岛获取的数量600-700 IEQ/只大鼠. 另外, 有活性、功能完整的胰岛是关键, 胰岛分离纯化过程中促炎性细胞因子的释放不仅影响胰岛的质量而且通过促使胰岛凋亡影响其数量; 实验证明牛磺酸确实能抑制促炎性细胞因子的释放发挥其细胞保护功能, 在胰岛移植前的胰岛培养阶段保护胰岛的活性和功能, 为临床提高移植胰岛的活性和功能奠定实验基础.

4 参考文献

- 1 Biarnes M, Montolio M, Nacher V, Raurell M, Soler J, Montanya E. Beta-cell death and mass in syngeneically transplanted islets exposed to short- and long-term hyperglycemia. *Diabetes* 2002; 51: 66-72
- 2 Takatani T, Takahashi K, Uozumi Y, Matsuda T, Ito T, Schaffer SW, Fujio Y, Azuma J. Taurine prevents the ischemia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiomyocytes through Akt/caspase-9 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 484-489
- 3 Ahn BO, Kim KH, Lee G, Lee HS, Kim CD, Kim YS, Son MW, Kim WB, Oh TY, Hyun JH. Effects of taurine on cerulein-induced acute pancreatitis in the rat. *Pharmacology* 2001; 63: 1-7
- 4 Serup J. Efficacy testing of cosmetic products. A proposal to the European Community by the Danish Environmental Protection Agency, Ministry of Environment and Energy. *Skin Res Technol* 2001; 7: 141-151
- 5 Bailes BK. Diabetes mellitus and its chronic complications. *AORN J* 2002; 76: 266-276, 278-282; quiz 283-286
- 6 Bloomgarden ZT. Inpatient diabetes control: approaches to treatment. *Diabetes Care* 2004; 27: 2272-2277
- 7 Rother KI, Harlan DM. Challenges facing islet transplantation for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 2004; 114: 877-883
- 8 Ehrnfelt C, Kumagai-Braesch M, Uzunel M, Holgersson J. Adult porcine islets produce MCP-1 and recruit human monocytes in vitro. *Xenotransplantation* 2004; 11: 184-194
- 9 Thomas HE, Darwiche R, Corbett JA, Kay TW. Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production. *Diabetes* 2002; 51: 311-316
- 10 Kutlu B, Darville MI, Cardozo AK, Eizirik DL. Molecular regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2003; 52: 348-355
- 11 Eder J. Tumour necrosis factor alpha and interleukin 1 signalling: do MAPKK kinases connect it all? *Trends Pharmacol Sci* 1997; 18: 319-322
- 12 Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996; 383: 443-446
- 13 Kwon G, Corbett JA, Hauser S, Hill JR, Turk J, McDaniel ML. Evidence for involvement of the proteasome complex (26S) and NFkappaB in IL-1beta-induced nitric oxide and prostaglandin production by rat islets and RINm5F cells. *Diabetes* 1998; 47: 583-591
- 14 Thomas HE, Darwiche R, Corbett JA, Kay TW. Interleukin-1 plus gamma-interferon-induced pancreatic beta-cell dysfunction is mediated by beta-cell nitric oxide production. *Diabetes* 2002; 51: 311-316
- 15 Kuttler B, Hartmann A, Wanka H. Long-term culture of islets abrogates cytokine-induced or lymphocyte-induced increase of antigen expression on beta cells. *Transplantation* 2002; 74: 440-445
- 16 Tran PO, Gleason CE, Poitout V, Robertson RP. Prostaglandin E(2) mediates inhibition of insulin secretion by interleukin-1beta. *J Biol Chem* 1999; 274: 31245-31248
- 17 Tran PO, Gleason CE, Robertson RP. Inhibition of interleukin-1beta-induced COX-2 and EP3 gene expression by sodium salicylate enhances pancreatic islet beta-cell function. *Diabetes* 2002; 51: 1772-1778
- 18 Wachlin G, Augstein P, Schroder D, Kuttler B, Klotting I, Heinke P, Schmidt S. IL-1beta, IFN-gamma and TNF-alpha increase vulnerability of pancreatic beta cells to autoimmune destruction. *J Autoimmun* 2003; 20: 303-312
- 19 Sun Z, Andersson R. NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock* 2002; 18: 99-106
- 20 Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* 1999; 13: 2905-2927
- 21 Aggarwal S, Ichikawa H, Takada Y, Sandur SK, Shishodia S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkappaBalpha kinase and Akt activation. *Mol Pharmacol* 2006; 69: 195-206
- 22 Kim D, Chung J. Akt: versatile mediator of cell survival and beyond. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35: 106-115
- 23 Gurujeyalakshmi G, Wang Y, Giri SN. Taurine and niacin block lung injury and fibrosis by down-regulating bleomycin-induced activation of transcription nuclear factor-kappaB in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 82-90
- 24 Ye J, Laychock SG. A protective role for heme oxygenase expression in pancreatic islets exposed to interleukin-1beta. *Endocrinology* 1998; 139:

- 4155-4163
- 25 Pileggi A, Molano RD, Berney T, Cattan P, Vizzardelli C, Oliver R, Fraker C, Ricordi C, Pastori RL, Bach FH, Inverardi L. Heme oxygenase-1 induction in islet cells results in protection from apoptosis and improved in vivo function after transplantation. *Diabetes* 2001; 50: 1983-1991
- 26 Midwinter RG, Cheah FC, Moskovitz J, Vissers MC, Winterbourn CC. IkappaB is a sensitive target for oxidation by cell-permeable chloramines: inhibition of NF-kappaB activity by glycine chloramine through methionine oxidation. *Biochem J* 2006; 396: 71-78
- 27 Kanayama A, Inoue J, Sugita-Konishi Y, Shimizu M, Miyamoto Y. Oxidation of Ikappa Balpha at methionine 45 is one cause of taurine chloramine-induced inhibition of NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 2002; 277: 24049-24056
- 28 Madrid LV, Mayo MW, Reuther JY, Baldwin AS Jr. Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38. *J Biol Chem* 2001; 276: 18934-18940
- 29 Hatano E, Brenner DA. Akt protects mouse hepatocytes from TNF-alpha- and Fas-mediated apoptosis through NK-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1357-G1368

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志计量单位标准

本刊讯 本刊计量单位采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为 M_r 30 000或30 kDa(M 大写斜体, r 小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即 A_r (A 大写斜体, r 小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是 u (小写正体). 计量单位在+、-、 \pm 及-后列出. 如 $37.6 \pm 1.2^\circ\text{C}$, 45.6 ± 24 岁, 56.4 ± 0.5 d. 3.56 ± 0.27 pg/ml应为 3.56 ± 0.27 ng/L, 131.6 ± 0.4 mmol/L, $t = 28.4 \pm 0.2^\circ\text{C}$. BP用kPa(mmHg), RBC数用 $\times 10^{12}/\text{L}$, WBC数用 $\times 10^9/\text{L}$, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r 明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm \times 6 cm \times 4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、 CO_2 结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU = 16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把 1×10^{-3} g与 5×10^{-7} g之类改成1 mg与0.5 μg , hr改成h, 重量 γ 改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数字的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg \cdot d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO_2 , 50 mL/L CO_2 ; 1 : 1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm = 45×10^{-6} ; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示. (常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

胰岛素样生长因子-1对重症急性胰腺炎大鼠小肠黏膜上皮细胞*bax*和*bcl-2* mRNA表达的影响

王映珍, 王世文, 李培杰, 党登峰, 孙志江, 王先坤, 徐庆杰

背景资料
重症急性胰腺炎(SAP)是临床上常见的急腹症之一,其起病急、进展快、病情危重、并发症多、治疗棘手、医疗费用昂贵,死亡率高达20%-30%。大量的证据表明,多种因素造成的肠屏障功能不全是细菌和内毒素大量易位的前提条件,而肠道细菌易位也是胰腺炎发生感染的主要来源,同时加重SIRS,导致MODS甚至MOF的发生。本文应用外源性IGF-1对SAP大鼠进行干预治疗,观察IGF-1对SAP大鼠小肠黏膜上皮细胞凋亡和凋亡相关基因表达的影响,以期了解其对肠屏障保护作用的机制。

王映珍, 李培杰, 孙志江, 王先坤, 徐庆杰, 兰州大学第二医院急救中心 甘肃省兰州市 730000
王世文, 党登峰, 甘肃省第二人民医院普外科 甘肃省兰州市 730000

王映珍, 硕士, 主治医师, 主要从事外科急腹症的研究。
作者贡献分布: 王映珍与王世文对此文所作贡献均等; 此课题由王映珍与王世文设计; 研究过程由王映珍、王世文、李培杰、党登峰、孙志江、王先坤及徐庆杰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由王世文提供; 数据分析由王映珍及王世文完成; 本论文写作由王映珍及王世文完成。

通讯作者: 王世文, 730000, 甘肃省兰州市, 甘肃省第二人民医院普外科, wshw120@163.com

电话: 0931-4920997

收稿日期: 2007-12-05 修回日期: 2008-03-03

Effects of insulin-like growth factor - 1 on *bax* and *bcl-2* mRNA expression in intestinal mucosal epithelial cells of rats with severe acute pancreatitis

Ying-Zhen Wang, Shi-Wen Wang, Pei-Jie Li, Deng-Feng Dang, Zhi-Jiang Sun, Xian-Kun Wang, Qing-Jie Xu

Ying-Zhen Wang, Pei-Jie Li, Zhi-Jiang Sun, Xian-Kun Wang, Qing-Jie Xu, Department of Emergence Center, the Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Shi-Wen Wang, Deng-Feng Dang, Department of Surgery, Gansu Provincial Deuto-People's Hospital, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Correspondence to: Dr. Shi-Wen Wang, Department of Surgery, Gansu Provincial Deuto-People's Hospital, Lanzhou 730030, Gansu Province, China. wshw120@163.com

Received: 2007-12-05 Revised: 2008-03-03

Abstract

AIM: To investigate the effects of exogenous insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on the intestinal mucosal epithelial cell apoptosis and the associated genes *bax* and *bcl-2* in rats with severe acute pancreatitis (SAP), and to explore the protective effect of IGF-1 on intestinal mucosal barrier function and its possible mechanisms.

METHODS: Seventy-two male Wistar rats were randomly divided into 3 groups: sham operation (SO) group, SAP group and IGF-1 treat-

ment group. Eight rats were killed in each group at 6, 12, and 24 h, respectively. Serum amylase level was detected by iodine-starch colorimetry. Pathological changes in the small intestine were observed. Apoptosis of mucosal cells was detected by TUNEL methods, and the variation of the *bax* and *bcl-2* gene expression in small intestinal tissue was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: In the IGF-1 treatment group, the apoptosis index of intestinal epithelial cells was decreased significantly as compared with that in the SAP group (6 h: 13.88 ± 1.73 vs 19.00 ± 2.78 ; 12 h: 10.13 ± 1.55 vs 17.63 ± 1.60 ; 24 h: 9.50 ± 1.07 vs 17.25 ± 2.76 ; all $P < 0.05$), and the pathological changes in intestinal tissues were obviously improved. Compared with that in the SAP group, the *bax* mRNA expression was notably reduced in the IGF-1 treatment group (6 h: 1.10 ± 0.02 vs 1.19 ± 0.04 ; 12 h: 0.97 ± 0.04 vs 1.16 ± 0.02 ; 24 h: 0.87 ± 0.03 vs 1.14 ± 0.03 ; all $P < 0.05$), while, the *bcl-2* mRNA expression was increased significantly in the IGF-1 treatment group (6 h: 0.65 ± 0.02 vs 0.57 ± 0.02 ; 12 h: 0.69 ± 0.04 vs 0.57 ± 0.01 ; 24 h: 0.72 ± 0.02 vs 0.58 ± 0.01 ; all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Exogenous IGF-1 may alleviate SAP-induced injury of intestinal mucosa by altering the transcription of *bax* and *bcl-2* genes.

Key Words: Insulin-like growth factor-1; Severe acute pancreatitis; Mucosal barrier; Apoptosis; *Bax*; *Bcl-2*; Reverse transcription polymerase chain reaction

Wang YZ, Wang SW, Li PJ, Dang DF, Sun ZJ, Wang XK, Xu QJ. Effects of insulin-like growth factor - 1 on *bax* and *bcl-2* mRNA expression in intestinal mucosal epithelial cells of rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1396-1401

摘要

目的: 研究外源性胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 对重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)大

同行评议者
刘改芳, 主任医师, 河北医科大学第三医院消化内科

鼠小肠黏膜上皮细胞凋亡及凋亡相关基因*bax*、*bcl-2* mRNA表达的影响, 探讨其对肠道屏障保护作用的机制。

方法: 72只♂ Wistar大鼠按照随机数字表法分为假手术组(SO组, $n = 24$)、重症急性胰腺炎组(SAP组, $n = 24$)、IGF-1 治疗组(IGF-1组, $n = 24$)。各组动物分别于术后6、12、24 h各处死8只, 检测血浆淀粉酶, 观察小肠组织病理学变化, TUNEL法检测小肠黏膜上皮细胞凋亡, RT-PCR检测小肠上皮细胞中*bax*和*bcl-2* mRNA的表达。

结果: 与SAP组各时相点相比, IGF-1 治疗组大鼠小肠黏膜上皮细胞凋亡指数显著降低(6 h: 13.88 ± 1.73 vs 19.00 ± 2.78 ; 12 h: 10.13 ± 1.55 vs 17.63 ± 1.60 ; 24 h: 9.50 ± 1.07 vs 17.25 ± 2.76 ; 均 $P < 0.05$), 小肠组织病理变化明显改善; 小肠组织中*bax* mRNA的表达在IGF-1 组的各时相点较SAP组明显减弱(6 h: 1.10 ± 0.02 vs 1.19 ± 0.04 ; 12 h: 0.97 ± 0.04 vs 1.16 ± 0.02 ; 24 h: 0.87 ± 0.03 vs 1.14 ± 0.03 , 均 $P < 0.05$); *bcl-2* mRNA的表达在IGF-1 组各时相点与SAP组相比明显增强(6 h: 0.65 ± 0.02 vs 0.57 ± 0.02 ; 12 h: 0.69 ± 0.04 vs 0.57 ± 0.01 ; 24 h: 0.72 ± 0.02 vs 0.58 ± 0.01 , 均 $P < 0.05$)。

结论: 外源性IGF-1 可以减轻SAP时肠黏膜的损伤。

关键词: 胰岛素样生长因子-1; 重症急性胰腺炎; 肠黏膜屏障; 凋亡; *Bax*; *Bcl-2*; 逆转录-聚合酶链反应

王映珍, 王世文, 李培杰, 党登峰, 孙志江, 王先坤, 徐庆杰. 胰岛素样生长因子-1 对重症急性胰腺炎大鼠小肠黏膜上皮细胞*bax*和*bcl-2* mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1396-1401
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1396.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)时多种因素造成的肠黏膜屏障功能障碍是细菌和内毒素大量移位的前提条件, 也是胰腺炎发生感染的主要来源。肠道细菌移位, 造成内毒素血症或菌血症, 加重全身炎症反应, 最终发展为多器官功能障碍, 这也是SAP死亡率居高不下的主要原因^[1-2]。细胞凋亡在维持肠黏膜上皮细胞稳态中起着重要作用, 研究表明肠黏膜上皮细胞过度凋亡参与了SAP时肠黏膜屏障功能障碍的发生, 是造成肠黏膜屏障损伤的原因之一^[3]。

胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)通过调节*bcl-2*家族基因表达而具有明显的抗凋亡作用^[4-6]。我们应用外源性IGF-1 对大鼠实验性SAP进行干预治疗, 以期了解IGF-1 对SAP大鼠小肠黏膜上皮细胞凋亡和凋亡相关基因表达的影响及对SAP大鼠肠屏障功能保护作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂ Wistar大鼠72只, 体质量200±20 g, 购自兰州大学医学实验动物中心。牛磺胆酸钠购自Sigma公司, 用生理盐水配制成浓度为50 g/L的溶液。TGF-1 (Biovision公司), 用生理盐水配制成浓度20 mg/L, 且分装后-20℃保存待用。TRIzol试剂及RT-PCR相关试剂购自大连宝生物公司。细胞凋亡原位检测(TUNEL)试剂盒购自德国Roche公司。*bcl-2*和*bax*引物由大连宝生物公司合成。PCR扩增仪(Elmper perkin 2004)。

1.2 方法

1.2.1 分组: 将大鼠按照随机数字表法分为假手术组(SO组)、重症急性胰腺炎组(SAP组)和IGF-1 治疗组(IGF-1 组), 每组24只; 各组再分为3个时相点(6, 12, 24 h), 每个时相点8只。动物术前禁食12 h, 自由饮水。采用20 g/L戊巴比妥钠溶液腹腔内注射麻醉(0.25 mL/100 g体质量)。常规消毒, 沿腹白线切开入腹, 采用胰胆管逆行注射法制作动物模型, SAP组和IGF-1 治疗组向胰胆管内逆行推注50 g/L牛磺胆酸钠溶液, SO组推注生理盐水, 剂量均为0.1 mL/100 g体质量(推注速度为0.2 mL/min), 注射完毕后, 停留4 min。观察SAP组和IGF-1 治疗组胰腺出现水肿伴出血灶后, 缝合腹壁各层。IGF-1 治疗组分别于术前30 min和术后3 h经后肢内侧皮下注射IGF-1 生理盐水溶液50 μg/kg体质量(浓度20 mg/L), 即2.5 mL/kg体质量, 而SO组和SAP组则于相同时间点经上述途径注射生理盐水2.5 mL/kg体质量。术后禁食, 自由饮水。

1.2.2 标本采集及预处理: 各组动物分别于术后6、12、24 h 3个时相点各取8只用20 g/L戊巴比妥钠溶液腹腔内注射麻醉(0.25 mL/100 g体质量)后, 无菌条件下取右心室血5 mL加入灭热源的肝素抗凝管, 分离血浆后保存于-70℃待检。开腹取距回盲部2 cm处回肠组织, 置于冰冷的生理盐水中, 沿纵轴剪开肠管, 冲洗干净肠内容物, 用滤纸吸干水后, 分别用100 g/L中性甲醛和25 g/L戊二醛固定做病理形态学检查, 另一部分装入

研发前沿
国内外关于IGF-1在SAP中的作用的研究内容主要是SAP时IGF-1在各组织器官中的表达以及外源性IGF-1在改善胰腺微循环、对相关细胞因子的相互影响等方面, 然而外源性IGF-1对重症急性胰腺炎时肠黏膜屏障功能及肠黏膜上皮细胞凋亡的研究较少。

相关报道

Pugazhenthil *et al* 发现IGF-1能通过激活核转录因子cAMP反应元件结合蛋白在转录水平上调*bcl-2*,并增强*bcl-2*启动子活性; Metsuzaki *et al*认为IGF-1可能通过PI3激酶/Akt信号途径来抑制凋亡。

用DEPC处理过的冻存管后即刻投入液氮内保存待检。用全自动生化分析仪测定检测血浆淀粉酶。

1.2.3 小肠组织病理形态学观察: 小肠组织石蜡切片行HE染色,由专一病理医师光镜下观察组织损伤程度。采用Chiu氏6级评分法^[7]评估损伤程度。用25 g/L戊二醛溶液固定的小肠组织,经脱水、包埋、超薄切片后于JEM-1230型透射电镜上观察。

1.2.4 肠黏膜上皮细胞凋亡检测: 采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)法,检测小肠组织切片中凋亡细胞的核酸断裂片断并计算凋亡指数(AI)。结果判断:以肠上皮细胞核内发现棕色颗粒为阳性。光镜下计数每100个上皮细胞中凋亡细胞个数,每张切片任选5个视野,求其平均值,即凋亡指数。

1.2.5 凋亡相关基因*bax*、*bcl-2* mRNA表达的检测: 从液氮内取出小肠组织样本放入用DEPC预处理过的研钵,迅速加入液氮研磨成粉末,采用TRIzol试剂提取总RNA,在20 μ L体系中分别用目的引物(下游引物)反转录合成cDNA后应用聚合酶链式反应(PCR)检测*bax*、*bcl-2* mRNA表达,以 β -actin为内参,取10 μ L PCR产物在10 g/L琼脂糖凝胶上电泳。引物序列(Primer Premier 5.0设计,大连宝生物公司合成)及反应条件分别为:*bax*,上游引物: 5'-GAAGCTGAGCGAGTGTC TCCG-3',下游引物: 5'-TGGTCACTGTCTGCC ATGTGG-3'(扩增产物524 bp); *bcl-2*,上游引物: 5'-CGGGCTGGGGATGACTTCTCT-3',下游引物: 5'-GCATCCCAGCCTCCGTTATCC-3'(扩增产物296 bp); β -actin,上游引物: 5'-ATGGATGAC GTATCGTG-3',下游引物: 5'-ATGAGGTAGTT GTCAGGT-3'(扩增产物445 bp); 反应条件: 变性94 $^{\circ}$ C、退火为*bax* 57 $^{\circ}$ C, *bcl-2*为60 $^{\circ}$ C, β -actin为54 $^{\circ}$ C,延伸72 $^{\circ}$ C,循环次数34。取10 μ L PCR产物在10 g/L琼脂糖凝胶上电泳,用DNA半定量扫描仪测定电泳带面积和光密度值, *bax*、*bcl-2*与内参照基因 β -actin的比值,代表组织*bax*、*bcl-2*相对表达量。

统计学处理 计量资料以mean \pm SD表示,采用SPSS11.0进行统计学处理,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Bonferroni或Tamhane法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆淀粉酶 SAP组血浆淀粉酶在各时相点

较SO组显著升高($P<0.05$),虽然在6 h相点IGF-1组与SAP组血浆淀粉酶无显著差异,但在12和24 h两组差异显著($P<0.05$), IGF-1组与SO组比较各时相点均无明显差异(表1)。

2.2 小肠组织病理学检查及评分结果 光镜示SO组小肠黏膜结构基本正常; SAP组6 h时即有小肠壁充血、水肿、伴少量炎症细胞浸润,少部分绒毛融合、脱落、缺损,此后上述改变更明显; IGF-1组上述病理变化明显减轻。肠组织病理学评分显示SAP组较SO组各相应时相点明显增高(均 $P<0.05$),而IGF-1组则较SAP组各相应时相点明显降低($P<0.05$,表1)。

电镜示SO组小肠上皮细胞间连接结构完整,偶见凋亡细胞; SAP组肠上皮细胞间紧密连接基本正常,吸收细胞肿胀明显,微绒毛紊乱,稀疏、长短不一,同时可见明显细胞凋亡及凋亡后坏死现象,表现为核沿细胞膜浓缩、染色质凝集等核边界现象,12 h后微绒毛稀疏、脱落及线粒体肿胀更加明显。经IGF-1治疗后微绒毛虽较稀疏,但无明显缺损,吸收细胞肿胀明显减轻,凋亡细胞数量亦明显减少(图1)。

2.3 肠黏膜上皮细胞凋亡检测 TUNEL法显示SAP组各时相点即可见较多的凋亡上皮细胞,凋亡指数较SO组和IGF-1组明显增高,以6 h达高峰($P<0.01$)。IGF-1组各时相点凋亡细胞明显减少,凋亡指数虽高于SO组,但两组各时相点间均没有明显的统计学差异(表1)。

2.4 小肠组织中*bax*和*bcl-2* mRNA的表达 *bax* mRNA在SAP组表达强于其他各组,术后6 h即达峰值,且变化与细胞凋亡指数呈显著的正相关($r = 0.56$, $P<0.05$),而在IGF-1组则呈明显下降,与SAP组各时相点相比差异均有统计学意义($P<0.01$); *bcl-2* mRNA的表达在SO组较弱, SAP组表达虽有所增强,但与SO组差别无统计学意义,而在IGF-1组的表达则明显增强(均 $P<0.05$),以24 h最明显($P<0.01$),且与SO组和SAP组各相应时相点的差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。 *bax*、*bcl-2* mRNA表达的比值在SAP组明显高于SO组,在IGF-1组明显低于SAP组,差异均有统计学意义,而IGF-1组与SO组相比,比值虽然均低于各相应时相点,但只在24 h差异有统计学意义(表2,图2)。

3 讨论

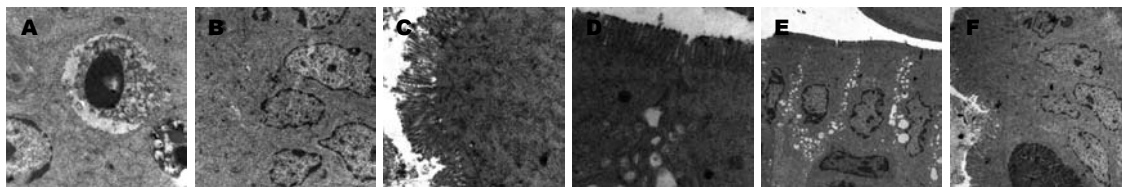
既往对于细胞凋亡和凋亡相关基因的研究表明,凋亡失调参与了病理状态下肠黏膜的病变

表 1 血浆淀粉酶、小肠组织病理学评分及凋亡指数 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	血浆淀粉酶(U/L)			肠组织病理学评分			凋亡指数		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
SO组	1287.50 \pm 109.11	1290.63 \pm 155.72	1091.50 \pm 178.05	0.63 \pm 0.53	0.75 \pm 0.46	0.63 \pm 0.52	8.00 \pm 1.31	8.13 \pm 2.03	8.13 \pm 2.03
SAP组	3063.38 \pm 676.33 ^a	2777.00 \pm 262.25 ^b	2336.38 \pm 279.92 ^b	2.38 \pm 1.06 ^b	2.88 \pm 0.99 ^b	2.75 \pm 0.71 ^b	19.00 \pm 2.78 ^b	17.63 \pm 1.60 ^b	17.25 \pm 2.76 ^b
IGF- I 组	2262.38 \pm 760.19	1572.50 \pm 635.90 ^c	1322.75 \pm 334.64 ^d	1.63 \pm 0.52	1.38 \pm 0.52 ^d	1.25 \pm 0.46 ^c	13.88 \pm 1.73 ^d	10.13 \pm 1.55 ^d	9.50 \pm 1.07 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs SO组相应时间点; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs SAP组相应时间点。表 2 小肠组织*bax*和*bcl-2* mRNA表达及*bax/bcl-2*变化 ($n = 8$, mean \pm SD)

分组	<i>bax</i>			<i>bcl-2</i>			<i>bax/bcl-2</i>		
	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
SO组	0.85 \pm 0.04	0.86 \pm 0.03	0.83 \pm 0.03	0.54 \pm 0.04	0.56 \pm 0.05	0.54 \pm 0.03	1.59 \pm 0.14	1.55 \pm 0.15	1.55 \pm 0.11
SAP组	1.19 \pm 0.04 ^b	1.16 \pm 0.02 ^b	1.14 \pm 0.03 ^b	0.57 \pm 0.02	0.57 \pm 0.01	0.58 \pm 0.01	2.24 \pm 0.11 ^a	2.10 \pm 0.10 ^a	2.06 \pm 0.16 ^a
IGF- I 组	1.10 \pm 0.02 ^d	0.97 \pm 0.04 ^d	0.87 \pm 0.03 ^d	0.65 \pm 0.02 ^d	0.69 \pm 0.04 ^c	0.72 \pm 0.02 ^d	1.69 \pm 0.08 ^d	1.41 \pm 0.11 ^d	1.21 \pm 0.07 ^d

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs SO组相应时间点; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs SAP组相应时间点。图 1 SAP组及IGF- I 组12 h小肠组织透射电镜图. A: SAP组($\times 12\ 000$); B: IGF- I 组($\times 8\ 000$); C: SAP组($\times 15\ 000$); D: IGF- I 组($\times 25\ 000$); E: SAP组($\times 5\ 000$); F: IGF- I 组($\times 5\ 000$).

过程. 王兴鹏 *et al*^[3]研究发现, 肠黏膜上皮细胞凋亡参与了SAP时肠屏障功能障碍的发生, 肠上皮细胞过度凋亡是损伤黏膜屏障的原因之一. 肠黏膜屏障功能受损, 通透性增加, 其为SAP时肠道细菌移位及内毒素血症的形态学基础^[8]. 另外许多基因参与细胞凋亡的调控, *bcl-2*基因家族就是最主要的凋亡调控基因, 包括两大类: 抑制凋亡的基因如*bcl-2*、*bcl-xl*、*bcl-w*等和促进凋亡的基因如*bax*、*bad*、*bak*等. Bcl-2蛋白作用于线粒体膜通透转孔(permeability transition pore, PTP)复合体, 阻止PTP的开放, 维持内膜跨膜电位及线粒体膜的稳定性, 同时抑制细胞色素C自线粒体释放至胞质, 阻止胞质细胞色素C对caspase蛋白酶的激活, 阻止凋亡诱导因子等, 从而发挥抑制细胞凋亡的作用. 而*bax*是个可溶

性蛋白质, 当受到凋亡刺激时构象发生变化, 从细胞浆转位于线粒体并与线粒体外膜结合, 直接降低线粒体外膜稳定性或与*bcl-2*结合形成异源二聚体的结构, 阻断*bcl-2*的抑制细胞凋亡功能, 或者通过促进caspase、细胞色素C等的释放而发挥促进细胞凋亡的作用. 既然肠黏膜上皮细胞的过度凋亡是造成SAP早期肠黏膜屏障功能损害并发生内毒素和肠道细菌移位的原因之一^[9], 是SAP早期肠屏障功能障碍的一个重要的分子生物学基础^[10], 因此如果能够阻断这种过度凋亡, 则有助于保护肠黏膜屏障功能.

IGF- I 是对机体生长发育起着重要调节作用的单链多肽. 有人研究了SAP状态下回肠IGF- I mRNA表达的变化, 发现肠道局部IGF- I 水平的降低与肠黏膜屏障受损有关. 对放射性肠

创新盘点
本研究通过在大鼠SAP早期使用外源性IGF- I, 探讨其对肠黏膜上皮细胞凋亡、凋亡相关基因的影响, 以期寻找新的治疗途径并寻找新的理论依据.

应用要点
IGF- I 可通过调节 *bcl-2* 家族基因的表达而明显减轻氧化应激和缺血再灌注等原因所致的肠黏膜细胞的过度凋亡, 而对肠黏膜屏障功能具有保护效应。

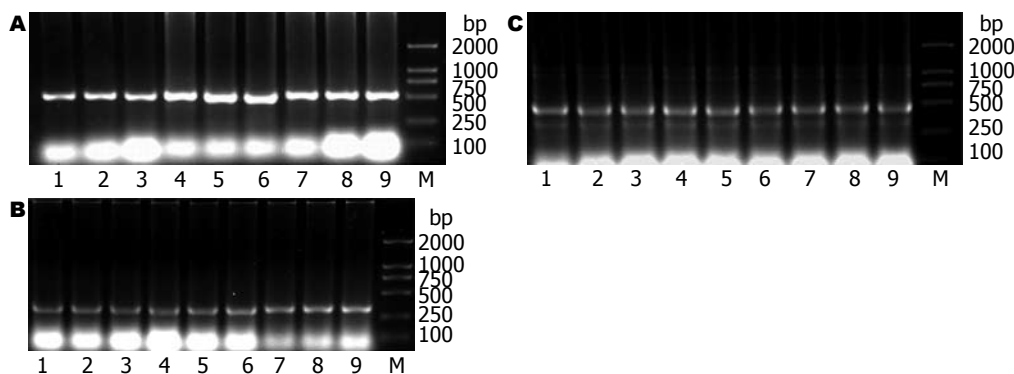


图 2 各组大鼠小肠组织mRNA的表达。A: *bax* mRNA; B: *bcl-2* mRNA; C: β -actin mRNA。1, 4, 7: 6 h; 2, 5, 8: 12 h; 3, 6, 9: 24 h; 1-3: SO组; 4-6: SAP组; 7-9: IGF- I 组; M: marker。

炎、小肠切除、烧伤等所致的肠黏膜损伤实验研究发现, 给予外源性IGF- I 恢复循环中IGF- I 水平后, 肠上皮细胞DNA、蛋白合成增加, 肠黏膜结构和功能均得到不同程度恢复^[11]。另外有研究表明IGF- I 对多种细胞凋亡均有一定的抑制作用^[12-15]。本研究发现, SAP时肠黏膜上皮细胞存在着明显的凋亡, 并且凋亡指数与肠损伤病理评分呈正相关, 另外SAP组*bax* mRNA表达明显增强, 在6 h达峰值, 与小肠黏膜上皮细胞凋亡指数和病理评分的变化相一致。 *bcl-2* mRNA在SO组呈低表达, 在SAP组表达虽然有所增强, 但与SO组各时间段间差异无统计学意义, 这说明机体可能存在某种调节机制, 当某种因素致使肠黏膜上皮细胞过度凋亡时, 机体通过这种自身的调节作用使凋亡抑制基因表达增强来抑制过度凋亡, 但这种作用还不足以对抗严重损伤所致的过度凋亡。经IGF- I 治疗后, 大鼠小肠黏膜细胞凋亡率明显下降, 小肠组织结构显著改善, *bax* mRNA表达明显减弱, 而*bcl-2* mRNA表达则明显增强。相应*bax*, *bcl-2* mRNA表达的比值在SAP组也明显增高, 而在IGF-I组则明显下降且低于对照组, 这说明经IGF-I治疗后, 在*bax* mRNA下降的同时也存在*bcl-2* mRNA表达的增强。提示外源性IGF- I 对SAP时小肠黏膜上皮细胞凋亡的抑制作用部分是与其对*bcl-2*与*bax*双方的调节相关, 即通过上调凋亡抑制基因的表达, 同时抑制促凋亡基因的表达, 从而抑制SAP时肠黏膜上皮细胞的过度凋亡, 对肠黏膜屏障起到保护作用。另外, *bax*, *bcl-2* mRNA表达的比值能更好地反映在凋亡促进基因与凋亡抑制基因双方力量的抗衡中机体组织细胞的凋亡状态, 即上调意味着促进凋亡, 下调意味着抑制凋亡。Pugazhenthil *et al*^[16]发现IGF- I 能通过激活核转录因子cAMP反应元件结合蛋白在转录水

平上调*bcl-2*, 并增强*bcl-2*启动子活性。Metsuzaki *et al*^[17]认为IGF- I 可能通过PI3激酶/Akt信号途径来抑制凋亡。那么IGF- I 到底通过何种途径对SAP时小肠黏膜上皮细胞*bcl-2*与*bax*的表达起调节作用, 还有待于进一步的探讨。

总之, 使用外源性IGF- I 能够减轻SAP大鼠小肠组织的损伤, 但本研究只是从外源性IGF- I 对凋亡相关基因*bax*和*bcl-2* mRNA水平的影响一个侧面来了解他对肠黏膜屏障的保护作用机制, 但他对*bax*与*bcl-2*蛋白水平的影响以及他对其他凋亡相关基因(如*bcl-xl*、*bcl-w*、*bad*、*bak*等)的影响, 同时对GH-IGF- I 轴、胰岛素及血糖水平的影响及最佳剂量、副作用等方面的问题也有待于进一步探讨。

4 参考文献

- 1 Xu GF, Lu Z, Gao J, Li ZS, Gong YF. Effect of ecoimmunonutrition supports on maintenance of integrity of intestinal mucosal barrier in severe acute pancreatitis in dogs. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119: 656-661
- 2 Assimakopoulos SF, Alexandris IH, Scopa CD, Mylonas PG, Thomopoulos KC, Georgiou CD, Nikolopoulou VN, Vagianos CE. Effect of bombesin and neurotensin on gut barrier function in partially hepatectomized rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6757-6764
- 3 王兴鹏, 王冰嫻, 吴恺, 徐选福. 细胞凋亡在急性坏死型胰腺炎早期肠黏膜上皮细胞死亡中的作用. *中华消化杂志* 2001; 21: 267-270
- 4 Baregamian N, Song J, Jeschke MG, Evers BM, Chung DH. IGF-1 protects intestinal epithelial cells from oxidative stress-induced apoptosis. *J Surg Res* 2006; 136: 31-37
- 5 Chrysis D, Calikoglu AS, Ye P, D'Ercole AJ. Insulin-like growth factor-I overexpression attenuates cerebellar apoptosis by altering the expression of Bcl family proteins in a developmentally specific manner. *J Neurosci* 2001; 21: 1481-1489
- 6 顾坚, 李堰松, 王大斌. 胰岛素样生长因子-1在病毒性心肌炎小鼠中的变化及对心肌的保护作用. *实用儿科临床杂志* 2007; 22: 35-36
- 7 Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd

- FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-483
- 8 尚占民, 王宝恩, 张淑文. 急性重症胰腺炎大鼠肠黏膜超微结构的改变. *中国急救医学* 2001; 21: 445-446
- 9 Wang X, Wang B, Wu J, Wang G. Beneficial effects of growth hormone on bacterial translocation during the course of acute necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 2001; 23: 148-156
- 10 龚时文, 张明, 赵志毅, 黄春南, 黄肇雄, 冯平. 谷氨酰胺对大鼠急性坏死性胰腺炎肠道细菌移位的影响. *中国急救医学* 2000; 20: 640-641
- 11 Gillingham MB, Dahly EM, Murali SG, Ney DM. IGF-I treatment facilitates transition from parenteral to enteral nutrition in rats with short bowel syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R363-R371
- 12 Sheen-Chen SM, Ho HT, Chia-Pei L, Hung KS, Eng HL. The effect of insulin-like growth factor-I on hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in rat. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 2220-2224
- 13 Ozen S, Akisu M, Baka M, Yalaz M, Sozmen EY, Berdeli A, Kultursay N. Insulin-like growth factor attenuates apoptosis and mucosal damage in hypoxia/reoxygenation-induced intestinal injury. *Biol Neonate* 2005; 87: 91-96
- 14 匡洪宇, 邹伟, 高昕媛, 朱学磊, 马丽丽, 江红. 早期糖尿病大鼠视网膜神经细胞凋亡及胰岛素样生长因子-1的作用. *中华内分泌代谢杂志* 2006; 22: 382-383
- 15 张鸿, 郑东明, 赵冬雪, 丛琳. 胰岛素样生长因子-1对大鼠局灶性脑缺血再灌注后神经细胞凋亡及**bcl-2**、**bax**蛋白表达的影响. *陕西医学杂志* 2004; 33: 867-870
- 16 Pugazhenth S, Miller E, Sable C, Young P, Heidenreich KA, Boxer LM, Reusch JE. Insulin-like growth factor-I induces **bcl-2** promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 1999; 274: 27529-27535
- 17 Matsuzaki H, Tamatani M, Mitsuda N, Namikawa K, Kiyama H, Miyake S, Tohyama M. Activation of Akt kinase inhibits apoptosis and changes in **Bcl-2** and **Bax** expression induced by nitric oxide in primary hippocampal neurons. *J Neurochem* 1999; 73: 2037-2046

同行评价
本文条理清楚, 逻辑性强, 结果可信, 具有一定的学术价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志作者贡献及同行评议公开政策

本刊讯 本刊实行作者贡献及同行评议公开政策, 具体格式如: (1)作者贡献分布: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献两均等; 此课题由陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲, 杨兰, 张金芳, 蒋金芳, 杨磊, 李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成. (2)同行评议者: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科. (常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

抗内毒素Fab'对严重烧伤早期小鼠肠道损伤的保护作用

庄颖, 张雅萍, 马思远

背景资料
肠道在全身性炎症反应综合征、脓毒症和MODS的连续发生发展中起重要作用, 保护肠道功能是防御MODS和降低危重病患者病死率的关键之一。严重烧伤早期, 内毒素与肠道损伤密切相关。但目前尚无有效的拮抗内毒素的药物应用于临床, 因此寻求一种能有效拮抗内毒素并抑制其对机体损伤作用的治疗措施具有广泛意义。

庄颖, 张雅萍, 马思远, 中国人民解放军第三军医大学西南全军医院烧伤研究所, 创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室重庆市 400038

庄颖, 2005年中国人民解放军第三军医大学硕士, 医师, 主要从事烧伤感染的防治研究。

国家重点基础研究发展规划项目(973), No. 2005CB522601
作者贡献分布: 本课题由张雅萍与庄颖设计; 研究过程由庄颖与马思远操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由马思远提供; 数据分析及论文写作由庄颖完成。

通讯作者: 张雅萍, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南全军医院烧伤研究所, 创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室。zhang_yaping40@yahoo.com

收稿日期: 2008-01-09 修回日期: 2008-03-27

Protective effect of Fab' in immunoglobulin Y against lipopolysaccharide on intestinal mucosa during the early stage in severely burned gut-derived endotoxemia mice

Ying Zhuang, Ya-Ping Zhang, Si-Yuan Ma

Ying Zhuang, Ya-Ping Zhang, Si-Yuan Ma, Institute of Burn Research, State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Southwest Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China

Supported by: the Major State Basic Research Development Program of China (973 Program), No. 2005CB522601

Correspondence to: Dr. Ya-Ping Zhang, Institute of Burn Research, State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Southwest Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China. zhang_yaping40@yahoo.com

Received: 2008-01-09 Revised: 2008-03-27

Abstract

AIM: To investigate the protective effect of Fab' against endotoxin on intestinal mucosa during the early stage in severely burned gut-derived endotoxemia mice, and to explore a new method for preventing and curing burn sepsis.

METHODS: The severely burned gut-derived endotoxemia mice model was used, and the mice were divided into 3 groups: control group (group A), burn group (group B) and Fab' treatment group (group C). At the 6th, 12th, 24th and 48th h after burn injury, the levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β

(IL-1 β) and interleukin-10 (IL-10) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Intestinal tissues were collected for pathological examination.

RESULTS: In comparison with those in group A, the levels of serum TNF- α , IL-1 β and IL-10 in group B increased significantly and reached the peak 24 h after burn injury (TNF- α : 242.06 ± 3.93 ng/L vs 14.98 ± 1.13 ng/L; IL-1 β : 37.86 ± 5.88 ng/L vs 14.39 ± 2.43 ng/L; IL-10: 324.78 ± 65.82 ng/L vs 97.63 ± 20.48 ng/L; all $P < 0.01$). The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-10 at 6, 12, 24 and 48 h in group C (6 h: 99.69 ± 10.67 , 19.19 ± 1.17 , 160.44 ± 24.99 ng/L; 12 h: 172.07 ± 22.47 , 22.29 ± 3.32 , 185.44 ± 22.30 ng/L; 24 h: 125.98 ± 6.93 , 28.39 ± 2.59 , 237.11 ± 30.28 ng/L; 48 h: 107.88 ± 5.24 , 26.23 ± 2.51 , 207.86 ± 20.35 ng/L) were significantly different from those in group B (all $P < 0.05$). Pathological examination showed a lower degree of intestinal mucosal injury in group C than in compared with group B.

CONCLUSION: The Fab' against endotoxin can significantly decrease the level of serum TNF- α , IL-1 β and IL-10 during the early stage in severely burned gut-derived endotoxemia mice, and consequently alleviate the endotoxin-induced injury.

Key Words: Egg yolk antibody; Tumor necrosis factor- α ; Interleukin-1 β ; Interleukin-10; Gut-derived sepsis; Enzyme-linked immunosorbent assay

Zhuang Y, Zhang YP, Ma SY. Protective effect of Fab' in immunoglobulin Y against lipopolysaccharide on intestinal mucosa during the early stage in severely burned gut-derived endotoxemia mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1402-1406

摘要

目的: 观察抗内毒素Fab'对严重烧伤早期肠源性内毒素血症小鼠肠道损伤的保护作用, 探讨防治烧伤脓毒症的新措施。

方法: 采用严重烧伤早期肠源性内毒素血症小鼠模型, 分为对照组(A组)、烧伤组(B组)和治疗组(C组), 分别于6、12、24和48 h 4个时

同行评议者
王忠裕, 教授, 大连医科大学附属第一医院普通外科二科; 王凤山, 副教授, 中国医科大学附属第一医院普外一科

相点测定血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)的含量;肠黏膜组织病理检测损伤情况。

结果:与A组相比,烧伤后血清TNF- α 、IL-1 β 和IL-10含量明显增高,24 h达到高峰(TNF- α : 242.06 ± 3.93 ng/L vs 14.98 ± 1.13 ng/L; IL-1 β : 37.86 ± 5.88 ng/L vs 14.39 ± 2.43 ng/L; IL-10: 324.78 ± 65.82 ng/L vs 97.63 ± 20.48 ng/L, 均 $P < 0.01$);C组TNF- α 、IL-1 β 、IL-10含量,在6、12、24和48 h 4个时相点时(99.69 ± 10.67 ng/L, 19.19 ± 1.17 ng/L, 160.44 ± 24.99 ng/L; 172.07 ± 22.47 ng/L, 22.29 ± 3.32 ng/L, 185.44 ± 22.30 ng/L; 125.98 ± 6.93 ng/L, 28.39 ± 2.59 ng/L, 237.11 ± 30.28 ng/L; 107.88 ± 5.24 ng/L, 26.23 ± 2.51 ng/L, 207.86 ± 20.35 ng/L)较烧伤组显著降低(均 $P < 0.01$)。病理检查结果提示C组较B组肠黏膜损伤有不同程度减轻。

结论:抗内毒素Fab'能抑制内毒素所诱导的TNF- α 、IL-1 β 产生,同时调节血清中的IL-10水平,减轻内毒素对机体的损害,从而起到对严重烧伤后肠源性脓毒症的防治作用。

关键词:鸡卵黄免疫球蛋白;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-1 β ;白细胞介素-10;肠源性脓毒症

庄颖, 张雅萍, 马思远. 抗内毒素Fab'对严重烧伤早期小鼠肠道损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1402-1406
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1402.asp>

0 引言

脓毒症是严重烧伤患者最常见并发症,也是多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的主要诱因之一。许多研究表明肠道在全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、脓毒症、MODS的连续发生、发展中起重要作用,被认为是危重病应激的“中心器官”和MODS的“启动器”^[1]。目前肠源性脓毒症的防治已成为危重病研究的热点。内毒素/脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)是引起严重创伤和烧伤并发SIRS、脓毒症以及MODS的重要因素之一^[2]。本研究采用小鼠的严重烧伤早期肠源性内毒素血症模型,观察抗内毒素Fab'对血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、

白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和白介素-10(interleukin-10, IL-10)水平的调控作用。

1 材料和方法

1.1 材料 纯系昆明种小鼠97只,25 wk龄雌雄不限,体质量28-32 g,由中国人民解放军第三军医大学实验动物中心提供,常规喂养,室温15-25℃,自然采光。LPS(*E.coli*O55: B5菌株)购自Sigma公司。抗内毒素Fab'由本所制备。TNF- α 、IL-1 β 、IL-10 ELISA试剂盒为美国R&D公司原装产品,由深圳晶美生物有限公司上海分公司提供。酶标仪ELX808系美国Biotek公司产品,严格按照说明书进行操作定量测定。

1.2 方法

1.2.1 造模和分组:禁食水8 h,背部脱毛后称体质量,ig 10 g/L NaHCO₃ 0.2 mL,按照文献得到的LD50值^[3]ig LPS 0.5 mL;备皮区涂3%凝固汽油1 mL,燃烧14 s致30% III度烧伤,烧伤面积计算方法:小鼠体表总面积计算公式: $S = 0.0913 \times W^{2/3}$,其中 S 代表小鼠体表面积(cm²), W 代表小鼠体质量(g),则30% III度烧伤小鼠模型烧伤面积为: $S \times 30\%$ 。伤后立即ip等渗盐水2 mL/只抗休克,创面涂碘伏抗感染,伤后常规饲养。动物随机分为3组,假伤组(A组),10只,除不烧伤外,其他处理同模型制作;烧伤模型组(B组),45只,烧伤后ig等渗盐水0.5 mL,以后每6 h重复1次;治疗组(C组),42只,烧伤后ig抗内毒素Fab'等渗盐溶液0.5 mL,以后每6 h重复1次。模型组及治疗组分为伤后6、12、24、48 h组,每组随机分配10-12只小鼠。

1.2.2 指标检测和病理检查:处死各时相点存活的小鼠,无菌条件下取血,3000 r/min,离心10 min后取血清置-80℃保存待测。采用鲎试剂偶氮显色基质法测定内毒素。双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA)测定TNF- α 、IL-1 β 和IL-10的含量。取距回盲部1 cm处的回肠1 cm,剖开清洗干净后,经40 g/L甲醛固定,常规石蜡包埋、切片、HE染色后,光镜下观察黏膜损害情况。

统计学处理 各分组所得计量数据采用mean \pm SD表示,用SPSS13.0软件处理数据,两组间均数比较用 t 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 死亡率 在伤后6、48 h,烧伤组与治疗组的死亡率差异无统计学意义($P > 0.05$);其中伤后12、

研发前沿
烧伤脓毒症往往来势凶猛,进展迅速,死亡率高,一直是国内外烧伤医学界研究的热点、重点和亟待解决的重大疑难问题。

相关报道
有研究表明胃蛋白酶酶切IgY后产生的Fab'片段仍然具有结合相应抗原和发挥拮抗效应等生物学活性的能力。

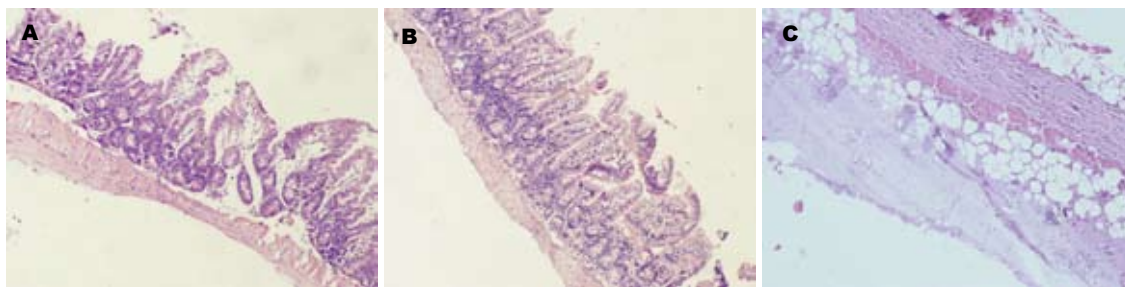


图1 光镜下肠组织病理切片(HE × 100). A: 烧伤组48 h; B: 治疗组48 h; C: 烧伤皮肤组织, 度烧伤。

表1 各组小鼠死亡率观察(%)

分组	时点(h)	n	死亡率	总死亡率
B组	6	10	20	48.89
	12	12	33.33	
	24	12	66.67	
	48	11	72.73	
C组	6	10	0	16.67 ^b
	12	11	18.18 ^a	
	24	10	20 ^a	
	48	11	27.27	

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs B组。

24 h, 治疗组死亡率依次为18.18%、20.00%, 低于烧伤组对应时间死亡率, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 治疗组总死亡率为16.67%, 低于烧伤组的48.89%, 差异具有显著性($P < 0.01$, 表1)。

2.2 LPS、TNF- α 、IL-1 β 和IL-10检测结果 严重烧伤早期小鼠血清LPS、TNF- α 、IL-1 β 及IL-10迅速升高, 各时相点含量均显著高于A组($P < 0.01$)。C组也体现出相似趋势, 但其含量较B组均显著降低($P < 0.01$, 表2)。

2.3 病理结果 肠源性内毒素血症小鼠早期肠黏膜即出现中央乳糜管扩张, 上皮间下间隙形成, 肠绒毛顶端上皮剥脱, 固有层裸露, 间质广泛性充血、水肿、大量中性粒细胞浸润等损伤性改变。治疗组动物黏膜病变明显缓解(图1)。

3 讨论

烧伤脓毒症往往来势凶猛, 进展迅速, 死亡率高, 一直是国内外烧伤医学界研究的热点、重点和亟待解决的重大疑难问题^[4]。肠道是人体最大的细菌及毒素库, 肠道黏膜是抵御入侵的重要屏障且极易受损, 因此保护肠道功能是防御MODS和降低脓毒症患者病死率的关键之一^[5-7]。严重烧伤后肠黏膜机械屏障破坏, 肠道内固有菌群失调, 肠道免疫功能受抑, 导致肠腔内毒素易位

入血; 内毒素又可通过缺氧、炎症介质释放、自由基增多使肠黏膜屏障进一步受损, 大量细菌和毒素易位, 引起体内抑炎性和促炎性炎症介质平衡失调, 导致恶性循环加重损伤, 最终造成MODS, 甚至死亡^[8-9]。目前尚无满意的拮抗内毒素的药物应用于临床。自从鸡卵黄免疫球蛋白Y技术问世以来, 卵黄抗体就以其成本低、产量高、易制备、均一性及稳定性好、特异性强等独特的优点引起人们的广泛关注和研究。目前已成功提取出抗小分子蛋白质、病毒、细菌的IgY, 并发现其具有良好的抗病毒抗细菌的生物学效应, 用于口服防治肠道病原体已取得良好效果^[10-12]。我们以内毒素为抗原免疫产蛋母鸡, 提纯IgY并酶切去除易引起过敏反应的Fc段, 得到抗内毒素Fab'。我们前期体外实验表明抗内毒素Fab'具有广谱的抗G-菌内毒素作用。本实验遂以严重烧伤后肠源性内毒素血症小鼠为模型, 探讨Fab'对烧伤小鼠肠源性脓毒症的防治作用。

细胞因子在体内形成统一网络系统, 他们相互协调、相互拮抗, 调节机体的生理活动。在正常的免疫应答中, 各种相关的细胞因子通常协调和谐, 在某种情况下某些细胞因子产生或其受体表达异常, 均会导致病理改变。炎症介质失衡在脓毒症的病理生理过程中起决定性作用^[13-17]。研究表明LPS能降低上皮细胞的抵抗力、促进细胞凋亡的产生并疏松紧密连接而增加上皮细胞通透性, 促进细菌易位, 损伤肠黏膜屏障, 引起肠炎症改变, 包括固有层水肿和绒毛结构的丢失, 炎症细胞浸润^[18-19]。在一定条件下还可激发细胞因子和其他炎症介质如TNF- α 、IL-1 β 和IL-6的连锁反应, 引起全身各器官的损害^[20]。

TNF- α 主要来源于内毒素刺激的单核-巨噬细胞, 通过诱导其他细胞因子如IL-1 β 、IL-6和IL-8等的产生和释放, 在造成机体损伤的同时, 可通过再激活炎症效应细胞释放更多的炎症因子, 使炎症信号进步放大和加强, 产生“级联放大”作用^[21-23]。IL-1是急性期免疫反应的主

表 2 各组小鼠血清LPS, TNF- α , IL-1 β 和IL-10浓度 (mean \pm SD)

分组	伤后时间(h)	LPS(EU/mL)	TNF- α (ng/L)	IL-1 β (ng/L)	IL-10(ng/L)
A组	0	0.04 \pm 0.03	14.98 \pm 1.13	14.39 \pm 2.43	97.63 \pm 20.48
B组	6	0.84 \pm 0.17 ^b	179.58 \pm 2.97 ^b	27.57 \pm 5.16 ^b	227.23 \pm 16.86 ^b
	12	0.95 \pm 0.13 ^b	242.06 \pm 3.93 ^b	29.26 \pm 3.60 ^b	264.27 \pm 38.28 ^b
	24	0.91 \pm 0.13 ^b	289.52 \pm 5.43 ^b	37.86 \pm 5.88 ^b	324.78 \pm 65.82 ^b
	48	0.86 \pm 0.21 ^b	247.87 \pm 3.75 ^b	33.18 \pm 3.37 ^b	285.13 \pm 13.06 ^b
C组	6	0.14 \pm 0.06 ^{bd}	99.69 \pm 10.67 ^{bd}	19.19 \pm 1.17 ^{bd}	160.44 \pm 24.99 ^{bd}
	12	0.27 \pm 0.10 ^{bd}	172.07 \pm 22.47 ^{bd}	22.29 \pm 3.32 ^{bd}	185.44 \pm 22.30 ^{bd}
	24	0.23 \pm 0.07 ^{bd}	125.98 \pm 6.93 ^{bd}	28.39 \pm 2.59 ^{bd}	237.11 \pm 30.28 ^{bd}
	48	0.19 \pm 0.03 ^{bd}	107.88 \pm 5.24 ^{bd}	26.23 \pm 2.51 ^{bd}	207.86 \pm 20.35 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs A组; ^d $P < 0.01$ vs B组.

要调节因子, 可与TNF- α 等其他细胞因子协同作用引起发热, 诱导肝细胞合成急性期蛋白, 引起代谢紊乱; 促进炎症蛋白合成炎症介质释放, 加重炎症反应; 活化内皮细胞, 引起血液凝固、增加黏附分子表达, 参与休克的病理过程; 使血管通透性增加, 造成低血压等^[24-25]. 体内多种细胞可分泌IL-10, 包括单核/巨噬细胞、CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞和B细胞等, 在体内IL-10合成晚于促炎症细胞因子^[26-27]. IL-10又称“细胞因子合成抑制因子”, 可抑制单核/巨噬细胞等产生TNF- α 、IL-1、IL-6和IL-8等促炎症细胞因子, 引起细胞免疫抑制^[28]. IL-10对炎症免疫应答有抑制作用, 起负性调控作用, 抑制或减少这些炎症细胞因子的产生和释放, 在一定程度上对机体起了保护作用, 有助于全身炎症反应的控制和病情的好转^[29]. 但过量的IL-10对机体的组织器官又会造成损害. Lehmann *et al*^[30]发现血清中IL-10的水平与促炎症细胞因子的浓度呈正相关.

本研究采用严重烧伤后肠源性内毒血症动物模型, 结果显示: (1)烧伤后血清LPS含量显著升高, 远高于正常小鼠, 病理检查结果也表明肠黏膜的损伤情况, 本模型具有稳定性和重复性好的特点, 可以满足实验需要. (2)通过对动物死亡率的观察, 经ig抗内毒素Fab'治疗, 小鼠死亡率明显降低, 可能与抗内毒素Fab'拮抗LPS并减轻其诱导的SIRS及脏器功能损害. (3)模型组小鼠血清LPS、TNF- α 、IL-1 β 和IL-10烧伤后水平明显升高, 提示LPS诱导了损伤的炎症反应, 促炎介质TNF- α 、IL-1 β 和抗炎介质IL-10均参与了脓毒症时的病理变化过程. 促炎与抗炎的相互作用, 导致了损伤的发生和发展. (4)烧伤后LPS含量大幅升高, 在伤后12 h达到高峰, 然后缓慢下

降, 治疗组的变化趋势与烧伤组基本一致, 但升高幅度明显降低, 与烧伤组比较, 差异具有显著性($P < 0.01$); TNF- α 和IL-1 β 的含量变化与LPS相似, 在伤后24 h达到高峰, 说明了内毒素与炎症介质之间相互关联的密切关系. (5)抑炎症细胞因子IL-10的含量变化与TNF- α 和IL-1 β 有相似的趋势, 提示严重烧伤早期抑炎症细胞因子的水平与促炎症细胞因子的浓度呈正相关, 抗内毒素Fab'具有调节小鼠血清中TNF- α 、IL-1 β 和IL-10水平的作用, 通过抑制高水平的炎症细胞因子对机体的损害, 实现肠道保护作用. (6)本实验给予外源性抗内毒素Fab'发现对小鼠血清中炎症介质的释放有明显的抑制作用, 病理结果提示肠黏膜组织损伤也有显著减轻, 我们可以推测通过抗内毒素Fab'与LPS的特异性结合, 阻止LPS与受损的肠黏膜细胞结合并易位, 影响了LPS的生物学活性, 从而减轻其在脓毒症中的源头作用.

我们的研究表明抗内毒素Fab'可抑制LPS诱导的促炎症细胞因子和抗炎性细胞因子的释放, 降低内毒素作用下小鼠肠组织的炎症反应, 对肠黏膜损伤具有一定的保护作用, 为抗内毒素Fab'的进一步开发研究提供了重要的实验依据, 为严重烧伤后肠道损伤的保护和脓毒症的治疗探索了一条新措施.

4 参考文献

- Liboni KC, Li N, Scumpia PO, Neu J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through IkappaB/NF-kappaB in human fetal and adult intestinal epithelium. *J Nutr* 2005; 135: 245-251
- O'Reilly M, Newcomb DE, Remick D. Endotoxin, sepsis, and the primrose path. *Shock* 1999; 12: 411-420
- 李强, 张雅萍. 特异性IgY防治烧伤小鼠肠源性内毒素

应用要点
抗内毒素Fab'对哺乳动物严重烧伤早期肠道损伤及肠源性内毒素损害具有显著的保护和治疗作用, 从而为将来通过进一步的研究和开发, 使其成为一种有效的预防和治理哺乳动物严重烧伤后肠源性内毒素损害和肠粘膜损伤的药物提供了新的理论依据.

同行评价
本研究内容针对性强, 检测指标能够反映小鼠烧伤后的肠道损伤程度及治疗效果, 对今后烧伤治疗有一定的启示。

- 血症. 中华创伤杂志 2005; 21: 773-774
- 4 Shlyk IV, Pivovarova LP, Krylov KM, Filippova OV, Il'ina VA, Krylov PK. Clinical and immunological criteria of burn sepsis. *Anesteziol Reanimatol* 2005; 42-45
- 5 Gosain A, Gamelli RL. Role of the gastrointestinal tract in burn sepsis. *J Burn Care Rehabil* 2005; 26: 85-91
- 6 Magnotti LJ, Deitch EA. Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure. *J Burn Care Rehabil* 2005; 26: 383-391
- 7 Epstein MD, Banducci DR, Manders EK. The role of the gastrointestinal tract in the development of burn sepsis. *Plast Reconstr Surg* 1992; 90: 524-531
- 8 McMillen MA, Huribal M, Sumpio B. Common pathway of endothelial-leukocyte interaction in shock, ischemia, and reperfusion. *Am J Surg* 1993; 166: 557-562
- 9 Schmidt H, Martindale R. The gastrointestinal tract in critical illness. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001; 4: 547-551
- 10 Yokoyama K, Sugano N, Shimada T, Shofiqur RA, Ibrahim el-SM, Isoda R, Umeda K, Sa NV, Kodama Y, Ito K. Effects of egg yolk antibody against *Porphyromonas gingivalis* gingipains in periodontitis patients. *J Oral Sci* 2007; 49: 201-206
- 11 Amaral JA, De Franco MT, Zapata-Quintanilla L, Carbonare SB. In vitro reactivity and growth inhibition of EPEC serotype O111 and STEC serotypes O111 and O157 by homologous and heterologous chicken egg yolk antibody. *Vet Res Commun* 2008; 32: 281-290
- 12 Chalhoughi R, Thewis A, Portetelle D, Beckers Y. Production of hen egg yolk immunoglobulins simultaneously directed against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* in the same egg yolk. *Poult Sci* 2008; 87: 32-40
- 13 Ozbalkan Z, Aslar AK, Yildiz Y, Aksaray S. Investigation of the course of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines after burn sepsis. *Int J Clin Pract* 2004; 58: 125-129
- 14 Osuchowski MF, Welch K, Siddiqui J, Remick DG. Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J Immunol* 2006; 177: 1967-1974
- 15 Osuchowski MF, Welch K, Yang H, Siddiqui J, Remick DG. Chronic sepsis mortality characterized by an individualized inflammatory response. *J Immunol* 2007; 179: 623-630
- 16 Xiao H, Siddiqui J, Remick DG. Mechanisms of mortality in early and late sepsis. *Infect Immun* 2006; 74: 5227-5235
- 17 Hotchkiss RS, Karl IE. Cytokine blockade in sepsis-Are two better than one? *Crit Care Med* 2001; 29: 671-672
- 18 Qureshi FG, Leapheart C, Cetin S, Li J, Grishin A, Watkins S, Ford HR, Hackam DJ. Increased expression and function of integrins in enterocytes by endotoxin impairs epithelial restitution. *Gastroenterology* 2005; 128: 1012-1022
- 19 Alscher KT, Phang PT, McDonald TE, Walley KR. Enteral feeding decreases gut apoptosis, permeability, and lung inflammation during murine endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G569-G576
- 20 Wischmeyer PE, Kahana M, Wolfson R, Ren H, Musch MM, Chang EB. Glutamine reduces cytokine release, organ damage, and mortality in a rat model of endotoxemia. *Shock* 2001; 16: 398-402
- 21 Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totsuka M, Sato K, Sugawara K. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. *Exerc Immunol Rev* 2002; 8: 6-48
- 22 Yeh FL, Lin WL, Shen HD, Fang RH. Changes in serum tumour necrosis factor-alpha in burned patients. *Burns* 1997; 23: 6-10
- 23 Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996; 77: 110-117
- 24 Hildebrand F, Pape HC, Krettek C. The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction. *Unfallchirurg* 2005; 108: 793-794, 796-803
- 25 Cembrzynska-Nowak M. Effect of post-trauma endotoxemia on production of IL-1 beta in burn patients. *Postepy Hig Med Dosw* 1996; 50: 537-540
- 26 Yeh FL, Lin WL, Shen HD. Changes in circulating levels of an anti-inflammatory cytokine interleukin 10 in burned patients. *Burns* 2000; 26: 454-459
- 27 Yeh FL, Shen HD, Fang RH. Deficient transforming growth factor beta and interleukin-10 responses contribute to the septic death of burned patients. *Burns* 2002; 28: 631-637
- 28 Armstrong L, Millar AB. Relative production of tumour necrosis factor alpha and interleukin 10 in adult respiratory distress syndrome. *Thorax* 1997; 52: 442-446
- 29 Kawai S, Sakayori S, Kobayashi H. The role of IL-10 in patients with SIRS (systemic inflammatory response syndrome)--in relation to TNF activity. *Kansenshogaku Zasshi* 1995; 69: 765-771
- 30 Lehmann AK, Halstensen A, Sornes S, Rokke O, Waage A. High levels of interleukin 10 in serum are associated with fatality in meningococcal disease. *Infect Immun* 1995; 63: 2109-2112

编辑 李军亮 电编 郭海丽

错配修复基因hMLH1甲基化与胃癌的关系

吴安城, 刘希双, 杨堃

吴安城, 刘希双, 青岛大学医学院附属医院内镜诊疗科 山东省青岛市 266003

杨堃, 青岛大学医学院附属医院分子生物学实验室 山东省青岛市 266003

吴安城, 2005级青岛大学医学院消化科在读硕士, 主要从事胃癌方面的研究。

青岛市科技计划资助项目, No. 06-2-2-5-nsh-3

作者贡献分布: 此课题由刘希双和杨堃设计; 研究过程由吴安城操作完成; 研究所用器材及分析工具由杨堃提供; 本文写作及数据统计分析由吴安城完成。

通讯作者: 刘希双, 266003, 山东省青岛市江苏路16号, 青岛大学医学院附属医院内镜诊疗中心. liuxishuang1@sina.com

电话: 0532-82911525

收稿日期: 2008-01-02 修回日期: 2008-02-29

Relationship between mismatch repair gene hMLH1 promoter methylation and gastric carcinoma

An-Cheng Wu, Xi-Shuang Liu, Kun Yang

An-Cheng Wu, Xi-Shuang Liu, Department of Endoscopic Diagnosis and Therapy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Kun Yang, Laboratory of Molecular Biology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Supported by: the Science and Technology Program Foundation of Qingdao, No. 06-2-2-5-nsh-3

Correspondence to: Dr. Xi-Shuang Liu, Department of Endoscopy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. liuxishuang1@sina.com

Received: 2008-01-02 Revised: 2008-02-29

Abstract

AIM: To detect the hypermethylation status of the 5'CpG island locating in the promoter region of hMLH1 (mismatch repair genes, MMR) gene, and to investigate the role of hMLH1 methylation in gastric carcinogenesis.

METHODS: Methylation specific polymerase chain reaction (MS-PCR) was used to examine the methylation status of hMLH1 promoter in 60 gastric carcinomas and 60 cancer-adjacent normal tissues, and reverse transcription PCR (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression of hMLH1 in the above tissues.

RESULTS: The expression of hMLH1 mRNA

was significantly lower in cancer tissues than that in cancer adjacent tissues ($t = 4.082, P < 0.01$). The incidence of hMLH1 promoter methylation occurred in 30% (18/60) cases. No methylation of hMLH1 promoter was found in cancer-adjacent normal tissues. The methylation of hMLH1 promoter did not correlate with the clinicopathological characteristics of gastric carcinoma. Seventeen of 21 (81%) hMLH1 mRNA-negative cases exhibited prominent methylation, but 1 of 39 (2.5%) hMLH1 mRNA-positive cases showed methylation. There existed a significant correlation between hMLH1 methylation and mRNA decrease ($\chi^2 = 8.0182, P = 0.0046$).

CONCLUSION: Promoter methylation of hMLH1 is closely related to the expression loss of hMLH1 mRNA, which is involved in gastric carcinogenesis.

Key Words: Gastric carcinoma; Mismatch repair gene; Methylation; hMLH1; Polymerase chain reaction

Wu AC, Liu XS, Yang K. Relationship between mismatch repair gene hMLH1 promoter methylation and gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1407-1411

摘要

目的: 通过研究散发性胃癌中错配修复基因hMLH1 mRNA的表达及其启动子区5'CpG岛甲基化状态, 探讨hMLH1基因异常甲基化在胃癌发生过程中的作用。

方法: 应用甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)检测60例胃癌组织及其癌旁黏膜组织中hMLH1基因启动子区的甲基化状态, 逆转录PCR(RT-PCR)检测两种组织中hMLH1 mRNA表达情况。

结果: 胃癌组织hMLH1 mRNA表达水平明显低于癌旁组织($t = 4.082, P < 0.01$), hMLH1基因启动子区高甲基化18例(30%), 其癌旁黏膜组织中未发现有甲基化。hMLH1基因启动子区甲基化与胃癌的临床病理参数之间无明显的相关性。hMLH1 mRNA表达阴性的21例病例中, 17例(81%)发生甲基化, 而hMLH1 mRNA表达阳性的39例中仅有1例(2.5%)发生甲基化,

背景资料

hMLH1是一种重要的错配修复基因, 其功能缺陷与多种肿瘤的发生密切相关。错配修复基因启动子区的甲基化是肿瘤抑癌基因失活的主要途径, 也可能是错配修复基因功能丧失的主要原因。本研究通过研究散发性胃癌中错配修复基因hMLH1 mRNA的表达及其启动子区5'CpG岛甲基化状态, 探讨hMLH1基因异常甲基化在胃癌发生过程中的作用。

同行评议者

王小众, 教授, 福建医科大学附属协和医院消化内科

研发前沿
错配修复基因启动子区甲基化成为近来研究抑癌基因失活的热点. 检测hMLH1异常甲基化有可能成为判断胃癌发生的一项新指标.

hMLH1 mRNA表达降低与甲基化之间存在明显的相关性($\chi^2 = 8.0182, P = 0.0046$).

结论: 胃癌组织中hMLH1基因启动子区甲基化与其mRNA表达缺失密切相关, 是导致hMLH1基因错配修复功能缺陷的重要原因之一.

关键词: 胃肿瘤; 错配修复基因; 甲基化; hMLH1; 聚合酶链反应

吴安城, 刘希双, 杨堃. 错配修复基因hMLH1甲基化与胃癌的关系. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1407-1411
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1407.asp>

0 引言

消化系肿瘤是我国常见的恶性肿瘤, 以胃癌最为常见. 作为多基因相关性肿瘤, 目前认为多种基因在不同阶段参与了胃癌的发生, 但发病机制仍不明确. 已有研究发现, 错配修复基因hMLH1的甲基化与胃癌有密切的关系^[1], 但目前的研究多集中在已建立的胃癌细胞系或遗传家系上, 而对散发性肿瘤的相关研究相对较少. 为了弄清楚散发性胃癌中基因甲基化状态的变化及其与hMLH1 mRNA表达的关系, 本研究应用甲基化特异性PCR(methylation specific PCR, MSP)方法和逆转录PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)方法, 检测60例胃癌组织及其癌旁黏膜组织中hMLH1基因启动子区的甲基化状态及mRNA表达情况, 探讨hMLH1基因异常甲基化在胃癌发生、发展过程中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 自2005年青岛大学医学院附属医院普外科胃癌手术切除标本60例, 其中, 男42例, 女18例, 男女比2.3:1, 年龄35-80(平均62)岁. 经病理诊断低分化腺癌56例, 中分化腺癌2例, 印戒细胞癌2例. 患者术前均未接受放化疗和免疫治疗. 标本离体后, 在无菌条件下30 min内分别切取肿瘤实质部位及肿瘤远端(距癌组织3-5 cm)相对正常的癌旁胃组织各一份, 迅速放入液氮速冻并转至-80℃超低温冰箱冻存. DNA抽提试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司. PCR试剂盒及RT-PCR试剂盒购自大连宝生生物工程有限公司. 10 mmol/L的氢醌(Sigma公司产品)和3 mol/L pH5.0的亚硫酸氢钠自制. Wizard DNA纯化柱购自Promega公司(Madison, WI, USA). 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成(表1).

1.2 方法

1.2.1 MSP检测hMLH1基因甲基化: 组织基因组DNA的提取按照DNA抽提试剂盒的说明操作. 甲基化修饰步骤为将2 μ g DNA溶于50 μ L双蒸水中, 加入2 mol/L NaOH 5.5 μ L, 37℃水浴10 min, 再加入33 μ L的10 mmol/L氢醌(对苯二酚)和520 μ L的3 mol/L亚硫酸氢钠, 50℃水浴过夜16 h. 去除DNA杂质, 经Wizard DNA纯化柱过滤, 80 g/L异丙醇2 mL冲洗, 离心后向纯化柱内加入50 μ L预热双蒸水(85℃), 放置1 min, 离心后保留洗脱液. 醋酸钠和纯乙醇沉淀DNA, 适量70%的冰乙醇洗脱1次, 空气干燥后加20 μ L双蒸水溶解, 置-80℃冰箱保存备用. 然后运用巢式PCR扩增目的基因, 同一标本以甲基化引物和非甲基化引物分别扩增, 各基因的引物序列及PCR产物片段的大小见表1. PCR反应体系为50 μ L, 其中: 10 \times PCR缓冲液5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 4 μ L, 甲基化上下游引物和去甲基化上下游引物分别为1 μ L, 甲基化模板DNA5 μ L, Taq酶0.25 μ L, 加水至总体积50 μ L. 反应条件: 95℃预变性1 min, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min共35个循环, 最后72℃延伸5 min. 以水作为阴性对照. 取PCR产物5 μ L, 与1 μ L上样缓冲液混合, 进行20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测, 紫外光凝胶成像系统观察结果. 若基因启动子区发生甲基化, 则用甲基化特异性引物可扩增出相应大小的条带; 若未发生甲基化, 则用非甲基化特异性引物可扩增出相应大小的条带.

1.2.2 RT-PCR检测hMLH1 mRNA表达: 按TRIzol试剂盒说明提取总RNA, 用紫外分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 在1.9-2.0之间, 计算RNA含量. 经逆转录后再以cDNA为模板扩增. hMLH1 PCR反应条件: 94℃ 3 min, 以94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 60 s循环36次, 72℃延伸10 min; GAPDH PCR反应条件: 94℃ 3 min, 以94℃ 40 s, 58℃ 30 s, 72℃ 60 s循环32次, 72℃延伸10 min. 20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍照并检测吸光度值, 将hMLH1与GAPDH吸光度比值作为其mRNA水平的相对值(相对值<1者定为hMLH1基因mRNA阴性表达; 其他为阳性表达), 重复实验2次, 取均值.

统计学处理 用SPSS12.0进行统计学分析. hMLH1 mRNA表达水平的差异用t检验, 甲基化频率的差异及甲基化频率与肿瘤临床病理特征之间的关系用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 hMLH1基因mRNA表达 60例胃癌标本39例

表 1 引物序列及扩增条件

hMLH1引物		引物序列(5'-3')	产物长度(bp)	温度(°C)
甲基化(M)	正义	ACGTAGACGTTTATTAGGGTCGC	115	55
甲基化(M)	反义	CCTCATCGTAACTACCCGCG	115	55
非甲基化(U)	正义	TTTTGATGTAGATGTTTATTAGGGTTGT	124	55
非甲基化(U)	反义	ACCACCTCATCATACTACCCACA	124	55
RT-PCR	正义	GACAGAGGAAGATGGTCCCAAAG	396	58
RT-PCR	反义	AGAATGTGTGAGCGCAAGGC	396	58
GAPDH	正义	TCATGGGTGTGAACCATGAGAA	146	58
GAPDH	反义	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	146	58

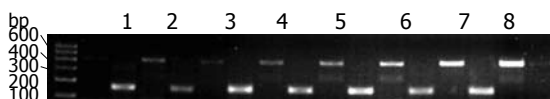


图 1 肿瘤组织mRNA表达降低与癌旁正常表达组织对照。1-6: 第3、5、25、60、53、28号肿瘤组织标本; 7: 癌旁正常组织第5号标本。

(65%)hMLH1 mRNA正常表达, 21例(35%)表达明显降低, 60例癌旁组织hMLH1 mRNA均正常表达。胃癌组织hMLH1 mRNA表达水平明显低于癌旁组织($t = 4.082, P < 0.01$)。胃癌及癌旁组织hMLH1基因mRNA表达见图1。

2.2 胃癌hMLH1甲基化状态 60例癌旁组织未见hMLH1基因启动子区甲基化现象, 所有癌旁组织hMLH1-U(hMLH1基因非甲基化)扩增均为阳性, hMLH1-M(hMLH1基因甲基化)扩增都为阴性; 60例胃癌中发现高甲基化18例, 占30%, 而且均为甲基化和非甲基化并存, 即hMLH1-U和hMLH1-M扩增都为阳性。胃癌组织和癌旁组织甲基化修饰DNA MSP产物的琼脂糖凝胶电泳结果见图2。

2.3 hMLH1基因mRNA表达与启动子区甲基化的关系 hMLH1基因mRNA表达阴性的21例病例中, 17例(81%)发生了甲基化, 而hMLH1基因mRNA表达阳性的39例仅有1例发生甲基化(2.5%), hMLH1基因mRNA表达降低与甲基化之间存在明显的相关性($\chi^2 = 8.0182, P = 0.0046$)。如图1所示, 其中前4例即第3、5、25、60号肿瘤组织标本均发现hMLH1基因启动子区存在甲基化, 其mRNA表达比第5号癌旁正常组织(n5)明显降低。

2.4 hMLH1基因启动子区甲基化与胃癌临床病理参数间的关系 hMLH1基因启动子区甲基化与胃癌临床病理参数(肿瘤大小、癌肿部位、TNM分期和淋巴结转移)以及与年龄和性别间无明显相关性(表2)。

相关报道

国内外已有研究表明胃癌中存在hMLH1基因甲基化, 且发生hMLH1基因甲基化的胃癌仅表达少量的hMLH1蛋白, 而未发生甲基化的胃癌表达丰富的hMLH1蛋白。

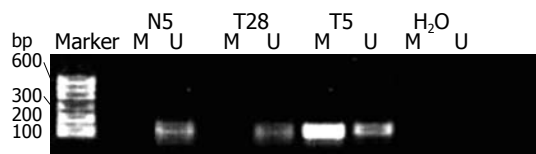


图 2 MSP法检测胃癌及癌旁正常组织hMLH1启动子区甲基化的电泳图。T5: 第5号肿瘤组织标本; T28: 第28号肿瘤组织标本; N5: 第5号正常标本; H₂O: 阴性对照; M: 甲基化引物扩增(产物为115 bp); U: 非甲基化引物扩增(产物为124 bp)。

3 讨论

错配修复基因MMR是一组高度保守的看家基因, 已发现的人类错配修复基因有9种, hMLH1基因是研究较广泛的一种, 在多种组织中均有表达。70%的hMLH1基因突变可形成终止密码, 导致翻译过早终止而产生不完全的hMLH1蛋白, 致使错配修复基因的表达在人类各种肿瘤细胞中的不同, 最终导致肿瘤的发生^[2]。DNA甲基化作为一种生化修饰过程, 主要指在DNA甲基化转移酶作用下, 胞嘧啶第五位碳原子上被加上一个甲基基团。通常情况下, DNA甲基化发生在CpG重复序列中。DNA甲基化常导致基因转录抑制, 其机制可能与以下两个因素有关: (1)胞嘧啶甲基化可能阻止转录因子与他们识别部位中的CpG序列结合; (2)这种转录抑制可能与两种蛋白质复合体(MeCP1和MeCP2)有关。这两种蛋白质复合体能够特异性地与发生甲基化的CpG序列结合, 从而阻止转录因子与后者结合。

近年来, 在一些肿瘤及细胞系研究中发现, hMLH1启动子区甲基化与蛋白表达缺失直接相关, hMLH1基因启动子继发转录缺失是许多人类散发性肿瘤发生的一个重要事件, 与该基因启动子区甲基化密切相关^[3-4]。Herman *et al*^[5]用MSP法对37个结肠癌细胞株研究发现, 8株出现hMLH1基因甲基化, 占21.6%; 在34例原发性结肠癌中, 甲基化占32.4%; 39例对照组织(正

应用要点
通过对hMLH1基因蛋白表达及甲基化的检测判断胃癌的发生与否,有助于胃癌的早期诊断。

表 2 hMLH1基因启动子区甲基化与胃癌的临床病理参数间的关系

病理参数	分组	n	hMLH1甲基化n(%)	χ^2	P
年龄(岁)	>60	30	10(33)	0.3175	0.5731
	<60	30	8(27)		
肿瘤大小(cm)	>5	29	12(41)	3.4610	0.0628
	<5	31	6(19)		
性别	男	42	11(26)	0.9675	0.3253
	女	18	7(39)		
癌肿部位	胃窦	26	6(23)	1.0472	0.3062
	胃体及贲门	34	12(35)		
淋巴结转移	有	9	4(44)	1.0520	0.3051
	无	51	14(27)		
TNM分期	期	22	5(23)	0.8749	0.3496
	期	38	13(34)		

常黏膜、淋巴结和痰细胞)无甲基化,提示在结肠癌中hMLH1常见5'CpG岛的过度甲基化与癌症的发生有着密切的关系. Fleisher *et al*^[6]检测了65例胃癌,发现29例存在hMLH1异常甲基化,发生hMLH1基因甲基化的胃癌仅表达少量的hMLH1蛋白,而未发生甲基化的胃癌表达丰富的hMLH1蛋白. 故认为在胃癌中通常有hMLH1蛋白表达缺失,且主要与hMLH1启动子区CpG岛甲基化有关. 本研究对60例胃癌组织检测发现有18例存在hMLH1启动子区甲基化,甲基化发生率为30%,而60例癌旁组织中未发现有甲基化,两者存在显著性差异($P<0.01$). 国内也开展了对肿瘤组织中hMLH1启动子区甲基化状态的一系列研究. 陈国安 *et al*^[7]对肺癌组织中hMLH1启动子区甲基化状态及其与蛋白表达的关系进行分析,在50例肺癌组织中甲基化发生率为32%,14例hMLH1蛋白表达阴性者中,有11例(78.6%)甲基化,认为甲基化与hMLH1蛋白不表达有明显的相关性,可能是导致hMLH1蛋白不表达的重要机制. 这充分表明甲基化在癌症的发生中扮演极为重要的角色. 在正常状态下基因启动子区一般是非甲基化的,当其发生甲基化时,常导致基因转录沉默,使重要基因如DNA错配修复基因等功能丧失,从而导致损伤的DNA不能被及时修复,这与多种肿瘤的形成相关. 有研究发现甲基化与饮食^[8]、年龄^[9]、吸烟^[10]和环境等^[11]因素有关,荷兰的一项队列研究表明,叶酸摄入过低可导致甲基化状态紊乱,这种变化可被过量饮酒所加剧. 陈国安 *et al*^[7]统计了hMLH1启动子区甲基化与性别、吸烟状态、临床病理间的关系,未发现有明显的相关性. 本

研究也统计了甲基化与肿瘤大小、癌肿部位、淋巴结转移和TNM分期等临床病理间的关系,也未发现有明显的统计学意义. 这提示hMLH1启动子区甲基化可能是胃癌发生过程中的早期分子事件,可望成为胃癌早期诊断的指标之一^[12-14]. Nakajima *et al*^[9]研究发现hMLH1甲基化频率随着年龄的增长而显著增高,认为hMLH1甲基化在老年胃癌患者发病机制中起重要作用. 本文亦研究了甲基化频率与年龄的关系,但未发现有明显的相关性,可能与样本例数过少有关.

我们研究发现: 60例胃癌组织中hMLH1基因mRNA阴性表达21例,60例癌旁组织中未发现有mRNA表达缺失. 在21例表达缺失的胃癌中有17例检测出甲基化(占81%),而hMLH1基因mRNA表达无缺失的39例中仅有1例发生甲基化(占2.5%),两者差异有显著性,这与国内外研究结果相符^[15-16]. 这提示hMLH1基因启动子区CpG高甲基化可使hMLH1基因沉默,导致其mRNA表达缺失,因此不能表达错配修复蛋白,使其错配修复基因功能丧失,最终导致胃癌的发生和发展. CpG岛高甲基化可能通过抑制CBF转录因子结合到相应的CCAATbox使hMLH1基因沉默. Veigl *et al*^[17]人用去甲基化制剂5'氮杂胞嘧啶(5-azacytidine)处理因甲基化导致hMLH1失活的肿瘤细胞系,成功地恢复了hMLH1的表达,其表达水平取决于药物的剂量. 相反,对hMLH1启动子未甲基化及由体细胞突变或生殖细胞缺陷引起的hMLH1表达缺失却无复活作用. 由此可见hMLH1启动子甲基化是基因表达关闭的主要原因,进一步证实了异常甲基化与基因表达抑制和肿瘤的发生有着密切的关系.

在本试验中还发现1例CpG存在甲基化而mRNA表达却正常, 考虑可能原因是在同一胃癌组织中的部分癌细胞存在甲基化, 而另外一部分未被甲基化, 未甲基化部分表达正常的mRNA. 研究中还发现, 不论hMLH1基因的表达低下抑或缺失, 一个样本中非甲基化条带常与甲基化条带同时出现, 这与既往研究的结果一致^[18-19]. 由于没有通过微切割取组织细胞, 因此癌肿组织中可能存在正常组织或者是肠化组织, 加之MSP方法极度敏感, 导致1例样本同时扩增出甲基化和非甲基化条带. Bai *et al*^[20]认为这种现象是由于CpG岛甲基化在等位基因内的异质性, 或者是等位基因之间甲基化的差异所致, 可能提示hMLH1基因部分甲基化已足以使该基因转录沉默.

总之, 我们初步证实了hMLH1 mRNA在胃癌组织中表达减少或缺失, 并与启动子高度甲基化显著相关. 由于DNA甲基化状态可被逆转, 同样hMLH1启动子去甲基化可以恢复肿瘤细胞hMLH1 mRNA的再表达, 进而恢复MMR活性^[21], 从而达到治疗的目的. 因此针对基因甲基化的靶向治疗已引起人们的重视.

4 参考文献

- 1 房殿春, 罗元辉, 刘为纹. 胃癌组织hMLH1和hMSH2基因启动子区甲基化状态的研究. 第三军医大学学报 2001; 23: 1010-1011
- 2 缪辉来, 桂水清, 林木生, 陈明, 陈念平. 原发性肝细胞癌中错配修复基因hMLH1的表达及其意义. 中华实验外科杂志 2005; 22: 435-436
- 3 Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 808-811
- 4 Yao Y, Tao H, Kim JJ, Burkhead B, Carloni E, Gasbarrini A, Sepulveda AR. Alterations of DNA mismatch repair proteins and microsatellite instability levels in gastric cancer cell lines. *Lab Invest* 2004; 84: 915-922
- 5 Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9821-9826
- 6 Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 1090-1095
- 7 陈国安, 刘天菊, 何积银, 张伟, 刘毅, 金顺钱, 李申德, 孙燕. 肺癌组织中错配修复基因hMLH1启动子甲基化状态分析. 中华肿瘤杂志 2000; 22: 493-495
- 8 Nan HM, Song YJ, Yun HY, Park JS, Kim H. Effects of dietary intake and genetic factors on hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3834-3841
- 9 Nakajima T, Akiyama Y, Shiraishi J, Arai T, Yanagisawa Y, Ara M, Fukuda Y, Sawabe M, Saitoh K, Kamiyama R, Hirokawa K, Yuasa Y. Age-related hypermethylation of the hMLH1 promoter in gastric cancers. *Int J Cancer* 2001; 94: 208-211
- 10 Pulling LC, Divine KK, Klinge DM, Gilliland FD, Kang T, Schwartz AG, Bocklage TJ, Belinsky SA. Promoter hypermethylation of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene: more common in lung adenocarcinomas from never-smokers than smokers and associated with tumor progression. *Cancer Res* 2003; 63: 4842-4848
- 11 Kang GH, Lee HJ, Hwang KS, Lee S, Kim JH, Kim JS. Aberrant CpG island hypermethylation of chronic gastritis, in relation to aging, gender, intestinal metaplasia, and chronic inflammation. *Am J Pathol* 2003; 163: 1551-1556
- 12 Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 2847-2851
- 13 Sato F, Meltzer SJ. CpG island hypermethylation in progression of esophageal and gastric cancer. *Cancer* 2006; 106: 483-493
- 14 Homma N, Tamura G, Honda T, Jin Z, Ohmura K, Kawata S, Motoyama T. Hypermethylation of Chfr and hMLH1 in gastric noninvasive and early invasive neoplasias. *Virchows Arch* 2005; 446: 120-126
- 15 Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 159-164
- 16 Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS. Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 1999; 59: 2029-2033
- 17 Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 8698-8702
- 18 Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2003; 83: 635-641
- 19 Que N, Sentani K, Yokozaki H, Kitadai Y, Ito R, Yasui W. Promoter methylation status of the DNA repair genes hMLH1 and MGMT in gastric carcinoma and metaplastic mucosa. *Pathobiology* 2001; 69: 143-149
- 20 Bai H, Gu L, Zhou J, Deng D. p16 hypermethylation during gastric carcinogenesis of Wistar rats by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Mutat Res* 2003; 535: 73-78
- 21 Leung WK, Yu J, Ng EK, To KF, Ma PK, Lee TL, Go MY, Chung SC, Sung JJ. Concurrent hypermethylation of multiple tumor-related genes in gastric carcinoma and adjacent normal tissues. *Cancer* 2001; 91: 2294-2301

同行评价
本文应用MSP及RT-PCR法检测60例胃癌及癌旁黏膜中hMLH1甲基化状态, 对探讨hMLH1基因甲基化在胃癌发生、发展中的作用有一定科学价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

术前化疗对hOGG1及PARP在原发性肝癌组织中表达的影响

苏智雄, 彭涛, 叶新平, 肖开银, 尚丽明, 苏铭, 黎乐群

背景资料
肝细胞性肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。研究表明, DNA损伤修复机制与多种肿瘤的发生、发展以及预后有关。本研究通过检测正常肝组织、肝癌组织和癌旁组织中hOGG1、PARP蛋白的表达, 探讨术前化疗对肿瘤损伤修复机制的影响, 为临床治疗肝癌提供理论依据。

苏智雄, 彭涛, 叶新平, 肖开银, 尚丽明, 苏铭, 黎乐群, 广西医科大学第一附属医院肝胆外科 广西壮族自治区南宁市530021
苏智雄, 广西医科大学第一附属医院博士, 主治医师, 主要从事肝癌方面的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30460143
作者贡献分布: 此课题由苏智雄, 彭涛及黎乐群设计; 研究过程由苏智雄, 叶新平, 肖开银, 尚丽明及苏铭操作完成; 数据分析、论文写作由苏智雄完成。
通讯作者: 黎乐群, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院肝胆外科. li_lequn@263.net
电话: 0771-5356528
收稿日期: 2007-12-17 修回日期: 2008-03-13

Effect of preoperative chemotherapy on the expression of human 8-oxoGuanine DNA glycosylase-1 and poly ADP-ribose polymerase in hepatocellular carcinoma

Zhi-Xiong Su, Tao Peng, Xin-Ping Ye, Kai-Yin Xiao, Li-Min Shang, Ming Su, Le-Qun Li

Zhi-Xiong Su, Tao Peng, Xin-Ping Ye, Kai-Yin Xiao, Li-Min Shang, Ming Su, Le-Qun Li, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30460143
Correspondence to: Dr. Le-Qun Li, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. li_lequn@263.net
Received: 2007-12-17 Revised: 2008-03-13

Abstract

AIM: To explore the effect of preoperative chemotherapy on repair mechanism.

METHODS: EnVision immunohistochemical method was used to detect the expression of human 8-oxoGuanine DNA glycosylase-1 (hOGG1) and poly ADP-ribose polymerase (PARP) in normal liver tissues ($n = 41$), hepatocellular carcinoma (HCC) and its surrounding tissues ($n = 187$; preoperative chemotherapy, $n = 88$; without preoperative chemotherapy, $n = 99$).

RESULTS: The expression levels of hOGG1 in nuclei were increased ordinally, while those of PARP were decreased ordinally in HCC tissues without preoperative chemotherapy, HCC tissues received preoperative chemotherapy, and normal liver tissues, and there were marked difference between the three groups (all $P < 0.05$). COX multivariate analysis of prognosis indicated that the risk factors for HCC recurrence included the positive degree of PARP expression ($P = 0.038$), alanine aminotransferase (ALT) level ($P = 0.001$), and histological grades ($P = 0.040$), while the protective factors included the peripheral blood lymphocyte count ($P = 0.026$) and chemotherapy ($P = 0.049$).

CONCLUSION: Preoperative chemotherapy promote the ability of DNA repair in HCC tissues.

Key Words: Human 8-oxoGuanine DNA glycosylase-1; Poly ADP-ribose polymerase; Hepatocellular carcinoma; Chemotherapy; DNA repair

Su ZX, Peng T, Ye XP, Xiao KY, Shang LM, Su M, Li LQ. Effect of preoperative chemotherapy on hOGG1 and PARP in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1412-1416

摘要

目的: 探讨术前化疗对损伤修复机制的影响。

方法: 应用EnVision免疫组化法检测41例正常肝组织、187例(术前未做化疗患者99例和术前行经肝动脉插管化疗患者88例)原发性肝癌患者的肝癌组织和癌旁组织中hOGG1和PARP的表达。

结果: 正常肝组织、术前化疗组与术前未化疗组肝癌组织中, hOGG1蛋白细胞核表达阳性分度依次递增, 而PARP蛋白细胞核表达阳性分度依次递减, 三者之间差异均有显著性差异(均 $P < 0.05$)。PARP癌旁组织阳性表达强度($P = 0.038$)、ALT($P = 0.001$)、病理分级($P = 0.040$)是肿瘤复发的危险因素, 外周血淋巴细胞数($P = 0.026$)、化疗($P = 0.049$)是肿瘤复发的保护因素。

同行评议者
刘彬彬, 副研究员, 复旦大学附属中山医院、复旦大学肝癌研究所

结论: 术前化疗可以杀伤对氧化损伤敏感的肝癌细胞。

关键词: hOGG1; 聚ADP核糖聚合酶; 原发性肝癌; 化疗; DNA损伤修复

苏智雄, 彭涛, 叶新平, 肖开银, 尚丽明, 苏铭, 黎乐群. 术前化疗对hOGG1及PARP在原发性肝癌组织中表达的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1412-1416
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1412.asp>

0 引言

肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国最常见的恶性肿瘤之一. 研究表明, DNA损伤修复机制与多种肿瘤的发生、发展以及预后有关^[1], 而且其中某些重要因子很可能成为未来肿瘤治疗的靶向分子. hOGG1(human 8-oxoGuanine DNA glycosylase-1, hOGG1)基因产物hOGG1蛋白具有DNA糖苷酶和AP裂解酶活性, 可特异切除修复8-oxoG以及自发碱基丢失、或因DNA糖苷化作用产生的阻断DNA复制的脱嘌呤或脱嘧啶(AP)位点^[2-4]. DNA损伤后, 聚ADP核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)被DNA缺口激活, 并与之结合, 通过合成并转运长链ADP-核糖多聚体到DNA修复蛋白上, 完成对DNA的修复^[5]. 我们通过检测正常肝组织、肝癌组织和癌旁组织中hOGG1、PARP蛋白的表达, 探讨术前化疗对肿瘤损伤修复机制的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-10/2006-07在我院接受手术治疗经病理证实的原发性肝癌患者187例, 其中术前未行化疗患者(I组)99例, 术前7-14 d行经肝动脉插管化疗患者(II组)88例, I组: 男86例, 女13例, 年龄23-75岁; II组男79例, 女9例, 年龄22-68岁. 两组间性别构成、年龄大小、肿瘤大小、HBsAg状态、AFP大小、血红蛋白、白蛋白、总胆红素、肝硬化程度差异无统计学意义. 兔抗人hOGG1为英国Abcam公司产品, 兔抗人PARP和EnVision免疫组化试剂盒均为迈新生物技术开发有限公司产品.

1.2 方法 用药方案: 表阿霉素(ADM)75 mg/m²; 顺铂(PDD)40 mg/m²; 5氟尿嘧啶(5-FU)500 mg/m². 取手术切除的肝癌和距肿瘤2 cm以上癌旁组织制作石蜡标本, 常规光镜检查获得病理诊断. 另选取HBsAg阴性血管瘤患者正常肝组织及肝移植供肝41例做正常对照. 标本均经40 g/L甲醛固

定, 石蜡包埋.

正常肝组织、癌组织、癌旁组织中hOGG1、PARP蛋白的测定用EnVision免疫组化法测定. 具体步骤: 石蜡切片脱蜡, hOGG1蜡块不进行抗原修复, PARP蜡块0.01 mol/L枸橼酸钠高压热修复抗原. 30 mL/L H₂O₂溶液室温孵育15 min. 滴加一抗、聚合物增强剂及酶标鼠/兔聚合物, 同时设阴性对照, DAB显色, 苏木素复染. 70℃烤片20 min. 中性树胶封片. 必须同时具备肝组织弥漫性纤维化及假小叶形成, 才能作出肝硬化病理诊断^[6]. 免疫组化阳性信号为棕黄色细小颗粒状, 定位于细胞核和/或细胞质. 染色结果参照Mark Kelley实验室的标准^[7]进行肿瘤细胞阳性计分, 首先在高倍镜下计数1000个肿瘤细胞, 避开肿瘤边缘及坏死区域. 根据阳性细胞数目所占百分比得出细胞核或细胞质标记指数(labeling index, LI), 即细胞核或细胞质LI = 阳性肿瘤细胞数/1000个肿瘤细胞×100%. 分为以下四级计分: I: 0分, <10%; II: 1分, 11%-25%; III: 2分, 26%-50%; IV: 3分, 51%以上. 染色强度按瘤细胞着色的深浅计分: 0分, 阴性; 1分, 弱阳性; 2分, 中等阳性; 3分, 强阳性. 将2个分值相加即得出该例标本的免疫组化阳性分度: 0-1分为阴性, 记为(-); 2-4分为弱阳性, 记为(+); 5分以上为阳性, 记为(++).

统计学处理 SPSS10.0统计软件包处理, 率的比较用 χ^2 检验; $P < 0.05$ 为有统计学显著性.

2 结果

2.1 hOGG1和PARP蛋白表达 hOGG1细胞核阳性分度在正常对照组、II组癌旁组织、I组癌旁组织、II组癌组织、I组癌组织中呈依次递增趋势, PARP细胞核呈递减趋势. 正常对照组与I组癌组织、II组癌组织比较, I组癌组织与II组癌组织比较均有临床意义的差异(表1, 图1).

2.2 病例随访 分别在术前化疗组和术前未化疗组中, 取2005-05以前病例进行随访, 其中术前化疗组38例, 术前未化疗组44例, 肿瘤复发时间为手术日期到影像学发现复发日期.

用Life Table法将化疗组与未化疗组复发时间进行比较, 其复发率差异有统计学意义($P = 0.049$). 化疗组中位未复发时间是905.6 d, 未化疗组中位未复发时间是614.6 d(图2). 术前化疗组及未化疗组hOGG1蛋白表达阴性(-)和阳性(+)病例, 与hOGG1蛋白表达阳性(++)病例复发时间比较, 其癌组织、癌旁组织复发率差异无统计学意义. 术前化疗组、术前未化疗组PARP蛋白

研发前沿
hOGG1蛋白表达高的肝癌细胞是否就对化疗药物敏感, 有待进一步研究.

应用要点

本文应用EnVision免疫组化法检测DNA修复酶hOGG1及PARP在原发性肝癌及癌旁组织中的表达,探讨术前化疗对损伤修复机制的影响,为术前行肝动脉插管化疗提供理论依据。

表 1 各组肝癌组织和癌旁组织中hOGG1和PARP蛋白表达(n, %)

组织类型	n	hOGG1细胞核			PARP细胞核		
		-	+	++	-	+	++
正常对照组	41	29(70.7)	9(22.0)	3(7.3)	12(29.3)	28(68.3)	1(2.4)
组癌组织	99	22(22.2)	32(32.3)	45(45.5)	70(70.7)	21(21.2)	8(8.1)
组癌旁组织	99	54(54.5)	36(36.4)	9(9.1)	41(41.4)	49(49.5)	9(9.1)
组癌组织	88	29(33.0)	31(35.2)	28(31.8)	48(54.5)	32(36.4)	8(9.1)
组癌旁组织	88	51(58.0)	27(30.7)	10(11.3)	36(40.9)	46(52.3)	6(6.8)

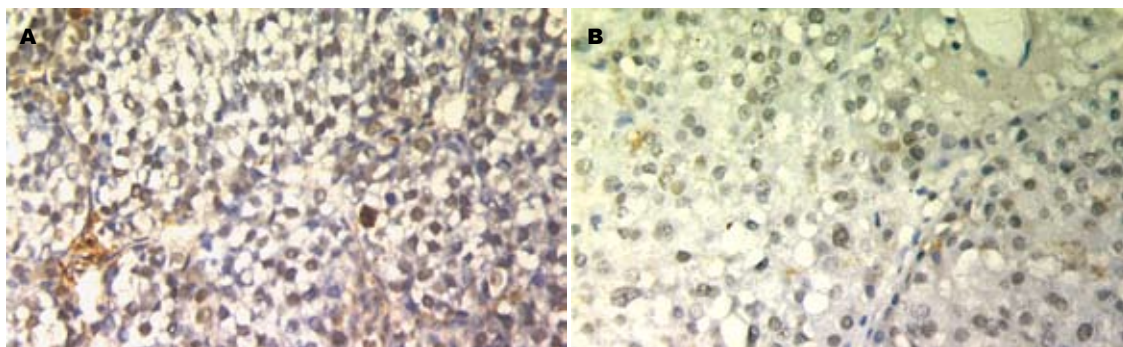


图 1 hOGG1和PARP蛋白表达. A: hOGG1阳性表达; B: PARP阳性表达.

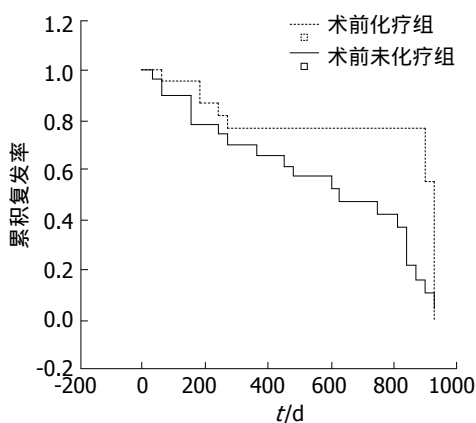


图 2 化疗组与未化疗组复发时间.

表达阴性(-)病例,与PARP蛋白表达阳性(+、++)病例复发时间比较,其癌组织、癌旁组织复发率差异无统计学意义.按统计软件要求整理数据(表2).Cox回归分析结果,PARP癌旁组织阳性表达强度($P = 0.038$)、ALT($P = 0.001$)、病理分级($P = 0.040$)是肿瘤复发的危险因素,外周血淋巴细胞数($P = 0.026$)和介入治疗($P = 0.049$)是肿瘤复发的保护因素(表3).

3 讨论

各种环境致癌和致突变物质均可引起DNA损伤.这些物质与超过1/3的肿瘤发生有关^[8].细胞在生理或病理状态下产生的活性氧也可以造成

表 2 可疑复发因素量化

复发因素	变量	数量化及编码
复发天数	Y	具体数值
hOGG1癌组织阳性表达	X1	- = 0, + = 1, ++ = 2
hOGG1癌旁组织阳性表达	X2	- = 0, + = 1, ++ = 2
PARP癌组织阳性表达	X3	- = 0, + = 1, ++ = 2
PARP癌旁组织阳性表达	X4	- = 0, + = 1, ++ = 2
年龄	X5	具体数值
白细胞	X6	具体数值
淋巴细胞	X7	具体数值
总胆红素	X8	具体数值
白蛋白	X9	具体数值
ALT	X10	具体数值
HBsAg	X11	阴性 = 0, 阳性 = 1
甲胎蛋白	X12	具体数值
介入治疗	X13	否 = 0, 是 = 1
肿瘤大小	X14	具体数值
有否肝硬化	X15	无 = 0, 有 = 1
病理分级	X16	= 0, = 1, = 2, = 3

DNA损伤. DNA损伤得不到及时有效的修复,细胞将发生基因突变和癌变.因此,由各种因素导致的DNA氧化损伤,可能参与肝癌的发生和发展.

hOGG1基因编码的蛋白产物具有DNA糖苷酶和AP裂解酶活性,可以特异切除DNA氧化损伤的重要产物8-羟基鸟嘌呤(8-oxoG),从而避免

表 3 多因素Cox回归分析

变量	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	自由度	P值	相对危险度
X1	0.509	0.414	1.516	1	0.218	1.664
X2	-0.566	0.523	1.170	1	0.279	0.568
X3	-0.483	0.628	0.592	1	0.442	0.617
X4	1.120	0.540	4.305	1	0.038	3.065
X5	-0.028	0.029	0.975	1	0.323	0.972
X6	-0.040	0.218	0.033	1	0.855	0.961
X7	-1.461	0.654	4.986	1	0.026	0.232
X8	0.039	0.041	0.890	1	0.346	1.040
X9	0.045	0.072	0.402	1	0.526	1.046
X10	0.020	0.006	11.697	1	0.001	1.021
X11	-0.388	0.642	0.366	1	0.545	0.678
X12	0.000	0.000	1.763	1	0.184	1.000
X13	-1.086	0.552	3.865	1	0.049	0.338
X14	-0.001	0.067	0.000	1	0.987	0.999
X15	-0.246	0.612	0.162	1	0.688	0.782
X16	0.905	0.440	4.234	1	0.040	2.471

名词解释

hOGG1: 蛋白具有DNA糖苷酶和AP裂解酶活性, 可特异切除修复8-oxoG以及自发碱基丢失、或因DNA糖苷化作用产生的阻断DNA复制的脱嘌呤或脱嘧啶(AP)位点。

在DNA复制过程中因错配而导致的G:C→T:A颠换突变^[2]。8-oxoG是氧化自由基攻击DNA形成的主要产物, 是一种重要的致癌性致突变性损伤^[9]。Kondo *et al*研究发现在结肠癌组织中hOGG1蛋白表达明显升高, 并与8-oxoG含量呈明显正相关^[10]。但在人类肺癌和肾癌组织中未发现癌组织和癌旁组织hOGG1蛋白表达的差异^[11]。hOGG1可以修复由阿霉素等化疗药物所致的线粒体DNA损伤和防止突变发生^[12]。hOGG1蛋白表达增高间接说明细胞氧化损伤加重。本研究结果显示, hOGG1蛋白表达细胞核阳性分度在正常对照组、化疗组癌组织、未化疗组癌组织中呈依次递增趋势。未化疗组癌组织hOGG1蛋白表达高于化疗组癌组织。表明肝癌组织在化疗药物作用下氧化损伤的修复活性降低。这可能是肝癌组织经化疗药物作用后, hOGG1蛋白表达高的细胞对化疗药物敏感, 首先凋亡, 余下的相对耐药的肝癌细胞hOGG1蛋白表达低有关; 有研究显示TACE诱导肝癌细胞凋亡是其最主要的治疗机制, 这种作用以早期最为明显^[13]。是否hOGG1蛋白表达高的肝癌细胞对化疗药物敏感, 有待进一步研究。

PARP是一类存在于多数真核细胞中的蛋白质翻译后修饰酶。主要存在于细胞核内, 少量存在于细胞质内。目前研究发现, PARP家族至少有6个成员, 分别是: PARP-1, PARP-2, PARP-3, PARP-4/VPARP, Tankyrase-1和-2等。PARP具有保持染色体结构完整、参与DNA复制和转录

的功能, 在维持基因组稳定和细胞凋亡过程中发挥作用。PARP在DNA损伤断裂时被激活, 作为DNA损伤的分子感受器, 识别、结合到DNA断裂处, 激活、催化受体蛋白的聚ADP核糖基化作用, 参与DNA的修复。PARP与组蛋白H1结合, 影响核小体的正常结构, 使染色体形成开放、松散结构, 有利于DNA修复^[14]。PARP抑制或基因缺陷小鼠的研究可以肯定PARP在维持基因组稳定方面起着关键的作用。研究发现, 化学性PARP抑制剂增加了姐妹染色体交换(sister chromosome exchange, SCE)的几率, 表明在DNA损伤剂的作用下, 增加基因重组的发生率。把PARP的DNA结合域导入Hela细胞, 结果增加了自发性和损伤诱导的SCE。PARP-/-小鼠在没有DNA损伤、微核和染色体损伤的情况下, 受烷化剂和放射刺激后SCE的几率增加。DNA断裂可以激发基因重组, PARP的作用是结合到受损DNA的断端减少重组发生, 并避免损伤DNA受核酸外切酶的作用产生重组中间物。PARP在DNA损伤时被激活, 识别并结合到DNA断裂部位, 从而保护裸露的DNA末端免遭核酸酶的分解^[15]。本研究结果显示, PARP蛋白表达细胞核阳性分度在正常对照组、化疗组癌组织、未化疗组癌组织中呈依次递减趋势。未化疗组癌组织PARP蛋白表达低于化疗组癌组织。表明肝癌组织在化疗药物作用下DNA损伤修复能力上调, 经过术前化疗药物筛选的DNA损伤修复能力加强的癌细胞如果逃避了手术切除可能成为术后

同行评价
本研究数据分析
合理,具有一定的
学术价值,但创新
性一般.

复发的来源. 是否化疗药物可减少肝癌细胞抑制PARP活性能力,从而增加肝癌细胞凋亡,有待进一步研究.

单因素分析发现介入治疗可以降低肝癌的复发,但未发现hOGG1、PARP蛋白在癌或癌旁组织表达对复发的影响. 多因素分析显示, PARP癌旁组织阳性表达强度高的患者, 肝癌复发的可能性增加, 提示PARP在癌细胞和癌旁细胞扮演两个不同的角色, PARP在癌细胞可能扮演凋亡角色, PARP在癌旁细胞可能扮演DNA损伤修复角色, 有研究表明PARP在细胞的凋亡以及DNA损伤修复方面起作用^[11]. PARP在癌旁细胞修复活性加强是否对肿瘤细胞有保护作用值得进一步研究. PARP也许可以成为提示肝癌患者预后的新指标. 多因素分析还显示淋巴细胞数高的患者, 肝癌复发的可能性降低, 这可以从免疫方面考虑, 这可能是淋巴细胞数高的患者, 免疫功能较强, 从而减少肿瘤复发. 另外ALT高, 说明患者肝细胞损伤重, 可能损伤/修复的生理过程有促进肝癌复发的作用. 而病理等级越高, 肿瘤分化越差, 肝癌越易于复发.

总之, 术前化疗可以杀伤对氧化损伤敏感的肝癌细胞, 表现为未化疗组癌组织hOGG1蛋白表达高于化疗组癌组织, 未化疗组癌组织PARP蛋白表达低于化疗组癌组织. PARP癌旁组织阳性表达强度高的患者, 肝癌复发的可能性增加, PARP也许可以成为提示肝癌患者预后的新指标.

4 参考文献

- Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 379-385
- Floyd RA. The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1447-1450
- Kannan S, Pang H, Foster DC, Rao Z, Wu M. Human 8-oxoguanine DNA glycosylase increases resistance to hyperoxic cytotoxicity in lung epithelial cells and involvement with altered MAPK activity. *Cell Death Differ* 2006; 13: 311-323
- Banerjee A, Yang W, Karplus M, Verdine GL. Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA. *Nature* 2005; 434: 612-618
- Minor T, Olschewski P, Tolba RH, Akbar S, Kocalkova M, Dombrowski F. Liver preservation with HTK: salutary effect of hypothermic aerobiosis by either gaseous oxygen or machine perfusion. *Clin Transplant* 2002; 16: 206-211
- 中华医学会肝病学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. *实用肝脏病杂志* 2006; 9: 8-18
- Wang D, Luo M, Kelley MR. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 679-686
- Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001; 27: 247-254
- Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000; 21: 361-370
- Kondo S, Toyokuni S, Tanaka T, Hiai H, Onodera H, Kasai H, Imamura M. Overexpression of the hOGG1 gene and high 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) lyase activity in human colorectal carcinoma: regulation mechanism of the 8-OHdG level in DNA. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1394-1400
- Chevillard S, Radicella JP, Levalois C, Lebeau J, Poupon MF, Oudard S, Dutrillaux B, Boiteux S. Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene* 1998; 16: 3083-3086
- Singh KK, Sigala B, Sikder HA, Schwimmer C. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* OGG1 DNA repair gene leads to an increased frequency of mitochondrial mutants. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 1381-1388
- 陈胜利, 全毅, 黄子诚, 陈国东, 张静, 许艳丽. 兔VX2肝癌LP-THACE后早期癌细胞凋亡研究. *医学研究杂志* 2006; 11: 39-42
- Duriez PJ, Shah GM. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochem Cell Biol* 1997; 75: 337-349
- Gilliams-Francis KL, Quay AA, Naegele JR. PARP cleavage, DNA fragmentation, and pyknosis during excitotoxin-induced neuronal death. *Exp Neurol* 2003; 184: 359-372

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

熊去氧胆酸联合通胆汤对原发性胆汁性肝硬化的治疗作用

唐海鸿, 陈英杰, 童光东, 周大桥, 贺劲松, 周小舟, 郑颖俊

唐海鸿, 陈英杰, 童光东, 周大桥, 贺劲松, 周小舟, 郑颖俊, 广州中医药大学附属深圳医院 广东省深圳市 518033
唐海鸿, 2006级广州中医药大学硕士, 主要从事自身免疫性肝病及肝癌前病变的研究。
作者贡献分布: 唐海鸿和童光东对此文所作贡献均等; 此课题由唐海鸿, 陈英杰及童光东设计; 研究过程由唐海鸿, 陈英杰, 童光东, 周大桥, 贺劲松, 周小舟及郑颖俊操作完成; 数据分析由唐海鸿及童光东完成; 本论文写作由唐海鸿及童光东完成。
通讯作者: 童光东, 广东省深圳市福华路1号, 广州中医药大学附属深圳医院. tgd755@163.com
电话: 0755-88359666-1005
收稿日期: 2007-12-04 修回日期: 2008-03-05

Efficacy of ursodeoxycholic acid combined with Tongdan Decoction in treatment of patients with primary biliary cirrhosis

Hai-Hong Tang, Ying-Jie Chen, Guang-Dong Tong, Da-Qiao Zhou, Jin-Song He, Xiao-Zhou Zhou, Ying-Jun Zheng

Hai-Hong Tang, Ying-Jie Chen, Guang-Dong Tong, Da-Qiao Zhou, Jin-Song He, Xiao-Zhou Zhou, Ying-Jun Zheng, Shenzhen Hospital Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China
Correspondence to: Guang-Dong Tong, Shenzhen Hospital Affiliated to Guangzhou University of Chinese Medicine, 1 Fuhua Road, Shenzhen 518033, Guangdong Province, China. tgd755@163.com
Received: 2007-12-04 Revised: 2008-03-05

Abstract

AIM: To observe the clinical efficacy of ursodeoxycholic acid (UDCA) in combination Tongdan Decoction in the treatment of patients with primary biliary cirrhosis (PBC).

METHODS: A total of 60 PBC patients were randomly divide into control group ($n = 30$) and treatment group ($n = 30$), treated with UDCA alone and UDCA combined with Tongdan Decoction, respectively. The clinical symptoms, liver function, immunologic index and side effect were observed 4, 12 and 24 wk after treatment, and most patients were followed up for 1 to 3 years.

RESULTS: After 24 wk, 25 patients (83.3%) in

the treatment group and 17 patients (56.7%) in the control group showed complete responses, and there was a significant difference between the two groups. The clinical symptoms were improved, especially in the treatment group after 4 wk ($P < 0.05$), and over 90% patients had no clinical symptoms after 12 wk in the treatment group. Combined therapy was superior to UDCA monotherapy in lowering cholestasis and aminopharase ($P < 0.05$); the immunologic indexes such as IgM, IgG and IgA were decreased at 96 wk in the treatment group as compared with those in the control group (1.93 ± 1.71 g/L vs 2.16 ± 1.81 g/L; 10.25 ± 6.23 g/L vs 12.45 ± 5.98 g/L; 1.86 ± 1.72 g/L vs 2.78 ± 2.12 g/L; all $P < 0.05$). The common side-effects were diarrhea and occasional pruritus induced by increased serum TBA level, which was alleviated by decreasing the dose.

CONCLUSION: UDCA combined with Tongdan Decoction can effectively treat PBC, and improve the biomarkers.

Key Words: Ursodeoxycholic acid; Primary biliary cirrhosis; Traditional Chinese Medicine; Combined treatment

Tang HH, Chen YJ, Tong GD, Zhou DQ, He JS, Zhou XZ, Zheng YJ. Efficacy of ursodeoxycholic acid combined with Tongdan Decoction in treatment of patients with primary biliary cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1417-1424

摘要

目的: 观察熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)联合通胆汤治疗 期原发性胆汁性肝硬化患者30例的临床疗效。

方法: 60例入组的患者被随机分配到对照组($n = 30$)和治疗组($n = 30$), 分别给UDCA和UDCA联合中药通胆汤治疗。在治疗4-24 wk分别记录患者的临床症状、肝功能、免疫指标及不良反应, 并随访1-3年。

结果: 24 wk后, 治疗组25例(83.3%)完全反

背景资料
原发性胆汁性肝硬化(PBC)是一种病因未明, 由自身免疫机制介导的, 以肝内小胆管进行性非化脓性炎症为特征的慢性胆汁淤积性疾病。过去在我国人群中少见, 随着国内对该病研究和诊断技术的不断提高, PBC在我国肝病患者中的检出率也逐渐提高。

同行评议者
丁惠国, 主任医师, 首都医科大学
附属北京佑安医
院肝病消化科

研发前沿
PBC临床分期不同,影响治疗效果的判断,解决UDCA在治疗存在的问题,提高PBC临床疗效与整体生存率,是目前学术界关注的问题。

应,对照组17例(56.7%)($P<0.05$);治疗组第4周临床症状阳性率低于对照组($P<0.05$),12 wk后90%的患者症状基本消失;在降低胆汁淤积及转氨酶上治疗组均明显优于单用UDCA($P<0.05$);治疗组IgM、IgG及IgA在治疗96 wk后较治疗前明显降低,与对照组比较有明显差异(1.93 ± 1.71 g/L vs 2.16 ± 1.81 g/L, 10.25 ± 6.23 g/L vs 12.45 ± 5.98 g/L, 1.86 ± 1.72 g/L vs 2.78 ± 2.12 g/L, $P<0.05$)。不良反应主要是腹泻与总胆汁酸升高所导致偶发皮肤瘙痒,减量后很快缓解。

结论: UDCA联合通胆汤治疗原发性胆汁性肝硬化,较单用UDCA能更有效改善临床症状与生化指标。

关键词: 熊去氧胆酸;原发性胆汁性肝硬化;中药;联合治疗

唐海鸿, 陈英杰, 童光东, 周大桥, 贺劲松, 周小舟, 郑颖俊. 熊去氧胆酸联合通胆汤对原发性胆汁性肝硬化的治疗作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1417-1424
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1417.asp>

0 引言

原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)是一种病因未明,由自身免疫机制介导的,以肝内小胆管进行性非化脓性炎症为特征的慢性胆汁淤积性疾病,主要累及中年或老年妇女,进一步可发展至肝纤维化与肝硬化^[1-2]。PBC在世界各地均有分布,50-70岁之间的人较常见,而青少年很少发生^[3],西方国家患病率高低不等,约为6.7-940/100万,年发病率约为0.7-49/100万^[4],近年来国内外报道PBC发病率有上升趋势^[5]。过去在我国人群中少见,随着国内外对该病研究和诊断技术的不断提高,PBC在我国肝病患者的检出率也逐渐提高^[6-7]。在治疗上,熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)^[8-10]被确认为常规、有效的药物,但其对PBC的症状、生化、疾病进程及生存指标的改善多个对照研究其结果存在差异。Poupon *et al*^[11]研究表明UDCA可改善患者的胆汁淤积的生化指征(胆红素、 γ -GT、ALP)、免疫指标(IgM),并且减轻炎症(转氨酶),改善患者的组织状况,但Heathcote *et al*^[12]研究表明UDCA虽可改善生化指标,但无明显改善临床症状的作用,在延长患者生存期及肝移植的时间方面却无明显差异。Lindor *et al*^[13]研究表明UDCA可延缓患者的疾病进程,但对症状及组织学改善无明显影响。Batts *et al*^[14]2年的研究表

明UDCA对患者的炎症及组织学改善无明显作用,加大剂量似乎可以改善炎症;更有一项大样本Meta分析显示UDCA作为标准治疗需要重新评价^[15]。尤其是在延缓疾病进展成严重的肝纤维化或肝硬化及延长PBC患者存活时间上,大多数文献存在不同观点,虽然大多数观点支持疾病早期应用UDCA可以显著延缓组织分期的进展^[16-17],但也有学者提出,UDCA虽可改善碎屑样死、门管和小叶间炎症、胆汁淤积及胆管缺失,然而根据Ludwig标准,UDCA不能改变肝纤维化和组织学分级^[18-19]。这些研究结果的差异,提示UDCA临床疗效有限性与不确定性,其次,可能与研究者选择PBC病例分期不同,病情的轻重有关。

PBC临床表现繁杂,很难归属于某一固定的中医病证,可在病程的不同阶段分别归属于“黄疸”,“胁痛”,“鼓胀”,以及“皮肤瘙痒”等内、妇、皮肤科等中医病证^[20]。近年有采用中医药治疗PBC的文献报告,如苏经格^[21]对30例PBC进行中医临床分型,常廷民 *et al*^[22]用复方甘草酸苷联合茵陈蒿汤治疗黄疸与肝功不正常的PBC,李林 *et al*^[23]研究采用UDCA联合中医辨证的治疗,以提高疗效。不过这些研究刚开始,样本小,设计不规范。为此,近年来我们对早中期(II、III期)PBC采用经验方通胆汤联合UDCA进行临床治疗研究,其目的是解决UDCA在治疗中存在的问题,努力减少因分期不同导致资料差异,提高PBC临床疗效与整体生存率。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 病例: 收集2002-05/2007-05在我科就诊的患者,符合入选条件病例共60例,男6例,女54例,男女比例为1:9。年龄25-62(平均 52.1 ± 7.2)岁。病程0.5-20(4.2 ± 3.3)年。60例PBC患者,一旦被确诊,便随机分为治疗组和对照组,每组各30例,治疗方案被放在不透光密封信封里,信封上标明由计算机随机产生的连续随机码,根据下面提到的分期标准,共有9例早期病例,51例中期,进行随机化分层,治疗组有早期患者4例,中期患者26例,男患者4例,对照组早期患者5例,中期患者25例,男患者2例。该试验所有患者亲自签署知情同意书,并且获得医院伦理委员会批准。治疗组采用通胆汤加UDCA治疗,对照组单用UDCA治疗。治疗前,入选患者的基线体征无统计学差异,具体见表1。

表 1 入选时两组的基本特征 ($n = 30$)

基本特征	治疗组	对照组	P 值
性别(男/女)	4/26	2/28	0.3894
年龄(岁)	51.20 ± 6.20	53.20 ± 6.80	0.2387
诊断时间(年)	4.10 ± 3.10	4.30 ± 3.40	0.8127
ALP(U/L)	425.31 ± 95.52	433.59 ± 84.32	0.7232
GGT(U/L)	403.25 ± 86.23	412.33 ± 80.23	0.6744
ALT(U/L)	261.38 ± 119.76	253.62 ± 121.63	0.8042
AST(U/L)	277.32 ± 146.31	270.91 ± 143.22	0.8644
TB(μ mol/L)	35.56 ± 10.15	34.61 ± 11.59	0.7368
Alb(g/L)	41.34 ± 6.91	40.17 ± 7.63	0.5360
TBA(μ mol/L)	40.34 ± 18.91	39.17 ± 19.61	0.8149
TG(mmol/L)	1.98 ± 1.12	1.83 ± 1.21	0.6202
CHOL(mmol/L)	6.23 ± 3.16	6.43 ± 3.91	0.8283
IgM(g/L)	2.98 ± 1.76	2.89 ± 2.01	0.8543
IgG(g/L)	15.65 ± 5.62	15.26 ± 6.22	0.7998
IgA(g/L)	3.56 ± 1.89	3.61 ± 1.86	0.9181
AMA阳性率	28/30	27/30	0.6404
M2阳性率	26/30	27/30	0.6876
M4阳性率	5/30	4/30	0.7177
M9阳性率	17/30	18/30	0.7934
ANA阳性率	11/30	13/30	0.5982

诊断标准: 参考美国肝病学会(AASLD)于2000年发表的PBC建议诊断程序^[24]。

确诊PBC, 且血清ALP和 γ -GT水平高于正常值上限的2倍(II期以上), 血清抗线粒体抗体阳性(AMA)和/或肝组织活检有PBC的特异性病变, 及肝功能异常者, 排除病毒性、药物性、酒精性肝炎及其他自身免疫性肝损害。

纳入标准: (1)首次症状发作或肝生化异常正式确诊后, 4 wk内未使用过本方案有关药物治疗者; (2)开始治疗时TBil < 51 μ mol/L (< 3 ULN), ALB > 35 g/L, B超提示无门静脉高压、腹水等肝硬化失代偿表现; (3)年龄在18-65岁之间。

排除标准: (1)合并有心、脑、肝、肾和造血系统疾病及精神病患者; (2)有感染、大量顽固性腹水等终末期并发症者; (3)依从性差及连续治疗时间不足4 wk者; (4)PBC-AIH重叠综合征、I及IV期PBC患者。

临床分期: 第I阶段: 无临床症状, 肝生化检查正常, 但AMA阳性, 大多数在病理学上已有PBC的表现; 第II阶段: 无明显临床症状, 但血清肝生化异常(如 γ -GT、ALP等升高), 临床属早期; 第III阶段: 除生化异常外, 已出现临床症状如乏力、皮肤瘙痒等, 属中期; 第IV阶段: 已出现肝功能失代偿的表现如血清胆红素升高、白蛋白降低或者伴门静脉高压等, 属晚期^[25]。

1.1.2 通胆汤: (1)组成: 瓜蒌皮、丝瓜络、橘络、青皮、明矾、生地等; (2)制剂: 由广州一方制药厂提供的单味中药免煎颗粒剂; (3)质量控制: 一方药业为国家GMP认证的高新科技产业, 所有免煎中药均由其提供。UDCA由德国福克大药厂生产, 商品名为优思弗, 250 mg/粒。

1.1.3 检测: 血清生化指标采用日本产Olympus 2700型全自动生化仪检测, 试剂由上海科华生物工程股份有限公司提供; 血清病毒学指标采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法, 试剂由上海科华生物工程股份有限公司提供; 血清自身抗体检测由深圳市中医院荧光室采用免疫荧光法检测, 试剂由德国欧蒙公司提供, 所用仪器为美国Beckman-Coulter Array 360 CE特定蛋白分析仪和日本Olympus BX60荧光显微镜。

1.2 方法

1.2.1 分组治疗: 基础治疗: (1)门诊患者: 口服复方甘草酸苷片(美能): 50 mg, 3次/d, 多烯磷脂酰胆碱胶囊(易善复): 0.456 g, 3次/d; (2)住院患者: 静滴甘草酸二铵(甘利欣)150 mg, 1次/d+硫普罗宁(凯西莱)0.3 g, 1次/d, 出院后改口服方法同门诊患者。对照组: 基础治疗+UDCA; 治疗组: 基础治疗+UDCA+通胆汤。

1.2.2 用量、方法和疗程: (1)用法、用量: 治疗组: UDCA 15-20 mg/d体质量, 3次/d, 最多每日不超过1000 mg, 温开水送服, 另外加服通胆汤; 通胆汤用法为将上述免煎中药颗粒倒入杯中, 以约200 mL开水将其充分溶解后温服, 一日1剂, 上下午各喝100 mL, 与UDCA胶囊隔开1 h服用, 中药每周只服5 d。对照组: 单用UDCA治疗, 剂量、疗程及药品生产厂家同治疗组; (2)疗程: 2组患者治疗后的4、12及24 wk时复测相应指标; 两组患者按所设计方案治疗24 wk后, 进入长期维持治疗阶段。其中治疗组患者继续服用UDCA及通胆汤治疗(每月不少于15剂), 而对照组仍继续单服用UDCA, 对部分ALT、AST仍然异常的患者继续予基础治疗, 分别于48、96及148 wk予复查2组患者的相关指标。

1.2.3 疗效观察: (1)临床症状及体征: 乏力、口干、眼干、皮肤瘙痒、肝区疼痛、纳差、腹胀、尿黄、脾大等; (2)血清生化指标: 60例患者全部测定晨起空腹时肘静脉血清TBil、ALT、AST、ALP、TBA、Alb、 γ -GT、CHOL、TG, 每份血清标本均复测; (3)血清病毒学指标: 采肘静脉血清进行ELISA, 检测患者血清甲、乙、丙、丁、戊型肝炎病毒标志, 以及抗EBV-IgM 和抗CMV-

相关报道

Lindor *et al* 研究表明UDCA可延缓患者的疾病进程, 但对症状及组织学改善无明显影响。Batts *et al* 2年的研究表明UDCA对患者的炎症及组织学改善无明显作用, 加大剂量似乎可以改善炎症。

创新盘点
本研究采取通胆汤联合UDCA治疗,重点考虑了通胆汤具有利胆和双向调节机体的整体功能作用。

IgM. 复测每份标本; (4)血清自身抗体: 采肘静脉血清进行抗线粒体抗体(AMA)、抗线粒体抗体M2亚型(M2)、抗线粒体抗体M4亚型(M4)、抗线粒体抗体M9亚型(M9)、抗核抗体(ANA)、IgM、IgG、IgA. 复测每份标本. (5)不良反应观察4、12及24 wk各查B超1次, 24 wk查甲胎蛋白(AFP)1次.

1.2.4 疗效评定: 参照邱德凯^[19]《自身免疫性肝病基础与临床》. (1)完全反应: 症状显著改善, 肝生化指标在治疗第1 mo至少改善50%, 在24 wk内AST和r-GT ALP水平持续下降到正常上限的两倍以内, 或48 wk肝生化指标恢复正常, 维持治疗时持续正常24 wk; (2)部分反应: 经过标准治疗仍未达到满意的缓解者, 这些患者的临床症状、实验室检查结果和组织学改变, 有部分改善; (3)无反应: 临床症状、实验室或组织检查恶化; (4)复发: 完全反应后, 症状重现以致需加强治疗, 并且伴血清AST和r-GT ALP水平升高.

统计学处理 对于计量资料, 2个或多个独立组间的比较采用Mann-Whitney和Kruskal-Wallis ANOVA检验, 对于计数资料, 采用卡方检验, 操作由我院DME专业人员采用SAS 6.12版统计分析软件进行统计学处理(检验水平 α 取0.05).

2 结果

2.1 治疗的反应与结局 2组患者在经过24 wk治疗与48 wk的维持治疗后, 在24 wk时, 治疗组83.3%得到完全反应, 与对照组相比有显著差异, 但48 wk时两组无差异. 两组在治疗过程中的复发皆因减量而引起, 其中对照组1例因妊娠所致复发, 恢复或加大剂量, 仍有效(表2).

2.2 临床症状 治疗组和对照组患者乏力、尿黄、纳差、厌油、皮肤瘙痒、腹胀和肝区痛等症状在4 wk均有一定程度的缓解, 其中乏力、口干眼干、皮肤瘙痒及肝区疼痛方面, 治疗组患者的常见症状阳性率低于对照组($P<0.05$), 治疗组90%以上大部分患者12 wk后症状基本消失, 而对照组30%的患者仍有一些常见临床症状存在; 在24 wk时, 对照组与治疗组相比, 尿黄现象仍有显著差异(表 3, $P<0.05$).

2.3 主要生化指标 治疗组分别在4、12及24 wk时所测ALP、GGT、ALT、AST及TB值均较上次检测前显下降, 与治疗前相比在统计学上有显著差别($P<0.05$), 其中TBA水平在治疗后4 wk却升高, 直到12 wk时TBA才开始下降(表4); TRIG在12 wk时明显降低, CHOL在24 wk时明

表 2 两组对治疗的反应及结局 ($n=30$)%

治疗的反应	时间(wk)	治疗组	对照组	P值
完全反应	24	25(83.3)	17(56.7)	0.0242
	48	28(93.3)	25(83.3)	0.2276
部分反应	24	5(16.7)	12(40.0)	0.0449
	48	2(6.9)	5(16.7)	0.2276
无反应	24	0	1(3.3)	0.3132
	48	0	0	-
任何复发	24	2(6.7)	1(3.3)	0.5536
	48	2(6.7)	3(10)	0.6404
死亡	24	0	0	-
	48	0	0	-
新发肝硬化	24	0	0	-
	48	0	0	-

显降低; 在24 wk时, 80%以上患者的主要观测生化指标除TBA外均恢复正常. 对于治疗组患者48-148 wk的随访结果显示: 患者48 wk时ALP值较24 wk时进一步下降($P<0.05$), 但GGT、ALT及AST值较前无明显变化; 48 wk时90%以上的患者ALP、GGT、ALT及AST值在正常范围, 至148 wk为止, 总体均值均在正常范围小幅度波动; 患者48 wk时所测TRIG及CHOL仅2例有轻度异常, 余均正常, 以后均值在正常范围内小幅波动; 48 wk时仅1例患者存在轻度黄疸, 余均恢复正常(表4).

对照组患者经UDCA治疗后, 在4 wk、12 wk及24 wk所测ALP、GGT、ALT及AST的值较上次检测前的数值均有明显下降, 与治疗组相比, 在4 wk、12 wk、及24 wk时所测值均高于同期治疗组所测值($P<0.05$); TB在12 wk时开始较治疗前明显下降, 48 wk时达到最低值(表4). 对于对照组随访, 48 wk时大部分对照组患者ALP、GGT、ALT及AST水平接近正常, 但仍有16.7%左右的患者未达到完全反应; 48 wk时TG及CHOL值较治疗前明显降低($P<0.05$), 在以后的随访中, 其均值在正常范围内波动.

整个过程查AFP及A1b均无明显临床意义, B超显示有2例患者脾大减小, 2例新发脾大患者, 无新发肝癌出现.

2.4 一般性免疫指标 治疗组患者IgM、IgG、IgA在96 wk时较治疗前明显降低($P<0.05$); 对照组IgG及IgA在148 wk时明显降低($P<0.05$), 在148 wk时患者IgM($P=0.0856$)亦有所下降, 但无统计学意义.

2.5 特异性免疫指标 治疗前60例患者AMA的阳性率91.7%(55/60), M2阳性率88.3%(53/60), M4

表 3 两组临床症状改善情况 (mean ± SD, $n = 30$, %)

分组	时间(wk)	常见症状及体征							
		乏力	口干眼干	皮肤瘙痒	肝区疼痛	纳差	腹胀	尿黄	脾大
治疗组	0	24(80.0)	20(66.7)	16(53.3)	15(50.0)	8(26.7)	6(20.0)	16(53.3)	4(13.3)
	4	7(23.3)	4(13.3)	4(13.3)	3(10.0)	2(6.7)	2(6.7)	3(10.0)	3(10.0)
	12	1(3.3)	1(3.3)	-	-	-	-	1(3.3)	3(10.0)
	24	-	-	-	-	-	-	-	2(6.7)
对照组	0	22(73.3)	19(63.3)	15(50.0)	14(46.7)	9(30.0)	6(20.0)	15(50.0)	3(10.0)
	4	14(46.7)	12(40.0)	11(36.7)	10(33.3)	4(13.3)	3(10.0)	5(16.7)	3(10.0)
	12	6(20.0)	6(20.0)	5(16.7)	1(6.7)	3(10.0)	2(6.7)	4(13.3)	3(10.0)
	24	3(10.0)	2(6.7)	3(10.0)	4(13.3)	3(10.0)	2(6.7)	5(16.7)	3(10.0)

应用要点
UDCA联合通胆汤治疗原发性胆汁性肝硬化, 较单用UDCA能更有效改善临床症状与生化指标。

表 4 两组患者主要生化指标功能与随访比较 (mean ± SD, $n = 30$)

分组	n	时间(wk)	生化指标							
			ALP(U/L)	GGT(U/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)	TB(μ mol/L)	TBA(μ mol/L)	TG(mmol/L)	CHOL(mmol/L)
治疗组	30	0	425.31 ± 95.52	403.25 ± 86.23	261.38 ± 119.76	277.32 ± 146.31	35.56 ± 10.15	40.34 ± 18.91	1.98 ± 1.12	6.23 ± 3.16
			433.59 ± 84.32	412.33 ± 80.23	253.62 ± 121.63	270.91 ± 143.22	34.61 ± 11.59	39.17 ± 19.61	1.83 ± 1.21	6.43 ± 3.91
对照组	30	0	256.25 ± 68.81	176.53 ± 70.32	79.21 ± 51.26	91.65 ± 53.56	23.33 ± 9.21	52.33 ± 20.19	1.51 ± 1.02	4.98 ± 2.96
			301.36 ± 91.23	249.25 ± 84.21	132.39 ± 75.31	138.67 ± 72.25	30.51 ± 11.94	63.57 ± 21.29	1.72 ± 1.22	5.98 ± 3.76
治疗组	30	4	159.37 ± 75.32	75.37 ± 42.61	37.88 ± 10.44	35.37 ± 9.36	18.11 ± 10.22	39.51 ± 15.63	1.34 ± 0.89	4.69 ± 3.09
			201.51 ± 83.36	109.37 ± 56.36	68.69 ± 30.29	60.27 ± 26.31	23.95 ± 11.60	51.55 ± 22.19	1.53 ± 1.12	5.23 ± 3.81
对照组	30	4	115.32 ± 68.63	40.31 ± 30.31	31.62 ± 8.18	29.65 ± 7.31	12.85 ± 8.87	27.12 ± 19.92	1.38 ± 0.83	4.16 ± 2.19
			151.31 ± 73.12	58.61 ± 46.31	53.34 ± 21.36	43.38 ± 16.25	21.63 ± 8.93	43.11 ± 17.92	1.55 ± 1.19	4.96 ± 3.92
治疗组	30	12	79.31 ± 49.21	32.56 ± 23.63	32.67 ± 19.36	28.69 ± 13.65	10.32 ± 7.98	25.36 ± 18.23	1.35 ± 0.69	4.46 ± 2.65
			121.26 ± 68.62	45.61 ± 36.92	49.36 ± 22.35	38.25 ± 11.26	16.32 ± 7.36	38.37 ± 21.96	1.43 ± 0.96	4.51 ± 3.05
对照组	30	12	81.37 ± 42.95	31.34 ± 20.71	33.67 ± 15.84	30.69 ± 13.54	11.39 ± 8.55	27.91 ± 17.20	1.41 ± 0.75	4.36 ± 2.71
			128.61 ± 59.54	43.18 ± 31.80	51.54 ± 21.67	43.35 ± 15.21	19.11 ± 11.65	41.65 ± 26.39	1.52 ± 1.06	4.65 ± 3.12
治疗组	30	24	85.61 ± 45.57	35.25 ± 16.67	36.20 ± 16.64	32.61 ± 14.15	12.24 ± 8.60	27.54 ± 21.55	1.36 ± 0.81	4.61 ± 2.95
			130.99 ± 62.60	46.84 ± 29.98	54.55 ± 19.83	46.94 ± 14.71	20.11 ± 10.14	43.36 ± 29.34	1.49 ± 1.31	4.46 ± 2.85
对照组	30	24	79.31 ± 49.21	32.56 ± 23.63	32.67 ± 19.36	28.69 ± 13.65	10.32 ± 7.98	25.36 ± 18.23	1.35 ± 0.69	4.46 ± 2.65
			121.26 ± 68.62	45.61 ± 36.92	49.36 ± 22.35	38.25 ± 11.26	16.32 ± 7.36	38.37 ± 21.96	1.43 ± 0.96	4.51 ± 3.05
治疗组	30	48	81.37 ± 42.95	31.34 ± 20.71	33.67 ± 15.84	30.69 ± 13.54	11.39 ± 8.55	27.91 ± 17.20	1.41 ± 0.75	4.36 ± 2.71
			128.61 ± 59.54	43.18 ± 31.80	51.54 ± 21.67	43.35 ± 15.21	19.11 ± 11.65	41.65 ± 26.39	1.52 ± 1.06	4.65 ± 3.12
对照组	30	48	81.37 ± 42.95	31.34 ± 20.71	33.67 ± 15.84	30.69 ± 13.54	11.39 ± 8.55	27.91 ± 17.20	1.41 ± 0.75	4.36 ± 2.71
			128.61 ± 59.54	43.18 ± 31.80	51.54 ± 21.67	43.35 ± 15.21	19.11 ± 11.65	41.65 ± 26.39	1.52 ± 1.06	4.65 ± 3.12
治疗组	27	96	81.37 ± 42.95	31.34 ± 20.71	33.67 ± 15.84	30.69 ± 13.54	11.39 ± 8.55	27.91 ± 17.20	1.41 ± 0.75	4.36 ± 2.71
			128.61 ± 59.54	43.18 ± 31.80	51.54 ± 21.67	43.35 ± 15.21	19.11 ± 11.65	41.65 ± 26.39	1.52 ± 1.06	4.65 ± 3.12
对照组	28	96	81.37 ± 42.95	31.34 ± 20.71	33.67 ± 15.84	30.69 ± 13.54	11.39 ± 8.55	27.91 ± 17.20	1.41 ± 0.75	4.36 ± 2.71
			128.61 ± 59.54	43.18 ± 31.80	51.54 ± 21.67	43.35 ± 15.21	19.11 ± 11.65	41.65 ± 26.39	1.52 ± 1.06	4.65 ± 3.12
治疗组	25	148	85.61 ± 45.57	35.25 ± 16.67	36.20 ± 16.64	32.61 ± 14.15	12.24 ± 8.60	27.54 ± 21.55	1.36 ± 0.81	4.61 ± 2.95
			130.99 ± 62.60	46.84 ± 29.98	54.55 ± 19.83	46.94 ± 14.71	20.11 ± 10.14	43.36 ± 29.34	1.49 ± 1.31	4.46 ± 2.85
对照组	25	148	85.61 ± 45.57	35.25 ± 16.67	36.20 ± 16.64	32.61 ± 14.15	12.24 ± 8.60	27.54 ± 21.55	1.36 ± 0.81	4.61 ± 2.95
			130.99 ± 62.60	46.84 ± 29.98	54.55 ± 19.83	46.94 ± 14.71	20.11 ± 10.14	43.36 ± 29.34	1.49 ± 1.31	4.46 ± 2.85

阳性率15%(9/60), M9阳性率58.3%(35/60), 经过24 wk的治疗, 以及148 wk的维持治疗随访, 两组患者AMA、M2阳性4例阴转, 其中治疗组3例, 对照组1例, 有5例患者M2阳性转为弱阳性, 其中治疗组3例, 对照组2例; M4治疗组有1例转

阴, 1例转为弱阳性, 对照组仅1例转为弱阳性, M9治疗组有6例转阴, 1例转为弱阳性, 对照组仅3例转阴, 1例转为弱阳性, ANA有6例转阴, 其中治疗组4例, 对照组2例, 上述皆无统计学意义($P > 0.05$, 表5).

同行评价
本研究设计合理, 概念清楚, 统计学处理正确, 具有较好的临床参考价值.

表 5 两组主要免疫指标与随访比较 (mean ± SD)

分组	n	时间 (wk)	免疫指标							
			IgM(g/L)	IgG(g/L)	IgA(g/L)	AMA阳性(n)	M2阳性(n)	M4阳性(n)	M9阳性(n)	ANA阳性(n)
治疗组	30	0	2.98 ± 1.76	15.65 ± 5.62	3.56 ± 1.89	28	26	5	17	11
对照组	30	0	2.89 ± 2.01	15.26 ± 6.22	3.61 ± 1.86	27	27	4	18	13
治疗组	30	48	2.49 ± 1.96	13.68 ± 5.98	2.95 ± 2.02	27	25	5	16	10
对照组	30	48	2.56 ± 1.92	14.05 ± 6.32	3.11 ± 2.03	27	27	4	18	13
治疗组	27	96	1.93 ± 1.71	10.25 ± 6.23	1.86 ± 1.72	23	22	3	13	8
对照组	28	96	2.16 ± 1.81	12.45 ± 5.98	2.78 ± 2.12	25	25	4	15	11
治疗组	25	148	1.53 ± 1.26	11.16 ± 5.11	1.96 ± 1.51	21	20	3	9	6
对照组	25	148	1.88 ± 1.78	11.26 ± 5.63	2.28 ± 2.09	22	23	3	13	9

表 6 两组不良反应 (n = 30)

	治疗组	对照组
腹泻	6	2
皮肤瘙痒	3	5
关节疼痛	0	0
腹痛	3	1
心悸	1	1
头晕头痛	1	1
呼吸道症状	0	0
TBA升高	15	17

2.6 主要不良反应 最常见的不良事件为TBA升高, 腹泻及瘙痒, 总共有32例患者出现TBA升高 (升高值>2倍上限值), 8例患者出现腹泻, 8例患者出现瘙痒(表6).

3 讨论

本研究中, 所有患者组织学皆证实为II-III期的PBC. 其主要的病理表现为肝内胆汁淤积, 肝内胆汁淤积是指肝细胞和胆管细胞对胆汁摄取、转运和排泄功能障碍, 以致胆汁成分(如胆汁酸、胆红素、胆固醇)在血液中滞留, 肝内胆汁淤积一开始即可有血清ALP、 γ -GT及胆固醇水平的升高, 而黄疸发生相对缓慢, 所以早中期患者可黄疸很轻或无黄疸, 一般黄疸指数在正常值3 ULN以下; 大多数患者的血清ALT和AST水平中度升高, 一般在正常值上限3-10 ULN, 而患者血清ALP和GGT水平却明显升高在正常值上限的3-12 ULN左右.

PBC患者的胆汁淤积可以导致血清CHOL明显升高, 但本研究对60例患者的CHOL及TG进行分析, 约有35%的患者这2项指标存在不同程度的升高, 与国外一些文献提到的85%的PBC患者合并高脂血症^[26]有一定的不同, 这可能和我

国患者肥胖率及高脂血症发病率低于国外有关, 且国内不同地区也会因为人群的体质、工作及生活不同而导致基础血脂水平的差异^[27]; 同时可能与我们选择早中期的病例有关^[19].

PBC以中年妇女为主, 免疫学指标治疗前AMA阳性率为91.7%, M2阳性率为88.3%, M9阳性率为58%, 而M4阳性较低15%, 这些基本资料除M4及M9以外, 其与近年报道^[28-30]相符一致. 目前已发现线粒体膜上存在9种自身抗原(M1-M9), 与PBC有关的包括M2、M4、M8、M9, 其中以AMA-M2诊断PBC的特异性最高. M2、M4、M8、M9可能与病情轻重程度及早晚期分期有关^[31]. 一般认为M9可能是反映早期PBC的一项指标, 预示转归良好, M4阳性往往多见于PBC严重类型^[32], 本研究资料选择早中期病例, 所以M4率低符合目前的认识水平.

从我们收治的PBC患者观察的结果发现, 早期PBC患者按中医辨证, 大多属肝胆湿热证, 并夹有阴虚、血瘀、脾虚等证; 病机属本虚标实, 本虚以肝肾阴虚为主, 标实以肝胆湿热为主, 并夹气郁、血瘀等. 为此, 我们在全中国名老中医朱良春治疗慢性胆囊炎胆石症的经验基础上^[33], 结合我科长期的临床观察, 初步摸索出以行气疏肝化湿为主, 佐以滋阴健脾、化瘀利湿、清热祛风之法, 采取通胆汤联合UDCA治疗, 疗效良好.

通胆汤由瓜蒌皮、丝瓜络、橘络、青皮、明矾、生地等组成基本方, 功能疏肝利胆、化瘀利湿, 滋阴养肝. 方中瓜蒌皮性甘寒, 有润肺化痰、利气宽胸之功; 丝瓜络性甘平, 有祛风通络、化痰散结之功, 与瓜蒌皮合用, 再予青皮以行气引经, 疏肝利胆之功更著; 橘络味辛微苦, 有理气化痰之功; 早在《金匱要略》中就有硝石矾石散方以治女劳疸兼瘀血证, 而且《医门法律》中也提到了明矾可治黄疸, 故配明矾入

气分以化湿兼活血; 生地可滋养肝肾之阴以固本. 本方配伍精当, 契合PBC肝胆湿热为主, 夹有阴虚、血瘀之病机, 从肝胆入手, 双向调节机体的整体功能因而取得良效.

在本研究中, 通胆汤联合UDCA治疗早中期患者, 明显的缩短了完全反应时间, 治疗组24 wk, 有25例(83.3%)完全反应, 对照组只有17例(56.7%, $P<0.05$). 两组患者皆因减量、中药停药或其他如妊娠等出现复发, 继用仍可缓解. 所以PBC维持治疗期间, 是否需要UDCA减量, 甚至停药, 通过以上3年资料显示, 减量与停药可能导致复发. 另外有两例复发是, 24 wk时停用美能等保肝降酶后出现复发, 美能为甘草酸制剂, 有稳定肝细胞膜与类固醇样的作用, 突然停药有反弹作用, 因此当PBC的联合美能类保肝药治疗时, 需注意逐渐减量撤药, 或长期维持.

UDCA可以有效的改善患者的胆汁淤积指标及转氨酶, 经过4 wk的治疗, ALP、GGT值即较治疗前有所降低, 随着胆汁淤积状况的改变, 肝脏炎症的缓解, 患者的ALT、AST亦开始好转, 这也可能和部分转氨酶较高患者加用基础治疗有关, 患者经UDCA治疗12 wk时, TB值较治疗前明显降低($P<0.05$), 在随访当中, 大部分患者可以保持TB值在正常范围内小幅度波动. 治疗组由于加用了通胆汤, 患者在降低胆汁淤积指标值及转氨酶的速度、程度及这些指标的维持上均明显优于单用UDCA, 胆红素的降低及控制方面亦明显优于对照组($P<0.05$).

在临床症状的改善上, 治疗组和对照组患者乏力、尿黄、纳差、厌油、皮肤瘙痒、腹胀、肝区痛等症状在4 wk均有一定程度的缓解, 在乏力、口干眼干、皮肤瘙痒及肝区疼痛方面, 治疗组患者的常见症状阳性率低于对照组($P<0.05$), 治疗组90%以上患者12 wk后症状基本消失, 而对照组有30%的患者仍有一些常见临床症状存在.

本研究中, 患者免疫球蛋白升高者占61.7%, 免疫蛋白升高患者以IgM升高为主达80%, 但一般高值都在上限的2倍左右, IgG也有40%的患者升高, IgA也有20%患者升高, 其中有部分患者免疫球蛋白是同时升高的. 经过治疗后, 观测两组患者免疫指标均有所改善, 特别是治疗组在改善免疫指标速度及程度上明显优于对照组($P<0.05$). 在3年的随访当中, 个别患者出现AMA及M2亚型转阴及M9的转阴, 并有统计学意义.

胆汁酸是胆固醇在肝脏分解代谢的产

物, 是胆汁中的主要成分, 各种肝脏疾病导致肝脏摄取、合成与排泄功能受损, 均可能引起血清总胆汁酸升高^[34], 国内有文献报道TBA结果与ALT、AST、GGT测定结果高度相关($r = 0.994, 0.834, P$ 均 <0.01)^[35].

本研究中, 两组患者治疗前TBA均值均在正常上限4倍以上, 随着ALT、AST、GGT及ALP值的降低, TBA的值应该下降, 但统计结果显示TBA在前12 wk内两组中50%以上的患者均有不同程度的升高(具体见不良反应), 甚至出现瘙痒症状; 患者前12 wk时, 血中TBA水平维持在较高水平, 可能是由于给予UDCA外源性的胆汁酸时, 肝脏对胆汁的摄取与排泄功能较差, 从而导致血胆汁酸升高或维持高水平, 但随着病情的改善, 肝脏在转运TBA功能逐渐恢复所致. 不良反应包括腹泻的发生率在13%左右, 在整个治疗过程中没有新发肝癌出现, 对照组有2例新发脾大.

总之, UDCA能起到很好的缓解早中期PBC患者病情作用, 这与国外大样本长期随访研究的结果基本一致. 加用中药通胆方, 可以明显缩短UDCA完全反应的时间, 改善症状与提高生化指标复常率. 因此可以认为通胆汤对UDCA有一定的增效作用. 由于本研究随访的时间较短, 我们3年数据显示, 采用UDCA合通胆汤治疗仍需要维持治疗, 目前尚没有明确的疗程, 因而任何对PBC治疗的评估还需要建立长期随访.

4 参考文献

- 1 Charatcharoenwitthaya P, Lindor KD. Current concepts in the pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *Ann Hepatol* 2005; 4: 161-175
- 2 Leuschner U. Primary biliary cirrhosis--presentation and diagnosis. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 741-758
- 3 Dahlan Y, Smith L, Simmonds D, Jewell LD, Wanless I, Heathcote EJ, Bain VG. Pediatric-onset primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 2003; 125: 1476-1479
- 4 Kumagi T, Heathcote EJ. Primary biliary cirrhosis. *Orphanet J Rare Dis* 2008; 3: 1
- 5 Leung PS, Coppel RL, Gershwin ME. Etiology of primary biliary cirrhosis: the search for the culprit. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 327-336
- 6 姚光弼. 中国人原发性胆汁性肝硬化的前瞻性研究. *肝脏* 2002; 7: 146-149
- 7 张福奎, 贾继东, 王宝恩, 钱林学, 尹珊珊, 王宇, 崔焱, 尤红, 马红, 王惠吉, 张长淮. 45例原发性胆汁性肝硬化的临床特征. *中华内科杂志* 2002; 41: 163-167
- 8 房静远. 原发性胆汁性肝硬化的熊去氧胆酸治疗. *肝脏* 2002; 7: 116-117
- 9 施健, 刘苏, 陈伟忠, 曾欣, 陈岳祥, 杨秀疆, 谢渭芬. 中等剂量熊去氧胆酸治疗原发性胆汁性肝硬化的系统评价. *中华消化杂志* 2005; 25: 355-358
- 10 Pares A, Rodes J. Treatment of primary biliary cirrhosis. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2000; 46: 165-174
- 11 Poupon RE, Balkau B, Eschwege E, Poupon R. A

- multicenter, controlled trial of ursodiol for the treatment of primary biliary cirrhosis. UDCA-PBC Study Group. *N Engl J Med* 1991; 324: 1548-1554
- 12 Heathcote EJ, Cauch-Dudek K, Walker V, Bailey RJ, Blendis LM, Ghent CN, Michieletti P, Minuk GY, Pappas SC, Scully LJ. The Canadian Multicenter Double-blind Randomized Controlled Trial of ursodeoxycholic acid in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 1994; 19: 1149-1156
- 13 Lindor KD, Dickson ER, Baldus WP, Jorgensen RA, Ludwig J, Murtaugh PA, Harrison JM, Wiesner RH, Anderson ML, Lange SM. Ursodeoxycholic acid in the treatment of primary biliary cirrhosis. *Gastroenterology* 1994; 106: 1284-1290
- 14 Batts KP, Jorgensen RA, Dickson ER, Lindor KD. Effects of ursodeoxycholic acid on hepatic inflammation and histological stage in patients with primary biliary cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 2314-2317
- 15 Goulis J, Leandro G, Burroughs AK. Randomised controlled trials of ursodeoxycholic-acid therapy for primary biliary cirrhosis: a meta-analysis. *Lancet* 1999; 354: 1053-1060
- 16 Poupon RE, Lindor KD, Pares A, Chazouilleres O, Poupon R, Heathcote EJ. Combined analysis of the effect of treatment with ursodeoxycholic acid on histologic progression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 39: 12-16
- 17 ter Borg PC, Schalm SW, Hansen BE, van Buuren HR. Prognosis of ursodeoxycholic Acid-treated patients with primary biliary cirrhosis. Results of a 10-yr cohort study involving 297 patients. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2044-2050
- 18 Ludwig J, Dickson ER, McDonald GS. Staging of chronic nonsuppurative destructive cholangitis (syndrome of primary biliary cirrhosis). *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1978; 379: 103-112
- 19 邱德凯, 马雄. 自身免疫性肝病基础与临床. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 110-111, 191-192
- 20 蒋健, 何森. 原发性胆汁性肝硬化的中医证候特点及疗效分析. 上海中医药大学学报 2003; 17: 16-17
- 21 苏经格. 原发性胆汁性肝硬化30例中医临床分析. 中国医药学报 2003; 18: 444-446
- 22 常廷民, 韩宇, 杨承汉. 复方甘草酸苷联合茵栀黄治疗原发性胆汁性肝硬化临床分析. 中国药物与临床 2005; 5: 800
- 23 李林, 钟德珍, 钟德雄. 中西医结合诊治胆汁性肝硬化32例临床观察. 北京中医 2002; 21: 287-288
- 24 Heathcote EJ. Management of primary biliary cirrhosis. The American Association for the Study of Liver Diseases practice guidelines. *Hepatology* 2000; 31: 1005-1013
- 25 王宝恩, 张定凤. 现代肝脏病学. 第1版. 北京: 科学出版社, 2003: 365-369
- 26 陆伦根, 曾民德. 胆汁淤积性肝病. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 171
- 27 张庆军, 祝淑珍. 我国血脂异常流行病学特征及控制策略. 公共卫生与预防医学 2006; 17: 1
- 28 姚定康, 朱樑, 赵鹏, 谢渭芬, 仲人前, 邓安梅. 原发性胆汁性肝硬化161例临床分析. 中华内科杂志 2007; 46: 398-399
- 29 陈国凤, 李莉, 高君, 李梵, 李冰. 原发性胆汁性肝硬化153例分析. 中华医学杂志 2002; 82: 1625-1628
- 30 Klein R, Pointner H, Zilly W, Glassner-Bittner B, Breuer N, Garbe W, Fintelmann V, Kalk JF, Muting D, Fischer R, Tittor W, Pausch J, Maier KP, Berg PA. Antimitochondrial antibody profiles in primary biliary cirrhosis distinguish at early stages between a benign and a progressive course: a prospective study on 200 patients followed for 10 years. *Liver* 1997; 17: 119-128
- 31 Klein R, Huizenga JR, Gips CH, Berg PA. Antimitochondrial antibody profiles in patients with primary biliary cirrhosis before orthotopic liver transplantation and titres of antimitochondrial antibody-subtypes after transplantation. *J Hepatol* 1994; 20: 181-189
- 32 韩玉坤, 魏振满, 陈菊梅, 张小峰, 杨斌. 原发性胆汁性肝硬化临床表现及自身抗体和血清学诊断意义. 胃肠病学和肝病学杂志 2004; 13: 514-516
- 33 单书键, 陈子华. 古今名医临证金鉴黄疸胁痛腹胀卷(上下卷). 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 1999: 329
- 34 杨旭, 雷建华, 张永红, 唐晓鹏, 郑煜煌, 陈军. 血清总胆汁酸测定的意义及其局限性. 中华内科杂志 2001; 40: 16-18
- 35 欧阳良, 彭可君. 肝胆疾病患者血清总胆汁酸的检测. 临床检验杂志 2004; 22: 411

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志作者署名要求

本刊讯 本刊论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格). 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 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. (常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

胰腺癌组织Survivin的表达与细胞凋亡、增殖的关系

倪金良, 陈晓星, 张国新, 郝波, 施瑞华, 王学浩

倪金良, 陈晓星, 张国新, 郝波, 施瑞华, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

王学浩, 南京医科大学第一附属医院肝胆外科 江苏省南京市 210029

倪金良, 2004年上海第二医科大学(上海交通大学医学院)博士, 副主任医师, 主要从事胰腺疾病和消化系统恶性肿瘤的基础和临床研究。

作者贡献分布: 此课题由陈晓星和王学浩设计; 研究过程由陈晓星、倪金良、张国新及郝波完成; 所用试剂及分析工具由施瑞华提供; 数据分析由倪金良完成; 本论文写作由陈晓星和倪金良完成。

通讯作者: 陈晓星, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科. chen_xxnj@163.com

电话: 025-83718836-6542

收稿日期: 2007-11-29 修回日期: 2008-03-18

Relationship between Survivin expression and indexes of cell apoptosis and proliferation in pancreatic carcinoma

Jin-Liang Ni, Xiao-Xing Chen, Guo-Xin Zhang, Bo Hao, Rui-Hua Shi, Xue-Hao Wang

Jin-Liang Ni, Xiao-Xing Chen, Guo-Xin Zhang, Bo Hao, Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Xue-Hao Wang, Department of Liver Transplantation, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Xiao-Xing Chen, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, 300 Guangzhou Road, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. chen_xxnj@163.com

Received: 2007-11-29 Revised: 2008-03-18

Abstract

AIM: To investigate the relationship between survivin expression and the indexes of apoptosis and proliferation in pancreatic carcinoma tissues.

METHODS: Sixty-four pairs of pancreatic carcinoma and cancer-adjacent tissues were included in this study. TUNEL method was used to measure the cell apoptosis index, and immunohistochemistry was used to detect ki-67 expression (standing for the cell proliferation index) and Survivin expression. The relations of apoptosis index and proliferation index with Survivin expression and pathological features were analyzed.

RESULTS: The apoptosis index had no correlation

with the age and gender of patients and tumor location, increased with the elevation of carcinoma differentiated degrees, and was markedly higher in cancer-adjacent tissues than that in cancer tissues (30.47% vs 1.64%, $P < 0.001$). The proliferation index had no correlation with the age and sex of patients, tumor location and lymphatic metastases, increased with the reduction of carcinoma differentiated degrees. From the view of differentiation, Survivin expression was negatively correlated with the apoptosis index ($r = -0.85$), but positively correlated with the proliferation index ($r = 0.87$) in pancreatic carcinoma tissues. From the view of metastases, the apoptosis index was negatively correlated with Survivin expression ($r = -0.81$).

CONCLUSION: Survivin gene plays an important role in the pathogenesis and development of pancreatic carcinoma.

Key Words: Pancreatic carcinoma; Survivin; Ki-67; Apoptosis index; Proliferation index; Immunohistochemistry; TUNEL method

Ni JL, Chen XX, Zhang GX, Hao B, Shi RH, Wang XH. Relationship between Survivin expression and indexes of cell apoptosis and proliferation in pancreatic carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1425-1429

摘要

目的: 观察胰腺癌组织Survivin的表达与细胞凋亡、增殖的关系。

方法: 采用TUNEL法和免疫组化法检测64例胰腺癌及癌旁组织的细胞凋亡指数(AI)与增殖指数(PI)及Survivin表达, 分析AI、PI与Survivin表达和临床病理因素的相关性。

结果: Survivin蛋白在癌旁组织无表达, 在胰腺癌组织阳性率为87.9%, 两者比较差异显著($P < 0.001$)。AI与年龄、性别及肿瘤部位无关, 随胰腺癌组织分化程度的增加而增加, 癌旁组织显著高于胰腺癌组织(30.47% vs 1.64%, $P < 0.001$); PI与年龄、性别、肿瘤部位及淋巴结转移无关, 而与癌组织的分化程度相关, 随着胰腺癌分化程度的降低而增加。从分化程

背景资料

Survivin是1997年耶鲁大学Altieri实验室利用效应细胞蛋白酶受体(EPR-1)cDNA筛选人类基因组文库获得的凋亡抑制蛋白(IAP)。Survivin是迄今已鉴定的8个IAPs家族成员中分子量(16.5 kDa)最小和最具有基础与临床意义而倍受关注的分子。现在一般都认为Survivin在胰腺癌组织中呈高表达, 并与胰腺癌的分化程度、分期、淋巴结转移等生物学行为和临床特征有关, 对胰腺癌的诊断和预后判断有价值。

同行评议者

吴泰璜, 教授, 山东省立医院肝胆外科; 吴河水, 教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科

研发前沿
Survivin是目前所知最强的凋亡抑制基因之一,其表达水平与某些恶性肿瘤的凋亡水平呈负相关,但在胰腺癌细胞中的研究较少。

度观察,胰腺癌组织AI与Survivin表达水平呈负相关($r = -0.85$),PI与Survivin表达水平呈正相关($r = 0.87$);从有无转移来看,胰腺癌AI与Survivin表达水平呈负相关($r = -0.81$)。

结论:Survivin凋亡抑制基因在胰腺癌发生和发展中起重要作用。

关键词:胰腺癌;Survivin;Ki-67;凋亡指数;增殖指数;癌旁组织;免疫组化;TUNEL法

倪金良,陈晓星,张国新,郝波,施瑞华,王学浩.胰腺癌组织Survivin的表达与细胞凋亡、增殖的关系.世界华人消化杂志2008;16(13):1425-1429
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1425.asp>

0 引言

Survivin是1997年耶鲁大学Altieri^[1]实验室利用效应细胞蛋白酶受体(effector cell protease receptor 1, EPR-1)cDNA筛选人类基因组文库获得的凋亡抑制蛋白(inhibitory of apoptosis protein, IAP)。Survivin是迄今已鉴定的8个IAPs家族成员中分子质量(16.5 kDa)最小和最具有基础与临床意义而倍受关注的分子。Survivin除了能以特征性的结构直接或间接抑制Caspase依赖或Caspase非依赖的凋亡途径之外,更重要的是他表达的特异性与功能的多样性。Survivin在几乎所有的人类肿瘤中高表达,在正常终末分化的成年组织或细胞中不表达^[1-2]。现在一般都认为Survivin在胰腺癌组织中呈高表达,并与胰腺癌的分化程度、分期、淋巴结转移等生物学行为和临床特征有关,对胰腺癌的诊断和预后判断有价值^[2-5]。

因为Survivin是目前所知最强的凋亡抑制基因之一,因此Survivin表达水平与某些恶性肿瘤的凋亡水平呈负相关,但是在胰腺癌细胞中Survivin与细胞凋亡水平之间的关系研究较少^[6-8]。本研究通过标记胰腺癌组织Ki-67基因及应用TUNEL法测定的凋亡指数比较了胰腺癌组织中增殖指数(PI)与凋亡指数(AI)的水平、二者与Survivin的关系,并探讨胰腺癌细胞凋亡水平与肿瘤临床特征之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 64例胰腺导管细胞癌手术切除的石蜡标本,均为南京医科大学第一附属医院近10年手术切除标本,均包括癌组织和癌旁组织,由本院病理科处理并诊断。抗人Survivin多抗购自Santa-Cruze公司;抗人Ki-67多抗购自长岛公司;

HRP标记通用型二抗、DAB显色液为长岛公司产品;枸橼酸盐缓冲液、PBS缓冲液为迈新公司产品;防脱片剂购自迈新公司;乙醇、苏木素、二甲苯、中性树胶均为本科实验室常备。TACS-BLUE TUNEL原位凋亡检测试剂盒购自美国R&D公司,包含:蛋白酶K, TdT标记缓冲液, TdT终止缓冲液, dNTP混合液, TdT酶, 链菌素-过氧化氢酶, TACS蓝色标记液, Mg^{2+} 溶液, 核快红溶液。其他实验仪器为本实验室常备。

1.2 方法 64例胰腺导管细胞癌组织及癌旁组织,按年龄、性别、肿瘤部位、分化程度和有无淋巴结转移等临床及生物学特征进行分析。免疫组化采用SP一步法, Survivin一抗的工作浓度为1:200。以PBS代替一抗作为空白对照。免疫组化的阳性表达程度通过计数高倍视野下1000个特定细胞的染色结果判定,染色阳性细胞为胞质或胞核内出现棕褐色深染区或颗粒样深染区。以图像扫描仪分析阳性染色区域百分比作为Survivin的表达程度,空白对照的染色灰度作为阴性对照。采用免疫组化标记胰腺癌组织的Ki-67基因, Ki-67在胰腺导管细胞癌的工作浓度为1:25,染色后计数1000个癌细胞,细胞核出现棕褐色深染为染色阳性,根据阳性染色结果的百分比计算PI。TUNEL法测定胰腺癌组织的AI,按TACS-BLUE试剂盒说明进行,染色后观察1000个癌细胞,细胞核蓝色深染为阳性细胞染色,根据阳性染色结果的百分比计算AI。以PBS代替TdT酶的步骤作为空白对照。

统计学处理 SAS统计软件处理数据, AI与PI按率的比较作方差分析, Survivin、AI与PI的相关性按Spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 胰腺癌组织和癌旁组织Survivin表达 Survivin蛋白在癌旁组织无表达,而胰腺癌组织可见大量的棕褐色深染区,阳性率为87.9%,与癌旁组织比较(图1, $P < 0.001$)。

2.2 胰腺癌组织AI和PI TUNEL染色可见空白对照组未见阳性的蓝色深染区,注意红色染色为阴性。胰腺癌组织可见数量不等的少量凋亡细胞:低分化胰腺癌见散在细胞核染成深蓝色阳性,中分化组可见较多细胞核染成深蓝色,高分化组见胰腺癌细胞蓝色深染区增加;而胰腺癌旁组织可见大量的凋亡细胞染色。由此分析得到的AI表明,胰腺癌旁组织的AI明显高于胰腺癌组织(30.47% vs 1.64%, $P < 0.001$, 图2, 表1)。64

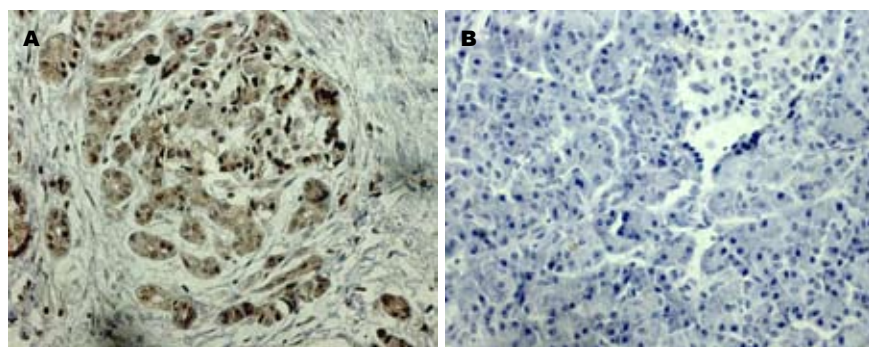


图 1 Survivin在胰腺癌和癌旁组织的表达(苏木素复染 $\times 200$). A: 胰腺导管细胞癌组织; B: 癌旁组织.

相关报道
Kawasaki *et al*报道了Survivin在结直肠癌的表达情况, 其中91例(53.2%)阳性, 癌旁正常组织均无表达.

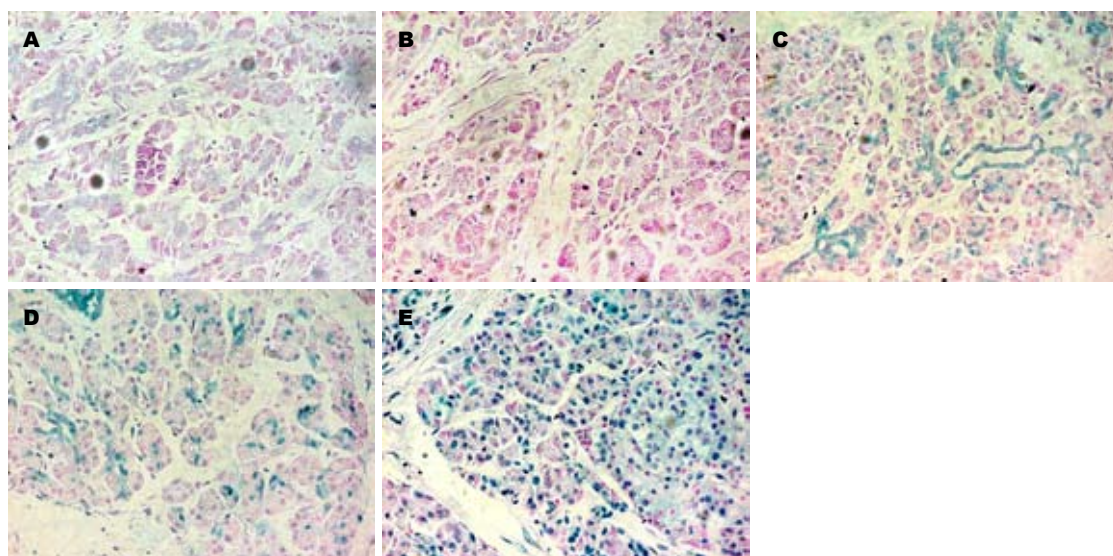


图 2 胰腺癌TUNEL染色($\times 200$). A: 空白对照; B: 低分化胰腺癌; C: 中分化胰腺癌; D: 高分化胰腺癌; E: 胰腺癌旁.

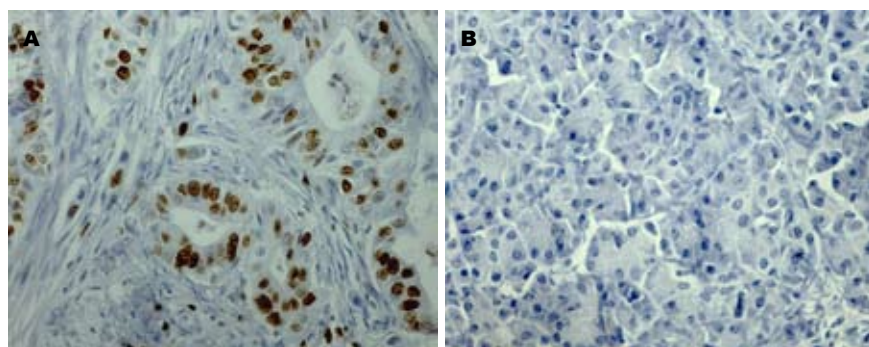


图 3 Ki-67在胰腺导管细胞癌和癌旁组织的表达(苏木素复染 $\times 200$). A: 胰腺导管细胞癌组织; B: 癌旁组织.

例胰腺癌按不同年龄、性别、部位分组, 各组之间的AI无显著差异($P>0.05$); AI与胰腺癌的分化程度和转移有关, 随着分化程度的增加, 凋亡细胞数增加, 胰腺癌细胞AI增加($P<0.01$, 图2, 表1); 有淋巴结转移组胰腺癌的AI亦低于无淋巴结转移组($P<0.01$, 表1).

Ki-67阳性染色为细胞核部位呈棕褐色深染, 阴性者为苏木素染成蓝色. Ki-67在癌旁组织中无表达, 在胰腺导管细胞癌中的表达率为94.4%, 明显高于癌旁组织($P<0.001$, 图3). 染色结果表明PI与年龄、性别、肿瘤部位及淋巴结

转移无关, 而与肿瘤分化程度有关, 随着胰腺癌分化程度的降低则PI增加($P<0.01$, 表1).

2.3 胰腺癌组织Survivin表达与AI、PI相关性 从分化程度观察, 胰腺癌组织AI与Survivin表达水平呈负相关($r = -0.85$); PI与Survivin表达水平呈正相关($r = 0.87$); 从有无转移来看, 胰腺癌AI与Survivin表达水平呈负相关($r = -0.81$, 表2).

2.4 胰腺癌组织与癌旁组织AI比较 不同年龄、性别、部位、分化程度和有无淋巴结转移组的胰腺癌, 其癌旁组织的AI无显著性差异; 而胰腺癌的癌旁组织的AI显著高于癌组织($P<0.001$).

应用要点
本研究为胰腺癌的基因治疗选择靶基因提供了初步的理论依据。

表 1 胰腺导管细胞癌组织AI和PI的检测

分组		<i>n</i>	AI(%)	PI(%)	癌旁组织AI(%)
年龄(岁)	55	35	1.52	92.3	28.7
	<55	29	1.61	95.7	27.2
性别	男	30	1.48	91.8	32.9
	女	34	1.55	96.6	31.8
分化程度	高	25	2.66	70.8	28.9
	中	17	1.28	89.7	31.5
	低	22	0.75	98.5	27.6
部位	胰头	41	1.61	94.3	29.5
	体尾部	23	1.54	92.5	32.1
淋巴结	有	33	0.69	97.9	32.7
转移	无	31	1.72	94.3	30.6

3 讨论

细胞凋亡是一种基因调控下的细胞生理性死亡过程,该过程受凋亡促进因子和凋亡抑制因子的共同调节。凋亡的主要路径有二条,即外源性和内源性路径^[1,9]。前者通过与TNF相关蛋白,如Fas、Fas-L等细胞的死亡受体结合,通过FADD激活起始Caspase-8,经效应Caspase即Caspase-3和/或Caspase-7执行凋亡作用;后者通过化疗药物、电离辐射(IR)等基因毒促使细胞线粒体释放细胞色素C,经Apaf-1激活起始Caspase-9及经Bid激活起始Caspase-8,再激活效应Caspase即Caspase-3和/或Caspase-7执行凋亡作用。可见Caspase-3(-7)是内外源性凋亡途径的共同信号途径^[9]。

IAPs是近10年来发现的抑制细胞程序性死亡的一组蛋白因子,对肿瘤的发生和耐受治疗起重要的作用^[9]。IAPs广泛存在于各种恶性肿瘤中,属于凋亡抑制因子家族,所抑制凋亡启动因子的种类比目前已知的包括**bcl-2**家族在内的所有凋亡抑制基因更多。Survivin是目前所知相对分子质量最小的IAP成员,仅由142个氨基酸和N-末端一个单独的杆状病毒凋亡抑制因子重复序列(baculoviral inhibitor of apoptosis repeat, BIR)结构域构成。Survivin具有强大的抑制凋亡的功能,能够直接抑制内外凋亡途径的共同信号分子Caspase-3和Caspase-7的活性,使Caspase-3不能有效地水解微管结构蛋白,因而维持了纺锤体的完整性,使细胞有丝分裂得以进行,同时Survivin与周期蛋白激酶cdk4、p34cdc2相互作用阻断凋亡信号转导通路这二条途径来抑制细胞凋亡。Survivin抑制Fas、Bax、Caspases及多种化疗药物诱导的凋亡,已证实

表 2 胰腺导管细胞癌组织Survivin表达与AI、PI相关性(%)

指标		<i>n</i>	Survivin表达率	AI	PI
分化程度	高	25	63.6	2.66	70.8
	中	17	71.2	1.28	89.7
	低	22	94.3	0.75	98.5
淋巴结转移	有	33	93.1	0.69	97.9
	无	31	78.6	1.72	94.3

Survivin表达阳性与凋亡抑制和肿瘤的复发呈正相关,而Survivin的高表达也与多种肿瘤对放疗和化疗的敏感性和预后呈负相关。

肿瘤组织内Survivin的表达具有普遍性,胃肠道恶性肿瘤中也存在着Survivin的高表达。Lu *et al*^[10]用免疫组化的方法分析了174例胃癌,其中60例(34.5%)呈不同程度的阳性表达,癌旁正常组织均无表达。其表达与p53和Bcl-2的表达正相关,与胃癌凋亡指数负相关。Kawasaki *et al*^[11]报道了Survivin在结直肠癌的表达情况,其中91例(53.2%)阳性,癌旁正常组织均无表达。该作者还发现Survivin在低度异常增生腺瘤、高度异常增生腺瘤和腺癌组织中的表达依次增高,凋亡指数依次降低, Ki-67标记的增殖指数和血管密度依次增高,从而认为Survivin在人类结直肠肿瘤由低恶性到高恶性的发展过程中起着重要的作用。Sato *et al*^[12]用免疫组化、RT-PCR等方法对4株胰腺癌细胞株、56例不同的胰腺病变组织标本进行了Survivin与胰腺癌关系的研究。结果表明胰腺癌阳性率为76.9%,而非癌组织均为阴性,在IPTM组织中为56.3%。近来,有学者发现胰腺导管上皮内瘤变也有Survivin少量表达,并且随着瘤变级别增高,Survivin的表达水平也逐渐增高,则提示Survivin在胰腺癌的发病早期可能也有作用,有待进一步的研究^[13]。

在胰腺癌中高表达的Survivin与凋亡指数(AI)呈负相关。提示胰腺癌早期发病和进展过程中Survivin的表达即上调,而凋亡受抑制。Sarela *et al*^[14]研究发现52例胰腺癌中Survivin的阳性率为88%, p53阳性率为54%, **bcl-2**为12%。Survivin的表达与细胞的增殖与凋亡指数均相关。多种研究结果表明, Survivin阳性时, 凋亡指数显著下降, 而凋亡指数低者其预后明显差于凋亡指数高者。Survivin表达阳性与否及对凋亡的抑制程度是评判胃肠道恶性肿瘤发展及预后的重要指标。

本研究采用TUNEL法和免疫组化观察和比较了胰腺癌和癌旁组织的AI和PI, 并与Survivin的相关性进行了比较。我们的结果表明AI与胰

腺癌的分化程度有关, 随着分化程度的降低, 胰腺癌细胞AI下降($P<0.01$); 有淋巴结转移组胰腺癌的AI亦低于无淋巴结转移组($P<0.01$). PI也与分化程度有关, 随着胰腺癌分化程度的降低则PI增加; 而胰腺癌Survivin表达与AI和PI的相关性结果提示, 从胰腺癌分化程度观察, 胰腺癌组织AI与Survivin表达水平呈负相关($r = -0.85$); PI与Survivin表达水平呈正相关($r = 0.87$); 从有无淋巴结转移观察, 胰腺癌AI与Survivin表达水平呈负相关($r = 0.81$); 各分组的胰腺癌, 其癌旁组织的AI均显著高于癌组织($P<0.001$). 以上结果进一步表明了胰腺癌Survivin与凋亡之间的密切关系, 与文献报道基本一致^[12,14]. 提示Survivin这一凋亡抑制基因在胰腺癌发生和发展中的重要作用, 也为我们研究胰腺癌的基因治疗时选择Survivin作为靶基因提供了理论依据. 已有学者研究利用反义寡核苷酸、mRNA剪切和DNA疫苗等技术, 抑制Survivin的转录与表达, 从而降低培养癌细胞的恶性表型, 甚至抑制肿瘤的生长等^[15-18], 探索Survivin的临床应用价值.

本研究TUNEL染色采用TACS-BLUE试剂盒, 阳性显色为蓝色, 而Ki-67阳性染色为棕褐色, 两者对比鲜明, 非常易于分析. 因胰腺癌旁组织几乎无Ki-67表达, 所以无法检测癌旁组织的PI. 今后可以考虑使用其他反映增殖水平的分子标志如增殖细胞核抗原(PCNA)或溴化脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)染色, 在正常组织中也有表达, 不过他们可能不具备如Ki-67与Survivin的密切关系. 不同年龄、性别、分化程度和有无淋巴结转移组的胰腺癌旁组织的AI无显著性差异, 表明胰腺癌旁组织的AI与肿瘤的临床与生物学特征无关.

4 参考文献

- 1 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997; 3: 917-921
- 2 Kami K, Doi R, Koizumi M, Toyoda E, Mori T, Ito D, Fujimoto K, Wada M, Miyatake S, Imamura M. Survivin expression is a prognostic marker in pancreatic cancer patients. *Surgery* 2004; 136: 443-448
- 3 陈晓星, 倪金良, 张国新, 郝波, 施瑞华, 王学浩. 胰腺癌组织Survivin与Ki-67的表达及其意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2650-2653
- 4 梁智勇, 刘彤华, 罗玉凤, 关健, 魏拴增, 曹金伶, 高洁, 崔全才. 存活素在胰腺癌组织中的表达. *中华病理学杂志* 2005; 34: 67-70
- 5 Jhala N, Jhala D, Vickers SM, Eltoum I, Batra SK, Manne U, Eloubeidi M, Jones JJ, Grizzle WE. Biomarkers in Diagnosis of pancreatic carcinoma in fine-needle aspirates. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 572-579
- 6 Yang L, Cao Z, Yan H, Wood WC. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer Res* 2003; 63: 6815-6824
- 7 Westphal S, Kalthoff H. Apoptosis: targets in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2003; 2: 6
- 8 Nimmanapalli R, Bhalla K. Targets in apoptosis signaling: promise of selective anticancer therapy. *Methods Mol Biol* 2003; 223: 465-483
- 9 Altieri DC. Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res* 2003; 88: 31-52
- 10 Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 1808-1812
- 11 Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5071-5074
- 12 Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 2001; 92: 271-278
- 13 Bhanot U, Heydrich R, Moller P, Hasel C. Survivin expression in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): steady increase along the developmental stages of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 754-759
- 14 Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, Davies CL, Markham AF, Guillou PJ. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 886-892
- 15 Liang Z, Wei S, Guan J, Luo Y, Gao J, Zhu H, Wu S, Liu T. DNase-mediated cleavage of survivin mRNA and inhibition of the growth of PANC-1 cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1595-1602
- 16 Zhu K, Qin H, Cha SC, Neelapu SS, Overwijk W, Lizee GA, Abbruzzese JL, Hwu P, Radvanyi L, Kwak LW, Chang DZ. Survivin DNA vaccine generated specific antitumor effects in pancreatic carcinoma and lymphoma mouse models. *Vaccine* 2007; 25: 7955-7961
- 17 王亚利, 宋天保, 王西京, 王中卫, 宋潍, 郝小静. Survivin mRNA反义寡核苷酸诱导胰腺癌细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1872-1874
- 18 Wobser M, Keikavoussi P, Kunzmann V, Weininger M, Andersen MH, Becker JC. Complete remission of liver metastasis of pancreatic cancer under vaccination with a HLA-A2 restricted peptide derived from the universal tumor antigen survivin. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1294-1298

同行评价
本文论述条理, 内容全面, 结论可靠, 国内期刊无类似文章, 是一篇较好的论著.

编辑 李军亮 电编 郭海丽

不同栓塞材料行部分性脾栓塞治疗脾功能亢进的疗效及术后反应对比

肖运平, 肖恩华, 刘惕生, 罗建光, 尚全良, 颜荣华

背景资料
部分性脾栓塞术已广泛应用于临床治疗脾功能亢进, 目前明胶海绵、真丝线段和PVA颗粒是最常用的3种栓塞剂, 如何选用安全、有效、价廉的栓塞材料及有针对性处理术后反应是临床面临的问题之一。本文基于上述问题进行回顾性研究。

肖运平, 刘惕生, 广西医科大学第五附属医院柳州市人民医院放射科 广西壮族自治区柳州市 545001
肖恩华, 罗建光, 尚全良, 颜荣华, 中南大学湘雅二医院放射科 湖南省长沙市 410011
肖运平, 硕士, 主治医师, 主要从事腹部疾病影像诊断与介入治疗。
国家自然科学基金资助项目, No. 30070235, No. 30470508
湖南省自然科学基金资助项目, No. 06JJ20081
作者贡献分布: 肖运平和肖恩华对此文所作贡献均等; 此课题设计由肖运平, 肖恩华及刘惕生完成; 研究过程由肖运平, 肖恩华, 刘惕生, 罗建光, 尚全良及颜荣华操作完成; 数据分析由肖运平, 刘惕生及颜荣华完成; 本论文写作由肖运平和肖恩华完成。
通讯作者: 肖恩华, 545001, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院放射科。cjr.xiaoenhua@vip.163.com
电话: 0731-8922242
收稿日期: 2008-01-14 修回日期: 2008-03-14

Curative effect and postoperative responses after partial splenic embolization with different embolic materials for hypersplenism: a comparative analysis

Yun-Ping Xiao, En-Hua Xiao, Ti-Sheng Liu,
Jian-Guang Luo, Quan-Liang Shang, Rong-Hua Yan

Yun-Ping Xiao, Ti-Sheng Liu, Department of Radiology, the Fifth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, People's Hospital of Liuzhou City, Liuzhou 545001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China
En-Hua Xiao, Jian-Guang Luo, Quan-Liang Shang, Rong-Hua Yan, Department of Radiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30070235, No. 30470508, and the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 06JJ20081
Correspondence to: En-Hua Xiao, Department of Radiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. cjr.xiaoenhua@vip.163.com
Received: 2008-01-14 Revised: 2008-03-14

Abstract

AIM: To evaluate the clinical value of partial splenic embolization (PSE) with different embolic materials for hypersplenism.

METHODS: Forty-three patients with hypersplenism were treated with PSE and followed up for 6 mo. According to the difference of embolic

materials in PSE, 43 patients were divided into 3 groups. Silk suture segments were used in group A ($n = 14$), while polyvinyl alcohol (PVA) particle and gelatin sponge were used in group B ($n = 13$) and C ($n = 16$), respectively. The follow-up indices included white blood cell (WBC) count, platelet (PLT) count and postoperative responses after PSE.

RESULTS: In 3 groups, WBC and PLT counts were significantly higher after PSE than those pre-embolization 1 wk, 1 mo, and 6 mo (WBC: $t_{A1wk} = 22.405$, $t_{A1mo} = 11.145$, $t_{A6mo} = 11.522$; $t_{B1wk} = 16.284$, $t_{B1mo} = 11.956$, $t_{B6mo} = 8.496$; $t_{C1wk} = 15.113$, $t_{C1mo} = 10.342$, $t_{C6mo} = 7.233$; all $P < 0.01$; PLT: $t_{A1wk} = 13.708$, $t_{A1mo} = 12.399$, $t_{A6mo} = 11.622$; $t_{B1wk} = 14.609$, $t_{B1mo} = 12.284$, $t_{B6mo} = 10.727$; $t_{C1wk} = 14.056$, $t_{C1mo} = 10.590$, $t_{C6mo} = 8.388$; all $P < 0.01$), but there was no marked difference in curative effect among the 3 groups. Abdominal pain and fever were the most frequent postoperative responses, and the occurrence rate of fever up to 38.5°C was higher in group A than that in group B or C ($\chi^2 = 6.725$, $P < 0.05$). The degree of abdominal pain was higher while the duration was longer in group B ($F = 13.783$, $P < 0.05$). Complications occurred less frequently in all the patients.

CONCLUSION: Silk suture segments, PVA and gelatin sponge can be used as the embolic materials of PSE in patients with hypersplenism, and they are proximate in curative effect and differential in postoperative responses.

Key Words: Hypersplenism; Embolization; Therapy; Embolic materials

Xiao YP, Xiao EH, Liu TS, Luo JG, Shang QL, Yan RH. Curative effect and postoperative responses after partial splenic embolization with different embolic materials for hypersplenism: a comparative analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1430-1434

摘要

目的: 探讨不同栓塞材料在部分性脾栓塞术

同行评议者
吕明德, 教授, 中山大学附属第一医院肝胆外科

(partial splenic embolization, PSE)治疗脾功能亢进(脾亢)中的临床价值。

方法: 43例脾功能亢进行PSE患者, 依据PSE术所采用的栓塞材料不同分为3组: A组14例, 栓塞材料为00000真丝线段; B组13例, 栓塞材料为300-500 μm 的聚乙烯泡沫醇(PVA)颗粒。C组16例, 栓塞材料为明胶海绵颗粒。随访观察3组外周血白细胞、血小板计数变化及术后反应。

结果: 各组术后1 wk、1 mo和6 mo内白细胞计数均较术前明显升高($t_{A1wk} = 22.405$, $t_{A1mo} = 11.145$, $t_{A6mo} = 11.522$; $t_{B1wk} = 16.248$, $t_{B1mo} = 11.956$, $t_{B6mo} = 8.496$; $t_{C1wk} = 15.113$, $t_{C1mo} = 10.342$, $t_{C6mo} = 7.233$; 均 $P < 0.01$), 血小板计数均较术前明显升高($t_{A1wk} = 13.708$, $t_{A1mo} = 12.399$, $t_{A6mo} = 11.622$; $t_{B1wk} = 14.609$, $t_{B1mo} = 12.284$, $t_{B6mo} = 10.727$; $t_{C1wk} = 14.056$, $t_{C1mo} = 10.590$, $t_{C6mo} = 8.388$; 均 $P < 0.01$), 但各组同一时间段疗效差异无显著性。PSE术后各组患者均出现不同程度的疼痛和发热, A组 38.5°C 以上发热的发生率较B、C组更高($\chi^2 = 6.725$, $P < 0.05$), B组较A、C组疼痛的程度重、持续时间长($F = 13.783$, $P < 0.05$)。3组病例严重并发症均较少。

结论: 真丝线段、PVA颗粒及明胶海绵颗粒均可作为PSE治疗脾功能亢进的栓塞材料, 三者近期临床疗效相近, 术后反应有差异。

关键词: 脾功能亢进; 栓塞; 治疗性; 栓塞材料

肖运平, 肖恩华, 刘惕生, 罗建光, 尚全良, 颜荣华. 不同栓塞材料行部分性脾栓塞治疗脾功能亢进的疗效及术后反应对比. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1430-1434
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1430.asp>

0 引言

部分性脾栓塞术(partial splenic embolization, PSE)是指选择性插管至脾动脉, 注入栓塞物质造成部分性脾梗塞, 获得“部分性脾切除术”的效果。该方法创伤性小、效果好、并发症低, 在改善脾功能亢进(脾亢)所致血细胞异常同时, 又保留了脾脏的免疫功能和贮血功能, 已逐步取代传统的脾切除术而广泛应用于临床中。本文报道43例脾亢患者, 对比分析真丝线段、聚乙烯泡沫醇(polyvinyl alcohol, PVA)及明胶海绵颗粒作为栓塞材料在PSE中的临床疗效及术后反应。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2003-01/2007-02中南大学湘雅二

医院及广西柳州市人民医院43例肝硬化伴脾功能亢进患者, 其中男38例, 女5例; 年龄29-72(平均43.5)岁。Child分级A级22例, B级18例, C级3例。本组病例不包括血清总胆红素 $>81.4 \mu\text{mol/L}$ 及严重感染的终末期肝癌伴肝硬化患者; 对于大量腹水患者, 术前需经积极的支持治疗使腹水降至中至低量。有上消化道出血史7例, 有牙龈及皮下出血史8例, 所有病例根据PSE使用不同栓塞材料分组, A组14例, 栓塞材料为长约1 cm的00000真丝线段; B组13例, 栓塞材料为300-500 μm 的PVA颗粒; C组16例, 栓塞材料为经高压消毒、抗生素浸泡大小约1 mm \times 1 mm \times 1 mm的明胶海绵颗粒。两组性别、年龄、Child分级及术前白细胞及血小板水平无显著性差异, 具有可比性。

1.2 方法 43例患者术前3 d po常规剂量抗生素及肠道清洁准备, 所有患者均行1次PSE。采用Seldinger技术用脾管超选择性插管至脾动脉主干远端, 避开胰背动脉和胃短动脉进行栓塞。栓塞前均经导管注入地塞米松10 mg, 然后采用低压漂流法技术缓慢注入混有造影剂的栓塞剂, 根据脾动脉主干血流速度变化及栓后造影时外周脾动脉分支的栓塞情况来控制栓塞范围。栓塞范围视脾脏大小、脾亢程度及肝功能状况而定, 一般控制在50%-70%之间, 3组栓塞范围无统计学差异。术后应有地塞米松(10 mg/d)3 d, 注射广谱抗生素3-7 d。分别于术前及术后1 wk和1 mo观察外周血WBC、PLT的计数变化。观察PSE术后反应及并发症发生情况, 术后疼痛评估根据主诉疼痛分级法(VRS)来分级, 0度: 无痛, I度: 轻度, 可耐受, 不影响睡眠, 可正常生活。II度: 中度, 疼痛明显, 睡眠受干扰, 需用一般止痛、镇静、安眠药。III度: 重度疼痛剧烈, 伴有自主神经功能紊乱, 睡眠严重受干扰, 需用麻醉性药物。

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件处理。包括单因素方差分析、配对 t 检验、 χ^2 检验等。

2 结果

原有上消化道出血、牙龈及皮下出血等症状多消失, 有腹水者术后近期腹水多减少。

PSE术后1 wk、1 mo及6 mo 3组外周血WBC及PLT变化见表1。各组术后1 wk、1 mo、6 mo内WBC计数均较术前明显升高($t_{A1wk} = 22.405$, $t_{A1mo} = 11.145$, $t_{A6mo} = 11.522$; $t_{B1wk} = 16.284$, $t_{B1mo} = 11.956$, $t_{B6mo} = 8.496$; $t_{C1wk} =$

研发前沿
新型栓塞剂的选择及临床应用一直是临床研究的热点, 如何选用和研制更安全、更有效的栓塞剂是脾栓研究的重要内容, 特别在如何提高远期疗效及预防严重并发症等方面是今后亟待解决的问题。

相关报道

目前,有关脾栓的研究在新型栓塞剂的应用、栓塞面积的控制及栓塞的技术等方面的文献较多,如应用海藻胶微球作为栓塞剂,应用微导管技术进行超选择性栓塞,在临床中进行了有益尝试,并取得较好的效果。

表 1 不同栓塞材料PSE前后外周血WBC和PLT计数变化 (mean \pm SD, $\times 10^9$)

观察时间	WBC计数			PLT计数		
	A组	B组	C组	A组	B组	C组
术前	2.87 \pm 0.49	2.66 \pm 0.51	2.73 \pm 0.47	44.11 \pm 11.01	49.58 \pm 9.79	51.60 \pm 12.98
术后						
1 wk	10.15 \pm 1.26	11.42 \pm 1.92	10.68 \pm 2.08	156.05 \pm 27.10	167.24 \pm 30.86	148.07 \pm 23.50
1 mo	6.53 \pm 0.98	7.21 \pm 1.24	6.92 \pm 1.49	109.21 \pm 13.85	120.38 \pm 20.82	115.13 \pm 16.08
6 mo	5.38 \pm 0.80	5.69 \pm 1.04	5.05 \pm 1.12	99.14 \pm 12.73	103.54 \pm 18.81	96.06 \pm 12.69

表 2 不同栓塞材料PSE术后疼痛比较 (mean \pm SD)

分组	疼痛严重程度n(%)			中重度疼痛持续时间(d)
	轻度	中度	重度	
A组	4(28.6)	8(57.1)	2(14.3)	4.26 \pm 1.23
B组	1(7.7)	7(53.8)	5(38.5)	9.21 \pm 2.27
C组	3(18.7)	9(56.3)	4(25.0)	6.52 \pm 1.93

15.113, $t_{C1mo} = 10.342$, $t_{C6mo} = 7.233$; 均 $P < 0.01$), PLT计数均较术前明显升高($t_{A1wk} = 13.708$, $t_{A1mo} = 12.399$, $t_{A6mo} = 11.622$; $t_{B1wk} = 14.609$, $t_{B1mo} = 12.284$, $t_{B6mo} = 10.727$; $t_{C1wk} = 14.056$, $t_{C1mo} = 10.590$, $t_{C6mo} = 8.388$; 均 $P < 0.01$), 但同一时间各组间差异WBC计数均无显著性($F = 0.624$ 、 1.694 、 0.958 、 1.485 , 均 $P > 0.05$), 同一时间各组间差异PLT计数均无显著性($F = 1.669$ 、 1.805 、 1.458 、 0.916 , 均 $P > 0.05$); 文献报道^[1-2], 脾栓前后红细胞及免疫功能无明显变化, 所以本组未作统计。

各组所有患者均出现不同程度的疼痛和发热, 体温在37.5℃-39.4℃间, 经对症治疗可缓解。术后各组患者疼痛情况见表2, B组较A、C组疼痛的程度重、持续时间长($F = 13.783$, $P < 0.05$)。各组患者术后发热在38.5℃以上者22例(51.2%), 其中A组11例(78.6%), B组4例(30.8%), C组7例(43.8%); A组38.5℃以上发热的发生率较B、C组更高($\chi^2 = 6.725$, $P < 0.05$)。3组患者术后1 mo内发生较严重并发症A、B组各1例, 分别为上消化道出血1例, 脾脓肿1例; C组2例, 为急性胰腺炎1例, 肝昏迷1例, 3组发生严重并发症无显著性差别($\chi^2 = 0.303$, $P > 0.05$)。

3 讨论

脾脏是人体的重要储血器官, 并且具有吞噬和破坏血细胞的功能。肝硬化门脉高压时, 由于大量的血细胞在肿大的脾脏中停留而被巨噬细胞所破坏, 临床表现是脾脏明显增大、一种或多

种外周血细胞显著减少。脾动脉节段性分布特征, 即每支脾叶、段、亚段动脉供应相应区域的脾脏组织, 各叶、段、亚段间血管吻合极少, 为PSE术提供了解剖学基础。PSE通过栓塞部分脾动脉分支, 使之缺血梗死, 减少了血细胞在脾脏的滞留和破坏。脾栓塞术后, 相应区域的脾脏组织就会发生缺血梗死, 梗死区的脾组织最终将被纤维组织增生所代替。这种不可逆性的病理改变, 破坏了脾内血管, 减少了血细胞的滞留, 削弱了脾脏的吞噬和破坏血细胞的能力, 使外周血像得到改善。由于是部分性栓塞, 免疫功能不受影响, 这对于增强患者的免疫能力和预防感染的能力有着十分重要的意义, 这也是取代外科脾切除的重要原因。另外, 因为门脉高压时门脉内70%的血流量来自脾静脉, 行PSE后脾脏血供减少, 脾静脉的回流量随之减少, 减少门脉血流量和降低门脉压力^[3-4], 食管胃底静脉曲张出血可得到缓解或控制, 脾血流减少后, 肝及肠系膜上动脉血流量增加, 肝脏血流灌注增加, 同时由于门脉压力降低, 使肠系膜上静脉回流改善, 提高了肝组织的营养, 从而使前白蛋白、白蛋白等肝功能得以改善^[5]。

脾栓塞常用的材料有明胶海绵、真丝线段和PVA颗粒, 本组研究结果提示上述3种栓塞材料对缓解肝硬化脾功能亢进均具有较好的临床疗效, 且3者的近期临床疗效差异无显著, 考虑为3者均为较细的栓塞材料, 其栓塞水平为脾动脉末梢, 接近脾窦, 脾功能区完全梗死确保了PSE疗效。真丝线段为永久性栓塞材料, 采用0000-00000号线段经导管注入脾动脉, 随血流漂至脾脏红髓小动脉并停留于此形成血栓, 达到选择性脾脏红髓区栓塞之目的^[6]。PVA是一种惰性的聚己烯己醇海绵, 能侵犯纤维母细胞, 在海绵周围形成致密的纤维性组织, 并引起邻近血管壁产生炎性反应, 这样在栓塞的同时有血管壁的纤维化, 500 μ m以下的PVA颗粒可较均匀地

栓塞外周脾组织, 脾外周形成“盔甲”样的纤维化, 限制术后脾脏增生, 减少复发, 能获得较好的末梢栓塞及远期疗效^[1-2]. 明胶海绵颗粒为最常用的中期栓塞剂, 14-90 d就被组织吸收, 血管再通后, 势必影响疗效, 明胶海绵组6 mo内白细胞、血小板数量上升较前两者低, 可能与其有关, 但三组临床疗效差异并无显著性, 考虑明胶海绵颗粒经导管注入后可停留在直径约1 mm的脾动脉分支内, 因为脾脏为终末供血器官, 短时间的栓塞阻断血液供应后即可造成其永久性梗死, 而明胶海绵颗粒被机体吸收时时则部分性梗死早已形成, 另外, 经高温高压处理后的明胶海绵颗粒在水溶液里分解时间延长, 可延长栓塞时间^[1]. 有作者^[7]将丝线线段与明胶海绵两种栓塞剂联合进行栓塞效果更佳, 复发率更低. 本组对三种栓塞材料的远期临床疗效如何, 我们在追踪随访中.

栓塞综合征为PSE常见的术后反应, 主要包括发热、脾区疼痛, 可能与脾组织缺血坏死、脾包膜紧张有关^[8]. 本组病例栓塞综合征的发生率达到100%, 栓塞综合征的严重程度与栓塞程度密切相关, 当栓塞程度>50%时, 栓塞综合征发生率明显上升, 且持续时间延长. 栓塞面积过小血象恢复情况却不理想, 复发及再次栓塞的机率明显增高^[9], 本研究显示三组术后反应有差异, 手术线段以发热突出, 考虑真丝线段组织相容性较差, 发热为机体组织反应性增高和吸收所致. PVA颗粒组以疼痛最为突出, 疼痛出现时间早, 持续时间长, 疼痛程度较重, 其原因可能与PVA颗粒小, 分布均匀, 更接近脾外周栓塞^[10], 引起脾周缺血梗死、炎性渗出及脾包膜肿胀有关, 大范围栓塞还有可能导致脾包膜下积液. PVA颗粒组发热的发生率较少, 可能与PVA颗粒在体内不存在重吸收过程有关, 而且更接近脾功能区栓塞, 脾功能区的完全梗死(干性梗死)减少了发热及脾脏感染的机会^[11]. 有学者认为采用脾下极动脉栓塞能减轻术后栓塞反应^[12-13]. 术后严重并发症有脾脓肿, 大量胸腔积液、门静脉血栓、肝肾功能衰竭、消化道出血等^[9-14], 本组病例显示上述严重并发症与栓塞材料的选用无明显关系, 可能主要取决于栓塞方法、程度及患者术前的肝功能状态. 李璐 *et al*^[15]报道PSE术后重型肝炎发生率与Child分级有关, 而与栓塞面积无关, 其他严重并发症与Child分级以及栓塞面积无相关性, Zhu *et al*^[2]报道栓塞面积超过70%组与栓塞面积低等于70%

组合并严重并发症的几率有显著差异性. 因此, PSE时应依据患者的肝功能个体差异掌握合适的栓塞范围, 脾栓塞范围不宜过大, 以安全为主, 一般认为栓塞范围在60%-70%之间为宜^[16], 因为随着栓塞程度提高, 术后反应也随之加重, 患者可能因剧烈的脾区疼痛和炎症渗出导致腹腔感染和消化道出血, 从理论上讲栓塞范围是与疗效成正相关的, 即范围越大疗效越明显, 但栓塞后综合征亦越重, 因此需要根据病情掌握适度. 另外, 还应加强术后支持治疗及保持大便通畅, 减少肠道毒素吸收及肠道细菌逆行感染的机会^[1].

总之, 真丝线段、PVA颗粒及明胶海绵颗粒均作为PSE治疗脾亢的栓塞剂, 三者近期疗效无明显差别; 术后反应方面, PVA疼痛更明显, 丝线段发热更明显; 从经济方面考虑, PVA颗粒使用方便、栓塞更彻底, 但价格较贵, 真丝线段及明胶海绵颗粒取材方便, 价格低廉.

4 参考文献

- 1 朱康顺, 单鸿, 李征然, 孟晓春, 沈新颖, 黄明声, 姜在波, 关守海. PVA颗粒作为栓塞材料在部分性脾栓塞术中的应用评价. 介入放射学杂志 2004; 13: 19-22
- 2 Zhu K, Meng X, Li Z, Huang M, Guan S, Jiang Z, Shan H. Partial splenic embolization using polyvinyl alcohol particles for hypersplenism in cirrhosis: A prospective randomized study. *Eur J Radiol* 2008; 66: 100-106
- 3 李征然, 单鸿, 朱康顺, 姜在波, 关守海, 黄明声. 部分性脾栓塞术改变门脉血流动力学的定量研究. 中华放射学杂志 2002; 36: 913-917
- 4 Chikamori F, Kuniyoshi N, Kawashima T, Takase Y. Short-term portal hemodynamic effects of partial splenic embolization for hypersplenism. *Hepatogastroenterology* 2007; 54: 1847-1849
- 5 Tajiri T, Onda M, Yoshida H, Mamada Y, Taniai N, Kumazaki T. Long-term hematological and biochemical effects of partial splenic embolization in hepatic cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2002; 49: 1445-1448
- 6 席嘉元, 翟凌云, 吕梁. 真丝线段栓塞脾脏红髓小动脉治疗脾功能亢进的实验研究. 中华放射学杂志 1996; 30: 781-783
- 7 彭建国, 洪澜, 张荣胜, 卢建强, 陈旺生. 丝线加明胶海绵栓塞部分脾脏治疗脾功能亢进. 放射学实践 2004; 19: 844-846
- 8 Sakai T, Shiraki K, Inoue H, Sugimoto K, Ohmori S, Murata K, Takase K, Nakano T. Complications of partial splenic embolization in cirrhotic patients. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 388-391
- 9 Kimura F, Itoh H, Ambiru S, Shimizu H, Togawa A, Yoshidome H, Ohtsuka M, Shimizu Y, Shimamura F, Miyazaki M. Long-term results of initial and repeated partial splenic embolization for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 179: 1323-1326
- 10 曾庆乐, 李彦豪, 陈勇, 赵剑波, 梅雀林. 使用PVA微粒为栓塞剂的部分性脾栓塞术. 临床放射学杂志 2003;

应用要点
本文通过回顾性分析明胶海绵、真丝线段和PVA颗粒3种栓塞材料PSE前后外周血WBC和PLT变化及发热、疼痛等术后反应的差异, 在总结相关文献基础上, 分析了其原因, 以便临床根据患者的不同情况选用不同的栓塞剂, 并对术后反应进行针对性处理.

同行评价

本文比较分析真丝线段、聚乙烯泡沫纯及明胶海绵颗粒作为栓塞材料的异同, 结论可靠, 具有一定的临床及学术价值。

22: 698-700

- 11 欧阳强, 肖湘生, 董伟华, 张电波, 董生, 刘加成. 部分性脾栓塞治疗肝癌患者脾功能亢进的疗效观察. 介入放射学杂志 2003; 12: 273-275
- 12 杨怀龙, 官泳松, 何志明, 王宏, 纪艳. 微导管和聚己烯醇在部分脾栓塞中的应用. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3284-3289
- 13 于长鹿, 贺能树, 董卫国, 王涛, 祁兵, 李津花. 不同方法部分性脾栓塞术治疗脾功能亢进(附30例报告). 天

津医科大学学报 2004; 10: 263-265

- 14 时冰, 朱晓玲, 佟晗. 部分脾栓塞术后并发症的预防及处理. 大连医科大学学报 2005; 27: 130-131
- 15 李璐, 曾争, 尹彪, 小红, 万华, 霍娜, 徐京杭, 徐小元. 部分脾动脉栓塞术治疗肝硬化脾功能亢进39例. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1297-1301
- 16 朱康顺, 单鸿, 李征然, 沈新颖, 孟晓春, 关守海, 姜在波, 黄明. 部分性脾栓塞术治疗肝硬化脾功能亢进的远期疗效观察. 中华放射学杂志 2004; 38: 732-736

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志修回稿须知

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

1 修回稿信件

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

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须经得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录. (常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

肠易激综合征脑功能成像的研究进展

曾芳, 刘旭光, 李学智, 梁繁荣

曾芳, 刘旭光, 李学智, 梁繁荣, 成都中医药大学针灸推拿学院 四川省成都市 610075
国家重点基础研究发展计划项目, No. 2006CB504501
国家自然科学基金资助项目, No. 30772835
作者贡献分布: 本论文写作由曾芳、刘旭光及李学智完成; 梁繁荣审定。
通讯作者: 梁繁荣, 610075, 四川省成都市, 成都中医药大学针灸推拿学院. lfr@cdutcm.edu.cn
电话: 028-66875831
收稿日期: 2007-10-25 修回日期: 2008-03-10

Research progress in brain function imaging of irritable bowel syndrome

Fang Zeng, Xu-Guang Liu, Xue-Zhi Li, Fan-Rong Liang

Fang Zeng, Xu-Guang Liu, Xue-Zhi Li, Fan-Rong Liang, College of Acupuncture and Massage, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China

Supported by: the State Key Program for Basic Research of China, No. 2006CB504501, and National Natural Science Foundation of China, No. 30772835

Correspondence to: Fan-Rong Liang, College of Acupuncture and Massage, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, Sichuan Province, China. lfr@cdutcm.edu.cn

Received: 2007-10-25 Revised: 2008-03-10

Abstract

Along with the development of nerve imaging, brain function imaging technique is gradually used in the research of functional gastrointestinal disorders (FGID), and it provides a new method for further investigation of the relationship between brain cortex function, gut function and FGID, as well as the relationship between brain and digestive tract. This review focuses on the major progress in the overseas study of irritable bowel syndrome using positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging, the problems and application prospect.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Brain function imaging; Functional gastrointestinal disorder

Zeng F, Liu XG, Li XZ, Liang FR. Research progress in brain function imaging of irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1435-1439

摘要

近年来, 随着神经影像学的发展, 功能性脑成像技术逐步用于功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGID)研究中, 为进一步研究皮质功能、肠功能和FGID之间的相关性, 探索脑与消化道之间的联系提供了新的方法. 本文重点介绍近年来国外运用正电子发射断层扫描和功能性磁共振技术进行肠易激综合征研究的主要进展、存在的主要问题和应用前景.

关键词: 肠易激综合征; 脑功能成像; 功能性胃肠病

曾芳, 刘旭光, 李学智, 梁繁荣. 肠易激综合征脑功能成像的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(13): 1435-1439
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1435.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是功能性胃肠病(functional gastrointestinal disorders, FGID)最常见的类型之一. 近年来, 随着神经影像学的发展, 功能性脑成像技术逐步用于FGID研究中, 这为进一步研究皮质功能、肠功能和FGID之间的相关性, 探索脑与消化道之间的联系提供了新的方法. 我们将对近年来国外运用正电子发射断层扫描(positron emission tomography, PET)和功能性磁共振(functional magnetic resonance imaging, fMRI)技术进行IBS研究的情况作一综述.

1 IBS脑功能成像

1.1 IBS与脑肠轴 人们很早就发现, 情绪的改变常常会导致腹泻、腹痛和便秘等消化系统症状, 进而推测脑与消化道之间存在某种功能的联系. 神经胃肠病学研究表明^[1-2], 肠道经神经系统(ENS)与中枢神经系统(CNS)相联系, 肠道的活动受CNS的调控. 这种相互作用被称为脑肠互动, 是通过脑肠轴来实现的. 生理学研究^[3]则为中枢神经系统调控处理消化道传入信息的病理生理机制, 及其如何影响胃肠运动、感觉功能和产生各种肠道刺激后的情绪和行为反应提供了新的认识. 虽然, 临床研究证实CNS对FGID的临床表

背景资料

近年来, 随着神经影像学的发展, 功能性脑成像技术逐步用于FGID研究中, 这为探索脑与消化道之间的联系提供了新的方法. 本文将对近年来国外运用正电子发射断层扫描(PET)和功能性磁共振(fMRI)技术进行IBS研究的情况作一综述.

同行评议者
肖恩华, 教授, 中南大学湘雅二医院放射教研室

相关报道

Lieberman *et al* 运用PET技术对运用安慰剂之前和运用安慰剂3 wk后大脑对肠道不适的反应,发现右侧前额叶腹外侧的激活预示自觉症状有所改善,并且这种相关性由与不良性疼痛感觉直接相关的dACC区的变化介导。

现有着重要的影响^[1]。然而,由于无法在人体直接评价脑肠轴的功能,对中枢神经系统在FGID中作用的研究显得非常困难。这就使脑功能成像技术成为研究者们瞩目的焦点。

多个研究小组利用脑功能成像技术研究健康受试者大脑皮质对内脏刺激的处理,记录了刺激胃肠道不同部位,如食管^[4]、胃远端^[5]和直肠^[6]时大脑皮质激活模式。综合这些研究可以发现,在接受内脏刺激后,皮质中的几个区域如岛叶和前扣带回皮层(anterior cingulate cortex, ACC)的背侧始终被激活,而大脑皮层第一躯体感觉区(S I区)、第二躯体感觉区(S II区)、丘脑、边缘系统和旁边缘系统则呈现出不同的激活程度。在此基础上,有关IBS患者接受内脏刺激后脑区激活情况的研究也相继开展。研究者们描述和确定了IBS患者和健康受试者在接受疼痛性和非疼痛性刺激后,大脑皮层的激活在脑区分布上的不同。这个领域开展的第一项研究是由Silverman *et al*^[7]利用H215O-PET技术完成的。他们观察IBS患者在接受内脏疼痛性刺激后大脑的激活情况并发现,与健康受试者相比,IBS患者ACC膝部对直肠扩张刺激呈低反应而前额叶(与注意力和警惕性反应有关)皮层反应增强。自此以后,几项运用PET或fMRI进行的研究^[8-12]也显示IBS患者和健康受试者大脑皮质对刺激的反应存在差异。然而报道的结果并不完全一致。例如,有研究者^[8]用相似的实验方案复制Silverman *et al*的PET研究,发现在疼痛性直肠扩张刺激后IBS患者ACC处呈低反应,而丘脑部激活。然而同样的刺激并不能引起正常人丘脑的激活。但该研究结果不能确定IBS患者前额叶的激活是否比正常人更加显著。Mertz *et al*^[9]用fMRI发现,非疼痛性和疼痛性直肠扩张时均可以激活IBS患者和正常人的ACC、额前皮质、岛叶和背侧丘脑。但在IBS患者中,疼痛性刺激引起的ACC激活比非疼痛性刺激引起的显著增强,而健康受试者无此表现。此外,一些脑功能成像的研究^[13-14]显示,IBS患者和其他功能性胃肠病如炎症性肠病患者脑区激活不同。尽管这类研究结果并不一致,但都证实IBS患者与健康受试者在大脑皮层激活上存在差异。

1.2 IBS与内脏高敏感性 在IBS脑功能成像研究中,内脏高敏感性引起了研究者兴趣。多项研究表明^[15-19],与健康对照组相比,IBS患者存在内脏敏感性增高的表现。他们对胃肠道充盈扩张、肠肌收缩等生理现象极为敏感,较易感到疼痛,即

痛阈下降。例如在直肠气囊扩张实验中,IBS患者的耐受性低于正常对照组,在较低的压力和容积下就感觉疼痛或不适。结果提示,内脏敏感性的异常增强可能是IBS的重要病理生理机制之一^[20]。虽然内脏高敏感性的确切机制尚不清楚,但有进一步的证据表明由各种社会心理因素介导的中枢作用比外周信号更能影响痛阈。最近Naliboff *et al*^[21]研究发现,当反复给予IBS患者直肠扩张刺激后,患者接受内脏刺激后的感知反应逐渐减轻。有研究显示^[22],当患者适应反复的内脏刺激后,处理内脏传入信息的相关脑区仍处于持续的激活状态,而与觉醒、警惕相关的脑区则呈现出与内脏刺激后的感知反应减轻相平行的适应状态。

1.3 IBS与性别差异 IBS患者通常以女性多见,女性与男性之比约为2:1,且女性患者发生便秘、腹胀和结肠外症状的可能性较男性患者大。因而研究者推测,这是否与不同性别患者大脑皮质处理胃肠信息的方式不同有关^[23]。初步证据显示^[24]IBS患者对内脏刺激的知觉反应存在性别差异,内脏传入信息的大脑皮层处理过程亦可能存在性别差异。Naliboff *et al*^[25]用PET研究IBS患者内脏刺激引起中枢应答过程的性别相关差异,通过对无便秘的23位女性IBS患者和19位男性患者进行内脏刺激,结果发现,对内脏刺激的反应,女性患者额前皮质的腹内侧、ACC和左杏仁体区被显著激活;而男性在额前皮质的右背侧、岛叶和脑桥背侧/导水管周围灰质被显著激活。这一结果显示IBS患者脑区激活存在性别差异。Nakai *et al*^[26]运用PET对IBS患者脑内5-HT的合成进行研究。结果第1次显示,IBS患者脑内5-HT合成率与年龄、性别匹配组存在差异。且女性IBS患者5-HT的合成率高于对照组。有趣的是,有研究发现,5-HT在IBS组患者不同脑区内的合成也存在性别差异^[27]。如Nakai *et al*^[28]发现,在Alosetron治疗中,男性IBS患者多个脑区5-HT的合成高于女性患者,而女性患者无任何脑区5-HT的合成高于男性患者。在5-HT的合成中,扣带回、尾核、苍白丘和小脑呈现出显著的性别-治疗之间的相互作用。Alosetron对脑内5-HT合成的影响效应所呈现出的性别差异性可能是与Alosetron在体内发挥功效的性别差异有关。这些结果提示,5-HT的合成在IBS病理生理机制中发挥着重要的作用,这可以帮助人们解释IBS临床表现和预后中存在的性别差异问题。

2 脑功能成像研究问题

在对目前开展的IBS脑功能成像研究结果进行

分析后,可以发现很多研究结论存在差异,甚至相互矛盾.各种研究结论的差异性可能与不同的方法学,例如运用PET或fMRI等不同的仪器设备,不同的流程、研究目的和对感兴趣区域进行精确定位的难度等有关^[29].在诸多的影响因素中,影像技术的选择和样本量的多少显得尤为突出.

2.1 脑影像技术的选择 目前常见的运用于消化道功能的脑影像技术包括: PET^[30]、fMRI^[31-32]、单光子发射断层扫描(SPECT)^[33]、脑电图(EEG)^[34]、脑诱发电位(CEP)^[35]和脑磁图(MEG)等.各种技术都有自身的优点和适应范围.例如: PET的优点是在活体上显示生物分子代谢、受体及神经介质活动.在脑研究中,用PET可以确定局部脑血量增多的部位或葡萄糖代谢增强的部位,从而发现脑结构和功能的空间联系^[36].运用于PET的放射性核素有上百种,最常用于胃肠研究的是¹⁵O. fMRI与PET相比,具有安全、无需注射任何放射性核素,信号直接反映脑组织的功能状态和成像速度快、时间分辨率高、价格低廉的优点,但其信号易受检测结构和血流方向影响.由于研究技术手段的成像原理不同以及研究者对感兴趣区的定位不同,研究结果也就存在一定的差异.此外仪器设备的性能对研究结果也产生一定的影响.

2.2 样本量 样本量过小是导致研究结果出现差异的常见原因.在FGID的脑功能成像研究中这一问题显得尤为突出.一方面,脑功能成像技术价格昂贵,研究者受到研究经费的限制,往往难以进行大样本的研究;另一方面,FGID是一组消化系统综合征,其病理生理机制体现了社会、心理、生物模式的综合作用^[37].无论是胃肠功能、神经、内分泌、免疫、心理因素等任何环节出现问题可能都可能会发病,而不同的环节紊乱就会产生不同的表现,形成不同的亚型.在样本量过小的情况下,通常难以考虑疾病的亚型等因素.有研究者推测,接受内脏刺激后,脑区激活的不同可能是由于不同的病理生理机制使得IBS患者大脑皮层对内脏疼痛刺激的反应存在很强的可变性^[38].所以,在今后的研究中,要尽量进行大样本研究,制定和实施严格的纳入和排除标准,重视疾病亚型的鉴别和区分以及抑郁、焦虑等不同情绪的影响,尽量减少和避免研究结果的差异.

3 IBS脑功能成像研究的前景

脑功能成像技术极大地提升了人们探索脑肠相

关性和评定中枢神经系统在内脏疼痛刺激中作用的能力.脑功能成像技术在IBS研究中的运用不仅表明IBS患者与健康受试者在大脑激活区域和程度上存在不同.近年来,脑功能成像技术还被用于FGDI产生的病理生理机制以及治疗效应研究等方面.这些研究都提示,脑功能成像技术在FGDI研究的重要运用价值^[39-43].虽然脑功能成像价格昂贵,也并不能解决FGDI研究中的所有问题,人们对将其作为FGDI患者的常规检测评估手段尚持怀疑态度,但其在FGDI疼痛产生机制评价中地位却不容置疑,若与神经生理和心理技术等联合应用,他仍将是胃肠研究者的重要工具.此外,脑功能成像技术将在FGDI药物和心理治疗评价中发挥重要的作用.如Lieberman *et al*^[44]运用PET技术对运用安慰剂之前和运用安慰剂3 wk后大脑对肠道不适的反应,发现右侧前额叶腹外侧的激活预示自觉症状有所改善,并且这种相关性由与不良性疼痛感觉直接相关的dACC区的变化介导. Lackner *et al*^[45]最近运用H215O-PET技术就认知行为疗法对IBS患者区域性脑活化的影响进行了研究.治疗后的脑影像显示,与警惕性和调节情绪有关的边缘系统活性降低,更为重要的是边缘系统的活性变化与患者疼痛、肠道不适、焦虑抑郁情绪等症状的改善情况平行.这一结果可能是认知行为疗法改善IBS患者症状的可能机制.

4 结论

我们相信脑功能成像技术在帮助我们认识胃肠道疼痛产生的神经生理机制、心理因素的调节作用、外伤或炎症引起的内脏高敏感性和评价药物或非药物的治疗效应方面都具有相当的应用潜力.

5 参考文献

- 1 Ringel Y, Sperber AD, Drossman DA. Irritable bowel syndrome. *Annu Rev Med* 2001; 52: 319-338
- 2 Kim DY, Camilleri M. Serotonin: a mediator of the brain-gut connection. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 2698-2709
- 3 Van Oudenhove L, Demyttenaere K, Tack J, Aziz Q. Central nervous system involvement in functional gastrointestinal disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 663-680
- 4 Hobson AR, Furlong PL, Worthen SF, Hillebrand A, Barnes GR, Singh KD, Aziz Q. Real-time imaging of human cortical activity evoked by painful esophageal stimulation. *Gastroenterology* 2005; 128: 610-619
- 5 Lu CL, Wu YT, Yeh TC, Chen LF, Chang FY, Lee SD, Ho LT, Hsieh JC. Neuronal correlates of gastric pain induced by fundus distension: a 3T-fMRI

应用要点
本文有利于了解
脑功能成像术在
肠易激综合征的
潜在应用价值.

同行评价
本文选题新颖, 信息量大, 有一定的科学性和可读性。

- study. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16: 575-587
- 6 Kern MK, Arndorfer RC, Hyde JS, Shaker R. Cerebral cortical representation of external anal sphincter contraction: effect of effort. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G304-G311
- 7 Silverman DH, Munakata JA, Ennes H, Mandelkern MA, Hoh CK, Mayer EA. Regional cerebral activity in normal and pathological perception of visceral pain. *Gastroenterology* 1997; 112: 64-72
- 8 Wold RM. Optometric intraprofessional referral of visual dysfunctions. *J Am Optom Assoc* 1975; 46: 982-987
- 9 Mertz H, Morgan V, Tanner G, Pickens D, Price R, Shyr Y, Kessler R. Regional cerebral activation in irritable bowel syndrome and control subjects with painful and nonpainful rectal distention. *Gastroenterology* 2000; 118: 842-848
- 10 Berman SM, Naliboff BD, Suyenobu B, Labus JS, Stains J, Ohning G, Kilpatrick L, Bueller JA, Ruby K, Jarcho J, Mayer EA. Reduced brainstem inhibition during anticipated pelvic visceral pain correlates with enhanced brain response to the visceral stimulus in women with irritable bowel syndrome. *J Neurosci* 2008; 28: 349-359
- 11 Morgan V, Pickens D, Gautam S, Kessler R, Mertz H. Amitriptyline reduces rectal pain related activation of the anterior cingulate cortex in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2005; 54: 601-607
- 12 Sidhu H, Kern M, Shaker R. Absence of increasing cortical fMRI activity volume in response to increasing visceral stimulation in IBS patients. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G425-G435
- 13 Bernstein CN, Frankenstein UN, Rawsthorne P, Pitz M, Summers R, McIntyre MC. Cortical mapping of visceral pain in patients with GI disorders using functional magnetic resonance imaging. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 319-327
- 14 Mayer EA, Berman S, Suyenobu B, Labus J, Mandelkern MA, Naliboff BD, Chang L. Differences in brain responses to visceral pain between patients with irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. *Pain* 2005; 115: 398-409
- 15 Prior A, Maxton DG, Whorwell PJ. Anorectal manometry in irritable bowel syndrome: differences between diarrhoea and constipation predominant subjects. *Gut* 1990; 31: 458-462
- 16 Yuan YZ, Tao RJ, Xu B, Sun J, Chen KM, Miao F, Zhang ZW, Xu JY. Functional brain imaging in irritable bowel syndrome with rectal balloon-distention by using fMRI. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1356-1360
- 17 Lackner JM, Lou Coad M, Mertz HR, Wack DS, Katz LA, Krasner SS, Firth R, Mahl TC, Lockwood AH. Cognitive therapy for irritable bowel syndrome is associated with reduced limbic activity, GI symptoms, and anxiety. *Behav Res Ther* 2006; 44: 621-638
- 18 Lawal A, Kern M, Sidhu H, Hofmann C, Shaker R. Novel evidence for hypersensitivity of visceral sensory neural circuitry in irritable bowel syndrome patients. *Gastroenterology* 2006; 130: 26-33
- 19 Andresen V, Bach DR, Poellinger A, Tsrouya C, Stroh A, Foerschler A, Georgiewa P, Zimmer C, Mönnikes H. Brain activation responses to subliminal or supraliminal rectal stimuli and to auditory stimuli in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 827-837
- 20 Ringel Y, Whitehead WE, Toner BB, Diamant NE, Hu Y, Jia H, Bangdiwala SI, Drossman DA. Sexual and physical abuse are not associated with rectal hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome. *Gut* 2004; 53: 838-842
- 21 Nakamura K, Mikami A, Kubota K. Oscillatory neuronal activity related to visual short-term memory in monkey temporal pole. *Neuroreport* 1992; 3: 117-120
- 22 Ladabaum U, Minoshima S, Hasler WL, Cross D, Chey WD, Owyang C. Gastric distention correlates with activation of multiple cortical and subcortical regions. *Gastroenterology* 2001; 120: 369-376
- 23 Kern MK, Jaradeh S, Arndorfer RC, Jesmanowicz A, Hyde J, Shaker R. Gender differences in cortical representation of rectal distension in healthy humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G1512-G1523
- 24 Berman S, Munakata J, Naliboff BD, Chang L, Mandelkern M, Silverman D, Kovalik E, Mayer EA. Gender differences in regional brain response to visceral pressure in IBS patients. *Eur J Pain* 2000; 4: 157-172
- 25 Naliboff BD, Berman S, Chang L, Derbyshire SW, Suyenobu B, Vogt BA, Mandelkern M, Mayer EA. Sex-related differences in IBS patients: central processing of visceral stimuli. *Gastroenterology* 2003; 124: 1738-1747
- 26 Nakai A, Kumakura Y, Boivin M, Rosa P, Diksic M, D'Souza D, Kersey K. Sex differences of brain serotonin synthesis in patients with irritable bowel syndrome using alpha-[11C]methyl-L-tryptophan, positron emission tomography and statistical parametric mapping. *Can J Gastroenterol* 2003; 17: 191-196
- 27 Chang L, Heitkemper MM. Gender differences in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2002; 123: 1686-1701
- 28 Nakai A, Diksic M, Kumakura Y, D'Souza D, Kersey K. The effects of the 5-HT₃ antagonist, alosetron, on brain serotonin synthesis in patients with irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2005; 17: 212-221
- 29 Ringel Y. Brain research in functional gastrointestinal disorders. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: S23-S25
- 30 Shoda H, Kakugawa Y, Saito D, Koza T, Terauchi T, Daisaki H, Hamashima C, Muramatsu Y, Moriyama N, Saito H. Evaluation of 18F-2-deoxy-2-fluoro-glucose positron emission tomography for gastric cancer screening in asymptomatic individuals undergoing endoscopy. *Br J Cancer* 2007; 97: 1493-1498
- 31 Wang GJ, Tomasi D, Backus W, Wang R, Telang F, Geliebter A, Korner J, Bauman A, Fowler JS, Thanos PK, Volkow ND. Gastric distention activates satiety circuitry in the human brain. *Neuroimage* 2008; 39: 1824-1831
- 32 Ringel Y, Drossman DA, Leserman JL, Suyenobu BY, Wilber K, Lin W, Whitehead WE, Naliboff BD, Berman S, Mayer EA. Effect of abuse history on pain reports and brain responses to aversive visceral stimulation: an FMRI study. *Gastroenterology* 2008; 134: 396-404
- 33 Fox M, Schwizer W, Fried M. The analysis of gastric volume measurement by SPECT: gastric structure vs. function. *Gastroenterology* 2005; 128: 1533-1534;

- author reply 1534-1535
- 34 Gurman GM, Popescu M, Weksler N, Steiner O, Avinoah E, Porath A. Influence of the cortical electrical activity level during general anaesthesia on the severity of immediate postoperative pain in the morbidly obese. *Acta Anaesthesiol Scand* 2003; 47: 804-808
- 35 Blomhoff S, Spetaten S, Jacobsen MB, Vatn M, Malt UF. Rectal tone and brain information processing in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1153-1159
- 36 Oliva MR, Saini S. Liver cancer imaging: role of CT, MRI, US and PET. *Cancer Imaging* 2004; 4 Spec No A: S42-S46
- 37 Mayer EA, Derbyshire S, Naliboff BD. Cerebral activation in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2000; 119: 1418-1420
- 38 Ringel Y, Drossman DA. Irritable bowel syndrome: classification and conceptualization. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: S7-S10
- 39 Bonaz B, Baciuc M, Papillon E, Bost R, Gueddah N, Le Bas JF, Fournet J, Segebarth C. Central processing of rectal pain in patients with irritable bowel syndrome: an fMRI study. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 654-661
- 40 Derbyshire SW. Visceral afferent pathways and functional brain imaging. *ScientificWorldJournal* 2003; 3: 1065-1080
- 41 Tozawa K, Miwa H, Ohda Y, Hida N, Matsumoto T. Brain function in IBS patients. *Nippon Rinsho* 2006; 64: 1536-1539
- 42 Ringel Y. New directions in brain imaging research in functional gastrointestinal disorders. *Dig Dis* 2006; 24: 278-285
- 43 Naliboff BD, Mayer EA. Brain imaging in IBS: drawing the line between cognitive and non-cognitive processes. *Gastroenterology* 2006; 130: 267-270
- 44 Lieberman MD, Jarcho JM, Berman S, Naliboff BD, Suyenobu BY, Mandelkern M, Mayer EA. The neural correlates of placebo effects: a disruption account. *Neuroimage* 2004; 22: 447-455
- 45 Lackner JM, Lou Coad M, Mertz HR, Wack DS, Katz LA, Krasner SS, Firth R, Mahl TC, Lockwood AH. Cognitive therapy for irritable bowel syndrome is associated with reduced limbic activity, GI symptoms, and anxiety. *Behav Res Ther* 2006; 44: 621-638

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如8.4 \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的, 应该舍。末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成, 不得多次完成。例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24。年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定: 分母 \leq 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 \leq 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

丙型肝炎病毒相关适配分子的研究进展

徐冬, 曹俊娜

背景资料
丙型肝炎易发生慢性化并可能进展为肝硬化和肝细胞癌。目前针对HCV的研究及诊治方法并不多, 一些研究开始转向HCV相关的适配子的研究。本文介绍了SELEX技术的原理、适配子的技术优势, 并就目前国际上针对HCV的适配子的最新研究成果作一综述。

徐冬, 曹俊娜, 中国人民解放军第161中心医院干部病房 湖北省武汉市 430010
作者贡献分布: 徐冬与曹俊娜对本文所作贡献均等; 本文写作由徐冬完成; 曹俊娜审核。
通讯作者: 徐冬, 430010, 湖北省武汉市, 中国人民解放军第161中心医院干部病房。wsygdmmw@163.com
电话: 027-50166447
收稿日期: 2008-01-09 修回日期: 2008-02-29

Advances in research of aptamers targeting at hepatitis C virus

Dong Xu, Jun-Na Cao

Dong Xu, Jun-Na Cao, Cadre Ward, the 161st Central Hospital of Chinese PLA, Wuhan 430010, Hubei Province, China
Correspondence to: Dong Xu, Cadre Ward, the 161st Central Hospital of Chinese PLA, Wuhan 430010, Hubei Province, China. wsygdmmw@163.com
Received: 2008-01-09 Revised: 2008-02-29

Abstract

Systematic evolution of ligand by exponential enrichment (SELEX) is a new combinational chemical methodology for *in vitro* selection of specific aptamers. Aptamers are artificial oligonucleotide ligands with high affinity binding to target molecules. They are isolated from combinational libraries of synthetic oligonucleotide by an iterative process of affinity selection, recovery and amplification. Several properties of aptamers such as convenient affinity selection and high affinity and specificity make them widely used. Their affinity and specificity for a given protein are superior to antibodies and make it possible to isolate a matching ligand and adjust its bioactivity. This article reviews the development and potentially clinical application of aptamers targeting at hepatitis C virus.

Key Words: Aptamer; Hepatitis C virus; Systematic evolution of ligand by exponential enrichment

Xu D, Cao JN. Advances in research of aptamers targeting at hepatitis C virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1440-1445

摘要

指数富集配基的系统进化(systematic evolution

of ligand by exponential enrichment, SELEX)技术是一类新的组合化学技术, 应用人工合成的随机寡核苷酸文库, 通过体外筛选、分离、富集获得能与靶物质特异性结合的寡核苷酸适配子。具有实用范围广、筛选过程简便、适配子有高通特异性和高亲和性等特点。适配子的选择性在很多方面优于抗体, 在分子识别研究中具有重要价值, 可用于靶物质的测定、阻断靶物质的生物活性。本文综述SELEX技术及寡核苷酸适配子在丙型肝炎病毒诊断和治疗领域的最新进展, 并且对其前景进行分析和预测。

关键词: 适配子; 丙型肝炎病毒; 指数富集配基的系统进化技术

徐冬, 曹俊娜. 丙型肝炎病毒相关适配分子的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(13): 1440-1445

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1440.asp>

0 引言

Tuerk *et al*^[1]和Ellington *et al*^[2]在1990年分别研究出一种新型体外筛选技术, 即建立人工设计的随机寡核苷酸库, 从这类随机序列库中筛选出与靶分子高度特异结合片段, 此过程称为配体系统进化的指数富集过程(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX), 经SELEX筛选出的配体称为aptamer, 即适配子(适配分子)。Shtatland和Singer *et al*^[3]又创造性地发挥此技术, 建立了基因组筛选技术, 将筛选形式从单靶物质筛选扩展到多靶物质筛选, 为生物界、生物化学界、医学界提供了高效、快速的检测手段和治疗方法。本文就与丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)相关的适配分子作一综述。

1 适配分子筛选的一般程序和要点

各种分子的适配分子筛选的程序大同小异, 多采用亲合方法, 即固定配体, 使其与扩增的寡核苷酸库混合培养, 待配体与寡核苷酸结合后洗去非结合核酸, 然后洗脱配体-适配分子复合物, 回收核酸, 扩增, 再进入下一轮筛选。筛选适配分子最重要的是如何保证核酸库的多样性。从理论上

同行评议者
刘正稳, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院

讲, 自由核酸的长度越大, 库容就越大, 但一般说来与蛋白或其他分子相互作用的核酸序列不会超过100 bp, 多集中于15-45 bp之间. 对双链DNA来说, 库容达 10^{13} 便可进行有效筛选, 单链DNA及RNA库容要求更低. 为保证PCR扩增的效果, 寡核苷酸两端应为AT丰富区且不应有对称结构. PCR扩增时, 为防止某些特殊序列的超比例扩增, 循环次数一般不超过20次.

2 寡聚核苷酸适配子的特性和优点

寡聚核苷酸适配子容易形成各种形状的二级结构和三级结构, 如发夹、口袋、假结、凸环和G-四聚体等空间结构, 通过这些空间结构与靶分子间通过氢键、范德华力等相互作用形成稳定的复合物. 有研究表明当靶目标存在时, 单链DNA或RNA发生适应性折叠, 与靶分子相互识别^[4].

SELEX技术所筛选的靶分子广泛, 可包括蛋白质、小分子有机物、金属离子、多糖、有机染料, 甚至可以是完整的细胞、病毒和孢子等^[5-7].

寡聚核苷酸适配子对靶物质的识别具有高亲和力. 寡聚核苷酸作为拮抗剂时解离常数为50 pmol/L-10 nmol/L, 与细胞因子与受体结合常数基本相同^[8]. 适配子对靶物质的结合具有高特异性. 核苷酸、氨基酸的寡聚核苷酸适配子能将他们与突变体、镜像体区分开来. 适配子甚至能够分辨出靶分子结构上1个甲基或1个羟基的差别, 如茶碱特异性RNA适配子对茶碱的亲合力比对咖啡因(与茶碱仅差1个甲基)高10 000倍^[9].

与抗体相比寡聚核苷酸适配子的筛选周期很短, 一般只需要8-15个循环, 约2-3 mo, 而制备mAb至少需要3-6 mo. 目前已建立多种用于适配子筛选的自动化系统^[10], 其筛选效率大大提高. 在合成过程中, 各种报告分子和功能基团能够很容易地被精确地标记到适配分子上的特定部位. 同时适配分子的性质是可逆的, 变性后可以很快地复性, 他可以长期保存并可在常温下运输.

3 寡聚核苷酸适配子的优化

目前已有多种方法对适配子进行优化, 以增加其抗核酸酶能力, 或使其更加稳定. 如镜像异构适配子(spiegelmer aptamer)以L-核糖代替D-核糖合成的寡核苷酸抗核酸酶的能力明显增强^[11]. 将适配子链接到大分子载体上, 可使其血浆中的存留时间更长^[12]. 引入锁核酸(locked nucleic acid)的杂合DNA适配子也明显增强了抗核酸酶

的能力^[13]. 环状DNA适配子在血清或血浆中的半衰期超过10 h^[14]. 对寡聚核苷酸适配子进行化学修饰(如荧光染料、放射性核素的标记、糖基化和硫代等)^[15-16], 也可以提高他的稳定性, 增加他的生物利用度, 使其更易于检测. 在血浆中, 未经修饰的RNA适配子的半衰期是几秒钟, 将核糖的五碳环上的第二位进行化学修饰可以使适配子的半衰期延长到5-15 h^[17-18].

4 HCV相关的适配分子研究进展

HCV被认为是引起输血后肝炎的主要致病因子, 丙型肝炎易发生慢性化并可能进展为肝硬化和肝细胞癌. HCV属于人类黄病毒属, 是一单股、正链RNA病毒, 基因组全长约9.5 kb, 由5'非编码区, 3'非编码区及中间一单一开放阅读框架组成. 单一开放阅读框架编码约3010-3030个氨基酸的多蛋白前体(NH₂ C E1 E2/NS1 NS2 NS3 NS4A NS4B NS5A NS5B COOH), 其中C E1 E2在宿主信号肽酶作用下裂解成核心蛋白和包膜蛋白; 而NS2 NS5是非结构蛋白区, 在NS2 NS3蛋白酶和NS3编码的丝氨酸蛋白酶的作用下裂解产生成熟的NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B蛋白. 在这些蛋白中, NS5B是一条重要的RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RDRP), 其对HCV的复制起重要作用.

Vo *et al*^[19]使用SELEX技术得到了8组NS5B特异的RNA适配分子, 60%在40 nt长的随机区内的5'端有保守序列YGUAGR(Y = 嘧啶, R = 嘌呤), 并且74%的配体分子在3'端以(A/C)U结尾, 适配分子与NS5B形成的特异结合解离常数极低. 但是, 这些适配子必须以包括两端的保守核苷酸在内的整体才能与NS5B形成极强的结合, 研究发现其结构中包含三个茎环结构, 带有内凸出部分, NS5B的结合区域在5'端的两个茎环结构之间. 针对HCV亚型3a的NS5B Jones *et al*^[20]筛选得到两种DNA适配子r10/43和r10/47, 均能抑制NS5B的RDRP活性. 其解离常数估计分别为 1.3 ± 0.3 nmol/L(r10/43)和 23.5 ± 6.7 nmol/L(r10/47), 而抑制常数分别为 1.4 ± 2.4 nmol/L和 6.0 ± 2.3 nmol/L. 这两种适配子显示极高的特异性, 仅能对HCV亚型3a的NS5B起作用, 而不能抑制HCV亚型1a和1b的NS5B多聚酶活性. Bellecave *et al*^[21]利用SELEX技术得到两种适配子, 可特异性抑制HCV NS5B的多聚酶活性, 而不能抑制脊髓灰质炎病毒3D多聚酶的活性. 其中被标记为27v的适配子的35 nt长的可

研发前沿
HCV的治疗一直是医学界的难题, HCV相关的适配子的研究刚刚起步, 其应用大都在实验室检测方面. 对HCV有治疗作用且能投入实用的适配子是一亟待研究的问题. 适配子与抗体相比优点不少, 但其自身也有缺点, 如何降低生产成本, 增加稳定性, 加强靶向性, 将是今后适配子治疗领域的研究重点.

相关报道
SELEX技术是一种新型体外筛选技术,近年在不同方面进行了改进,向着高效、自动化、筛选更高亲和力适配子的方向发展。适配子在医药、基础研究、疾病诊治和分子识别等领域有广泛应用。Stoltenburg *et al*对SELEX技术的发展、适配子的优缺点和应用进行了详细论述。

变区与其和NS5B结合及抑制能力有关,他能与RNA模板竞争结合到HCV多聚酶上。而Biroccio *et al*^[22]针对NS5B进行筛选,得到2条有特异性高亲和力的适配子,其解离常数到达nmol级,并且与GB病毒B的NS5B根本不结合。通过变异分析发现这2条适配子有相同的茎环结构,此结构与适配子和NS5B之间的紧密结合有关,并且这2条适配子可抑制NS5B的多聚酶活性,与模板RNA之间不存在竞争性,表明适配子与模板RNA并没结合在同一位点上。这些适配子有助于研究NS5B的空间结构与功能之间的关系,作进一步的修饰后具有潜在的治疗应用价值。

HCV非结构蛋白3(HCV NS3)具有蛋白酶、NTP酶和RNA解旋酶活性,在病毒的复制及病毒体的成熟和装配中起着重要作用。

Kumar *et al*^[23]筛选得到适配分子G6-G16和G6-G19,动力学研究表明G6-G16和G6-G19均能抑制NS3的RNA解旋酶活性,而且G6-G16还能抑制NS3的蛋白酶活性,抑制常数为3 $\mu\text{mol/L}$ 。Nishikawa *et al*^[24]从一个随机DNA库得到数种适配分子,其共同特点为都有一5'端单链区及一有保守序列(5'-GGA(U/C)GGAGCC-3')的茎环区。其中适配子5在体外实验中表现了很强的抑制解旋酶活性的能力,其含有保守序列的茎环区相当重要,若其结构被破坏则适配子5失去抑制解旋酶活性的能力。

Fukuda *et al*^[25]在一个有30个核苷酸可变核心区的RNA库中得到一批NS3蛋白酶活性区(DeltaNS3)特异性的适配子。这些适配分子被分成3组: G9- I, - II 和-III, 其结合常数大致为10 nmol/L,可抑制大约90%的DeltaNS3和MBP-NS3(融合了麦芽糖结合蛋白的全长NS3)蛋白酶活性。进一步研究发现这些适配子有共同序列5'-GA(A/U)UGGGAC-3',这一序列通过二级结构形成一个环^[26]。其中G9- I 对NS3蛋白酶活性的抑制是非竞争性的,通过蛋白酶抑制试验分析表明DeltaNS3的161位精氨酸和130位精氨酸对于NS3与G9- I 的结合起着基本作用^[27]。在G9- I 中发现一个51 nt长的片段(NEO-III)是G9- I 发挥抑制能力的最小有效片段,并利用此片段发现G9- I 抑制酶活性需要适配子的茎 I, 茎III和环III的参与^[28]。Fukuda *et al*^[29]将(U)14加到G9适配分子NEO-III的3'端,形成的NEO-III-14U比原适配分子更有效的抑制了NS3的蛋白酶活性,并且也能抑制解旋酶活性。在细胞中也证实NEO-III-14U能抑制NS3的蛋白酶活

性,可能是通过降低NS3与HCV正链的3'非编码区(3'-UTR)的特异性结合来发挥作用。Umehara *et al*^[30]将解旋酶适配子的结构域#5Delta通过寡核苷酸U链连接于双功能适配子NEO-III-14U和蛋白酶适配子G9- II 的3'端。通过优化间隔序列的长度得到了两种适配子NEO-35-s41和G925-s50,这两种适配子在体外都更有效的抑制了NS3的蛋白酶和解旋酶活性,特别是与NEO-III-14U相比对解旋酶活性的抑制能力上升了4-5倍。其中G925-s50在细胞内抑制了NS3的蛋白酶活性,在体外实验中抑制了HCV复制。Umehara *et al*^[31]在此基础上又设计和构建了新的双功能适配子NEO-35-sX和G925-sX(X: 5-51 nts),这些适配子通过寡U区与HCVNS3区结合,其对NS3蛋白酶及解旋酶活性均有抑制,对NS3解旋酶活性的抑制能力较前面的适配子增强了10倍。

Nishikawa *et al*^[32]构建了一个G9适配子表达系统,其中使用了巨细胞病毒增强子和鸡beta-肌动蛋白(CAG)启动子,将丁型肝炎病毒(hepatitis D virus, HDV)核酶与G9- II 适配子相结合,构建了一个HDV核酶-G9- II 适配子嵌合体(HA),这个嵌合体能在体内产生稳定的RNA从而产生串联的功能单位重复序列。为将转录成的RNA适配子运送至胞浆中去,对来自逆转录病毒的转运构成单位作了一个小改动后连接到HA的3'端(HAC),而从HA(n)和HAC(n)形成的转录本RNA都被HDV核酶处理成G9- II 适配子单位。HDV核酶-G9- II 适配子表达质粒被导入HeLa细胞中后成功抑制了NS3的蛋白酶活性。

Urvil *et al*^[33]筛选得到一个RNA适配子10G-1,其与NS3的结合常数为650 nmol/L,在体外能抑制NS3的蛋白酶活性。通过磷酸盐修饰干扰分析发现10G-1结合至NS3过程中G28-U34和A47-A55的磷酸化起着关键作用。

HCV的5'非编码区(341 nt)在所有HCV分离株中是最保守的区域,高度有序,有发夹型结构,形成稳定的二级结构,且含有帽非依赖性mRNA翻译所必须的内部核糖体进入位点(internal ribosomal entry site, IRES)。IRES包括HCV5' NCR和部分C区基因,有稳定的空间构象,含有核糖体的有效结合部位和与内部翻译起始相关的起始因子的结合部位,以内部起始调控介导HCV蛋白的翻译启动,在翻译调控中具有重要作用^[34-36]。据推测IRES的二级结构是由四个结构区(I, II, III, IV)组成,对翻译的起始十分重要。从44到118位的核苷酸是构成II区的关键结

构, 研究表明这个区的结构的完整性对IRES指导的翻译的有效性十分重要. Da Rocha Gomes S *et al*^[37]筛选出一种RNA适配分子, 此分子形成一个不完全的发夹结构, 带有一个内环, 与II区的顶端环相互作用, 形成一个顶端环-内环复合体, 通过分析发现的这类RNA-RNA的相互作用中由富含鸟嘌呤、胞嘧啶的上端和下端茎组成的互补环起着至关重要的作用. HCV IRES的III d亚单位对IRES与核糖体40 S亚单位的结合有关. 针对III d亚单位Toulmé *et al*^[38]筛选出特异的适配分子, 不论是与核糖体40 S亚单位一起加入IRES中, 或是加入已经形成的40 S亚单位-IRES复合体中, 适配分子在8 nmol/L浓度下使得IRES的保持率减少50%. Romero-López *et al*^[39]通过新的体外筛选方法得到10个RNA适配分子, 能结合到IRES上抑制翻译启动, 其抑制效率高达95%. Kikuchi *et al*^[40]得到的RNA适配分子结合于IRES的II区及III-IV区, 在体外实验中成功抑制了IRES依赖性翻译, 其中结合于III d区的3-07适配分子的抑制能力特别强.

5 HCV相关适配分子的应用

HCV相关的适配分子目前主要用于实验室检测HCV的存在. Cho *et al*^[41]将NS3特异性适配分子嵌入入锤头状核酶茎I和茎III中构成适配核酶, 并制成生物感应器, 可用于检测HCV的存在. 而Lee *et al*^[42]将通过基于蛋白芯片分析得到HCV核心抗原特异性适配分子制成生物感应器, 用于HCV诊断, 结果其特异性在HCV感染患者的血清中得了很好的证实. Cho *et al*^[43]将HCVNS5B特异性的适配分子应用于HCV检测, 可以从含有96 fmol NS5B的800 nL HCV患者血清中检测出NS5B的存在, 其检测极限被推测为9.6 fmol/L. Hwang *et al*^[44]通过纳米工程微悬臂技术使用RNA适配分子作为受体分子可以探测极微量的HCV解旋酶的存在. 随着HCV适配分子的研究进展, 相信高特异性及高灵敏度的HCV生物感应器很快可投入临床使用.

6 结论

HCV的治疗一直是医学界的难题, 随着SELEX技术的发展, 适配分子已从寡聚核苷酸适配分子发展到多肽适配分子, 目前已发现一种能抑制NS3解旋酶活性的多肽适配分子^[45]. 随着越来越多的针对HCV的适配分子被发现, 对适配分子及与相应HCV成分的研究必将导致对HCV的进一步的了

解, 相信对HCV的诊断和治疗会有一个新的突破. 虽然前景非常乐观, 适配分子的大量应用也存在一些限制性因素: 早期的主要问题是适配分子的稳定性, 通过努力目前已克服了药物代谢动力学的限制, 适配分子在血液中的半衰期有望达到24 h以上; 与其他制药方法相比, 适配分子制备的成本较高; 而且与抗体一样, 适配分子很难独立接近和穿透靶组织; 适配分子的高特异性使针对动物靶物质的特异性适配分子不能用于人体, 如与牛凝血酶高特异性结合的寡核苷酸配基不能识别人凝血酶^[46]; SELEX的筛选条件与天然条件不可能完全相同, 因此, 获得的适配分子的结合位点与天然条件下的结合位点可能不一致^[47]. 如何降低生产成本, 增加稳定性, 加强靶向性, 将是今后适配分子治疗领域的研究重点.

7 参考文献

- 1 Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990; 249: 505-510
- 2 Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990; 346: 818-822
- 3 Shtatland T, Gill SC, Javornik BE, Johansson HE, Singer BS, Uhlenbeck OC, Zichi DA, Gold L. Interactions of Escherichia coli RNA with bacteriophage MS2 coat protein: genomic SELEX. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: E93
- 4 Hermann T, Patel DJ. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 2000; 287: 820-825
- 5 Shanguan D, Meng L, Cao ZC, Xiao Z, Fang X, Li Y, Cardona D, Witek RP, Liu C, Tan W. Identification of liver cancer-specific aptamers using whole live cells. *Anal Chem* 2008; 80: 721-728
- 6 Xiao Z, Shanguan D, Cao Z, Fang X, Tan W. Cell-Specific Internalization Study of an Aptamer from Whole Cell Selection. *Chemistry* 2008; 14: 1769-1775
- 7 Chen F, Zhou J, Luo F, Mohammed AB, Zhang XL. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent Mycobacterium tuberculosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 743-748
- 8 Schlecht U, Malavé A, Gronewold T, Tewes M, Löhndorf M. Comparison of antibody and aptamer receptors for the specific detection of thrombin with a nanometer gap-sized impedance biosensor. *Anal Chim Acta* 2006; 573-574
- 9 Jenison RD, Gill SC, Pardi A, Polisky B. High-resolution molecular discrimination by RNA. *Science* 1994; 263: 1425-1429
- 10 Drolet DW, Jenison RD, Smith DE, Pratt D, Hicke BJ. A high throughput platform for systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). *Comb Chem High Throughput Screen* 1999; 2: 271-278
- 11 Vater A, Klussmann S. Toward third-generation aptamers: Spiegelmers and their therapeutic prospects. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2003; 6: 253-261
- 12 Healy JM, Lewis SD, Kurz M, Boomer RM,

应用要点
在HCV的研究中大量开发HCV相关适配分子, 这对HCV致病机制的研究、早期发现及治疗有相当重要的意义.

名词解释
生物传感器: 是将生物活性材料(酶、蛋白质、抗体、抗原等)与物理化学换能器有机结合, 是物质分子水平的快速、微量分析方法。

- Thompson KM, Wilson C, McCauley TG. Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. *Pharm Res* 2004; 21: 2234-2246
- 13 Schmidt KS, Borkowski S, Kurreck J, Stephens AW, Bald R, Hecht M, Friebe M, Dinkelborg L, Erdmann VA. Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 5757-5765
- 14 Di Giusto DA, King GC. Construction, stability, and activity of multivalent circular anticoagulant aptamers. *J Biol Chem* 2004; 279: 46483-46489
- 15 Kusser W. Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. *J Biotechnol* 2000; 74: 27-38
- 16 Adler A, Forster N, Homann M, Göringer HU. Post-SELEX chemical optimization of a trypanosome-specific RNA aptamer. *Comb Chem High Throughput Screen* 2008; 11: 16-23
- 17 Pieken WA, Olsen DB, Benseler F, Aurup H, Eckstein F. Kinetic characterization of ribonuclease-resistant 2'-modified hammerhead ribozymes. *Science* 1991; 253: 314-317
- 18 Beigelman L, McSwiggen JA, Draper KG, Gonzalez C, Jensen K, Karpeisky AM, Modak AS, Matulic-Adamic J, DiRenzo AB, Haerberli P. Chemical modification of hammerhead ribozymes. Catalytic activity and nuclease resistance. *J Biol Chem* 1995; 270: 25702-25708
- 19 Vo NV, Oh JW, Lai MM. Identification of RNA ligands that bind hepatitis C virus polymerase selectively and inhibit its RNA synthesis from the natural viral RNA templates. *Virology* 2003; 307: 301-316
- 20 Jones LA, Clancy LE, Rawlinson WD, White PA. High-affinity aptamers to subtype 3a hepatitis C virus polymerase display genotypic specificity. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 3019-3027
- 21 Bellocave P, Andreola ML, Ventura M, Tarrago-Litvak L, Litvak S, Astier-Gin T. Selection of DNA aptamers that bind the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus and inhibit viral RNA synthesis in vitro. *Oligonucleotides* 2003; 13: 455-463
- 22 Biroccio A, Hamm J, Incitti I, De Francesco R, Tomei L. Selection of RNA aptamers that are specific and high-affinity ligands of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 2002; 76: 3688-3696
- 23 Kumar PK, Machida K, Urvil PT, Kakiuchi N, Vishnuvardhan D, Shimotohno K, Taira K, Nishikawa S. Isolation of RNA aptamers specific to the NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA. *Virology* 1997; 237: 270-282
- 24 Nishikawa F, Funaji K, Fukuda K, Nishikawa S. In vitro selection of RNA aptamers against the HCV NS3 helicase domain. *Oligonucleotides* 2004; 14: 114-129
- 25 Fukuda K, Vishnuvardhan D, Sekiya S, Hwang J, Kakiuchi N, Taira K, Shimotohno K, Kumar PK, Nishikawa S. Isolation and characterization of RNA aptamers specific for the hepatitis C virus nonstructural protein 3 protease. *Eur J Biochem* 2000; 267: 3685-3694
- 26 Sekiya S, Fukuda K, Hwang J, Kakiuchi N, Taira K, Kusakabe I, Nishikawa S. Analysis of interaction between RNA aptamer and protein using nucleotide analogs. *Nucleic Acids Symp Ser* 2000; 163-164
- 27 Hwang J, Fauzi H, Fukuda K, Sekiya S, Kakiuchi N, Shimotohno K, Taira K, Kusakabe I, Nishikawa S. The RNA aptamer-binding site of hepatitis C virus NS3 protease. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 557-562
- 28 Sekiya S, Nishikawa F, Fukuda K, Nishikawa S. Structure/function analysis of an RNA aptamer for hepatitis C virus NS3 protease. *J Biochem* 2003; 133: 351-359
- 29 Fukuda K, Umehara T, Sekiya S, Kunio K, Hasegawa T, Nishikawa S. An RNA ligand inhibits hepatitis C virus NS3 protease and helicase activities. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325: 670-675
- 30 Umehara T, Fukuda K, Nishikawa F, Kohara M, Hasegawa T, Nishikawa S. Rational design of dual-functional aptamers that inhibit the protease and helicase activities of HCV NS3. *J Biochem* 2005; 137: 339-347
- 31 Umehara T, Fukuda K, Nishikawa F, Sekiya S, Kohara M, Hasegawa T, Nishikawa S. Designing and analysis of a potent bi-functional aptamers that inhibit protease and helicase activities of HCV NS3. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)* 2004: 195-196
- 32 Nishikawa F, Kakiuchi N, Funaji K, Fukuda K, Sekiya S, Nishikawa S. Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 1935-1943
- 33 Urvil PT, Kakiuchi N, Zhou DM, Shimotohno K, Kumar PK, Nishikawa S. Selection of RNA aptamers that bind specifically to the NS3 protease of hepatitis C virus. *Eur J Biochem* 1997; 248: 130-138
- 34 Sizova DV, Kolupaeva VG, Pestova TV, Shatsky IN, Hellen CU. Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J Virol* 1998; 72: 4775-4782
- 35 Otto GA, Lukavsky PJ, Lancaster AM, Sarnow P, Puglisi JD. Ribosomal proteins mediate the hepatitis C virus IRES-HeLa 40S interaction. *RNA* 2002; 8: 913-923
- 36 Jubin R. Hepatitis C IRES: translating translation into a therapeutic target. *Curr Opin Mol Ther* 2001; 3: 278-287
- 37 Da Rocha Gomes S, Dausse E, Toulmé JJ. Determinants of apical loop-internal loop RNA-RNA interactions involving the HCV IRES. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 820-826
- 38 Toulmé JJ, Darfeuille F, Kolb G, Chabas S, Staedel C. Modulating viral gene expression by aptamers to RNA structures. *Biol Cell* 2003; 95: 229-238
- 39 Romero-López C, Barroso-delJesus A, Puerta-Fernández E, Berzal-Herranz A. Interfering with hepatitis C virus IRES activity using RNA molecules identified by a novel in vitro selection method. *Biol Chem* 2005; 386: 183-190
- 40 Kikuchi K, Umehara T, Fukuda K, Hwang J, Kuno A, Hasegawa T, Nishikawa S. Structure-inhibition analysis of RNA aptamers that bind to HCV IRES. *Nucleic Acids Res Suppl* 2003; : 291-292
- 41 Cho S, Kim JE, Lee BR, Kim JH, Kim BG. Bis-aptazyme sensors for hepatitis C virus replicase

- and helicase without blank signal. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e177
- 42 Lee S, Kim YS, Jo M, Jin M, Lee DK, Kim S. Chip-based detection of hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 47-52
- 43 Cho S, Lee SH, Chung WJ, Kim YK, Lee YS, Kim BG. Microbead-based affinity chromatography chip using RNA aptamer modified with photocleavable linker. *Electrophoresis* 2004; 25: 3730-3739
- 44 Hwang KS, Lee SM, Eom K, Lee JH, Lee YS, Park JH, Yoon DS, Kim TS. Nanomechanical microcantilever operated in vibration modes with use of RNA aptamer as receptor molecules for label-free detection of HCV helicase. *Biosens Bioelectron* 2007; 23: 459-465
- 45 Trahtenherts A, Gal-Tanamy M, Zemel R, Bachmatov L, Loewenstein S, Tur-Kaspa R, Benhar I. Inhibition of hepatitis C virus RNA replicons by peptide aptamers. *Antiviral Res* 2008; 77: 195-205
- 46 Liu X, Zhang D, Cao G, Yang G, Ding H, Liu G, Fan M, Shen B, Shao N. RNA aptamers specific for bovine thrombin. *J Mol Recognit* 2003; 16: 23-27
- 47 Shultzaberger RK, Schneider TD. Using sequence logos and information analysis of Lrp DNA binding sites to investigate discrepancies between natural selection and SELEX. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 882-887

同行评价
本文综述了 SELEX 技术及 HCV 相关适配分子的研究进展, 但对分子机制的描述较为浅显, 若作者能对分子机制进行深入介绍, 将是一篇很好的论文。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第二十次全国中西医结合消化学术会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2008-11在上海市召开第二十次全国中西医结合消化系统疾病学术会议, 并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为肝病、内镜与胃癌)新技术新理论继续教育学习班。学习班招收对象: 中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等。参加学习班者授予国家级1类继续教育学分; 大会论文报告者另授继续教育学分6分。

1 征稿内容

消化内镜技术及其中西医结合临床应用; 脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究; 消化道肿瘤中西医结合诊疗; 脾胃学说及其临床应用; 其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等。

2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编。稿件请附800字论文摘要, 尽可能以电子信件的形式将稿件传送, 截稿日期: 2008-09-30。

3 联系方式

刘成海, 201203, 上海市浦东新区张衡路528号上海中医药大学附属曙光医院肝病所, 传真: 021-51324445或51328500, shxhhy2008@yahoo.cn或czs.xiaohua@163.com

重症急性胰腺炎预防性使用抗生素的认识和评价

夏庆, 黄伟, 杨晓楠

背景资料
英国及爱尔兰问卷调查显示: 使用预防性抗生素治疗胰腺炎的医师, 占医师总数的约88%, 其中有24%的医师将预防性抗生素治疗应用于所有病例。国内医师使用抗生素更为普遍, 包括轻型胰腺炎也普遍应用。其中, 有相当一部分应属于对抗生素的不合理应用。不合理应用抗生素的后果, 必然是造成二重感染及耐药菌株产生, 从而增加了患者的医疗费用, 造成了医疗资源的浪费。

夏庆, 黄伟, 杨晓楠, 四川大学华西医院中西医结合科 四川省成都市 610041
四川省科技厅重点攻关项目, No. 05SG011-021-1
通讯作者: 杨晓楠, 610041, 成都国学巷37号, 四川大学华西医院中西医结合科. yangxiaonan1@medmail.com.cn
电话: 028-85423373 传真: 028-85423028
收稿日期: 2007-11-15 修回日期: 2007-01-23

Prophylactic use of antibiotics in treatment of severe acute pancreatitis

Qing Xia, Wei Huang, Xiao-Nan Yang

Qing Xia, Wei Huang, Xiao-Nan Yang, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by: the Key Project of Sichuan Science and Technology Committee, No. 05SG011-021-1
Correspondence to: Xiao-Nan Yang, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, 37 Guoxue Street, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. yangxiaonan1@medmail.com.cn
Received: 2007-11-15 Revised: 2008-01-23

Abstract

Necrotic pancreatic infection is the most serious complication of severe acute pancreatitis (SAP). Although prophylactic antibiotics are widely used to reduce its death rate, its practical efficiency still remains controversial. Therefore, the clinical experiences with prophylactic use of antibiotics are summarized in this paper, hoping to offer certain guides to its treatment. However, results from recent studies do not support prophylactic use of antibiotics in all cases of necrotic pancreatic infection and suggest that only imipenem or meropenem can be used for no more than three weeks in patients with their pancreatic necrosis area >30% or in patients with biliogenic pancreatitis to decrease the risk of necrotic infection and its mortality rate.

Key Words: Antibiotics; Acute pancreatitis; Pancreatic necrosis

Xia Q, Huang W, Yang XN. Prophylactic use of antibiotics in treatment of severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren*

Xiaohua Zazhi 2008; 16(13): 1446-1451

摘要

胰腺坏死感染是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)最为严重的并发症, 尽管预防性使用抗生素被广泛应用以期降低病死率, 但其实际的作用却仍然存在争议。在此问题的基础上, 我们总结了最近的研究SAP预防性使用抗生素的临床试验和指南。其结果并不支持所有的胰腺坏死均预防性抗生素, 而仅推荐有大于30%胰腺坏死或胆源性患者使用<3 wk的亚胺培南或美罗培南, 以降低感染性坏死和病死率。

关键词: 抗生素; 急性胰腺炎; 胰腺坏死

夏庆, 黄伟, 杨晓楠. 重症急性胰腺炎预防性使用抗生素的认识和评价. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1446-1451
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1446.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)占急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的10%-25%^[1-4], 病程中容易出现全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)而导致继发的多器官功能障碍(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)和(或)胰腺坏死, 病死率约为17%(8%-39%)^[4-8], 急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)中有33%(16%-47%)会发生感染性坏死^[7-13], 而中后期死亡病例的40%-80%与胰腺或胰外器官感染有关^[14-17], 因此临床上普遍预防性使用抗生素以期降低SAP感染并发症。然而SAP是否应预防性使用抗生素, 使用什么抗生素以及抗生素应用的时间仍颇具争议^[18]。

1 SAP预防性使用抗生素的实验研究

一般认为病程第2-3周左右是ANP患者胰腺感染高峰期, 但de Souza *et al*^[19]在动物AP造模成功后6 h就在胰腺组织中发现了细菌。Schwarz *et al*^[20]也在介导AP后8-16 h观察到了动物胰腺坏死组织中有移位的细菌。这为预防性使用抗生素提

同行评议者
陈光, 教授, 吉林大学第一医院消化器官外科

表 1 1993–2004年ANP预防性使用抗生素的临床研究(*n*, %)

临床研究	年份	分组	<i>n</i>	胰腺感染	手术	脓毒症	病死率
Pederzoli <i>et al</i> ^[9]	1993	亚胺培南(14 d)对照	41	5/41(12.2)	12/41(29.3)	11/41(26.8) ^a	3/41(7.3)
			33	10/33(30.3)	11/33(33.3)	26/33(78.8)	4/33(12.0)
Sainio <i>et al</i> ^[25]	1995	头孢唑肟(14 d)对照	30	9/30(30.3)	7/30(23.3)	4/30(13.3)	1/30(3.3) ^a
			30	12/30(40.0)	14/30(46.6)	8/30(26.6)	7/30(23.3)
Delcenseri <i>et al</i> ^[26]	1996	头孢噻甲羧肟+(10 d) ^m 对照	11	0/11(0.0)	-	0/11(0.0)	1/11(9.1)
			12	3/12(25.0)	-	7/12(58.3)	3/12(25.0)
Schwarz <i>et al</i> ^[27]	1997	氧氟沙星+甲硝唑(早期)	13	8/13(62.0)	-	4/13(31.0)	0/13(0.0)
		氧氟沙星+甲硝唑(>10 d)	13	7/13(54.0)	-	6/13(46.0)	2/13(15.0)
Bassi <i>et al</i> ^[28]	1998	培氟沙星(14 d)	30	10/30(34.0)	-	13/30(44.0)	7/30(24.0)
		亚胺培南(14 d)	30	3/30(10.0) ^a	-	6/30(20.0)	3/30(10.0)
Takeda <i>et al</i> ^[29]	2001	亚胺培南+酶抑制剂 (动脉使用对照静脉使用)	156	20/156(12.8)	-	-	29/156(18.6)
Nordback <i>et al</i> ^[30]	2001	亚胺培南(早期)	25	2/25(8.0) ^a	2/25(8.0) ^a	-	2/25(8.0)
		亚胺培南(怀疑感染时)	33	14/33(42.0)	14/33(42.0)	5/33(15.0)	-
Manes <i>et al</i> ^[31]	2003	美洛培南(>14 d)	88	10/88(11.4)	15/88(17.0)	19/88(21.6)	2/88(13.6)
		亚胺培南	88	12/88(13.6)	16/88(18.2)	10/88(11.4)	-
Maravi-Poma <i>et al</i> ^[32]	2003	亚胺培南/西司他丁(14 d)	46	13/46(28.0)	-	5/46(11.0)	9/46(19.6)
		亚胺培南/西司他丁(>14 d)	46	14/46(30.4)	7/46(15.0)	8/46(17.4)	-
Isenmann <i>et al</i> ^[7]	2004	环丙沙星+甲硝唑(14 d)	37	7/37(18.9)	8/37(21.6)	-	3/37(8.1)
		安慰剂	33	5/33(15.2)	5/33(15.2)	-	3/33(9.1)

^a*P*<0.05; m: 头孢噻甲羧肟+阿米卡星+甲硝唑, -: 文献中没有报道。

供了证据, 已完成的多个动物实验研究提示: AP预防性使用抗生素能减少胰腺感染发生率, 并降低动物死亡率^[21–24]。

2 SAP预防性使用抗生素的临床研究

2.1 抗生素的使用 在1993–2004年期间发表的预防性抗生素治疗ANP的研究中有10个设计质量较高的临床随机对照试验, 均选用了能穿透血-胰屏障的抗生素(表1)^[7,9,25–32], 但在胰腺感染发生率、手术率、脓毒症发生率以及病死率方面结论各异。

影响临床试验质量和结论可信度的主要因素包括: 早期死亡的病例, 难于区分死亡是否由于胰腺感染, 或是由于其他原因引起的, SIRS或MODS等是早期死亡的常见原因; 各临床试验的基线不一致, 如: 纳入患者的病情程度不一致, 评估病情轻重的指标不一致, 诊断胰腺感染的方法学差异, 治疗手段的多样性, 如抗生素的种类和使用时间的不同, 营养支持方法不同, 手术干预的指征和时机不一致。此外, 大部分临床随机对照试验的样本量过小, 证据强度低。

最近的一篇荟萃分析纳入了上述10个临床试验, 结果提示在ANP中预防性使用抗生素能降低胰腺感染性坏死发生率、手术率、脓毒症

发生率和病死率。但对抗生素进行亚组分析显示, 除碳青霉烯类以外的其他抗生素对上述指标的影响均为阴性结果, 而碳青霉烯类抗生素能降低胰腺感染性坏死发生率、手术率和脓毒症发生率, 但仍不能明显降低病死率^[33]。因而该研究结论倾向于肯定预防性抗生素使用的价值, 但主要指碳青霉烯类抗生素。

相反, 新近在北美和欧洲32个医学中心实施的一项随机双盲安慰剂对照临床试验, 纳入ANP患者100例, 治疗组预防性使用碳青霉烯类抗生素美罗培南(3 g/d, 疗程7–21 d), 结果显示治疗组和安慰剂对照组在胰腺或胰周感染、中转手术率及病死率等方面均无统计学差异^[34]。该研究结论不推荐预防性使用抗生素, 有可能对预防性抗生素的价值引起新一轮更大的争论。

2.2 ANP预防性抗生素应用的认识 大部分指南都支持有胰腺坏死的患者应早期使用抗生素(表2)^[35–46]。国际胰腺病学会支持对CT证实的ANP患者预防性使用广谱抗生素以期降低感染率, 推荐程度为A级^[35]。尽管临床试验中抗生素的种类、疗程和运用方法不尽相同, 但Bassi *et al*^[37]的循证结论支持静脉预防性使用抗生素10–14 d能降低ANP胰腺感染率和病死率。虽然支持预防性使用抗生素的指南占多数^[34–36,40–44],

研发前沿
重症急性胰腺炎(SAP)病情凶险, 病死率高。目前由于重症监护及治疗措施的进步, SAP早期由于循环、呼吸及肾脏并发症而死亡的患者减少, 使其总的病死率有一定程度下降。但SAP并发感染发生率仍居高不下。

相关报道
意大利最近的一次治疗AP的多中心调查显示,最常使用的预防胰腺坏死感染的抗生素是亚胺培南(43.1%).

表 2 各级指南对预防性使用抗生素的推荐意见

作者	年份	来源	推荐
Toouli <i>et al</i> ^[35]	2002	<i>J Gastroenterol Hepatol</i>	是
Uhl <i>et al</i> ^[36]	2002	<i>Pancreatolgy</i>	是
Bassi <i>et al</i> ^[37]	2003	<i>Cochrane Database Syst Rev</i>	是
Nathens <i>et al</i> ^[38]	2004	<i>Crit Care Med</i>	否
UK working party ^[39]	2005	<i>Gut</i>	不一致
Clancy <i>et al</i> ^[40]	2005	<i>J Gastrointest Surg</i>	是
Werner <i>et al</i> ^[41]	2005	<i>Gut</i>	是
Chinese pancreatic disease group ^[42]	2005	<i>Chin J of Dig Dis</i>	是
Takeda <i>et al</i> ^[43]	2006	<i>J Hepatobiliary Pancreat Surg</i>	是
Otsuki <i>et al</i> ^[44]	2006	<i>World J Gastroenterol</i>	是
Banks <i>et al</i> ^[45]	2006	<i>Am J Gastroenterol</i>	否
AGA ^[46]	2007	<i>Gastroenterology</i>	不一致

2005年发表的英国指南则认为当胰腺坏死小于30%时其感染的机率小^[38],推荐在胰腺坏死大于30%时预防性使用抗生素,而后美国最新的两个指南也提出没有证据支持无胰腺坏死的SAP能从预防性应用抗生素治疗中获益^[45-46],和英国的指南意见一致.基于以上指南的意见,我们可以认为不提倡盲目预防性使用抗生素,而当SAP患者有30%以上的胰腺坏死时尽早使用是对预后有益的.

2.3 抗生素的选择 临床上选择抗生素遵循覆盖SAP常见感染菌群和能穿透血-胰屏障在胰腺组织保持较高浓度的原则.有研究证实胰腺及胰周组织常见的致病菌依次是大肠杆菌(27%-35%),肠球菌(24%-26%),金黄色葡萄球菌(14%-16%),表皮葡萄球菌(15%),克雷白杆菌(15%),铜绿假单胞菌(7%-11%),链球菌(4%-7%)^[47-49].而抗生素在胰腺的浓度则受抗生素成分、胰腺的解剖和生理、胰腺内pH值和离子浓度、胰酶和激素的调节、胰腺病理改变和感染等因素影响^[50].氨苄西林已被实验证实不能很好的穿透血-胰屏障^[51-52],而环丙沙星、氧氟沙星、亚胺培南和甲硝唑则具有较好的穿透力^[50].尽管如此,在已发表的临床试验中,可能改善SAP患者预后的仅有碳青酶烯类抗生素,如亚胺培南、美罗培南等,而氟喹诺酮或头孢类抗生素联合甲硝唑没有有效作用^[33].意大利最近的一次治疗AP的多中心调查显示:最常使用的预防胰腺坏死感染的抗生素是亚胺培南(43.1%)^[53].

2.4 预防性抗生素应用的时机和疗程 合理有效地应用预防性抗生素治疗SAP的重要环节包括给药时机和疗程.根据目前现有证据,我们认为较为明确的胰腺-胰周感染的危险因素是胰腺

坏死的面积>30%或胆源性SAP.因此,早期行增强CT检查对尽早明确胰腺坏死面积以及是否合并胆系结石有积极的意义.一般应在入院3 d内完成CT评估,争取早期对具有感染高危因素的患者即开始应用经验性预防性抗生素干预.之后,有条件应在CT或B超指导下细针穿刺胰腺病灶作细菌培养明确有无感染及感染细菌^[45,54-57].24% ANP患者感染并发症发生在第1周,71%发生在第3周以后^[14,57],而早期胰腺及胰周组织的感染是导致SAP患者死亡最重要的独立因素之一^[58].Schwarz *et al*^[59]在动物实验中发现早期或晚期使用抗生素均能降低胰腺感染率,但是只有早期能降低胰外感染率.因此Bassi *et al*^[37]提出,在SAP在发病1-3 wk内是预防性使用抗生素的最佳时机.病情的严重程度是决定初始治疗的重要因素,在有感染征象的时候尽早使用抗生素可能对SAP患者更有益.Nordback *et al*^[30]试验发现早期使用亚胺培南比晚期使用对ANP患者的预后更有益;Manes *et al*^[60]将215例AP患者分成两组,A组108例(30例ANP),B组107例(29例ANP),两组分别于1.1±0.6 d和4.6±1.2 d开始预防性使用亚胺培南,结果A组胰腺感染率(13.3%)小于B组(31.0%),但无统计学差异,病死率两组亦无统计学差异,但A组胰外感染率、手术率及住院时间明显低于B组.总体看来,早期对感染高危SAP患者进行预防性抗生素干预可能在一定程度上改善其预后.

关于预防性应用抗生素的疗程目前尚有争议,时间太短不足以达到防治感染的目的,时间过长又可能出现继发的真菌感染、耐药菌株,及增加G⁺菌株感染几率.真菌感染可能是不利于AP患者预后的因素^[57],另外耐药菌株出现的

几率虽然仅2.9%, 但一旦出现后果极为严重^[50]. 目前虽尚无针对预防性抗生素应用疗程的相关文献, 但多个指南和会议比较一致的意见是预防性应用抗生素10-14 d是合理的^[37,39-40,42]. 国内的研究^[58]认为使用抗生素21 d后耐药菌和真菌感染率明显上升, 且抗生素应用时间延长对败血症发生率和死亡率并无明显影响. 因此一般考虑预防性抗生素应用时间不应超过21 d. 作者认为应根据每一个患者的具体情况来分析, 抗生素的应用至少应覆盖SAP病程中容易发生感染的时期, 高度怀疑有真菌感染时, 可给予经验性抗真菌治疗.

3 结论

SAP患者是否应该预防性使用抗生素、使用抗生素的种类、干预的时机及疗程等还无定论. 当前证据更倾向于推荐对胰腺坏死面积>30%或胆源性SAP患者早期开始预防性使用碳青霉烯类抗生素, 一般使用不超过3 wk. 但尚需进一步的高质量大样本随机对照试验以及卫生经济学评价来探索预防性抗生素应用在重症急性胰腺炎综合治疗中价值.

4 参考文献

- 1 Werner J, Feuerbach S, Uhl W, Büchler MW. Management of acute pancreatitis: from surgery to interventional intensive care. *Gut* 2005; 54: 426-436
- 2 Lankisch PG, Mahlke R, Blum T, Bruns A, Bruns D, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Hemoconcentration: an early marker of severe and/or necrotizing pancreatitis? A critical appraisal. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2081-2085
- 3 Dziurkowska-Marek A, Marek TA, Nowak A, Kacpersek-Hartleb T, Sierka E, Nowakowska-Dulawa E. The dynamics of the oxidant-antioxidant balance in the early phase of human acute biliary pancreatitis. *Pancreatol* 2004; 4: 215-222
- 4 Malangoni MA, Martin AS. Outcome of severe acute pancreatitis. *Am J Surg* 2005; 189: 273-277
- 5 Connor S, Ghaneh P, Raraty M, Rosso E, Hartley MN, Garvey C, Hughes M, McWilliams R, Evans J, Rowlands P, Sutton R, Neoptolemos JP. Increasing age and APACHE II scores are the main determinants of outcome from pancreatic necrosectomy. *Br J Surg* 2003; 90: 1542-1548
- 6 Company L, Saez J, Martinez J, Aparicio JR, Laveda R, Grino P, Perez-Mateo M. Factors predicting mortality in severe acute pancreatitis. *Pancreatol* 2003; 3: 144-148
- 7 Isenmann R, Runzi M, Kron M, Kahl S, Kraus D, Jung N, Maier L, Malferttheiner P, Goebell H, Beger HG. Prophylactic antibiotic treatment in patients with predicted severe acute pancreatitis: a placebo-controlled, double-blind trial. *Gastroenterology* 2004; 126: 997-1004
- 8 Mettu SR, Wig JD, Khullar M, Singh G, Gupta R. Efficacy of serum nitric oxide level estimation in assessing the severity of necrotizing pancreatitis. *Pancreatol* 2003; 3: 506-513; discussion 513-514
- 9 Pederzoli P, Bassi C, Vesentini S, Campedelli A. A randomized multicenter clinical trial of antibiotic prophylaxis of septic complications in acute necrotizing pancreatitis with imipenem. *Surg Gynecol Obstet* 1993; 176: 480-483
- 10 Banks PA, Gerzof SG, Langevin RE, Silverman SG, Sica GT, Hughes MD. CT-guided aspiration of suspected pancreatic infection: bacteriology and clinical outcome. *Int J Pancreatol* 1995; 18: 265-270
- 11 Rau B, Pralle U, Mayer JM, Beger HG. Role of ultrasonographically guided fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of infected pancreatic necrosis. *Br J Surg* 1998; 85: 179-184
- 12 Gotzinger P, Wamser P, Barlan M, Sautner T, Jakesz R, Fugger R. Candida infection of local necrosis in severe acute pancreatitis is associated with increased mortality. *Shock* 2000; 14: 320-323; discussion 323-324
- 13 Riche FC, Cholley BP, Laisne MJ, Vicaut E, Panis YH, Lajeunie EJ, Boudiaf M, Valleur PD. Inflammatory cytokines, C reactive protein, and procalcitonin as early predictors of necrosis infection in acute necrotizing pancreatitis. *Surgery* 2003; 133: 257-262
- 14 Gloor B, Muller CA, Worni M, Stahel PF, Redaelli C, Buchler MW. Pancreatic infection in severe pancreatitis: the role of fungus and multiresistant organisms. *Arch Surg* 2001; 136: 592-596
- 15 Schmid SW, Uhl W, Friess H, Malferttheiner P, Buchler MW. The role of infection in acute pancreatitis. *Gut* 1999; 45: 311-316
- 16 Mutinga M, Rosenbluth A, Tenner SM, Odze RR, Sica GT, Banks PA. Does mortality occur early or late in acute pancreatitis? *Int J Pancreatol* 2000; 28: 91-95
- 17 Baron TH, Morgan DE. Acute necrotizing pancreatitis. *N Engl J Med* 1999; 340: 1412-1417
- 18 Brown A. Prophylactic antibiotic use in severe acute pancreatitis: hemlock, help, or hype? *Gastroenterology* 2004; 126: 1195-1198
- 19 de Souza L, Sampietre SN, Figueiredo S, Yria Y, Machado MC, Pinotti HW. [Bacterial translocation in acute pancreatitis. Experimental study in rats. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo* 1996; 51: 116-120
- 20 Schwarz M, Thomsen J, Meyer H, Buchler MW, Beger HG. Frequency and time course of pancreatic and extrapancreatic bacterial infection in experimental acute pancreatitis in rats. *Surgery* 2000; 127: 427-432
- 21 Widdison AL, Karanjia ND, Reber HA. Antimicrobial treatment of pancreatic infection in cats. *Br J Surg* 1994; 81: 886-889
- 22 Foitzik TF, Fernandez-del Castillo C, Ferraro MJ, Mithofer K, Rattner DW, Warshaw AL. Pathogenesis and prevention of early pancreatic infection in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Ann Surg* 1995; 222: 179-185
- 23 Araida T, Frey CF, Ruebner B, Carlson J, King J. Therapeutic regimens in acute experimental pancreatitis in rats: effects of a protease inhibitor, a beta-agonist, and antibiotics. *Pancreas* 1995; 11: 132-140
- 24 Mithofer K, Fernandez-del Castillo C, Ferraro MJ, Lewandowski K, Rattner DW, Warshaw AL. Antibiotic treatment improves survival in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Gastroenterology* 1996; 110: 232-240
- 25 Sainio V, Kemppainen E, Puolakkainen P,

应用要点

本文综述SAP预防性使用抗生素的指征、时机及疗程. 并引用荟萃分析资料认为, 当前证据更倾向于推荐对胰腺坏死面积>30%或胆源性SAP患者早期开始预防性使用碳青霉烯类抗生素, 一般使用不超过3 wk.

同行评价
本文探索预防性
抗生素应用在
SAP综合治疗中
的价值,对临床治
疗具有指导意义。

- 26 Taavitsainen M, Kivisaari L, Valtonen V, Haaapiainen R, Schroder T, Kivilaakso E. Early antibiotic treatment in acute necrotizing pancreatitis. *Lancet* 1995; 346: 663-667
- 27 Delcenserie R, Yzet T, Ducroix JP. Prophylactic antibiotics in treatment of severe acute alcoholic pancreatitis. *Pancreas* 1996; 13: 198-201
- 28 Schwarz M, Isenmann R, Meyer H, Beger HG. Antibiotic use in necrotizing pancreatitis. Results of a controlled study. *Dtsch Med Wochenschr* 1997; 122: 356-361
- 29 Bassi C, Falconi M, Talamini G, Uomo G, Papaccio G, Derveniz C, Salvia R, Minelli EB, Pederzoli P. Controlled clinical trial of pefloxacin versus imipenem in severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1998; 115: 1513-1517
- 30 Takeda K, Matsuno S, Ogawa M, Watanabe S, Atomi Y. Continuous regional arterial infusion (CRAI) therapy reduces the mortality rate of acute necrotizing pancreatitis: results of a cooperative survey in Japan. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 216-220
- 31 Nordback I, Sand J, Saaristo R, Paajanen H. Early treatment with antibiotics reduces the need for surgery in acute necrotizing pancreatitis--a single-center randomized study. *J Gastrointest Surg* 2001; 5: 113-118; discussion 118-120
- 32 Manes G, Rabitti PG, Menchise A, Riccio E, Balzano A, Uomo G. Prophylaxis with meropenem of septic complications in acute pancreatitis: a randomized, controlled trial versus imipenem. *Pancreas* 2003; 27: e79-e83
- 33 Maravi-Poma E, Gener J, Alvarez-Lerma F, Olaechea P, Blanco A, Dominguez-Munoz JE. Early antibiotic treatment (prophylaxis) of septic complications in severe acute necrotizing pancreatitis: a prospective, randomized, multicenter study comparing two regimens with imipenem-cilastatin. *Intensive Care Med* 2003; 29: 1974-1980
- 34 Dambrauskas Z, Gulbinas A, Pundzius J, Barauskas G. Meta-analysis of prophylactic parenteral antibiotic use in acute necrotizing pancreatitis. *Medicina (Kaunas)* 2007; 43: 291-300
- 35 Dellinger EP, Tellado JM, Soto NE, Ashley SW, Barie PS, Dugernier T, Imrie CW, Johnson CD, Knaebel HP, Laterre PF, Maravi-Poma E, Kissler JJ, Sanchez-Garcia M, Utzolano S. Early antibiotic treatment for severe acute necrotizing pancreatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Ann Surg* 2007; 245: 674-683
- 36 Toouli J, Brooke-Smith M, Bassi C, Carr-Locke D, Telford J, Freeny P, Imrie C, Tandon R. Guidelines for the management of acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S15-S39
- 37 Uhl W, Warshaw A, Imrie C, Bassi C, McKay CJ, Lankisch PG, Carter R, Di Magno E, Banks PA, Whitcomb DC, Derveniz C, Ulrich CD, Satake K, Ghaneh P, Hartwig W, Werner J, McEntee G, Neoptolemos JP, Buchler MW. IAP Guidelines for the Surgical Management of Acute Pancreatitis. *Pancreatology* 2002; 2: 565-573
- 38 Bassi C, Larvin M, Villatoro E. Antibiotic therapy for prophylaxis against infection of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; : CD002941
- 39 Nathens AB, Curtis JR, Beale RJ, Cook DJ, Moreno RP, Romand JA, Skerrett SJ, Stapleton RD, Ware LB, Waldmann CS. Management of the critically ill patient with severe acute pancreatitis. *Crit Care Med* 2004; 32: 2524-2536
- 40 UK guidelines for the management of acute pancreatitis. *Gut* 2005; 54 Suppl 3: iii1-iii9
- 41 Clancy TE, Benoit EP, Ashley SW. Current management of acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2005; 9: 440-452
- 42 Werner J, Feuerbach S, Uhl W, Buchler MW. Management of acute pancreatitis: from surgery to interventional intensive care. *Gut* 2005; 54: 426-436
- 43 Consensus on the diagnosis and treatment of acute pancreatitis. *Chin J Dig Dis* 2005; 6: 47-51
- 44 Takeda K, Takada T, Kawarada Y, Hirata K, Mayumi T, Yoshida M, Sekimoto M, Hirota M, Kimura Y, Isaji S, Koizumi M, Otsuki M, Matsuno S. JPN Guidelines for the management of acute pancreatitis: medical management of acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2006; 13: 42-47
- 45 Otsuki M, Hirota M, Arata S, Koizumi M, Kawa S, Kamisawa T, Takeda K, Mayumi T, Kitagawa M, Ito T, Inui K, Shimosegawa T, Tanaka S, Kataoka K, Saisho H, Okazaki K, Kuroda Y, Sawabu N, Takeyama Y. Consensus of primary care in acute pancreatitis in Japan. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3314-3323
- 46 Banks PA, Freeman ML. Practice guidelines in acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2379-2400
- 47 AGA Institute medical position statement on acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2019-2021
- 48 Pederzoli P, Falconi M, Bassi C, Girelli R, Vesentini S, Martini N, Messori A. Ofloxacin penetration into bile and pancreatic juice. *J Antimicrob Chemother* 1989; 23: 805-807
- 49 Barie PS. A critical review of antibiotic prophylaxis in severe acute pancreatitis. *Am J Surg* 1996; 172: 385-435
- 50 Beger HG, Rau B, Isenmann R, Schwarz M, Gansauge F, Poch B. Antibiotic prophylaxis in severe acute pancreatitis. *Pancreatology* 2005; 5: 10-19
- 51 Büchler M, Malfertheiner P, Friess H, Isenmann R, Vanek E, Grimm H, Schlegel P, Friess T, Beger HG. Human pancreatic tissue concentration of bactericidal antibiotics. *Gastroenterology* 1992; 103: 1902-1908
- 52 Gianotti L, Munda R, Gennari R, Pyles R, Alexander JW. Effect of different regimens of gut decontamination on bacterial translocation and mortality in experimental acute pancreatitis. *Eur J Surg* 1995; 161: 85-92
- 53 Luiten EJ, Hop WC, Lange JF, Bruining HA. Controlled clinical trial of selective decontamination for the treatment of severe acute pancreatitis. *Ann Surg* 1995; 222: 57-65
- 54 Pezzilli R, Uomo G, Gabbriellini A, Zerbi A, Frulloni L, De Rai P, Castoldi L, Cavallini G, Di Carlo V. A prospective multicentre survey on the treatment of acute pancreatitis in Italy. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 838-846
- 55 González-González JA, Calderón-Lozano IE, Maldonado-Garza H, Mendoza-Fuerte E, Garza-Galindo AA, García-Cantú DA. Value of clinical criteria to indicate a CT-FNA in the diagnosis of infected acute pancreatitis. *Rev Gastroenterol Mex* 2007; 72: 104-112
- 56 Bukeirat FA, Swart SS, Mukdadi S. Acute pancreatitis: management update and future directions of pancreatic imaging. *W V Med J* 2007; 103: 24-28
- 57 Triantopoulou C, Lytras D, Maniatis P,

- Chrysovergis D, Manes K, Sifas I, Papailiou J, Dervenis C. Computed tomography versus Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II score in predicting severity of acute pancreatitis: a prospective, comparative study with statistical evaluation. *Pancreas* 2007; 35: 238-242
- 57 Olah A, Belagyi T, Issekutz A, Gamal ME, Bengmark S. Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89: 1103-1107
- 58 Ho HS, Frey CF. The role of antibiotic prophylaxis in severe acute pancreatitis. *Arch Surg* 1997; 132: 487-492; discussion 492-493
- 59 Schwarz M, Poch B, Isenmann R, Kriesse D, Rozdzinski E, Beger HG, Gansauge F. Effect of early and late antibiotic treatment in experimental acute pancreatitis in rats. *Langenbecks Arch Surg* 2007; 392: 365-370
- 60 Manes G, Uomo I, Menchise A, Rabitti PG, Ferrara EC, Uomo G. Timing of antibiotic prophylaxis in acute pancreatitis: a controlled randomized study with meropenem. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1348-1353
- 61 王化虹, 李纾, 孙亚萍, 郑悦, 赵霞, 成虹. 急性重症胰腺炎应用抗生素情况分析. *中国临床药理学杂志* 2005; 21: 151-153

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会征文通知

本刊讯 为满足全国专家、学者和临床一线医师对消化性病变介入/内镜新技术研究、探讨和交流的需求, 进一步提升国内消化系疾病尤其是消化道恶性病变介入/内镜诊治的技术水平, 上海同仁医院联合福建省肿瘤医院, 定于2008-11-7/12在福建省福州市举办第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会. 会议由福建省抗癌协会、福建省消化内镜学会和福建省放射学会介入学组具体承办. 中华消化内镜学杂志、中华放射学杂志、世界华人消化杂志和介入放射学杂志共同参与协办. 会议将着重介绍消化道病变内镜治疗、介入放射学治疗、肿瘤内外科治疗的新理论、新技术和新方法, 为各相关交叉学科之间的相互交流和研讨搭建一个平台. 本次会议拟安排相关学科的著名专家围绕食管、胆管和胃肠道等消化道管腔内支架治疗应用技术和发生的问题, 以及消化道病变的消化内镜、介入放射和内外科治疗新进展等热点课题进行精彩演讲及深入研讨. 会议中还将安排疑难案例讨论及手术操作演示, 内容精彩. 参会者将授予国家级一类继续医学教育学分10分.

1 征稿内容

消化道恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等; 消化系良性病变(如: 门静脉高压、胆道结石和消化道出血等)的内镜及介入新技术应用; 消化病诊治边缘交叉学科与消化介入诊治新技术相关的论著、文献综述、临床经验和个案报告等稿件.

2 征稿要求

(1)专题讲座由组委会约稿, 也可自荐, 需全文; (2)论著需1000字以内的标准论文摘要, 包括目的、方法、结果和结论四要素. 经验交流、短篇报道等全文限1000字以内; (3)所有稿件内容应科学、创新、实用、数据准确, 书写规范, 稿件应是未发表过的论文. 优秀论文将安排在国家级杂志上发表; (4)邮寄稿件要求Word格式打印, 并附软盘, 特别鼓励E-mail投稿(以附件Word格式传送); (5)截稿日期: 2008-08-31.

3 联系方式

林海澜, 350014, 福州市福马路凤坂马路顶91号福建省肿瘤医院介入科. hailan@pub2.fz.fj.cn; 手机: 13850171973, 电话: 0591-83660063-8428, 8017, 传真: 0591-83546120

施宏, 350014, 福州市福马路凤坂马路顶91号福建省肿瘤医院内镜科. endoshihong@hotmail.com; 手机: 13959105615, 电话: 0591-83660063-8428, 8017, 传真: 0591-83546120

重症急性胰腺炎早期液体复苏治疗及护理

黎贵湘, 黄才蓉, 吴灵, 万美华

背景资料
SAP起病急、进展快、并发症多、病死率高,是目前临床公认的危重难治性疾病。SAP早期,大量体液从消化道丢失及转移到第三间隙等多种因素导致有效循环血容量不足甚至低血容量性休克是本期重要的病理生理改变,也是患者早期死亡的主要原因之一。

黎贵湘, 黄才蓉, 吴灵, 万美华, 四川大学华西医院中西医结合科 四川省成都市 610041
作者贡献分布: 此课题由黎贵湘、黄才蓉、吴灵及万美华设计; 本论文写作由黎贵湘和万美华完成。
通讯作者: 万美华, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院中西医结合科, meihuawan@hotmail.com
电话: 028-85422556
收稿日期: 2007-11-15 修回日期: 2008-01-16

Early fluid resuscitation and nursing care of patients with severe acute pancreatitis

Gui-Xiang Li, Cai-Rong Huang, Ling Wu, Mei-Hua Wan

Gui-Xiang Li, Cai-Rong Huang, Ling Wu, Mei-Hua Wan, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Correspondence to: Mei-Hua Wan, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. meihuawan@hotmail.com
Received: 2007-11-15 Revised: 2008-01-16

Abstract

Effective circulating blood volume deficiency or even hypovolemic shock, due to large quantities of body fluid loss, can occur in the early stage of severe acute pancreatitis. This is induced by multiple factors, including losses from the digestive tract and shifts to the third space. Thus, it is critical to correct hypovolemic shock and prevent complications by early fluid resuscitation, which is closely related to the implementation of nursing care. This article describes the abnormal fluid distribution, fluid resuscitation and nursing care of patients with early-stage severe acute pancreatitis, providing a reference for the safe and efficient fluid resuscitation.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Fluid resuscitation; Treatment; Nursing care

Li GX, Huang CR, Wu L, Wan MH. Early fluid resuscitation and nursing of patients with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1452-1456

摘要

重症急性胰腺炎早期,大量体液从消化道丢失

及转移到第三间隙等多种因素导致有效循环血容量不足甚至低血容量性休克。早期积极的液体复苏对及时纠正低血容量性休克,防治全身并发症至关重要,而液体复苏的实施与护理工作密切相关。本文就重症急性胰腺炎早期液体异常分布的特点、早期液体复苏治疗及护理进行了评述,为对重症急性胰腺炎早期实施安全、有效的液体复苏提供参考。

关键词: 胰腺炎; 液体复苏; 治疗; 护理

黎贵湘, 黄才蓉, 吴灵. 重症急性胰腺炎早期液体复苏治疗及护理. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1452-1456
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1452.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是目前临床公认的危重难治性疾病^[1]容易并发多脏器功能障碍进而引起多脏器功能衰竭,后者是患者早期死亡的主要原因^[2-5]。SAP早期,大量体液从消化道丢失及转移到第三间隙等多种因素导致有效循环血容量不足甚至低血容量性休克是本期重要的病理生理改变,早期积极的液体复苏是及时纠正低血容量性休克,防治多脏器功能不全的关键因素之一^[6-8],而液体复苏的实施与护理工作密切相关。

1 SAP早期液体异常分布特点

SAP早期由于炎症介质和血管活性物质的产生和释放,毛细血管通透性明显增加,大量液体丢失到组织间隙、胸腹腔及肠腔等第三间隙,丢失的液体量可达到血容量的20%-30%,甚至更多,造成有效循环血容量锐减^[9-13];同时,由于发热出汗、频繁呕吐、胃肠减压等造成体液和电解质的额外丢失,使有效循环血容量进一步减少,全身血液浓缩,红细胞压积(hematocrit, HCT)升高,甚至发生低血容量性休克,导致严重的胰腺微循环障碍,并作为一种持续性损伤机制贯穿于SAP整个病程中^[14-18]。

2 SAP早期液体复苏治疗

SAP早期血容量严重不足,积极的液体复苏极为

同行评议者
刘改芳, 主任医师, 河北医科大学第三医院消化内科

重要。2002年曼谷会议指南把液体复苏列为SAP治疗措施之首, 要求在发病数小时内即补充足够的液体, 快速有效的液体复苏是预防SAP全身并发症的关键措施^[19-21]。由于SAP病情程度不一, 体液失衡的类型和程度也有很大的差异, 因而液体复苏应遵循个体化原则。诸多临床指标对于体液失衡的判断、指导补液方案的制定具有重要的临床意义, 一些特殊情况下的液体复苏更为复杂^[22]。

2.1 有效循环血容量判断的临床指标 准确判断患者的血容量状态是容量复苏的前提, 但对SAP患者的容量状态的临床估计常常是不足的^[23]。及时的血压、心率、尿量、尿比重和末梢灌注的监测、HCT和中心静脉压(central venous pressure, CVP)等血流动力学监测, 有助于判断患者的血容量状态^[24]。另外, 因SAP患者病情复杂, 还需充分考虑以下影响因素: (1)SAP早期体液大量丢失, 血容量明显减少, 有效循环血容量急剧下降, 平均动脉压可低于60 mmHg, 但病程早期因血管过度收缩可出现血压升高过程^[25]; (2)在肾功能正常的情况下, 尿量可作为判断血容量状况简便、实用、可靠性较强的指标, 但应注意排除高血糖渗透性利尿作用, 而误以为血容量已经补足; (3)CVP是在右心功能正常时判断血容量状况最好的指标, 但其测定受胸腔负压的影响较大, 机械通气压力较高、腹水、腹腔间室综合征导致腹内高压, 胸腔负压显著下降, CVP可明显升高^[26-28]; (4)机械通气压力不足、合并急性肺损伤、气道阻塞致呼吸增强、增快, 胸腔负压显著升高, 可致CVP明显降低^[29]; (5)在SAP早期, 由于患者烦躁、急性肺损伤等因素而出现张口呼吸, 加之血糖升高等因素使血浆渗透压升高, 即使血容量补足, 患者仍可表现出明显口渴及舌质干燥等症状; (6)因SAP呈高分解代谢状态, 部分患者虽有休克早期的表现但皮温不低甚至偏高, 这与其他低血容量休克导致的外周循环灌注不足有明显区别^[22,30]。因此, 判断SAP患者的血容量状态, 不能单看某一项指标, 而必须综合分析上述指标才能准确判断。

2.2 SAP早期液体复苏治疗 SAP早期血液浓缩持续时间越长, 对微循环、胰腺组织的损害越重, 预后可能越差。因此, 对已明确诊断或疑为SAP患者, 在其治疗之初无论是否存在低血压, 均应进行积极的早期液体复苏治疗, 及时纠正血液浓缩状态^[31-33], 以维持良好的胰腺血运, 改善胰

腺组织微循环, 避免胰腺继发性缺血坏死, 为SAP综合治疗打下良好的基础^[34-35]。

SAP早期水、电解质及酸碱失衡较复杂, 且变化快, 液体治疗需考虑以下问题^[36]: (1)补什么, 首先应分析患者有无水、电解质和酸碱失衡, 是何种类型的失衡; (2)补多少, 应根据临床判断和实验室检查结果计算补液总量和各种电解质补充量, 补液总量包括已丢失量、继续丢失量和当日需要量3个部分。特别是采用中西医结合治疗时, 在治疗的前3 d, 因采用了较强的通里攻下中药治疗, 患者大便次数和量均较多, 必然会增加液体的丢失, 故准确评估大便次数及量, 准确记录患者的继续丢失量, 对指导补液有重要参考意义。 (3)掌握好补液的程序和速度: SAP早期液体治疗的特点是量大, 种类多, 加之患者的病情复杂, 因此补液的程序和速度需要个体化, 注意边治疗、边监测、边调整; 补液程序上, 应先扩容, 尽快恢复有效循环血容量, 继而适当纠酸, 再酌情调整 K^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等紊乱; 补液种类上, 应先盐后糖, 先晶后胶, 维持正常体液渗透压, 见尿补钾, 有研究表明^[37]在SAP发病3-5 d内患者多处于全身炎症反应期上调阶段, 应以平衡盐等晶体液补充为主, 病情严重者需输入适量血浆代用品如贺斯和万汶等, 既可扩容亦能防止液体渗漏, 同时应注意补充维生素、微量元素; 补液速度上, 应先快后慢, 注意监测调整。

2.3 液体复苏要达到的指标 判断液体复苏的标准是以血液动力学稳定为基础, 以纠正氧代谢紊乱和防止多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)为目的, 目前尚缺乏简单、客观的方法来判断液体复苏是否达标。以往临床常依据生命体征、CVP、尿量等判断灌注是否充分, 但其并非敏感也不具特异性^[30]。目前心脏前后负荷、心肌收缩力的间接测定常作为指导液体复苏的准确指标, 从而达到氧的供需平衡^[38]。而混合静脉血氧饱和度(SvO_2)、血乳酸、碱缺乏、pH值则被认为是复苏成功的标志^[39], 尤其 SvO_2 被认为是早期复苏治疗达到血流动力学稳态的可靠指标^[40], 其可以通过肺动脉漂浮导管采右心房血进行检测, 但若患者无法下漂浮导管则可通过中心静脉导管测量中心静脉血饱和度($ScvO_2$), 其与 SvO_2 相关性甚好^[30]。

一旦临床诊断循环血容量不足, 应尽快积极液体复苏, 6 h内达到复苏目标: CVP 8-12

研发前沿
早期积极的液体复苏对及时纠正低血容量性休克, 防治全身并发症至关重要, 而液体复苏的实施与护理工作密切相关。

相关报道
2002年曼谷会议指南把液体复苏列为SAP治疗措施之首,要求在发病数小时内即补充足够的液体,快速有效的液体复苏是预防SAP全身并发症的关键措施。

cm H₂O, 平均动脉压 ≥ 65 mmHg, 尿量 ≥ 0.5 mL/(kg·h), 中心静脉或混合静脉血氧饱和度 $\geq 70\%$ ^[30]。机械通气和腹高压可导致患者胸腔内压增高,使CVP升高,对于这些患者,CVP 12-15 cm H₂O作为复苏目标^[41]。

2.4 特殊情况下的液体复苏问题

2.4.1 间质性肺水肿、脑水肿:对SAP合并间质性肺水肿、脑水肿患者,原则上应限制液体量,由于间质性肺水肿、脑水肿可发生在循环血容量尚未补足、已补足或容量过多等情况下,故应采取不同的治疗方案:(1)当CVP高于正常时,应给予静脉扩张剂如硝酸甘油,待血流动力学稳定后再给予强利尿剂;(2)CVP低于正常时,应先给予大剂量激素及胶体溶液,迅速将CVP升至正常,然后给予强利尿剂;(3)CVP在正常范围时,强利尿剂和胶体溶液可同时应用^[42]。原则上应保持每日出量大于入量的负平衡状态,负平衡的量目前没有具体的参考标准,应根据患者的生命体征和CVP等综合分析,有作者^[22]认为一般在500-2000 mL/d左右较为合适。间质性脑水肿还应给予20%甘露醇或25%甘油果糖以迅速降低颅内压。

2.4.2 急性肾功能障碍:SAP患者并发急性肾功能障碍的机制目前尚未完全明了,与早期有效循环血容量不足,肾缺血有密切关系^[43-47]。液体复苏治疗应根据血压、CVP、尿量的变化来确定补液量和速度,如尿量未增加而容量负荷过度扩张,易出现肺水肿、脑水肿,并可能加重稀释性低钠血症,水分向细胞内转移,肾组织细胞内水分增加,影响肾小球循环血量,进一步加重肾损害。可适量选择胶体液,并在液体给足的同时使用大剂量利尿药(速尿)和收缩内脏血管药(血管加压素)及直接扩张肾血管药(多巴胺)^[48-49]。

2.4.3 液体的负平衡:SAP早期,尤其是全身炎症上调期,严重的全身毛细血管渗漏综合征(systematic capillary leak syndrome, SCLS)导致机体液体异常分布,大量体液潴留于“第三间隙”,导致有效循环血量锐减,临床表现为低血容量性休克、急性肾功能不全甚至循环衰竭等一系列相应的症状,因此,为了维持循环的稳定和充足的尿量,输入的液体量必然多于排出量,临床上表现为液体正平衡^[50]。液体正平衡是SAP早期多脏器功能不全和诸多并发症发生及加重的重要因素之一,且正平衡持续时间和程度与预后直接相关^[30,51]。随着急性期炎症反应逐渐消退,

血管通透性逐渐改善,早期外渗的液体大量回入血管内,若疾病并未严重损害到心肺肾功能,血管内容量的增加会引起机体的自发性利尿,血容量趋于稳定。此时,临床上出现总出量大于总入量的液体负平衡,提示液体复苏的终点。临床一旦出现液体负平衡,应控制输液量,而不是盲目的追加液体量^[22,52]。

3 SAP早期液体复苏治疗的护理

SAP早期充分的液体复苏对于防止全身并发症至关重要,而液体复苏的实施与护理工作密切相关,护理的目的在于加强病情观察,遵医嘱及时完成液体复苏治疗计划,以维持水、电解质及酸碱平衡,防治休克^[53],为SAP综合治疗建立良好的基础,其护理重点如下:

3.1 快速开通静脉补液通路 SAP患者入院后应立即开通两路以上静脉同时输液,有条件者尽可能开通中心静脉通路,及时给予补液扩容抗休克治疗。中心静脉置管(CVC)的途径有锁骨下静脉、颈内静脉和股静脉。由于锁骨下静脉穿刺置管较颈内静脉易于固定,监测的CVP较股静脉准确、可靠,故以锁骨下静脉穿刺置管应用较多^[54]。近年来,在SAP患者中采用了经外周静脉置入中心静脉导管(peripherally inserted central catheter, PICC)的方法。PICC较锁骨下静脉穿刺置管简单、安全、方便、操作容易、患者痛苦小,可直接由护士操作,既可作为早期快速补液的通路及测量CVP^[55-56],又因其留置时间长,静脉炎的发生率较低^[57-60],可作为SAP整个病程的输液通路,同时也是进行全胃肠外营养治疗的良好途径^[61-64]。因此,PICC已逐渐广泛应用于SAP治疗中。

3.2 补液过程中的监护 SAP患者液体治疗量大、种类多,加之患者病情重、变化快,应注意补液过程中的监护,避免不良反应。监护内容有:(1)密切观察患者生命体征的变化,注意患者的神志、皮肤黏膜湿度、外周静脉充盈度、皮肤弹性、口干口渴、舌质舌苔、肺部啰音等。如患者出现心悸、气紧、咯泡沫痰、双肺满布湿啰音、心率快等表现,提示心功能不全或补液过快,需立即减慢输液速度,及时给予强心、利尿等处理。(2)准确记录出入量,观察小时尿量及尿比重,为补液计划的制定提供参考依据。(3)监测血液电解质、渗透压及血气分析,了解电解质及酸碱失衡的纠正情况。(4)监测CVP,更精确地指导和调整输液量及输液速度。SAP患者

由于各种炎症因子的影响, 肺毛细血管通透性增加, 极易在急性肺损伤基础上并发急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS), 大量快速补液可能会加速ARDS的发展, 并促发心衰, 因此在快速补液的同时必须监测CVP. 动态监测CVP的变化和密切观察患者的呼吸功能, 在快速补液和防止心功能不全两方面做好平衡^[65]. (5)监测HCT, 了解早期血液浓缩的纠正情况, 并对预测SAP具有重要意义. 研究发现^[15,66-69], 入院24 h HCT如果不下降, 则发生SAP的可能性将大大增加. (6)若患者末梢转暖, 口干、口渴、舌苔干裂好转, 脉搏变慢、有力, 血压上升、稳定或正常, 尿色逐渐转清和尿量增加, CVP正常, 提示体液补足, 循环改善.

3.3 加强输液通路的管理 加强输液通路的管理, 尤其是CVC和PICC的管理, 防止管道堵塞、滑脱、感染及空气栓塞的发生, 保证液体复苏治疗的顺利实施.

4 结论

SAP早期, 大量体液从消化道丢失及转移到第三间隙等多种因素导致有效循环血容量不足甚至低血容量性休克, 早期积极的液体复苏对及时纠正低血容量性休克, 防治全身并发症至关重要, 而液体复苏的实施与护理工作密切相关. 准确判断患者的血容量状态是容量复苏的前提, 血压、心率、尿量、尿比重、末梢灌注、HCT、CVP等的及时监测, 有助于判断患者的血容量状态, 但影响SAP患者血容量的因素较多, 故不能单一分析某项指标, 而必须综合分析上述指标才能准确判断其血容量状况. 液体复苏应遵循个体化原则, 注意一些特殊情况下的液体复苏, 并加强补液过程中的监护及输液通路的管理, 使SAP早期液体复苏能有效、安全地实施, 为SAP综合治疗建立良好的基础.

5 参考文献

- 1 夏庆, 黄宗文, 蒋俊明, 陈光远, 杨晓楠, 唐文富, 张肇达, 刘续宝, 胡伟明, 田伯乐, 李全生, 严律南, 罗传兴, 康焰, 袁朝新, 宋彬, 罗燕. 以“益活清下”为主的中西医结合综合疗法治疗重症急性胰腺炎1161例疗效报告. 中国中西医结合急救杂志 2006; 13: 131-134
- 2 张喜平, 王蕾. 重症急性胰腺炎并发肾损害的发病机制. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2364-2370
- 3 段美丽, 张淑文, 王宝恩. 急性胰腺炎患者并发MODS的机制探讨. 中华急诊医学杂志 2005; 14: 222-224
- 4 薛平, 黄宗文, 张鸿彦, 郭佳, 赵建蕾, 郑晓梅. 暴发性胰腺炎67例. 世界华人消化杂志 2005; 13: 680-681
- 5 黎介寿, 李维勤. 重症急性胰腺炎手术指征和时机的再认识. 中国实用外科杂志 2003; 13: 513
- 6 Banks PA. Practice guidelines in acute pancreatitis.

- 7 Am J Gastroenterol 1997; 92: 377-386
- 8 严律南. 重症急性胰腺炎的治疗. 中国实用外科杂志 2001; 21: 238-240
- 9 Liu XB, Jiang JM, Huang ZW, Tian BL, Hu WM, Xia Q, Chen GY, Li QS, Yuan CX, Luo CX, Yan LN, Zhang ZD. Clinical study on the treatment of severe acute pancreatitis by integrated traditional Chinese medicine and Western medicine. *Sichuan Daxue Xuebao Yixueban* 2004; 35: 204-208
- 10 陶京, 王春友. 重症急性胰腺炎早期临床救治的几个重要方面. 肝胆外科杂志 2005; 13: 11-13
- 11 吴新民, 马四清, 叶成杰. 高原重症急性胰腺炎早期并发多脏器功能障碍综合征的危险因素及治疗策略. 胰腺病学 2007; 7: 6-8
- 12 刘宝, 潘爱军, 周树生, 王华, 邵敏, 张琳琳. 重症急性胰腺炎的早期个体化综合治疗 - 附110例分析. 中国危重病急救医学 2006; 18: 169-171
- 13 屈振亮, 傅强, 夏庆. 重症急性胰腺炎中西医结合诊治常规(草案). 中国中西医结合外科杂志 2007; 13: 232-237
- 14 Isenmann R, Henne-Bruns D, Adler G. Gastrointestinal disorders of the critically ill. Shock and acute pancreatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 345-355
- 15 江从庆, 艾中立, 刘志苏, 何跃明, 孙权, 徐睿, 樊利芳. 重症急性胰腺炎的早期危险因素 - 血液浓缩. 中国实用外科杂志 2001; 21: 666-667
- 16 何志刚, 季峰, 邵爱仙, 田华. 红细胞压积对重症急性胰腺炎早期识别的临床价值. 临床内科杂志 2005; 22: 122-123
- 17 夏亮, 吕农华. 胰腺微循环障碍与重症急性胰腺炎发病的关系. 中华消化杂志 2006; 26: 284-286
- 18 汪佩文, 何之彦, 袁晓春, 解学乾, 吴坚炯, 姜海琼, 王兴鹏. 急性胰腺炎时胰腺血循环变化的临床和影像学研究. 中华消化杂志 2005; 25: 469-472
- 19 于洪亮, 郑荣哲, 杨维良. 重症急性胰腺炎微循环障碍的治疗现状. 国际外科学杂志 2007; 34: 685-688
- 20 韩斌如, 冯新玮, 王欣然. 26例重症急性胰腺炎并发腹腔间室综合征患者的护理. 中华护理杂志 2007; 42: 213-215
- 21 方裕强, 吴丽颖, 程礼, 蒋海飏, 王兴鹏, 许国铭. 急性胰腺炎诊治指南(二). 胰腺病学 2002; 2: 103-109
- 22 Yousaf M, McCallion K, Diamond T. Management of severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2003; 90: 407-420
- 23 常文明, 夏庆, 杨晓楠. 重症急性胰腺炎有效循环血量判断的临床指标及特殊情况下的补液问题. 华西医学 2005; 20: 542-543
- 24 邱海波. 重症急性胰腺炎的救治. 中华急诊医学杂志 2006; 15: 191-192
- 25 张圣道, 许志伟, 雷若庆. 当前影响重症急性胰腺炎治疗效果的一些关键问题. 肝胆胰外科杂志 2006; 18: 335-336
- 26 夏天, 严律南. SAP血流动力学变化特点与液体复苏应注意的问题. 中国实用外科杂志 2003; 23: 524-526
- 27 吕秀艳, 李晓华, 吴医学. 影响中心静脉压测定的相关因素及护理干预. 现代护理 2007; 13: 2755-2756
- 28 吴庆珠, 李爱军, 方小君, 吴桂真. CVP监测在心脏手术后患者监护中的应用. 国际医药卫生导报 2006; 12: 96
- 29 薛平, 黄宗文, 张鸿彦, 游真, 李永红, 郭佳. 重症急性胰腺炎并发休克的临床探讨. 华西医学 2006; 21: 441-442
- 30 朱蕾. 判断有效循环血容量时需注意的几个问题. 中国呼吸与危重监护杂志 2003; 2: 323-324
- 31 区金锐, 侯宝华. 重症急性胰腺炎早期液体复苏. 中国实用外科杂志 2007; 27: 613-615
- 32 王喜艳, 徐新建, 温浩, 陈启龙, 李俊. 重症急性胰腺炎

应用要点

本文就重症急性胰腺炎早期液体异常分布的特点、早期液体复苏治疗及护理进行了评述, 为重症急性胰腺炎早期实施安全、有效的液体复苏提供参考.

同行评价
本文立题实用, 条理清楚, 从护理的角度阐述问题全面, 对临床SAP患者早期护理有一定帮助。

- 急性反应期体液代谢变化的初步观察. 中国普通外科杂志 2004; 13: 780-782
- 32 巫协宁. 重症胰腺炎的规范化治疗和治疗策略. 中华消化杂志 2001; 21: 300-302
- 33 张建庆, 姜庆贺, 张晋芬. 重症急性胰腺炎42例早期救治体会. 济宁医学院学报 2007; 30: 264
- 34 朱家沂, 王亚东, 周鹏, 沈洪章, 刘宏喜, 侯俊民, 杨列, 张鸣. 早期液体复苏、肠道去污联合肠内营养治疗重症急性胰腺炎的临床研究. 中华急诊医学杂志 2006; 15: 1035-1037
- 35 张喜平, 李志军. 改善微循环障碍药物在治疗急性胰腺炎中的应用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1867-1871
- 36 张肇达, 严律南, 刘续宝. 急性胰腺炎. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 143
- 37 王春友. 进一步细化重症急性胰腺炎治疗方案的几个重要方面. 临床外科杂志 2006; 14: 11-13
- 38 Nguyen HB, Rivers EP, Havstad S, Knoblich B, Ressler JA, Muzzin AM, Tomlanovich MC. Critical care in the emergency department: A physiologic assessment and outcome evaluation. *Acad Emerg Med* 2000; 7: 1354-1361
- 39 Elliott DC. An evaluation of the end points of resuscitation. *J Am Coll Surg* 1998; 187: 536-547
- 40 Gattinoni L, Brazzi L, Pelosi P, Latini R, Tognoni G, Pesenti A, Fumagalli R. A trial of goal-oriented hemodynamic therapy in critically ill patients. SvO₂ Collaborative Group. *N Engl J Med* 1995; 333: 1025-1032
- 41 孙家邦, 王亚军. 重症急性胰腺炎的早期处理. 首都医科大学学报 2007; 28: 42-46
- 42 汤耀卿. 重症急性胰腺炎的监测与治疗. 中国实用外科杂志 2003; 23: 62-64
- 43 张西亮, 丁辉. 重症急性胰腺炎并发肾脏损害的相关因素分析. 中国医师进修杂志 2007; 30: 51-52
- 44 张鸿彦, 夏庆. 重症急性胰腺炎并发急性肾功能衰竭44例. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1462-1463
- 45 王国品. 重症急性胰腺炎时肾损伤的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2542-2545
- 46 程国祚, 张建新, 李龙, 瞿建国, 王旭青. 急性坏死性胰腺炎大鼠肾损害与肾微循环的动态变化. 肝胆外科杂志 2002; 10: 310-312
- 47 童智慧, 虞文魁, 李维勤, 叶向红, 王晓东, 燕晓雯, 刘海燕, 黎介寿. 重症急性胰腺炎合并急性肾功能衰竭54例临床分析. 中国实用外科杂志 2006; 26: 350-352
- 48 徐秋萍, 平宝坤, 陈周闻, 张舸, 丁晨彦. 急性肾功能衰竭的综合药物治疗研究. 中国急救医学 2002; 22: 101-102
- 49 蔡为民, 张彬彬. 肝肾综合征的治疗. 临床肝胆病杂志 2004; 20: 67-68
- 50 李玉坤, 罗勇, 杨闻晓. 液体负平衡对重症胰腺炎患者预后的意义. 中国现代医学杂志 2007; 17: 1481-1482
- 51 邹岩, 黄伯华, 王森, 唐剑星. 急性坏死性胰腺炎临床病理分期和治疗措施. 世界华人消化杂志 1998; 6: 426
- 52 方力争, 金燕, 朱涛. 液体负平衡在重症急性胰腺炎治疗中的意义. 中国急救医学 2004; 24: 231
- 53 杨梅, 程桂兰, 黎贵湘, 涂霖. 中西医结合治疗急性胰腺炎液体疗法的护理. 四川中医 2000; 18: 22-23
- 54 黎贵湘, 涂霖. 32例锁骨下静脉穿刺置管的护理. 华西医学 1997; 12: 443-445
- 55 马冬萍, 余咏梅. 应用PICC导管测量中心静脉压的方法. 护士进修杂志 2004; 19: 1075
- 56 张爱珍, 李荣杰, 柳凯芹. PICC在重危患者抢救中的应用体会. 护士进修杂志 2005; 20: 275-276
- 57 谢红英, 毛君晓, 丁梅, 王凤珍, 李珍. 经外周穿刺中心静脉置管测定中心静脉压的应用研究. 中国实用护理杂志 2007; 23: 47-48
- 58 李薇薇. 外周置入中心静脉置管在ICU的应用和护理. 现代中西医结合杂志 2007; 16: 5041-5042
- 59 董建英, 王阿莉, 李勇, 毕越英. 经外周静脉置入中心静脉导管的国内外进展. 现代护理 2006; 12: 1199-1201
- 60 汪素萍, 钟小青, 游晓燕, 潘年妙, 黄年娇, 黄萍, 何青竹. PICC与锁骨下静脉置管的比较研究. 护理学杂志 2005; 20: 15-16
- 61 童莉. 经外周静脉穿刺中心静脉置管应用于胃肠外营养. 中国临床营养杂志 2007; 15: 319-323
- 62 彭娜, 江晓林, 李显敏. 恶性肿瘤患者经PICC行全胃肠外营养的护理体会. 重庆医学 2007; 36: 2073-2074
- 63 张静. PICC在内科重症监护室的应用及观察. 护士进修杂志 2002; 17: 785-786
- 64 王静茹, 李拉秀. PICC管常见并发症的预防及处理. 护士进修杂志 2007; 22: 659-660
- 65 寻华音, 陈建萍, 许晓红. 重症急性胰腺炎患者休克期治疗的护理. 现代实用医学 2006; 18: 919-920
- 66 郭健政. 早期红细胞压积、血糖变化对老年重症急性胰腺炎早期识别的临床价值. 苏州大学学报(医学版) 2007; 27: 390-392
- 67 史立军, 李双星, 王秀洁. 血细胞比容变化对重症急性胰腺炎的诊断意义. 中国急救医学 2007; 27: 519-520
- 68 张锦华, 金安琴, 缪连生. 早期红细胞压积变化对重症急性胰腺炎及并发症的预测价值. 中华消化杂志 2004; 24: 181-182
- 69 Baillargeon JD, Orav J, Ramagopal V, Tenner SM, Banks PA. Hemoconcentration as an early risk factor for necrotizing pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2130-2134

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志网络版的发表前链接

本刊讯 本刊即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文, 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程.(常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

重症急性胰腺炎合并腹内高压的研究进展

朱林

朱林, 四川大学华西医院中西医结合科 四川省成都市 610041
通讯作者: 朱林, 610041, 四川省成都市黄门后街37号, 四川大学华西医院中西医结合科. cloudrambler@163.com
电话: 028-85423546
收稿日期: 2007-11-15 修回日期: 2008-04-07

Advances in intra-abdominal hypertension due to severe acute pancreatitis

Lin Zhu

Lin Zhu, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Correspondence to: Lin Zhu, Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, West China Hospital, Sichuan University, 37 Huangmen Backstreet, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. cloudrambler@163.com
Received: 2007-11-15 Revised: 2007-04-07

Abstract

Intra-abdominal hypertension due to severe acute pancreatitis (SAP) has attracted more and more attention of clinicians. It directly influences the treatment and prognosis of SAP and, moreover, becomes an important marker for judging the prognosis of SAP. The mechanism of intra-abdominal hypertension due to SAP is consistent with that of primary intra-abdominal hypertension. In this article, the definition, pathophysiology, and prognosis of intra-abdominal hypertension are reviewed.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Intra-abdominal hypertension

Zhu L. Advances in intra-abdominal hypertension due to severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1457-1460

摘要

重症急性胰腺炎中的腹内高压已引起越来越多临床医生的关注, 其直接影响着重症急性胰腺炎本身的治疗和预后, 并且已经作为判定重症急性胰腺炎预后的重要指标之一. 重症急性胰腺炎并发腹内高压的发生机制与原发

内高压相符合. 本文就腹内高压的定义、病理生理以及预后等相关概念进行综述.

关键词: 重症急性胰腺炎; 腹内高压

朱林. 重症急性胰腺炎合并腹内高压的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16(13): 1457-1460
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1457.asp>

0 引言

腹腔间隙综合征(abdominal compartment syndrome, ACS)常见于各种危重疾病, 他影响心、肺、肝、肾、神经等全身各系统及腹腔脏器的血流, 并进一步影响各器官功能. 外科危重病状态是发生ACS的主要原因, 其发生发展具有一定的隐匿性, 常被原发病或其他征象所掩盖; 膀胱压(UBP)测定是诊断ACS的重要指标, $UBP \geq 20-25$ mmHg, 伴有少尿、无尿, 呼吸困难, 吸气压增高, 血压降低时应诊断为ACS. 在重症急性胰腺炎发生多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)过程中起重要作用. 降低腹内压对改善症状、逆转器官功能, 以提高患者的存活率.

1 腹内高压和ACS的认识

随着最近10年临床医师对腹内压力的关注, 关于腹内高压的认识也不断深化. 2004-12在澳大利亚举行的腹腔间隙综合征国际会议, 就腹内高压和ACS的相关问题达成了一致^[1].

1.1 腹内压力(intraabdominal pressure, IAP) 指来自腹腔内的压力, 可随着呼吸运动变化. 在生理情况下, IAP的正常值大约为5 mmHg, 肥胖可使IAP增高. IAP的检测需要在呼气末和仰卧体位, 并且腹肌要松弛. 在检测腹内压时, 传感器需要在腋中线调零. 直接检测IAP的金标准是细针的腹腔穿刺直接检测IAP, 可通过腹膜透析或腹腔镜实现; 间接检测IAP的金标准是通过膀胱压力的检测, 间接反映IAP; 间接持续监测腹内压力可通过胃管或膀胱的持续液体灌入, 通过液体传导IAP. 腹腔灌注压(abdominal perfusion

背景资料
重症急性胰腺炎的腹内高压越来越受到临床医生的关注, 相关的病理生理和治疗都发展迅速. 了解腹内高压的进展对临床医生认识重症急性胰腺炎的病理生理会有很大帮助.

同行评议者
邢光明, 教授, 大连医科大学附属二院普通外科

研发前沿
腹内压力的动态监测的临床普及,以及腹内高压的治疗手段的丰富,是该领域研究的热点。传统的中药口服和灌肠治疗能否治疗腹内高压是亟待解决的问题。

pressure, APP) = 平均动脉压-IAP.

1.2 定义和分类 腹内高压至少满足以下两个条件之一: (1) IAP ≥ 12 mmHg (至少用上述三种检测方法之一检测4-6 h以上) 分级标准 I 级: 12-15 mmHg; II 级: 16-20 mmHg; III 级: 21-25 mmHg; IV 级: >25 mmHg. (2) 腹腔灌注压 ≤ 60 mmHg; (至少用上述3种检测方法之一检测1-6 h以上). ACS为 IAP ≥ 20 mmHg伴有或不伴有腹腔灌注压 ≤ 50 mmHg (至少用上述3种检测方法之一检测1-6 h以上) 并且继发有一个或多个器官功能衰竭。我们可以看出相对于腹内高压, ACS除了在程度上升高以外, 更强调伴随有器官衰竭, 并且ACS不能分级, 呈全或无现象。

腹内高压按发生时间可分为: (1) 超急性: 多数为生理状态, 持续几秒或几分钟, 包括笑、咳嗽、打喷嚏、排便等; (2) 急性: 一般在1 h以内发生: 包括创伤、腹腔内出血和其他任何原因(例如腹主动脉瘤破裂); (3) 亚急性: 一般在1 d以内发生, 多数为医源性因素, 包括液体复苏和毛细血管渗漏; (4) 慢性: 一般在几个月或几年发生: 包括病理性肥胖、腹腔内巨大肿瘤(卵巢巨大囊肿或纤维瘤)、慢性腹水患者(肝硬化、长期接受腹膜透析的患者)或怀孕。

ACS按病位可分为: (1) 原发性: 疾病或创伤来自于腹腔-骨盆区域, 如重症急性胰腺炎、脾破裂和骨盆出血等; (2) 继发性: 疾病不是来源于腹腔, 如肺炎引起的败血症和毛细血管渗漏, 大面积烧伤或其他需要大量液体复苏(24 h >5000 mL)的疾病等; (3) 第三类: 通过内科或外科治疗仍不能缓解, 如通过外科开腹减压术仍然存在或属于原发性、继发性仍旧复发。

1.3 病理生理和器官功能评估 生理情况下, 腹壁具有很好的顺应性, 可耐受一定的液体或气体负荷。但由于各种病因(炎症或液体复苏等)造成腹腔间隙容量超过负荷, 使腹腔的这种顺应性减弱, 可发生腹内高压以致ACS。腹内高压能导致多种器官的病理生理改变, 甚至器官衰竭, 可按一定的标准评价器官的功能, 了解器官的损伤程度。 (1) 神经系统: 有多个动物实验证实两者存在正相关^[2-5]。但是具体机制不明, 目前的假说认为腹内高压造成横膈上移, 胸膜压力增高, 中心静脉压增高, 脑静脉流量降低, 造成脑实质的充血水肿, 颅内压增高。神经系统的损伤程度可用格拉斯哥昏迷指数(glasgow coma scale)评价, 格拉斯哥昏迷指数 <10 为器官衰竭的表现, 格拉斯哥昏迷指数 <13 是器官功能不全的表现。 (2) 心

血管系统: 腹内高压造成了回心血量和心输出量减少, 全身静脉尤其是肺静脉的容量增加, 心率可以正常或增加, 平均动脉压先增加后降低, 肺动脉压力增加, 左心室的顺应性和动力降低。可导致左心衰竭、水肿和肺动脉栓塞等并发症^[6]。心血管系统损伤程度由血管活性药物的使用评价, 心功能衰竭以多巴胺使用 >5 mg/(kg·min)或者为标准, 心功能不全以多巴胺使用 >5 mg/(kg·min)。 (3) 呼吸系统: 腹内高压是造成患者发生急性肺损伤或急性呼吸衰竭最重要的病因^[7-9]。病理生理机制主要包括腹内高压可造成胸部弹性降低和胸膜压力增高, 肺顺应性降低, 气道阻力增加, 潮气量降低。即使已经接受呼吸机支持治疗的患者, 在腹内高压或者腹腔间隙综合征的状态下也有继续发生急性肺损伤或急性呼吸衰竭的危险。PaO₂/FiO₂比值 <200 并且有呼吸机支持的必要为呼吸衰竭的评价标准, PaO₂/FiO₂比值 <300 不需要呼吸机支持为呼吸功能障碍的评价标准。 (4) 肾脏: 腹内高压造成的肾功能损害是众多器官中最早被认识的, 腹内高压可以减少肾脏血流量和血浆滤过率, 还能减少肾脏灌注压和滤过梯度^[6]。但是确切的腹内高压造成肾功能损害的机制仍不清楚, 有学者观察到许多患者在腹内压力升高之前肾功能已经发生了损害^[10]。肾功衰竭的标准以血肌酐 >3.5 mg/dL(300 mmol/L), 肾功能不全以血肌酐 ≥ 2 mg/dL(170 mmol/L)为标准。 (5) 胃肠系统: 腹内高压可造成胃肠组织的渗透压增高, 内脏缺血, 加快细菌移位。在动物实验中证实增高腹内压力, 可在肠系膜淋巴结、肝脏、脾脏发现增高的菌落计数^[11-12]。学者们也在动物实验中发现当腹内压力 >20 mmHg, 包括胃肠在内的多个消化器官都会缺血^[13]。由于腹内高压可以引起细菌移位和内脏缺血, 所以可释放大量的炎症因子, 可造成二次打击引起多器官功能不全或多器官衰竭^[14]。腹内高压合并内脏缺血释放的炎症因子, 远远大于单独腹内高压或者单独内脏缺血再灌注损伤释放的炎症因子^[15]。胃肠系统功能衰竭目前无特异性的评价标准, 我们在临床工作中常以监测患者胃肠动力是否恢复作为胃肠功能的评价标准。 (6) 肝脏: 腹内高压多数学者认为可以降低肝脏门静脉血流量^[16], 降低肝动脉血流^[17], 还可由于门脉高压引起肝硬化和食道静脉曲张^[18], 肝功衰竭的评价指标以血浆中的总胆红素 ≥ 6 mg/dL(10^2 mmol/L)为标准, 肝功不全以血浆中的总胆红素 ≥ 2 mg/dL(33 mmol/L)为标准, 但

创新盘点
本文详细介绍了腹内高压引起器官衰竭的病理生理, 为中西医结合治疗重症急性胰腺炎提出腹内压力这个新的临床指标。

需要排除各种肝胆基础疾病引起的黄疸。

2 重症急性胰腺炎合并腹内高压或ACS

2.1 病因和病理生理特点 重症急性胰腺炎并发腹内高压的发生机制符合原发性腹内高压的特点,是由于胰腺炎症和医源性大量的液体复苏引起腹腔广泛的炎性渗出导致的内脏水肿、麻痹性肠梗阻和胰源性腹水,引起的腹腔顺应性改变^[19]。腹内高压在重症急性胰腺炎的发生率大约为40%, ACS的发生率大约为10%。腹内高压已经作为判定重症急性胰腺炎预后的重要指标之一^[20]。重症急性胰腺炎合并腹内高压最易发生衰竭的器官依次是肺(95%), 心血管(91%), 肾脏(86%)^[21]。发生器官衰竭机制除了腹内高压本身导致的病理生理改变外,还包括重症急性胰腺炎本身的炎症级联反应引起的多器官功能损害,有动物实验证明炎症反应合并腹内高压比单纯炎症反应或单纯腹内高压释放的炎性介质多^[15]。所以重症急性胰腺炎合并腹内高压导致的器官损害机制可能不是分别两者作用的累加,可能有放大的作用。

2.2 治疗方法和循证医学证据级别 重症急性胰腺炎合并腹内高压或ACS的治疗方法包括: A级证据: 开腹减压手术或腹腔镜减压手术^[22]; C级证据: (1)经皮导管引流^[23], (2)血液滤过^[24]; E级证据: (1)生长抑素^[25], (2)腹腔穿刺术, (3)保留胃管, (4)灌肠, (5)胃肠动力药(红霉素、胃复安、西沙比利、吗丁啉), (6)结肠动力药(新斯的明), (7)利尿药或联用20%人体白蛋白, (8)镇静, (9)箭毒化, (10)改变体位, (11)肉毒杆菌毒素肛门括约肌注射。

目前手术仍然是缓解腹内高压的首选治疗方法。但手术本身也有很多的并发症和很高的死亡率,有报道死亡率高达49%^[26],且很难选择明确的手术指针。而重症急性胰腺炎合并腹内高压的保守治疗方法循证证据级别都较低,对临床指导意义不大,高质量的关于重症急性胰腺炎合并腹内高压的保守治疗方法的临床试验是目前迫切需要的。

3 结论

单纯重症急性胰腺炎或单纯腹内高压的造模方法较成熟,但重症急性胰腺炎并发腹内高压的动物模型面临许多问题。如果在重症急性胰腺炎动物模型的基础上通过向腹腔打气或注水等方法建立腹内高压模型,一方面会加速实验动

物的死亡,另一方面也违背重症急性胰腺炎并发腹内高压的病理生理过程。结合腹内高压的病因,给重症急性胰腺炎动物模型进行大量的液体复苏应该是可以尝试的一种方法。我们知道腹内高压在重症急性胰腺炎中发生的流行病学,但什么样的重症急性胰腺炎才会发生腹内高压?与本身重症急性胰腺炎的全身损害释放入血的炎性因子有关还是和重症急性胰腺炎局部的腹腔损害有关?以及腹内高压和胃肠麻痹的关系?重症急性胰腺炎合并腹内高压还有很多不清楚的病理生理机制需要动物实验去解决。英国一项腹腔压力监测调查表明,在全英国ICU病房93.2%患者都进行了腹腔压力监测,3.8%患者急诊腹部手术后进行了监测,2.9%患者在急诊手术和大量液体复苏的情况下进行了监测^[27]。而我国腹腔压力的监测还未普遍开展起来。其次是重症急性胰腺炎需要大量液体复苏的情况下,如何通过适度的补液来预防或减轻腹内高压?再次,在重症急性胰腺炎合并腹内高压的保守治疗方法上,我科普遍采用的中西结合方法,例如中药灌肠或新斯的明穴位注射等方法虽然有很好的临床疗效,但能否改善腹内高压?

总之,重症急性胰腺炎并发腹内高压或腹腔间隙综合征还有很多的基础和临床问题需要我们不断的摸索和探索,我们需要在实践中不断加深认识。

4 参考文献

- 1 Balogh Z, Jones F, D'Amours S, Parr M, Sugrue M. Continuous intra-abdominal pressure measurement technique. *Am J Surg* 2004; 188: 679-684
- 2 Josephs LG, Este-McDonald JR, Birkett DH, Hirsch EF. Diagnostic laparoscopy increases intracranial pressure. *J Trauma* 1994; 36: 815-818; discussion 818-819
- 3 Holthausen UH, Nagelschmidt M, Troidl H. CO(2) pneumoperitoneum: what we know and what we need to know. *World J Surg* 1999; 23: 794-800
- 4 Bloomfield GL, Ridings PC, Blocher CR, Marmarou A, Sugerman HJ. Effects of increased intra-abdominal pressure upon intracranial and cerebral perfusion pressure before and after volume expansion. *J Trauma* 1996; 40: 936-941; discussion 941-943
- 5 Saggi BH, Bloomfield GL, Sugerman HJ, Blocher CR, Hull JP, Marmarou AP, Bullock MR. Treatment of intracranial hypertension using nonsurgical abdominal decompression. *J Trauma* 1999; 46: 646-651
- 6 Malbrain ML. Is it wise not to think about intraabdominal hypertension in the ICU? *Curr Opin Crit Care* 2004; 10: 132-145
- 7 Gattinoni L, Pelosi P, Suter PM, Pedoto A, Vercesi P, Lissoni A. Acute respiratory distress syndrome caused by pulmonary and extrapulmonary disease. Different syndromes? *Am J Respir Crit Care Med*

应用要点
腹内压力的动态监测将会成为重症急性胰腺炎的一个临床普及的新的监测指标。

同行评价
本文从一较新的
概念着眼, 探讨临
床疑难病症的病
生和治疗, 选题有
创新, 对临床具有
重要的意义。

- 1998; 158: 3-11
- 8 Ranieri VM, Brienza N, Santostasi S, Puntillo F, Mascia L, Vitale N, Giuliani R, Memeo V, Bruno F, Fiore T, Brienza A, Slutsky AS. Impairment of lung and chest wall mechanics in patients with acute respiratory distress syndrome: role of abdominal distension. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 1082-1091
- 9 Rouby JJ, Puybasset L, Nieszkowska A, Lu Q. Acute respiratory distress syndrome: lessons from computed tomography of the whole lung. *Crit Care Med* 2003; 31: S285-S295
- 10 Sugrue M, Jones F, Lee A, Buist MD, Deane S, Bauman A, Hillman K. Intraabdominal pressure and gastric intramucosal pH: is there an association? *World J Surg* 1996; 20: 988-991
- 11 Gargiulo NJ 3rd, Simon RJ, Leon W, Machiedo GW. Hemorrhage exacerbates bacterial translocation at low levels of intra-abdominal pressure. *Arch Surg* 1998; 133: 1351-1355
- 12 Diebel LN, Dulchavsky SA, Brown WJ. Splanchnic ischemia and bacterial translocation in the abdominal compartment syndrome. *J Trauma* 1997; 43: 852-855
- 13 Caldwell CB, Ricotta JJ. Changes in visceral blood flow with elevated intraabdominal pressure. *J Surg Res* 1987; 43: 14-20
- 14 Rezende-Neto JB, Moore EE, Melo de Andrade MV, Teixeira MM, Lisboa FA, Arantes RM, de Souza DG, da Cunha-Melo JR. Systemic inflammatory response secondary to abdominal compartment syndrome: stage for multiple organ failure. *J Trauma* 2002; 53: 1121-1128
- 15 Oda J, Ivatury RR, Blocher CR, Malhotra AJ, Sugerman HJ. Amplified cytokine response and lung injury by sequential hemorrhagic shock and abdominal compartment syndrome in a laboratory model of ischemia-reperfusion. *J Trauma* 2002; 52: 625-631; discussion 632
- 16 Kotzampassi K, Paramythiotis D, Eleftheriadis E. Deterioration of visceral perfusion caused by intra-abdominal hypertension in pigs ventilated with positive end-expiratory pressure. *Surg Today* 2000; 30: 987-992
- 17 Schäfer M, Sägger H, Reichen J, Krähenbühl L. Alterations in hemodynamics and hepatic and splanchnic circulation during laparoscopy in rats. *Surg Endosc* 2001; 15: 1197-1201
- 18 Caldwell CB, Ricotta JJ. Changes in visceral blood flow with elevated intraabdominal pressure. *J Surg Res* 1987; 43: 14-20
- 19 Leppaniemi A, Johansson K, De Waele JJ. Abdominal compartment syndrome and acute pancreatitis. *Acta Clin Belg Suppl* 2007; : 131-135
- 20 Rosas JM, Soto SN, Aracil JS, Cladera PR, Borlan RH, Sanchez AV, Ros FB, Posa LG. Intra-abdominal pressure as a marker of severity in acute pancreatitis. *Surgery* 2007; 141: 173-178
- 21 De Waele JJ, Hoste E, Blot SI, Decruyenaere J, Colardyn F. Intra-abdominal hypertension in patients with severe acute pancreatitis. *Crit Care* 2005; 9: R452-R457
- 22 Barnes GS, Papasavas PK, O'Mara MS, Urbandt J, Hayetian FD, Gagne DJ, Newton ED, Caushaj PF. Modified extraperitoneal endoscopic separation of parts for abdominal compartment syndrome. *Surg Endosc* 2004; 18: 1636-1639
- 23 Reckard JM, Chung MH, Varma MK, Zagorski SM. Management of intraabdominal hypertension by percutaneous catheter drainage. *J Vasc Interv Radiol* 2005; 16: 1019-1021
- 24 Oda S, Hirasawa H, Shiga H, Matsuda K, Nakamura M, Watanabe E, Moriguchi T. Management of intra-abdominal hypertension in patients with severe acute pancreatitis with continuous hemodiafiltration using a polymethyl methacrylate membrane hemofilter. *Ther Apher Dial* 2005; 9: 355-361
- 25 Kacmaz A, Polat A, User Y, Tilki M, Ozkan S, Sener G. Octreotide: a new approach to the management of acute abdominal hypertension. *Peptides* 2003; 24: 1381-1386
- 26 Torrie J, Hill AA, Streat S. Staged abdominal repair in critical illness. *Anaesth Intensive Care* 1996; 24: 368-374
- 27 Ravishankar N, Hunter J. Measurement of intra-abdominal pressure in intensive care units in the United Kingdom: a national postal questionnaire study. *Br J Anaesth* 2005; 94: 763-766

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。(常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

异丙酚对缺血再灌注大鼠肠黏膜的保护作用

李琳, 张丽, 赵京禹, 郝建华, 李平

李琳, 张丽, 赵京禹, 郝建华, 李平, 中国人民解放军总医院第一附属医院麻醉科 北京市 100037
通讯作者: 李琳, 100037, 北京市海淀区阜成路51号, 中国人民解放军总医院第一附属医院麻醉科. zoubai185@163.com
收稿日期: 2008-02-15 修回日期: 2008-03-25

Protective effect of propofol on intestinal mucosa in rats with gut ischemia-reperfusion

Lin Li, Li Zhang, Jing-Yu Zhao, Jian-Hua Hao, Ping Li

Lin Li, Li Zhang, Jing-Yu Zhao, Jian-Hua Hao, Ping Li, Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China
Correspondence to: Lin Li, Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of General Hospital of Chinese PLA, 51 Fucheng Road, Beijing 100037, China. zoubai185@163.com
Received: 2008-02-15 Revised: 2008-03-25

Abstract

AIM: To investigate the effect of propofol on intestinal mucosa in rats with gut ischemia-reperfusion (I/R).

METHODS: Ninety-six Wistar rats were randomized into 3 groups: sham operation (SO) group, control group (I/R + saline) and treatment (I/R + propofol) group. Propofol (0.1 mg/kg) was injected into gut immediately after superior mesenteric artery occlusion in the treatment group. The pathological changes in intestinal mucosa were assessed by Chiu's scores. The contents of diamine oxidase (DAO) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in gut tissues were determined. All measurements were done 0, 30, 60, 120 and 240 min after reperfusion.

RESULTS: Pathological changes were observed both in the control group and in the treatment group, but those in the latter were lighter. In comparison with the control group, the TNF- α content was decreased dramatically in the treatment group, and the decrease was the most significant at 60 min (9.52 ± 2.82 vs 12.08 ± 3.64 , $P < 0.01$); the content of DAO in the treatment group was decreased obviously, and a significant de-

crease also occurred at 60 min (2.34 ± 0.42 vs 0.98 ± 0.49 , $P < 0.01$).

CONCLUSION: Enteral administration of propofol can protect intestinal mucosa against I/R injury in rats.

Key Words: Ischemia-reperfusion; Propofol; Intestinal mucosa

Li L, Zhang L, Zhao JY, Hao JH, Li P. Protective effect of propofol on intestinal mucosa in rats with gut ischemia-reperfusion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1461-1464

摘要

目的: 研究缺血再灌注时异丙酚对大鼠肠黏膜的保护作用及可能机制。

方法: 96只成年雄性Wistar大鼠, 随机分为假手术组、缺血再灌注(I/R)+生理盐水组和I/R+异丙酚组。再灌注后0、30、60、120、240 min(每时间点8只)处死动物取肠袋组织, 采用病理学方法观察肠黏膜损伤指数, ELLSA检测检测肠黏膜TNF- α 中含量变化; 分光光度法测定肠组织中DAO含量的变化。

结果: 与I/R+生理盐水组相比, I/R+异丙酚组肠黏膜病理变化较轻, 肠黏膜中TNF- α 含量明显减少, 60 min最明显(9.52 ± 2.82 vs 12.08 ± 3.64 , $P < 0.01$), 肠袋组织DAO含量显著增加, 60 min时差异显著(2.34 ± 0.42 vs 0.98 ± 0.49 , $P < 0.01$)。

结论: 异丙酚能抑制缺血再灌注时肠黏膜中TNF- α 的表达, 减轻病理损害, 对肠黏膜具有保护作用。

关键词: 缺血再灌注; 异丙酚; 肠黏膜

李琳, 张丽, 赵京禹, 郝建华, 李平. 异丙酚对缺血再灌注大鼠肠黏膜的保护作用. *世界华人消化杂志* 2008; 16(13): 1461-1464
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1461.asp>

0 引言

缺血再灌注是烧(创)伤后常见的病理生理过程,

背景资料
肠黏膜是肠屏障的重要组成部分, 直接与外界细菌及毒素直接接触。严重应激状态下, 肠黏膜的通透性增加, 造成细菌及内毒素的易位, 引起肠源性内毒素血症和脓毒症。这一过程与脓毒症和MODS的发生有密切关系。

同行评议者
黄志勇, 教授, 上海交通大学医学院附属仁济医院普外科

研发前沿
严重的烧伤、创伤时,肠黏膜功能的保护是当前研究的一个热点,其涉及多个研究领域。

持续缺血再灌注造成肠上皮细胞损害,从而造成肠黏膜屏障功能下降,通透性增加,后者与脓毒症和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的发生有密切关系^[1-4]。如何减轻肠黏膜损伤,减少细菌和内毒素易位一直是临床防治脓毒症和MODS亟待研究的重要课题。异丙酚是一种新型麻醉剂,除镇痛作用外,还有抗氧化损伤抑制钙超载,稳定细胞膜的作用。但肠异丙酚对缺血再灌注肠黏膜的影响尚无研究,本实验探讨缺血再灌注时异丙酚对肠黏膜的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠96只,由军事医学科学院实验动物中心提供,体质量230-250 g。异丙酚(0.1 mg/kg)为山东正大福瑞达制药有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 造模与分组:大鼠实验前适应性饲养1 wk,术前12 h禁食,自由饮水。30 g/L戊巴比妥钠腹腔麻醉(30 mg/kg),麻醉成功后,仰卧固定于手术台上,常规备皮消毒铺无菌洞巾。取腹部正中切口长约3-4 cm,将肠管外置并覆盖温盐水纱布,外用烤灯加温,保持肠管的湿润和温度。在距离十二指肠悬韧带后10 cm和18 cm处,分别用两根一号丝线结扎肠管,造成长约8 cm肠袋。无损伤动脉夹夹闭肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA)始部,阻断SMA血流45 min后,松夹恢复肠系膜血流,制成肠缺血再灌注模型。大鼠随机分为缺血再灌注+生理盐水组、缺血再灌注+异丙酚组和假手术组。缺血再灌注+异丙酚组阻断SMA血流45 min后肠袋内注射异丙酚,缺血再灌注+生理盐水组注射等体积生理盐水。假手术组行上述操作,而未夹闭SMA。以上各组分别在再灌注后0、30、60、120和240 min(每时间点8只)处死动物取肠袋组织。冲洗后用40 g/L的甲醛溶液固定48 h,脱水,常规石蜡包埋,切片。

1.2.2 苏木素-伊红染色:石蜡切片常规脱蜡至水后,进行HE染色,用于光镜下观察病理变化和肠上皮损伤。每份切片光镜下随机选择10视野(400×)由病理医师观察,根据Chiu's评分方法进行肠上皮损伤测定。采用黎君友 *et al*^[5]建立的分光光度法测定肠组织中DAO含量。准确称取组织质量,按质量:体积为1:9加生理盐水制备组织匀浆,然后2500 r/min,离心10 min,取上清,按试剂操作步骤进行测定。

统计学处理 数据均以mean±SD表示,用SPSS11.0软件进行t检验。

2 结果

2.1 光镜下病理改变 正常组肠黏膜呈柱状,刷状缘清晰,排列整齐。对照组从再灌注开始时肠黏膜略有肿胀,再灌注时间延长,肠黏膜肿胀逐渐加重,并出现坏死,脱落。黏膜层炎症细胞浸润,固有层红细胞增多。治疗组损伤变化趋势同对照组,但病变程度明显减轻。

2.2 肠黏膜上皮损伤指数 缺血再灌注+生理盐水组肠黏膜组织的损伤主要发生在缺血再灌注120 min和240 min,以再灌注120 min组最明显。缺血再灌注+异丙酚组的损伤的变化趋势与缺血再灌注+生理盐水组的基本相同,但损伤程度较缺血再灌注+生理盐水组轻($P<0.01$,表1)。

2.3 肠组织DAO的含量 缺血再灌注+生理盐水组肠组织DAO含量再灌注后前60 min稍有升高,后迅速降低,再灌注后120 min后最低,后逐渐上升,到再灌注240 min,基本接近正常。缺血再灌注+异丙酚组血浆DAO含量变化基本同缺血再灌注+生理盐水组相同,但程度要较缺血再灌注+生理盐水组小($P<0.01$,表2)。

2.4 肠黏膜中TNF- α 的含量 I/R+生理盐水组肠黏膜组织中TNF- α 含量从再灌注0 min开始逐渐升高,到再灌注60 min达到顶峰12.08 ng/g pro,后逐渐下降。各时间点I/R+生理盐水组肠黏膜组织中TNF- α 含量要显著高于假手术组TNF- α 含量。I/R+异丙酚组肠黏膜组织TNF- α 含量变化基本同I/R+生理盐水组相同,但各时间点I/R+异丙酚组肠黏膜组织TNF- α 含量要明显较I/R+生理盐水组低($P<0.01$,表3),到再灌注240 min与假手术组无明显差异。

3 讨论

肠道既是创伤、休克后损伤发生的靶器官,又是全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)的“启动器官”,肠黏膜缺血再灌注损伤是最终导致MODS的重要病因学基础及中心环节^[6]。休克、创伤及复苏过程中脏器尤其是肠道的缺血再灌注损伤的防治已成为相关学科研究的热点和难点。为此,寻找减轻肠黏膜损害的方法,对于临床上治疗全身SIRS和MODS有重要的意义。

异丙酚是一种新型静脉麻醉药,其除了麻醉作用外,现认为对缺血再灌注损伤有较强的保护作用。首先异丙酚可减少自由基的生成和维持细胞膜及线粒体功能稳定等作用,对缺血再灌注损伤具有保护作用^[7-9]。在化学结构上与

表 1 肠缺血再灌注时肠黏膜上皮损伤指数 (mean \pm SD)

分组	再灌注时间(min)				
	0	30	60	120	240
假手术组	0.80 \pm 0.12	0.83 \pm 0.13	0.81 \pm 0.12	0.79 \pm 0.10	0.81 \pm 0.17
I/R+生理盐水组	8.34 \pm 2.34 ^a	7.54 \pm 2.25 ^a	7.40 \pm 2.10 ^a	9.45 \pm 2.11 ^a	8.50 \pm 2.13 ^a
I/R+异丙酚组	8.29 \pm 1.34	4.84 \pm 1.23 ^b	4.64 \pm 1.30 ^b	6.25 \pm 1.11 ^b	5.90 \pm 1.42 ^b

^a $P < 0.01$ vs 假手术组; ^b $P < 0.01$ vs I/R+生理盐水组.表 2 肠缺血再灌注时肠组织DAO含量 (U/g pro, mean \pm SD)

分组	再灌注时间(min)				
	0	30	60	120	240
假手术组	3.54 \pm 0.98	3.52 \pm 0.85	3.58 \pm 0.96	3.57 \pm 0.86	3.58 \pm 0.89
I/R+生理盐水组	1.11 \pm 0.47 ^c	1.20 \pm 0.35 ^c	0.98 \pm 0.49 ^c	1.31 \pm 0.40 ^c	1.54 \pm 0.36 ^c
I/R+异丙酚组	1.52 \pm 0.43	2.67 \pm 0.48 ^d	2.34 \pm 0.42 ^d	2.71 \pm 0.44 ^d	3.20 \pm 0.49 ^d

^a $P < 0.01$ vs 假手术组; ^b $P < 0.01$ vs I/R+生理盐水组.表 3 各组肠黏膜组织TNF- α 的含量 (ng/g pro, mean \pm SD)

分组	再灌注时间(min)				
	0	30	60	120	240
假手术组	5.43 \pm 0.7	5.50 \pm 0.92	5.48 \pm 1.01	5.71 \pm 1.11	5.78 \pm 0.79
I/R+生理盐水组	8.61 \pm 1.5	9.25 \pm 2.86 ^e	12.08 \pm 3.64 ^e	9.42 \pm 2.31 ^e	8.20 \pm 2.53 ^e
I/R+异丙酚组	7.81 \pm 1.4	6.34 \pm 1.23 ^f	9.52 \pm 2.82 ^f	7.62 \pm 2.31 ^f	5.80 \pm 1.89 ^f

^a $P < 0.01$ vs 假手术组; ^f $P < 0.01$ vs I/R+生理盐水组.

内源性抗氧化剂维生素E和已知的抗氧化剂丁化羟基甲苯十分相似. 其抗氧化作用的结构基础也正是这种类似的酚羟基结构. 异丙酚可直接与自由基反应, 生成2, 6-二异丙基苯氧基团, 同时使自由基灭活. 其次, 异丙酚能抑制细胞因子的产生和释放. 大量研究证明, 异丙酚能够影响TNF- α 的产生和释放, 且在低浓度时便有较强的抑制作用^[10]. 另外, 异丙酚能抑制细胞内钙离子浓度. 有研究表明异丙酚可以心肌细胞钙离子通道有抑制作用, 降低细胞内钙超载.

DAO是人类和哺乳动物肠黏膜上皮细胞代谢不可缺少的酶, 是肠上皮细胞的标志酶, 其活性与上皮细胞的核算和蛋白合成有密切关系, 因此通过测定DAO在肠组织中的变化, 可以反映肠黏膜上皮细胞的损伤和修复情况^[5]. 肠上皮细胞是肠黏膜的重要组成部分. 本实验发现缺血再灌注+生理盐水组大鼠肠组织中DAO含量显著降低. 其原因可能是缺血再灌注时, 肠上皮

细胞损伤、坏死, 肠上皮细胞脱落进入肠腔. 缺血再灌注+异丙酚组肠组织中DAO含量较缺血再灌注+生理盐水组显著升高, 提示异丙酚对肠上皮细胞具有保护, 从而减轻肠黏膜缺血再灌注损伤.

国内外研究表明肠缺血再灌注时, 肠组织可分泌TNF- α , 引起局部和全身的炎症, 导致远隔器官的损伤, 促进MODS的发生. TNF- α 在局部可以加重肠上皮细胞的损害. van Lanschot *et al*研究发现, 给大鼠注射外源性重组TNF- α 可引起肠上皮细胞剥落、坏死, 肠黏膜固有层中性粒细胞浸润^[11-12]. 如果应用小鼠抗人TNF- α mAb被动免疫大鼠1 h后再注射TNF- α , 则黏膜损害明显减轻, 说明TNF- α 可引起肠黏膜的损伤. 本实验结果显示, 缺血再灌注+异丙酚组大鼠肠黏膜组织中TNF- α 含量明显低于缺血再灌注+生理盐水组, 显示减少肠黏膜TNF- α 的含量是异丙酚减轻肠黏膜的一条重要途径.

应用要点
异丙酚不但可以作为麻醉药, 更可以作为一种抗氧化剂, 具有减轻对缺血再灌注损伤的作用.

同行评价
本研究设计准确
简单,思路新颖,
结果正确,讨论条
理清晰,具有一定
的临床应用价值.

本实验结果显示,缺血再灌注+异丙酚组与缺血再灌注+生理盐水组相比DAO含量明显升高,而缺血再灌注+异丙酚组肠黏膜中TNF- α 含量明显低于缺血再灌注+生理盐水组,说明异丙酚可通过抑制炎症介质的释放减轻肠缺血再灌注时肠上皮细胞的损害,从而保护肠黏膜.因此异丙酚在防治肠缺血灌流引起的失控炎症反应和脓毒症中具有潜在的临床应用前景.

4 参考文献

- 1 盛新华, 石汉平. 肠道在多器官功能障碍综合征中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2029-2032
- 2 Mole DJ, Taylor MA, McFerran NV, Diamond T. The isolated perfused liver response to a 'second hit' of portal endotoxin during severe acute pancreatitis. *Pancreatol* 2005; 5: 475-485
- 3 Shimizu K, Ogura H, Goto M, Asahara T, Nomoto K, Morotomi M, Yoshiya K, Matsushima A, Sumi Y, Kuwagata Y, Tanaka H, Shimazu T, Sugimoto H. Altered gut flora and environment in patients with severe SIRS. *J Trauma* 2006; 60: 126-133
- 4 张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 417-421
- 5 黎君友, 吕艺, 付小兵, 晋桦, 胡森, 孙晓庆, 盛志勇. 二

胺氧化酶在创伤后肠道损伤中变化及意义. 中国危重病急救医学 2000; 12: 482-484

- 6 Deitch EA, Xu D, Kaise VL. Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci* 2006; 11: 520-528
- 7 Zhou W, Fontenot HJ, Liu S, Kennedy RH. Modulation of cardiac calcium channels by propofol. *Anesthesiology* 1997; 86: 670-675
- 8 Karashima Y, Oike M, Takahashi S, Ito Y. Propofol prevents endothelial dysfunction induced by glucose overload. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 683-691
- 9 Takahashi H, Puttick RM, Terrar DA. The effects of propofol and enflurane on single calcium channel currents of guinea-pig isolated ventricular myocytes. *Br J Pharmacol* 1994; 111: 1147-1153
- 10 Gillil HE, Armstrong MA, Carabine U. The choice of anesthetic maintenance technique in fluences the antinflammatory cytokine to abdominal surgery. *Anesth Analg* 1997; 85: 1394-1398
- 11 van Lanschot JJ, Mealy K, Wilmore DW. The effects of tumor necrosis factor on intestinal structure and metabolism. *Ann Surg* 1990; 212: 663-670
- 12 Yamamoto S, Tanabe M, Wakabayashi G, Shimazu M, Matsumoto K, Kitajima M. The role of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in ischemia-reperfusion injury of the rat small intestine. *J Surg Res* 2001; 99: 134-141

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志外文字符标准

本刊讯 本刊论文出现的外文字符应注意大小写、正斜体与上下角标. 静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60 = Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, T_{1/2}不能写成tl/2或T_{1/2}, V_{max}不能写Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*ln*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylacetanilide(*N*-甲基乙酰苯胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *L*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *Vd*, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白. (常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

伊托必利在复合外伤术后患者恢复胃肠功能中的作用

王斯闻, 印春铭, 邹延红, 刘丹, 李春香, 张恒, 郭俊, 桑海泉

王斯闻, 印春铭, 邹延红, 刘丹, 李春香, 张恒, 桑海泉, 中国医科大学附属第四医院ICU 辽宁省沈阳市 110032
郭俊, 沈阳市第一人民医院(沈东医院)内科 辽宁省沈阳市 110032

作者贡献分布: 王斯闻和邹延红对此文所作贡献均等; 此课题由王斯闻, 印春铭及邹延红设计; 研究过程由邹延红, 刘丹, 李春香, 张恒, 郭俊及桑海泉操作完成; 数据分析由王斯闻, 印春铭及桑海泉完成; 本论文写作由王斯闻, 邹延红及桑海泉完成。

通讯作者: 王斯闻, 110032, 辽宁省沈阳市于洪区崇山东路4号, 中国医科大学附属第四医院ICU. wsw0523@yahoo.com.cn

电话: 024-62042857 传真: 024-62042857

收稿日期: 2007-12-05 修回日期: 2008-02-27

Role of itopride hydrochloride in gastrointestinal function recovery of postoperative patients with compound trauma

Si-Wen Wang, Chun-Ming Yin, Yan-Hong Zou, Dan Liu, Chun-Xiang Li, Heng Zhang, Jun Guo, Hai-Quan Sang

Si-Wen Wang, Chun-Ming Yin, Yan-Hong Zou, Dan Liu, Chun-Xiang Li, Heng Zhang, Hai-Quan Sang, Department of Intensive Care Unit, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Jun Guo, Department of Internal Medicine, the First People's Hospital (Shendong Hospital) of Shenyang City, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Correspondence to: Si-Wen Wang, Department of Intensive Care Unit, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, 4 Chongshan Eastern Road, Yuhong District, Shenyang 110032, Liaoning Province, China. wsw0523@yahoo.com.cn

Received: 2007-12-05 Revised: 2008-02-27

Abstract

AIM: To observe the efficacy of itopride hydrochloride in recovering the gastrointestinal function of postoperative patients with compound trauma.

METHODS: Forty-four postoperative patients with compound trauma were randomly divided into groups A ($n = 24$) and B ($n = 20$), treated with IHC (50 mg, 3 times per day) and domperidone (10 mg, 3 times per day) for 1 wk. The efficacy and adverse reaction were observed and the data were processed by chi-square test.

RESULTS: Symptoms of the digestive system

were improved in both groups, and there was no significant difference between them ($\chi^2 = 0.761$, $P > 0.05$). Compared with group B, the gastric emptying rate of patients in group A significantly increased ($\chi^2 = 6.704$, $P < 0.05$). The incidence rate of adverse reaction was 17% in group A and 10% in group B, and there was also no marked difference between the two groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Itopride hydrochloride can effectively and safely improve the gastrointestinal function in postoperative patients with compound trauma.

Key Words: Itopride hydrochloride; Domperidone; Compound trauma; Gastrointestinal motility disorder

Wang SW, Yin CM, Zou YH, Liu D, Li CX, Zhang H, Guo J, Sang HQ. Role of itopride hydrochloride in gastrointestinal function recovery of postoperative patients with compound trauma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1465-1467

摘要

目的: 探讨胃肠动力药伊托必利在复合外伤的患者术后恢复胃肠动力的效果。

方法: 复合外伤术后入ICU患者44例, 随机分为伊托必利治疗组($n = 24$), 多潘立酮对照组($n = 20$)。治疗组每次po(鼻饲)盐酸伊托必利片 50 mg, 3 次/d; 对照组每次po(鼻饲)多潘立酮片 10 mg, 3 次/d。两组均连续用药 1 wk, 观察有效率和不良反应发生率。各指标之间相关因素的差异性比较采用 χ^2 检验。

结果: 伊托必利可使复合外伤患者术后消化道功能明显改善, 其疗效与多潘立酮相似($\chi^2 = 0.761$, $P > 0.05$); 伊托必利可显著改善胃排空功能, 与多潘立酮相比差异有显著性($\chi^2 = 6.704$, $P < 0.05$)。药物不良反应发生率分别为 17% 和 10%, 二者比较差异无显著性($P > 0.05$)。

结论: 伊托必利能快速恢复复合外伤术后患者的胃肠动力并且安全。

关键词: 盐酸伊托必利; 多潘立酮; 复合外伤; 胃肠动力障碍

背景资料

肠内营养(EN)在危重病患者中的应用日益增多, 但应用不当, 也会出现各种不良反应, 其中以胃肠道反应多见。盐酸伊托必利是新一代全胃肠动力药, 能显著改善消化不良的症状, 加快胃排空。

同行评议者
李奇林, 教授, 南方医科大学附属珠江医院急诊部

应用要点
伊托必利在改善功能性消化不良中没有明显副作用,可临床推广使用。

王斯闻, 印春铭, 邹延红, 刘丹, 李春香, 张恒, 郭俊, 桑海泉. 伊托必利在复合外伤术后患者恢复胃肠功能中的作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1465-1467
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1465.asp>

0 引言

随着营养支持研究的深入及对肠道在创伤应激中的重要作用的认识, 肠内营养(enteral nutrition, EN)在危重病患者中的应用日益增多^[1]. 总体而言, EN支持较肠外营养(parenteral nutrition, PN)支持更符合生理需求, 并且EN组患者感染性并发症发生率低于PN组^[2-3]. 但应用不当, 也会出现各种不良反应. 其中以胃肠道反应多见, 如腹胀、腹泻、恶心、呕吐等. 在危重病科腹泻发生率高, 其他如营养液的反流及误吸也有报道. 盐酸伊托必利是新一代全胃肠动力药, 能显著改善消化不良的症状, 加快胃排空. 我们对复合外伤术后入ICU的患者在开通EN的同时, 采用伊托必利并与多潘立酮对照, 观察患者的消化功能^[4].

1 材料和方法

1.1 材料 本组为我院2006-03/2007-10 ICU患者. 入选标准: 年龄18-64岁, 性别不限. 急性生理与慢性健康状况评分系统II(APACHE II)>15分. 排除标准: 有胃肠、肝、胆基础疾病, 应激性溃疡上消化道出血及本次患病后开腹手术者. 符合标准44例, 其中男性37例, 女性7例(包括脑外伤颅骨骨折、硬膜下血肿、脑出血; 颌面外伤软组织挫裂伤、下颌骨骨折; 多发肋骨骨折肺挫伤、血气胸; 四肢骨折、胸、腰椎骨折等). 随机原则分为治疗组(伊托必利组), 对照组(多潘立酮组). 治疗组24例, 男20例, 女4例, 平均年龄 36.1 ± 8.5 岁, 平均APACHE II 21.7 ± 9.4 分; 对照组20例, 男17例, 女3例, 平均年龄 36.4 ± 10.6 岁, APACHE II 20.5 ± 10.1 分. 盐酸伊托必利片(为力苏, 雅培制药有限公司提供), 多潘立酮片(吗丁林, 西安杨森制药有限公司生产).

1.2 方法 两组患者均给予常规治疗如抗感染、补液、改善微循环、保护重要脏器功能等措施, 在生命指标稳定后24-48 h开始EN. 患者取半卧位, 床头抬高30-45度, 均给予瑞先营养液(华瑞制药). 温控、泵控以20 mL/h速度开始, 经鼻饲管连续均匀输注. 根据个体营养状况, 耐受程度, 逐渐增加剂量. 同时治疗组给予盐酸伊托必利片50 mg po(鼻饲), 3次/d; 对照组给予多潘立酮片10 mg po(鼻饲), 3次/d.

表 1 两组临床症状疗效比较

分组	n	良好	明显改善	轻度改善	无效	有效率(%)
治疗组	24	8	7	6	3	87.50
对照组	20	7	4	5	4	80.00

表 2 两组胃排空观察结果

分组	n	显效	有效	无效	有效率(%)
治疗组	24	12	10	2	91.67
对照组	20	5	7	8	60.00

患者于术后入ICU 24-48 h后开始EN, 平均2.7 d. 治疗1 wk, 观察消化系统症状(呃逆、呕吐、腹胀、腹泻)变化. 对清醒患者询问有无腹痛等. 症状评估为^[5-6]良好: 无消化不良症状; 明显改善: 有症状, 随用药时间延长而消失; 轻度改善: 症状存在, 但有所减轻; 无变化: 消化不良症状无改善; 恶化: 有明显症状, 立即停止EN, 无效: 无变化及恶化. 有效率为良好、明显改善、轻度改善之和与总数的百分比. 胃排空功能判定^[7-8]: 每4 h测1次胃残余量. 胃残余量 ≤ 200 mL, 维持原速度; 胃残余量 ≤ 100 mL, 增加速度20 mL/h; 胃残余量 ≥ 200 mL/h, 停止输入. 显效: 治疗后4 h胃排空率 $\geq 50\%$, 有效: 治疗后4 h胃排空率 $\geq 30\%$ 但 $<50\%$; 无效: 治疗4 h胃排空率 $<10\%$. 显效与有效之和与总数的百分比为有效率. 实验室检查: 治疗前和治疗后验血、尿、便常规(便球/杆比)、肝、肾功能、血糖及心电图. 不良反应包括呃逆、呕吐、腹胀、腹泻等.

统计学处理 对所有统计资料都采用SPSS 10.0软件包进行统计分析, 各指标之间相关因素的差异性比较采用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 两组临床症状改善比较 伊托必利可使复合外伤患者术后消化道功能明显改善, 其疗效与多潘立酮相似($\chi^2 = 0.761, P > 0.05$, 表1).

2.2 两组胃排空功能比较 伊托必利可以显著改善胃排空功能, 与多潘立酮相比差异有显著性($\chi^2 = 6.704, P < 0.05$, 表2).

2.3 不良反应和实验室检查 治疗组: 腹泻4例; 对照组: 反流3例, 腹泻2例, $\chi^2 = 0.466, P > 0.05$. 治疗前和治疗后血、尿、便常规、肝、肾功能、血糖及心电图两组比较无显著差异.

3 讨论

早期EN作为一种治疗手段, 因其更符合机体的生理状态, 能更有效地促进肠道功能恢复而被危重病医学领域广泛接受和采用^[9-11]. 本组试验危重症患者, 胃肠道功能存在, 但不能经口正常进食, 估计短时间的管饲可过渡到经口饮食. 但在管饲初期, 又往往存在胃肠道动力障碍, 如呃逆、呕吐、胃潴留, 严重者有误吸风险. 所以在开通EN的同时, 给予促胃肠动力药(伊托必利、多潘立酮), 目的是通过增加胃肠运动, 促进胃排空; 能改善腹胀、呕吐、反流症状. 目前对危重病患者出现胃肠动力障碍者, 首选促胃肠动力药物治疗已达成共识^[8,12]. 伊托必利和多潘立酮都是新型的胃肠动力药. 伊托必利有独特的双重药理作用机制, 既通过拮抗多巴胺D2受体和乙酰胆碱脂酶活性发挥促动力作用. 在动物实验中耐受性好, 毒性低, 能增强胃和十二指肠运动作用, 还具有中等强度的止吐作用^[13]. 多潘立酮为外周多巴胺D2受体阻滞剂, 直接作用于胃肠壁, 可使食管下部括约肌张力升高, 防止胃内容物向食管反流, 并增强胃蠕动, 协调胃与十二指肠运动, 抑制恶心、呕吐^[14-15]. 本研究结果显示伊托必利能有效改善危重患者消化不良症状, 治疗1 wk后总有效率(87.50%)与多潘立酮有效率(80.00%)结果相似($\chi^2 = 0.761$, $P > 0.05$). 多潘立酮作为胃肠动力药已应用较长时间, 其疗效已得到肯定. 胃排空监测结果显示伊托必利有效率91.67%, 多潘立酮有效率60%; 故伊托必利在促胃排空功能上优于多潘立酮($\chi^2 = 6.704$, $P < 0.05$). 本组试验观察到患者对伊托必利耐受性好, 仅有4例腹泻(17%)但便常规正常. 多潘立酮出现反流3例(15%), 腹泻2例(10%). 药物不良反应(腹泻)二者差异无显著($\chi^2 = 0.466$, $P > 0.05$). 治疗组与对照组出现的腹泻, 考虑一方面给予胃肠动力药后促进肠蠕动而引起排便次数增加; 另一方面由于机体受到创伤打击后, 处于应激状态而出现消化功能紊乱. 本实验由于病例数

少故不良反应发生率高, 以后需要进行多病例的观察总结. 其他实验室检查未见明显异常. 伊托必利对危重病患者在促胃肠动力上效果确切, 无严重不良反应.

4 参考文献

- 1 王宝恩. 应重视和大力提倡临床营养支持. 中国危重病急救医学 2006; 10: 578-579
- 2 Kudsk KA, Croce MA, Fabian TC, Minard G, Tolley EA, Poret HA, Kuhl MR, Brown RO. Enteral versus parenteral feeding. Effects on septic morbidity after blunt and penetrating abdominal trauma. *Ann Surg* 1992; 215: 503-511; discussion 511-513
- 3 Moore FA, Moore EE, Jones TN, McCroskey BL, Peterson VM. TEN versus TPN following major abdominal trauma--reduced septic morbidity. *J Trauma* 1989; 29: 916-922; discussion 922-923
- 4 石刚, 吴硕东. 促胃肠动力药的作用机制及临床应用研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 189-196
- 5 Wijnhoven BP, Salet GA, Roelofs JM, Smout AJ, Akkermans LM, Gooszen HG. Function of the proximal stomach after Nissen fundoplication. *Br J Surg* 1998; 85: 267-271
- 6 Drossman DA. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 2006; 130: 1377-1390
- 7 朱长清, 茅益民, 曾民德, 董胜翔, 许国铭, 王根生, 厉有民, 蔡建庭. 盐酸伊托必利片治疗功能性消化不良的临床研究. 中国药科大学学报 2005; 36: 580-583
- 8 中华医学会重症医学分会. 危重病患者营养支持指导意见(草案). 中国危重病急救医学 2006; 10: 584-585
- 9 黎介寿. 肠内营养-外科临床营养支持的首选途径. 中国临床营养杂志 2003; 11: 171-172
- 10 Braga M, Gianotti L, Gentilini O, Parisi V, Salis C, Di Carlo V. Early postoperative enteral nutrition improves gut oxygenation and reduces costs compared with total parenteral nutrition. *Crit Care Med* 2001; 29: 242-248
- 11 Fukatsu K, Zarzaur BL, Johnson CD, Lundberg AH, Wilcox HG, Kudsk KA. Enteral nutrition prevents remote organ injury and death after a gut ischemic insult. *Ann Surg* 2001; 233: 660-668
- 12 左文革, 李瑜元. 功能性消化不良发病机制的研究进展. 广州医药 2007; 38: 5-7
- 13 莫剑忠, 李定国, 姜晴寰, 蒋义斌, 王兴鹏, 龚自华, 曹芝君. 盐酸伊托必利治疗功能性消化不良的多中心临床研究. 中国新药杂志 2003; 12: 467-469
- 14 上海多潘立酮多中心临床研究协作组. 多潘立酮片治疗功能性消化不良的临床研究. 中华消化杂志 2003; 23: 220-222
- 15 周吕, 袁勃, 王礼建, 张春玥. 多潘立酮增强胃运动作用的中枢机制. 基础医学与临床 2003; S1: 23

同行评价
本研究设计比较合理, 结论可靠, 讨论深入, 对临床应用有一定的指导性.

编辑 李军亮 电编 何基才

阿德福韦酯联合拉米夫丁治疗拉米夫丁耐药失代偿期肝硬化患者14例

王方, 张俊, 张小岗, 张静, 李德明

背景资料
慢性乙型肝炎患者如不进行抗病毒治疗, 常进展到肝硬化, 最终死于各种各样的并发症。临床实践已经证实, 对于肝硬化失代偿期的患者, 拉米夫丁抗病毒治疗可以有效抑制病毒复制, 改善肝功能, 提高生存质量, 但在治疗过程中病毒容易产生变异而耐药, 使病情反复甚至加重。

王方, 张俊, 张静, 李德明, 中国人民解放军兰州军区总医院安宁分院感染科 甘肃省兰州市 730070
张小岗, 甘肃省中医院骨科 甘肃省兰州市 730050
作者贡献分布: 此课题由王方、张俊及张小岗设计; 研究过程由王方、张静及李德明操作完成; 论文写作由王方完成。
通讯作者: 王方, 730070, 甘肃省兰州市安宁东路818号, 中国人民解放军兰州军区总医院安宁分院感染科。
kaixin919@163.com
电话: 0931-7712117
收稿日期: 2007-12-27 修回日期: 2008-03-15

Adefovir combined with lamivudine in treatment of lamivudine-resistant patients with decompensated liver cirrhosis: an analysis of 14 cases

Fang Wang, Jun Zhang, Xiao-Gang Zhang, Jing Zhang, De-Ming Li

Fang Wang, Jun Zhang, Jing Zhang, De-Ming Li, Department of Infectious Diseases, General Hospital Anning Branch, Lanzhou Military Command of Chinese PLA, Lanzhou 730070, Gansu Province, China
Xiao-Gang Zhang, Department of Orthopaedics, Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, Gansu Province, China
Correspondence to: Fang Wang, Department of Infectious Diseases, General Hospital Anning Branch, Lanzhou Military Command of Chinese PLA, 818 Anning Eastern Road, Lanzhou 730070, Gansu Province, China. kaixin919@163.com
Received: 2007-12-27 Revised: 2008-03-15

Abstract

AIM: To observe the efficacy and safety of adefovir in combination with lamivudine in the treatment of lamivudine-resistant patients with decompensated liver cirrhosis.

METHODS: Fourteen decompensated liver cirrhosis patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus (HBV) mutants, positive HBsAg, HBeAg, and HBcAb, and HBV DNA level $>10^8$ copies/L were treated with lamivudine in combination with adefovir. The clinical efficacy after 6 mo and the adverse reaction during treatment were observed.

RESULTS: The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL), albumin (Alb), and prothrombin activity (PTA) were improved distinctly after 6-mo combined treatment. The levels of serum ALT, AST and TBIL became normal in 57.1%, 42.8%, and 50.0% of patients, respectively. The percentages of patients with undetectable HBV DNA levels ($<10^5$ copies/L), seropositive HBeAg and seroconversion were 50.0%, 28.4% and 7.1%, respectively. Ascites was retrogressed in those accompanied with ascites. There were no obvious renal toxicity and adverse reaction. No adefovir-related HBV mutations were identified.

CONCLUSION: Combined treatment with lamivudine and adefovir is stable and safe for lamivudine-resistant patients with decompensated liver cirrhosis.

Key Words: Decompensated cirrhosis; Adefovir; Lamivudine

Wang F, Zhang J, Zhang XG, Zhang J, Li DM. Adefovir combined with lamivudine in treatment of lamivudine-resistant patients with decompensated liver cirrhosis: an analysis of 14 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1468-1470

摘要

目的: 观察阿德福韦酯(贺维力)联合拉米夫丁治疗拉米夫丁耐药的慢性乙型肝炎肝硬化失代偿期患者的疗效和安全性。

方法: 选择拉米夫丁治疗后产生耐药的HBsAg、HBeAg和HBcAb阳性、HBV DNA $>10^8$ copies/L的肝硬化失代偿期患者14例, 加用阿德福韦联合抗病毒治疗, 于治疗6 mo后观察疗效及不良反应。

结果: 联合治疗6 mo后患者ALT、AST、TBIL、Alb、PTA水平较联合治疗前明显改善, ALT、AST和TBIL复常患者的比例分别为57.1%、42.8%、50.0%; HBV DNA $<10^5$

同行评议者
丁惠国, 主任医师, 首都医科大学
附属北京佑安医院肝病消化科

copies/L、HBeAg转阴、HBeAg/抗HBeAb转化的患者比例分别为50.0%、28.4%和7.1%;产生腹水的患者腹水全部消退,对肾功能无明显影响,治疗期间未观察到阿德福韦相关的变异.

结论: 阿德福韦联合拉米夫丁治疗拉米夫丁耐药的肝硬化失代偿期患者的疗效肯定,安全性好.

关键词: 失代偿期肝硬化; 阿德福韦酯; 拉米夫丁; 耐药

王方, 张俊, 张小岗, 张静, 李德明. 阿德福韦酯联合拉米夫丁治疗拉米夫丁耐药失代偿期肝硬化患者14例. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1468-1470
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1468.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎患者如果不进行抗病毒治疗,常进展到肝硬化,最终死于各种各样的并发症. 临床实践已经证实,对于肝硬化失代偿期的患者而言,拉米夫丁抗病毒治疗可以有效抑制病毒复制,改善肝功能,提高生存质量^[1-5],但在治疗过程中病毒容易产生变异而耐药,使病情反复甚至加重^[6-7]. 据国外文献报道在慢性活动性乙型肝炎患者,阿德福韦对于拉米夫丁耐药后产生的YMDD变异株有效^[8-9],拉米夫丁耐药后如联合使用阿德福韦酯(贺维力)抗病毒,可降低阿德福韦耐药的发生率^[10-13]. 但对于慢性乙型肝炎肝硬化失代偿期的患者,拉米夫丁联合阿德福韦的疗效及安全性国外文献未见报道. 本研究用阿德福韦联合拉米夫丁治疗发生拉米夫丁耐药的肝硬化失代偿期患者,观察其疗效及安全性.

1 材料和方法

1.1 材料 选择我科2004-10/2007-10门诊和住院部治疗的肝硬化失代偿期患者14例,肝功能B-C级,全部符合2000年西安会议《病毒性肝炎防治方案》诊断标准,肝硬化分级按Child-Pugh改良分级法. 其中男性10例,女性4例,年龄26-72(平均46)岁. 全部患者拉米夫丁治疗在9 mo以上,已经发生全部和部分应答,病毒变异后出现反跳,HBV DNA $>10^8$ copies/L, HBeAg阳转,生化指标出现异常,肝功能ALT: 205.1 ± 67.5 IU/L, AST: 286.0 ± 109.8 U/L, TBIL: 93.3 ± 42.1 μ mol/L, ALB: 23.8 ± 2.3 g/L, PTA: $35\% \pm 6.4\%$. 部分患者临床症状恶化,9例患者出现明显乏力、纳差

症状,7例患者出现腹水. 排除合并其他的嗜肝或非嗜肝病毒感染.

1.2 方法 全部患者继续服用拉米夫丁100 mg ig, 1次/d,并在此基础上加用阿德福韦酯(贺维力)10 mg口服,1次/d联合抗病毒治疗. 治疗后密切监测肝功(ALT、AST、TBIL、Alb)、凝血酶原活动度(采用雅培公司的全自动生化仪)、HBV DNA定量(采用罗氏公司荧光定量PCR仪)、HBV血清标记物(采用上海复兴生物公司试剂),观察患者临床症状改善和腹水消退情况.

统计学处理 计数资料采用mean \pm SD表示,组间比较用成对资料 t 检验. $P<0.05$ 为统计学上有显著性差异.

2 结果

2.1 肝功能和凝血酶原活动度的变化 抗病毒治疗6 mo后患者ALT、AST、TBIL、Alb和PTA分别为 40.4 ± 17.3 IU/L、 53.7 ± 23.6 IU/L、 31.1 ± 8.2 μ mol/L、 32.3 ± 3.2 g/L、 $43.4\% \pm 11.5\%$,与治疗前相比有显著性差异($P<0.05$,表1). ALT、AST和TBIL复常的患者比例分别为57.1%(8/14)、42.8%(6/14)、50.0%(7/14).

2.2 HBV DNA定量、HBeAg转阴及HBeAg转换情况 治疗3 mo时患者HBV DNA逐渐下降,6 mo时HBV DNA $<10^5$ copies/L、HBeAg转阴、HBeAg/抗HBeAb转化的患者比例分别为50.0%(7/14)、28.4%(4/14)和7.1%(1/14).

2.3 临床症状改善和腹水消退情况 9例出现明显乏力、纳差患者治疗1 mo后症状明显缓解;7例出现腹水的患者治疗3 mo时6例患者腹水完全消退,6 mo时全部患者腹水消退.

3 讨论

阿德福韦是一种单磷酸腺苷的无环核苷类似物,在细胞激酶的作用下被磷酸化为有活性的代谢产物即阿德福韦二磷酸盐. 阿德福韦二磷酸盐通过下列两种方式来抑制HBV DNA多聚酶(逆转录酶);一是与自然底物脱氧腺苷三磷酸竞争,二是整合到病毒DNA后引起DNA链延长终止,抑制HBV病毒复制,使患者HBV DNA水平下降. 国外临床研究资料表明,阿德福韦酯能有效地抑制拉米夫定耐药变异株的复制. Schiff *et al*^[14]报道226例等待肝移植的拉米夫丁耐药的慢性肝病患者,用阿德福韦酯治疗48 wk和96 wk后血清HBV DNA水平 $<10^6$ copies/L的患者比例分别是59%和65%,48 wk时,ALT、Alb、TBIL和PTA

相关报道
据国外文献报道在慢性活动性乙型肝炎患者,阿德福韦对于拉米夫丁耐药后产生的YMDD变异株有效,拉米夫丁耐药后如联合使用阿德福韦酯(贺维力)抗病毒,可降低阿德福韦耐药的发生率.

同行评价
本研究临床数据
合理、可信,对临
床有一定的参考
价值。

表 1 肝功能各项指标及PTA在联合抗病毒治疗前后的变化(mean ± SD)

	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	TBIL(μmol/L)	Alb(g/L)	PTA(%)
治疗前	205.1 ± 67.5	286.0 ± 109.8	93.3 ± 42.1	23.8 ± 2.3	35.0 ± 6.4
治疗后	40.4 ± 17.3 ^c	53.7 ± 23.6 ^c	31.1 ± 8.2 ^b	32.3 ± 3.2 ^a	43.4 ± 11.5 ^a

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01, ^c*P*<0.005 vs 治疗前。

正常率分别是77%, 76%, 60%和84%。Dai *et al*^[15]报道出现YMDD变异的患者, 单用阿德福韦酯治疗52 wk后HBeAg转阴率、HBeAg转化率及HBV DNA<2×10⁵ copies/L的患者比例分别是23.5%、11.8%和48.3%, 其中20.7%的患者血清中YMDD变异株检测不到。同时国外的资料报道耐药后在拉米夫丁基础上联用阿德福韦比单用阿德福韦酯抗病毒的效果要好, 而且阿德福韦酯的耐药发生率更低^[10-13]。Perrillo *et al*^[12]报道拉米夫丁耐药后的代偿性慢性肝病患者分别用阿德福韦酯联合拉米夫丁治疗和单用阿德福韦酯治疗52 wk, HBV DNA下降<10⁸ copies/L或下降>2 log(10)的患者比例分别是85%和11%, ALT正常的患者比例分别是31%和6%, 可见联用效果明显优于单用。Rapti *et al*^[13]报道YMDD变异的HBeAg阳性的慢性乙型肝炎患者叠加阿德福韦酯治疗3年的时间尚未发现阿德福韦酯耐药者。

我们的这14例失代偿期肝硬化患者因为出现耐药后病情有加重的趋势, 为增强抗病毒效果, 一直未停用拉米夫丁, 在拉米夫丁100 mg/d的基础上联合阿德福韦酯(贺维力)10 mg/d治疗。治疗6 mo时, 肝功能ALT、TBIL、PTA和ALB等指标较治疗前明显好转, ALT、AST和TBIL复常的比例分别为57.1%、42.8%、50.0%; HBV DNA转阴率为50.0%; HBeAg转阴率28.4%, HBeAg/抗HBeAb转化率7.1%。HBeAg/抗HBeAb转化率较低, 可能与疗程短有关。治疗后大部分患者乏力、纳差等症状明显改善, 腹水消退, 表明失代偿期肝硬化患者在拉米夫丁耐药后联合阿德福韦酯抗病毒治疗有效。

治疗过程中未观察到阿德福韦酯10 mg/d的剂量对肾功能有明显影响, 也未观察到阿德福韦相关的耐药发生。综上所述, 应用阿德福韦酯(贺维力)联合拉米夫丁治疗拉米夫丁耐药的失代偿期肝硬化疗效明显, 安全性好, 无明显不良反应。

4 参考文献

- 1 王明, 黄丽萍. 拉米夫定治疗早期肝硬化的疗效观察. 肝脏 2005; 10: 148-149
- 2 黄莉莉. 拉米夫丁的失代偿性肝硬化的疗效观察. 南通医学院学报 2004; 24: 206-207
- 3 刘秀珍, 候春生. 拉米夫定治疗活动性肝硬化临床探讨. 肝脏 2004; 9: 142
- 4 林向飞, 林秀英, 韩清锡, 王剑虹. 拉米夫定对慢性乙型肝炎肝硬化患者的疗效观察. 中华肝病杂志 2002; 10: 304
- 5 路宪中, 刘金鑫, 刘秀华, 许百全. 贺普丁治疗失代偿性肝硬化13例疗效观察. 山东医药 2001; 41: 31
- 6 Liaw YF, Chien RN, Yeh CT, Tsai SL, Chu CM. Acute exacerbation and hepatitis B virus clearance after emergence of YMDD motif mutation during lamivudine therapy. *Hepatology* 1999; 30: 567-572
- 7 苏关关, 赵年丰, 周勇, 应美芳. 阿德福韦治疗YMDD 13 医学版 2005; 34: 470-472
- 8 吴锦瑜, 黎明, 郎梅春. 阿德福韦酯治疗YMDD变异的乙型肝炎肝硬化患者近期疗效观察. 肝脏 2006; 11: 215-216
- 9 张蓉, 王秀燕. 阿德福韦酯治疗YMDD变异的失代偿期乙型肝炎肝硬化临床观察. 实用肝脏病杂志 2007; 10: 309-311
- 10 Hadziyannis SJ. Treatment paradigms on hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients. *Expert Opin Investig Drugs* 2007; 16: 777-786
- 11 Hadziyannis SJ. New developments in the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 913-921
- 12 Perrillo R, Hann HW, Mutimer D, Willems B, Leung N, Lee WM, Moorat A, Gardner S, Woessner M, Bourne E, Brosgart CL, Schiff E. Adefovir dipivoxil added to ongoing lamivudine in chronic hepatitis B with YMDD mutant hepatitis B virus. *Gastroenterology* 2004; 126: 81-90
- 13 Rapti I, Dimou E, Mitsoula P, Hadziyannis SJ. Adding-on versus switching-to adefovir therapy in lamivudine-resistant HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 307-313
- 14 Schiff E, Lai CL, Hadziyannis S, Neuhaus P, Terrault N, Colombo M, Tillmann H, Samuel D, Zeuzem S, Villeneuve JP, Arterburn S, Borroto-Esoda K, Brosgart C, Chuck S. Adefovir dipivoxil for wait-listed and post-liver transplantation patients with lamivudine-resistant hepatitis B: final long-term results. *Liver Transpl* 2007; 13: 349-360
- 15 Dai CY, Chuang WL, Hsieh MY, Lee LP, Huang JF, Hou NJ, Lin ZY, Chen SC, Hsieh MY, Wang LY, Tsai JF, Chang WY, Yu ML. Adefovir dipivoxil treatment of lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Antiviral Res* 2007; 75: 146-151

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

人巨细胞病毒UL141A和B片段在黄疸和先天性巨结肠分离株中的序列分析

马艳萍, 阮强, 何蓉, 齐莹, 孙峥嵘, 吉耀华

马艳萍, 阮强, 何蓉, 齐莹, 孙峥嵘, 吉耀华, 中国医科大学附属盛京医院病毒研究室 辽宁省沈阳市 110004
国家自然科学基金资助项目, No. 30170986
作者贡献分布: 马艳萍与阮强对此文贡献均等; 此课题设计由阮强完成; 何蓉和齐莹参与实验设计; 试剂由孙峥嵘提供; 软件分析由吉耀华完成; 本论文写作由马艳萍和阮强完成.
通讯作者: 阮强, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属盛京医院病毒研究室. ruanq@cmu2h.com
电话: 024-83955345
收稿日期: 2008-01-24 修回日期: 2008-02-29

Sequence analysis of human cytomegalovirus UL141 A and B genes in strains isolated from infants with jaundice or Hirschsprung's disease

Yan-Ping Ma, Qiang Ruan, Rong He, Ying Qi, Zheng-Rong Sun, Yao-Hua Ji

Yan-Ping Ma, Qiang Ruan, Rong He, Ying Qi, Zheng-Rong Sun, Yao-Hua Ji, Virus Laboratory, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30170986

Correspondence to: Qiang Ruan, Virus laboratory, Shengjing Hospital Affiliated to China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. ruanq@cmu2h.com

Received: 2008-01-24 Revised: 2008-02-29

Abstract

AIM: To study the sequence variance of human cytomegalovirus (HCMV) UL141 in clinical isolates from infants with jaundice or Hirschsprung's disease (HD), and to find the relationship between the variance and the above two diseases.

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify the entire UL141 region of clinical isolates, which were proven positive for HCMV-DNA by real time PCR. The PCR products were sequenced and analyzed

RESULTS: There was a nucleotide deletion at the site 227 in clinical isolates and two new UL141 open reading frames, named UL141A

and UL141B, were found. In clinical isolates, the predicted proteins of UL141A were hypervariable after the position 75 of amino acid sequence. The predicted protein of UL141B was highly conserved.

CONCLUSION: There are two new UL141 open reading frames in clinical isolates from infants with jaundice or HD. The two open reading frames have no specific variation between the two groups of isolates.

Key Words: Jaundice; Hirschsprung's disease; Human cytomegalovirus; UL141; Polymerase chain reaction

Ma YP, Ruan Q, He R, Qi Y, Sun ZR, Ji YH. Sequence analysis of human cytomegalovirus UL141 A and B genes in strains isolated from infants with jaundice or Hirschsprung's disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1471-1475

摘要

目的: 分析来自黄疸和先天性巨结肠(hirschsprung's disease, HD)患儿的人巨细胞病毒临床分离株UL141片段的序列变化, 以及这种变化与人巨细胞病毒感染导致不同消化系疾病之间的关系.

方法: 对荧光定量PCR方法检测HCMV-DNA阳性的临床低传代分离株进行UL141基因全序列PCR扩增, 对扩增阳性的标本进行测序及分析.

结果: 15株临床低传代分离株在Toledo株UL141基因227位均缺失一个碱基T, 因此产生两个新的ORF(UL141A和UL141B). 与Toledo株相应片段比较, UL141A预测蛋白质第75位氨基酸后序列和翻译后修饰位点产生大量变异. UL141B的核苷酸和氨基酸序列均高度保守.

结论: 来自黄疸和先天性巨结肠患儿的人巨细胞病毒临床分离株的UL141片段产生两个新的ORF, 这两个ORF在黄疸和先天性巨结肠

背景资料
人巨细胞病毒(HCMV)是导致小儿先天畸形和出生缺陷的主要病原体. HCMV感染的不同临床表现可能与宿主免疫状态有关, 也可能与不同临床分离株基因及其编码产物的多态性有关.

同行评议者
管冬元, 副教授, 上海中医药大学基础医学院实验医学教研室

研发前沿
HCMV UL/b'区19个基因可能在病毒潜伏、复制、逃避机体免疫和不同组织细胞嗜性等方面起重要作用。这一区域的基因结构特点和编码产物的功能是目前HCMV致病机制研究的一个热点。

分离株之间均未发现特异性变异。

关键词: 黄疸; 先天性巨结肠; 人巨细胞病毒; UL141; 聚合酶链式反应

马艳萍, 阮强, 何蓉, 齐莹, 孙峥嵘, 吉耀华. 人巨细胞病毒UL141A和B片段在黄疸和先天性巨结肠分离株中的序列分析. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1471-1475
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1471.asp>

0 引言

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)属于 β -疱疹病毒亚科, 人群中大多数呈现不显性感染或潜伏感染。孕妇原发或复发感染均可引起新生儿宫内感染或围生期感染, 可导致小儿多个器官和系统受累, 消化系统是常见HCMV侵袭部位^[1-2]。HCMV感染的不同临床表现一方面可能与宿主免疫状态有关, 亦可能与不同临床分离株基因及其编码产物的多态性有关^[3-5]。实验室株AD169的全部基因组测序工作已经完成。1996年Cha *et al*^[6]在Toledo的低传代分离株基因组UL/b'区中发现在AD169株中不存在的19个开放阅读框架(open reading frame, ORF), 依次命名为UL133-UL151。推测, 实验室株AD169在细胞培养反复传代中出现了UL/b'区遗传信息的丢失, 引起了该区基因的缺失, 从而导致HCMV实验室株的复制水平、毒力和致病力明显减弱。因此, 这19个基因可能在病毒潜伏、复制、逃避机体免疫和不同组织细胞嗜性等方面起重要作用。我们应用PCR和DNA测序的方法, 分析来自黄疸和先天性巨结肠患儿的HCMV临床分离株UL141片段及其编码蛋白氨基酸序列的变化。

1 材料和方法

1.1 材料 23株低传代临床分离株均来自1988-1993年住院患儿, 其中黄疸患儿(J)分离株17株, 先天巨结肠患儿(C)分离株6株。年龄<14 mo。标本取自HCMV分离实验, -70℃保存。2000年应用荧光定量PCR方法^[7]检测HCMV DNA, 结果均为阳性。

1.2 方法 取HCMV低传代分离株接种细胞的培养上清液与等量裂解液(华美生物工程公司)混合, 煮沸15 min, 作为扩增模板。按照Toledo株序列(参考株, GenBank accession number U33331), 应用引物设计软件Primer premier 5.0设计用于扩增HCMV UL141片段的全序列引物、鉴定引物和分段PCR扩增分段引物(表1)。引物合成由北

京奥科公司完成。引物也用于UL141基因测序。应用全序列引物及搭配引物(全序列及鉴定引物之一)和分段PCR引物扩增UL141基因全序列。rTaq酶、10×Buffer、dNTP mixture为TaKaRa公司产品。制备反应体系如下: 1×Buffer, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP mixture 0.2 mmol/L, 上下游引物各150 ng, rTaq酶0.5 U, 模板3.5 μL, 用双蒸水补至总反应体积50 μL。PCR循环条件见表1。PCR产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳后, 紫外检测仪下观察扩增结果。测序前所有扩增产物应用TaKaRa公司的PCR Fragment Recovery kit切胶回收目的DNA片段, 以去除非特异产物带的干扰。PCR扩增阳性标本测序由上海联合基因公司完成。通过正反两个方向分别对目的基因的正链及负链进行测序, 以增加实验结果的可信性。应用生物信息学软件DNAClub、BioEdit、Genedoc、DNASIS、DNASstar等完成序列分析。用Sequin软件向GenBank提交整理后的HCMV UL141 ORF序列。

2 结果

2.1 UL141片段在临床分离株中的存在及ORF的变化 对23株来自黄疸、先天性巨结肠患儿的低传代临床分离株进行HCMV UL141全序列PCR扩增, 15株阳性(图1), 其中黄疸11株, 巨结肠4株。总阳性率65.21%。15株阳性临床分离株均完成HCMV UL141基因全序列测定, HCMV UL141 ORF序列均已被GenBank收录, 序列号为AY496548, AY496550-AY496555, AY600459-AY600461, AY600464-AY600468。

应用BioEdit软件对Toledo株及15株临床分离株进行UL141基因核苷酸序列线性化比较, 结果表明所有低传代临床分离株UL141基因在Toledo株UL141序列的核苷酸位点227均有核苷酸T的缺失, 产生两个新的ORF, 分别命名为UL141A、UL141B。Toledo株UL141 ORF全长1278 bp, 所有临床分离株UL141A位于Toledo株UL141核苷酸序列第1-316位, 全长309 bp或315 bp, UL141B位于Toledo株UL141核苷酸序列第262至1278位, 全长1017 bp。

2.2 核苷酸和氨基酸序列分析 因所有临床分离株UL141A在Toledo株227核苷酸位点均缺失碱基T, 造成移码突变, 使预测编码蛋白质第76位以后的氨基酸产生大量变异(图2)。其中, 来自黄疸分离株7个和先天性巨结肠分离株2个, 在Toledo株第78-83核苷酸位点有6个碱基的缺失,

表 1 HCMV UL141基因PCR扩增引物和循环条件

引物	序列	位置(nt)	产物长度(bp)	扩增条件
UI141	上游 5'CGTTCCTTCTTAAACATCCGA3'	5070	1418	96 4 min, 95 45 s, 53 1 min
	下游 5'ACAAAGTATCCGAATAACCACC3'	6488		72 2 min, 35 cycles, 72 10 min
UI141 _{a1}	上游 5'CGTTCCTTCTTAAACATCCGA3'	5070	617	95 4 min, 94 45 s, 53 1 min
	下游 5'CGGTACTGGAGTCCGTTTCAT3'	5687		72 1 min, 35 cycles, 72 10 min
UI141 _{b1}	上游 5'CTGTTCTGGGTGCTGTTGAG3'	5395	1055	95 4 min, 94 45 s, 52 1 min
	下游 5'CAACGGATGACACAAAGTATC3'	6450		72 1 min, 35 cycles, 72 10 min
UL141 _{a2}	上游 5'CGTTCCTTCTTAAACATCC3'	5070	742	95 4 min, 94 45 s, 49 1 min
	下游 5'GCGTGAGAATTACGAAGC3'	5842		72 1 min, 35 cycles, 72 10 min
UI141 _{b2}	上游 5'TCGGCTGATGAACGGACT3'	5661	874	95 4 min, 94 45 s, 50 1 min
	下游 5'CCAAGTGGAACGATAGGAT3'	6535		72 1 min, 35 cycles, 72 10 min

使预测编码蛋白质第26位氨基酸产生突变, 由天冬氨酸突变为谷氨酸, 而27、28位的甘氨酸和谷氨酸缺失. 其他变异均为核苷酸的替换. 临床分离株UL141A核苷酸和氨基酸与Toledo株相应区域比较, 同源性分别为95.9%-98.7%和70.2%-74.0%. 临床分离株UL141B核苷酸和氨基酸与Toledo株相应序列比较, 均高度保守, 同源性分别为97.6%-98.5%, 98.5%-99.4%. 核苷酸变异均为碱基替换, 多分布在ORF的中部和3'端.

2.3 编码蛋白质翻译后修饰位点分析 应用Genedoc软件及Prosite数据库预测编码产物的翻译后修饰位点, UL141A包括硫酸化位点(SUL)、蛋白激酶C磷酸化位点(PKC)、酪蛋白激酶II磷酸化位点(CKP)、N相连豆蔻酰化位点(MYR)和酰胺化位点(AMID). 与Toledo株比较, 临床分离株UL141A在第75位氨基酸后的修饰位点产生大量变异(图2). 与Toledo株相应区域比较, 除分离株10j第138-144位MYR位点变为CK2位点外, 其余分离株UL141B预测蛋白质的翻译后修饰位点均高度保守.

2.4 编码蛋白质性质预测 Toledo株UL141基因预测编码蛋白质含有425个氨基酸, 临床分离株UL141A预测编码蛋白质含有102或104个氨基酸, UL141B预测编码蛋白质含有338个氨基酸. 编码蛋白质等电点预测值分别为, Toledo株8.95, 临床分离株UL141A 10.36-11.54, UL141B 7.99-8.18, 均为碱性蛋白质.

2.5 黄疸和先天性巨结肠分离株在进化树的分布 应用DNASTar软件包中的MegAlign软件进行UL141A和UL141B的进化树分析(图3). 未发现来自黄疸和先天性巨结肠患儿的HCMV临床分离株在UL141A和UL141B基因进化树中的分布具有明显规律.

3 讨论

HCMV在体内具有多种组织趋向性, 可以感染

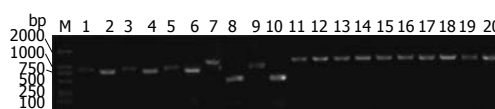


图 1 PCR产物电泳图. 1-2: 10J扩增产物; 3-4: 14J扩增产物; 5-6: 25J扩增产物; 7-8: 51C扩增产物; 9-10: 13J扩增产物; 11-20: 2J、8J、9J、27C、29C、32C、33J、39J、45J、63J扩增产物. M: marker DL 2000; 1, 3, 5: 874 bp; 2, 4, 6: 742 bp; 7, 9: 1055 bp; 8, 10: 617 bp; 11-20: 1418 bp.

多种器官和组织, 产生不同的临床表现. 先天和围生期感染会造成较严重后果. HCMV侵犯肝细胞或肝内外胆管系统, 可破坏肝细胞或胆管上皮细胞, 造成直接和间接胆红素增高^[2-8]. 另有研究表明, HCMV先天感染侵犯肠壁组织, 使其发育不良, 造成先天性巨结肠.

HCMV感染的不同临床表现, 一方面可能与宿主的免疫状态有关, 另一方面可能与不同临床分离株基因及其编码产物多态性有关. Cha et al^[6]发现Toledo株大约有19个ORF在实验室株AD169中不存在, 却广泛存在于低传代的临床分离株中. 这些基因的编码产物可能与HCMV的致病性有关. UL144基因编码一种I型跨膜糖蛋白, 是TNFR超家族成员之一, 很可能具有免疫调节功能, 并可能与HCMV的免疫逃避机制有关^[9]. 不同研究人员对UL144的基因分型基本一致. 并证明UL144不同基因型可能与HCMV先天感染的类型和预后有关^[10-12].

研究表明UL141基因能够下调CD155分子的表达, 从而逃避NK细胞的杀伤作用^[13-14]. 因此UL141基因可能在HCMV致病过程中发挥重要作用. 我们主要探讨UL141基因在来自黄疸和先天性巨结肠患儿的临床低传代分离株中序列变化, 并分析些变化与临床致病性的关系. 对Toledo株及15株来自黄疸和先天性巨结肠患儿的临床分离株进行核苷酸线性化比较分析, 结果表明, 所有临床分离株在Toledo株UL141的核

创新盘点
本文首次报道UL141基因的多态性及其与HCMV先天感染致病性的关系. 且研究中的标本均来自先天和围产期感染的分离株.

- Myerson D, Gooley T. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. *Blood* 1997; 90: 2097-2102
- 6 Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 1996; 70: 78-83
- 7 何蓉, 刘兰青, 吕绳敏. 荧光定量PCR方法检测婴儿尿液中人类巨细胞病毒基因的含量. *中华儿科杂志* 2001; 39: 739-742
- 8 胡雪影, 王明丽. 人巨细胞病毒先天性潜伏感染再激活致老年小鼠肝脏的损伤. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1146-1150
- 9 Benedict CA, Butrovich KD, Lurain NS, Corbeil J, Rooney I, Schneider P, Tschopp J, Ware CF. Cutting edge: a novel viral TNF receptor superfamily member in virulent strains of human cytomegalovirus. *J Immunol* 1999; 162: 6967-6970
- 10 Lurain NS, Kapell KS, Huang DD, Short JA, Paintsil J, Winkfield E, Benedict CA, Ware CF, Bremer JW. Human cytomegalovirus UL144 open reading frame: sequence hypervariability in low-passage clinical isolates. *J Virol* 1999; 73: 10040-10050
- 11 He R, Ruan Q, Xia C, Liu LQ, Lu SM, Lu Y, Qi Y, Ma YP, Liu Q, Ji YH. Sequence variability of human cytomegalovirus UL144 open reading frame in low-passage clinical isolates. *Chin Med Sci J* 2004; 19: 293-297
- 12 Mao ZQ, Huang Y, Sun M, Ruan Q, Qi Y, He R, Huang YJ, Ma YP, Ji YH, Sun ZR, Gao H. Genetic polymorphism of UL144 open reading frame of human cytomegalovirus DNA detected in colon samples from infants with Hirschsprung's disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4350-4354
- 13 Tomasec P, Wang EC, Davison AJ, Vojtesek B, Armstrong M, Griffin C, McSharry BP, Morris RJ, Llewellyn-Lacey S, Rickards C, Nomoto A, Sinzger C, Wilkinson GW. Downregulation of natural killer cell-activating ligand CD155 by human cytomegalovirus UL141. *Nat Immunol* 2005; 6: 181-188
- 14 Wilkinson GW, Tomasec P, Stanton RJ, Armstrong M, Prod'homme V, Aicheler R, McSharry BP, Rickards CR, Cochrane D, Llewellyn-Lacey S, Wang EC, Griffin CA, Davison AJ. Modulation of natural killer cells by human cytomegalovirus. *J Clin Virol* 2008; 41: 206-212
- 15 Dolan A, Cunningham C, Hector RD, Hassan-Walker AF, Lee L, Addison C, Dargan DJ, McGeoch DJ, Gatherer D, Emery VC, Griffiths PD, Sinzger C, McSharry BP, Wilkinson GW, Davison AJ. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2004; 85: 1301-1312

同行评价
本研究深入、全面, 方法合理, 结果可信, 具有较强的创新性。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称), 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。(常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

食管黏膜表层剥脱症1例

黎培员, 王南下, 田德安

背景资料
食管黏膜表层剥脱症是一种临床上甚为少见的食管良性疾病, 表现为食管黏膜表层鳞状上皮部分或全部从食管剥脱。

黎培员, 王南下, 田德安, 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
作者贡献分布: 本文写作由黎培员完成; 王南下与田德安审校。
通讯作者: 田德安, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科。
tiandeanwh@medmail.com.cn
电话: 027-83663585 传真: 027-83663585
收稿日期: 2007-11-16 修回日期: 2008-03-10

One-case analysis of esophageal superficial mucosal exfoliation

Pei-Yuan Li, Nan-Xia Wang, De-An Tian

Pei-Yuan Li, Nan-Xia Wang, De-An Tian, Division of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: De-An Tian, Division of Gastroenterology, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Avenue, Wuhan 430030, China. tiandeanwh@medmail.com.cn
Received: 2007-11-16 Revised: 2008-03-10

Abstract

Esophageal superficial mucosal exfoliation is a quite rare disease in clinical practice. We report a young female who vomited out a strip of pale soft tissue like a strand with one end in the mouth and the other free with a little blood after taking food. After being admitted, the patient was given conventional therapies such as fasting and acid-suppression by proton pump inhibitor. Six days later, the patient was discharged with liquid diet. After a 2-mo to 1-year following up, no abnormal findings were observed under endoscope after two months and one year later.

Key Words: Esophageal superficial mucosal exfoliation; Esophageal benign disease

Li PY, Wang NX, Tian DA. One-case analysis of esophageal superficial mucosal exfoliation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1476-1478

摘要

食管黏膜表层剥脱症较为罕见。本文报告1例

年轻女性, 因进食火锅后上腹部不适入院。入院后予以禁食、质子泵抑制剂抑酸等内科保守治疗, 住院6 d后恢复流质饮食出院。2 mo至1年后, 随访复查内镜未见明显异常。

关键词: 食管黏膜表层剥脱症; 食管良性疾病

黎培员, 王南下, 田德安. 食管黏膜表层剥脱症1例. 世界华人消化杂志 2008; 16(13): 1476-1478
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1476.asp>

0 引言

食管黏膜表层剥脱症(esophageal superficial mucous exfoliation)是一种临床上甚为少见的食管良性疾病, 表现为食管黏膜表层鳞状上皮部分或全部从食管剥脱。大部分患者表现为一条索样膜管状物随鲜血一同呕出于口腔外, 一端可仍残留于口腔内, 小部分患者系因呕血内镜检查发现食管黏膜剥脱于管腔内。对于前者患者常十分惊惧, 且少有接诊医生能正确认识和诊断。我们收治由市级医院转诊而来的食管黏膜表层剥脱症典型病例1例, 报告如下, 并对相关文献进行复习。

1 病例报告

患者22岁, 女性, 2006-09入院。患者于入院前5 d进食火锅后开始出现上腹部不适, 为间断隐痛, 不伴烧心、胸痛、吞咽困难、反酸等不适, 未予以特殊处理。入院前12 h进食少量稀饭后出现呕吐, 约4-6次, 为胃内容物及胆汁样物, 同时有胸骨后阻塞感。入院前8 h左右呕吐出一灰白色条索样膜管状软组织, 类似鸡肠子, 长约20 cm, 一端悬于口腔外, 一端仍残留于口腔内。伴有鲜血呕出, 量约100 mL。患者感咽部、胸骨后及剑突下疼痛。急送当地医院, 耳鼻喉科医生自咽部剪去此膜管状软组织, 予以抑酸、补液等治疗后转入我院。患者曾于两年因上腹不适在当地医院行胃镜检查, 诊断为“慢性糜烂性胃炎”, 予以抑酸治疗后症状好转, 未再复查。无其他既往病史。入院后查体, 体温37.7℃, 急性病容, 因咽痛

同行评议者
程英升, 主任医师, 上海交通大学附属第六人民医院放射科、上海交通大学影像学研究所

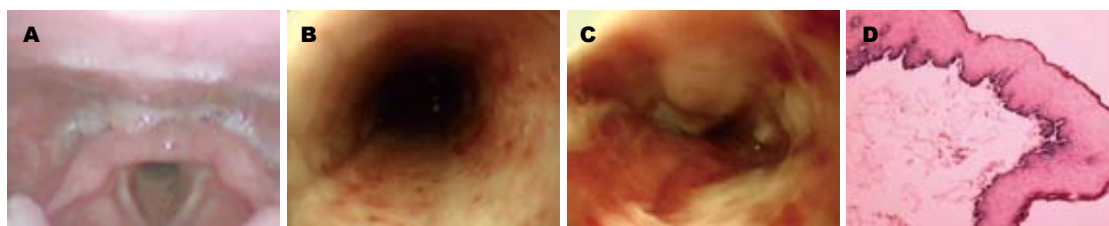


图1 内镜及病理学检查: A: 喉镜检查; B: 胃镜检查(食管中段); C: 胃镜检查(食管下段); D: 病理检查(HE染色×100)。

及紧张不愿言语, 咽稍充血, 口腔内未见明显软组织残留。心肺腹查体无特殊发现。入院后急查血常规, WBC $21.52 \times 10^9/L$, 中性粒细胞占88.2%, Hb 123 g/L。尿常规、生化常规、出凝血时间无特殊。发病次日喉镜检查, 见咽部黏膜稍充血, 环后隙见淡黄色伪膜样物附着(图1A)。胃镜见食管全段条片状充血、糜烂、渗血, 下段有白色黏稠分泌物附着, 齿状线不清晰, 贲门开闭尚可, 余无特殊(图1B-C)。将呕吐出的软组织分段多处取材, 全制片, HE染色, 为环形的复层鳞状上皮黏膜组织, 未见明显炎性细胞(图1D)。入院后予以禁食、质子泵抑制剂抑酸、止血、预防感染、补液支持、安慰镇静等处理。入院次日患者体温正常, 4 d后患者咽痛及胸骨后疼痛好转, 复查血常规正常, 开始流质饮食。住院6 d后予以出院。嘱患者逐渐恢复至半流质饮食。2 mo及1年后两次随访, 患者无不适, 复查内镜未见明显异常。

2 讨论

食管黏膜表层剥脱症最早于1895年由Schavunos描述, 国内于1941年由张仓祥 *et al* 首先报道。此病临床上一直没有统一的命名, 又称为(表层)剥脱性食管炎(esophagitis dissecans superficialis)、食管管型(esophageal cast)、食管黏膜撕脱和食管黏膜管型剥脱等。

食管黏膜表层剥脱症发生的原因和机制目前仍不是十分清楚。发病者多为健康青壮年, 大多无明确的基础疾病。如食管下段有炎性病变, 或食管黏膜上皮层与固有层结合较为松弛, 可能更易于发病。还有作者认为和细胞桥粒病变有关。推测分析发病机制, 患者一般以进食硬粗热食为诱因, 在机械力刺激作用下食管黏膜表层(复层鳞状上皮层)与固有层分离, 二层之间血管断裂, 发生血肿。如果此时剧烈呕吐, 血肿逐渐增大, 最后使整个食管表层与固有层分离。呕吐时食管内负压, 食管下括约肌产生高压性收缩, 上皮层下端发生断裂, 断裂的食管黏膜表层向上翻转, 随吐出物及血液等吐出口外。因上端

仍附着, 所以呈条管状悬于口外^[1-2]。

此病大多为单次散发, 多发生于青壮年, 儿童及老年人亦有报道^[3-4]。目前仅有1例报告为反复4次发生者^[5]。患者大多于进食干硬、粗糙、热的食物过程中或之后即刻发病, 出现呕吐, 可合并有咽及胸骨后疼痛不适, 吞咽梗阻感。几乎均有呕血发生, 量多不大。典型者可呕出一段白色条索膜管样物, 一端悬于口外, 一端系于咽部。大多由医生自咽部剪断或由患者自行扯出。因不明是何物, 患者常十分紧张。少数患者系因呕吐、上消化道出血就诊, 内镜下发现食管黏膜部分剥脱^[1,6]。而体格检查患者腹部常无明显阳性体征, 偶有剑突下压痛。喉镜检查可见咽部充血水肿, 少部分可见膜性残留。行钡餐或食管碘水造影可见食管中下段黏膜不规则, 狭窄, 不连续, 少数可无明显异常。而胃镜检查可发现黏膜部分或全部剥脱缺如, 剥脱处有糜烂渗血, 可有膜状物残留。极少有肌层外露。脱出物病理检查多为食管黏膜正常复层鳞状上皮, 少有炎性改变及坏死。极少见固有层及黏膜下组织脱出^[7]。一般根据典型的病史即可作出诊断, 而确诊有赖于内镜和病理检查。

对于此病的治疗, 一般采取内科保守治疗即可, 如止血、抑酸、保护黏膜、预防感染等, 主要是预防并发症, 促进黏膜表层再生修复。而食管黏膜表层修复常十分迅速, 一般7-10 d剥脱处内镜检查即无明显异常^[8]。部分患者未经特殊处理而痊愈, 亦提示黏膜修复迅速, 有自愈倾向^[9]。对于脱出口外的部分, 应齐咽部剪断, 或嘱患者吞入, 切勿强行拉出, 增加损伤和出血。一般经内科处理后预后良好, 几无食管狭窄等发生。但有文献报道3例发生食管黏膜表层剥脱者, 有2例行空肠造瘘术, 后于2 mo内拔管, 经食道逐渐恢复正常饮食^[10]。1例患者空肠造瘘半年, 后食管前后壁粘连行结肠代食管手术^[11]。此3例患者剥脱物病理检查均为鳞状上皮, 均未报告见有上皮组织。而接诊医师仍对其采用了空肠造瘘以减轻食物刺激食管的治疗方法, 对此

名词解释
食管黏膜表层剥脱症: 是一种临床上甚为少见的食管良性疾病, 表现为食管黏膜表层鳞状上皮部分或全部从食管剥脱。患者起病多有进食诱因, 大部分患者表现为一条索样膜管状物随鲜血一同呕出于口腔外, 一端可仍残留于口腔内, 小部分患者系因呕血内镜检查发现食管黏膜剥脱于食管腔内。内科保守治疗有效, 预后良好。

同行评价
本文资料完整, 图文并茂, 具有较强的真实性和可靠性.

处理尚有争议. 因此对于外科治疗, 绝大多数作者认为除非有穿孔等并发症发生, 否则没有必要.

本病预后良好, 1例于12岁-43岁反复4次发生食管黏膜表层剥脱者^[5], 及1例单发病例最长随访5年者^[12], 均未发现有食管粘连、狭窄等病变.

3 参考文献

- 1 黎培员, 王南下, 廖家智, 田德安, 刘南植. 150例食管黏膜剥脱症临床分析. 中华医学会第七次全国消化病学术会议论文汇编(上册) 2007: 170
- 2 沈伟明, 李必瑾, 沈翠英. 剥脱性食管炎16例分析. 南通医学院学报 1997; 17: 218-219
- 3 李发义, 李金凤. 食管黏膜剥脱1例. 中国实用儿科杂

志 2000; 15: 300

- 4 宋继业. 食管黏膜剥脱症1例. 中华消化内镜杂志 1995; 12: 63
- 5 王政民, 马培东. 食管黏膜多次剥脱1例报告. 中华消化内镜杂志 1994; 6: 376
- 6 魏秀芹, 张玫. 食管黏膜剥脱2例. 实用医学杂志 2005; 21: 2005
- 7 束东山, 涂秀芳. 食管黏膜剥脱症一例. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志 1994; 2: 205
- 8 李明兰, 贺莉, 何长培. 剥脱性食管黏膜炎1例. 川北医学院学报 1998; 13: 97
- 9 张义和, 许瑞彬, 姜泓. 食管管型一例. 中国胸心血管外科临床杂志 2002; 9: 242
- 10 杨玉伦, 王俊英, 薛宝军. 自发性食管黏膜撕脱3例分析. 中国误诊学杂志 2006; 6: 976-977
- 11 吴宁. 食管黏膜撕脱伤1例. 人民军医 1998; 41: 618
- 12 陈著声. 食管黏膜管型剥脱症1例. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志 2001; 9: 46

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致. 具体格式要求如下: (1)题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2)作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3)单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4)基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5)通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com; (6)收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

肝紫癜诊治1例

李良平, 李开艳, 肖震宇, 朱德强, 赵银锋, 陈孝平, 黄志勇

李良平, 肖震宇, 朱德强, 赵银锋, 陈孝平, 黄志勇, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心 湖北省武汉市 430030

李开艳, 华中科技大学同济医学院附属同济医院超声科 湖北省武汉市 430030

教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目, No. NCET-04-0701
作者贡献分布: 此课题由黄志勇及陈孝平设计; 研究过程由黄志勇, 李良平, 李开艳, 肖震宇, 朱德强及赵银锋操作完成; 本文写作由李良平及朱德强完成。

通讯作者: 黄志勇, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心。

zyhuang@medmail.com.cn

电话: 027-83663871 传真: 027-83803209

收稿日期: 2008-01-08 修回日期: 2008-02-26

One-case analysis of diagnosis and therapy for hepatic peliosis

Liang-Ping Li, Kai-Yan Li, Zhen-Yu Xiao, De-Qiang Zhu, Yin-Feng Zhao, Xiao-Ping Chen, Zhi-Yong Huang

Liang-Ping Li, Zhen-Yu Xiao, De-Qiang Zhu, Yin-Feng Zhao, Xiao-Ping Chen, Zhi-Yong Huang, Center of Hepatic Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Kai-Yan Li, Department of Ultrasound, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by: the New Century Talent Supporting Program Foundation of Chinese Education Ministry, No. NCET-04-0701

Correspondence to: Dr. Zhi-Yong Huang, Center of Hepatic Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Road, Wuhan 430030, Hubei Province, China. zyhuang@medmail.com.cn

Received: 2008-01-08 Revised: 2008-02-26

Abstract

A male patient of fifty-two years old was admitted with hepatic space-occupying lesion found by ultrasound examination. He had no history of liver disease, and no positive physical sign was identified by physical examination. The alpha-fetoprotein (AFP) level was normal. Hepatic space-occupying lesion was further confirmed by computerized tomography and contrast-enhanced ultrasound. The patient underwent liver resection, and hepatic peliosis was diagnosed by post-operative pathologic method.

Key Words: Hepatic peliosis; Diagnosis; Therapy

Li LP, Li KY, Xiao ZY, Zhu DQ, Zhao YF, Chen XP, Huang ZY. One-case analysis of diagnosis and therapy for hepatic peliosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(13): 1479-1481

摘要

患者, 男, 52岁, 因体检检查B超发现肝占位性病变10 d入院, 既往无肝病史, 无明显阳性体征, AFP正常, CT增强及超声造影提示肝内占位性病变, 行手术切除, 病检证实为肝紫癜, 此病罕见。

关键词: 肝紫癜; 诊断; 治疗

李良平, 李开艳, 肖震宇, 朱德强, 赵银锋, 陈孝平, 黄志勇. 肝紫癜诊治1例. *世界华人消化杂志* 2008; 16(13): 1479-1481
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1479.asp>

0 引言

肝紫癜(poliosis hepatis)是指在肝切除或活检标本中, 看到一些大小不等的小囊, 内充满血液, 是一种罕见的肝脏疾病^[1]. 2007-11我院收治1例肝紫癜患者, 现报道如下。

1 病例报告

患者, 男, 52岁, 因体检检查B超发现肝占位性病变10 d, 于2007-11-12入院. 无发热、腹痛、腹泻、腹胀, 无其他不适. 无乙肝史及血吸虫病史. 既往30年每日饮酒250-500 g. 体格检查无明显异常. 肝功能: ALT 69 U/L, AST 19 U/L, 总蛋白 64.6 g/L, 白蛋白38.4 g/L, 总胆红素9.2 μmol/L, 一分钟胆红素3.40 μmol/L. 乙肝检查: HbsAg(-)、HBsAb(+), HbeAg(-)、HbcAg(-)、HbcAb(-); 凝血功能: 凝血酶原时间10.6 s, 凝血酶原活动度128%, 国际标准化值0.99, 纤维蛋白原3.57 g/L, 活化部分凝血活酶时间31.4 s, 凝血酶时间14.4 s; 输血全套: HIV(-)、HCV(-)、梅毒抗体(-); 肿瘤标志物: AFP 4.9 μg/L, CEA 4.3 μg/L, CA12-5 5700 U/L, CA19-9 4400 U/L. CT增强: 肝右叶后段见一片状低密度影, 大小约为1.9 cm×1.1 cm, 周围欠清, 增强后轻度强化, 其内呈低密度, 延迟

背景资料

肝紫癜是指在肝切除或活检标本中, 看到一些大小不等的小囊, 内充满血液, 是一种罕见的肝脏疾病. 肝紫癜的临床诊断很困难, 影像学检查无特异性, 需要与原发性肝癌、转移性肝癌、肝血管瘤、肝包虫病、炎性假瘤等鉴别。

同行评议者

王鲁, 副教授, 复旦大学附属中山医院肝外科 复旦大学肝癌研究所

相关报道

Tóth *et al*对1例肝破裂导致的腹腔内出血的患者,先采用高选择性动脉插管栓塞控制出血,再行肝肿瘤切除的方法,治愈了1例肝紫癜患者; Tsirigotis *et al*采用肝右动脉插管栓塞出血部位成功地处理了1例严重被膜下出血的肝紫癜患者。

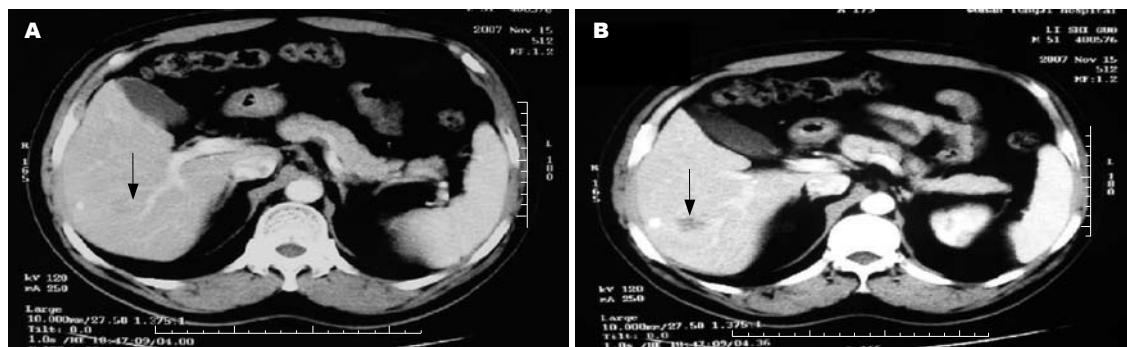


图1 CT增强影像表现: A: CT增强后轻度强化, 其内呈低密度(箭头示); B: 延迟期呈低密度(箭头示)。

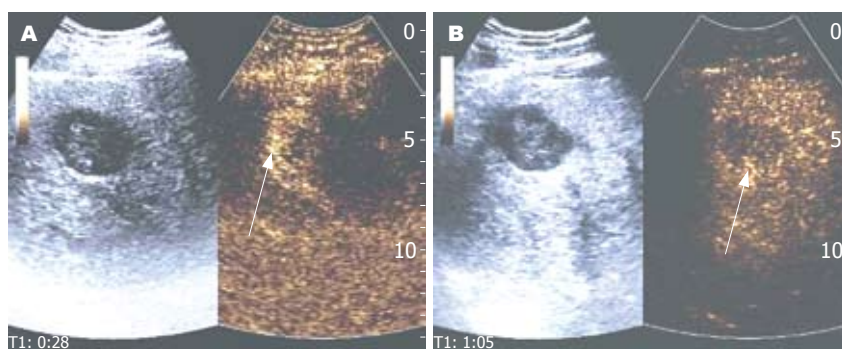


图2 超声造影影像表现: A: 超声造影动脉相低回声区开始增强, 回声强度高于周围肝组织(箭头示); B: 门脉相上述增强区域开始减退, 回声强度低于周围肝组织(箭头示)。



图3 肝组织切面见一直径3 cm的灰黄色结节。

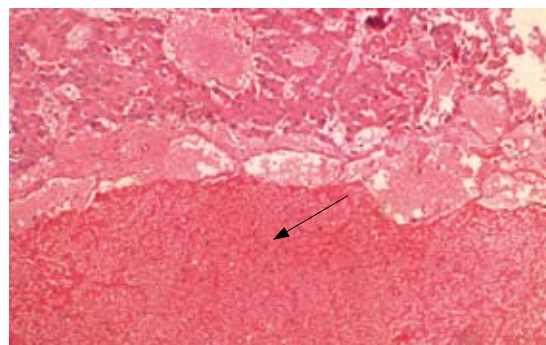


图4 镜下见结节区肝组织小叶内中央静脉及肝窦严重淤血扩张, 部分融合形成“血池”(箭头示)。

期仍呈低密度。诊断为肝右叶低密度占位性病变(图1)。B超: 肝脏切面形态正常, 肝右叶内见一大小为4.3 cm×3.1 cm的低回声区, 边界尚清, 周边呈低回声区, 中央呈高回声。超声造影检查: 经左侧肘部静脉分两次分别注入SonoVue 2.4 mL; 动脉相: 上述区域开始增强, 回声强度高于周围肝组织; 门脉相: 上述增强区域开始减退, 回声强度低于周围肝组织; 实质相: 上述区域回声强度低于周围肝组织。提示肝内实质性肿块(图2)。患者于2007-11-20行肝右后叶下段部分切除术(图3)。术中顺利, 术后恢复良好, 2007-12-07痊愈出院。术后病理检查示: 送检肝组织9 cm×8 cm×5 cm, 切面见一直径3 cm的灰黄色结节, 多处取材制片, 镜下见结节区肝组织小叶内中央静脉及肝窦严

重淤血扩张, 部分融合形成“血池”, 肝细胞索单层排列, 无异型性, 部分区域肝细胞因淤血显著萎缩, 结节周围肝组织不同程度水变性, 脂肪变性, 结合肉眼、组织学特点及临床病史, 考虑为肝紫癜(图4)。

2 讨论

1861年Tsokos *et al*^[2]首先使用“pelios”描述这种肝疾病的切面的肉眼观, 其病因不甚明确, 可能与下列情况有关: 进展期的肺结核、长期消耗性疾病、肾移植术后、炎症肿瘤、服用甾体类激素、以及长期血液透析等。Zafrani *et al*^[3]认为3种可能的发病机制: (1)肝静脉会合处的肝窦流出道梗阻; (2)一种毒性物质对肝窦壁的影响;

(3)肝细胞坏死导致囊肿形成. 本病例无肝炎史及血吸虫史, 家族中无类似疾病患者, 肿瘤标志物正常, 肝功能除AST轻度增高(69 U/L)外, 其他均正常. 患者最显著的特点是长期大量饮酒, 既往30年平均饮酒250-500 g/d, 酒精对肝脏的损伤是否是该患者的病因, 值得考虑.

肝紫癜的临床诊断很困难, 影像学检查无特异性, 需要与原发肝癌、转移性肝癌、肝血管瘤、肝包虫病、炎性假瘤等鉴别. Kim *et al*^[4]对8例肝紫癜患者的影像学资料进行回顾性分析, 显示局灶性肝紫癜在增强CT和MRI上可以表现为不同的增强模式, 他的最终诊断依靠病理学检查. 本病例的增强CT显示: 增强后轻度强化, 其内呈低密度, 延迟期仍呈低密度. 其增强CT与典型肝癌的“快进快出”的模式有所区别, 与血管瘤的“慢进慢出”的模式也有区别. 其超声造影表现: 动脉相有增强, 门脉相出现了减退, 与典型肝癌的“快进快出”模式相比, 动脉相增强的强度较弱, 门脉相减退的时间延迟. 这种超声造影表现与部分类型的肝癌、炎性假瘤等难以鉴别. 考虑到本病例无肝病史、甲胎蛋白不升高, 结合影像学检查, 术前认为患者良性肿瘤的可能性大, 但不能排除恶性肿瘤, 决定行手术切除, 术后病理检查证实为肝紫癜.

该病临床上一般无明显的症状, 往往是因为其他原因作肝组织活检时偶然发现. 少数患者可出现不同程度的肝功能不全改变. 也有报道, 患者由于大量的血囊而使肝脏增大, 个别患者可能由于血囊穿孔, 导致致命性出血. 所以该

病的最大危险是肝破裂致腹腔内大出血. Tóth *et al*^[5]对1例肝破裂导致的腹腔内出血的患者, 先采用高选择性动脉插管栓塞控制出血, 再行肝肿瘤切除的方法, 治愈了1例肝紫癜患者. Tsigotis *et al*^[6]采用肝右动脉插管栓塞出血部位成功地处理了1例严重被膜下出血的肝紫癜患者. 我们认为对于该病, 首先要明确诊断, 若无肝病史, AFP不升高, 影像学检查不支持肝癌, 可行肝穿刺活检; 若证实为肝紫癜, 可根据病灶情况确定治疗方案. 若病灶不大, 可暂不处理, 严密观察; 若病灶增大可采用微波固化、射频消融等方法治疗. 若肿瘤巨大, 有出血危险, 可采用肝动脉插管栓塞治疗或手术切除.

3 参考文献

- 1 周晓军, 张丽华. 肝脏诊断病理学. 第1版. 南京: 江苏科学技术出版社, 2006: 160
- 2 Tsokos M, Erbersdobler A. Pathology of peliosis. *Forensic Sci Int* 2005; 149: 25-33
- 3 Zafrani ES, Cazier A, Baudelot AM, Feldmann G. Ultrastructural lesions of the liver in human peliosis. A report of 12 cases. *Am J Pathol* 1984; 114: 349-359
- 4 Kim SH, Lee JM, Kim WH, Han JK, Lee JY, Choi BI. Focal peliosis hepatitis as a mimicker of hepatic tumors: radiological-pathological correlation. *J Comput Assist Tomogr* 2007; 31: 79-85
- 5 Tóth P, Takács I, Kerekes L, Sápy P. Surgical treatment of intraabdominal hemorrhage in peliosis hepatitis. *Chirurg* 2002; 73: 83-85
- 6 Tsigotis P, Sella T, Shapira MY, Bitan M, Bloom A, Kiselgoff D, Levin M, Libster D, Hai AA, Gesundheit B, Or R, Slavin S, Resnick I. Peliosis hepatitis following treatment with androgen-steroids in patients with bone marrow failure syndromes. *Haematologica* 2007; 92: e106-e110

编辑 李军亮 电编 何基才

同行评价
本文报道罕见病例肝紫癜, 临床资料详细, 具有一定的临床参考价值.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求, 本刊论文中的句号都采用黑圆点; 数字间的起止号采用“-”字线, 并列的汉语词间用顿号分开, 而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开, 参考文献中作者间一律用逗号分开; 表示终了的标点符号, 如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半, 通常不用于一行之首; 而表示开头的标点符号, 如括号及书名号的前一半, 不宜用于一行之末. 标点符号通常占一格, 如顿号、逗号、分号、句号等; 破折号应占两格; 英文连字符只占一个英文字符的宽度, 不宜过长, 如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体, 两横线表示用小写, 三横线表示用大写, 波纹线表示用黑体. (常务副总编辑: 张海宁 2008-05-08)

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

蔡三军 主任医师

复旦大学附属肿瘤医院腹部外科

陈力 教授

浙江大学医学院附属第二医院外科

陈立波 副教授

华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心

陈贻胜 教授

福建省立医院消化内科

邓长生 教授

武汉大学中南医院消化内科

房静远 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院消化所

冯志杰 主任医师

河北医科大学第二医院消化内科

何振平 教授

中国人民解放军第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所、解放军西南肝胆外科医院

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

李国威 教授

西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

李华山 副主任医师

中国中医科学院广安门医院肛肠科

李旭 副教授

广东省广州市南方医院急诊科

李永哲 副教授

中国医学科学院中国协和医科大学, 北京协和医院检验科

梁力建 教授

中山大学附属第一医院肝胆外科

刘改芳 主任医师

河北医科大学第三医院消化内科

陆云飞 教授

广西医科大学第一附属医院胃肠外科

钱林学 教授

首都医科大学附属北京友谊医院内科

乔岐禄 主任医师

北京大学第一医院外科

秦环龙 教授

上海交通大学附属第六人民医院外科

孙诚谊 教授

贵阳医学院附属医院院长办

唐霓 副研究员

重庆医科大学教育部感染性疾病分子生物学重点实验室

王小众 教授

福建医科大学附属协和医院消化内科

王志刚 副主任医师

上海市第六人民医院普外科

徐德忠 教授

中国人民解放军第四军医大学流行病学教研室

伊力亚尔·夏合丁 教授

新疆医科大学第一附属医院胸外科

于晓峰 主任医师

复旦大学附属华东医院消化内科

张吉翔 教授

南昌大学第二附属医院消化内科

张明辉 副主任医师

河北医科大学第一医院肝病中心(传染病)

周丁华 主任医师

中国人民解放军二炮总医院普外科

周国雄 主任医师

南通大学附属医院消化内科