

# TGF $\beta$ 1基因变异与疾病相关性研究展望

高春芳

高春芳, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院实验诊断科 上海市 200438

高春芳, 1993年第二军医大学博士, 研究员, 主要从事临床实验诊断学研究, 专长于肝病的基础和临床实验诊断研究。

国家自然科学基金资助, No. 30270605, No. 30571774

通讯作者: 高春芳, 200438, 上海市长海路225号, 中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院实验诊断科, gaocf1115@yahoo.com

电话: 021-25070850 传真: 021-25070850

收稿日期: 2007-08-13 修回日期: 2007-09-08

## Progress of research on the correlation between transforming growth factor $\beta$ 1 gene mutation and disease

Chun-Fang Gao

Chun-Fang Gao, Department of Laboratory Medicine, Eastern Hepatobiliary Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200438, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30270605, No. 30571774

Correspondence to: Dr. Chun-Fang Gao, Department of Laboratory Medicine, Eastern Hepatobiliary Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, 225 Chang-hai Road, Shanghai 200438, China. gaocf1115@yahoo.com

Received: 2007-08-13 Revised: 2007-09-08

## Abstract

Since the description of transforming growth factor (TGF)  $\beta$ 1 became known in 1972, much progress has been achieved in its genetic location, gene structure and expression, protein structure, receptor binding, and signal transduction, as well as its biological effects. Here we introduce the structure and function of TGF $\beta$ 1, with an emphasis on its special effects on liver fibrosis. Single nucleotide polymorphisms of the TGF $\beta$ 1 gene and its effects on disease development and prediction are also discussed to reveal the pathogenesis of this polypeptide growth factor and its potential in disease diagnosis and intervention.

**Key Words:** Transforming growth factor  $\beta$ 1; Progress; Disease

Gao CF. Progress of research on the correlation between transforming growth factor  $\beta$ 1 gene mutation and disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 2959-2965

## 摘要

转化生长因子 $\beta$ 1(TGF $\beta$ 1)自1972年发现以来, 相关研究取得了长足进展, 其基因染色体定位、基因结构、表达、蛋白结构、受体结合、信号传导、生物学效应等均基本明确. 本文介绍了TGF $\beta$ 1的结构和功能, 特别是他在肝纤维化中的独特作用的同时, 重点讨论TGF $\beta$ 1基因单核苷酸多态性(SNP)对其功能的影响及其在疾病中的意义及前景, 以进一步了解该多肽类生长因子在以肝病为代表的多种疾病中的病理意义及潜在的诊断、干预治疗前景.

**关键词:** 转化生长因子 $\beta$ 1; 进展; 疾病

高春芳. TGF $\beta$ 1基因变异与疾病相关性研究展望. *世界华人消化杂志* 2007;15(28):2959-2965

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2959.asp>

## 0 引言

转化生长因子 $\beta$ 1(TGF $\beta$ 1)自1972年发现以来, 共相关研究取得了长足进展, 其基因染色体定位、基因结构、表达、蛋白结构、受体结合、信号传导、生物学效应等均基本明确<sup>[1]</sup>. 目前已确定TGF $\beta$ 1对细胞外间质基因表达、基质降解、细胞增殖分化、细胞凋亡及免疫功能起明确作用. 国外及本实验室的研究发现TGF $\beta$ 1在肿瘤、脏器纤维化、创伤修复、炎症性疾病及自身免疫性疾病等发生发展中具有重要意义<sup>[1-4]</sup>, 提示该分子在多种疾病发生发展中的特殊重要地位. 本文介绍了TGF $\beta$ 1结构和功能, 特别是他在肝纤维化中的独特作用. 同时, 重点讨论了TGF $\beta$ 1基因单核苷酸多态性(SNP)对其功能的影响及其在疾病中的意义和前景, 为进一步了解该多肽类生长因子在以肝病为代表的多种疾病中的病理意义及潜在的诊断、干预提供了应用前景.

## 1 TGF $\beta$ 1的分子结构和功能

TGF $\beta$ 超家族在结构上具有一些共同的特征, 即在合成初期, 都是一个分子量较大的前体分子, 包括一个氨基酸末端信号肽及各种大小的羧基

## 背景资料

TGF $\beta$ 1具有多种广泛功能, 对细胞外间质基因表达、基质降解、细胞增殖分化、细胞凋亡及免疫功能具有明确作用. 国外及本实验室的研究发现TGF $\beta$ 1在肿瘤、脏器纤维化、创伤修复、炎症性疾病及自身免疫性疾病等发生发展中具有重要意义, 提示该分子在多种疾病发生发展中具有特殊重要地位.

### 相关报道

研究表明, TGF $\beta$ 1基因至少存在8个以上的基因多态性位点。2002年, Gressner实验室首先采用Lightcycler、ARMS-PCR方法, 建立了其中4个位点(-800, -509, codon 10, codon 25)SNP的检测方法, 以后陆续有实验室采用不同方法如RFLP(限制性片段长度多态性)、SSCP(单链核酸构象多态性)、ASO(等位基因特异性寡核苷酸探针)等, 分别分析-509, codon 10的多态性位点。2004年本实验室建立了6个位点(-988, -800, -509, codon 10, codon 25, codon 263)SNP的检测方法, 为进一步认识TGF $\beta$ 1基因SNP与疾病的关系奠定了基础。

端(C端)活性分子。前体分子在酶解位点裂解, 释放出一分子量大约在110-140个氨基酸的成熟多肽亚单位。两个相同或不同的亚单位组成的二聚体具有生物活性。在TGF $\beta$ 超家族的TGF $\beta$ 亚家族中, 目前研究报道有6种TGF $\beta$ 分子, 分别为TGF $\beta$ 1-6, 在哺乳动物中表达并已克隆的是TGF $\beta$ 1-3。TGF $\beta$ 1-3亚单体同源性近80%。TGF $\beta$ 种属同源性高达95%以上, 提示该类分子介导了独特的、重要的进化中的保守生理过程。在诸多TGF $\beta$ 分子中, TGF $\beta$ 1是目前研究最多的与疾病相关分子, 除非特指, 很多研究中采用的TGF $\beta$ 即为TGF $\beta$ 1分子。

TGF $\beta$ 1前体分子的一级结构(图1), N端的信号肽、潜活肽(latent associated peptide, LAP)酶解后产生C端成熟态单体(mature form), 分子量约12.5 kDa。LAP与TGF $\beta$ 1成熟态同种二聚体(25 kDa)非共价交联可形成小复合物, 并可进一步与LTBP(latent TGF $\beta$  binding protein)共价结合形成分子量约为225 kDa以上的大复合物。TGF $\beta$ 1单体(又称成熟态mature form)、TGF $\beta$ 1活性二聚体及TGF $\beta$ 前体大、小两种复合物之间的结构关系见图2。TGF $\beta$ 大分子复合物将TGF $\beta$ 锚定于细胞外间质, 是TGF $\beta$ 活性分子的一个良好天然储存库<sup>[1]</sup>。

TGF $\beta$ 1具有多种广泛功能, 国外及本实验室的研究发现TGF $\beta$ 1在肿瘤、脏器纤维化、创伤修复、炎症性疾病及自身免疫性疾病等发生发展中具有重要意义<sup>[1-4]</sup>, 提示该分子在多种疾病发生发展中的特殊重要地位。在上述诸多疾病中, TGF $\beta$ 1与肝纤维化/硬化/肝癌的相关性研究有重要的现实意义。众所周知, 我国是病毒性肝炎特别是乙型病毒性肝炎的高发地, 作为其主要不良结局的肝纤维化/硬化和原发性肝癌同样具有较高的发病率, 以肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)激活、细胞外基质(ECM)过度沉积为特征的肝纤维化如果得不到及时诊断和治疗, 可进一步发展为肝硬化, 肝功能可从代偿走向失代偿, 患者最终因肝功能衰竭或并发肝癌而影响生存。因此肝炎-肝纤维化-肝硬化-肝癌是这类疾病发展的典型规律。肝硬化和肝癌均是病理条件下肝损伤修复的异常表现, 其中细胞外间质基因如何被异常激活并高水平表达、肝实质细胞在损伤后的修复中如何发生异常突变导致癌变等是目前肝纤维化/硬化及癌变发生机制中尚未弄清的核心问题。TGF $\beta$ 1在纤维硬化性疾病中的特殊作用表现为: (1)对纤

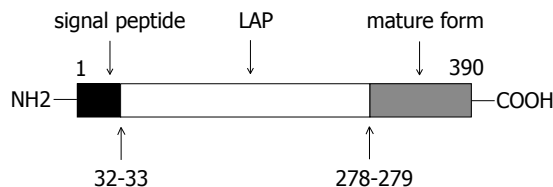


图1 TGF $\beta$ 1前体分子一级结构。

维化形成细胞的初始激活作用, (2)促进ECM的产生, (3)改变分泌基质金属蛋白酶(MMPs)及其抑制剂的活性, (4)增强靶细胞对细胞因子的反应性等。因此TGF $\beta$ 1是重要的介导细胞对组织损伤的强效致纤维化因子, 对肝炎肝损伤后肝纤维化(硬化)及其他脏器纤维化如心脑血管硬化、肺纤维化、肾纤维化、皮肤纤维疤痕等形成具有重要起始促进作用<sup>[1]</sup>。此外, TGF $\beta$ 1通过调节淋巴细胞增殖、分化和存活以及抑制NK细胞增殖及杀伤等途径发挥免疫抑制作用, 对维持机体免疫内环境稳定发挥重要作用<sup>[3]</sup>。病理情况下, TGF $\beta$ 1通过其免疫抑制机制, 损伤机体的免疫监督机制, 使机体失去对自我抗原、外来抗原、或肿瘤相关抗原的正常免疫应答, 从而导致自身免疫性疾病或肿瘤的发生<sup>[4]</sup>。TGF $\beta$ 1对纤维硬化性疾病效应细胞的特殊激活作用及其在炎症、免疫反应中的独特作用赋予了TGF $\beta$ 1异常在脏器纤维化/硬化及肿瘤等相关疾病中的特殊病理意义<sup>[3-4]</sup>。多视角、多层次的进一步研究还表明TGF $\beta$ 1转基因大鼠高表达TGF $\beta$ 1后, 可发生包括肝纤维化在内的多种脏器损伤<sup>[5-7]</sup>; 可溶性TGF $\beta$ 1受体中和阻断TGF $\beta$ 1功能或导入TGF $\beta$ 1信号传导的抑制性分子SMAD7后, 能有效预防DMN诱导或胆管结扎诱导的大鼠肝纤维化的发生<sup>[8-12]</sup>, 这些研究进一步确认了TGF $\beta$ 1在组织脏器纤维化中的作用。

## 2 TGF $\beta$ 1基因多态性与疾病相关性研究现状

2000年后, 随着人类基因组计划的完成, 有关基因结构和功能的研究蓬勃发展, 其中TGF $\beta$ 1基因多态性与疾病相关性的研究取得了令人鼓舞的结果。研究表明, TGF $\beta$ 1基因至少存在8个以上的基因多态性位点(图3)。

2002年, Gressner实验室首先采用Lightcycler(实时荧光PCR结合熔点曲线分析)及ARMS-PCR(amplification refractory mutation system-PCR, 扩增难控性突变系统PCR)方法, 建立了其中4个位点(-800, -509, codon 10, codon 25)SNP的检测方法<sup>[13]</sup>, 以后陆续有实验室采用不同方法

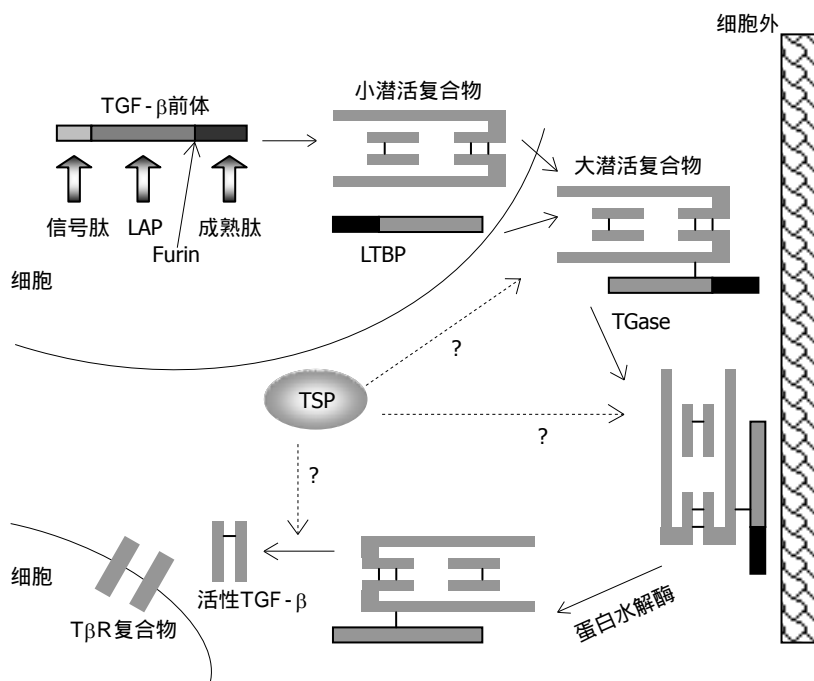


图 2 TGFβ1的大、小复合物结构及其激活过程.

**应用要点**  
TGFβ1基因SNP的分析可辅助判断相关疾病的进展和预后,为该多肽类生长因子在以肝病为代表的多种疾病中的病理意义及潜在的诊断、干预提供应用前景.

如RFLP(限制性片段长度多态性)、SSCP(单链核酸构象多态性)、ASO(等位基因特异性寡核苷酸探针)等,分别分析-509, codon 10的多态性位点. 2004年本实验室建立了6个位点(-988, -800, -509, codon 10, codon 25, codon 263)SNP的检测方法<sup>[14-15]</sup>. 研究表明,丙肝病毒(HCV)感染后, Arg25Arg者属于高TGFβ1表型,更容易发生肝纤维化, Arg25Pro杂合子发生肝纤维化的进展更快<sup>[13]</sup>. 本实验室的研究也发现, HBV感染后肝硬化的发生与codon 10基因多态性密切相关,这种肝硬化的严重性则与-509多态性有关<sup>[15]</sup>. 除了与乙型、丙型肝炎感染后肝硬化发生有关外,查阅2000年以来的文献可以发现, TGFβ1 SNP主要与以下5大类疾病有关: (1)纤维硬化性疾病,如心脑血管硬化导致的脑血管意外(脑卒中)、血管性痴呆、心梗、系统性硬化、心衰以及多发性硬化症、囊性纤维化等; (2)肿瘤性疾病如乳腺癌、肺癌、妇科肿瘤、前列腺肿瘤、结直肠癌等; (3)免疫性疾病如哮喘、风湿病、变态反应、HCV清除率、移植排斥反应等; (4)糖尿病及其并发症; (5)肾功能衰竭. 上述研究结论主要集中在-509、codon 10, codon 25这3个位点. 上述文献调研的结果见表1.

### 3 TGFβ1基因多态性对TGFβ1表达及功能的影响

TGFβ1基因多态性与如此多疾病的发生发展存在相关性,进一步提示该分子在多种疾病发生发展中的特殊重要地位,同时也提示细胞因子网络调控的复杂性. 目前有关TGFβ1多态性研究

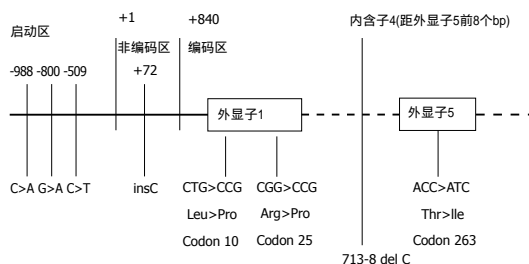


图 3 TGFβ1基因常见的8个SNP位点示意图.

的结果主要停留在不同位点基因多态性与疾病的相关性、严重性或易感性上. 我们认为这种现象的研究不足以揭示靶基因对疾病发生发展影响的本质, TGFβ1基因多态性究竟以何种方式参与疾病的病理过程值得进一步深入研究.

根据我们实验室的研究结果,在TGFβ1常见的8个SNP位点中,中国人在-800、-988位点及codon 25、codon 263基本不存在基因多态性,常见的变异主要存在于-509 C>T和codon 10(+29 T>C, 10 Leu>Pro),其中-509存在于TGFβ1转录起始位点上游. 为弄清这一位点变异可能带来的影响,我们采用计算机软件模拟分析其核转录因子结合情况,下图中我们分析了以-509为核心的上、下游60 bp的序列即-449-570 bp(图中相应位置是-570为+1, -449为+122,故-509相当于+62的位置)的DNA结合蛋白,可以发现-509 C>T的变化,相应核蛋白转录因子的结合谱是不同的. 提示-509 C>T的变化理论上可影响核转录因子的结合模式(图4A-B).

Codon 10(10 Leu>Pro)的变异存在于

## 名词解释

单核苷酸多态性 (SNP): 是目前发现的第三代遗传标志. 染色体的某个位点上存在单个碱基的变化. 如果在人群中的频率超过1%, 就可以认为是SNPs. 在人类基因组中平均每1000个碱基对就会有一个. 个体基因组DNA中的少数甚至个别碱基多态性, 可导致特定基因疾病相关的特征性改变. 这就是SNP的主要特征. SNPs对于研究基因多态性以及识别、定位疾病位点、分析多基因疾病的主基因及个体对药物的不同反应性差异、个体化用药等具有重要价值.

表 1 疾病与TGF $\beta$ 1 SNP研究一览表

疾病名称	研究人群所在国家	疾病相关TGF $\beta$ 1 SNP位点	参考文献
心脏移植受者肾功能	捷克	Codon 25	16
派若尼氏症	德国	Codon 25	17
肾移植受体免疫抑制病	瑞士	ND	18
增生性糖尿病视网膜病变	捷克	Codon 25	19
丙肝引起的肝硬化	德国	Codon 25	13, 14
特应性皮炎	英国	Codon 25	20
牙龈增生	英国	Codon 25	21
囊性纤维化的肺功能	英国	Codon 25	22
心肌梗塞并高血压	爱尔兰/法国	Codon 25	23
韦格纳肉芽肿病	德国	Codon 25	24
疤痕疾病	英国	Codon 25	25
系统性硬化症	日本	Codon 25	26
老年性痴	法国	Codon 25	27
1型糖尿病性肾炎	美国	Codon 25	28
成人牙周炎	捷克	Codon 25	29
哮喘	英国	Codon 25	30
多发性硬化	美国	Codon 25	31
扩张型心肌病心力衰竭	荷兰	Codon 25	32
伯克肉样瘤	德国	Codon 25	33
心脏移植后加速移植血管病	荷兰	Codon 25	34
同种异体肾脏移植排斥反应	英国	Codon 25	35
心脏移植后肾衰竭	荷兰	Codon 25	36
原发性高血压	阿拉伯联合酋长国	Codon 25	37
子宫颈侵袭性磷状细胞癌	津巴布韦	Codon 25	38
脑中风	荷兰	-509/Codon 10	39
缺血性脑卒/血管性痴呆	韩国	Codon 10	40
变态反应/免疫活性	美国	-509	41
乳腺癌	美国/中国	Codon 10	42, 43
骨密度/骨折	中国	Codon 10	44
肺癌	韩国	-509, Codon 10	45
遗传缺陷性高度近视	中国	Codon 10	46
丙肝病毒清除率	日本	-509	47
哮喘	中国	-509/Codon 10	48
风湿性心脏病/关节炎	中国台湾/北欧	-509/Codon 10	49, 50
乙型肝炎后肝硬化	中国	-509/Codon 10	14, 15
前列腺增生/肿瘤	日本	Codon 10	51

TGF $\beta$ 1前体分子的的信号肽中(图1), 而信号肽中氨基酸序列的改变理论上可影响相应蛋白质的分泌. Dunning *et al*<sup>[52]</sup>通过Hela细胞转染研究发现, codon 10(10 Leu>Pro)变异可改变细胞TGF $\beta$ 1分泌水平. 这种分泌活性的改变是否在其他储存或产生TGF $\beta$ 1的细胞如正常肝细胞、肝星状细胞(HSC)等也存在类似现象尚无文献报道; 此外, 研究发现肝脏的HSC具有重要的抗原递呈活性<sup>[53]</sup>. 作为重要免疫抑制性调控因子的TGF $\beta$ 1转录或分泌活性的改变是否可影响病理状态下HSC的抗原递呈活性并因此参与影响

病毒清除进而成为影响其病理转归的重要原因. 目前尚无文献报道. 另外, TGF $\beta$ 1具有诱导肝细胞凋亡的作用, 这在病毒性肝病、肝硬化及肿瘤的发生中具有重要意义. 不同个体对于病毒性肝病的不同病理转归是否与-509、codon10不同的基因表现型导致的凋亡活性改变有关尚不清楚.

#### 4 TGF $\beta$ 1基因多态性与HBV感染后肝病相关研究存在的问题及前景

针对上述研究现状, 以我国具有较大发生率

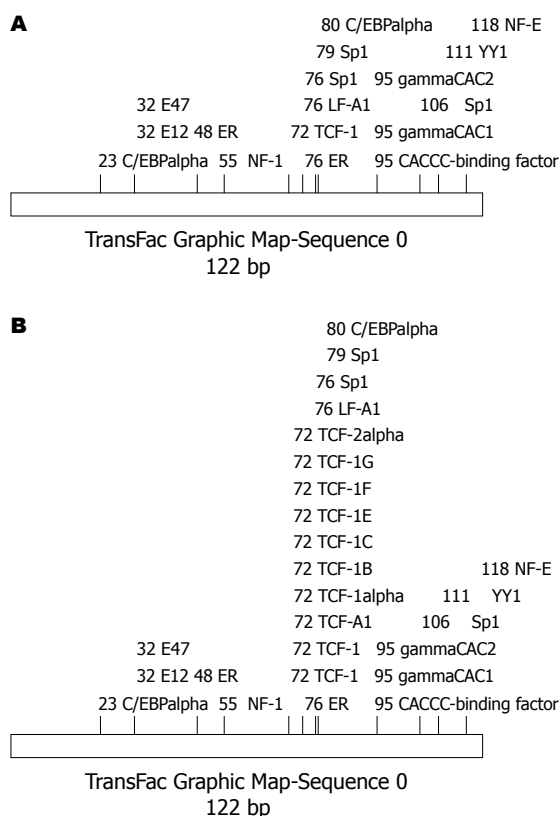


图 4 DNA结合蛋白模拟分析结果(DNAassist 2.0). A: -509位点序列为C; B: -509位点序列为T.

的肝病为主要研究目标,我们认为应解决以下几个问题:(1)TGFβ1基因多态性通过什么机制介导或参与以肝病为代表的相关疾病的发生、发展?作为上游调控序列中重要位点变异-509C>T是否因不同细胞因子结合转录因子的不同导致启动转录活性的差异?(2)存在于信号肽中的Codon 10(+29 T>C, 10 Leu>Pro)的变异是否改变肝源性细胞如肝细胞、肝癌细胞、肝星状细胞TGFβ1的分泌?(3)不同的-509、codon 10基因型是否具有影响HSC抗原递呈活性的作用并因此影响病毒性肝病的病理转归?(4)不同的-509、codon 10基因型是否具有影响肝细胞的凋亡活性并因此影响肝损伤后的病理转归?(5)是否可通过临床大样本研究进一步证实不同的-509、codon10基因型影响HBV感染后HBV的清除以及病毒性肝炎后肝硬化或肝癌的发生?

基于前述国内外研究现状及上述问题,我们认为应进一步深入研究TGF $\beta$ 1基因变异对肝细胞、肝星状细胞、肝癌细胞TGF $\beta$ 1基因转录调控、转录因子、细胞因子反应性的改变以及对TGF $\beta$ 1成熟肽分泌、病毒清除、HCC发生等的影响,从而在更深层次上阐述TGF $\beta$ 1基因变异与

肝病(肝纤维化/硬化、肝癌)发生发展相关的本质和作用机制。上述问题的阐述将对以HBV感染后肝硬化、肝癌为代表的TGF $\beta$ 1异常相关疾病的发病机制研究、实验室早期诊断及干预治疗靶点的寻找具有深远意义。

## 5 参考文献

- 1 高春芳, 陆伦根. 纤维化疾病的基础和临床. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 90-99
- 2 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10: 76-99
- 3 Wahl SM, Wen J, Moutsopoulos N. TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol Rev* 2006; 213: 213-227
- 4 Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 99-146
- 5 Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS. Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 2572-2576
- 6 Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, zum Buschenfelde KH, Blessing M. TGF-beta1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *Am J Physiol* 1999; 276: G1059-1068
- 7 Ueberham E, Low R, Ueberham U, Schonig K, Bujard H, Gebhardt R. Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. *Hepatology* 2003; 37: 1067-1078
- 8 Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2345-2349
- 9 Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Qi Z, Astuchi N, Takeshita A, Shimizu K, Ohashi H. A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 33-42
- 10 George J, Roulot D, Kotliansky VE, Bissell DM. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 12719-12724
- 11 Arias M, Sauer-Lehnen S, Treptau J, Janoschek N, Theuerkauf I, Buettner R, Gressner AM, Weiskirchen R. Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 29
- 12 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003; 125: 178-191
- 13 Gewaltig J, Mangasser-Stephan K, Gartung C, Biesterfeld S, Gressner AM. Association of

**同行评价**  
本文内容新颖全面,行文流畅,引用的参考文献较新,代表了国内外现阶段该领域的研究现状,是一篇有深度有见解的文章,具有较高的学术价值。

- polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene with the rate of progression of HCV-induced liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2002; 316: 83-94
- 14 Wang H, Mengsteab S, Tag CG, Gao CF, Hellerbrand C, Lammert F, Gressner AM, Weiskirchen R. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms are associated with progression of liver fibrosis in Caucasians with chronic hepatitis C infection. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1929-1936
- 15 杨再兴, 王皓, 高春芳, 徐玲玲, 赵文静. 转化生长因子 $\beta$ 1基因多态性对乙型肝炎肝硬化化的影响. *中华医学杂志* 2005; 85: 1021-1026
- 16 Lacha J, Hubacek JA, Viklicky O, Malek I, Hutchinson I, Vitko S. TGF-beta1 gene polymorphism is a risk factor for renal dysfunction in heart transplant recipients. *Transplant Proc* 2001; 33: 1567-1569
- 17 Hauck EW, Hauptmann A, Schmelz HU, Bein G, Weidner W, Hackstein H. Prospective analysis of single nucleotide polymorphisms of the transforming growth factor beta-1 gene in Peyronie's disease. *J Urol* 2003; 169: 369-372
- 18 Ochsner S, Guo Z, Binswanger U, Knoflach A. TGF-beta 1 gene expression in stable renal transplant recipients: influence of TGF-beta 1 gene polymorphism and immunosuppression. *Transplant Proc* 2002; 34: 2901-2903
- 19 Beranek M, Kankova K, Benes P, Izakovicova-Holla L, Znojil V, Hajek D, Vlkova E, Vacha J. Polymorphism R25P in the gene encoding transforming growth factor-beta (TGF-beta1) is a newly identified risk factor for proliferative diabetic retinopathy. *Am J Med Genet* 2002; 109: 278-283
- 20 Arkwright PD, Chase JM, Babbage S, Pravica V, David TJ, Hutchinson IV. Atopic dermatitis is associated with a low-producer transforming growth factor beta(1) cytokine genotype. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 281-284
- 21 Linden GJ, Haworth SE, Maxwell AP, Poulton KV, Dyer PA, Middleton D, Irwin CR, Marley JJ, McNamee P, Short CD, Hull PS, James JA. The influence of transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms on the severity of gingival overgrowth associated with concomitant use of cyclosporin A and a calcium channel blocker. *J Periodontol* 2001; 72: 808-814
- 22 Arkwright PD, Laurie S, Super M, Pravica V, Schwarz MJ, Webb AK, Hutchinson IV. TGF-beta(1) genotype and accelerated decline in lung function of patients with cystic fibrosis. *Thorax* 2000; 55: 459-462
- 23 Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Generenaz L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirier O. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension* 1996; 28: 881-887
- 24 Murakozy G, Gaede KI, Ruprecht B, Gutzeit O, Schurmann M, Schnabel A, Schlaak M, Gross WL, Muller-Quernheim J. Gene polymorphisms of immunoregulatory cytokines and angiotensin-converting enzyme in Wegener's granulomatosis. *J Mol Med* 2001; 79: 665-670
- 25 Bayat A, Walter JM, Bock O, Mrowietz U, Ollier WE, Ferguson MW. Genetic susceptibility to keloid disease: mutation screening of the TGFbeta3 gene. *Br J Plast Surg* 2005; 58: 914-921
- 26 Ohtsuka T, Yamakage A, Yamazaki S. The polymorphism of transforming growth factor-beta1 gene in Japanese patients with systemic sclerosis. *Br J Dermatol* 2002; 147: 458-463
- 27 Araria-Goumidi L, Lambert JC, Mann DM, Lendon C, Frigard B, Iwatsubo T, Cottel D, Amouyel P, Chartier-Harlin MC. Association study of three polymorphisms of TGF-beta1 gene with Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002; 73: 62-64
- 28 Ng DP, Warram JH, Krolewski AS. TGF-beta 1 as a genetic susceptibility locus for advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus: an investigation of multiple known DNA sequence variants. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 22-28
- 29 Holla LI, Fassmann A, Benes P, Halabala T, Znojil V. 5 polymorphisms in the transforming growth factor-beta 1 gene (TGF-beta 1) in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 336-341
- 30 Pulleyn LJ, Newton R, Adcock IM, Barnes PJ. TGFbeta1 allele association with asthma severity. *Hum Genet* 2001; 109: 623-627
- 31 Weinshenker BG, Hebrink D, Kantarci OH, Schaefer-Klein J, Atkinson E, Schaid D, McMurray CM. Genetic variation in the transforming growth factor beta1 gene in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2001; 120: 138-145
- 32 Holweg CT, Baan CC, Niesters HG, Vantrimpont PJ, Mulder PG, Maat AP, Weimar W, Balk AH. TGF-beta1 gene polymorphisms in patients with end-stage heart failure. *J Heart Lung Transplant* 2001; 20: 979-984
- 33 Murakozy G, Gaede KI, Zissel G, Schlaak M, Muller-Quernheim J. Analysis of gene polymorphisms in interleukin-10 and transforming growth factor-beta 1 in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2001; 18: 165-169
- 34 Holweg CT, Baan CC, Balk AH, Niesters HG, Maat AP, Mulder PM, Weimar W. The transforming growth factor-beta1 codon 10 gene polymorphism and accelerated graft vascular disease after clinical heart transplantation. *Transplantation* 2001; 71: 1463-1467
- 35 Poole KL, Gibbs PJ, Evans PR, Sadek SA, Howell WM. Influence of patient and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence from a single centre study. *Transpl Immunol* 2001; 8: 259-265
- 36 Baan CC, Balk AH, Holweg CT, van Riemsdijk IC, Maat LP, Vantrimpont PJ, Niesters HG, Weimar W. Renal failure after clinical heart transplantation is associated with the TGF-beta 1 codon 10 gene polymorphism. *J Heart Lung Transplant* 2000; 19: 866-872
- 37 Frossard PM, Gupta A, Pravica V, Perrey C, Hutchinson IV, Lukic ML. A study of five human cytokine genes in human essential hypertension. *Mol Immunol* 2002; 38: 969-976
- 38 Stanczuk GA, Tswana SA, Bergstrom S, Sibanda EN. Polymorphism in codons 10 and 25 of the transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) gene in patients with invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Immunogenet* 2002; 29: 417-421
- 39 Sie MP, Uitterlinden AG, Bos MJ, Arp PP, Breteler MM, Koudstaal PJ, Pols HA, Hofman A, van Duijn



- CM, Witteman JC. TGF-beta 1 polymorphisms and risk of myocardial infarction and stroke: the Rotterdam Study. *Stroke* 2006; 37: 2667-2671
- 40 Kim Y, Lee C. The gene encoding transforming growth factor beta 1 confers risk of ischemic stroke and vascular dementia. *Stroke* 2006; 37: 2843-2845
- 41 Meng J, Thongngarm T, Nakajima M, Yamashita N, Ohta K, Bates CA, Grunwald GK, Rosenwasser LJ. Association of transforming growth factor-beta1 single nucleotide polymorphism C-509T with allergy and immunological activities. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; 138: 151-160
- 42 Ziv E, Cauley J, Morin PA, Saiz R, Browner WS. Association between the T29-->C polymorphism in the transforming growth factor beta1 gene and breast cancer among elderly white women: The Study of Osteoporotic Fractures. *JAMA* 2001; 285: 2859-2863
- 43 Shin A, Shu XO, Cai Q, Gao YT, Zheng W. Genetic polymorphisms of the transforming growth factor-beta1 gene and breast cancer risk: a possible dual role at different cancer stages. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1567-1570
- 44 Lau HH, Ho AY, Luk KD, Kung AW. Transforming growth factor-beta1 gene polymorphisms and bone turnover, bone mineral density and fracture risk in southern Chinese women. *Calcif Tissue Int* 2004; 74: 516-521
- 45 Park KH, Lo Han SG, Whang YM, Lee HJ, Yoo YD, Lee JW, Shin SW, Kim YH. Single nucleotide polymorphisms of the TGFβ1 gene and lung cancer risk in a Korean population. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 169: 39-44
- 46 Lin HJ, Wan L, Tsai Y, Tsai YY, Fan SS, Tsai CH, Tsai FJ. The TGFβ1 gene codon 10 polymorphism contributes to the genetic predisposition to high myopia. *Mol Vis* 2006; 12: 698-703
- 47 Kimura T, Saito T, Yoshimura M, Yixuan S, Baba M, Ji G, Muramatsu M, Kawata S. Association of transforming growth factor-beta 1 functional polymorphisms with natural clearance of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 2006; 193: 1371-1374
- 48 Mak JC, Leung HC, Ho SP, Law BK, Ho AS, Lam WK, Ip MS, Chan-Yeung MM. Analysis of TGF-beta(1) gene polymorphisms in Hong Kong Chinese patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 92-96
- 49 Chou HT, Chen CH, Tsai CH, Tsai FJ. Association between transforming growth factor-beta1 gene C-509T and T869C polymorphisms and rheumatic heart disease. *Am Heart J* 2004; 148: 181-186
- 50 Matthey DL, Nixon N, Dawes PT, Kerr J. Association of polymorphism in the transforming growth factor {beta}1 gene with disease outcome and mortality in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1190-1194
- 51 Li Z, Habuchi T, Tsuchiya N, Mitsumori K, Wang L, Ohyama C, Sato K, Kamoto T, Ogawa O, Kato T. Increased risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia associated with transforming growth factor-beta 1 gene polymorphism at codon10. *Carcinogenesis* 2004; 25: 237-240
- 52 Dunning AM, Ellis PD, McBride S, Kirschenlohr HL, Healey CS, Kemp PR, Luben RN, Chang-Claude J, Mannermaa A, Kataja V, Pharoah PD, Easton DF, Ponder BA, Metcalfe JC. A transforming growth factor-beta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 2610-2615
- 53 Vinas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Gines P, Berenguer C, Enrich C, Nicolas JM, Ercilla G, Gallart T, Vives J, Arroyo V, Rodes J. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 2003; 38: 919-929

编辑 何燕 电编 郭海丽

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

• 消息 •

## 世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。凡在在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息。

## 静脉注射吸毒人群丙型肝炎病毒感染研究进展

骆峻, 夏娴, 喻荣彬

**背景资料**  
吸毒和丙型肝炎均是近年来受到广泛关注的公共卫生问题。静脉注射吸毒人群HCV感染率远高于一般人群, 是非常重要的传染源, 直接影响着一般人群的健康。近年来, 国内外许多学者在该人群中开展HCV感染方面的研究。

骆峻, 江苏职工医科大学微生物学教研室 江苏省南京市210029  
夏娴, 喻荣彬, 南京医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系 江苏省南京市210029  
喻荣彬, 博士, 副教授, 主要从事传染病分子流行病学的研究。  
国家自然科学基金资助课题, No. 30200232  
江苏省现代病原生物学重点实验室开放基金, No. 1623  
通讯作者: 喻荣彬, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学流行病学与卫生统计学系, rongbinyu@njmu.edu.cn  
电话: 025-86862815  
收稿日期: 2007-06-11 修回日期: 2007-08-17

### Recent research about hepatitis C virus infection among intravenous drug users

Jun Luo, Xian Xia, Rong-Bin Yu

Jun Luo, Department of Microbiology, Jiangsu Medical University of Staff, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Xian Xia, Rong-Bin Yu, Department of Epidemiology and Biostatistics, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30200232; the Fund from Laboratory of Pathogen Biology of Jiangsu Province, No. 1623

Correspondence to: Rong-Bin Yu, Department of Epidemiology and Biostatistics, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. rongbinyu@njmu.edu.cn

Received: 2007-06-11 Revised: 2007-08-17

### Abstract

Drug use is a worldwide difficult problem, which leads to a series of public health problem harmful to common population. Hepatitis C virus infection rate among intravenous drug users (IVDUs) is obviously higher than that among common population. IVDUs are an important source of infection. This article summarizes mainly research results and standpoints in the field of HCV infection among IVDUs, the virology characteristics of the infection, particularly reviews the risk factors for the infection such as intravenous, years of drug use, sharing equipment, sexual risk behaviors, ethnic background and prevention, control of HCV infection among IVDUs.

**Key Words:** Intervenes drug users; Hepatitis C virus; Infection

Luo J, Xia X, Yu RB. Recent research about hepatitis C virus infection among intravenous drug users. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 2966-2971

### 摘要

吸毒是世界性难题, 其导致的公共卫生问题直接影响一般人群的健康。静脉注射吸毒者(IVDUs)人群丙型肝炎病毒(HCV)感染率远高于一般人群, 是重要的传染源。本文概述近年来国内外学者在IVDUs人群HCV感染方面的主要研究成果和观点, 探讨IVDUs人群感染HCV的病毒学特点, 重点介绍IVDUs人群吸毒方式, 吸毒年限, 器具共用, 性行为特征以及民族差异等因素对该人群感染HCV的影响作用。

**关键词:** 静脉注射吸毒; 丙型肝炎病毒; 感染

骆峻, 夏娴, 喻荣彬. 静脉注射吸毒人群丙型肝炎病毒感染研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(28):2966-2971  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2966.asp>

### 0 引言

吸毒问题已经成为世界性难题。截至2004年底, 全球共有吸毒人员1.85亿, 占总人口的3%<sup>[1]</sup>。我国至2005年底, 累计登记在册的吸毒人数也已达1 160 000人, 在现有吸毒人员中静脉注射吸毒者(intravenous drug users, IVDUs)比例平均为53.8%, 注射吸毒者中共用注射器比例平均为45.0%<sup>[2-3]</sup>, 共用注射器吸毒是血液传播病原体的主要途径, 包括HIV、HBV、HCV、HDV、HGV、输血传播病毒(TTV)、人类T淋巴细胞白血病病毒(HTLV)、SEN病毒以及梅毒等。

### 1 静脉注射吸毒人群HCV感染的流行特点

全球共有抗-HCV阳性者约1.7亿人, 我国一般人群抗-HCV阳性率为3.20%<sup>[4]</sup>, 而IVDUs人群的抗-HCV阳性率为31%-93%(表1), 研究对象主要来源于戒毒所, 美沙酮治疗门诊以及社区招募。静脉注射吸毒感染HCV的危险度之高超过其他



各种血液传播病原体(*OR*值在10以上). 由于不同国家和地区吸毒现象的严重程度差异很大, 因此吸毒人群中HCV的流行程度也不相同. 我国吸毒人群的数量仍处于上升趋势, 吸毒人数由1990年约70 000人增加至2005年1 160 000人, 吸毒人群中HCV感染者的数量也随之增加. 感染HCV的吸毒人员以16至45岁青壮年男性为主, 各报道显示男女性别在HCV感染率方面差异不显著. 尽管目前我国吸毒人群数量占总人口的比例很小, 但他们在HCV的传播中具有重要的作用. 因为HCV不仅可通过共用注射器等行为在吸毒人群中快速传播, 还可能通过输血、母婴传播以及性传播等方式危及一般人群.

## 2 静脉注射吸毒人群HCV感染的特点

**2.1 病毒学特点** HCV为单股正链RNA病毒, 极易演变成慢性化感染的趋势, 约50%-80%<sup>[37]</sup>. 丙型肝炎病毒基因型有明显的地域性. 欧美国家主要以基因型1型为主, 北美洲70%以上为基因型1a和1b型, 我国南方地区以1b型为主, 北方地区以1b和2a型为主<sup>[37]</sup>. IVDUs人群中, 以1a和3a型为主<sup>[38]</sup>, 我国IVDUs人群则以1b、3a、3b和4型多见<sup>[39]</sup>. 研究显示不同基因型HCV, 其临床表现以及对抗病毒治疗的敏感程度有显著差异. 1b型对干扰素治疗的持续应答率为20%, 而非1b型对干扰素治疗的持续应答率可达60%-70%<sup>[40-41]</sup>, 其他报道也指出3型更易于治疗, 1b型的治疗效果较差<sup>[42-43]</sup>. 而我国部分地区吸毒人群HCV感染者中1b型的感染率达到78.9%<sup>[44]</sup>, 因此治疗上有相当的难度. 此外, 在同一丙型肝炎患者体内还存在着具有不同核苷酸序列的多种HCV毒株, 这种由母序列和来自该序列的大量相关突变体所组成的病毒基因组, 被称为“准种”(quasispecies). 唐小平 *et al*<sup>[45]</sup>对76例慢性丙型肝炎患者的HCV-HVR1片段进行单链构像多态性(SSCP)检测, IVDUs组94.7%有变异发生, 准种数目为5.6±2.8条.

**2.2 多病毒重叠感染** IVDUs人群中HCV、HBV、HIV等病毒的重叠感染率远远高于一般人群, Atanasova *et al*<sup>[46]</sup>和罗耀星 *et al*<sup>[47]</sup>的检测结果显示, 在一般人群中HBV/HCV重叠感染只有0.68%和0.30%, 而在IVDUs人群中重叠感染的情况却非常普遍(表2). Filippini *et al*<sup>[48]</sup>报道在HIV阳性的IVDUs中80%重叠HCV感染, Rodriguez-Mendez *et al*<sup>[49]</sup>报道在HIV阳性的IVDUs中79%重叠有HBV或HCV感染. 此外, Morimoto

表 1 国内外部分关于IVDUs人群anti-HCV阳性率的报道

著者	国家地区	<i>n</i>	抗-HCV 阳性率(%)
Craine N <sup>[5]</sup>	UK	153	33.0
Maher L <sup>[6]</sup>	Australia	377	36.6
Weightman R <sup>[7]</sup>	UK	354	51.0
Weissenbacher M <sup>[8]</sup>	Argentina	174	54.6
Grogan L <sup>[9]</sup>	Ireland	316	66.0
Oliveira ML <sup>[10]</sup>	Brazil	102	69.6
Agdamag DM <sup>[11]</sup>	Pilippine	87	70.1
Hallinan R <sup>[12]</sup>	Australia	178	75.3
Abdala N <sup>[13]</sup>	Russia	-	78.2
Norden L <sup>[14]</sup>	Sweden	42	88.0
孙相德 <sup>[15]</sup>	吉林延边	35	31.4
赵敏 <sup>[16]</sup>	湖南	106	32.1
庄妍 <sup>[17]</sup>	贵州贵阳	285	51.9
王艳芬 <sup>[18]</sup>	北京	251	55.0
王丽荣 <sup>[19]</sup>	广东湛江	508	57.9
何军 <sup>[20]</sup>	贵州	90	63.3
颜瑾 <sup>[21]</sup>	广东	850	63.7
马秀敏 <sup>[22]</sup>	新疆	102	68.6
周枫 <sup>[23]</sup>	四川凉山	379	71.0
谢智联 <sup>[24]</sup>	四川	370	74.3
张志祥 <sup>[25]</sup>	云南昆明	125	76.8
邓莉平 <sup>[26]</sup>	湖北	62	77.4
钟金群 <sup>[27]</sup>	广东清远	265	77.7
高克勇 <sup>[28]</sup>	浙江平阳	239	79.5
谢志坚 <sup>[29]</sup>	广西南宁	148	79.7
Garten RJ <sup>[30]</sup>	广西	485	82.9
古有婵 <sup>[31]</sup>	广东中山	205	86.3
左虹 <sup>[32]</sup>	新疆	64	89.1
梁玉君 <sup>[33]</sup>	广西柳州	208	89.4
范淑英 <sup>[34]</sup>	新疆	206	92.7
熊远 <sup>[35]</sup>	广东广州	356	93.3
王秀 <sup>[36]</sup>	湖南	772	93.6

**创新盘点**  
目前对吸毒者没有完全的戒断治疗方法, 对丙型肝炎病毒的感染也没有完全有效的预防措施. 因此, 作者格外关注了国内外学者尝试采取的预防静脉注射吸毒人群感染丙型肝炎病毒的干预措施及其效果评价.

*et al*<sup>[50]</sup>报道HCV感染是HIV和人类T淋巴细胞白血病病毒(HTLV)的高危因素(*OR* = 22.60). HBV与HCV重叠感染者的临床症状较单独感染者显著不同, ALT异常率显著高于单一感染者<sup>[19]</sup>, 肝纤维化的进程加速<sup>[51]</sup>. HIV与HCV的重叠感染, 可使HCV的早期清除率降低<sup>[52]</sup>, 肝纤维化进程明显加快, 肝硬化的危险性显著增加<sup>[53]</sup>.

## 3 静脉注射吸毒人群HCV感染的危险因素

HCV的最重要传播途径是输血, 但随着临床用血制度的改革和献血员HCV抗体的全面筛查, 已使通过输血途径传播的HCV发病率迅速降低. 而IVDUs人群中, 由于大量存在的不安全注射行为, 以及不安全性行为, 已使之成为HCV感染的

## 应用要点

本文重点对近年相关文献报道中有关吸毒人群吸毒方式, 吸毒年限, 器具共用, 性行为特征以及民族差异等因素对该人群HCV感染的影响作用进行了归纳和总结。

表 2 我国关于IVDUs人群中HCV、HBV、HIV重叠感染率的报道

著者	地点	n	HCV (%)	HCV重叠		
				HBV(%)	HIV(%)	HBV、HIV(%)
张志祥 <sup>[25]</sup>	云南 昆明	125	76.8	8.8	-	-
Garten RJ <sup>[30]</sup>	广西	485	82.9	9.6	16.6	-
赵敏 <sup>[16]</sup>	湖南	106	32.1	10.4	-	-
古有婵 <sup>[31]</sup>	广东 中山	317	66.2	13.9	2.2	0.6
谢志坚 <sup>[29]</sup>	广西 南宁	148	79.7	18.2	4.7	1.4
梁玉君 <sup>[33]</sup>	广西 柳州	208	89.4	21.6	-	-
刘春 <sup>[54]</sup>	湖南	772	-	24.3	-	-
范淑英 <sup>[34]</sup>	新疆	206	92.7	24.8	23.3	18.5
谢智联 <sup>[24]</sup>	四川	370	74.3	-	14.4	-

表 3 iv吸毒组与非iv吸毒组抗HCV阳性率比较

作者	地点	非iv (n, %)	iv (n, %)	共用注射器(%)
庄妍 <sup>[17]</sup>	贵州 贵阳	92(17.4)	285(51.9)	38.5 - 41.9
颜瑾 <sup>[21]</sup>	广东	324(25.2)	850(63.7)	80.8
谢智联 <sup>[24]</sup>	四川	81(17.3)	370(74.3)	89.2
张志祥 <sup>[25]</sup>	云南 昆明	175(15.4)	125(76.8)	-
邓莉平 <sup>[26]</sup>	湖北	27(11.1)	62(77.4)	-
Garten RJ <sup>[30]</sup>	广西	106(28.3)	485(82.9)	51.1
古有婵 <sup>[31]</sup>	广东 中山	112(29.5)	205(86.3)	-
左虹 <sup>[32]</sup>	乌鲁 木齐	42(38.1)	64(89.1)	-
熊远 <sup>[35]</sup>	广东 广州	80(48.8)	356(93.3)	56.7
王秀 <sup>[36]</sup>	湖南	128(46.1)	644(93.60)	-

最高危人群. 国内外报道的主要危险因素如下.

**3.1 吸毒方式** 总体上吸毒人群的HCV感染率显著高于一般人群, IVDUs人群与非静脉注射吸毒者(NIVDUs)人群相比也具有显著性差异, 说明静脉注射方式是重要的危险因素(表3).

**3.2 吸毒用具的共用** 吸毒用具的共用无疑是非常重要的危险因素, 在我国IVDUs人群中普遍存在针具共用现象(表3). 国外学者<sup>[14,55]</sup>认为不仅共用注射器或注射用针头会增加HCV传播机会, 共用过滤棉花或稀释液体也同样是高危因素. 我国周枫 *et al*<sup>[23]</sup>和刘石柱 *et al*<sup>[56]</sup>的研究也提示共用注射器或针头, 或共用注射器皿或过滤棉球, 或共用洗针头水或稀释用水每周多于1次者, HCV感染率均显著高于每周共用少于1次者 ( $P < 0.05$ ). 作者在无锡市MMT门诊的流行病学调查显示, 吸毒者往往不共用针头或偶尔共用, 而共用过滤棉花或稀释液体更为普遍, 提示大部分吸毒者已认识到共用针头的危险性, 而对共用过滤棉花或稀释液体的危险性认识不足.

**3.3 静脉注射吸毒时间长短** Denis *et al*<sup>[55]</sup>和Garfein *et al*<sup>[57]</sup>认为大多数IVDUs在吸毒2年内即可感染HCV. 我国的研究也认为HCV感染率与吸毒时间长短相关, 如杨翌 *et al*<sup>[58]</sup>报道吸毒2年以上者HCV感染率显著高于吸毒不足2年者. 王秀 *et al*<sup>[36]</sup>研究显示吸毒10年以上者HCV感染率达93%, 显著高于吸毒5年以下和5至10年者 ( $P < 0.05$ ). 刘春 *et al*<sup>[54]</sup>还报道随着吸毒时间的增加, HCV和HBV重叠感染的比率也升高, 吸毒10年以上者重叠感染率达28.3%.

**3.4 性行为** 吸毒人群往往也同时属于性传播疾病(sexually transmitted disease, STD)的高危人群, 国内外大量的研究均发现吸毒者中存在无保护性行为, 如同性恋、双性恋、多性伙伴、卖淫或用性行为交换毒品等. 周枫 *et al*<sup>[23]</sup>研究显示HCV感染率与梅毒病史间存在相关性, 但与性伙伴人数以及是否提供或接受性服务无显著差异. 周平玉 *et al*<sup>[59]</sup>认为HBV、HCV等血液传播病毒性传播的途径不容忽视. 部分报道认为IVDUs人群非固定性伙伴的数量与其是否感染HCV有显著性差异, 刘春 *et al*<sup>[60]</sup>还认为性伙伴个数的增加会导致更高比例的HBV/HCV重叠感染. 刘志民 *et al*<sup>[61]</sup>在云南、四川两省吸毒者的调查中发现, 该群体中有1.55%性活动对象是同性, 1.91%表示曾经与同性进行性活动. Jin *et al*<sup>[62]</sup>在澳洲的研究显示静脉吸毒史是同性行为者感染HCV的危险因素, OR高达60.43.

**3.5 安全套的使用情况** 大多数调查结果显示, 在IVDUs人群性行为中安全套的使用率较低, 而每次使用安全套的IVDUs者, 其HCV感染率显著低于不使用安全套的IVDUs者 ( $OR = 0.52$ ,  $P = 0.01$ )<sup>[58]</sup>, 说明安全套的使用在降低IVDUs人群HCV感染率方面具有一定保护作用.

**3.6 纹身** IVDUs人群中纹身的比例相当高, 纹身也是HCV感染的危险因素. 国外学者Hellard *et al*<sup>[63]</sup>, de Nishioka *et al*<sup>[64]</sup>, Haley *et al*<sup>[65]</sup>均报道纹身者更易感染HCV ( $OR = 2.7-6.5$ ). 我国学者王秀 *et al*<sup>[36]</sup>也认为有纹身及扎耳穿孔者HCV感

染率更高( $P<0.05$ )。

**3.7 民族差异** 在我国部分少数民族聚居区,如新疆、四川等地,发现在维族等少数民族IVDU人群中HCV的感染率要高于汉族IVDU人群。张曼 *et al*<sup>[66]</sup>在乌鲁木齐的调查显示维族吸毒者采取注射吸毒的比率高于汉族和回族,其HCV感染率也显著高于汉族和回族。但左虹<sup>[32]</sup>同样在乌鲁木齐的调查观察到维族吸毒者HCV感染率高于汉族,但经统计学检验未见显著差异。

#### 4 静脉注射吸毒人群HCV感染的干预措施及效果

迄今为止,还没有针对HCV感染的有效疫苗,因此,目前可行的方案只有针对IVDU人群的针具交换以及相关知识的普及和教育。明中强 *et al*<sup>[67]</sup>在广西某县IVDU人群中开展了为期1年的针具交换和同伴教育干预试验,终期调查时针具的共用率已由60%降至30%,差异显著,起到了一定的效果。Huo *et al*<sup>[68]</sup>报道针具交换等预防干预措施使台湾16年来IVDU人群HBV、HCV、HDV的患病率呈现下降趋势。但Tortu *et al*<sup>[69]</sup>在美国女性IVDU中的调查显示,虽然他们使用的注射器75%来源清洁,但仍会与“密友”共用。因此,相关知识的普及和教育是必不可少的。控制母婴传播是减慢HCV从IVDU人群向一般人群传播的重要环节。目前多数研究认为单独HCV感染者,母婴传播发生率大约为5%左右<sup>[70]</sup>,Resti *et al*<sup>[71]</sup>在欧洲一项多中心研究证实静脉吸毒感染HCV的抗-HIV阴性母亲,其母婴传播概率明显高于无静脉吸毒史的单独HCV感染母亲。此外,给予IVDU人群中慢性HCV感染者一定的人道主义治疗,也是阻止HCV在IVDU人群中扩散和向一般人群传播的方法之一。

#### 5 结论

在全世界范围内,IVDU人群均处于非常高的HCV感染状态,中国也同样如此。而在IVDU人群中HCV感染率往往作为该人群针具共用的敏感指标,可评估该人群HIV感染的危险程度,对吸毒人群HCV感染状况的密切监控,对有效防治HIV感染也是必要的。由于HCV感染后约50%-80%的慢性化率,加之没有真正有效的预防措施,且临床治疗效果不尽如人意,在这种情况下,IVDU人群一方面在人群内部呈现持续暴露,感染和重复感染机会大增的状态,导致流行状况极其复杂难以得到有效控制;另一方面该人群可通过不安全性行为,同性性行为,母婴传

播,输血,家庭内或医院内传播等途径向一般人群传播,成为威胁公共卫生安全的重要隐患。专题教育和清洁针具交换起到了一定的作用,但要真正解决这一问题只有一方面加快丙型肝炎病毒疫苗的研制,保护易感人群,另一方面则是帮助IVDU人群进行有效的毒品戒断,至少是戒断静脉注射的方式,如采用美沙酮替代治疗等,才能从根本上降低HCV等血液传播病原体的感染率。

#### 6 参考文献

- 1 刘海梅. 2004年度世界毒品报告. <http://www.people.com.cn/GB/guandian/183/2281/3276/2607166.html>
- 2 2006中国禁毒报告. 中华人民共和国国家禁毒委员会. <http://www.china.com.cn/chinese/law/1252951.htm>
- 3 宋绮霞. 2005年中国艾滋病疫情与防治工作进展. 卫生部, 联合国艾滋病规划署, WHO联合发布. [http://www.chinapop.gov.cn/rkzh/rk/wxzl/t20060227\\_56354.htm](http://www.chinapop.gov.cn/rkzh/rk/wxzl/t20060227_56354.htm)
- 4 康富标, 赵敏. 丙型肝炎抗病毒治疗研究进展. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 933-935
- 5 Craine N, Walker AM, Williamson S, Brown A, Hope VD. Hepatitis B and hepatitis C seroprevalence and risk behaviour among community-recruited drug injectors in North West Wales. *Commun Dis Public Health* 2004; 7: 216-219
- 6 Maher L, Chant K, Jalaludin B, Sargent P. Risk behaviors and antibody hepatitis B and C prevalence among injecting drug users in southwestern Sydney, Australia. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 1114-1120
- 7 Weightman R, Walton R, Bury J. Audit of bloodborne virus prevention activity with drug users seen in primary care. *Commun Dis Public Health* 2004; 7: 301-305
- 8 Weissenbacher M, Rossi D, Radulich G, Sosa-Estani S, Vila M, Vivas E, Avila MM, Cuchi P, Rey J, Peralta LM. High seroprevalence of bloodborne viruses among street-recruited injection drug users from Buenos Aires, Argentina. *Clin Infect Dis* 2003; 37 Suppl 5: S348-S352
- 9 Grogan L, Tiernan M, Geoghegan N, Smyth B, Keenan E. Bloodborne virus infections among drug users in Ireland: a retrospective cross-sectional survey of screening, prevalence, incidence and hepatitis B immunisation uptake. *Ir J Med Sci* 2005; 174: 14-20
- 10 Oliveira ML, Bastos FI, Telles PR, Yoshida CF, Schatzmayr HG, Paetzold U, Pauli G, Schreier E. Prevalence and risk factors for HBV, HCV and HDV infections among injecting drug users from Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 1107-1114
- 11 Agdamag DM, Kageyama S, Alesna ET, Solante RM, Leano PS, Heredia AM, Abellanosa-Tac-An IP, Vibal ET, Jereza LD, Ichimura H. Rapid spread of hepatitis C virus among injecting-drug users in the Philippines: Implications for HIV epidemics. *J Med Virol* 2005; 77: 221-226
- 12 Hallinan R, Byrne A, Amin J, Dore GJ. Hepatitis C virus prevalence and outcomes among injecting

**同行评价**  
本文对静脉注射吸毒人群感染丙型肝炎病毒的情况进行了叙述,内容新颖,较全面,对从事相关专业的医护人员有一定的参考价值。

- drug users on opioid replacement therapy. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1082-1086
- 13 Abdala N, Carney JM, Durante AJ, Klimov N, Ostrovski D, Somlai AM, Kozlov A, Heimer R. Estimating the prevalence of syringe-borne and sexually transmitted diseases among injection drug users in St Petersburg, Russia. *Int J STD AIDS* 2003; 14: 697-703
- 14 Norden L, Lidman C. Differentiated risk behaviour for HIV and hepatitis among injecting drug users (IDUs). *Scand J Infect Dis* 2005; 37: 493-496
- 15 孙相德, 金京华, 卢春爱. 延边朝鲜族自治州吸毒人员HIV和HCV感染情况的流行病学调查. *中国艾滋病性病* 2003; 9: 267
- 16 赵敏, 吴电荣, 杨德森, 郝伟, 何艳, 李萍, 谌伟文, 邓小雄, 成杰进, 王勇. 海洛因依赖者的乙型肝炎和丙型肝炎感染. *中国心理卫生杂志* 1999; 13: 98-100
- 17 庄妍, 胡丽娟, 蔡星和. 贵阳市某戒毒所静脉吸毒人群HCV感染现状调查. *贵州医药* 2000; 24: 573
- 18 王艳芬. 不同方式滥用海洛因依赖者HAV、HBV和HCV感染情况分析. *中国药物依赖性杂志* 2002; 11: 62-63
- 19 王丽荣, 陈嘉琳, 陈益, 李升华, 何紫电, 杨春, 符立龙, 叶国强, 柯建义. 吸毒人群HBV、HCV感染状况及吸毒合并两种病毒感染对ALT异常的影响. *中国误诊学杂志* 2004; 4: 675-677
- 20 何军, 李相新, 龙正元, 杨运霞, 黄金梅, 张姝. 183例海洛因依赖者的HCV感染分析. *中国药物滥用防治杂志* 2006; 12: 224-225
- 21 颜瑾, 曾常红, 李晖, 王晔, 赵茜茜, 林恺生. 广东省1998年吸毒人群吸毒方式与艾滋病、丙型肝炎及梅毒的关系分析. *中国性病艾滋病防治* 2000; 6: 338-339
- 22 王晓岚, 丁剑冰, 许晏. 新疆静脉吸毒者中TTV、HBV和HCV感染情况分析. *新疆医科大学学报* 2004; 27: 125-127
- 23 周枫, 马泽恩, 胡薇, 冯宗亮, 陈康林, 秦光明, 孙乔, 刘刚, 梁姝, 何益新, 刘石柱, 阮玉华, 邵一鸣. 静脉吸毒共用注射器具方式和性行为与丙型肝炎病毒感染关系的研究. *中华流行病学杂志* 2004; 25: 329-332
- 24 谢联智, 陈曦, 胡薇, 边会珍, 刘莉, 邢志惠, 杨正宁, 梁妹, 张莉, 尹璐, 王君, 陈康林, 秦光明, 阮玉华, 邵一鸣. 吸毒人群高危行为与相关血源病原感染相关研究. *中国热带医学* 2006; 6: 1140-1142
- 25 张志祥, 诸兰芳, 程琳霞, 沙丽君. 海洛因依赖者HBV、HCV感染的流行病学调查-附300例. *中国药物依赖性杂志* 2000; 9: 144-146
- 26 邓莉平, 桂希恩, 王兮, 骆嘉拉. 湖北吸毒人群中HIV、HBV、HCV、HGV、TTV感染情况调查. *湖北预防医学杂志* 2003; 14: 1-2
- 27 钟金群, 黄奕标, 禰汝流, 丘玮玲, 张荣, 刘利兴. 清远市吸毒人员丙型肝炎流行病学调查分析. *职业与健康* 2005; 21: 861-862
- 28 高克勇, 杨学斌, 陈建聪. 吸毒人员性病及肝炎血清学调查. *浙江预防医学* 2003; 15: 22
- 29 谢志坚. 148例静脉吸毒者艾滋病病毒、乙型肝炎病毒及丙型肝炎病毒感染的调查结果分析. *广西医学* 2004; 26: 1859
- 30 Garten RJ, Lai S, Zhang J, Liu W, Chen J, Vlahov D, Yu XF. Rapid transmission of hepatitis C virus among young injecting heroin users in Southern China. *Int J Epidemiol* 2004; 33: 182-188
- 31 古有婵, 吴宝燕, 李桂娇, 罗小铭, 高赛珍. 317名吸毒人员吸毒行为与艾滋病、乙型肝炎、丙型肝炎及梅毒感染状况分析. *华南预防医学* 2002; 28: 26-27
- 32 左虹. 乌鲁木齐铁路戒毒所吸毒人群HIV、HCV感染的现状调查分析. *中国性病艾滋病防治* 2000; 6: 376
- 33 梁玉君, 陈彦华, 韦启援, 陆遥. 柳州市静脉吸毒人群肝炎病毒感染的调查与分析. *广西医科大学学报* 2000; 17: 342-343
- 34 范淑英, 杨淑礼, 赵素元. 静脉吸毒人群多病毒共感染的血清流行病学分析. *海南医学* 2004; 15: 69-70
- 35 熊远, 徐慧芳, 高凯, 施文钧, 张周斌, 陈小平. 436例强制戒毒者吸毒行为与HIV、HBV、HCV及梅毒感染关系的分析. *疾病监测* 2002; 17: 176-177
- 36 王秀, 李登清, 黄民主, 关岚, 刘浩. 吸毒人员丙型肝炎病毒感染及其影响因素的研究. *中华医学实践杂志* 2005; 4: 20-21
- 37 王青, 梁晓峰, 陈园生. 丙型病毒性肝炎的研究近况. *国际检验医学杂志* 2006; 27: 349-351
- 38 Mathei C, Robaey G, Van Ranst M, Van Damme P, Buntinx F. The epidemiology of hepatitis C among injecting drug users in Belgium. *Acta Gastroenterol Belg* 2005; 68: 50-54
- 39 阴宁, 梅珊, 李莉, 魏飞力, 张林琦, 曹韵贞. 中国经血传播人群中艾滋病病毒-1与丙型肝炎病毒亚型分布研究. *中华流行病学杂志* 2003; 24: 962-965
- 40 Fujiyama S, Chikazawa H, Honda Y, Tomita K. Effective interferon therapy for chronic hepatitis C patients with low viral loads. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 817-820
- 41 闫碧如, 李变兰, 王博文, 庄辉, 闫小君, 郭春久. 干扰素治疗丙型肝炎效果随访研究. *第四军医大学学报* 1999; 20: 326-327
- 42 Jessner W, Stauber R, Hackl F, Datz C, Watkins-Riedel T, Hofer H, Gangl A, Kessler H, Ferenci P. Early viral kinetics on treatment with pegylated interferon-alpha-2a in chronic hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Viral Hepat* 2003; 10: 37-42
- 43 Arase Y, Ikeda K, Tsubota A, Suzuki Y, Saitoh S, Kobayashi M, Kobayashi M, Suzuki F, Akuta N, Someya T, Kumada H. Efficacy of prolonged interferon therapy for patients with chronic hepatitis C with HCV-genotype 1b and high virus load. *J Gastroenterol* 2003; 38: 158-163
- 44 吴立平, 刘玉萍, 王乃昌, 段元宏, 聂晓勇, 张丽芬. 山西省吸毒人员丙型肝炎病毒的基因分型和序列分析. *中国预防医学杂志* 2002; 3: 35-38
- 45 唐小平, 钱可平, Johnson YN LAU, 袁小珍. HCV准种多样性及其与临床关系的研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 2001; 15: 173-175
- 46 Atanasova MV, Haydouchka IA, Zlatev SP, Stoilova YD, Iliev YT, Mateva NG. Prevalence of antibodies against hepatitis C virus and hepatitis B coinfection in healthy population in Bulgaria. A seroepidemiological study. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2004; 50: 89-96
- 47 罗耀星, 张吉凯, 李建基, 李辉, 蔡汉港, 方苓, 陆碧如, 阳文胜. 广东省2002年病毒性肝炎血清流行病学调查分析. *中国计划免疫* 2005; 11: 89-92
- 48 Filippini P, Coppola N, Scolastico C, Rossi G, Battaglia M, Onofrio M, Pisapia R, Marrocco C, Sagnelli C, Piccinino F, Sagnelli E. Hepatitis viruses and HIV infection in the Naples area. *Infez Med* 2003; 11: 139-145
- 49 Rodriguez-Mendez ML, Gonzalez-Quintela A, Aguilera A, Carballo E, Barrio E. Association of HCV and HBV markers in Spanish HIV-seropositive patients in relation to risk practices. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 2093-2097
- 50 Morimoto HK, Caterino-De-Araujo A, Morimoto AA, Reiche EM, Ueda LT, Matsuo T, Stegmann JW, Reiche FV. Seroprevalence and risk factors for human T cell lymphotropic virus type 1 and 2 infection in human immunodeficiency virus-infected patients attending AIDS referral center

- health units in Londrina and other communities in Parana, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21: 256-262
- 51 Sagnelli E, Pasquale G, Coppola N, Scarano F, Marrocco C, Scolastico C, Santantonio T, Gentile A, Piccinino F. Influence of chronic coinfection with hepatitis B and C virus on liver histology. *Infection* 2004; 32: 144-148
- 52 Mehta SH, Cox A, Hoover DR, Wang XH, Mao Q, Ray S, Strathdee SA, Vlahov D, Thomas DL. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* 2002; 359: 1478-1483
- 53 Soriano V, Sulkowski M, Bergin C, Hatzakis A, Cacoub P, Katlama C, Cargnel A, Mauss S, Dieterich D, Moreno S, Ferrari C, Poynard T, Rockstroh J. Care of patients with chronic hepatitis C and HIV co-infection: recommendations from the HIV-HCV International Panel. *AIDS* 2002; 16: 813-828
- 54 刘春, 黄民主, 李登清, 龚文波, 关岚, 刘浩. 吸毒者吸毒特点与HBV、HCV重叠感染情况的研究. *实用预防医学* 2004; 11: 907-908
- 55 Denis B, Dedobbeleer M, Collet T, Petit J, Jamoulle M, Hayani A, Brenard R. High prevalence of hepatitis C virus infection in Belgian intravenous drug users and potential role of the "cotton-filter" in transmission: the GEMT Study. *Acta Gastroenterol Belg* 2000; 63: 147-153
- 56 刘石柱, 陈康林, 朱国平, 巫俊林, 冯成玉, 范建英, 秦光明, 孙乔, 刘刚, 郑国英, 何益新, 周枫, 阮玉华, 邵一鸣. 以社区为基础的静脉吸毒人群丙型肝炎病毒感染危险因素研究. *疾病控制杂志* 2004; 8: 19-21
- 57 Garfein RS, Vlahov D, Galai N, Doherty MC, Nelson KE. Viral infections in short-term injection drug users: the prevalence of the hepatitis C, hepatitis B, human immunodeficiency, and human T-lymphotropic viruses. *Am J Public Health* 1996; 86: 655-661
- 58 杨翌, 张冠群, 许雅, 陈思东, 伍碧雯. 吸毒人群丙型和乙型肝炎病毒感染的血清流行病学研究. *中华实验和临床病毒学杂志* 1999; 13: 247-250
- 59 周平玉, 王侠生, 廖康煌. 性行为与乙型肝炎及丙型肝炎病毒感染的关系. *复旦学报(医学科学版)* 2001; 28: 139-140, 144
- 60 刘春, 黄民主, 关岚, 刘浩. 男女吸毒者吸毒特点、性行为特点与HBV-HCV重叠感染关系的研究. *现代医院* 2005; 5: 12-14
- 61 刘志民, 曹家琪, 吕宪祥, 连智, 赵成正, 赵琴, 刘彦红, 穆悦, 王钥. 云南、四川两省吸毒者吸毒特征及其与HIV感染高危因素的研究. *中国药物依赖性杂志* 2003; 12: 204-214
- 62 Jin F, Prestage GP, Kippax SC, Kaldor JM, Dore GJ, Grulich AE. Prevalence and risk factors of hepatitis C in HIV-negative homosexual men in Sydney, Australia. *Aust N Z J Public Health* 2005; 29: 536-539
- 63 Hellard ME, Hocking JS, Crofts N. The prevalence and the risk behaviours associated with the transmission of hepatitis C virus in Australian correctional facilities. *Epidemiol Infect* 2004; 132: 409-415
- 64 de Nishioka SA, Gyorkos TW, Joseph L, Collet JP, MacLean JD. Tattooing and transfusion-transmitted diseases in Brazil: a hospital-based cross-sectional matched study. *Eur J Epidemiol* 2003; 18: 441-449
- 65 Haley RW, Fischer RP. The tattooing paradox: are studies of acute hepatitis adequate to identify routes of transmission of subclinical hepatitis C infection? *Arch Intern Med* 2003; 163: 1095-1098
- 66 张曼, 芮宝玲, 陈阳贵. 乌鲁木齐市吸毒人群HIV HBV HCV梅毒感染状况调查. *中国艾滋病性病* 2004; 10: 350-351, 364
- 67 明中强, 吴尊友, 刘伟, 梁绍伶, 陆伟江, 周月娇. 针具交换结合同伴宣传对注射吸毒人群吸毒行为的影响. *中国艾滋病性病* 2005; 11: 188-191
- 68 Huo TI, Wu JC, Wu SI, Chang AL, Lin SK, Pan CH, Huang YH, Chang FY, Lee SD. Changing seroepidemiology of hepatitis B, C, and D virus infections in high-risk populations. *J Med Virol* 2004; 72: 41-45
- 69 Tortu S, McMahon JM, Hamid R, Neaigus A. Women's drug injection practices in East Harlem: an event analysis in a high-risk community. *AIDS Behav* 2003; 7: 317-328
- 70 张亚飞, 聂青和. 丙型肝炎病毒垂直传播的危险因素分析. *肝脏* 2006; 11: 130-132
- 71 Resti M, Azzari C, Galli L, Zuin G, Giacchino R, Bortolotti F, Marcellini M, Moriondo M, de Martino M, Vierucci A. Maternal drug use is a preeminent risk factor for mother-to-child hepatitis C virus transmission: results from a multicenter study of 1372 mother-infant pairs. *J Infect Dis* 2002; 185: 567-572

编辑 程剑侠 电编 郭海丽



# 人参皂苷单体Rh<sub>2</sub>诱导小鼠前胃癌细胞系凋亡的分子机制

吴歌, 杨世杰

**背景资料**  
G-Rh<sub>2</sub>可以通过诱导细胞凋亡或分化有效地抑制包括前列腺癌、黑色素瘤、肝癌、宫颈癌等多种肿瘤细胞的增殖活性, 而目前尚无其对胃癌增殖抑制的研究报道。

吴歌, 杨世杰, 吉林大学基础医学院药理学教研室 吉林省长春市 130021

吴歌, 在读博士研究生, 主要从事肿瘤分子药理学研究。  
通讯作者: 杨世杰, 130021, 吉林省长春市, 吉林大学基础医学院药理学教研室. jcyao@sina.com  
电话: 0431-85619799

收稿日期: 2007-06-14 修回日期: 2007-09-24

## Molecular mechanism of G-Rh<sub>2</sub>-induced apoptosis in gastric carcinoma cells

Ge Wu, Shi-Jie Yang

Ge Wu, Shi-Jie Yang, Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Correspondence to: Shi-Jie Yang, Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China. jcyao@sina.com

Received: 2007-06-14 Revised: 2007-09-24

## Abstract

**AIM:** To investigate the effect of Ginseng (G)-Rh<sub>2</sub> on the proliferation and apoptosis of mouse gastric carcinoma cells (MFCs), and to explore the activation of the Ca<sup>2+</sup> transduction pathways mediating G-Rh<sub>2</sub>-induced MFC cell apoptosis.

**METHODS:** MFCs were divided into a normal free-serum MFC cell group, a G-Rh<sub>2</sub> (3, 10, 30 mg/L) treatment group, a Ca<sup>2+</sup> chelator BAPTA (20 μmol) + G-Rh<sub>2</sub> (10 mg/L) group and a BAPTA (20 μmol) group. Morphologic changes were observed by fluorescence microscopy (Hoechst 33 258). The early apoptosis rate was detected by Annexin V-FITC using flow cytometry; late apoptosis was analyzed by agarose gel electrophoresis. The mitochondrial membrane potential (ΔΨ<sub>m</sub>) and Ca<sup>2+</sup> density were measured by confocal microscopy. The expression of caspase 3 was observed by Western blotting.

**RESULTS:** G-Rh<sub>2</sub> (10 mg/L) reinforced cell activity and induced apoptosis of MFC cells. The apoptosis rate in the drug group increased greatly after G-Rh<sub>2</sub> treatment. G-Rh<sub>2</sub> induced MFC cell apoptosis, markedly enhance calcium ion

concentration, effectively reduced ΔΨ<sub>m</sub> and increased the protein expression of caspase 3, but all of these effects could be inhibited by BAPTA (20 μmol).

**CONCLUSION:** G-Rh<sub>2</sub> can induce apoptosis of gastric carcinoma cells, possibly via a Ca<sup>2+</sup> - dependent mitochondrial apoptosis pathway.

**Key Words:** Ginseng Rh<sub>2</sub>; Apoptosis; Gastric carcinoma; Flow cytometry; Western blotting

Wu G, Yang SJ. Molecular mechanism of G-Rh<sub>2</sub>-induced apoptosis in gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 2972-2976

## 摘要

**目的:** 观察人参皂苷Rh<sub>2</sub>(G-Rh<sub>2</sub>)诱导小鼠前胃癌MFC细胞的凋亡, 探讨Ca<sup>2+</sup>在G-Rh<sub>2</sub>诱导细胞凋亡中的作用, 揭示G-Rh<sub>2</sub>诱导MFC细胞凋亡的分子机制。

**方法:** 分别对无血清培养24 h后的MFC正常细胞组、G-Rh<sub>2</sub>(3、10、30 mg/L)给药组、Ca<sup>2+</sup>螯合剂BAPTA(20 μmol)+G-Rh<sub>2</sub>(10 mg/L)给药组及BAPTA(20 μmol)组, 荧光显微镜(Hoechst 33 258)观察细胞形态学改变; 流式细胞仪Annexin V-FITC双染法检测细胞早期凋亡率; 琼脂糖凝胶电泳法观察细胞晚期凋亡; 共聚焦显微镜分析G-Rh<sub>2</sub>给药后细胞内钙和细胞线粒体膜电位, Western blot分析caspase 3的表达。

**结果:** 10 mg/L的G-Rh<sub>2</sub>能显著抑制无血清培养的MFC细胞增殖和诱导MFC细胞凋亡, 可剂量和时间依赖性的提高细胞内钙浓度, 降低细胞线粒体膜电位, 增加caspase 3的表达, 但这些作用均可被BAPTA(20 μmol)抑制。

**结论:** G-Rh<sub>2</sub>可激活细胞内Ca<sup>2+</sup>信号转导途径, 从而最终通过线粒体凋亡途径诱导胃癌细胞凋亡。

**关键词:** 人参皂苷单体Rh<sub>2</sub>; 凋亡; 胃癌; 流式细胞仪; 免疫印迹



吴歌, 杨世杰. 人参皂苷单体Rh<sub>2</sub>诱导小鼠前胃癌细胞系凋亡的分子机制. 世界华人消化杂志 2007;15(28):2972-2976  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2972.asp>

## 0 引言

人参皂苷单体Rh<sub>2</sub>(ginsenoside Rh<sub>2</sub>)是从人参中分离出的原人参二醇型低糖链皂苷单体, 多项研究证实, G-Rh<sub>2</sub>可以通过诱导细胞凋亡或分化有效地抑制多种肿瘤细胞<sup>[1-7]</sup>的增殖活性, 而目前尚无其对胃癌增殖抑制的研究报道. 目前已揭示的参与G-Rh<sub>2</sub>诱导凋亡的信号分子包括JNK<sup>[8]</sup>、Cdk<sub>2</sub><sup>[9]</sup>、PKC $\delta$ <sup>[10]</sup>等, 然而G-Rh<sub>2</sub>上调这些蛋白酶活性的分子机制仍不明晰. 2006年, Ham *et al*<sup>[11]</sup>首次发现G-Rh<sub>2</sub>可使HeLa细胞线粒体的Ca<sup>2+</sup>升高, 随之产生大量ROS, 进而激活JNK途径, 并最终通过线粒体凋亡通路诱导MFC细胞凋亡. 本研究以小鼠前胃癌MFC细胞为受试细胞, 探讨G-Rh<sub>2</sub>在诱导胃癌细胞凋亡过程中Ca<sup>2+</sup>信号转导途径的激活及下游线粒体凋亡通路活化的分子机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** G-Rh<sub>2</sub>由吉林大学分析化学教研室提供, IMDM培养基购自美国Gibco公司, 新生小牛血清购自杭州四季清生物有限公司, Hoechst 33258购自凯基生物, Annexin V-FITC试剂盒购自晶美生物工程有限公司, 动物细胞凋亡DNA Ladder提取试剂盒购自北京鼎国生物公司, Rhodamine123购自Sigma公司, Fluo-3, AM购自Molecular Probes公司, caspase 3购自天津灏阳, BAPTA购自北京海德生物.

**1.2 方法** MFC细胞由本室冻存, 常复苏后, 培养和维持在体积分数为100 mL/L新生小牛血清IMDM培养液里, 置CO<sub>2</sub>培养箱(37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>)培养, 取对数生长期细胞经24 h无血清培养后, 分组进行实验.

**1.2.1 分组及细胞处理** 对数生长期的MFC细胞经24 h无血清培养后, 将密度为 $1.0 \times 10^9$ /L的MFC细胞分为: 空白对照组、G-Rh<sub>2</sub>各组(3、10、30 mg/L), 检测早期细胞凋亡率和晚期细胞凋亡率; 将MFC细胞分为: 空白组、G-Rh<sub>2</sub>(10 mg/L)组、G-Rh<sub>2</sub>(10 mg/L)+BAPTA(20  $\mu$ mol)组、BAPTA(20  $\mu$ mol)组, 检测细胞核形态, 线粒体膜电位, 细胞内钙各项实验指标.

**1.2.2 流式细胞仪分析** 收获细胞, 用4℃预冷的

PBS洗两次, 用250  $\mu$ L结合缓冲液重新悬浮细胞, 调节其浓度为 $1 \times 10^9$ /L, 取100  $\mu$ L细胞悬液于5 mL流式管中, 加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC(150 mg/L)和10  $\mu$ L碘化丙锭(120 mg/L), 混匀后室温避光孵育15 min, 在反应管中加400  $\mu$ L PBS, 流式细胞仪(FACS)分析细胞凋亡率.

**1.2.3 琼脂糖凝胶电泳检测晚期细胞凋亡** 药物处理24 h后, 收集细胞, 按动物细胞凋亡DNA Ladder提取试剂盒要求提取DNA, 每个泳道上样量为10  $\mu$ L, 用20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 电压为4 V/cm, 经EB染色后, 凝胶成像系统下观察和照相.

**1.2.4 细胞形态学观察** 细胞经药物处理12 h后, 在同一视觉域内用Hoechst 33258(10 mg/L)进行核染色, 然后在荧光显微镜(Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Germany)下观察细胞核形态并记录.

**1.2.5 共聚焦显微镜测定线粒体膜电位和细胞内钙** 线粒体膜电位<sup>[12-13]</sup>: 收集细胞, 加入0.026 mmol/L的Rhodamine123染液200  $\mu$ L, 37℃避光孵育10 min, 用PBS洗3次后, 每孔选4个视野, 每个视野观察50个细胞, 以平均荧光强度变化反映细胞线粒体膜电位的相对水平, 荧光探针Rhodamine123进入细胞, 其激发的荧光强度与细胞内线粒体膜电位成正比, 所得荧光强度以软件处理即得激光共聚焦显微镜检测线粒体膜电位. 细胞内钙: 收集细胞, 加入10  $\mu$ mol/L的Fluo-3, AM负载液200  $\mu$ L, 37℃避光孵育40 min, 用Hepe液洗涤3次后, 每孔选4个视野, 每个视野观察50个细胞, 以平均荧光强度变化反映细胞内游离钙浓度的相对水平. 荧光探针Fluo-3/AM进入细胞, 其激发的荧光强度与细胞内游离钙离子的浓度成正比, 所得荧光强度以软件处理即得激光共聚焦显微镜检测细胞内钙浓度.

**1.2.6 Western blotting分析caspase 3在细胞中的表达** 具体方法见分子克隆实验指南<sup>[14]</sup>.

**统计学处理** 采用image-protein plus统计软件进行处理. 组间比较采用 $t$ 检验, 结果采用mean  $\pm$  SD表示.

## 2 结果

**2.1 G-Rh<sub>2</sub>对MFC细胞早期凋亡的影响** 流式细胞仪分析可见, 与对照组相比G-Rh<sub>2</sub>各给药组, MFC细胞凋亡率分别为24%、29.7%和43%, 与对照组凋亡率1.9%相比显著增加, 且呈明显

**相关报道**  
2006年, Ham *et al*首次发现G-Rh<sub>2</sub>可使HeLa细胞线粒体的Ca<sup>2+</sup>升高, 随之产生大量ROS, 进而激活JNK途径, 并最终通过线粒体凋亡通路诱导MFC细胞凋亡.

**创新盘点**  
在众多凋亡刺激因子中,  $\text{Ca}^{2+}$  作为细胞内生命信号途径的重要成员, 其稳态失调是造成线粒体机能紊乱的主要机制之一, G-Rh<sub>2</sub> 诱导肿瘤细胞凋亡的研究对于钙在信号转导和凋亡中的作用研究甚少, 本研究较系统的对其进行了研究和报道。

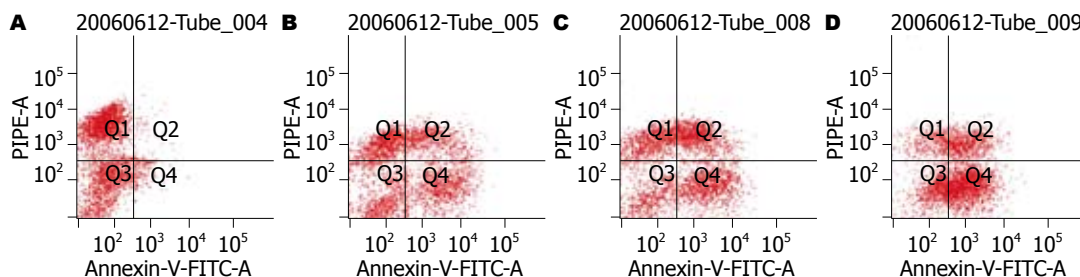


图1 G-Rh<sub>2</sub>对MFC细胞早期凋亡率的影响. A: 对照组; B: 3 mg/L组; C: 10 mg/L组; D: 30 mg/L组.

的剂量依赖性, 而各组间坏死率无明显差异 ( $P>0.05$ , 图1).

**2.2 G-Rh<sub>2</sub>对MFC细胞晚期凋亡的影响** MFC细胞在加入G-Rh<sub>2</sub>(10 mg/L)4、6、12 h后, 凝胶电泳显示了180-200 bp或其多聚体组成的寡核苷酸片断的出现, 和空白对照组比较, DNA Ladder现象显著, 且呈明显的剂量依赖性, 但12 h组弥散现象明显, 提示此时G-Rh<sub>2</sub>对MFC的增殖抑制以诱导细胞坏死为主(图2).

**2.3 G-Rh<sub>2</sub>对MFC细胞形态学的影响** 经Hoechst 33258染色后, 荧光显微镜下可观察到G-Rh<sub>2</sub>(10 mg/L)组细胞核内出现浓染致密的颗粒块状荧光, 显示出胞核固缩、染色质高度凝聚和碎裂, 而对照组、BAPTA(20  $\mu\text{mol}$ )组、BAPTA(20  $\mu\text{mol}$ )+G-Rh<sub>2</sub>(10 mg/L)组细胞核呈弥散均匀的荧光(图3).

**2.4 G-Rh<sub>2</sub>对MFC细胞线粒体膜电位( $\Delta\Psi_m$ )的影响** 共聚焦显微镜结果显示, G-Rh<sub>2</sub>给药30 min后Rhodamine123标记的MFC细胞荧光强度为  $120.08 \pm 10.32$ , 与对照组  $360.08 \pm 27.12$  相比显著降低 ( $P<0.01$ ), 表明G-Rh<sub>2</sub>处理后MFC细胞  $\Delta\Psi_m$  明显下降, 而BAPTA(20  $\mu\text{mol}$ )组、BAPTA(20  $\mu\text{mol}$ )+G-Rh<sub>2</sub>组荧光强度分别为  $353.32 \pm 18.28$  和  $310.08 \pm 29.20$ , 与对照组无显著性差异 ( $P>0.05$ , 图3).

**2.5 G-Rh<sub>2</sub>对MFC细胞内钙浓度的影响** 共聚焦显微镜结果显示, G-Rh<sub>2</sub>给药30 min后Fluo-3/AM标记的MFC细胞荧光强度为  $455.94 \pm 42.48$ , 与对照组  $110.25 \pm 10.69$  相比显著升高 ( $P<0.01$ ), 而BAPTA(20  $\mu\text{mol}$ )组、BAPTA(20  $\mu\text{mol}$ )+G-Rh<sub>2</sub>组荧光强度分别为  $110.03 \pm 10.74$  及  $160.08 \pm 15.24$ , 与对照组无显著性差异 ( $P>0.05$ , 图3).

**2.6 G-Rh<sub>2</sub>对MFC细胞内caspase 3的影响** Western blotting结果显示, G-Rh<sub>2</sub>作用后, caspase 3从30 min开始表达, 于2 h出现高峰, 其后降为基础水平, 而BAPTA(20  $\mu\text{mol}$ )+G-Rh<sub>2</sub>组caspase 3没

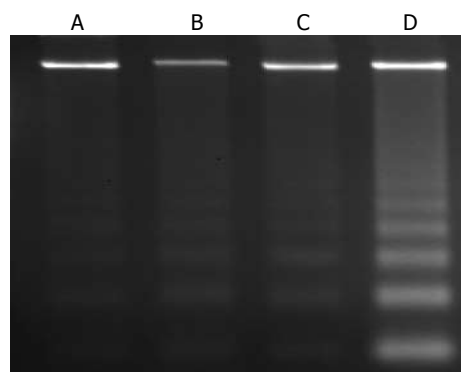


图2 琼脂糖凝胶电泳检测DNA Ladder. A: 对照组; B: 6 h; C: 12 h; D: 24 h.

有激活(图4).

### 3 讨论

现代药理学研究表明人参皂苷单体Rh<sub>2</sub>具有较强的抗肿瘤作用, 而目前尚无其对胃癌增殖抑制的研究报道. 本实验通过流式细胞术检测早期凋亡和DNA凝胶电泳图检测晚期凋亡等途径首次证明, G-Rh<sub>2</sub>可诱导小鼠前胃癌MFC细胞发生典型凋亡从而有效地抑制胃癌细胞的增殖.

$\Delta\Psi_m$ 的崩解是细胞凋亡的早期特异性指标之一<sup>[15]</sup>, 当细胞受到某些生理性或病理性刺激(如放射线、化学药物、氧化剂、钙超载、神经鞘醇等)后, 线粒体外膜通透性增加, 内膜电势梯度降低, 线粒体膜通道转换孔(PT孔)开放<sup>[16]</sup>, 导致线粒体内外膜依次裂解释放出caspase激活蛋白等一系列变化, 使细胞进入不可逆的凋亡过程<sup>[17-19]</sup>. 本实验观察到10 mg/L G-Rh<sub>2</sub>用药30 min后MFC细胞的 $\Delta\Psi_m$ 开始下降, 同时凋亡前蛋白caspase 3开始活化, 预示MFC细胞进入了不可逆凋亡过程.

肿瘤的增殖、侵袭、转移是一个复杂的过程, 肿瘤细胞针对细胞外刺激产生的应答通过信号转导过程来调节, 进而影响细胞的生命活动<sup>[20-23]</sup>. 在众多凋亡刺激因子中,  $\text{Ca}^{2+}$  作为细胞

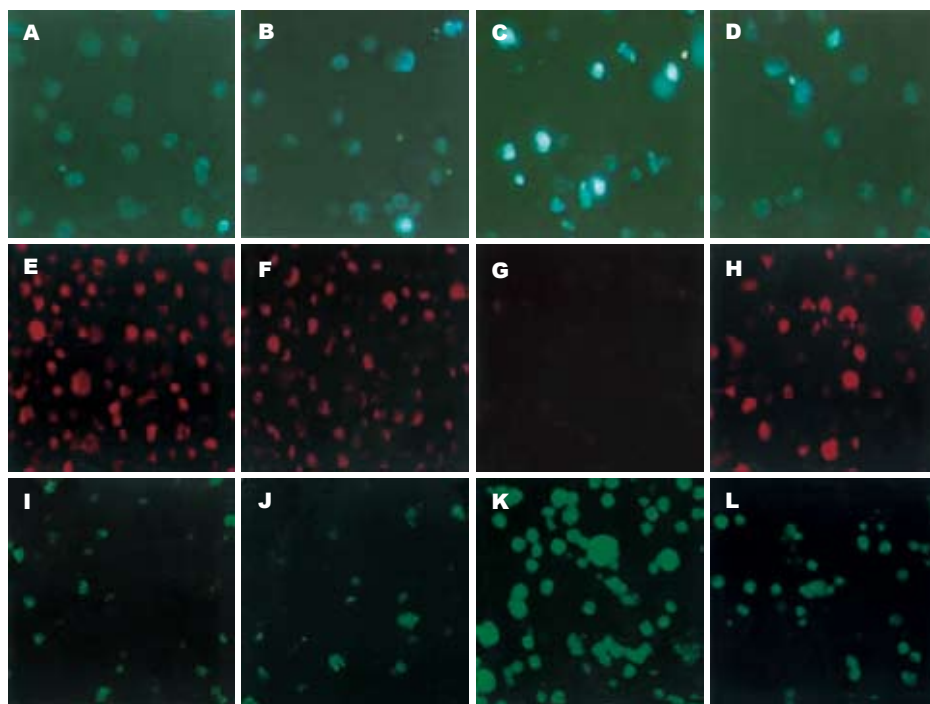


图 3 G-Rh<sub>2</sub>对MFC的影响. A-D: 荧光显微镜( $\times 200$ )下MFC细胞核形态的影响; E-H: MFC细胞线粒体膜电位的影响; I-L: 对MFC细胞内钙的影响. A, E, I: 对照组; B, F, J: BAPTA(20  $\mu$ mol)组; C, G, K: G-Rh<sub>2</sub>(10 mg/L)组; D, H, L: G-Rh<sub>2</sub>+BAPTA(20  $\mu$ mol)组.

**应用要点**  
本文首次证明, G-Rh<sub>2</sub>可诱导小鼠前胃癌MFC细胞发生典型凋亡从而有效地抑制胃癌细胞的增殖, 为临床应用中药治疗胃癌提供了一些有意义的实验基础.

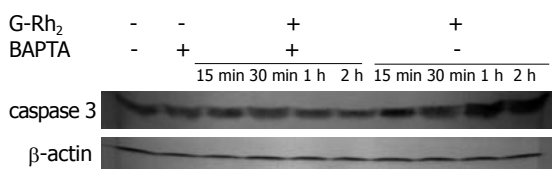


图 4 G-Rh<sub>2</sub>对MFC细胞caspase 3的影响.

内生命信号途径的重要成员, 其稳态失调是造成线粒体机能紊乱的主要机制之一<sup>[24]</sup>, 已有大量实验证实Ca<sup>2+</sup>作为细胞凋亡的早期信号, 在细胞凋亡前有持续显著增高<sup>[15,25-26]</sup>, 而如果使用钙螯合剂或阻断剂来减低细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度, 则可有效抑制或延迟细胞凋亡的进程<sup>[27-29]</sup>. 为进一步揭示G-Rh<sub>2</sub>诱导MFC凋亡过程中可能启动的早期信号, 我们对细胞内游离钙进行了测定, 发现10 mg/L G-Rh<sub>2</sub>用药30 min后MFC细胞的细胞内Ca<sup>2+</sup>开始升高, 提示G-Rh<sub>2</sub>用药后MFC细胞的内钙水平和线粒体膜电位下降之间存在明显的协同性, 且均可被细胞内钙抑制剂BAPTA显著抑制.

本实验揭示G-Rh<sub>2</sub>在凋亡早期通过影响MFC细胞跨膜转导钙离子、膜离子通道的通透性等作用使线粒体内Ca<sup>2+</sup>升高, 导致钙超载和钙稳态的破坏, 致线粒体PT孔开放后, 激活Ca<sup>2+</sup>依赖磷脂酶、Ca<sup>2+</sup>依赖蛋白酶和Ca<sup>2+</sup>依赖核酸内切酶等多种凋亡相关蛋白酶的活性, 最终通过线粒体凋亡通路诱导细胞发生凋亡, 这可能是G-Rh<sub>2</sub>诱导胃癌细胞凋亡的机制之一. 而Ca<sup>2+</sup>超载具体导致哪些相关蛋白酶的活化及相应信号

通路的开启尚有待于进一步的研究.

#### 4 参考文献

- 1 Tatsuka M, Maeda M, Ota T. Anticarcinogenic effect and enhancement of metastatic potential of BALB/c 3T3 cells by ginsenoside Rh(2). *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 1184-1189
- 2 Fei XF, Wang BX, Tashiro S, Li TJ, Ma JS, Ikejima T. Apoptotic effects of ginsenoside Rh2 on human malignant melanoma A375-S2 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23: 315-322
- 3 Popovich DG, Kitts DD. Ginsenosides 20(S)-protopanaxadiol and Rh2 reduce cell proliferation and increase sub-G1 cells in two cultured intestinal cell lines, Int-407 and Caco-2. *Can J Physiol Pharmacol* 2004; 82: 183-190
- 4 Yim H, Jin YH, Park BD, Choi HJ, Lee SK. Caspase-3-mediated cleavage of Cdc6 induces nuclear localization of p49-truncated Cdc6 and apoptosis. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 4250-4259
- 5 Oh JI, Chun KH, Joo SH, Oh YT, Lee SK. Caspase-3-dependent protein kinase C delta activity is required for the progression of Ginsenoside-Rh2-induced apoptosis in SK-HEP-1 cells. *Cancer Lett* 2005; 230: 228-238
- 6 Cheng CC, Yang SM, Huang CY, Chen JC, Chang WM, Hsu SL. Molecular mechanisms of ginsenoside Rh2-mediated G1 growth arrest and apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005; 55: 531-540
- 7 Kim YS, Jin SH. Ginsenoside Rh2 induces apoptosis via activation of caspase-1 and -3 and up-regulation of Bax in human neuroblastoma. *Arch Pharm Res* 2004; 27: 834-839
- 8 Jin YH, Yoo KJ, Lee YH, Lee SK. Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 30256-30263
- 9 Kim YS, Jin SH, Lee YH, Park JD, Kim SI.

同行评价  
本文选题较新颖,  
行文流畅, 研究内  
容较丰富, 使用的  
研究方法恰当, 结  
果结论可信, 客观  
性强, 参考文献较  
新.

- Differential expression of protein kinase C subtypes during ginsenoside Rh2-induced apoptosis in SK-N-BE(2) and C6Bu-1 cells. *Arch Pharm Res* 2000; 23: 518-524
- 10 Ham YM, Chun KH, Choi JS, Kim DH, Lee SK. SEK1-dependent JNK1 activation prolongs cell survival during G-Rh2-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 358-364
- 11 Ham YM, Lim JH, Na HK, Choi JS, Park BD, Yim H, Lee SK. Ginsenoside-Rh2-induced mitochondrial depolarization and apoptosis are associated with reactive oxygen species- and Ca<sup>2+</sup>-mediated c-Jun NH2-terminal kinase 1 activation in HeLa cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 1276-1285
- 12 Huang M, Camara AK, Stowe DF, Qi F, Beard DA. Mitochondrial inner membrane electrophysiology assessed by rhodamine-123 transport and fluorescence. *Ann Biomed Eng* 2007; 35: 1276-1285
- 13 Kai L, Wang ZF, Shi YL, Liu LM, Hu DY. Opioid receptor antagonists increase [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat arterial smooth muscle cells in hemorrhagic shock. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 395-400
- 14 J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第2版. 科学出版社, 2002: 880-894
- 15 Sareen D, Darjatmoko SR, Albert DM, Polans AS. Mitochondria, Calcium, and Calpain are Key Mediators of Resveratrol-Induced Apoptosis in Breast Cancer. *Mol Pharmacol* 2007
- 16 Grimm S, Brdiczka D. The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 2007; 12: 841-855
- 17 Javadov S, Karmazyn M. Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* 2007; 20: 1-22
- 18 Scatena R, Bottoni P, Botta G, Martorana GE, Giardina B. The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C12-21
- 19 Hacker G, Paschen SA. Therapeutic targets in the mitochondrial apoptotic pathway. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 515-526
- 20 Li SS. Signal transduction pathways and esophageal carcinoma. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2007; 36: 366-369
- 21 Hursting SD, Lashinger LM, Colbert LH, Rogers CJ, Wheatley KW, Nunez NP, Mahabir S, Barrett JC, Forman MR, Perkin SN. Energy balance and carcinogenesis: underlying pathways and targets for intervention. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7: 484-491
- 22 Davis CD, Milner JA. Molecular targets for nutritional preemption of cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2007; 7: 410-415
- 23 Hagland H, Nikolaisen J, Hodneland LI, Gjertsen BT, Bruserud O, Tronstad KJ. Targeting mitochondria in the treatment of human cancer: a coordinated attack against cancer cell energy metabolism and signalling. *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11: 1055-1069
- 24 Giacomello M, Drago I, Pizzo P, Pozzan T. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1267-1274
- 25 Jozwiak Z, Marczak A. The role of ion channels in apoptosis. *Postepy Biochem* 2006; 52: 373-382
- 26 Mizobuchi M, Ogata H, Hatamura I, Saji F, Koiwa F, Kinugasa E, Koshikawa S, Akizawa T. Activation of calcium-sensing receptor accelerates apoptosis in hyperplastic parathyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362: 11-16
- 27 Mu D, Zhang W, Chu D, Liu T, Xie Y, Fu E, Jin F. The role of calcium, P38 MAPK in dihydroartemisinin-induced apoptosis of lung cancer PC-14 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007
- 28 Masuda Y, Aiuchi T, Mihara S, Nakajo S, Nakaya K. Increase in intracellular Ca(2+) concentrations and the corresponding intracellular acidification are early steps for induction of apoptosis by geranylgeraniol in HL60 cells. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 880-884
- 29 Ip SW, Weng YS, Lin SY, Mei-Dueyang, Tang NY, Su CC, Chung JG. The role of Ca<sup>2+</sup> on rhin-induced apoptosis in human cervical cancer Ca Ski cells. *Anticancer Res* 2007; 27: 379-389

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

## 世界华人消化杂志关于作者署名的声明

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



# 维生素E、硒对非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞色素P4501A1及脂质过氧化的干预作用

谭丽, 管小琴

谭丽, 管小琴, 重庆医科大学病理教研室 重庆市 400016  
谭丽, 2004年重庆医科大学本科, 2007年重庆医科大学病理学硕士, 主要从事肝脏疾病的病理研究, 现就职于重庆市医药高等专科学校担任病理学教学工作。  
通讯作者: 管小琴, 400016, 重庆市, 重庆医科大学病理学教研室. guanxiaolin2003@163.com  
电话: 023-68485789  
收稿日期: 2007-06-27 修回日期: 2007-09-19

## Vitamin E and Se interfere in cytochrome P4501A1 and lipid peroxidation in nonalcoholic fatty liver diseases in rats

Li Tan, Xiao-Qin Guan

Li Tan, Xiao-Qin Guan, Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China  
Correspondence to: Xiao-Qin Guan, Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China. guanxiaolin2003@163.com  
Received: 2007-06-27 Revised: 2007-09-19

### Abstract

**AIM:** To study the effects of vitamin E and Se on cytochrome P4501A1 and lipid peroxidation in nonalcoholic fatty liver diseases in rats.

**METHODS:** Forty male SD rats were randomly divided into 5 groups: normal control group, model group, VE group, Se group and VE + Se group. Each subgroup comprised 8 rats, which were respectively fed with normal diets, fat-rich diets and interfering diets (VE, Se, VE + Se). All animals were sacrificed at the end of the 5th week. Superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels in the serum and liver were detected by biochemical analysis. The expression levels of cytochrome P4501A1 mRNA in liver tissue were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) proteins in hepatic tissue were examined by immunohistochemistry.

**RESULTS:** Compared with the control group,

MDA levels in the serum and livers of model group animals were elevated (serum,  $13.40 \pm 4.24$  mmol/L vs  $6.43 \pm 1.76$  mmol/L; liver,  $9.79 \pm 0.94$  nmol/mgprot. vs  $6.80 \pm 0.97$  nmol/mgprot.,  $P < 0.01$ ), while SOD levels were decreased (serum,  $312.72 \pm 49.51$  kU/L vs  $583.23 \pm 63.37$  kU/L; liver,  $8.13 \pm 0.63$  U/mgprot. vs  $13.99 \pm 2.33$  U/mgprot.;  $P < 0.01$ ). The levels of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  proteins and cytochrome P4501A1 mRNA in liver tissue were significantly increased in model group animals ( $0.069 \pm 0.01$ ,  $0.230 \pm 0.013$  and  $0.628 \pm 0.116$ , respectively) compared with control animals ( $0.003 \pm 0.001$ ,  $0.03 \pm 0.006$ , and 0, respectively;  $P < 0.05$ ). Compared with the model group, in the VE group and Se group, MDA decreased in serum and liver while SOD heightened, levels of cytochrome P4501A1 mRNA in liver tissue also decreased. Expression of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  proteins also decreased ( $P < 0.05$ ). The SOD levels in the serum of VE + Se group animals clearly increased, and approached the levels of the control group, compared with those in model group animals, whereas the levels of cytochrome P4501A1 mRNA in liver tissue significantly decreased ( $0.324 \pm 0.070$  vs  $0.628 \pm 0.116$ ;  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Lipid peroxidation and the expression of some correlation factors in nonalcoholic fatty liver diseases is probably relevant to the up-regulation of cytochrome P4501A1 mRNA in liver tissue. Vitamin E and Se can protect against nonalcoholic fatty liver diseases owing to their antioxidant capabilities. The function of the administration of both Vitamin E and Se combined was significantly larger than those of vitamin E and sodium selenite alone.

**Key Words:** Nonalcoholic Fatty Liver Disease; Cytochrome P4501A1; Vitamin E; Se; Reverse transcription polymerase chain reaction

Tan L, Guan XQ. Vitamin E and Se interfere in cytochrome P4501A1 and lipid peroxidation in nonalcoholic fatty liver diseases in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 2977-2982

### 背景资料

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是一种无过量饮酒史, 以肝细胞脂肪变性和脂质贮积为特征的临床病理综合征, 目前在欧美发达国家已成为最普遍的肝脏疾病, 近年来在我国发病率逐年升高, 据现有流行病学研究结果显示, 北京、上海、杭州职员发病率分别为11.0%、12.8%、5.2%。

**研发前沿**  
NAFLD发病机制至今尚未完全阐明。目前较为公认的“二次打击学说”认为氧化应激及脂质过氧化在脂肪肝发生发展过程中处于主导地位。脂肪性肝炎是单纯性脂肪肝从机体适应性反应向进展性病理状态发展的转折点,其预后与单纯性脂肪肝截然不同。目前认为脂质过氧化反应可能是单纯性脂肪肝诱导脂肪性肝炎和肝纤维化的重要机制。

## 摘要

**目的:** 研究维生素E、硒对非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞色素P4501A1及脂质过氧化的干预作用。

**方法:**  $\delta$  SD大鼠,随机均分为5组:对照组(普通饲料)、模型组(高脂饲料)、VE干预组、Se干预组、VE+Se干预组,建模5 wk处死全部大鼠。生化方法检测血清及肝组织超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量的变化,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定肝细胞色素P4501A1 mRNA表达的变化,免疫组化方法测定肝组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)表达的变化。

**结果:** 与对照组比较,模型组血清及肝组织中SOD显著降低( $312.72 \pm 49.51$  kU/L vs  $583.23 \pm 63.37$  kU/L;  $8.13 \pm 0.63$  U/mgprot. vs  $13.99 \pm 2.33$  U/mgprot.,  $P < 0.01$ ), MDA增高( $13.40 \pm 4.24$  mmol/L vs  $6.43 \pm 1.76$  mmol/L;  $9.79 \pm 0.94$  nmol/mgprot. vs  $6.80 \pm 0.97$  nmol/mgprot.,  $P < 0.01$ ), 细胞色素P4501A1 mRNA表达水平,肝组织TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B蛋白表达明显增强( $0.628 \pm 0.116$  vs  $0$ ,  $0.230 \pm 0.013$  vs  $0.03 \pm 0.006$ ,  $0.069 \pm 0.01$  vs  $0.003 \pm 0.001$ ;  $P < 0.05$ )。与模型组比较VE组、Se组的血清及肝组织中SOD增高,MDA降低,细胞色素P4501A1 mRNA表达水平略下降;肝组织TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B蛋白表达下降( $P < 0.05$ )。VE+Se组与模型组比较,血清SOD明显增高,其值接近对照组水平;细胞色素P4501A1 mRNA表达水平显著下降( $0.324 \pm 0.070$  vs  $0.628 \pm 0.116$ ,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 非酒精性脂肪肝的脂质过氧化损伤及相关因子的表达可能与肝细胞色素P4501A1表达上调有关。VitE和硒能提高机体的抗氧化能力,对非酒精性脂肪肝有保护作用,二者联合作用更明显。

**关键词:** 非酒精性脂肪肝;肝细胞色素P4501A1;维生素E;硒;逆转录聚合酶链反应;免疫组化方法

谭丽, 管小琴. 维生素E、硒对非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞色素P4501A1及脂质过氧化的干预作用. 世界华人消化杂志 2007;15(28):2977-2982

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2977.asp>

## 0 引言

非酒精性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)发病率逐年提高,然而其发病机制至今尚未完全阐明,目前在临床上亦缺乏十分有效的防治手段。Day *et al*提出的“二次打击学

说”认为氧化应激及脂质过氧化在脂肪肝发生发展过程中处于主导地位,许多发病因素通过增加氧化活性和脂质过氧化作为共同致病途径对肝脏实施二次打击,导致脂肪肝发生及其后病变进展<sup>[1-3]</sup>。本实验采用高脂饮食动物模型,通过检测脂质过氧化与抗氧化的标志物超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)及肝细胞色素P4501A1(cytochrome P4501A1, CYP1A1)和相关细胞因子TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B,探讨脂肪肝的脂质过氧化及与CYP1A1、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B的相关性,进而观察维生素E(VE)和亚硒酸钠(Se)对脂肪肝损伤程度及上述各项指标的干预作用,以期对脂肪肝的发生和治疗提供理论基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料**  $\delta$  SD大鼠40只,质量200 g左右,购自重庆医科大学实验动物中心。Vit E为厦门鱼肝油厂产品,亚硒酸钠为北京市朝阳区中联化工试剂公司产品(分析纯),超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,兔抗大鼠TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65多克隆抗体、SABC免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒购自武汉博士德生物工程公司,TRIzol试剂购自美国Promega公司,总RNA抽提试剂盒购自大连宝生物公司,RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa试剂公司,DNA marker及PCR引物由成都天泰生物工程公司生产合成。

**1.2 方法** 大鼠正常喂养1 wk后随机分成对照组、模型组、VE干预组、Se干预组、VE+Se干预组,每组8只,分笼饲养。对照组以普通饲料喂养,模型组以高脂饲料喂养(2%胆固醇+0.5%胆酸钠+0.2%丙硫氧嘧啶+5%蔗糖+10%猪油+82.3%普通饲料),VE干预组在高脂饲料中添加VitE(250 mg/kg饲料)喂养,Se干预组在高脂饲料中添加亚硒酸钠(0.5 mg/kg饲料)喂养,VE+Se干预组在高脂饲料中同时添加上述同等剂量的VitE和亚硒酸钠喂养。建模5 wk后处死,处死前禁食12 h,以10 g/L的戊巴比妥钠溶液3.0 mL/kg BW ip麻醉,眶静脉采血,置37℃恒温水浴20 min,红细胞沉降后,取血清-20℃保存待检。打开腹腔,取出肝脏,观察组织大体形态、颜色及质地。取部分肝组织按常规制备石蜡切片,根据中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学会“非酒精性脂肪肝诊断标准”<sup>[4]</sup>,对各组大鼠肝脂变程度进行分级;剩余组织置液氮中保存备用。

**1.2.1 血清及肝组织SOD、MDA含量的检测** 血



清SOD、MDA检测方法按试剂盒说明书进行,采用752分光光度计比色,波长分别为550 nm、532 nm;肝组织SOD、MDA测定:取肝组织1 g剪碎,加冰生理盐水至总体积为10 mL,制备10%肝匀浆;4000 r/min、4℃离心10 min,取上清液;比色方法与血清相同。

**1.2.2 RT-PCR检测CYP1A1 mRNA的表达** (1)根据genbank中查阅的mRNA全长序列,用Primer3引物设计软件设计CYP1A1和内对照环素CYC的引物;CYP1A1上游序列: 5'-CTGGTTC TGGATACCCAGCTG-3',下游序列: 5'-CCTAG GGTGTTACCAGG-3',其产物长度为332 bp;内对照环素CYC上游序列: 5'-CTTCGACATC ACGGCTGATG-3',下游序列5'-CAGGACCTGA TGCTTCAGG-3',其产物长度为266 bp; (2)肝脏总RNA提取和cDNA合成按试剂盒标准步骤操作;PCR反应体系: cDNA 3  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP 2.5  $\mu$ L, 25 mmol/L  $Mg^{2+}$  5  $\mu$ L, 10×PCR缓冲液5  $\mu$ L, DEPC水3  $\mu$ L, Taq酶0.5  $\mu$ L, CYP1A1、CYC引物各1.5  $\mu$ L. CYP1A1 PCR循环为95℃变性2 min, 58℃退火1 min, 72℃延伸1.5 min, 循环35次. CYC PCR循环为95℃变性1 min, 58℃退火50 s, 72℃延伸1 min, 循环35次; (3)10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物, EB染色;采用Quantity One凝胶图像分析系统对RT-PCR产物电泳条带进行密度分析,测定目的带及CYC条带的V值 (Volume = 平均吸光密度值×条带面积),目的带表达强度RV = V目的带/CYC。

**1.2.3 免疫组化TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达** 一抗稀释浓度分别为1:300, 1:200, 肝组织切片经常规脱蜡至水, 30 mL/L过氧化氢孵育消除内源性过氧化物酶活性;微波修复,冷却后PBS洗涤1-2次;50 mL/L正常山羊血清封闭20 min;滴加一抗,阴性对照以PBS代替,4℃过夜;加入生物素化二抗,室温孵育20 min;滴加SABC 20 min, DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片. 400倍光镜下观察,每张切片摄取3个高倍(×400)视野,输入计算机,应用金盘图像处理系统自动分析得出平均光密度(AIOD)值。

**统计学处理** 应用统计学分析软件包SPSS 11.0进行统计学分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 肝脏病理组织学改变** 至造模结束,各组大鼠均无死亡。模型组大鼠肝脏体积较对照组增大,颜色变黄,包膜紧张,切面触之有油腻感。HE染色光镜下观察,与对照组比较,模型组肝细胞体

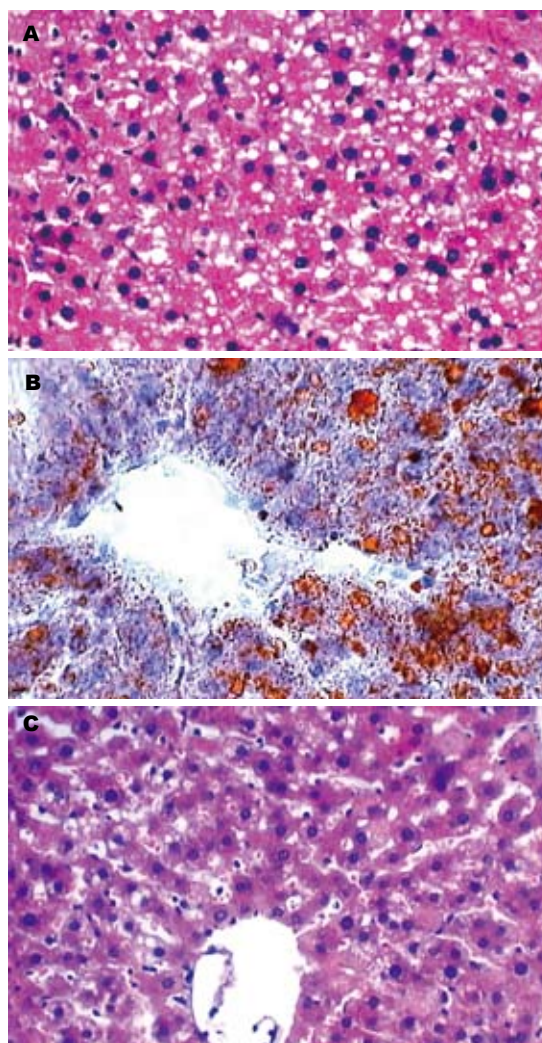


图1 肝细胞脂肪变性。A: 模型组(HE ×100); B: 模型组(苏丹 ×200); C: VE+Se组(HE ×200)。

积增大,排列紊乱,细胞内充满大小不等的空泡(经苏丹IV特殊染色显示为橘红色,证实为脂滴),部分区域伴炎症细胞浸润及灶性坏死;与模型组比较,各干预组肝脂肪变程度有所减轻,尤以VE+Se组最为显著,炎症及坏死不明显(图1)。脂变程度分级见表1。

**2.2 生物化学指标变化** 模型组血清及肝组织中SOD较对照组明显降低,各干预组较模型组有不同程度的增高,尤以VE+Se组增高最为显著,其值接近对照组水平。相反,模型组血清及肝组织中MDA较对照组明显增高,各干预组较模型组不同程度降低,以VE+Se组降低最为显著(表2)。

**2.3 CYP-1A1 mRNA表达变化** RT-PCR检测显示,对照组CYP1A1 mRNA无表达,与对照组相比模型组CYP1A1 mRNA表达显著增加;各干预组中VE、Se单独使用时CYP1A1 mRNA表达水平略下降,无统计学意义;VE+Se组CYP1A1 mRNA

**相关报道**  
国外学者Shertzer *et al*研究报道,肝微粒体CYP1A1表达增强与羟自由基的生成增多及脂质过氧化有关。第三军医大学史洪涛 *et al*学者研究报道,非酒精性脂肪肝形成时肝CYP1A1活性明显增强,其增高与脂肪肝的严重程度密切相关;并且认为肝微粒体CYP1A1表达增强与脂质过氧化及自由基生成增多有关,随着脂肪变程度的加重, CYP1A1活性明显增高,使脂质过氧化反应加剧,损害肝细胞结构和功能。

## 应用要点

VitE和硒是两种重要的抗氧化剂。本实验在膳食中单独及联合补充适量VitE和亚硒酸钠,对脂肪肝损伤程度起到不同程度的干预作用,二者联合作用更显著,为临床上脂肪肝的治疗提供了一定的理论和实验依据。

表 1 各组大鼠肝组织脂肪变性程度比较( $n=8$ )

脂肪变性程度	-	+	++	+++
N组	8	0	0	0
M组 <sup>b</sup>	0	1	2	5
VE组 <sup>a</sup>	0	3	4	1
Se组 <sup>a</sup>	0	4	3	1
VE+Se组 <sup>a</sup>	0	5	3	0

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs M组; <sup>b</sup> $P<0.01$  vs N组。

表达水平较模型组明显降低( $P<0.05$ )(图2, 表3)。

**2.4 肝脏TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B p65蛋白表达的变化** 对照组肝细胞内TNF- $\alpha$ 几乎不表达, Kupffer细胞见少量表达; 模型组肝细胞内TNF- $\alpha$ 阳性表达明显增强, 其阳性程度与脂变程度一致; 各干预组TNF- $\alpha$ 阳性表达较模型组有不同程度的减弱, 以VE+Se组最为显著(表3, 图3A-B)。对照组肝细胞内NF- $\kappa$ B p65有少量表达, 主要位于肝细胞胞质; 模型组肝细胞NF- $\kappa$ B p65表达较对照组明显增强, 胞质及胞核均有表达, 其阳性程度与脂变程度一致; 各干预组NF- $\kappa$ B p65阳性表达较模型组有减弱, 其中VE+Se组仅个别肝细胞见阳性表达, 大部分肝细胞不表达(表3, 图3C-D)。

## 3 讨论

脂质过氧化在脂肪肝发生发展过程中处于主导地位, 肝细胞脂肪变性及其伴存或继发的胰岛素抵抗(IR)、游离脂肪酸(FFA)增多、肝细胞内甘油三酯(TG)氧化增多、肝细胞色素P450酶系表达增强、肝细胞能量储备不足等均可通过诱发氧应激导致脂质过氧化损伤<sup>[5]</sup>。本文通过测定脂质过氧化与抗氧化的标志物MDA和SOD及CYP1A1、TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B等相关因子, 结合组织病理学的变化, 对非酒精性脂肪肝发病及其演变过程中, 氧应激脂质过氧化损伤及细胞防御机制改变之间作用及其相互关系进行探讨, 进而观察Vit E和亚硒酸钠两种抗氧化剂对高脂饮食大鼠脂肪肝损伤程度及上述指标的干预作用。

肝细胞色素P450系统是一组广泛存在于机体, 但主要存在于肝细胞内质网上的混合功能氧化酶系, 该酶系主要包括有CYP1A、2E、3A, 其中CYP1A1不仅参与药物的代谢, 而且还能催化许多前致癌物和前毒物的活化过程<sup>[6]</sup>。Shertzer *et al*<sup>[7]</sup>提出, CYP1A1参与脂肪肝发病中的脂质过氧化反应, 且与羟自由基的生成增多

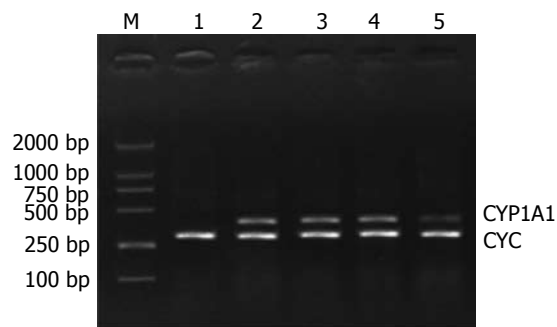


图 2 大鼠肝组织CYP1A1 mRNA表达。1: 对照组; 2: 模型组; 3-5: 分别为VE干预组、Se干预组、VE+Se干预组。

有关。羟自由基是脂质过氧化反应的启动剂, 高脂饮食可增加线粒体或微粒体对脂肪酸的氧化而导致氧应激, 故脂肪酸可诱导细胞色素P450酶系的产生。本研究结果显示, 高脂饮食诱导的NAFLD大鼠肝细胞微粒体CYP1A1 mRNA表达上调, 肝脏及血清中脂质过氧化物终产物MDA含量显著增高, 抗氧化及清除自由基的SOD含量明显降低; 提示高脂饮食模型组大鼠体内脂质过氧化反应增强, 其机制一方面可能由于CYP1A1表达增加, 使微粒体还原型辅酶II (NADPH) 依赖的脂质过氧化反应增强, 另一方面可能是由于增多的FFA为氧应激脂质过氧化提供足够的反应基质。

本研究中所有NAFLD模型组大鼠均处于早期及单纯性脂肪肝向脂肪性肝炎过渡阶段, 免疫组化结果显示大鼠肝细胞TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B蛋白阳性表达较正常对照组显著增强; 提示TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B因子的表达参与NAFLD的发生与进展。NAFLD形成时, 氧应激、FFA增多、CYP1A1、CYP2E1表达增加及IR等因素可促使大量的活性氧(ROS)生成, 通过促使NF- $\kappa$ B活化和结合蛋白-1(AP-1)在核内移位, 进而刺激枯否氏细胞生成TNF- $\alpha$ 增加, 增多的TNF- $\alpha$ 又使ROS生成增多; 另一方面还通过激活IKK $\beta$ 使KB抑制蛋白(I $\kappa$ B)降解, 从而活化NF- $\kappa$ B, ROS-NF- $\kappa$ B-TNF- $\alpha$ 三者之间形成恶性循环, 进一步促使脂质过氧化反应加剧<sup>[8]</sup>。国内外较多研究均提出, 脂质过氧化反应可能是单纯性脂肪肝诱导脂肪性肝炎和肝纤维化的重要机制, 除非及时阻止炎症-坏死循环, 否则将难避免脂肪性肝炎和肝纤维化的发生<sup>[9-10]</sup>。

VitE和硒是两种重要的抗氧化剂, 前者的抗氧化功能依赖其自身结构, 他可以插入到细胞膜的脂质双分子层之间, 与多价不饱和脂肪酸形成膜结构的一部分, 并与结合在膜上的能产



表 2 各组大鼠血清及肝组织中SOD, MDA含量的变化(mean ± SD, n = 8)

	SOD		MDA	
	血清(U/L)	肝组织(U/mgprot.)	血清(mmol/L)	肝组织(nmol/mgprot.)
N组	583.23 ± 63.37	13.99 ± 2.33	6.43 ± 1.76	6.80 ± 0.97
M组	312.72 ± 49.51 <sup>d</sup>	8.13 ± 0.63 <sup>d</sup>	13.40 ± 4.24 <sup>d</sup>	9.79 ± 0.94 <sup>d</sup>
VE组	356.03 ± 69.05 <sup>a</sup>	9.87 ± 0.05 <sup>a</sup>	12.83 ± 2.45 <sup>a</sup>	9.13 ± 0.06 <sup>a</sup>
Se组	393.79 ± 42.95 <sup>a</sup>	10.01 ± 0.05 <sup>a</sup>	12.46 ± 0.65 <sup>a</sup>	8.87 ± 0.08 <sup>a</sup>
VE+Se组	528.23 ± 53.72 <sup>b</sup>	12.79 ± 1.15 <sup>b</sup>	8.51 ± 1.33 <sup>b</sup>	7.53 ± 0.40 <sup>b</sup>
F	33.63	31.72	25.33	29.98
P	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs M组; <sup>d</sup>P<0.01 vs N组.

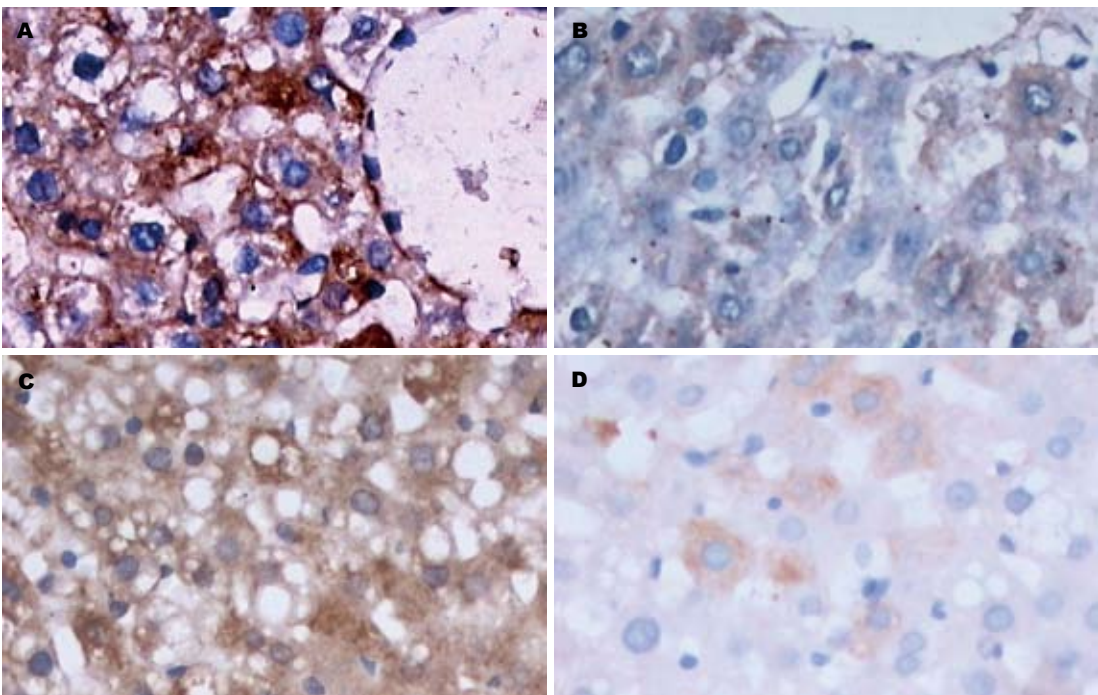


图 3 TNF-α和NF-κB在肝组织中的表达(× 400). A: 模型组TNF-α; B: VE+Se组TNF-α; C: 模型组NF-κB; D: VE+Se组NF-κB.

生氧自由基的酶(如混合功能氧化酶)紧密相邻,在氧自由基攻击多不饱和脂肪酸前将其捕获和清除,阻断其氧化过程,防止和抑制了膜上磷脂形成脂质过氧化;硒是机体必须的微量元素之一,为谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性中心的必须组成成分.体内SOD、GSH-Px可直接拮抗自由基的毒性作用,清除脂质过氧自由基和羟自由基,羟自由基是脂质过氧化的启动剂.故VitE是防止脂质过氧化的第一道防线,含硒的GSH-Px起着第二道防线的作用<sup>[11]</sup>,二者在防止细胞膜脂质的过氧化反应、保护细胞膜、肝线粒体及内质网膜的稳定性方面具有互补作用.本实验结果显示,膳食中适量补充VitE和亚硒酸

表 3 各组大鼠肝组织CYP1A1 mRNA, TNF-α、NF-κB p65蛋白表达(mean ± SD, n = 8)

分组	CYP1A1/CYC	TNF-α	NF-κB p65
N组	0	0.03 ± 0.006	0.003 ± 0.001
M组	0.628 ± 0.116	0.230 ± 0.013 <sup>d</sup>	0.069 ± 0.01 <sup>d</sup>
VE组	0.609 ± 0.099	0.225 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.065 ± 0.016 <sup>a</sup>
Se组	0.588 ± 0.0624	0.215 ± 0.020 <sup>a</sup>	0.060 ± 0.016 <sup>a</sup>
VE+Se组	0.324 ± 0.070 <sup>a</sup>	0.163 ± 0.015 <sup>b</sup>	0.030 ± 0.01 <sup>b</sup>
F	20.45	163.38	44.73
P	<0.0001	<0.0001	<0.0001

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs M组; <sup>d</sup>P<0.01 vs N组.

钠,可有效防止脂质过氧化反应的发生,减少对

同行评价  
本文层次清楚, 条理分明, 数据可信, 对基础研究有一定的参考意义.

P4501A1的诱导和肝组织中TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B蛋白的表达,进而阻止炎症-坏死循环,对病变的进展起到有效的干预作用.二者联合应用对增强抗氧化能力作用更显著,这为临床上脂肪肝的治疗提供了一定的理论和实验依据.

#### 4 参考文献

- 1 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845
- 2 Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16: 663-678
- 3 曾民德. 脂肪肝发病机制及其“二次打击”假设. *中华消化杂志* 2002; 22: 167-168
- 4 中华肝脏病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝诊断标准(草案). *中华肝病杂志* 2002; 7: 附

页2

- 5 范建高. 非酒精性脂肪肝的病因和发病机制. *胃肠病学* 2003; 8: 363-368
- 6 Ioannides C, Parke DV. Induction of cytochrome P4501 as an indicator of potential chemical carcinogenesis. *Drug Metab Rev* 1993; 25: 485-501
- 7 Shertzer HG, Clay CD, Genter MB, Schneider SN, Nebert DW, Dalton TP. Cyp1a2 protects against reactive oxygen production in mouse liver microsomes. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 605-617
- 8 Kaplowitz N. Biochemical and cellular mechanisms of toxic liver injury. *Semin Liver Dis* 2002; 22: 137-144
- 9 范建高. 脂肪肝与肝纤维化的关系及其机制. *国外医学消化系疾病分册* 1997; 17: 92-95
- 10 董菁, 成军. 脂肪肝形成分子机制的研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 1035-1037
- 11 游金明, 张宏福, 陈能春. 微量元素硒营养的研究与应用. *中国饲料* 2002; 8: 13-15

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

### • 消息 •

## 世界华人消化杂志个性化服务订购活动

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

#### 1 精彩专家述评专辑印刷版杂志

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

#### 2 WCJD电子杂志

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

#### 3 WCJD网络版杂志

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

#### 4 WCJD印刷版杂志

WCJD印刷版1-36期. 定价: 864元/年.

#### 5 订购信息

邮政编码, 姓名, 地址, 部门, 机构名称, E-mail, 手机号.

#### 6 汇款的方式

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

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

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

# 改良蛋氨酸胆碱缺乏饮食喂养的非酒精性脂肪性肝炎大鼠模型的建立

钱晓武, 范竹萍, 汪晓红, 盛黎, 奚志峰, 邱德凯

钱晓武, 泰州市人民医院老年科 江苏省泰州市 225300  
范竹萍, 汪晓红, 盛黎, 奚志峰, 邱德凯, 上海交通大学医学院附属仁济医院 上海消化疾病研究所 上海市 200001  
钱晓武, 1998年南京医科大学学士, 2006年上海交通大学硕士, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的非酒精性脂肪性肝炎的研究。  
通讯作者: 范竹萍, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院, 上海消化疾病研究所. jstzqianxw99@163.com  
收稿日期: 2007-04-04 修回日期: 2007-09-14

## Establishment of nonalcoholic steatohepatitis rat models with modified methionine-choline-deficient diets

Xiao-Wu Qian, Zhu-Ping Fan, Xiao-Hong Wang,  
Li Sheng, Zhi-Feng Xi, De-Kai Qiu

Xiao-Wu Qian, Department of Geriatrics, People's Hospital of Taizhou City, Taizhou 225300, Jiangsu Province, China  
Zhu-Ping Fan, Xiao-Hong Wang, Li Sheng, Zhi-Feng Xi, De-Kai Qiu, Department of Gastroenterology, Renji Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University; Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai 200001, China

Correspondence to: Dr. Zhu-Ping Fan, Department of Gastroenterology, Renji Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University; Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai 200001, China. jstzqianxw99@163.com

Received: 2007-04-04 Revised: 2007-09-14

## Abstract

**AIM:** To establish nonalcoholic steatohepatitis (NASH) rat models with modified methionine-choline-deficient (MCD) diets. Hepatic steatosis and inflammation would be expected in these rats.

**METHODS:** Rats were randomly divided into 4 groups. Rats were fed with MCD or with choline-supplemented (CS) diets. Weight and food intake were determined. After 3 and 8 weeks, rats were sacrificed; liver specimens were fixed overnight in buffered formaldehyde (40 g/L) and embedded in paraffin. HE-stained and Masson-stained sections were graded blindly for the degree of fatty change, inflammation, fibrosis and necrosis. Serum was measured for biochemical markers.

**RESULTS:** After 3 weeks on an MCD diet, ste-

atosis and inflammation could be seen in rat livers. The liver index was increased significantly by the MCD diet. Serum ALT and AST levels were also increased significantly, whereas TG levels decreased. After 8 weeks on the diet, fibrogenesis could be seen.

**CONCLUSION:** Rat NASH models can be established using modified MCD diets.

**Key Words:** Methionine-choline-deficient diet; Non-alcoholic steatohepatitis; Hepatic steatosis

Qian XW, Fan ZP, Wang XH, Sheng L, Xi ZF, Qiu DK. Establishment of nonalcoholic steatohepatitis rat models with modified methionine-choline-deficient diets. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 2983-2989

## 摘要

**目的:** 观察改良蛋氨酸胆碱缺乏饮食(MCD)建立的脂肪性肝炎大鼠模型肝脏的脂肪变性和炎症情况。

**方法:** 大鼠26只随机分为4组, 分别喂养MCD饮食和胆碱添加饮食(CS)。3-8 wk后处死, 肝脏标本在甲醛中固定和石蜡包埋。HE染色和Masson染色后对脂肪变性、炎症和纤维化进行评分。血清ALT, AST, CH, LDL等指标通过生化分析仪进行测定。

**结果:** MCD喂养组3 wk可以看见肝脂肪变性和炎症, 肝指数显著增加, ALT和AST显著升高, 8 wk可见纤维形成。

**结论:** 可通过改良的蛋氨酸胆碱缺乏(MCD)饮食建立非酒精性脂肪肝动物模型。

**关键词:** 蛋氨酸胆碱缺乏饮食; 非酒精性脂肪性肝炎; 脂肪变性

钱晓武, 范竹萍, 汪晓红, 盛黎, 奚志峰, 邱德凯. 改良蛋氨酸胆碱缺乏饮食喂养的非酒精性脂肪性肝炎大鼠模型的建立. *世界华人消化杂志* 2007;15(28):2983-2989  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2983.asp>

**背景资料**  
NAFLD是发达国家最为常见的引起肝功能异常的原因, 也是隐性肝硬化的常见原因。NAFLD包括肝脏单纯脂肪变性、NASH、肝纤维化和肝硬化等一系列的病理变化。单纯脂肪变性是相对静止性疾病, 而NASH则是进展性疾病, 可以发展为肝硬化、肝功能衰竭和肝癌, 与全球的肥胖化趋势同步, NAFLD和NASH的发病率逐渐升高, 对于NASH机制和防治的研究成为近年来的热点。

## 研发前沿

对NASH的研究需要有合适的动物模型。国内外的NASH动物模型有十余种,近年来仍有不断有新的基因敲除模型和饮食模型报道,但尚没有一种能完全和人类的机制吻合。

## 0 引言

非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)在美国、澳大利亚、欧洲、亚太地区很多国家内引起慢性肝功能异常最为常见的原因<sup>[1-5]</sup>,也是隐源性肝硬化的常见原因<sup>[6-7]</sup>。非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)是NAFLD的一种病理类型<sup>[8]</sup>,是进展性疾病<sup>[9-10]</sup>,可以发展为肝硬化、肝功能衰竭和肝癌等终末期肝病<sup>[11-13]</sup>,其病理生理机制尚不完全清楚。疾病的发病机制只有通过疾病相似的合适动物模型才可以得到阐明,关于NASH的最新实验数据大部分来源于2种动物模型,1种是通过基因敲除方法获得的动物模型如ob/ob小鼠;另一种就是由蛋氨酸胆碱缺乏饮食(methionine-choline deficient, MCD)引起的脂肪性肝炎模型<sup>[14-15]</sup>。

MCD饮食最初由Shinozuka *et al*<sup>[16]</sup>提出,是用于探讨饮食因素对肝脏肿瘤形成的影响,后来发现在短期内可以引起脂肪性肝炎。在该模型中,脂肪性肝炎发展速度快,3 wk左右可见明显的脂肪性肝炎病变,10 wk可见明显的肝纤维化,且引起的脂肪性肝炎病变与人类NASH类似<sup>[14]</sup>。使用MCD饮食制造NASH模型是国外进行脂肪性肝炎研究常用的方案,但因为MCD饮食价格昂贵,配方复杂,国内尚没有应用这种饮食造模的报道。我们通过改良的MCD饮食建立了NASH动物模型。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我们根据实际情况,在Shinozuka *et al*<sup>[16]</sup>配方基础上进行了改良,具体成分(g/kg):大豆分离蛋白147.0,纤维素10.0,玉米淀粉121.0,糊精100.0,蔗糖426.0,酪蛋白,不含维生素10.0,胱氨酸2.0,善存片2片(每片1.5 g,含维生素A 7500国际单位,维生素E 60国际单位,维生素C 120 mg,叶酸400  $\mu$ g,维生素B1 1.5 mg,维生素B2 1.7 mg,烟酰胺20 mg,维生素B6 2 mg,维生素B12 6 mg,维生素D 400国际单位,生物素30  $\mu$ g,泛酸10 mg,钙162 mg,磷109 mg,碘150  $\mu$ g,铁9 mg,镁100 mg,铜3 mg,锌22.5 mg,锰2.5 mg,钾80 mg,氯72 mg,铬65  $\mu$ g,铝150  $\mu$ g,硒20  $\mu$ g),NaCl 2.9, CaHPO<sub>4</sub> 16.6 g, MgSO<sub>4</sub> 1.6 g, 柠檬酸钾9.9 g, 玉米油50.0 g, 氢化植物油100.0 g, 总计1000.0 g。大豆分离蛋白购自南通光合生物技术有限公司,玉米淀粉购自上海绿苑淀粉有限公司,纤维素购自Sigma公司,善存片、蔗糖、玉米油购自易

初莲花超市,氢化植物油购自南海油脂工业有限公司,糊精、酪蛋白、胱氨酸、柠檬酸钾、CaHPO<sub>4</sub>, NaCl, MgSO<sub>4</sub>, 氯化胆碱等均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。添加胆碱饮食为胆碱缺乏饮食基础上每千克饮食减去蔗糖8 g,添加氯化胆碱8 g。上述成分充分混匀后高温灭菌后使用,饮食每周配制1次。

**1.2 方法**  $\delta$  清洁级SD大鼠26只(120-140 g),由中科院上海实验动物中心提供。普通饲料喂养1 wk后随机分为4组。1, 2组为正常对照组,每组5只,喂养添加胆碱饮食(choline supplemented CS)。3, 4组为模型组,每组8只,喂养胆碱缺乏饮食(choline deficient CD)。1, 3组大鼠在3 wk处死,2, 4组大鼠8 wk处死。大鼠饲养于仁济医院动物中心,每笼4-5只,保持恒温于20-22℃,12 h光照和黑夜循环,水和食物均为随意摄取。

**1.2.1 一般情况** 大鼠编号后每周称1次体质量,每2周连续3 d称进食质量。处死前称体质量,观察食欲行为、状态、毛发情况。处死前大鼠隔夜禁食,第2天称体质量,麻醉后固定,从下腔静脉取血,迅速切下肝脏,称湿质量,计算肝指数(肝湿质量/体质量 $\times$ 100%)。从肝右叶切除1 cm $\times$ 2 cm大小,用中性甲醛液固定,石蜡包埋,切片用HE染色和Masson染色,光镜下评估肝脂肪变性和炎症活动情况,Masson染色评估肝纤维化情况。血标本取血清置于-70℃冰箱中保存。其他肝脏和脂肪组织迅速置于液氮中冻存。

**1.2.2 血清生化及肝脏TG测定** 血清ALT, AST, TG等的测定在Bayer Advia 1650全自动生化分析仪上进行。肝脏TG测定:精确称量肝脏0.5 g,制成匀浆后,加入异丙醇5 mL,混匀后静置2 h,2500 r/min离心30 min后,取上清测定肝脏TG含量,测定仪器同上。

**1.2.3 病理学检查** HE切片光镜下评估肝脏脂肪变性和炎症活动情况。肝脏脂肪变性标准按肝小叶内含脂滴细胞数/总细胞数之比值分为0(-),计分为0, <1/3(+),计分为1, 1/3-2/3(++),计分为2, >2/3(+++),计分为3, = 1(++++),计分为4。NASH的病理诊断标准采用亚太地区非酒精性脂肪性肝病诊断与治疗共识所推荐的美国国立卫生研究院NASH临床研究网络病理委员会2005年所定指南<sup>[17]</sup>,根据其制定的NAFLD活动度积分(a NAFLD activity score, NAS)进行评估。NAS组织学评分系统观察了14项病理改变。3项指标进行了半定量评估计分:肝脂肪变(发生脂



表 1 脂肪性肝炎大鼠体质量、肝指数、血生化指标和肝TG量

	分组			
	对照组( <i>n</i> = 5)		模型组( <i>n</i> = 8)	
	组1	组2	组3	组4
开始时体质量(g)	131.4 ± 9.1	129.6 ± 7.4	127.5 ± 9.7	127.4 ± 7.6
处死时体质量(g)	224.0 ± 13.2	456.8 ± 18.4	208.9 ± 14.8	440.2 ± 11.6
体质量增加量(g)	92.6 ± 11.0	327.2 ± 14.9	88.2 ± 19.4	312.8 ± 11.3
肝指数(%)	3.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.2 ± 0.2 <sup>d</sup>	7.5 ± 0.5	5.6 ± 0.8
TG(mmol/L)	1.5 ± 0.7 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>d</sup>	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
ALT(U/L)	76.2 ± 17.9 <sup>b</sup>	57.6 ± 13.4 <sup>d</sup>	162.6 ± 27.8	93.1 ± 18.6
AST(U/L)	135.6 ± 15.9 <sup>b</sup>	105.6 ± 19.5 <sup>d</sup>	466.8 ± 133.4	206.8 ± 54.2
肝脏TG量(mg/g)	15.4 ± 6.5 <sup>b</sup>	16.1 ± 4.2 <sup>d</sup>	114.8 ± 15.7	121.0 ± 14.0

<sup>b</sup>*P* < 0.01 vs 组3, <sup>d</sup>*P* < 0.01 vs 组4.

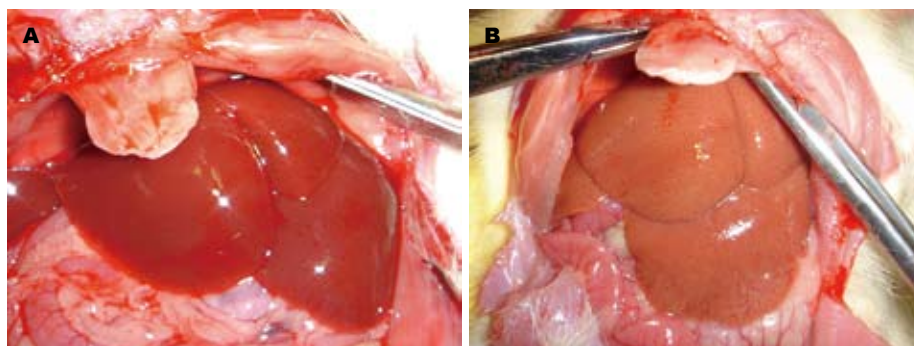


图 1 肝脏外观. A: 对照组; B: 模型组.

肪变性实质细胞<5%, 5%-33%, 33%-66%, >66% 分别计0-3分)、小叶内炎症[无病灶、<2(每×200视野)、2-4(×200视野)、>4(×200视野) 分别计0-3分]、肝细胞气球样变(无、少量气球样细胞、较多/显著气球样变分别计0-2分), NAS≥5者可明确NASH的诊断, NAS<3可排除NASH, 两者之间者为NASH可能. 其余观察指标包括小泡性脂肪变性、大脂质肉芽肿、嗜酸小体、门脉炎症、色素沉着巨噬细胞等以“有或无(1/0)”表示. HE切片使用Olympus摄像系统进行观察和摄片. Masson染色切片使用Leica DM5000B摄像系统进行观察和摄片.

**统计学处理** 计数资料用mean±SD表示, 两组之间的比较用独立*t*检验, 统计学显著性用双侧检验*P*<0.05. 使用SPSS11.5软件包进行统计学分析.

## 2 结果

**2.1 一般情况** 各组大鼠均无死亡, 习性、毛发、活动均无异常. 在开始的2 wk内, 各组大鼠的进食量无明显差异, 从11.8到15.6 g/d, 以后进食量逐渐增加, 恒定至约22.4至25.3 g/d, 对照组大

鼠进食量稍多, 但是与模型组相比无明显差异(*P*>0.05). 处死时, 模型组大鼠的体质量低于对照组 (3 wk, *P* = 0.089; 8 wk, *P* = 0.07); 模型组大鼠的体质量增加低于对照组, 但是无显著差异(3 wk, *P* = 0.66, 8 wk, *P* = 0.073). 3 wk处死的1, 3组大鼠的肝指数有显著性差异(*P*<0.01); 8 wk处死的2, 4组大鼠的肝指数亦有显著性差异(*P*<0.01)(表1).

**2.2 血生化指标** 与1, 2组相比, 3, 4组大鼠的血清ALT, AST均有显著升高(*P*<0.05). 3, 4组血清TG显著低于1, 2组(*P*<0.05). 3, 4组肝脏TG含量显著高于1, 2组(*P*<0.01), 3, 4组之间无差异(*P*>0.05)(表1).

**2.3 肝脏病理学变化** 3 wk时, 正常对照组大鼠处死后, 其肝脏外观表现为无肿胀增大, 色泽深红色, 有光泽, 质软, 边缘锐利, 密度正常(图1A), HE切片可见肝细胞大小正常, 未见脂肪浸润, 无小叶和汇管区炎症(图2A), Masson染色无纤维组织形成. 模型组大鼠肝脏外观表现为肿胀增大, 色泽土黄, 边缘钝, 标本漂浮于中性甲醛液面上(密度降低)(图1B). 切片表现为脂滴弥漫浸润入肝细胞中, 肝小叶内含脂滴细胞数/总细胞数大

**创新盘点**  
基因敲除产生的ob/ob小鼠、具有脂质萎缩特点的SREBP-1小鼠和通过MCD饮食建立的动物模型是国外研究最多和最具有代表性的NASH模型, 但是由于价格原因, 国内均很少, 本文通过改良MCD饮食配方成功建立起与国外相似的MCD动物模型, 有利于国内对NASH机制进一步研究.

**应用要点**  
本文的改良MCD饮食只有国外同类产品价格的1/20, 但同样可以获得满意的效果, 对以后国内NASH的研究提供了很好的模型, 填补了国内空白。

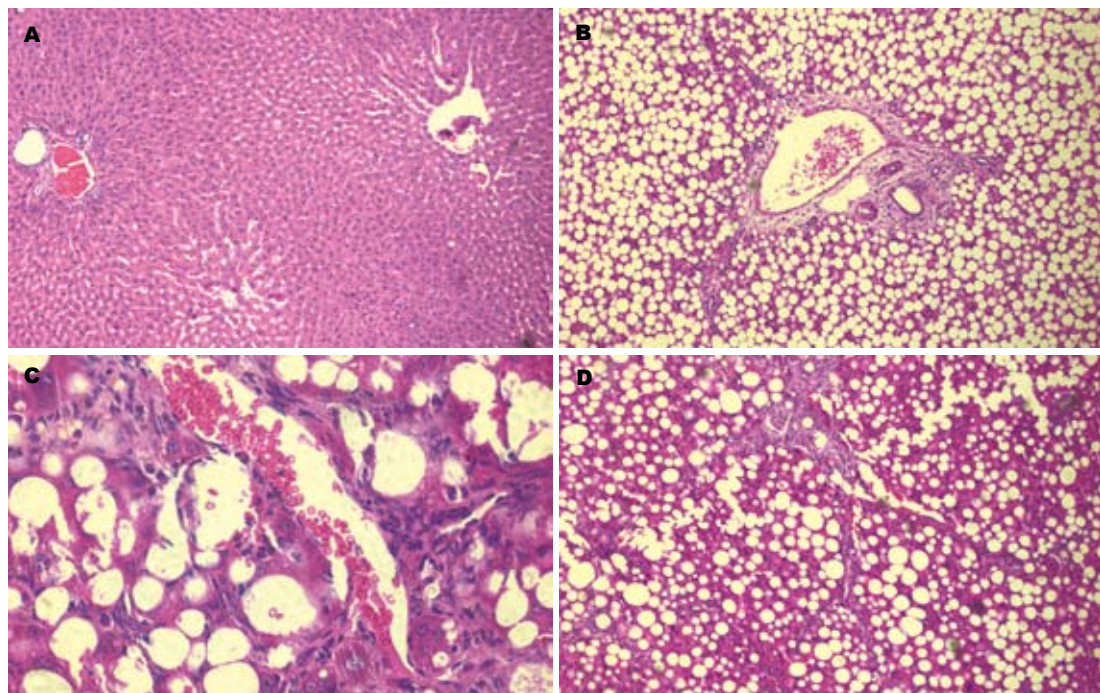


图2 大鼠脂肪肝组织学(HE). A: 3 wk 对照组( $\times 100$ ); B: 3 wk模型组脂肪浸润( $\times 100$ ); C: 3 wk模型组汇管区和小叶内少量炎性细胞( $\times 400$ ); D: 8 wk模型组脂肪浸润纤维组织增多( $\times 100$ ).

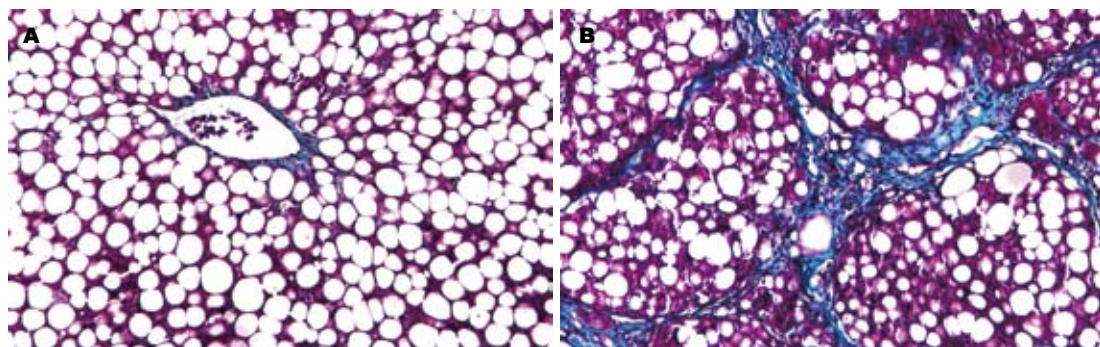


图3 模型组肝脏Masson染色( $\times 100$ ). A: 3 wk; B: 8 wk.

于2/3, 脂变肝细胞极度肿胀呈圆形, 体积较正常明显增加, 胞质内充满大量脂肪空泡. 汇管区和小叶内可见少量炎性细胞浸润, 炎症细胞以单核细胞、淋巴细胞为主(图2B-C). Masson染色未见明显纤维形成(图3A). 8 wk时, 对照2组大鼠肝脏外观及病理与1组相似. 模型4组大鼠肝脏外观表现为肝脏肿大, 色泽暗黄, 密度较前增加, 肝脏表面颗粒样感觉, 质韧. 切片HE染色可见小叶内含脂滴细胞数/总细胞数大于2/3, Masson染色可见纤维组织增多, 部分有假小叶形成(图2D, 3B). 两种饮食特点比较见表2.

### 3 讨论

国内进行脂肪性肝病研究时, 多采用高脂或高糖等高能量饮食建立动物模型. 高能量饲料喂

养大鼠建立单纯性脂肪变性肝病模型一般需要6-8 wk, 如果要发展为脂肪性肝炎, 还需要延长时间, 而且脂肪性肝炎的发生率低. 我们用改良MCD饮食喂养的大鼠, 与正常添加胆碱(CS)饮食喂养的大鼠相比, 3 wk肝脏可见明显的脂肪浸润, 密度下降, 并可见炎性细胞浸润, 脂肪变性评分与CS饮食喂养的大鼠脂肪变性评分有着显著差异, 且 $NAS \geq 5$ ; 同时血清中ALT, AST显著升高, TG显著降低, 肝脏中TG含量增加, 均与文献记载的相同<sup>[16]</sup>. 随着造模时间的延长, 可以见到肝脏炎症进一步发展, 肝脏内纤维组织逐渐增加, 密度也逐渐增加. 而随着纤维组织的增加, ALT和AST有逐渐下降的趋势, 但较对照组仍然显著升高, 符合MCD模型的特点, 表明使用改良MCD饮食制造NASH模型成功. 但国外MCD饮



表 2 改良MCD饮食与国外报道MCD饮食特点比较

	标准MCD	改良MCD
成分	复杂, 难以自行配制	相似, 改良后配制方便
能量蛋白质	满足生长所需要	满足生长所需要
来源	多购买自MP medicals等公司	自行配制
价格	昂贵	价廉 约为国外同类产品的1/20
造模时间	3 wk左右可见明显的脂肪性肝炎病变, 10 wk可见明显的肝纤维化	2-3 wk可见明显脂肪浸润及炎症, 3-6 wk可见明显脂肪性肝炎, 8 wk可见纤维化
体质量	较CS饮食组有显著下降	较CS饮食组有临界性下降
血清ALT、AST	较CS饮食组显著升高	显著升高
血清TG	较CS饮食组降低	降低
肝脏脂肪浸润	2 wk可见	相似
肝脏炎症	显著	相似

食喂养大鼠体质量较对照组显著下降<sup>[14-15]</sup>, 而我们使用改良MCD饮食喂养后, 模型组大鼠体质量也较对照组下降, 但仅有临界性差异. 我们认为可能与饮食改良有关, 同时可能样本量较小也有一定关系.

使用MCD饮食制造NASH模型是国外进行脂肪性肝炎研究常用模型之一, 国外都是购买成品, 但是因为价格昂贵, 国内很少应用. 我们通过改良后成本只有外国的1/20, 同样可以获得满意的NASH模型效果. 此种饮食提供的能量和蛋白质均能充分满足生长需要. 酒精萃取的花生粉, 主要是来源于花生压 后, 他缺乏赖氨酸, 大约含有45%的蛋白质, 但是因为无法获得, 我们用增加大豆分离蛋白来替代. 大豆分离蛋白含有丰富的蛋白质(约90%), 这种蛋白质是经过精心挑选的, 含有充足的蛋白质只有极少量的蛋氨酸(0.2%). 由于大鼠体内可以有效地通过蛋氨酸合成胆碱, 因此, 从这个角度来讲, 该胆碱缺乏饮食也是蛋氨酸胆碱缺乏饮食(MCD)<sup>[16]</sup>.

蛋氨酸是一种必需氨基酸, 在体内提供甲基合成胆碱. 当蛋氨酸缺乏时, 胆碱合成障碍<sup>[18]</sup>. 胆碱又称为VitB4, 是卵磷脂、乙酰胆碱等物质的组成成分. 当缺少胆碱时, 肝脏合成磷脂减少, 不能有效地合成脂蛋白, 特别是极低密度脂蛋白(VLDL); 而VLDL是运输内源性甘油三酯出肝的主要形式, 从而使甘油三酯在肝脏内积聚, 迅速沉积, 形成脂肪肝. 积累在肝的甘油三酯代谢生成甘油二酯, 胆碱与甘油二酯生成卵磷脂减少会导致甘油二酯积累, 结果细胞膜中的卵磷脂会被代谢以提供胆碱, 引起肝细胞膜损伤.

胆碱和蛋氨酸缺乏, 导致活性甲基缺乏, 使

肝脏内严重缺乏抗氧化物, 因此MCD饮食使抗氧化屏障机制受损并增加氧应激<sup>[19]</sup>. 氧应激可以导致细胞多种功能和结构损伤, 还可以诱导TNF $\alpha$ 和其他促炎症细胞因子活化<sup>[20]</sup>. MCD饮食喂养的大鼠, 2 d后就可以发现肝脏TNF $\alpha$ 水平升高<sup>[21]</sup>. 肥胖的NASH患者也存在着TNF $\alpha$ 表达增加的情况, 而同样肥胖但是无NASH者则没有TNF $\alpha$ 表达增加<sup>[22]</sup>. 氧应激和TNF $\alpha$ 还可以激活IKK $\beta$ 途径, IKK $\beta$ 激活核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B), 而NF- $\kappa$ B是一个可以诱导TNF $\alpha$ 合成的转录因子. 因此, 一旦激活, IKK $\beta$ -TNF $\alpha$ 循环就可以不断的自我增强, 导致胰岛素抵抗和慢性炎症状态持续存在, 肝脏炎症细胞浸润和肝脏纤维化很快就会出现.

MCD饮食引起的NASH模型还存在CYP2E1<sup>[14]</sup>上调, CYP2E1是引起氧应激的主要因素, 可以导致羟自由基、超氧阴离子等的产生. 自由基的大量形成可造成肝细胞膜等多部位和成分的广泛损伤和肝纤维化. CYP2E1和其异构体表达增加在人和动物NASH模型中均可以见到<sup>[23]</sup>. 最近Schattenberg *et al*<sup>[24]</sup>报道了CYP2E1的过度表达可以使肝脏胰岛素信号通路受损, 导致肝脏胰岛素抵抗. 且MCD饮食大鼠血浆内 $\beta$ 羟丁酸浓度不升高<sup>[14]</sup>, 提示MCD饮食喂养大鼠的肝脏线粒体 $\beta$ 氧化受损. 因此MCD饮食引起的NASH模型, 除了在组织学上引起的脂肪性肝炎病变与人类NASH类似之外, 也同样可以产生氧应激、TNF $\alpha$ 升高、脂质过氧化等人类NASH中常见的危险因素.

MCD饮食模型有着严重的脂肪浸润、氧应激及TNF $\alpha$ 升高, 有着严重的炎症, 并可能存在着胰岛素抵抗. 但是Rinella *et al*<sup>[25]</sup>使用MCD

## 名词解释

1 NAFLD: 非酒精性脂肪性肝病是一种病变主体在肝小叶, 以肝细胞脂肪变性和脂肪贮积为病理特征但无过量饮酒史的临床综合征, 包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎、脂肪性肝硬化三种主要类型.

2 NASH: 为NAFLD的一种病理类型. 指血清ALT水平高于正常值上限的2倍, 持续时间大于4 wk, 影像学表现符合脂肪肝诊断标准或肝脏组织学表现符合脂肪性肝炎诊断标准.

3 MCD饮食: 蛋氨酸胆碱缺乏饮食, 导致VLDL合成障碍, 使内源性甘油三酯出肝受阻, 从而使甘油三酯在肝脏内积聚, 迅速沉积, 形成脂肪肝.

## 同行评价

本文研究内容较新颖,行文流畅,方法使用较恰当,结果结论较可信,为试验研究提供了一良好的动物模型,有一定的参考价值。

饮食喂养FVB/NJ小鼠后,糖耐量试验、胰岛素耐量试验和定量胰岛素敏感测定表明,MCD饮食引起的NASH模型中不存在胰岛素抵抗,相反还有胰岛素敏感性增高现象。而Tahan *et al*<sup>[26]</sup>却发现,短期或长期MCD饮食喂养的Wistar大鼠,均表现出糖耐量受损和胰岛素耐量下降,而没有出现胰岛素敏感性增加的现象。他认为这可能与大鼠的种属差异性有关。结合以上谈到的氧应激、TNF $\alpha$ 和CYP2E1的作用,我们认为MCD饮食模型是否存在全身性胰岛素抵抗尚有争议,但肝脏的局部胰岛素抵抗是存在的。我们应该注意到,虽然大部分NASH患者均存在中心性肥胖和胰岛素抵抗,但是仍有约10%-20%的NASH患者是瘦的,并无胰岛素抵抗<sup>[27]</sup>,而这部分人有可能就存在着局部的胰岛素抵抗。

MCD饮食模型在发病过程中与人类非肥胖患者的NASH发病过程很相似,因为此模型强调在肝脏脂肪变性和脂肪性肝炎的发病机制中,氧应激独立于肥胖之外的对于NASH发病的重要性,而且存在着肝脏局部的胰岛素抵抗。近来发现,抑癌基因p53, PTEN(phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten)等在脂肪性肝炎的发展中起重要作用,而氧应激可以诱导这些基因的表达<sup>[28]</sup>,对于进一步探讨p53, PTEN在NASH中的机制是有重要意义的。

总之,我们通过改良MCD饮食建立了NASH模型,本模型是研究NASH的发病机制及筛选防治方案的良好实验材料。

## 4 参考文献

- Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. The prevalence and etiology of elevated aminotransferase levels in the United States. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 960-967
- Farrell GC. Non-alcoholic steatohepatitis: what is it, and why is it important in the Asia-Pacific region? *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 124-138
- Ruhl CE, Everhart JE. Relation of elevated serum alanine aminotransferase activity with iron and antioxidant levels in the United States. *Gastroenterology* 2003; 124: 1821-1829
- Chen CH, Huang MH, Yang JC, Nien CK, Yang CC, Yeh YH, Yueh SK. Prevalence and etiology of elevated serum alanine aminotransferase level in an adult population in Taiwan. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1482-1489
- Malik A, Cheah PL, Hilmi IN, Chan SP, Goh KL. Non-alcoholic fatty liver disease in Malaysia: a demographic, anthropometric, metabolic and histological study. *J Dig Dis* 2007; 8: 58-64
- Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespeneide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999; 29: 664-669
- Maheshwari A, Thuluvath PJ. Cryptogenic cirrhosis and NAFLD: are they related? *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 664-668
- Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-1219
- Mulhall BP, Ong JP, Younossi ZM. Non-alcoholic fatty liver disease: an overview. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 1136-1143
- Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Non-alcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980; 55: 434-438
- Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-1419
- Sanyal AJ. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 1705-1725
- McCullough AJ. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2002; 34: 255-262
- Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* 2000; 105: 1067-1075
- Weltman MD, Farrell GC, Liddle C. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterology* 1996; 111: 1645-1653
- Shinozuka H, Lombardi B, Sell S, Iammarino RM. Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline-deficient diet. *Cancer Res* 1978; 38: 1092-1098
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313-1321
- Ghoshal AK, Ahluwalia M, Farber E. The rapid induction of liver cell death in rats fed a choline-deficient methionine-low diet. *Am J Pathol* 1983; 113: 309-314
- Hensley K, Kotake Y, Sang H, Pye QN, Wallis GL, Kolker LM, Tabatabaie T, Stewart CA, Konishi Y, Nakae D, Floyd RA. Dietary choline restriction causes complex I dysfunction and increased H(2)O(2) generation in liver mitochondria. *Carcinogenesis* 2000; 21: 983-989
- Diehl AM. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol Rev* 2000; 174: 160-171
- Diehl AM, Goodman Z, Ishak KG. Alcohollike liver disease in nonalcoholics. A clinical and histologic comparison with alcohol-induced liver injury. *Gastroenterology* 1988; 95: 1056-1062
- Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, Fernandez-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001; 34: 1158-1163
- Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis:

- association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120: 1183-1192
- 24 Schattenberg JM, Wang Y, Singh R, Rigoli RM, Czaja MJ. Hepatocyte CYP2E1 overexpression and steatohepatitis lead to impaired hepatic insulin signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 9887-9894
- 25 Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol* 2004; 40: 47-51
- 26 Tahan V, Yavuz D, Imeryuz N, Avsar E, Tozun N. Oral glucose tolerance deteriorates in rats fed with methionine choline deficient diet. *J Hepatol* 2004; 41: 352; author reply 353
- 27 Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D, Federspil G, Sechi LA, Vettor R. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 113-118
- 28 Yahagi N, Shimano H, Matsuzaka T, Sekiya M, Najima Y, Okazaki S, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Inoue N, Nakagawa Y, Takeuchi Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Kadowaki T, Ishibashi S, Osuga J, Yamada N. p53 involvement in the pathogenesis of fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 20571-20575

编辑 何燕 电编 马文华

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

• 消息 •

## WJG 总编辑在京亲切会见 加拿大英属哥伦比亚大学医学系 Freeman 教授

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 总编辑马连生教授于2007-08-28上午在北京王府饭店会见了加拿大英属哥伦比亚大学医学系医学教授、著名胃肠病专家、WJG编委Hugh J Freeman教授(图1)。两人对WJG的未来规划、发展思路、栏目设置、稿件约稿、同行评议、配发评论及运作模式等进行了亲切友好而富有成果的商谈。Freeman教授对上述方面提出了许多富有价值的建议性意见。

Freeman教授说:“免费在线开放存取、快速的同行评议和周刊出版是WJG予以制胜的三大法宝,希望不断加以完善和提高。”他也非常肯定WJG的“作者创造、市场主导、读者收益”的出版运作模式,还强调:“根据国外期刊的出版状况,过度的商业广告参与会阻碍期刊的正常发展,削弱期刊自身的政策性和导向性决策。”

对于WJG设置的同行评议、配发评论,Freeman教授也给予了高度评价。他说:“每篇文章配发评论很有特色,这是其他期刊所没有的。在阅读文章内容的同时,仔细阅读配发评论,就好像上了一堂新课,准确理解了许多专业概念,扩充了相关背景知识,同时也了解了同行对论文的科学性和创新性评价。”他还建议配发评论中可以考虑同行评议实名制,这样有助于同行评议更加客观公正,激发读者参与热情,让读者感觉更加真实。

对于上述提议,马总编辑非常赞同,并打算逐步



图1 马连生总编辑(左), Hugh J Freeman教授(中), 长有德科学编辑(右)。

加以尝试。

作为此次会见的第二个议程,马总编辑聘请Freeman教授为WJG的副总编辑,担任新增栏目“观察家”(OBSERVER)的责任编辑。本栏目要办出时效性,包括热点、难点、疑点等问题,且本栏目为约稿,不接受自由投稿。Freeman教授将邀请全世界特定领域有名的专家提出一系列正反问题,然后汇总出一系列胃肠病学和肝病研究所面临的重大科学问题,然后邀请专家针对性地撰写评论。Freeman教授对此栏目有着极大的兴趣和热情,相信此栏目在双方的共同努力下,一定能取得成功。(科学编辑:长有德 2007-08-30)

# 靶向S区和C区基因的M1GS RNA核酶共同抑制HBV的表达

毛涛, 殷凡, 田字彬, 厉海妮, 孔心涓, 刘希双, 张海燕

**背景资料**  
乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是一个世界范围的卫生问题, 但目前抗HBV治疗的药物疗效均不能令人满意。近年来, 由RNase P的催化亚基M1 RNA发展而来的M1GS RNA核酶因其特异性和灵活性受到人们的关注, 在病毒性疾病、肿瘤及遗传病的基因治疗上具有广阔的应用前景。

毛涛, 刘希双, 张海燕, 青岛大学医学院附属医院内镜诊疗科 山东省青岛市 266003  
殷凡, 青岛市疾病预防控制中心毒理室 山东省青岛市 266033  
田字彬, 厉海妮, 孔心涓, 青岛大学医学院附属医院消化内科 山东省青岛市 266003  
毛涛, 2006年青岛大学医学院硕士生, 主要从事乙型肝炎和消化道肿瘤的基础和临床研究。  
通讯作者: 毛涛, 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科. maotaoqy@163.com  
电话: 0532-82911525  
收稿日期: 2007-05-27 修回日期: 2007-09-28

## Inhibition of HBV replication by M1GS RNA ribozymes targeting the S and C regions of the HBV genome

Tao Mao, Fan Yin, Zi-Bin Tian, Hai-Ni Li, Xin-Juan Kong, Xi-Shuang Liu, Hai-Yan Zhang

Tao Mao, Xi-Shuang Liu, Hai-Yan Zhang, Department of Endoscopic Diagnosis and Therapy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical School, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Fan Yin, Department of Toxicology, Qingdao Municipal Centers for Disease Control and Prevention, Qingdao 266033, Shandong Province, China

Zi-Bin Tian, Hai-Ni Li, Xin-Juan Kong, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Tao Mao, Department of Endoscopic Diagnosis and Therapy, the Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, 16 Jiangsu Road, Qingdao 266003, Shandong Province, China. maotaoqy@163.com  
Received: 2007-05-27 Revised: 2007-09-28

## Abstract

**AIM:** To construct two M1GS RNA ribozymes targeting the S region and C region of the HBV genome, and evaluate their inhibitory effect on HBV gene expression.

**METHODS:** A 294-nt in the S region and a 2333-nt in the C region of HBV genome were selected as sites of cleavage. DNA templates for site-specific M1GS RNA ribozymes targeting the HBV genome were constructed by polymerase chain reaction (PCR) using plasmid pTK117 as

template. Then, the DNA templates were cloned into the eukaryotic expression vector pEGFP-C1. The recombinant vectors pEGFP-GSS and pEGFP-GSC were co-transfected into HepG2.2.15 cells. HBsAg and HBeAg proteins were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and their mRNA levels were analyzed by RT-PCR.

**RESULTS:** The two ribozymes effectively inhibited the secretion of HBsAg and HBeAg in HepG2.2.15 cells, by 33.2% and 39.1%, respectively. RT-PCR results showed that HBV S and C mRNAs were markedly decreased by 29.7% and 32.5%, respectively. Expression of M1GS RNA ribozyme had no effect on the proliferation of HepG2.2.15 cells.

**CONCLUSION:** These results demonstrate that vectors with site-specific M1GS RNA ribozymes targeting the S and C regions of HBV can inhibit HBV replication specificity *in vitro*.

**Key Words:** Hepatitis B virus; Ribozyme; RNase P; Gene therapy; Reverse transcription polymerase chain reaction; Enzyme linked immunosorbent assay

Mao T, Yin F, Tian ZB, Li HN, Kong XJ, Liu XS, Zhang HY. Inhibition of HBV replication by M1GS RNA ribozymes targeting the S and C regions of the HBV genome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 2990-2994

## 摘要

**目的:** 研究靶向HBV S区和C区基因的M1GS RNA核酶共同作用对HBV基因表达的影响。

**方法:** 选择HBV *ayw*亚型S区基因294 nt和C区基因2333 nt为切割位点, 以含有编码M1 RNA的DNA序列的质粒pTK117为模板, 通过PCR扩增得到M1GS RNA核酶的DNA模板, 并将其克隆至真核表达载体pEGFP-C1得到重组质粒pEGFP-GSS和pEGFP-GSC。将2个重组质粒共转染HepG2.2.15细胞, 转染后ELISA法测细



胞培养液中的HBsAg和HBeAg, RT-PCR检测HBV mRNA.

结果: 成功构建了分别靶向HBV S区基因和C区基因的真核表达载体. 共转染HepG2.2.15细胞后, HBsAg和HBeAg的表达分别被抑制了33.2%和39.1%, HBV C mRNA和S mRNA分别被抑制了32.5%和29.7%, 而HepG2.2.15细胞的增殖无明显变化.

结论: 靶向HBV S区和C区基因的M1GS RNA核酶共同作用可特异性抑制HBV S区和C区基因的表达.

关键词: 乙型肝炎病毒; 核酶; 核糖核酸酶P; 基因治疗; 逆转录聚合酶链式反应; 酶联免疫吸附试验

毛涛, 殷凡, 田宇彬, 厉海妮, 孔心涓, 刘希双, 张海燕. 靶向S区和C区基因的M1GS RNA核酶共同抑制HBV的表达. 世界华人消化杂志 2007;15(28):2990-2994  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2990.asp>

## 0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个世界范围的卫生问题<sup>[1-2]</sup>, 但迄今为止尚未有一种令人满意的治疗方法<sup>[3-4]</sup>. 近年来, 由核糖核酸酶P(RNase P)及其催化亚基M1 RNA发展而来的M1GS RNA, 因其特异性和灵活性受到人们的广泛关注<sup>[5-6]</sup>, 在病毒性疾病<sup>[8]</sup>和肿瘤<sup>[9]</sup>的基因治疗上具有广阔的应用前景, 是一种极有潜力的基因治疗方法<sup>[10-11]</sup>; 前期研究发现, 靶向HBV C区基因3'端保守序列的M1GS RNA核酶, 能明显抑制HepG2.2.15细胞中HBeAg的表达, 但对HBsAg的表达没有影响, 因此, 我们分别构建了靶向HBV C区和S区基因的M1GS RNA核酶真核表达载体, 共转染HepG2.2.15细胞, 研究其对HBV基因表达的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 *E.coli* JM109购自Promega公司; 含有由T7 RNA聚合酶控制的编码M1 RNA的DNA序列的质粒pTK117由Fengyong Liu教授惠赠; 真核表达载体pEGFP-C1购自Clontech公司; HepG2.2.15细胞购自山东大学医学院免疫研究所; DNA marker, 限制性内切酶EcoR I 和Sal I, T4 DNA Ligase购自宝生物工程(大连)有限公司; Taq DNA聚合酶、dNTP、MgCl<sub>2</sub>、10×Buffer等PCR反应试剂购自上海中科开瑞生物工程技术有限公司; PCR引物合成和DNA测序由上海生工生

物工程技术有限公司完成; QIAquick PCR Purification Kit购自Qiagen公司; MEM培养基为Gibco公司产品; 胎牛血清为杭州四季青生物公司产品; Lipofectamine TM200为Invitrogen公司产品; G418为Amresco公司产品; RT试剂盒购自Promega公司; 去内毒素质粒小提试剂盒、2×Taq PCR MasterMix为北京天根公司产品; ELISA试剂盒购自上海实业科华公司.

1.2 方法 根据M1 RNA切割位点的选择原则, 如切割位点的3'和5'端分别为鸟嘌呤和嘧啶可获得最佳的切割效率<sup>[12]</sup>, 同时根据HBV基因的结构与功能, 选择HBV *ayw*亚型S区基因294 nt和C区基因2333 nt为靶位点, 并通过NCBI GenBank Blast确定该序列与人的基因序列没有同源性. 以pTK117质粒为模板, 根据M1 RNA作用底物的特征设计特异性引物, 扩增产物为目的基因即M1GS RNA的DNA模板. 靶向S区基因的3'端引物为: 5'-gcgtcgacGTGGTGTGTGTCTTGGCCAAAATATGACCATG-3'; 靶向C区基因的3'端引物为: 5'-gcgtcgacGTGGTGAACTACTGTTGTTATATGACCATG-3'; 共同的5'端引物为: 5'-gcgaattcTAATACGACTCACTATAG-3'. 其中3'端引物添加了限制性内切酶Sal I 的酶切位点(小写序列)、与底物结构中3'端的ACCAC序列相对应的序列(斜体序列)和与HBV上切割位点3'端一侧互补的引导序列(下划线序列); 5'端引物添加了限制性内切酶EcoR I 的酶切位点(小写序列). 以质粒pTK117为模板进行PCR反应, 反应条件为: 94℃ 10 min, 94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 1 min, 共35个循环, 最后72℃延伸10 min. 扩增产物于含溴化乙锭(0.5 mg/L)的10 g/L琼脂糖凝胶中电泳检测, 紫外透射仪下观察电泳结果. 目的基因经鉴定后用QIAquick PCR纯化试剂盒按照说明书进行纯化. 以限制性核酸内切酶Sal I 和EcoR I 双酶切M1GS RNA核酶的DNA模板和真核表达载体pEGFP-C1, 37℃水浴5 h, QIAquick PCR纯化试剂盒纯化回收, 得到具有黏性末端的目的基因和真核表达载体pEGFP-C1. 将上述目的基因和线性化的pEGFP-C1载体按4:1的摩尔比混合, 用T4 DNA Ligase 16℃过夜进行连接反应. 应用1×TSS两步法, 将连接产物转化至新鲜制备的*E.coli* JM109感受态细菌, 在含卡那霉素(浓度35 mg/L)LB平板上培养18-24 h后, 随机挑取转化成功的单个菌落接种于含卡那霉素的LB液体培养基, 应用去内毒素质粒小提试剂盒提取质粒, 将得到的靶向S区和C区的重组质粒分别

研发前沿  
M1 RNA核酶是*E.coli*核糖核酸酶P(RNase P)的RNA亚单位, 体内执行核酸内切酶活性. 研究表明把能特异识别底物分子的外源性引导序列(EGS)连接到M1 RNA上, 形成的特异性核酶M1GS RNA可在体内和体外特异性地切割靶RNA.

相关报道  
已有学者设计M1 RNA在体外及胞内切割单纯疱疹病毒(HSV-1), 人巨细胞病毒(HCMV)mRNA, 发现病毒的扩增速率及基因的表达水平明显下降. 在肿瘤治疗方面, Cobaled *et al*以M1 RNA为基础设计特异性的核酶可以抑制慢性粒细胞白血病患者畸形染色体所产生的肿瘤特异性融合基因BCR-ABL的表达.

### 创新盘点

目前HBV的基因治疗主要是应用反义核苷酸、锤头状核酶、发夹状核酶及RNA干扰技术, 还未见有应用M1 RNA抑制HBV基因表达的报道. 本文分别构建了靶向HBV S区和C区基因的M1GS RNA核酶真核表达载体, 共转染HepG2.2.15细胞, 研究其对HBV基因表达的影响.

### 应用要点

本文的研究结果表明靶向HBV C区和S区基因的M1GS RNA核酶真核表达载体共转染HepG2.2.15细胞后可以抑制HBV基因的表达, 且较单个核酶作用的抗病毒效果显著, 对进一步体内研究有指导作用, 为研究高效特异性的抗HBV治疗方法奠定了基础.

表 1 核酶对细胞增殖活性和HBsAg和HBeAg表达的影响(mean ± SD)

分组	$A_{570}$ value( $n=12$ )	HBsAg		HBeAg	
		P/N	抑制率(%)	P/N	抑制率(%)
单纯脂质体	$0.957 \pm 0.127$	$16.15 \pm 0.59$	-	$7.37 \pm 0.63$	-
pEGFP-C1	$0.933 \pm 0.093$	$15.03 \pm 0.78^a$	7.0	$7.45 \pm 0.57$	-
共转染	$0.919 \pm 0.112$	$11.49 \pm 0.47^b$	33.2	$5.31 \pm 0.69^b$	39.1

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 单纯脂质体.

命名为pEGFP-GSS和pEGFP-GSC. *Sal* I 和 *Eco* R I 双酶切重组质粒pEGFP-GSC和pEGFP-GSS以及对对照空质粒, 37℃水浴过夜, 次日各取酶切产物10 μL于10 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 在凝胶成像系统中观察电泳结果. 将重组质粒送上海生物工程技术有限公司测序, 测序引物为合成M1GS RNA的DNA模板所用的引物. 测序结果与M1 RNA的DNA模板序列对比.

**1.2.1 细胞培养和转染** HepG2.2.15细胞在37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>的条件下培养. 培养基为含G418(380 mg/L)、10 mL/L胎牛血清并加有含青霉素和链霉素50 kU/L的MEM培养液. 转染前24 h, 将HepG2.2.15细胞种入24孔板, 每孔 $2 \times 10^5$ 个细胞, 用Lipofectamine 2000脂质体转染试剂盒将pEGFP-GSS和pEGFP-GSC以1:1的比例共转染入HepG2.2.15细胞, 并设阴性对照(仅转染pEGFP-C1)及空白对照(单纯脂质体). 转染48 h后用倒置荧光显微镜观察绿色荧光, 换液, 再培养48 h后收集细胞和培养液进一步检测.

**1.2.2 MTT实验** 用胰蛋白酶将细胞消化分散为单个细胞悬液, 细胞计数后将其稀释至 $1 \times 10^8$  cells/L, 每孔加细胞悬液( $2 \times 10^4$ 个细胞)200 μL接种于96孔板. 48 h后每孔加5 g/L MTT溶液20 μL, 继续培养4 h后, 每孔加入100 μL分析纯DMSO原液, 振荡溶解后, 570 nm处比色测定. 按下式计算药物作用下的细胞存活率: 细胞存活率 = 药物处理孔吸光度值/对照孔吸光度值 × 100%.

**1.2.3 HBsAg和HBeAg的检测** 分别对转染成功的阳性细胞及空白对照进行细胞计数, 每组 $5 \times 10^5$ 细胞接种于12孔细胞培养板中继续培养, 48 h后收获细胞上清液, ELISA试剂盒检测细胞转染48 h后细胞培养上清液的HBsAg和HBeAg,  $A$ 值在 $A_{450}$ 下读取. 结果均以样品孔 $A$ 值/阴性对照孔 $A$ 平均值(P/N值)表示, 抑制率按下式计算: 抑制率 = (对照孔P/N值-实验孔P/N值)/(对照孔P/N值-2.1) × 100%, 同时取每组细胞计数, 检测结果

用细胞数量进行校正, 按 $1 \times 10^6$ 细胞数抗原分泌量进行统计分析.

**1.2.4 HBV S mRNA和C mRNA表达的检测** 转染后48 h收集细胞, TRIzol试剂提取转染的HepG2.2.15细胞中的总RNA, 以Oligo(dT)作为引物, 在AMV逆转录酶的催化下生成互补DNA, 然后进行PCR扩增S区和C区基因, S区引物P1: 5'-GCGGGGTTTTCTTGTTGA-3', P2: 5'-GGGACTCAAGATGTTGTACAG-3', 产物为585 bp; C区引物P1: 5'-GGCTTTGGGGCATGGAC-3', P2: 5'-ATACTAACATTGAGGTTCC-3', 产物为566 bp. 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 45 s, 53℃ 45 s, 72℃ 1 min, 共35个循环, 后72℃延伸10 min; 以人源性β-actin作为内参照, 引物P1: 5'-CCCAGATCATGTTTGAGACC-3', P2: 5'-TAGCTCTTCTCCAGGGAGGA-3', PCR反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 共30个循环, 后72℃延伸10 min, PCR产物在20 g/L琼脂糖凝胶上进行电泳. 经电泳及扫描后, 所有PCR产物条带经β-actin标化后由Quantity One 1-D analysis software测定.

**统计学处理** 实验数据用mean ± SD表示, 采用SPSS10.0进行方差分析,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 重组质粒的鉴定** 重组质粒pEGFP-GSS和pEGFP-GSC经*Sal* I 和 *Eco* R I 双酶切后行10 g/L琼脂糖凝胶电泳可分别观察到470 bp和4700 bp的2个条带(图1). 测序结果证实, 重组质粒pEGFP-GSS和pEGFP-GSC中M1GS RNA核酶的DNA片段插入准确无误.

**2.2 核酶对HepG2.2.15细胞增殖活性的影响** 在显微镜下观察转染后HepG2.2.15细胞形态, 与对照组比较, 无明显可见的形态差别. MTT实验结果表明, 与对照组比较, 共转染pEGFP-GSS和pEGFP-GSC后的HepG2.2.15细胞的增殖活性亦

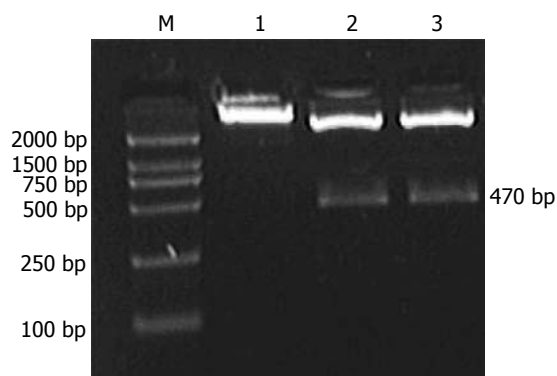


图 1 *Sal*I 和 *Eco*R I 双酶切重组质粒 pEGFP-GSS 和 pEGFP-GSC. M: DNA Marker DL2000; 1: pEGFP-C1; 2: pEGFP-GSS; 3: pEGFP-GSC.

无显著差异(表1).

**2.3 M1GS RNA核酶对HBsAg和HBeAg表达的抑制作用** 细胞转染48 h后, ELISA法检测培养液中HBsAg和HBeAg含量, 结果表明HepG2.2.15细胞中HBsAg和HBeAg的表达分别被抑制了33.2%和39.1%(表1).

**2.4 M1GS RNA核酶对HBV mRNA表达的影响** HBV S mRNA、C mRNA及内参照 $\beta$ -actin mRNA的RT-PCR扩增产物分别为585 bp、566 bp和361 bp. RT-PCR结果显示, 共转染组HBV S mRNA和C mRNA的表达均降低, 与单纯脂质体组比较分别减少了29.7%和32.5%, 而转染pEGFP-C1的细胞HBV S mRNA和C mRNA与单纯脂质体组相比无明显差别(图2).

### 3 讨论

随着生命科学的发展, 人们对疾病的认识逐渐深入到分子水平, 基因治疗已成为当前分子生物学最重要的研究领域之一. M1 RNA核酶是 *E. coli* 核糖核酸酶P(RNase P)的RNA亚单位, 在体内执行核酸内切酶活性, 切割tRNA前体(pre-tRNA)和一些小RNA分子的5'端前导序列<sup>[5]</sup>. RNase P是一类普遍存在的核糖核蛋白复合体, 在 *E. coli* 中, 其RNA被称为M1 RNA, 大小为375 bp, 蛋白称为C5蛋白<sup>[13]</sup>. 如果C5蛋白缺失, M1 RNA可作为催化剂在含高浓度二价金属离子(如 $Mg^{2+}$ )的反应体系中裂解底物<sup>[14]</sup>. RNase P对底物识别与广泛应用的锤头状或发夹状核酶不同, 其与天然底物之间的相互作用依赖于对底物结构的识别, 而不是某些特殊的序列或核苷酸. 能被M1 RNA识别的底物结构单元包括: 双链RNA区域(类似于pre-tRNA的氨酰基或T茎); 5'端前导序列中4-16个配对碱基和至少一个突

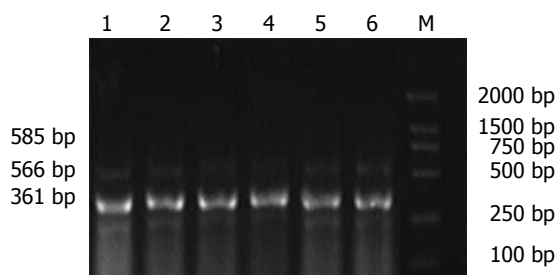


图 2 M1GS RNA核酶对HBV mRNA表达的影响. 1-3: HBV C DNA; 4-6: HBV S DNA; 1, 6: 单纯脂质体组; 2, 5: pEGFP-C1组; 3-4: 共转染组; M: DNA marker DL2000.

出碱基; 3'端未配对的-CCA序列<sup>[15]</sup>. 任何符合上述要求的RNA序列, 原则上都可作为M1 RNA的靶基因. Liu *et al*<sup>[16]</sup>将特异识别底物分子的外源性引导序列(external guide sequence, EGS)连接到M1 RNA上, 形成具有序列特异性催化活性的M1GS RNA, 研究证实, M1GS RNA核酶在体内及体外都能特异性切割靶RNA<sup>[17]</sup>. 已有学者设计了在体外及体内切割单纯疱疹病毒<sup>[7]</sup>和巨细胞病毒(HCMV)<sup>[8,18-19]</sup> mRNA的M1GS RNA核酶, 发现病毒的扩增速率及基因表达水平均明显下降. 在肿瘤治疗方面, Cobaleda *et al*<sup>[9]</sup>以M1 RNA为基础, 设计特异性核酶抑制慢性粒细胞白血病患者畸形染色体所产生的肿瘤特异性融合基因BCR-ABL的表达.

我们的前期研究表明, 靶向HBV C区基因的M1GS RNA核酶作用于HepG2.2.15细胞后, 可特异性抑制HBV C区基因的表达, 对细胞培养上清液中HBV C区基因表达产物HBeAg的抑制率达31.6%; RT-PCR结果显示, 该核酶可以有效抑制HBV C mRNA的表达, 但对HBsAg的表达及空白对照均无统计学差别. 可能因HBV基因组为长约3.2 kb的部分双链环状DNA, 在核内以共价闭合环状DNA(cccDNA)为模板, 在宿主RNA聚合酶II的作用下, 转录成3.5 kb, 2.4/2.1 kb及0.7 kb 3种不同长度的mRNA, 在胞内分别编码生成HBcAg/HBeAg和DNA多聚酶, HBsAg及HBxAg<sup>[20-22]</sup>. 靶向HBV C区基因的M1GS RNA核酶可以抑制胞质内的3.5 kb的前基因组mRNA, 进而减少了HBeAg的分泌. 但对其他mRNA无抑制效应, 故并不影响HBsAg的生成. 因此我们设计了2个分别靶向C区和S区基因的M1GS RNA核酶, 将构建的表达载体共转染HepG2.2.15细胞, 研究靶向不同位点的核酶共同作用的效果. HepG2.2.15细胞是整合HBV *ayw*型全基因组的肝癌细胞系, 能够表达各种HBV产物并能分泌

#### 名词解释

M1 RNA核酶: *E. coli*核糖核酸酶P(RNase P)的RNA亚单位, 在体内执行核酸内切酶活性, 切割tRNA前体(pre-tRNA)和一些小RNA分子的5'端前导序列.

同行评价  
本文设计合理, 实验技术先进, 所获结果有一定科学价值, 对进一步的体内研究有指导作用。

HBV颗粒, 是一种较为理想的细胞感染模型<sup>[23]</sup>。研究结果表明, S mRNA和C mRNA的表达分别减少了29.7%和32.5%, HBsAg和HBeAg的生成也分别被抑制了33.2%和39.1%。且较单个核酶作用的抗病毒效果显著, 具有“鸡尾酒效应”, 为研究高效特异性的抗HBV治疗方法奠定了基础。

#### 4 参考文献

- 1 Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S1-3
- 2 Baumert TF, Thimme R, von Weizsacker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 82-90
- 3 Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 395-403
- 4 Tillmann HL. Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 125-140
- 5 Altman S. Ribonuclease P: an enzyme with a catalytic RNA subunit. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1989; 62: 1-36
- 6 Forster AC, Altman S. External guide sequences for an RNA enzyme. *Science* 1990; 249: 783-786
- 7 Trang P, Kilani A, Kim J, Liu F. A ribozyme derived from the catalytic subunit of RNase P from *Escherichia coli* is highly effective in inhibiting replication of herpes simplex virus 1. *J Mol Biol* 2000; 301: 817-826
- 8 Trang P, Lee M, Nepomuceno E, Kim J, Zhu H, Liu F. Effective inhibition of human cytomegalovirus gene expression and replication by a ribozyme derived from the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5812-5817
- 9 Cobaleda C, Sanchez-Garcia I. In vivo inhibition by a site-specific catalytic RNA subunit of RNase P designed against the BCR-ABL oncogenic products: a novel approach for cancer treatment. *Blood* 2000; 95: 731-737
- 10 Raj SM, Liu F. Engineering of RNase P ribozyme for gene-targeting applications. *Gene* 2003; 313: 59-69
- 11 Trang P, Kim K, Liu F. Developing RNase P ribozymes for gene-targeting and antiviral therapy. *Cell Microbiol* 2004; 6: 499-508
- 12 Liu F, Altman S. Requirements for cleavage by a modified RNase P of a small model substrate. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 2690-2696
- 13 Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 1983; 35: 849-857
- 14 Hsu AW, Kilani AF, Liou K, Lee J, Liu F. Differential effects of the protein cofactor on the interactions between an RNase P ribozyme and its target mRNA substrate. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 3105-3116
- 15 Zou H, Chan K, Trang P, Liu F. General design and construction of RNase P ribozymes for gene-targeting applications. *Methods Mol Biol* 2004; 252: 385-398
- 16 Liu F, Altman S. Inhibition of viral gene expression by the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *Genes Dev* 1995; 9: 471-480
- 17 Guerrier-Takada C, Li Y, Altman S. Artificial regulation of gene expression in *Escherichia coli* by RNase P. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 11115-11119
- 18 Trang P, Kilani A, Lee J, Hsu A, Liou K, Kim J, Nassi A, Kim K, Liu F. RNase P ribozymes for the studies and treatment of human cytomegalovirus infections. *J Clin Virol* 2002; 25 Suppl 2: S63-74
- 19 Trang P, Kim K, Zhu J, Liu F. Expression of an RNase P ribozyme against the mRNA encoding human cytomegalovirus protease inhibits viral capsid protein processing and growth. *J Mol Biol* 2003; 328: 1123-1135
- 20 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129
- 21 Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 48-64
- 22 Wang GH, Seeger C. Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses. *J Virol* 1993; 67: 6507-6512
- 23 Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 1005-1009

编辑 程剑侠 电编 何基才



# Leptin mRNA表达的组织分布及在大鼠急性肠道损伤中的变化

林季, 颜光涛, 高晓宁, 廖杰, 王录焕, 郝秀华

林季, 颜光涛, 王录焕, 郝秀华, 中国人民解放军总医院生化研究室 北京市 100853

高晓宁, 中国人民解放军总医院血液内科 北京市 100853

廖杰, 中国人民解放军总医院医学实验测试中心 北京市 100853

林季, 2005年中国人民解放军总医院医学博士生, 研究实习员, 主要从事消化道创伤后内源性促修复机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30670821, 30700868

解放军总医院苗圃基金资助项目, No. 06MP83

通讯作者: 颜光涛, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院生化研究室. yan301@263.net

电话: 010-66937072 传真: 010-68176512

收稿日期: 2007-05-16 修回日期: 2007-09-30

## Tissue distribution of leptin mRNA expression and its variation in acute intestinal injury in rats

Ji Lin, Guang-Tao Yan, Xiao-Ning Gao, Jie Liao, Lu-Huan Wang, Xiu-Hua Hao

Ji Lin, Guang-Tao Yan, Lu-Huan Wang, Xiu-Hua Hao, Research Laboratory of Biochemistry, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Xiao-Ning Gao, Department of Hematology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Jie Liao, Medical and Laboratory Analysis Center, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30670821, 30700868, and the Nursery Fund of General Hospital of Chinese PLA, No. 06MP83

Correspondence to: Professor Guang-Tao Yan, Research Laboratory of Biochemistry, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Beijing 100853, China. yan301@263.net

Received: 2007-05-16 Revised: 2007-09-30

## Abstract

**AIM:** To explore the role that leptin plays in acute inflammation.

**METHODS:** Vital organ samples, including hypothalamus, lung, liver, spleen, stomach, duodenum, kidney, epididymal fat pad and testis, were collected from normal rats, and the levels of leptin mRNA expression in those samples were determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (PCR). A cecal ligation and perforation model was established in rats. The rats were divided into sham-operation

(A), intralipid injection (B), injury (C), estradiol injection (D) and insulin injection (E) groups to assess energy metabolism and neuroendocrine function. Reverse transcriptase-PCR was also used to detect leptin mRNA expression in adipose tissue, liver and lung.

**RESULTS:** Leptin mRNA expressions were confirmed in all nine vital organs examined, with the highest seen in kidney and the lowest levels seen in testis. By twelve hours after cecal ligation and perforation, compared with the level of leptin mRNA expression in the sham-operation group, that in the intralipid injection group was increased significantly in adipose tissue but decreased significantly in liver and lung; that in the injury group showed no difference in liver but was decreased significantly in adipose tissue and lung; that in the estradiol group was increased significantly in lung but decreased significantly in adipose tissue and liver; and that in the insulin group showed no difference in lung but was decreased significantly in adipose tissue and liver. The effect of intralipid injection on leptin mRNA expression was found to be a dual-direction pattern, as intralipid injection induced leptin mRNA expression in central secretory tissue (adipose tissue), but inhibited it in peripheral organs.

**CONCLUSION:** Leptin mRNA expression shows a sensitive change when intervening energy metabolism and neuroendocrine function after acute intestinal injury, which suggests that leptin may be a key protective factor promoting homeostasis.

**Key Words:** Leptin; mRNA expression; Tissue distribution; Reverse transcriptase-PCR; Cecal ligation and perforation; Rat; Homeostasis

Lin J, Yan GT, Gao XN, Liao J, Wang LH, Hao XH. Tissue distribution of leptin mRNA expression and its variation in acute intestinal injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 2995-3000

## 摘要

**目的:** 探讨leptin在急性炎症反应中的作用。

**背景资料**  
研究表明瘦素(leptin)参与能量代谢、神经-内分泌、血管新生、生殖、免疫应答等的调节,能够促进细胞损伤的修复,有助于内环境紊乱的恢复。探讨leptin表达的组织分布及在急性肠道损伤中的变化,为利用以leptin为核心的代谢、免疫及神经-内分泌网络进行损伤后干预提供了理论依据。

## 研发前沿

自从发现leptin存在于胰腺、胃、结肠、角质和内皮细胞以来,国内外尚未见leptin mRNA表达组织分布的详细报道。同时,由于leptin可能参与创伤后内环境紊乱的恢复过程,研究leptin mRNA表达在急性肠道损伤时重要脏器内的变化,成为证明这种变化是否与leptin发挥保护效应相关的一个主要环节。

**方法:** 采集正常大鼠下丘脑、肺、肝、脾、胃、十二指肠、肾、附睾脂肪垫、睾丸等重要脏器标本,以RT-PCR法检测leptin mRNA表达的组织分布;并建立大鼠盲肠结扎穿孔模型,设立假手术组(A)和脂肪乳组(B)、单纯损伤组(C)、雌二醇组(D)、胰岛素组(E)等实验组,采用RT-PCR检测脂肪、肝及肺内leptin mRNA表达的变化。

**结果:** 正常大鼠的上述9种重要脏器内均有leptin mRNA表达,肾脏内含量最高而睾丸内含量最低。大鼠盲肠结扎穿孔12 h后,与A组leptin mRNA表达水平相比,其在B组脂肪内表达显著增高而在肝、肺内表达显著降低,在C组肝内表达无显著差异而在脂肪、肺内表达显著降低,在D组肺内表达显著增高而在脂肪、肝内表达显著降低,在E组肺内表达无显著差异而在脂肪、肝内表达显著降低。脂肪乳对leptin mRNA表达的影响具有中枢分泌组织(脂肪)内诱导而外周脏器内抑制的双向模式。

**结论:** Leptin mRNA表达水平在干预急性肠道损伤后能量代谢和神经-内分泌功能时发生敏感变化,提示leptin可能作为一种核心保护因子促进内环境的稳定。

**关键词:** 瘦素; mRNA表达; 组织分布; 逆转录-PCR; 盲肠结扎穿孔; 大鼠; 内环境稳定

林季, 颜光涛, 高晓宁, 廖杰, 王录焕, 郝秀华. Leptin mRNA表达的组织分布及在大鼠急性肠道损伤中的变化. 世界华人消化杂志 2007;15(28):2995-3000

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2995.asp>

## 0 引言

瘦素(leptin)是一种由ob基因表达,含167个氨基酸,分子质量为16 kDa的活性因子,通过下丘脑内的特异受体而发挥抑制摄食、促进能量消耗的主要作用<sup>[1-3]</sup>。自1994年成功克隆leptin以来,大量事实已证明他参与能量代谢、神经-内分泌、血管新生及生殖的调控<sup>[4-6]</sup>。此外,leptin能够加速糖和脂肪的氧化以提供足量ATP代偿细胞损伤,并增强特异及非特异免疫系统功能和促进内皮细胞的增殖<sup>[7-9]</sup>,提示leptin可能参与创伤后内环境紊乱的恢复过程,但是目前国内外尚无定论,而且未见leptin mRNA表达组织分布的报道。我们假设leptin mRNA广泛表达并在急性肠道损伤时发生一定的变化,而且这种变化与其发挥保护效应相关。我们通过采集正常大鼠的重要脏器样本,以逆转录-PCR法检测leptin mRNA表达

的组织分布;并建立大鼠盲肠结扎穿孔(CLP)模型,观察损伤时leptin mRNA表达的变化,探讨干预急性肠道损伤后能量代谢和神经-内分泌功能对leptin基因表达水平的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 实验用清洁级♂SD大鼠60只,体质量250 g,由解放军总医院实验动物中心提供。β-雌二醇购自Sigma<sup>®</sup>公司;胰岛素注射剂购自Novo Nordisk<sup>®</sup>公司;AMV逆转录酶、Oligo(dT)15购自Promega<sup>®</sup>公司;脂肪乳注射液购自华瑞<sup>®</sup>制药;TRIzol, Taq DNA聚合酶及β-actin引物购自北京鼎国<sup>®</sup>公司;Leptin引物由上海生工<sup>®</sup>公司合成;其他试剂均为国产分析纯级。取10只大鼠按10 g/L戊巴比妥钠60 mg/kg ip麻醉,无菌条件下迅速取出其下丘脑、肺、肝、脾、胃、十二指肠、肾、左侧附睾体部脂肪垫(属白色脂肪组织)、睾丸等重要脏器,立即投入液氮速冻,然后转移到-80℃冻存。

**1.2 方法** 大鼠随机分成5组,每组10只。第1组设为假手术组,第2组为脂肪乳组(2 mL, ip),第3组为单纯损伤组,第4组为雌二醇组[12.5 mg/L(2 mL), ip],第5组为胰岛素组[0.5 U(2 mL), sc],雌二醇、胰岛素以生理盐水配制。实验前12 h禁食、不限水,实验时按10 g/L戊巴比妥钠60 mg/kg ip麻醉,无菌条件下开腹,分离盲肠末端以3-0号丝线结扎,再用5号针头随机穿孔2处,将盲肠放回腹腔后逐层关腹<sup>[10-11]</sup>。假手术组于分离盲肠末端时,不进行结扎、穿孔。假手术组与单纯损伤组于术后关腹时,2 mL生理盐水注射;其他3组则注射上述剂量的药物。CLP后12 h于麻醉条件下迅速取出大鼠左侧附睾体部脂肪垫、肝及肺组织,立即投入液氮速冻,然后转存于-80℃。采用TRIzol试剂提取组织样品的总RNA,操作步骤按说明书进行。提取总RNA后,以三蒸水为空白对照,测量样品260 nm处的紫外吸光度A值并计算总RNA浓度。

逆转录体系(20 μL)包括:总RNA 2.5 μg, AMV逆转录酶667 nkat, Oligo(dT)15 1 μg, 5×逆转录缓冲液4 μL, 10 mmol/L dNTPs 2 μL, RNA酶抑制剂20 U及焦碳酸二乙酯处理的水6.5 μL。将逆转录样品置于37℃水浴2 h,然后95℃水浴5 min灭活AMV酶,快速冰镇后按4℃, 10 000 g离心5 min,保存cDNA样品于-20℃。

PCR反应以β-actin的mRNA表达作为cDNA合成及PCR反应的内源性参照。Leptin和β-actin PCR体系(50 μL)包括: cDNA 4 μL, 25 μmol/L

表 1 PCR所用的引物序列及反应条件

引物名	核酸序列及PCR反应条件	产物大小	GenBank编号
leptin	上游引物: 5'-CCTGTGGCTTTGGTCCTATCGG-3' 下游引物: 5'-CTGCTCAAAGTCACCACCTCGG-3' 变性: 94 45 s, 退火: 60 45 s, 延伸: 72 60 s, 循环: 35	290 bp	RATOBESSE
$\beta$ -actin	上游引物: 5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3' 下游引物: 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3' 变性: 94 45 s, 退火: 55 45 s, 延伸: 72 45 s, 循环: 30	318 bp	BC063166

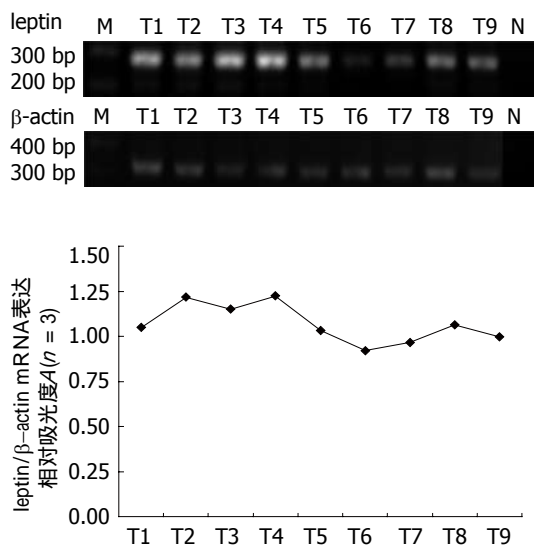


图 1 Leptin mRNA在正常 $\delta$ 大鼠重要脏器内的表达. T1-T9依次为下丘脑、胃、肺、肾、脂肪、睾丸、肝、脾、十二指肠.

上游及下游引物1  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 4  $\mu$ L, Taq酶33 nkat, 10 $\times$ PCR缓冲液(含20 mmol/L  $MgCl_2$ )5  $\mu$ L及灭菌去离子水34  $\mu$ L. PCR所用的引物序列及反应条件如表1所示. 于15 g/L琼脂糖凝胶(含0.5 mg/L溴乙吡啶)电泳检测PCR产物, 并用Gel-Pro<sup>®</sup>凝胶分析仪拍摄和分析电泳图像.

## 2 结果

**2.1 正常 $\delta$ 大鼠leptin mRNA的组织分布** 正常 $\delta$ 大鼠的下丘脑、肺、肝、脾、胃、十二指肠、肾、附睾脂肪垫、睾丸等重要脏器组织均有leptin mRNA表达, 但是表达量不同, 以肾脏内含量为最高, 而睾丸内含量最低. 该结果表明, leptin mRNA不仅仅存在于脂肪组织, 还广泛存在于机体中枢神经系统和外周重要脏器(图1).

**2.2 CLP对leptin mRNA表达的影响** 在脂肪组织中, 与损伤后假手术组相比, 脂肪乳组leptin mRNA表达显著增高( $t = 0.1384$ ,  $P < 0.001$ ), 其他3组均显著降低, 而且按雌二醇组、单纯损伤组和胰岛素组依次递减( $t = -0.0526$ ,  $-0.1292$ ,

$-0.332$ ,  $P < 0.001$ ). 在肝组织中, 与损伤后假手术组相比, 单纯损伤组leptin mRNA表达无显著差异( $t = -0.0277$ ,  $P = 0.067$ ), 其他3组均显著降低, 而且按雌二醇组、脂肪乳组和胰岛素组依次递减( $t = -0.6826$ ,  $-1.4506$ ,  $-1.9057$ ,  $P < 0.001$ ). 与脂肪乳组相比, 单纯损伤组和雌二醇组leptin mRNA表达显著增高( $t = 1.4229$ ,  $0.76792$ ,  $P < 0.001$ ), 而胰岛素组显著降低( $t = -0.4551$ ,  $P < 0.001$ ). 在肺组织中, 与损伤后假手术组相比, 胰岛素组leptin mRNA表达无显著差异( $t = 0.0363$ ,  $P = 0.125$ ), 雌二醇组显著增高( $t = 0.1549$ ,  $P < 0.001$ ), 脂肪乳组和单纯损伤组均显著降低( $t = -1.0191$ ,  $-0.2725$ , 均 $P < 0.001$ ). 与脂肪乳组相比, 其他3个药物组leptin mRNA表达均显著升高, 而且按单纯损伤组、胰岛素组和雌二醇组依次递增( $t = 0.7466$ ,  $1.0554$ ,  $1.1741$ ,  $P < 0.001$ ), 如图2.

## 3 讨论

Leptin是一种主要由哺乳动物脂肪细胞分泌的中分子活性蛋白, 不同物种间的同源性高达80%<sup>[12-13]</sup>. 由于急性炎症反应诱发机体的高代谢状态, 而leptin是调控代谢的重要因子, 因此他在炎症反应后的内环境失调中发挥特殊作用, 成为联系能量代谢、免疫调控和神经-内分泌3大功能系统的枢纽. leptin要发挥这些重要的功能, 必然要通过与其特异性受体结合. leptin受体(OB-R)属于I型细胞因子受体家族, 包含6种亚型(OB-Ra, b, c, d, e及f), 主要通过Janus激酶-酪氨酸激酶途径转导信号<sup>[14-16]</sup>. 除了皮下、心旁、肾周、肠系膜4种脂肪组织以外, 还发现OB-R存在于肝、脾、肠系膜淋巴结、小肠、肾上腺皮质、肾、主动脉等外周脏器和下丘脑、垂体、大脑皮质、小脑皮质、松果体等中枢神经组织<sup>[17-19]</sup>. 根据OB-R的广泛存在, 我们推测leptin基因也应该在各组织内有表达. 但目前国内外仅见leptin mRNA表达于胰腺、胃、结肠、角质和

### 相关报道

目前认为leptin受体包含6种亚型(OB-Ra, b, c, d, e及f), 广泛存在于脂肪、肝、脾、肠系膜淋巴结、小肠、肾上腺皮质、肾、主动脉等外周脏器和下丘脑、垂体、大脑皮质、小脑皮质、松果体等中枢神经组织, 提示leptin有对应的广泛表达. 前期研究也证实leptin在损伤后发挥迟缓而持续的保护效应.

### 创新盘点

本文研究发现leptin是一种广泛表达于机体多种重要脏器的活性蛋白, 他对于急性肠道损伤引发的能量代谢紊乱和神经-内分泌失调有敏感的应答性. 在脂肪组织和外周脏器等leptin基因表达具有双向性的模式, 提示他可能作为一种保护因子促进机体内环境的稳定.

**应用要点**  
本文探讨了leptin mRNA表达的  
组织分布及其在急性  
肠道损伤中的  
变化,为充分利用  
以leptin为核心的  
调控网络进行损伤  
后的内源性和  
外源性干预,开拓  
早期、便捷地救  
治消化系统脏器  
创伤、感染等危  
重症患者的新技  
术有积极的意义。

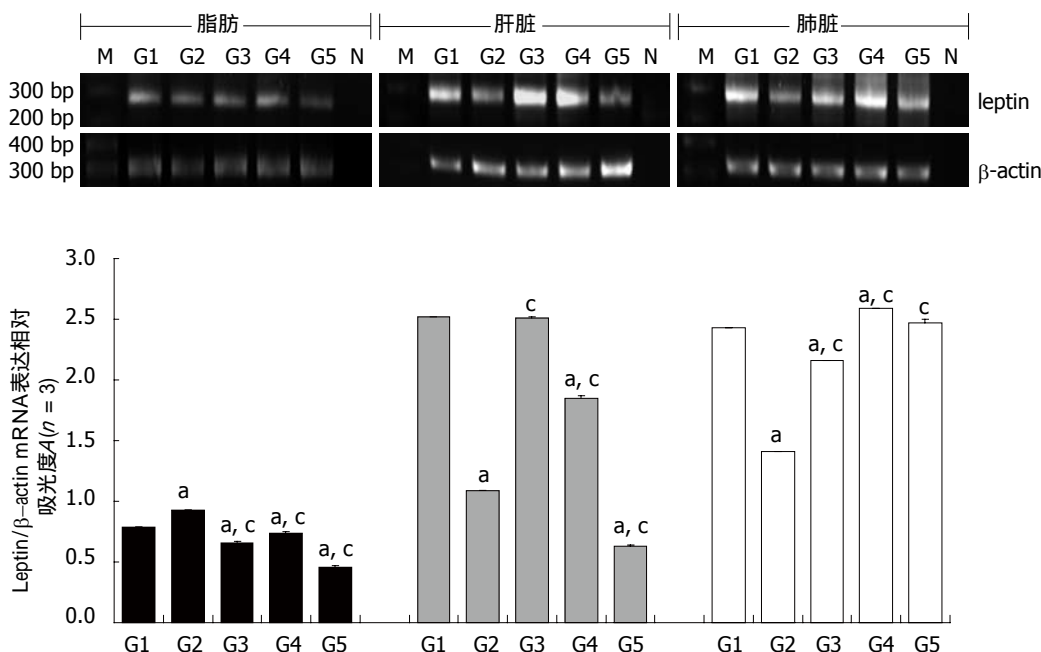


图2 大鼠盲肠结扎穿孔术后leptin mRNA表达。G1-G5依次为假手术组、脂肪乳组、单纯损伤组、雌二醇组、胰岛素组; M: Marker; N: 阴性对照。\* $P < 0.05$  vs G1;  $^{\circ}P < 0.05$  vs G2。

内皮细胞的零散报道<sup>[20-22]</sup>, 未有其详细组织分布的论述。

我们选择了中枢神经系统(下丘脑)、呼吸系统(肺)、消化系统实质器官(肝)、消化系统空腔器官(胃和十二指肠)、血液系统(脾)、泌尿系统(肾)、内分泌系统(附睾脂肪垫)和生殖系统(睾丸)等脏器系统内具有代表性的器官, 进行leptin mRNA组织分布的考察。结果发现, leptin mRNA并非只存在于脂肪细胞内, 他在上述其他8种重要脏器内均有表达, 只是表达量有所不同。Leptin mRNA在肾、胃、肺和下丘脑内表达丰度不亚于脂肪细胞, 提示leptin在应激时能通过外周脏器和中枢神经系统的协调作用来代偿其表达水平的变化, 因为肾、胃、肺是机体维持电解质、水和CO<sub>2</sub>代谢平衡的最重要脏器, 而下丘脑是神经-内分泌调控网络的高端脏器。我们前期已证实, 肠缺血/再灌注损伤后, leptin对机体发挥迟缓而持续的保护效应<sup>[1,23]</sup>。既然leptin mRNA在上述多种重要组织内有表达, 而且leptin是联系能量代谢、免疫调控和神经-内分泌3大功能系统的枢纽, 我们推测干预急性炎症反应后的能量代谢和神经-内分泌功能可能会对leptin mRNA表达产生一定的影响, 其表达水平的增高可能与改善内环境紊乱有关。CLP是一种经典的创伤、感染模型, 能够引发动物盲肠出血、坏死及大量内毒素和氧自由基进入血液循环, 同时激活单核-巨噬细胞、中性粒细胞及

交感神经系统, 导致严重的系统性炎症反应和能量代谢障碍<sup>[24-26]</sup>。我们采用脂肪乳、胰岛素及雌二醇等干预能量代谢和下丘脑-垂体轴功能的药物, 来探讨leptin在创伤炎症反应中的作用。在国内外尚属首次, 对于揭示leptin在急性肠道损伤后恢复内环境稳定中的确切作用有重要的意义。

各组leptin mRNA在脂肪、肝、肺内表达的水平不一, 其原因我们考虑有以下几点: (1)脂肪乳注射后体内脂肪酸含量升高, 增加了机体的能量储备。而leptin的主要作用是促进能量消耗, 此时能量储备的增加就会反馈诱导leptin表达水平的升高。与假手术组相比, 脂肪乳组leptin mRNA在脂肪内表达水平的显著升高, 以及在肺和肝内表达水平的显著降低, 提示脂肪乳主要通过诱导leptin的中枢分泌器官-脂肪组织来表达更多的leptin, 以代偿CLP对外周脏器leptin表达的抑制; (2)急性腹腔内感染发生后早期, 机体处于一种类似于饥饿的高代谢状态, 会通过神经-内分泌调节抑制leptin的释放<sup>[27]</sup>, 导致单纯损伤组leptin表达被抑制。与假手术组相比, 单纯损伤组leptin mRNA在脂肪和肺内显著降低, 在肝内虽无显著差异但已接近显著降低的边界( $P = 0.067$ ), 提示CLP后12 h leptin基因表达被显著抑制, 可能是损伤后高代谢状态及自由基对leptin表达的破坏所致; (3)与假手术组相比, 雌二醇组leptin mRNA在脂肪和肝内显



著降低,可能是由于外源性雌二醇反馈抑制下丘脑-垂体-性腺轴,使下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴功能也受到抑制,导致糖皮质激素刺激脂肪细胞分泌leptin的作用<sup>[4]</sup>减弱。雌二醇组leptin mRNA在肺内的显著增高,目前尚无明确机制可解释其原因,我们推测与雌二醇扩张气道平滑肌、加速肺通气而改善损伤后的肺组织酸中毒有关,因为酸中毒会抑制leptin的表达<sup>[28]</sup>;(4)与假手术组相比,胰岛素组leptin mRNA在脂肪和肝内表达显著降低,提示由于胰岛素降低血糖水平,导致机体能量储备减低,反馈抑制leptin的表达以减少能量消耗。胰岛素组leptin mRNA之所以在肺内表达无显著差异,可能是由于胰岛素刺激肺内NO释放而扩张气道平滑肌和血管内皮细胞<sup>[29]</sup>,改善损伤后肺组织酸中毒而恢复leptin mRNA的表达。

以往的研究发现,脂肪乳能减轻再灌注后静脉内皮细胞的损伤<sup>[30]</sup>和烧伤患者血浆白蛋白的消耗<sup>[31]</sup>,我们预期脂肪乳应用于CLP大鼠会增高leptin mRNA的表达。结果与预期不尽相同,脂肪乳注射后仅脂肪内leptin mRNA表达增高,外周器官(肝和肺)内的表达量均低于单纯损伤组和雌二醇组。我们认为脂肪乳对leptin mRNA的作用存在中枢分泌组织内诱导和外周脏器内抑制的双向模式,即在急性损伤应激状态下,首先诱导中枢分泌组织(脂肪)表达更多的leptin,以外分泌方式输送至各脏器;在外周脏器内,其自身表达leptin mRNA受到脂肪分泌信号增高的负反馈以及高代谢状态的双重抑制,所以脂肪乳引发的能量储备升高时无法诱导外周器官的leptin基因表达。与胰岛素组相比,脂肪乳毕竟是增高能量储备,而且肝脏又是代谢最旺盛的器官,因此脂肪乳组在肝内leptin mRNA的表达高于胰岛素组;另一方面,由于前述的胰岛素能改善损伤后肺组织酸中毒程度,因此脂肪乳组在肺内leptin mRNA的表达低于胰岛素组。

总之,leptin是一种广泛表达于机体多种重要脏器的活性蛋白,他对于急性肠道损伤引发的能量代谢紊乱和神经-内分泌失调有敏感的应答性,在脂肪组织和外周脏器内leptin基因表达模式的双向性提示他可能作为一种保护因子促进机体内部环境的稳定。若能充分利用以leptin为核心的代谢、免疫及神经-内分泌网络进行内源性和外源性的干预,对于开拓早期、便捷地救治消化系统脏器创伤、感染等危重症患者的新

技术有积极意义。

致谢:薛辉、张凯和卢荷丹老师对本研究的技术操作给予了支持。

#### 4 参考文献

- 1 Lin J, Yan GT, Hao XH, Wang LH, Zhang K, Xue H. Effect of intestinal ischemia-reperfusion injury on protein levels of leptin and orexin-A in peripheral blood and central secretory tissues. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1000-1004
- 2 Krol E, Speakman JR. Regulation of body mass and adiposity in the field vole, *Microtus agrestis*: a model of leptin resistance. *J Endocrinol* 2007; 192: 271-278
- 3 Buyukberber M, Koruk M, Savas MC, Gulsen MT, Pehlivan Y, Deveci R, Sevinc A, Gergerlioglu S. Leptin levels in the differential diagnosis between benign and malignant ascites. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 398-402
- 4 Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 2006; 393: 7-20
- 5 Rolland YM, Perry HM 3rd, Patrick P, Banks WA, Morley JE. Leptin and adiponectin levels in middle-aged postmenopausal women: associations with lifestyle habits, hormones, and inflammatory markers--a cross-sectional study. *Metabolism* 2006; 55: 1630-1636
- 6 Hausman GJ, Richardson RL. Adipose tissue angiogenesis. *J Anim Sci* 2004; 82: 925-934
- 7 Waelput W, Brouckaert P, Broekaert D, Tavernier J. A role for leptin in the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and in immune response, an update. *Curr Med Chem* 2006; 13: 465-475
- 8 De Rosa V, Procaccini C, Cali G, Pirozzi G, Fontana S, Zappacosta S, La Cava A, Matarese G. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. *Immunity* 2007; 26: 241-255
- 9 Rahmouni K, Haynes WG. Endothelial effects of leptin: implications in health and diseases. *Curr Diab Rep* 2005; 5: 260-266
- 10 Madorin WS, Rui T, Sugimoto N, Handa O, Cepinskas G, Kvietys PR. Cardiac myocytes activated by septic plasma promote neutrophil transendothelial migration: role of platelet-activating factor and the chemokines LIX and KC. *Circ Res* 2004; 94: 944-951
- 11 Qin HL, Shen TY, Gao ZG, Fan XB, Hang XM, Jiang YQ, Zhang HZ. Effect of lactobacillus on the gut microflora and barrier function of the rats with abdominal infection. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2591-2596
- 12 Lin J, Yan GT, Xue H, Hao XH, Zhang K, Wang LH. Leptin protects vital organ functions after sepsis through recovering tissue myeloperoxidase activity: an anti-inflammatory role resonating with indomethacin. *Peptides* 2007; 28: 1553-1560
- 13 Harvey J. Leptin: a diverse regulator of neuronal function. *J Neurochem* 2007; 100: 307-313
- 14 Myers MG Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59: 287-304
- 15 Munzberg H, Bjornholm M, Bates SH, Myers MG Jr. Leptin receptor action and mechanisms of leptin resistance. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 642-652
- 16 Stefanou N, Satra M, Papanikolaou V, Kalala F,

#### 名词解释

瘦素(leptin): 也称为消脂素,是一种由ob基因表达的16 kDa蛋白激素,分为脂肪型和血清型。他通过与特异性受体结合,活化Janus激酶/信号传导及转录活化子、丝裂原活化的蛋白激酶和磷脂酰肌醇-3-激酶通路等主要信号途径,参与能量代谢、体质量平衡、神经-内分泌、创伤修复等多种功能的调控。

同行评价  
本文内容新颖, 设计合理, 讨论客观. 对基础研究和临床研究有一定的参考意义.

- Gatselis N, Germenis A, Dalekos GN, Tsezou A. Leptin receptor isoforms mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic viral hepatitis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006; 231: 1653-1663
- 17 Chelikani PK, Glimm DR, Kennelly JJ. Short communication: Tissue distribution of leptin and leptin receptor mRNA in the bovine. *J Dairy Sci* 2003; 86: 2369-2372
- 18 Gallardo N, Arribas C, Villar M, Ros M, Carrascosa JM, Martinez C, Andres A. ObRa and ObRe are differentially expressed in adipose tissue in aged food-restricted rats: effects on circulating soluble leptin receptor levels. *Endocrinology* 2005; 146: 4934-4942
- 19 Sayed-Ahmed A, Kulcsar M, Rudas P, Bartha T. Expression and localisation of leptin and leptin receptor in the mammary gland of the dry and lactating non-pregnant cow. *Acta Vet Hung* 2004; 52: 97-111
- 20 Buyse M, Aparicio T, Guilmeau S, Goiot H, Sobhani I, Bado A. Paracrine actions of the stomach-derived leptin. *Med Sci (Paris)* 2004; 20: 183-188
- 21 Sitaraman S, Liu X, Charrier L, Gu LH, Ziegler TR, Gewirtz A, Merlin D. Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD. *FASEB J* 2004; 18: 696-698
- 22 Murad A, Nath AK, Cha ST, Demir E, Flores-Riveros J, Sierra-Honigsmann MR. Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB J* 2003; 17: 1895-1897
- 23 Lin J, Yan GT, Wang LH, Hao XH, Zhang K, Xue H. Leptin fluctuates in intestinal ischemia-reperfusion injury as inflammatory cytokine. *Peptides* 2004; 25: 2187-2193
- 24 Shen TY, Qin HL, Gao ZG, Fan XB, Hang XM, Jiang YQ. Influences of enteral nutrition combined with probiotics on gut microflora and barrier function of rats with abdominal infection. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4352-4358
- 25 Song XM, Li JG, Wang YL, Zhou Q, Du ZH, Jia BH, Ke JJ. Effects of ketamine on proinflammatory cytokines and nuclear factor kappaB in polymicrobial sepsis rats. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7350-7354
- 26 Shang HF, Hsu CS, Yeh CL, Pai MH, Yeh SL. Effects of arginine supplementation on splenocyte cytokine mRNA expression in rats with gut-derived sepsis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7091-7096
- 27 Faggioni R, Moser A, Feingold KR, Grunfeld C. Reduced leptin levels in starvation increase susceptibility to endotoxic shock. *Am J Pathol* 2000; 156: 1781-1787
- 28 Teta D, Bevington A, Brown J, Pawluczyk I, Harris K, Walls J. Acidosis downregulates leptin production from cultured adipocytes through a glucose transport-dependent post-transcriptional mechanism. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 2248-2254
- 29 Boulbou M, Gourgoulis K, Molyvdas PA. Insulin effect on lung diffusion: NO pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 398; author reply 398-399
- 30 Fujiwara T, Kawarasaki H, Fonkalsrud EW. Reduction of postinfusion venous endothelial injury with intralipid. *Surg Gynecol Obstet* 1984; 158: 57-65
- 31 Rong XZ, Zhang T, Li QH, Yang RH, Hua R, Huang XH. Effect of intralipid for ameliorating protein loss in severe burned patients. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2006; 26: 500-501

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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

• 消息 •

## 世界华人消化杂志的同行评价

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

# 多发性胃肠间质瘤的克隆性及其临床病理

巩丽, 张伟, 李艳红, 王旭霞, 朱少君, 韩秀娟, 苏勤

巩丽, 张伟, 朱少君, 韩秀娟, 苏勤, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科 陕西省西安市 710038  
李艳红, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院妇产科 陕西省西安市 710038  
王旭霞, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院消化内科 陕西省西安市 710038  
巩丽, 主治医师, 硕士, 主要从事临床病理诊断及肿瘤分子病理学研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30171052  
通讯作者: 张伟, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科. zhwyh@fmmu.edu.cn  
电话: 029-84777467  
收稿日期: 2007-05-11 修回日期: 2007-09-27

## Clonality status and clinicopathological features of multiple gastrointestinal stromal tumors

Li Gong, Wei Zhang, Yan-Hong Li, Xu-Xia Wang, Shao-Jun Zhu, Xiu-Juan Han, Qin Su

Li Gong, Wei Zhang, Shao-Jun Zhu, Xiu-Juan Han, Qin Su, Department of Pathology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Yan-Hong Li, Department of Gynecology and Obstetrics, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Xu-Xia Wang, Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30171052

Correspondence to: Dr. Wei Zhang, Department of Pathology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China. zhwyh@fmmu.edu.cn

Received: 2007-05-11 Revised: 2007-09-27

## Abstract

**AIM:** To elucidate the clonality status of multiple gastrointestinal stromal tumors (GISTs) and the relationships among them.

**METHODS:** Fifteen different tumors were examined by histopathology, immunohistochemistry and clonality assays based on X-chromosomal inactivation mosaicism in female somatic tissues and microdissection. Genomic DNA was isolated from the lesions and the surrounding fibrous connective tissue as controls, pretreated with the methylation-sensitive restriction enzyme *Hpa*

or *Hha*, and amplified via nested polymerase chain reaction (PCR) using primer pairs specific for the genes encoding phosphoglycerate kinase (PGK) and androgen receptor (AR). A single nucleotide polymorphism (SNP) was identified at the PGK locus by incubation with *Bst* and agarose gel electrophoresis, and a CAG repeat length polymorphism was revealed at the AR locus on denaturing polyacrylamide gels, and visualized by silver staining.

**RESULTS:** Microscopically, each sample showed typical histological characteristics. Lesions were composed of spindle cells with abundant cytoplasm, arranged in cords, knot and whirlpool patterns. The nuclei were staff-like or fusiform. Mitosis was widely observed. The tumor tissues showed positive reactions for CD117 and CD34, but not for desmin, S-100, SM-actin and NF. The clonality assays demonstrated polymorphisms at PGK and AR loci, and these were seen on gels containing the PGK and AR PCR products. DNA samples of tissue analyzed without *Hpa* digestion showed two groups of bands, with equal intensity. When the DNA samples of the lesion tissue were digested with *Hpa* or *Hha*, the lower bands exhibited obviously reduced intensity or disappeared. Monoclonality was demonstrated for the lesion, suggesting that they were neoplastic lesions. However, the intensities of the two bands were equal for the surrounding fibrous connective tissue treated with or without *Hpa* or *Hha*.

**CONCLUSION:** Gastrointestinal stromal tumors are monoclonal as well as most of tumors, suggesting that they originate from a single cell.

**Key Words:** Gastrointestinal stromal tumors; Multiple; Monoclonality

Gong L, Zhang W, Li YH, Wang XX, Zhu SJ, Han XJ, Su Q. Clonality status and clinicopathological features of multiple gastrointestinal stromal tumors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 3001-3005

## 摘要

**目的:** 探讨多发性胃肠间质瘤的克隆性及其

## 背景资料

多数肿瘤由单克隆细胞组成, 而正常组织和反应性增生的病变是多克隆的, 利用克隆性分析方法探讨具有同一组织学特征并且同时发生的不同结节性病变的克隆构成, 以区别其是否为肿瘤和同一起源。这项技术不但对于阐明某些未知病变的性质有重要价值, 而且对于探讨多发性肿瘤的起源、明确他们之间的关系具有重要的意义。

研发前沿  
随着分子生物学和免疫组化技术的不断发展,对GIST的认识日渐深入,并且有了一些显著的进展,但关于胃肠外多发性GISTs克隆性的研究却未见报道,本文就发生于一位女性患者的胃肠外多发性GISTs的特殊病例,探讨其克隆性以及不同瘤体之间的相关性。

## 不同瘤体之间的关系.

方法: 15个大小不同的瘤体均经中性甲醛固定,石蜡包埋,HE染色和免疫组织化学染色观察确诊后,应用显微切割技术分离病变及病变周围纤维结缔组织,提取基因组DNA,经甲基化敏感的*Hpa* 或*Hha* 消化,巢式聚合酶链式反应(PCR)扩增磷酸甘油酸激酶(PGK)和雄激素受体(AR)基因. 通过*Bst* 消化和琼脂糖电泳显示PGK基因单核苷酸多态性;应用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示AR基因CAG重复序列长度多态性.

结果: 光镜下瘤细胞主要为梭形,呈束状、编织状或旋涡状排列;胞质丰富,嗜酸性;细胞核杆状或长梭形. 免疫组化标记瘤细胞表达CD117和CD34强阳性. 克隆性分析结果显示,所有分析的组织的PGK和AR位点的凝胶电泳图上均表现为两条带,具有多态性. 其中15个肿瘤组织酶切后下带均消失,只保留上带,显示出X染色体失活嵌合性丢失,证明为肿瘤性病变. 而周围纤维结缔组织在酶切前后两条带密度无明显改变.

结论: 胃肠间质瘤属于单克隆性,多发性胃肠间质瘤起源相同,即起源于同一个细胞.

关键词: 胃肠间质瘤; 多发性; 单克隆性

巩丽, 张伟, 李艳红, 王旭霞, 朱少君, 韩秀娟, 苏勤. 多发性胃肠间质瘤的克隆性及其临床病理. 世界华人消化杂志 2007;15(28):3001-3005

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3001.asp>

## 0 引言

胃肠间质瘤(gastrointestinal stromal tumors, GISTs)是胃肠道最常见的间叶性肿瘤,起源于表达c-kit(CD117)的Cajal间质细胞<sup>[1]</sup>. GISTs通常单个发生,但近年来,神经纤维瘤病I型(NF-1)患者发生GISTs有增长的趋势. NF-1又称为多发性神经纤维瘤病,是最常见的人单个基因紊乱引起的疾病之一,可累及全世界范围内100万人和多种组织,如皮肤、神经组织、骨和软组织<sup>[2]</sup>. 在NF-1的GISTs临床病理学特征不同于单发的GISTs病例;其中大多数病例都发生于小肠,并且c-kit基因的突变或血小板衍生的生长因子受体A(PDGFR $\alpha$ )是很罕见的<sup>[3-5]</sup>. GISTs只有一部分发生于胃肠道,其中大部分来自于胃(39%),小肠(32%)和大肠(15%)<sup>[6]</sup>. 极少部分见于十二指肠甚至腹腔内的网膜、肠系膜. 近年来,随着分

子生物学和免疫组化技术的不断发展,对GISTs的认识日渐深入,并且有了一些显著的进展. 但关于胃肠外多发性GISTs克隆性的研究却未见报道. 我们就发生于一位女性患者的胃肠外多发性GISTs的特殊病例,探讨其克隆性以及不同瘤体之间的相关性.

## 1 材料和方法

1.1 材料 患者,女,34岁,间断性腹痛7 d. 查体:左上腹及左下腹可触及一直径分别约10 cm和7 cm的肿块, B超和CT均提示子宫体、脾脏、子宫与膀胱间、胃胰皱襞间、肝脏右叶、腹腔壁腹膜等处多个囊实性占位. 血AFP<10  $\mu$ g/L, CEA<7.0  $\mu$ g/L, CA125<10  $\mu$ g/L, 均在正常范围. 手术摘除所有可见肿瘤约15个,并全部送病检.

### 1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 应用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)试剂盒(KIT9730, 福州迈新生物技术开发有限公司),按厂家说明书进行. 所用第一抗体包括针对CD34、结蛋白(Desmin)、神经特异性烯醇化酶(NSE)、神经纤维(NF)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的鼠抗人mAb和CD117、S-100蛋白、平滑肌肌动蛋白(SM-actin)及HMB45的兔抗人多克隆抗体以及波形蛋白(vimentin)的鼠抗猪mAb. 以上试剂均购自迈新公司.

1.2.2 显微切割和DNA提取 所有标本石蜡包埋后制备10  $\mu$ m切片8张,经HE染色后,用100%甘油覆盖组织,在倒置光显微镜4倍物镜下用4号半注射器针头将病变组织剔出,收集到装有无水乙醇的1.5 mL Eppendorf管内. 同时分离相同面积的病变旁纤维结缔组织,作为阴性对照. 经3次无水乙醇洗涤后,室温放置,待组织干燥后,应用QIAamp DNA提取试剂盒(Qiagen GmbH, Germany)按照说明书提取基因组DNA.

1.2.3 克隆性检测PGK和AR位点 基于女性体细胞组织的X染色体失活嵌合性,即所有女性体细胞的2条X染色体中的1条在胚胎发育早期必须通过永久甲基化而随机灭活,另一条保持遗传活性<sup>[7]</sup>. PGK基因多态性表现为在甲基化位点下游有一个可以被*Bst* XI识别的单核苷酸多态性位点,可经琼脂糖凝胶电泳显示<sup>[8]</sup>. AR基因多态性表现为其第一外显子的CAG串联重复序列(short-tandem repeat, STR)的长度不同,即(CAG)<sub>n</sub>的n值有差别(11-31),通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示<sup>[9]</sup>. 具有多态性位点的女性个体中正常





图1 大体标本20 cm × 16.5 cm × 13 cm, 网膜上可见大小不等多个结节样肿物, 部分有包膜。

和多克隆增生的组织显示两条带, 而肿瘤性病变更仅显示一条带或以一条带为主<sup>[10]</sup>。克隆性检测参照以前的方法进行<sup>[11-12]</sup>。PGK位点所用序列如下: PGK1A, 5'-CTG TTC CTG CCC GCG CGG TGT TCC GCA TTC-3'; PGK1B, 5'-ACG CCT GTT ACG TAA GCT CTG CAG GCC TCC-3'; PGK2A, 5'-AGC TGG ACG TTA AAG GGA AGC GGG TCG TTA-3'; PGK2B, 5'-TAC TCC TGA AGT TAA ATC AAC ATC CTC TTG-3'。DNA样品经*Hpa* II 消化3 h后, 巢式PCR扩增。第1轮反应含有引物对PGK1A/PGK1B, 97℃ 7 min预变性, 94℃变性40 s, 58℃淬火50 s, 72℃延长1 min, 共35个循环, 72℃延长15 min。反应产物1:20稀释后, 取5 μL加入第2轮反应体系, 其中含有引物对PGK2A/PGK2B, 除淬火温度为56℃外, 余条件与第1轮相同。第2轮反应产物再经*Bst* XI酶48℃消化8-10 h后, 20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色显示结果。AR位点所用序列如下: AR1A, 5'-GAC GAG CTT TCC AGA ATC TG-3'; AR1B, 5'-CAT GGG CTT GGG GAG A-3'; AR2A, 5'-TCC AGA ATC TGT TCC AGA GC-3'; AR2B, 5'-TGG GGA GAA CCA TCC TCA CC-3'。DNA样品在37℃水浴锅内经*Hha* I 消化3 h后, 62℃灭活10 min, 巢式PCR扩增。第1轮反应和第2轮反应的引物对分别为AR1A/AR1B和AR2A/AR2B, 淬火温度均为56℃, 25个循环。第1轮反应产物1:100稀释后, 取1 μL加入第2轮反应, 余反应参数同PGK位点的扩增反应。以上步骤的每一轮PCR都设定阳性对照和水作为阴性对照。琼脂糖凝胶(20 g/L)电泳评价AR基因扩增效果。然后将4 μL产物和等体积的上样缓冲液混匀后, 加到厚度为0.8 mm的变性聚丙烯酰胺(100 g/L, 含尿素8 mol/L), 应用miniVE电泳系统(Amersham-Pharmacia Biotech, USA)120 V泳动4 h, 按以前

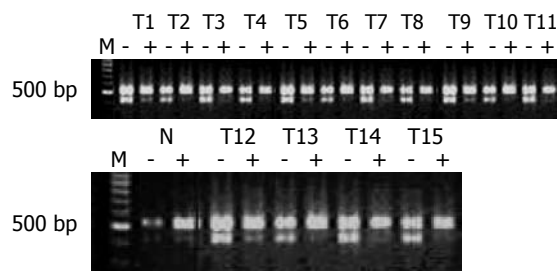


图2 PGK位点15个不同瘤组织(T1-T15)酶切后, 下带完全消失, 只保留上带。-: *Hpa* II 酶切前; +: *Hpa* II 酶切后; M: DNA标记物。

描述的方法<sup>[10]</sup>进行银染。电泳结果观察分别用UVP凝胶分析系统(UVP, Cambridge, UK)和光学照相记录数据, 用相应软件(LabWorks™, UVP)比较*Hpa* II 或*Hha* I 消化前后一对等位基因扩增产物的强度差异, 其中1条带可比强度减弱达50%以上时才被认为有意义, 即X染色体失活嵌合性丢失<sup>[12]</sup>。

## 2 结果

**2.1 病理学观察** 送检肠系膜及大小不等肿物组织一堆, 总体积20 cm × 16.5 cm × 13 cm, 其中可见肿物约15个, 最大体积10 cm × 8.5 cm × 7 cm, 最小体积2.8 cm × 2.5 cm × 2 cm。大部分肿瘤包膜完整, 切面灰黄, 质中, 局部有出血(图1)。光镜下瘤细胞主要为梭形, 呈束状、编织状或漩涡状排列; 胞质丰富, 嗜酸性; 细胞核杆状或长梭形, 核分裂像易见。免疫组化标记瘤细胞表达CD117, CD34, S-100, GFAP和vimentin, 余标记物CD30, CD20, CD45RO, CK, EMA, HMB-45, NF, desmin, SM-actin和SC-actin均为阴性。

**2.2 克隆性分析** 所有检测组织在PGK和AR位点的凝胶电泳图上均表现为2条带, 有多态性。其中15个肿瘤组织酶切后下带均消失, 只保留上带, 均显示出X染色体失活嵌合性丢失, 证明为肿瘤性病变更。而周围纤维结缔组织在酶切前后两条带密度无明显改变(图2-3)。这表明, 所有肿瘤组织均为单克隆性病变更, 并且起源于同一个细胞。

## 3 讨论

胃肠间质瘤是一种发生于消化道少见肿瘤。Mazur *et al*<sup>[13]</sup>1983年首先提出, 他是指一类既无雪旺氏细胞免疫组化特点又无平滑肌细胞超微结构的胃肠道非上皮细胞性肿瘤。以往由于病理技术的限制, 以及胃肠道许多梭形细胞肿瘤

**创新盘点**  
本文在国内率先运用女性体细胞中PGK位点和AR位点多态性的克隆性分析方法, 探讨多发性胃肠间质瘤的克隆性及其不同瘤体之间的关系, 阐明了他们的本质及其相互关系。

## 应用要点

本文探讨多发性胃肠间质瘤的克隆性及其不同瘤体之间的关系,以阐明其本质,提供与多发性神经纤维瘤病鉴别的一种可靠手段,并为进一步阐明多发性胃肠间质瘤的病理发生机制和治疗提供帮助。

中残存有平滑肌或神经束,而认为他是一种平滑肌源性或神经源性肿瘤,并归类于平滑肌瘤,平滑肌瘤细胞瘤或平滑肌肉瘤。现认为其起源于控制胃肠蠕动的Cajal间质细胞,有着特殊的免疫表型及组织学特点,具有向平滑肌,神经分化或不定向分化的多向分化特征,是一种具有潜在恶性潜能的胃肠道肿瘤。国外文献报道每年发病约为10-20/100万,多发生在40岁以上,儿童罕见,男女之比为3:1<sup>[6]</sup>。且GISTs只有一部分发生于胃肠道,其中大部分来自于胃(39%),小肠(32%)和大肠(15%),极少数发生于胃肠外。

GISTs通常单个发生,且大多数都发生在胃,其次是小肠,大肠,食管,肛门,胆道和肠外软组织罕见。然而,在一些家族性疾病中可多灶性发生,如I型神经纤维瘤病,并且认为与KIT或血小板衍生的生长因子受体A(PDGFR)种系的突变有关<sup>[14-17]</sup>。由于这些患者的肿瘤常位于小肠,因此推论可能与Cajal间质细胞的增生有关,并有相关的临床表现,如皮肤的色素沉着和肥大细胞的紊乱。GISTs的诊断主要依赖于组织病理学和免疫组化表型,其中最主要的免疫组化特点就是肿瘤细胞CD117和CD34染色阳性。根据文献报道,大约90%-95%的GISTs表达CD117,60%-70%的GISTs表达CD34,30%-40%的GISTs表达SM-actin,而只有5%的GISTs表达S-100蛋白。当然,vimentin总是阳性的。通过这些免疫组化特点,即可与其他间叶性肿瘤,如雪旺氏细胞瘤或平滑肌瘤相鉴别。我们对此例也进行了详细的组织病理学观察和免疫组织化学染色,除了具有典型的形态学特点外,其肿瘤细胞还强表达CD117和CD34,多发性GISTs的诊断应该不容置疑,但根据文献报道,多发性GISTs一般多见于I型神经纤维瘤病患者。为了进一步明确之间的相关性,我们对这些大小不等的瘤体分别进行了克隆性检测。

克隆性增生是多数肿瘤性病变的特征<sup>[18]</sup>,通过克隆性分析技术,即可判断一个病变的性质。PGK和AR位点的克隆性检测是基于女性体细胞组织的X染色体失活嵌合性,即所有女性体细胞的2条X染色体中的一条在胚胎发育早期必须通过永久甲基化而随机灭活,另一条保持遗传活性<sup>[7]</sup>。PGK基因多态性表现为在甲基化位点下游有一个可以被BstXI识别的单核苷酸多态性位点,酶切后可经琼脂糖凝胶电泳显示<sup>[8]</sup>。AR基因多态性表现为其第一外显子的CAG短串联重复

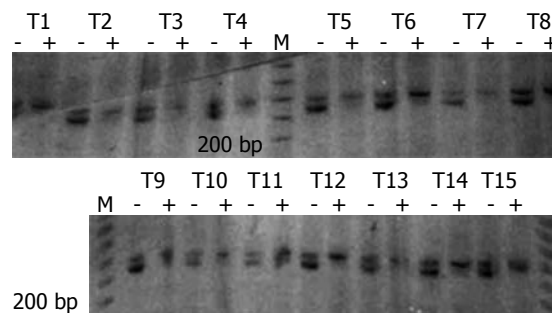


图3 AR位点15个不同瘤组织(T1-T15)酶切后,下带完全消失,只保留上带。 -: *HhaI* 酶切前; +: *HhaI* 酶切后; M: DNA 标记物。

序列(short-tandem repeat, STR)的长度不同,即重复次数有差别( $n = 11-31$ ),可通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示<sup>[9]</sup>。具有多态性位点的女性个体中正常组织以及反应性增生的组织都属于多克隆性细胞构成,显示两条带,而肿瘤性(单克隆)病变仅显示一条带或以一条带为主<sup>[10]</sup>。

GISTs是近年提出的一种间叶性肿瘤,关于其克隆起源,文献上未见报道。大多数肿瘤是单克隆性增生,只有一小部分肿瘤是多克隆性增生。这一点已得到公认。那么,GISTs是怎样的呢?多发性GISTs又是怎样的呢?他们之间存在什么样的关系?他们与NF-1之间又是什么样的关系呢?这一系列问题都值得进一步探讨。本实验结果证明,GISTs属于单克隆性,而大小不等的15个肿瘤酶切后均表现为同一条X染色体失活的嵌合性丢失,为同一起源,并且可能是由于侵袭性生长所形成的。而多发性神经纤维瘤病不同瘤体之间是各自独立的。Wang *et al*<sup>[19]</sup>曾分析了28例共82个子宫平滑肌瘤,证实所有瘤结节均为单克隆起源。同时对1例高分化平滑肌肉瘤的7个看似独立的瘤结节进行了检测,结果均显示相同的酶切带型,证明他们起源于同一个细胞,属于肿瘤的子宫内侵袭。而有4例仅有2个结节的多发性平滑肌瘤却显示不同的失活等位基因,他们之间完全独立;另有一部分多发性平滑肌瘤,部分酶切后显示相同的带型,而其他的则表现为另一条带型,并由此认为,多发性子宫平滑肌瘤的各瘤结节的关系,并不像以前的作者所认为的那么简单,可能包括完全独立,局部侵袭和二者的混合型3种类型。由此我们推论,此例多发性GISTs可能是肿瘤广泛侵袭形成的,至于所有的多发性GISTs是否都像上述结果描述的那样,还需要对更多的病例进行进一步研究证实。

#### 4 参考文献

- 1 Fletcher CD, Berman JJ, Corless C, Gorstein F, Lasota J, Longley BJ, Miettinen M, O'Leary TJ, Remotti H, Rubin BP, Shmookler B, Sobin LH, Weiss SW. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: A consensus approach. *Hum Pathol* 2002; 33: 459-465
- 2 Tsukuda K, Ikeda E, Takagi S, Miyake T, Muraoka T, Watanabe K, Hirai R, Moriyama S, Nawa S, Kunitomo T, Tsuji H. Multiple gastrointestinal stromal tumors in neurofibromatosis type 1 treated with laparoscopic surgery. *Acta Med Okayama* 2007; 61: 47-50
- 3 Miettinen M, Fetsch JF, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. *Am J Surg Pathol* 2006; 30: 90-96
- 4 Takazawa Y, Sakurai S, Sakuma Y, Ikeda T, Yamaguchi J, Hashizume Y, Yokoyama S, Motegi A, Fukayama M. Gastrointestinal stromal tumors of neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease). *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 755-763
- 5 Kinoshita K, Hirota S, Isozaki K, Ohashi A, Nishida T, Kitamura Y, Shinomura Y, Matsuzawa Y. Absence of c-kit gene mutations in gastrointestinal stromal tumours from neurofibromatosis type 1 patients. *J Pathol* 2004; 202: 80-85
- 6 Resorlu B, Baltaci S, Resorlu M, Kankaya D, Savas B. Coexistence of papillary renal cell carcinoma and gastrointestinal stromal tumor in a case. *Turk J Gastroenterol* 2007; 18: 47-49
- 7 Lyon MF. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1972; 47: 1-35
- 8 Gilliland DG, Blanchard KL, Levy J, Perrin S, Bunn HF. Clonality in myeloproliferative disorders: analysis by means of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 6848-6852
- 9 Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1229-1239
- 10 苏勤, 刘茜, 王淑芳. 基于X染色体基因多态性的克隆性分析技术及其应用. *中华病理学杂志* 2002; 31: 162-164
- 11 刁小莉, 苏勤, 王淑芳, 冯英明, 刘节. 非放标AR基因多态性分析探讨子宫平滑肌瘤的克隆性. *第四军医大学学报* 2002; 23: 1969-1973
- 12 Wang SF, Liu Q, Zhang W, Liu J, Su Q. Clonality of uterine leiomyomas, an assay using X chromosome polymorphism at the phosphoglycerate kinase locus. *Di-Si Junyi Daxue Xuebao* 2001; 22: 1576-1582
- 13 Mazur MT, Clark HB. Gastric stromal tumors. Reappraisal of histogenesis. *Am J Surg Pathol* 1983; 7: 507-519
- 14 Beghini A, Tibiletti MG, Roversi G, Chiaravalli AM, Serio G, Capella C, Larizza L. Germline mutation in the juxtamembrane domain of the kit gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa. *Cancer* 2001; 92: 657-662
- 15 Hirota S, Okazaki T, Kitamura Y, O'Brien P, Kapusta L, Dardick I. Cause of familial and multiple gastrointestinal autonomic nerve tumors with hyperplasia of interstitial cells of Cajal is germline mutation of the c-kit gene. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 326-327
- 16 Hirota S, Nishida T, Isozaki K, Taniguchi M, Nishikawa K, Ohashi A, Takabayashi A, Obayashi T, Okuno T, Kinoshita K, Chen H, Shinomura Y, Kitamura Y. Familial gastrointestinal stromal tumors associated with dysphagia and novel type germline mutation of KIT gene. *Gastroenterology* 2002; 122: 1493-1499
- 17 Isozaki K, Terris B, Belghiti J, Schiffmann S, Hirota S, Vanderwinden JM. Germline-activating mutation in the kinase domain of KIT gene in familial gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000; 157: 1581-1585
- 18 苏勤. 人肝细胞癌的癌前病变. *诊断病理学杂志* 2003; 10: 112-115
- 19 Wang S, Su Q, Zhu S, Liu J, Hu L, Li D. Clonality of multiple uterine leiomyomas. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 2002; 31: 107-111

同行评价  
本文内容新颖, 语言流畅, 图片清晰, 有一定的科学性和可读性.

编辑 何燕 电编 何基才

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

• 消息 •

## 中国学术期刊综合引证报告(2006)

**本刊讯** 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2005年从6182种统计刊源析出的214万条中国期刊引文数据库及CNKI“中国期刊网”中心网站2005-01/12全文下载记录(1.5亿篇次)的大样本数据统计分析得到: 世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床科学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2471, 影响因子为0.661, 5年影响因子为0.644, 即年指标为0.079, 他引总引比为0.73, 被引期刊数为491, 被引半衰期为4.6, 2005载文量为768, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为0.6. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].

# 中药辨证治疗中重度慢性乙肝临床疗效对照分析

何义华, 潘志恒, 李林, 关卫兵, 王拥泽, 李永伟, 杨跃武

**背景资料**  
中医药在我国防治肝病中起到重要作用, 众多的研究表明, 中医药具有抗病毒、调节免疫、消除肝脏炎症、改善临床症状以及防治肝纤维化等综合作用。

何义华, 潘志恒, 李林, 关卫兵, 王拥泽, 李永伟, 杨跃武, 中山大学第三附属医院中医科 广东省广州市 510630  
何义华, 1995年江西省中医学院本科, 2006年中山大学硕士研究生, 主治医师, 主要从事消化系统疾病的临床研究。  
通讯作者: 潘志恒, 510630, 广东省广州市, 中山大学第三附属医院中医科. stevenp28@21cn.com  
电话: 020-85516867-3028  
收稿日期: 2007-07-17 修回日期: 2007-09-28

## Therapeutic-effect analysis of chronic hepatitis B treated by traditional Chinese medicine based on differentiation of symptoms and signs

Yi-Hua He, Zhi-Heng Pan, Lin Li, Wei-Bing Guan, Yong-Ze Wang, Yong-Wei Li, Yue-Wu Yang

Yi-Hua He, Zhi-Heng Pan, Lin Li, Wei-Bing Guan, Yong-Ze Wang, Yong-Wei Li, Yue-Wu Yang, Department of Traditional Chinese Medicine, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Correspondence to: Zhi-Heng Pan, Department of Traditional Chinese Medicine, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China. stevenp28@21cn.com  
Received: 2007-07-17 Revised: 2007-09-28

## Abstract

**AIM:** To observe and evaluate the differences in therapeutic effects between traditional Chinese medicine (TCM) and conventional practice on treating chronic hepatitis B.

**METHODS:** Eighty nine hospitalized patients with CHB in the department of TCM made up the study group; the same number of randomly selected hospitalized patients in the department of infectious diseases made up the control group. Liver functional indexes (ALT, AST, ALB, A/G, TBIL, GGT, CHE), blood coagulation indexes (PT, PTA), liver fibrosis indexes (HA, PCIII, IV-C, LN) and ultrasonography indexes (the diameter of main portal vein, the diameter of spleen vein, spleen thickness, spleen length, gallbladder wall thickness) were measured before and after treatment.

**RESULTS:** After treatment, all liver functional

indexes improved ( $P < 0.05$ ), but CHE continued to decrease ( $P < 0.05$ ). The extents of improvement in ALB, A/G and GGT were greater in the study group than in the control group (ALB:  $1.72 \pm 0.64$ ,  $1.21 \pm 0.85$  vs  $1.32 \pm 0.57$ ,  $1.06 \pm 0.12$ ; A/G:  $0.085 \pm 0.030$ ,  $0.105 \pm 0.039$  vs  $0.036 \pm 0.007$ ,  $0.069 \pm 0.034$ ; GGT:  $-154.14 \pm 30.69$ ,  $-151.06 \pm 31.16$  vs  $-20.90 \pm 7.17$ ,  $-54.86 \pm 20.64$ , all  $P < 0.05$ ). The blood coagulation indexes were also improved after treatment ( $P < 0.05$ ), but the cases of CHE (mid-range) in the study group showed smaller improvements than those in the control group ( $P < 0.05$ ). The ultrasonography indexes were not obviously improved, but gallbladder wall thickness was better in the study group than in the control group ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** TCM treatment based on differentiation of symptoms and signs has a better effect than conventional practice in terms of improving liver synthesis function, lessening hepatic inflammation and necrosis, and relieving cholecystitis.

**Key Words:** Chronic hepatitis B; Traditional Chinese medicine; Differentiation of symptoms and signs; Conventional practice

He YH, Pan ZH, Li L, Guan WB, Wang YZ, Li YW, Yang YW. Therapeutic-effect analysis of chronic hepatitis B treated by traditional Chinese medicine based on differentiation of symptoms and signs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 3006-3010

## 摘要

**目的:** 按照循证医学方法观察评价中医辨证用药与常规用药治疗中、重度慢性乙肝的临床疗效差异。

**方法:** 选择2003年我院中医科所有慢性乙肝住院患者89例(中度57例, 重度32例)作为治疗组, 在常规治疗基础上加用中医辨证治疗; 按分层随机的原则选择同期本院传染科慢性乙肝住院患者89例(中度57例, 重度32例)作为对照组, 采用常规治疗。观察治疗前后两组患者肝功能(ALT、AST、ALB、A/G、TBIL、GGT、CHE)、肝纤维化标志物(HA、PC-



、-C、LN)、凝血功能(PT、PTA)、腹部B超(MPV、脾厚、脾长、SPV、胆囊壁厚度)等指标。

结果: 治疗前后两组肝功指标(CHE除外)均改善( $P<0.05$ ), 其中中、重度乙肝治疗组ALB、A/G、GGT改变幅度优于对照组(ALB:  $1.72\pm0.64$ ,  $1.21\pm0.85$  vs  $1.32\pm0.57$ ,  $1.06\pm0.12$ ; A/G:  $0.085\pm0.030$ ,  $0.105\pm0.039$  vs  $0.036\pm0.007$ ,  $0.069\pm0.034$ ; GGT:  $-154.14\pm30.69$ ,  $-151.06\pm31.16$  vs  $-20.90\pm7.17$ ,  $-54.86\pm20.64$ , 均 $P<0.05$ ); 两组CHE均呈下降趋势, 但治疗组下降幅度小于对照组( $-835.08\pm241.61$ ,  $-228.95\pm113.26$  vs  $-2488.79\pm356.73$ ,  $-765.14\pm261.90$ , 均 $P<0.05$ ); 治疗组慢性乙肝(中度)患者PT、PTA改善优于对照组(PT:  $-1.31\pm0.24$  vs  $-0.38\pm0.18$ ; PTA:  $11.96\pm2.04$  vs  $5.32\pm2.58$ , 均 $P<0.05$ ); 治疗组B超胆囊壁厚度减小幅度大于对照组( $P<0.05$ ), 其他指标两组无差异。

结论: 中药辨证治疗的介入对改善中重度慢性乙肝患者肝脏炎症坏死, 蛋白合成功能和减轻胆囊炎症方面优于常规治疗。

关键词: 慢性乙型肝炎; 中药; 辨证治疗; 常规治疗

何义华, 潘志恒, 李林, 关卫兵, 王拥泽, 李永伟, 杨跃武. 中药辨证治疗中重度慢性乙肝临床疗效对照分析. 世界华人消化杂志 2007;15(28):3006-3010  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3006.asp>

## 0 引言

慢性乙型病毒性肝炎是乙肝病毒(HBV)感染引起的常见传染病, 传统的中医药治疗虽然在我国慢性乙肝的防治工作中占有重要的地位, 但目前有关中医辨证治疗中、重度慢性乙肝的临床研究报告能够符合循证医学“证据”要求的则甚少<sup>[1-2]</sup>. 我们旨在按照循证医学的标准体系, 评价中药辨证用药治疗中、重度慢性乙肝的疗效。

## 1 材料和方法

1.1 材料 选择2003年我院中医科所有慢性乙肝住院患者89例作为治疗组, 男72例、女17例, 年龄20-59(平均 $42.03\pm14.79$ )岁, 病程0.5-13(平均 $6.67\pm0.65$ )年, 治疗时间11-80(平均 $29.94\pm19.06$ ) d, 中医辨证属湿热中阻型34例(38%)、瘀血阻络型29例(33%)、肝郁脾虚型21例(24%)、肝肾阴虚4例(4%)、脾肾阳虚型1例(1%)。按照分层随机的原则选择我院同期传染科慢性乙肝

住院患者89例作为对照组, 男77例、女12例, 年龄18-52(平均 $34.30\pm12.13$ )岁, 病程0.5-9.5(平均 $4.51\pm0.49$ )年, 治疗时间14-76(平均 $28.11\pm19.08$ ) d. 两组病例均有中度患者57例, 重度患者32例. 所有患者均符合2000-06在西安召开的全国病毒性肝炎防治会议制定的慢性乙肝中、重度诊断标准<sup>[2]</sup>, 中医辨证分型按中华全国中医学会内科肝病专业委员会天津会议(1991-12)标准<sup>[3]</sup>. 排除合并其他肝炎病毒感染、自身免疫性肝炎、酒精性肝病及其他系统严重原发疾病. 治疗组和对照组两组患者在病情轻重、治疗时间、性别构成方面均无显著性差异( $P>0.05$ ). 治疗组平均年龄、病程均大于对照组( $P<0.05$ ). 甘利欣由江苏正大天晴药业股份有限公司生产, 茵栀黄由北京双鹤高科天然药物有限公司生产, 苦参碱由江苏正大天晴药业股份有限公司生产, 中药煎剂由本院药剂科用煎药机负责统一煎煮。

### 1.2 方法

1.2.1 用药 两组病例均按常规剂量给予静滴甘利欣150 mg、茵栀黄30 mL、苦参碱150 mg; 治疗组在上述治疗基础上根据中医辨证分型加用口服中药煎剂, 2次/d, 250 mL/次, 由本院药剂科用煎药机负责统一煎煮. 基本方剂如下: 湿热中阻型方用茵陈蒿汤加減, 瘀血阻络型方用血府逐瘀汤加減, 肝郁脾虚型方用柴胡疏肝散加減, 肝肾阴虚型方用一贯煎加減, 脾肾阳虚型方用茵陈术附汤加減。

1.2.2 观察指标 (1)肝功能: 谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)、白球蛋白比例(A/G)、总胆红素(TBIL)、谷氨酰转肽酶(GGT)、胆碱酯酶(CHE)(采用Technicon RA-1000全自动生化仪进行检测); (2)凝血功能: 凝血酶原时间(PT)、凝血酶原活动度(PTA)(采用思达高诊断技术公司全自动止血/血栓分析仪(凝固法)SAT-Compact进行检测); (3)血清肝纤标志物: 透明质酸(HA)、III型前胶原(PC-III)、IV型胶原(IV-C)、层黏蛋白(LN)(采用放射免疫法, 试剂盒为海军医学研究所产品); (4)B超: 门静脉主干内径(MPV)、脾静脉内径(SPA)、脾厚度、脾长径、胆囊壁厚度(Biosons AU4型彩色多普勒超声诊断仪, 3.5-5.0 MHz凸阵电子扫描探头)。

统计学处理 所有资料均采用SPSS13.0 for Windows软件包进行统计学处理; 计数资料采用 $\chi^2$ 检验, 计量资料采用 $t$ 检验; 检验显著性水平设在0.05, 计量资料用 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示。

相关报道  
据世界卫生组织报道, 全球约20亿人曾感染过HBV, 其中3.5亿人为慢性HBV感染者, 其中25%-40%最终死于肝硬化和肝癌. 我国属HBV感染高流行区, 一般人群的HBsAg阳性率为9.09%, 2002年我国发病前10位的传染病中, 病毒性肝炎发病占首位, 每年发病数约66万例. 刘建平 *et al*检索关于中草药治疗慢性乙型肝炎文献531篇, 其中符合循证医学要求仅9篇, 其中高质量的文章只有1篇, 大部分文章存在科研设计不够严格, 得出的结论可信度差, 中医药治疗慢乙肝是否有效, 从循证医学角度仍受到不断质疑。

## 应用要点

本文通过对中山三院中医科与传染科收治共178例慢性乙型病毒性肝炎(中、重度)同时期住院患者进行病例对照分析,比较两科收治病例的病情特点与差异,观察评价中医辨证治疗的介入与常规西药治疗的疗效差异,为临床中医辨证治疗慢乙肝提供客观依据。

表 1 治疗前后两组病例肝功能、凝血功能比较(mean ± SD)

			ALT(U/L)	AST(U/L)	ALB(g/L)	A/G	TBIL(μmol/L)	GGT(U/L)	CHE(U/L)	PT(s)	PTA(%)
治疗组	中度	治疗前	305.21 ± 49.67	212.60 ± 23.54	38.34 ± 6.20 <sup>a</sup>	1.26 ± 0.36 <sup>a</sup>	41.31 ± 21.17 <sup>a</sup>	259.38 ± 34.66 <sup>a</sup>	7250.71 ± 640.25	14.93 ± 1.98 <sup>a</sup>	80.17 ± 17.44 <sup>a</sup>
			49.75 ± 28.36 <sup>c</sup>	51.74 ± 30.99 <sup>c</sup>	39.67 ± 4.63 <sup>c</sup>	1.34 ± 0.30 <sup>c</sup>	21.48 ± 0.83 <sup>c</sup>	105.24 ± 12.17 <sup>c</sup>	5838.71 ± 300.96 <sup>c</sup>	13.64 ± 1.10 <sup>c</sup>	92.12 ± 13.16 <sup>c</sup>
		治疗后	542.73 ± 106.28	475.78 ± 98.92	34.49 ± 7.58 <sup>a</sup>	1.23 ± 0.37 <sup>a</sup>	147.54 ± 87.44	224.89 ± 34.88	4772.76 ± 517.64	17.71 ± 3.79	61.92 ± 19.36
			73.88 ± 21.14 <sup>c</sup>	53.55 ± 30.47 <sup>c</sup>	37.71 ± 5.49 <sup>c</sup>	1.30 ± 0.31 <sup>c</sup>	46.71 ± 9.74 <sup>c</sup>	73.83 ± 7.05 <sup>c</sup>	4432.86 ± 433.80 <sup>c</sup>	15.4 ± 3.65 <sup>c</sup>	79.68 ± 22.38 <sup>c</sup>
	重度	治疗前	402.76 ± 76.36	224.41 ± 32.21	39.61 ± 4.08	1.50 ± 0.31	31.39 ± 3.13	115.14 ± 15.70	7662.19 ± 437.14	13.81 ± 2.12	93.27 ± 22.39
			84.46 ± 12.03 <sup>c</sup>	67.22 ± 9.85 <sup>c</sup>	41.33 ± 4.20 <sup>c</sup>	1.54 ± 0.32 <sup>c</sup>	20.20 ± 2.62 <sup>c</sup>	113.04 ± 12.09 <sup>c</sup>	5073.40 ± 310.83 <sup>c</sup>	13.42 ± 1.73 <sup>c</sup>	98.59 ± 19.99 <sup>c</sup>
		治疗后	644.76 ± 92.80	476.63 ± 77.89	37.41 ± 8.60	1.29 ± 0.37	169.11 ± 12.42	156.09 ± 1.66	4716.78 ± 261.43	16.81 ± 3.64	66.89 ± 22.90
			81.58 ± 21.72 <sup>c</sup>	75.26 ± 6.43 <sup>c</sup>	37.59 ± 4.81 <sup>c</sup>	1.35 ± 0.35 <sup>c</sup>	71.56 ± 0.53 <sup>c</sup>	101.23 ± 10.89 <sup>c</sup>	3951.64 ± 208.36 <sup>c</sup>	15.04 ± 3.65 <sup>c</sup>	82.33 ± 23.02 <sup>c</sup>
对照组	中度	治疗前	402.76 ± 76.36	224.41 ± 32.21	39.61 ± 4.08	1.50 ± 0.31	31.39 ± 3.13	115.14 ± 15.70	7662.19 ± 437.14	13.81 ± 2.12	93.27 ± 22.39
			84.46 ± 12.03 <sup>c</sup>	67.22 ± 9.85 <sup>c</sup>	41.33 ± 4.20 <sup>c</sup>	1.54 ± 0.32 <sup>c</sup>	20.20 ± 2.62 <sup>c</sup>	113.04 ± 12.09 <sup>c</sup>	5073.40 ± 310.83 <sup>c</sup>	13.42 ± 1.73 <sup>c</sup>	98.59 ± 19.99 <sup>c</sup>
		治疗后	644.76 ± 92.80	476.63 ± 77.89	37.41 ± 8.60	1.29 ± 0.37	169.11 ± 12.42	156.09 ± 1.66	4716.78 ± 261.43	16.81 ± 3.64	66.89 ± 22.90
			81.58 ± 21.72 <sup>c</sup>	75.26 ± 6.43 <sup>c</sup>	37.59 ± 4.81 <sup>c</sup>	1.35 ± 0.35 <sup>c</sup>	71.56 ± 0.53 <sup>c</sup>	101.23 ± 10.89 <sup>c</sup>	3951.64 ± 208.36 <sup>c</sup>	15.04 ± 3.65 <sup>c</sup>	82.33 ± 23.02 <sup>c</sup>
	重度	治疗前	402.76 ± 76.36	224.41 ± 32.21	39.61 ± 4.08	1.50 ± 0.31	31.39 ± 3.13	115.14 ± 15.70	7662.19 ± 437.14	13.81 ± 2.12	93.27 ± 22.39
			84.46 ± 12.03 <sup>c</sup>	67.22 ± 9.85 <sup>c</sup>	41.33 ± 4.20 <sup>c</sup>	1.54 ± 0.32 <sup>c</sup>	20.20 ± 2.62 <sup>c</sup>	113.04 ± 12.09 <sup>c</sup>	5073.40 ± 310.83 <sup>c</sup>	13.42 ± 1.73 <sup>c</sup>	98.59 ± 19.99 <sup>c</sup>
		治疗后	644.76 ± 92.80	476.63 ± 77.89	37.41 ± 8.60	1.29 ± 0.37	169.11 ± 12.42	156.09 ± 1.66	4716.78 ± 261.43	16.81 ± 3.64	66.89 ± 22.90
			81.58 ± 21.72 <sup>c</sup>	75.26 ± 6.43 <sup>c</sup>	37.59 ± 4.81 <sup>c</sup>	1.35 ± 0.35 <sup>c</sup>	71.56 ± 0.53 <sup>c</sup>	101.23 ± 10.89 <sup>c</sup>	3951.64 ± 208.36 <sup>c</sup>	15.04 ± 3.65 <sup>c</sup>	82.33 ± 23.02 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组治疗前; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 同组治疗前。

表 2 治疗后两组病例肝功能、凝血功能降幅比较(mean ± SD)

			ALT(U/L)	AST(U/L)	ALB(g/L)	A/G	TBIL(μmol/L)	GGT(U/L)	CHE(U/L)	PT(s)	PTA(%)
治疗组	中度	治疗前	-255.46 ± 49.12	-160.86 ± 21.91	1.72 ± 0.64 <sup>a</sup>	0.085 ± 0.030 <sup>a</sup>	-17.56 ± 2.77	-154.14 ± 30.69 <sup>a</sup>	-835.08 ± 241.61 <sup>a</sup>	-1.31 ± 0.24 <sup>a</sup>	11.96 ± 2.04 <sup>a</sup>
			-468.85 ± 104.93	-422.23 ± 100.18	1.21 ± 0.85 <sup>a</sup>	0.105 ± 0.039 <sup>a</sup>	-98.25 ± 11.60	-151.06 ± 31.16 <sup>a</sup>	-228.95 ± 113.26 <sup>a</sup>	-2.29 ± 0.51	7.75 ± 2.64
	重度	治疗前	-318.30 ± 71.73	-157.19 ± 31.00	1.32 ± 0.57	0.036 ± 0.007	-11.19 ± 2.20	-20.90 ± 7.17	-2488.79 ± 356.73	-0.38 ± 0.18	5.32 ± 2.58
			-564.64 ± 92.22	-402.71 ± 78.35	1.06 ± 0.12	0.069 ± 0.034	-97.55 ± 13.71	-54.86 ± 20.64	-765.14 ± 261.90	-1.77 ± 0.40	7.37 ± 3.00
	对照组	中度	-318.30 ± 71.73	-157.19 ± 31.00	1.32 ± 0.57	0.036 ± 0.007	-11.19 ± 2.20	-20.90 ± 7.17	-2488.79 ± 356.73	-0.38 ± 0.18	5.32 ± 2.58
			-564.64 ± 92.22	-402.71 ± 78.35	1.06 ± 0.12	0.069 ± 0.034	-97.55 ± 13.71	-54.86 ± 20.64	-765.14 ± 261.90	-1.77 ± 0.40	7.37 ± 3.00

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 对照组降幅。

## 2 结果

## 2.1 两组患者治疗前后肝功能、凝血功能变化

治疗前后患者的肝功指标(CHE除外)均有明显改善(治疗后 vs 治疗前,  $P < 0.05$ ), 两组间的差值比较无统计学意义(治疗组 vs 对照组,  $P > 0.05$ ), 但治疗组ALB、A/G、GGT改善幅度优于对照组(治疗组 vs 对照组,  $P < 0.05$ ); CHE治疗后两组均无改善, 呈继续下降趋势(治疗后 vs 治疗前,  $P < 0.05$ ), 但治疗组下降幅度小于对照组(治疗组 vs 对照组,  $P < 0.05$ ), 两组的凝血功能指标治疗后均有改善(治疗后 vs 治疗前,  $P < 0.05$ ), 但治疗组慢性乙肝(中度)患者改善幅度优于对照组(治疗组 vs 对照组,  $P < 0.05$ )(表1-2)。

## 2.2 两组患者治疗前后血清肝纤维化指标变化

治疗前后血清肝纤维化指标(对照组慢性乙肝中度患者PC-III除外)均有改善(治疗后 vs 治疗前,  $P < 0.05$ ), 但治疗组改善程度优于对照组(治疗组 vs 对照组,  $P < 0.05$ )(表3)。

## 2.3 两组病例治疗前后腹部B超变化

两组病例治疗前后腹部B超指标(除胆囊壁厚度)均无明显改变, 胆囊壁厚度治疗后两组病例均显著缩小(治疗后 vs 治疗前,  $P < 0.05$ ), 但治疗组缩小程度优于对照组(治疗组 vs 对照组,  $P < 0.05$ )(表4)。

## 3 讨论

慢性乙肝按照其临床表现和改变特点, 诊断上多属于中医“胁病”、“黄疸”、“疫病”等病的范畴。中医一般认为“湿热带毒”是慢性乙肝

表 3 治疗前后肝纤四项指标比较(mean ± SD, μg/mL)

			HA	PC-III	IU-C	LN
治疗组	中度	治疗前	337.90 ± 126.28	146.78 ± 34.06	205.9 ± 61.22	167.82 ± 64.00
		治疗后	211.98 ± 123.95 <sup>ac</sup>	89.44 ± 73.27 <sup>ac</sup>	75.91 ± 37.08 <sup>ac</sup>	89.93 ± 55.04 <sup>ac</sup>
	重度	治疗前	417.67 ± 165.32	198.65 ± 80.83	216.00 ± 71.46	205.13 ± 86.77
		治疗后	190.93 ± 140.54 <sup>ac</sup>	68.03 ± 60.82 <sup>ac</sup>	78.86 ± 46.32 <sup>ac</sup>	69.30 ± 55.07 <sup>ac</sup>
对照组	中度	治疗前	291.30 ± 151.20	137.13 ± 39.74	226.9 ± 63.87	159.32 ± 51.53
		治疗后	223.17 ± 215.24 <sup>a</sup>	117.35 ± 111.63 <sup>a</sup>	134.60 ± 94.49 <sup>a</sup>	126.05 ± 107.47 <sup>a</sup>
	重度	治疗前	460.65 ± 163.06	207.65 ± 91.31	227.57 ± 82.63	212.43 ± 91.72
		治疗后	283.84 ± 143.48 <sup>a</sup>	119.86 ± 90.56 <sup>a</sup>	147.80 ± 91.90 <sup>a</sup>	127.22 ± 80.80 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 同组治疗前; <sup>c</sup>*P* < 0.05 vs 对照组治疗后.

表 4 治疗前后两组病例腹部B超值比较(mean ± SD, mm)

			MPV	脾厚	脾长	SPV	胆囊壁厚
治疗组	中度	治疗前	12.02 ± 1.54	39.60 ± 11.27	112.16 ± 29.26	6.84 ± 2.18	4.96 ± 1.79
		治疗后	11.99 ± 1.34	39.32 ± 8.18	111.24 ± 23.18	6.78 ± 2.06	3.28 ± 0.73 <sup>ac</sup>
	重度	治疗前	11.86 ± 1.41	41.89 ± 11.41	120.30 ± 25.01	7.59 ± 2.53	5.49 ± 1.81
		治疗后	11.71 ± 1.01	41.65 ± 10.44	119.56 ± 22.70	7.43 ± 2.15	3.43 ± 0.96 <sup>ac</sup>
对照组	中度	治疗前	11.58 ± 1.11	37.42 ± 6.63	112.25 ± 15.39	6.29 ± 1.74	4.69 ± 1.74
		治疗后	11.55 ± 1.00	37.06 ± 5.09	112.04 ± 4.75	6.29 ± 1.48	3.70 ± 0.80 <sup>a</sup>
	重度	治疗前	11.39 ± 1.02	38.08 ± 4.36	112.30 ± 15.03	6.79 ± 2.13	5.09 ± 1.72
		治疗后	11.10 ± 0.93	37.86 ± 3.48	112.07 ± 13.84	6.54 ± 1.43	3.92 ± 1.07 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 同组治疗前; <sup>c</sup>*P* < 0.05 vs 对照组治疗后.

的病因, 其基本病理因素则与“湿”、“热”、“毒”、“淤”、“虚”等密切相关<sup>[5]</sup>. 本组资料中, 治疗组中医辨证证型属湿热中阻与瘀血阻络合计共67例(67/89, 71%), 显示湿热瘀阻仍是中、重度慢性乙型肝炎的基本中医病机.

党中群 *et al* 的研究发现, 活血化瘀类中药具有扩张毛细胆管、改善微循环以及减轻肝内胆汁淤积等作用<sup>[6]</sup>, 而复方中联合使用清热解毒、活血化瘀的中药能够改善肝脏微循环、增加肝实质血供、纠正肝内缺氧状态, 有助减轻肝损害、修复肝细胞、增强肝细胞合成ALB、凝血因子的能力<sup>[7]</sup>. 本组资料的统计分析结果显示, 治疗组ALB、A/G、GGT、PT、PTA等指标的改善幅度优于对照组(*P* < 0.05), 说明中药辨证治疗具有改善慢性乙肝中、重度患者的肝细胞合成ALB、凝血因子的能力. 以往的研究一般认为, 中医药在退黄、护肝方面有一定的治疗优势, 但本组资料的分析结果并未显示出治疗组与对照组在TBIL、ALT、AST等指标改善方面有统计学上的差异(*P* > 0.05), 分析原因可能与对照组在治疗过程中不同程度使用了茵栀黄、苦

参碱等清热利湿的中药注射液的退黄护肝治疗作用重叠有关. 另一方面是治疗组患者平均病程较长、年龄较大、病情相对复杂. 此外, 我们观察的样本量偏小可能也是其中的原因之一.

血清胆碱脂酶(CHE)是由肝脏合成后释放到血液中的非特异性酶, 能很好地反映中重度患者的肝脏储备功能以及病理损害程度<sup>[8]</sup>. 本组资料中两组患者治疗后尽管多数肝功指标有所改善, 但CHE仍呈下降趋势, 说明无论中西药物在短期内对患者的肝脏储备功能以及病理损害程度的改善作用有限. 而治疗组CHE下降幅度小于对照组(*P* < 0.05)提示中药辨证治疗具有改善患者预后情况的潜在作用.

HA、PC-III在血清中的活性受肝脏摄取和排泄能力影响<sup>[9]</sup>, 血清肝纤维化标志物虽然通常用于反应肝内纤维化的速度, 但不代表肝内纤维化的程度<sup>[10]</sup>; 肝内发生炎症坏死时, 血清肝纤维化标志物可一过性升高. 随着肝内炎症的消除, 以及肝窦内皮细胞功能的改善, 血清肝纤维化标志物又可很快恢复正常<sup>[11]</sup>. 本组资料中治疗组肝纤四项指标的下降幅度大于对照组, 反映

同行评价  
本文思路清晰, 实验设计合理, 方法可靠, 对临床应用具有很大的参考价值.

中药辨证治疗在改善肝脏炎症坏死方面优于常规治疗。同样,治疗后B超检查发现治疗组的胆囊壁厚度缩小幅度大于对照组,也提示中药可能有较好的消炎利胆作用。

总之,我们的初步临床观察结果表明,中药辨证用药治疗的介入在改善中、重度慢性乙肝患者的肝脏炎症坏死、蛋白合成功能、减轻胆囊炎症等方面可能优于一般的常规治疗,其详细治疗机制尚有待今后的进一步深入研究。

#### 4 参考文献

- 1 刘建平, McIntosh H, 林辉. 中草药治疗慢性乙型肝炎随机对照试验的系统评价. 中国循证医学 2001; 1: 16-24
- 2 危北海. 循证医学在中西医结合治疗病毒性肝炎研究中的意义. 中西医结合肝病杂志 2004; 14: 193-194
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分

会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝病杂志 2000; 8: 324-329

- 4 中国中医药学会内科肝病专业委员会. 病毒性肝炎中医辨证标准(试行). 中医杂志 1992; 33: 39-40
- 5 朱丽芳. 慢性乙型肝炎病因病机探讨. 陕西中医 2001; 22: 61-62
- 6 党中群, 牛晓玲. 从瘀论治瘀胆型病毒性肝炎述要. 中医药学刊 2003; 21: 1170-1171
- 7 刘平, 吴定中, 刘成海, 李风华, 顾宏图, 胡义扬, 徐列明, 刘成. 扶正化瘀中药复方促进CCl<sub>4</sub>大鼠肝纤维化逆转的配伍机理研究. 上海中医药大学学报 2002; 16: 37-41
- 8 邹正升, 辛绍杰, 齐心, 李保森, 赵景民, 毛远丽, 沈宏辉, 陈德永, 陈菊梅.  $\gamma$ -球蛋白及胆碱酯酶与肝组织病理损害的关系. 世界华人消化杂志 1998; 6: 212-213
- 9 夏启荣, 何峰. 肝硬化的诊断与治疗. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 90-91
- 10 姚集鲁. 传染病学临床专论. 广州: 广东高等教育出版社, 2000: 51-64
- 11 潘志恒, 程木华, 李林, 凌莉, 武敬, 陈艺. 大黄蔗虫丸抗肝纤维化作用的临床研究. 中国中西医结合消化杂志 2003; 11: 212-214

编辑 李军亮 电编 郭海丽

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

#### • 消息 •

### 欢迎订阅 2008 年《世界华人消化杂志》

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

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

《世界华人消化杂志》2008年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号 CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期每月8, 18, 28日,月价72.00, 年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023, 北京市2345信箱。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; <http://www.wjgnet.com>。



# 转化生长因子- $\beta$ 3对肝脏和胰腺纤维化的影响

周霞, 徐可树

周霞, 徐可树, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022  
通讯作者: 徐可树, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. xuzou@medmail.com.cn  
电话: 027-67119890  
收稿日期: 2007-06-18 修回日期: 2007-09-18

## Effect of transforming growth factor- $\beta$ 3 on hepatic and pancreatic fibrosis

Xia Zhou, Ke-Shu Xu

Xia Zhou, Ke-Shu Xu, Department of Digestive Disease, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China  
Correspondence to: Dr. Ke-Shu Xu, Department of Digestive Disease, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. xuzou@medmail.com.cn  
Received: 2007-06-18 Revised: 2007-09-18

### Abstract

Excessive deposition of extracellular matrix leading to tissue reconstruction is the basic characteristic of tissue fibrosis. Transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 3 has an anti-fibrotic effect through inhibiting the deposition of collagen and promoting its decomposition. Furthermore, it has been shown that TGF- $\beta$ 3 can decrease scar formation during wound healing. We focused on the expression and effect of TGF- $\beta$ 3 in the course of hepatic and pancreatic fibrosis, then investigated the effect of TGF- $\beta$ 3 on fibrosis.

**Key Words:** Transforming growth factor- $\beta$ 3; Hepatic fibrosis; Pancreatic fibrosis

Zhou X, Xu KS. Effect of transforming growth factor- $\beta$ 3 on hepatic and pancreatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 3011-3014

### 摘要

组织纤维化的基本特征是细胞外基质降解减少、过度沉积, 导致组织结构的改建. TGF- $\beta$ 3通过抑制胶原的沉积, 促进其降解而具有抗纤维化作用, 并被证实创伤愈合过程中可减轻

伤后疤痕的形成. 本文着重介绍了TGF- $\beta$ 3在肝脏及胰腺纤维化中的表达及其作用, 以进一步了解其对纤维化疾病的影响.

**关键词:** 转化生长因子- $\beta$ 3; 肝纤维化; 胰腺纤维化

周霞, 徐可树. 转化生长因子- $\beta$ 3对肝脏和胰腺纤维化的影响. *世界华人消化杂志* 2007;15(28):3011-3014  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3011.asp>

### 0 引言

转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )是一种多功能的多肽类细胞因子, 几乎体内所有细胞都能分泌TGF- $\beta$ 并存在其受体, 在细胞的生长调节中起重要作用<sup>[1-2]</sup>. 自1983年在哺乳类动物中发现TGF- $\beta$ 1及随后其他两个成员TGF- $\beta$ 2、TGF- $\beta$ 3以来, 关于TGF- $\beta$ 的研究也越来越引起人们的重视<sup>[3-4]</sup>. TGF- $\beta$ 3虽与其他TGF- $\beta$ 家族成员具有相似的结构, 但在组织分布和调节生物学功能上有一定的差异. TGF- $\beta$ 1是已知最重要的致纤维化因子之一<sup>[5]</sup>, 可以促进肝脏及胰腺纤维化的发生与发展, 最终导致严重的器官功能障碍. 近年来研究提示, TGF- $\beta$ 3可拮抗TGF- $\beta$ 1, 发挥抗纤维化的作用<sup>[6-7]</sup>. 本文就TGF- $\beta$ 3与肝脏及胰腺纤维化形成的关系作一综述.

### 1 TGF- $\beta$ 3的结构和功能

哺乳类中TGF- $\beta$ s超家族成员主要包括TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 2和TGF- $\beta$ 3<sup>[8]</sup>. 他们的序列同源性为70%-80%, 并与TGF- $\beta$ 超家族的其他成员共享有明显的序列同源性(30%)和7个保守的半胱氨酸区. TGF- $\beta$ 3基因在人体细胞定位于第14号染色体, 经转录翻译后成为大分子前体蛋白<sup>[9]</sup>. TGF- $\beta$ 3在胚胎发育早期主要表达于肺上皮细胞、软骨膜, 晚期表达于大部分组织, 包括卵巢、胎盘、脐带、心、肺、肾、消化道、脑、骨、皮肤、骨骼肌及软骨; 成人组织主要表达于心、肺、睾丸、子宫及脑. TGF- $\beta$ 3在胚胎发育过程及成人组织中表达的差异提示TGF- $\beta$ 3在不同组织中发挥不同作用<sup>[10]</sup>. TGF- $\beta$ 3是胚胎、

**背景资料**  
TGF- $\beta$ 家族是与纤维化疾病关系密切的细胞因子, 其中TGF- $\beta$ 1是最重要的促纤维化细胞因子之一, 而TGF- $\beta$ 3有抑制胶原沉积的作用, 随着人们对TGF- $\beta$ 家族的研究进一步深入, TGF- $\beta$ 3在纤维化疾病发展过程中的作用越来越受到重视.

**创新盘点**  
本文在参与纤维化的众多细胞因子中,以TGF- $\beta$ 3为研究对象,对该因子在肝脏、胰腺纤维化中的表达、调节及其生物学作用进行了详细的综述,并总结了其抗纤维化作用。

新生儿、成人组织正常发育及修复过程中起重要作用的内源性调节因子,具有调节细胞生长和分化的作用,是细胞生长的双向调节剂<sup>[11]</sup>。

## 2 TGF- $\beta$ 3与组织纤维化

组织纤维化是指组织或器官纤维组织增生,过量胶原形成和沉着及其细胞外基质(ECM)的改变<sup>[12-13]</sup>。他是以下因素综合作用的结果:新的胶原合成增加,已形成的纤维凝聚加强以及ECM改变,胶原降解减少。近年来研究显示TGF- $\beta$ 3具有抑制胶原沉积的作用。

**2.1 TGF- $\beta$ 3与胰腺纤维化** 胰腺纤维化是慢性胰腺炎的主要病理表现<sup>[14-15]</sup>,是胰腺组织炎症、坏死改变后修复过程中,以胶原纤维为主的ECM过度沉积的结果,最终导致胰腺内分泌及外分泌功能损害<sup>[16-17]</sup>。根据纤维组织沉着的部位,可分为小叶间纤维化、小叶周围纤维化和腺泡内纤维化。胰腺星状细胞在慢性胰腺炎胰腺纤维化的进程中扮演重要的角色<sup>[18-19]</sup>,其中TGF- $\beta$ 1是最重要的刺激该细胞分泌胶原的细胞因子之一<sup>[20-21]</sup>。Friess *et al*<sup>[22]</sup>研究急性坏死性胰腺炎组织修复纤维化过程中TGF- $\beta$ s的表达发现,正常胰腺组织中TGF- $\beta$ s的表达较少,而坏死性胰腺炎标本中腺泡细胞及导管细胞中可见大量TGF- $\beta$ s表达。Fukumura *et al*<sup>[23]</sup>对癌相关的慢性阻塞性胰腺炎患者标本的免疫组化研究表明,巨噬细胞及中性粒细胞分布于成纤维细胞间,并表达TGF- $\beta$ 1,可能是致纤维化因子TGF- $\beta$ 1的来源,TGF- $\beta$ 2和TGF- $\beta$ 3则表达于导管结构中。新近研究显示,TGF- $\beta$ 3能减少胰腺星状细胞的胶原分泌,具有抗胰腺纤维化功能,与对照组相比,I型胶原明显减少,MMP-2活性增加而TIMP-1表达减少使ECM降解增加<sup>[24]</sup>。提示TGF- $\beta$ 3可能通过抑制胰腺星状细胞胶原合成而发挥抑制胰腺纤维化的作用。

**2.2 TGF- $\beta$ 3与肝纤维化** 肝纤维化是由不同炎症因子激活肝星状细胞(HSC),导致以胶原为主的ECM各种成分合成增多,降解减少,从而使ECM在肝脏异常沉积而引起的肝脏纤维化病变,可导致肝硬化及严重的并发症,如门脉高压症、肝性脑病、肝癌等<sup>[25-27]</sup>。HSC活化是肝纤维化发生的关键,活化的HSC具有增殖、纤维生成、致炎和收缩肌成纤维细胞表型的作用<sup>[28-30]</sup>,抑制该细胞的活化与增殖是目前抗纤维化治疗的中心策略<sup>[31-32]</sup>。TGF- $\beta$ 1是激活HSC的主要细胞因子<sup>[33-34]</sup>。在正常肝脏TGF- $\beta$ 1 mRNA主要表达

于HSC和枯否细胞,不表达于内皮细胞及肝实质细胞;TGF- $\beta$ 2及TGF- $\beta$ 3的表达较TGF- $\beta$ 1弱,TGF- $\beta$ 2主要表达于枯否细胞,其次为HSC和内皮细胞;TGF- $\beta$ 3只表达于HSC<sup>[35]</sup>。Baer *et al*<sup>[36]</sup>研究了肝硬化过程中TGF- $\beta$ s的表达,结果显示,肝硬化过程中,TGF- $\beta$ 1在胆管、胆管内皮细胞、炎性细胞中呈高表达,在肝窦壁细胞亦可少量表达TGF- $\beta$ 1和适量表达TGF- $\beta$ 2;而TGF- $\beta$ 3主要表达于胆管、胆管内皮细胞、炎性细胞及成纤维样细胞中。在肝移植后纤维化过程中,TGF- $\beta$ 3的表达与早期基质构成的细胞外基质分子黏合素(tenacin)的表达一致,提示TGF- $\beta$ 3可能主要在纤维化的早期发挥作用<sup>[37]</sup>。Seong *et al*<sup>[38]</sup>运用放射线照射肝脏,并检测在造成纤维化病理改变前TGF- $\beta$ 1和TGF- $\beta$ 3的表达,发现两者的表达有不同特征。在照射过程中,TGF- $\beta$ 1 mRNA表达逐渐增高,在28 d达到高峰;而TGF- $\beta$ 3表达在第7天达到高峰,此后逐渐降低。免疫组化结果显示,TGF- $\beta$ 1在第28天在中心静脉周围的非实质细胞呈阳性表达,而TGF- $\beta$ 3在第7天呈相似的表达。TGF- $\beta$ 1和TGF- $\beta$ 3 mRNA表达的改变在早期就已发生,他们表达的差异提示在肝纤维化早期已存在TGF- $\beta$ 1和TGF- $\beta$ 3的相互作用。研究提示,在肝纤维化早期形成过程中,TGF- $\beta$ 1起正调节作用,促进纤维化的发展,而TGF- $\beta$ 3可能起负调节作用。

## 3 TGF- $\beta$ 3的调节

Li *et al*<sup>[39]</sup>运用基因敲除小鼠研究TGF- $\beta$ 3与致纤维化因子纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)之间的关系,敲除TGF- $\beta$ 3基因约15 d的小鼠表皮及真皮层PAI-1的表达增高,此外在该小鼠真皮成纤维细胞的培养液中也发现PAI-1的表达及活性增高,说明TGF- $\beta$ 3可能通过抑制促纤维化因子的表达而发挥抗纤维化作用。Liu *et al*<sup>[40]</sup>研究发现,Smad3和CREB-1是诱导TGF- $\beta$ 3最重要的转录因子,JNKs和p38是TGF- $\beta$ 3合成关键的上游调节因子。高水平的TGF-V3可以通过DNA结合蛋白与启动子中含有3个重复TCCC序列的区域结合,从而激活TGF- $\beta$ 3启动子。这个序列的突变不仅可抑制蛋白与该区域的结合,还明显降低启动子的活性<sup>[41]</sup>。Abdelaziz *et al*<sup>[42]</sup>研究显示,一氧化氮(NO)可调节TGF- $\beta$ 3的表达,培养的新生大鼠心脏成纤维细胞经S-亚硝基N-乙酰二甲基半胱氨酸盐酸盐(SNAP)处理4 h后,TGF- $\beta$ 3mRNA的表达水平明显下降;而缺氧诱导因子-1可直接

诱导TGF- $\beta 3$ 转录, 促进其表达<sup>[43]</sup>.

#### 4 结论

TGF- $\beta 3$ 在多种组织纤维化进程中发挥作用, 但其抗纤维化作用及其机制尚不十分明确. 对TGF- $\beta 3$ 作用机制的进一步研究有利于我们更清楚的了解纤维化过程中各因子的相互作用, 为TGF- $\beta 3$ 的临床应用提供理论依据.

#### 5 参考文献

- Dibrov A, Kashour T, Amara FM. The role of transforming growth factor beta signaling in messenger RNA stability. *Growth Factors* 2006; 24: 1-11
- Huang SS, Huang JS. TGF-beta control of cell proliferation. *J Cell Biochem* 2005; 96: 447-462
- Lawrence DA. Latent-TGF-beta: an overview. *Mol Cell Biochem* 2001; 219: 163-170
- Ray S, Broor SL, Vaishnav Y, Sarkar C, Girish R, Dar L, Seth P, Broor S. Transforming growth factor beta in hepatitis C virus infection: in vivo and in vitro findings. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 393-403
- Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3056-3062
- Carrington LM, Albon J, Anderson I, Kamma C, Boulton M. Differential regulation of key stages in early corneal wound healing by TGF-beta isoforms and their inhibitors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1886-1894
- Ferguson MW, O'Kane S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2004; 359: 839-850
- Lim H, Zhu YZ. Role of transforming growth factor-beta in the progression of heart failure. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 2584-2596
- Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 753-791
- Yamazaki K, Crowe DL, Shuler CF. Hunchback sequence binding protein suppresses mouse TGF-beta3 promoter in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 346: 802-809
- Cox DA. Transforming growth factor-beta 3. *Cell Biol Int* 1995; 19: 357-371
- Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 2007; 117: 524-529
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007; 170: 1807-1816
- Yoo BM, Yeo M, Oh TY, Choi JH, Kim WW, Kim JH, Cho SW, Kim SJ, Hahm KB. Amelioration of pancreatic fibrosis in mice with defective TGF-beta signaling. *Pancreas* 2005; 30: e71-e79
- Dite P. Chronic pancreatitis--etiological classifications and diagnostic criteria. *Vnitr Lek* 2007; 53: 354-358
- Witt H, Apte MV, Keim V, Wilson JS. Chronic pancreatitis: challenges and advances in pathogenesis, genetics, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology* 2007; 132: 1557-1573
- Kim CD. Pancreatitis--etiology and pathogenesis. *Korean J Gastroenterol* 2005; 46: 321-332
- Watanabe S, Nagashio Y, Asaumi H, Nomiyama Y, Taguchi M, Tashiro M, Kihara Y, Nakamura H, Otsuki M. Pressure activates rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287: G1175-G1181
- Shek FW, Benyon RC, Walker FM, McCrudden PR, Pender SL, Williams EJ, Johnson PA, Johnson CD, Bateman AC, Fine DR, Iredale JP. Expression of transforming growth factor-beta 1 by pancreatic stellate cells and its implications for matrix secretion and turnover in chronic pancreatitis. *Am J Pathol* 2002; 160: 1787-1798
- Vogelmann R, Ruf D, Wagner M, Adler G, Menke A. Effects of fibrogenic mediators on the development of pancreatic fibrosis in a TGF-beta1 transgenic mouse model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G164-G172
- 孙蕴伟, 袁耀宗. 结缔组织生长因子及其在胰腺纤维化中的作用机制. *胰腺病学* 2003; 3: 121-122
- Friess H, Lu Z, Riesle E, Uhl W, Brundler AM, Horvath L, Gold LI, Korc M, Buchler MW. Enhanced expression of TGF-betas and their receptors in human acute pancreatitis. *Ann Surg* 1998; 227: 95-104
- Fukumura Y, Kumasaka T, Mitani K, Karita K, Suda K. Expression of transforming growth factor beta1, beta2, and beta3 in chronic, cancer-associated, obstructive pancreatitis. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130: 356-361
- Shek FW, Li KF, Mann J, Williams EJ, Iredale JP, Benyon RC, Fine DR. Transforming growth factor-beta3 (TGF-[beta]-3) express anti-fibrotic properties in pancreatic stellate cells. *Gut* 2004; 53: supplement A16
- Kisseleva T, Brenner DA. Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S73-S78
- Ikegami T, Zhang Y, Matsuzaki Y. Liver fibrosis: possible involvement of EMT. *Cells Tissues Organs* 2007; 185: 213-221
- Garcia B L, Galvez G J, Armendariz B J. Therapeutic targets for revert liver fibrosis. *Rev Med Chil* 2007; 135: 783-791
- Parsons CJ, Takashima M, Rippe RA. Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S79-S84
- Gutierrez-Ruiz MC, Gomez-Quiroz LE. Liver fibrosis: searching for cell model answers. *Liver Int* 2007; 27: 434-439
- Urtasun R, Nieto N. Hepatic stellate cells and oxidative stress. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99: 223-230
- Cheng K, Mahato RI. Gene modulation for treating liver fibrosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2007; 24: 93-146
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115: 209-218
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d793-d807
- Liu X, Hu H, Yin JQ. Therapeutic strategies against TGF-beta signaling pathway in hepatic fibrosis. *Liver Int* 2006; 26: 8-22
- De Bleser PJ, Niki T, Rogiers V, Geerts A. Transforming growth factor-beta gene expression in normal and fibrotic rat liver. *J Hepatol* 1997; 26: 886-893
- Baer HU, Friess H, Abou-Shady M, Berberat

**应用要点**  
进一步明确TGF- $\beta 3$ 抗纤维化的作用机制, 可为其在纤维化疾病中的应用提供更多的依据.

同行评价  
本文内容丰富,  
条理分明, 参考文献  
全面, 对基础研  
究和临床研究有  
重要的指导意义.

- P, Zimmermann A, Gold LI, Korc M, Buchler MW. Transforming growth factor betas and their receptors in human liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998; 10: 1031-1039
- 37 Demirci G, Nashan B, Pichlmayr R. Fibrosis in chronic rejection of human liver allografts: expression patterns of transforming growth factor-TGFbeta1 and TGF-beta3. *Transplantation* 1996; 62: 1776-1783
- 38 Seong J, Kim SH, Chung EJ, Lee WJ, Suh CO. Early alteration in TGF-beta mRNA expression in irradiated rat liver. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 46: 639-643
- 39 Li WY, Huang EY, Dudas M, Kaartinen V, Warburton D, Tuan TL. Transforming growth factor-beta3 affects plasminogen activator inhibitor-1 expression in fetal mice and modulates fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 516-525
- 40 Liu G, Ding W, Neiman J, Mulder KM. Requirement of Smad3 and CREB-1 in mediating transforming growth factor-beta (TGF beta) induction of TGF beta 3 secretion. *J Biol Chem* 2006; 281: 29479-29490
- 41 Lafyatis R, Denhez F, Williams T, Sporn M, Roberts A. Sequence specific protein binding to and activation of the TGF-beta 3 promoter through a repeated TCCC motif. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 6419-6425
- 42 Abdelaziz N, Colombo F, Mercier I, Calderone A. Nitric oxide attenuates the expression of transforming growth factor-beta(3) mRNA in rat cardiac fibroblasts via destabilization. *Hypertension* 2001; 38: 261-266
- 43 Schaffer L, Scheid A, Spielmann P, Breyman C, Zimmermann R, Meuli M, Gassmann M, Marti HH, Wenger RH. Oxygen-regulated expression of TGF-beta 3, a growth factor involved in trophoblast differentiation. *Placenta* 2003; 24: 941-950

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

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

• 消息 •

## 中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会暨第三届学会研讨会通知

**本刊讯** 由中华医学会消化内镜学分会主办, 江西省医学会消化内镜专业委员会、南昌大学第一附属医院承办的中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会暨第三届学术研讨会将于2007-11-02/04在江西南昌举行. 届时将邀请美国、香港等国家和地区的国际著名消化内镜专家及国内知名消化内镜专家莅临大会.

### 1 会议内容

中华医学会第五届消化内镜学分会青年委员会成立大会; 青年内镜医师培训讲座; 消化内镜新进展讲座; 青年委员专题讲座.

### 2 联系方式

徐萍, 330006, 江西省南昌市永外正街17号, 南昌大学第一附属医院消化科. 电话: 0791-8692506或0791-8692540, E-mail: yfyxp@yahoo.com.cn.



# 调节性T细胞在炎症性肠病中的研究进展

何相宜, 陈维雄

何相宜, 陈维雄, 上海交通大学附属第六人民医院消化内科  
上海市 200233

通讯作者: 陈维雄, 200233, 上海交通大学附属第六人民医院消化内科. tcrichard@sohu.com

电话: 021-64369181

收稿日期: 2007-06-14 修回日期: 2007-09-24

## Progress in research the roles of regulatory T cells in inflammatory bowel disease

Xiang-Yi He, Wei-Xiong Chen

Xiang-Yi He, Wei-Xiong Chen, Department of Gastroenterology, Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Wei-Xiong Chen, Department of Gastroenterology, Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. tcrichard@sohu.com  
Received: 2007-06-14 Revised: 2007-09-24

### Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a nonspecific intestinal inflammatory disease. Its causes and pathogenesis have a close relationship with disorder of autoimmune function. The imbalance of the Th1/Th2 paradigm is an important factor for IBD. However, the pathogenesis of IBD cannot be interpreted on the basis of the Th1/Th2 paradigm alone. Recent research has highlighted the substantial role of regulatory T cells in the nosogenesis of IBD. This review will explore the relationship between regulatory T cells and IBD, and the progress in the study of regulatory T cells.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Regulatory T cell; Autoimmunity

He XY, Chen WX. Progress in research the roles of regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 3015-3019

### 摘要

炎症性肠病(IBD)是一种非特异性肠道炎症性疾病, 其发病与自身免疫功能紊乱有关. Th1/Th2失衡是导致IBD的重要因素之一. 然而,

Th1/Th2理论并不能充分阐明IBD的发病机制. 近几年来, 越来越多的研究显示, 调节性T细胞在炎症性肠病的发生发展中起重要的作用. 本文就近年来调节性T细胞在炎症性肠病中作用的研究进展作一综述.

关键词: 炎症性肠病; 调节性T细胞; 自身免疫

何相宜, 陈维雄. 调节性T细胞在炎症性肠病中的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(28):3015-3019

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3015.asp>

**背景资料**  
炎症性肠病是一种累及胃肠道的自身免疫性疾病, 近年来患病率呈逐渐上升趋势. 炎症性肠病发病机制不明, 近年来发现调节性T细胞在IBD中起重要作用.

## 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一种累及胃肠道的自身免疫性疾病, 包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(crohn's disease, CD). 近年来患病率呈逐渐上升趋势. IBD发病机制不明, 目前认为Th1/Th2失衡是导致IBD肠黏膜损害的重要因素之一. 近年来发现一类有别于Th1/Th2的特殊细胞调节性T细胞(regulatory T cell, Tr), 在IBD中起重要作用.

## 1 Tr细胞的生物学特性

Tr细胞具有高度异源性, 目前仍不清楚他们的前体、分化过程. 根据其来源、表位特性及发挥效应机制, Tr可划分为自然发生的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr细胞(natural regulatory T cells, nTreg)和适应性Tr细胞(induced regulatory T cells or adaptive regulatory T cells)<sup>[1-5]</sup>, 后者有Tr1、Th3等多种亚型. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr细胞是目前研究较多的一类亚群, 可从人的胸腺和外周血中分离到, 且实验证实人和小鼠的Tr具有相似的特性.

自然发生的Tr细胞主要是指在胸腺发育成熟后进入外周淋巴组织, 抑制自身反应性T细胞, 以维持自身免疫平衡, 在预防病理性自身免疫反应方面起作用<sup>[2-3,6]</sup>. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr细胞拥有独特的细胞表型和功能, 是一种功能成熟的T细胞亚群, 约占正常人和小鼠的外周血及脾脏组织中CD4<sup>+</sup> T细胞的5%-10%, 具有免疫抑制性和免疫无能性. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr细胞的免疫抑制性

研发前沿  
对调节性T细胞在炎症性肠病发病中的作用,以及对以调节性T细胞为靶点治疗炎症性肠病的策略研究是现在和今后研究的重点。

表现为经TCR信号刺激活化后能抑制CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>淋巴细胞的活化和增殖,这种抑制作用无抗原特异性,不具有组织相容性复合体(MHC)限制性<sup>[7-8]</sup>;免疫无能性表现在对高浓度IL-2的单独刺激,固相包被或可溶性抗CD3单抗,以及抗CD3单抗、抗CD28单抗的联合作用呈无应答状态,也不分泌IL-2<sup>[7-8]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr介导免疫抑制的确切分子机制尚不清楚,目前发现细胞因子(IL-10、TGF- $\beta$ 等)的分泌、与同源的抗原递呈细胞(APCs)的接触(既细胞与细胞特定表面共刺激分子的结合)、以及对APCs功能的下调等多种机制可能参与CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr的抑制<sup>[9]</sup>。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr具有独特的表型,CD25(IL-2受体的 $\alpha$ 链)是早期发现的标志<sup>[10]</sup>,但因其也表达在活化T细胞表面,对活动状态的免疫性疾病单靠CD25表达鉴定Tr不够特异。Foxp3是CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr相对较特异性的标志物。Foxp3属于foxhead家族成员的转录因子,组成性表达于机体的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr,对nTreg细胞的发育和功能起关键作用<sup>[11-15]</sup>。但是因为Foxp3属于胞内蛋白,其检测和分离有所不便。近来报道,表面分子CD127低表达可以取代Foxp3,作为Tr细胞特异标记<sup>[16-17]</sup>。另外,Neuropilin-1(Nrp1)也可能是CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr的相对特异标志物。Nrp1是与轴突导向、血管生成和T细胞激活有关的受体。Bruder *et al*<sup>[18]</sup>发现其组成性表达于CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr表面。其他标志物还有CD45RB<sup>low</sup>, CD62L等,但都不是CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr的特异性标志。此外与CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr抑制功能相关的分子还有GITR<sup>[19]</sup>、lag-3<sup>[20]</sup>、瘦素<sup>[21]</sup>、Toll样受体-8(TLR-8)<sup>[22]</sup>。

适应性Tr细胞由初始(naive)T细胞在抗原和某些特定因素(如未成熟DC,成熟DC,IL-10,TGF- $\beta$ ,抗CD4或抗CD8 mAb,IFN及维生素D3等)刺激下产生<sup>[4]</sup>。研究较多的有CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T细胞、Tr1细胞<sup>[23]</sup>和Th3细胞、某些表达 $\gamma\delta$ T细胞受体的CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T细胞、NKT细胞<sup>[3,24]</sup>。

## 2 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr细胞在IBD免疫紊乱中的作用及其机制

肠道是人体与外界抗原接触的主要场所,因此肠道的局部反应需要精密地调节以避免对食物性抗原和正常菌群产生免疫反应,同时又能有效地防御病原体。在人体以及动物模型中的研究显示,Tr细胞在保持肠道稳态中起重要作用。

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr数量的减少,表面分子表达的缺陷,抑制功能的受损,都与IBD的发生相

关。Maul *et al*<sup>[25]</sup>分析IBD患者外周血和肠黏膜组织的Tr细胞,结果显示在疾病活动期外周血CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>和Foxp3<sup>+</sup> Tr细胞下降,而在疾病缓解期上升;IBD病变肠黏膜Tr细胞较非病变处升高,但这种升高仍然低于健康对照组。Takahashi *et al*<sup>[26]</sup>也得到类似的结果:活动期UC外周血CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T细胞显著降低,且与疾病的严重程度呈反比,但CD患者无统计学差异。然而仍有报道显示IBD患者的Tr细胞抑制功能没有减低,且有少数报道活动期IBD外周血、肠黏膜Tr细胞升高<sup>[27-28]</sup>,这可能是体内环境的不同,炎症细胞数量的优势,或是其他Tr细胞的拮抗机制,使其无法抗衡IBD的肠黏膜炎症。

在T细胞缺陷的小鼠与大鼠中,输注CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T细胞可以诱发IBD。如果与此同时输入CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr则能预防IBD的发生;若在此之后,IBD的病理变化已建立,输注CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr,可被招募到肠淋巴组织、固有层,迁移到脾脏而发挥免疫调节作用,治疗IBD<sup>[29]</sup>。CCR4在CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr的迁移中起重要作用,对这一模型中CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr的抑制功能起关键作用<sup>[30]</sup>。尽管CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr的调节机制还不清楚,但进一步研究初步显示,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr细胞大致可通过细胞接触及分泌抑制性细胞因子等方式实现对CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T细胞的非特异性抑制效应,以预防治疗IBD。

**2.1 细胞接触依赖机制** 在体外,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr细胞介导的免疫抑制是通过Tr细胞与反应细胞同细胞接触实现。多种配体-受体参与此过程,其中包括介导信号的共刺激分子,如细胞毒性T淋巴细胞相关抗原-4(cytotoxic T-lymphocyte antigen,CTLA-4)、糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体(glucocorticoid-induced TNF-receptor, GITR)、OX40(CD134)、淋巴细胞活化基因3(LAG-3)等。

CTLA-4属于CD28细胞表面受体家族,与CD28相反,活化的T细胞膜受体CTLA-4与APCs上的配体CD80/CD86结合,介导免疫抑制信号,以维持免疫自稳。研究证实Tr细胞高表达CTLA-4。高水平的CTLA-4与APCs上的B7结合,诱导色氨酸裂解酶-吡啶胺2,3-二加氧酶(IDO)活化,介导免疫耐受<sup>[31]</sup>。CTLA-4在结肠炎中可能起重要作用。CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr对肠炎的控制可被CTLA-4的中和抗体阻断<sup>[32]</sup>。然而CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr的体外免疫抑制效应不为CTLA-4阻断而逆转<sup>[33]</sup>。

GITR表达在胸腺和外周血的静息CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tr细胞上。GITR可能与抗CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

Tr抗体结合,使 $CD4^+CD25^+$  Tr活性增强.在 $CD4^+CD45RB^{high}$  T诱发的IBD模型中, $CD4^+GITR^+$  T细胞能阻止结肠炎的发展;给予抗GITR mAb可阻断 $CD4^+CD25^+$  Tr对小鼠结肠炎的抑制作用<sup>[34]</sup>.然而 $CD4^+CD45RB^{high}$  T表达GITR起到相反的作用. GITR-/-小鼠脾脏 $CD4^+CD45RB^{high}$  T诱导结肠炎的活性降低; GITR基因剔除和阻断GITR,可预防2, 4, 6-trinitrobenzene sulphonic acid(TNBS)诱发的结肠炎.因此GITR在IBD中的作用还有待进一步研究.

OX40分子短暂地表达于活化的 $CD4^+$  T细胞上,与APC表面OX40L结合,介导免疫活化信号,参与 $CD4^+CD45RB^{high}$  T诱发的结肠炎产生<sup>[32]</sup>.给予抗OX40L抗体能够阻止T细胞在小鼠结肠炎肠黏膜中积聚,并且使结肠炎缓解<sup>[32]</sup>.

LAG-3表达于活化的 $CD4^+CD25^+$  Tr, LAG-3基因敲除小鼠的 $CD4^+CD25^+$  Tr的抑制功能明显降低, $CD4^+$  T细胞异位表达LAG-3后可获得Tr的特性<sup>[20]</sup>.但目前,有关LAG-3与IBD研究的报道少见,需进一步研究LAG-3与IBD的关系.

由此可见,共激分子/共激分子受体在Tr细胞活化中起重要作用.研究其表达异常的机制及如何调节这一类信号途径可能为治疗IBD带来新的曙光.

**2.2 细胞因子调节机制**  $CD4^+CD25^+$  Tr细胞还可通过释放抑制性的细胞因子(如IL-10, TGF- $\beta$ 和IL-2等)发挥重要作用.体外研究显示, $CD4^+CD25^+$  Tr细胞中IL-10和TGF- $\beta$  mRNA的表达水平较高,并且给予合适的刺激, $CD4^+CD25^+$  Tr细胞能直接分泌IL-10和TGF- $\beta$ .在 $CD4^+CD45RB^{high}$  T诱发的IBD模型中,TGF- $\beta$ 和IL-10在Tr细胞对IBD的保护作用中占有较重要地位.从TGF- $\beta$ 基因敲除小鼠分离的 $CD4^+CD25^+$  Tr细胞<sup>[35]</sup>或来源于IL-10敲除小鼠 $CD4^+CD45RB^{low}$  T则失去了抗IBD作用<sup>[36]</sup>.在抗原脉冲细胞(antigen-experienced cells)、缠绕杆菌、利什曼原虫诱发的结肠炎模型中,Tr细胞的预防与治疗作用依赖IL-10<sup>[37]</sup>.此外IL-10基因敲除的小鼠或用IL-10受体抗体处理野生型小鼠可产生慢性结肠炎,可见IL-10在肠道内环境中起负性调节肠道免疫反应的作用. TGF- $\beta$ 也能阻断噻唑酮诱导的Th2型小鼠结肠炎<sup>[38]</sup>.但在CD, Tr细胞分泌TGF- $\beta$ 的量反而增加,可能是因为存在部分抗调节的活化机制.  $CD4^+CD25^+$  Tr细胞可以通过体外TGF- $\beta$ 诱导 $CD25^+$  T细胞产生,这

一TGF- $\beta$ 诱导的Tr细胞具有拮抗 $CD4^+CD62L^+$  T细胞输注引发实验性结肠炎的作用<sup>[39]</sup>. IBD的TGF- $\beta$ 信号转导缺陷与Smad7的上调有关. *po* Smad7的反义核苷酸可改善TNBS诱导的结肠炎并防止其复发<sup>[40]</sup>.

### 3 其他亚群的Tr细胞在IBD中的作用及机制

除自然发生的 $CD4^+CD25^+$  Tr细胞之外,尚有多种T细胞群能抑制其他T细胞的效应,例如Th3细胞、Tr1细胞、与未成熟DC共培养的 $CD4^+$  T细胞、 $CD8^+CD28^-$ 调节T细胞.

Th3细胞最早是从*po*免疫耐受的小鼠体内分离得到的,并对Th1和Th2有抑制作用<sup>[41]</sup>. *po*免疫耐受是指*po*抗原后,引起机体对该种抗原产生无或低免疫性反应,但机体对其他抗原仍可产生正常免疫性应答<sup>[42]</sup>. Th3的抑制效应是抗原非特异性,并且通过分泌TGF- $\beta$ 介导以“旁观者抑制”途径产生. Th3的抑制活性以受体TGF- $\beta$ 介导为特征,其产生也与TGF- $\beta$ 相关.与nTreg依赖IL-2相比, Th3的体外存活有赖于IL-4和IL-10<sup>[42]</sup>.然而Th3和nTreg之间的关系还不明确.现已证实, Th2环境诱导Th3细胞,而Th1环境抑制Th3的诱导.但是,参与Th3诱导过程的确切细胞因子群还不清楚.在 $CD4^+CD45RB^{high}$ 细胞诱导的IBD模型中, Th3通过分泌TGF- $\beta$ 诱导B细胞转换为IgA的同种型,并且能维持*po*耐受<sup>[43]</sup>. Neurath *et al*<sup>[44]</sup>证实Th3细胞能抑制TNBS诱导的结肠炎.

Tr1细胞与经典的Th1和Th2不同,多在IL-10诱导下产生, IFN- $\alpha$ 可增强IL-10诱导产生Tr1细胞的能力<sup>[23,45-47]</sup>.其低增殖不分泌IL-4,但产生高水平的IL-10,中等量的TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ 和IL-5,少量的IL-2,具有旁观者抑制效应和免疫记忆力<sup>[23,45-47]</sup>.他们在体外通过分泌IL-10和TGF- $\beta$ 来抑制抗原特异性免疫反应<sup>[48-49]</sup>. Tr1细胞除了在体外抑制免疫反应,在体内也有免疫抑制作用.在SCID鼠转入 $CD4^+CD45RB^{high}$  T诱发的IBD模型中, *po*卵清蛋白(OVA)诱导的特异性Tr1细胞和致病的 $CD4^+CD45RB^{high}$ 细胞共同传输,可预防这一Th1细胞介导的炎症<sup>[49]</sup>.随后的实验显示Tr1具有预防和治疗 $CD4^+CD45RB^{high}$ 诱导的IBD作用,且显示 $CD4^+CD25^+$  Tr的免疫耐受作用部分归功于:通过Tr1的分化而间接起作用<sup>[50]</sup>.

除了 $CD4^+$ 细胞的亚群具有调节功能,  $CD8^+$ 的亚群细胞也同样能起到免疫调节作用.其中 $CD8^+CD28^-$ 的一类T细胞备受关注,其作用机

**创新盘点**  
多数文章只探讨了自然发生的 $CD4^+CD25^+$  Tr细胞和炎症性肠病的关系.本文不仅对 $CD4^+CD25^+$  Tr细胞在炎症性肠病中新的进展进行了总结,还描述其他适应性调节T细胞亚群在炎症性肠病中的作用.

## 应用要点

本文对调节性T细胞在IBD中的研究,对IBD的治疗和诊断都有重要的意义,调节性T细胞的变化作为IBD进展的指标,通过增强调节T细胞的功能或回输调节T细胞可能起到治疗IBD的作用,这些都有广阔的应用前景。

制是损害CD40通路的信号传导,抑制APC激活T辅助细胞。CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T细胞可以预防输注CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup> T细胞诱导的IBD<sup>[51]</sup>。此外在IBD患者的肠黏膜中存在CD8<sup>+</sup>调节细胞的缺陷,表现为肠黏膜中CD8<sup>+</sup>调节细胞体外抑制淋巴细胞增殖作用几乎消失,并可能出现TCR Vβ5.1-阳性的CD8明显降低,但CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T细胞的变化不明显<sup>[52]</sup>。

总之,目前对Tr细胞的确切作用机制、不同亚型的本质和相互作用还存在争议,和IBD的关系还不是很清楚。但是,在IBD中,Tr细胞无疑补充了传统的Th1/Th2理论。对Tr细胞进一步深入研究,不仅可以使我们加深对IBD发病机制的理解,而且提示Tr细胞可能成为新的治疗靶点,为IBD的治疗提供广阔的前景。

## 4 参考文献

- O'Neill EJ, Sundstedt A, Mazza G, Nicolson KS, Ponsford M, Saurer L, Streeter H, Anderton S, Wraith DC. Natural and induced regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1029: 180-192
- Levings MK, Allan S, d'Hennezel E, Piccirillo CA. Functional dynamics of naturally occurring regulatory T cells in health and autoimmunity. *Adv Immunol* 2006; 92: 119-155
- Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 2007; 13: 108-116
- Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 253-257
- Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003; 171: 6323-6327
- Randolph DA, Fathman CG. Cd4<sup>+</sup>Cd25<sup>+</sup> regulatory T cells and their therapeutic potential. *Annu Rev Med* 2006; 57: 381-402
- Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998; 10: 1969-1980
- Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000; 164: 183-190
- Sakaguchi S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531-562
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-1164
- Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 209-226
- Campbell DJ, Ziegler SF. FOXP3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 305-310
- Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007; 445: 771-775
- Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007; 445: 766-770
- Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 2007; 8: 277-284
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4<sup>+</sup> T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701-1711
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1693-1700
- Bruder D, Probst-Kepper M, Westendorf AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, von Boehmer H, Buer J, Hansen W. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 623-630
- Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002; 3: 135-142
- Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, Hipkiss EL, Ravi S, Kowalski J, Levitsky HI, Powell JD, Pardoll DM, Drake CG, Vignali DA. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004; 21: 503-513
- De Rosa V, Procaccini C, Cali G, Pirozzi G, Fontana S, Zappacosta S, La Cava A, Matarese G. A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. *Immunity* 2007; 26: 241-255
- Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, Voo KS, Peng W, Fu T, Wang DY, Li Y, Wang HY, Wang RF. Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4<sup>+</sup> regulatory T cell function. *Science* 2005; 309: 1380-1384
- Veldman C, Nagel A, Hertl M. Type I regulatory T cells in autoimmunity and inflammatory diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2006; 140: 174-183
- Jiang H, Chess L. Regulation of immune responses by T cells. *N Engl J Med* 2006; 354: 1166-1176
- Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, Zeitz M, Duchmann R. Peripheral and intestinal regulatory CD4<sup>+</sup> CD25(high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005; 128: 1868-1878
- Takahashi M, Nakamura K, Honda K, Kitamura Y, Mizutani T, Araki Y, Kabemura T, Chijiwa Y, Harada N, Nawata H. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 677-686
- Holmen N, Lundgren A, Lundin S, Bergin AM, Rudin A, Sjoval H, Ohman L. Functional CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity.



- Inflamm Bowel Dis* 2006; 12: 447-456
- 28 Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA. Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 191-199
  - 29 Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev* 2006; 212: 256-271
  - 30 Yuan Q, Bromley SK, Means TK, Jones KJ, Hayashi F, Bhan AK, Luster AD. CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *J Exp Med* 2007; 204: 1327-1334
  - 31 Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 1206-1212
  - 32 Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 2000; 192: 295-302
  - 33 Gad M, Pedersen AE, Kristensen NN, Claesson MH. Demonstration of strong enterobacterial reactivity of CD4+CD25- T cells from conventional and germ-free mice which is counter-regulated by CD4+CD25+ T cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 695-704
  - 34 Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, Nakamura T, Watanabe M. Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25+ and CD25- CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells. *J Immunol* 2003; 171: 708-716
  - 35 Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359: 693-699
  - 36 Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999; 190: 995-1004
  - 37 Asseman C, Read S, Powrie F. Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4+ regulatory T cells and IL-10. *J Immunol* 2003; 171: 971-978
  - 38 Boirivant M, Fuss IJ, Chu A, Strober W. Oxazolone colitis: A murine model of T helper cell type 2 colitis treatable with antibodies to interleukin 4. *J Exp Med* 1998; 188: 1929-1939
  - 39 Fantini MC, Becker C, Tubbe I, Nikolaev A, Lehr HA, Galle P, Neurath MF. Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* 2006; 55: 671-680
  - 40 Boirivant M, Pallone F, Di Giacinto C, Fina D, Monteleone I, Marinaro M, Caruso R, Colantoni A, Palmieri G, Sanchez M, Strober W, MacDonald TT, Monteleone G. Inhibition of Smad7 with a specific antisense oligonucleotide facilitates TGF-beta1-mediated suppression of colitis. *Gastroenterology* 2006; 131: 1786-1798
  - 41 Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 207-214
  - 42 Faria AM, Weiner HL. Oral tolerance. *Immunol Rev* 2005; 206: 232-259
  - 43 De Winter H, Elewaut D, Turovskaya O, Huflejt M, Shimeld C, Hagenbaugh A, Binder S, Takahashi I, Kronenberg M, Cheroute H. Regulation of mucosal immune responses by recombinant interleukin 10 produced by intestinal epithelial cells in mice. *Gastroenterology* 2002; 122: 1829-1841
  - 44 Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Presky DH, Waegell W, Strober W. Experimental granulomatous colitis in mice is abrogated by induction of TGF-beta-mediated oral tolerance. *J Exp Med* 1996; 183: 2605-2616
  - 45 Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 2006; 212: 28-50
  - 46 Battaglia M, Gregori S, Bacchetta R, Roncarolo MG. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin Immunol* 2006; 18: 120-127
  - 47 Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182: 68-79
  - 48 Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* 2001; 166: 5530-5539
  - 49 Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389: 737-742
  - 50 Foussat A, Cottrez F, Brun V, Fournier N, Breittmayer JP, Groux H. A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation. *J Immunol* 2003; 171: 5018-5026
  - 51 Menager-Marcq I, Pomie C, Romagnoli P, van Meerwijk JP. CD8+CD28- regulatory T lymphocytes prevent experimental inflammatory bowel disease in mice. *Gastroenterology* 2006; 131: 1775-1785
  - 52 Brimnes J, Allez M, Dotan I, Shao L, Nakazawa A, Mayer L. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2005; 174: 5814-5822

同行评价  
本文内容新颖、全面, 有较强的理论意义和参考价值。

编辑 程剑侠 电编 何基才

# 直肠癌Miles术会阴创口的处理

黄 烨, 王向阳

**背景资料**  
经腹会阴联合直肠癌切除术是治疗低位直肠癌的经典术式, 该手术须切除全部直肠、肛管、肛门及坐骨直肠窝组织, 因此, 会阴创口较大, 创面渗血渗液多且时间长, 骶前残留的巨大腔隙由于周围有骨性结构而不易闭合, 血液及渗出液常汇聚于此, 加之骶前的生理弯曲, 引流常不充分, 成为诱发感染的潜在危险因素。因此, 会阴创口处理的关键是消灭骶前及尾骨前残腔和有效的引流。近百年来, 学者们采用了各种方法以消灭残腔, 并不断地改进引流方式, 取得了较好的效果, 形成了两种基本的处理方法, 即会阴创口纱布填塞敞开引流法和会阴创口一期缝合法, 目前多采用一期缝合法。

黄烨, 王向阳, 华中科技大学同济医学院附属荆州医院胃肠外科 湖北省荆州市 434020  
通讯作者: 黄烨, 434020, 湖北省荆州市荆州区人民路1号, 华中科技大学同济医学院附属荆州医院胃肠外科. huangye2@263.net  
电话: 0716-8445110  
收稿日期: 2007-07-02 修回日期: 2007-09-26

## Treatment of the perineum wound following Miles' operation for rectum carcinoma

Ye Huang, Xiang-Yang Wang

Ye Huang, Xiang-Yang Wang, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Jingzhou Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Jingzhou 434020, Hubei Province, China  
Correspondence to: Ye Huang, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Jingzhou Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1 Renmin Road, Jingzhou District, Jingzhou 434020, Hubei Province, China. huangye2@263.net  
Received: 2007-07-02 Revised: 2007-09-26

## Abstract

There are two fundamental methods (placing wadding pledgets before opening outflow and primary suture) for treating the perineum wound following Miles' operation for rectum carcinoma. We review the great quantity of documents and reports from the last two decades on treating the perineum wound in Miles' operation for rectum carcinoma, summarize the indications and main procedure points, appraise the advantages and disadvantages of each approach, analyze the influential factors and measures of prevention and cure (that is, primary healing of the perineum wound), and introduce the ameliorative method of placing wadding pledgets before opening outflow.

**Key Words:** Rectum carcinoma; Miles operation; Perineum wound

Huang Y, Wang XY. Treatment of the perineum wound following Miles' operation for rectum carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 3020-3024

## 摘要

直肠癌Miles术会阴创口的处理主要有纱布填塞敞开引流和一期缝合两种基本方法。我们综合近20年来在此方面研究的大量文献报道, 总结了两种方法的适应症和操作要点, 评价了两种方法的优缺点, 分析了会阴创口一期愈合的影响因素及防治措施, 并提出了纱布填塞敞开引流法的改进方法。

**关键词:** 直肠癌; Miles术; 会阴创口

黄烨, 王向阳. 直肠癌Miles术会阴创口的处理. 世界华人消化杂志 2007; 15(28): 3020-3024  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3020.asp>

## 0 引言

经腹会阴联合直肠癌切除术(Miles术)是治疗低位直肠癌的经典术式。该手术须切除全部直肠、肛管、肛门及坐骨直肠窝组织, 因此, 会阴创口较大, 创面渗血渗液多且时间长, 骶前残留的巨大腔隙由于周围有骨性结构而不易闭合, 血液及渗出液常汇聚于此, 加之骶前的生理弯曲, 引流常不充分, 成为诱发感染的潜在危险因素。文献报道其感染率可高达42%<sup>[1]</sup>。骶前腔隙积液并感染是影响会阴创口愈合的主要因素, 因此, 会阴创口处理的关键是消灭骶前及尾骨前残腔和有效的引流。近百年来, 学者们采用了各种方法以消灭残腔, 并不断地改进引流方式, 取得了较好的效果, 形成了两种基本的处理方法, 即会阴创口纱布填塞敞开引流法和会阴创口一期缝合法。

## 1 会阴创口纱布填塞敞开引流法

Miles在做腹会阴直肠癌切除术时, 对会阴创口采用的是以纱布填塞的敞开引流法。原因是他认为, 直肠癌的淋巴转移有上方、侧方和下方3个方向, 为达到根治的目的, 主张切除肛门和广泛清除坐骨直肠窝内的组织, 导致术后会阴创口较大, 难以一期缝合, 故只能采用纱布填塞的开放引流法, 但其愈合时间较长, 一般在2 mo左

右. 敞开引流法沿用至今.

**1.1 会阴创口纱布填塞敞开引流法的适应症** 随着对直肠癌病理认识的提高和外科学技术的逐步改进, 会阴创口的处理逐渐改为一期缝合. 但有下列情况时, 仍主张采用纱布填塞敞开引流: (1) 距肛缘6-8 cm的弥漫浸润型(尤其年轻患者)直肠癌以及距肛缘6 cm以内的局限型直肠癌<sup>[2]</sup>, 应按肿瘤根治原则, 彻底清除坐骨直肠窝内组织, 并紧靠盆壁切断肛提肌; (2) 术中直肠破损, 会阴创口污染较重<sup>[3]</sup>; (3) 骶前创面中有难以止血的微小渗血<sup>[4]</sup>.

**1.2 盆底腹膜的重建** 上世纪初, Miles术后因会阴创口常规敞开引流, 为防止术后小肠脱出, 大都常规重建盆底腹膜. 若关闭盆底腹膜的缝线脱落, 局部形成缺损, 则小肠可能坠入盆腔形成盆腔疝和会阴疝, 引发小肠梗阻. 李学明 *et al*<sup>[5]</sup>报告Miles术后盆腔疝的发生率近1%, So *et al*<sup>[6]</sup>观察Miles术后会阴疝的发生率为0.6%. 因此, 有学者建议不缝合盆底腹膜, 而重点是会阴切口的关闭, 以避免这种并发症的发生. 国内鄂云翔<sup>[7]</sup>和周庆华 *et al*<sup>[8]</sup>亦采用开放盆底腹膜, 以小肠自然坠入充填骶前残腔, 会阴切口一期缝合, 仅发生会阴切口裂开2例, 未发生小肠脱出及小肠梗阻等并发症. 其机制是盆腔腹膜再生迅速, 可使盆底形成腹膜腔的一部分, 开放盆底腹膜, 可使尾骨及骶骨前间隙直接与腹腔相通, 该处积液可全部流入腹膜腔, 从而发挥腹膜的再吸收功能, 减少会阴部液体积聚, 保证切口一期愈合.

尽管开放盆底腹膜的方法省时省力, 效果尚可, 但文献报道并不多见, 主要原因可能有以下几点: (1) 直肠切除后, 整个盆壁均为剥离面, 无腹膜覆盖, 加之小肠坠入盆腔后距离较长, 容易形成肠粘连, 导致肠梗阻; (2) 若出现腹水、剧烈频繁的咳嗽以及小肠梗阻等情况, 引起腹压增大, 则会阴切口可能裂开, 出现小肠脱出等严重并发症; (3) 有证据表明大剂量的术后盆腔放疗会有效地降低复发率, 若小肠坠入盆腔, 则放射线可能造成急性小肠损伤. 因此, 无论术后是否行辅助放疗, 都应关闭盆底腹膜, 以避免小肠进入盆腔. 目前, 盆底腹膜的重建方法主要有以下几种: (1) 若盆底腹膜缺损不大, 可直接对缝两侧盆底腹膜, 并注意针距不可过大, 以不大于0.8 cm为宜, 否则, 极易造成内疝<sup>[4]</sup>; (2) 我们的体会是若盆底腹膜缺损较大, 可适当游离两侧盆腹膜, 并可利用子宫或膀胱后壁参与重建, 没有出现小肠脱出、梗阻及膀胱症状等并发症; (3) 段

东明 *et al*<sup>[9]</sup>报道采用盲肠填充术来修补盆底腹膜. 方法是先切开结肠侧腹膜, 游离升结肠, 一直分离到结肠肝区, 然后将盲肠拉入小骨盆内, 将其浆膜层与小骨盆附近腹膜固定缝合3-4针即可, 效果确实可靠; (4) 亦有报道使用补片重建盆底腹膜. Devereux *et al*<sup>[10]</sup>和Dasmahapatra *et al*<sup>[11]</sup>均采用了这种方法, 使用1-2块Dexon或Vicryl补片, 补片应固定在骶岬水平, 使用连续锁边缝合法将补片与两侧盆底腹膜缝合, 前方与前腹壁缝合, 从而避免小肠进入盆腔, 没有出现小肠梗阻, 急性放射性肠炎及与补片相关的并发症.

**1.3 会阴创口纱布填塞敞开引流法的操作要点** 切除标本后, 会阴部残留一很大的空腔, 创面应彻底止血, 盆侧壁及骶前的出血点必须电灼或结扎止血, 前列腺或阴道后壁表面的出血点则应缝扎止血. 然后用大量的温热盐水反复冲洗盆腔, 以清除坏死组织和可能脱落入手术野的癌细胞. 重建盆底腹膜后, 首先以大块凡士林油纱布覆盖在创面上, 然后再以大块干纱布填塞于会阴创腔内, 应该稍紧一些, 填满后将会阴皮肤缝合4-6针, 以防止纱布脱出, 皮肤表面再盖上无菌纱布.

因会阴创口渗血渗液较多, 术后3 d内应每日更换伤口敷料2-3次, 术后第3天开始拆除会阴缝线, 逐步将大纱布及凡士林纱布取出, 至术后第5天取尽. 可以用生理盐水和双氧水冲洗会阴创口, 术后第10天开始用1/5000的温热高锰酸钾溶液坐浴, 每日2-3次, 每次约15 min, 直到伤口愈合. 一般情况下骶前创面完全愈合大约需2 mo左右<sup>[12]</sup>.

**1.4 会阴创口纱布填塞敞开引流法的评价** 会阴创口敞开引流可以保证手术按肿瘤根治原则进行, 彻底清除坐骨直肠窝内的淋巴脂肪组织, 有利于骶前间隙的引流, 由于肉芽组织由内向外生长, 不易形成瘘管及炎性肉芽肿. 当然敞开引流法也有不尽人意的地方, 如术后1 wk内换药次数多, 医生工作量大, 更换敷料常给患者带来痛苦, 会阴创口愈合慢, 平均愈合时间为2 mo, 最长达6 mo.

**1.5 会阴创口纱布填塞敞开引流法的改进** 鉴于会阴创口纱布填塞敞开引流法有上述缺点, 我们对其进行了改进, 采用先缝后敞的方法, 即先缝合会阴创口皮肤及皮下组织, 术后第7天拆除缝线敞开会阴创口, 术后第10天开始行PP粉坐浴, 取得了较好的效果, 换药次数、换药费用及创口愈合时间(55/65 d)明显少于填塞组, 避免了

#### 相关报道

黄平 *et al*采用Miles术中术后开放会阴创口的方法, 无明显并发症. 黄烨 *et al*采用先缝后敞法, 创口愈合时间缩短, 方法简便实用. 姬清华 *et al*采用一期缝合加创腔引流, 创口愈合快, 但合并创腔感染及愈合不良. 饶华民采用大网膜填塞会阴创腔, 平均愈合时间为14 d, 并发大网膜坏死1例, 创腔感染1例.

**创新盘点**  
本文从直肠癌Miles术会阴创口的处理入手,总结近20年来国内外的研究情况,多方探讨了各种会阴创口处理方法的适应症、操作要点及优缺点,并提出了纱布填塞敞开引流法的改进方法。

患者因取纱布带来的痛苦,降低了患者的医药费用,也减轻了医生的工作量,患者可以很简便地自行护理会阴创口,不影响日常生活及术后放化疗。会阴创口一般仅有少量白色分泌物附着,无感染、积液、炎性肉芽肿及瘘管形成<sup>[13]</sup>。填塞组创口愈合慢的原因可能是大量纱布长时间填塞于骶前腔内,阻碍了小肠、大网膜及盆底腹膜的下降,膀胱及子宫的后移和臀部软组织上移,加之纱布刺激会阴创面产生更多的渗液,从而影响了会阴创口的愈合。

## 2 会阴创口一期缝合法

因Miles术会阴创口采用敞开引流的愈合时间较长,故学者们不断探索新的方法,以期缩短会阴创口愈合时间。1963年开始对会阴创口采用部分缝合法,但愈合时间仍嫌过长;70年代初采用一期缝合法处理会阴创口,愈合效果良好,时间大为缩短。目前,其已成为临床首选方法。

**2.1 会阴创口一期缝合的适应症** 近期文献报道,会阴创口一期缝合愈合率在38%-94%之间<sup>[14-15]</sup>,仍有部分会阴创口一期缝合后愈合不良或合并感染,需敞开引流。Delalande *et al*<sup>[16]</sup>比较会阴创口一期缝合与纱布填塞两种处理方法,发现近期死亡率、平均住院天数(25/27 d)及3 mo内治愈率无明显差别,而1 mo内的治愈率差别明显(30% vs 0%),较短的瘢痕延期形成时间亦有明显差别(47/69 d),前者有两个患者1年内未愈合,形成血肿、会阴脓肿,所以会阴创口一期缝合附加引流术能促进伤口的愈合但需要两次手术的机会多一些。因此,必须严格掌握适应症。目前认为有下列情况时,不宜一期缝合:(1)局部弥漫浸润型低位直肠癌及肛管癌,会阴部组织广泛清除者;(2)肠道准备不充分,术中分离造成直肠破裂,会阴创口污染较重者;(3)会阴创面有难以控制的广泛渗血者;(4)合并糖尿病、高血压、肺气肿等疾病,因组织修复能力差,难以一期愈合<sup>[17]</sup>。

**2.2 会阴创口一期缝合的操作要点** 切除标本后,会阴创面彻底止血,用大量温热盐水反复冲洗手术野,以清除会阴创口内的积血积液、坏死组织和可能脱落的癌细胞,于骶前及尾骨前间隙内放置引流管。重建盆底腹膜后,先将残留的肛提肌与前阴道后壁或前列腺包膜缝合或用臀大肌束与残留的肛提肌缝合,再缝合两侧的软组织,尽量缩小会阴残腔,最后一层缝合会阴皮肤及皮下组织。早期会阴部引

流多为单管引流,目前多采用双管引流加负压吸引并间断会阴创腔灌洗,效果较好。在术后第10-15天可拔除引流管,创面可以达到一期愈合。

**双腔双管引流置管方法:** 采用两根内径为0.8 cm,长约40 cm的乳胶管,内置直径为0.5 cm的导尿管或乳胶管制成双套管。进水双套管尖端剪两个直径为0.5 cm的小侧孔,出水双套管剪3-4个较大的侧孔。进水管放在骶前腔较高的位置,出水管放在其下方约2-3 cm左右。出水管应有两个侧孔在尾骨前间隙内,两管分别从会阴切口两侧皮肤开口引出。术毕后,进水管可用盐水冲洗,出水管接负压吸引。

**2.3 会阴创口一期愈合的影响因素及防治措施** 影响会阴创口一期愈合最根本的因素(骶前残留的巨大腔隙周围有骨性结构而不易闭合所致),加上其他的全身和局部因素,导致会阴组织感染率较高,影响会阴创口的一期愈合。现就影响创口愈合的几个重要因素论述如下。

**2.3.1 全身疾病** 影响所有手术切口愈合的因素同样也是影响会阴创口愈合的因素,如中重度贫血、低蛋白血症、营养不良、糖尿病等,故术前应进行糖尿病治疗,纠正贫血、低蛋白血症及营养不良等疾病。

**2.3.2 术前肠道准备** 大肠内粪便含有大量细菌,直肠手术即便是在严格无菌操作下进行,仍有40%创面有细菌生长可能。通过术前肠道准备,使肠道处于无粪少菌状态,即可减少或避免感染,保证创口一期愈合。目前,多采用po甲硝唑加全消化道清洁法,有报道称此法可使肠腔细菌数减少97%,创口感染率下降28%。

**2.3.3 会阴创口出血** 术中止血不彻底,术后较长时间渗血,会导致骶前间隙积血,阻塞引流管,促成细菌的生产繁殖。

**2.3.4 术中直肠及阴道破损** 文献报道术中分破直肠后,一半患者的会阴创口将感染<sup>[18]</sup>,会阴创口一期缝合感染率的高低与术中分破直肠污染创面与否有关,其会阴创口感染率明显高于无破损者。因此,术中应缝闭肛门,尽量避免分破直肠及阴道,防止肠内容物外溢。对已有直肠和阴道破损者,术中应以稀碘伏和大量生理盐水反复冲洗创面,可降低感染率。

**2.3.5 术中腹盆腔冲洗** 术中腹盆腔冲洗能清除坏死组织、积血及淋巴液等,文献报道腹盆腔冲洗者切口感染率为7%,未冲洗者切口感染率为25%,有明显统计学差异<sup>[18]</sup>,因此,术中应以



表 1 不同引流方式的会阴创口愈合及感染率

作者	报道时间	引流方式	<i>n</i>	一期愈合 $n$ (%)	创口感染率(%)
徐光 <sup>[1]</sup>	1991年	单管引流加负压吸引	40	23(57.5)	42.5
		双管引流加负压吸引	40	35(87.5)	12.5
单吉贤 <sup>[19]</sup>	1993年	单管引流	101	65(64.4)	23.8
刘家邦 <sup>[14]</sup>	1996年	烟卷加单管引流	48	18(37.5)	12.5
		双管引流加负压吸引	61	52(85.2)	1.64
曲化远 <sup>[20]</sup>	1997年	双管引流加灌洗	180	164(91.1)	2.20
韦军民 <sup>[15]</sup>	1998年	双腔双管引流加负压吸引	136	128(94.0)	6.00
		双管单腔引流加负压吸引	24	20(83.0)	17.0
邓蓓 <sup>[21]</sup>	1999年	双管引流加间断灌洗加负压吸引	176	165(93.8)	3.40
王海江 <sup>[22]</sup>	2002年	双管引流加负压吸引	56	52(92.9)	1.80

大量温热盐水反复冲洗创面, 尽量清除坏死组织、积血、积液及细菌。

**2.3.6 会阴创口引流** 会阴创口引流的目的是引流骶前及尾骨前间隙的积血及积液, 缩小残腔, 从而减少感染机会, 以便会阴创口尽早愈合。早期多采用烟卷引流及单管引流, 无负压吸引, 目前多采用双管引流加间断或持续灌洗, 同时负压吸引。从表1可以看出, 烟卷及单管开放式引流效果差, 一期愈合率低, 感染率高, 而双管引流加间断或持续灌洗同时负压吸引效果好, 一期愈合率可达到94%, 感染率为2%-3%。采用双管引流加骶前灌洗能有效地清除骶前腔隙的积血、积液及坏死脱落组织, 降低创面细菌密度和毒力, 可避免负压吸引造成创面渗液增加组织水肿, 并可使盆腔腹膜紧贴骶骨和盆底组织, 缩小盆底间隙, 从而降低会阴切口的感染, 有利于切口愈合<sup>[23]</sup>。

**2.3.7 引流位置** 引流管放置不当, 可造成引流不畅。引流管可经会阴切口或切口侧方或耻骨上腹壁拉出, 经耻骨上腹壁拉出引流虽换药方便, 但其位置较高, 且流程较长, 不利于引流。文献报道经会阴切口侧方拉出引流的切口感染率(7%)明显低于经会阴切口拉出引流者(22%)<sup>[18]</sup>, 故目前多采用会阴部切口侧方引流。

**2.4 会阴创腔的填塞治疗** 会阴创口一期缝合后, 骶前及尾骨前的巨大腔隙难以闭合。国外学者曾尝试用各种方法填塞会阴创腔, 以促进会阴创口的愈合, 如带蒂大网膜移植, 股薄肌、臀大肌和腹直肌皮瓣移植等。de Haas *et al*<sup>[24]</sup>用腹直肌肌皮瓣填塞会阴部死腔并缝合会阴伤口治疗大的、难以愈合的会阴部(放疗后)伤口取得较好效果, 但因技术复杂, 创伤大而难以推广。唯以大网膜填塞会阴创腔效果较好, 国内外应

用较多, 原因是大网膜有很强的吸收及抗感染能力, 而且具有血运丰富、活动度大、可塑性强、取材容易、不产生纤维硬化等特点。1970年Buckley用带蒂大网膜填塞直肠癌根治术后形成的会阴部创腔, 创口一期愈合。国内金秀然 *et al*<sup>[25]</sup>、王成峰 *et al*<sup>[26]</sup>、李东苗 *et al*<sup>[27]</sup>、饶华民<sup>[28]</sup>报道, 会阴创口一期愈合率多在80%-92%之间。大网膜填塞会阴创腔可减少局部感染及局部疤痕的形成, 有利于会阴创口一期愈合, 使患者能早期进行术后放化疗。

**手术方法:** 切除标本后, 会阴创面彻底止血, 以大量盐水冲洗腹盆腔, 然后行大网膜剪裁及腹膜后隧道成形。根据大网膜进入盆腔的途径可分为左、中、右3个入路。左路经降结肠旁沟腹膜后隧道入盆<sup>[25-26]</sup>, 需保留胃网膜左动脉; 右路经升结肠旁沟腹膜后隧道入盆, 需保留胃网膜右动脉; 中路经脊柱左侧腹膜后隧道入盆<sup>[29]</sup>。使大网膜在无张力状况下达尾骨尖, 可重建或开放盆底腹膜, 会阴部仍需放置引流管, 一层缝合会阴创口。经游离腹腔入盆, 易产生肠梗阻并发症; 经腹膜后隧道入盆, 可避免此类并发症。腹膜后隧道以中路法最好, 较左路, 右路法, 有隧道短、成形容易、隧道位于腹部切口下、显露清楚及操作方便等优点, 隧道成形手术较其他方法缩短一半时间<sup>[30]</sup>。

**2.5 会阴创口一期缝合法的评价** 会阴创口一期缝合能减轻术后会阴部伤口的疼痛, 避免更换敷料的痛苦, 加快患者的恢复, 缩短会阴部伤口愈合的时间, 愈合时间多在15 d左右, 少数Ⅱ期愈合多在30 d内, 术后可尽早补充放疗。但仍有部分伤口愈合不良或合并感染, 需要敞开引流, 并且容易形成瘘管及炎性肉芽肿。另外, 需常规行创腔冲洗, 不仅会限制患者的活动, 而且引流

#### 应用要点

本文的实际应用价值在于为大家提出了各种处理方法的适应症和操作要点, 并总结了会阴创口一期愈合的影响因素及防治措施, 为临床工作提供指导。

#### 名词解释

会阴创口: Miles术后在盆腔内残留的一个巨大腔隙, 其前壁为膀胱(子宫)、前列腺及尿道(阴道后壁), 后壁为骶骨和尾骨, 两侧壁为坐骨和盆壁软组织, 下壁为缝合后的会阴部皮肤及皮下组织, 上壁为盆底腹膜。因此, 盆底腹膜的重建是会阴创口处理的重要组成部分。

同行评价  
本文选题实用, 资料可靠, 对临床有一定的借鉴价值和参考意义。

管常有阻塞现象, 需随时调整引流管, 增加医生及护士的工作量。

### 3 参考文献

- 1 徐光, 左学鑫, 白练. 预防Miles手术后感染方法的前瞻性对照研究. 实用癌症杂志 1991; 6: 31-33
- 2 黄平, 楼荣灿, 李德川, 陈贤贵, 陈万源, 曹浩明. Miles术中术后会阴部开放创口的处理. 中国肿瘤 2001; 10: 176-177
- 3 吕厚山, 王杉. 结肠与直肠外科学. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 697-698
- 4 王军. 遗传性大肠肿瘤学. 第1版. 北京: 北京科学技术出版社, 2004: 113-120
- 5 李学明, 戴安邦. 直肠癌Miles术后盆底腹膜裂孔疝3例报告. 实用癌症杂志 2002; 17: 133-134
- 6 So JB, Palmer MT, Shellito PC. Postoperative perineal hernia. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 954-957
- 7 鄂翔翔. 直肠癌Miles术式盆底腹膜开放探讨. 徐州医学院学报 1999; 19: 191-192
- 8 周庆华, 蔡中瑞, 何柏威. Miles手术会阴伤口一期缝合. 腹部外科 2000; 13: 89-90
- 9 段东明, 王轶伟, 张建志, 邢玉新, 谷川. 直肠癌根治术盆底腹膜缺损的盲肠填充术. 临床外科杂志 2004; 12: 649
- 10 Devereux DF, Eisenstate T, Zinkin L. The safe and effective use of postoperative radiation therapy in modified Astler Collier Stage C3 rectal cancer. *Cancer* 1989; 63: 2393-2396
- 11 Dasmahapatra KS, Swaminathan AP. The use of a biodegradable mesh to prevent radiation-associated small-bowel injury. *Arch Surg* 1991; 126: 366-369
- 12 刘宝善, 许玉成, 王辉, 董新舒. 大肠肛门肿瘤学. 第1版. 成都: 四川科学技术出版社, 1998: 311-312
- 13 黄烨, 王向阳, 庞典付, 张克难, 冯安明. 直肠癌Miles术会阴创口处理方法的改进. 中国癌症杂志 2007; 17: 473-475
- 14 刘家邦, 周建华. 直肠癌Miles手术会阴部切口一期缝合125例分析. 临床外科杂志 1996; 4: 220-221
- 15 韦军民, 苏伟, 谭树平, 曹金铎. 骶前腔双套管引流在Miles手术病人中的应用(附136例分析). 中国实用外科杂志 1998; 18: 215-216
- 16 Delalande JP, Hay JM, Fingerhut A, Kohlmann G, Paquet JC. Perineal wound management after

abdominoperineal rectal excision for carcinoma with unsatisfactory hemostasis or gross septic contamination: primary closure vs. packing. A multicenter, controlled trial. French Association for Surgical Research. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 890-896

- 17 姬清华, 鞠冬阳, 张汝一, 颜登国. Miles术会阴一期缝合伤口的处理. 贵阳医学院学报 2002; 27: 274-276
- 18 杨国风, 王福义, 华南, 王晓明, 刘峰. 直肠癌Miles手术会阴部切口一期缝合效果观察(附108例分析). 实用肿瘤学杂志 1994; 2: 45-46
- 19 单吉贤, 王舒宝, 陈峻青, 齐春莲. 直肠癌Miles术后会阴切口缝合并发症处理体会. 实用外科杂志 1993; 13: 39-40
- 20 曲化远, 宗修锟, 陈源光. Miles术后持续灌洗防治会阴切口感染体会(附180例临床报告). 中国实用外科杂志 1997; 17: 357
- 21 邓蓓, 陈增蓉, 杨维琼, 张刚. 骶前冲洗引流在直肠癌Miles术后的应用及护理. 实用护理杂志 1999; 15: 27-28
- 22 王海江, 尹东, 刘江齐. Miles术会阴伤口 一期缝合56例临床分析. 新疆医科大学学报 2002; 25: 161-162
- 23 杨勇, 王振军. Miles手术后会阴部切口愈合的影响因素及防治. 结直肠肛门外科 2006; 12: 207-209
- 24 de Haas WG, Miller MJ, Temple WJ, Kroll SS, Schusterman MA, Reece GP, Skibber JM. Perineal wound closure with the rectus abdominis musculocutaneous flap after tumor ablation. *Ann Surg Oncol* 1995; 2: 400-406
- 25 金秀然, 谢国璋, 张君强, 宋尉官. 带蒂大网膜充填直肠癌切除术后骶前腔49例临床分析. 中国实用外科杂志 1994; 14: 595-597
- 26 王成峰, 邵永孚, 张海增, 兰忠民. 大网膜在直肠癌腹会阴联合根治术中会阴伤口的应用. 中国肿瘤临床 2001; 28: 310-311
- 27 李东苗, 李俊华. 带蒂大网膜盆腔转移在直肠癌手术中的应用(附100例报告). 贵州医药 2004; 28: 154-155
- 28 饶华民. 游离大网膜在直肠癌Miles术后会阴创面的应用. 实用癌症杂志 2005; 20: 543
- 29 高增书. 直肠癌切除术后带蒂大网膜填塞骶前腔29例临床分析. 河北医科大学学报 1996; 17: 155-156
- 30 高增书, 尹长恒, 宋德余, 刘防震, 谷云芝, 刘玉平. 直肠癌根治术中带蒂大网膜移植的价值. 世界华人消化杂志 1998; 6: 875-876

编辑 何燕 电编 郭海丽

# 端粒长度测量方法的研究进展

刘义, 汉丽梅, 潘永荣, 金勇

刘义, 汉丽梅, 潘永荣, 金勇, 沈阳农业大学畜牧兽医学院 辽宁省沈阳市 110161  
教育部留学回国人员科研启动基金, No. 2006331  
辽宁省科学技术博士启动基金, No. 20061044  
通讯作者: 汉丽梅, 110161, 辽宁省沈阳市, 沈阳农业大学畜牧兽医学院生物化学教研室. limeihan@hotmail.com  
电话: 024-88487156  
收稿日期: 2007-05-30 修回日期: 2007-09-24

## Progress in telomere length measurement methods

Yi Liu, Li-Mei Han, Yong-Rong Pan, Yong Jin

Yi Liu, Li-Mei Han, Yong-Rong Pan, Yong Jin, College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning Province, China

Supported by: The Scientific Research Foundation for Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry, No. 2006331, and Doctoral Science Technology Foundation of Liaoning Province No. 20061044

Correspondence to: Li-Mei Han, Department of Biochemistry, College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning Province, China. limeihan@hotmail.com

Received: 2007-05-30 Revised: 2007-09-24

## Abstract

Research indicate that telomere is relative to certain diseases such as cancer. Telomerase activity, replicative history and genetic stability of the cells are all reflected in telomere length. Since telomerase is known to be activated and have its length changed by certain cancers, assessments of telomere length are important for disease investigation and analysis. We here describe several methods for detecting telomere length.

Key Words: Telomere; Measurement

Liu Y, Han LM, Pan YR, Jin Y. Progress in telomere length measurement methods. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 3025-3028

## 摘要

近年来研究表明端粒的长短同癌症的发生有密切联系, 各国学者报道了大量与端粒相关的研究. 端粒长短测量法则成为研究端粒的重要

手段. 本文总结了多种端粒测量方法, 对相关疾病研究有一定指导意义.

关键词: 端粒; 测量

刘义, 汉丽梅, 潘永荣, 金勇. 端粒长度测量方法的研究进展. 世界华人消化杂志 2007;15(28):3025-3028

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3025.asp>

## 背景资料

近年有关端粒研究端粒长短的变化与疾病的发生密切相关, 在科学研究中经常通过测量端粒长度来研究某种疾病.

## 0 引言

端粒长度的变化是癌症发生的重要指针, 监测端粒长度变化则是研究癌症发生的重要手段. 近年来报道了多种端粒长度测量方法, 从简单易行的DNA印迹法到单个染色体水平上的端粒测量方法都可以测量端粒的长度. 根据不同的试验材料及试验目的, 应该有针对性地选择端粒测量方法.

## 1 端粒及其作用

端粒-线性DNA分子末端特殊的核蛋白结构决定染色体末端长度, 使DNA免受不恰当的修复以及防止端-端融合和核酸外切酶的降解<sup>[1-2]</sup>. 端粒通常为富含TG简单重复序列(TTAGGG)<sup>[3]</sup>, 但是不同真核生物的端粒重复序列不同. 除了端粒酶可以保护端粒不被降解以外, Rad50蛋白也有维持端粒长度的作用<sup>[4]</sup>. 研究表明, 端粒和端粒相关序列与某些疾病发生相关<sup>[5]</sup>. 端粒还能够抑制临近基因的转录<sup>[1]</sup>. 因此研究端粒、端粒相关序列在疾病发生特别是癌症发生中有重大意义.

## 2 端粒长度的测量方法

2.1 DNA印迹法(Southern blot, SB) SB已广泛应用于分析DNA和端粒结构<sup>[6]</sup>. 用限制性核酸内切酶Hinf I 或Rsa I 消化DNA, 然后琼脂糖电泳分离不同大小的片段, 转移到硝酸纤维或尼龙膜上. 用<sup>32</sup>P同位素或生物素、碱性磷酸酯酶标记的端粒特异探针与其杂交(CCCATT)<sub>n</sub>. 末端限制酶切片段(TRF)通过光密度计定量测量<sup>[7]</sup>. 选用Hinf I 或Rsa I 是因为这两种酶能频繁的切断DNA, 使亚端粒区域变得尽可能小. 用于SB分析

**应用要点**  
本文总结了多种测量端粒长度的方法,在何种条件下应用哪种方法较合适,对疾病研究有一定参考意义。

的DNA应该没有被打碎和纯度较高的,但是因为DNA的高分子量、高黏度使得这点较难保证。TRF法得到的数据除代表所有染色体端粒的长度外,还包括部分亚端粒区长度。因此TRF法不能提供端粒的实际长度<sup>[7]</sup>。

**2.2 杂交保护分析法(hybridization protection assay, HPA)** HPA需要制备基因组DNA、细胞或组织溶胞产物同吡啶酯(AE)标记端粒的探针进行杂交,检测发光强度,确定端粒在Alu序列中比例。研究表明,Alu序列中比例为0.01的端粒大约与2 kb的TRF法测量的端粒长度对应。HPA不需要完整的或没有修剪的DNA,但是,推荐使用下限为10 ng修剪过的DNA。纯化的细胞DNA或至少含有1000个细胞的组织溶胞产物都能用于测量。虽然HPA不包括亚端粒序列,但是HPA法没有给出详细的细胞或染色体水平的端粒信息,也不能直接测定端粒长度<sup>[8]</sup>。

**2.3 荧光原位杂交(FISH)**<sup>[9]</sup> FISH直接将寡核苷酸探针标记在端粒序列上<sup>[10-12]</sup>。标准的FISH包括制作分裂中期的染色体以及DNA变性,与异硫氰酸荧光素(FITC)或Cy3标记的寡核苷酸探针杂交,用DAPI或PI复染,最后用荧光显微镜检测信号<sup>[13]</sup>。FISH方法被广泛地应用于特定基因的细胞遗传学研究。FISH自身的特点使其适合于测定端粒长度,如小的端粒探针可增加进入细胞的渗透度,而且单链探针不需要退火。

几种改良的FISH:用FISH方法进行的端粒定量被称作Q-FISH<sup>[14-15]</sup>(Quantitative-FISH)。Lansdorp *et al*<sup>[10]</sup>用核酸肽(PNA)寡核苷酸探针(PNA-FISH)代替寡核苷酸探针改良了Q-FISH法。因为带电的脱氧核糖磷酸盐主链被肽链连接的不带电N-(2-氨基乙基)-甘氨酸主链替代<sup>[16]</sup>,PNA探针的复式结构远比DNA/DNA或DNA/RNA的稳定。结合FISH和免疫染色(TELI-FISH)的方法可以测量用甲醛固定,石蜡包埋的人组织样本的端粒,同时还可以鉴别细胞种类。在TELI-FISH中只需用很少的细胞,这种方法可以忽略不同细胞种类而直接比较正常和癌变细胞的端粒长度<sup>[17]</sup>。Perner *et al*<sup>[18]</sup>发明了端粒/着丝粒-FISH(T/C-FISH)测量每个单独的染色体臂的端粒长度的方法,2号染色体着丝粒作内参。荧光强度的比率经过计算同TRF法有很好的相关性。Yan *et al*在染色体/DNA纤维制备中应用了Fiber-FISH法<sup>[19-20]</sup>。端粒的特异PNA Green探针和1q亚端粒的特异Red探针在染色质纤维上同时杂交,已知的1q亚端

粒探针大小为100 kb。因为解压缩的染色质的可变伸缩性使得纤维杂交的时候显色长度变得可变。然而,目的序列同亚端粒探针有相似的伸缩程度。因此,用已知大小的亚端粒探针作对照对判断DNA纤维解压缩的程度起很重要的作用。在检测淋巴瘤细胞系1q时,端粒和亚端粒排列在纤维上的信号范围分别在0.9  $\mu\text{m}$ -2.9  $\mu\text{m}$ 和13.8-29  $\mu\text{m}$ 之间。这意味着根据纤维的不同伸展程度杂交到纤维上的探针可见长度为3.4-7.2 kb/ $\mu\text{m}$ (平均5.5 kb/ $\mu\text{m}$ )。

**2.4 流式细胞计量-荧光原位杂交(Flow-FISH)** Flow-FISH包括6个基本步骤:细胞分离,DNA变性并与PNA探针杂交,洗去多余探针,复染后用流式细胞计量术采集和分析<sup>[21]</sup>。来自不同细胞系和临床样本的骨髓、血液淋巴结、经过检测的扁桃体的端粒长度值同TRF法有很好的相关性<sup>[22]</sup>。同Q-FISH相反,Flow-FISH可以分析周期中和非周期中的细胞端粒,整个操作只需1 d<sup>[21-23]</sup>。此外,不同的细胞亚群能够同时处理,这对于分析较难纯化的细胞是很有用的<sup>[24]</sup>。Flow-FISH法测定端粒长度在研究有核血细胞在正常个体和病态个体的血液病时有很高的实用性<sup>[25-26]</sup>。Flow-FISH同时分析端粒长度和细胞表型的技术难度很高,因为只有很少的带有合适发射光谱的荧光染料能承受DNA变性和PNA杂交的条件。Baerlocher *et al*<sup>[27]</sup>运用Hydra 96孔微型分注器测量端粒长度<sup>[28]</sup>,他可以定量差异很小(0.5 kb)的端粒片段,而且只用很少的细胞(1000个)。当同时测量复杂样品时,这种自动化操作尽显优势。

**2.5 寡核苷酸引物原位DNA合成法(PRINS)**<sup>[29-31]</sup> 寡核苷酸引物(CCCTAA)7与分裂中期或分裂间期的同源染色体退火、杂交,加入热稳定DNA聚合酶和荧光标记的核苷酸后引物开始延伸,最终通过荧光显微镜分析荧光信号<sup>[32]</sup>。许多位点的引物同时扩增保证了充足的荧光信号得以检测,但是不均匀的引物退火可能导致端粒长度测量不充分。一些用于增加标记和退火功效的改良,双脱氧核苷酸的参与可以通过减少染色体被随机打断的非相关DNA的扩增而使更多特异端粒序列被标记<sup>[33-34]</sup>。最近,Yan *et al*<sup>[35]</sup>用双链PRINS法,即(TTAGGG)7和(CCCTAA)7两个引物标记端粒DNA的正链和反链。两个方向的标记使产物的信号得以加强,标记功效增加到78%至95%。





- N. Mesenchymal stem cells with high telomerase expression do not actively restore their chromosome arm specific telomere length pattern after exposure to ionizing radiation. *BMC Mol Biol* 2007; 8: 49
- 16 Uhlmann V, Prasad M, Silva I, Luettich K, Grande L, Alonso L, Thisted M, Pluzek KJ, Gorst J, Ring M, Sweeney M, Kenny C, Martin C, Russell J, Bermingham N, O'Donovan M, Sheils O, O'Leary JJ. Improved in situ detection method for telomeric tandem repeats in metaphase spreads and interphase nuclei. *Mol Pathol* 2000; 53: 48-50
- 17 Meeker AK, Gage WR, Hicks JL, Simon I, Coffman JR, Platz EA, March GE, De Marzo AM. Telomere length assessment in human archival tissues: combined telomere fluorescence in situ hybridization and immunostaining. *Am J Pathol* 2002; 160: 1259-1268
- 18 Perner S, Bruderlein S, Hasel C, Waibel I, Holdenried A, Ciloglu N, Chopurian H, Nielsen KV, Plesch A, Hogel J, Moller P. Quantifying telomere lengths of human individual chromosome arms by centromere-calibrated fluorescence in situ hybridization and digital imaging. *Am J Pathol* 2003; 163: 1751-1756
- 19 Lavania UC, Basu S, Srivastava S, Mukai Y, Lavania S. In situ chromosomal localization of rDNA sites in "Safed Musli" *Chlorophytum ker-gawl* and their physical measurement by fiber FISH. *J Hered* 2005; 96: 155-160
- 20 Ersfeld K. Fiber-FISH: fluorescence in situ hybridization on stretched DNA. *Methods Mol Biol* 2004; 270: 395-402
- 21 Baerlocher GM, Mak J, Tien T, Lansdorp PM. Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry: tips and pitfalls. *Cytometry* 2002; 47: 89-99
- 22 Hultdin M, Gronlund E, Norrback K, Eriksson-Lindstrom E, Just T, Roos G. Telomere analysis by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 3651-3656
- 23 Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 743-747
- 24 Schmid I, Dagarag MD, Hausner MA, Matud JL, Just T, Effros RB, Jamieson BD. Simultaneous flow cytometric analysis of two cell surface markers, telomere length, and DNA content. *Cytometry* 2002; 49: 96-105
- 25 Brummendorf TH, Maciejewski JP, Mak J, Young NS, Lansdorp PM. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood* 2001; 97: 895-900
- 26 Brummendorf TH, Holyoake TL, Rufer N, Barnett MJ, Schulzer M, Eaves CJ, Eaves AC, Lansdorp PM. Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood* 2000; 95: 1883-1890
- 27 Baerlocher GM, Vulto I, de Jong G, Lansdorp PM. Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH). *Nat Protoc* 2006; 1: 2365-2376
- 28 Baerlocher GM, Lansdorp PM. Telomere length measurements in leukocyte subsets by automated multicolor flow-FISH. *Cytometry A* 2003; 55: 1-6
- 29 Bonifacio S, Centrone C, Da Prato L, Scordo MR, Estienne M, Torricelli F. Use of primed in situ labeling (PRINS) for the detection of telomeric deletions associated with mental retardation. *Cytogenet Cell Genet* 2001; 93: 16-18
- 30 Philippe C, Coullin P, Bernheim A. Double telomeric signals on single chromatids revealed by FISH and PRINS. *Ann Genet* 1999; 42: 202-209
- 31 Bolzan AD, Bianchi MS. Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations. *Mutat Res* 2006; 612: 189-214
- 32 Lavoie J, Bronsard M, Lebel M, Drouin R. Mouse telomere analysis using an optimized primed in situ (PRINS) labeling technique. *Chromosoma* 2003; 111: 438-444
- 33 Malaska J, Sklenickova M, Krejci K, Fajkusova L, Bajer M, Hrstkova H, Fajkus J. Telomerase activity and expression and telomere analysis in situ in the course of treatment of childhood leukemias. *Blood Cells Mol Dis* 2000; 26: 534-539
- 34 Krejci K, Koch J. An in situ study of variant telomeric repeats in human chromosomes. *Genomics* 1999; 58: 202-206
- 35 Yan J, Chen BZ, Bouchard EF, Drouin R. The labeling efficiency of human telomeres is increased by double-strand PRINS. *Chromosoma* 2004; 113: 204-209
- 36 Callicott RJ, Womack JE. Real-time PCR assay for measurement of mouse telomeres. *Comp Med* 2006; 56: 17-22
- 37 Betts DH, Perrault S, Harrington L, King WA. Quantitative analysis of telomerase activity and telomere length in domestic animal clones. *Methods Mol Biol* 2006; 325: 149-180
- 38 Gil ME, Coetzer TL. Real-time quantitative PCR of telomere length. *Mol Biotechnol* 2004; 27: 169-172
- 39 Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e47
- 40 Baird DM, Rowson J, Wynford-Thomas D, Kipling D. Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells. *Nat Genet* 2003; 33: 203-207
- 41 Cheung I, Schertzer M, Baross A, Rose AM, Lansdorp PM, Baird DM. Strain-specific telomere length revealed by single telomere length analysis in *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 3383-3391
- 42 Baird DM, Davis T, Rowson J, Jones CJ, Kipling D. Normal telomere erosion rates at the single cell level in Werner syndrome fibroblast cells. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1515-1524

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

# 肿瘤基因组中体细胞性改变的研究进展

杨壹玲, 褚嘉祐

杨壹玲, 褚嘉祐, 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所遗传室 云南省昆明市 650118  
美国中华医学基金会(CMB)资助项目, No. 04-805  
通讯作者: 褚嘉祐, 650118, 云南省昆明市茭菱路379号, 中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所. chujiy@imbcams.com.cn  
电话: 0871-8334872 传真: 0871-8334188  
收稿日期: 2007-06-28 修回日期: 2007-09-20

## Progress in research on somatic alterations in the oncogenome

Yi-Ling Yang, Jia-You Chu

Yi-Ling Yang, Jia-You Chu, the Department of Genetics, Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650118, Yunnan Province, China

Supported by: China Medical Board of New York Inc. No. 04-805

Correspondence to: Prof. Jia-You Chu, Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, 379 Jiaoling Road, Kunming 650118, Yunnan province, China. chujiy@imbcams.com.cn

Received: 2007-06-28 Revised: 2007-09-20

## Abstract

Somatic alterations within the oncogenome underlie the genesis and progression of most human tumors, by causing oncogene activation or tumor suppressor gene inactivation. The present review summarizes our current knowledge of these areas and the progress that has been made. The purposes of this review are to highlight the importance of the human genome project to identify cancer genome alterations, and to discuss the advancement of research on systematic cancer genome analysis.

**Key Words:** Oncogenome; Somatic alterations; Human genome project; Mutation

Yang YL, Chu JY. Progress in research on somatic alterations in the oncogenome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 3029-3034

## 摘要

大部分人类肿瘤是由基因组中的体细胞性改变所导致的癌基因激活或抑癌基因失活所引

发的。本文总结了近年来肿瘤基因组中体细胞性改变的研究状况, 我们主要关注人类基因组计划为肿瘤相关基因的鉴定所带来的机遇并讨论以全基因组分析为基础的研究进展。

**关键词:** 肿瘤基因组; 体细胞性改变; 人类基因组计划; 突变

杨壹玲, 褚嘉祐. 肿瘤基因组中体细胞性改变的研究进展. *世界华人消化杂志* 2007;15(28):3029-3034

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3029.asp>

**背景资料**  
基因组中的体细胞性改变所导致的癌基因激活或抑癌基因的失活是引发人类肿瘤的重要原因。人类基因组绘图工作的完成为我们在基因组水平全面检测肿瘤相关基因的改变奠定了坚实的基础。

## 0 引言

通过人类基因组测序可以系统地鉴定癌基因组的改变, 这些变化包括点突变、拷贝数目的增加或减少, 杂合性丢失及染色体易位。利用系统的基因组分析手段, 我们在肿瘤中检测到了 *BRAF*、*PIK3CA*、*EGFR* 等基因的体细胞性突变。随着肿瘤靶向治疗的发展和基因组技术的运用, 肿瘤全基因组分析将不仅为肿瘤研究提供新的发现, 更有可能成为诊断的工具。

## 1 体细胞性肿瘤基因组改变的研究背景

调控细胞生长分化的基因活性改变可能会导致细胞异常增殖从而引发肿瘤。这些“肿瘤相关基因”可以划分成两大类: 抑癌基因和癌基因, 他们对肿瘤细胞的生长具有相反的效应。即在肿瘤中能够抑制细胞生长的抑癌基因是失活的, 而具有刺激细胞生长功能的癌基因则是过度激活的<sup>[1]</sup>。

基因组序列中的特异性改变将导致肿瘤相关基因的功能失调。这些畸变包括: 引发遗传性肿瘤的胚系变异, 获得肿瘤病毒中的转化DNA或RNA序列以及肿瘤基因组中的体细胞性改变<sup>[2]</sup>。以上异常都可以导致抑癌基因的失活或癌基因的激活。此外, 表观遗传学说, 例如DNA甲基化或组蛋白修饰, 也被认为可以通过调节肿瘤相关基因的活性而促进肿瘤生成, 但支持这一学说的证据有待人们进一步证实。

在这些机制中, 体细胞性基因组改变与肿瘤发生的关系最为密切。早在上个世纪, Boveri提

研发前沿  
随着肿瘤靶向治疗的发展和基因组技术的运用,全基因组分析将不仅为肿瘤研究提供新的发现,更有可能成为肿瘤诊断的主要方法。

出体细胞性的染色体改变可能导致癌症<sup>[3-4]</sup>。随着慢性粒细胞性白血病(CML)中费城1号(Ph<sup>1</sup>)染色体的鉴定,这一观点被首次证实。值得关注的是,对于Ph<sup>1</sup>染色体的研究跨越了40年,并最终导致高效的肿瘤靶向治疗药物的发展,即酪氨酸激酶抑制剂imatinib(Gleevec)对CML的治疗。这一工作的基础在于发现Ph<sup>1</sup>染色体即9号和22号染色体易位导致*Bcr*基因和*Abl*酪氨酸激酶基因的融合<sup>[5]</sup>,而imatinib可以通过抑制*Abl*激酶活性阻止CML细胞的生长,这一药物已经用于CML患者的治疗。从Ph<sup>1</sup>染色体的发现到imatinib的临床应用以及从*neu*癌基因的鉴定到Herceptin治疗的发展,给以致癌性的体细胞分子畸变为靶标的治疗模式提供了良好的范例。

## 2 人类基因组计划完成之前全基因组水平筛选肿瘤相关基因的工作

在完整的人类基因组计划完成之前,多种系统性的“基因组水平”研究技术已经发现了很多重要的肿瘤相关基因。这些技术涉及肿瘤细胞遗传学、癌基因转染、家族性肿瘤综合症相关基因的定位及基因组水平筛查杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH)和纯合性缺失。

**2.1 癌基因的鉴定** 从CML中发现致病性的Ph<sup>1</sup>染色体开始,运用细胞遗传学技术主要是染色体显带技术鉴定了大量由染色体易位所激活的癌基因,这正是在全基因组范围寻找肿瘤与其他疾病改变的第1种方法<sup>[6]</sup>。另一种寻找癌基因的有效方法是鉴定从肿瘤细胞中分离出的具有体外转化能力的基因。尽管癌基因转化实验并非以全基因组序列为基础,然而他却是一种全基因组范围的筛选方法。通过这些技术鉴定了多种细胞癌基因,包括*myc*、*ras*、*abl*和*neu*等人类同源基因。其中*Her-2/neu(ERBB2)*的鉴定尤为重要,因为这一发现最终导致了乳腺癌的靶向治疗药物Herceptin的临床应用<sup>[7]</sup>。然而运用转染技术发现癌基因的速度是非常缓慢的,新的文库构建和基因递送方法是否有助于这一目标的早日完成,仍有待时间的验证。

在一些生物的生命周期中,染色体特定区域的扩增是程序化的、有目的的事件;而在肿瘤细胞中由染色体区域扩增而带来的基因剂量增加是基因表达上调的常见遗传机制。利用细胞遗传学方法如比较基因组杂交(comparative genomic hybridization, CGH),发现了多种类型肿瘤中的频繁扩增区,这些区域极有可能包含潜

在的癌基因<sup>[8]</sup>。

**2.2 抑癌基因的筛选** 人们对抑癌基因的鉴定主要是通过家族性肿瘤综合症中运用肿瘤特异等位基因LOH区域定位的方法进行的,其中一项飞跃性的进步是全基因组定位技术的产生,尤其是限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphisms, RFLPs)的应用使得系统定位遗传病致病基因成为可能。这一技术首先在X染色体连锁病,如慢性肉芽肿、进行性假肥大性肌营养不良中得以运用;他对于肿瘤的研究,尤其是抑癌基因的鉴定具有深远的意义。第1个被克隆的抑癌基因-视网膜母细胞瘤基因(*RBI*)就是联合使用RFLPs的遗传连锁分析和纯合性缺失定位两项技术完成的。另一个实例是*APC*抑癌基因的发现,这一工作综合运用了连锁分析、突变检测及缺失定位技术对家族性腺瘤性息肉患者进行了全基因组分析<sup>[9]</sup>。

众所周知,由Knudson提出的经典的二次打击模型(two-hit model)认为:抑癌基因的一个等位基因携带了胚系突变,出生后另一个等位基因又遭受第2次突变或LOH打击,致使两个等位基因全部失活,使细胞获得了选择性生长的能力。第1个被发现的抑癌基因*RBI*即验证了“二次打击”假说。运用RFLPs、微卫星标记及单核苷酸多态性分析技术,使得在全基因组范围内进行肿瘤LOH定位成为可能。这些遗传标记在肿瘤中频繁缺失区域如9号染色体中抑癌基因p16<sup>INK4a</sup><sup>[10]</sup>及18号染色体中抑癌基因*SMAD4/DFC4*<sup>[11]</sup>的定位工作中起到了关键的作用。利用CGH技术也可以鉴定肿瘤中的很多高度丢失区域,这些位点提示存在潜在的抑癌基因。细胞遗传学和LOH分析发现在前列腺癌、恶性胶质瘤中,10q23可能含有抑癌基因,通过差异分析(representational difference analysis, RAD)和缺失定位研究从该位点定位出了抑癌基因PTEN<sup>[12]</sup>。

## 3 人类基因组计划完成后肿瘤分子病因学的研究进展

完整的人类基因组绘图工作的完成使得我们可以系统地研究肿瘤基因组<sup>[13-15]</sup>,这一成果的运用为我们在整个基因组范围内全面检测拷贝数目及等位基因的改变奠定了坚实的基础。

**3.1 系统性的拷贝数目分析** 染色体拷贝数目扩增常常导致癌基因的激活,而抑癌基因的失活可以由半合子缺失同时并发突变或是纯合子缺失所引起。因此,针对拷贝数目改变的鉴定工作

是发现新的肿瘤相关基因强有力的工具. 利用array CGH和cDNAs array技术, 我们可以全面筛选肿瘤基因组拷贝数目改变并大范围鉴定表达基因. 随着人类基因组计划的完成, 对基因组拷贝数目进行高密度系统性分析已经成为现实, 这些技术包括基因组寡核苷酸array CGH<sup>[16-17]</sup>、tiling CGH<sup>[18]</sup>及SNP microarrays<sup>[19-20]</sup>的拷贝数目分析和数字化表型<sup>[21]</sup>等. 此外, DNA拷贝数目的定量技术也为全基因组中扩增子及纯合子缺失区域的定位提供了有效的支持. 最近, 一种建立在测序基础上的研究方法通过利用BAC末端测序与已知基因组序列对比, 以达到同时进行拷贝数目分析和复杂染色体结构畸变检测的目标<sup>[22]</sup>, 但该技术尚处于完善阶段.

**3.2 系统性的LOH分析** 传统的多态性标记, 如RFLPs和微卫星分析是通过对肿瘤样本和匹配的邻近正常组织DNA等位(基因)型进行对比的方法检测LOH. 尽管这类技术能对全基因组进行分析, 可是很难自动化并量化, 因此大部分研究仅能针对有限的标记. 然而, 人类基因组计划的竣工, 鉴定出了数以百万的SNP位点, 这些标记对遗传学分析提供了理想的标志物. 正是因为人类基因组中的这些大量的SNP位点, 使我们能够很容易的运用array平台建立全基因组水平的LOH技术<sup>[23-24]</sup>. 研究证实, SNP array的LOH分析与原先的微卫星分析结果具有较高的一致性. 运用SNP array技术, 有研究组在特定亚型的肺癌中检测到了共有的LOH区<sup>[25]</sup>; 另有研究也提示不同模式的LOH与肿瘤的临床参数有关<sup>[26]</sup>. 此外, 高密度的SNP array还可以对肿瘤DNA杂交强度进行量化从而精确反映DNA拷贝数目的改变. 故而SNP arrays、拷贝数目与LOH分析技术的联合, 可以同时检测并区分拷贝数缺失、增益及杂合性丢失, 为肿瘤研究提供广泛的基因组改变的定位.

**3.3 基因的表达分析与目的基因的鉴定** 表达分析技术与拷贝数目分析如FISH、array CGH等的联合应用, 将有助于从DNA扩增子中鉴定关键的目的基因. 正如我们所看到的array CGH工作除了能够对个体扩增子进行有效的分析, 还可以展示全基因组水平拷贝数目改变与基因表达的关系<sup>[27-28]</sup>. 例如, 运用组织microarray FISH和RT-PCR, 在部分的乳腺癌中发现了以*ERBB2*基因为中心的最小扩增区域并检测到了该基因的高表达, 值得一提的是由扩增所产生的基因剂量增加是其表达上调的主要原因<sup>[29]</sup>.

**3.4 针对激酶、磷酸酶、PI3激酶基因家族的肿瘤基因组测序研究** 迄今为止, 我们发现了越来越多的肿瘤相关基因的突变, 这些工作主要集中在对某些特定基因家族的研究. 但值得注意的是, 我们需要通过功能实验区分肿瘤发生过程中的非随机性与随机性突变. 同时, 将突变分析与临床特征相联系将会为肿瘤发病机制研究开创新的领域.

运用变性毛细管凝胶电泳技术, 人们在乳头状甲状腺癌、结肠癌和原发性肺癌等多种类型的恶性肿瘤中检测到了*BRAF*基因的功能获得性突变<sup>[30]</sup>; 其中, 60%的黑色素瘤携带有*BRAF*突变, 提示该基因极有可能成为肿瘤治疗的靶标. 有趣的是在同一通路上的基因*K-RAS*的突变与*BRAF*突变无重叠<sup>[31-33]</sup>, 这一结果服从“排他原则”: 即处于同一通路中的多个基因仅有一个存在突变, 这可能是由于他们之中任何一个突变所产生的功效都相似的缘故.

针对涉及细胞信号通路的酪氨酸激酶、酪氨酸磷酸酶和磷脂酰肌醇3-激酶等基因家族, 人们进行了系统的测序分析, 并检测到了肿瘤中上述基因的特异性体细胞突变<sup>[34-36]</sup>. 发生在*PIK3CA*基因的体细胞性突变被认为能够增加他的催化活性, 该突变可见于结肠癌、恶性胶质瘤<sup>[37]</sup>及乳腺癌<sup>[38]</sup>. 除此之外, 在多种类型的肿瘤中, 还检测到了*PIK3CA*基因的频繁扩增与过表达<sup>[39]</sup>. 利用系统的外显子测序技术, 人们分析了结肠癌中6个酪氨酸磷酸酶基因*PTPRF*、*PTPRG*、*PTPRT*、*PTPN3*、*PTPN13*和*PTPN14*, 并检测到了一些功能失活性的突变; 生物化学实验显示其中改变最频繁的基因*PTPRT*极有可能是抑癌基因<sup>[36]</sup>. 除此之外, 研究者们在其他类型的肿瘤中也发现了这些基因的部分突变. 有研究者对蛋白激酶*NTRK3*、*FES*、*EPHA3*、*NTRK2*、*MLK4*和*GUCY2*基因进行了系统的测序分析, 发现结肠癌中上述基因的激酶结构域易发突变<sup>[40]</sup>. 对携带这些突变的结肠及其他肿瘤患者进行随访研究, 可以帮助我们判断他们是否在肿瘤发生过程中发挥作用.

非小细胞性肺癌是世界十大恶性肿瘤之一, 通过对肺癌患者的酪氨酸激酶基因进行系统性序列分析发现: 表皮生长因子受体(*EGFR*)基因存在突变<sup>[35]</sup>, 并且该基因的突变率在日本(30%)与美国(15%)患者间具有差异. 目前人们对导致这一差异的原因还不甚了解, 可能是由于不同人群中肿瘤发生的分子机制不同所产生的. 值

**相关报道**  
利用系统性的拷贝数目、LOH检测和基因表达分析, 研究者已经从多种类型的肿瘤中鉴定出了大量的相关基因.

应用要点  
基因鉴定技术的迅速发展以及先前基因分析技术所积累的经验能够使我们全面的发现新基因、寻找新诊断指标和治疗靶标。

得关注的是,肺腺癌中突变*EGFR*基因的发现具有重要的临床意义,因为*EGFR*激酶抑制剂Iressa能够有效地治疗具有*EGFR*基因突变的肺腺癌患者<sup>[41]</sup>,这类患者以日本、非吸烟和女性个体为主。目前,*EGFR*基因的突变检测及个性化的Iressa治疗已经广泛的应用于临床,并且取得了较好的疗效。另有研究发现4%的原发性肺癌和10%肺腺癌患者具有*ERBB2*基因的激酶结构域的突变<sup>[42]</sup>,这些突变与激酶抑制剂之间的关系有待于深入研究。

总之,研究者们利用系统性的外显子测序技术已经在多种类型的肿瘤中鉴定出了各式各样的体细胞性突变,其中一些改变无疑将会为肿瘤治疗提供靶标。此后,随着定向基因组测序技术的运用,将会有更多的致癌性突变被鉴定出来。另外,系统性的拷贝数目、LOH检测和基因表达分析也会广泛的应用于体细胞性畸变的鉴定工作中<sup>[43]</sup>。鉴于新兴的高通量方法的发展为测序技术提供了强有力的平台,针对肿瘤基因组的测序工作也会相应增加<sup>[44-46]</sup>。我们可以想象,在不远的未来,肿瘤特异性的突变检测将取代传统的组织学显微镜检查而成为肿瘤诊断的主要方法。

#### 4 参考文献

- Akiyama T, Sudo C, Ogawara H, Toyoshima K, Yamamoto T. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. *Science* 1986; 232: 1644-1646
- Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 177-183
- Knudson AG. Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet* 2000; 34: 1-19
- Knudson AG. Cancer genetics. *Am J Med Genet* 2002; 111: 96-102
- Daley GQ, Ben-Neriah Y. Implicating the bcr/abl gene in the pathogenesis of Philadelphia chromosome-positive human leukemia. *Adv Cancer Res* 1991; 57: 151-184
- Mitelman F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 2000; 462: 247-253
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001; 344: 783-792
- Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, Tarkkanen M, Wolf M, Monni O, Szymanska J, Larramendy ML, Tapper J, Pere H, El-Rifai W, Hemmer S, Wasenius VM, Vidgren V, Zhu Y. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol* 1998; 152: 1107-1123
- Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 721-733
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-440
- Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996; 271: 350-353
- Dahia PL. PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7: 115-129
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrum J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams



- A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921
- 14 Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hanchenalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yoosaph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304-1351
  - 15 Weir B, Zhao X, Meyerson M. Somatic alterations in the human cancer genome. *Cancer Cell* 2004; 6: 433-438
  - 16 Brennan C, Zhang Y, Leo C, Feng B, Cauwels C, Aguirre AJ, Kim M, Protopopov A, Chin L. High-resolution global profiling of genomic alterations with long oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 2004; 64: 4744-4748
  - 17 Lucito R, Healy J, Alexander J, Reiner A, Esposito D, Chi M, Rodgers L, Brady A, Sebat J, Troge J, West JA, Rostan S, Nguyen KC, Powers S, Ye KQ, Olshen A, Venkatraman E, Norton L, Wigler M. Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. *Genome Res* 2003; 13: 2291-2305
  - 18 Ishkanian AS, Malloff CA, Watson SK, DeLeeuw RJ, Chi B, Coe BP, Snijders A, Albertson DG, Pinkel D, Marra MA, Ling V, MacAulay C, Lam WL. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 2004; 36: 299-303
  - 19 Bignell GR, Huang J, Greshock J, Watt S, Butler A, West S, Grigorova M, Jones KW, Wei W, Stratton MR, Futreal PA, Weber B, Shaper MH, Wooster R. High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. *Genome Res* 2004; 14: 287-295
  - 20 Zhao X, Li C, Paez JG, Chin K, Janne PA, Chen TH, Girard L, Minna J, Christiani D, Leo C, Gray JW, Sellers WR, Meyerson M. An integrated view of copy number and allelic alterations in the cancer genome using single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Res* 2004; 64: 3060-3071
  - 21 Wang TL, Maierhofer C, Speicher MR, Lengauer C, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. Digital karyotyping. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16156-16161
  - 22 Volik S, Zhao S, Chin K, Brebner JH, Herndon DR, Tao Q, Kowbel D, Huang G, Lapuk A, Kuo WL, Magrane G, De Jong P, Gray JW, Collins C. End-sequence profiling: sequence-based analysis of aberrant genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 7696-7701
  - 23 Lindblad-Toh K, Tanenbaum DM, Daly MJ, Winchester E, Lui WO, Villapakkam A, Stanton SE, Larsson C, Hudson TJ, Johnson BE, Lander ES, Meyerson M. Loss-of-heterozygosity analysis of small-cell lung carcinomas using single-nucleotide polymorphism arrays. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 1001-1005
  - 24 Mei R, Galipeau PC, Prass C, Berno A, Ghandour G, Patil N, Wolff RK, Chee MS, Reid BJ, Lockhart DJ. Genome-wide detection of allelic imbalance using human SNPs and high-density DNA arrays. *Genome Res* 2000; 10: 1126-1137
  - 25 Janne PA, Li C, Zhao X, Girard L, Chen TH, Minna J, Christiani DC, Johnson BE, Meyerson M. High-resolution single-nucleotide polymorphism array and clustering analysis of loss of heterozygosity in human lung cancer cell lines. *Oncogene* 2004; 23: 2716-2726
  - 26 Wang ZC, Lin M, Wei LJ, Li C, Miron A, Lodeiro G, Harris L, Ramaswamy S, Tanenbaum DM, Meyerson M, Iglehart JD, Richardson A. Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers. *Cancer Res* 2004; 64: 64-71
  - 27 Pollack JR, Sorlie T, Perou CM, Rees CA, Jeffrey SS, Lonning PE, Tibshirani R, Botstein D, Borresen-Dale

## 名词解释

Oncogenome: 指在基因组水平上研究肿瘤发生发展过程中各种结构的改变及所导致的功能异常的分支学科。研究内容涉及肿瘤易感基因的全面筛查和鉴定、肿瘤基因组不稳定、基因表达谱变化以及通过基因组研究筛选新的诊断指标、治疗靶标等。

同行评价  
本文内容充实, 引述全面, 有一定的可读性和指导意义。

- AL, Brown PO. Microarray analysis reveals a major direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 12963-12968
- 28 Wolf M, Mousses S, Hautaniemi S, Karhu R, Huusko P, Allinen M, Elkahoulou A, Monni O, Chen Y, Kallioniemi A, Kallioniemi OP. High-resolution analysis of gene copy number alterations in human prostate cancer using CGH on cDNA microarrays: impact of copy number on gene expression. *Neoplasia* 2004; 6: 240-247
- 29 Kauraniemi P, Kuukasjarvi T, Sauter G, Kallioniemi A. Amplification of a 280-kilobase core region at the ERBB2 locus leads to activation of two hypothetical proteins in breast cancer. *Am J Pathol* 2003; 163: 1979-1984
- 30 Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954
- 31 Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Guerrero R, Einhorn E, Herlyn M, Minna J, Nicholson A, Roth JA, Albelda SM, Davies H, Cox C, Brignell G, Stephens P, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR, Weber BL. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 2002; 62: 6997-7000
- 32 Naoki K, Chen TH, Richards WG, Sugarbaker DJ, Meyerson M. Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 2002; 62: 7001-7003
- 33 Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002; 418: 934
- 34 Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004; 350: 2129-2139
- 35 Paez JG, Janne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304: 1497-1500
- 36 Wang Z, Shen D, Parsons DW, Bardelli A, Sager J, Szabo S, Ptak J, Silliman N, Peters BA, van der Heijden MS, Parmigiani G, Yan H, Wang TL, Riggins G, Powell SM, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers. *Science* 2004; 304: 1164-1166
- 37 Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 2004; 304: 554
- 38 Bachman KE, Argani P, Samuels Y, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Konishi H, Karakas B, Blair BG, Lin C, Peters BA, Velculescu VE, Park BH. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 772-775
- 39 Ma YY, Wei SJ, Lin YC, Lung JC, Chang TC, Whang-Peng J, Liu JM, Yang DM, Yang WK, Shen CY. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene* 2000; 19: 2739-2744
- 40 Bardelli A, Parsons DW, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Saha S, Markowitz S, Willson JK, Parmigiani G, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* 2003; 300: 949
- 41 Miller VA, Kris MG, Shah N, Patel J, Azzoli C, Gomez J, Krug LM, Pao W, Rizvi N, Pizzo B, Tyson L, Venkatraman E, Ben-Porat L, Memoli N, Zakowski M, Rusch V, Heelan RT. Bronchioloalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitivity to gefitinib in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1103-1109
- 42 Stephens P, Hunter C, Bignell G, Edkins S, Davies H, Teague J, Stevens C, O'Meara S, Smith R, Parker A, Barthorpe A, Blow M, Brackenbury L, Butler A, Clarke O, Cole J, Dicks E, Dike A, Drozd A, Edwards K, Forbes S, Foster R, Gray K, Greenman C, Halliday K, Hills K, Kosmidou V, Lugg R, Menzies A, Perry J, Petty R, Raine K, Ratford L, Shepherd R, Small A, Stephens Y, Tofts C, Varian J, West S, Widaa S, Yates A, Bressan F, Cooper CS, Flanagan AM, Knowles M, Leung SY, Louis DN, Looijenga LH, Malkowicz B, Pierotti MA, Teh B, Chenevix-Trench G, Weber BL, Yuen ST, Harris G, Goldstraw P, Nicholson AG, Futreal PA, Wooster R, Stratton MR. Lung cancer: intragenic ERBB2 kinase mutations in tumours. *Nature* 2004; 431: 525-526
- 43 武珊珊, 刘吉福, 王明荣. 食管、贲门癌染色体异常分析及意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 681-684
- 44 Brenner S, Johnson M, Bridgman J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo S, McCurdy S, Foy M, Ewan M, Roth R, George D, Eletr S, Albrecht G, Vermaas E, Williams SR, Moon K, Burcham T, Pallas M, DuBridge RB, Kirchner J, Fearon K, Mao J, Corcoran K. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 630-634
- 45 Mitra RD, Shendure J, Olejnik J, Edyta-Krzyszanska-Olejnik, Church GM. Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies. *Anal Biochem* 2003; 320: 55-65
- 46 Shendure J, Mitra RD, Varma C, Church GM. Advanced sequencing technologies: methods and goals. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 335-344

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

# 热应激预处理对梗阻性黄疸大鼠T细胞亚群的影响

毛盛名, 张百萌, 关晓东, 李 坚, 潘海燕, 贾英斌

毛盛名, 张百萌, 关晓东, 李坚, 潘海燕, 贾英斌, 中山大学第五附属医院普通外科 广东省珠海市 519000  
通讯作者: 毛盛名, 519000, 广东省珠海市梅华东路52号, 中山大学第五附属医院普通外科3区. 521msm@sina.com.cn  
电话: 0756-2528781  
收稿日期: 2007-06-05 修回日期: 2007-09-10

## The effect of hyperthermia pretreatment on the subgroups of T lymphocytes in obstructive jaundiced rats

Sheng-Ming Mao, Bai-Meng Zhang, Xiao-Dong Guan, Jian Li, Hai-Yan Pan, Ying-Bin Jia

Sheng-Ming Mao, Bai-Meng Zhang, Xiao-Dong Guan, Jian Li, Hai-Yan Pan, Ying-Bin Jia, Department of Hepatobiliary Surgery, the Fifth Affiliated Hospital of Sun-Yat Sen University, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China  
Correspondence to: Sheng-Ming Mao, Section 3, Department of Hepatobiliary Surgery, the Fifth Affiliated Hospital of Sun-Yat Sen University, 52 Meihua East Road, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China. 521msm@sina.com.cn  
Received: 2007-06-05 Revised: 2007-09-10

### Abstract

**AIM:** To study the effect of heat stress pretreatment on cell-mediated immunity in rats with obstructive jaundice.

**METHODS:** Thirty male Wistar rats were randomly divided into three groups: a sham-operated group (S group), a bile duct ligation group (B group), and a heat stress pretreatment + bile duct ligation group (P group). Each group comprised 10 rats. The rats were sacrificed one week after operation, and the levels of T lymphocytes (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>) and bilirubin in blood samples from the hearts of the rats were measured by flow cytometry.

**RESULTS:** One week after ligation of the common bile duct in rats, the number of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes was significantly decreased compared with that in sham-operated rats, whereas the number of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes was significantly increased. However, the numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells in the P group did not change significantly, which had a statistical difference

compared with B group ( $52.60 \pm 3.27$  vs  $43.52 \pm 2.23$ ,  $2.37$  vs  $1.96$ ;  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Ligation of the common bile duct inhibits cell-mediated immunity in rats. Heat stress pretreatment can improve the cell-mediated immunity in rats with obstructive jaundice.

**Key Words:** Obstructive jaundice; Heat stress pretreatment; T lymphocyte; Rats

Mao SM, Zhang BM, Guan XD, Li J, Pan HY, Jia YB. The effect of hyperthermia pretreatment on the subgroups of T lymphocytes in obstructive jaundiced rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 3035-3037

### 摘要

**目的:** 研究热应激预处理对梗阻性黄疸大鼠细胞免疫功能的影响。

**方法:** 将30只Wistar大鼠随机均分为3组: 假手术组(S组)、胆总管结扎组(B组)、热应激预处理+胆总管结扎组(P组)。术后1 wk处死大鼠穿刺心脏取血, 用流式细胞仪检测各份血液标本的T淋巴细胞(CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>)分类及胆红素含量。

**结果:** 胆总管结扎后1 wk, 大鼠血胆红素明显升高, CD4<sup>+</sup>减少, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>下降; 热应激预处理组的CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>下降不明显, 但与胆总管结扎组比较有显著差异( $52.60 \pm 3.27$  vs  $43.52 \pm 2.23$ ,  $2.37$  vs  $1.96$ ;  $P < 0.01$ )。

**结论:** 热应激预处理可改善梗阻性黄疸大鼠的细胞免疫功能。

**关键词:** 梗阻性黄疸; 热应激预处理; T淋巴细胞; 大鼠

毛盛名, 张百萌, 关晓东, 李坚, 潘海燕, 贾英斌. 热应激预处理对梗阻性黄疸大鼠T细胞亚群的影响. *世界华人消化杂志* 2007;15(28):3035-3037  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3035.asp>

### 0 引言

梗阻性黄疸患者往往伴有全身免疫功能低下,

**背景资料**  
热应激预处理在国内外已经进行了很多年的研究。热应激预处理可对机体提供保护, 提高机体对抗有害刺激的能力, 可增强SOD清除细胞内氧自由基的水平, 以及对IL-6所致中性粒细胞凋亡障碍的影响。梗阻性黄疸是外科常见病、多发病, 患者常伴有免疫功能下降, 导致术后高并发症的发生。本文重点讨论热应激预处理对梗阻性黄疸大鼠T细胞亚群的影响, 目前尚缺乏有关报道。

### 相关报道

Gulluoglu研究发现,热应激预处理可使梗阻性黄疸大鼠的NK细胞和CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值升高,改善梗阻性黄疸大鼠的免疫反应。Todryk报道HSP70可诱导DC, NK细胞分泌IL-12,能够促进CD4<sup>+</sup> Th0细胞向Th1转化,增强机体对肿瘤的免疫。

抵抗力降低,导致术后感染性并发症升高,给外科治疗梗阻性黄疸带来一定的困难,影响患者的顺利恢复。许多研究认为,梗阻性黄疸会抑制机体的细胞免疫功能,这可能是导致患者术后感染性并发症升高的重要原因。本实验利用梗阻性黄疸大鼠模型,研究热应激预处理对梗阻性黄疸大鼠T淋巴细胞亚群的影响。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康♂ Wistar大鼠共随机分3组:梗阻性黄疸组(B组,  $n = 10$ 只),热应激预处理+梗阻性黄疸组(P组,  $n = 10$ 只),假手术组(S组,  $n = 10$ 只),大鼠喂养在清洁动物房内,每笼两只,自由进食饲料和水。每天光照时间为12 h。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的制作** 3组均在乙醚开放麻醉下,腹部剃毛,用1%的碘伏消毒切口2次,经剑突下正中小切口进腹,游离出胆总管,于肝门部和其远端用6/0的丝线分别结扎,中间予以切断。腹部切口用4/0的丝线分两层缝合。其中S组接受同样手术,但只游离胆总管而不结扎胆总管;P组在手术前进行热应激预处理,具体方法为:将大鼠麻醉后置于42℃带鼓风装置的恒温干燥箱内,20 min后取出,12 h后进行胆总管结扎手术。术后大鼠自由进食饲料和水,不予补液和抗生素治疗。

**1.2.2 大鼠T淋巴细胞亚群的测定** 术后1 wk处死大鼠,穿刺心脏取血2 mL置于枸橼酸钠抗凝的试管内,用于流式细胞仪检测T淋巴细胞亚群(CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>)。试剂为抗大鼠CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> mAb,均购自北京鼎国生物制品公司。应用流式细胞仪(美国BD公司生产的FACS Calibur)检测与靶细胞结合的异硫氰酸(FITC)及藻红蛋白(PE)荧光素荧光强度。设定电子窗口分离靶细胞,收集窗口内靶细胞荧光数据,经CellQuest软件处理获得对数荧光直方图。

**统计学处理** 所有数据均以mean±SD表示,结果采用方差分析及Student's *t*-test检验处理,  $P < 0.05$ 为统计学差异显著。

## 2 结果

**2.1 一般状况** 胆总管结扎48 h后大鼠尿液颜色开始变黄,4-5 d时全身皮毛开始黄染,进食量逐渐减少,精神萎靡不振,活动减少。术后1 wk,梗阻性黄疸大鼠近肝侧胆总管囊状扩张,肝脏弥漫性肿大,呈黄褐色。部分大鼠腹腔内有少量淡黄色渗液。

表1 三组实验大鼠血浆CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>细胞

	P组	B组	S组
CD4 <sup>+</sup>	52.60 ± 3.27 <sup>a</sup>	43.52 ± 2.23	55.37 ± 3.15 <sup>b</sup>
CD8 <sup>+</sup>	22.18 ± 1.31 <sup>a</sup>	36.70 ± 2.12	20.69 ± 1.26 <sup>b</sup>
CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	2.37 <sup>a</sup>	1.96	2.67 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs B组。

**2.2 血清胆红素含量** 梗阻性黄疸组及热应激预处理+梗阻性黄疸组大鼠血胆红素含量分别为37.3 ± 6.9和36.5 ± 5.9,与假手术组(1.0 ± 0.2)比较明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );梗阻性黄疸组与热应激预处理+梗阻性黄疸组之间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.3 T淋巴细胞分类** CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>细胞所占百分比在B、P、S组中分别为43.52 ± 2.23, 36.70 ± 2.12; 52.60 ± 3.27, 22.18 ± 1.31; 55.37 ± 3.15, 21.69 ± 1.26。CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>分别为1.96, 2.37和2.67。B组和P组之间比较有显著性差异( $P < 0.05$ ), B组与S组之间比较差异有显著意义( $P < 0.01$ ), P、S组之间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(表1)。

## 3 讨论

梗阻性黄疸是胆道梗阻导致血液中胆红素升高,从而引起全身一系列的病理生理变化。梗阻性黄疸可对全身多个器官、系统的功能造成损害,主要有肝<sup>[1]</sup>、肾<sup>[2]</sup>、胃肠道、免疫系统和凝血系统。胆红素异常升高是有毒性的,他会抑制淋巴细胞的有丝分裂和增殖以及产生IL-2<sup>[3-4]</sup>。Haga *et al*<sup>[5]</sup>研究发现,非结合胆红素以剂量依赖的方式抑制细胞毒T淋巴细胞(CTL)活性、降低IL-2的反应性、抑制NK细胞活性和细胞介导的抗体依赖性细胞毒活性。我们的实验结果显示,胆总管结扎后1 wk,梗阻性黄疸大鼠的细胞免疫功能明显受损,表现为CD4<sup>+</sup>下降, CD8<sup>+</sup>上升和CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>下降。这与国内外其他一些学者的结果是相互吻合的。李炳辉 *et al*<sup>[6]</sup>研究发现,梗阻性黄疸可以使大鼠血清sIL-2R水平显著升高,伴有CD4<sup>+</sup>下降, CD8<sup>+</sup>升高及CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值下降,表明梗阻性黄疸大鼠存在着细胞免疫功能下降。Scott-Conner *et al*<sup>[7]</sup>结扎小鼠胆总管,3 d后小鼠的T淋巴细胞对丝裂原反应降低。Vane *et al*<sup>[8]</sup>的实验研究证实,梗阻性黄疸可使肝脏网状内皮系统枯否细胞受抑制,清除细菌和内毒素的功能降低。Plusa *et al*<sup>[9]</sup>报道,梗阻性黄疸大鼠的中性粒细胞表达更少的黏附分子受体,对

### 应用要点

热应激预处理可改善梗阻性黄疸对细胞免疫和肝功能的损害作用,这为热疗在梗阻性黄疸中的应用提供了一定的理论依据。

细菌产物刺激的反应也减弱. 这可能是导致梗阻性黄疸患者更易发生感染性并发症的原因之一. 王涌 *et al*<sup>[10]</sup>研究发现, 阻塞性黄疸大鼠血液中T淋巴细胞总量减少, 其中CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>细胞均有所下降, 而CD4<sup>+</sup>细胞下降更为明显. 梗阻性黄疸导致细胞免疫抑制的机制尚未完全阐明, 目前一些研究认为可能与营养不良、肠道细菌移位、内毒素血症、促炎性细胞因子及血中免疫抑制因子等因素有关. 确切的机制尚有待进一步阐明.

很早以前人们就发现热应激预处理可对机体提供保护, 提高机体对抗有害刺激的能力. 经过许多学者的不懈努力, 后来他们发现原来在热应激条件下, 机体会产生一种蛋白质叫应激蛋白(stress protein, SP)(又称为热休克蛋白heat shock protein, HSP), 这种蛋白质可对机体提供多重保护. 当机体受到各种应激刺激时, 如冷热刺激, 重金属, 创伤, 缺氧, 感染, 中毒, 手术等均可刺激机体产生HSP. 热休克蛋白是一组结构上高度保守的多肽, 广泛存在于自然界的原核细胞和真核细胞中, 参与细胞的损伤和修复. 热休克蛋白是细胞中普遍存在的胞内蛋白, 占正常总胞内蛋白质的5%, 但在应激状态下能升高到15%或更多, 他不仅是维持细胞正常生命活动所必须的, 而且在天然免疫和适应性免疫中也起到重要作用<sup>[11]</sup>. Gulluoglu *et al*<sup>[12]</sup>研究发现, 热应激预处理可使梗阻性黄疸大鼠的NK细胞和CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>比值升高, 改善梗阻性黄疸大鼠的免疫反应. 这与我们的试验结果是相吻合的. 但在我们的实验中, 热应激预处理组的CD4<sup>+</sup>细胞亦明显升高, 这可能是实验条件、方法及实验动物的差异造成的. Todryk *et al*<sup>[13]</sup>报道, HSP70可诱导DC, NK细胞分泌IL-12, 能够促进CD4<sup>+</sup> Th0细胞向Th1转化, 增强机体对肿瘤的免疫.

热应激预处理可改善梗阻性黄疸大鼠的细胞免疫功能的确切机制尚不清楚, 我们认为可能与以下因素有关: (1)HSP的分子伴侣作用, (2)HSP的抗凋亡作用, (3)HSP与细胞因子之间

的相互作用, (4)HSP的免疫原性等. 其确切机制尚有待更深入的实验研究去揭示, 其机制的阐明将对改善梗阻性黄疸患者的预后大有裨益.

#### 4 参考文献

- 1 Wang JM, Wang H, Xu LN, Zou SQ. Hepatic injury in rats with obstructive jaundice: roles of the protein kinase C signal pathway and cytoprotection of fructose. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2005; 4: 577-581
- 2 Cruz A, Padillo FJ, Tunez I, Munoz C, Granados J, Pera-Madrado C, Montilla P. Melatonin protects against renal oxidative stress after obstructive jaundice in rats. *Eur J Pharmacol* 2001; 425: 135-139
- 3 Keane RM, Gadacz TR, Munster AM, Birmingham W, Winchurch RA. Impairment of human lymphocyte function by bile salts. *Surgery* 1984; 95: 439-443
- 4 Jiang WG, Puntis MC. Immune dysfunction in patients with obstructive jaundice, mediators and implications for treatments. *HPB Surg* 1997; 10: 129-142
- 5 Haga Y, Tempero MA, Zetterman RK. Unconjugated bilirubin inhibits in vitro cytotoxic T lymphocyte activity of human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1317: 65-70
- 6 李炳辉, 赵刚. 梗阻性黄疸大鼠白细胞介素2受体和T细胞亚群的变化. *黑龙江医学* 2001; 25: 26-27
- 7 Scott-Conner CE, Grogan JB. Serum and cellular factors in murine obstructive jaundice. *Surgery* 1994; 115: 77-84
- 8 Vane DW, Redlich P, Weber T, Leapman S, Siddiqui AR, Grosfeld JL. Impaired immune function in obstructive jaundice. *J Surg Res* 1988; 45: 287-293
- 9 Plusa S, Webster N, Primrose J. Obstructive jaundice causes reduced expression of polymorphonuclear leucocyte adhesion molecules and a depressed response to bacterial wall products in vitro. *Gut* 1996; 38: 784-787
- 10 王涌, 胡志前, 成志刚, 张玲珍, 王元和. 中药黄芪对阻塞性黄疸大鼠细胞免疫功能的影响. *肝胆外科杂志* 2000; 8: 64-66
- 11 Tsan MF, Gao B. Cytokine function of heat shock proteins. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 286: C739-744
- 12 Gulluoglu BM, Bekraki A, Cerikcioglu N, Soyletir G, Aktan AO. Immunologic influences of hyperthermia in a rat model of obstructive jaundice. *Dig Dis Sci* 2001; 46: 2378-2384
- 13 Todryk S, Melcher AA, Hardwick N, Linardakis E, Bateman A, Colombo MP, Stoppacciaro A, Vile RG. Heat shock protein 70 induced during tumor cell killing induces Th1 cytokines and targets immature dendritic cell precursors to enhance antigen uptake. *J Immunol* 1999; 163: 1398-1408

同行评价  
本文立意新颖, 层次清晰, 方法得当, 数据可信, 结论合理, 有较强的可读性和研究价值.

编辑 程剑侠 电编 何基才



# 内镜下钛夹治疗非静脉曲张性消化道出血47例

李欢, 于皆平, 杨艳, 曹俊, 于红刚

**背景资料**  
消化道出血是临床常见疾病, 治疗方法比较多, 有喷洒药物、内镜下注射药物、电凝、激光和微波治疗等, 近年来钛夹在治疗出血方面的作用日益受到重视。

李欢, 于皆平, 杨艳, 曹俊, 于红刚, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060

通讯作者: 李欢, 430060, 湖北省武汉市武昌紫阳路99号, 武汉大学人民医院消化内科. yiersanli@163.com

电话: 027-83251103

收稿日期: 2007-03-13 修回日期: 2007-09-20

## Treatment of non-variceal gastrointestinal tract bleeding with metal clips: an analysis of 47 cases

Huan Li, Jie-Ping Yu, Yan Yang, Jun Cao, Hong-Gang Yu

Huan Li, Jie-Ping Yu, Yan Yang, Jun Cao, Hong-Gang Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Huan Li, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yiersanli@163.com

Received: 2007-03-13 Revised: 2007-09-20

## Abstract

**AIM:** To observe the efficacy of titanium clips in treating acute non-variceal gastrointestinal tract bleeding.

**METHODS:** Data on forty-seven cases of acute non-variceal gastrointestinal tract bleeding, treated between December 2003 and July 2006, were collected. The bleeding site was identified by endoscope, and both ends of the bleeding area were clipped with a titanium clip adjuster.

**RESULTS:** Acute non-variceal gastrointestinal tract bleeding was stopped immediately in all cases using electronic gastroscopy and metal titanium clips, the instant hemostasis rate was 100%. Patients were followed-up for about 3 months and none recurred.

**CONCLUSION:** Metal titanium clips provide an effective and easy measure with which to treat gastrointestinal tract bleeding. They offer better efficacy than hemostasis treatment without any severe complications and their widespread clinical application is recommended.

**Key Words:** Acute non-variceal gastrointestinal tract

bleeding; Metal titanin clips; Hemostasis treatment

Li H, Yu JP, Yang Y, Cao J, Yu HG. Treatment of non-variceal gastrointestinal tract bleeding with metal clips: an analysis of 47 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 3038-3040

## 摘要

**目的:** 观察内镜下金属钛夹治疗非静脉曲张性消化道出血的疗效。

**方法:** 收集我院2003-12/2006-07非静脉曲张性消化道出血患者47例, 在内镜直视下明确出血部位, 使用钛夹推送器对准出血部位两端, 钳夹止血。

**结果:** 非静脉曲张性消化道出血患者47例经钛夹钳夹治疗后, 均一次性止血成功, 即时止血率100%, 术后无明显并发症, 随访3 mo无1例再发出血。

**结论:** 金属钛夹是非静脉曲张性消化道出血的一种有效的止血方法, 具有操作简单、止血效率高及无明显并发症等优点, 值得临床推广应用。

**关键词:** 急性非静脉曲张性消化道出血; 金属钛夹; 止血治疗

李欢, 于皆平, 杨艳, 曹俊, 于红刚. 内镜下钛夹治疗非静脉曲张性消化道出血47例. *世界华人消化杂志* 2007; 15(28): 3038-3040

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3038.asp>

## 0 引言

消化道出血是临床常见疾病, 有喷洒药物, 内镜下注射药物、电凝、激光和微波治疗等治疗方法<sup>[1-4]</sup>, 近年来钛夹在治疗出血方面的作用日益受到重视<sup>[5]</sup>. 我院自2003-12/2006-07应用金属钛夹经电子内镜下治疗非静脉曲张性消化道出血47例, 均取得了满意的止血效果, 现报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 非静脉曲张性消化道出血患者47例, 男

**相关报道**  
近年来国内外众多学者如 Jensen DM, 王仲玉, 陆华生 *et al* 都曾对钛夹在消化道出血中的应用进行了相关报道, 证实钛夹有较广的应用推广价值。

36例, 女11例, 年龄11-71(平均42)岁. 其中内镜治疗相关性消化道出血41例, 包括胃息肉15例, 结肠息肉25例, PJ综合征电凝切除后创面渗血1例. 非内镜治疗相关性消化道出血6例, 临床表现为呕血、黑便(5例因输血、补液、止血等, 内科常规治疗未能有效控制出血而行急诊内镜治疗), 包括胃底恒径动脉破裂出血2例, 胃体血管畸形破裂出血1例, 食管贲门黏膜撕裂出血2例, 十二指肠溃疡出血1例. 所用设备有Olympus-240电子胃镜, Olympus-240I电子肠镜, Olympus金属钛夹(MD850型), 钛夹推送器Olympus HX-5LR-I(经胃镜)及HX-5QR-I(经肠镜).

**1.2 方法** 按内镜检查做好常规术前准备, 息肉切除者检查血小板、血浆凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT). 不能耐受内镜检查者肌注杜冷丁50 mg、安定10 mg、山莨菪碱10 mg. 消化道急性大出血有休克者, 予以输血、输液等治疗纠正血容量, 维持生命体征稳定. 治疗前先安装好金属钛夹, 然后将金属夹收回推送器鞘内, 备用. 内镜治疗相关性出血患者先于内镜下明确息肉部位、大小基底部宽度、有无蒂及分叶. 息肉切除后, 经钳道插入钛夹放置器, 伸出原先安置上的金属钛夹, 将夹子头调整到与出血部位相垂直, 对准出血血管两侧, 轻轻按压操作杆, 收紧钛夹, 继而离断钛夹, 钛夹即将整根出血血管连同附近组织紧箍, 截断血流. 为确保止血效果, 减少近期再出血率, 可增加钛夹枚数. 若切口黏膜凹陷, 不易钳夹, 可在病灶黏膜下注射少量冰去甲肾上腺素盐水, 使其稍隆起后再钳夹止血. 非内镜治疗相关性出血患者于内镜直视下发现病灶, 若视野不清晰, 可经冰去甲肾上腺素盐水冲洗至视野清晰, 充分暴露出血点, 按上述方法予以数枚钛夹钳夹血管, 再以去甲肾上腺素盐水冲洗患处, 待完全止血后, 结束治疗. 金属钛夹通常经1-2 wk局部肉芽肿形成后自然脱落, 随粪便排出体外. 所有患者均住院观察3-7 d, 予以对症治疗, 出院后随访1-3 mo, 必要时复查内镜.

## 2 结果

47例患者经内镜共放置钛夹150枚, 平均每人3.6枚, 均一次性钳夹止血成功(图1), 即时止血成功率100%. 术后无明显并发症, 随访3 mo内无1例再发出血.

## 3 讨论

内镜下钛夹止血主要适用于血管直径小于3

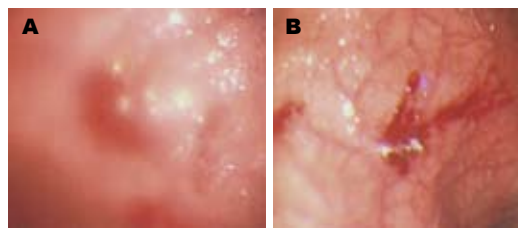


图1 内镜. A: 胃底横径动脉出血止血治疗前; B: 钛夹钳夹止血治疗后停止出血.

mm的病灶出血. 该方法适应证广泛, 已报道可用于消化性溃疡、胃癌、食管癌、结肠癌、Dieulafoy病、Mallory-Weiss综合征、消化道息肉电切术后出血、组织活检后出血等<sup>[6-8]</sup>. 据报道<sup>[9-10]</sup>, 内镜下钛夹止血与内镜下注射药物、电凝止血疗效无统计学差异. 其止血机制是一种物理机械止血的方法, 即将病灶连同附近组织紧箍, 截断血流, 其作用类似订书器. 与外科缝扎相似, 但与外科手术相比, 操作方便, 创伤较小, 并发症少, 能够快速有效的达到止血目的, 且远期疗效好, 住院时间短, 治疗费用低<sup>[11]</sup>. 尤其是对于血管畸形、食管贲门黏膜撕裂症<sup>[12]</sup>及经积极内科保守治疗仍不能控制的溃疡出血患者, 经钳夹止血后, 出血迅速控制既可免除患者遭受手术的痛苦, 又能减轻患者的经济负担. 目前金属钛夹主要应用于非静脉曲张性消化道出血, 因为钛夹叉口锋利, 容易导致血管损伤, 所以少用于静脉曲张性破裂出血. 我们治疗非静脉曲张性消化道出血47例, 即时止血率达100%, 与国内郭世斌 *et al*<sup>[13]</sup>治疗9例、陆华生 *et al*<sup>[14]</sup>治疗18例消化道急性出血的报道一致.

我们应用钛夹治疗消化道出血的体会是:

- (1)保持手术视野清晰, 充分暴露出血病灶, 必要时用冰正肾盐水充分冲洗病灶, 做到有的放矢;
- (2)选择合适的钳夹部位, 理想位置应是两侧有较完整的支撑组织的出血血管, 张开的钛夹把出血血管置于中央而止血;
- (3)放置钛夹角度须与血管垂直, 最低不应小于45度, 若小于45度, 钛夹仅夹于组织的表面, 容易脱落;
- (4)放置钛夹时, 应将夹子两脚顶紧黏膜, 才能将病灶连同附近组织箍紧以截断血流, 放置成功的标志为钛夹直立于黏膜上, 且视野转清;
- (5)钛夹钳夹深度适当, 若钳夹过浅, 钛夹易早期脱落, 有再发出血的可能, 若钳夹过深, 则有造成穿孔之虞;
- (6)术后仔细检查病灶, 勿遗漏潜在的出血位点.

总之钛夹止血是一种简便、安全可靠的方法, 他不引起组织黏膜的凝固、变性、坏死, 只

**名词解释**  
PJ综合征(Peutz-Jeghers syndrome, PJS): 又称黑斑息肉综合症, 是一种常染色体显性遗传性疾病, 以皮肤黏膜黑斑合并消化道息肉为特征, 是一类少见病, 临床处理常较困难.

同行评价  
本文所研究的资料可靠,采用的方法既先进又实用,得出的结果结论较可信,有一定的实用价值。

引起伤口周围黏膜最小限度的损伤,止血见效快,特别适合年老及危重患者,并可反复进行而无特殊的并发症,即使个别有夹子残留,也没有任何影响<sup>[15]</sup>,值得临床推广。

#### 4 参考文献

- 1 王一鸣,许桦林,郑国荣,熊毅敏,杨然.紧急内镜下局部喷洒与注射联合治疗重症上消化道非静脉曲张性出血.中国内镜杂志 2002; 8: 112
- 2 Freeman ML. New and old methods for endoscopic control of nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Rev Gastroenterol Mex* 2003; 68 Suppl 3: 62-65
- 3 Rollhauser C, Fleischer DE. Nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Endoscopy* 2004; 36: 52-58
- 4 Kanai M, Hamada A, Endo Y, Takeda Y, Yamakawa M, Nishikawa H, Torii A. Efficacy of argon plasma coagulation in nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Endoscopy* 2004; 36: 1085-1088
- 5 Soehendra N, Bohnacker S, Binmoeller KF. Nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. New and alternative hemostatic techniques. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1997; 7: 641-656
- 6 Yamaguchi Y, Yamato T, Katsumi N, Imao Y, Aoki K, Morita Y, Miura M, Morozumi K, Ishida H, Takahashi S. Short-term and long-term benefits of endoscopic hemoclip application for Dieulafoy's lesion in the upper GI tract. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 653-656
- 7 Hui AJ, Sung JJ. Endoscopic Treatment of Upper Gastrointestinal Bleeding. *Curr Treat Options*

*Gastroenterol* 2005; 8: 153-162

- 8 Jensen DM, Machicado GA, Hirabayashi K. Randomized controlled study of 3 different types of hemoclips for hemostasis of bleeding canine acute gastric ulcers. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 768-773
- 9 Cheng CL, Liu NJ, Lee CS, Chen PC, Ho YP, Tang JH, Yang C, Sung KF, Lin CH, Chiu CT. Endoscopic management of Dieulafoy lesions in acute nonvariceal upper gastrointestinal bleeding. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1139-1144
- 10 Saltzman JR, Strate LL, Di Sena V, Huang C, Merrifield B, Ookubo R, Carr-Locke DL. Prospective trial of endoscopic clips versus combination therapy in upper GI bleeding (PROTECCT--UGI bleeding). *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1503-1508
- 11 Katsinelos P, Paroutoglou G, Beltsis A, Papaziogas B, Gouvalas A, Chatzimavroudis G, Vlachakis I, Mimidis K, Vradelis S, Pilpilidis I. Endoscopic hemoclip application in the treatment of nonvariceal gastrointestinal bleeding: short-term and long-term benefits. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2005; 15: 187-190
- 12 Huang SP, Wang HP, Lee YC, Lin CC, Yang CS, Wu MS, Lin JT. Endoscopic hemoclip placement and epinephrine injection for Mallory-Weiss syndrome with active bleeding. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 842-846
- 13 郭世斌,谭育红,马静.经内镜金属夹钳夹术治疗上消化道出血.中国内镜杂志 2002; 8: 31-32
- 14 陆华生,钱俊波,陈天敏,孔社女.急性消化道出血的内镜下金属钛夹治疗.中华消化内镜杂志 2004; 21: 197-198
- 15 钟文英,杨柳明,林红,林济宝,谢俊芳,梁绛菱.经内镜下金属钛夹治疗急性消化道大出血——附25例分析.现代消化及介入诊疗 2001; 6: 66-67

编辑 何燕 电编 何基才

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

• 消息 •

## 2007 全国早期胃癌及消化病进展研讨会征文通知

**本刊讯** 由中华医学会消化内镜学会主办,中华消化内镜学会胃病学组、浙江省消化内镜学会、温州医学院、上海市胃肠肿瘤重点学科承办的2007全国早期胃癌及消化病进展研讨会将于2007-11-16/18在浙江省温州市举行.邀请国内外专家作专题讲演及内镜操作演示.

#### 1 征文内容和要求

(1)有关早期胃癌及消化病进展;(2)胃癌及消化病诊疗的最新技术及研究成果.投稿截止日期:2007-10-10.

#### 2 联系方式

夏宣平, 325000, 浙江省温州市学院西路109号,温州医学院附属第二医院消化内科;贾国葆, 325000, 浙江省温州市温州医学院附属第一医院消化内科. Email: feyxh@163.com或xxpsummer@yahoo.com.cn.

## 回顾性分析临床药物性肝病109例

秦敏, 白文元, 谭莉莉

秦敏, 白文元, 谭莉莉, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

通讯作者: 白文元, 050000, 河北省石家庄市新华区和平路215号, 河北医科大学第二医院消化内科. wenyuanbai@medmail.com.cn  
电话: 0311-66002951

收稿日期: 2007-05-12 修回日期: 2007-09-24

### Retrospective clinical analysis of 109 cases of drug-induced liver disease

Min Qin, Wen-Yuan Bai, Li-Li Tan

Min Qin, Wen-Yuan Bai, Li-Li Tan, Department of Gastroenterology, Hebei Medical University Affiliated to the second Hospital, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China  
Correspondence to: Wen-Yuan Bai, Department of Gastroenterology, Hebei Medical University Affiliated to the second Hospital, 215 Heping Road, Xinhua District, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. wenyuanbai@medmail.com.cn

Received: 2007-05-12 Revised: 2007-09-24

### Abstract

**AIM:** To analyze the state of drug-induced liver disease and improve its clinical level on diagnosis and therapy.

**METHODS:** We investigated the causes and incidence of drug-induced liver disease in 109 cases occurring between 1999 and 2004.

**RESULTS:** Antibiotics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, anti-thyroid drugs, traditional Chinese medicines and anti-tuberculosis were the most common causes of drug-induced liver disease. Different drugs caused different liver injuries. The incidence of drug-induced liver disease annually was increased. Among 109 cases of drug-induced liver disease, 22.94% were symptomatic, whereas 77.06% were non-symptomatic. There were seven cases of chronic liver disease and 102 of acute drug-induced liver injury (67 cases of liver cell injury, 23 cases of cholestasis, 12 mixed cases). A cure was achieved in 17 cases, 81 cases improved, 10 cases were not cured, and 1 died.

**CONCLUSION:** Drug-induced liver disease

mostly manifests as acute drug-induced liver disease, with only a few incidences of chronic drug-induced liver disease; this is due to the species, dose and administration route of the causative drugs. Enhancing drug administration and patient monitoring might prevent drug-induced liver disease.

**Key Words:** Drug; Liver disease; Acute drug-induced liver disease

Qin M, Bai WY, Tan LL. Retrospective clinical analysis of 109 cases of drug-induced liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 3041-3044

### 摘要

**目的:** 分析总结近年来药物性肝病的情况, 提高本病的诊断治疗水平。

**方法:** 回顾调查1999-2004年各种药物致药物性肝病109例, 分析统计每年药物性肝病发病例数的变迁及临床情况。

**结果:** 抗生素、非甾体抗炎药、治疗甲亢药、中草药、抗结核药是主要的损肝药物。急性药物性肝损伤是逐年增加的, 肝损伤发生时间因所用药物不同而差异很大, 无临床症状者占22.94%, 有症状者占77.06%。慢性药物性肝病7例, 急性药物性肝损伤102例(肝细胞损伤型67例, 胆汁淤积型23例, 混合型12例);治愈17例, 好转81例, 未愈10例, 死亡1例。

**结论:** 药物性肝病多数表现为急性药物性肝损伤, 少数为慢性肝损伤, 取决于药物的种类、剂量和给药途径。药物性肝病的早期诊断与重视程度和认识有关, 加强规范合理用药及用药监测可以预防本病。

**关键词:** 药物; 肝病; 药物性肝病

秦敏, 白文元, 谭莉莉. 回顾性分析临床药物性肝病109例. *世界华人消化杂志* 2007;15(28):3041-3044

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3041.asp>

### 背景资料

近年来药物性肝病的报告屡见不鲜, 药物引起的肝脏损害日益受到重视。但因药物性肝病的诊断缺乏特异性诊断实验, 容易出现漏诊和误诊, 对我院近5年的药物性肝病的诊治情况进行总结分析, 发现目前药物性肝病诊断中存在的问题, 提高临床医师对本病的认识和警惕性。

### 研发前沿

中草药的配方复杂, 中草药引起的药物性肝病不易诊断, 容易漏诊, 因此研究中草药肝脏毒型及其机制成为目前研究的热点。



## 应用要点

药物性肝病的预防是非常重要的,临床医师对所用药物的适应证、性能和毒副作用应该熟悉掌握,要详细询问病史,特别是肝脏病史和过敏史或过敏体质。对有药物性肝损害病史的患者,应避免再度给予相同或化学结构类似的药物;避免滥用及长期大量用药,尽可能选用同类药物中毒性和副反应较少或较轻的药物,用药过程中应定期复查血像和肝功,应用中草药也应慎重,要认识到中草药亦是有副作用的,在其长期应用中定期复查血象和肝功,及早发现及时处理。

## 0 引言

近年来,随着新药的不断上市和药物种类的增加以及在临床上的广泛应用,药物性肝病(drug induced liver disease, DILD)的发生率也随之相应增加,已经成为当前临床上主要的医源性疾病之一,给患者带来不同程度的危害和经济负担,值得引起我们的重视。为了提高认识,早期发现,及时诊断和预防DILD,现对我院2000-01/2004-12住院的DILD患者进行回顾性分析,报告如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 回顾性分析2000-01-01/2004-12-31住院的DILD患者109例,男59例(54.13%),女50例(45.87%),平均年龄43(13-76)岁。其中2例HBsAg(+), HBeAb(+), HBeAb(+); 1例HBsAg(+), HBeAb(+); 3例抗-HEV(+); 2例抗-HCV(+); 1例EBV抗体(+).

**1.2 方法** 记录DILD患者的服药史(药物种类、剂量、给药途径、症状出现的时间、有无合并用药),临床表现,实验室检查(肝功能、血凝功能、病原学检查),药物性肝损伤不良反应处理情况及结局。统计各种原因所致肝损伤每年住院诊断例数。预后判定标准: (1)治愈: 临床症状体征完全消失或明显改善,胆红素、转氨酶、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶、碱性磷酸酶等肝功能指标降至正常范围; (2)好转: 临床症状好转,肝功能指标较治疗前下降,并低于正常上限2倍以下; (3)未愈: 症状体征无改善,肝功能指标改善不明显或病情加重; (4)死亡: 按照急性药物性肝损伤国际共识意见的量化评分方法<sup>[1]</sup>, 对每例急性药物性肝损伤住院病例中可疑药物与肝损伤之间的关联性程度做出判断(>8分, 非常可能; 6-8分, 很可能; 3-5分, 可能; 1-2分, 不太可能;  $\leq 0$ 分, 无关), 明确所服用药物与急性药物性肝损伤的关系。

## 2 结果

**2.1 引起肝损伤常见药物** 引起DILD的各类药物及其构成比: 最多为抗生素, 其后依次为非甾体抗炎药, 抗甲亢药, 中草药, 抗结核药, 中枢神经系统用药, 免疫抑制剂, 激素类, 预防脑出血药等。少见的有减肥药, 止泻药, 皮肤科用药(表1)。

**2.2 肝损伤发生时间** 肝损伤发生时间因所用药物不同而差异很大, 用药后出现药物性肝损伤的时间是:  $\leq 15$  d发病50例(45.87%), 15-30 d发病21例(19.27%), 30-45 d发病8例(7.34%), 45-60

d发病13例(11.93%), 60-75 d发病2例(1.83%), 75-90 d发病4例(3.67%),  $\geq 90$  d发病11例(10.09%)。

**2.3 临床表现** 无症状者25例(22.94%), 有症状者84例(77.06%)。其中恶心呕吐者49例, 黄疸者50例, 皮肤瘙痒者12例, 腹痛者8例, 过敏表现者10例, 脑病者4例, 皮疹1例。

**2.4 肝损伤表现类型预后特征** 慢性药物性肝病7例, 急性药物性肝损伤102例, 急性药物性肝损伤中肝细胞损伤型67例(59.8%), 胆汁淤积型23例(20.5%), 混合型12例(10.7%)。急性药物性肝损伤是逐年增加的, 2000年6例, 2001年8例, 2002年25例, 2003年30例, 2004年33例。急性药物性肝损伤与急性肝损伤的比值见表2。109例患者中, 治愈17例, 好转81例, 未愈10例, 死亡1例。

**2.5 急性药物性肝损伤病因关联性评价评分结果** 非常可能13例(12.75%), 很可能31例(30.39%), 可能50例(49.02%), 不太可能5例(4.90%), 无法评价3例(2.94%)。

## 3 讨论

随着基础医学的发展, 各类新药的不断涌现和广泛应用, 药物性肝病率呈上升趋势。目前已报道引起急慢性肝病的药物种类达1000多种<sup>[2]</sup>, 各类药物引起药物性肝病的比例报道不一致, 有的报道以抗菌素为主<sup>[3]</sup>, 有的报道以肿瘤药和结核药为主<sup>[4]</sup>。从对我院近5年DILD患者的回顾性分析结果中, 可以看出抗生素引起DILD占有患者中23.21%, 居于首位, 有相当高的比例。抗生素的种类繁多, 新的抗生素不断上市, 以及抗生素在临床的广泛应用, 使许多临床医生未能完全了解所有的抗生素副作用, 致使抗生素引起的药物性肝病极易漏诊, 从而延长疾病的病程, 使疾病恶化, 甚至造成患者死亡。因此, 早发现抗生素对肝脏的损害, 及时停药并给予合理的治疗是至关重要的。

非甾体抗炎药, 抗甲状腺机能亢进症(简称, 甲亢)药, 抗结核药引起的DILD分别为13.76%, 13.76%, 7.34%。这与结核病、甲亢以及风湿性疾病的发病率升高有关。非甾体抗炎药, 抗甲亢药, 抗结核药这3类药物都是极易引起发生DILD且需长期服用药的药物<sup>[5]</sup>。随着这几年结核患者的增多, 抗结核药引起的药物性肝病呈上升趋势<sup>[6]</sup>。因此在抗结核、抗甲亢以及引用非甾体抗炎药治疗前, 应常规检查肝功能, 尽量选用对肝脏损害小的药物, 而且在用药过程中应定期监测肝功能变化以早期发现DILD, 以便早期停用



表 1 引起DILD的药物分布率

药物种类	n(%)	药物
抗生素	25(22.94)	罗红霉素、青霉素、头孢三嗪、左氧氟沙星、环丙沙星、加替沙星、羟氨头孢菌素
非甾体抗炎药	15(13.76)	消炎痛、扶他林、布洛芬、去痛片、酮洛芬
抗甲亢药	15(13.76)	他巴唑、丙硫氧嘧啶、多抗甲素
中草药	11(10.09)	具体药名不详
抗结核药	8(7.34)	异烟肼、利福平、乙胺丁醇、利福喷丁、链霉素
中枢神经系统用药	5(4.59)	安定、氯丙嗪、多虑平、美多巴
免疫抑制剂	5(4.59)	甲胺喋呤、雷公藤、霉酚酸酯、来氟米特
感冒药	4(3.67)	速效感冒胶囊、含“PPA”感冒药
降糖药	4(3.67)	二甲双胍、优降糖、达美康
激素类	3(2.75)	强的松、甲强龙、复方左炔诺孕酮
预防脑出血用药	2(1.83)	维脑路通、脑复康、苏意、克敌
降血脂药	2(1.83)	脂必妥
抗真菌药	2(1.83)	酮康唑
降压药	1(0.92)	复方降压片
抗病毒药	1(0.92)	更昔洛韦
其他	6(5.50)	溶栓丸、肤力健、泻痢停、慢咽舒宁、咽炎片、脂肪燃烧弹、盐酸芬氟拉明
合计	109	

## 名词解释

药物性肝病(drug-induced liver disease, DILD): 是指由于药物或其代谢产物引起的肝细胞损害, 可以发生在原来没有肝脏疾病的人群或以往就有肝脏疾病的患者, 在使用某种药物后发生不同程度的肝细胞损害。

可疑药物及进行相应治疗<sup>[7]</sup>。

传统观念认为中草药治疗肝病较安全、不良反应少或轻微, 但近年来由他引起的肝损害报道日益增多<sup>[8]</sup>, 与一般的化学性药物不同, 大多数草药制剂成分复杂, 难以在药物上市前通过随机对照试验证明其有效性和安全性, 甚至某些“保肝”草药制剂也有潜在的肝毒性<sup>[9]</sup>。由于中草药的配方复杂, 因此对中草药引起的药物性肝病不易诊断, 容易漏诊。本组资料中草药引起DILD的构成比为10.09%, 因此临床医生该提高对中草药毒副作用认识, 及早发现中草药的肝损害, 及时停药。

一旦发现DILD及时处理往往预后较好, 因此早期诊断显得至关重要, 而早期诊断有赖于临床医生对本病的认识和警惕性。对我院109例药物性肝损伤病因关联性评价显示: 非常可能及很可能的是44例, 不到总数的50%。不太可能和无法评价的为8例, 占总数的7.84%。以上结果表明, 目前对DILD的诊断容易出现漏诊和误诊, 这是由于对DILD的诊断缺乏特异性诊断实验<sup>[10]</sup>, 以及一些临床医生尤其非专业医生对DILD的认识不足以及缺乏对DILD的警惕性。诊断需要依靠临床怀疑、详细用药史、考虑摄取药物与肝病发生时间之间的关系, 以及排除其他疾病。

药物性肝病的预防是非常重要的, 临床医师对所用药物的适应证、性能和毒副作用应该

表 2 急性药物性肝损伤住院诊断构成比统计表(n)

时间(年)	急性药物性肝损伤	急性肝损伤	急性药物性肝损伤/急性肝损伤(%)
2000	6	28	21.42
2001	8	41	19.51
2002	25	105	23.81
2003	30	110	27.27
2004	33	145	22.72
合计	102	429	23.78

熟练掌握, 要详细询问病史, 特别是肝脏病史和过敏史或过敏体质。对有药物性肝损伤病史的患者, 应避免再度给予相同或化学结构类似的药物; 避免滥用及长期大量用药, 尽可能选用同类药物中毒性和副反应较少或较轻的药物, 用药过程中应定期复查血像和肝功。应用中草药也应慎重, 要认识到中草药亦是有副作用的, 在其长期应用中定期复查血象和肝功, 及早发现及时处理。只要重视预防, 加强监测, 中毒性药物性肝损害常常是可以避免的。

## 4 参考文献

- 1 Danan G, Benichou C. Causality assessment of adverse reaction to Drug-I. Anovel method based on the conclusions of international consensus meeting: application to drug-induced liver injuries.

同行评价  
本文研究的病例  
数较多, 数据可  
信, 有一定的科学  
性和应用价值.

- 1993; 46: 1323-1330
- 2 Ikeda T. Drug-induced liver injury. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2006; 127: 454-459
- 3 Andrade RJ, Lucena MI, Fernandez MC, Pelaez G, Pachkoria K, Garcia-Ruiz E, Garcia-Munoz B, Gonzalez-Grande R, Pizarro A, Duran JA, Jimenez M, Rodrigo L, Romero-Gomez M, Navarro JM, Planas R, Costa J, Borrás A, Soler A, Salmeron J, Martin-Vivaldi R. Drug-induced liver injury: an analysis of 461 incidences submitted to the Spanish registry over a 10-year period. *Gastroenterology* 2005; 129: 512-521
- 4 Meier Y, Cavallaro M, Roos M, Pauli-Magnus C, Folkers G, Meier PJ, Fattinger K. Incidence of drug-induced liver injury in medical inpatients. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61: 135-143
- 5 de Abajo FJ, Montero D, Madurga M, Garcia Rodriguez LA. Acute and clinically relevant drug-induced liver injury: a population based case-control study. *Br J Clin Pharmacol* 2004; 58: 71-80
- 6 Shigeto E. Survey of anti-tuberculosis drug-induced severe liver injury in Japan. *Kekkaku* 2007; 82: 467-473
- 7 Saukkonen JJ, Cohn DL, Jasmer RM, Schenker S, Jereb JA, Nolan CM, Peloquin CA, Gordin FM, Nunes D, Strader DB, Bernardo J, Venkataramanan R, Sterling TR. An official ATS statement: hepatotoxicity of antituberculosis therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 935-952
- 8 Escher M, Desmeules J, Giostra E, Mentha G. Hepatitis associated with Kava, a herbal remedy for anxiety. *BMJ* 2001; 322: 139
- 9 Schiano TD. Hepatotoxicity and complementary and alternative medicines. *Clin Liver Dis* 2003; 7: 453-473
- 10 王思宝, 张定凤. 现代肝脏病学. 第1版. 北京: 科学出版社, 2003: 700

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

## • 消息 •

### 2007 年国际会议

Meeting Falk Workshop: Mechanisms of Intestinal Inflammation

10 October 2007

Dresden

symposia@falkfoundation.de

Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology

11-12 October 2007

Dresden

symposia@falkfoundation.de

American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting

12-17 October 2007

Pennsylvania Convention Center

Philadelphia, PA

Meeting APDW 2007 - Asian Pacific Digestive Disease Week 2007

15-18 October 2007

Kobe

apdw@convention.co.jp

15th United European Gastroenterology Week, UEGW

27-31 October 2007

Le Palais des Congrès de Paris, Paris, France

Meeting The Liver Meeting® 2007 - 57th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases

2-6 November 2007

Boston - MA

www.aasld.org

# 原位肝移植术后胆道并发症诊治134例

崔东旭, 刘臻, 刘宝林, 张小薄, 许维雪, 邓永林, 沈中阳

崔东旭, 刘臻, 刘宝林, 张小薄, 许维雪, 中国医科大学盛京医院移植外科 辽宁省沈阳市 110004  
邓永林, 沈中阳, 天津市第一中心医院移植外科 天津市 300192

通讯作者: 崔东旭, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学盛京医院移植外科. cuidongxu@hotmail.com.cn  
电话: 024-83955052

收稿日期: 2007-06-27 修回日期: 2007-09-22

## Diagnosis and treatment of biliary complication after orthotopic liver transplantation: an analysis of 134 cases

Dong-Xu Cui, Zhen Liu, Bao-Lin Liu, Xiao-Bo Zhang, Wei-Xue Xu, Yong-Lin Deng, Zhong-Yang Shen

Dong-Xu Cui, Zhen Liu, Bao-Lin Liu, Xiao-Bo Zhang, Wei-Xue Xu, Department of Transplantation Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Yong-Lin Deng, Zhong-Yang Shen, Department of Transplantation Surgery, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China

Correspondence to: Dong-Xu Cui, Department of Transplantation Surgery, Shengjing Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. cuidongxu@hotmail.com.cn

Received: 2007-06-27 Revised: 2007-09-22

## Abstract

**AIM:** To investigate the prevention and treatment of biliary complications after orthotopic liver transplantation.

**METHODS:** One hundred and thirty-four recipients undergoing liver transplantation between October 2004 and January 2006 were retrospectively reviewed.

**RESULTS:** Biliary complications occurred in 18 cases. Seventeen patients were cured, while 1 patient gave up treatment. Biliary strictures occurred in 12 cases, bile leakage in 2 cases, and cholelithiasis in 6 cases. The incidence of biliary complications due to a T tube was 11.7% (14/120). Cold ischemic time and double hot ischemic time in the group of patients with bili-

ary complications (624 minutes and 60 minutes, respectively) were longer than those in the group of patients without biliary complications (384 minutes and 43 minutes, respectively; both  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The most important reason for biliary complications is preservative and ischemic injury. Early cholangiography and MRI are helpful in the diagnosis of biliary complications. Treatment of biliary tract complications by intervention is effective.

**Key Words:** Liver transplantation; Bile duct; Complication

Cui DX, Liu Z, Liu BL, Zhang XB, Xu WX, Deng YL, Shen ZY. Diagnosis and treatment of biliary complication after orthotopic liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 3045-3048

## 摘要

**目的:** 探讨原位肝移植术后胆道并发症的预防和治疗。

**方法:** 回顾性分析2004-10/2006-01施行的134例肝移植患者的临床资料。

**结果:** 18例患者(共20例次)出现胆道并发症, 治愈17例, 1例放弃治疗。其中胆道狭窄12例次, 胆漏2例次, 胆管结石6例次。与T管相关的胆道并发症发生率为11.7%(14/120)。胆道并发症组冷缺血时间(624 min)和二次热缺血时间(60 min)均高于无胆道并发症组(384 min, 43 min, 均 $P < 0.05$ )。

**结论:** 保存性损伤和缺血性损伤是肝移植术后胆道并发症的重要原因。术后早期胆道造影并联合应用核磁共振胆管成像有助于及时诊断胆道并发症。介入技术是胆道并发症的主要治疗手段。

**关键词:** 肝移植; 胆道; 并发症

崔东旭, 刘臻, 刘宝林, 张小薄, 许维雪, 邓永林, 沈中阳. 原位肝移植术后胆道并发症诊治134例. 世界华人消化杂志

## 背景资料

随着肝移植手术及术后管理的不断成熟, 肝移植术后胆道并发症的发生率近年来有所下降, 但其致死率仍较高, 是导致肝移植失败的主要原因之一。探讨胆道并发症的病因、诊断和治疗方法, 有助于进一步提高肝移植成功率。

**相关报道**  
胆道并发症的研究着重于病因、胆道重建方式、早期诊断、治疗方法的选择等多个方面,但在某些因素的研究上,许多报道并未达成共识,寻找发生胆道并发症的易感因素及更为合理有效的处理方法仍是需要进一步研究的问题。

2007;15(28):3045-3048

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3045.asp>

## 0 引言

近年来,临床肝移植发展迅速,已成为改善终末期肝病患者预后、挽救生命的重要治疗手段。但是,术后胆道并发症的发生率仍较高,是目前肝移植手术面临的主要问题之一,影响患者长期生存及生活质量。本文回顾性分析134例原位肝移植患者胆道并发症临床资料,总结胆道并发症的诊疗经验。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 自2004-10/2006-01共实施同种异体原位肝移植134例,男123例,女11例,年龄18-74(中位年龄49)岁。原发病包括:肝炎后肝硬化45例,慢性重症肝炎3例,酒精性肝硬化7例,肝豆状核变性1例,原发性胆汁性肝硬化3例,原发性硬化性胆管炎1例,原发性肝癌73例,肝转移癌1例。

### 1.2 方法

**1.2.1 供肝情况** 均采用UW保存液灌洗保存,热缺血时间2-7(平均5) min;冷缺血时间245-720(平均416) min。2次热缺血(门静脉开放到肝动脉开放)时间27-90(平均46) min。全组病例供受者ABO血型均相同。

**1.2.2 胆道重建方式** 134例患者中118例行经典原位肝移植,供受体胆总管端端吻合,其中112例留置T管引流,6例未留置T管。16例行改良背驮式肝移植,胆总管端端吻合,其中8例未放置T管,8例放置T管。

**1.2.3 术后监测** 134例患者多数采用FK506、骁悉、激素三联免疫抑制方案,少数例采用FK506、激素两联免疫抑制方案。术后密切监测肝功、凝血、FK506、乙肝表面抗体滴度、巨细胞病毒抗原PP65等指标。胆道并发症临床表现多样,可以出现不同程度的腹痛、发热、黄疸,肝功能显示胆红素、谷丙转氨酶、谷氨酰转肽酶、碱性磷酸酶有不同程度的升高。术后定期行彩色多普勒超声、肝脏CT检查,必要时行磁共振胰胆管成像(MRCP)及内镜下逆行胰胆管造影(ERCP)检查,观察肝移植术后肝脏的形态、血流动力学变化(包括肝动脉阻力指数、流量、门静脉内径和流量)、胆树全貌,以便及时发现胆道狭窄或扩张及其部位和程度。

## 2 结果

**2.1 胆道并发症发生情况** 134例患者术后18例

(共20例次)发生胆道并发症,发生率为13.4%:胆道狭窄12例次,胆漏2例次,胆管结石6例次。120例行T管引流,14例发生胆道并发症,发生率11.7%;14例未行T管引流患者中4例发生胆道并发症,发生率为28.6%,两组胆道并发症发生率无统计学差异( $P>0.05$ )。术后3 mo内胆道并发症发生率为8.2%(12/134),3 mo后发生率为6.0%(8/134)(表1)。

**2.2 胆道并发症与缺血时间相关性** 发生胆道并发症组热缺血时间平均为5 min,未发生组为5 min,两组比较,无明显差异( $P>0.05$ )。发生胆道并发症组冷缺血时间平均为624 min,未发生组为384 min,两组比较,差异显著( $P<0.05$ )。2次热缺血时间,发生胆道并发症组为60 min,未发生组为43 min,两组差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.3 治疗** 治愈17例,1例放弃治疗。4例单纯吻合口狭窄患者,1例接受ERCP球囊扩张,胆道内支架置入;2例接受PTC球囊扩张,内支架置入治疗;1例经T管球囊扩张。7例非吻合口狭窄患者,3例经ERCP球囊扩张,胆道内支架置入;1例经ERCP球囊扩张;1例经T管置胆道引流管引流,之后又发生胆总管结石,行ERCP取石;1例术后1 mo出现吻合口上方胆管狭窄,行ENBD治疗好转,术后3 mo,出现胆道吻合口上方胆管狭窄,经手术扩张狭窄胆道,留置T管好转,但术后5 mo,出现肝内胆管弥漫性狭窄,行二次肝移植治愈;另1例术后14 d发生吻合口上方胆总管狭窄,经T管更换胆道引流管2次后,肝功持续恶化,拟行二次肝移植,但患者放弃治疗出院。2例胆漏患者,1例术后2 mo T管造影示T管开口处少量渗漏,开放T管,术后3 mo拔T管,肝内外胆管正常。另1例术后3 mo拔T管后出现胆漏,经T管窦道放入引流管引流后治愈。3例胆总管结石患者均经ERCP取石治愈。2例肝内存在泥沙样结石患者1例行ERCP取石、冲洗;1例给予利胆溶石药物治疗。

## 3 讨论

随着肝移植外科的成熟、器官保存技术的改善及新型免疫抑制剂的应用,肝移植近年来得到迅速推广,且术后成功率稳步提高。肝移植术后胆道并发症的发生率由20世纪90年代以前的35%-50%降至目前的9%-30%<sup>[1]</sup>,但其致死率仍较高,是导致肝移植失败的主要原因之一<sup>[2]</sup>。因此,肝移植术后胆道并发症的早期诊断和处理对改善移植肝功能,提高移植肝成活率及患者术后生存质量具有重要意义。

表 1 18例胆道并发症患者临床资料

病例号	发病时间(mo)	有无T管	病变	治疗方法	预后
1	3	无	胆总管结石	ERCP取石	治愈
2	2	有	T管引出口处胆漏	T管开放引流	治愈
3	3、8	有	肝外胆道轻度狭窄、胆总管结石	引流管引流、ERCP取石	治愈
4	3	有	吻合口轻度狭窄	经T管球囊扩张	治愈
5	2.5	有	左右肝管汇合部狭窄	ERCP球囊扩张	治愈
6	9	有	肝门部胆管狭窄	ERCP球囊扩张、内支架置入	治愈
7	3	有	肝内胆管胆泥	利胆	治愈
8	8	有	胆总管结石	ERCP取石	治愈
9	1、5	无	吻合口上方胆总管狭窄、 肝内胆管弥漫性狭窄	二次肝移植	治愈
10	0.5	有	吻合口上方胆总管狭窄	胆管引流	放弃
11	4	有	吻合口狭窄	ERCP球囊扩张、内支架置入	治愈
12	3	有	拔T管后胆漏	经T管置管引流	治愈
13	2.5	有	胆总管结石	ERCP取石	治愈
14	10	有	左右肝管汇合部狭窄	ERCP球囊扩张、内支架置入	治愈
15	3	无	吻合口狭窄	PTC内支架置入	治愈
16	3	无	吻合口狭窄	PTC内支架置入	治愈
17	4	有	左右肝管汇合处狭窄	ERCP球囊扩张、内支架置入	治愈
18	8	有	肝内胆管胆泥	ERCP取石、冲洗	治愈

## 应用要点

本文总结了内镜和介入技术是治疗胆道并发症的主要手段。肝移植患者术后应严格定期复查, 尤其对于表现为碱性磷酸酶、谷氨酰转肽酶升高的患者, 及时进行MRCP或胆道造影, 有助于早期明确诊断。

胆道并发症是指具有临床表现, 有放射学依据, 需要进行手术或介入治疗的胆道狭窄、梗阻及胆漏等<sup>[3]</sup>, 本组病例胆道并发症的发生率为13.4%。研究显示: 供肝冷热缺血时间过长与肝移植术后胆道系统的损伤密切相关, 冷缺血性损伤是肝移植术后发生胆道并发症的重要原因。本组结果显示胆道并发症组冷缺血时间和二次热缺血时间均高于无胆道并发症组。因此, 缩短供肝冷缺血时间及二次热缺血时间有利于减少胆道损伤。Ostroff *et al*<sup>[4]</sup>提出, 同时开放门静脉和肝动脉有助于降低胆道缺血性并发症的发生率, 但此方法延长了无肝期, 相应带来了一系列的问题, 有待进一步研究。本组中热缺血时间为2-7 min, 平均5 min。胆道并发症组与无胆道并发症组热缺血时间无差异(均为5 min), 因此, 我们认为热缺血时间在5 min内对控制胆道并发症的发生是有利的。

由于供肝内胆汁对胆管上皮有自溶作用, 易引起黏膜破坏和胆泥形成, 引起胆道梗阻。因此供肝切取时除了尽量缩短热、冷缺血时间外, 应对胆道进行充分冲洗直到灌洗液呈清亮色, 减少胆道损伤。

本组120例行T管引流患者, 14例发生胆道并发症, 发生率11.7%; 14例未行T管引流患者中4例发生胆道并发症, 发生率为28.6%, 两组比较无统计学差异。对于肝移植手术胆总管是否放

置“T”管的问题一直存在争议。近年来, 国内外一些移植中心就这一问题进行了一些研究, 但得到的结论并不一致, Jeffrey *et al*<sup>[5]</sup>认为是否放置T管与胆道并发症无明显影响; 而Scatton *et al*<sup>[6]</sup>研究显示留置T管组的胆道并发症的发生率明显增高。我们认为, 这种差异可能是由于研究例数较少, 考虑相关因素不同所致。由于留置T管存在医源性感染、胆泥形成等弊端, 故手术是否留置“T”管要根据具体情况而定。我们对于胆道灌洗充分, 冷缺血、二次热缺血时间短, 供受体胆管口径匹配, 术中测定肝动脉血流良好的患者不留置T管。由于留置T管的问题之一是拔管后胆漏, 故在拔除管时, 通过造影经T管于局部再留置引流管, 充分引流, 若无胆漏发生, 2 wk后拔除引流管。本组患者仅有2例发生胆漏, 发生率低于国内外报道, 且2例患者经充分引流及ERCP内支架置入治愈。

本组18例胆道并发症患者16例经非手术治疗方法治愈, 治愈率88.9%。目前内镜、介入方法是治疗胆道并发症的主要手段<sup>[7]</sup>。本组11例胆道狭窄患者, 1例行ERCP球囊扩张, 4例行ERCP内支架置入, 2例行PTC内支架置入治愈。本组2例行PTC内支架治疗患者, 是由于胆道吻合口严重狭窄, ERCP下导丝无法通过, 故改行PTC。我们认为ERCP或PTC选择主要是依据胆道并发症的位置, 位于肝门部以上的胆道并发症一般



同行评价  
本文立意科学性  
较高,经验值得推  
广应用,是一篇较  
好的临床研究论  
文。

选用PTC,而肝门部以下的一般选用ERCP。如果患者肝内胆管明显扩张,PTC可能更适合,因为ERCP下置入支架易出现胰腺炎、胆管炎等并发症。胆泥淤积是肝移植术后胆道并发症中处理比较困难的一种情况,往往因胆管上皮坏死脱落淤积所致,与慢性排斥反应有关,严重者可形成胆管铸型综合征。对此类患者,我们先采用保守治疗,*po*熊去氧胆酸片及利胆溶石类药物,如无效则采用ERCP治疗,术中可用取石篮取石以及反复胆道冲洗,放置鼻胆管引流,术后亦可冲洗,这与Rerknimitr提出的胆汁淤积内镜解决方法一致<sup>[8]</sup>。

本组66.7%(12/18)的胆道并发症发生于术后3 mo内,其余发生于术后12 mo内。因此,肝移植患者术后应严格定期复查,尤其对于肝功异常,特别是表现为碱性磷酸酶、谷氨酰转肽酶升高的患者,及时进行MRCP或胆道造影,早期明确诊断。

总之,胆道并发症是肝移植术后常见的并发症,寻找发生胆道并发症的易感因素及更为合理有效的处理方法仍是我们需要进一步研究的问题。

#### 4 参考文献

1 Icoz G, Kilic M, Zeytunlu M, Celebi A, Ersoz G, Killi

- R, Memis A, Karasu Z, Yuzer Y, Tokat Y. Biliary reconstructions and complications encountered in 50 consecutive right-lobe living donor liver transplantations. *Liver Transpl* 2003; 9: 575-580
- 2 Buczkowski AK, Schaeffer DF, Kim PT, Ho SG, Yoshida EM, Steinbrecher UP, Erb SR, Chung SW, Scudamore CH. Spatulated end-to-end bile duct reconstruction in orthotopic liver transplantation. *Clin Transplant* 2007; 21: 7-12
- 3 Verdonk RC, Buis CI, Porte RJ, Haagsma EB. Biliary complications after liver transplantation: a review. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2006: 89-101
- 4 Ostroff JW. Post-transplant biliary problems. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2001; 11: 163-183
- 5 Jeffrey GP, Brind AM, Ormonde DG, Frazer CK, Ferguson J, Bell R, Kierath A, Reed WD, House AK. Management of biliary tract complications following liver transplantation. *Aust N Z J Surg* 1999; 69: 717-722
- 6 Scatton O, Meunier B, Cherqui D, Boillot O, Sauvanet A, Boudjema K, Launois B, Fagniez PL, Belghiti J, Wolff P, Houssin D, Soubrane O. Randomized trial of choledochocholedochostomy with or without a T tube in orthotopic liver transplantation. *Ann Surg* 2001; 233: 432-437
- 7 Scarborough JE, Desai DM. Treatment options for biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2007; 10: 81-89
- 8 Rerknimitr R, Sherman S, Fogel EL, Kalayci C, Lumeng L, Chalasani N, Kwo P, Lehman GA. Biliary tract complications after orthotopic liver transplantation with choledochocholedochostomy anastomosis: endoscopic findings and results of therapy. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 224-231

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

• 消息 •

## 关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

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

## 双气囊电子小肠镜在小肠疾病诊断中的应用价值

毛高平, 宁守斌, 白莉, 唐杰, 曹传平, 杨春敏, 陈英, 周平, 杜斌

毛高平, 宁守斌, 白莉, 唐杰, 曹传平, 杨春敏, 陈英, 周平, 杜斌, 中国人民解放军空军总医院消化内科 北京市 100036  
全军十一五面上课题资助项目, No. 06MA026  
通讯作者: 毛高平, 100036, 北京市, 中国人民解放军空军总医院消化内科. maogaoping@medmail.com.cn  
电话: 010-66928232  
收稿日期: 2007-05-15 修回日期: 2007-09-21

### Double balloon endoscopy for the diagnosis of small intestinal disorders

Gao-Ping Mao, Shou-Bin Ning, Li Bai, Jie Tang, Chuan-Ping Cao, Chun-Min Yang, Ying Chen, Ping Zhou, Bin Du

Gao-Ping Mao, Shou-Bin Ning, Li Bai, Jie Tang, Chuan-Ping Cao, Chun-Min Yang, Ying Chen, Ping Zhou, Bin Du, Department of Gastroenterology, Air-force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100036, China  
Supported by: the Project of Chinese PLA during the 11<sup>th</sup> 5 year plan period, No. 06MA026  
Correspondence to: Gao-Ping Mao, Department of Gastroenterology, Air-force General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100036, China. maogaoping@medmail.com.cn  
Received: 2007-05-15 Revised: 2007-09-21

### Abstract

**AIM:** To evaluate the diagnostic rates, indications and complications of double balloon enteroscopy (DBE) for small-bowel diseases

**METHODS:** A total of 183 patients with suspected or known small-bowel disease underwent 210 DBE procedures (under anesthesia with propofol, via an oral approach 61 patients, an anal approach in 95 patients, or both approaches 27 patients) at our institution.

**RESULTS:** The success rate of DBE was 99.5% (209/210). The mean duration of the procedure was 75 (30 - 180) min. A positive diagnosis was achieved in 130 patients, giving an overall of 71.0% (130/183). The main discovered small-bowel diseases were as follows: jejunitis/ileitis ( $n = 43$ ), Crohn's disease ( $n = 19$ ), angiodysplastic lesions ( $n = 17$ ), polyps ( $n = 14$ ), tumor ( $n = 14$ , malignancy 10, benign 4), Peutz-Jeghers syndrome ( $n = 8$ ), diverticula and celiosites of the small intestine ( $n = 4$  respectively), and other

rare diseases of the intestine ( $n = 7$ ). A few patients complained of light indisposition or pain in the pharyngeal portion or pars analis after the DBE procedure.

**CONCLUSION:** The procedure is safe and useful, provides high diagnostic yields, and can be regarded as the first-choice of examination procedure for suspected small-bowel diseases.

**Key Words:** Double-balloon endoscopy; Small-intestinal diseases; Diagnosis

Mao GP, Ning SB, Bai L, Tang J, Cao CP, Yang CM, Chen Y, Zhou P, Du B. Double balloon endoscopy for the diagnosis of small intestinal disorders. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(28): 3049-3053

### 摘要

**目的:** 探讨和评价双气囊电子小肠镜(DBE)对小肠疾病的诊断价值、安全性及适应症。

**方法:** 对怀疑或证实有小肠疾病的183例患者在异丙酚麻醉/镇静状态下进行210例次(经口检查61例, 经肛门检查95例, 双侧对接检查27例)DBE检查。

**结果:** 检查成功率为99.5%(209/210), 平均检查时间75(30-180) min。小肠病变阳性检出率为71.0%(130/183), 检出的主要病变有: 小肠炎症性改变( $n = 43$ )、小肠Crohn病( $n = 19$ )、小肠血管发育不良( $n = 17$ )、小肠息肉( $n = 14$ )、小肠肿瘤( $n = 14$ , 恶性10例, 良性4例)、Peutz-Jeghers综合征( $n = 8$ )、小肠憩室及小肠寄生虫病各4例, 其他少见小肠疾病7例。仅少数患者检查结束后有轻微咽部或肛门部疼痛不适和腹胀。

**结论:** DBE能够对整个小肠进行直视检查, 检查成功率高, 安全可靠, 对小肠疾病检出率高, 可作为小肠疾病诊断的首选方法。

**关键词:** 双气囊电子小肠镜; 小肠疾病; 诊断

毛高平, 宁守斌, 白莉, 唐杰, 曹传平, 杨春敏, 陈英, 周平, 杜斌。

### 背景资料

双气囊电子小肠镜(DBE)的发明和临床应用, 使临床医师在不开腹的前提下对整个小肠进行内镜下直视检查成为可能。但作为一项新技术, 临床应用经验还比较缺乏, 检查的适应症、操作技巧、小肠疾病镜下的识别和诊断、检查的并发症和风险等都需要进一步临床验证。

**研发前沿**  
随着双气囊电子小肠镜检查技术的不断完善和相关机械配件的研究开发,该技术将可能成为诊断小肠疾病的金标准,而且也可能在部分小肠疾病的内镜介入治疗方面发挥重要作用。

双气囊电子小肠镜在小肠疾病诊断中的应用价值. 世界华人消化杂志 2007;15(28):3049-3053  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3049.asp>

## 0 引言

双气囊电子小肠镜(DBE)是近年发展起来的一项用于深部小肠检查的新方法<sup>[1]</sup>. 近年来,国内外在应用DBE诊断小肠疾病方面积累了一些经验,初步的临床应用表明, DBE对小肠疾病的总体诊断率达到60%-80%,并发症相对较低(1%-3%)<sup>[2-11]</sup>. 但是,目前报道的大多是一些小样本资料,还缺乏多中心及大样本的总结性资料. 作为一项新的临床检查手段,其临床实用性、安全性等还需要进一步验证. 本文拟将我们自2003年以来积累的210例次双气囊小肠镜检查的病例作一总结和分析.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2003-12/2007-04,对已经接受电子胃镜和结肠镜检查,怀疑或证实有小肠疾病的183例患者[女74例,男109例,平均年龄48.6(12-80)岁]在麻醉/镇静状态下进行了210例次(经口检查61例次,经肛门检查95例次,双侧对接检查27例次)DBE检查,不明原因消化道出血74例,长期腹痛30例,临床怀疑Crohn病23例,长期腹泻18例,不完全性小肠梗阻16例. 其他检查提示小肠病变13例,临床怀疑或已确诊的Peutz-Jeghers综合征9例. 双气囊电子小肠镜为富士能EN-450/P5型以及与之配套的活检钳、圈套器、注射针等配件.

**1.2 方法** 检查前常规进行肠道清洁准备,由麻醉科医师静脉滴注异丙酚等药物进行镇静/麻醉,在吸氧、持续心电监护及严密观察生命体征的情况下进行双气囊电子小肠镜检查. 一般经口检查时异丙酚用量稍大,年龄大于60岁者常规气管插管给氧;经肛门检查时异丙酚用量较少,一般只需保持镇静状态即可,调整用量以检查患者无痛苦为原则. 根据患者的临床资料判断疾病的大致部位,估计病变在中上段小肠者选择经口腔途径进镜,怀疑在远段小肠病变者选择经肛门途径进镜. DBE检查成功的评判标准:经口检查超越幽门50 cm以上,经肛门检查超越回盲瓣50 cm以上,如果在小肠两端50 cm以内发现小肠病变导致小肠狭窄,小肠镜无法通过而停止检查者,按检查成功计算.

**统计学处理** 检查统计结果以mean±SD表示.

表 1 双气囊小肠镜对可疑小肠疾病的阳性检出率

受检原因	n	检出小肠病变n	阳性检出率(%)
不明原因	74	63	85.1
消化道出血			
临床怀疑Crohn病	23	19	82.6
不完全性小肠梗阻	16	12	75.0
长期腹痛	30	10	33.3
长期腹泻	18	5	27.8
其他检查提示有小肠病变	13	13	100
可疑或确诊的Peutz-Jeghers综合征	9	8	88.9
总计	183	130	71.0

## 2 结果

**2.1 DBE检查的完成情况** 183例患者总共接受了210次DBE检查(经口88次,经肛门122次),只有1例因回盲部变形、狭窄,小肠镜未能通过狭窄部,检查失败. 有5例因回肠末段狭窄停止进镜(距回盲瓣30 cm以内,肿瘤2例,炎症性狭窄3例),有2例因十二指肠水平部狭窄停止进镜(2例均为恶性肿瘤). 其余患者经口检查均到达回肠上段或中段,经肛门进镜可到达空回肠交界部或以上. 检查成功率为99.5%(209/210),平均检查时间75±45(30-180) min. 双气囊电子小肠镜对可疑小肠疾病的阳性检出率和检出的主要小肠病变见表1,表2. 另外检出大肠疾病37例,胃、十二指肠疾病16例(其中结肠癌4例,胃癌1例). 部分典型病例图片见图1.

**2.2 DBE检查相关的并发症** 异丙酚麻醉/镇静过程中只有2例出现短暂的呼吸抑制,血氧饱和度下降,经对症处理后恢复正常. 操作过程中所有患者无任何不适,有少数患者在清醒后诉轻微的咽部或肛门部疼痛不适及腹胀. 有1例不全肠梗阻患者经口检查后腹痛加重伴频繁呕吐,排便排气停止,急诊外科手术发现回肠末段巨大憩室,憩室底部有一直径3 cm的脂肪瘤,憩室及脂肪瘤向肠腔内翻导致肠套叠,行外科手术切除. 无胃肠穿孔和出血等其他严重并发症出现.

## 3 讨论

DBE是小肠疾病检查手段上的重要进展,理论上可以在不开腹的情况下进行全小肠直视检查. 经过近几年的临床初步应用实践, DBE对小肠疾病的诊断价值基本得到肯定,对小肠疾病的总

表 2 双气囊小肠镜检出的主要小肠病变

疾病	n	备注
小肠炎症性改变	43	黏膜充血、糜烂、溃疡及炎性增生性改变, 病理提示均为小肠黏膜慢性炎
小肠Crohn病	19	多为小肠节段性炎性改变, 以回肠末段多见
小肠血管畸形	17	有孤立存在的血管瘤或血管畸形扩张, 但多数为散在分布的小肠毛细血管扩张
小肠肿瘤	14	恶性10例, 良性4例
小肠息肉	14	病理提示为腺瘤性或炎性息肉
Peutz-Jeghers综合征	8	病理提示多为错构瘤
小肠憩室	4	其中2例为Meckel憩室
小肠寄生虫病	4	钩虫2例, 蛔虫2例
其他少见小肠疾病	7	如出血坏死性小肠炎、骨髓移植术后小肠弥漫性病变(移植植物抗宿主病)等
总计	130	

## 应用要点

双气囊小肠镜对小肠出血性疾病、小肠Crohn病、不完全性小肠梗阻等有较高的阳性检出率, 因此对这类疾病具有重要的临床诊断价值, 而对于长期腹痛及腹泻患者的阳性检出率相对较低, 临床应用价值有限。由于检查过程中会给患者带来较大痛苦, 适当应用镇静和/或麻醉剂可减轻患者痛苦, 提高检查耐受性。

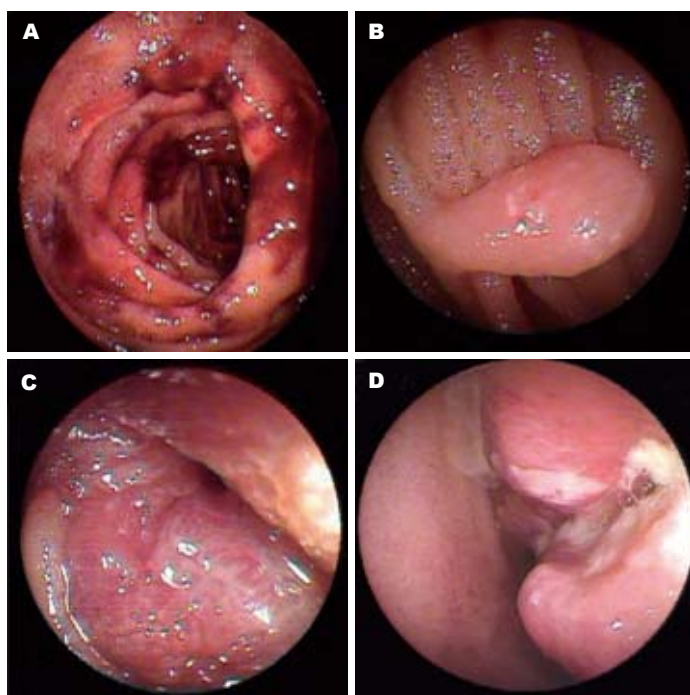


图 1 双气囊小肠镜检查的小肠疾病. A: 出血坏死性小肠炎(经口进镜, 空肠上段开始见广泛小肠黏膜坏死、剥脱及出血); B: 小肠息肉(经口进镜, 距幽门约200 cm处); C: 小肠Crohn病(经肛门进镜, 回肠末段开始见节段性分布的炎性病变, 距回盲瓣约50 cm处见环形针孔样狭窄); D: 小肠恶性淋巴瘤(经肛门进镜, 距回盲瓣约80 cm处见巨大肿物, 表面溃疡形成, 病理提示为恶性淋巴瘤)。

诊断率达到60%-80%<sup>[2-12]</sup>。我们的结果表明, DBE总诊断率为71.0%(130/183), 尤其对不明原因消化道出血的诊断率达到了85.1%(63/74), 与文献报道一致。DBE对小肠黏膜的观察更直观、清晰, 可以通过控制镜身对可疑部位反复观察, 尤其对可疑病变可以通过活检获得病理学诊断<sup>[7-8]</sup>。其对小肠疾病的诊断优势显而易见。

DBE检查操作时间长, 如果在清醒状态下检查, 会给患者带来较大痛苦, 尤其经口腔检查时, 外套管的反复推进和勾拉, 可以引起患者强烈的恶心及呕吐等反应, 患者往往因不能耐受长时间检查而影响小肠镜插入深度。所以我们推荐在条件允许的情况下, 适当的应用麻醉/镇静剂, 可明显减轻患者的痛苦, 提高检查质量<sup>[3]</sup>。但对于麻醉风险, 应该高度警惕。我们曾遇到2

例患者在检查过程中血氧饱和度降低, 最低降至40%, 经面罩加压给氧后恢复。对经口检查的患者, 因为要求麻醉程度较深, 应常规气管插管。对于经肛门检查的患者, 可视具体情况调整药物用量, 只要患者能耐受, 尽量减少麻醉剂和镇静剂的用量。

由于DBE检查操作有一定难度, 可能引起小肠穿孔、出血、急性胰腺炎、肠梗阻等严重并发症<sup>[13-17]</sup>, 检查时间长, 耗材和检查费用昂贵, 而且小肠疾病发病率相对较低, 所以对DBE检查的适应症应该严格把握。在决定行DBE检查之前, 尽量先进行胃镜、结肠镜、消化道气钡造影及腹部CT等检查, 排除胃、十二指肠、大肠疾病及消化道以外的疾病, 并提供有关小肠疾病的线索, 这对于我们决定是否行DBE检查非



同行评价  
本文内容较新, 病例样本较大, 有很好的临床利用价值和参考价值.

常重要. 我们的结果表明, 对于经胃镜、结肠镜检查而未发现出血灶的消化道出血患者, DBE检查的阳性率高达85.1%(63/74), 临床怀疑Crohn病的阳性检出率为82.6%(19/23), 不全性肠梗阻的阳性检出率75%(12/16), 长期腹痛的阳性检出率为33.3%(10/30), 长期腹泻的阳性检出率27.8%(5/18). 以上数据说明, DBE对小肠出血性疾病、小肠Crohn病、小肠不全梗阻等疾病阳性检出率较高, 而对于长期腹痛及腹泻患者阳性检出率较低. 值得注意的是, 我们对1例临床表现为不全性肠梗阻的患者经口进镜行小肠镜检查后, 腹痛、呕吐等症状加重, 急诊手术提示回肠末端憩室内翻导致肠套叠发生. 所以对不全性肠梗阻的患者, 检查前应该慎重选择进镜途径和检查时机, 以免加重病情. 另外, 在本组病例中, 有部分病例在当地医院行胃镜、结肠镜检查未发现病变, 我们在DBE检查中发现了胃、十二指肠或大肠疾病, 其中中晚期大肠癌4例(3例在升结肠, 1例盲肠), 早期胃癌1例, 幽门管溃疡3例, 说明存在胃镜和结肠镜检查的漏诊情况.

双气囊电子小肠镜经口或肛门单侧进镜检查, 很难完成对整个小肠的检查. 由于检查费用较昂贵, 临床上还不能常规从两侧进镜进行对接检查. 本组接受DBE检查的183例患者, 仅14.8%(27/183)接受了对接检查, 但我们的总体阳性检出率与国外报道经双侧进镜的检查结果基本一致<sup>[5-15,17-21]</sup>, 所以进镜途径的选择对提高DBE检查的阳性率至关重要. 通过详细询问病史, 仔细查体, 结合胃镜、结肠镜、消化道气钡造影、腹部CT及胶囊内镜等检查结果, 估计小肠疾病大概的发病部位, 对可能位于中上段小肠者, 选择经口进镜, 而对可能位于远段小肠者, 选择经肛门进镜. 高度怀疑存在小肠疾病, 经一侧进镜检查未发现病变者, 必须用墨水或美兰等标记后经对侧进镜完成整个小肠的对接检查, 以免遗漏病变. 胶囊内镜检查是一种无创的全消化道检查方法, 可指导选择DBE检查的进镜方式, 并且两者之间可互相补充和验证<sup>[16-17]</sup>, 但昂贵的检查费用限制了两者的合并应用. 最近, 应用双气囊小肠镜对部分小肠疾病的镜下治疗也逐渐开展, 如息肉切除、小肠狭窄的扩张治疗、注射止血、小肠支架置放等, 显示了其重要的临床应用价值<sup>[5,7,14,18,20-21]</sup>.

我们的结果证明, DBE对小肠疾病的检出率较高, 安全可靠, 出现严重并发症的机率不高,

显示了DBE在小肠疾病诊断中的独特优势和广阔的应用前景.

#### 4 参考文献

- 1 Yamamoto H, Sekine Y, Sato Y, Higashizawa T, Miyata T, Iino S, Ido K, Sugano K. Total enteroscopy with a nonsurgical steerable double-balloon method. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 216-220
- 2 戴军, 李晓波, 高云杰, 戈之铮, 胡运彪, 萧树东. 双气囊电子小肠镜在小肠狭窄诊断中的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 3466-3470
- 3 毛高平, 宁守斌, 杨春敏, 周平, 曹传平, 白莉. 镇静/麻醉状态下双气囊小肠镜检查对小肠疾病的诊断价值. *中华消化杂志* 2006; 26: 46-47
- 4 毛高平, 宁守斌, 曹传平, 周平, 杨春敏. 双气囊小肠镜对不明原因消化道出血的诊断价值. *中华消化内镜杂志* 2005; 22: 337-339
- 5 May A, Nachbar L, Ell C. Double-balloon enteroscopy (push-and-pull enteroscopy) of the small bowel: feasibility and diagnostic and therapeutic yield in patients with suspected small bowel disease. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 62-70
- 6 Di Caro S, May A, Heine DG, Fini L, Landi B, Petruzzello L, Cellier C, Mulder CJ, Costamagna G, Ell C, Gasbarrini A. The European experience with double-balloon enteroscopy: indications, methodology, safety, and clinical impact. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 545-550
- 7 Sun B, Rajan E, Cheng S, Shen R, Zhang C, Zhang S, Wu Y, Zhong J. Diagnostic yield and therapeutic impact of double-balloon enteroscopy in a large cohort of patients with obscure gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2011-2015
- 8 Heine GD, Hadithi M, Groenen MJ, Kuipers EJ, Jacobs MA, Mulder CJ. Double-balloon enteroscopy: indications, diagnostic yield, and complications in a series of 275 patients with suspected small-bowel disease. *Endoscopy* 2006; 38: 42-48
- 9 Oshitani N, Yukawa T, Yamagami H, Inagawa M, Kamata N, Watanabe K, Jinno Y, Fujiwara Y, Higuchi K, Arakawa T. Evaluation of deep small bowel involvement by double-balloon enteroscopy in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1484-1489
- 10 Su MY, Liu NJ, Hsu CM, Chiu CT, Chen PC, Lin CJ. Double balloon enteroscopy-the last blind-point of the gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1041-1045
- 11 Manabe N, Tanaka S, Fukumoto A, Nakao M, Kamino D, Chayama K. Double-balloon enteroscopy in patients with GI bleeding of obscure origin. *Gastrointest Endosc* 2006; 64: 135-140
- 12 May A, Ell C. European experiences with push-and-pull enteroscopy in double-balloon technique (double-balloon enteroscopy). *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2006; 16: 377-382
- 13 Honda K, Mizutani T, Nakamura K, Higuchi N, Kanayama K, Sumida Y, Yoshinaga S, Itaba S, Akiho H, Kawabe K, Arita Y, Ito T. Acute pancreatitis associated with peroral double-balloon enteroscopy: a case report. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1802-1804
- 14 Ohmiya N, Taguchi A, Shirai K, Mabuchi N, Arakawa D, Kanazawa H, Ozeki M, Yamada M, Nakamura M, Itoh A, Hirooka Y, Niwa Y, Nagasaka



- T, Ito M, Ohashi S, Okamura S, Goto H. Endoscopic resection of Peutz-Jeghers polyps throughout the small intestine at double-balloon enteroscopy without laparotomy. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 140-147
- 15 Sunada K, Yamamoto H, Kita H, Yano T, Sato H, Hayashi Y, Miyata T, Sekine Y, Kuno A, Iwamoto M, Ohnishi H, Ido K, Sugano K. Clinical outcomes of enteroscopy using the double-balloon method for strictures of the small intestine. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1087-1089
- 16 李晓波, 戈之铮, 戴军, 高云杰, 刘文忠, 胡运彪, 萧树东. 胶囊内镜检查对双气囊小肠镜进镜方式选择的指导作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1828-1832
- 17 Nakamura M, Niwa Y, Ohmiya N, Miyahara R, Ohashi A, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Preliminary comparison of capsule endoscopy and double-balloon enteroscopy in patients with suspected small-bowel bleeding. *Endoscopy* 2006; 38: 59-66
- 18 Lo SK, Mehdizadeh S. Therapeutic uses of double-balloon enteroscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2006; 16: 363-376
- 19 Yano T, Yamamoto H, Kita H, Sunada K, Hayashi Y, Sato H, Iwamoto M, Sekine Y, Miyata T, Kuno A, Nishimura M, Ajibe H, Ido K, Sugano K. Technical modification of the double-balloon endoscopy to access to the proximal side of the stenosis in the distal colon. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 302-304
- 20 Yamamoto H, Kita H, Sunada K, Hayashi Y, Sato H, Yano T, Iwamoto M, Sekine Y, Miyata T, Kuno A, Ajibe H, Ido K, Sugano K. Clinical outcomes of double-balloon endoscopy for the diagnosis and treatment of small-intestinal diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1010-1016
- 21 Nishimura M, Yamamoto H, Kita H, Yano T, Sunada K, Miyata T, Sugimoto T, Iino S, Sekine Y, Iwamoto M, Ohnishi N, Kuno A, Ohnishi H, Sakurai S, Ido K, Sugano K. Gastrointestinal stromal tumor in the jejunum: diagnosis and control of bleeding with electrocoagulation by using double-balloon enteroscopy. *J Gastroenterol* 2004; 39: 1001-1004

编辑 程剑侠 电编 何基才

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

## • 消息 •

# 第三届国际微创外科论坛暨 2007 年天津市 消化内镜学会征文通知

**本刊讯** 为了跟踪国际发展的最新态势, 加强该领域的交流与合作, 由天津市医学会主办, 天津市南开医院、天津市微创外科中心承办的“第三届国际微创外科论坛暨2007年天津市消化内镜学会”将于2007-11-02/04在天津举办。

本次会议还将邀请澳大利亚、奥地利、日本、香港等国家和地区及国内内镜、腹腔镜领域的知名专家与会, 以专题讲座及操作演示等方式展示当前微创外科(肝胆胰胃肠)领域的最新前沿技术, 其中包括: 大会专题演讲及大会论文交流, 微创手术实况演示, 内镜操作实况演示, 世界级大师精彩手术实况演示, 国家级继续教育项目, 微创手术新技术与新器械, 微创外科手术设备与器械展示。

## 1 征文内容和要求

征文内容: 凡是与本次会议内容相关的实验研究、临床工作总结、新方法、新技术、新器械等论文, 尚未在全国性学术会议上交流和尚未在国内外正式刊物上发表过的论文。征文要求: 论文、摘要、软盘各一份, 论文字数限4000字以内, 摘要800字以内, 按“目的、方法、结果、结论”。摘要中写明: “题目、作者、单位(包括城市和邮编)。

## 2 联系方式

邹富胜, 300100, 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院. 注明会议论文。

# 升结肠癌合并原发性小肝癌同期治疗1例

夏翠锋, 李云峰

**背景资料**  
本文源于一名升结肠癌为主诊的患者, 术前各项检查资料考虑为升结肠癌肝转移(期), 通过术中超声、术中冰冻病理及术后常规病理检查确诊为升结肠癌和原发性肝细胞性小肝癌并存。并行根治性右半结肠切除术的同时行肝肿瘤冷循环射频消融术, 疗效非常好。因此, 在诊治中极易误诊为结肠癌肝转移。查看历年的报道, 实属罕见。

夏翠锋, 李云峰, 云南省肿瘤医院大肠癌临床研究中心 云南省昆明市 650118  
通讯作者: 夏翠锋, 650118, 云南省昆明市昆州路519号, 云南省肿瘤医院大肠癌临床研究中心。  
xiacuiifeng20050908@yahoo.com.cn  
电话: 0871-8185656-2132  
收稿日期: 2007-05-15 修回日期: 2007-09-25

## 摘要

本例患者术前检查考虑为升结肠癌肝转移, 通过术中超声及冰冻病理检查确诊为升结肠癌合并原发性肝细胞性小肝癌。运用手术和冷循环射频消融同期根治性治疗, 疗效佳。

**关键词:** 升结肠癌; 原发性小肝癌; 同期治疗

夏翠锋, 李云峰. 升结肠癌合并原发性小肝癌同期治疗1例. 世界华人消化杂志 2007;15(28):3054-3055  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3054.asp>

## 0 引言

升结肠癌和原发性肝癌是临床上常见的恶性肿瘤, 进行手术和冷循环射频消融术(RFA)可以达到根治性治疗的效果。RFA具有微创、安全、操作简单、可反复治疗等特点, 特别适合于原发性小肝癌伴肝硬化肝功能失代偿期的患者。升结肠癌合并原发性小肝癌临床上罕见, 运用手术和RFA同期进行根治性治疗, 效果佳, 现报道如下。

## 1 病例报告

男, 58岁, 因反复大便带血1年, 加重并发现肝脏占位性病变10 d入院。入院前外院检查确诊为升结肠肝曲部癌及肝右叶肿瘤。体检: 消瘦, 肝脏肋下2 cm, 剑突下3 cm, 质硬, 移动性浊音(+), 余(-)。检查: B超, CT示弥漫性肝损伤, 肝脏比例失调, 肝硬化, 肝右前叶可见约2.5 cm×2.8 cm椭圆型肿块(图1A-B), 脾脏肿大, 升结肠壁不均匀增厚(图1C)。肠镜及病理提示升结肠癌。HBsAg(+), HBcAb抗核心抗体(+), HBeAb(+), CEA 7.6 μg/L(0-5 μg/L), AFP 17.9 μg/L(<20 μg/L)。治疗: 手术探查有腹水, 肝硬化明显, 肝右叶膈面可触及3.0 cm×

**相关报道**  
曾有原发性肝癌合并直肠癌2例, 胃癌、胆囊癌各1例的报道, 上述均为首次报道, 提出了存在多源性原发性癌的可能。

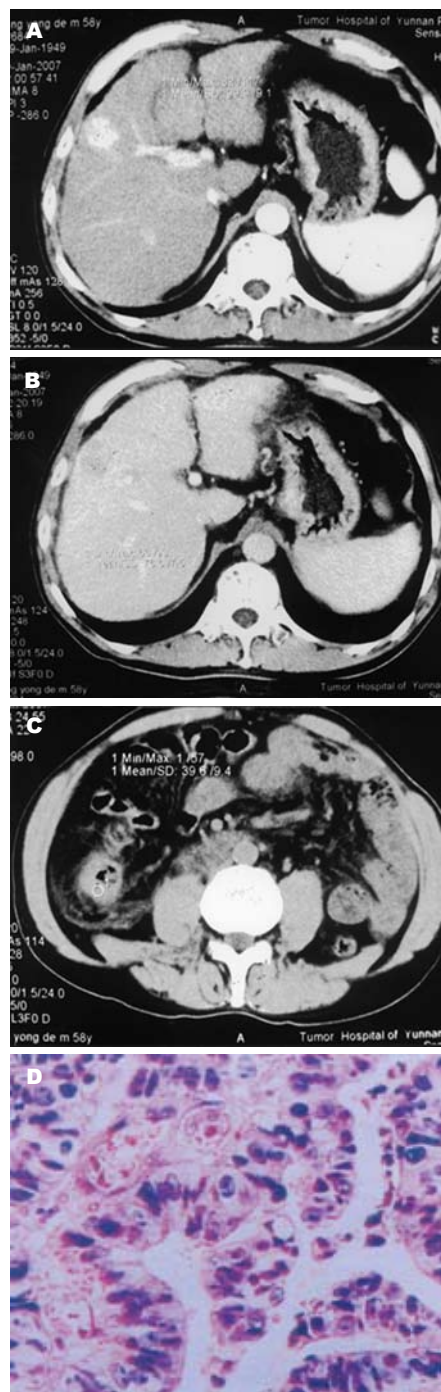


图1 升结肠癌, 原发性肝癌CT及病理影像。A: 原发性肝癌; B: 原发性肝癌; C: 升结肠癌; D: 原发性肝癌。

3.0 cm的质硬肿块, 肿瘤位于结肠肝曲, 约5.0 cm

×5.0 cm大小, 行根治性右半结肠切除术, 并在B超引导下肝右叶肿块穿刺活检, 冰冻病理确诊为肝右叶恶性肿瘤, 同期行肝脏肿瘤冷循环射频消融术(RFA). 病理: 升结肠高分化乳头状管状腺癌(T<sub>3</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub>)并存肝细胞性肝癌(图1D). 术后随访CEA 3.1 μg/L, CT和B超显示肝癌内部液化坏死, 升结肠无复发及转移.

## 2 讨论

多源性原发恶性肿瘤是存在于人体同一器官的不同部位或同一系统不同器官相同或不同组织来源的并排除有相互转移及浸润可能的原发性恶性肿瘤<sup>[1-2]</sup>. 查阅1979年以来近30年的文献, 曾有原发性肝癌合并直肠癌2例, 胃腺癌, 胆囊癌各

1例的报道, 均未行同期治疗. 本例是升结肠癌和原发性小肝癌共存的多源性原发性癌, 实属罕见, 并且运用手术和RFA的方法进行同期根治性治疗, 效果非常好. 所以, 在大肠癌的临床诊治中, 除了要警惕存在大肠多原发性肿瘤外, 同时应警惕存在多源性原发恶性肿瘤的可能, 特别应重视对AFP阴性的孤立性原发性肝癌与转移性肝癌的鉴别诊断, 以及对原发性肝癌肝功能失代偿期治疗手段的正确选择, 以防误判误治.

## 3 参考文献

- 1 杨永红, 王安群, 许荣双. 原发性肝细胞性肝癌与胃腺癌并存一例. 四川肿瘤防治 1997; 10: 4
- 2 张树荣, 田学明, 欧秋生, 蔡业枝, 张彦. 直肠癌并原发性肝癌2例报道. 中国肿瘤临床与康复 2001; 8: 46

编辑 程剑侠 电编 李军亮

**同行评价**  
本文报道了1例升结肠癌合并原发性小肝癌的同期治疗效果, 对临床工作有一定的实际意义.

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

## • 消息 •

# 第四届哈尔滨全国消化内镜学术会议通知

**本刊讯** 为促进消化内镜诊治技术的发展和学术交流, 由中华消化内镜学会、黑龙江省医学会、黑龙江省医院、黑龙江省临床消化病研究所联合举办的第四届全国消化内镜学术会议定于2007-12-22/23在哈尔滨召开. 大会将邀请国内外著名专家作消化内镜进展方面专题报告及内镜演示, 并制定中华消化内镜学会消化内镜消毒指南(讨论稿). 欢迎消化届同仁积极投稿及参与, 参会代表授予国家继续教育 I 类学分.

## 1 投稿要求

论著要求800字以内摘要(目的、方法、结果、结论), 电脑打印(WORD格式), 网上投稿. 截稿时间: 2007-10-31.

## 2 联系方式

朱春兰, 150001, 哈尔滨和平邨宾馆(中山路171号), 哈尔滨市果戈里大街405号, 黑龙江省医院, 电话: 13845048249或0451-88025055, 传真: 0451-53625617, E-mail: zhuchulan@medmail.com.cn