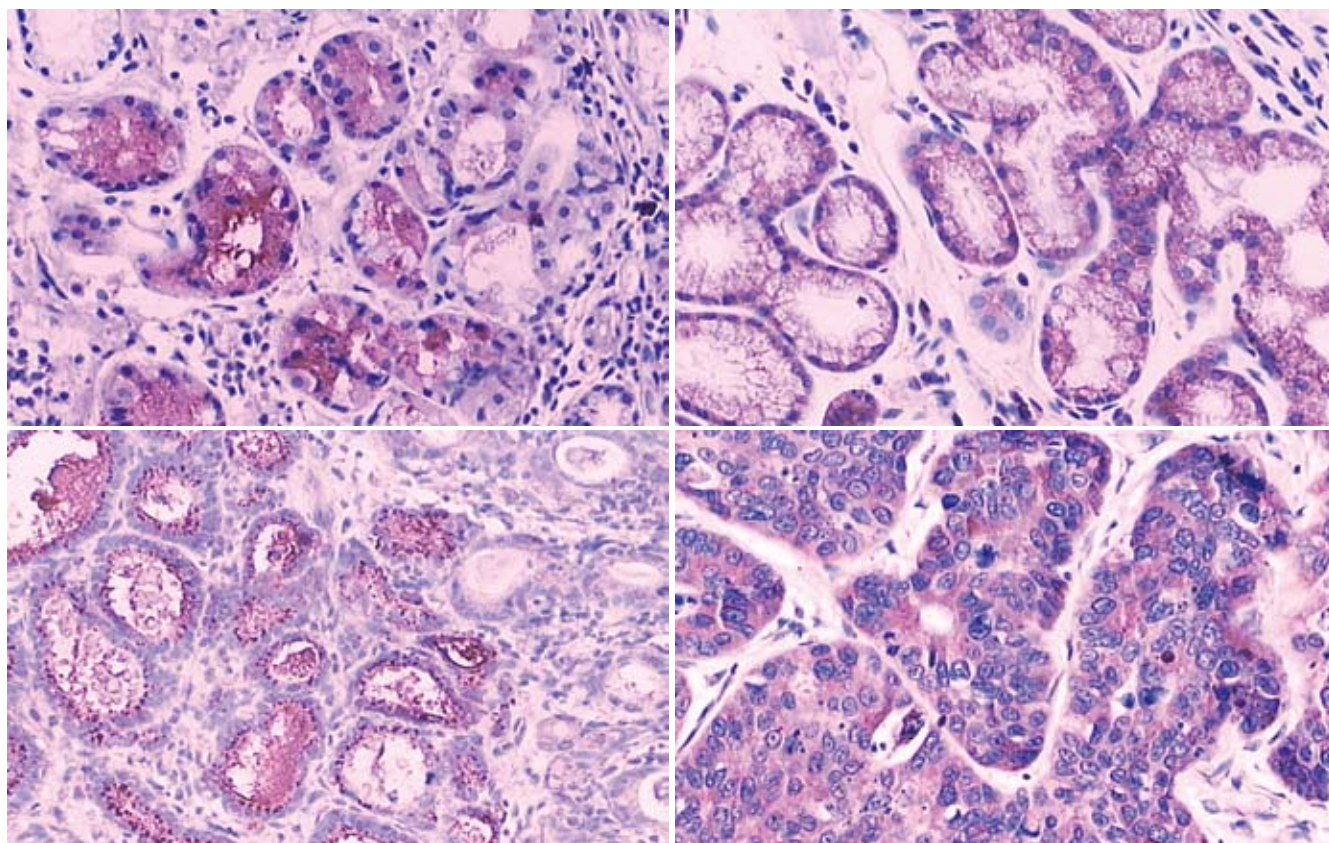


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2007年6月8日 第15卷 第16期 (Volume 15 Number 16)



16 / 2007

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

陈士葆教授
房殿春教授
纪小龙教授
姜洪池教授
王苑本教授
吴云林教授
徐克成教授
杨思风教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

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

编委

白爱平主治医师

白文元教授

白玉贤教授

别平教授

蔡淦教授

蔡开琳副教授

蔡三军主任医师

曹杰主任医师

曹洁副教授

曹志成院士

苁新明教授

陈国凤主任医师

陈公琰主任医师

陈海龙教授

陈红松副研究员

陈积圣教授

陈建杰教授

陈建荣副教授

陈力教授

陈立波副教授

陈凇教授

陈尼维主任医师

陈其奎教授

陈强谱教授

陈仕珠主任医师

陈卫昌教授

陈耀凯副教授

陈贻胜教授

陈玉林教授

陈知水教授

陈治水主任医师

陈祖林副教授

程爱国教授

程爱群主任医师

程斌副教授

程红岩教授

程树群副教授

迟宝荣教授

迟强教授

崔乃强教授

崔彦教授

崔毅主任医师

崔云甫教授

代文杰教授

戴朝六教授

戴冬秋教授

党双锁副教授

邓长生教授

丁士刚主任医师

丁义涛教授

丁佑铭教授

董蕾教授

董明主任医师

杜群副研究员

杜祥教授

樊红副教授

范建高教授

范小玲主任医师

范志宁主任医师

房静远教授

冯红主任医师

冯志杰主任医师

傅春彬主任医师

傅红副教授

傅华群教授

傅志仁主任医师

高成新教授

高春芳研究员

高峰教授

高润平教授

高英堂研究员

戈之铮教授

龚国忠教授

龚建平教授

巩鹏副教授

谷俊朝主任医师

顾岩教授

关玉盘教授

管冬元副教授

郭克建教授

郭晓钟教授

郭新宁教授

韩天权教授

韩新巍教授

郝春秋副教授

郝俊鸣副主任医师

何超教授

何生教授

何生松教授

何裕隆教授

何振平教授

洪天配教授

侯晓华教授

胡伏莲教授

胡和平主任医师

黄恒青主任医师

黄金华副教授

黄文林教授

黄晓东副主任医师

黄颖秋教授

黄裕新教授

黄志勇副教授

霍丽娟主任医师

季国忠副教授

季加孚教授

姜波健教授

姜春萌教授

姜慧卿教授

江家骥教授

蒋龙元副教授

金懋林教授

金瑞教授

匡安仁教授

兰平教授

蓝宇教授

劳绍贤教授

黎乐群教授

李定国教授

李东辉教授

李方儒教授

李国威教授

李华山副主任医师

李继强教授

李健丁教授

李杰副教授

李靖副教授

李军祥教授

李奇林教授

李胜研究员

李淑德教授

李涛主治医师

李小荣教授

李晓宇主任医师

李旭副教授

李延青教授

李永哲副研究员

李玉民教授

李玉明教授

李瑜元教授

李瑗教授

李增山副教授

李兆申教授

李振华教授

李智伟教授

李志霞教授

李宗芳教授

梁力建教授

林胜璋副教授

林勇讲师

林志辉教授

刘宝瑞教授

刘彬彬副研究员

刘冰熔教授

刘成海研究员

刘海林主任医师

刘建教授

刘鲁明教授

刘平教授

刘杞教授

刘铁夫教授

刘颖斌副教授

刘勇钢副主任医师

刘云鹏教授

刘占举教授

刘志苏教授

刘正稳教授

刘作金副教授

龙致贤教授

卢榜裕教授

卢实春教授

鲁华玉研究员

陆才德教授

陆伦根教授

陆云飞教授

禄韶英主治医师

吕明德教授

吕宁主任医师

吕云福教授

吕志武教授

马大烈教授

马金城教授

马力文主任医师

马欣主任医师

茅爱武主任医师

毛高平主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

梅林教授	师英强博士	王石林主任医师	许亚平副教授	张青云研究员
梅铭惠教授	石统东副教授	王晓艳副教授	宣世英教授	张群华教授
孟庆华教授	宋世兵主任医师	王效民教授	闫惠平研究员	张水军教授
宁琴教授	宋于刚教授	王新月教授	严律南教授	张小晋主任医师
倪润洲教授	宋振顺教授	王学美研究员	严以群主任医师	张晓岚教授
牛建昭教授	孙诚谊教授	王怡主任医师	阎晓初副教授	张绪清副教授
牛俊奇教授	孙殿兴主任医师	王正康教授	杨冬华教授	张学教授
欧希龙副教授	孙富强副教授	王志刚副主任医师	杨广顺教授	张肇达教授
潘林娜教授	孙家邦教授	王忠裕教授	杨建民教授	张占卿主任医师
潘兴华副主任医师	孙侃教授	卫洪波教授	杨建勇教授	张志坚教授
潘秀珍教授	孙秀发教授	魏经国教授	杨林副研究员	张宗明教授
彭波副教授	孙学英教授	魏来教授	杨维良教授	赵桂鸣主任医师
彭吉润主任医师	孙延平副主任医师	闻勤生教授	杨希山教授	赵桂珍教授
彭曦副研究员	邵升副教授	吴德全教授	杨尹默教授	赵景民教授
彭心宇教授	谭德明教授	吴河水教授	杨幼林主任医师	赵连三教授
彭志海教授	谭群友副教授	吴建国教授	杨云生教授	赵平副教授
朴熙绪主任医师	谭学瑞教授	吴健雄教授	杨昭徐教授	赵晓晏教授
朴云峰教授	汤恢焕教授	吴金术教授	姚登福教授	赵增仁副主任医师
钱建民教授	汤展宏副教授	吴君主任医师	姚鹏副教授	郑加生主任医师
钱林学主任医师	唐采白副教授	吴萍主任医师	姚树坤教授	郑民华教授
秦波教授	唐芙爱教授	吴晴教授	叶红军主任医师	郑鹏远教授
秦成勇教授	唐霓副研究员	吴泰璜教授		智发朝教授
秦春宏副主任医师	唐丽安教授	吴晓东教授	阴赓宏研究员	钟德珩教授
秦华东教授	唐世刚教授	吴志勇教授	殷正丰教授	周伯平教授
秦环龙教授	唐文富主治医师	席启主任医师	于恩达教授	周丁华主任医师
秦仁义教授	唐文皓副主任医师	夏建川研究员	于聪慧教授	周国雄主任医师
邱宝安主任医师	唐晓鹏教授	向德兵讲师	于红刚副教授	周士胜教授
邱双健副教授	唐旭东主任医师	肖恩华教授	于健春教授	周伟平教授
邱伟华副主任医师	唐志鹏研究员	谢敏主任医师	于良副教授	周文兴教授
仇毓东副教授	田德安主任医师	谢青教授	于晓峰主任医师	周霞秋教授
裘正军教授	田素礼教授	谢晓华副教授	于颖彦教授	周晓东研究员
曲智威副主任医师	童强主任医师	邢光明教授	于则利教授	周晓武副主任医师
任超世研究员	屠红副研究员	熊斌教授	余宏宇教授	朱传武副主任医师
任粉玉副教授	万军教授	徐爱民副教授	郁宝铭教授	朱春兰主任医师
任建安教授	汪波副主任医师	徐存拴教授	郁正亚副教授	朱立元教授
任建林教授	汪思应教授	徐大华主任医师	喻荣彬副教授	朱人敏教授
邵成浩讲师	王邦茂教授	徐德忠教授	袁伟建教授	庄林主任医师
邵先玉教授	王炳元教授	徐列明教授	曾勇教授	邹小明教授
邵永孚教授	王承党副教授	徐宁志研究员	展玉涛副主任医师	左国营副主任药师
沈洪教授	王春友教授	徐小元教授	张柏和教授	
沈俊教授	王广义教授	徐秀英副教授	张方信主任医师	
沈琳主任医师	王济明教授	徐迎新研究员	张凤春教授	
沈世强教授	王吉耀教授	徐智教授	张国梁主任医师	
沈守荣教授	王健生副教授	许春舫主任医师	张集昌主任医师	
沈薇教授	王凯教授	许戈良教授	张吉翔教授	
沈岩主任医师	王莉瑛教授	许乐主任医师	张锦生教授	
施诚仁教授	王烈主任医师	许玲副教授	张军教授	
施瑞华教授	王鲁副教授	许文燮教授	张明辉副主任医师	

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2007 年 6 月 8 日

第 15 卷

第 16 期

(总第204期)

述 评

1775 DNA损伤与肝癌发生 朱德强, 黄志勇

基 础 研 究

1781 扶正利湿解毒法体内外逆转肝纤维化

何金洋, 符路娣, 邓文娣, 周映云

1788 TNF- α 对肠上皮细胞紧密连接蛋白表达的作用

崔巍, 刘冬妍, 马力, 刘沛

1794 生长抑素类似物对大鼠急性胰腺炎PAP的影响

佟柏峰, 周昊昕, 邹小明, 彭海, 周文学, 杨维良

1800 OPN和Syndecan-1在原发性肝癌中的表达及与临床病理参数之间的相关性

刘秀峰, 施瑞华, 张国新, 王学浩, 郜恒骏, 秦叔逵

1806 PARP-1抑制剂PJ34对人肝癌细胞株HepG2的抑制作用

周欣, 黄志勇, 陈孝平, 黄胜辉

1810 二甲双胍对高脂饲养大鼠肝脏脂肪变的干预作用

陈世清, 黎华, 刘杞

临 床 研 究

1815 结肠癌多层螺旋CT表现与术后病理的相关性分析

赵雪梅, 马民, 张宗明, 朱建平, 白燕

1820 三种抗病毒治疗方法对慢性乙型肝炎患者生活质量的影响

王艳, 于岩岩, 斯崇文, 陈新月, 韩忠厚, 陈宇萍

1825 细胞色素P4502E1酶与非酒精性脂肪肝的关系

郭艳梅, 王沁, 祁志

文 献 综 述

1830 PET/CT在胰腺癌临床应用中的进展

王荣福

1835 慢性HBV感染的免疫治疗

于贤杰, 王贵强

1841 胶囊内镜在小肠Crohn病的应用

王健, 贾红

研 究 快 报

1845 通腑颗粒改善犬缺血再灌注状态下实施肠内营养时的小肠功能

胡森, 王海滨, 夏斌, 于勇, 黎君友, 邹晓防, 周国勇, 车晋伟

1850 凝结芽孢杆菌活菌TBC169株对右旋葡聚糖硫酸钠引发大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用

万阜昌, 崔云龙, 闫述翠

1855 自创微需氧罐优选幽门螺杆菌培养与保存条件

周华, 徐帆, 李平, 楚更五, 王根春

临 床 经 验

1859 乙肝病毒基因型与肝脏病理改变的关系

钟崇芳, 郝娃, 李卓, 孟欣, 严艳, 牛京勤, 殷继明

1865 快速乙型肝炎疫苗接种程序分析

陈仕珠, 张晋红, 任菊香, 温风玲, 刘振霞, 任雪莲

1868 吉西他滨联合卡培他滨一线治疗晚期胰腺癌的Meta分析

	谢德荣, 梁汉霖, 杨琼, 郭双双, 江志敏, 陈邓林
致 谢	1872 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	1780 欢迎订阅2007年《世界华人消化杂志》 1799 2007年国际会议 1824 关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报 1829 《功能性胃肠病诊治进展》通知 1840 全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事 1844 中国学术期刊综合引证报告(2006) 1849 世界华人消化杂志在线办公系统 1854 肝胆胰外科领域新技术研讨会通知 1858 世界华人消化杂志关于作者署名的声明 1864 2007年原位肝脏移植新技术及进展学习班通知
封面故事	Xin-Pu Miao, Jian-Sheng Li, Hui-Yan Li, Shi-Ping Zeng, Ye Zhao, Jiang-Zheng Zeng. Expression of ornithine decarboxylase in precancerous and cancerous gastric lesions. <i>World J Gastroenterol</i> 2007;13(20):2867-2871 http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2867.asp
国际会议	Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology 11–12 October 2007 Dresden symposia@falkfoundation.de 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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(旬刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2007-06-08
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生
编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁
中文编辑 张海宁 张焕兰 王晓瑜 程剑侠
电子编辑 张 敏 郭海丽 何基才
责任编辑 张海宁
刊 名 称 世界华人消化杂志
主 管 单 位 山西省科学技术厅
主 办 单 位 太原消化病研究中心

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
出版 世界华人消化杂志编辑部
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京市399信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界华人消化杂志编辑部
030001, 山西省太原市双塔西街77号
电话: 0351-4078656
E-mail: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

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

世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://wcjd.wjgnet.com>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

2007年版权归世界华人消化杂志所有

中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 M 4481

国内定价 每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证 1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

June 2007 Contents in Brief Volume 15 Number 16

EDITORIAL	<p>1775 DNA damage and liver cancer <i>Zhu DQ, Huang ZY</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>1781 <i>In vivo</i> and <i>in vitro</i> study on liver fibrosis reversion effect by therapy of strengthening healthy qi combined with draining dampness and relieving toxin <i>He JY, Fu LD, Deng WD, Zhou YY</i></p> <p>1788 Effect of tumor necrosis factor-α on protein expression of tight junction protein in intestinal epithelial cells <i>Cui W, Liu DY, Ma L, Liu P</i></p> <p>1794 Influence of somatostatin analogue on pancreatitis-associated protein in rats with acute pancreatitis <i>Tong BF, Zhou HX, Zou XM, Peng H, Zhou WX, Yang WL</i></p> <p>1800 Study on the expression of Osteopontin and Syndecan-1 and their correlations with the clinical pathological characteristics of hepatocellular carcinoma by tissue microarray technique <i>Liu XF, Shi RH, Zhang GX, Wang XH, Gao HJ, Qin SK</i></p> <p>1806 Suppressive effect of poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor PJ34 on human hepatoma cell line HepG2 <i>Zhou X, Huang ZY, Chen XP, Huang SH</i></p> <p>1810 Effects of metformin on hepatic steatosis induced in rats fed a high fat diet <i>Chen SQ, Li H, Liu Q</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>1815 Correlative analysis of colorectal cancer stage between multi-slice spiral computed tomography and operative pathology <i>Zhao XM, Ma M, Zhang ZM, Zhu JP, Bai Y</i></p> <p>1820 Assessment on life quality of patients with chronic hepatitis B after three types of antiviral treatment <i>Wang Y, Yu YY, Si CW, Chen XY, Han ZH, Chen YP</i></p> <p>1825 Association of CYP2E1 enzymes and susceptibility for non-alcoholic liver disease <i>Guo YM, Wang Q, Qi Z</i></p>
REVIEW	<p>1830 Progress in the clinical application of Positron emission tomography-computed tomography in patients with pancreatic cancer <i>Wang RF</i></p> <p>1835 Immunotherapy for chronic hepatitis B virus infections <i>Yu XJ, Wang GQ</i></p> <p>1841 Video capsule endoscopy for diagnosis of small bowel Crohn's disease <i>Wang J, Jia H</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>1845 Improvement effect of Tongfu particles on gut function in the process of enteral nutrition following intestinal ischemia and reperfusion in dogs <i>Hu S, Wang HB, Xia B, Yu Y, Li JY, Zou XF, Zhou GY, Che JW</i></p>

	<p>1850 Therapeutic effects of <i>Bacillus coagulans</i> on the dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in rats <i>Wan FC, Cui YL, Yan SC</i></p> <p>1855 Optimization of cultivation and preservation of <i>Helicobacter pylori</i> using self-made microaerophilic pot <i>Zhou H, Xu F, Li P, Chu GW, Wang GC</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>1859 Relationship between the histology and genotype of hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients <i>Zhong CF, Hao W, Li Z, Meng X, Yan Y, Niu JQ, Yin JM</i></p> <p>1865 Analysis on accelerated hepatitis B immunization schedule <i>Chen SZ, Zhang JH, Ren JX, Wen FL, Liu ZX, Ren XL</i></p> <p>1868 Gemcitabine plus capecitabine as a front-line therapy for advanced pancreatic cancer: a meta-analysis <i>Xie DR, Liang HL, Yang Q, Guo SS, Jiang ZM, Chen DL</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	1872 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology
COVER	<p><i>Miao XP, Li JS, Li HY, Zeng SP, Zhao Y, Zeng JZ.</i></p> <p>Expression of ornithine decarboxylase in precancerous and cancerous gastric lesions.</p> <p><i>World J Gastroenterol</i> 2007;13(20):2867-2871</p> <p>http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/2867.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>Meeting Falk Symposium 161: Future Perspectives in Gastroenterology 11–12 October 2007 Dresden symposia@falkfoundation.de</p> <p>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</p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date June 8, 2007

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY-EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Deputy Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2007 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2007 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

DNA损伤与肝癌发生

朱德强, 黄志勇

朱德强, 黄志勇, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝胆外科中心 湖北省武汉市 430030

黄志勇, 教授, 1996年获同济医科大学医学博士学位, 1999/2002在美国从事博士后研究, 主要从事肝脏外科、肝癌发生的分子机制及治疗研究。

教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目, No. NCET-04-0701
通讯作者: 黄志勇, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝胆外科中心. zyhuang@medmail.com.cn

电话: 027-83663871 传真: 027-83803209

收稿日期: 2007-05-18 接受日期: 2007-05-30

DNA damage and liver cancer

De-Qiang Zhu, Zhi-Yong Huang

De-Qiang Zhu, Zhi-Yong Huang, Hepatic Surgery Center, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by The New Centaury Excellent Talent Foundation from Ministry of Education, No. NCET-04-0701

Correspondence to: Dr. Zhi-Yong Huang, Center of Hepatic Surgery, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. zyhuang@medmail.com.cn
Received: 2007-05-18 Accepted: 2007-05-30

Abstract

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignant tumors. Carcinogenesis of HCC involves complex biological processes for which the mechanism/s remains to be completely clarified. Research has shown that hepatitis B and C virus infections, aflatoxin contamination, alcohol abuse, ionizing radiation and human metabolic products toxic to the human genome can induce HCC. Most of these cause DNA damage by having direct impacts on the genetic materials of hepatocytes. This constitutes an important molecular basis for the carcinogenesis of HCC. DNA damage causes a series of cell responses, including injury signal transduction, damage repair, and induction of cell death. The factors involved in DNA damage can also affect some aspects of the DNA injury repair system, preventing the damage from being repaired or correctly repaired, leading to malignant transformations. Therefore, the accumulation of damaged DNA becomes an important molecular mechanism underlying the

carcinogenesis of HCC. Further studies should lay a foundation for research into treatments for HCC.

Key Words: DNA damage; DNA repair; Hepatocellular carcinoma

Zhu DQ, Huang ZY. DNA damage and liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1775-1780

摘要

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其发生是一个复杂的生物学过程, 具体机制尚未完全阐明。研究表明, 乙、丙型肝炎病毒感染, 黄曲霉毒素污染, 饮酒, 电离辐射以及具有有遗传毒性的人体代谢产物等能够诱导肝癌的发生, 他们大都直接作用于肝细胞的遗传物质, 引起DNA的损伤, 这是发生肝癌的重要分子基础。DNA损伤后引起细胞一系列的反应, 包括损伤信号的传导, 损伤修复, 诱导细胞死亡。这些诱因也能作用于损伤修复系统中的某个环节, 使DNA损伤不能修复或不能正确修复, 细胞发生恶性转化。因此, 损伤DNA的累积就成为肝癌发生的重要分子机制, 对其深入研究将会为肝癌的治疗奠定基础。

关键词: DNA损伤; DNA修复; 肝癌发生

朱德强, 黄志勇. DNA损伤与肝癌发生. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1775-1780

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1775.asp>

0 引言

人体细胞经常受到多种体内外因子的损伤, 如电离辐射(IR), 紫外线(UV)等物理因素, 烷化剂, 亚硝胺类等各种化学因素, 病毒感染等生物因素。这些因素中具有遗传毒性的物质会造成各种各样的DNA损伤, 如单、双链缺口(SSB, DSB), 碱基突变, 碱基氧化损伤等。如果损伤被正确修复, 细胞存活, 如果修复过程中出现缺失、插入等不正确的修复, 这些异常碱基的累积就可能导致癌症的发生。如果损伤严重不能修复, 细胞就会启动凋亡程序, 诱导细胞死

背景资料

肝癌是人类常见的恶性肿瘤之一, 各种致癌因素如乙、丙肝病毒(HBV, HCV), 黄曲霉毒素, 电离辐射, 烷化剂等引起肝癌的具体机制尚未完全阐明, 但都与DNA的损伤有关。近年来, 通过深入和广泛的研究, 这些因素引起DNA损伤从而导致肝癌发生的机制已得到一定程度的阐明。这大大促进了临床靶向治疗肝癌的研究。

研发前沿
乙肝病毒X蛋白(HBX)在HBV诱导肝癌发生的过程中起了关键作用,通过研发灭活HBX的特异性抑制剂,有望成为预防HBV导致肝癌的新手段。另外,HBV诱发肝癌是否也涉及到防止细胞恶性转化的重要分子PARP-1,都需要进一步的研究。

亡,这条通路也被认为是阻止细胞恶性转化的最后一道屏障。由此,信号传导、损伤修复和诱导凋亡就形成了一个密切联系,相互影响的复杂网络,使细胞作为一个整体对DNA损伤作出反应,因此,任何一个系统功能的障碍都会降低DNA的稳定性,为癌症发生奠定基础。目前肝癌的发生机制尚未完全阐明,但其发生与DNA的损伤密切相关。诱发肝癌的主要危险因素包括乙、丙型肝炎病毒(HBV, HCV),黄曲霉毒素B1(AFB1),亚硝胺等。这些诱因不仅能够引起肝细胞DNA的损伤,而且能直接或间接影响损伤修复系统,使DNA修复障碍,从而导致肝癌的发生。

1 DNA损伤与修复机制

DNA损伤后首先是具有信号传导作用的酶或蛋白质识别并结合到损伤位点,起信号传导作用的分子有:运动失调性毛细血管扩张症基因突变体(ataxia telangiectasia mutated, ATM)/运动失调性毛细血管扩张症基因突变体和Rad3相关基因(ATM- and Rad3-related gene, ATR),依赖DNA的蛋白激酶(DNA-PK),聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1(PARP-1)等。DNA损伤激活ATM/ATR后引起细胞周期停滞在G1, S, 或G2期,以便细胞对损伤进行修复。DNA-PK作为最初的DNA损伤感受器,介导细胞对损伤进行修复,而不是损伤信号诱导的下游效应器^[1]。PARP-1已被证明在许多修复通路包括碱基切除修复(BER)、同源重组(HR)中起重要作用^[2],因此,PARP-1迅速识别并结合DNA损伤位点一是为了防止缺口处的核苷酸受核酶分解和同源基因在局部发生错误重组;二是募集各种修复蛋白对损伤进行修复^[2]。各信号传导系统构成复杂的信号传导网,将DNA损伤信号传导给下游的修复蛋白和酶,对损伤迅速修复。哺乳动物细胞内主要有四种修复方式:同源重组修复(homologous recombination, HR),非同源末端连接(nonhomologous end-joining, NHEJ),核苷酸切除修复(nucleotide-excision repair, NER),碱基切除修复(base-excision repair, BER)^[3],但是没有哪种修复通路能够修复所有的损伤,机体通过这四种主要的修复方式完成了大部分(但不是全部)的DNA损伤。DSB是严重的DNA损伤,主要由HR和NHEJ修复完成,但多数致癌因子不会直接引起DSB,而是SSB, DNA氧化损伤,各种DNA螯合物(DNA adducts)等相对较轻的损伤,由NER和BER完成修复。在NER和BER功能障碍时,这些

损伤变为DSB,因此NER和BER是抵抗致癌因子的损伤、维持DNA稳定性的关键。NER主要修复外源性损伤物质介导的DNA损伤,如UV, AFB1以及内源性的氧化损伤,并且修复过程依赖ATP供能;BER主要修复内源性损伤物质如HBV感染引起的免疫反应导致的DNA微小损伤,以及各种DNA-致癌因子螯合物等,这些损伤可能不会阻滞细胞转录或复制的进行,也不会引起细胞周期停滞^[4],这可能就是损伤DNA累积的机制。已证明,PARP-1在BER中起重要作用,而NER需要的应急能量也主要由PARP-1产生^[5],因此,PARP-1对维持肝细胞DNA稳定性有重要作用。实验证明,PARP-1^{-/-}, Ku80^{-/-}的小鼠在胚胎期8.5 d前即发生生长停滞,并于9.5 d死亡,提示PARP-1和Ku80双缺失对小鼠是致命的。PARP-1^{-/-}, Ku80^{-/-}的小鼠肝腺瘤和肝癌的发生率明显增高^[6],并且Nomura *et al*^[7]发现,人肝癌组织中PARP-1比邻近非瘤组织表达增高且活性增强。

如果损伤不能修复或细胞周期停滞过长,细胞就会启动P53介导的凋亡通路,诱导细胞凋亡,因此, P53介导的细胞凋亡被认为是防止细胞恶性转化的重要机制。正常情况下,鼠双微蛋白2(MDM2)紧密结合在P53的N-末端,使P53失活并诱导其降解,MDM2受多种激酶磷酸化的调控,如ATM/ATR, DNA-PK等,磷酸化后的MDM2从P53脱落, P53恢复活性^[8]。如果细胞周期停滞过长,也会激活ATM/ATR磷酸化MDM2使P53活性恢复并介导细胞凋亡^[9]。Oren^[10]认为,在DNA损伤后,细胞是进行修复还是诱导凋亡,这取决于细胞内生存信号和凋亡信号的强弱对比,而这又主要取决于DNA的损伤程度。据研究,PARP-1在这一过程中起到重要作用,轻度的DNA损伤,PARP-1被激活,传导损伤信号并参与修复,细胞存活;中重度的DNA损伤, DNA修复失败,导致不能正常的转录或复制,引起细胞周期停滞时间过长,诱发P53介导的细胞凋亡,同时, P53介导PARP-1的降解,以保证凋亡的能量需求;严重的DNA损伤, PARP-1被大量激活,引起能量耗竭,导致细胞坏死^[11]。

2 乙肝病毒(HBV)与肝癌的发生

HBV引起肝癌发生的机制可能是通过病毒DNA整合到宿主DNA中,引起基因重排和/或部分基因缺失^[12]。研究发现,几乎所有HBV诱导的肝癌中,都能发现整合的病毒DNA^[13]。Hytiroglou *et al*^[14]发现,病毒DNA整合到宿主肝细胞DNA

中时,引起整合位点处的碱基缺失,整合还可能发生在编码信号传导蛋白的基因、细胞增生调控基因序列中,从而影响这些基因的表达.通常情况下,病毒DNA整合效率很低(每个细胞中约有10-50个可以整合的基因组),但有DSB时,整合效率明显提高^[15].另据研究,DNA氧化损伤能增加病毒基因的整合效率^[16],而Choudhury *et al*^[17]发现,在LEV鼠系细胞中,HBV急性感染期,宿主细胞修复碱基氧化损伤的BER功能降低,在慢性炎症期,修复功能恢复到正常水平.修复能力的降低导致DNA氧化损伤的增加,这样,HBV感染和细胞DNA的氧化损伤就形成恶性循环,其机制可能是损伤的DNA不能阻滞细胞周期和转录复制的进行,当细胞转录或复制到损伤位点时,复制叉激发损伤位点处SSB变为DSB,在DSB存在下,病毒DNA整合效率明显提高.整合的病毒基因能在宿主细胞中稳定表达,引发机体持续的免疫反应导致DNA氧化损伤,这时机体BER功能的恢复可使已感染的细胞免遭氧化损伤诱导的细胞凋亡,为细胞的恶性转化提供条件.此外,病毒DNA还能编码乙肝病毒X蛋白(HBX),HBX能够干涉信号转导系统某些分子(如AP-1, PKC等),涉及细胞周期、增生及凋亡基因的表达^[18].但也有实验表明,HBX并不影响细胞的凋亡及增生,但能降低UV诱导的DNA损伤修复能力,增加宿主DNA对UV的敏感性^[19],表达HBX的HepG2细胞在没有经过UV处理时,能表现和正常细胞相同的细胞周期和细胞凋亡过程,也能修复DNA损伤,这说明在HBV感染早期,病毒数不足以引发病毒繁殖时,HBX能帮助病毒在细胞中存活.经过UV处理后,正常细胞会转导生存信号对损伤进行修复,而表达HBX的HepG2细胞则倾向于转导凋亡信号,表现出很强的G₂/M期停滞反应和很高的细胞凋亡率,这种作用可能是通过HBX和P53的相互作用增加P21的表达实现的.此外,HBX能与P53直接作用,改变但不阻滞P53的功能^[20],使P53在细胞中累积并稳定存在,这主要通过HBX与P53的结合阻碍MDM2导致的P53降解,P53在细胞中累积导致肝细胞较高的凋亡率,使感染后期大量增殖的病毒从宿主细胞中释放,引起HBV的扩散.HBX损坏DNA修复系统和诱导细胞凋亡导致宿主细胞损伤DNA的累积和抗凋亡突变,最终引起细胞恶性转化.另据研究,同时接受HBV和AFB1处理的树鼯与只用HBV处理或只用AFB1处理的树鼯相比,前者肝癌的发生率(58.9%)明显高

于HBV处理组(3.6%)和AFB1处理组(20.7%),并且癌症发生的平均时间和恶性程度都要高于后两组,说明HBV和AFB1在肝癌的发生中存在协同作用^[21].这种作用可能是由于AFB1导致DNA氧化损伤和DSB的形成,增加HBV整合效率.而HBV感染使细胞对AFB1的敏感性增高,这种作用可能通过HBX实现:HBX能够调节代谢AFB1的酶活性,在HBV转染的肝细胞中,谷胱甘肽(GST)的活性明显降低,而GST是催化灭活AFB1的主要物质^[22];HBX还可以通过与蛋白质或蛋白质复合体的相互作用阻止损伤DNA的修复,如前面提到的HBX能抑制NER修复通路,导致化学致癌物如AFB1引起的DNA损伤累积;HBX还能诱导细胞增生和下调细胞周期停滞反应,使诱变剂改变的肝细胞增生并发生恶性转化.

3 丙肝病毒(HCV)与肝癌的发生

HCV是RNA病毒,不像HBV一样能整合到宿主DNA中直接引起DNA损伤,但HCV能编码多种病毒蛋白,如非结构蛋白5A, 2(NS5A, NS2),核心蛋白等.这些病毒蛋白能直接或间接影响宿主DNA的稳定性.研究表明^[23],NS5A能作用于中心粒和纺锤体,引起延迟分裂和错误分裂,导致染色体畸变.核心蛋白和HBX一样,能使宿主细胞抵抗氧化损伤,使HCV感染的细胞逃脱免疫损伤,也使癌变细胞得以存活^[24].此外,HCV能直接引起细胞的氧化应激^[25],并能引发细胞持续的炎症反应和免疫反应,直接或间接产生活性氧簇(ROS),导致细胞DNA的氧化损伤,包括嘌呤和嘧啶碱基化学性质的改变,产生2-脱氧核糖,碱基缺失和SSB,形成8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)聚合物等,其中8-OHdG聚合物是最常见的致DNA氧化损伤物(每个细胞每天大约能产生200个此类聚合物)^[26].体外研究证明,8-OHdG能导致DNA聚合酶读码错误,诱导基因突变,并在DNA复制时诱导G: C→T: A突变,这种突变在癌基因和抑癌基因中发生率较高^[27],这可能是HCV诱发肝癌的一种机制.另外,病毒蛋白导致的DNA氧化损伤主要由PARP-1介导的BER完成修复^[28],可以推测,HCV导致肝癌的机制可能是病毒蛋白引起BER修复功能障碍,使DNA损伤累积,引起细胞癌变,其作用的主要分子可能就是PARP-1.

4 AFB1与肝癌发生

AFB1是另一种诱导肝癌发生的危险因素,AFB1在体内转化为活性AFB1-8, 9-环氧化物,此化合

相关报道
国外研究表明HBV、HCV,饮酒等可以引起机体的氧化应激,而氧化应激可以诱发DNA损伤,从而引起肝癌的发生.还有文献从分子水平研究阐明了修复DNA损伤的四条主要通路的机制,以及这四条修复通路与癌症发生的关系.

创新盘点
本文综述了国内外对乙、丙肝病毒(HBV, HCV),黄曲霉毒素,电离辐射,烷化剂等各种致癌因素引起肝癌的最新进展,围绕DNA损伤,在分子水平上阐述这些因子通过不同的机制引起损伤累积,最终导致肝细胞恶性转化的主要机制.

应用要点
本文能使广大读者能及时了解国内外肝癌发生机制的研究现状,也为进一步的实验研究和临床研发新的靶向治疗药物提供理论依据。

物能高亲和力结合DNA鸟嘌呤的N7位点,形成AFB1-N7-Gua复合物,AFB1-N7-Gua能自发变为更稳定的AFB1-FAPY,这两种物质都能引起结合位点的G→T突变和5'端突变^[29],AFB1在体内主要与谷胱甘肽(GST)结合成共价化合物而灭活。实验证明,经过AFB1处理的小鼠肺细胞,UV诱导的DNA损伤修复被抑制,说明AFB1能下调或抑制在NER中起限速作用的酶或蛋白质的活性^[30]。由于AFB1引起的DNA不能被NER修复,导致损伤DNA累积,引起细胞恶性转化。因此,不同生物对AFB1的灭活能力以及对损伤的修复能力是决定生物对AFB1敏感性的重要机制。另外,新生小鼠和P53缺乏的成年鼠的肝细胞对AFB1的敏感性要高于正常成年鼠^[31],这两种小鼠都有肝细胞的增生,因此,增生的不成熟肝细胞也是导致小鼠对化学致癌物敏感的重要机制。还有实验证明,AFB1能诱导P53基因第249位密码子的点突变(AGG→AGT),导致P53蛋白中丝氨酸替代原来的精氨酸,突变的P53蛋白可能阻止细胞从G1期进入S期^[32]。也有实验表明,P53第249位密码子的点突变与P53^{+/+}在诱导肝癌发生的效果上是相同的^[31]。

5 其他因素与肝癌的发生

研究表明,过量饮酒以及各种化学物质如亚硝酸胺等也能导致肝癌的发生。过量饮酒能导致脂肪肝的形成,引起肝细胞脂质过氧化反应(LPO)和脂肪变性。LPO的代谢产物如反式4-羟基-2-壬烯醇(HNE),丙二醛(MDA)等能与DNA形成复合物引起细胞DNA的损伤^[33]。HNE-脱氧鸟苷(HNE-dG)复合物能结合P53基因第249位密码子的第3个碱基,引起碱基突变^[34]。Feng *et al*^[35]发现,接受HNE处理的人体细胞不能修复UV介导的DNA损伤,说明HNE能抑制NER的修复通路,而NER也是修复HNE导致的DNA损伤的主要通路。这样,损伤DNA的累积就成为HNE等LPO产物诱导肝癌发生的重要机制。实验证明^[36],单纯患有脂肪肝的FLS鼠系可自发肝癌,这与肝细胞脂肪变性有关,这可能是非酒精性脂肪肝引发肝癌的重要机制。此外,过量饮酒还能导致机体的氧化应激,引起细胞DNA的氧化损伤^[26]。化学致癌物如亚硝酸胺能形成DNA-致癌因子复合物,还能诱导DNA双链改变,如碱基氧化损伤,SSB,DSB,染色体畸变,DNA-蛋白质交连等,这是致癌物如二乙基亚硝酸胺(DEN)导致DNA损伤的最初形式^[37]。DEN在体内氧化代谢并分解为高活性

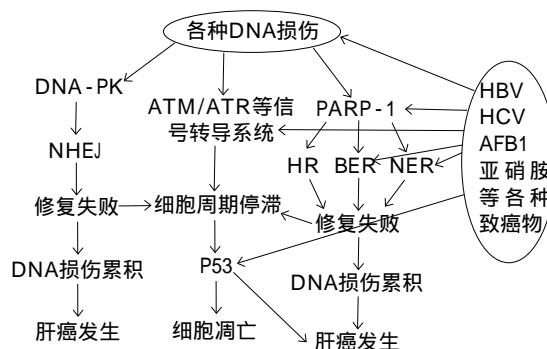


图1 HBV, HCV, AFB1等各种损伤物质诱导肝癌发生机制。

的烷化剂,这些亲电子体能攻击DNA链的亲质子中心如鸟嘌呤的N7和O6位点,形成烷化DNA复合物,复制这种烷化DNA能引起位点处的G:C突变,激活原癌基因^[38]。Iwai *et al*^[39]研究表明,经过DEN处理的FLS鼠系肝癌发生率要明显高于C3H和C57鼠系,说明FLS鼠系对DEN的致癌敏感性要高于C3H和C57鼠系,其机制可能是脂肪肝引起的LPO消耗了大量的GSH,产生的代谢物如HNE又抑制NER修复系统,脂肪变性引起许多细胞器如内质网、线粒体的功能障碍,这些都加重了DEN引起的DNA损伤,使损伤累积导致细胞恶性转化。

总之,各种诱因如HBV, HCV, AFB1等都可能引起肝细胞DNA损伤, DNA损伤后引发机体一系列的信号转导,包括损伤信号转导,损伤修复和P53介导的细胞凋亡。这些诱因诱导肝癌发生的机制就是作用于此系统中的某些环节,或影响信号转导,或影响损伤修复,或影响P53介导的细胞凋亡通路(图1)。如HBV, HBV整合到宿主细胞时,会引起整合处的基因重排和/或碱基缺失,以及HBV感染引发机体持续的免疫反应都会导致DNA损伤;而HBV编码的HBX蛋白则会影响信号转导系统,降低DNA损伤修复功能,同时HBX还可以与P53相互作用,影响P53的一系列功能,最终会导致DNA损伤的累积和细胞的恶性转化。但是,仍有许多问题未得到完全阐明,如已证明HBX在HBV诱导的肝癌中起重要作用,而HBV引起的DNA损伤主要由PARP-1介导的BER修复通路完成。因此,可以推测作为致癌因素的HBX和抗癌因素的PARP-1之间是否存在相互作用,以及这种作用在HBV诱导肝癌发生的重要性。随着各种先进技术的应用以及更多动物模型的建立,肝癌发生的确切机制将会被完全阐明。针对肝癌发生机制重要分子的靶向治疗,也会使治疗更有效,更安全,细胞特异性

也会更强, 如PAPR-1抑制剂作为抗肿瘤药物的研究取得显著效果, 目前已投入临床试用, 相信随着肝癌的研究进展, 以后还会应用更多的靶向治疗达到完全治愈肝癌的效果。

6 参考文献

- 1 Yang J, Yu Y, Hamrick HE, Duerksen-Hughes PJ. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1571-1580
- 2 Masutani M, Nakagama H, Sugimura T. Poly (ADP-ribose) and carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 38: 339-348
- 3 Lindahl T, Wood RD. Quality control by DNA repair. *Science* 1999; 286: 1897-1905
- 4 Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001; 411: 366-374
- 5 Oei SL, Ziegler M. ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly (ADP-ribose). *J Biol Chem* 2000; 275: 23234-23239
- 6 Tong WM, Cortes U, Hande MP, Ohgaki H, Cavalli LR, Lansdorp PM, Haddad BR, Wang ZQ. Synergistic role of Ku80 and poly (ADP-ribose) polymerase in suppressing chromosomal aberrations and liver cancer formation. *Cancer Res* 2002; 62: 6990-6996
- 7 Nomura F, Yaguchi M, Togawa A, Miyazaki M, Isobe K, Miyake M, Noda M, Nakai T. Enhancement of poly-adenosine diphosphate-ribosylation in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 529-535
- 8 Deb SP. Function and dysfunction of the human oncoprotein MDM2. *Front Biosci* 2002; 7: d235-d243
- 9 Dasika GK, Lin SC, Zhao S, Sung P, Tomkinson A, Lee EY. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene* 1999; 18: 7883-7899
- 10 Oren M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 2003; 10: 431-442
- 11 Virag L, Szabo C. The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375-429
- 12 Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet* 2002; 31: 339-346
- 13 Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik D, Mugnier C, Lagorce D, Brechot C. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene* 2003; 22: 3911-3916
- 14 Hytiroglou P, Theise ND. Telomerase activation in human hepatocarcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 839-841
- 15 Bill CA, Summers J. Genomic DNA double-strand breaks are targets for hepadnaviral DNA integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11135-11140
- 16 Dandri M, Burda MR, Burkle A, Zuckerman DM, Will H, Rogler CE, Greten H, Petersen J. Increase in de novo HBV DNA integrations in response to oxidative DNA damage or inhibition of poly (ADP-ribosyl) ation. *Hepatology* 2002; 35: 217-223
- 17 Choudhury S, Zhang R, Frenkel K, Kawamori T, Chung FL, Roy R. Evidence of alterations in base excision repair of oxidative DNA damage during spontaneous hepatocarcinogenesis in Long Evans Cinnamon rats. *Cancer Res* 2003; 63: 7704-7707
- 18 Waris G, Siddiqui A. Regulatory mechanisms of viral hepatitis B and C. *J Biosci* 2003; 28: 311-321
- 19 Lee AT, Ren J, Wong ET, Ban KH, Lee LA, Lee CG. The hepatitis B virus X protein sensitizes HepG2 cells to UV light-induced DNA damage. *J Biol Chem* 2005; 280: 33525-33535
- 20 Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Sturzbecher HW, Hoeijmakers JH, Harris CC. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res* 1995; 55: 6012-6016
- 21 Su JJ, Li Y, Ban KC, Qin LL, Wang HY, Yang C, Ou C, Duan XX, Lee YI Y, Yan RQ. Alteration of the p53 gene during tree shrews' hepatocarcinogenesis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 612-616
- 22 Mykkanen H, Zhu H, Salminen E, Juvonen RO, Ling W, Ma J, Polychronaki N, Kemilainen H, Mykkanen O, Salminen S, El-Nezami H. Fecal and urinary excretion of aflatoxin B1 metabolites (AFQ1, AFM1 and AFB-N7-guanine) in young Chinese males. *Int J Cancer* 2005; 115: 879-884
- 23 Baek KH, Park HY, Kang CM, Kim SJ, Jeong SJ, Hong EK, Park JW, Sung YC, Suzuki T, Kim CM, Lee CW. Overexpression of hepatitis C virus NS5A protein induces chromosome instability via mitotic cell cycle dysregulation. *J Mol Biol* 2006; 359: 22-34
- 24 Severi T, Vander Borgh S, Libbrecht L, Vanaelst L, Nevens F, Roskams T, Cassiman D, Fevery J, Verslype C, van Pelt JF. HBx or HCV core gene expression in HepG2 human liver cells results in a survival benefit against oxidative stress with possible implications for HCC development. *Chem Biol Interact* 2007; 168: 128-134
- 25 Sasaki Y. Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma? *J Gastroenterol* 2006; 41: 1135-1148
- 26 Rusyn I, Asakura S, Pachkowski B, Bradford BU, Denissenko MF, Peters JM, Holland SM, Reddy JK, Cunningham ML, Swenberg JA. Expression of base excision DNA repair genes is a sensitive biomarker for in vivo detection of chemical-induced chronic oxidative stress: identification of the molecular source of radicals responsible for DNA damage by peroxisome proliferators. *Cancer Res* 2004; 64: 1050-1057
- 27 Moriya M. Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 1122-1126
- 28 Girard PM, Boiteux S. Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie* 1997; 79: 559-566
- 29 Wang JS, Groopman JD. DNA damage by mycotoxins. *Mutat Res* 1999; 424: 167-181
- 30 Bedard LL, Alessi M, Davey S, Massey TE. Susceptibility to aflatoxin B1-induced carcinogenesis correlates with tissue-specific differences in DNA repair activity in mouse and in rat. *Cancer Res* 2005; 65: 1265-1270
- 31 Sell S. Mouse models to study the interaction of risk factors for human liver cancer. *Cancer Res* 2003; 63:

名词解释

1 聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1 (PARP-1): PARP-1是一种分子量为116 ku的核酶, 他包括三个主要的结构域: N-末端的DNA结合域, 中间的自身修饰域, C-末端的催化域。

2 依赖DNA的蛋白激酶(DNA-PK): DNA-PK是非同源末端连接(NHEJ)修复系统中的重要组成部分, 由一个催化亚基(DNA-PKcs)和一个DNA结合亚基Ku70/Ku80组成, 催化亚基具有蛋白激酶活性, 能够磷酸化多种蛋白。

3 ATM/ATR: 运动失调性毛细血管扩张症基因突变体(ataxia telangiectasia, mutated, ATM)/运动失调性毛细血管扩张症基因突变体和Rad相关基因(ATM- and Rad3-related, ATR)。他们和DNA-PK都属于PI-3激酶超家族, 具有丝/苏氨酸蛋白激酶活性, 但没有脂酶活性。

同行评价
本综述有一定的可读性,能较好地反映我国甚至国际胃肠病学临床和基础研究水平,是一篇较好的文章.

- 7553-7562
- 32 Ming L, Thorgeirsson SS, Gail MH, Lu P, Harris CC, Wang N, Shao Y, Wu Z, Liu G, Wang X, Sun Z. Dominant role of hepatitis B virus and cofactor role of aflatoxin in hepatocarcinogenesis in Qidong, China. *Hepatology* 2002; 36: 1214-1220
- 33 Lee SH, Arora JA, Oe T, Blair IA. 4-Hydroperoxy-2-nonenal-induced formation of 1,N2-etheno-2'-deoxyguanosine adducts. *Chem Res Toxicol* 2005; 18: 780-786
- 34 Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg* 2006; 391: 499-510
- 35 Feng Z, Hu W, Tang MS. Trans-4-hydroxy-2-nonenal inhibits nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for lipid peroxidation-induced carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 8598-8602
- 36 Soga M, Kishimoto Y, Kawamura Y, Inagaki S, Makino S, Saibara T. Spontaneous development of hepatocellular carcinomas in the FLS mice with hereditary fatty liver. *Cancer Lett* 2003; 196: 43-48
- 37 Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993; 362: 709-715
- 38 Maher VM, Domoradzki J, Bhattacharyya NP, Tsujimura T, Corner RC, McCormick JJ. Alkylation damage, DNA repair and mutagenesis in human cells. *Mutat Res* 1990; 233: 235-245
- 39 Iwai S, Murai T, Makino S, Min W, Morimura K, Mori S, Hagihara A, Seki S, Fukushima S. High sensitivity of fatty liver Shionogi (FLS) mice to diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis: comparison to C3H and C57 mice. *Cancer Lett* 2007; 246: 115-121

电编 何基才 编辑 张海宁

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 2007 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》综合介绍以下内容:消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊.

《世界华人消化杂志》2007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研究人员、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;网址:www.wjgnet.com.

扶正利湿解毒法体内外逆转肝纤维化

何金洋, 符路娣, 邓文娣, 周映云

何金洋, 邓文娣, 周映云, 广州中医药大学热带医学研究所
广东省广州市 510405

符路娣, 广州中医药大学实验动物中心 广东省广州市
510405

何金洋, 博士, 助理研究员, 主要从事乙型肝炎、艾滋病
等病毒性疾病研究。

广州中医药大学科研创新基金, No.k0050044

通讯作者: 何金洋, 510405, 广东省广州市机场路12号, 广州中
医药大学热带医学研究所. sunny12345678_89@yahoo.com.cn

电话: 020-31774402

收稿日期: 2007-03-06 接受日期: 2007-03-23

***In vivo* and *in vitro* study on liver fibrosis reversion effect by therapy of strengthening healthy qi combined with draining dampness and relieving toxin**

Jin-Yang He, Lu-Di Fu, Wen-Di Deng, Ying-Yun Zhou

Jin-Yang He, Wen-Di Deng, Ying-Yun Zhou, Tropical
Medical Institute, Guangzhou university of Chinese Medi-
cine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Lu-Di Fu, Laboratory Animal Center, Guangzhou univer-
sity of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong
Province, China

Correspondence to: Jin-Yang He, Tropical Medical Insti-
tute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medi-
cine, 12 Jichang Road, Guangzhou 510405, Guangdong
Province, China. sunny12345678_89@yahoo.com.cn

Received: 2007-03-06 Accepted: 2007-03-23

Abstract

AIM: To observe the reversing effect on liver
fibrosis by the therapy of strengthening healthy
qi combined with draining dampness and
relieving toxin (SHQDDRT).

METHODS: Rat model of liver fibrosis was
induced by dimethylnitrosamine (DMN). All
the rats were randomly divided into 6 groups,
named group A (control, $n = 10$), B (model, $n =$
 10), C (colchicine, $n = 10$), D (with the basic herb
complex, high dose, $n = 10$), E (with the basic
herb complex, middle dose, $n = 10$) and F (with
the basic herb complex, low dose, $n = 10$). The
content of liver hydroxyproline and the serum
alanine aminotransferase (ALT) were tested. HE
and Masson staining were conducted for patho-

logical examination. HSC-T6 cell line was used
as an *in vitro* model. After 24 hours of drug ad-
ministration, the inhibitory effect was observed
under an optical microscope. Cell prolifera-
tion was detected by MTT assay. Additionally,
HSC-T6 cells were observed by electron micro-
scopy after they were treated with the basic herb
complex and control drug at the concentration
of 2 g/L.

RESULTS: The content of liver hydroxypro-
line and the serum ALT in group D and E were
significantly lower than those in group B (hy-
droxyproline: $213.73 \pm 58.05 \mu\text{g/g}$, 245.95 ± 67.70
 $\mu\text{g/g}$ vs $317.37 \pm 42.06 \mu\text{g/g}$, $P < 0.01$, $P < 0.05$;
ALT: $33.56 \pm 8.16 \text{ kU/L}$, $42.38 \pm 14.99 \text{ kU/L}$ vs
 $58 \pm 10.32 \text{ kU/L}$, $P < 0.01$, $P < 0.05$). Masson
staining showed that the fibrotic degrees were
significantly decreased in group D and E in con-
trast with those in group B (2.33 ± 0.87 , $2.63 \pm$
 0.74 vs 3.70 ± 0.67 , both $P < 0.01$), and the fiber
deposition, inflammation and hemorrhage were
also improved. Light endoscopy and MTT as-
say demonstrated that the basic herb complex
inhibited the growth of HSC-T6 cells in a dose-
dependent manner. Electron microscopy exhib-
ited typical apoptosis features in HSC-T6 cells.

CONCLUSION: The basic herb complex shows
significant reversing effect on liver fibrosis *in vi-*
tro and *in vivo*.

Key Words: Liver fibrosis; Reversing effect; The ba-
sic herb complex; Cell apoptosis; Masson staining

He JY, Fu LD, Deng WD, Zhou YY. *In vivo* and *in vitro*
study on liver fibrosis reversion effect by therapy of
strengthening healthy qi combined with draining
dampness and relieving toxin. *Shijie Huaren Xiaohua*
Zazhi 2007;15(16):1781-1787

摘要

目的: 观察扶正利湿解毒法基本方(简称基本
方)对肝纤维化的逆转作用。

方法: 采用DMN诱导大鼠肝纤维化, 造模结
束后随机分为模型对照组, 秋水仙碱组, 基本
方高剂量组, 基本方中剂量组及基本方低剂量

背景资料

肝纤维化是所有
慢性肝病进展到
肝硬化的必经阶
段, 肝纤维化的逆
转将大大降低因
肝病导致的死亡率。

研发前沿
近年来研究表明了肝纤维化可以逆转,但到目前为止还未找到确切地逆转肝纤维化的方法。

组并分组给药,同时设空白对照组。灌胃3 wk后检测肝组织Hyp, ALT水平; HE, Masson染色。采用HSC-T6细胞培养,药物作用24 h后光镜下观察拍照,检测药物对细胞的抑制率并在电镜下观察药物浓度为2 g/L时细胞的变化。

结果:基本方高、中剂量均可使大鼠肝组织Hyp, 血清ALT显著下降(Hyp: $213.73 \pm 58.05 \mu\text{g/g}$, $245.95 \pm 67.70 \mu\text{g/g}$ vs $317.37 \pm 42.06 \mu\text{g/g}$, $P < 0.01$, $P < 0.05$; ALT: $33.56 \pm 8.16 \text{ kU/L}$, $42.38 \pm 14.99 \text{ kU/L}$ vs $58 \pm 10.32 \text{ kU/L}$, $P < 0.01$, $P < 0.05$); Masson染色肝纤维化分级评分显示,基本方高、中剂量均可使肝纤维化程度显著降低(2.33 ± 0.87 , 2.63 ± 0.74 vs 3.70 ± 0.67 , $P < 0.01$, $P < 0.01$),同时显著改善肝组织炎症、出血及纤维沉积;光镜观察及抑制率检测显示基本方呈剂量依赖性抑制HSC-T6细胞增殖。电镜显示基本方主要导致HSC-T6细胞凋亡。

结论:基本方显示了显著的体内外逆转肝纤维化作用。

关键词:肝纤维化;逆转作用;复方;Masson染色;细胞凋亡

何金洋,符路娣,邓文娣,周映云.扶正利湿解毒法体内外逆转肝纤维化.世界华人消化杂志 2007;15(16):1781-1787
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1781.asp>

0 引言

肝纤维化(liver fibrosis, LF)是肝病进展的中间阶段,对于LF的治疗可以减少严重肝病及因肝病而死亡的发生,因此对于LF的研究一直备受重视。近年的实验研究证实了LF甚至肝硬化(liver cirrhosis, LC)是可以逆转的^[1]。而目前尚未见有疗效确切的能够经得起检验的逆转LF的公认方法。我们多年运用扶正利湿解毒法治疗慢乙肝(hepatitis B),观察到坚持运用该法治疗的患者可能具有较好的远期疗效。推测该治法可能逆转LF,我们对该法的基本方-扶正利湿解毒复方进行了体内外实验研究,现予以报道。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级SD大鼠80只,雌雄各半,体重120-150 g,购于广州中医药大学实验动物中心。饲养于广州中医药大学实验动物中心清洁级动物房,按照中国实验动物学会规定的大鼠喂饲标准进行喂养。

扶正利湿解毒法基本方(以下简称基本方):

主要由白花蛇舌草、丹参、山药、旱莲草等8味药组成,购于广州采芝林医药连锁店。购回后以蒸馏水500 mL煎煮2次,每次烧开后30 min收集药液,将2次所得药液合并,浓缩为1 kg/L浓度,冷藏后尽快使用。丹参注射液:江苏神龙制药厂生产。秋水仙碱(colchicine):Sigma分装,购自广州威佳科技有限公司。二甲亚硝胺(N-Nitrosodimethylamine, DMN):购自天津化学试剂研究所。谷丙转氨酶(ALT)、羟脯氨酸(Hyp)检测试剂盒:购自南京建成生物工程研究所。HSC-T6细胞系由北京佑安医院汪晓军博士惠赠;DMEM高糖培养基、Hepes、MTT、胎牛血清、胰酶、双抗、细胞培养板、细胞培养瓶均购于广州威佳科技公司。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组给药 大鼠适应性喂养3 d,对70只大鼠进行造模,其余10只为空白对照组。造模方法为:用生理盐水配制1:100 (V/V)的DMN稀释溶液,每周前3 d对大鼠进行腹腔注射,DMN 10 $\mu\text{L/kg}$ 体重;空白对照组同时腹腔注射生理盐水;共注射4 wk。第4周注射结束后随机分为模型对照组、秋水仙碱组、基本方高剂量组、基本方中剂量组及基本方低剂量组;秋水仙碱组以0.01 mg/kg体重灌胃,基本方高、中、低剂量组分别以20, 10, 5 g/kg体重灌胃;模型对照组灌胃生理盐水10 mL/kg。均每天灌胃,共21 d。从开始造模到试验结束观察记录动物死亡情况。实验结束时摘眼球取血收集血清,观察腹水情况、肝脏肉眼观形态、色泽;并取左前叶肝脏,置于bouin固定液中固定。

1.2.2 血清ALT与肝组织Hyp检测 ALT, Hyp检测分别严格按照试剂盒操作说明书进行操作。

1.2.3 病理检查 固定36 h后立即取出选块、石蜡包埋、切片5 μm ,然后行苏木素-伊红(HE)染色、Masson染色,光镜下观察并拍照^[2]。纤维化程度评价用评分方法,具体分级方法如下:0分,无纤维化;1分,轻度纤维化,纤维沉积仅位于小叶中央;2分,中度纤维化,纤维沉积扩展至小叶中央之外,但仍未至小叶边缘;3分,严重肝纤维化,纤维沉积扩展至小叶边缘;4分,肝硬化。

1.2.4 体外实验方法 细胞复苏、传代与冻存采用常规方法操作。将已传至第三代的且已长满培养瓶的HSC-T6细胞用2.5 g/L的胰酶消化,调细胞浓度至 $2 \times 10^8/\text{L}$,铺于96孔板,24 h后上药。基本方从10 g/L起始,5倍稀释,共7个浓度,即分别为10, 2, 0.4, 0.08, 0.016, 0.0032, 0.00064 g/L。

表 1 各组大鼠血清ALT水平及肝组织Hyp含量的比较(mean ± SD)

分组	<i>n</i>	ALT(kU/L)	Hyp(μg/g)
空白对照组	10	20.8 ± 4.96	109.14 ± 29.06
模型对照组	10	58 ± 10.32 ^b	317.37 ± 42.06 ^b
秋水仙碱组	8	39.25 ± 18.4 ^{bc}	242.25 ± 47.93 ^{bc}
基本方高剂量组	9	33.56 ± 8.16 ^{bd}	213.73 ± 58.05 ^{bd}
基本方中剂量组	8	42.38 ± 14.99 ^{bc}	245.95 ± 67.70 ^{bc}
基本方低剂量组	6	50.67 ± 18.39 ^b	255.03 ± 91.73 ^b

^b*P*<0.01 vs 空白对照组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs 模型对照组.

丹参注射液以原液稀释的10, 100, 1000倍共3个浓度进行上药.

根据相关文献^[3]常规操作进行MTT检测, 测得的各复孔 A 值取平均数. 按文献方法^[4], 计算出药物对细胞增殖的抑制率IE. 公式如下: $IE = 1 - A_t/A_0$. 注: IE(inhibitory effect)表示药物对细胞增殖的抑制率, A_t 表示某药物浓度下的吸光度值, A_0 表示对照组细胞的吸光度值.

细胞用6 cm方瓶培养, 分为丹参、基本方及正常对照共3瓶, 按前述传代上药, 上药浓度为基本方与丹参均为2 g/L, 正常对照不上药. 作用24 h后用2.5 g/L胰酶消化细胞, 离心用戊二醛固定后, 包埋制超薄切片, 电镜观察拍照.

2 结果

2.1 动物实验

2.1.1 大鼠死亡、腹水及肝脏肉眼观情况 造模第1周死亡2只, 第2周末未见死亡, 第3周注射完毕后开始有大鼠批量死亡, 至第4周造模结束时造模大鼠共死亡14只, 仍有56只存活, 分组给药时模型组12只, 秋水仙碱组、基本方高、中、低剂量组均为11只. 在给药期间仍陆续有大鼠死亡, 至给药结束采集标本时模型组为10只, 秋水仙碱组为8只, 基本方高剂量组为9只, 中剂量组为8只, 低剂量组为6只.

取肝脏时见模型对照组8只有大量腹水, 均为血性, 另2只少量腹水; 秋水仙碱组2只有腹水, 其余6只未见腹水; 基本方高剂量组1只见少量腹水; 基本方中剂量组4只见中等量腹水; 基本方低剂量组4只有腹水; 其余未见腹水; 空白对照组未见腹水, 肝脏表面平滑, 浅黄色, 边缘锐利, 无肿大、缩小.

2.1.2 基本方对血清ALT水平、肝组织Hyp含量的影响 模型对照组及各给药组血清ALT水平均升高, 与空白对照组比较, 有非常显著性差异

(均 P <0.01); 基本方高、中剂量组血清ALT水平显著降低, 与模型对照组比较有显著性差异(分别为 P <0.01, P <0.05); 秋水仙碱组血清ALT水平也显著降低, 与模型对照组比较有显著性差异(P <0.05); 而基本方低剂量组血清ALT水平均值也有降低, 但与模型对照组比较无显著意义(P >0.05). 说明基本方高、中剂量均对该LF模型血清ALT水平有显著降低作用(表1).

模型对照组及各给药组肝组织Hyp水平均升高, 与空白对照组比较, 有显著性差异(均 P <0.01); 秋水仙碱组与模型对照组比较, Hyp含量显著降低(P <0.01); 基本方高、中剂量组与模型对照组比较, Hyp含量均显著降低(分别为 P <0.01, P <0.05), 说明基本方高、中剂量组均可使纤维化大鼠的肝组织Hyp含量明显下降, 而高剂量优于中剂量(表1).

2.1.3 各组肝组织病理检查结果 空白对照组大鼠肝组织肝小叶排列整齐, 各大鼠均未见明显异常(图1A); 模型对照组所有标本汇管区大量纤维沉积, 有8个样本形成假小叶; 肝细胞排列紊乱, 所有标本均有脂肪沉积, 汇管区大片炎细胞浸润, 肝组织大片出血灶(图1B); 秋水仙碱组所有标本汇管区大量纤维沉积, 有5个样本形成假小叶; 肝细胞排列紊乱, 4个标本肝细胞有脂肪沉积, 汇管区大片炎细胞浸润(图1C); 基本方高剂量组中有2个标本大量纤维沉积于汇管区, 其中1个形成假小叶, 大部分肝细胞排列整齐, 所有标本均有少量炎细胞浸润, (图1D); 基本方中剂量组所有标本均有大量汇管区纤维沉积, 有6个标本形成假小叶, 肝细胞排列紊乱, 有3个标本肝细胞中有脂滴沉积, 汇管区大片炎细胞浸润; 肝组织大片出血灶(图1E); 基本方低剂量组所有标本均有大量汇管区纤维沉积, 有5个标本形成假小叶, 肝细胞排列紊乱, 有3个标本肝细胞中有脂滴沉积, 汇管区大片炎细胞浸润; 肝组

相关报道

目前对于肝纤维化的逆转的研究主要集中在机制方面. 在药物逆转效果方面只有个别报道. 例如有研究报道“扶正化瘀方”有促进CC14实验性肝纤维化逆转的作用.

创新盘点

本研究首次提出了中医理论去除湿热毒邪在肝纤维化逆转中的重要性。采用DMN致大鼠肝纤维化模型,在造模结束后给药,突出了逆转肝纤维化的特点。且本研究在体外细胞培养中采用电镜、光镜、MTT等多种方法进行检测,使基本方逆转肝纤维化的效果及机制更加客观。

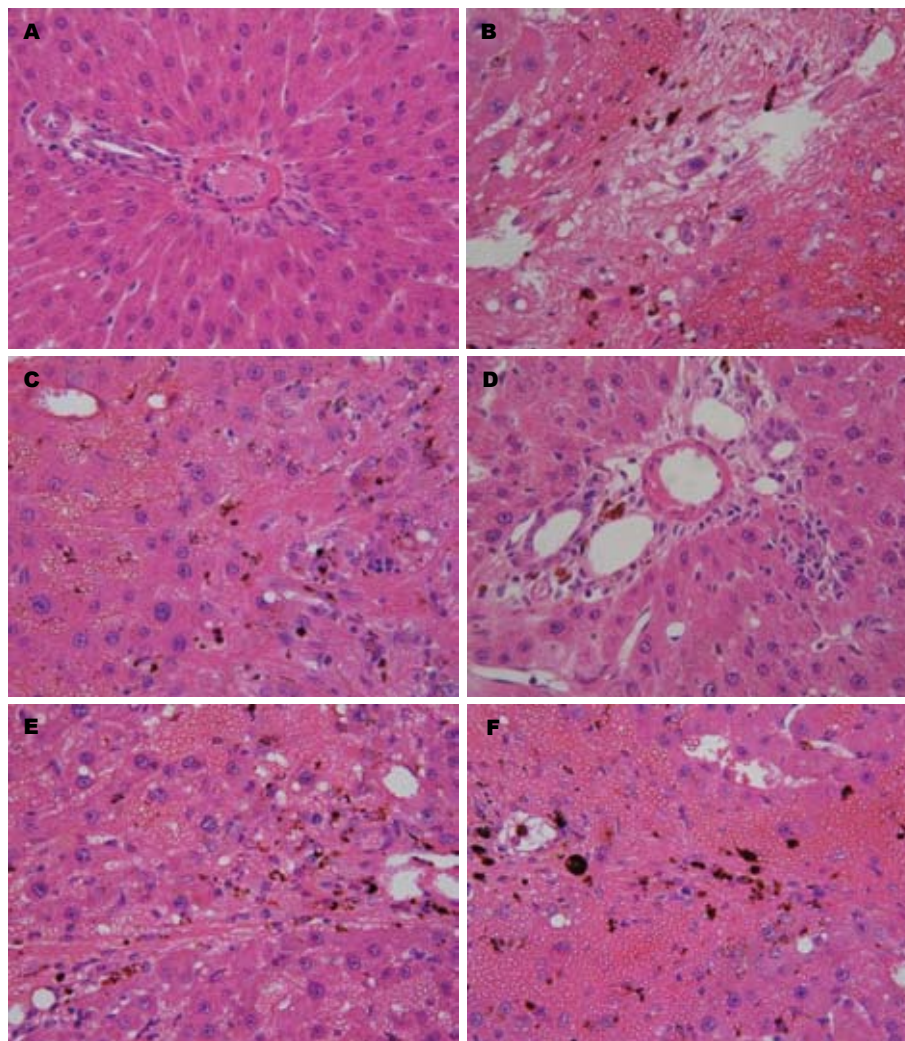


图 1 各组肝组织病理检查结果(HE × 400). A: 空白对照组; B: 模型对照组; C: 秋水仙碱组; D: 基本方高剂量组; E: 基本方中剂量组; F: 基本方低剂量组。

表 2 各组大鼠肝纤维化分级评分(mean ± SD)

分组	<i>n</i>	0	+1	+2	+3	+4	Staging scores
空白组	10	10	0	0	0	0	0
模型组	10	0	0	1	1	8	3.70 ± 0.67
秋水仙碱组	8	0	0	1	6	1	3.0 ± 0.53 ^a
基本方高剂量组	9	0	1	5	2	1	2.33 ± 0.87 ^b
基本方中剂量组	8	0	0	4	3	1	2.63 ± 0.74 ^b
基本方低剂量组	6	0	0	0	2	4	3.67 ± 0.52

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 模型对照组。

织大片出血灶(图1F)。

Masson染色所见与HE染色中纤维化基本一致,纤维沉积基本为胶原纤维,显色为淡绿色(图2)。纤维化程度分级定量(表2)。

2.2 细胞实验

2.2.1 上药24 h后各药物浓度光镜下观察 上药24 h后,基本方10 g/L剂量组细胞与对照组细胞相比,数量明显稀少,大部分细胞伪足收缩,不呈

星状。2 g/L剂量组细胞较10 g/L剂量组数量明显增多,外形正常的星状细胞明显增多,但与对照组细胞比较数量仍明显减少,外形仍有较多未呈星状,0.4 g/L剂量组又较2 g/L剂量组细胞致密,外形更为接近正常星状,但与对照组细胞比较仍然能看出数量及形态差别,0.08 g/L剂量组细胞在数量与外形上均看不出与对照组细胞有明显区别(图3),这些说明从光镜下观察细胞数

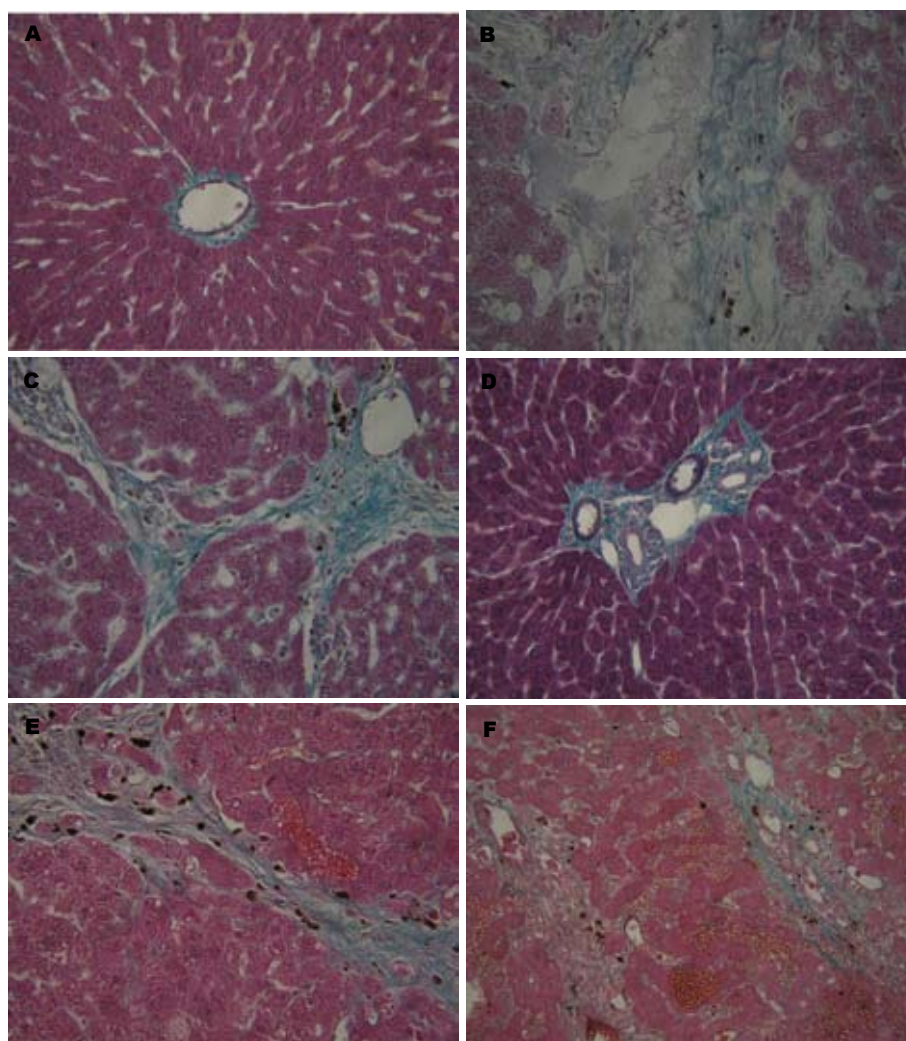


图 2 各组肝组织病理检查结果 (Masson $\times 400$). A: 空白对照组; B: 模型对照组; C: 秋水仙碱组; D: 基本方高剂量组; E: 基本方中剂量组; F: 基本方低剂量组.

应用要点
本文表明了扶正利湿解毒法具有逆转实验性肝纤维化的作用, 为临床肝纤维化治疗用药提出指导意见.

量及形态可以看出, 基本方从10 g/L浓度5倍稀释至0.08 g/L浓度, 对HSC-T6细胞生长呈梯度抑制, 说明基本方对HSC-T6生长有明显抑制作用, 且呈现剂量依赖型.

2.2.2 MTT检测结果 基本方在0.016 g/L以上浓度时均对HSC-T6具有抑制作用, 随着药物浓度的增大, 其对HSC-T6增殖的抑制作用逐渐增强, 有明显的量效关系(表3).

2.2.3 电镜观察结果 丹参和基本方作用于HSC-T6细胞24 h后均可使HSC-T6细胞大量凋亡, 丹参组细胞凋亡的特点是凋亡细胞的数量明显多于复方组, 其凋亡细胞形态变小, 核染色体堆积, 线粒体、内质网等细胞器明显减少, 代之以大量空泡. 基本方组大量细胞形态明显缩小, 出现大批双核细胞, 此点明显不同于丹参组, 细胞质中线粒体、内质网等细胞器明显减少, 也出现大量空泡. 而且大量还未成熟的细胞已开始显现凋亡特征, 这点也与丹参组明显不同(图4).

3 讨论

LF是一个病理过程, 中医大多从湿、热、毒、瘀、虚来解释其病理机制^[5], 目前治疗LF大多以活血化瘀为基础, 配合扶正, 取得一定疗效^[6-9]. 而实际情况是LF大多有湿热毒邪的存在^[10-11], 或十分明显, 或潜伏不显, 从现代医学角度讲, 大多是HBV慢性感染者^[12]. 而目前用于治疗LF的中药大都不具有解毒祛湿功效. 不能祛除湿热毒邪, LF病理机制就不能去除; 因此只有兼顾解毒祛湿清热, 才可能使LF彻底逆转和恢复.

扶正利湿解毒法正好符合上述理念, 而且基本方是在具有确切抑制HBV和保护免疫性肝损伤效果的“复方肝毒清”的基础上组方而成^[13-14], 因此其具有确切的解毒祛湿清热功效, 再辅以扶正和活血化瘀, 使基本方能够针对LF的整体病机, 因此具有较好的逆转LF的作用.

DMN导致的大鼠LF具有停用DMN后不自发逆转的特点^[15-16], 因此用此模型可以观察药物是否能够逆转LF^[17-19]. 而实验显示, 基本方高、

名词解释

抑制率(IE): 药物对细胞增值的抑制率, 一般是用MTT法检测吸光度 A , 以药物作用的细胞孔的 A 值与无药物作用的细胞孔 A 值进行比较, 1减去此比值。

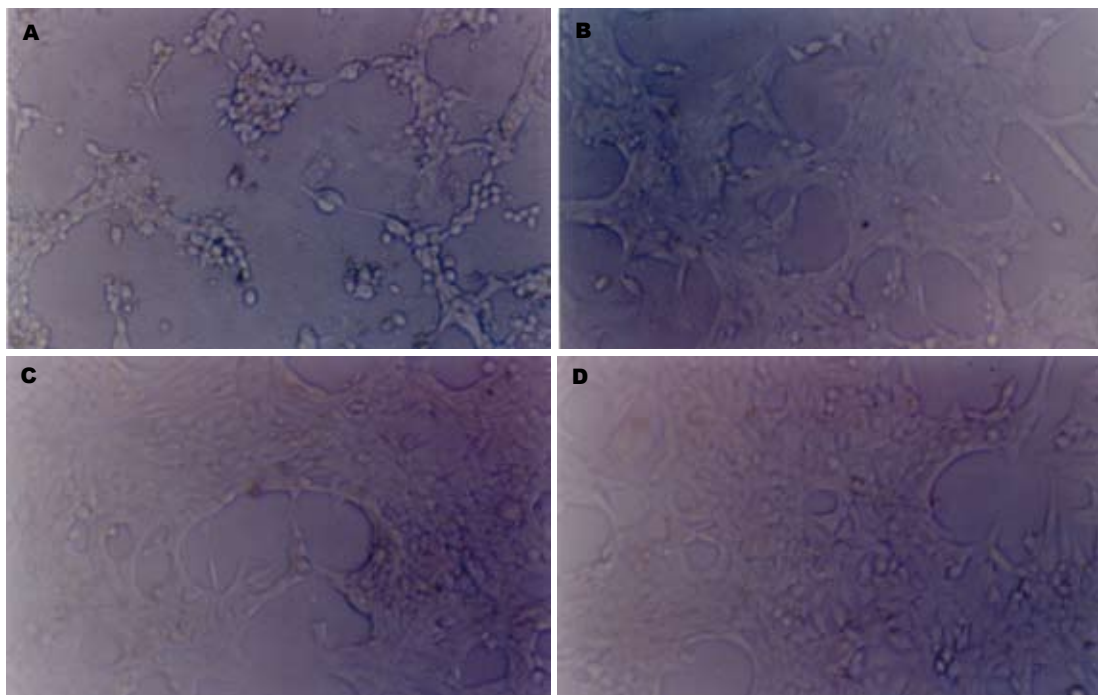


图 3 上药24 h后各药物浓度光镜下观察(光镜 $\times 200$). A: 10 g/L; B: 2 g/L; C: 0.4 g/L; D: 0.08 g/L.

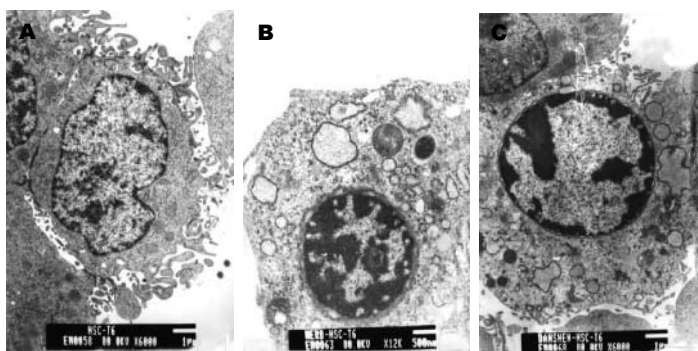


图 4 基本方与丹参对HSC-T6细胞影响的电镜观察. A: HSC正常细胞(6000 \times); B: 基本方作用后HSC-T6(12 000 \times); C: 丹参作用后HSC-T6(6000 \times).

表 3 基本方各药物浓度对HSC-T6增殖的抑制作用(g/L)

项目	10	2	0.4	0.08	0.016	0.0032	0.00064	对照
A	0.433	0.634	0.721	1.036	1.120	1.136	1.156	1.13
IE(%)	62	44	36	8.3	1	-0.6	-2.6	-

中剂量组均可使血清ALT水平和肝组织Hyp含量下降, 其中基本方高剂量组效果较好, 肝组织病理切片也证明了这一点, 病理染色切片分级评分显示, 基本方高、中剂量组均能显著改善LF大鼠的肝组织病理改变, 综合HE染色观察结果, 表明基本方具有改善肝组织出血、炎症, 减轻LF作用. 从基本方高、中剂量组病理切片及ALT水平、Hyp含量来看, 基本方高、中剂量组具有确切的逆转LF效果.

近年来临床何实验研究都证实了LF可以

逆转以及肝星状细胞在LF逆转中的核心作用^[20-27], 因此我们采用HSC-T6细胞作为体外模型, 结果表明, 基本方在0.016 g/L以上浓度时均对HSC-T6具有抑制作用, 电镜观察发现, 基本方抑制HSC-T6细胞的机制主要是导致HSC-T6细胞凋亡, 这点与对照组的丹参类似但又有显著不同, 基本方作用后大量细胞形态变小, 但只有较少细胞出现染色体堆积现象, 大部分细胞尚未明显出现染色体堆积现象, 而是出现大量双核细胞, 而且尚未成熟的幼稚细胞即已开始凋

亡, 说明一方面可能基本方能够刺激HSC-T6的生长, 而另一方面能够在其生长的初期即可导致其凋亡; 而丹参则不是这样, 因此基本方导致HSC-T6凋亡的分子机制可能不同于丹参, 值得进一步研究。

4 参考文献

- 1 Elsharkawy AM, Oakley F, Mann DA. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis* 2005; 10: 927-939
- 2 Brunt EM. Grading and staging the histopathological lesions of chronic hepatitis: the Knodell histology activity index and beyond. *Hepatology* 2000; 31: 241-246
- 3 Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods* 1986; 89: 271-277
- 4 谈博, 张奉学, 刘妮, 郭兴伯. 丹参含药血清对肝星状细胞增生的抑制作用. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1357-1360
- 5 叶放, 周珉, 薛博瑜. 对中医药防治肝纤维化研究若干问题的思考. *中西医结合肝病杂志* 2004; 14: 375-377
- 6 王继, 陈俊红, 李兵顺. 活血、益气、软坚不同中医治则逆转大鼠肝纤维化的实验观察. *中国中医基础医学杂志* 2006; 12: 420-422
- 7 梁尧, 刘强, 林寿宁. 扶正化痰法抗肝纤维化的研究进展. *陕西中医学院学报* 2006; 29: 66-67
- 8 Liu P, Liu C, Xu LM, Hu YY, Xue HM, Liu CH, Zhang ZQ. Effects of Fuzheng Huayu 319 recipe on liver fibrosis in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 348-353
- 9 赵素平, 郑玉. 活血化痰法在治疗肝纤维化中的作用. *河南中医* 2004; 24: 79-80
- 10 梁治学, 王晓平. 肝纤维化的中医病因病机研究概况. *甘肃中医* 2006; 19: 43-45
- 11 叶放, 薛博瑜, 周珉, 周仲瑛. 论湿热瘀毒与肝纤维化. *南京中医药大学学报* 2005; 21: 346-349
- 12 段国玉. 浅谈病毒与湿邪的关系. *中国中医药信息杂志* 2002; 9: 31-32
- 13 何金洋, 郭兴伯, 朱宇同, 李向阳, 周红艳, 赵昉. 复方肝毒清对乙型肝炎病毒的体内外抑制作用. *广州中医药大学学报* 2004; 21: 134 - 136
- 14 何金洋, 葛文华, 陈媛, 郭卫中, 周映云, 郭兴伯, 朱宇同. 复方肝毒清对免疫性肝损伤模型小鼠的保护作用. *广州中医药大学学报* 2005; 22: 285-288
- 15 Jenkins SA, Grandison A, Baxter JN, Day DW, Taylor I, Shields R. A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat. *J Hepatol* 1985; 1: 489-499
- 16 He JY, Ge WH, Chen Y. Iron deposition and fat accumulation in dimethylnitrosamine-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2061-2065
- 17 Yen MH, Weng TC, Liu SY, Chai CY, Lin CC. The hepatoprotective effect of Bupleurum kaioi, an endemic plant to Taiwan, against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 442-448
- 18 Sakaida I, Hironaka K, Terai S, Okita K. Gadolinium chloride reverses dimethylnitrosamine (DMN)-induced rat liver fibrosis with increased matrix metalloproteinases (MMPs) of Kupffer cells. *Life Sci* 2003; 72: 943-959
- 19 Hu QW, Liu GT. Effects of bicyclol on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in mice and its mechanism of action. *Life Sci* 2006; 79: 606-612
- 20 Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM. Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 127: 981-985
- 21 Wanless IR. Use of corticosteroid therapy in autoimmune hepatitis resulting in the resolution of cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 2001; 32: 371-372
- 22 Kaplan MM, DeLellis RA, Wolfe HJ. Sustained biochemical and histologic remission of primary biliary cirrhosis in response to medical treatment. *Ann Intern Med* 1997; 126: 682-688
- 23 Kweon YO, Goodman ZD, Dienstag JL, Schiff ER, Brown NA, Burchardt E, Schoonhoven R, Brenner DA, Fried MW. Decreasing fibrogenesis: an immunohistochemical study of paired liver biopsies following lamivudine therapy for chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001; 35: 749-755
- 24 Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Flejou JF, Degott C, Belghiti J, Bernades P, Valla D, Ruzsniowski P, Levy P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med* 2001; 344: 418-423
- 25 Yang F, Yang XP, Liu YH, Xu J, Cingolani O, Rhaleb NE, Carretero OA. Ac-SDKP reverses inflammation and fibrosis in rats with heart failure after myocardial infarction. *Hypertension* 2004; 43: 229-236
- 26 Issa R, Williams E, Trim N, Kendall T, Arthur MJ, Reichen J, Benyon RC, Iredale JP. Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut* 2001; 48: 548-557
- 27 Lee JI, Lee KS, Paik YH, Nyun Park Y, Han KH, Chon CY, Moon YM. Apoptosis of hepatic stellate cells in carbon tetrachloride induced acute liver injury of the rat: analysis of isolated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003; 39: 960-966

同行评价
该论文研究内容丰富, 从体内外实验观察了扶正利湿解毒法逆转肝纤维化的作用, 有一定的可读性和理论价值。

电编 何基才 编辑 张焕兰

TNF- α 对肠上皮细胞紧密连接蛋白表达的作用

崔巍, 刘冬妍, 马力, 刘沛

背景资料
炎症性肠病时肠上皮细胞旁路通透性的增高是其重要的发病基础, TNF- α 可能发挥重要作用。目前体内、体外的多项研究已经证实, TNF- α 可以增加肠上皮细胞旁路的通透性, 但具体作用机制还不十分清楚。肠上皮细胞旁路通透性主要受紧密连接调控, 而紧密连接由多种紧密连接蛋白组成, claudin-1是最重要的一种紧密连接蛋白, 其表达量的高低直接影响肠上皮细胞屏障的跨上皮细胞电阻。那么TNF- α 增加肠上皮细胞旁路的通透性是否是由于破坏紧密连接蛋白claudin-1而造成的呢? 本文就这一问题研究了TNF- α 对肠上皮细胞紧密连接蛋白claudin-1表达的影响。

崔巍, 刘沛, 中国医科大学附属第一医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
刘冬妍, 马力, 中国医科大学附属盛京医院感染科实验室 辽宁省沈阳市 110001
崔巍, 在读博士生讲师, 中国医科大学附属第一医院消化内科, 主要从事肝脏病的临床和科研工作。
国家自然科学基金资助项目, No. 30670947
通讯作者: 刘沛, 110001, 辽宁省沈阳市南京街155号, 中国医科大学附属第一医院消化内科. sylupei2003@yahoo.com.cn
电话: 024-83956962 传真: 024-83956451
收稿日期: 2007-02-25 接受日期: 2007-03-31

Effect of tumor necrosis factor- α on protein expression of tight junction protein in intestinal epithelial cells

Wei Cui, Dong-Yan Liu, Li Ma, Pei Liu

Wei Cui, Pei Liu, Department of Digestive diseases, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Dong-Yan Liu, Li Ma, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 97100252
Correspondence to: Pei Liu, Department of Digestive Diseases, the First Affiliated Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. sylupei2003@yahoo.com.cn
Received: 2007-02-25 Accepted: 2007-03-31

Abstract

AIM: To explore the mechanism of intestinal epithelial barrier disruption induced by tumor necrosis factor alpha (TNF- α). We detected the expression of the tight junction protein claudin-1 in Caco-2 cells with TNF- α treatment.

METHODS: Caco-2 cells between passages 20 and 30 were cultured with DMEM including 20% fetal bovine serum and 2 mmol/L glutamine for 7 days. Cells were then treated with different concentrations of TNF- α (0, 10, and 100 μ g/L) for 24 hours when they became fused. Protein was extracted from cells to prepare NP-40 detergent-soluble and insoluble protein fractions. Western blot was used to measure the protein levels of phosphorylated and unphosphorylated claudin-1. Indirect immunofluorescence was ap-

plied to the localization of claudin-1. Real-time quantity polymerase-chain reaction (RQ-PCR) was used to detect the mRNA expression of claudin-1.

RESULTS: Immunofluorescence showed that claudin-1 was distributed around the cell membrane and presented scrobiculate linear fluorescence. A 10 μ g/L concentration of TNF- α caused weakened fluorescence signals that were abnormally distributed dentately. Claudin-1 has two molecular forms: one is the nonphosphorylated form (20 kDa) that primarily exists in NP-40 soluble proteins; the other is the phosphorylated form (25 kDa) that only exists in NP-40 insoluble proteins. TNF- α did not affect the protein expression of 65-kDa claudin-1 but decreased 80-kDa claudin-1 protein expression in a concentration-dependant manner compared with the control (10, 100 μ g/L: 0.31 ± 0.02 , 0.24 ± 0.05 vs 0.43 ± 0.09 , $P > 0.05$, $P < 0.05$). Real time PCR demonstrated that the mRNA expression of claudin-1 in TNF- α treatment groups with different concentrations (10 and 100 μ g/L) for 24 hours, or a different reacting time (4, 8, 24 h), was not significantly different from the corresponding time normal groups ($P > 0.05$).

CONCLUSION: TNF- α does not affect the mRNA expression of the tight junction protein claudin-1 but decrease the expression of functional claudin-1 in Caco-2 cells.

Key Words: Tissue necrosis factor- α ; Tight junction protein claudin-1; Caco-2 cell; Immunofluorescence; Western blot; Real-time quantity polymerase-chain reaction

Cui W, Liu DY, Ma L, Liu P. Effect of tumor necrosis factor- α on protein expression of tight junction protein in intestinal epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1788-1793

摘要

目的: 研究肿瘤坏死因子 α (TNF- α)对肠上皮细胞紧密连接蛋白claudin-1定位和表达的影响, 探讨TNF- α 增加肠上皮细胞屏障通透性的作用机制。

方法: Caco-2细胞(20-30代)应用含有2 mmol/L谷氨酰胺、20%胎牛血清的DMEM培养液培养7 d, 细胞生长达到融合后加入不同浓度的TNF- α (0, 10, 100 μ g/L)继续培养24 h, 提取细胞蛋白制备NP-40可溶性及不溶性蛋白框架, Western blot检测磷酸化和非磷酸化的claudin-1蛋白含量, 并应用间接免疫荧光法检测claudin-1的定位, 实时定量PCR技术检测claudin-1 mRNA的表达。

结果: 免疫荧光染色可见对照组claudin-1沿细胞膜分布, 呈蜂巢状线性荧光, 10 μ g/L TNF- α 引起claudin-1荧光信号减弱, 并呈锯齿状异常分布; Western blot分析显示claudin-1蛋白有两种表达形式, 一种为20 kDa(非磷酸化claudin-1), 主要存在于NP-40可溶性蛋白样品中; 另一种为25 kDa(磷酸化claudin-1), 只存在于NP-40不溶性蛋白样品中。TNF- α 不影响20 kDa claudin-1蛋白的表达, 但可使25 kDa claudin-1蛋白表达下降且具有浓度依赖性(10, 100 μ g/L: 0.31 ± 0.02 , 0.24 ± 0.05 vs 0.43 ± 0.09 $P > 0.05$, $P < 0.05$); 实时定量PCR结果显示不同浓度的TNF- α (10, 100 μ g/L)作用24 h或100 μ g/L TNF- α 作用不同时间(4, 8和24 h)与正常对照组相比均不能引起claudin-1 mRNA的改变。

结论: TNF- α 对Caco-2细胞紧密连接蛋白claudin-1 mRNA的表达没有影响, 但可以引起有功能的磷酸化claudin-1蛋白表达减少。

关键词: 肿瘤坏死因子- α ; 紧密连接蛋白claudin-1; Caco-2细胞; 免疫荧光; 免疫印迹; 实时定量聚合酶链式反应

崔巍, 刘冬妍, 马力, 刘沛. TNF- α 对肠上皮细胞紧密连接蛋白表达的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1788-1793
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1788.asp>

0 引言

肠黏膜屏障功能损害被认为是炎症性肠病的始动因素^[1], 可引起肠黏膜屏障通透性增高, 使正常情况下不能通透的各种毒性物质、微生物进入肠壁, 诱发炎症反应。炎症细胞因子TNF- α 在这一过程中占据重要位置, 已有研究表明炎症性肠病患者TNF- α 异常增高, 并伴随肠黏膜屏障通透性的增高, 应用TNF- α 抗体可以降低这些患者肠黏膜屏障的通透性^[2], 但是TNF- α 引起肠黏膜屏障通透性增高的具体机制还不十分清楚。炎症性肠病时肠黏膜屏障通透性增高的特征是肠上皮细胞旁路的通透性明显增高, 而肠上皮

细胞旁路的通透性主要受紧密连接限制。紧密连接由多种紧密连接蛋白组成, claudin-1是最重要的一种紧密连接蛋白, 对于屏障功能的维持和紧密连接的完整性具有重要作用。有研究表明, claudin-1表达异常可使肠上皮细胞跨上皮细胞电阻(transsepithelial electrical resistance, TEER)降低, 肠黏膜通透性增高^[3]。因此我们检测了TNF- α 对紧密连接蛋白claudin-1表达的影响, 以探讨TNF- α 增加肠上皮细胞屏障通透性的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM高糖培养基, FCS购自美国Gibco公司, 非必须氨基酸、丙酮酸钠购自美国Hyclone公司, 谷氨酰胺、重组人TNF- α 购自美国Sigma公司, 兔抗claudin-1多克隆抗体购自美国Zymed公司, FITC-辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG购自美国Santa Cruz公司, PCR试剂盒、T7体外转录试剂盒、定时定量PCR试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Caco-2细胞应用含有200 mL/L胎牛血清、10 g/L非必须氨基酸、4 mmol/L谷氨酰胺和青霉素-链霉素双抗液的DMEM培养液, 在37℃、50 mL/L CO₂条件下进行培养, 每7天按1:2的比例传代。传代后7 d左右细胞生长达到融合, 加入不同浓度的TNF- α (0, 10, 100 μ g/L)培养24 h后, 进行免疫荧光检测, 并收集Caco-2细胞提取蛋白及总RNA, -130℃保存待用。每种实验均选取3组非同代细胞进行。

1.2.2 免疫荧光 取同代细胞接种于盖玻片上, 待细胞生长融合70%左右加入处理因素, 取出盖玻片, PBS漂洗3次(每次10 min)后, 用40 g/L多聚甲醛固定15 min, PBS漂洗, 加入5 g/L Triton X-100处理10 min, PBS漂洗, 100 mL/L小牛血清白蛋白室温封闭30 min, 加入claudin-1抗体(1:50), 4℃过夜, PBS漂洗后加入FITC标记二抗(1:200)室温孵育1 h, 再用PBS漂洗, 蒸馏水洗后用甘油封片, 荧光显微镜下观察。PBS液代替一抗作为空白对照。

1.2.3 NP-40可溶性及不溶性蛋白框架的制备 细胞用冰PBS洗3遍, 然后用NP-40蛋白裂解液(25 mmol/L HEPES, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 4 mmol/L EDTA, 10 g/L Nonidet P-40, 25 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na₃VO₄, 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 1 mmol/L PMSF)冰上裂解细胞20 min, 4℃, 12 000 g离心30 min, 上清即为NP-40可溶性蛋白, 转移

研发前沿
炎症性肠病时TNF- α 水平明显增高, 并且与肠黏膜屏障通透性增高密切相关。但TNF- α 引起肠黏膜屏障通透性增高的机制, 尤其是其发挥作用的信号传导通路是目前研究的热点。

相关报道

在体外细胞培养中, TNF- α 对紧密连接蛋白 claudin-1 表达的影响, 国内尚未见相关报道。国外研究存在不同的结果, 有研究认为 TNF- α 可以使 claudin-1 表达减少, 也有研究认为 TNF- α 对 claudin-1 的表达没有影响。

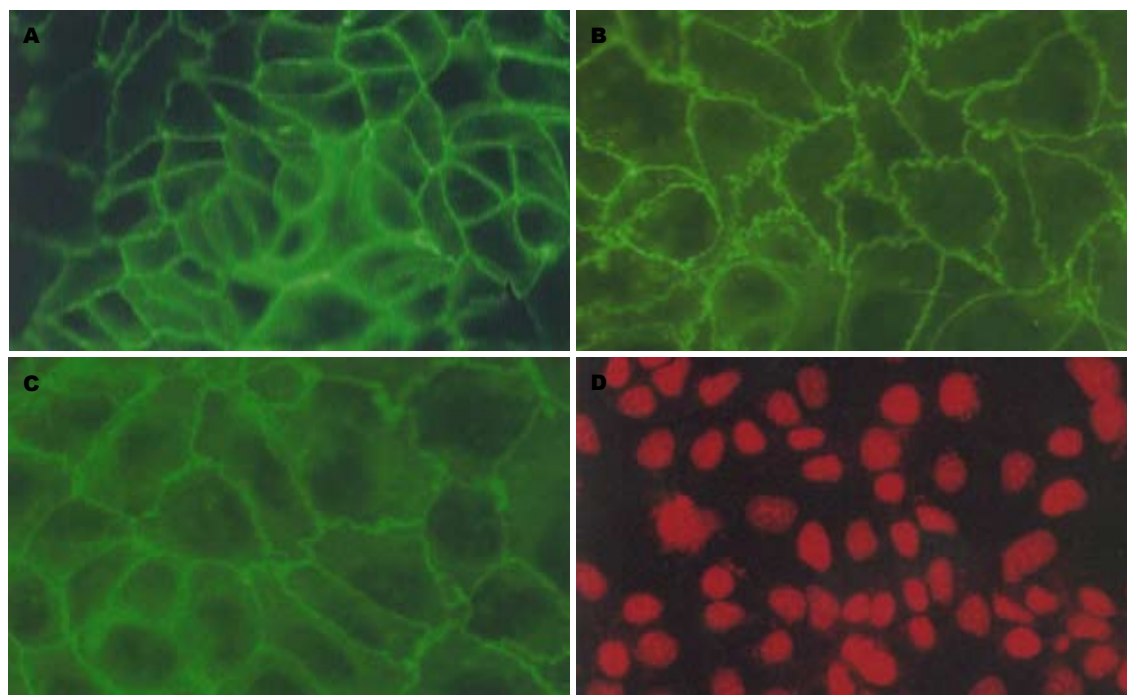


图1 各组免疫荧光染色结果($\times 400$)。A: 对照组可见沿细胞膜分布的蜂巢状线性荧光; B: 低浓度TNF- α 组可见荧光信号呈锯齿状异常分布; C: 高浓度TNF- α 组荧光信号明显减弱, 锯齿状异常分布更加明显; D: 空白对照。

至新的Microtube内。剩余沉淀应用SDS蛋白裂解液(25 mmol/L HEPES, pH 7.4, 4 mmol/L EDTA, 10 g/L SDS, 25 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 1 mmol/L PMSF)冰上裂解细胞20 min, 超声波粉碎5 s $\times 5$ 次, 4 $^{\circ}\text{C}$, 12 000 g 离心30 min, 所得上清即为NP-40不溶性蛋白, 两种蛋白的混合物即为总蛋白。采用BCA法对蛋白样品进行定量, 用蒸馏水将蛋白样品调成相同浓度, 加入相同体积上样缓冲液, 沸水煮5 min进行蛋白变性。

1.2.4 Western blot 每个样本取等量蛋白(约50 μg)进行80 g/L SDS-PAGE凝胶电泳, 电压100 V, 2.5 h, 电泳后将蛋白转至硝酸纤维素膜上, 电压50 V, 2 h, 脱脂奶粉4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜, TBS洗5 min $\times 3$ 次, 加入多克隆兔抗claudin-1抗体(1:500)室温2 h, TTBS洗5 min $\times 3$ 次, 然后加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔-IgG抗体(1:10 000)室温2 h, TTBS洗5 min $\times 3$ 次, ECL显色。以同一样本的 β -actin作为内参。结果通过天能图像分析系统进行分析, claudin-1蛋白含量 = 样本claudin-1蛋白灰度值/同一样本 β -actin灰度值。

1.2.5 实时定量PCR 用TRIzol一步法提取细胞总RNA。采用SYBR Green I 荧光染料嵌合法检测claudin-1 mRNA。简言之先构建目的基因(claudin-1基因)和管家基因(GAPDH)的RNA标

准品, 制作标准曲线, 利用标准曲线对样品中的目的基因和管家基因分别进行定量。通过管家基因的校正, 检测各组大肠组织中claudin-1目的基因的相对表达量。Claudin-1 mRNA的相对表达量 = claudin-1基因拷贝数/GAPDH基因拷贝数。PCR反应体系的组成参照说明书进行, 反应条件为逆转录反应42 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, PCR扩增95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s 1个循环, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s 45个循环。Claudin-1和GAPDH引物序列如下: Claudin-1引物: 5'-AAGAGTTGACAGTCCCATGGCATAC-3'(上游), 5'-ATCCACAGGCGAAGTTAATGGAAG-3'(下游); GAPDH引物: 5'-AAATGGTGAAGGT CCGTGTG-3'(上游), 5'-TGAAGGGGTCGTTGATGG-3'(下游)。Claudin-1产物片段133 bp, GAPDH产物片段144 bp。

统计学处理 实验结果以mean \pm SD表示, 采用SPSS10.0统计软件对各组间数据进行单因素方差分析, 每种实验均选取3组数据进行分析。

2 结果

2.1 免疫荧光染色结果 对照组claudin-1蛋白主要沿细胞膜分布, 呈蜂巢状线性荧光; 加入TNF- α 10 $\mu\text{g/L}$ 可使claudin-1蛋白荧光信号减弱, 并呈锯齿状分布; 增加TNF- α 浓度到100 $\mu\text{g/L}$ 发现claudin-1蛋白荧光信号进一步减弱, 锯齿状分布更加

创新盘点

目前关于TNF- α 对肠上皮细胞间紧密连接蛋白 claudin-1 表达变化的文章国内尚未见报道。TNF- α 对肠黏膜屏障损伤的研究主要集中在肠上皮细胞的凋亡, 对紧密连接蛋白表达的影响研究较少。

明显, 并且在胞浆内可见阳性染色. 以上结果提示TNF- α 可引起claudin-1分布异常, 由膜顶端向膜下及胞浆转移, 并具有浓度依赖性(图1).

2.2 Western blot结果 各组蛋白样品分为NP-40可溶性与NP-40不溶性两个框架分别进行蛋白杂交, 结果发现NP-40可溶性标本仅在20 kDa处见一特异性的蛋白条带, 对各条带进行灰度分析发现各组claudin-1蛋白的表达无明显差异. NP-40不溶性标本可见两条蛋白条带, 分别在20 kDa和25 kDa, 对各条带进行灰度分析发现各组标本20 kDa的蛋白含量无统计学差异, 但是对于25 kDa的蛋白含量, TNF- α 组较对照组明显下降并呈剂量依赖性(0.31 ± 0.02 , 0.24 ± 0.05 vs 0.43 ± 0.09 , $P > 0.05$, $P < 0.05$, 图2).

2.3 实时定量PCR结果 电泳结果和OD值结果显示, 构建的人claudin-1基因和GAPDH基因RNA标准品片段长度分别为358 bp和1043 bp. 其质量良好, 所获得的标准曲线相关系数为0.998, 线性关系良好, 融解曲线显示特异性良好. 利用标准曲线对样品中的claudin-1基因和GAPDH基因进行定量, 结果发现不同浓度TNF- α 组与正常对照组比较claudin-1 mRNA的水平没有统计学差异(0.63 ± 0.1 , 0.61 ± 0.06 vs 0.6 ± 0.07 , $P > 0.05$). 进一步我们检测了TNF- α 100 $\mu\text{g/L}$ 作用不同时间(4, 8, 24 h)claudin-1 mRNA水平的变化, 与正常对照组相应时间点相比, claudin-1 mRNA水平仍然没有统计学差异(0.9 ± 0.4 , 1.02 ± 0.6 , 0.92 ± 0.3 vs 0.94 ± 0.4 , $P > 0.05$). 这些结果提示TNF- α 对claudin-1的调节不发生在转录水平(图3).

3 讨论

TNF- α 已被证实是炎症性肠病时引起肠黏膜屏障功能损伤的重要启动因子, 这可以从下面几点证明: (1)炎症性肠病患者TNF- α 水平异常增高, 并与肠黏膜损伤的程度直接相关^[4]; (2)抗TNF- α 抗体治疗炎症性肠病患者有效^[5-8]; (3)TNF- α 可引起其他细胞因子如IL-1, -6, -8, -12、CSF等增高, 这些细胞因子被证实参与了炎症性肠病的发生^[4,6]. TNF- α 引起肠黏膜屏障通透性增高的机制还不十分清楚, 与NF- κB 活化有关^[9], MLCK, MAPK, PKC等信号途径皆参与其调节^[10-16]. 最近越来越多的研究表明, TNF- α 可以增加肠上皮细胞细胞旁的通透性, 降低肠上皮细胞屏障的跨上皮电阻, 并认为这是TNF- α 引起肠黏膜屏障通透性增高的主要原因^[17-19]. 正常情况下肠上皮细胞细胞旁间隙是由连接复合体封

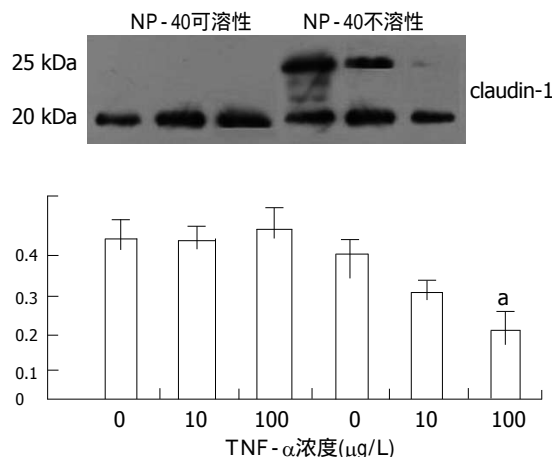


图2 各组Western blot结果. ^a $P < 0.05$ vs 对照组.

闭的, 其中最重要的是紧密连接(tight junction, TJ)^[20]. 紧密连接由多种紧密连接蛋白分子组成, 包括跨膜蛋白claudin-1、claudins、连接黏附分子(junctional adhesion molecule, JAM)和胞质附着蛋白Zos、AF6、7H6等. Claudin-1是最先分离出来的TJ跨膜蛋白, 分子量为20 kDa, 形成两个细胞外环和一个短的细胞内环. 相邻细胞间通过外环以“拉链”状结合产生细胞旁封闭. Claudin-1蛋白对于上皮细胞屏障功能的维持和紧密连接的完整性具有重要作用. 有研究表明, 用claudin-1转染L-纤维母细胞(缺乏TJ)后, 相邻细胞之间可以形成TJ样结构^[21]. 另外在MDCK(犬肾上皮)细胞中增加claudin-1表达可以增加上皮细胞的TEER^[22-23], 而在蟾蜍胚胎中, 转入缺乏完整结构的claudin-1片段可破坏屏障功能^[24]. 这提示claudin-1是TJ的主要功能蛋白, 参与屏障功能的调节. 因此我们推测TNF- α 是通过影响紧密连接蛋白的表达, 从而破坏紧密连接的完整性, 增加肠黏膜屏障的通透性. 为了验证这一假设, 我们检测了TNF- α 对TJ中最重要的跨膜蛋白claudin-1表达和定位的影响. 我们首先应用免疫荧光染色对claudin-1蛋白的定位进行研究. 正常情况下, claudin-1定位在细胞膜顶端, 交织成网状, 加入TNF- α 后, claudin-1由膜顶端向膜下转移, 表现为荧光信号呈锯齿状分布并有中断现象. 这说明TNF- α 可以引起claudin-1蛋白分布异常, 使其不能定位在紧密连接上发挥功能, 从而引起紧密连接的断裂. 这与Han和Sappington在Caco-2细胞中的研究结果相一致^[25-26]. Claudin-1存在磷酸化和非磷酸化两种形式, 磷酸化是其活性形式, 在ATP或钙转移实验中发现TJ的组装和高TEER的形成有赖

应用要点
本研究发现在体外培养肠上皮细胞, TNF- α 可以引起紧密连接蛋白claudin-1异常分布及磷酸化减少, 而对claudin-1 mRNA的表达没有影响, 为进一步深入研究TNF- α 损伤肠黏膜屏障的机制提供了基础.

名词解释

紧密连接存在于各类上皮细胞及血管内皮细胞间的顶端, 形成一个顶端闭锁结构且发挥“屏障”和“防御”功能, 以控制细胞间的通透性和保持细胞的极性。紧密连接由多种紧密连接蛋白组成, 包括 claudin, claudin-1 以及 Zo-1, Zo-2, Zo-3 等, 在不同的组织结构, 各种紧密连接蛋白的表达亦存在差别。

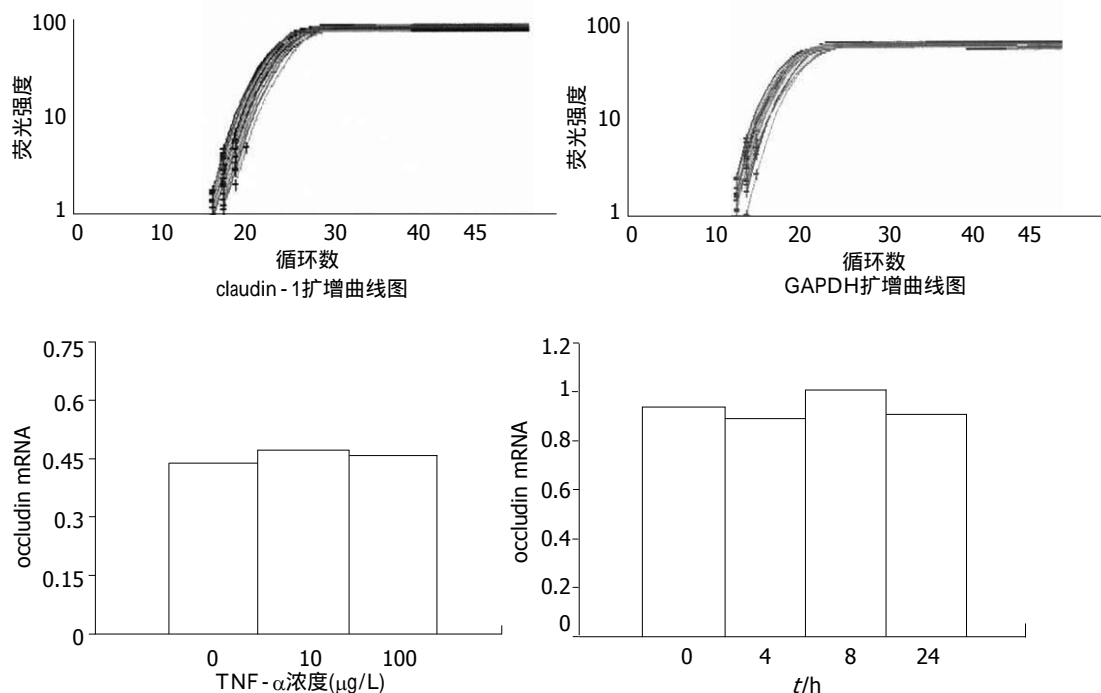


图3 各组实时定量PCR结果. 可见不同浓度的TNF- α 作用24 h或TNF- α 100 μ g/L作用不同时间后, claudin-1 mRNA的相对含量没有明显差异.

于claudin-1酪氨酸残基的磷酸化^[27]. 有研究表明磷酸化的claudin-1定位在TJ上, 而非磷酸化claudin-1沿膜的基底侧分布, 并且磷酸化会使claudin-1分子量上调并不溶于NP-40^[28]. 利用这一特性我们制备了NP-40可溶性和不溶性蛋白框架, 分别进行claudin-1蛋白杂交. 结果发现在NP-40可溶性蛋白框架内只存在一种蛋白, 分子量在20 kDa, TNF- α 不能影响其表达; 而在NP-40不溶性蛋白框架内存在两种蛋白, 一种为20 kDa的非磷酸化claudin-1蛋白, 一种为25 kDa的磷酸化claudin-1蛋白, TNF- α 可以下调后者的表达并具有浓度依赖性. 这也进一步解释了免疫荧光中TNF- α 为何会引起claudin-1蛋白的分布异常-是TNF- α 减少claudin-1蛋白磷酸化的结果. 在目前研究中, TNF- α 对claudin-1蛋白含量的影响存在不同结果, 有研究表明TNF- α 或细胞因子混合物(TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β)可以减少claudin-1蛋白的表达^[25-26], 也有研究认为TNF- α 对claudin-1蛋白总量没有影响^[29-30]. 我们实验中发现TNF- α 不影响claudin-1蛋白的总量, 但可以减少claudin-1蛋白的磷酸化, 这些结果上的差异可能与选择的细胞系及细胞因子的作用时间有关, 单一细胞因子及较短的作用时间(24 h)不引起claudin-1蛋白总量的改变. 有报道称TNF- α 可以下调肠上皮细胞HT-29/B6 claudin-1基因启动子的表达^[31-32], 提示claudin-1蛋白表达亦受转录

水平的调节, 因此我们应用实时定量PCR技术检测了TNF- α 对claudin-1 mRNA的影响, 结果表明无论哪种浓度的TNF- α 均不能引起claudin-1 mRNA水平的变化. 对于蛋白分子调控, 其转录水平的调节与蛋白水平的调节具有一定的时相性, 因此我们又检测了TNF- α 100 μ g/L作用不同时间(4, 8, 24 h)claudin-1 mRNA水平的变化, 同样没有发现任何阳性结果. 提示在Caco-2细胞中, TNF- α 对claudin-1的调节发生在蛋白水平, 而不是转录水平, 这一结果也与Western blot实验中claudin-1蛋白的总量没有变化相一致. 在本实验中, 我们证明TNF- α 可以减少紧密连接蛋白claudin-1磷酸化, 使其从紧密连接上解聚, 紧密连接断裂, 并认为这是TNF- α 增加肠上皮屏障通透性的作用靶点. 为进一步研究TNF- α 增加肠上皮细胞屏障通透性的分子机制提供基础.

4 参考文献

- 1 Ma TY. Intestinal epithelial barrier dysfunction in Crohn's disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214: 318-327
- 2 Suenart P, Bulteel V, Lemmens L, Noman M, Geypens B, Van Assche G, Geboes K, Ceuppens JL, Rutgeerts P. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2000-2004
- 3 Hopkins AM, Walsh SV, Verkade P, Boquet P, Nusrat A. Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and

- epithelial barrier function. *J Cell Sci* 2003; 116: 725-742
- 4 Van Deventer SJ. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 1997; 40: 443-448
- 5 Ricart E, Panaccione R, Loftus EV, Tremaine WJ, Sandborn WJ. Infliximab for Crohn's disease in clinical practice at the Mayo Clinic: the first 100 patients. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 722-729
- 6 Rutgeerts P, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Hanauer SB. Comparison of scheduled and episodic treatment strategies of infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 402-413
- 7 Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 1541-1549
- 8 Zeissig S, Bojarski C, Buergele N, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment. *Gut* 2004; 53: 1295-1302
- 9 Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G367-376
- 10 Wang F, Graham WV, Wang Y, Witkowski ED, Schwarz BT, Turner JR. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 2005; 166: 409-419
- 11 Patrick DM, Leone AK, Shellenberger JJ, Dudowicz KA, King JM. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma modulate epithelial barrier function in Madin-Darby canine kidney cells through mitogen activated protein kinase signaling. *BMC Physiol* 2006; 6: 2
- 12 Ye D, Ma I, Ma TY. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G496-504
- 13 Ma TY, Boivin MA, Ye D, Pedram A, Said HM. Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G422-430
- 14 Banan A, Zhang LJ, Shaikh M, Fields JZ, Farhadi A, Keshavarzian A. Theta-isoform of PKC is required for alterations in cytoskeletal dynamics and barrier permeability in intestinal epithelium: a novel function for PKC-theta. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; 287: C218-234
- 15 李晓芳. 严重烧伤后胃肠道功能障碍的机制和防治. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 888-893
- 16 武金宝, 王继德, 张亚历. 肠黏膜屏障研究进展. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 619-623
- 17 Gitter AH, Bendfeldt K, Schmitz H, Schulzke JD, Bentzel CJ, Fromm M. Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 915: 193-203
- 18 Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Eppler HJ, Riecken EO, Schulzke JD. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 1999; 112 (Pt 1): 137-146
- 19 Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003; 171: 6164-6172
- 20 秦环龙, 高志光. 肠上皮细胞紧密连接在肠屏障中的作用研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 443-447
- 21 Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to claudin-1. *J Cell Biol* 1998; 141: 1539-1550
- 22 McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, Furuse M, Tsukita S, Rogers RA, Lynch RD, Schneeberger EE. Claudin-1 is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci* 1996; 109 (Pt 9): 2287-2298
- 23 Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cerejido M, Matter K. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 1996; 134: 1031-1049
- 24 Chen Y, Merzdorf C, Paul DL, Goodenough DA. COOH terminus of claudin-1 is required for tight junction barrier function in early *Xenopus* embryos. *J Cell Biol* 1997; 138: 891-899
- 25 Han X, Fink MP, Delude RL. Proinflammatory cytokines cause NO^{*}-dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock* 2003; 19: 229-237
- 26 Sappington PL, Han X, Yang R, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction in endotoxemic mice and immunostimulated Caco-2 enterocytic monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 304: 464-476
- 27 Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, Jeanson B. Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with claudin-1 during tight junction formation in canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 1227-1237
- 28 Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of claudin-1 in tight junction formation. *J Cell Biol* 1997; 137: 1393-1401
- 29 Poritz LS, Garver KI, Tilberg AF, Koltun WA. Tumor necrosis factor alpha disrupts tight junction assembly. *J Surg Res* 2004; 116: 14-18
- 30 Quesnell RR, Erickson J, Schultz BD. Apical electrolyte concentration modulates barrier function and tight junction protein localization in bovine mammary epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C305-318
- 31 Mankertz J, Waller JS, Hillenbrand B, Tavalali S, Florian P, Schoneberg T, Fromm M, Schulzke JD. Gene expression of the tight junction protein claudin-1 includes differential splicing and alternative promoter usage. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 657-666
- 32 Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, Schulzke JD. Expression from the human claudin-1 promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci* 2000; 113 (Pt 11): 2085-2090

同行评价
TNF- α 是重要的炎性细胞因子, 在各种炎症疾病中起重要的作用, 近年来很多研究已经证实了他与肠黏膜屏障损伤有关. 本文利用分子生物学的方法在培养的肠上皮细胞上探讨了TNF- α 与紧密连接蛋白claudin-1表达的关系, 目的明确, 研究方法先进, 结果具有一定的创新性为临床防治消化道炎症性疾病提供了实验依据.

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

生长抑素类似物对大鼠急性胰腺炎PAP的影响

佟柏峰, 周昊昕, 邹小明, 彭海, 周文学, 杨维良

背景资料
近些年的研究发现, 胰腺炎相关蛋白在AP时大量合成、分泌, 而在正常胰腺及胰液中并不存在; 并且其与AP的发生、发展密切相关, 故他可作为AP的特异性诊断指标, 用于AP的治疗效果评价和预后判断。人工合成的生长抑素类似物已广泛用于临床治疗急性胰腺炎多年, 取得了一定的治疗效果, 但对其具体作用机制至今尚未完全阐明, 因此我们研究生长抑素类似物对PAP蛋白水平和基因表达的影响, 探讨生长抑素类似物和PAP之间的关系, 将有助于进一步揭示AP发病机制和指导临床对AP的治疗。

佟柏峰, 周昊昕, 邹小明, 彭海, 周文学, 杨维良, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086
佟柏峰, 2002年哈尔滨医科大学硕士毕业, 讲师, 参与国家课题猪胰岛移植和猪异种小肠移植等工作。
中华医学会胰腺外科科研项目基金(2005)
通讯作者: 邹小明, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外科。
电话: 0451-86605726
收稿日期: 2006-11-22 接受日期: 2007-01-31

Influence of somatostatin analogue on pancreatitis-associated protein in rats with acute pancreatitis

Bai-Feng Tong, Hao-Xin Zhou, Xiao-Ming Zou, Hai Peng, Wen-Xue Zhou, Wei-Liang Yang

Bai-Feng Tong, Hao-Xin Zhou, Xiao-Ming Zou, Hai Peng, Wen-Xue Zhou, Wei-Liang Yang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by the Pancreatic Surgery Research Foundation of Chinese Medical Association (2005)

Correspondence to: Xiao-Ming Zou, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Received: 2006-11-22 Accepted: 2007-01-31

Abstract

AIM: To investigate the influence of somatostatin analogue octreotide on the expression of pancreatitis-associated protein (PAP) and pathological changes in pancreas in rats with acute pancreatitis (AP). Then the level of serum PAP was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

METHODS: Eighty Wistar rats were randomized into group A, B, C and D, served as negative control group, sham operation group, AP model group and octreotide-treated group, respectively. The experimental samples were collected at the 6th and 12th hour in all the groups. The expression of PAP in pancreas was detected by semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry (IHC) after the AP tissues were

verified by pathological method. Then the level of serum PAP was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: IHC showed that the expression of PAP was significantly higher in group C than that in group B ($\chi^2 = 26.11$, $P < 0.01$), but it was markedly lower in group D than that in group C ($\chi^2 = 15.65$, $P < 0.05$). RT-PCR and ELISA demonstrated a significant PAP increase in tissue and serum in group C, but a notable decrease in group D, and there were significant differences between group B, C and D (RT-PCR: $F = 71.3$, $P < 0.01$; ELISA: $F = 925$, $P < 0.001$). PAP expression at the 6th and 12th hour had obvious difference in group C (IHC: $\chi^2 = 16.92$, $P < 0.05$; RT-PCR: $t = 2.49$, $P < 0.05$; ELISA: $t = 2.56$, $P < 0.05$), but not in the other groups (except the ELISA result). Dramatic pathological changes were observed in group C.

CONCLUSION: PAP highly expressed at the early stage of AP, and it is sensitive to the treatment of octreotide. PAP is also useful for the diagnosis and prognosis of acute pancreatitis.

Key Words: Somatostatin similarity; Acute pancreatitis; Pancreatitis-associated protein; Rat

Tong BF, Zhou HX, Zou XM, Peng H, Zhou WX, Yang WL. Influence of somatostatin analogue on pancreatitis-associated protein in rats with acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1794-1799

摘要

目的: 观察生长抑素类似物(奥曲肽)对实验性急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)胰腺炎相关蛋白(pancreatitis-associated protein, PAP)的表达及胰腺组织病理变化的影响。

方法: Wistar大鼠80只, 随机分为阴性对照组、假手术组、手术组、治疗组, 每组均在6、12 h采集标本。胰腺组织病理切片证实后, 对PAP进行半定量RT-PCR及免疫组化检测, 其血清做ELISA检测。

结果: 免疫组化结果显示, 手术组PAP表达比假手术组显著增强($\chi^2 = 26.11, P < 0.01$), 治疗组比手术组显著降低($\chi^2 = 15.65, P < 0.05$). RT-PCR及ELISA显示, PAP在手术后组织和血清中的表达明显升高, 经奥曲肽治疗后明显降低, 3组间有显著差异(RT-PCR: $F = 71.3, P < 0.01$; ELISA: $F = 925, P < 0.001$). 免疫组化、RT-PCR及ELISA结果组内比较显示, 手术组PAP表达随时间逐渐显著升高, 6, 12 h之间比较有显著差异($\chi^2 = 16.92, P < 0.05$; $t = 2.49, P < 0.05$; $t = 2.56, P < 0.05$), 而其他组(治疗组ELISA结果除外)6, 12 h之间无显著差异($P > 0.05$). 手术组病理改变明显.

结论: PAP是AP早期表达明显升高的蛋白, 对奥曲肽反应敏感, 对胰腺炎的诊断和预后判断有一定作用.

关键词: 生长抑素类似物; 急性胰腺炎; 胰腺炎相关蛋白; 大鼠

佟柏峰, 周昊昕, 邹小明, 彭海, 周文学, 杨维良. 生长抑素类似物对大鼠急性胰腺炎PAP的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1794-1799

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1794.asp>

0 引言

近些年的研究发现, 由于胰腺炎相关蛋白(pancreatitis-associated protein, PAP)在急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)时大量合成、分泌, 而在正常胰腺及胰液中并不存在; 并且其与AP的发生、发展密切相关, 故他可作为AP的特异性诊断指标, 并可用于AP的治疗效果评价和预后判断^[1-8]. 人工合成的生长抑素类似物已广泛用于临床治疗急性胰腺炎多年, 取得了一定的治疗效果^[9-16], 但对其具体作用机制至今也尚未完全阐明, 因此我们研究生长抑素类似物对PAP蛋白水平和基因表达的影响, 探讨生长抑素类似物和PAP之间的关系, 将有助于进一步揭示AP发病机制和指导临床对AP的治疗.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂健康成年Wistar大鼠80只, 体质量180-200 g, 由哈尔滨医科大学第二临床医学院实验动物中心提供, 适应性饲养1 wk后开始实验. 奥曲肽购自诺华公司. 牛磺胆酸钠(970 g/L)购自Sigma公司. 琼脂糖购自上海蓝季科技发展有限公司. TRIzol试剂为Invitrogen公司产品, RT试剂盒(A3500)购自Promega公司. PAP及 β -actin

引物由上海申能博彩生物科技有限公司合成, 引物序列(由Primer3软件设计)如下: PAP(目的片段长度为330 bp): 上游: 5'TGCTCTCCTGCCTGATGCTCTTAT3'; 下游: 5'TACTCCACTCCATCCACCTCCAT3'. β -actin(目的片段长度为452 bp): 上游: 5'GAGAGGGAAATCGTGCGTGAC3'; 下游: 5'CATCTGCTGGAAGGTGGACA3'. 小鼠抗大鼠PAP单克隆抗体购自美国R&D公司, 兔抗小鼠超敏试剂盒(UltraSensitive™ SP, 即用型)购自福州迈新生物技术有限公司, 操作按说明书进行. 大鼠PAP定量ELISA试剂盒购自美国Rapidbio公司.

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及标本采集 将实验动物随机分为4组, 分别为A组(阴性对照组)、B组(假手术组)、C组(手术组)、D组(治疗组), 每组20只. 各组内每10只分别于造模后6和12 h采集标本. 用100 mL/L水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠, 固定于无菌手术台, 消毒腹部皮肤, 正中切口进腹, 于十二指肠内侧可见片状分布的胰腺. 在近肝门端胆胰管用无损金属夹将其夹闭, 通过十二指肠侧壁用注射器针头穿入胆胰管, 细丝线活结结扎胆胰管和针头, 用WZS-50型微量注射泵(浙江大学仪器厂)以20 μ L/min速度逆行注射3.5 g/100 mL牛磺胆酸钠(1 mL/kg), 然后松开结扎线和金属夹, 两层连续缝合关闭腹腔^[17-18]. 假手术组于胆胰管逆行注射等剂量生理盐水, 手术组于术后30 min背部皮下注射奥曲肽(20 μ g/kg). 各组动物每10只分别于造模后6和12 h处死大鼠, 于下腔静脉采血后离心(3000 r/min), 保留血清, -20℃冻存备用. 完整切除胰腺组织, 部分于中性甲醛中固定, 另一部分立即至于-195℃液氮保存备用.

1.2.2 病理评估 每标本随机选取 $\times 100$ 视野30个, 每视野划分100个网络, 计算该区域正常与坏死胰腺组织所占网格数目及间质浸润炎症细胞数量. 坏死为丧失正常腺泡细胞结构及HE改变, 选取造模成功者进行下一步实验.

1.2.3 免疫组化检测 选取造模成功的标本按试剂盒说明, 采用DAB显色, 苏木素复染. 用推荐的阳性标本和磷酸盐缓冲液(PBS)代一抗分别做阳性和阴性对照. 高倍视野分4区各计数100个细胞, 求其平均数值. 阳性判断标准: 阳性细胞 $\leq 25\%$ 为+(弱阳性), 25%-50%为++(阳性), $\geq 50\%$ 为+++ (强阳性), 未见阳性染色为-(阴性).

1.2.4 胰腺总RNA的提取及RT-PCR 将保存于液

同行评价
文章有一定的可读性, PAP蛋白发现到现在已有20余年, 是否具有临床意义尚难评价, 但考虑国内外相关报道较少, 因此有一定价值.

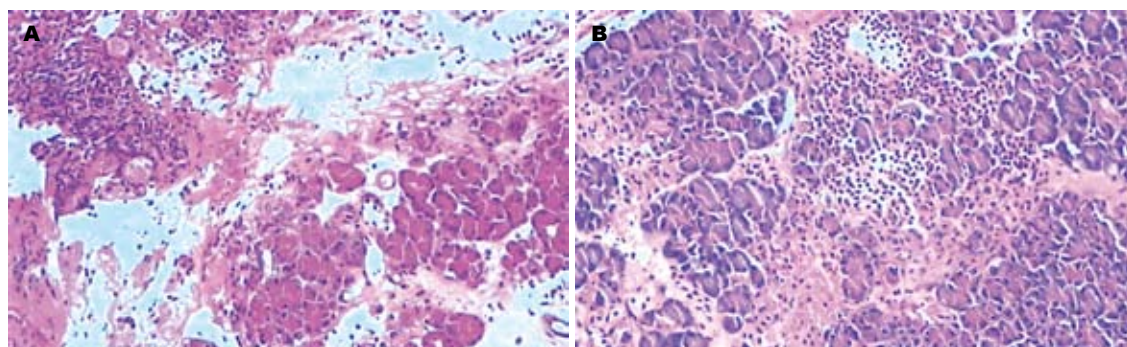


图1 造模后胰腺组织病理改变(HE染色). A: 6 h; B: 12 h.

氮中的胰腺组织研碎后加1 mL TRIzol试剂, 按试剂盒说明书提取RNA后至于-80℃保存. 采用紫外分光光度仪测定 A_{260}/A_{280} 比值为1.9, 按 $1A = 40 \text{ mg/L}$ 计算RNA含量. 逆转录反应: 按A3500试剂盒说明书进行反应, 将RNA逆转录为cDNA. PCR反应: 每0.2 mL Eppendorf管中加入 MgCl_2 (25 mmol/L) 2 μL , $10\times$ 反应缓冲液2.5 μL , dNTP(10 mmol/L) 0.5 μL , 上下游特异引物1 μL , Tag DNA聚合酶0.5 μL , 各实验样品(cDNA) 2 μL , 加入RNase Free dH_2O 15.5 μL , 补足25 μL 反应体系, 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 22 s, 后三步反应进行35个循环, 结束前72℃ 7 min以充分延伸, 产物置4℃保存.

1.2.5 PCR产物电泳及ELISA检测 PCR产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果, 以 β -actin为内参照, 结果以PCR产物/ β -actin比值表示. 按照试剂盒说明测定各组血清标本PAP含量.

统计学处理 所有数据以均数加减标准差(mean \pm SD)表示. 用 t 检验、 χ^2 检验、单因素方差分析及多个样本均数间的多重比较进行显著性检验, $P \leq 0.05$ 表示差异具有显著性.

2 结果

2.1 病理组织学改变 阴性对照组及假手术组胰腺无明显病理改变. 其余各组均可见胰腺组织出血成血块, 多叶成片坏死, 成堆炎细胞浸润, 或破坏原组织, 胰腺炎的炎症改变随时间延长病变明显加重, 相继有间质水肿、灶性出血、白细胞浸润、脂肪坏死、腺泡坏死、小脓肿、大出血等(图1).

2.2 免疫组化检测结果 A组及B组在胞质中呈阴性或极少有弱阳性表达. C组在胞质中呈较强棕黄色表达. D组介于两者之间. 与B组相比, C组PAP的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 26.11$,

$P < 0.01$, 图2A-B). 与C组相比, D组PAP的表达差异有统计学意义($\chi^2 = 15.65$, $P < 0.05$, 图2C-D). 另外, C组中12 h的PAP蛋白90%呈强阳性表达, 且颜色较深, 而6 h组中仅40%呈强阳性, 两者相比表达差异有统计学意义($\chi^2 = 16.92$, $P < 0.05$, 图2B-C). D组中6 h与12 h相比PAP的表达差异无统计学意义($\chi^2 = 9.91$, $P > 0.05$).

2.3 胰腺组织PAP基因在6及12 h的表达 阴性对照组未见PAP表达. B组、C组及D组的mRNA表达明显增强(图3), 3组之间差异具有显著性($F = 71.3$, $P < 0.01$, 表1). 各组AP 6与12 h相比较, B组与D组mRNA表达的差异不具有显著性(0.05 vs 0.06, $t = 0.82$, $P > 0.05$; 0.14 vs 0.16, $t = 1.33$, $P > 0.05$), C组PAP的表达差异具有显著性(0.32 vs 0.37, $t = 2.49$, $P < 0.05$).

2.4 血清中PAP的含量 阴性对照组血清中未能检测到PAP. B组中可检测少量PAP. C组及D组血中PAP的含量明显增加, 3组之间差异具有显著性($F = 925$, $P < 0.001$). 各组AP 6与12 h相比较, B组PAP含量差异不具有显著性(230 vs 243, $t = 1.21$, $P > 0.05$), C组、D组两时间点的PAP含量差异具有显著性(1378 vs 1606, $t = 2.56$, $P < 0.05$; 1294 vs 1399, $t = 2.78$, $P < 0.05$, 表2).

3 讨论

AP是以胰腺自身消化为基础, 胰腺实质坏死为主要特征的一种全身性疾病, 发病机制目前尚不完全清楚. 因其起病急、病情重、发展快、并发症多、病死率高而不断受到消化内外科医生以及基础医学学者们的重视. 而AP发病的不确定性一直困扰着他的临床诊断和处理. 目前, 该病诊断的“金标准”为高分辨率CT以及Ranson和APACHE II评分系统^[19]. 高分辨率CT在临床常规应用受到一定限制, 而评分系统不仅需要测定很多指标, 而且在症状发生后48 h

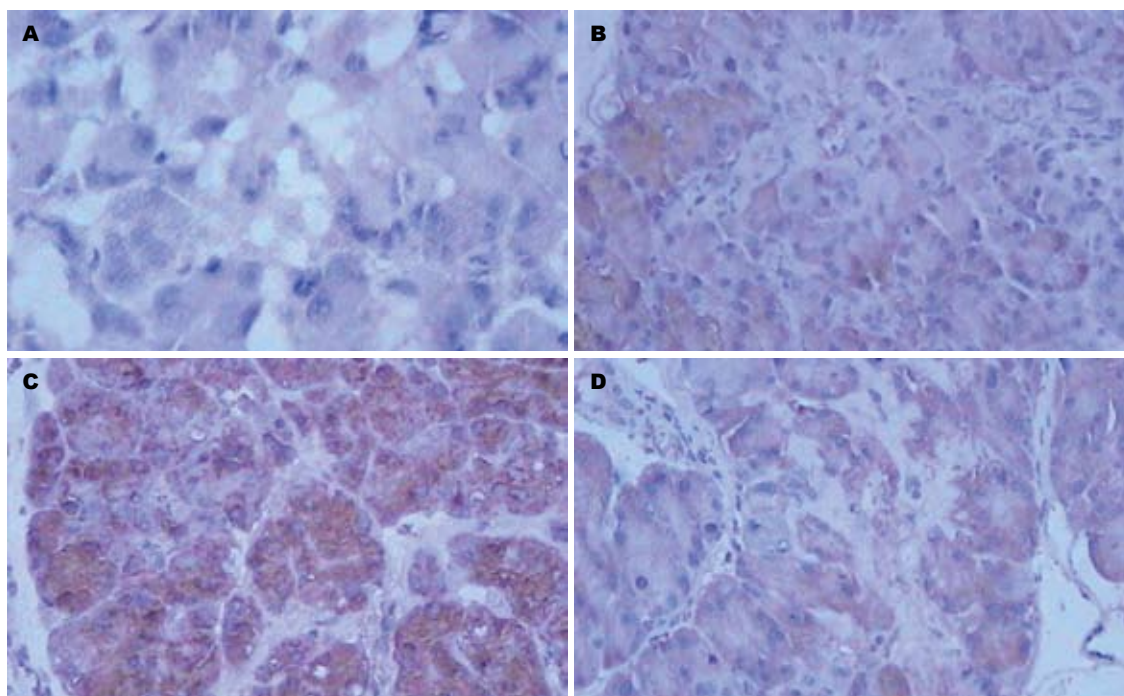


图 2 胞质中PAP免疫组化结果, 胞质棕黄色为阳性细胞(DAB染色, $\times 400$)。A: B组, 无黄染; B: C组6 h; C: C组12 h; D: D组12 h。

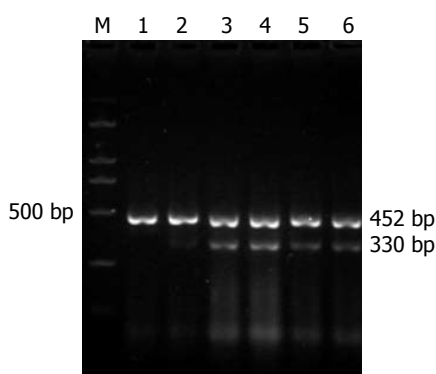


图 3 胰腺组织PAP基因在6及12 h的表达。上行为 β -actin, 下行为目的基因; M: marker; 1: 空白对照组; 2: 假手术12 h组; 3: 手术6 h组; 4: 手术12 h组; 5: 治疗6 h组; 6: 治疗12 h组。

才可判断。虽有重症监护和内外科积极处理, 但SAP的病死率仍在20%-40%。尽早明确诊断和积极干预对SAP的预后至关重要, 因此国内外医学界一直试图建立一种既有较高敏感性、特异性和准确性, 又简单易行的急诊SAP鉴别方法。

PAP是Keim *et al*^[20]在1984年发现的一种新的分泌型蛋白质。由于这种蛋白质仅发现于诱发AP模型的胰液中, 因此称为PAP。PAP在胰腺外分泌部腺泡细胞的粗面内质网合成, 并储存于酶原颗粒中。在正常胰腺及胰液中检测不出PAP, 仅在胰腺炎发生后, 尤其重症胰腺炎, 胰腺的酶蛋白基因表达迅速调整^[21], 许多编码胰腺酶蛋白的mRNA水平显著降低, 其中淀粉酶, 胰

表 1 胰腺组织PAP在6及12 h的表达

分组	6 h	12 h
A组(阴性对照组)	0	0
B组(假手术组)	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.03
C组(手术组)	0.32 ± 0.04^b	0.37 ± 0.05^{be}
D组(治疗组)	0.14 ± 0.03^d	0.16 ± 0.04^d

^b $P < 0.01$ vs B组; ^d $P < 0.01$ vs C组; ^e $P < 0.05$ vs C组中6 h。

表 2 血清中6及12 h的PAP水平(ng/L)

分组	6 h	12 h
A组(阴性对照组)	0	0
B组(假手术组)	230	243
C组(手术组)	1378^b	1606^{be}
D组(治疗组)	1294^d	1399^{dc}

^b $P < 0.01$ vs B组; ^c $P < 0.05$ vs D组中6 h; ^d $P < 0.01$ vs C组; ^e $P < 0.05$ vs C组中6 h。

蛋白酶原I, 糜蛋白酶原B, 弹力蛋白酶I, 前羧肽酶A等的mRNA水平在急性期降低了50%。相反, PAP mRNA表达明显升高, 本实验结果也证实了这一点。由于PAP基因在胰腺腺泡细胞中过表达, 在胰液及血清中都可检测到较高水平PAP。因此, PAP可望成为胰腺炎的一个特异性的早期诊断指标。病理研究发现PAP水平与胰腺炎的严

重程度密切相关^[22], 胰腺炎程度越高, PAP水平也就越高. 随着病情控制和患者逐渐恢复, 血清PAP水平开始不断下降^[23]. 因此, PAP可作为急性期胰腺炎轻重程度、病情预测的依据和病程追踪观察的血清指标. 近年来人工合成的生长抑素八肽拟似剂——奥曲肽, 广泛用于临床治疗AP, 取得了一定的治疗效果, 但对其具体作用机制至今尚未完全阐明. 目前, 较为公认的理论为奥曲肽通过直接和间接的抑制胰酶的释放和活化, 松弛Oddi's括约肌, 降低胰管压力, 减少胰管内胰液进入胰腺组织, 减轻由此引起的胰腺自身消化, 从而在AP的治疗中发挥重要作用^[24], 近年来, Hietaranta *et al*^[25]认为, 生长抑素可能通过抑制胰弹性蛋白酶的释放, 进而使TLR信号通路所调控的NF- κ B的表达降低, 从而下调了炎症细胞因子的基因表达, 这可能是生长抑素治疗胰腺炎的主要机制.

本实验结果证实, C组中随造模时间延长, PAP mRNA表达明显升高. 奥曲肽在各时间点都可明显降低PAP在胰腺组织中的基因表达. 这提示奥曲肽有可能也是通过TLR信号通路实现其对PAP的表达调控, 而应用PAP的优势在于他的特异性较炎症因子为强. 本实验从多个角度验证了随胰腺炎时间延长, PAP在基因水平、蛋白水平及外周血中表达明显增强, 应用奥曲肽治疗后, 从各个层次均可使PAP表达下降, 而D组中6与12 h相比PAP基因及蛋白的表达差异无统计学意义则提示在今后的实验中可将造模时间延长并增加给药次数以进一步观察有无变化.

虽然, PAP产生的确切机制目前尚不清楚, 但在AP时其增高的程度明显高于其他疾病却是不争的事实. 采用ELISA法, 免疫组化法和RT-PCR方法从蛋白水平和mRNA水平的检测均支持这一点. 对于PAP的功能, 尚处于探索中, Motoo *et al*^[26]研究发现通过诱导PAP mRNA的表达, 合成PAP而抑制胰腺腺泡细胞凋亡的发生, 而奥曲肽治疗AP的机制之一可能是诱导损伤的胰腺细胞凋亡以减轻炎症反应^[27], 故奥曲肽可能是通过抑制PAP mRNA的表达, 从而达到治疗胰腺炎的目的. 奥曲肽可直接作用于PAP并从各个层次降低其表达, 其机制尚未完全明了, 进一步研究其机制及PAP蛋白的功能将有助于揭示AP的病因, 指导AP患者的早期诊断和预后判断.

4 参考文献

- Bodeker H, Keim V, Fiedler F, Dagorn JC, Iovanna JL. PAP I interacts with itself, PAP II, PAP III, and lithostathine/regIalpha. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999; 2: 150-154
- Kiriyama S, Kumada T, Tanikawa M. Recent advances in biochemical diagnosis and assessment of severity in acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2035-2039
- Heller A, Fiedler F, Schmeck J, Luck V, Iovanna JL, Koch T. Pancreatitis-associated protein protects the lung from leukocyte-induced injury. *Anesthesiology* 1999; 91: 1408-1414
- Zhang H, Kandil E, Lin YY, Levi G, Zenilman ME. Targeted inhibition of gene expression of pancreatitis-associated proteins exacerbates the severity of acute pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 870-881
- Wang X, Wang B, Wu J. Pancreatitis-associated protein-I mRNA expression in mouse pancreas is upregulated by lipopolysaccharide independent of cerulein-pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 79-86
- Fiedler F, Croissant N, Rehbein C, Iovanna JL, Dagorn JC, van Ackern K, Keim V. Acute-phase response of the rat pancreas protects against further aggression with severe necrotizing pancreatitis. *Crit Care Med* 1998; 26: 887-894
- Gronborg M, Bunkenborg J, Kristiansen TZ, Jensen ON, Yeo CJ, Hruban RH, Maitra A, Goggins MG, Pandey A. Comprehensive proteomic analysis of human pancreatic juice. *J Proteome Res* 2004; 3: 1042-1055
- Schiesser M, Bimmler D, Frick TW, Graf R. Conformational changes of pancreatitis-associated protein (PAP) activated by trypsin lead to insoluble protein aggregates. *Pancreas* 2001; 22: 186-192
- Suga H, Tsuruta O, Okabe Y, Saitoh F, Noda T, Yoshida H, Ono N, Kinoshita H, Toyonaga A, Sata M. A case of mediastinal pancreatic pseudocyst successfully treated with somatostatin analogue. *Kurume Med J* 2005; 52: 161-164
- Manfredi R, Calza L, Chiodo F. A case-control study of HIV-associated pancreatic abnormalities during HAART era. Focus on emerging risk factors and specific management. *Eur J Med Res* 2004; 9: 537-544
- Takase K, Ueda T, Kuroda Y. New aspects of pharmacotherapy for acute pancreatitis. *Nippon Rinsho* 2004; 62: 2074-2078
- Yang YM, Tian XD, Zhuang Y, Wang WM, Wan YL, Huang YT. Risk factors of pancreatic leakage after pancreaticoduodenectomy. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2456-2461
- Jung DH, Hwang S, Lee SG. An analysis on the amount of excreted pancreatic juice after pancreatoduodenectomy. *Korean J Gastroenterol* 2004; 43: 309-315
- Rollins MD, Meyers RL. Frey procedure for surgical management of chronic pancreatitis in children. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 817-820
- Chebli JM, Gaburri PD, de Souza AF, Ornellas AT, Martins Junior EV, Chebli LA, Felga GE, Pinto JR. Internal pancreatic fistulas: proposal of a management algorithm based on a case series analysis. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: 795-800
- Kohsaki T, Nishimori I, Onishi S. Treatment of acute pancreatitis with protease inhibitor, H2 receptor antagonist and somatostatin analogue.

- Nippon Rinsho* 2004; 62: 2057-2062
- 17 施新岗, 李兆申, 贾一韬, 许永春, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 许国铭. 大鼠重症急性胰腺炎发病机制中p38丝裂原活化蛋白激酶的作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 653-656
- 18 黄晓丽, 刘顺英, 王国品, 曾皓明, 杨丽, 王智. 重症急性胰腺炎肺损伤内皮素的变化及丹参的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 853-857
- 19 吴在德, 吴肇汉. 外科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 601-603
- 20 Keim V, Rohr G, Stockert HG, Haberich FJ. An additional secretory protein in the rat pancreas. *Digestion* 1984; 29: 242-249
- 21 Iovanna JL, Keim V, Michel R, Dagorn JC. Pancreatic gene expression is altered during acute experimental pancreatitis in the rat. *Am J Physiol* 1991; 261: G485-489
- 22 Keim V, Willemer S, Iovanna JL, Adler G, Dagorn JC. Rat pancreatitis-associated protein is expressed in relation to severity of experimental pancreatitis. *Pancreas* 1994; 9: 606-612
- 23 Iovanna JL, Keim V, Nordback I, Montalto G, Camarena J, Letoublon C, Levy P, Berthezene P, Dagorn JC. Serum levels of pancreatitis-associated protein as indicators of the course of acute pancreatitis. Multicentric Study Group on Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 1994; 106: 728-734
- 24 李军成, 吴浩荣, 田斌. 重症急性胰腺炎外科治疗有关的认识进展. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 212-216
- 25 Hietaranta A, Mustonen H, Puolakkainen P, Haapiainen R, Kempainen E. Proinflammatory effects of pancreatic elastase are mediated through TLR4 and NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323: 192-196
- 26 Motoo Y, Taga K, Su SB, Xie MJ, Sawabu N. Arginine induces apoptosis and gene expression of pancreatitis-associated protein (PAP) in rat pancreatic acinar AR4-2J cells. *Pancreas* 2000; 20: 61-66
- 27 龚自华, 袁耀宗, 楼恺娴, 涂水平, 翟祖康, 徐家裕. 生长抑素类似物对急性胰腺炎时胰腺细胞凋亡的作用机制. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 964-966

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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 ESGAR 2007 18th Annual Meeting and Postgraduate Course
12-15 June 2007
Lisbon
fca@netvisao.pt

Meeting Falk Symposium 160: Pathogenesis and Clinical Practice in Gastroenterology
15-16 June 2007
Portoroz
symposia@falkfoundation.de

Meeting 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer
27-30 June 2007
Barcelona
meetings@imedex.com

Meeting ILTS 13th Annual International Congress
20-23 June 2007
Rio De Janeiro
www.ilt.org

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

OPN和Syndecan-1在原发性肝癌中的表达及与临床病理参数之间的相关性

刘秀峰, 施瑞华, 张国新, 王学浩, 郜恒骏, 秦叔逵

背景资料
原发性肝细胞肝癌(HCC)目前是世界上死亡率第3位的恶性肿瘤,在亚洲和非洲发病率很高,近年在欧美国家也呈上升趋势。尽管临床研究取得了较大进步,但其复发率仍然较高。OPN是一个有多种功能的分泌型钙结合磷酸化糖蛋白,在多种实体瘤中均有表达,目前该基因在HCC中的研究是热点课题。Syndecan-1属于黏附分子家族成员,研究发现其分子的表达在控制恶性肿瘤细胞生长和转移等过程中具有重要作用。本研究应用生物芯片上海国家工程中心的高通量肝病特异性组织芯片(478点阵),考察两者在HCC中的表达及与临床病理参数之间的相关性。

刘秀峰, 秦叔逵, 中国人民解放军第八一医院全军肿瘤中心内科 江苏省南京市 210002
施瑞华, 张国新, 南京医科大学第一附属医院消化内科 江苏省南京市 210029
王学浩, 南京医科大学第一附属医院普通外科 江苏省南京市 210029
郜恒骏, 生物芯片上海国家工程研究中心 上海市 201203
刘秀峰, 医学博士, 副主任医师, 主要从事生物芯片在原发性肝癌中的应用研究。
通讯作者: 施瑞华, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院消化内科。ruihuashi@126.com
电话: 025-83674636 传真: 025-83674636
收稿日期: 2006-12-19 接受日期: 2007-01-10

Study on the expression of Osteopontin and Syndecan-1 and their correlations with the clinical pathological characteristics of hepatocellular carcinoma by tissue microarray technique

Xiu-Feng Liu, Rui-Hua Shi, Guo-Xin Zhang, Xue-Hao Wang, Heng-Jun Gao, Shu-Kui Qin

Xiu-Feng Liu, Shu-Kui Qin, Cancer Center, the 81st Hospital of Chinese PLA, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Rui-Hua Shi, Guo-Xin Zhang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

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

Heng-Jun Gao, National Engineering Center for Biochip, Shanghai 201203, China

Correspondence to: Dr. Rui-Hua Shi, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. ruihuashi@126.com

Received: 2006-12-19 Accepted: 2007-01-10

Abstract

AIM: To explore the expression of osteopontin (OPN) and syndecan-1 as well as their correlations with the clinical pathological characteristics of hepatocellular carcinoma (HCC) by tissue microarray (TMA) technique, and analyze the potential mechanisms during the development and progression of HCC.

METHODS: The expression patterns of OPN and syndecan-1 proteins in HCC, liver cirrhosis (LC) and normal liver tissue (NLT) were investigated using high throughput TMA specified to HCC (478 spots, product batch No: OD-CT-DgLiv01-001) by SP method.

RESULTS: The positive rate of OPN in HCC was significantly higher than that in LC or NLT (73.3% vs 47.4%, 22.2%, both $P < 0.05$). Correspondingly, the positive rate of Syndecan-1 expression was significantly lower than that in LC or NLT (19.6% vs 35.0%, 90.0%, $P < 0.05$, $P < 0.01$). The results of single-factor analysis showed that OPN expression was correlated with the integrity of tumor membrane ($\chi^2 = 4.52$, $P < 0.05$), the formation of embolus in portal vein ($\chi^2 = 4.28$, $P < 0.05$) and metastases ($\chi^2 = 7.21$, $P < 0.05$). Syndecan-1 expression was correlated with the integrity of tumor membrane ($\chi^2 = 5.58$, $P < 0.01$), metastases ($\chi^2 = 3.37$, $P < 0.05$) and pathological grades ($\chi^2 = 4.35$, $P < 0.01$). Moreover, OPN was negatively correlated with syndecan-1 ($r = -0.439$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: TMA is a high-throughput platform by which molecular pathology of cancer can be studied effectively. Over-expression of OPN and down-regulation of syndecan-1 may be involved in the development and progression of HCC, suggesting that OPN may decrease the adhesiveness of tumor cells and promote the metastasis by down-regulating the expression of syndecan-1.

Key Words: Tissue microarray; Hepatocellular carcinoma; Osteopontin; Syndecan-1

Liu XF, Shi RH, Zhang GX, Wang XH, Gao HJ, Qin SK. Study on the expression of Osteopontin and Syndecan-1 and their correlations with the clinical pathological characteristics of hepatocellular carcinoma by tissue microarray technique. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1800-1805

摘要

目的: 应用组织芯片技术考察骨桥蛋白

(osteopontin, OPN)和Syndecan-1在原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中的表达及与临床病理参数之间的相关性, 分析两者在HCC发生发展过程中的可能机制。

方法: 应用S-P法对高通量肝癌组织芯片(478点阵, 产品批号: OD-CT-DgLiv01-001)进行染色, 检测OPN和Syndecan-1蛋白在肝癌、肝硬化和正常肝组织中的表达。

结果: OPN在HCC、肝硬化和正常肝组织中的阳性率分别为73.3%, 47.4%和22.2%, 差异具有显著性($P<0.05$, $P<0.05$); Syndecan-1在HCC、肝硬化和正常肝组织中的阳性率分别为19.6%, 35.0%和90%, 亦有显著性差异($P<0.05$, $P<0.01$)。单因素分析结果显示OPN的表达与肿瘤包膜的完整性($\chi^2 = 4.52$, $P<0.05$), 门静脉有无癌栓($\chi^2 = 4.28$, $P<0.05$)及肿瘤的转移相关($\chi^2 = 7.21$, $P<0.05$), 与其他临床病理特征没有相关性; Syndecan-1的表达与肿瘤有无包膜($\chi^2 = 5.58$, $P<0.01$), 病理分级($\chi^2 = 4.35$, $P<0.01$)以及肿瘤转移与否相关($\chi^2 = 3.37$, $P<0.05$), 与其他临床病理特征没有相关性。蛋白之间的相关性分析显示, OPN与Syndecan-1之间存在负相关($r = -0.439$, $P<0.01$)。

结论: 组织芯片是一种可高效率和高通量研究肿瘤分子病理的技术平台; HCC的发生发展与癌细胞OPN的过表达和Syndecan-1表达下调可能有关, OPN可能通过下调Syndecan-1的表达, 降低肿瘤细胞之间的黏附性, 从而促进肿瘤的转移。

关键词: 组织芯片; 肝细胞肝癌; 骨桥蛋白; Syndecan-1

刘秀峰, 施瑞华, 张国新, 王学浩, 郜恒骏, 秦叔逵. 应用组织芯片技术研究OPN和Syndecan-1在原发性肝癌中的表达及与临床病理参数之间的相关性. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1800-1805
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1800.asp>

0 引言

原发性肝细胞癌目前是世界上死亡率第3位的恶性肿瘤, 在亚洲和非洲发生率很高, 近年在欧美国家发病率呈上升趋势。尽管HCC的临床研究取得了较大进步, 但其复发率仍然较高。我们在前期应用基因芯片对HCC的差异基因表达谱进行筛选时, 发现osteopontin(OPN)和Syndecan-1基因分别出现了上调和下调表达。

OPN是一个有多种功能的分泌型钙结合磷

酸化糖蛋白, 在多种实体瘤中均有表达, 目前该基因在HCC中的研究是热点课题; Syndecan-1属于黏附分子家族成员, 研究发现其分子的表达在控制恶性肿瘤细胞生长和转移等过程中具有重要作用。本研究在基因芯片工作的基础上应用高通量肝癌特异性组织芯片(478点阵)(TMA), 考察两者在HCC中的表达及与临床病理参数之间的相关性。

1 材料和方法

1.1 免疫组化相关试剂和TMA OPN鼠抗人单克隆抗体系Santa Cruz公司产品, Syndecan-1鼠抗人单克隆抗体购自Ebioscience公司, SP染色试剂盒和DAB显色试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司, 一抗工作浓度均为1:100。以PBS代替一抗作为阴性对照。

高通量肝癌TMA(产品批号: OD-CT-DgLiv01-001)是芯超公司郜恒骏教授与上海市肿瘤研究所顾健人院士合作推出的最新产品。高通量-478个样本; 高质量-最新鲜的标本材料和最敏感的生物学活性; 高价值-203例肝细胞癌组织、18例肝硬化组织、10例正常肝组织和14例其他组织对照。每个点都经过病理诊断。

1.2 免疫组化染色方法 使用前将TMA从冰箱中取出放于玻片架上复温, 然后60℃左右烘烤3 h将表面封蜡融掉。然后置于二甲苯10 min, 无水乙醇5 min, 95%乙醇5 min, 70%乙醇5 min, 进行脱蜡水化。采用高压热修复法进行抗原热修复。S-P免疫组织化学染色参考试剂盒说明。

1.3 结果判断标准 观察阳性反应采用双盲法, 并由两位上海第二医科大学附属仁济医院的病理学专家独立观察TMA每个点阵的信息, 进行详细记录。免疫组化染色结果按0-3+进行记录, 计数胞质、胞膜和/或胞核阳性染色细胞所占比例。阴性为≤10%的肿瘤细胞染色, 10%-25%阳性记为1+, 26%-50%记为2+, 51%-75%记为3+, 76%-100%记为4+。

统计学处理 采用SPSS11.0软件包进行统计学处理, 相关蛋白与HCC临床病理指标之间的关系用 χ^2 检验; 蛋白之间在肿瘤组织中表达的相关性用Spearman进行相关性检验分析。检验水准以 $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 高通量肝癌TMA 图1所示为高通量肝癌

研发前沿
OPN在肺癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌以及前列腺癌等肿瘤中均有表达, 而与HCC预后的临床病理参数之间相关性的报道不多。有关Syndecan-1与HCC之间的相关性研究报道甚少, 可能的机制还不清楚。

相关报道

小样本研究显示, OPN与HCC有无浸润、肿瘤的大小、分期以及AFP的水平相关, OPN可能作为一个新的Tcf信号通路的下调因子直接促进肿瘤转移, 还可能通过诱导uPA和MMPs的水解作用或与VEGF共同刺激内皮细胞的迁移, 促进肿瘤新生血管的形成。另有研究报道, 在人类恶性肿瘤形成过程中, 肿瘤细胞表面Syndecan-1分子的表达可以缺失, 但与HCC的相关性鲜见报道。

TMA, 含478个样本, 其中包括203例肝细胞癌组织、18例肝硬化组织、10例正常肝组织和14例其他组织对照。

2.2 OPN蛋白在TMA上的染色结果 如图2所示, A表示TMA点阵全貌($\times 100$), B表示局部放大结果($\times 200$), 以下相同。OPN表达一般定位于HCC细胞的胞质, 少数肿瘤细胞胞膜和胞质同时阳性。而肝硬化组织中阳性着色细胞明显减少, 而正常肝组织几乎呈阴性。

2.3 Syndecan-1蛋白在TMA上的染色结果 如图3-4所示, Syndecan-1蛋白在HCC组织中基本不表达, 而在正常肝组织中呈明显阳性表达, 主要定位于细胞膜以及细胞与细胞之间的紧密连接。

2.4 OPN和Syndecan-1在TMA中的表达情况 OPN染色过程中, 在203例HCC样本中出现了8例脱片, 20例肝硬化组织和10例正常肝组织分别有1例脱片; Syndecan-1染色过程中, 在203例HCC样本中出现了4例脱片, 20例肝硬化组织和10例正常肝组织没有脱片发生。

如表1所示, OPN在HCC组织中的阳性率为73.3%, 与正常肝组织相比, 明显升高($P = 0.030$)。而肝硬化组织的染色阳性率为47.4%, 与HCC组织比较, 差异亦有显著性($P = 0.041$)。深入考察OPN与HCC临床病理特征之间的相关性, 如表2所示, OPN的表达与肿瘤包膜的完整性、门静脉有无癌栓以及肿瘤的转移与否有一定的相关性, 与其他临床病理特征没有相关性。Syndecan-1在HCC组织中的阳性率为19.6%, 正常肝组织的阳性率为90%, 而肝硬化组织的染色阳性率为35.0%, 与HCC组织比较, 均具有显著性差异。深入考察Syndecan-1与HCC临床病理特征之间的相关性, Syndecan-1的表达与肿瘤转移与否、病理分级以及肿瘤有无包膜有相关性, 与其他临床病理特征没有相关性。相关性检验分析发现OPN与Syndecan-1之间存在负相关($r = -0.439$, $P = 0.003$, 表3)。

3 讨论

TMA技术随基因芯片技术与功能基因组的发展应运而生, 与细胞芯片、蛋白芯片、抗体芯片一样, 属于一种特殊生物芯片技术。TMA技术可以将数十个甚至上千个不同个体的临床组织标本按预先设计的顺序排列在一张玻片上进行分析研究, 是一种高通量、多样本的基因功能分析工具。他使科研人员第1次有可能同时对几百甚至上千种正常或疾病以及疾病发展不同阶段

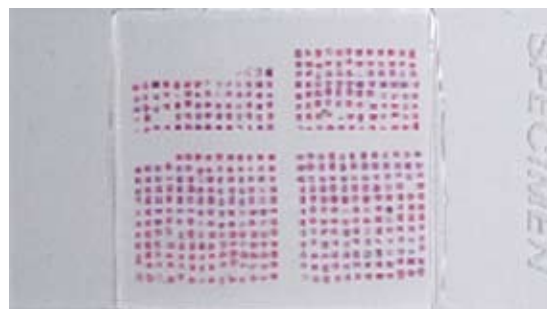


图1 高通量肝癌TMA。

表1 OPN、Syndecan-1在TMA上的表达情况

组织类型	OPN			Syndecan-1		
	n	阳性率(%)	P	n	阳性率(%)	P
HCC	195	143(73.3)		199	39(19.6)	
肝硬化	19	9(47.4)	0.041	20	7(35.0)	0.032
正常肝	9	2(22.2)	0.030	10	9(90.0)	0.001

的自然病理生理状态下的组织样本, 进行某一个或多个特定的基因, 或与其相关的表达产物的研究。这对人类基因组学的研究与发展, 尤其对基因和蛋白质与疾病关系的研究, 疾病相关基因的验证、新药物的开发与筛选、疾病的分子诊断, 治疗过程的追踪和预后等方面具有实际意义和广阔的市场前景^[1]。1998年Kononen *et al*^[2]首次应用TMA技术对6种基因在1000乳腺癌中的表达情况进行了研究, 揭开了TMA的研究序幕。

OPN是一种黏附蛋白, 又是一种细胞因子, 是一个有多种功能的分泌型钙结合磷酸化糖蛋白, 相对分子质量为41.5 kDa。编码他的单基因序列在脊椎动物中是高度保守的, 与许多细胞外基质(ECM)蛋白一样具有RGD(精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)细胞黏附序列^[3]。OPN的受体家族包括整合素受体和CD44受体^[4]。通过受体结合, 促进细胞的趋化、黏附和迁移, 参与骨的吸收, 也能与羟磷灰石结合参与骨的形成。

OPN在肺癌^[5]、乳腺癌^[6-8]、胃癌^[9]、前列腺癌^[10-11]以及卵巢癌^[12-13]等肿瘤中均有表达, 而应用TMA技术研究OPN与HCC相关性的报道不多。本研究在前期的基因芯片结果中, 发现OPN在HCC中的表达水平较癌旁组织上调了3.6293倍, 较正常肝组织上调了4.6367倍(结果未显示)。在蛋白水平的深入研究发现, 在HCC、肝硬化和正常肝组织中的阳性表达率分别是73.3%、47.4%和22.2%, 差异具有显著性。与临床病理参

创新盘点

本研究应用生物芯片上海国家工程中心的高通量肝癌特异性组织芯片(478点阵), 考察OPN和Syndecan-1在HCC中的表达及与临床病理参数之间的相关性, 目前国内外尚无如此大样本的研究。

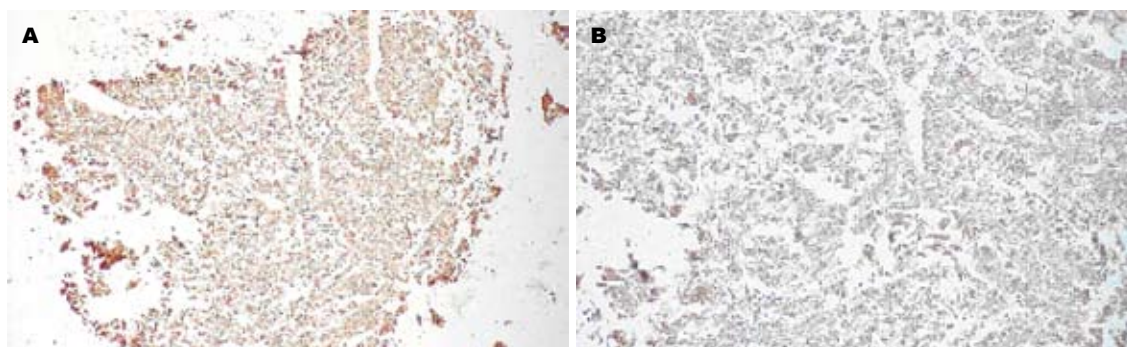


图 2 OPN蛋白在HCC组织中表达的IHC染色. A: TMA点阵全貌($\times 100$); B: 局部放大结果($\times 200$).

应用要点
研究发现, HCC的发生发展与癌细胞OPN的过表达和Syndecan-1表达下调可能有关, OPN可能通过下调Syndecan-1的表达, 降低肿瘤细胞之间的黏附性, 从而促进肿瘤的转移. OPN和Syndecan-1可能成为治疗HCC的药物靶点.

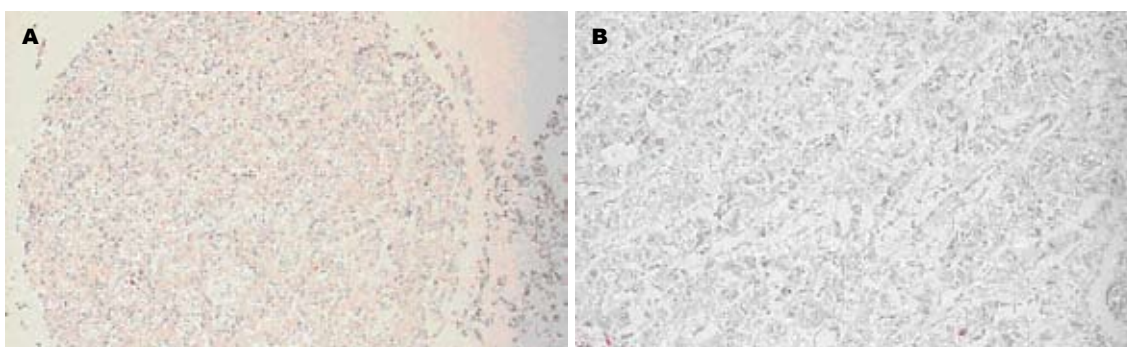


图 3 Syndecan-1蛋白在HCC组织中表达的IHC染色. A: TMA点阵全貌($\times 100$); B: 局部放大结果($\times 200$).

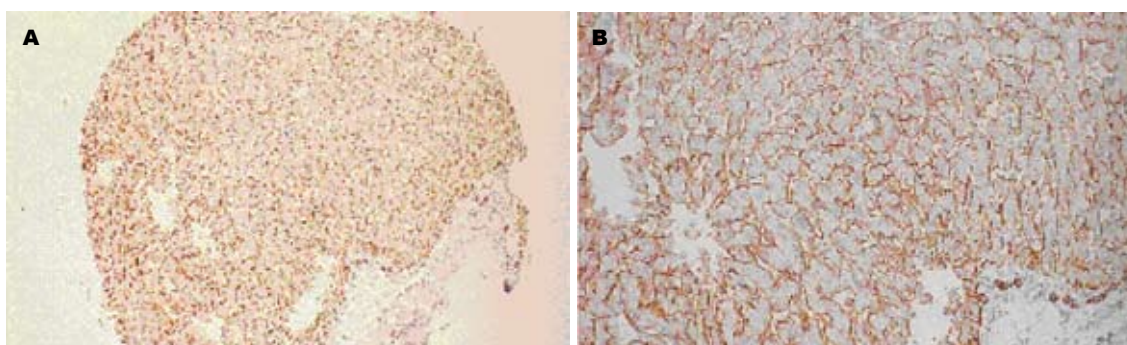


图 4 Syndecan-1蛋白在正常肝组织中表达的IHC染色. A: TMA点阵全貌($\times 100$); B: 局部放大结果($\times 200$).

数之间的相关性分析显示, OPN过表达与肿瘤包膜、门静脉癌栓和转移呈正相关. 蛋白之间的相关性分析发现, OPN与Syndecan-1之间呈负相关($r = -0.439$, $P = 0.003$), 提示OPN可能通过下调Syndecan-1的表达, 降低肿瘤细胞之间的黏附性, 从而促进肿瘤的转移. 目前OPN的受体CD44已经被用来作为各种肿瘤的治疗靶点, 整合素受体 $\alpha_v\beta_3$ 不仅对肿瘤细胞的弥散有作用, 而且对血管生成和骨转移的骨质溶解起作用. 因此, OPN和他的主要受体将成为治疗肿瘤新的药物靶点.

Syndecan-1(CD138)来自于希腊文*syndein*, 是指将细胞微环境成分与细胞骨架结合起来. 他属于黏附分子整合素跨膜黏连蛋白聚糖家

族成员, 通过其分子表面的硫酸肝素侧链可结合一系列配基如细胞黏附分子、基质成分、生长因子、酶和酶抑制物等, 以共受体方式调节细胞与微环境之间的相互作用, 参与组织器官分化发育、血管形成、组织再生等一系列生理过程的调节^[14]. 随着研究的深入, 人们发现Syndecan-1分子的表达在控制恶性肿瘤细胞生长和转移等过程中具有重要作用, 而且可作为判断肿瘤预后的指标, 指导临床诊断与治疗.

Syndecan-1分子属于I型跨膜蛋白, 含有N末端信号肽. 小鼠分子定位于12号染色体, 人则定位在第2号染色体(2p23), 基因全长含有5个外显子, 分别编码分子量为3.5 kD单链结构的核

名词解释

1 组织芯片(tissue microarray, TMA): 与细胞芯片、蛋白芯片、抗体芯片一样, 属于一种特殊生物芯片. TMA可以将数十个甚至上千个不同个体的临床组织标本按预先设计的顺序排列在一张玻片上进行分析研究, 是一种高通量、多样本的分析工具.

2 骨桥蛋白(OPN): 是一种黏附蛋白, 又是一种细胞因子, 是一个有多种功能的分泌型钙结合磷酸化糖蛋白, 相对分子质量为41.5 kD.

3 Syndecan-1: 他属于黏附分子整合素跨膜黏连蛋白聚糖家族成员, 通过其分子表面的硫酸肝素侧链可结合一系列配基如细胞黏附分子、基质成分、生长因子、酶和酶抑制物等, 以共受体方式调节细胞与微环境之间的相互作用, 参与组织器官分化发育、血管形成、组织再生等一系列生理过程的调节.

表 2 OPN、Syndecan-1与HCC临床病理特征之间的相关性

临床病理特征	OPN				Syndecan-1			
	<i>n</i>	阳性率(%)	χ^2	<i>P</i>	<i>n</i>	阳性率(%)	χ^2	<i>P</i>
年龄(岁)								
< 50	83	61(73.5)	0.336	0.910	86	17(19.8)	0.621	0.701
50	112	82(73.2)			113	22(19.5)		
性别								
男	101	72(71.3)	0.410	0.877	103	21(20.4)	0.710	0.696
女	94	71(75.5)			96	18(18.8)		
肿瘤直径								
< 5 cm	75	59(78.7)	0.424	0.760	76	16(21.1)	0.770	0.650
5 cm	120	84(70.0)			123	23(18.7)		
肿瘤数目								
单发	72	53(73.6)	0.330	0.915	74	13(17.6)	0.800	0.373
多发	123	90(73.2)			125	26(20.8)		
AFP(μ g/L)								
<400	96	74(77.1)	0.615	0.690	97	18(18.6)	0.744	0.670
400	99	69(69.7)			102	21(20.6)		
肿瘤包膜								
有	109	71(65.1)	4.520	0.037	109	11(10.1)	5.582	0.003
无	86	72(83.7)			90	28(31.1)		
门静脉癌栓								
有	133	111(83.5)	4.281	0.044	132	26(19.7)	0.620	0.723
无	62	32(51.6)			67	13(19.4)		
肿瘤转移								
有	87	80(92.0)	7.211	0.013	90	9(10.0)	3.373	0.015
无	108	63(58.3)			109	30(27.5)		
Child - Pugh								
A	67	47(70.1)	0.370	0.865	65	12(18.5)	1.010	0.086
B	61	45(73.8)			64	11(17.2)		
C	67	51(76.1)			70	16(22.9)		
病理分级								
	40	31(77.5)	0.436	0.751	44	18(40.9)	4.346	0.008
	92	65(70.7)			91	15(16.5)		
	63	47(74.6)			64	6(9.4)		
临床分期								
	59	41(69.5)	0.550	0.713	60	10(16.7)	0.757	0.654
	61	48(78.7)			67	14(20.9)		
	75	54(72.0)			72	15(20.8)		

心蛋白. 在人类恶性肿瘤形成过程中, 肿瘤细胞表面Syndecan-1分子的表达可以缺失. 如头颈部及肺部鳞状上皮癌细胞Syndecan-1分子的表达水平降低, 并与肿瘤恶性程度、瘤体积、淋巴结肿大、临床分期及预后呈负相关. 乳腺浸润性导管癌细胞较之正常乳房导管上皮细胞, Syndecan-1表达明显减少, 而周围结缔组织和基质细胞表面Syndecan-1分子表达增加. 皮肤鳞状细胞癌Syndecan-1表达缺失, 伴随鳞状细胞失黏附增加, 从而促进肿瘤细胞侵入皮肤^[15].

目前有关Syndecan-1与HCC之间的相关性研究报道很少, 可能的机制还不清楚. 我们应用TMA技术分析Syndecan-1在HCC组织中的表达情况, 结果发现Syndecan-1主要定位于细胞膜上, 在HCC中的阳性率为19.6%, 正常肝组织的阳性率为90%, 而肝硬化组织的染色阳性率为35.0%, 与HCC组织比较, 均具有显著性差异. 深入考察Syndecan-1与HCC临床病理特征之间的相关性, 发现Syndecan-1的表达与肿瘤转移与否、病理分级以及肿瘤有无包膜有相关性, 与其他临床

表 3 OPN与Syndecan-1在HCC中的表达相关性

OPN	Syndecan-1				
	-	+	++	+++	++++
-	52	14	7	3	0
+	20	12	2	1	0
++	28	10	7	0	0
+++	49	5	2	0	0
++++	34	0	0	0	0

$P = 0.003(r = -0.439)$.

病理特征没有相关性. 提示肝癌细胞Syndecan-1分子表达下降或缺失是肝癌细胞具有高度转移性的一个特征, 是肝癌细胞的转移抑制因子. 由于Syndecan-1分子能与碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)结合^[16], 故肿瘤基质Syndecan-1分子的积聚有助于血管形成和基质增生. 因此, HCC细胞表面Syndecan-1分子表达的缺失和基质细胞高表达Syndecan-1, 是促进HCC转移的关键.

TMA是一个令人兴奋、功能强大的研究工具, 具有高通量、大样本、省时快速、简便经济、用途广泛、结果可靠、便于设计实验对照、可进行自动化研究等优点. 利用这一技术可以使疾病的分子诊断、预后和治疗等相关领域的大规模研究和开发成为可能. 但TMA仍以手工制作和人工判断和读片为主, 所以自动化制备技术的发展无疑十分重要, 这些技术目前仍在研发之中^[1]. TMA的应用领域十分广阔并正在进一步拓展, 相信这一技术在后基因组学、蛋白质组学、药物基因组学、生物信息学等相关领域将发挥越来越重要的作用.

4 参考文献

- 1 Shergill IS, Shergill NK, Arya M, Patel HR. Tissue microarrays: a current medical research tool. *Curr Med Res Opin* 2004; 20: 707-712
- 2 Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 1998; 4: 844-847
- 3 Denhardt DT, Giachelli CM, Rittling SR. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 723-749
- 4 Sodek J, Zhu B, Huynh MH, Brown TJ, Ringuette M. Novel functions of the matricellular proteins osteopontin and osteonectin/SPARC. *Connect Tissue Res* 2002; 43: 308-319
- 5 Zhang J, Takahashi K, Takahashi F, Shimizu K, Ohshita F, Kameda Y, Maeda K, Nishio K, Fukuchi Y. Differential osteopontin expression in lung cancer. *Cancer Lett* 2001; 171: 215-222
- 6 Urquidí V, Sloan D, Kawai K, Agarwal D, Woodman AC, Tarin D, Goodison S. Contrasting expression of thrombospondin-1 and osteopontin correlates with absence or presence of metastatic phenotype in an isogenic model of spontaneous human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 61-74
- 7 Reinholz MM, Iturria SJ, Ingle JN, Roche PC. Differential gene expression of TGF-beta family members and osteopontin in breast tumor tissue: analysis by real-time quantitative PCR. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 74: 255-269
- 8 Tuck AB, Chambers AF. The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6: 419-429
- 9 张东涛, 袁静, 杨力, 郭新宁, 郝志明, 韩者艺, 吴开春, 樊代明. 骨桥蛋白在胃癌中的表达及与胃癌侵袭转移的关系. *中华肿瘤杂志* 2005; 27: 167-169
- 10 Tozawa K, Yamada Y, Kawai N, Okamura T, Ueda K, Kohri K. Osteopontin expression in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. *Urol Int* 1999; 62: 155-158
- 11 Angelucci A, Festuccia C, D'Andrea G, Teti A, Bologna M. Osteopontin modulates prostate carcinoma invasive capacity through RGD-dependent upregulation of plasminogen activators. *Biol Chem* 2002; 383: 229-234
- 12 Kim JH, Skates SJ, Ueda T, Wong KK, Schorge JO, Feltmate CM, Berkowitz RS, Cramer DW, Mok SC. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA* 2002; 287: 1671-1679
- 13 Tiniakos DG, Yu H, Liapis H. Osteopontin expression in ovarian carcinomas and tumors of low malignant potential (LMP). *Hum Pathol* 1998; 29: 1250-1254
- 14 Lopes CC, Dietrich CP, Nader HB. Specific structural features of syndecans and heparan sulfate chains are needed for cell signaling. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 157-167
- 15 李新燕, 张学光. Syndecan-1分子研究进展. *国外医学分子生物学分册* 2001; 23: 30-33
- 16 Li HG, Xie DR, Shen XM, Li HH, Zeng H, Zeng YJ. Clinicopathological significance of expression of paxillin, syndecan-1 and EMMPRIN in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1445-1451

同行评价
本文选题新颖, 研究方案设计合理, 文笔流畅, 是一篇较好的基础研究文章.

电编 郭海丽 编辑 张焕兰

PARP-1抑制剂PJ34对人肝癌细胞株HepG2的抑制作用

周欣, 黄志勇, 陈孝平, 黄胜辉

背景资料
PARP-1是存在于真核细胞中催化聚ADP核糖化的细胞核酶, 他参与的聚ADP核糖化是真核细胞中蛋白质翻译后的重要修饰方法之一, 在DNA修复、细胞凋亡和肿瘤发生过程中发挥着至关重要的作用。

周欣, 黄志勇, 陈孝平, 黄胜辉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心 湖北省武汉市 430030
教育部新世纪优秀人才支持计划项目资助, No.NCET-04-0701
通讯作者: 黄志勇, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心. zyhuang@medmail.com.cn
电话: 027-83663871 传真: 027-83663400
收稿日期: 2007-02-26 接受日期: 2007-03-31

Suppressive effect of poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor PJ34 on human hepatoma cell line HepG2

Xin Zhou, Zhi-Yong Huang, Xiao-Ping Chen, Sheng-Hui Huang

Xin Zhou, Zhi-Yong Huang, Xiao-Ping Chen, Sheng-Hui Huang, Hepatic Surgical Center, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Supported by New Century Excellent Talent Program of Education Ministry, No. NCET-04-0701

Correspondence to: Zhi-Yong Huang, Hepatic Surgical Center, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 1095 Jiefang Road, Wuhan 430030, Hubei Province, China. zyhuang@medmail.com.cn

Received: 2007-02-26 Accepted: 2007-03-31

Abstract

AIM: To evaluate the inhibitory effect and its mechanism of poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, PJ34, on the growth of human hepatoma cell line, and investigate whether PJ34 can further enhance the suppression of γ -rays on HepG2 cell growth.

METHODS: Cell proliferation test was conducted to observe the effects of various concentrations of PJ34 or PJ34 in combination with γ -rays on the growth of HepG2 cells. Flow cytometry was used to examine the apoptosis rate in the PJ34-treated HepG2 cells.

RESULTS: PJ34 significantly suppressed the growth of HepG2 cells ($t = 15.175$, $P < 0.01$). The suppressive effects were enhanced with the increase of PJ34 concentration. 1Gy γ -rays also

significantly inhibited HepG2 cell growth, but there was no significant difference in cell growth between the group with γ -rays or PJ34 alone and the group with combination ($t = -1.413$, $P > 0.05$) PJ34 induced apoptosis of HepG2 cells, and the apoptosis rate of PJ34-treated cells was significantly higher than that of the control cells at 72 hours (33.2% vs 11.4%, $P < 0.01$).

CONCLUSION: PARP-1 inhibitor PJ34 can directly inhibit the cell growth of HepG2 cells through inducing cell apoptosis. However, PJ34 does not significantly increase the inhibitory effects of γ -rays on HepG2 cells.

Key Words: Poly (ADP-ribose) polymerase-1; PJ34; Hepatoma; HepG2 cell line; Growth suppression; Flow cytometry

Zhou X, Huang ZY, Chen XP, Huang SH. Suppressive effect of poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor PJ34 on human hepatoma cell lines HepG2. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(16):1806-1809

摘要

目的: 研究聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1 (PARP-1) 抑制剂PJ34对人肝癌细胞株HepG2增殖的影响及其作用机制, 以及PJ34是否进一步增强 γ 射线对肝癌细胞的增殖抑制作用。

方法: 细胞增殖实验观察不同浓度的PJ34, 以及PJ34合并 γ 射线照射对HepG2细胞增殖的影响, 流式细胞仪检测PJ34对HepG2细胞凋亡的影响。

结果: PJ34对HepG2细胞的增殖有显著的抑制作用($t = 15.175$, $P < 0.01$)。随着PJ34浓度的增加, 其抑制作用进一步增强。1Gy的 γ 射线照射对HepG2细胞的增殖有明显抑制作用, 但 γ 射线照射联合PJ34与单用PJ34或 γ 射线照射对肝癌细胞的增殖抑制作用相比较无明显统计学差异($t = -1.413$, $P > 0.05$)。PJ34能诱导HepG2细胞凋亡, 72 h时凋亡率明显高于对照组, 二者有显著性差异(33.2% vs 11.4%, $P < 0.01$)。

结论: PARP-1抑制剂PJ34通过诱导HepG2细胞凋亡抑制人肝癌细胞的增殖; PJ34并不显著增加 γ 射线对HepG2细胞增殖的抑制作用。

关键词: 聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1; PJ34; 肝癌; HepG2细胞; 增殖抑制; 流式细胞仪

周欣, 黄志勇, 陈孝平, 黄胜辉. PARP-1抑制剂PJ34对人肝癌细胞株HepG2的抑制作用. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1806-1809

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1806.asp>

0 引言

肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 其手术切除率低, 易复发和转移, 目前尚无有效的药物治疗, 预后差. 因此, 寻找新的有效的药物, 对肝癌的治疗具有重要的意义. PJ34[*N*-(6-oxo-5, 6-dihydrophenanthridin-2-yl)-*N*, *N*-dimethylacetamide. HCl]是选择性PARP-1抑制剂, 能有效的抑制PARP-1活性. 在PARP-1活性增高的肿瘤中, 选择性抑制PARP-1活性, 能抑制恶性黑色素瘤、中枢神经系统肿瘤、乳腺癌等恶性肿瘤的生长^[1-3]. 我们在前期研究中发现, 人肝癌组织及肝癌细胞株HepG2中PARP-1的表达增高^[4], 因此抑制PARP-1活性可能达到治疗肝癌的目的. 本研究选择人肝癌细胞株HepG2首先在体外研究PARP-1抑制剂PJ34对HepG2细胞的抑制作用.

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2细胞株为华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科实验室提供. 用含100 mL/L的胎牛血清的DMEM培养液于37°C、50 mL/L CO₂培养箱培养. PJ34购自美国Inotek Pharmaceutical公司.

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖实验 将对数生长期的HepG2细胞消化后制成单细胞悬液, 并计数. 将 5×10^4 个细胞置于直径为6 cm的培养皿中培养, 分为空白对照组和实验组, 每组9个培养皿. 实验组HepG2细胞以分别含0.5, 1.0, 2.0 mg/L的PJ34的DMEM培养液培养, 空白对照组以常规DMEM培养液培养. γ 射线照射剂量为1Gy, 细胞种植贴壁后的次日开始第一次照射, 细胞每3天更换培养液1次, 每次换液后的次日照射1次, 共照射3次. 对照组与实验组同时换液, 但不接受照射. 实验组和对照组的细胞分别于培养3, 6和9 d后计数, 每次计

数3个培养皿, 取平均值.

1.2.2 细胞凋亡的测定 将HepG2细胞植入6孔培养板中, 以100 mL/L的胎牛血清的DMEM培养液培养, 待细胞增殖至对数生长期, 实验组HepG2细胞中加入终浓度为1.0 mg/L的PJ34溶液培养细胞, 而对照组细胞在不含PJ34的培养液中培养, 分别于培养后12, 24, 48, 72 h收集细胞, 用PBS溶液洗涤、离心后, 冰乙醇固定, 离心去乙醇, 加入碘化丙啶(PI)染液(含RNase)过夜. 采用PI染色法, 在FACSort流式细胞仪(美国)下分析DNA含量.

统计学处理 采用配对 t 检验分析PJ34对HepG2细胞增殖的影响和 χ^2 检验分析PJ34对HepG2细胞凋亡的影响, 应用SPSS12.0统计软件对实验结果进行统计学处理.

2 结果

2.1 PJ34对HepG2细胞增殖的影响 当PJ34浓度为0.5 mg/L, 与对照组相比, HepG2细胞在给予PJ34培养第6天时开始出现增殖明显减慢, 至第9天, 增殖抑制达到高峰, 与空白对照组相比较有明显的差异($t = 15.175$, $P < 0.01$, 图1A). 当PJ34的浓度增加至1 mg/L和2 mg/L时, 同样观察到PJ34对HepG2细胞的增殖抑制作用(图1B-C), 且PJ34对HepG2的增殖抑制作用随着PJ34浓度升高而进一步增强, 0.5, 1和2 mg/L浓度PJ34培养HepG2于培养第9天计数的细胞平均数呈递减趋势(图2). 当以剂量为1Gy的 γ 射线照射HepG2细胞时, HepG2细胞的增殖明显受抑, 但 γ 射线照射联合不同浓度的PJ34培养对HepG2细胞的抑制作用与单用PJ34或 γ 射线照射对HepG2细胞的增殖抑制作用比较无显著统计学差异($t = -1.413$, $P > 0.05$).

2.2 PJ34对HepG2细胞凋亡的影响 对1 mg/L PJ34培养的HepG2细胞和不含PJ34培养的对照组细胞于培养后12, 24, 48和72 h行流式细胞仪检测, 结果显示, 含1 mg/L PJ34培养的HepG2细胞在培养后第12, 24, 48, 72小时, 其细胞凋亡率逐渐增高, 于72 h时凋亡率达到33.2%, 而对照组细胞72 h时凋亡率为11.4%, 二者有显著性差异($P < 0.01$, 图3A-B). 其空白对照组的细胞凋亡率随着时间的延长稍有升高, 这可能与培养过程中自然凋亡细胞的积累有关.

3 讨论

聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1[poly(ADP-ribose)

创新盘点
本研究揭示PARP-1抑制剂PJ34能够对肝癌细胞株HepG2细胞的增殖产生明显的抑制作用, 且有明显的量效关系. 通过抑制PARP-1活性对肝癌可能具有潜在治疗价值, 并可能成为肝癌治疗的新方法.

名词解释

1 PARP-1: 聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶-1[poly(ADP-ribose) polymerase-1]是存在于真核细胞中催化聚ADP核糖化的细胞核酶,他在DNA修复和细胞凋亡中发挥至关重要的作用. PARP-1的缺失使细胞对DNA损伤因子易感,可能与某些肿瘤的发生有关.

2 PJ34: [N-(6-oxo-5,6-dihydrophenanthridin-2-yl)-N,N-dimethylacetamide.HCl]是选择性PARP-1抑制剂,能有效的抑制PARP-1活性.

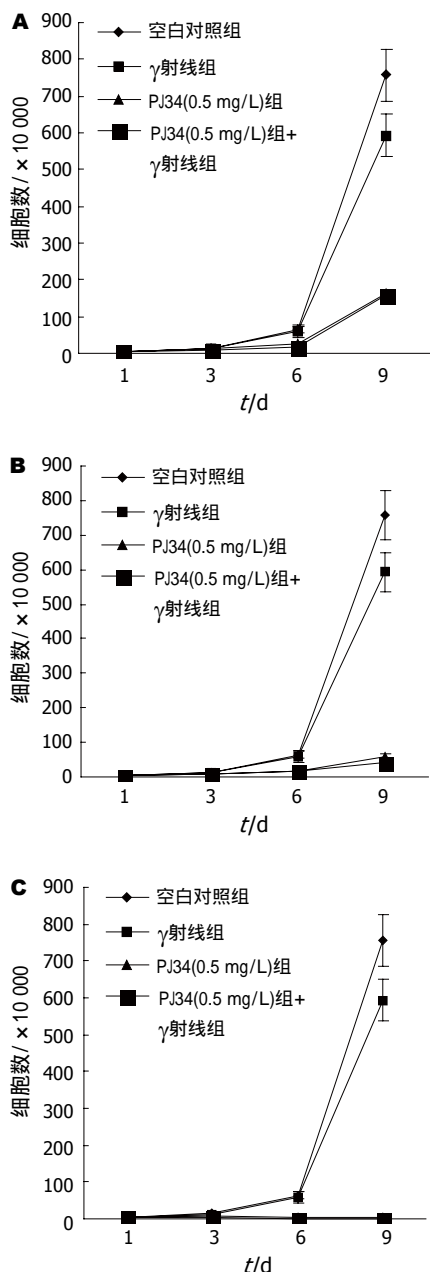


图1 不同浓度PJ34以及PJ34合并 γ 射线照射对HepG2细胞增殖的抑制作用. A: 0.5 mg/L PJ34对细胞增殖的影响; B: 1 mg/L PJ34对细胞增殖的影响; C: 2 mg/L PJ34对细胞增殖的影响.

polymerase-1, PARP-1]是存在于真核细胞中催化聚ADP核糖化的细胞核酶,他在DNA修复和细胞凋亡中发挥至关重要的作用. PARP-1的缺失使细胞对DNA损伤因子易感,可能与某些肿瘤的发生有关^[5],同时,抑制PARP-1可能减少DNA修复,增强肿瘤的放疗或化疗效果^[6]. Nozaki *et al*^[7]通过破坏PARP外显子1产生PARP-1^{-/-}小鼠,给予氧化偶氮甲烷(AOM)后PARP-1^{-/-}小鼠结肠腺瘤和腺癌、肝脏结节发生率均明显高于PARP^{+/+}组,提示PARP-1缺失与结肠肿瘤的发

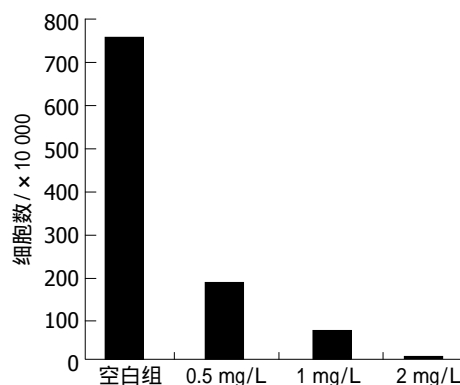


图2 不同浓度的PJ34培养HepG2细胞9 d时的细胞计数.

生有关. 而Nomura *et al*^[8]利用P32标记NAD后多聚ADP核糖基化的蛋白凝胶电泳发现,肝癌组织中116 kDa蛋白条带明显高于邻近非肿瘤组织,提示PARP-1在肝癌组织中可能高表达. 我们最近的研究表明,人肝癌组织中PARP-1的表达明显高于其癌周肝组织^[4]. 虽然我们对PARP-1在肝癌中高表达的意义并不完全清楚,推测可能与乙肝病毒感染和化学致癌剂产生的DNA损伤诱导机体启动DNA损伤修复机制有关. 因此,抑制PARP-1,阻止肝癌中PARP-1介导的DNA损伤修复机制,则可使已损伤的DNA得不到修复,从而对肝癌细胞的增殖产生抑制作用,并可能增强放、化疗对肝癌细胞DNA损伤,进一步提高放、化疗对肝癌的抑制作用.

我们的研究发现,PARP-1抑制剂PJ34能够对肝癌细胞株HepG2细胞的增殖产生明显的抑制作用,且有明显的量效关系. PJ34虽然能一定程度增强 γ 射线照射对HepG2的增殖抑制作用,但联合应用PJ34和 γ 射线照射对HepG2细胞的抑制作用与单用PJ34或单纯 γ 射线照射相比较无统计学差异. 这可能与单用PJ34本身已对HepG2细胞的增殖产生了显著的抑制,致使对 γ 射线对HepG2细胞的抑制作用的增强效果不再显著有关. 对PARP-1抑制剂诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制的已在对乳腺癌的治疗有研究报道^[9],即半胱-天冬蛋白酶Casepase7和Casepase3可以通过识别PARP-1核定位信号(NLS)的DEVD模序,促使DNA结合域与催化域分离导致PARP-1分裂成p89和p24两个片段,后者可不可逆结合于DNA断端,抑制PARP-1与DNA断端结合能力,导致PARP-1损伤修复作用丧失,诱发凋亡^[10]. 我们的研究还表明,给予PJ34培养的HepG2细胞72 h时凋亡率明显增高,其凋亡率与空白组有显著性差异,证明PJ34同样能显著诱导肝癌细胞株

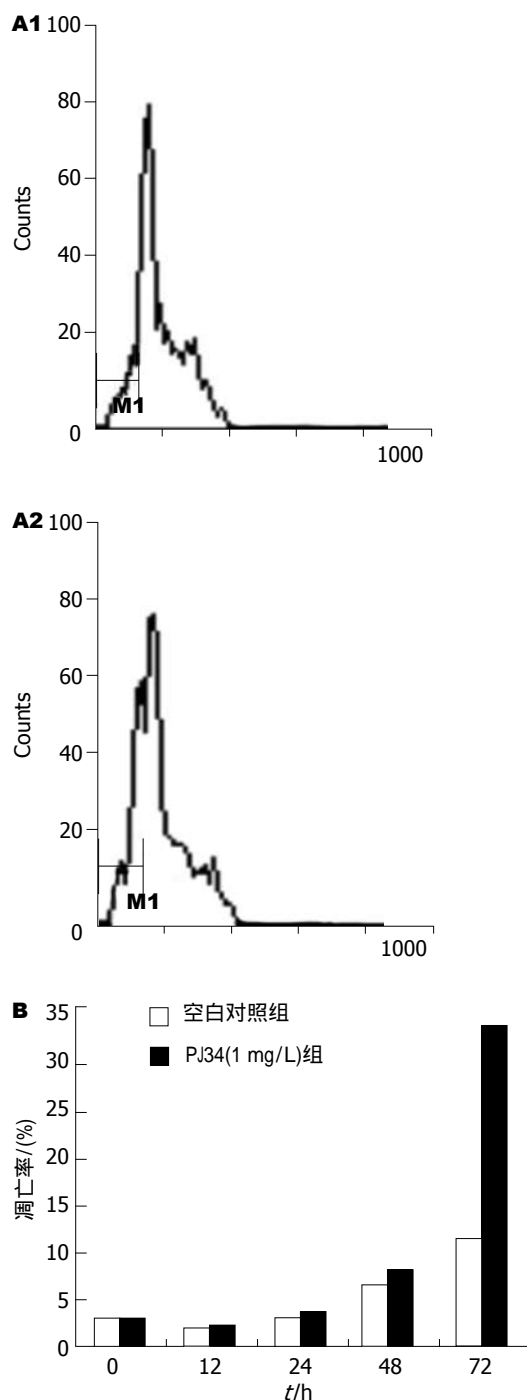


图 3 72 h后PJ34诱导HepG2细胞凋亡. A1: 空白对照组; A2: PJ34实验组; M1: 细胞凋亡峰; B: 0-72 h细胞凋亡率比较.

HepG2的凋亡.

目前, PARP-1的抑制剂在国外已经在对恶性黑色素瘤、中枢神经系统肿瘤、乳腺癌等恶性肿瘤的治疗中进入I期临床实验阶段^[2-3], 但对PARP-1的抑制剂是否可用于对肝癌的治疗尚无研究报道. 该研究首次揭示PARP-1的抑制剂

PJ34能直接抑制肝癌细胞的增殖, 其机制是通过诱导肝癌细胞凋亡. 虽然这一观察有待于在动物实验中来进一步证实, 该研究的重要意义在于揭示PARP-1抑制剂PJ34对肝癌细胞有直接抑制作用, 为我们的肝癌治疗的研究提供了一个新的药物治疗靶点. 相信随着对PARP-1抑制剂治疗肝癌研究的深入, 以及联合其他抗肿瘤治疗手段的应用, PARP-1抑制剂可能在将来肝癌治疗中发挥重要的作用.

4 参考文献

- Haince JF, Rouleau M, Hendzel MJ, Masson JY, Poirier GG. Targeting poly(ADP-ribosyl)ation: a promising approach in cancer therapy. *Trends Mol Med* 2005; 11: 456-463
- http://www.eddn.org/clinicalTr_caResUK.html
- Tentori L, Leonetti C, Scarsella M, Vergati M, Xu W, Calvin D, Morgan L, Tang Z, Woznick K, Alemu C, Hoover R, Lapidus R, Zhang J, Graziani G. Brain distribution and efficacy as chemosensitizer of an oral formulation of PARP-1 inhibitor GPI 15427 in experimental models of CNS tumors. *Int J Oncol* 2005; 26: 415-422
- 王志强, 黄志勇. 人肝癌组织中PARP-1的表达与生物学特性的关系. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1995-1998
- Dandri M, Burda MR, Burkle A, Zuckerman DM, Will H, Rogler CE, Greten H, Petersen J. Increase in de novo HBV DNA integrations in response to oxidative DNA damage or inhibition of poly (ADP-ribosyl) ation. *Hepatology* 2002; 35: 217-223
- Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 2005; 434: 917-921
- Nozaki T, Fujihara H, Watanabe M, Tsutsumi M, Nakamoto K, Kusuoka O, Kamada N, Suzuki H, Nakagama H, Sugimura T, Masutani M. Parp-1 deficiency implicated in colon and liver tumorigenesis induced by azoxymethane. *Cancer Sci* 2003; 94: 497-500
- Nomura F, Yaguchi M, Togawa A, Miyazaki M, Isobe K, Miyake M, Noda M, Nakai T. Enhancement of poly-adenosine diphosphate-ribosylation in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 529-535
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of poly (ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002; 297: 259-263
- Veuger SJ, Curtin NJ, Richardson CJ, Smith GC, Durkacz BW. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly (ADP-ribose) polymerase-1. *Cancer Res* 2003; 63: 6008-6015

同行评价
本文作者针对PARP-1抑制剂PJ34对人肝癌细胞株HepG2增殖的影响进行了研究, 研究结果为肝癌治疗提供了一个新的药物治疗靶点, 具有实际意义.

电编 何基才 编辑 张焕兰

二甲双胍对高脂饲养大鼠肝脏脂肪变的干预作用

陈世清, 黎华, 刘杞

背景资料
NAFLD发病机制复杂, 目前认为胰岛素抵抗可能是其主要发病机制, 治疗靶点应该是提升机体胰岛素敏感性。但胰岛素增敏剂对NAFLD治疗存在结果的不一致性。本文用精确的方法判断了二甲双胍对高脂饮食所致脂肪肝大鼠胰岛素抵抗的影响, 并在此基础上探讨其对肝脏脂肪变的影响及其可能的机制, 为NAFLD的发病机制和防治提供了理论基础, 但二甲双胍对NAFLD的防治作用仍需要进行更多的大样本前瞻性临床研究。

陈世清, 黎华, 鄖阳医学院附属太和医院 湖北省十堰市 442000

刘杞, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所 教育部感染性疾病分子生物学重点实验室 重庆市 400010

通讯作者: 刘杞, 400010, 重庆市渝中区临江路72号, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所. liuqiz@hotmail.com

电话: 0719-8452796

收稿日期: 2007-03-06 接受日期: 2007-03-23

Effects of metformin on hepatic steatosis induced in rats fed a high fat diet

Shi-Qing Chen, Hua Li, Qi Liu

Shi-Qing Chen, Hua Li, Taihe Hospital, Yungang Medical College, Shiyan, 442000, Hubei Province, China

Qi Liu, Institute for Viral Hepatitis, Key Laboratory for Molecular Biology of Infectious Diseases of Education Ministry, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China

Correspondence to: Qi Liu, Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University, 72 Linjiang Road, Yuzhong District, Chongqing 400010, China. liuqiz@hotmail.com

Received: 2007-03-06 Accepted: 2007-03-23

Abstract

AIM: To investigate the role and mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), and to evaluate the intervening effects of metformin (Met) on rats with hepatic steatosis induced by feeding a high fat diet.

METHODS: Twenty-one male Wistar rats were randomly divided into three equal groups. Rats in standard chow group (SD) were fed normal food, those in the high fat diet group (HF) had a high fat diet, and rats in the HF-Met group were fed a high fat diet but gavaged with Met for 8 weeks. Rats were sacrificed at the end of 8 weeks to weigh epididymal fat and calculate the liver index. Levels of ALT, AST, insulin, TG, TC, FFA, SOD, and MDA were detected by biochemistry, and fasting insulin by radioimmunoassay. mRNA and protein expression of hepatic TNF- α were detected by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. Insulin sensitivity was measured with

Glucose Infusion Rate (GIR) by the euglycemic hyperinsulinemia clamp technique. Assessments of steatosis and inflammatory activity in all rats were scored under light microscope.

RESULTS: Notable steatosis and lobular inflammatory activities were more decreased in HF-Met than those in HF. The liver index, insulin, and levels of AST, ALT, TG and FFA were significantly decreased in HF-Met compared with those in HF (3.25 ± 0.26 vs 4.29 ± 0.12 , 33.37 ± 8.34 vs 46.73 ± 5.24 , 17.29 ± 5.34 vs 43.48 ± 6.21 , 4.10 ± 2.47 vs 12.05 ± 4.05 , $P < 0.01$; 106.0 ± 31.04 vs 141.37 ± 24.87 , 48.31 ± 16.11 vs 88.34 ± 21.94 , $P < 0.05$) TNF- α expression also decreased, while GIR increased (7.58 ± 1.05 vs 6.31 ± 1.28 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Metformin intervention can markedly improve insulin resistance induced by a high fat diet, decrease the levels of hepatic TG, FFA and TNF- α expression, while lessen hepatic steatosis, suggesting that it could be an active strategy to enhance insulin sensitivity in NAFLD.

Key Words: Nonalcoholic fatty liver disease; Insulin resistance; Metformin; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Enzyme-linked immunosorbent assay

Chen SQ, Li H, Liu Q. Effects of metformin on hepatic steatosis induced in rats fed a high fat diet. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1810-1814

摘要

目的: 探讨胰岛素抵抗在非酒精性脂肪性肝发病中的作用及机制, 观察二甲双胍对高脂饲养大鼠肝脏脂肪变的干预效果。

方法: 21只♂ Wistar大鼠分为3组, 每组7只, 普通饮食组(SD), 高脂饮食组(HF), 二甲双胍组(HF-Met)在高脂饮食的同时给予二甲双胍, 共8 wk。8 wk末处死大鼠, 称量附睾脂肪, 计算肝指数, 生化方法测定ALT、AST、TG、TC、FFA、SOD和MDA。放免法测定空腹胰岛素, 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和ELISA法检测肝脏TNF- α

mRNA和蛋白的表达, 用葡萄糖输注率(GIR)来评价胰岛素敏感性, 并观察肝组织病理变化.

结果: 与HF相比, HF-Met肝细胞脂肪变和小叶炎症明显减轻, 肝指数、胰岛素、AST、ALT、TG、FFA显著下降(3.25 ± 0.26 vs 4.29 ± 0.12 , 33.37 ± 8.34 vs 46.73 ± 5.24 , 17.29 ± 5.34 vs 43.48 ± 6.21 , 4.10 ± 2.47 vs 12.05 ± 4.05 , $P < 0.01$; 106.0 ± 31.04 vs 141.37 ± 24.87 , 48.31 ± 16.11 vs 88.34 ± 21.94 , $P < 0.05$) TNF- α 的表达也显著下降, GIR增加(7.58 ± 1.05 vs 6.31 ± 1.28 , $P < 0.05$).

结论: 二甲双胍干预能明显改善高脂饲养大鼠的胰岛素抵抗, 降低肝脏TG、FFA和TNF- α 的表达, 减轻肝脏脂肪变的程度, 提示胰岛素增敏治疗可能是NAFLD防治的一种积极策略.

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 胰岛素抗药性; 二甲双胍; 聚合酶链式反应; 酶联免疫测定

陈世清, 黎华, 刘杞. 二甲双胍对高脂饲养大鼠肝脏脂肪变的干预作用. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1810-1814
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1810.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)发病率逐年升高, 起病渐趋低龄化, 已成为严重影响人类健康的主要慢性肝病, 但其发病机制尚不清楚, 直接影响了对该病的有效治疗. 近年研究发现, NAFLD与胰岛素抵抗密切相关, 胰岛素抵抗是NAFLD的重要特征^[1]. 研究显示^[2], 高脂饲养的大鼠可产生明显的胰岛素抵抗. 为了研究胰岛素抵抗对脂肪肝形成和发展的影响, 设想在胰岛素抵抗产生和肝脏脂质聚积的初始阶段, 给予胰岛素增敏治疗, 提升机体对胰岛素的敏感性, 降低高胰岛素血症及随之导致的脂代谢紊乱和细胞因子的异常, 有可能减轻或改善肝脏的脂肪变、炎症和坏死, 为NAFLD防治提供新的选择. 二甲双胍作为抗糖尿病药物, 具有胰岛素增敏作用, 可调节脂质代谢和脂肪细胞因子在肝脏中的表达^[3], 我们通过二甲双胍对高脂饲养大鼠的干预处理, 来探讨胰岛素抵抗在NAFLD发病中的作用及可能的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 δ Wistar大鼠21只, 体质量170-190 g, 鼠龄4-6 wk, 分笼饲养在温度为22℃-28℃动物室中, 明暗周期为12 h(6 am-6 pm), 实验前适应性饲养1 wk, 天黑前投食, 自由饮水. 大鼠能量供

给每天为320 kJ/只, 并且观察大鼠摄食量的变化. 高速低温离心机(Beckman公司), PCR扩增仪(Eppendorf公司), DU® series600全波长分光光度计(Beckman公司), GENEGENIUS成像仪(Gene公司), GENEGNOME化学发光仪(Gene公司). 水平电泳槽、电泳仪(北京六一仪器厂), 光学显微镜(XSZ-G)(重庆光学仪器厂). RT-PCR试剂盒(Promega公司), RNeasy Mini Kit(Qiagene公司), 核酸分子标准物(Mbi公司). 盐酸二甲双胍为中美上海施贵宝制药有限公司产品.

1.2 方法 大鼠随机分为普通饮食组(standard chow diet, SD)、高脂饮食组(high-fat diet, HF)和二甲双胍组(HF-Metformin, HF-Met), 每组各7只. 普通饮食组喂养普通饲料, 二甲双胍组和高脂饮食组喂养高脂饲料. 普通饲料其蛋白质、脂肪、碳水化合物提供能量分别为21%, 19%和60%; 高脂饲料其蛋白质、脂肪、碳水化合物提供能量分别为15%, 45%和40%. 适应性喂养1 wk后, 普通饮食组继续喂养普通饲料, 二甲双胍组继续喂饲高脂饲料并用二甲双胍灌胃, 剂量为200 mg/(kg·d), 普通饮食组、高脂饮食组用等量生理盐水灌胃. 每天上午9时左右灌胃给药, 每周称重1次, 据此调整药物剂量, 饲养8 wk, 至8 wk末全部大鼠称质量、测量血糖, 进行正常血糖-高胰岛素钳夹实验.

1.2.1 胰岛素敏感性的测定 用正常血糖高胰岛素钳夹技术来评价胰岛素敏感性: 大鼠均禁食过夜12 h, 用200 mL/L乌拉坦(1.5 mL/kg)腹腔内注射麻醉后, 进行颈动脉和颈静脉插管留置. 胰岛素、葡萄糖分别用二个微电脑数字式微量注射泵由颈静脉泵入, 血液标本由颈动脉导管获取. 胰岛素输注率为10.0 mU/(kg·min), 从颈动脉取血用微型血糖仪在30 s内测出血糖值, 维持稳态血糖在 5.0 ± 0.5 mmol/L的范围内, 持续上述过程达2 h完成. 钳夹实验结束后, 计算灌流第2小时的葡萄糖输注率(glucose infusion rate, GIR), 判断大鼠的胰岛素敏感性. 钳夹结束颈动脉采血后处死动物, 迅速取出肝脏并称质量, 按常规制备血清, 并在肝脏的同一部位切取肝组织, 放入40 g/L甲醛溶液固定后制备石蜡切片.

1.2.2 肝脏TNF- α 和肝脏脂质的抽取 肝组织匀浆、离心、取上清, 用双抗体夹心ELISA法测定TNF- α 及双缩脲法测匀浆蛋白浓度. 肝脏脂质的抽取采用Folch法^[4].

1.2.3 肝脏TNF- α mRNA表达 利用RT-PCR测定肝脏组织TNF- α mRNA: 细胞总RNA用RNeasy

创新盘点
本文利用抗糖尿病药物二甲双胍来研究胰岛素抵抗与NAFLD的关系, 证明二甲双胍对NAFLD有一定的防治效果.

表 1 体质量、肝指数、附睾脂肪、血糖、胰岛素、GIR的变化

分组	<i>n</i>	体质量(g)	肝指数(%)	附睾脂肪重量/体质量(%)	血糖(mmol/L)	胰岛素(mU/L)	GIR[mg(kg·min)]
SD	7	328.25 ± 11.35	2.80 ± 0.23	1.49 ± 0.17	4.35 ± 0.58	39.36 ± 6.51	10.22 ± 1.47
HF	7	341.35 ± 20.26	4.29 ± 0.12 ^b	2.09 ± 0.52 ^a	4.50 ± 0.60	46.73 ± 5.24 ^a	6.31 ± 1.28 ^b
HF-Met	7	314.86 ± 10.01 ^c	3.25 ± 0.26 ^d	1.43 ± 0.45 ^c	4.00 ± 0.49	33.37 ± 8.34 ^d	7.58 ± 1.05 ^c

^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01 vs SD组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs HF组.

Mini Kit根据操作说明提取, 然后进行RT-PCR. 用Primer 4.1软件设计目的基因和内参照β-actin引物, TNF-α mRNA引物序列如下: 上游引物: 5'-GGTCCCAACAAGGAGGAGAAGT-3'; 下游引物: 5'-GTATGAAGTGGCAAATCGGCT-3'; 长度327 bp. 扩增条件为48℃ 45 min, 94℃ 2 min, 94℃ 40 s, 58℃ 60 s, 68℃ 90 s, 循环数30, 68℃ 退火7 min. 同时扩增β-actin基因(长度237 bp)作为内参照. 扩增产物在15 g/L的琼脂糖凝胶里电泳, 利用凝胶成像分析系统进行紫外光成像和图形分析, 测出各条带的光密度值. 结果以TNF-α条带和β-actin条带的光密度比值表示.

1.2.4 肝脏组织病理检查 光镜下评估肝脏脂肪变性和炎症情况, 肝细胞脂肪变程度和脂肪性肝炎判断标准参照1999年Brunt *et al*^[5]提出的分级和分期方法, 由病理学专家评判.

统计学处理 所有计量资料以均数±标准差(mean±SD)表示, 采用One-Way ANOVA和*q*检验, *P*<0.05表示统计学差异, *P*<0.01表示显著性差异. 所有资料应用SPSS12.0统计软件进行数据分析.

2 结果

2.1 体质量、肝指数、附睾脂肪的变化 实验中高脂饲养大鼠性情温顺, 皮毛无光泽, 大便松软, 各组动物均无死亡发生, 大鼠每日摄食能量基本相当. 高脂饮食组大鼠的肝指数、附睾脂肪占体质量的百分比高于普通饮食组(*P*<0.01和*P*<0.05), 体质量无差别. 与高脂饮食组相比, 二甲双胍组大鼠体质量增加减缓(*P*<0.05); 肝指数、附睾脂肪占体质量的百分比明显降低(*P*<0.01和*P*<0.05), 且大鼠附睾脂肪占体质量的百分比与普通饮食组相近(表1).

2.2 血糖、胰岛素、葡萄糖输注率的变化 空腹血糖各组间水平相似. 高脂饮食组大鼠的空腹胰岛素水平高于普通饮食组(*P*<0.05), GIR低于普通饮食组(*P*<0.01). 与高脂饮食组相比, 二甲双胍组大鼠空腹胰岛素水平明显降低 (*P*<0.01),

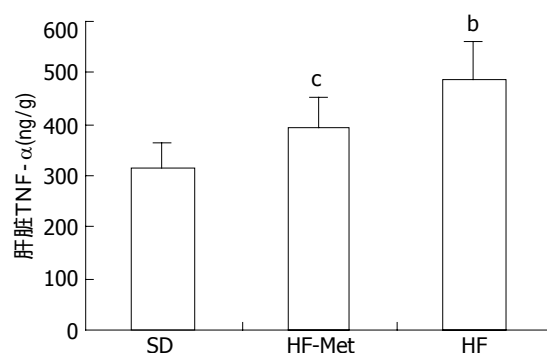


图 1 肝脏TNF-α蛋白的表达. ^b*P*<0.01 vs SD组; ^c*P*<0.05 vs HF组.

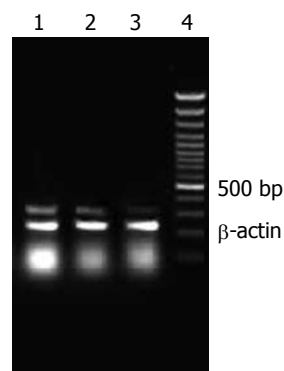


图 2 肝脏TNF-α mRNA的表达. 1: HF; 2: Met; 3: SD; 4: Marker.

GIR高于高脂饮食组(*P*<0.05)(表1).

2.3 生化指标的变化 高脂饮食组大鼠的AST、ALT、MDA明显高于普通饮食组(*P*<0.01和*P*<0.05), SOD低于普通饮食组(*P*<0.01). 与高脂饮食组相比, 二甲双胍组大鼠AST、ALT、MDA明显降低 (*P*<0.01和*P*<0.05), SOD高于高脂饮食组(*P*<0.05)(表2).

2.4 肝脏脂代谢的变化 高脂饮食组大鼠肝脏TG、TC、FFA明显高于普通饮食组(*P*<0.01). 与高脂饮食组相比, 二甲双胍组大鼠肝脏TG、FFA明显降低(*P*<0.05), TC无明显变化(表3).

2.5 肝脏TNF-α mRNA和蛋白表达 高脂饮食组大鼠肝脏TNF-α mRNA和蛋白含量明显高于普通饮食组(*P*<0.01). 与高脂饮食组相比, 二甲双胍组大鼠肝脏TNF-α mRNA和蛋白含量明显降低(*P*<0.01和*P*<0.05)(图1-2).

表 2 生化指标的变化

分组	n	AST(U/L)	ALT(U/L)	SOD(U/mg)	MDA(μ mol/g)
SD	7	20.73 \pm 7.40	7.95 \pm 2.54	8.08 \pm 0.68	0.33 \pm 0.14
HF	7	43.48 \pm 6.21 ^b	12.05 \pm 4.05 ^a	4.77 \pm 0.40 ^b	0.65 \pm 0.05 ^b
HF - Met	7	17.29 \pm 5.34 ^d	4.10 \pm 2.47 ^c	6.37 \pm 1.52 ^c	0.46 \pm 0.18 ^c

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs SD组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs HF组.

2.6 肝脏组织学的改变 肝组织HE染色显示, 普通饮食组肝细胞正常, 无脂滴和炎症细胞浸润(图3A), 高脂饮食组出现弥漫性脂肪变性, 以中央静脉周围最为明显, 细胞体积增大, 胞质中有大量脂滴空泡, 核居边, 小叶内有炎症细胞浸润(图3B). 二甲双胍组的肝脏脂肪变性程度和炎症活动度明显比高脂饮食组减轻($P < 0.01$, 表3, 图3C).

3 讨论

NAFLD是脂质在肝细胞内聚积过多的一种病理状态, 是胰岛素抵抗在肝脏的局部表现, 且胰岛素抵抗可能是NAFLD形成的启动和促发因素^[6]. 目前研究表明, 即使是预后良好的单纯性脂肪肝, 亦不能视为静止性病变, 由于遗传易感性和适应性反应机制的影响, 其肝病仍可能呈亚临床状态进展, 并可通过诱发全身炎症反应和代谢紊乱促进代谢综合征的发生. 为此, 需通过改善胰岛素抵抗、减轻氧化应激、提高肝细胞存活能力来防治NAFLD及其相关事件. 二甲双胍能提高胰岛素受体酪氨酸激酶的活性, 增加胰岛素受体的数量、与靶组织的亲和力、促进葡萄糖转运蛋白的转位和抑制糖异生、减少肝脏葡萄糖的产生, 具有胰岛素增敏作用, 且研究证实二甲双胍可参与脂质代谢, 调节脂肪细胞因子在肝脏中的表达. 临床和实验研究均显示出对NAFLD有一定的防治效果^[7-8], 但其具体的机制尚未完全阐明.

高脂饮食可引起肝脏和外周组织的胰岛素抵抗, 使胰岛素抗脂解作用受损, 血中的游离脂肪酸(FFA)增加, 进入组织的FFA增多, 在肝脏, 当进入肝细胞的FFA超过肝脏的氧化能力时, 过多的FFA就会转化为TG, 使TG在肝细胞内沉积, 导致肝脏发生脂肪变性, 而且脂肪酸还可活化多种细胞死亡途径直接杀伤肝细胞. 我们发现, 二甲双胍的干预可明显改善高脂饮食所致的胰岛素抵抗, 其可能与他能减轻体质量、降低循环的胰岛素水平和内脏脂肪的堆积, 减少

同行评价
非酒精性脂肪肝发病机制尚未完全阐明, 该文旨在研究胰岛素抵抗在NAFLD发病中的作用和机制. 实验设计合理, 图片清晰, 结果与结论较可靠, 有一定的学术价值.

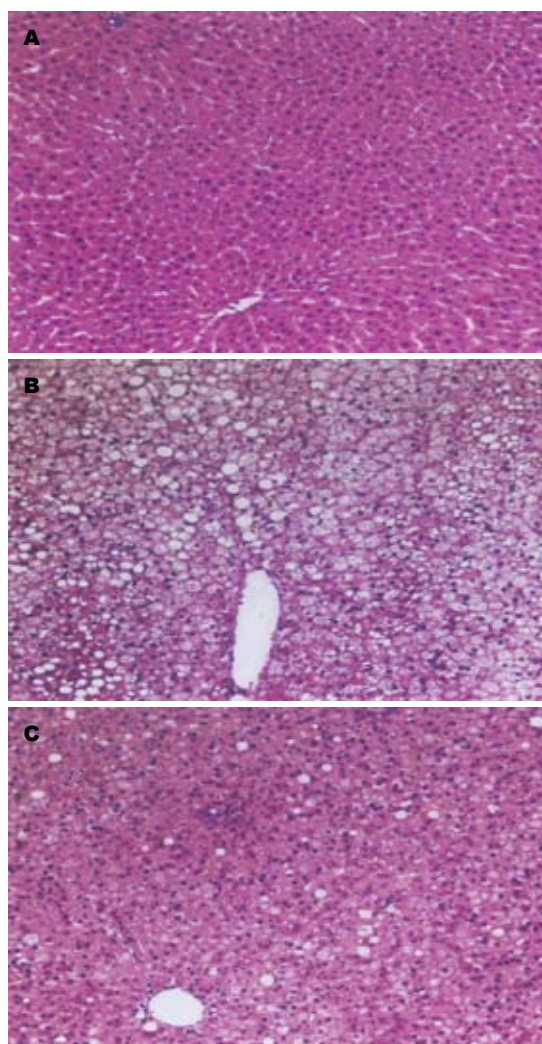


图 3 大鼠肝脏组织学的病理改变(HE染色 $\times 200$). A: 正常大鼠; B: 高脂饮食组大鼠; C: 二甲双胍组大鼠.

FFA的产生, 增强了机体对胰岛素的敏感性有关. 长期的FFA增高可通过以下机制引起胰岛素抵抗: FFA增多使脂肪氧化增加, 葡萄糖氧化受到抑制^[9]; 抑制胰岛素介导的细胞对葡萄糖的摄取^[10]; 促进糖异生; 引起肝脏、骨骼肌中脂肪聚集, 造成该组织的胰岛素抵抗; 对胰岛素下游信号转导系统产生影响. 另一方面, 降低了肝脏的TNF- α , 阻断TNF- α 引起的细胞外信号调节激酶的活化和脂滴包被蛋白(perilipin)的下调, 抑

表 3 肝脏的脂质变化及脂肪变性、炎症活动度计分

分组	n	TG(mg/g)	TC(mg/g)	FFA(μ mol/g)	脂肪变性	炎症活动
SD	7	45.00 \pm 18.07	66.37 \pm 29.33	42.99 \pm 17.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
HF	7	141.37 \pm 24.87 ^b	148.94 \pm 22.13 ^b	88.34 \pm 21.94 ^b	2.82 \pm 0.21 ^b	2.33 \pm 0.52 ^b
HF - Met	7	106.0 \pm 31.04 ^c	141.20 \pm 35.37	48.31 \pm 16.11 ^c	2.00 \pm 0.82 ^c	1.07 \pm 0.45 ^c

^bP<0.01 vs SD组; ^cP<0.05 vs HF组.

制脂肪分解,改善胰岛素抵抗^[11].二甲双胍还可改善高脂饮食大鼠的脂代谢,明显降低肝脏局部的TG和FFA,从而减轻肝脏脂质的浸润,改善肝脏的胰岛素抵抗和脂肪变性.FFA、TNF- α 和高胰岛素血症的减轻还能改善或恢复肝脏胰岛素信号转导分子的异常,有助于机体胰岛素敏感性的改善.近年来研究发现,二甲双胍可降低NAFLD升高的转氨酶,但其对肝脏组织学的改善报道不一,可能与研究对象的入选标准、药物的剂量、时间、组织学改善的判断方法等不同有关^[12-13].本研究观察了二甲双胍干预对高脂饮食大鼠肝脏组织学影响,结果显示,与高脂饮食组相比,肝脏的脂肪变、炎症细胞的浸润程度均有明显的改善,这可能与他降低了肝脏FFA和TNF- α 的水平,改善了机体的胰岛素抵抗,减轻了肝脏的“第一次打击”有关;同时也与他增加肝脏SOD的活性、减少MDA的形成,改善肝细胞的能量供应和抑制肝脏的氧化应激,减轻了肝脏的“第二次打击”有关.研究发现,二甲双胍能提高高乳果糖喂养大鼠红细胞铜锰SOD的活性和血谷胱甘肽水平,并独立于胰岛素敏感性的改善,提示二甲双胍可能还具有一定的抗氧化作用和降低氧化应激反应^[14-15].

总之,二甲双胍在高脂饮食诱发大鼠脂肪肝的形成中显示出有效的干预作用,表明胰岛素抵抗在NAFLD发病中占重要地位,减轻胰岛素抵抗,增加胰岛素敏感性有助于预防NAFLD.

4 参考文献

- 1 Utzschneider KM, Kahn SE. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 4753-4761
- 2 Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 32345-32353
- 3 Hundal RS, Inzucchi SE. Metformin: new understandings, new uses. *Drugs* 2003; 63:

1879-1894

- 4 FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509
- 5 Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2467-2474
- 6 Neuschwander-Tetri BA, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-1219
- 7 Lin HZ, Yang SQ, Chuckaree C, Kuhajda F, Ronnet G, Diehl AM. Metformin reverses fatty liver disease in obese, leptin-deficient mice. *Nat Med* 2000; 6: 998-1003
- 8 Nair S, Diehl AM, Wiseman M, Farr GH Jr, Perrillo RP. Metformin in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a pilot open label trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 23-28
- 9 RANDLE PJ, GARLAND PB, HALES CN, NEWSHOLME EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1963; 1: 785-789
- 10 Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest* 1994; 93: 2438-2446
- 11 Ren T, He J, Jiang H, Zu L, Pu S, Guo X, Xu G. Metformin reduces lipolysis in primary rat adipocytes stimulated by tumor necrosis factor- α or isoproterenol. *J Mol Endocrinol* 2006; 37: 175-183
- 12 Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Zoli M, Melchionda N. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. *Lancet* 2001; 358: 893-894
- 13 Uygun A, Kadayifci A, Isik AT, Ozgurtas T, Deveci S, Tuzun A, Yesilova Z, Gulsen M, Dagalp K. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 537-544
- 14 Faure P, Rossini E, Wiernsperger N, Richard MJ, Favier A, Halimi S. An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diabetes* 1999; 48: 353-357
- 15 Beisswenger P, Ruggiero-Lopez D. Metformin inhibition of glycation processes. *Diabetes Metab* 2003; 29: 6S95-103

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

结肠癌多层螺旋CT表现与术后病理的相关性分析

赵雪梅, 马民, 张宗明, 朱建平, 白燕

赵雪梅, 马民, 白燕, 清华大学第一附属医院放射科 北京市 100016

张宗明, 朱建平, 清华大学第一附属医院普外科 北京市 100016

赵雪梅, 1998年白求恩医科大学硕士, 主治医师, 主要从事胸腹部病变的影像诊断。

通讯作者: 赵雪梅, 100016, 北京市朝阳区, 清华大学第一附属医院放射科. shangziqiang126@sina.com

电话: 010-64308325

收稿日期: 2007-03-06 接受日期: 2007-03-23

Correlative analysis of colorectal cancer stage between multi-slice spiral computed tomography and operative pathology

Xue-Mei Zhao, Min Ma, Zong-Ming Zhang, Jian-Ping Zhu, Yan Bai

Xue-Mei Zhao, Min Ma, Yan Bai, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China

Zong-Ming Zhang, Jian-Ping Zhu, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China

Correspondence to: Xue-Mei Zhao, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China. shangziqiang126@sina.com

Received: 2007-03-06 Accepted: 2007-03-23

Abstract

AIM: To evaluate correlations for the staging of colorectal cancer between enhanced multi-slice spiral computed tomography (MSCT) pneumocolon and surgical pathology.

METHODS: Thirty-two patients diagnosed with colorectal cancer from surgery were examined by a three-phase enhanced scan with MSCT. Cancer was staged by Tumor, Node, Metastases (TNM) by axial images and multi-planar reformation (MPR) images. MSCT findings were compared with post-operative pathologic staging.

RESULTS: The diagnostic accuracy of T-stage and N-stage before operation, metastasizing and the TNM-stage of MSCT in colorectal cancer was 90.63% (29/32), 84.38% (27/32), 100% (4/4) and 90.63% (29/32), respectively. All correlated with

surgical appearances and pathological findings (Kappa: 0.807, 0.673, 1.0 and 0.803, respectively, both $P < 0.01$).

CONCLUSION: A very good correlation exist between manifestations on enhanced MSCT with MPR and operative pathology. MSCT may become the first choice diagnostic modality for pre-treatment staging evaluations of colorectal carcinomas.

Key Words: Colorectal cancer; Multi-slice spiral computed tomography; Multi-planar reformation; Pathology; Correlation

Zhao XM, Ma M, Zhang ZM, Zhu JP, Bai Y. Correlative analysis of colorectal cancer stage between multi-slice spiral computed tomography and operative pathology. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1815-1819

摘要

目的: 探讨低张结肠充气多层螺旋CT(MSCT)三期增强扫描结肠癌术前分期与术后病理的相关性。

方法: 对手术证实的结肠癌患者32例行MSCT三期增强扫描, 横轴位结合多平面重组(MPR)图像进行TNM分期, 与术后病理对照。

结果: MSCT对结肠癌术前T分期、术前N分期、远处转移及TNM分期的诊断准确率分别为90.63%(29/32), 84.38%(27/32), 100%(4/4), 以及90.63%(29/32), 均与手术病理一致 (kappa: 0.807, 0.673, 1, 0.803; 均 $P < 0.01$)。

结论: 结肠癌MSCT表现与手术病理之间具有较强一致性, 可作为治疗前评估分期首选检查方法。

关键词: 结肠癌; 低张结肠充气多层螺旋CT; 多平面重组; 病理学; 相关性

赵雪梅, 马民, 张宗明, 朱建平, 白燕. 结肠癌多层螺旋CT表现与术后病理的相关性分析. *世界华人消化杂志* 2007;15(16):1815-1819

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1815.asp>

背景资料

结肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一, 检查方法各异, 内镜及气钡双重造影是最常用的检查方法, 但只能观察肠腔内情况, 对于腔外侵犯及淋巴结转移情况无法判定。MSCT动态增强扫描具有速度快、范围广及强大的后处理优势, 大大提高了图像的空间及密度分辨率, 使腹部CT图像质量明显提高。原始轴位图像结合多平面重组图像(MPR), 可以有效地显示肿瘤部位、大小形态、对肠壁的浸润深度及对周围组织器官的侵犯范围、有无淋巴结转移及远处组织器官的转移, 从而能够进行准确的术前分期并判定预后情况。

应用要点

MSCT对结肠癌术前分期与术后病理分期具有较强一致性,对肿瘤突破浆膜,向外直接侵犯、淋巴结转移和远处转移均能较准确判断,可以根据影像表现特点推测出结肠癌的病理特性,从而指导手术及判断预后。且MSCT为无创性检查,可以成为结肠癌治疗前分期的首选检查方法。

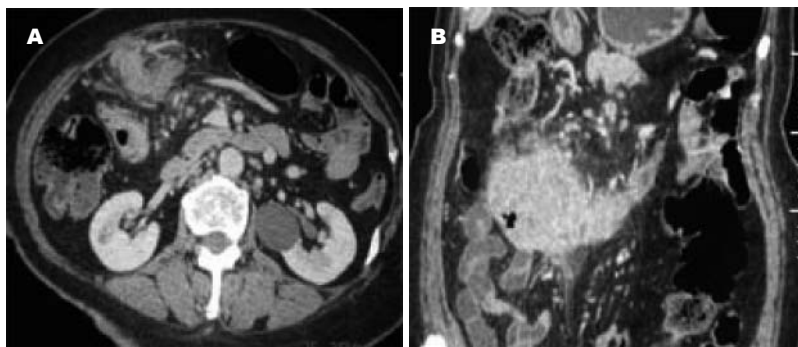


图1 横结肠癌淋巴结转移,血管根部多个大小不等淋巴结,部分呈簇状,增强后CT值为82 Hu。A: 轴位原始图像; B: 冠状位MPR重组图像。

0 引言

结肠癌是消化道常见的恶性肿瘤之一,检查方法各异,内窥镜及气钡双重造影是最常用的检查方法,但只能观察肠腔内情况,对于腔外侵犯及淋巴结转移情况无法判定^[1]。低张结肠充气16层螺旋CT(MSCT)动态增强扫描具有速度快、范围广及强大的后处理优势,大大提高了图像的空间及密度分辨率,使腹部CT图像质量明显提高。原始轴位图像结合多平面重组图像(MPR),可以有效地显示肿瘤部位、大小、形态、对肠壁的浸润深度及对周围组织器官的侵犯范围、有淋巴结转移及远处组织器官的转移,从而能够进行准确的术前分期并判定预后情况^[2]。

1 材料和方法

1.1 材料 收集手术病理证实结肠癌32例,男21例,女11例,年龄65-82(中位年龄71.8)岁。病变位于盲肠和升结肠10例、横结肠3例、降结肠12例、乙状结肠7例。

1.2 方法 均采用美国GE公司16层螺旋CT扫描机检查,扫描参数:120 kV及200-240 mA。常规肠道准备后,于检查前10 min肌注山莨菪碱20 mg后,左侧卧位于CT扫描床,将一次性肛管插入肛门后,注入1000-1500 mL气体,以患者腹腔能够耐受为准。嘱患者适当翻转体位,取仰卧位先行全腹盆部平扫,确定肿瘤部位后,再行增强扫描。以高压注射器静脉注入非离子型对比剂碘海醇(300 g/L),按1.5 mL/kg体质量,流速约3.0 mL/s,扫描延迟时间分别为:动脉期30 s、静脉期80 s、平衡期180-210 s。每位患者均为一次屏气完成扫描,扫描层厚5-10 mm、重组层厚0.625 mm,将重组轴位图像传至AW4.2工作站对薄层图像连续滚动观察,最后集中在病变部位,然后用薄层MPR进行重建,选择轴位及有意义的重建图像激光打印。所有图像胶片由2位放射科主治医师



图2 结肠癌腹腔种植转移 大网膜明显增厚呈饼状,腹腔内大量积液。

师进行分析。

1.2.1 图像分析标准 (1)病变的部位、大小、形态。(2)侵犯的范围及深度。(3)病变不同时间强化程度。(4)浆膜是否受侵。(5)相应肠腔周围脂肪是否受侵。(6)有无周围邻近组织器官侵犯。(7)有无周围及远处淋巴结转移(位置、大小、数目、增强后强化程度)。(8)有无远处脏器转移(肝脏、肺脏、腹腔、盆腔、及腹膜后)。我们通过大小、数目、形态及强化程度几方面来综合评估。1-3个淋巴结短径 ≥ 8 mm、增强扫描后有明显强化(CT值 ≥ 80 Hu)或边缘强化中心未强化的淋巴结可以考虑转移;4个以上淋巴结 4 mm \leq 短径 ≥ 8 mm成簇状、增强扫描后有明显强化者可考虑转移^[13-14](图1);对于结节状腹腔种植转移表现为大网膜、系膜区脂肪密度增高、模糊,腹膜增厚并见腹壁结节、网膜饼状改变及腹水等(图2)。

1.2.2 MSCT术前分期标准 参照国际统一TNM分期标准并参照相关文献,制定出术前MSCT分期标准如下^[3]: T0无异常发现; T1肠壁局限性增厚(大于0.5 cm)、强化明显、肠腔无明显狭窄; T2肠壁局限性增厚(大于0.5 cm)、可有挛缩、但外壁光滑、周围脂肪组织清晰; T3肠壁局限性增厚、肠腔狭窄、肠外壁毛糙、周围脂肪组织略显模糊、无邻近组织器官受侵; T4病变突破

表 1 32例结肠癌MSCT浸润深度与病理的关系

MSCT征象	<i>n</i>	病理未侵及浆膜T ₁₊₂	病理侵及浆膜T ₃₊₄	χ^2	<i>P</i>	Kappa
未侵及浆膜	13	12	1	20.98	<0.001	0.807
侵及浆膜	19	2	17			
合计	32	14	18			

表 2 32例结肠癌MSCT淋巴结转移与病理的关系

MSCT征象	<i>n</i>	病理无淋巴结转移	病理有淋巴结转移	χ^2	<i>P</i>	Kappa
无淋巴结转移	12	10	2	14.52	<0.005	0.673
有淋巴结转移	20	3	17			
合计	32	13	19			

表 3 32例结肠癌MSCT远处组织器官转移与病理的关系

MSCT征象	<i>n</i>	病理无远处转移	病理有远处转移	χ^2	<i>P</i>	Kappa
无远处转移	28	28	0	32	<0.001	1
有远处转移	4	0	4			
合计	32	28	4			

表 4 32例结肠癌rMSCT TNM分期与病理的关系

MSCT征象	<i>n</i>	病理 I + II	病理 III + IV	χ^2	<i>P</i>	Kappa
+	12	11	1	20.74	<0.001	0.803
+	20	2	18			
合计	32	13	19			

浆膜、肠腔明显狭窄、外周脂肪密度增高、见条索样高密度影、并侵及邻近组织器官; N0局部未见明确转移淋巴结; N1有1-3个可视淋巴结(直径大于4 mm)并有明显强化; N2有4个或以上可视淋巴结(直径大于4 mm)并有明显强化; M0未发现远处转移; M1有远处脏器转移(肝脏、肺脏、腹腔、盆腔、及腹膜后等)的证据。

统计学处理 双向无序计数资料进行 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。一致性检验用Kappa检验, Kappa值小于0.4一致性差、0.4-0.7具有中度一致性、大于0.7有较强一致性。

2 结果

MSCT对结肠癌术前T分期诊断准确率为90.63%(29/32), 其中非浆膜侵犯诊断准确率为92.31%(12/13), 1例高估; 在32例患者中有19例显示肠腔周围的脂肪组织密度增高, 并可见条索状高密度影, 判定为浆膜侵犯(图3), 浆膜侵犯

诊断准确率为89.47%(17/19), 2例低估; MSCT诊断结肠癌浸润深度与手术病理有较强一致性($P<0.001$, Kappa = 0.807, 表1)。MSCT对结肠癌术前N分期诊断准确率为84.38%(27/32), 其中非转移淋巴结诊断准确率为83.33%(10/12), 转移淋巴结诊断准确率为85.0%(17/20), MSCT诊断结肠癌淋巴结转移与手术病理有中等一致性($P<0.005$, Kappa = 0.673, 表2)。MSCT对结肠癌远处转移诊断准确率为100.0%(4/4), 其中2例为肝转移、1例为腹腔种植转移、1例为肝转移、肺转移合并腹腔淋巴结转移(表3)。MSCT对32例结肠癌术前TNM分期诊断准确率为90.63%(29/32), 与手术病理TNM分期有较强一致性($P<0.001$, Kappa = 0.803, 表4)。

3 讨论

本研究结果表明MSCT对结肠癌术前分期与术后病理分期具有较强一致性, 对肿瘤突破浆膜,

同行评价
本文通过探讨结肠癌多层螺旋CT与术后病理的相关性, 说明了MSCT在结肠癌应用中的价值, 有一定的临床意义。

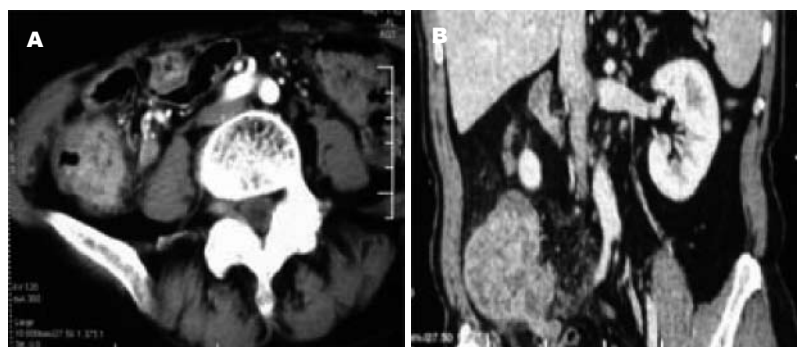


图3 升结肠癌突破浆膜, 升结肠壁明显增厚并见强化软组织团块影, 周围脂肪间隙内可见模糊条带形高密度影。A: 轴位原始图像; B: 冠状位MPR重组图像。

向外直接侵犯、淋巴结转移和远处转移均能较准确判断, 对临床治疗有重要的指导意义, 关系到是否行手术切除、手术术式、综合治疗方案以及预后评估。因此, MSCT对结肠癌术前分期具有重要作用。

MSCT 具有安全无创、扫描速度快、范围广、无重叠、对比剂用量少、具有很高的时间、空间及密度分辨率, 采用轴位薄层扫描图像并结合多平面重组图像可以满足临床诊断的需要。能从不同平面更好地评估病变的侵犯范围。扫描时间短, 可以明显减少肠道蠕动伪影, 对于那些不能配合的患者以及体质较弱患者, 这项检查更具有临床实用性。内窥镜能够取活检对小黏膜病变诊断很有帮助, 但不能观察肠腔外病变情况, 对于肠腔重度狭窄患者不能通过, 有肠梗阻及结肠冗长患者不宜采用^[4,6]。MSCT原始轴位图像对于放射科医师来说是诊断病变最准确的依据, 但不适合外科医师做手术参考。多平面重组图像可以从多平面、多角度整体观察病变的解剖关系, 这一点对于外科医生进行术前评估及推测预后是很有意义的。0.625 mm的重组层厚完全可以满足临床诊断和图像处理需要, 使MSCT有很高的空间及密度分辨率, 对小病灶不易漏诊。MPR能够很好消除容积效应, 在二维多平面上任意重建, 以结肠病变段为中心, 逐层行轴位、冠状位及矢状位重建, 无明显阶梯伪影, 可以利用不同的灰阶反映不同密度的组织, 密度分辨率高, 能清晰显示病变段肠腔、肿块沿肠壁侵犯的范围。结肠周围脂肪组织较丰富, 通过调节窗宽窗位, 可以较准确判断浆膜及邻近脏器受侵情况, 结合三期动态增强扫描对于病变的定位、定性、浸润深度、淋巴结及远处脏器转移等均能较准确识别。使MSCT成为结肠癌术前分期的常规检查方法之一^[7-10]。

MSCT三期扫描诊断的重点在于病变是否侵犯浆膜及邻近脏器, 这一点直接影响结肠的

手术切除率及5 a生存率, 本组病例中MSCT对浆膜侵犯诊断的准确率为89.47%、对无浆膜侵犯诊断的准确率为92.30%、与术后病理有较强一致性。表明MSCT三期扫描对结肠癌浆膜侵犯有较高敏感性, 与术后病理对照, 其中有17例有浆膜侵犯, 1例为炎性反应、1例为过分消瘦脂肪组织大部分消失而误判。1例出现过判主要因为炎性浸润与早期浸润不易判别。在结肠充盈良好的情况下, 结合三期增强扫描, 观察浆膜及周围脂肪内条形强化病灶, 适当调整窗宽窗位, 薄层图像连续滚动观察并结合MPR图像可消除容积效应而造成的误判^[4], 对于观察浆膜及邻近脏器侵犯很有帮助^[11-12]。

判断转移淋巴结仍然是对三期增强MSCT的挑战, 结合结肠癌本身的病变特点是否有浆膜及邻近脏器侵犯, 可以提高诊断的准确率。本组非淋巴结转移诊断的准确率为83.33%、淋巴结转移诊断的准确率为85.0%, 与术后病理有中等一致性。我们通过薄层轴位图像结合MPR图像调节窗宽窗位以及静脉期、平衡期淋巴结与强化血管的鉴别, 对于提高N分期的准确率是有帮助的^[5], 这一点对于治疗方法的选择有重要指导意义。刘玉金 *et al*^[6]报道转移淋巴结平扫密度高于非转移淋巴结, 转移淋巴结强化明显, 且随时间延长而强化; 而反应性及炎性淋巴结强化不明显, 由于MSCT发现的淋巴结难以与手术结果一一对照, 故研究有一定局限性^[4]。

结肠癌常见的远处转移为肝脏、腹腔种植转移及远处淋巴结转移。肝脏MSCT多期扫描结合结肠癌病史, 可以与其他肝实质病变相鉴别。远处淋巴结转移可根据多期扫描后薄层图像调节灰阶度与强化血管鉴别。可以通过三期扫描后薄层轴位结合MPR重组图像调节窗宽窗位均可准确显示。但对于颗粒状腹腔种植转移难以判定, 尚不具备与手术病理完全对照的条件。

总之, MSCT三期增强扫描与MPR相结合对

结肠癌术前评估病灶大小、浆膜侵犯、淋巴结转移及远处脏器转移等TNM分期有重要作用, 准确性较高^[7, 15-18]. 与病理分期有较强一致性. 因此可以根据影像表现特点推测出结肠癌的病理特性, 从而指导手术及判断预后. 且为无创性检查, 可以成为结肠癌治疗前分期的首选检查方法^[19-20].

4 参考文献

- 1 高剑波, 郭华. 胃肠道肿瘤螺旋CT诊断的新进展. 中华放射学杂志 2001; 35: 312-314
- 2 Harvey CJ, Amin Z, Hare CM, Gillams AR, Novelli MR, Boulos PB, Lees WR. Helical CT pneumocolon to assess colonic tumors: radiologic-pathologic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 1998; 170: 1439-1443
- 3 Iyer RB, Silverman PM, DuBrow RA, Charnsangavej C. Imaging in the diagnosis, staging, and follow-up of colorectal cancer. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 179: 3-13
- 4 刘玉金, 陈克敏, 刘林祥, 张秀美, 朱建忠, 董海朋, 杨燕萍. 低张水灌肠多层螺旋CT对大肠癌分期的临床研究. 中华放射学杂志 2006; 40: 406-409
- 5 Sinha R, Verma R, Rajesh A, Richards CJ. Diagnostic value of multidetector row CT in rectal cancer staging: comparison of multiplanar and axial images with histopathology. *Clin Radiol* 2006; 61: 924-931
- 6 刘玉金, 陈克敏, 刘林祥, 吕守敬, 邵岩. 低张水灌肠多层螺旋CT对大肠癌的诊断价值. 临床放射学杂志 2006; 25: 54-58
- 7 Harvey CJ, Renfrew I, Taylor S, Gillams AR, Lees WR. Spiral CT pneumocolon: applications, status and limitations. *Eur Radiol* 2001; 11: 1612-1625
- 8 Caseiro-Alves F, Goncalo M, Cruz L, Ilharco J, Leite J, Agostinho A, Castro e Sousa F, Vilaca-Ramos H. Water enema computed tomography (WE-CT) in the local staging of low colorectal neoplasms: comparison with transrectal ultrasound. *Abdom Imaging* 1998; 23: 370-374
- 9 Chiesura-Corona M, Muzzio PC, Giust G, Zuliani M, Pucciarelli S, Toppan P. Rectal cancer: CT local staging with histopathologic correlation. *Abdom Imaging* 2001; 26: 134-138
- 10 Ji H, Rolnick JA, Haker S, Barish MA. Multislice CT colonography: current status and limitations. *Eur J Radiol* 2003; 47: 123-34
- 11 Panzironi G, De Vargas Macciucca M, Manganaro L, Ballesio L, Ricci F, Casale A, Campagnano D. Preoperative locoregional staging of rectal carcinoma: comparison of MR, TRUS and Multislice CT. Personal experience. *Radiol Med (Torino)* 2004; 107: 344-355
- 12 Kulinna C, Scheidler J, Strauss T, Bonel H, Herrmann K, Aust D, Reiser M. Local staging of rectal cancer: assessment with double-contrast multislice computed tomography and transrectal ultrasound. *J Comput Assist Tomogr* 2004; 28: 123-130
- 13 Liersch T, Langer C, Jakob C, Muller D, Ghadimi BM, Siemer A, Markus PM, Fuzesi L, Becker H. Preoperative diagnostic procedures in locally advanced rectal carcinoma (> or = T3 or N⁺). What does endoluminal ultrasound achieve at staging and restaging (after neoadjuvant radiochemotherapy) in contrast to computed tomography? *Chirurg* 2003; 74: 224-234
- 14 Bertoglio S, Sandrucci S, Percivale P, Goss M, Gipponi M, Moresco L, Mussa B, Mussa A. Prognostic value of sentinel lymph node biopsy in the pathologic staging of colorectal cancer patients. *J Surg Oncol* 2004; 85: 166-170
- 15 Hur J, Park MS, Lee JH, Lim JS, Yu JS, Hong YJ, Kim KW. Diagnostic accuracy of multidetector row computed tomography in T- and N staging of gastric cancer with histopathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr* 2006; 30: 372-377
- 16 Jin KN, Lee JM, Kim SH, Shin KS, Lee JY, Han JK, Choi BI. The diagnostic value of multiplanar reconstruction on MDCT colonography for the preoperative staging of colorectal cancer. *Eur Radiol* 2006; 16: 2284-2291
- 17 Filippone A, Ambrosini R, Fuschi M, Marinelli T, Genovesi D, Bonomo L. Preoperative T and N staging of colorectal cancer: accuracy of contrast-enhanced multi-detector row CT colonography--initial experience. *Radiology* 2004; 231: 83-90
- 18 Kulinna C, Eibel R, Matzek W, Bonel H, Aust D, Strauss T, Reiser M, Scheidler J. Staging of rectal cancer: diagnostic potential of multiplanar reconstructions with MDCT. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 183: 421-427
- 19 Sun CH, Li ZP, Meng QF, Yu SP, Xu DS. Assessment of spiral CT pneumocolon in preoperative colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3866-3870
- 20 Ashraf K, Ashraf O, Haider Z, Rafique Z. Colorectal carcinoma, preoperative evaluation by spiral computed tomography. *J Pak Med Assoc* 2006; 56: 149-153

电编 何基才 编辑 张焕兰

三种抗病毒治疗方法对慢性乙型肝炎患者生活质量的影响

王 艳, 于岩岩, 斯崇文, 陈新月, 韩忠厚, 陈宇萍

背景资料
肝病患者的治疗中, 身心健康一直为同行学者所重视。但科学规范的研究不多。SF-36作为健康状况问卷由美国医学疗效评价研究机构 (medical outcomes study, MOS) 研究并发展成熟, 并被广泛应用于各领域生活质量的评估。

王艳, 于岩岩, 斯崇文, 北京大学第一医院感染疾病科 北京市 100034
陈新月, 北京市佑安医院特需科 北京市 100069
韩忠厚, 秦皇岛市第三人民医院肝病科 河北省秦皇岛市 066001
陈宇萍, 保定市传染病医院肝病科 河北省保定市 071000
王艳, 2002年北京中医药大学感染疾病科临床博士, 主治医师, 主要从事慢性肝病的诊治。
北京市科委重大项目, No. H020920020690
北京大学211工程资助项目, No. 91000-246156054
通讯作者: 于岩岩, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院感染疾病科。yyy@bjmu.edu.cn
电话: 010-66551122-2362
收稿日期: 2007-02-27 接受日期: 2007-03-17

Assessment on life quality of patients with chronic hepatitis B after three types of antiviral treatment

Yan Wang, Yan-Yan Yu, Chong-Wen Si, Xin-Yue Chen, Zhong-Hou Han, Yu-Ping Chen

Yan Wang, Yan-Yan Yu, Chong-Wen Si, Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China
Xin-Yue Chen, Department of Special Service, Beijing You'an Hospital, Beijing 100069, China
Zhong-Hou Han, Department of Hepatology, Qinhuangdao Third Hospital, Qinhuangdao 066001, Hebei Province, China
Yu-Ping Chen, Department of Hepatology, Baoding Hospital for Infectious Diseases, Baoding 071000, Hebei Province, China

Supported by the Important Item of Beijing Science Committee, No. H020920020690, Peking University "211" Project Item, No. 91000-246156054

Correspondence to: Yan-Yan Yu, Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, 8 Xishiku Street, Xicheng District, Beijing 100034, China. yyy@bjmu.edu.cn

Received: 2007-02-27 Accepted: 2007-03-17

Abstract

AIM: To assess the life quality of patients with chronic hepatitis B after different approaches to antiviral treatment.

METHODS: A total of 143 patients were randomly divided into group A, B and C, received lamivudine plus interferon- α 2b sequential therapy, lamivudine and interferon- α 2b therapy,

respectively. The life quality of the 143 patients with chronic hepatitis B was assessed by the quality of life questionnaire (SF-36 in Chinese). The laboratory data and marks of questionnaires were compared before and after the antiviral treatments. The marks of the following-up period were also considered.

RESULTS: The SF-36 marks of patients with chronic hepatitis B were not significantly different between the 3 types of antiviral treatments. There were no significant differences between the marks of life quality before and after the same treatment. The life quality of patients with different virus loads showed no marked differences, either, at the end of antiviral treatment and following up.

CONCLUSION: The life quality of patients with chronic hepatitis B is not associated with the different antiviral approaches. It is essential that a reasonable and available antiviral approach combined with the positive psychological treatment should be used to improve the patients' life quality.

Key Words: Chronic hepatitis B; Antiviral treatment; SF-36 questionnaire; Life quality

Wang Y, Yu YY, Si CW, Chen XY, Han ZH, Chen YP. Assessment on life quality of patients with chronic hepatitis B after three types of antiviral treatment. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1820-1824

摘要

目的: 探讨不同治疗方法治疗的慢性乙型病毒性肝炎, 对生活质量的影晌。

方法: 选择143例慢性乙型肝炎患者, 随即分为序贯治疗组(拉米夫定+干扰素 α 2b, $n = 56$)、拉米夫定组($n = 60$)、干扰素组($n = 27$)。应用标准化的量表(SF36中文版)评定法, 对全部调查对象进行健康状况调查问卷。每名治疗对象于治疗前、治疗结束、随访结束分别接受评定3次。

结果: 三种不同的治疗方法对慢性乙型肝炎患者的生活质量影响不明显, 同一治疗方法在治疗前、治疗后、随访后患者的生活质量也无显著性差异; 治疗结束和随访结束, 不同病毒载量的患者其生活质量亦没有显著性差异。

结论: 慢性乙型肝炎患者的生活质量与不同的抗病毒治疗方法无关, 临床医师应根据患者的病情选择合理、有效的抗病毒方案并辅以积极的心理干预以最终提高患者生活质量。

关键词: 慢性乙型肝炎; 抗病毒治疗; SF36问卷; 生活质量

王艳, 于岩岩, 斯崇文, 陈新月, 韩忠厚, 陈宇萍. 三种抗病毒治疗方法对慢性乙型肝炎患者生活质量的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1820-1824
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1820.asp

0 引言

SF-36作为健康状况问卷由美国医学疗效研究机构(medical outcomes study, MOS)研究并发展成熟^[1]. 最初, 问卷冗长, 90年代初发展为仅仅包含36个问题的短问卷, 并被广泛应用^[2-9]. 英国于1990年开始应用SF-36问卷, 澳大利亚1992年开始应用, 我国近10 a也应用广泛^[10-11]. 本研究应用SF-36中文问卷, 对143例经三种不同治疗方法治疗的慢性乙型肝炎患者在治疗前后、随访后进行生活质量测评, 并对三种治疗方案治疗前后、随访后的病毒载量、总疗效和生活质量主观指标进行对照分析, 从生活质量的角度进行综合评价。

1 材料和方法

1.1 材料 选择北京大学第一医院感染疾病科、北京市佑安医院、河北省秦皇岛市第三医院、北京市地坛医院、河北省保定市传染病院2003-03/2006-03门诊及住院的慢性乙型肝炎患者143例. 按2000年西安第十次全国病毒性肝炎与肝病学术会议修订的“病毒性肝炎防治方案”的诊断标准^[12]. 年龄在16-65岁, 性别不限; 血清HBsAg阳性持续半年以上、HBeAg阳性、HBV DNA $\geq 10^8$ copies/L; 血清ALT $\geq 2-10$ 倍正常值上限; 血清总胆红素 ≤ 2 倍正常值上限; PTA正常者; 治疗前6 mo未用过抗病毒药及免疫调节剂; 除外合并其他肝炎病毒感染、肝硬化、孕妇、合并其他系统性疾病、不稳定糖尿病、甲亢、SLE等。

表 1 三组患者一般情况的比较

分组	n	年龄(岁)	性别(男)%	病程(mo)
甲	56	30.5 \pm 9.6	68	198.0 \pm 173.3
乙	60	31.0 \pm 9.7	74	216.2 \pm 182.6
丙	27	27.5 \pm 9.1	42	208.6 \pm 155.6
P		0.107	0.766	0.518

1.2 方法 入选143例患者, 随机分为3组: 序贯治疗组56例, 拉米夫定组60例, 干扰素组27例. 临床研究符合GCP规范, 入组前签署知情同意书. 序贯组(甲组): 拉米夫定口服0.1 g, 每日1次, 共8 mo, 第7个月开始加用干扰素 $\alpha 2b$, 5 MIU, 隔日一次肌注, 共用6 mo, 两种药重叠应用2 mo, 总疗程12 mo. 拉米夫定组(乙组): 拉米夫定口服0.1 g, 每日1次, 共12 mo. 干扰素 $\alpha 2b$ 组(丙组): 干扰素 $\alpha 2b$, 5 MIU, 隔日1次肌注, 共6 mo. 三组患者治疗结束后均随访6 mo.

SF36健康状况调查问卷(中文版). 他是一个普适性测定量表, 是国际上普遍认可的代表性生活质量测评工具, 分8个方面, 包括生理功能(PF)、生理职能(RP)、躯体疼痛(BP)、总体健康(GH)、活力(V)、社会功能(SF)、情感职能(RE)和精神健康(MH) 8个领域, 有36个条目, 按百分制评分^[13-14].

应用标准化的量表评定法. 全部调查对象均在无医护人员干扰的情况下, 填写健康状况调查问卷. 每名治疗对象于治疗前、治疗结束、随访结束分别接受评定3次. 由有经验的临床医师在调查前进行调查方法、程序等的培训, 保证患者填表时不受到任何干扰和暗示. 资料收集完成后由项目主持者逐份核查.

统计学处理 数据采用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)和百分数表示, 使用SPSS12.0建立数据库进行统计描述和分析, $P < 0.05$ 为统计学上有显著性差异.

2 结果

年龄、性别和病程经分析, 各组之间差异无显著性统计学意义($P > 0.05$, 表1). 说明三组间具有可比性.

2.1 3种治疗方法对慢性乙型病毒性肝炎生活质量的影响 三组患者治疗前、结束时、随访时生活质量量表的8个纬度用mean \pm SD表示, 结果显示差异无显著性统计学意义($P > 0.05$, 表2-4).

2.2 3种治疗方法组内不同时间点生活质量测评

创新盘点
本研究应用SF-36中文问卷, 对143例经三种不同治疗方法治疗的慢性乙型肝炎患者, 在治疗前后、随访后进行生活质量测评, 并对三种治疗方案治疗前后、随访后的病毒载量、总疗效和生活质量主观指标进行对照分析, 从生活质量的角度进行综合评价, 资料完整, 方法规范。

名词解释

SF36健康状况调查问卷(中文版):是一个普适性测定量表,是国际上普遍认可的代
表性生活质量测评工具,分8个方面,包括生理功能(PF)、生理职能(RP)、躯体疼痛(BP)、总体健康(GH)、活力(V)、社会功能(SF)、情感职能(RE)和精神健康(MH)8个领域,有36个条目,按百分制评分。

表 2 治疗前组间比较(mean ± SD)

分组	n	GH	PF	RP	RE	SF	BP	V	MH	SF36
甲	56	49.11 (19.82)	91.16 (7.63)	65.18 (38.04)	64.88 (38.36)	57.37 (16.99)	76.65 (16.92)	64.20 (15.43)	72.43 (13.53)	71.41 (11.91)
乙	60	50.42 (21.58)	85.83 (14.71)	63.33 (40.77)	63.33 (38.67)	63.33 (22.06)	79.04 (19.34)	65.75 (19.09)	71.20 (15.18)	70.21 (15.59)
丙	27	55.93 (22.41)	86.48 (18.34)	52.78 (40.63)	56.79 (42.18)	67.22 (25.26)	80.28 (18.56)	60.56 (20.16)	73.33 (15.01)	69.42 (17.71)
P		0.375	0.119	0.392	0.671	0.101	0.648	0.461	0.797	0.826

表 3 治疗结束点组间比较(甲、乙组48 wk, 丙组24 wk, mean ± SD)

分组	n	GH	PF	RP	RE	SF	BP	V	MH	SF36
甲	56	52.68 (20.07)	87.50 (18.14)	59.82 (41.47)	68.45 (37.83)	63.62 (17.40)	71.88 (17.30)	62.86 (21.23)	70.21 (16.07)	70.19 (16.85)
乙	60	53.33 (21.17)	88.92 (12.01)	70.42 (33.98)	65.56 (36.81)	65.04 (22.64)	77.75 (21.94)	65.00 (19.16)	71.53 (17.21)	72.50 (14.85)
丙	27	51.85 (18.04)	83.89 (19.63)	55.56 (42.37)	60.49 (39.26)	65.37 (22.82)	79.72 (18.65)	62.59 (15.34)	69.93 (15.15)	68.34 (16.47)
P		0.950	0.418	0.296	0.637	0.910	0.145	0.793	0.876	0.498

表 4 随访结束点组间比较(甲、乙组72 wk, 丙组48 wk, mean ± SD)

分组	n	GH	PF	RP	RE	SF	BP	V	MH	SF36
甲	33	50.61 (20.76)	87.12 (19.41)	61.72 (39.65)	51.04 (42.32)	60.94 (15.80)	73.59 (19.66)	63.44 (16.92)	71.13 (16.18)	67.71 (17.89)
乙	30	54.33 (24.10)	90.50 (11.25)	80.83 (26.82)	73.33 (37.55)	66.25 (23.71)	74.83 (20.51)	65.17 (14.91)	70.07 (15.14)	74.08 (12.73)
丙	27	56.30 (22.71)	85.37 (20.04)	59.26 (41.11)	64.20 (39.14)	64.44 (21.34)	82.50 (16.19)	65.00 (19.12)	73.48 (17.12)	71.03 (18.31)
P		0.608	0.523	0.100	0.091	0.583	0.166	0.908	0.723	0.314

的比较 三组在治疗前、治疗结束、随访结束不同时间点(组内)的生活质量量表的差异无显著性统计学意义($P>0.05$, 表5)。

2.3 治疗结束时病毒载量与生活质量的关 系 治疗结束时,不同病毒载量与生活质量量表的8个纬度的差异无显著性统计学意义($P>0.05$, 表6)。

3 讨论

病毒性肝炎是一种严重影响人们身体健康的疾病。我国有慢性乙型肝炎患者3000万,如未经治疗,慢性乙型肝炎可进展为肝硬化、肝癌,慢性乙型肝炎的治疗最重要的是抗病毒治疗,现有的抗病毒药物主要包括干扰素和核苷类似物,他们都有一定的副作用,如发热、抑郁以及疾病的反弹等,可能影响生活质量,我们探讨了不

表 5 甲、乙、丙三组治疗前、治疗结束、随访结束不同时间点SF-36总分比较(mean ± SD)

时间点	甲组	乙组	丙组
治疗前	71.41 ± 11.91	70.21 ± 15.59	69.42 ± 17.71
治疗结束	70.19 ± 16.85	72.50 ± 14.85	68.34 ± 16.47
随访结束	67.71 ± 17.89	74.08 ± 12.73	71.03 ± 18.31
P	0.371	0.579	0.852

同抗病毒药物治疗慢性乙型肝炎对生活质量的影 响。

对患者生活质量的关注有助于对患者身体和心理的全面了解,这也正符合近些年来医学模式的转变,即从过去的单纯生物型模式逐渐向生物-社会-心理模式的转变,注重疾病整体

表 6 治疗结束时病毒载量与对生活质量的量表的关系(mean ± SD)

病毒量copies/L	n	GH	PF	RP	RE	SF	BP	V	MH	SF36
<10 ⁶	43	55.47 (19.93)	89.07 (13.98)	63.95 (38.69)	69.77 (36.96)	68.02 (18.16)	77.67 (20.04)	65.93 (17.26)	68.56 (15.48)	72.32 (15.02)
10 ⁶ - 10 ⁸	53	51.98 (18.95)	87.08 (14.59)	62.74 (38.49)	61.64 (37.78)	61.13 (20.32)	76.32 (17.70)	62.45 (19.45)	74.04 (15.42)	70.33 (15.31)
>10 ⁸	35	54.86 (20.27)	85.57 (22.45)	65.71 (39.34)	69.52 (36.49)	67.21 (21.66)	76.36 (18.58)	67.71 (17.25)	69.60 (16.70)	71.64 (17.06)
P		0.651	0.655	0.866	0.427	0.188	0.929	0.383	0.200	0.820

同行评价
本文采用循证医学方法对3种不同抗病毒疗法改善患者生活质量进行了研究, 结果对临床医生的治疗有参考意义。

的发生与发展, 从而使患者全身心得到康复. 对生活质量的了解可以从患者的工作、学习、生活、情绪、社交等多个方面进行。

多项研究证实慢乙肝患者生活质量明显低于健康人群^[15-16]. 有研究结果也显示干扰素、拉米夫定、联合治疗, 不同抗病毒治疗方案对患者的生活质量影响差异无统计学意义^[17]. 但易露茜 *et al*^[18]报道拉米夫定治疗6 mo前后慢乙肝患者生活质量有显著性差异。

我们的研究结果显示, 接受干扰素-拉米夫定序贯组、拉米夫定组、干扰素组三种治疗方法的患者, 其生活质量无明显差别; 同一种治疗方法, 在治疗前、治疗结束及随访结束, 其生活质量也无明显变化; 生活质量与治疗后患者的病毒载量无明显相关性。

本研究与某些作者研究结果不同, 分析原因: 本研究入选患者主要是轻、中度肝炎, 治疗前基线生活质量并无明显下降, 因此随后的生活质量改善空间很小; 本研究入选患者多为长期接受治疗监测的患者, 由于心理治疗的及时介入, 使得生活质量的改善不显著; 患者的生活质量是与多方面因素有关的, 如病情的轻重、病程的长短、患者的性格和心理因素、社会与周围环境的影响等^[19-21]. 肝炎患者心理问题的严重程度与其采用消极的应对方式有关, 消极的应对方式可以影响生活质量. 傅文青 *et al*^[22]对152例慢乙肝患者的生活质量评估和医学问卷调查的结果显示, 慢性乙肝患者具有广泛的心理问题, 其中以躯体化、强迫、焦虑、抑郁、敌对为主, 逃避和屈服与心身症状呈正相关, 提示肝炎患者心理问题的严重程度与其采用消极的应对方式有关, 推测肝病对患者造成的心理应激可能是以回避、屈服等消极的应对方式为中介的, 这可解释临床中观察到的病情严重程度与心身症状不一致的现象. 相关分析发现, 回

避和屈服, 尤其是屈服应对与生活质量呈负相关, 说明消极的应对方式可以降低生活质量. 杜耀民 *et al*^[23]与王佳贺 *et al*^[24]报道常规治疗加健康教育, 比单纯常规治疗的患者生活质量明显提高。

因此, 我们认为, 提高慢性乙肝患者生活质量, 除了根据病情选择合理的抗病毒治疗方法外, 还需要配合积极的心理治疗和健康教育. 心理干预的要点是: 帮助患者改变消极的、任由疾病摆布的生活状态, 培养积极乐观的康复信念和生活方式. 只有医疗和心理兼顾的治疗才能最大效能的提高慢性乙型肝炎患者的生活质量, 才能给他们最全面的关爱. 另外, 也需要探讨更有助于反映HBV感染者的生活质量的专用量表, 以期能更好的关注并提高HBV感染者的生活质量。

4 参考文献

- 1 Sanson-Fisher RW, Perkins JJ. Adaptation and validation of the SF-36 Health Survey for use in Australia. *J Clin Epidemiol* 1998; 51: 961-967
- 2 Velanovich V. Comparison of generic (SF-36) vs. disease-specific (GERD-HRQL) quality-of-life scales for gastroesophageal reflux disease. *J Gastrointest Surg* 1998; 2: 141-145
- 3 Kvien TK, Kaasa S, Smedstad LM. Performance of the Norwegian SF-36 Health Survey in patients with rheumatoid arthritis. II. A comparison of the SF-36 with disease-specific measures. *J Clin Epidemiol* 1998; 51: 1077-1086
- 4 Manu MA, Radulescu S, Harza M, Manu R, Capsa D, Sinescu I. Quality of life assessed by SF-36 health survey in renal transplant patients. *Transplant Proc* 2001; 33: 1927-1928
- 5 L Gee, J Abbottt, S Conway, C Etherington, AK Webb. Testing and validation of the SF-36 as a suitable quality of life measure for adults with CF. *Neth J Med* 1999; 54: 75
- 6 J Bellido-Casadoa, J Martyn-Escudero, A Duenas-Laitac, FJ Mena-Martynb, D Arzua-Mouronteb, F Simal-Blancob. The SF-36 Questionnaire as a measurement of health-related quality of life: assessing short- and medium-term effects of exposure to tobacco versus the known long-term

- effects. *Eur J Intern Med* 2004; 15: 511-517
- 7 Failde I, Ramos I. Validity and reliability of the SF-36 Health Survey Questionnaire in patients with coronary artery disease. *J Clin Epidemiol* 2000; 53: 359-365
- 8 Aydemir O, Ozdemir C, Koroglu E. The impact of co-morbid conditions on the SF-36: a primary-care-based study among hypertensives. *Arch Med Res* 2005; 36: 136-141
- 9 Jomeen J, Martin CR. The factor structure of the SF-36 in early pregnancy. *J Psychosom Res* 2005; 59: 131-138
- 10 项凤梅, 符林春, 王永梅. 慢性中度乙型肝炎住院患者 2004; 31: 136-138
- 11 潘化平. 慢性乙型肝炎患者生存质量的测量与评价. *肝脏* 2001; 6: 86-88
- 12 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. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- 13 Ware JE Jr, Gandek B. Overview of the SF-36 Health Survey and the International Quality of Life Assessment (IQOLA) Project. *J Clin Epidemiol* 1998; 51: 903-912
- 14 Apolone G, Mosconi P. The Italian SF-36 Health Survey: translation, validation and norming. *J Clin Epidemiol* 1998; 51: 1025-1036
- 15 Kallman J, O'neil MM, Larive B, Boparai N, Calabrese L, Younossi ZM. Fatigue and Health-Related Quality of Life (HRQL) in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Dig Dis Sci* 2007
- 16 巫贵成, 周卫平, 赵有蓉, 郭树华, 王志毅, 邹淑碧, 张全海, 任红, 黄爱龙, 张定凤. 慢性乙型肝炎患者远期生存质量研究. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 275-277
- 17 陈晓蓓, 龚作炯, 杨丽华. 慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗后生存质量评估. *中华传染病杂志* 2006; 24: 44-48
- 18 易露茜, 杨旭, 王小万. 拉米夫定治疗后慢性乙型肝炎患者的生活质量测评. *中国实用内科杂志* 2004; 24: 737-738
- 19 胡玉琳, 牛俊奇, 苏秀芬. 肝炎患者生活质量调查分析(附142份健康状况调查). *吉林医学(护理版)* 2004; 25: 5-7
- 20 Sobhonslidsuk A, Silpakit C, Kongsakon R, Satitpornkul P, Sripetch C, Khanthavit A. Factors influencing health-related quality of life in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 7786-7791
- 21 von Wagner M, Lee JH, Kronenberger B, Friedl R, Sarrazin C, Teuber G, Herrmann E, Zeuzem S. Impaired health-related quality of life in patients with chronic hepatitis C and persistently normal aminotransferase levels. *J Viral Hepat* 2006; 13: 828-834
- 22 傅文青, 张静, 于宏华, 李茹, 王磊. 慢性乙型肝炎患者心身症状和应对方式对生活质量的. *中国临床心理学杂志* 2004; 12: 281-283
- 23 杜耀民, 黄东锋. 健康教育对慢性乙型病毒性肝炎患者生活质量的影响. *中国临床康复* 2004; 8: 3440-3441
- 24 王佳贺, 张姝娜, 陈佰义. 心理行为干预对慢性丙型肝炎患者生活质量的影响. *中国临床康复* 2005; 9: 35, 37

电编 张敏 编辑 张焕兰

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 2007-01-30)

细胞色素P450E1酶与非酒精性脂肪肝的关系

郭艳梅, 王沁, 祁志

郭艳梅, 甘肃中医学院临床医疗系 甘肃省兰州市 730000
王沁, 祁志, 兰州大学第一医院消化科 甘肃省兰州市 730000
郭艳梅, 2004级兰州大学临床医学院硕士研究生, 主要从事酒精性肝病研究。

通讯作者: 郭艳梅, 730000, 甘肃中医学院临床医疗系。
guoyanmei100@126.com

电话: 0931-8625200

收稿日期: 2007-02-02 接受日期: 2007-03-17

Association of CYP2E1 enzymes and susceptibility for non-alcoholic liver disease

Yan-Mei Guo, Qin Wang, Zhi Qi

Yan-Mei Guo, Department of Clinical Medicine, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Qin Wang, Zhi Qi, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Correspondence to: Yan-Mei Guo, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China. guoyanmei100@126.com

Received: 2007-02-02 Accepted: 2007-03-17

Abstract

AIM: To investigate correlations between cytochrome P450E1 (CYP2E1) enzyme gene polymorphisms and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD).

METHODS: A polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method was used to determined polymorphisms of CYP2E1 *Pst* I and *Rsa* I sites.

RESULTS: Genotypes were separated into three: type A (homozygous for *c1* gene), type B (heterozygous for *c1/c2* gene), and type C (homozygous for *c2* gene). In 20 healthy controls, *c1* frequency was 85.0% and *c2* 15.0%. In 40 patients with NAFLD, *c1* was 58.8% and *c2* 41.2%. Comparing the NAFLD group with the healthy controls, *c1* was decreased and *c2* increased, significantly ($P = 0.004$). Comparing the NAFLD group with the alcoholic liver disease group, the frequency of the *c2* allele gene was not significantly different ($P = 0.896$). In the NAFLD group

the frequency of the *c2* allele gene increased with the degree of pathogenesis of liver disease ($P = 0.000$).

CONCLUSION: The genetic polymorphism of CYP2E1 at the *Pst* I and *Rsa* I sites is associated with susceptibility for NAFLD.

Key Words: Non-alcoholic fatty liver disease; Genetic polymorphism; Cytochrome P450E1

Guo YM, Wang Q, Qi Z. Association of CYP2E1 enzymes and susceptibility for non-alcoholic liver disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1825-1829

摘要

目的: 探讨细胞色素P450E1(CYP2E1)酶基因多态性与非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的关系及NAFLD的遗传学发病机制。

方法: 采用聚合酶链反应——限制性片段长度多态性分析法(PCR-RFLP)对40例非酒精性脂肪肝患者, 20例酒精性肝病患者, 20例非脂肪肝对照组, 20例正常对照者分析CYP2E1基因多态性, 并进行相关性分析。

结果: NAFLD中*c2*等位基因型与正常对照组($\chi^2 = 8.376$, $P = 0.004$)和非脂肪肝对照组($\chi^2 = 6.769$, $P = 0.005$)相比明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$), NAFLD中基因型分布与酒精性肝病相比无明显改变, 差异无统计学意义($P = 0.896$)。在NAFLD中肝脏病变程度不同, *c2*等位基因频率不同, 在脂肪性肝炎($P = 0.04$)和肝硬化($P = 0.000$)中, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: NAFLD与CYP2E1酶基因多态性有关, 同时也为研究NAFLD遗传易感性提供了新的思路。

关键词: 非酒精性脂肪性肝病; 基因多态性; 细胞色素P450E1

郭艳梅, 王沁, 祁志. 细胞色素P450E1酶与非酒精性脂肪肝的关系. *世界华人消化杂志* 2007;15(16):1825-1829
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1825.asp>

背景资料

CYP2E1酶是二甲亚硝胺D-脱甲基酶, 主要在肝脏表达, 参与许多外源性化合物的代谢。有关CYP2E1酶与酒精性脂肪肝肝纤维化的关系虽有部分文献报道, 但CYP2E1酶基因与非酒精性脂肪肝肝纤维化相关性的研究, 迄今国内外均少见。关于CYP2E1酶和脂肪肝易感性、肝纤维化机制的研究已成为热点。

相关报道

国内外研究表明, CYP2E1在酒精性肝病中表达明显增强, 主要参与氧化应激-脂质过氧化损伤. 在高脂饮食诱导的脂肪肝大鼠CYP2E1表达与酒精性脂肪肝相似, 即在腺泡3区表达增强, 且脂肪肝程度的加重, 表达逐渐增高. 在脂肪肝患者, CYP2E1的含量和活性均增加, 而且, 随着脂肪肝病理严重程度增加而增加.

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一类肝组织学与酒精性肝病相似^[1-2], 但无过量饮酒史的临床病理综合征, 包括单纯性脂肪肝, 脂肪性肝炎和肝硬化三种病理类型. NAFLD的病因和发病机制较复杂, 迄今尚未完全明了. 文献报道遗传易感性与其发病关系密切^[3]. 细胞色素P4502E1(cytochrome P4502E1, CYP2E1)是细胞色素P450的乙醇诱导形式, 在非乙醇脱氢酶氧化途径中起重要作用, 是酒精性脂肪肝的主要发病形式^[4-6]. 而NAFLD与酒精性脂肪肝有相似的病理特征, 推测CYP2E1可能在NAFLD发病中起一定作用. 我们利用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP), 研究CYP2E1基因多态性与NAFLD发病的关系, 以寻找NAFLD的易感因素, 并从分子水平探讨该病的发病机制.

1 材料和方法

1.1 材料 所有研究对象均来自2006-03-01/11-28在兰州大学第一医院消化科住院及门诊患者以及健康体检中心体检者, 均为长期(10 a以上)居住在甘肃地区无血缘关系的甘肃籍汉族人. 检测生化全项(肝功、血脂)、肝纤维化4项、肝脏B超. 非酒精性脂肪性肝病组40例, 男/女: 29/11, 平均年龄 50 ± 6.25 岁, 诊断标准符合2006-03中华医学会肝病学会通过的“非酒精性肝病诊疗指南”^[7]; 并排除病毒性、药物性、自身免疫性肝病. NAFLD组根据生化全项, 肝脏B超, CT检查及肝脏穿刺活检分为单纯性脂肪肝, 脂肪性肝炎(5例为穿刺活检证实)和肝硬化(10例为穿刺活检证实)3组. NAFLD组根据伴随症状不同分为肥胖组(体质量指数: 女 ≥ 25 , 男 ≥ 27)和糖尿病组, 诊断符合WHO 1999年糖尿病诊断标准^[8]. 酒精性肝病组20例, 均为男性, 平均年龄 51 ± 6.43 岁, 诊断标准符合2006年“酒精性肝病诊疗指南”^[9]. 非脂肪肝对照组20例, 暴露因素相似, 无肝脏疾病, 男/女: 8/12, 平均年龄 50 ± 4.32 岁. 健康对照组20例, 来自健康体检人群, 男/女: 10/10, 平均年龄 49 ± 5.22 岁, B超、生化全项、肝纤维化4项均正常, 不吸烟、不饮酒. 空腹抽取静脉血2 mL乙二胺四乙酸防凝处理后-80℃保存备用. 聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增仪, Eneamp system 2400

型, 美国Perkin-Elmer公司生产. 凝胶成像系统: HOOD-SN73S100108型, BIO-RAD, 意大利米兰生产. 内切酶*Rsa* I 和*Pst* I 酶购自Sangon公司. 扩增CYP2E1基因的引物由Sangon公司合成. 引物1: 5'-CCAGTCGAGTCTACAT TGTCA-3'; 引物2: 5'-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3'.

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA制备 用血液基因组DNA抽提试剂盒按说明书提纯DNA.

1.2.2 PCR反应条件 94℃预变性2 min后, 94℃变性1 min, 50℃退火50 s, 72℃延伸50 s, 共40个循环. 72℃延伸10 min.

1.2.3 酶切及电泳 在检测PCR扩增产物后, 分别用限制性内切酶*Rsa* I 或*Pst* I 消化PCR产物, 37℃电热恒温水浴箱孵育18 h. 加样于25 g/L琼脂糖凝胶上, 70 V恒压条件垂直电泳45 min. 凝胶电泳成像分析系统扫描分析仪分析各基因型并拍照.

统计学处理 采用SPSS10.0软件进行*t*检验, χ^2 检验. 对群体数据作Hardy-Weinberg平衡吻合度检验.

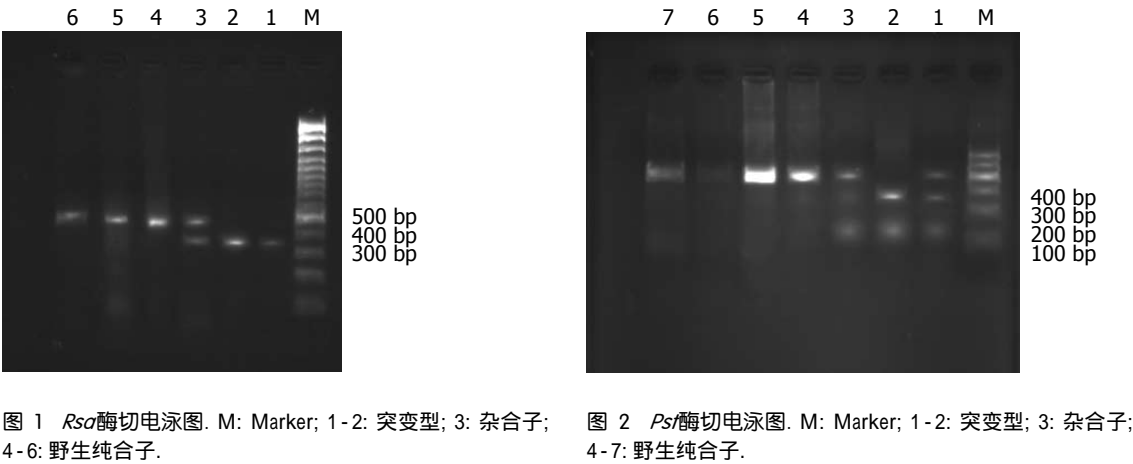
2 结果

2.1 CYP2E1酶基因多态性 *Rsa* I 的酶切位点存在-1053 C/T突变, 酶切后野生纯合子片段为360和50 bp; 杂合子为410, 360和50 bp; 突变纯合子片段为410 bp^[10](图1). *Pst* I 的酶切位点存在-1293 G/C突变, 酶切后野生纯合子片段为290和120 bp; 杂合子为410, 290和120 bp; 突变纯合子片段为410 bp(图2).

2.2 非酒精性脂肪性肝病组与酒精性肝病组、非脂肪肝对照组、正常对照组基因型分布 非酒精性脂肪性肝病组与正常对照组相比c2等位基因型明显升高, 差异有统计学意义($\chi^2 = 8.376$, $P < 0.05$). NAFLD组与非脂肪肝对照组相比c2等位基因型明显升高, 差异有统计学意义($\chi^2 = 6.769$, $P \leq 0.05$). NAFLD组与酒精性肝病组相比, 基因型无明显改变, 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.017$, $P \geq 0.05$, 表1).

2.3 CYP2E1酶基因型与非酒精性脂肪性肝病的关系 NAFLD中, 肝脏病变程度不同, c2等位基因频率不同, 差异有统计学意义(表2).

2.4 非酒精性脂肪性肝病不同伴发症与CYP2E1基因型的关系 NAFLD伴肥胖与NAFLD伴糖尿病等位基因分布无显著性差异($\chi^2 = 0.052$, $P > 0.05$, 表3).



创新盘点
在非酒精性脂肪肝中, 各基因型分布与酒精性脂肪肝分布相似, 以*c2*型为主. 说明*c2*型基因在非酒精性脂肪肝发生中起着重要的作用, 其发病机制与酒精性肝病有相似之处. 非酒精性脂肪肝随肝脏病变程度增加, *c2*等位基因明显升高, 进一步证实*c2*等位基因与非酒精性脂肪肝的发病相关, 并更容易发展为肝硬化.

表 1 非酒精性脂肪性肝病组基因型分布

分组	<i>n</i>	基因型			基因型		χ^2	<i>P</i>
		A (<i>c1/c1</i>)	B (<i>c1/c2</i>)	C (<i>c2/c2</i>)	<i>c1</i>	<i>c2</i>		
非酒精性脂肪性肝病	40	12(30.0%)	23(57.5%)	5(12.5%)	47(58.8%)	33(41.2%)		
酒精性肝病对照	20	6(30.0%)	12(60.0%)	2(10.0%)	24(60.0%)	16(40.0%)	0.017	0.896(>0.05)
非脂肪肝对照	20	13(65.0%)	7(35.0%)	0	33(82.5%)	7(17.5%)	6.769	0.005(<0.05)
正常对照	20	14(70.0%)	6(30.0%)	0	34(85.0%)	6(15.0%)	8.376	0.004(<0.05)

表 2 CYP2E1基因型与非酒精性脂肪性肝病的关系(*n*, %)

分组	<i>n</i>	基因型			基因型		χ^2	<i>P</i>
		A (<i>c1/c1</i>)	B (<i>c1/c2</i>)	C (<i>c2/c2</i>)	<i>c1</i>	<i>c2</i>		
单纯性脂肪肝	13	10(76.9%)	3(23.1%)	0	23(88.5%)	3(11.5%)		
脂肪性肝炎	10	1(10.0%)	8(80.0%)	1(10.0%)	10(50.0%)	10(50.0%)	8.248	0.04(<0.05)
肝硬化	17	1(5.9%)	12(70.6%)	4(23.5%)	14(41.2%)	20(58.8%)	13.935	0.000(<0.05)

表 3 非酒精性脂肪肝不同伴发症基因型分布

分组	<i>n</i>	基因型			基因型		χ^2	<i>P</i>
		A (<i>c1/c1</i>)	B (<i>c1/c2</i>)	C (<i>c2/c2</i>)	<i>c1</i>	<i>c2</i>		
肥胖	20	5(25.0%)	13(65.0%)	2(10.0%)	23(57.5%)	17(42.5%)		
糖尿病	20	7(35.0%)	10(50.0%)	3(15.0%)	24(60.0%)	16(40.0%)	0.052	0.820(>0.05)

3 讨论

CYP2E1酶是二甲基亚硝胺D-脱甲基酶, 主要在肝脏表达^[11-12], 参与许多外源性化合物的代谢^[13]. 大量证据表明, CYP2E1在酒精性肝病中表达明显增强^[14-19], 主要参与氧应激-脂质过氧化损伤. 而非酒精性脂肪性肝病的组织病理学变化与酒精性脂肪肝相似, 推测两者在引起肝

脏损害中有相似的致病机制. 动物实验证明, 在高脂饮食诱导的脂肪肝大鼠CYP2E1表达与酒精性脂肪肝相似, 即在腺泡3区表达增强, 且脂肪肝程度的加重, 表达逐渐增高^[13,17,20-27]. 有研究证实在脂肪肝患者, CYP2E1的含量和活性均增加^[28], 而且, 随着脂肪肝形态学上的病理严重程度增加而增加^[29-30]. CYP2E1酶基因位于人第

应用要点
CYP2E1酶基因多态性在非酒精性脂肪肝的发生、发展中具有重要作用,其中c2等位基因与非酒精性脂肪肝的遗传易感性有关。CYP2E1可作为非酒精性脂肪肝判断肝纤维化程度和预后的指标。

10号染色体上,长11413个碱基对,包括9个外显子和8个内含子^[31],CYP2E1基因存在6种限制性内切酶片段长度多态性,其中5'-端的Rsa I/Pst I多态是两个连锁多态不平衡,存在c1单倍型(Rsa I+, Pst I-)和c2单倍型(Rsa I-, Pst I+). Rsa I/Pst I酶切位点的变异在转录水平影响CYP2E1的表达,c2位基因使其增加^[32-33]. 本研究所有数据符合Hardy-Weinberg平衡吻合度检验,说明群体基因遗传平衡,来自同一蒙德尔群体. 研究结果发现CYP2E1至少可分为3个基因型,即A型(c1基因纯合子)、B型(c1/c2基因的杂合子)及C型(c2基因的纯合子). 在20例健康对照组中,A型为主,说明在正常人群中以c1型为主. 在NAFLD中,各基因型分布与正常人群相比差异有统计学意义,这与以往研究相符^[29,34];与酒精性脂肪肝分布相似,以c2型为主. 说明c2型基因在NAFLD发生中起着重要的作用,其发病机制与酒精性肝病有相似之处. 在不同伴发症NAFLD中无统计学差异,即基因型与伴发症无关. NAFLD随肝脏病变程度增加,c2等位基因明显升高,进一步证实c2等位基因与NAFLD的发病相关,并更容易发展为肝硬化.

总之,CYP2E1酶基因多态性在NAFLD的发生、发展中具有重要意义,其中c2等位基因与NAFLD的遗传易感性有关,同时也为研究NAFLD遗传易感性提供了新的思路.

4 参考文献

- 史洪涛, 陈东风, 李陶, 熊仁平. 非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞色素P450 2E1基因及表达变化的意义. 中华肝病杂志 2005; 13: 154-155
- Lieber CS. CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatol Res* 2004; 28: 1-11
- Yu AS, Keffe EB. Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2002; 2: 11-19
- Gemma S, Vichi S, Testai E. Individual susceptibility and alcohol effects: biochemical and genetic aspects. *Ann Ist Super Sanita* 2006; 42: 8-16
- Zhuge J, Luo Y, Yu YN. Heterologous expression of human cytochrome P450 2E1 in HepG2 cell line. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2732-2736
- Castaneda F, Rosin-Steiner S. Low concentration of ethanol induce apoptosis in HepG2 cells: role of various signal transduction pathways. *Int J Med Sci* 2006; 3: 160-167
- 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. 中华肝病杂志 2006; 14: 161-163
- 何兴华. 糖尿病的诊断标准. 西部医学 2006; 18: 180
- 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南. 中华肝病杂志 2006; 14: 164-166
- Ulusoy G, Arinc E, Adali O. Genotype and allele frequencies of polymorphic CYP2E1 in the Turkish population. *Arch Toxicol* 2007
- Pentiuk OO, Kachula SO, Herych OKh. Cytochrome P4502E1. Polymorphism, physiological function, regulation, and role in pathology. *Ukr Biokhim Zh* 2004; 76: 16-28
- Plumlee CR, Lazaro CA, Fausto N, Polyak SJ. Effect of ethanol on innate antiviral pathways and HCV replication in human liver cells. *Virology* 2005; 2: 89
- Nielsen JS, Moller BL. Cloning and expression of cytochrome P450 enzymes catalyzing the conversion of tyrosine to p-hydroxyphenylacetaldehyde in the biosynthesis of cyanogenic glucosides in *Triglochin maritima*. *Plant Physiol* 2000; 122: 1311-1321
- Lieber CS. Pathogenesis and treatment of alcoholic liver disease: progress over the last 50 years. *Rocz Akad Med Bialymst* 2005; 50: 7-20
- Wong NA, Rae F, Simpson KJ, Murray GD, Harrison DJ. Genetic polymorphisms of cytochrome p4502E1 and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a white population: a study and literature review, including meta-analysis. *Mol Pathol* 2000; 53: 88-93
- Tsutsumi M, Takada A, Wang JS. Genetic polymorphisms of cytochrome P4502E1 related to the development of alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1994; 107: 1430-1435
- Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 2004; 34: 9-19
- Konishi T, Calvillo M, Leng AS, Feng J, Lee T, Lee H, Smith JL, Sial SH, Berman N, French S, Eysselein V, Lin KM, Wan YJ. The ADH3*2 and CYP2E1 c2 alleles increase the risk of alcoholism in Mexican American men. *Exp Mol Pathol* 2003; 74: 183-189
- 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
- Quertemont E. Genetic polymorphism in ethanol metabolism: acetaldehyde contribution to alcohol abuse and alcoholism. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 570-581
- Gonzalez FJ. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutat Res* 2005; 569: 101-110
- Rana SV, Chaudhary N, Verma Y. Circadian variation in lipid peroxidation induced by benzene in rats. *Indian J Exp Biol* 2007; 45: 253-257
- Xu Y, Leo MA, Lieber CS. DLPC attenuates alcohol-induced cytotoxicity in HepG2 cells expressing CYP2E1. *Alcohol Alcohol* 2005; 40: 172-175
- Hayashi N, Tsutsumi M, Fukura M, Yano H, Tsuchishima M, Takase S. Effect of chronic dietary ethanol consumption on colonic cancer in rats induced by 1,1-dimethylhydrazine. *Alcohol Clin Exp Res* 2007; 31: S72-76
- Kim BJ, Hood BL, Aragon RA, Hardwick JP, Conrads TP, Veenstra TD, Song BJ. Increased oxidation and degradation of cytosolic proteins in alcohol-exposed mouse liver and hepatoma cells. *Proteomics* 2006; 6: 1250-1260
- Zhou Z, Wang L, Song Z, Saari JT, McClain CJ, Kang YJ. Zinc supplementation prevents alcoholic liver injury in mice through attenuation of oxidative

- stress. *Am J Pathol* 2005; 166: 1681-1690
- 27 Arsov T, Larter CZ, Nolan CJ, Petrovsky N, Goodnow CC, Teoh NC, Yeh MM, Farrell GC. Adaptive failure to high-fat diet characterizes steatohepatitis in Alms1 mutant mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 1152-1159
- 28 Wan J, Ernstgard L, Song BJ, Shoaf SE. Chlorzoxazone metabolism is increased in fasted Sprague-Dawley rats. *J Pharm Pharmacol* 2006; 58: 51-61
- 29 Orellana M, Rodrigo R, Varela N, Araya J, Poniachik J, Csendes A, Smok G, Videla LA. Relationship between in vivo chlorzoxazone hydroxylation, hepatic cytochrome P450 2E1 content and liver injury in obese non-alcoholic fatty liver disease patients. *Hepatol Res* 2006; 34: 57-63
- 30 Wu D, Cederbaum A. Nitric oxide donors prevent while the nitric oxide synthase inhibitor L-NAME increases arachidonic acid plus CYP2E1-dependent toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 216: 282-292
- 31 Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 502-509
- 32 Orellana M, Guajardo V. Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. *Rev Med Chil* 2004; 132: 85-94
- 33 Chelule PK, Pegoraro RJ, Gqaleni N, Dutton MF. The frequency of cytochrome P450 2E1 polymorphisms in Black South Africans. *Dis Markers* 2006; 22: 351-354
- 34 Piao YF, Li JT, Shi Y. Relationship between genetic polymorphism of cytochrome P450IIE1 and fatty liver. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2612-2615

同行评价
目前对于非酒精性脂肪性肝病遗传易感性的相关筛选基因有细胞色素P450, SCD, TNF- α 等炎症细胞因子等。其中, P4502E1在氧化应激和NASH两次打击学说中都占有重要的地位。本文对P4502E1的基因多态性与非酒精性脂肪肝关系进行分析, 立意新颖, 有可读性和学术价值。

电编 张敏 编辑 王晓瑜

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

• 消息 •

《功能性胃肠病诊治进展》通知

本刊讯 经卫生部批准, 由甘肃省人民医院消化科主办的2007年国家继续医学教育项目“功能性胃肠病诊治进展”(项目编号: 2007-0-0-02), 定于2007-09-01/05在甘肃兰州举行。学习班期间将邀请国内及省内知名消化专家, 讲授功能性胃肠病诊治进展。

1 授课内容

功能性胃肠病罗马III分类及诊断标准的核心内容, 有消化道症状的抑郁及焦虑症状的判定评分标。伴有抑郁及焦虑症状的功能性胃肠病患者的心理治疗, 便秘及腹泻型IBS、功能性腹胀、功能性便秘等, 功能性烧心、食管源性胸痛、功能性吞咽困难, 食管压力测定的临床意义; 糖尿病人食管压力测定结果与正常人群食管压力测定结果对比分析; 功能性消化不良、反刍综合征等; 胆囊及Oddi括约肌功能紊乱的诊断和治疗; 功能性大便失禁、功能性肛门直肠疼痛、功能性排便障碍; 功能性腹痛的诊断标准及治疗, 兰州地区50例健康成人食管PH测定结果分析; 食管PH监测的临床意义; 胃食管反流病人反流程度不同伴有不同的症状积分; 治疗功能性胃肠道疾病新方法疗效的临床试验设计; 学习班结业时授予国家级继续医学教育项目学分12学分。学习班费用(含资料及证书费): 680元。食宿统一安排。费用自理。

有意参加者请于2007-07-25日前将回执寄至甘肃省人民医院消化科, 以便预定房间并发第二轮通知。

2 联系方式

兰州市东岗西路160号甘肃省人民医院消化科; 邮编: 730000 联系人: 陈翔; 电话: 0931-8281140; 8281141

PET/CT在胰腺癌临床应用中的进展

王荣福

背景资料
PET/CT将PET的功能显像与CT的解剖成像有机融合, 不仅显示脏器或病变的位置、形态、大小等解剖学结构, 更同时提供有关脏器和病变的血流、功能、代谢和/或受体密度, 甚至是分子水平的化学信息, 有助于疾病的早期诊断、诊疗指导、疗效监控和预后评价等。PET/CT显像为无创性检查, 具有灵敏度高、安全性好的优点。随着多种正电子药物的开发以及融合图像技术的发展, PET/CT在临床疾病诊断, 尤其是肿瘤诊断中具有重要的应用价值。

王荣福, 北京大学第一医院核医学科北京市 100034
国家重点基础研究发展计划基金-973计划, No. 2006CB705705
北京大学985 II期基金资助, NO. 985-2-056
通讯作者: 王荣福, 100034, 北京大学第一医院核医学科。
Rongfu_wang2003@yahoo.com.cn
电话: 010-66551122-2594
收稿日期: 2007-01-17 接受日期: 2007-04-02

Progress in the clinical application of in patients with pancreatic cancer

Rong-Fu Wang

Rong-Fu Wang, Department of Nuclear Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China
Supported by National Basic Research Program-973 Program of China, No. 2006CB705705; and 985-II Project Foundation of Peking University, No. 985-2-056
Correspondence to: Rong-Fu Wang, Department of Nuclear Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China. rongfu_wang2003@yahoo.com
Received: 2007-01-17 Accepted: 2007-04-02

Abstract

Pancreatic cancer, which has high morbidity, difficult diagnosis, and poor treatment results, is a type of malignant tumor in the digestive system. Positron emission tomography-computed tomography, an important imaging modality in modern medicine, combines the functional imaging of PET and the anatomic imaging of CT to efficiently image tumor metabolism, proliferation, hypoxia and cell apoptosis. It can also precisely image the anatomic structure of tumors and their adjacent organs or tissues. Positron emission tomography-computed tomography was found to be particularly helpful for guiding diagnosis and therapy, the staging and grading of tumors, monitoring therapy and in evaluating the prognosis of patients with pancreatic cancer.

Key Words: Positron emission tomography-computed tomography; Pancreatic cancer; Clinical application; Progression

Wang RF. Progress in the clinical application of Positron emission tomography-computed tomography in patients

with pancreatic cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(16):1830-1834

摘要

胰腺癌是一类发病率高、早期诊断困难、治疗疗效不佳的消化系统恶性肿瘤。PET/CT作为现代医学成像重要组成内容之一, 将PET的功能显像与CT的解剖成像有机融合, 不仅能有效显示肿瘤的代谢、增生、乏氧和细胞凋亡状态, 而且能精确显示肿瘤与其周围脏器组织的解剖结构。在胰腺癌患者的诊疗指导、肿瘤分期、疗效监控和预后评价等方面, PET/CT都具有重要的临床应用价值。本文将简要介绍PET/CT在胰腺癌临床应用中的进展情况。

关键词: PET/CT; 胰腺癌; 临床应用; 进展

王荣福, PET/CT在胰腺癌临床应用中的进展。世界华人消化杂志 2007;15(16):1830-1834
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1830.asp>

0 引言

胰腺癌(pancreatic cancer)是胰外分泌性恶性肿瘤, 发病率仅次于胃癌、食管癌、肝癌、大肠癌, 居消化系统恶性肿瘤第五位, 近年呈增多趋势。我国胰腺癌的年发病率为5.1/10万, 好发年龄在40-70岁之间, 男性多于女性。由于胰腺癌的临床表现较多样化, 常与癌肿的部位、病程早晚、远近组织受累、转移及有关并发症因素有关; 而且生长较快, 很早发生转移, 所以早期诊断困难, 绝大多数患者一经确诊已属晚期。据统计, 未经治疗的胰腺癌患者, 90%以上于诊断明确后1 a内死亡。只有10%-15%的患者有手术切除的机会, 其中能根治者仅为5%-7.5%。美国国立卫生研究院报告, 胰腺癌1 a生存率为8%, 5 a生存率为3%, 中位生存期仅2-3 mo。我国外科的统计资料显示, 胰腺癌患者的5 a生存率在5%左右。

鉴于胰腺癌患者的预后极差, 因此应用合适方法进行早期诊断, 进而采取适当手段干预治疗就显得至关重要。目前, 常用的筛选胰腺癌

的方法是肿瘤标志物CA19-9测定, 70%-90%的胰腺癌患者的血清CA19-9水平升高, 但是该方法的特异性不强^[1]. 影像诊断方法主要有计算机体层摄影(CT)、门静脉造影(portocavogram)、核磁共振成像(MRI)、内镜逆行胆胰管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)、超声内镜(ultrasonic endoscope)等, 其中CT检查是临床上最常应用的诊断胰腺癌手段. 随着正电子发射计算机断层/计算机体层摄影(PET/CT)的逐渐应用, 其在胰腺癌的临床应用价值也日趋显著. 本文将就PET/CT在临床应用中的进展以及他与其他影像诊断技术之间的比较综述如下.

1 PET/CT在胰腺癌临床诊断中的应用

PET/CT是现代医学成像重要组成内容之一, 其显像原理与X线、B超、CT和MR等检查截然不同, 是通过探测器接收并记录引入体内靶组织或器官的正电子药物发射的核射线; 然后以影像的方式显示出来, 不仅可以显示脏器或病变的位置、形态、大小等解剖学结构, 更可以同时提供有关脏器和病变的血流、功能、代谢和/或受体密度, 甚至是分子水平的化学信息, 因此有助于疾病的早期诊断. 此外, PET/CT显像为无创性检查, 所用的放射性核素半衰期短, 显像剂化学量极微, 患者所接受的辐射吸收剂量低, 发生毒副作用的几率极低^[2]. 目前, 随着多种正电子药物的开发以及融合图像技术的发展, PET/CT在临床疾病诊断, 尤其是肿瘤诊断中具有重要的应用价值.

1.1 葡萄糖代谢显像 氟[¹⁸F]-氟代脱氧葡萄糖(¹⁸F-fluorodeoxyglucose, ¹⁸F-FDG)是目前临床上应用最多的肿瘤代谢显像剂. 他与天然葡萄糖的化学结构相似, 在己糖激酶的作用下, 磷酸化成6-磷酸氟代脱氧葡萄糖(¹⁸F-FDG-6-PO₄). 但与葡萄糖代谢不同的是, ¹⁸F-FDG-6-PO₄不是磷酸己糖变构酶的底物, 不能继续进一步的代谢反应; 而且带负电荷, 不能反向通过细胞膜离开细胞; 另外, 肿瘤细胞内使¹⁸F-FDG-6-PO₄去磷酸化的葡萄糖-6-磷酸酶活性极低, 所以¹⁸F-FDG-6-PO₄最后滞留在肿瘤细胞内, 其滞留率与葡萄糖在体内的代谢率具有一定的比例关系. 通过PET/CT探测¹⁸F湮灭辐射后发射的高能射线, 再经过计算机的处理, 就可以获得¹⁸F-FDG在体内的分布影像, 该影像实质是反应体内葡萄糖代谢的状态和水平^[3]. 由于恶性肿瘤如胰腺癌具有异常旺盛的

糖酵解, 因此在¹⁸F-FDG代谢显像上具有一定的基本特征, 即肿瘤病灶处出现异常增高并且持续存在的¹⁸F-FDG摄取, 摄取增高程度与肿瘤的病理类型、大小和所处肿瘤增殖周期的不同阶段密切相关.

1.1.1 在胰腺癌治疗指导中的应用 胰腺癌的主要治疗手段是手术治疗, 但是仅有20%的胰腺癌患者有手术治疗的机会^[4]. 通常导致胰腺癌手术无法正确实施的困难在于以下两方面: 一, 缺乏组织学诊断, 错过了切除恶性胰腺肿瘤的良机; 二, 临床上疑似恶性胰腺肿瘤, 实为良性病变, 却采取了手术切除措施. 这些无疑都给患者带来极大的痛苦.

多项研究表明, ¹⁸F-FDG PET显像相较于CT来说, 可以提高术前胰腺癌患者的诊断精确度(达到85%-93%), 而且显像灵敏度达到85%-100%, 特异性为67%-99%. 另外, CT成像灵敏度随着胰腺癌病灶大小的增加而提高, 而¹⁸F-FDG PET显像的灵敏度是不依赖于病灶的大小^[5]. PET/CT图像的融合, 将PET与CT在诊断胰腺癌方面的优势结合起来, 不仅能够准确显示出病灶范围、大小、与邻近组织器官的关系, 还能够区分肿瘤的良恶性, 提供肿瘤生物学活性的信息, 从而有助于判断是否适宜进行手术治疗以及采取何种手术方法. 另一方面, 对于原发病灶未明的患者, PET/CT全身显像有助于追溯原发病灶(主要是肺癌或胰腺癌), 从而有效地制定治疗方案^[6].

Heinrich *et al*^[7]对已确诊并拟定手术治疗的胰腺癌患者行PET/CT检查, 诊断的阳性率达到91%, 其中16%的患者在检查之后确定无手术适应证而改变治疗方案. Nishiyama *et al*^[8]对86例胰腺肿瘤患者(55例为胰腺癌, 31例为良性病变)进行临床试验, 评价¹⁸F-FDG PET延迟显像是否更有助于区分良恶性病灶以及是否能够发现更多的病灶. 他们采用SUV(standard uptake value)值作为分析指标, 并且计算滞留指数(retention index, RI) = $(SUV_{延迟} - SUV_{早期}) \times 100 / SUV_{早期}$, 其中延迟显像为注射¹⁸F-FDG后2 h, 早期显像为注射¹⁸F-FDG后1 h. 结果发现: RI的诊断精确度达到88%; 胰腺癌患者的SUV_{延迟}平均值显著高于SUV_{早期}平均值; 而且仅在延迟图像中观察到2例肝转移、1例淋巴结转移. 通过研究结果, 得出结论: ¹⁸F-FDG PET延迟显像有助于区分病灶的良恶性, 并且有助于发现更多的转移病灶, 从而有利于正确地实施治疗方案.

相关报道
CT检查是临床上最常应用的诊断胰腺癌的手段. 随着PET/CT的逐渐应用, 临床试验研究表明其对胰腺癌的治疗指导、肿瘤分期、疗效监控与预后评价等临床应用价值也日趋显著.

名词解释

1 PET/CT: 通过探测器接收并记录引入体内靶组织或器官的正电子药物发射的核射线, 以影像的方式显示。将PET的功能显像与CT的解剖成像有机融合。
2 ^{18}F -FDG: 即氟 [^{18}F] 标记的氟代脱氧葡萄糖 (^{18}F -fluorodeoxyglucose, ^{18}F -FDG)。他与天然葡萄糖的化学结构相似, 引入体内后, PET显像结果反应体内葡萄糖代谢的状态和水平。是目前临床上应用最多的肿瘤代谢显像剂。

1.1.2 在胰腺癌肿瘤分期中的应用 研究发现, 在诊断II期胰腺癌方面, 解剖性成像技术(如CT、MRI)具有较大的优势; 但是, 在诊断III期(淋巴结转移)和IV期(远处转移)胰腺癌方面, 功能性显像如 ^{18}F -FDG PET具有较高的诊断效率^[4]。

一项临床研究^[9]报道, 对42例未经过任何治疗的胰腺癌患者行 ^{18}F -FDG PET全身显像, 然后结合临床症状、体征和放射学资料进行肿瘤分期。结果表明: PET显像的诊断精确度达到81%; 他能发现7例患者身上的共8处转移灶, 而相应的CT检查结果为阴性。最后, 依据PET显像结果, 有5例患者的临床分期做出相应修改。

临床上, 胰腺癌的患者通常发生原位复发、肝转移和腹膜转移等恶性肿瘤征象, 但是很少见有胃转移的病例。Takamori *et al*^[10]报道1例胰体癌患者(49岁, 女性, 行远端胰腺切除术后合并放疗), 通过 ^{18}F -FDG显像, 发现在胃部出现一高摄取区域, 经组织学诊断确定为胃转移癌。

另一项研究中, 对31例胰腺癌术后患者进行随访(分别进行 ^{18}F -FDG PET显像和CT/MRI扫描), 发现其中25例患者出现复发病灶, ^{18}F -FDG PET的诊断率为96%, CT/MRI的诊断率为34%。但是, 研究同时表明, CT/MRI更有利于发现肝脏转移病灶, 而PET倾向于发现腹部转移病灶和腹腔外的转移病灶^[11]。肿瘤的分期情况, 如表1-2所示。

1.1.3 在胰腺癌疗效监控中的应用 胰腺癌患者在手术期间, 如果辅以放射治疗和(或)化学治疗, 有助于提高生存率。初步研究结果表明, ^{18}F -FDG PET显像可以评价肿瘤患者对放、化疗的反应, 并且监控在肿瘤切除部位是否出现复发病灶^[12]。

Yoshioka *et al*^[13]应用 ^{18}F -FDG PET评价胰腺癌患者经过动脉灌注化疗结合放疗之后的治疗疗效。研究中, 10例胰腺癌患者(无手术治疗适应证)在放化疗前后分别进行CT检查(显示肿瘤大小情况)、 ^{18}F -FDG PET检查(以SUV值评价肿瘤的生物活性)以及血清CA19-9水平测定。结果显示, ^{18}F -FDG PET显像能早期、有效地评价肿瘤患者的治疗疗效, 而且在 ^{18}F -FDG PET显示肿瘤部位放射性摄取降低的2 mo之后, CT才检测出肿瘤病灶缩小。

1.1.4 在胰腺癌预后评价中的应用 胰腺癌的预后与该病的分级、分期、肿瘤标志物的水平、早期诊断和及时治疗等因素有关^[14]。多项研究表明, ^{18}F -FDG在肿瘤部位的摄取变化有利于评价患者的生存期长短, 是一个良好的预后因素。

表 1 肿瘤(TNM)分期(美国癌症联合委员会)

分组	标准
原发肿瘤(T)	
T _x	无法发现原发癌
T ₀	无法证实原发癌
T ₁	原位癌
T ₂	肿瘤局限于胰腺, 最大直径小于或等于2 cm
T ₃	肿瘤局限于胰腺, 最大直径大于2 cm
T ₄	肿瘤突出胰腺但未过腹中线或未侵犯肠系膜上动脉
T ₄	肿瘤突破腹中线或侵犯肠系膜上动脉(原发灶不能切除)
局部淋巴结(N)	
N _x	无法评估局部淋巴结
N ₀	无局部淋巴结转移
N ₁	局部淋巴结转移
远处转移(M)	
M _x	无法估计的远处转移
M ₀	无远处转移
M ₁	有远处转移

表 2 综合分期

0期	Tis	N ₀	M ₀
IA期	T ₁	N ₀	M ₀
IB期	T ₂	N ₀	M ₀
IIA期	T ₃	N ₀	M ₀
IIB期	T ₁	N ₁	M ₀
	T ₂	N ₁	M ₀
	T ₃	N ₁	M ₀
III期	T ₄	任何N	M ₀
IV期T ₂	任何T	任何N	M ₁

Lyshchik *et al*^[15]对65例胰腺癌患者进行双时相 ^{18}F -FDG PET显像(分别在注射 ^{18}F -FDG后1 h和2 h), 并且计算 $\text{RI} = (\text{SUV}_{2\text{h}} - \text{SUV}_{1\text{h}}) / \text{SUV}_{1\text{h}}$ 。通过多因素分析发现, 只有3个因素(即女性性别、TNM分期和RI值)与患者的预后具有独立相关性。I -III期患者伴有 $\text{RI} > 10\%$, 其生存期显著长于同分期但 $\text{RI} < 10\%$ 的患者(分别为15.3和11.5 mo); IV期患者伴有 $\text{RI} > 10\%$, 其中位生存期为9.5 mo; IV期患者伴有 $\text{RI} < 10\%$, 其预后最差, 中位生存期为4.9 mo。

另一项临床研究对118例胰腺癌患者进行长期随访(1996-2002年), 分析多个参考因素(包括 ^{18}F -FDG PET显像的SUV值, TNM分期标准, 肿瘤分级, 是否患有糖尿病, 年龄, 性别, 血清

表 3 PET与CT诊断胰腺癌

	CT	PET(CT检查阳性)	PET(CT检查阴性)	PET(CT检查不明确)
灵敏度(%)	81(72-88)	92(87-95)	73(50-88)	100
特异性(%)	66(53-77)	68(51-81)	86(75-93)	68

同行评价
本文是对PET/CT在临床应用中的方法研究,对胰腺癌的诊断方法有借鉴作用和参考价值。

CA19-9水平等)对患者预后的影响。通过多因素分析,结果显示其中三个因素(即肿瘤分期、分级与SUV值)可作为判断患者预后的独立因素^[16]。

1.2 其他正电子药物 首先用于诊断胰腺癌患者的显像剂有DL-碳^[11C-]缬氨酸和DL-^{11C}-色氨酸,他们能快速聚集在肿瘤病灶处,并且清除速度快,静脉注射这些显像剂后几乎可以立即进行PET显像。之后,逐渐发展有其他的正电子药物用于诊断胰腺肿瘤,诸如^{11C}-蛋氨酸、氮^[13N]-L-谷氨酸、^{14C}-酪氨酸、氧^[15O]-水、^{13N}-氨水、^{11C}-5-羟色氨酸、^{11C}-L-DOPA、^{18F}-FET^[17]以及^{18F}、镓^[67Ga]、钇^[86Y]等标记的生长抑素特异受体等等。但是,在临床上应用较多的还是^{18F}-FDG PET显像。

2 其他技术在胰腺癌诊断中的作用及与PET/CT的比较

在诊断胰腺癌方面,主要的诊断技术有:CT、MRI、ERCP、超声内镜等。其中,CT、超声内镜是首选的临床诊断手段。

2.1 PET, CT, PET/CT 不仅能探测到胰腺肿块,而且随着CT成像技术的不断发展,能够清楚地显示出肿瘤周边血管侵袭和邻近器官组织浸润的情况。在一项多中心性研究中^[4],结果显示:CT的诊断精确度达到73%;对非适合手术切除治疗病例的阳性预测率达到90%。然而,在以下几种情况中,CT检查很难做出正确的诊断:(1)肿块型胰腺炎或其他可疑发现(如胰头扩大而不伴有确定的恶性征象);(2)胰腺癌发生局域性淋巴结转移;(3)小转移病灶(病灶直径小于1 cm)和包囊。同为解剖型成像技术,MRI和MRI结合MR血管造影可为CT检查提供进一步的有用信息,但是他的临床应用局限如同CT^[18]。

Orlando *et al*^[19]采用偏位分析法,比较PET与CT在诊断胰腺癌上的作用。患者分别在CT检查结果阳性、阴性和不明确的情况下行PET显像,如表3所示。

在另一项研究中,对104例疑似胰腺癌患者行PET、CT和PET/CT检查,结果表明:PET/CT的诊断精确度达到96%;仅通过PET/CT发现2例

主动脉旁淋巴结转移。PET、CT和PET/CT的灵敏度分别是84.4%、76.6%和89.1%。由此可见,PET/CT图像融合有助于提高诊断灵敏度^[20]。

2.2 其他 超声内镜能探测到直径为2-3 mm的微小病灶。而且,在超声内镜的引导下进行病灶活检,做病理诊断,可以提高诊断的精确度,但是该方法的局限性在于活检的范围有限,并且容易存在取样误差的情况。

ERCP是一种较好的诊断胰腺癌的手段,其区分良、恶性肿瘤(包括慢性胰腺炎)的精确度可以达到80%-90%。但是,ERCP主要适用于伴有胆管阻塞的胰腺癌患者,当胰腺肿瘤不是来源于主胆管时,应用该方法常出现诊断假阴性的情况。而且,临床实践表明,进行该操作时会出现10%的失败率,从而导致医源性胰腺炎。

3 总结及展望

总之,PET/CT能有效显示肿瘤的代谢、增生、乏氧和细胞凋亡状态,能精确显示解剖结构,对于肿瘤患者的诊疗指导、肿瘤分期、疗效监控、预后评价等具有十分重要的作用^[21-22]。

^{18F}-FDG是目前PET/CT显像中最常应用、也最成熟的显像剂。但是在应用^{18F}-FDG时,须考虑到以下几方面的问题:(1)患者的血糖水平对^{18F}-FDG PET诊断精确度的影响。高葡萄糖耐量患者和糖尿病患者,由于血清葡萄糖浓度升高,通过竞争性抑制的作用导致^{18F}-FDG在肿瘤部位的摄取降低,从而引起诊断假阴性率提高、SUV比值降低。有研究者提出根据患者的血糖水平来校正SUV值。但是,关于血糖水平对^{18F}-FDG PET诊断精确度的真正影响机制,还存在一定的争议,这需要提高临床诊断样本量来进行进一步的研究。(2)^{18F}-FDG PET诊断的假阳性情况。许多良性炎症病变,如慢性活动性胰腺炎(伴或不伴有脓肿形成)、浆液性囊腺瘤、腹膜后纤维变性、胰腺假瘤、胰腺内分泌肿瘤等等,均能导致^{18F}-FDG在病灶部位的摄取增加,出现假阳性的诊断。因此,在诊断过程中,应当结合患者的病史、临床表现、体征和其他的辅助检查来提高诊断的精确度。

另外, PET/CT在诊断胰腺癌方面, 还具有极大的潜在发展空间, 这有赖于研究者开发出具有特异性的、正电子标记的、可在胰腺癌聚集, 而不在其他病变组织中聚集的显像剂; 结合基因诊断技术, 研发能在基因水平上早期诊断胰腺癌的正电子分子探针; 并且研发监测胰腺癌治疗疗效的正电子显像剂。

4 参考文献

- 1 Papos M, Takacs T, Pavics L, Farkas G, Ambrus E, Szakall S Jr, Lonovics J, Csernay L, Tron L. The role of FDG-PET scan in the diagnosis of pancreatic carcinoma. *Orv Hetil* 2002; 143: 1283-1286
- 2 王荣福. 肿瘤影像核医学进展. 中国医学影像技术 2004; 20: 1792-1796
- 3 王荣福. 核医学. 北京: 北京大学医学出版社, 2004: 63-67
- 4 Michl P, Pauls S, Gress TM. Evidence-based diagnosis and staging of pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 227-251
- 5 Valk PE, Bailey DL, Townsend DW, Maisey MN. Positron emission tomography, basic science and clinical practice. *Springer Press*, 2003: 588-594
- 6 Scott CL, Kudaba I, Stewart JM, Hicks RJ, Rischin D. The utility of 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose positron emission tomography in the investigation of patients with disseminated carcinoma of unknown primary origin. *Mol Imaging Biol* 2005; 7: 236-243
- 7 Heinrich S, Goerres GW, Schafer M, Sagmeister M, Bauerfeind P, Pestalozzi BC, Hany TF, von Schulthess GK, Clavien PA. Positron emission tomography/computed tomography influences on the management of resectable pancreatic cancer and its cost-effectiveness. *Ann Surg* 2005; 242: 235-243
- 8 Nishiyama Y, Yamamoto Y, Monden T, Sasakawa Y, Tsutsui K, Wakabayashi H, Ohkawa M. Evaluation of delayed additional FDG PET imaging in patients with pancreatic tumour. *Nucl Med Commun* 2005; 26: 895-901
- 9 Nishiyama Y, Yamamoto Y, Yokoe K, Monden T, Sasakawa Y, Tsutsui K, Satoh K, Ohkawa M. Contribution of whole body FDG-PET to the detection of distant metastasis in pancreatic cancer. *Ann Nucl Med* 2005; 19: 491-497
- 10 Takamori H, Kanemitsu K, Tsuji T, Kusano S, Chikamoto A, Okuma T, Iyama K. Metastatic gastric tumor secondary to pancreatic adenocarcinoma. *J Gastroenterol* 2005; 40: 209-212
- 11 Ruf J, Lopez Hanninen E, Oettle H, Plotkin M, Pelzer U, Stroszczyński C, Felix R, Amthauer H. Detection of recurrent pancreatic cancer: comparison of FDG-PET with CT/MRI. *Pancreatol* 2005; 5: 266-272
- 12 Ruf J, Amthauer H, Oettle H, Steinmüller T, Plotkin M, Pelzer U, Scholman HJ, Felix R, Wust P. Role of F18-FDG PET for monitoring of radiochemotherapy--estimation of detectable number of tumour cells. *Onkologie* 2004; 27: 287-290
- 13 Yoshioka M, Sato T, Furuya T, Shibata S, Andoh H, Asanuma Y, Hatazawa J, Shimosegawa E, Koyama K, Yamamoto Y. Role of positron emission tomography with 2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose in evaluating the effects of arterial infusion chemotherapy and radiotherapy on pancreatic cancer. *J Gastroenterol* 2004; 39: 50-55
- 14 van Kouwen MC, Laverman P, van Krieken JH, Oyen WJ, Jansen JB, Drenth JP. FDG-PET in the detection of early pancreatic cancer in a BOP hamster model. *Nucl Med Biol* 2005; 32: 445-450
- 15 Lyshchik A, Higashi T, Nakamoto Y, Fujimoto K, Doi R, Imamura M, Saga T. Dual-phase ¹⁸F-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography as a prognostic parameter in patients with pancreatic cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005; 32: 389-397
- 16 Sperti C, Pasquali C, Chierichetti F, Ferronato A, Decet G, Pedrazzoli S. 18-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography in predicting survival of patients with pancreatic carcinoma. *J Gastrointest Surg* 2003; 7: 953-959; discussion 959-960
- 17 Pauleit D, Stoffels G, Schaden W, Hamacher K, Bauer D, Tellmann L, Herzog H, Broer S, Coenen HH, Langen KJ. PET with O-(2-¹⁸F-Fluoroethyl)-L-Tyrosine in peripheral tumors: first clinical results. *J Nucl Med* 2005; 46: 411-416
- 18 Saisho H, Yamaguchi T. Diagnostic imaging for pancreatic cancer: computed tomography, magnetic resonance imaging, and positron emission tomography. *Pancreas* 2004; 28: 273-278
- 19 Orlando LA, Kulasingam SL, Matchar DB. Meta-analysis: the detection of pancreatic malignancy with positron emission tomography. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 1063-1070
- 20 Lemke AJ, Niehues SM, Hosten N, Amthauer H, Boehmig M, Stroszczyński C, Rohlfing T, Rosewicz S, Felix R. Retrospective digital image fusion of multidetector CT and ¹⁸F-FDG PET: clinical value in pancreatic lesions--a prospective study with 104 patients. *J Nucl Med* 2004; 45: 1279-1286
- 21 Ell PJ. PET/CT in oncology: a major technology for cancer care. *Chang Gung Med J* 2005; 28: 274-283
- 22 Delbeke D, Pinson CW. Pancreatic tumors: role of imaging in the diagnosis, staging, and treatment. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2004; 11: 4-10

电编 何基才 编辑 王晓瑜

慢性HBV感染的免疫治疗

于贤杰, 王贵强

于贤杰, 北京大学第一医院病毒研究室 北京市 100034
王贵强, 北京大学第一医院感染疾病科 北京市 100034
通讯作者: 王贵强, 100034, 北京市, 北京大学第一医院感染疾病科. wangqg@hotmail.com
电话: 010-66551122-2370
收稿日期: 2007-03-30 接受日期: 2007-04-13

Immunotherapy for chronic hepatitis B virus infections

Xian-Jie Yu, Gui-Qiang Wang

Xian-Jie Yu, Laboratory of Virology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China
Gui-Qiang Wang, Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China
Correspondence to: Gui-Qiang Wang, Department of Infectious Diseases, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China. wangqg@hotmail.com
Received: 2007-03-30 Accepted: 2007-04-13

Abstract

The immune system functions to control and clear virus infections. Viral persistence has been closely associated with dysfunctional specific immunity, especially cellular immunity. Current antiviral therapies have been disappointing. Immunotherapies with strategies to boost or restore the virus-specific immune response of patients with chronic hepatitis B virus infection have been proposed for curing persistent infections, and are attracting increasing attention. This review summarizes recent advances in the field of immunology and the immunotherapy of chronic HBV infections, including dendritic, regulatory T and CD8⁺ T cells, and discusses therapeutic vaccines.

Key Words: Chronic hepatitis B virus infection; Immunotherapy; Dendritic cell; Regulatory T cell; CD8⁺ T cell; Therapeutic vaccine

Yu XJ, Wang GQ. Immunotherapy for chronic hepatitis B virus infections. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1835-1840

摘要

目前现有的抗病毒药物对慢性HBV感染的疗

效不甚满意。HBV感染的控制和清除有赖于机体的免疫系统,其感染慢性化与机体特异性免疫,尤其是细胞免疫功能低下密切相关。旨在通过增强或恢复机体抗HBV免疫功能以控制和清除HBV感染的免疫治疗是被人们寄予厚望的一种治疗策略,备受关注。本文将从树突状细胞、调节性T细胞、CD8⁺T细胞、治疗性疫苗等几个方面对近几年慢性HBV感染的免疫学和免疫治疗研究进展进行综述。

关键词: 慢性HBV感染; 免疫治疗; 树突状细胞; 调节性T细胞; CD8⁺T细胞; 治疗性疫苗

于贤杰, 王贵强. 慢性HBV感染的免疫治疗. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1835-1840
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1835.asp>

0 引言

尽管有效的HBV疫苗已经存在20多年,但HBV感染所致的慢性肝炎依然是严重危害人类健康的全球性疾病,是人类十大死亡原因之一^[1]。中国作为HBV感染的高发流行区,慢性HBV感染的危害尤为严重。因此,寻求和探索能够有效抑制或消除HBV,减少和防止肝脏失代偿、肝硬化、肝癌及死亡的治疗方法或药物显得尤为迫切和重要。然而,目前国内外公认的有效抗HBV药物-干扰素和核苷(酸)类似物,无法清除cccDNA,对携带者无效,只适应于已进展成为肝炎或存在并发症的患者,并且前者由于存在副作用限制其广泛应用,且有效率仅为30%左右;后者抗病毒作用较强,但疗效不能持久,停药复发率高,且长期应用经济负担重,而且还有耐药性变异问题而影响疗效。近几年研究表明HBV感染的控制和清除有赖于机体的免疫系统,其感染慢性化与机体针对HBV的特异性免疫,尤其是细胞免疫的缺陷或低下相关,但现有的抗HBV药物无法帮助恢复这种免疫缺陷,故而很难清除病毒。因此,目前认为增强或恢复机体针对HBV的特异性免疫,尤其是细胞免疫的治疗策略能够最终消除HBV的慢性感染,并且

背景资料
目前严重危害人类健康的慢性病毒感染(如HBV、HCV、HIV)疾病与机体的免疫功能缺陷或不健全密切相关,而现有的抗病毒药物疗效不甚满意。旨在重建和增强机体免疫功能的免疫治疗被人们称为从根本上征服病毒感染一条希望之路。免疫学与病毒学的不断进步,为人们更深入地了解慢性病毒感染的机制进而设计出更为有效的免疫治疗方法提供了保障。

研发前沿
慢性HBV感染的免疫治疗近年来备受学者关注。主要是治疗性疫苗的研究,其中疫苗的设计是关键。许多学者从各个方面作了探索,但目前尚无大的突破。DC治疗更是刚刚起步,尚无大规模的临床实验见诸报道。

这也应该成为未来慢性HBV感染治疗的研究焦点之一^[2-4]。免疫治疗策略通过激发和增强机体的免疫功能,以控制和清除病毒,成为人们从根本上征服慢性HBV感染的一条希望之路。此外,发现慢性乙型肝炎患者接受HBV自愈者的骨髓移植后得到治愈,直接证实了免疫治疗的有效性^[2,6]。因此,免疫治疗日益受到重视并成为目前研究热点。慢性病毒感染的免疫学基础的不断进展,为人们探求有效治疗慢性病毒感染如HIV、HBV、HCV等提供了新的途径和思路。本文将就近几年慢性HBV感染的免疫学和免疫治疗研究进展进行综述。

1 树突状细胞(DC)及其介导的免疫治疗

目前DC在人类主要分为两大类, MDC(myeloid DC, conventional DC)和PDC(plasmacytoid DC)。两者在外周血含量低,因为现在已经能够在体外通过细胞因子(主要是GM-CSF和IL-4)诱导外周血单核细胞或骨髓干细胞分化来得到数量可观的MDC,对该类细胞的研究更为详尽,且已经被用于治疗各种肿瘤和慢性感染性疾病的动物模型和临床试验中。DC是目前公认的体内功能最强的抗原提呈细胞,也是唯一能够刺激活化初始性T细胞(naïve T cell)的抗原提呈细胞。他功能众多,具有很强的可塑性,能通过膜表面的分子或分泌的细胞因子直接或间接影响辅助性T细胞(Th细胞)的分化,也是Th细胞帮助产生记忆性CD8⁺ T细胞的重要的中间环节^[5]。其中, PDC, 又称作IPC(type 1 interferon-producing cells), 病毒刺激后能够产生大量的I类干扰素,调节各种免疫细胞如NK细胞、MDC、T细胞、B细胞的功能,被认为是天然免疫和特异性免疫的桥梁和抗病毒天然免疫中最重要的细胞^[7]。可见, DC在机体抗病毒免疫的启动、转归及维持中的重要地位。因此,该类细胞在探究慢性病毒感染的免疫机制和免疫治疗中受到高度重视。

目前国内外已有不少文章报道慢性HBV感染者的MDC(或是单核细胞诱导分化的或外周血中存在)和PDC数目减少和功能存在缺陷,后者表现为:在体外促成熟后某些共刺激分子(如CD80, CD86)表达低下,分泌细胞因子(如IL-12, TNF- α)的能力下降,体外混合淋巴反应功能低下,诱导Th细胞向Th1型细胞分化的能力下降等^[8-11]。存在缺陷的DC不能有效地呈递抗原或刺激活化特异性T细胞,进而出现慢性HBV感染中特异性T细胞免疫反应低下。因此,恢复慢性

HBV感染者DC的功能,增强其活化特异性细胞免疫的能力,则有望纠正慢性HBV感染中的免疫低下,有助于清除HBV。我们和其他课题组都发现改善慢性HBV患者DC功能能够增强HBV特异性细胞反应^[12-13]。然而DC功能低下的原因目前并不清楚,但已基本明确DC不支持HBV的复制^[14],这也为DC免疫治疗的安全性提供了保障。需要指出的是,DC功能缺陷究竟是病毒感染所致还是导致病毒持续感染的原因至今仍不清楚,有待于进一步研究。此外,DC功能低下在导致免疫功能低下中的作用也存在争议^[3]。

研究DC介导的慢性HBV感染的免疫治疗是基于两点:一是慢性HBV感染中DC存在功能的低下,可能是HBV感染慢性化的原因之一,需要恢复DC功能;二是DC独特而又强大的免疫学功能使其成为良好的免疫学疫苗。

体外通过细胞因子GM-CSF和IL-4诱导外周血单核细胞或骨髓干细胞分化为DC,加入相关抗原和促成熟剂(或免疫佐剂)后,回输入体内治疗HIV的动物实验和临床研究在国外已有很多报道,已发现此方法能够诱导机体产生有效抑制HIV的特异性T细胞反应,并证实了DC临床治疗的安全性和可行性^[15]。DC治疗HBV感染的动物实验已有报道,但关于其在临床上的研究国外尚无报道。我国学者任红 *et al*^[22]在2005年报道,用HBsAg负载的DC治疗19例慢性乙型肝炎患者,发现能够有效抑制病毒复制,但其结论有待于更大样本的临床试验进一步证实。然而,我们可以从DC治疗在HIV的临床试验和HBV的动物模型研究中总结经验,指导未来人类慢性HBV感染的DC治疗。

其中尤值得一提的是DC治疗在HIV感染者中的研究。Lu *et al*^[15]在2004年首次报道灭活HIV负载的DC在18例HIV患者中的应用,发现病毒载量在第112天下降80%,其中8例患者在1 a内病毒载量下降90%,剩余10例则只表现出一过性微弱反应。病毒载量的下降与外周血中能够分泌IL-2和IFN- γ 的CD4⁺ T细胞和表达穿孔素的特异性CD8⁺ T细胞的数目增加呈正相关。这与Kundu *et al*^[16]应用重组HIV-1蛋白抗原和抗原肽负载DC对病毒载量无影响的报道截然不同。作者分析认为可能是灭活病毒的抗原性优于重组蛋白和抗原肽的原因。但在最近的两个相关报道中,DC的治疗效果却令人不甚满意。其中, Garcia *et al*^[17]对接受HAART治疗的12例HIV患者中应用热灭活HIV负载的DC(皮下注射),发现仅能够激发弱的

Th1和HIV特异性的CD8⁺T细胞反应, 一过性地部分控制HIV的复制. 近年来Ide *et al*^[18]用TNF和HIV表位相关的7个抗原肽负载DC治疗4例接受1年HAART治疗的男性患者, 发现只有2例患者能检测到比较局限的分泌IFN- γ 的CD8⁺T细胞. 可见目前DC介导的免疫治疗在HIV感染中疗效的不确定性, 可能与选取的患者的疾病进展程度、应用DC的数量和成熟度、抗原的选取等因素的不同有关. 因此, 有待于设计更为完善的大样本的临床试验研究来进一步证实.

DC介导的免疫治疗在HBV转基因小鼠中有诸多报道. 其中, 美国学者Shimizu *et al*^[19]发现, 回输活化的DC能够打破HBV转基因小鼠体内的免疫耐受, 诱发抗原特异性CTL反应, 但不能抑制病毒基因的表达和病毒复制. 日本学者Akbar *et al*^[20]却发现只有回输HBsAg负载的DC才能使HBV转基因小鼠的表面抗原转阴, 产生抗体. 这些研究初步显示了DC在HBV转基因小鼠中的有效性, 为DC介导的免疫治疗在人HBV的感染中的应用做好铺垫, 但有待于进一步的研究. 此外, 德国学者陆蒙吉等也在土拨鼠肝炎动物模型中对DC的免疫治疗进行了多方面的探索.

DC介导的免疫治疗是个非常复杂的过程, DC制备必须个体化, 其有效性受到以下因素的制约: DC的种类和质量、抗原负载的方式、剂量和输入途径以及患者的选择等^[21]. 我们可以初步推测: 灭活病毒优于抗原肽或重组蛋白, 成熟的DC优于非成熟DC, 促成熟剂中混合细胞因子(IL-1、IL-6、TNF、CD40L)优于其他细胞因子. 总之, DC免疫治疗依然处于早期阶段, 需要进行更多的基础研究和临床试验来获得最佳优化的DC治疗方案.

2 慢性HBV感染中的CD4⁺CD25⁺调节性T细胞

CD4⁺CD25⁺调节性T细胞在70年代早期最初被称作抑制性T细胞. 近几年研究表明, 慢性HBV感染者外周血和肝脏中的调节性T细胞数目增多, 在体外能够抑制HBV特异性T细胞的增殖, 祛除这些细胞能够增强特异性反应. 因此, 认为CD4⁺CD25⁺调节性T细胞参与慢性HBV感染中的免疫耐受, 是病毒持续感染的原因之一^[23-25]. 减少这些调节性细胞的数目或下调其功能有望打破机体对病毒的免疫耐受, 有利于病毒的清除, 是慢性HBV感染免疫治疗的一条新思路, 值得探讨和研究. 目前, 关于调节性T细胞的免疫治疗在肿瘤中的研究较为详尽并已显示出了

良好的前景, 如去除调节性T细胞的CD25抗体已在小鼠肿瘤模型中显示出强大的抗肿瘤效应, 在疫苗治疗前祛除肾癌患者的调节性T细胞能够使特异性T细胞增加100倍^[26], 但其在治疗HBV感染中的研究尚未见报道.

3 抗原特异性CD8⁺T细胞

CD8⁺T细胞是免疫系统控制和清除HBV感染的中心环节, 其反应低下或处于“exhausted”状态与感染慢性化直接密切相关, 目前机制不明确, 但已经证实这种功能低下是可以逆转的, 因而通过重塑这些CD8⁺T细胞的功能以控制病毒感染是可行的. 因此, 直接向患者体内回输体外扩增的功能正常的特异性T细胞的过继性免疫治疗是个很值得探索的领域. 已发现给骨髓移植患者输入体外扩增的CMV特异性CTL细胞, 能够有效控制CMV的复制^[27]. 该免疫策略在慢性HBV感染中的应用已在进行中.

新近Daniel *et al*^[28]在淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)小鼠模型中发现慢性感染中的“exhausted”的抗原特异性的CD8⁺T细胞始终选择性地高表达PD-1, 阻断PD-1/PDL-1途径能够逆转T细胞的功能并使病毒载量明显下降. 这一发现为人类慢性病毒感染的治疗提供了崭新而又充满希望的思路^[29-30]. 随后陆续有报道发现HIV感染中的特异性CD8⁺T细胞同样高表达PD-1, 在体外阻断PD-1/PDL-1途径能够使特异性T细胞反应明显增强, 相应的抗HIV药物已在研发中^[31-33]. 美国学者Isogawa *et al*^[34]也发现HBV转基因小鼠中的特异性CD8⁺T细胞IFN分泌降低的同时伴随PD-1表达升高. 急性HBV感染过程中, HBV特性型CD8⁺T细胞的体外扩增能力在清除期的升高伴随PD-1表达下调^[35]. 关于人慢性HBV感染中的抗原特异性CD8⁺T细胞与PD-1的关系目前正在研究中, 相信很快就有结果, 并将会为HBV治疗提供很好的启示.

4 治疗性疫苗

治疗性疫苗, 与预防性疫苗完全不同, 是以增强和扩大机体内已经存在的特异性免疫为目的的免疫策略. 他起源于预防性狂犬病疫苗能够使狂犬病感染者的病症减轻和发作时间延缓, 现在已被人们广泛用于尝试治疗目前用药物不能清除的慢性病毒感染, 如HIV、HPV和HBV. 他的理论基础是病毒感染的慢性化是因为机体的免疫系统不能有效控制病毒或出于不合适的免疫

相关报道
慢性病毒感染中, 无论是动物实验还是临床实验, HBV的免疫治疗研究的最多也最为详尽, 是很好的借鉴.

创新盘点

本文主要是以近年来的基础免疫学和病毒感染慢性化机制的进展为基础,借鉴HIV和肿瘤的免疫治疗的经验,对慢性HBV的免疫治疗进行综述,提出了一些展望和建议。

耐受状态^[36]。尽管疫苗用于治疗这些感染性疾病的合理性存在争议^[36],但不少临床研究报道已初步提示他们在慢性感染性疾病中可能的有效性。

鉴于HBV预防性疫苗的成功应用,治疗性疫苗的探索也是从应用这类单纯表面抗原疫苗开始的,并已显示出了一定的有效性,但远不尽人意^[4]。因此,为了增强免疫效果,表面抗原疫苗联合应用佐剂或免疫调节因子,如IL-2, IL-12, GM-CSF, CpG等的研究正在进行中。疫苗与抗病毒药物联合应用、表面抗原与表面抗体的复合物的应用也是研究热点。这些联合应用是目前疫苗免疫策略研究的主要方向。其中疫苗联合抗病毒药物的临床研究已有报道。Dahmen *et al*^[37]发现皮下注射乙肝疫苗加拉米夫定治疗14例慢乙肝患者中有9例患者出现病毒清除。在Horiike *et al*^[38]的研究中,拉米夫定与疫苗联合组中有9例患者出现DNA阴转,联合组e抗原转换明显高于单纯拉米夫定组,显示出联合治疗的优越性。Helvacı *et al*^[39]在一项interferon-alpha-2b治疗儿童慢性乙肝的临床对照研究中发现加用疫苗能降低血清病毒载量,但不能维持。

相比蛋白疫苗, DNA疫苗具有许多优点,如能够同时激活体液和细胞免疫、因本身含有天然佐剂如CpG等有利于Th1型细胞反应、由于需要在胞内从头合成抗原能如灭活病毒疫苗一样激发CTL反应,因而也倍受研究者青睐。其中, Mancini *et al*^[40]2004年首次报道DNA疫苗(preS2+S)在慢性HBV感染(11例常规治疗无效的慢性HBV携带者)中的研究,结果发现有5例患者出现病毒DNA量一过性下降,大部分患者仅出现一过性特异性分泌IFN- γ 的T细胞反应。目前其他能够同时编码表面抗原和其他免疫调节分子如IL-12的DNA疫苗的临床研究正在进行中^[2]。

各种治疗性疫苗的安全性和耐受性在治疗HBV感染中得到证实,并能在某种程度上增强机体针对HBV的特异性反应,有助于降低HBV复制,但疗效不甚满意,大多维持时间不长,表现为一过性,且在病毒载量高时,疗效不显著。因此,该免疫策略有待于进一步探讨,关键在于疫苗的设计。更加有效的疫苗免疫策略应该尽量包含有助于清除病毒的抗原、增大剂量、含有能够有效活化天然免疫和后天免疫系统的佐剂或免疫调节剂、与抗病毒治疗联合应用、选择合适的患者(病毒载量最好不要太高)^[2, 36]。

细胞因子IL-12能够刺激活化NK细胞,促进Th1型细胞反应,增强CD8⁺ T细胞功能,在细

胞免疫中起重要作用。已发现IL-12能够通过诱导细胞产生IFN- γ 完全抑制HBV转基因小鼠肝内的病毒复制^[41],并在体外能够恢复慢乙肝患者特异性T细胞的功能^[42-43]。在临床研究中, Rigopoulou *et al*^[44]联合应用重组IL-12和拉米夫定治疗15例慢性乙型肝炎患者,发现IL-12能够增强HBV特异性Th1细胞的反应,提高IFN-r的生成,更明显抑制病毒复制,但中断拉米夫定,病毒载量会缓慢升高。

总之,免疫治疗是被人们寄予厚望能够终止病毒慢性感染的一种治疗策略,也正在从各个方面进行研究,并已得到了一些可靠结论,显示出某些免疫治疗的可行性和有效性,但目前尚无大的突破,依然处于探索阶段。然而,我们相信随着免疫学的不断进展和病毒感染慢性化机制的不断揭示,最终能够寻求到有效的免疫治疗策略,消除HBV、HIV等慢性病毒感染。

5 参考文献

- 1 Mailliar ME, Gollan JL. Emerging therapeutics for chronic hepatitis B. *Annu Rev Med* 2006; 57: 155-166
- 2 Hui CK, Lau GK. Immune system and hepatitis B virus infection. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S44-S48
- 3 Bertolotti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2006; 87: 1439-1449
- 4 Michel ML, Mancini-Bourguin M. Therapeutic vaccination against chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S108-S114
- 5 Castellino F, Germain RN. Cooperation between CD4⁺ and CD8⁺ T cells: when, where, and how. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 519-540
- 6 Lau GK, Suri D, Liang R, Rigopoulou EI, Thomas MG, Mullerova I, Nanji A, Yuen ST, Williams R, Naoumov NV. Resolution of chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 2002; 122: 614-624
- 7 Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 275-306
- 8 van der Molen RG, Sprengers D, Binda RS, de Jong EC, Niesters HG, Kusters JG, Kwekkeboom J, Janssen HL. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2004; 40: 738-746
- 9 Duan XZ, Zhuang H, Wang M, Li HW, Liu JC, Wang FS. Decreased numbers and impaired function of circulating dendritic cell subsets in patients with chronic hepatitis B infection (R2). *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 234-242
- 10 Zheng BJ, Zhou J, Qu D, Siu KL, Lam TW, Lo HY, Lee SS, Wen YM. Selective functional deficit in dendritic cell--T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2004; 11: 217-224
- 11 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken

- G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487-495
- 12 Zhang HH, He Y, Zhao H, Piao WH, Liu MC, Xi HL, Yu M, Wang GQ. The effect of stimulation of dendritic cell on HBV-epitopic cytotoxic T-lymphocyte. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85: 1171-1176
- 13 Duan XZ, He HX, Zhuang H. Restoration in vitro of impaired T-cell responses in patients with chronic hepatitis B by autologous dendritic cells loaded with hepatitis B virus proteins (R2). *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 970-976
- 14 Untergasser A, Zedler U, Langenkamp A, Hosel M, Quasdorff M, Esser K, Dienes HP, Tappertzhofen B, Kolanus W, Protzer U. Dendritic cells take up viral antigens but do not support the early steps of hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2006; 43: 539-547
- 15 Lu W, Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. *Nat Med* 2004; 10: 1359-1365
- 16 Kundu SK, Engleman E, Benike C, Shaper MH, Dupuis M, van Schooten WC, Eibl M, Merigan TC. A pilot clinical trial of HIV antigen-pulsed allogeneic and autologous dendritic cell therapy in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14: 551-560
- 17 Garcia F, Lejeune M, Climent N, Gil C, Alcami J, Morente V, Alos L, Ruiz A, Setoain J, Fumero E, Castro P, Lopez A, Cruceta A, Piera C, Florence E, Pereira A, Libois A, Gonzalez N, Guila M, Caballero M, Lomena F, Joseph J, Miro JM, Pumarola T, Plana M, Gatell JM, Gallart T. Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2005; 191: 1680-1685
- 18 Ide F, Nakamura T, Tomizawa M, Kawana-Tachikawa A, Odawara T, Hosoya N, Iwamoto A. Peptide-loaded dendritic-cell vaccination followed by treatment interruption for chronic HIV-1 infection: a phase 1 trial. *J Med Virol* 2006; 78: 711-718
- 19 Shimizu Y, Guidotti LG, Fowler P, Chisari FV. Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice. *J Immunol* 1998; 161: 4520-4529
- 20 Akbar SM, Furukawa S, Hasebe A, Horiike N, Michitaka K, Onji M. Production and efficacy of a dendritic cell-based therapeutic vaccine for murine chronic hepatitis B virus carrier. *Int J Mol Med* 2004; 14: 295-299
- 21 Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 2004; 10: 475-480
- 22 Chen M, Li YG, Zhang DZ, Wang ZY, Zeng WQ, Shi XF, Guo Y, Guo SH, Ren H. Therapeutic effect of autologous dendritic cell vaccine on patients with chronic hepatitis B: a clinical study. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1806-1868
- 23 Kondo Y, Kobayashi K, Ueno Y, Shiina M, Niitsuma H, Kanno N, Kobayashi T, Shimosegawa T. Mechanism of T cell hyporesponsiveness to HBcAg is associated with regulatory T cells in chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4310-4317
- 24 Xu D, Fu J, Jin L, Zhang H, Zhou C, Zou Z, Zhao JM, Zhang B, Shi M, Ding X, Tang Z, Fu YX, Wang FS. Circulating and liver resident CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 2006; 177: 739-747
- 25 Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 41: 771-778
- 26 Greten TF, Manns MP, Korangy F. Immunotherapy of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006; 45: 868-878
- 27 Peggs KS, Verfuert S, Pizzey A, Khan N, Guiver M, Moss PA, Mackinnon S. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* 2003; 362: 1375-1377
- 28 Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439: 682-687
- 29 Okazaki T, Honjo T. Rejuvenating exhausted T cells during chronic viral infection. *Cell* 2006; 124: 459-461
- 30 Blattman JN, Greenberg PD. PD-1 blockade: rescue from a near-death experience. *Nat Immunol* 2006; 7: 227-228
- 31 Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, Boulassel MR, Delwart E, Sepulveda H, Balderas RS, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8⁺ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 2006; 12: 1198-1202
- 32 Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, Brown JA, Moodley ES, Reddy S, Mackey EW, Miller JD, Leslie AJ, DePierres C, Mncube Z, Duraiswamy J, Zhu B, Eichbaum Q, Altfeld M, Wherry EJ, Coovadia HM, Goulder PJ, Klenerman P, Ahmed R, Freeman GJ, Walker BD. PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006; 443: 350-354
- 33 Freeman GJ, Wherry EJ, Ahmed R, Sharpe AH. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J Exp Med* 2006; 203: 2223-2227
- 34 Isogawa M, Furuichi Y, Chisari FV. Oscillating CD8(+) T cell effector functions after antigen recognition in the liver. *Immunity* 2005; 23: 53-63
- 35 Boettler T, Panther E, Bengsch B, Nazarova N, Spangenberg HC, Blum HE, Thimme R. Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8⁺ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* 2006; 80: 3532-3540
- 36 Autran B, Carcelain G, Combadiere B, Debre P. Therapeutic vaccines for chronic infections. *Science* 2004; 305: 205-208
- 37 Dahmen A, Herzog-Hauff S, Bocher WO, Galle PR, Lohr HF. Clinical and immunological efficacy of intradermal vaccine plus lamivudine with or without interleukin-2 in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2002; 66: 452-460
- 38 Horiike N, Fazle Akbar SM, Michitaka K, Joukou K, Yamamoto K, Kojima N, Hiasa Y, Abe M, Onji M.

名词解释

PD-1/PD-L: 两者分别是CD28家族和共刺激分子B7家族的成员, 其中后者包括PD-1, PD-2. 两者结合后抑制T细胞活化, 在机体的免疫耐受中起重要作用。

同行评价

本文将近几年慢性HBV感染的免疫学和免疫治疗研究进展进行了阐述,为人们探求有效治疗慢性病毒感染的方法提供了新途径和新思路,科学性较强,具有重要的临床指导意义。

- In vivo immunization by vaccine therapy following virus suppression by lamivudine: a novel approach for treating patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 2005; 32: 156-161
- 39 Helvacı M, Kizilgunesler A, Kasirga E, Ozbal E, Kuzu M, Sozen G. Efficacy of hepatitis B vaccination and interferon-alpha-2b combination therapy versus interferon-alpha-2b monotherapy in children with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 785-791
- 40 Mancini-Bourguine M, Fontaine H, Scott-Algara D, Pol S, Brechot C, Michel ML. Induction or expansion of T-cell responses by a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. *Hepatology* 2004; 40: 874-882
- 41 Cavanaugh VJ, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 1997; 71: 3236-3243
- 42 Suri D, Schilling R, Lopes AR, Mullerova I, Colucci G, Williams R, Naoumov NV. Non-cytolytic inhibition of hepatitis B virus replication in human hepatocytes. *J Hepatol* 2001; 35: 790-797
- 43 Lohr HF, Pingel S, Bocher WO, Bernhard H, Herzog-Hauff S, Rose-John S, Galle PR. Reduced virus specific T helper cell induction by autologous dendritic cells in patients with chronic hepatitis B - restoration by exogenous interleukin-12. *Clin Exp Immunol* 2002; 130: 107-114
- 44 Rigopoulou EI, Suri D, Chokshi S, Mullerova I, Rice S, Tedder RS, Williams R, Naoumov NV. Lamivudine plus interleukin-12 combination therapy in chronic hepatitis B: antiviral and immunological activity. *Hepatology* 2005; 42: 1028-1036

电编 何基才 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会征文启事

本刊讯 为提高我国消化内镜诊疗技术的整体水平,《中华消化内镜杂志》编辑部拟于2007-08在新疆乌鲁木齐召开“全国消化及消化内镜诊断与治疗进展学术研讨会”,邀请消化和消化内镜专家作有关专题学术报告.会议将出论文汇编,并授予继续教育 I 类学分,《中华消化内镜杂志》将择优刊登应征论文.

1 征文内容

征文内容包括消化系统疾病的内镜(食管镜、胃镜、十二指肠镜、小肠镜、大肠镜、肠道镜、腹腔镜、超声内镜等)诊疗技术;内镜外科的临床应用及进展;食管、胃、肠、肝胆、胰腺疾病的基础研究、临床诊治及其进展(炎症、溃疡、出血、肿瘤、异物等);消化系统疾病的中医、中西医结合治疗及其进展;消化内镜消毒及护理技术,消化系统疾病的急诊护理.

2 征文要求

应征文章按《中华消化内镜杂志》稿约要求撰写打印,并寄3000字以内全文及500字以内的论文摘要各一份;已投《中华消化内镜杂志》尚未发表的稿件,请注明稿号.应征文章经单位推荐盖公章后,寄南京市紫竹林3号《中华消化内镜杂志》编辑部卜小乐、赵在文同志收.邮编: 210003.信封左下脚注“征文”字样,同时汇寄审稿费10元.请自留底稿,恕不退稿.截稿日期2007-05-31.有关会议的具体事项另行通知.联系电话: 025-83472831, 86086091.

胶囊内镜在小肠Crohn病的应用

王健, 贾红

王健, 四川省泸州医学院附属医院消化内科 四川省泸州市 646000
贾红, 四川省泸州医学院公共卫生系 四川省泸州市 646000
通讯作者: 王健, 646000, 四川省泸州医学院附属医院消化内科.
sdwangjian888@yahoo.com.cn
收稿日期: 2006-12-23 接受日期: 2007-04-13

Video capsule endoscopy for diagnosis of small bowel Crohn's disease

Jian Wang, Hong Jia

Jian Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan, China
Hong Jia, Department of Public Health, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan, China
Correspondence to: Jian Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. sdwangjian888@yahoo.com.cn
Received: 2006-12-23 Accepted: 2007-04-13

Abstract

Small bowel Crohn's disease is a segmental transmural inflammatory disease of the intestinal tract. Its etiological factors remain unclear, clinical manifestations are variegated and histological changes show no distinctive features. Therefore, it is easily misdiagnosed. Video capsule endoscopy can play an important role in the diagnosis of small bowel Crohn's disease. In this paper, we review the rationale for clinical application and discuss other problems and potential utilities in the diagnosis of small bowel Crohn's disease.

Key Words: Video capsule endoscopy; Small bowel Crohn's disease; Disease of the digestive tract

Wang J, Jia H. Video capsule endoscopy for diagnosis of small bowel Crohn's disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1841-1844

摘要

小肠Crohn病是一种节段性、全壁层炎症性病变,其病因不明,临床表现多样,病理改变无特异性,误诊率高。对于小肠Crohn病,胶囊内镜

是一种有价值的诊断方法。此文综述了胶囊内镜的应用原理、诊断小肠Crohn病的临床应用情况及存在的问题,并且探讨了今后的研究领域。

关键词: 胶囊内镜; 小肠Crohn病; 消化道疾病

王健, 贾红. 胶囊内镜在小肠Crohn病的应用. *世界华人消化杂志* 2007;15(16):1841-1844
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1841.asp>

0 引言

Crohn病是一种与免疫异常、遗传、感染等多种因素有关的非特异性炎症性疾病,多发生于小肠和结肠,不少临床症状也见于肠结核和溃疡性结肠炎等其他炎症性肠病,诊断和鉴别诊断都较困难,术前误诊率高。Crohn可累及胃肠道各部位,其中小肠约占30%-40%^[1]。近年来有大量文献报道在全世界范围内小肠Crohn病发病率有明显升高的趋势。小肠是消化道最长的器官,由于其解剖和生理的特殊性,传统的各种检查手段因敏感性和准确性较低,很难对其作出明确诊断。因此,广大临床工作者迫切寻求一种可获得全小肠图像、无创、诊断阳性率高的新型检查方法。胶囊内镜的问世革命性地填补了这一领域的空白。

1 胶囊内镜简述

胶囊内镜(capsule endoscopy, CE)又名无线胶囊内镜(wireless capsule endoscopy, WCE),为一种直观、全面、准确、简便、安全和无痛的检查小肠疾病的新方法。2000-04由以色列Given影像公司生产并且正式面世,并于2001-08获FDA认证,准许运用于临床^[2]。2005-03重庆金山科技集团公司自主研发的OMOM胶囊内镜正式投放市场,并且在多家综合性医院应用,效果等同于进口产品,虽体积稍大但具有价格优势。胶囊内镜实际是一台微型的摄像机,外面包裹生物相容性塑料制成的外壳,因为胶囊内镜体积小,易吞入,吞入后借助消化道自身的蠕动能力通过全消化道,整

背景资料

Crohn病可以侵犯胃肠道的任何部位,其中小肠是最常受侵犯的部位。然而在Crohn病的早期,临床症状并不典型,给诊断带来很大困难。由于小肠的解剖学特点,传统的检查方法难以对小肠病变获得满意的诊断。胶囊内镜对此病的诊断有一定的价值,本文综述了胶囊内镜在诊断Crohn病的应用及存在的问题,并且探讨了今后的研究领域。

研发前沿
胶囊内镜(CE)的发明和应用为小肠疾病的诊断提供了一种新的方法。经临床试验证明CE对于小肠Crohn病的诊断有一定意义,且优于CT及X线检查。深入探讨CE对于小肠Crohn病的应用价值、诊断率、成本-效益分析、并发症等具有重要意义,今后将重点研究CE的诊断和治疗双重功效。

个检查过程无痛苦,而且患者无需住院,不影响日常活动,因此胶囊内镜自从问世以来,在临床上迅速推广,尤其是在胃肠道出血、小肠Crohn病、小肠肿瘤的诊断方面应用广泛^[3]。

2 目前研究及优势

胶囊内镜的面世时间虽短,但是据不完全统计,全球检查人数已逾100 000例,尤其在西方发达国家中已经广泛使用^[4]。我国已有部分医院引进了胶囊内镜,并且也有不少研究论著发表。Marmo *et al*^[5]开展了一项胶囊内镜和钡剂灌肠在小肠Crohn病方面诊断的评价研究。本次研究的31例患者(男20例;平均年龄43岁)均已经被组织学证明为Crohn病。采取单盲的方法分别评价两种检查方法。放射学者运用小肠灌肠在31例患者中确诊8例患者,胃肠医生使用胶囊内镜在31例患者中确诊22例(25.8% vs 71%, $P<0.05$)。在已知回肠末端被累及的16例患者中,胶囊内镜和小肠灌肠的诊断阳性发现率为(89% vs 37%, $P<0.05$)。在回肠末端未被累及的15例患者中,胶囊内镜发现有7例患者(46%)在小肠近侧端有病变,而在小肠灌肠中只发现2例患者(13%)。胶囊内镜还发现了45%的病例中小肠灌肠未发现的其他损害。我们认为胶囊内镜可能是用于没有狭窄和瘘管的小肠Crohn病诊断的新标准。

Fireman *et al*^[6]评估胶囊内镜对采用传统方法未能明确的小肠可疑Crohn病患者的诊断效果。其中符合录入标准的17例患者(男8例,平均年龄40岁)完成了研究。17例患者诊断前的平均症状持续时间为(6.3±2.2)年,其中9例患者为缺铁性贫血(平均血红蛋白10.5±1.8 g/L),8例腹痛,7例腹泻,3例伴有体质量下降。以上病例采用小肠和胃肠内镜所见正常。每个受试者均吞下一个MZA Given Capsule,记录时间大约为8 h,17例患者所吞胶囊内镜均随胃肠道运动自然排出体外。结果根据MZA Given Capsule的发现17例患者中12例(70.6%)被诊断患有小肠Crohn,5例(29.4%)患者没有阳性发现。证明胶囊内镜为一种有效可行的方法,可用于对传统诊断方法检查未能明确的可疑Crohn病患者诊断。Gezz *et al*^[7]在传统检查方法未被发现却高度怀疑小肠Crohn病患者中开展无线胶囊内镜检查效力评估。根据录入标准共选择了20例患者,这些患者都具有腹痛、腹泻、发热、体质量减轻、缺铁性贫血和潜血实验阳性等临床表现。20例患者均顺利完成了胶囊内镜检查,结果显示13例

(65%)患者被诊断为小肠Crohn病,病变主要累及小肠远侧端。病变表现为黏膜性侵蚀(2例),小溃疡(5例),结节样淋巴增生(1例),较大溃疡(2例)和肠腔狭窄(3例)。认为胶囊内镜在可疑小肠Crohn病患者中可早期发现小肠病变。Hara *et al*^[8]在怀疑患有小肠Crohn病患者中开展4种小肠诊断技术,评价其诊断效果。四种小肠诊断技术分别为CT、结肠镜、全小肠钡剂造影(SBFT)和胶囊内镜。共有20例患者登记,但是只有17例患者(男8例,平均年龄49岁)完成了本项研究。CT确诊9例(53%)为小肠Crohn病,结肠镜确诊11例(65%),SBFT确诊4例(24%),胶囊内镜确诊12例(71%)。这项研究中胶囊内镜的诊断阳性率最高,SBFT的诊断阳性率最低,这种差异虽然经过统计学处理以后无意义,但是我们仍能看到胶囊内镜在诊断小肠Crohn病方面的优势。在一项评价胶囊内镜对小肠Crohn病诊断价值的研究中,Hererías *et al*^[9]共选择了21例患者进行胶囊内镜检查,这21例患者(男14例,女7例,平均年龄43岁),被高度怀疑为Crohn病,但是采用传统的检查方法均无阳性发现。胶囊内镜的检查结果是12例(57%)未有阳性发现,在另外的9例(43%)患者中发现支持Crohn病的影像学改变。病变主要累及回肠末端,其中1个患者十二指肠远端受累。胶囊内镜采集图片主要改变为阿弗他溃疡,这些溃疡多位于肠壁的肠系膜缘,可融合成匍行或者线行溃疡。这项研究结论是胶囊内镜可以成为小肠Crohn病有价值的诊断工具。Leighton *et al*^[10]在安装心脏起搏器的患者中开展胶囊内镜检查的安全性评估。共有5例患者(男4例,女1例,平均年龄73岁),进行了检查。在进行胶囊内镜检查的过程中,由1位心脏疾病专家和1位护士对心脏起搏器进行监测和评估,在整个检查过程中没有发现心脏节律不齐和不利于心脏的事件发生。胶囊内镜传出图像也未受到起搏器的干扰。在装有起搏器的患者中进行胶囊内镜检查毫无疑问是安全的。

小肠Crohn病目前诊断的依据主要是临床表现、影像学表现和内镜检查。常用的检查方法有X线钡剂检查、CT、MRI、小肠镜、胶囊内镜。X线钡剂检查往往是诊断小肠Crohn病和判断疾病累及范围的首选方法,但是其检查结果的可靠性有一定程度取决于放射学者的操作水平和工作经验。CT、MRI虽然采取了一些新的方法来诊断小肠Crohn病,但是检测黏膜的变化阳性率不及X线钡剂检查^[11],只是在诊断小肠

表 1 胶囊内镜并发症的文献调研

第一作者	n	嵌顿	手术取出	其他
Enns ^[13]	226	7	5(1例急诊)	2例内镜取出
Fireman ^[14]	160	2	2	
Fidder ^[15]	125	3	1	
Delvaux ^[16]	137	5	3	2例患者拒绝, 无症状
Buchman ^[17]	30	2	2	

Crohn病严重并发症方面优于钡剂检查. 最新型的双气囊小肠镜可以直观获得肠内图像^[12], 并进行活检. 但是整个检查过程耗时长(78 ± 10 min), 通常需要麻醉和镇静, 患者痛苦较大, 并有出血和穿孔的危险性. 小肠Crohn病早期仅有黏膜炎症表现和扁平的或轻度的微隆起病灶, 这正是传统检查方法的盲区. 而胶囊内镜对经传统方法未能检出的疑似小肠Crohn病具有较高的检出率, 尤其是对疾病早期和对轻型患者的诊断具有明显优越性. 虽然目前胶囊内镜的检查费用偏高, 但是他对于早期Crohn病有着良好的诊断效果, 可以使患者得到及时的治疗, 避免并发症的出现. 因此胶囊内镜的成本-效果分析(cost-effectiveness analysis, CEA)优于其他检查手段.

3 并发症和存在问题

目前, 胶囊内镜最主要的并发症就是胶囊嵌顿, 绝大多数患者最终都需要手术取出. 尤其是在明确Crohn病的患者中, 目前Crohn病在无严重并发症时属于手术禁忌症, 因此一旦发生嵌顿是一个比较棘手的问题. 现将目前有关胶囊内镜并发症的文献进行总结(表1)^[13-17]. 胶囊内镜是安全的, 但是存在着一些不稳定的因素, 小肠狭窄是胶囊内镜并发症的重要诱因, 在进行胶囊内镜检查前最好进行小肠钡餐检查, 对小肠的狭窄程度进行严格的评估, 以降低胶囊内镜的风险. 胶囊内镜检查全过程, 要密切注意大便情况, 了解胶囊内镜排出情况, 必要时可以进行X线检查, 但是胶囊内镜在排出体外之前禁止进行核磁共振检查. 当前对于胶囊内镜的研究也存在着一定局限性, 这些研究在病例入选时, 就存在着选择性偏移, 而且样本量不大, 我们还需要设计合理、评测严格的大样本研究来进一步探讨胶囊内镜的应用.

胶囊内镜的发射器在工作中不断向体外发射无线信号, 由于胶囊内镜的信号与日常生活中的电磁信号不一致, 互相干扰很少, 但是胶囊内镜之间干扰很明显^[18], 在相距3 m以内两个胶

囊内镜的信号可以互相接受, 而且计算机在处理时不易区分, 因此在同一时间和同一地点不能同时进行两个人以上的胶囊内镜检查. 胶囊内镜的图象还不是很清晰, 有待于改进. 而且不能进行活检和内镜下治疗是其缺点.

4 创新性

胶囊内镜在小肠Crohn病早期诊断方面的优势是不容置疑的, 但是胶囊内镜的稳定性有待进一步的提高^[19], 现在已经有多种新型的胶囊内镜问世. 一种可以推进胶囊内镜在小肠内向前或向后运动的电子装置已经用于动物实验, 该小组已经发明了各种可以供胶囊附着和回收的装置. 目前, 又有一种新型的“开放式胶囊”问世, 这种胶囊配备有电频尾随监视器, 并且能被吞咽下. 如果这种胶囊在狭窄处嵌顿, 信号仍会被传送, 但是如果该胶囊滞留超过24 h或4 d(分别为2种型号), 他即开始自动溶解^[20]. 相信随着胶囊内镜的不断完善, 将在临床上日益普及, 并且具有广泛的应用前景.

5 参考文献

- 1 Delaney CP, Fazio VW. Crohn's disease of the small bowel. *Surg Clin North Am* 2001; 81: 137-158
- 2 Meron GD. The development of the swallowable video capsule (M2A). *Gastrointest Endosc* 2000; 52: 817-819
- 3 Kubota K, Nakamura T, Terano A. Capsule endoscopy. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2005; 106: 685-688
- 4 Swain P. Wireless capsule endoscopy and Crohn's disease. *Gut* 2005; 54: 323-326
- 5 Marmo R, Rotondano G, Piscopo R, Bianco MA, Siani A, Catalano O, Cipolletta L. Capsule endoscopy versus enteroclysis in the detection of small-bowel involvement in Crohn's disease: a prospective trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 772-776
- 6 Fireman Z, Mahajna E, Broide E, Shapiro M, Fich L, Sternberg A, Kopelman Y, Scapa E. Diagnosing small bowel Crohn's disease with wireless capsule endoscopy. *Gut* 2003; 52: 390-392
- 7 Ge ZZ, Hu YB, Xiao SD. Capsule endoscopy in diagnosis of small bowel Crohn's disease. *World J*

创新盘点
文章对于胶囊内镜诊断小肠Crohn病的结果进行适当的分析, 并从目前对此方面的研究和优势、并发症和仍然存在问题、胶囊内镜创新性等方面进行了较为全面的介绍. 尤其是对胶囊内镜目前的并发症和新出现的问题做了评述.

应用要点
本文对胶囊内镜诊断小肠Crohn病的结果和并发症进行了系统、全面的总结, 可将其作为临床医师诊断的重要参考.

同行评价
本文对胶囊内镜
在小肠Crohn病中
的应用作了详细
综述,对于临床应
用胶囊内镜有一
定的参考价值。

- Gastroenterol* 2004; 10: 1349-1352
- 8 Hara AK, Leighton JA, Heigh RI, Sharma VK, Silva AC, De Petris G, Hentz JG, Fleischer DE. Crohn disease of the small bowel: preliminary comparison among CT enterography, capsule endoscopy, small-bowel follow-through, and ileoscopy. *Radiology* 2006; 238: 128-134
- 9 Herrerias JM, Caunedo A, Rodriguez-Tellez M, Pellicer F, Herrerias JM Jr. Capsule endoscopy in patients with suspected Crohn's disease and negative endoscopy. *Endoscopy* 2003; 35: 564-568
- 10 Leighton JA, Srivathsan K, Carey EJ, Sharma VK, Heigh RI, Post JK, Erickson PJ, Robinson SR, Bazzell JL, Fleischer DE. Safety of wireless capsule endoscopy in patients with implantable cardiac defibrillators. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1728-1731
- 11 Mako EK, Mester AR, Tarjan Z, Karlinger K, Toth G. Enteroclysis and spiral CT examination in diagnosis and evaluation of small bowel Crohn's disease. *Eur J Radiol* 2000; 35: 168-175
- 12 May A, Nachbar L, Wardak A, Yamamoto H, Ell C. Double-balloon enteroscopy: preliminary experience in patients with obscure gastrointestinal bleeding or chronic abdominal pain. *Endoscopy* 2003; 35: 985-991
- 13 Enns R, Go K, Chang H, Pluta K. Capsule endoscopy: a single-centre experience with the first 226 capsules. *Can J Gastroenterol* 2004; 18: 555-558
- 14 Fireman Z, Eliakim R, Adler S, Scapa E. Capsule endoscopy in real life: a four-centre experience of 160 consecutive patients in Israel. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 927-931
- 15 Fidler HH, Nadler M, Lahat A, Lahav M, Bardan E, Avidan B, Bar-Meir S. The utility of capsule endoscopy in the diagnosis of Crohn's disease based on patient's symptoms. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 384-387
- 16 Delvaux M, Fassler I, Gay G. Clinical usefulness of the endoscopic video capsule as the initial intestinal investigation in patients with obscure digestive bleeding: validation of a diagnostic strategy based on the patient outcome after 12 months. *Endoscopy* 2004; 36: 1067-1073
- 17 Buchman AL, Miller FH, Wallin A, Chowdhry AA, Ahn C. Videocapsule endoscopy versus barium contrast studies for the diagnosis of Crohn's disease recurrence involving the small intestine. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 2171-2177
- 18 陈孝, 张子其, 张建萍, 张钰. 胶囊内镜检查存在的问题及副作用的初步分析. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2233-2236
- 19 Jonnalagadda S, Prakash C. Intestinal strictures can impede wireless capsule enteroscopy. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 418-420
- 20 Delvaux M, Ben Soussan E, Laurent V, Lerebours E, Gay G. Clinical evaluation of the use of the M2A patency capsule system before a capsule endoscopy procedure, in patients with known or suspected intestinal stenosis. *Endoscopy* 2005; 37: 801-807

电编 何基才 编辑 王晓瑜

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\临床医学\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].

通腑颗粒改善犬缺血再灌注状态下实施肠内营养时的小肠功能

胡森, 王海滨, 夏斌, 于勇, 黎君友, 邹晓防, 周国勇, 车晋伟

胡森, 夏斌, 黎君友, 邹晓防, 周国勇, 车晋伟, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所休克与多器官功能障碍实验室 北京市 100037
王海滨, 于勇, 中国人民解放军总医院第一附属医院检验科 北京市 100037
军队十一五专项课题资助项目, No. 06Z055
通讯作者: 胡森, 100037, 北京市阜成路51号, 中国人民解放军总医院第一附属医院烧伤研究所休克与多器官功能障碍实验室. hs82080@yahoo.com.cn
电话: 010-66867397 传真: 010-68989391
收稿日期: 2007-01-22 接受日期: 2007-02-08

Improvement effect of Tongfu particles on gut function in the process of enteral nutrition following intestinal ischemia and reperfusion in dogs

Sen Hu, Hai-Bin Wang, Bin Xia, Yong Yu, Jun-You Li, Xiao-Fang Zou, Guo-Yong Zhou, Jin-Wei Che

Sen Hu, Bin Xia, Jun-You Li, Xiao-Fang Zou, Guo-Yong Zhou, Jin-Wei Che, Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burn Institute, the First Hospital Affiliated to General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China
Hai-Bin Wang, Yong Yu, Department of Clinical Laboratory, the First Hospital Affiliated to General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China

Supported by the Special Foundation of the 11th Five-Year Plan for Military Medical Project, No. 06Z055

Correspondence to: Sen Hu, Laboratory of Shock and Multiple Organ Dysfunction, Burn Institute, the First Hospital Affiliated to General Hospital of Chinese PLA, 51 Fucheng Road, Beijing 100037, China. hs82080@yahoo.com.cn

Received: 2007-01-22 Accepted: 2007-02-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of Tongfu particles (TF) on gut function during the administration of enteral nutrition (EN) following intestinal ischemia and reperfusion (I/R).

METHODS: Thirty-two male dogs were randomly and averagely divided into group A, B, C and D, received single EN, single I/R, I/R plus EN, and I/R plus EN plus TF, respectively. The intestinal I/R were achieved by clipping superior mesenteric artery (SMA) for 1 hours. EN was performed 4 hours after reperfusion. Gut intolerance was assessed by monitoring the

symptoms of diarrhea and vomiting. Intestinal cavity pressure (ICP), plasma D-xylose absorption and diamine oxidase (DAO) activities were measured to determine intestinal function.

RESULTS: The value of ICP and the activities of DAO were significantly increased (ICP: 17.5 ± 1.1 kPa, 17.6 ± 1.3 kPa, 17.3 ± 1.5 kPa vs 12.3 ± 0.9 kPa, all $P < 0.01$; DAO: 1.19 ± 0.15 U, 1.14 ± 0.13 U, 1.18 ± 0.15 U vs 0.68 ± 0.23 U, all $P < 0.01$), but the plasma D-xylose absorption was decreased (2.28 ± 0.23 mmol/L, 2.31 ± 0.14 mmol/L, 2.33 ± 0.10 mmol/L vs 3.68 ± 1.05 mmol/L, all $P < 0.01$) in group B, C and D as compared with those in group A. The most significant changes were found in group C, with a higher intolerance than that group B and A (87.5% vs 12.5% , 0% , both $P < 0.01$). Tongfu particles caused significant decreases of plasma ICP and DAO (ICP: 17.1 ± 1.3 kPa vs 27.5 ± 1.1 kPa, $P < 0.01$; DAO: 1.19 ± 0.24 U vs 1.94 ± 0.27 U, $P < 0.01$) and increases of D-xylose absorption (2.97 ± 0.21 mmol/L vs 1.07 ± 0.15 mmol/L, $P < 0.01$) 1 hour after EN, and the gut tolerance to EN was also down-regulated.

CONCLUSION: Tongfu particles have obvious improvement effect on gut tolerance to EN by attenuating gut dysfunction in dogs with I/R injury.

Key Words: Tongfu particles; Intestinal ischemia and reperfusion; Enteral nutrition; Gut tolerance

Hu S, Wang HB, Xia B, Yu Y, Li JY, Zou XF, Zhou GY, Che JW. Improvement effect of Tongfu particles on gut function in the process of enteral nutrition following intestinal ischemia and reperfusion in dogs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1845-1849

摘要

目的: 研究通腑颗粒(TF)对肠缺血-再灌注(I/R)状态下实施早期肠内营养(EN)时小肠功能的影响。

方法: ♂杂种犬32只随机平均分为EN组、I/R组、I/R+EN组和I/R+EN+TF组, 夹闭肠系膜上动脉(SMA)1 h后恢复灌流造成肠I/R损伤,

背景资料

早期EN已被外科及危重病医学领域所广泛接受和普遍采用。但临床实践表明, 在对休克和危重患者实施EN过程中, 常发生肠道并发症和对EN不能耐受。作者以往的研究显示, 创、烧伤休克引起肠I/R是导致小肠对EN的耐受能力显著降低的重要因素, 因此减轻肠I/R损伤, 提高小肠对EN的耐受能力, 对于创、烧伤休克患者安全有效的实施EN有重要意义。通腑颗粒就是值得关注的能提高小肠对EN耐受能力的一种中药。

创新盘点
本文结果显示肠I/R损伤引起小肠功能障碍是导致小肠对EN的耐受能力显著降低的重要因素。

复流后4 h实施EN. 检测小肠腔内压(ICP)、血浆D-木糖含量和二胺氧化酶(DAO)活性评价小肠动力、吸收和屏障功能。

结果: 肠I/R各组与单纯EN组比较ICP和DAO显著升高(ICP: 17.5 ± 1.1 kPa, 17.6 ± 1.3 kPa, 17.3 ± 1.5 kPa vs 12.3 ± 0.9 kPa, 均 $P < 0.01$; DAO: 1.19 ± 0.15 U, 1.14 ± 0.13 U, 1.18 ± 0.15 U vs 0.68 ± 0.23 U, 均 $P < 0.01$), 血浆D-木糖明显降低(2.28 ± 0.23 mmol/L, 2.31 ± 0.14 mmol/L, 2.33 ± 0.10 mmol/L vs 3.68 ± 1.05 mmol/L, 均 $P < 0.01$). 肠I/R+EN组上述变化最重, 肠道不能耐受发生率显著高于I/R组和EN组(87.5% vs 12.5% , 0% , $P < 0.01$). EN后1 h, 通腑颗粒治疗组与I/R+EN组相比, 血浆ICP和DAO显著降低(ICP: 17.1 ± 1.3 kPa vs 27.5 ± 1.1 kPa, $P < 0.01$; DAO: 1.19 ± 0.24 U vs 1.94 ± 0.27 U, $P < 0.01$). D-木糖明显升高(2.97 ± 0.21 mmol/L vs 1.07 ± 0.15 mmol/L, $P < 0.01$); 肠道不能耐受发生率也显著降低。

结论: 通腑颗粒能显著改善肠道吸收、动力和屏障功能指标, 提高犬I/R时小肠对早期肠内营养的耐受能力。

关键词: 通腑颗粒; 缺血再灌注; 肠内营养; 肠耐受

胡森, 王海滨, 夏斌, 于勇, 黎君友, 邹晓防, 周国勇, 车晋伟. 通腑颗粒改善犬缺血再灌注状态下实施肠内营养时的小肠功能. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1845-1849
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1845.asp>

0 引言

早期肠内营养(early enteral nutrition, EN)作为一种治疗手段, 因更符合机体的生理状态和能有效促进胃肠功能恢复, 而被外科及危重病医学领域所广泛接受和普遍采用^[1-3]. 我们以往的研究表明, 肠道低灌流和再灌流能显著降低小肠对EN的耐受能力, 造成肠道功能和病理损害^[4-6], 因此改善肠缺血状态下实施EN时的小肠功能, 对于休克患者安全有效的实施EN具有重要意义. 通腑颗粒是国内学者根据胃气上逆腑气不通证理论和治则研制成功的中药复方颗粒, 经动物实验与临床研究验证, 在改善肠黏膜灌流、保护胃肠黏膜及防治微生态紊乱等方面显示了良好的治疗效果^[7-8]. 本文研究通腑颗粒对肠缺血-再灌注(I/R)状态下实施EN时小肠吸收、运动和屏障功能的影响, 为其用于提高创、烧伤休克患者对EN的耐受能力, 防治肠道的并发症提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性健康杂种犬32只(解放军总医院第一附属医院实验动物科提供), 体质量10-14 kg. 通腑颗粒: 主要成分厚朴、大黄、枳实、木香等, 北京友谊医院研制, 北京长城制药厂产品, 使用前用生理盐水配成0.15 g/mL通腑颗粒溶液. 瑞代营养液: 德国费森尤斯卡比公司产品. CardioMax II型动力监测仪: 美国Columbus Instruments公司产品. ZNB-XB型输液泵: 北京科利丰科技公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物模型 动物适应性饲养1 wk后进行实验. 手术前禁食水18 h, 氯胺酮(8 mg/kg)+速眠新II(0.1 mL/kg) im麻醉. 无菌手术行右侧股动、静脉插管, 监测平均动脉压(MAP)、采集血样本及输液. 取上腹部正中切口逐层进腹, 于距Treitz韧带10-15 cm处行空肠造口, 放置TONO-16F肠黏膜张力计, 荷包缝合固定. 各组动物术中均按30 mL/h输入9 g/L氯化钠和50 g/L葡萄糖注射液. 术后6 h待动物完全清醒后制作动物模型. 即钝性游离肠系膜上动脉(SMA)根部, 用动脉夹夹闭SMA 60 min后恢复血流. 还纳肠管后逐层关闭腹腔, 术毕im硫酸庆大霉素注射液8万单位. SMA恢复灌流后4 h开始实施EN, 先用ZNB-XB型输液泵的配套加温装置预热肠内营养管, 至温度达到33℃-37℃时, 按照4 mL/(kg·h)滴速持续滴注(经预实验EN对照组动物完全耐受, I/R+EN组出现不能耐受时间为实施EN后2-4 h)瑞代营养液, 维持并连续观察直至动物出现肠道不能耐受症状时停止EN, 所有不能耐受的动物在停止EN、并间隔6 h后均能够耐受再次EN. 整个肠内营养过程在动物完全清醒状态下完成, 动物于恢复SMA灌流后24 h处死。

1.2.2 分组处理 动物随机分为4组: (1)单纯缺血-再灌注组(I/R): 夹闭SMA 1 h后恢复灌流, 自复流4 h起肠内滴注生理盐水4 mL(kg·h); (2)缺血-再灌注后EN组(I/R+EN): 夹闭SMA 1 h复流4 h后行肠内滴注瑞代营养液4 mL(kg·h); (3)通腑颗粒治疗组(I/R+EN+TF): 于EN后5 min经肠黏膜张力管同时滴注0.15 g/mL通腑颗粒溶液, 剂量为0.3 g/kg, 滴注速度1 mL/min, 约20 min滴完; (4)单纯EN组(EN): 不夹闭SMA, 其余操作同I/R+EN。

1.2.3 检测及方法 分别在缺血60 min(I60)、实施

表 1 肠I/R犬小肠腔内压的变化($n = 8$, mean \pm SD, kPa)

分组	I60	EN后时间(h)				
		0	1	4	8	20
EN	12.3 \pm 0.9	13.7 \pm 1.3	11.6 \pm 1.4	12.7 \pm 1.1	13.1 \pm 1.2	12.9 \pm 1.1
I/R	17.5 \pm 1.1 ^b	23.5 \pm 1.9 ^b	24.6 \pm 1.3 ^b	27.1 \pm 1.7 ^b	23.7 \pm 1.5 ^b	20.6 \pm 1.3 ^b
I/R+EN	17.6 \pm 1.3 ^b	23.1 \pm 1.7 ^b	27.5 \pm 1.1 ^{bd}	29.8 \pm 1.4 ^b	32.3 \pm 1.6 ^{bd}	21.1 \pm 0.9 ^b
I/R+EN+TF	17.3 \pm 1.5 ^b	23.4 \pm 1.6 ^b	17.1 \pm 1.3 ^{bdf}	13.8 \pm 1.2 ^{df}	14.1 \pm 1.5 ^{df}	13.5 \pm 1.1 ^{df}

^b $P < 0.01$ vs EN组; ^d $P < 0.01$ vs I/R组; ^f $P < 0.01$ vs I/R+EN组.

EN即刻及实施EN后1, 4, 8和20 h(相当恢复灌流24 h)各时相点测定: (1)小肠动力: 测定肠腔内压力反映. 将腹腔引出的肠腔内测压管(北京颐松科技发展有限公司制作)与CardioMax型压力监测仪连接后, 先抽空测压管气囊内空气, 然后注入2 mL气体, 待气体平衡5 min后, 通过压力传感器压力经监测仪显示出肠内压记录值, 连续记录10 min肠腔内平均压力, 单位以“kPa”表示; (2)小肠吸收功能: 测定血浆D-木糖吸收量^[9]: 即用注射器将木糖溶液(0.5 g/kg)经肠内营养通道注入肠腔, 1 h后采血, 取血浆25 μ L, 分别加入显色剂(间苯三酚1 g, 冰乙酸200 mL, 浓盐酸12 mL)2.5 mL, 充分混匀后, 100℃水浴8 min, 流水中冷却至室温. 于DU-7Beckman紫外分光光度计上在554 nm处测定A值. 根据标准曲线计算D-木糖浓度. 单位以“mmol/L”表示; (3)血浆二胺氧化酶(DAO)活性: 采用黎君友 *et al*^[9]报道的方法测定, 单位以“U”表示.

1.2.4 肠不耐受症状的判定 根据参考文献^[10-11]和预实验结果, 我们以呕吐和腹泻等肠道症状做为肠道不能耐受时的临床症状指标, 出现其中任一项症状即判定为肠道不能耐受. 其中呕吐物在50 mL以内者为(+), 50-100 mL之间为(++), 在100 mL以上者为(+++); 腹泻量在50 mL以内者为(+), 50-100 mL为(++), 100 mL以上者为(+++).

统计学处理 数据以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 采用SPSS10.0统计软件进行 t 检验、方差分析及相关分析, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 肠道不能耐受症状 单纯EN组全部耐受(0/8); I/R+EN组7只动物不能耐受(7/8), 出现时间为实施EN后2-4 h, 其中呕吐5只(+++2只, ++3只), 腹泻6只(+++3只, ++2只, +1只); 单纯I/R组1只不能耐受(1/8, 腹泻+++); TF治疗组1只不能耐受(1/8,

呕吐++). I/R+EN组不能耐受发生率(87.5%)及严重程度均高于单纯I/R组和TF治疗组(12.5%, $P < 0.01$). 单纯I/R组、单纯EN及TF治疗组三者之间无显著性差异($P > 0.05$). 所有不能耐受的动物在停止EN并间隔6 h后均能够耐受再次EN.

2.2 小肠内压 恢复灌流前, I/R组、I/R+EN组及I/R+EN+TF组ICP无显著差别, 但均显著高于EN组($P < 0.01$), 恢复灌流后, I/R+EN组ICP进行性增加, 显著高于EN组和I/R组($P < 0.01$); 给予通腑颗粒使ICP明显降低, I/R+EN+TF组ICP显著低于I/R组和I/R+EN组($P < 0.01$), EN后8 h起I/R+EN+TF组ICP与EN组相比无显著差别($P > 0.05$)(表1).

2.3 血浆D-木糖含量变化 实验过程中EN组D-木糖含量变化不大. 恢复灌流前, I/R组、I/R+EN组及通腑颗粒治疗组D-木糖含量均显著低于EN组($P < 0.01$), 但3组间无显著差别; 实施EN后, I/R+EN组D-木糖进行性降低, EN后1-8 h(8/7动物出现肠道不能耐受), I/R+EN组D-木糖与I/R组比较差异非常显著($P < 0.01$); 而通腑颗粒治疗组肠D-木糖迅速回升, EN后4 h起显著高于I/R组和I/R+EN组($P < 0.01$)(表2).

2.4 血浆DAO活性 I/R+EN组和I/R组DAO显著高于EN组, I/R+EN组与I/R组之间DAO差别无显著性; EN后1 h起, 通腑颗粒治疗组DAO显著低于I/R组和I/R+EN组($P < 0.01$), EN后4 h回降至EN组水平($P > 0.05$)(表3).

3 讨论

近年的临床实践表明, 在严重创伤、烧伤、休克以及外科大手术后患者实施EN过程中, 常发生腹胀、腹痛、呕吐、腹泻、甚至非梗阻性肠坏死(NOBH)等肠道并发症和对EN不能耐受. 以往认为实施EN时发生肠道并发症主要与EN成分和技术有关, 但通过临床病例分析发现, 许多不能耐受EN的患者都不同程度的处于肠道低灌流和/或隐匿性休克状态下^[12-13]. 严重创(烧)伤休

应用要点
通腑颗粒能显著改善肠I/R时肠道吸收、动力和屏障功能. 对于改善创、烧伤休克患者小肠功能和对早期肠内营养的耐受能力具有临床应用价值.

名词解释

小肠耐受性(gut tolerance)是指小肠对肠内营养的耐受能力。在肠内营养方案确定时, 主要与小肠功能状态(运动和吸收功能)有关。能影响小肠功能状态的肠道疾病如肠缺血、肠梗阻、肠道炎症以及全身急危重症均能显著降低小肠耐受性。

表 2 肠I/R犬血浆D-木糖含量变化($n = 8$, mean \pm SD, mmol/L)

分组	I60	EN后时间(h)				
		0	1	4	8	20
EN	3.68 \pm 1.05	3.72 \pm 0.87	3.93 \pm 0.54	3.89 \pm 0.76	3.71 \pm 0.93	3.81 \pm 0.85
I/R	2.28 \pm 0.23 ^b	1.51 \pm 0.31 ^b	1.49 \pm 0.13 ^b	1.37 \pm 0.23 ^b	2.12 \pm 0.15 ^b	2.45 \pm 0.31 ^b
I/R+EN	2.31 \pm 0.14 ^b	1.57 \pm 0.36 ^b	1.07 \pm 0.15 ^{bd}	0.89 \pm 0.25 ^{bd}	0.76 \pm 0.12 ^{bd}	2.39 \pm 0.37 ^b
I/R+EN+TF	2.33 \pm 0.10 ^b	1.56 \pm 0.24 ^b	2.97 \pm 0.21 ^{bdf}	3.61 \pm 0.22 ^{df}	3.57 \pm 0.15 ^{df}	3.69 \pm 0.31 ^{df}

^b $P < 0.01$ vs EN组; ^c $P < 0.01$ vs I/R组; ^d $P < 0.01$ vs I/R+EN组。

表 3 各组犬血浆DAO活性的变化($n = 8$, mean \pm SD, U)

分组	I60	EN后时间(h)				
		0	1	4	8	20
EN	0.68 \pm 0.23	0.79 \pm 0.16	0.71 \pm 0.27	0.69 \pm 0.21	0.72 \pm 0.20	0.74 \pm 0.21
I/R	1.19 \pm 0.15 ^b	1.45 \pm 0.19 ^b	1.98 \pm 0.26 ^b	2.08 \pm 0.26 ^b	3.11 \pm 0.13 ^b	1.281 \pm 0.11 ^b
I/R+EN	1.14 \pm 0.13 ^b	1.40 \pm 0.17 ^b	1.94 \pm 0.27 ^b	2.13 \pm 0.15 ^b	3.32 \pm 0.10 ^b	1.40 \pm 0.23 ^b
I/R+EN+TF	1.18 \pm 0.15 ^b	1.44 \pm 0.16 ^b	1.19 \pm 0.24 ^{bdf}	0.81 \pm 0.25 ^{df}	0.91 \pm 0.13 ^{df}	0.77 \pm 0.23 ^{df}

^b $P < 0.01$ vs EN组; ^c $P < 0.01$ vs I/R组; ^d $P < 0.01$ vs I/R+EN组。

克时, 机体通过神经体液调节促使全身血流重新分布, 减少胃肠道、肌肉、皮肤等组织的血液供应, 以保障心、脑等生命器官的血液供应。胃肠道作为“牺牲器官”, 在创、烧伤休克时及复苏后可出现严重的缺血、缺氧和再灌注性损伤^[14-15]。为了模拟休克时肠道低灌注状态及隐匿性缺血时实施EN的临床过程, 我们建立了肠道I/R状态下实施EN的实验模型。在研究中我们分别以木糖吸收实验、肠腔内压力和血浆DAO作为反映小肠吸收、运动及屏障功能的指标。其中木糖吸收实验中测定的D-木糖为五碳糖, 在肠道内不能完全被吸收, 其吸收需要钠泵转运, 血浆或尿液中的含量能反映小肠的吸收功能; 肠腔内压力测定是评价小肠动力变化的方法之一; 而DAO存在于小肠黏膜上皮绒毛内, 缺血性损伤后可大量释放入血, 因而可以间接反映小肠黏膜屏障的损伤^[16]。本实验结果显示, 与单纯EN组比较, 肠I/R各组血浆D-木糖明显降低, DAO和ICP显著升高。其中肠I/R+EN组的变化最重, 肠道不能耐受发生率(87.5%)显著高于I/R组(12.5%)和EN组(0%), 表明肠I/R能显著降低小肠对早期肠内营养的耐受能力, 造成小肠动力、吸收和屏障功能损害。发生上述变化的机制主要是由于缺血缺氧引起肠组织细胞能量代谢障碍, 使肠道环行肌与纵行肌的收缩受到抑制, 造成肠麻痹或肠腔闭塞使营养物排空受阻, 导致

肠内压升高。另一方面, 大多数营养物质在肠道的吸收过程需要消耗ATP、通过Na⁺-K⁺-ATP酶泵做功完成, 肠I/R损伤能显著降低肠黏膜ATP的含量, 从而加重了肠黏膜的代谢应激, 造成肠黏膜吸收障碍和屏障损害^[4-5], 充分说明肠I/R时过早实施EN不仅不能改善肠道功能, 反而加重肠黏膜代谢应激和缺血状态, 进一步抑制小肠吸收和运动功能, 这也有助于解释临床危重患者实施EN时出现不能耐受的情况。

研究还显示, 通腑颗粒治疗组与I/R+EN和I/R组相比, 血浆D-乳酸和ICP显著降低, 血浆D-木糖明显升高($P < 0.01$); 肠道不能耐受发生率也显著降低。说明肠内给予通腑颗粒能显著改善肠组织功能指标, 减轻肠黏膜的病理损害, 对I/R时小肠有保护作用。本实验中所用通腑颗粒为首都医科大学附属北京友谊医院研制的中药制剂, 由厚朴、大黄、枳实、木香等中药组成, 是一种以通里攻下、清热解毒、疏肝理气、活血化瘀为主旨的中药方剂。根据以往的报告和本研究结果分析, 通腑颗粒对I/R小肠的保护作用的机制可能有以下几方面。(1)活血化瘀、增加肠道血流: 我们以往的研究表明通腑颗粒能降低狗肠I/R时升高的小肠黏膜pHi。国内其他学者的研究报告也显示通腑颗粒主要成分大黄能显著增加失血性休克大鼠和危重病患者肠黏膜血流量, 降低血液黏度, 改善肠道微循环^[16]; (2)清

热解毒、减轻黏膜炎症: 大黄能降低休克和脓毒症患者血浆TNF α 和IL-6含量, 减轻胃肠黏膜的炎症损害^[17]; (3)气促动, 改善胃肠麻痹: 研究表明大黄能提高内毒素休克大鼠肠跨膜电位和肠道平滑肌兴奋性^[18]。厚朴能改善内毒素休克时胃肠电抑制及肠麻痹^[19]。木香能促进内源性胃动素的释放, 加速胃的排空^[20]。通腑颗粒主要成分中含有上述三种中药, 协同作用能显著改善胃肠动力, 纠正胃肠功能紊乱。

4 参考文献

- 1 黎介寿. 肠内营养——外科临床营养支持的首选途径. 中国实用外科杂志 2003; 23: 67
- 2 Braga M, Gianotti L, Gentilini O, Parisi V, Salis C, Di Carlo V. Early postoperative enteral nutrition improves gut oxygenation and reduces costs compared with total parenteral nutrition. *Crit Care Med* 2001; 29: 242-248
- 3 Fukatsu K, Zarzaur BL, Johnson CD, Lundberg AH, Wilcox HG, Kudsk KA. Enteral nutrition prevents remote organ injury and death after a gut ischemic insult. *Ann Surg* 2001; 233: 660-668
- 4 胡森, 盛志勇, 柳琪琳, 石德光, 姜小国, 孙丹, 张蓉. 大鼠小肠缺血再灌注时肠内给予不同营养物对肠黏膜吸收功能和能量代谢的影响. 中华医学杂志 2002; 82: 689-691
- 5 Kozar RA, Hu S, Hassoun HT, DeSoignie R, Moore FA. Specific intraluminal nutrients alter mucosal blood flow during gut ischemia/reperfusion. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2002; 26: 226-229
- 6 胡森, 夏斌, 黎君友, 陈廷秀, 段美丽, 张淑文. 犬肠缺血/再灌注时小肠对早期肠内营养耐受能力的实验研究. 中国危重病急救医学 2006; 18: 605-608
- 7 夏斌, 靳风烁, 胡森, 陈廷秀, 黎君友, 吕艺, 孙丹. 肠缺血-再灌注对早期肠内营养耐受性的影响. 第三军医大学学报 2005; 27: 1016-1019
- 8 胡森, 段美丽, 夏斌, 黎君友, 陈廷秀, 张淑文. 通腑颗粒对犬缺血/再灌注损伤小肠黏膜灌流和通透性的影响. 中国中西医结合急救杂志 2006; 13: 331-334
- 9 黎君友, 吕艺, 付小兵, 晋桦, 胡森, 孙晓庆, 盛志勇. 二胺氧化酶在创伤后肠道损伤中变化及意义. 中国危重病急救医学 2000; 12: 482-484
- 10 Davies AR, Froome PR, French CJ, Bellomo R, Gutteridge GA, Nyulasi I, Walker R, Sewell RB. Randomized comparison of nasojejunal and nasogastric feeding in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002; 30: 586-590
- 11 Munshi IA, Steingrub JS, Wolpert L. Small bowel necrosis associated with early postoperative jejunal tube feeding in a trauma patient. *J Trauma* 2000; 49: 163-165
- 12 Mentec H, Dupont H, Bocchetti M, Cani P, Ponche F, Bleichner G. Upper digestive intolerance during enteral nutrition in critically ill patients: frequency, risk factors, and complications. *Crit Care Med* 2001; 29: 1955-1961
- 13 Davies AR, Froome PR, French CJ, Bellomo R, Gutteridge GA, Nyulasi I, Walker R, Sewell RB. Randomized comparison of nasojejunal and nasogastric feeding in critically ill patients. *Crit Care Med* 2002; 30: 586-590
- 14 Hu S, Sheng ZY. The effects of anisodamine and dobutamine on gut mucosal blood flow during gut ischemia/reperfusion. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 555-557
- 15 Li JY, Lu Y, Hu S, Sun D, Yao YM. Preventive effect of glutamine on intestinal barrier dysfunction induced by severe trauma. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 168-171
- 16 陈德昌, 姜兴禄, 李红江, 景炳文. 大黄对危重症患者胃肠黏膜血流灌注的影响. 中国急救医学 1999; 19: 581-584
- 17 陈德昌, 景炳文, 杨兴易, 宋志芳, 严鸣, 赵良, 单红卫, 余康龙, 张翔宇, 马钧. 大黄对危重症患者胃肠道的保护作用. 中国危重病急救医学 2000; 12: 87-90
- 18 陈德昌, 景炳文, 杨建东, 杨兴易, 陈学云, 李红江, 严鸣. 大黄对胃肠动力学影响的基础和临床研究. 中国危重病急救医学 1997; 9: 411-413
- 19 次秀丽, 王宝恩, 郭昌燕, 陈玲. 厚朴对正常和内毒素休克大鼠胃肠电活动影响的实验研究. 中国中医药科技 1999; 6: 154-156
- 20 陈少夫, 李宇权, 何凤云, 潘丽丽. 木香对胃酸分泌、胃排空及胃泌素、生长抑素、胃动素水平的影响. 中国中西医结合杂志 1994; 14: 406-408

同行评价
本课题思路新颖, 研究方法得当, 结果可靠, 讨论有据, 具有一定的临床参考价值。

电编 郭海丽 编辑 王晓瑜

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。

凝结芽孢杆菌活菌TBC169株对右旋葡聚糖硫酸钠引发大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用

万阜昌, 崔云龙, 闫述翠

背景资料
溃疡性结肠炎是全球范围内的一种慢性肠道炎症性疾病, 迄今为止, 由于其发病原因和发病机制不明, 尚无根治办法。该病常反复发作, 久治不愈, 患者极为苦恼。化学药物对该病虽有一定疗效, 但因副作用大, 患者难于坚持服用。为此, 探索用无毒安全的微生态制剂来治疗该病, 具有很大的现实意义。

万阜昌, 北京天施康医药科技发展有限公司医学部 北京市100037
崔云龙, 闫述翠, 青岛东海药业有限公司菌种鉴定部 青岛市266400
万阜昌, 1964年江西医学院毕业, 研究员, 主要从事药理学研究工作。
国家科技部863计划项目, No.2003AA2ZC50
通讯作者: 万阜昌, 100037, 北京市海淀区阜成路白堆子, 北京天施康医药科技发展有限公司医学部。wanfc2@126.com
电话: 010-68438088 传真: 010-68438088
收稿日期: 2007-02-26 接受日期: 2007-03-31

Therapeutic effects of *Bacillus coagulans* on the dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in rats

Fu-Chang Wan, Yun-Long Cui, Shu-Cui Yan

Fu-Chang Wan, Department of Medicine, Beijing Tian Shi Kang Medicine and Technology Corporation Limited, Beijing 100037, China

Yun-Long Cui, Shu-Cui Yan, Division of Bacterial Strain Selection and Identification, Qingdao Eastern Sea Pharmaceutical Corporation Limited, Qingdao 266400, Shandong Province, China

Supported by The National "863" Plan Item from the Ministry of Science and Technology, China, No.2003AA2ZC50

Correspondence to: Fu-Chang Wan, Department of Medicine, Beijing Tian Shi Kang Medicine and Technology Corporation Limited, Beijing 100037, China. wanfc2@126.com

Received: 2007-02-26 Accepted: 2007-03-31

Abstract

AIM: To investigate the effect of *Bacillus coagulans* (BC, TBC169 strain) in the treatment of rats with ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS).

METHODS: DSS was used to induce UC in Sprague Dawley rats, and then the rats were treated with 10^7 CFU/mL, 10^6 CFU/mL BC, 0.02 g/mL sulfasalazine and normal saline (control), respectively. After 21 days of treatment, the body weight, colorectal wet weight, intestinal mucosal ulcer, erosion spots and area, myeloperoxidase (MPO) activity, and intestinal bacterial flora were observed.

RESULTS: After treatment, the body weights of rats in all the groups were increased, especially in the group received BC at 10^7 CFU/mL ($P < 0.05$). Intestinal wet weight, ulcerative number and area, and MPO activity were significantly reduced in all the treatment groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$ or $P < 0.001$) as compared with those in model control group. Analysis on intestinal flora showed that the number of *Bifidobacterium* was decreased remarkably after modeling, but it was significantly increased in all the treatment groups ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). BC was found colonized in the intestinal tract of BC-treated group.

CONCLUSION: BC has notable therapeutic effect on DSS-induced UC.

Key Words: *Bacillus coagulans*; Dextran sodium sulfate; Rat; Ulcerative colitis; Intestinal flora

Wan FC, Cui YL, Yan SC. Therapeutic effects of *Bacillus coagulans* on the dextran sodium sulfate-induced ulcerative colitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1850-1854

摘要

目的: 研究凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*, BC)对右旋葡聚糖硫酸钠(DSS)引发的大鼠溃疡性结肠炎(UC)的治疗作用。

方法: 采用DSS引发大鼠UC, 分别用 10^7 和 10^6 CFU/mL BC、0.02 g/mL柳氮磺胺吡啶(SASP)和生理盐水(NS)处理。21 d后测定动物体重、结直肠湿重、肠黏膜溃疡、糜烂点数及面积、髓过氧化物酶活性和肠道菌群培养。

结果: 治疗21 d后, 各组中大鼠的体质量增加, 以BC 10^7 CFU/mL增重明显($P < 0.05$); 各治疗组中大鼠的结直肠湿重、肠溃疡糜烂点数、面积、MPO活性与模型组比较均有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); 肠道菌群分析, 造型后双歧杆菌数明显下降($P < 0.05$), 治疗后各组的双歧杆菌数量均明显增加($P < 0.01$)。

或 $P<0.001$),以BC组和SASP组增加最明显($P<0.01$ 或 $P<0.001$).BC在肠道定植.

结论:BC对DSS引发的大鼠UC有明显治疗作用.

关键词:凝结芽孢杆菌;右旋葡聚糖硫酸钠;大鼠;溃疡性结肠炎;肠道菌群

万阜昌,崔云龙,闫述翠.凝结芽孢杆菌活菌TBC169株对右旋葡聚糖硫酸钠引发大鼠溃疡性结肠炎的治疗作用.世界华人消化杂志 2007;15(16):1850-1854

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1850.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(UC)是一种发病原因不明的慢性结肠和直肠炎症性肠道疾病,许多研究提示该病可能与免疫、感染、遗传、肠道菌群失调、食物过敏和精神因素等有关^[1].有研究表明感染可能是一种始动因子(triggering factor)引起肠道炎症,动物模型显示大多数动物在无菌环境中不发生结肠炎,结肠袋囊手术后也一定要有细菌定植才有炎症发生,肠道正常菌群改变或对肠道微生物免疫耐受有缺陷而引起^[1-2].中国炎症性肠病协作组报道我国近年来UC患病率为11.62/10万,住院UC患者以轻度(35.4%)和中度(42.9%)为主,也有报道我国UC患者累计超过12万例^[2-3];在西方国家患病率为每年79-268/10万,在亚洲20世纪后期日本和新加坡报道患病率分别为每年7.8-18.1/10万和8.6/10万,近年来有上升的趋势^[2-3];在美国约有250 000-500 000人被UC所困扰^[4].该病目前尚未有根治方法,常反复发作,不但给人们造成精神和肉体上的痛苦,而且还会给国家和个人带来沉重的经济负担,且UC患者久病不愈,还有恶化为结肠癌的危险.

本试验用DSS造成大鼠实验性UC模型,之后用BC进行治疗,以SASP作对照,研究试药对UC的治疗作用,开辟用凝结芽孢杆菌活菌制剂(商品名爽舒宝)治疗该病的新途径.

1 材料和方法

1.1 材料 凝结芽孢杆菌活菌(含凝结芽孢杆菌活菌TBC169株 10^{10} CFU/g,批号:20010501,北京天施康医药科技发展有限公司),柳氮磺吡啶片(0.25g,批号:200307C02,上海三维制药有限公司),右旋葡聚糖硫酸钠(10 g/瓶,批号:BI03071, Sino-American Biotec),爱尔新蓝(1 g/瓶,批号:BS0084, Sino-American Biotec),髓过氧化物酶

测试盒(南京建成生物工程研究所).EC培养基(肠球菌),EMB培养基(肠杆菌),KV培养基(类杆菌),TPY培养基(双歧杆菌),MRS培养基(乳杆菌)和凝结芽孢杆菌(BC)选择性培养基.SD雄性大鼠60只,体质量80-100 g,标准2级,购自中国药品生物制品检定所实验动物中心,证号:SCXK(京)2000-0010. UV-2100型紫外光分析仪(北京市技术应用研究所).

1.2 方法

1.2.1 UC造型和治疗 SD大鼠60只,试验前在无菌情况下,从大鼠肛门采大便作正常肠道菌群培养,然后其中10只大鼠作为正常对照,50只大鼠参照吴小平 *et al*^[5]报道的大鼠UC造型等方法^[6-7],略加改进,即用DSS(30 g/L)溶液给空腹大鼠10 mL/kg.体质量,ig, qd \times 7 d,最后1次,从肛门加注DSS 1 mL/只,至直肠内,7 d后采大便用作菌群分析.然后处死其中10只,剖腹取结直肠,测定结直肠湿质量(g/kg.体质量),甲醛固定.用爱尔新蓝溶液染色,按李兆申 *et al*^[8]所述方法,肉眼观测肠黏膜糜烂和溃疡点数,用卡尺测量蓝染点(溃疡病灶)的蓝染面积(cm^2).证实UC形成后,将UC大鼠分为4组,每组10只,分别用BC(10^{10} CFU/L)、BC(10^9 CFU/L)、SASP (20 g/L)和NS, ig, bid \times 21 d,21 d后取大便作肠道菌群分析.之后称体质量,处死全部大鼠,按上法处理结直肠标本,检测相应指标,并采取肠组织块制成5%匀浆,采用髓过氧化物酶测试盒,用紫外光分析仪测定髓过氧化物酶(MPO)活性(U/g \cdot 湿片).

1.2.2 肠道菌群培养分析 分别在造型前、造型后和治疗结束后,在无菌操作下,分别采取从大鼠肛门挤出的新鲜大便,称重后10倍稀释,取 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 稀释匀浆液各0.1 mL,接种到含有适宜培养基的平板上,涂匀,需氧菌在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h,厌氧菌在37 $^{\circ}\text{C}$ 培养72 h,计数活菌数(CFU/g) 肠杆菌,肠球菌,类杆菌,乳杆菌和双歧杆菌的培养分别为EMB, EC, KV, MRS, TPY, BC.

统计学处理 数据用mean \pm SD表示,用Student's *t*-test,进行组间均数差异的显著性检验.统计学显著性为 $P<0.05$.

2 结果

2.1 体质量与结直肠湿质量 如表1所示造型前与造型后,各组中大鼠的体质量均有增加,但在各组间无显著性差异;治疗后5组大鼠体质量均有增加,其中以正常组和BC 10^{10} 组增加更显著

研发前沿
国内外医药研究者,对炎症性肠病的研究已日益重视,重点是从分子生物学和微生物学角度进行研究,试图阐明肠道感染和肠道免疫异常与炎症性肠病发病的相关性,尤其是炎症细胞因子对该病发病和治疗机制的研究,已成为热门,而且取得了令人可喜的进展.但因该病病因复杂,因此,应从综合研究上着手解决.

创新盘点

本研究是采用DSS溶液给动物灌胃加直肠给药法,造UC模型,较动物自由饮用DSS溶液造型(21 d以上),具有给药剂量准确,病灶典型,重复性好,时间短(7 d)、花费少等优点.使用凝结芽胞杆菌活菌治疗UC,对动物无毒安全.

表 1 大鼠实验性溃疡性结肠炎DSS造型和BC治疗作用(mean \pm SD, $n = 10$)

分组	体质量(g)			肠湿重 (g/kg. 体质量)	溃疡或糜烂点		MPO活性 (U/g·湿片)
	造型前	造型后	治疗后		点数	面积(cm ²)	
正常组	88.0 \pm 9.2	134.0 \pm 12.7	292.0 \pm 14.00 ^a	5.0 \pm 0.4	0	0	0.07 \pm 0.05
造型组	90.0 \pm 8.2	127.0 \pm 8.2	无	12.6 \pm 0.8 ^b	4.20 \pm 0.92	0.68 \pm 0.21 ^a	1.33 \pm 0.31 ^b
造型+NS	86.00 \pm 8.4	130.0 \pm 6.7	255.0 \pm 16.5	6.1 \pm 0.7	3.50 \pm 0.97	0.42 \pm 0.16	0.68 \pm 0.35
造型+BC 10 ¹⁰	89.0 \pm 9.9	127.0 \pm 9.5	275.0 \pm 22.7 ^b	4.8 \pm 0.5 ^b	1.80 \pm 1.23 ^b	0.14 \pm 0.14 ^b	0.20 \pm 0.10 ^b
造型+BC 10 ⁹	93.0 \pm 9.5	133.0 \pm 9.5	267.0 \pm 16.7	5.0 \pm 0.5 ^b	1.60 \pm 1.07 ^b	0.15 \pm 0.10 ^b	0.29 \pm 0.29 ^b
造型+SASP	86.0 \pm 8.4	131.0 \pm 8.8	264.0 \pm 13.5	5.4 \pm 0.5 ^a	2.20 \pm 0.96 ^b	0.22 \pm 0.18 ^a	0.20 \pm 0.10 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 造型+NS.

著,与造型+NS组比较有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$).正常组中大鼠的结直肠湿质量与3个药物治疗组接近,无明显不同.治疗后造型组肠湿质量与造型组+NS组的比较有非常显著性差异($P < 0.001$),2个BC组与造型+NS组比较也均有非常显著性差异(P 均 < 0.001),SASP组与造型+NS组比较也有显著性差异($P < 0.05$),而3个药物间作用则基本接近(表1).

2.2 结直肠溃疡(或糜烂)点数与面积 用DSS溶液给大鼠ig,加直肠给药后可形成典型的大鼠溃疡性结肠炎,在整个结直肠,尤其结肠下端和直肠的肠标本用爱尔新蓝染色后,肠黏膜可见明显深染的不规则的溃疡点或糜烂点.结直肠溃疡(糜烂)点数,3个药物治疗组与造型+NS组比较均有很显著差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),而他们间比较无多大差异.溃疡面积,造型组与造型组+NS组与比较有显著性差异($P < 0.05$),治疗后2个BC组的溃疡面积与造型+NS组的比较均有很显著差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),而SASP组与造型组+NS组比较也有显著性差异($P < 0.05$),但3组间无明显不同(表1).

2.3 MPO活性 正常组中大鼠结肠组织中MPO活性极低,有的检测为0.造型后,造型组的MPO活性比造型+NS组的非常显著地增高($P < 0.001$).治疗后,各治疗组的MPO活性大幅度下降与造型+NS组的比较均有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$).而3个治疗组之间的MPO活性无明显不同(表1).

2.4 肠道菌群培养分析 正常大鼠肠道的肠杆

菌、肠球菌、类杆菌、乳杆菌和双歧杆菌的生长状态属正常(表2).经DSS造型后,造型组大鼠肠道双歧杆菌的数量比正常组的明显地低($P < 0.05$),而其他菌群无明显变化;治疗后的各组肠道菌群基本恢复到正常,但BC组和SASP组的双歧杆菌数量均非常显著高于($P < 0.001$)造型组;造型+NS组(自然恢复)也显著高于($P < 0.01$)造型组. BC在肠道定植,10¹⁰ CFU/L组定植数较高(表2).

3 讨论

本实验结果提示BC对DSS引起的大鼠实验性溃疡性结肠炎有一定治疗作用,其表现是治疗后的大鼠肠湿质量显著地减轻,结直肠黏膜溃疡的糜烂点数显著减少、溃疡面积明显缩小,MPO活性明显下降,肠道内的双歧杆菌数减少有明显恢复,对照药SASP也有一定的治疗效果.造型+NS组的大鼠结直肠湿质量和溃疡病灶也比造型组减轻,说明大鼠实验性溃疡性结肠炎有自愈倾向,肠道双歧杆菌下降也有自然恢复现象.

凝结芽胞杆菌治疗大鼠溃疡性结肠炎的作用机制是:(1)修复肠黏膜,BC在代谢过程中能产生短链脂肪酸(SCFAs)如乳酸、乙酸等,这类物质能作为受损的肠黏膜的能量供给,有利于溃疡面的修复,日本Araki *et al*^[9]报道酪酸梭菌产生的SCFAs,能修复受损的肠黏膜,因而对溃疡性结肠炎有一定疗效,吴小平 *et al*^[5]也报道酪酸梭菌可治疗DSS引发的大鼠UC;(2)抗氧化作用,

表 2 大鼠肠道菌群培养(mean \pm SD, $n = 10$, log 10⁷CFU/g)

组别	EMB	EC	KV	MRS	TPY	BC
正常组	6.01 \pm 0.52	5.86 \pm 0.71	9.41 \pm 0.40	9.79 \pm 0.47	9.31 \pm 0.41 ^a	0
造模组	6.52 \pm 0.27	6.14 \pm 0.36	10.16 \pm 0.35	10.03 \pm 0.76	8.91 \pm 0.42	0
造模组+NS	6.45 \pm 0.58	5.97 \pm 0.34	9.51 \pm 0.26	10.04 \pm 0.36	9.58 \pm 0.37 ^b	0
造模组+BC 10 ¹⁰	5.81 \pm 0.48	5.80 \pm 0.58	9.50 \pm 0.96	10.25 \pm 0.58	9.90 \pm 0.23 ^b	6.47 \pm 0.17
造模组+BC 10 ⁹	5.80 \pm 0.47	5.34 \pm 0.64	9.72 \pm 0.43	10.34 \pm 0.24	9.90 \pm 0.19 ^b	5.36 \pm 0.50 ^d
造模组+SASP	6.25 \pm 0.63	5.90 \pm 0.66	8.99 \pm 0.30	9.86 \pm 0.27	9.50 \pm 0.24 ^b	0

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 造模组; ^d $P < 0.01$ vs BC 10¹⁰组。

本研究证明BC能抑制髓过氧化物酶的活性,减少氧自由基对肠黏膜的损伤。Krawisz *et al*^[10]报道用8%-12%醋酸给大鼠灌肠造成结肠炎也可激活MPO活性,且肠黏膜损害炎症越严重,白细胞数目也越多,MPO活性就越高,甚至高达30.5 U/g。可见MPO活性的高低明显影响着溃疡性结肠炎的发生和发展,当自由基不断增多,超过机体清除能力时,则引起周围组织的严重破坏性损伤,并使炎症和组织损伤之间形成恶性循环;(3)免疫调节作用,在IBD病程中经常可以观察到肠道免疫系统失调,包括抗原的刺激作用,使得黏膜IgG产生细胞聚集和激活;T淋巴细胞亚群以辅助性T细胞激活为主,而非抗原特异性的抑制性T细胞,由此产生致炎细胞因子(IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 和TGF- γ 等),而抑制性炎症细胞因子(IL-ra、IL-4、IL-10和TGF- β 等)则相对不足,从而产生细胞因子网络调控失衡,引起和放大黏膜的炎症反应。乙酸性大鼠UC,也发现结肠黏膜TNF- α 、NF- κ B表达明显提高,IL-10表达则明显降低^[2,6,11],张婵 *et al*^[11]使用能释放谷胱苷肽的发酵乳杆菌治疗IBD,发现其主要通过降低结肠内TNF- α 和诱导氮氧合酶的表达,从而调节NO等炎性介质产生,以改善炎症症状。向军英 *et al*^[12]用美常安(枯草杆菌、屎肠球菌二联活菌)联合柳氮磺吡啶治疗溃疡性结肠炎22例,总有效率为91.66%。王文杰 *et al*^[13]和房志仲 *et al*^[14]的研究均证实BC能提高机体的巨细胞吞噬功能、增加血清溶血素的生成、增强NK细胞活性和淋巴细胞的转化,对异常的免疫反应、炎症反应及过敏反应有下调作用,减轻或消除黏膜内皮细胞过强的免疫应答。还有研究表明,敲除小鼠IL-10基因能导致动物产生结肠炎,而用IL-10灌肠治疗UC患者,能明显改善肠道黏膜炎症^[15];

(4)解毒作用,BC对肠道中有害菌产生的氨、胺和硫化氢等有毒物质,能阻止其产生或加速其排出,防止这些有毒物质对肠道的损害,起到解毒和排毒作用^[13];(5)抑菌和调节肠道菌群平衡,Hyronimus *et al*^[16]报道BC在代谢中能分泌凝固素(coagulin),这种细菌素对肠球菌、明串珠球菌、李斯特菌等有抑制作用,能防止有害菌的感染也有利于炎症消除。本研究得出BC能将UC大鼠肠道内下降的双歧杆菌恢复到正常水平。万阜昌 *et al*^[17]的动物实验表明BC对由氨苄青霉素引起的小鼠实验性腹泻有明显的止泻作用,并能加速肠道菌群失调的恢复,双歧杆菌数量明显增加。Cui *et al*^[18]报道在临床研究中证实BC能治疗急慢性肠炎性腹泻,并使患者肠道内低下的双歧杆菌和乳酸杆菌数量显著地提高,这表明BC有促进双歧杆菌和乳酸杆菌繁殖,调整肠道菌群平衡的作用,可防范有害菌对肠道的侵袭。崔云龙 *et al*^[19]的抑菌实验也证实BC对大肠埃希菌、痢疾志贺菌、伤寒沙门菌、普通变形杆菌、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌均有明显的抑制作用,能减少黏膜需氧粘附菌和易位菌数量,防止肠道细菌性感染,消除UC感染这一致病因素,以阻止肠道炎症的发生。本实验结果首次证实了BC对大鼠实验性UC的治疗作用,为正在进行的用该活菌制剂(爽舒宝片)治疗人体UC提供了临床理论依据。

4 参考文献

- 王群英,陈村龙,孙勇,张兰兰,刘梅娟,潘令嘉. 溃疡性结肠炎患者菌群分析结果的研究. 中国微生态学杂志 2002; 11: 31
- 欧阳钦,梁红亮. 溃疡性结肠炎. 继续医学教育 2006; 20: 30
- 中国炎症性肠病协作组. 3100例溃疡性结肠炎住院病例回顾分析. 中华消化杂志 2006; 26: 368-372
- Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice

应用要点
本研究初步阐明了BC能明显改善肠黏膜病变和恢复肠道菌群平衡,为临床上用该品治疗UC提供了理论依据。

同行评价
文章研究凝结芽孢杆菌活菌(TBC169株)对右旋葡聚糖硫酸钠引发的大鼠溃疡性结肠炎的作用,发现明显的治疗效果,描述逻辑性强,方法可靠,具有一定的科学性。

- guidelines in adults (update): American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1371-1385
- 5 吴小平, 刘德良, 凌奇荷. 酪酸菌对大鼠右旋葡聚糖硫酸钠结肠炎的治疗作用. *中华消化杂志* 2003; 23: 305
- 6 缪娴, 周建锋. 溃疡性结肠炎实验研究概况. *世界肿瘤杂志* 2006; 5: 146-149
- 7 姚惠芬, 陈务华, 周毅. 溃疡性结肠炎动物模型研究概况. *天津药学* 2006; 18: 72
- 8 李兆申, 湛先保, 许国铭. 胃黏膜损伤与保护 - 基础与临床. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 708-710
- 9 Araki Y, Andoh A, Fujiyama Y, Takizawa J, Takizawa W, Bamba T. Short-term oral administration of a product derived from a probiotic, *Clostridium butyricum* induced no pathological effects in rats. *Int J Mol Med* 2002; 9: 173-177
- 10 Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; 87: 1344-1350
- 11 张婵, 唐立. 益生菌治疗炎症性肠病的研究进展. *中国微生态学杂志* 2006; 18: 154
- 12 向军英, 冯迎春. 美常安联合柳氮磺吡啶治疗溃疡性结肠炎22例. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1742-1744
- 13 王文杰, 刘洋, 彭珊瑛, 万阜昌, 崔云龙, 李雄彪. 凝结芽孢杆菌对小鼠免疫功能和粪便胺含量及肠道中氮含量的影响. *中国微生态学杂志* 2006; 18: 6-8
- 14 房志仲, 李璐, 杨金荣, 严海鸿. 凝结芽孢杆菌对免疫功能影响的实验研究. *中国微生态学杂志* 2005; 17: 263
- 15 郝微微, 马贵同. 溃疡性结肠炎发病机制的研究进展. *陕西医学杂志* 2002; 31: 1100-1101
- 16 Hyronimus B, Le Marrec C, Urdaci MC. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* 14. *J Appl Microbiol* 1998; 85: 42-50
- 17 万阜昌, 崔云龙, 闫述翠. 凝结芽孢杆菌活菌片对实验性腹泻小鼠的治疗作用. *中国微生态学杂志* 2005; 17: 4-6
- 18 Cui YL, Wan FC, Tang DL, Wu SH. Efficacy of *Bacillus coagulans* tablets in the treatment of acute and chronic diarrhea. *INT.J.IMMUNOTHERAPY* 2004; XX(1): 17-22
- 19 崔云龙, 闫述翠, 万阜昌. 凝结芽孢杆菌TBC169株对肠道致病菌的抑制作用. *中国微生态学杂志* 2005; 17: 333

电编 何基才 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

肝胆胰外科领域新技术研讨会通知

本刊讯 为了推动肝胆胰外科临床及科研工作的深入开展,由哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰外科与《*World Journal of Gastroenterology*》共同举办的国家继续教育项目“肝胆胰外科领域新技术研讨会”拟于2007-08-03/05在哈尔滨召开.届时将邀请日本及国内肝胆胰领域知名专家进行讲座和学术交流,会议将对活体肝移植供受体手术、肝脏手术、血管技术在肝胆胰手术中的应用、如何提高胰十二指肠手术切除率以及生物人工肝脏等技术的新进展进行深入讨论,学习该领域国内外先进技术和理念,促进学术交流和学科发展.与会者将被授予国家I类继续教育学分12分.欢迎各位肝胆胰及相关领域同仁参加.

通讯地址: 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰外科 邮编: 150001 联系人: 吴祥松 电话: 0451-53643849-5721, 13633621389. E-mail: wxs417@yahoo.com.cn

收费标准: 500元(含资料费及午间工作餐,统一安排食宿,费用自理). 报到日期: 2007-08-02.

自创微需氧罐优选幽门螺杆菌培养与保存条件

周华, 徐帆, 李平, 楚更五, 王根春

周华, 昆明医学院第一附属医院放疗科 云南省昆明市 650032

徐帆, 成都军区昆明总医院药剂科 云南省昆明市 650032

李平, 楚更五, 云南中医学院基础部 云南省昆明市 650200

王根春, 成都军区昆明总医院微生物室 云南省昆明市 650032

云南省自然科学基金资助项目, No. 2003C0089M

通讯作者: 李平, 650200, 云南省昆明市关上双桥路201号, 云南

中医学院基础部. kmliping08@126.com

电话: 0871-7150987 传真: 0871-7150987

收稿日期: 2007-01-25 接受日期: 2007-03-06

Optimization of cultivation and preservation of *Helicobacter pylori* using self-made microaerophilic pot

Hua Zhou, Fan Xu, Ping Li, Geng-Wu Chu, Gen-Chun Wang

Hua Zhou, Department of Radiotherapy, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Fan Xu, Department of Pharmacy, Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Ping Li, Geng-Wu Chu, Basic Department, Yunnan College of Chinese Traditional Medicine, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Gen-Chun Wang, Department of Microbiology, Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Supported by The Natural Science Foundation of Yunnan Province, China, No. 2003C0089M

Correspondence to: Ping Li, Basic Department, Yunnan College of Chinese Traditional Medicine, 201 Shuangqiao Road, Guanshang, Kunming 650032, Yunnan Province, China. kmliping08@126.com

Received: 2007-01-25 Accepted: 2007-03-06

Abstract

AIM: To optimize the operation and condition of cultivation and preservation for *Helicobacter pylori*.

METHODS: Self-made microaerophilic pot was used to optimize the cultivation condition for *H pylori* with orthogonal designing, and the anabiosis of *H pylori* was observed and compared in two preservative fluids of different concentration under -20°C.

RESULTS: *H pylori* were cultivated successfully

with self-made microaerophilic pot. Solid cultivation medium for *H pylori*: *H pylori* grew well as presented in the Colombian agar medium and brain heart infusion agar with 53 mL/L calf serum or sheep serum and 26 mL/L mixed antibiotics at pH 7.5. Under -20°C, the survival time of *H pylori* was 7 and 20 days when 300 mL/L glycerine/Bromfield medium and 200 mL/L glycerine/brain heart infusion were used, respectively.

CONCLUSION: The self-made microaerophilic pot is reliable and its operation is simple, by which the cultivation and preservation of *Helicobacter pylori* were optimized.

Key Words: Microaerophilic pot; *Helicobacter pylori*; Cultivation; Preservation

Zhou H, Xu F, Li P, Chu GW, Wang GC. Optimization of cultivation and preservation of *Helicobacter pylori* using self-made microaerophilic pot. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1855-1858

摘要

目的: 简化幽门螺杆菌(*H pylori*)培养操作, 优选*H pylori*培养与保存条件.

方法: 自创微需氧罐, 采用正交设计优选*H pylori*培养条件, 并对-20°C保存的不同浓度两种保存液*H pylori*复苏对照观察.

结果: 自创微需氧罐成功培养出*H pylori*; 哥伦比亚琼脂和脑心浸液琼脂中分别添加53 mL/L浓度小牛/绵羊血清和26 mL/L浓度混合抗生素, pH值7.5时, *H pylori*生长良好; -20°C条件下: 300 mL/L甘油/布氏肉汤和200 mL/L甘油/脑心浸液菌种保存时间分别为7 d和20 d.

结论: 自创微需氧罐操作简便、效果可靠, *H pylori*培养与保存条件得到优化.

关键词: 微需氧罐; 幽门螺杆菌; 培养; 保存

周华, 徐帆, 李平, 楚更五, 王根春. 自创微需氧罐优选幽门螺杆菌培养与保存条件. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1855-1858

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1855.asp>

背景资料

*H pylori*培养是*H pylori*诊断的“金标准”, 但*H pylori*体外生长条件非常苛刻, 所需设备特殊, 培养过程繁琐、困难. 作者首创了操作简便、价格低廉、效果可靠的微需氧培养罐, 简化了培养操作, 并以标准菌株SS1为研究对象, 选择出最佳的培养和保存方法, 有很好的应用价值.

同行评价

本文用自行改造的微需氧罐探讨幽门螺杆菌的最适培养与保存条件,对于幽门螺杆菌的感染诊断有一定的应用价值,可作为技术方法交流。

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)培养是*H pylori*诊断的“金标准”,特异性100%^[1]。但*H pylori*体外生长条件非常苛刻,所需试验设备特殊,培养过程繁琐、困难。我们自行创新了操作简便、价格低廉、效果可靠的微需氧培养罐,简化了*H pylori*培养操作。以*H pylori*标准菌株SS1为研究对象,比较了不同培养条件和保存方法的优缺点,选择出最佳的培养和保存方法。

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* SS1标准菌株由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所馈赠。哥伦比亚琼脂和脑心浸液琼脂;脱纤维绵羊血、绵羊血清、新生小牛血清;选择性抗生素:盐酸万古霉素、多黏菌素、可溶性两性霉素B、三甲氧苄氨嘧啶;乳酸、触酶、氧化酶、快速尿素酶试纸;主要设备:自制微需氧培养罐(用市场易购的真空干燥器,仅对其盖子活塞加以改造为气体进出口双通道即成,图1)、特种混合气体(配比:50 mL/L CO₂、100 mL/L CO₂、850 mL/L N₂)、温湿度计、超净工作台、37℃恒温培养箱、-20℃冰箱、高温高压消毒锅等。

1.2 方法

1.2.1 混合抗生素的配制 分析天平准确称取万古霉素0.0161 g,两性霉素B 0.0163 g,多黏菌素B 0.0007 g,3种抗生素在紫外线下照射1 h,均匀混合。准确称取三甲氧苄氨嘧啶(TMP) 0.008 g,溶于10 mL蒸馏水,并加乳酸一滴,煮沸10 min后无菌加入以上混合抗生素中,用灭菌蒸馏水加至40 mL,混匀,4℃冰储备用。

1.2.2 优选*H pylori*最佳固体培养条件 称取哥伦比亚琼脂5 g,溶于128 mL蒸馏水中,脑心浸液琼脂5 g溶于100 mL蒸馏水中,均匀混合,121℃高压灭菌15 min。待温度降至45-50℃时,在9个小烧杯中分别倒入15 mL,按正交设计,在各烧杯中加入不同的血样、混合抗生素并调节不同pH值(表1-2),混匀后趁热快速浇板,数分钟冷却凝固后备用。其中血样按53 mL/L浓度加入0.8 mL,混合抗生素按26 mL/L浓度加入0.4 mL,用HCl和NaOH调节pH值。各固体培养基制备好后,将-70℃冻存的*H pylori* SS1标准菌株室温解冻,接种于不同固体培养基,每板50 μL,用棒涂匀,放入微需氧培养罐,置入37℃恒温箱,通入特种混合气体5 min,湿度为95%条件下,培养3 d。

1.2.3 *H pylori*鉴定 (1)菌落形态:平板上的*H*



图1 自创微需氧罐。

表1 优选*H pylori*最佳固体培养条件因素与水平

水平	A因素 琼脂	B因素 血样	C因素 混合抗生素	D因素 pH
1	哥伦比亚 琼脂	新生小 牛血清	加	6.5
2	脑心浸 液琼脂	脱纤维 绵羊血	不加	7.5
3		绵羊血清		8.5

*pylori*菌落呈针尖样,透明湿润,直径0.2-2 mm;(2)涂片镜检:滴1滴生理盐水于干净载玻片上,用接种环刮取少许菌落在生理盐水中涂开。将涂片烘干后进行常规革兰氏染色,在显微镜下观察,见紫色短杆状;(3)氧化酶试验:刮取细菌放置在浸有氧化酶试剂的滤纸上,出现深蓝/黑色反应者为阳性;(4)触酶试验:在1张载玻片上滴加1滴触酶液(30 mL/L H₂O₂液),刮取一环菌落置入后,阳性可见到连续的氧气泡形成;(5)尿素酶试验:刮取1环细菌放置到尿素酶试纸上,约1 min后试纸变为紫红色为阳性。

1.2.4 *H pylori*菌株的不同保存方法及菌株复苏对照观察 (1)300 mL/L甘油/布氏肉汤保存液的配制:参照周殿元 *et al*^[2]的经典配方,称取0.6 g布氏肉汤培养基,溶于14 mL蒸馏水,加入6 mL甘油,混匀,121℃高压灭菌15 min,300 mL/L甘油/布氏肉汤保存液20 mL配制完毕,4℃冰储备用。(2)200 mL/L甘油/脑心浸液保存液的配制:称取3.7 g脑心浸液培养基,溶于80 mL蒸馏水,加入20 mL甘油,混匀,121℃高压灭菌15 min,200 mL/L甘油/脑心浸液保存液100 mL配制完毕,4℃冰储备用。将上述的两种保存液1 mL分别装入1支试管,用接种环刮取菌落加入不同保存液中,迅速置于-20℃冰箱保存。每隔两天同样方法各保存1支,共保存到各10支,1 mo同时复苏对照观察。

统计学处理 采用SPSS12.0统计软件的

表 2 优选*H pylori*最佳固体培养条件的正交试验方案和结果

试验号	固体培养基	因素				<i>H pylori</i> 生长情况	杂菌生长情况
		A	B	C	D		
1	哥伦比亚琼脂15 mL+脱纤维绵羊血0.8 mL, pH为7.5	1	2	2	2	+	+++
2	哥伦比亚琼脂15 mL+绵羊血清0.8 mL+混合抗生素0.4 mL, pH为8.5	1	3	1	3	+-	-
3	哥伦比亚琼脂15 mL+新生小牛血清0.8 mL, pH为8.5	1	1	2	3	-	++++
4	脑心浸液琼脂15 mL+脱纤维绵羊血0.8 mL+混合抗生素0.4 mL, pH为8.5	2	2	1	3	+	-
5	哥伦比亚琼脂15 mL+绵羊血清0.8 mL+混合抗生素0.4 mL, pH为7.5	1	3	1	2	++++	-
6	哥伦比亚琼脂15 mL+脱纤维绵羊血0.8 mL+混合抗生素0.4 mL, pH为6.5	1	2	1	1	-	-
7	脑心浸液琼脂15 mL+绵羊血清0.8 mL, pH为6.5	2	3	2	1	-	+++
8	哥伦比亚琼脂15 mL+新生小牛血清0.8 mL+混合抗生素0.4 mL, pH为6.5	1	1	1	1	+	-
9	脑心浸液琼脂15 mL+新生小牛血清0.8 mL+混合抗生素0.4 mL, pH为7.5	2	1	1	2	++++	-

+: 细菌生长; -: 细菌不生长; +-: 细菌生长可疑.

Conjoint模块功能进行正交设计与数据处理.

2 结果

自行创新的微需氧培养罐成功培养出*H pylori*, 生长良好. *H pylori*在不同固体培养条件下的生长结果(表2). 哥伦比亚琼脂和脑心浸液琼脂中分别添加53 mL/L浓度小牛、绵羊血清和26 mL/L浓度混合抗生素, pH值为7.5时, *H pylori*生长良好; pH值为6.5和8.5时*H pylori*几乎不生长, 且pH值在6.5时, 培养基呈半固体状; 不加混合抗生素易被杂菌(镜检为枯草杆菌)污染, 加混合抗生素后能有效控制杂菌的污染, 对细菌的生长没有影响. 菌落形态呈透明、湿润、针尖样, 直径0.5-2 mm. 显微镜下可见革兰氏染色阴性短杆状、弯曲状和海鸥状的细菌. 三酶试验均呈阳性. 在-20℃条件下, 300 mL/L甘油/布氏肉汤保存液对菌种的保存时间为7 d, 200 mL/L甘油/脑心浸液保存液对菌种的保存时间为20 d, 成功复苏.

3 讨论

*H pylori*是一种生存、生长条件都非常苛刻的细菌, 对培养基及培养条件要求很高^[3], 较一般细菌难以培养, 需特殊的试验设备. 目前, 由于各种条件的限制, 我国*H pylori*培养主要在大学附属医院和科研机构进行, 这使许多医院不能进行*H pylori*的药敏测试, 导致临床上治疗*H pylori*

感染时, 多凭临床经验选择抗生素, 有较大的盲目性^[4]. 其中最重要的微需氧培养罐, 进口及国内价格均较贵, 且因需求量少而难以购买, 我们自行创新的微需氧培养罐是市场易购的真空干燥器, 仅对其盖子活塞加以改造为气体进出口双通道即成, 价格低廉; 免除了抽真空的过程, 操作简便; 罐内放一装有蒸馏水的培养皿维持罐内的高湿度, 经温湿度计测量罐内温度37℃时, 湿度为95%, 完全满足*H pylori*生长所需的温湿度条件及气体环境, 成功培养出*H pylori*, 效果可靠. 此罐国内外未见报道, 可供借鉴应用.

*H pylori*的培养多以哥伦比亚琼脂和脑心浸液琼脂作为培养基础, 因此我们以这两种培养基作为试验因素, 观察他们对*H pylori*培养情况的差异. 实验发现: 两种琼脂的培养效果无差异, 两者可任选. 添加53 mL/L的动物血清培养效果较好, 与熊杰 *et al*^[5]提出的*H pylori*培养营养要求较高, 一般加入50-100 mL/L的动物(马、羊、兔、牛等)血或血清相符. 26 mL/L浓度混合抗生素能有效减少枯草杆菌等杂菌的污染, 对细菌生长无影响. 其中TMP既可作为抗生素, 又能提供*H pylori*生长所需的胸腺嘧啶脱氧核苷^[6], 故加入一定量的混合抗生素是有必要的. 熊杰 *et al*^[5]指出*H pylori*耐受pH值为4-10, 曾浩 *et al*^[7]指出*H pylori*最适pH值为7.5, 我们观察了pH为6.5, 7.5, 8.5时*H pylori*生长情况, 结果与曾浩 *et al*得出的

结果一致. 我们的研究表明哥伦比亚琼脂和脑心浸液琼脂中分别添加53 mL/L浓度小牛/绵羊血清和26 mL/L浓度混合抗生素, pH值为7.5时, 为培养幽门螺旋杆菌的最佳固体培养条件.

总之, *H pylori*的保存对于深入开展该菌的研究有重要意义, 而菌种的保存较为困难, 目前常用的保存方法均欠理想, 国外均为保存于-193℃或-70℃, 且认为-70℃保存优于-193℃^[8-9]. 尽管-70℃保存菌种较为理想, 但国内大部分单位无此条件, 而-20℃冰箱却易具备. 本试验对-20℃下不同浓度两种常用保存液保存的*H pylori*复苏情况进行了对照观察, 300 mL/L甘油/布氏肉汤保存液对菌种的保存时间为7 d, 与周殿元 *et al*^[6]报道结果相符. 200 mL/L甘油/脑心浸液保存液对菌种的保存时间可长达20 d, 表明在-20℃条件下, 通过增加培养基浓度, 适当降低甘油含量, 可延长*H pylori*的保存时间. 在无低温冰箱的情况下, 为*H pylori*的保存提供了一条新思

路和简便易行可资借鉴的方法.

4 参考文献

- 1 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 林三仁, 胡品津, 刘文忠, 王继德, 徐智民, 成虹. 对幽门螺杆菌若干问题共识意见. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2457-2458
- 2 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 247
- 3 Hunt RH, Malfertheiner P, Yeomans ND, Hawkey CJ, Howden CW. Critical issues in the pathophysiology and management of peptic ulcer disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 685-699
- 4 范学工, 李铁刚, Harry HX Xia. 人血清对幽门螺杆菌生长的影响. 湖南医科大学学报 2000; 25: 371-372
- 5 熊杰, 白生平. 幽门螺旋杆菌的研究现状. 微生物学免疫学进展 2002; 30: 71-74
- 6 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 241
- 7 曾浩, 邹全明, 张卫军. 培养幽门螺杆菌的发酵工艺研究. 微生物学报 2002; 42: 607-610
- 8 Drumm B, Sherman P. Long-term storage of *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1655-1656
- 9 Ansorg R, Von Recklinghausen G, Pomarius R, Schmid EN. Evaluation of techniques for isolation, subcultivation, and preservation of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 51-53

电编 何基才 编辑 王晓瑜

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.

乙肝病毒基因型与肝脏病理改变的关系

钟崇芳, 郝娃, 李卓, 孟欣, 严艳, 牛京勤, 殷继明

钟崇芳, 郝娃, 李卓, 孟欣, 严艳, 牛京勤, 殷继明, 首都医科大学附属北京佑安医院北京市卫生局肝炎研究所 北京市 100069

北京市科委重大基金项目, No. H020920020590

通讯作者: 李卓, 100069, 北京市, 首都医科大学附属北京佑安医院北京市卫生局肝炎研究所. lizhuo_youan@163.com

电话: 010-83997427

收稿日期: 2007-03-12 接受日期: 2007-04-02

Relationship between the histology and genotype of hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients

Chong-Fang Zhong, Wa Hao, Zhuo Li, Xin Meng, Yan Yan, Jing-Qin Niu, Ji-Ming Yin

Chong-Fang Zhong, Wa Hao, Zhuo Li, Xin Meng, Yan Yan, Jing-Qin Niu, Ji-Ming Yin, Hepatitis Institute of Beijing Health Bureau, Beijing You'an Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China

Supported by Major Project Fund of Beijing Science and Technology, No. H020920020590

Correspondence to: Zhuo Li, Hepatitis Institute of Beijing Health Bureau, Beijing You'an Hospital Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China. lizhuo_youan@163.com

Received: 2007-03-12 Accepted: 2007-04-02

Abstract

AIM: To investigate the relationship between hepatitis B virus DNA genotype and pathological changes in patients with chronic hepatitis B.

METHODS: A total of 92 chronic hepatitis B (CHB) patients were tested for HBV genotype and sub-genotypes by nested and fluorescence quantitative polymerase chain reactions, respectively. Liver biopsy specimens of all patients were taken and histological activity index (HAI) necroinflammation (HAI-NI), and fibrosis (HAI-F) scores were calculated.

RESULTS: Among the 92 cases, 17 (18.48%) had genotype B (sub-genotype B2), 17 (18.48%) had mixed B/C genotype (sub-genotype B2/Ca) and 58 (63.04%) had C (sub-genotype Ca) infections.

In the 17 CHB patients with genotype B, HAI-NI were 35.29%, 58.82% and 5.88% for G1, G2 and G3, respectively, HAI-F scores were 58.82%, 29.41% and 11.76% for S1, S2, and S3, respectively; In the 17 cases with mixed B/C genotype infection, HAI-NI were 35.29%, 52.94% and 11.76% for G1-G3, respectively, HAI-F were 23.52%, 52.94%, 23.52% for S1-S3, respectively; In the 58 patients with genotype C, HAI-NI was 31.03%, 24.14%, 36.21% and 8.62% for G1-G4, respectively, HAI-F were 25.86%, 39.66%, 5.17%, 29.31% for S1-S4, respectively. There were significant differences in the HAI-NI and HAI-F scoring in patients with different HBV genotypes ($\chi^2 = 15.13, P < 0.01$). The ages of CHB patients were significantly different between the HBV genotypes C and B. The frequencies were 58%-76% for those 21-30 years old, 17.6%-29.4% for 31-40 in genotype B, and 25% for 21-30 years old, 46.6% for 31-40, and 24.24% for > 40 in genotype C ($\chi^2 = 9.54, P < 0.05$).

CONCLUSION: The most common HBV genotype was C. Patients with HBV C had severer infections than those of other genotypes. Further, different HBV genotypes infected different ages of HBV patients.

Key Words: Hepatitis B virus; Chronic hepatitis; Genotype; Pathology; Nested-polymerase chain reaction; Fluorescence quantify polymerase chain reaction

Zhong CF, Hao W, Li Z, Meng X, Yan Y, Niu JQ, Yin JM. Relationship between the histology and genotype of hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1859-1864

摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒基因型与慢性乙型肝炎患者肝脏病理变化的关系。

方法: 应用乙肝病毒型特异性引物采用巢式聚合酶链反应(PCR)和荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR), 对北京佑安医院住院92例慢性乙型肝炎患者进行乙型肝炎病毒基因型及亚型分析, 参照2000年《病毒性肝炎防治方案》

背景资料

近年的研究表明乙型肝炎病毒可以分为A、B、C、D、E、F、G、H8个基因型; 同时每个基因型又有数个亚型。不同的HBV基因型及亚型与HBV感染后的临床转归可能有一些差异; 分析HBV基因型、基因亚型与肝脏组织病理学改变的关系, 可以使我们深入地了解不同HBV基因型及亚型与HBV感染致病的相关性。

研发前沿

HBV感染后具有较为广泛的肝脏疾病谱,既有慢性HBV携带者、慢性乙型肝炎也有肝癌患者,HBV感染后的不同结局与多种因素有关。进一步研究基因型、基因亚型与肝脏组织病理学改变的关系,可能为临床治疗提供参考依据。

对慢性肝炎进行病理分级、分期诊断。

结果: 92例慢性乙型肝炎患者中HBV基因型分布为B型17例(B2亚型), B/C混合型17例(B2/Ca亚型), C型58例(Ca亚型)。17例HBV B型感染患者中病理诊断肝脏炎症活动分级为G1-G3期分别为35.29%, 58.82%, 5.88%; 肝脏纤维化程度分级为S1-3级分别为58.82%, 29.41%, 11.76%。17例HBV B/C型感染患者中病理诊断肝脏炎症活动分级为G1-G3期35.29%, 52.94%, 11.76%; 肝脏纤维化程度分级为S1-3级23.52%, 52.94%, 23.52%。58例HBV C型感染患者中病理诊断肝脏炎症活动分级为G1-G4期31.03%, 24.14%, 36.21%, 8.62%; 肝脏纤维化程度分级为S1-4级25.86%, 39.66%, 5.17%, 29.31%; HBV三组不同基因型的慢性乙型肝炎患者肝组织病理检查有统计学意义($\chi^2 = 15.13, P < 0.01$)。HBV B型与B/C型感染患者年龄在21-30岁组58%-76%, 31-40岁组17.6%-29.4%, C型感染患者年龄在21-30岁组25%, 31-40岁组46.6%, 40岁以上有24.24%; 不同HBV基因型感染患者的年龄分布有显著性差异($\chi^2 = 9.54, P < 0.05$)。

结论: 慢性乙型肝炎患者HBV基因型中C型比例明显高于B型与B/C型。HBV C型患者肝脏病理变化较B型与B/C型严重。不同HBV基因型感染患者的年龄分布不同。

关键词: 乙型肝炎病毒; 慢性乙型肝炎; 基因型; 病理学; 巢氏聚合酶链式反应; 荧光定量聚合酶链式反应

钟崇芳, 郝娃, 李卓, 孟欣, 严艳, 牛京勤, 殷继明. 乙型肝炎病毒基因型与肝脏病理改变的关系. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1859-1864
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1859.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是嗜肝DNA病毒, 长3.2 kb。HBsAg是HBV胞膜的主要蛋白, 共有10个血清亚型, 主要为adr, adw, ayr, ayw等4种; 但是血清型的划分不能反映HBV基因组的差异。根据HBV全基因核苷酸序列异源性 $\geq 8\%$ 或者S基因区核苷酸序列异源性 $\geq 4\%$, 将HBV病毒株分为8个基因型, 即A, B, C, D, E, F, G, H型^[1-3]。HBV基因型的全球分布具有明显的地理区域分布特征^[4-6]。而近年来研究发现, 慢性乙型肝炎(CHB)患者感染乙型肝炎病毒基因型不同, 其临床转归也不同; 而也有一些报道指出乙型肝炎病毒

基因型的差异与肝脏病理改变有关。本文以北京佑安医院的部分住院慢性乙型肝炎患者为观察对象, 进行HBV血清学、病毒基因型和基因亚型与肝脏病理改变进行相关性研究, 报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-12/2006-06北京佑安医院就诊住院的慢性乙型肝炎患者92例, 男76例, 女16例, 年龄16-67岁。临床诊断参照2000年全国(西安)病毒性肝炎学术会议修订的诊断标准。采集静脉血10 mL, 常规进行血生化和乙型肝炎病毒学指标检测, 并分离血清标本放置-20℃冰箱, 保存备用。乙型肝炎病毒学指标检测采用Roche公司化学发光乙肝五项诊断试剂盒, 检测血清HBsAg, 抗HBs, HBeAg, 抗HBe和抗HBc。荧光定量HBV DNA PCR诊断试剂应用达安基因公司产品。荧光定量PCR扩增仪、PCR扩增仪采用美国PE公司产品。

选择GenBank中已发表的18株HBV(包括A-F型), 应用Vector NTI suite 7软件和Tree View软件分别对全基因序列及SCX区序列进行同源性比较和分子进化关系分析, 选择最佳的分型基因片段及基因型特异性引物。引物设计: 根据HBV基因序列比较结果和Natio *et al*^[7-11]的研究设计HBV DNA引物, 由北京赛百盛生物公司合成(表1)。

1.2 方法

1.2.1 核酸提取及PCR基因扩增 采用裂解液加热煮沸法提取HBV DNA。巢氏PCR基因分型方法检测HBV基因型; PCR反应混合液为: 第1次扩增反应: 反应体积30 μ L中含模板DNA 5 μ L, dNTPs 200 μ mol/L, 引物Ps1, Ps2每个0.1 μ mol/L, Taq酶1.5 U, PCR反应循环条件为: 94℃预变性180 s, 94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 45 s, 扩增35个循环。第2轮扩增反应混合液A组: 取第一次PCR产物2 μ L作模板, 引物B2为0.1 μ mol/L, 引物BA1R, BB1R, BC1R各为0.08 μ mol/L, 其余同第1次扩增反应, 30 μ L反应体积; B组: 引物B2R为0.1 μ mol/L, 引物BD1, BE1, BF1每个各为0.08 μ mol/L, 其余条件同A组。循环条件为: 94℃预变性180 s, 94℃ 40 s, 58℃ 40 s, 72℃ 40 s, 扩增20个循环, 将退火温度提高到60℃, 再扩增20个循环。每次PCR反应均设阳性和阴性对照。扩增后取第2次PCR产物4 μ L, 用60 g/L的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 溴化乙锭(EB)染色后, 紫外灯下观察结

表 1 HBV DNA基因分型巢式PCR引物序列

基因型外引物

Ps1 5'-TCACCATATTCTTGGGAACAAGA-3'

Ps2 5'-CGAACCACTGAACAAATGGC-3'

基因型内引物A组(扩增HBV基因A、B、C型)

B2 5'-GGCTCCAGTTCGGAACAGT-3'

BA1R 5'-CTCGCGGAGATTGACGAGATG-3'

BB1R 5'-CAGGTTGGTGAGTGAAGTGGAG-3'

BC1R 5'-GGTCCTAGGAATCCTGATGTTG-3'

基因型内引物B组(扩增HBV基因D、E、F型)

BD1 5'-GCCAACAAGGTAGGAGCT-3'

BE1 5'-CACCAGAAATCCAGATTGGGACCA-3'

BF1 5'-GCTACGGTCCAGGGTACCA-3'

B2R 5'-GGAGGCGGATATGCTGGCAA-3'

HBV 基因亚型

BJ基因亚型

1stPCR 5'-ATGCAACTTTTTCACCTCTGACTA-3'

5'-ATAGGGGCATTGTTGGTCT-3'

2stPCR 5'-ATGCAACTTTTTCACCTCTGACTA-3'

5'-TTCTTTATAMGGGTCAATGTCCATG-3'

Ba基因亚型

1stPCR 5'-ATGCAACTTTTTCACCTCTGCTTA-3'

5'-ATAGGGGCATTGTTGGTCT-3'

2stPCR 5'-TAGCAACTTTTTCACCTCTGCTTA-3'

5'-TTCTTTATAMGGGTCAATGTCCATG-3'

C1基因亚型

5'-TGTTTGGCTTTTCAGTTATATG-3'

5'-AAAGGCATTAATGCTGGGT-3'

C2基因亚型

5'-TGTTTGGCTTTTCAGTTATATG-3'

5'-CAAGGCAGTTTTCGAAAACAT-3'

表 2 慢性乙型肝炎患者血清HBV DNA基因型与年龄相关性比较 $n(\%)$

基因型	n	年龄组			
		21-30岁	31-40岁	41-50岁	51-60岁
B	17	13(76.5)	3(17.6)	1(5.8)	
B+C	17	10(58.8)	5(29.4)	2(11.7)	
C	58	17(29.3)	27(46.6)	10(17.2)	4(6.9)

引物C1组与C2组各为0.1 $\mu\text{mol/L}$, Taq酶1.5 U, 94℃预变性180 s, 94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 45 s, 扩增35个循环. 用60 g/L的聚丙烯酰胺凝胶电泳EB染色后, 紫外灯下观察结果. C1亚型PCR产物为340 bp, C2亚型PCR产物为240 bp.

1.2.2 病理组织学检查 肝组织采用常规肝穿刺活检法, 组织用苏木精-伊红网织纤维染色. 分别由两位病理科的医师读片, 进行分级分期. 慢性肝炎病理分级、分期诊断标准参照2000年《病毒性肝炎防治方案》, 组织学诊断: 肝脏炎症活动度(G)0-4级, 肝脏纤维化程度(S)0-4级.

1.2.3 荧光定量-聚合酶链反应(FQ-PCR)法检测HBV DNA含量 诊断试剂采用达安公司产品, 参照说明书操作方法进行.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件, 采用Fisher精确卡方检验(χ^2), t 检验方法进行统计学处理.

2 结果

2.1 巢式PCR方法检测HBV基因型结果 PCR产物为281 bp为B基因型, 122 bp为C基因型, 同时有122 bp与281 bp条带为B、C混合型. Ba亚型为110 bp, C2亚型240 bp. 92例血清进行HBV DNA检测, 结果显示B型17例(18.48%)亚型为Ba; B/C型17例(18.48%)全部为Ba/C2亚型; C型58例(63.04%)均为C2亚型. 未检测到其他基因型与亚型.

2.2 92例血清进行HBV DNA基因型检测与患者年龄比较结果 B型与B/C型感染患者年龄在21-30岁组58.8%和76.5%, 31-40岁组17.6%和29.4%, 而C型感染患者年龄在21-30岁组29.3%, 31-40岁组46.6%, 40岁以上有24.24%. 3个基因型在各同年龄组中的感染比较有显著性差异($\chi^2 = 14.03$, $P = 0.007$). HBV C基因型显示了随年龄增高感染率逐渐高于B型与B+C型. HBV B型感染在21-30岁组显著高于其他年龄组(表2).

2.3 肝穿病理检查 17例HBV B型感染患者中病理诊断肝脏炎症活动分级为G1期35.29%, G2期58.82%, G3期5.88%; 17例HBV B/C型感染患

果, PCR产物为281 bp为B基因型, 122 bp为C基因型, 同时有122与281 bp条带为B、C混合型.

HBV B基因亚型PCR反应条件为半巢式方法: 第1次扩增反应体积30 μL 中模板5 μL , dNTPs 200 $\mu\text{mol/L}$, 引物BJ 1st PCR各为0.1 $\mu\text{mol/L}$, Taq酶1.5 U, 94℃预变性180 s, 94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 45 s, 扩增35个循环. 第2轮扩增反应: 取第一次PCR产物2 μL 作模板, dNTPs 200 $\mu\text{mol/L}$, 第二次PCR引物各为0.1 $\mu\text{mol/L}$, 30 μL 反应体积; 循环条件为: 94℃预变性180 s, 94℃ 40 s, 58℃ 40 s, 72℃ 40 s, 扩增35个循环. Ba, Bj亚型条件相同. 用60 g/L的聚丙烯酰胺凝胶电泳EB染色后, 紫外灯下观察结果, Ba, Bj亚型PCR产物均为110 bp产物.

HBV C基因亚型PCR反应条件为多对引物PCR法: 分别采用C1组和C2组引物, 扩增反应总体积30 μL 其中模板DNA 5 μL , dNTPs 200 $\mu\text{mol/L}$,

创新盘点

本研究结果显示不同年龄组HBV基因型分布存在差异, 在HBV B基因型在青年组高于C基因型; C基因型分布无年龄组差异; C基因型HBV感染患者肝脏炎症与纤维化较B基因型严重. 本研究发现的主要HBV基因亚型是Ba和C2亚型.

应用要点
对HBV不同基因型与亚型感染与临床转归的相关性分析,结合病理学诊断对判断慢性乙型肝炎患者的愈后可能具有临床意义。

表 3 HBV基因型与肝脏病理诊断 $n(\%)$

HBV基因型	n	炎症活动度分级				纤维化分期			
		G1	G2	G3	G4	S1	S2	S3	S4
B	17	6(35.29)	10(58.82)	1(5.88)	0(0.00)	10(58.82)	5(29.41)	2(11.76)	0(0.00)
C	58	18(31.03)	14(24.14)	21(36.21)	4(8.62)	15(25.86)	23(39.66)	3(5.17)	17(29.31)
B/C	17	6(35.29)	6(35.29)	2(11.76)	0(0.00)	4(23.52)	9(52.94)	4(23.52)	0(0.00)

者中G1期35.29%, G2期35.29%, G3期11.76%; 58例HBV C型感染患者中G1期31.03%, G2期24.14%, G3期36.21%, G4期8.62%, 3种不同HBV基因型的慢性乙型肝炎患者组比较炎症分级有统计学意义($\chi^2 = 15.13, P = 0.004$).

肝脏纤维化程度分级比较17例HBV B型感染患者为S1级58.82%, S2级29.41%, S3级11.76%. 17例HBV B+C混合型感染者为S1级23.52%, S2级52.94%, S3级23.52%. 58例HBV C型感染患者中S1级25.86%, S2级39.66%, S3级5.17%, S4级29.31%. 3组比较也有统计学意义($\chi^2 = 9.54, P = 0.049$, 表3).

2.4 HBV基因型与慢性乙型肝炎患者的肝功能、凝血酶原时间的关系比较 不同HBV基因型的慢性乙型肝炎患者的肝功能、凝血酶原时间的关系比较无统计学意义(表4).

2.5 慢性乙型肝炎患者中HBeAg与HBV基因型的相关性 92例慢性乙型肝炎患者中HBeAg阳性75例(81.52%), 其中B基因型15例(20.0%), C基因型46例(61.3%), B/C基因型14例(18.7%); HBeAg阴性17例(18.48%)其中B基因型2例(11.77%), C基因型12例(70.59%), B/C基因型3例(17.64%). HBeAg阳性率在B, C, B/C不同基因型的慢性乙型肝炎患者中分别为88.24%, 79.31%, 82.35%显著高于HBeAg阴性者。

3 讨论

HBV感染后具有较为广泛的肝脏疾病谱,既有慢性HBV携带者、慢性乙型肝炎也有肝癌患者,HBV感染后的不同结局与多种因素有关^[12-19]. 乙型肝炎病毒不同的基因型感染导致不同的结果已经有一些文献报道,国外Kao *et al*^[20]报道了270例HBV B或C基因型感染的患者,研究结果发现在50岁以上肝癌患者中, C基因型比例明显高于B基因型;而与此相反,在50岁以下肝癌患者中B基因型较C基因型更易发展成肝癌. 日本千叶大学的Sumi *et al*^[21]报道了一项585例慢性乙型肝炎患者的多项研究(其中包括经组织学证

表 4 HBV基因型与慢性乙型肝炎患者的肝功能、凝血酶原时间的关系比较(mean \pm SD)

基因型	ALT (U/L)	TBL(μ mol/L)	PT(s)
B	156.8 \pm 114.5	14.2 \pm 11.2	13.11 \pm 1.1
C	162.9 \pm 104.9	21.2 \pm 13.1	15.2 \pm 1.2
B+C	159.7 \pm 121.2	20.2 \pm 11.9	15.1 \pm 1.4

实的258例慢性乙型肝炎和74例肝癌患者)结果发现: HBV B基因型的患者HBeAg阴性率和累积的HBe血清转化率显著高于C基因型患者(P 分别为0.01和0.02); 多变量分析发现B基因型、前C突变、ALT水平和重度肝组织学变化是HBe血清转化的独立相关因素; 肝脏病理学证实在晚期肝纤维化患者中, B基因型的比例明显低于C基因型, 而且这种现象只发生在年龄小于45岁的患者中, 在大于45岁的患者中并未显示出差异, 同时研究人员认为B基因型感染较C基因型血清转换率更早, 肝纤维化程度及肝细胞癌发生率都比较低。

我国也有一些相关的报道, C基因型HBV感染者预后比B基因型者差, 可能与C基因型HBV感染病毒不易被清除, 病毒血症水平高, 持续时间长有关^[22-24]. 如唐跃华 *et al*^[25]报道了73例HBeAg阴性与73例HBeAg阳性的慢性乙型肝炎患者进行肝组织病理炎症分级、HBV DNA水平监测与血清HBeAg对比分析, 结果显示, HBeAg阴性的慢性乙型肝炎患者HBV DNA水平为 10^5 copies/mL与肝组织学炎症的相关性有显著性意义; 而HBeAg阳性的慢性乙型肝炎患者HBV DNA水平为 10^8 copies/L与肝组织学炎症的相关性无统计学差异. 因此患者血清HBV DNA水平可以作为判断HBeAg阴性的慢性乙型肝炎患者肝组织炎症损伤程度的指标; HBeAg阴性的慢性乙型肝炎患者HBV DNA复制活跃, 可能存在于HBV的前C区或C区变异; 而血清HBV DNA水平不能反映HBeAg阳性的慢性乙型肝炎患者肝组织炎症损伤程度。

李雅娟 *et al*^[26]的研究表明HBeAg阳性与HBeAg阴性的慢性乙型肝炎患者的基因型分布不同, HBeAg阳性的C基因型及B/C混和型感染的比例高于HBeAg阴性感染组; HBeAg阴性组的B基因比例高于HBeAg阳性组。陈公英 *et al*^[27]的研究显示在慢性乙型肝炎患者中年龄、肝功能及凝血酶原之间无显著性差异的B、C HBV基因型患者, 其肝组织病变与基因型显著相关; 肝组织炎症分级和纤维化分期以B/C混和型为重, C型重于B型; 肝组织炎症分级和纤维化分期有显著相关性, 随炎症分级加重B型所占比例从G0-1的52.3%-53.35%, 到G4的30.7%, 而B/C混和型比例从G0的4.7%增加到G4的33.7%。C基因型患者的HBeAg阳性率和HBV DNA水平略高于B基因型患者, 但无统计意义。

我们的研究结果显示在 不同年龄组的慢性乙型肝炎患者中, HBV基因型有显著差异, B基因型患者的年龄比较集中在低年龄组; 76.5 % 是21-30岁年龄组的年轻患者, 5.8% 41-50岁年龄组的中年患者, 随着年龄的增长B基因型的感染逐渐减少; B/C混和型感染患者在年龄分布上介于B基因和C基因型之间; C基因型中29.3% 21-30岁年龄组是年轻患者, 46.6% 31-40岁年龄组中年患者, 17.2% 41-50岁年龄组和6.9% 51-60岁年龄组的老年患者。HBV C基因型可能由于病毒不易被清除, 而病毒血症持续时间较长, 因而在各年龄组分散存在, 本研究的病理诊断显示C基因型患者肝脏炎症与纤维化程度较B基因型严重, 这种差异与HBV基因型有关, 而在肝功能血生化检查方面并无明显差异。HBeAg阳性率在B, C, B/C不同基因型的慢性乙型肝炎患者中分别为88.24%, 79.31%, 82.35%显著高于HBeAg的阴性率。李雅娟 *et al*的研究结果“HBeAg阳性的C基因型及B/C混和型感染的比例高于HBeAg阴性感染”大致相同; 而与HBeAg阴性组的B基因比例高于HBeAg阳性组结果不同。可能由于所入组患者的不同而有差异; 尚应进行相关的寻访观察, 进一步了解HBV基因型和亚型的临床意义。

4 参考文献

- Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, Sastrosoewignjo RI, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol* 1988; 69 (Pt 10): 2575-2583
- Norder H, Hammas B, Lofdahl S, Courouce AM, Magnius LO. Comparison of the amino acid

sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J Gen Virol* 1992; 73 (Pt 5): 1201-1208

- Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, Zoulim F, Fried M, Schinazi RF, Rossau R. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol* 2000; 81: 67-74
- Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol* 2002; 83: 2059-2073
- Tanaka Y, Hasegawa I, Kato T, Orito E, Hirashima N, Acharya SK, Gish RG, Kramvis A, Kew MC, Yoshihara N, Shrestha SM, Khan M, Miyakawa Y, Mizokami M. A case-control study for differences among hepatitis B virus infections of genotypes A (subtypes Aa and Ae) and D. *Hepatology* 2004; 40: 747-755
- Norder H, Courouce AM, Coursaget P, Echevarria JM, Lee SD, Mushahwar IK, Robertson BH, Locarnini S, Magnius LO. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology* 2004; 47: 289-309
- Sugauchi F, Kumada H, Sakugawa H, Komatsu M, Niitsuma H, Watanabe H, Akahane Y, Tokita H, Kato T, Tanaka Y, Orito E, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Two subtypes of genotype B (Ba and B₁) of hepatitis B virus in Japan. *Clin Infect Dis* 2004; 38: 1222-1228
- Huy TT, Ushijima H, Quang VX, Win KM, Luengrojanakul P, Kikuchi K, Sata T, Abe K. Genotype C of hepatitis B virus can be classified into at least two subgroups. *J Gen Virol* 2004; 85: 283-292
- Shiina S, Fujino H, Uta Y, Tagawa K, Unuma T, Yoneyama M, Ohmori T, Suzuki S, Kurita M, Ohashi Y. Relationship of HBsAg subtypes with HBeAg/anti-HBe status and chronic liver disease. Part I: Analysis of 1744 HBsAg carriers. *Am J Gastroenterol* 1991; 86: 866-871
- Mayerat C, Mantegani A, Frei PC. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J Viral Hepat* 1999; 6: 299-304
- Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *J Virol Methods* 1998; 72: 163-174
- 许军, 王齐欣, 蒋栋, 杨柳明, 赵延龙, 陈红松, 魏来, 王宇. 乙型肝炎病毒基因型与病情轻重的关系. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 11-14
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学会分会. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000; 8: 324-329
- Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, Nakanishi M. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001; 44: 43-47
- Ding X, Mizokami M, Ge X, Orito E, Iino S, Ueda R, Nakanishi M. Different hepatitis B virus genotype distributions among asymptomatic carriers and patients with liver diseases in Nanning, southern China. *Hepatol Res* 2002; 22: 37-44
- Ding X, Gu H, Zhong ZH, Zilong X, Tran HT, Iwaki

同行评价
本文从临床的病例中探讨了乙型肝炎病毒基因型与肝脏病理改变的关系, 方法先进, 结果可信, 有一定的临床意义。

- Y, Li TC, Sata T, Abe K. Molecular epidemiology of hepatitis viruses and genotypic distribution of hepatitis B and C viruses in Harbin, China. *Jpn J Infect Dis* 2003; 56: 19-22
- 17 范金水, 庄辉, 李远贵, 朱晓洁, 徐德忠, 马为民, 王跃民, 陈雅洁, 姜国强, 马廷贤. 我国8城市HBsAg阳性和阴性乙肝患者的病毒血清型和基因型分析. *中化微生物学和免疫学杂志* 1998; 18: 88-92
- 18 阎丽, 侯金林, 王战会, 牛贞玉, 郭亚兵, 骆抗先. 宁夏地区乙型肝炎病毒基因型分布及D基因型的测序鉴定. *解放军医学杂志* 2000; 25: 4-7
- 19 夏国梁, Omana V, Nainan, 贾志远, 刘洪斌, 罗述斌, 李荣成, 曹慧霖, 刘崇柏, Harold S Margolis. 乙型肝炎病毒基因型和血清亚型在我国部分地区的分布及其特点. *中华流行病学杂志* 2001; 22: 348-351
- 20 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1207-1209
- 21 Sumi H, Yokosuka O, Seki N, Arai M, Imazeki F, Kurihara T, Kanda T, Fukai K, Kato M, Saisho H. Influence of hepatitis B virus genotypes on the progression of chronic type B liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 19-26
- 22 Yuen MF, Fung SK, Tanaka Y, Kato T, Mizokami M, Yuen JC, Wong DK, Yuan HJ, Sum SM, Chan AO, Wong BC, Lai CL. Longitudinal study of hepatitis activity and viral replication before and after HBeAg seroconversion in chronic hepatitis B patients infected with genotypes B and C. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5036-5040
- 23 Orito E, Mizokami M, Sakugawa H, Michitaka K, Ishikawa K, Ichida T, Okanoue T, Yotsuyanagi H, Iino S. A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. Japan HBV Genotype Research Group. *Hepatology* 2001; 33: 218-223
- 24 Chu CJ, Hussain M, Lok AS. Hepatitis B virus genotype B is associated with earlier HBeAg seroconversion compared with hepatitis B virus genotype C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1756-1762
- 25 唐跃华, 谢建敏, 梁玉全, 刘建辉. 慢性乙型肝炎患者血清HBeAg、HBV DNA与肝组织炎症关系的探讨. *中华传染病杂志* 2005; 23: 338-341
- 26 李雅娟, 庄辉, 李杰, 董庆鸣, 陈雅洁, 牛俊奇, 马为民, 赵伟, 赵保安, 钟金群. 乙型肝炎病毒感染者病毒基因型和亚型分布及其临床意义. *中华肝脏病杂志* 2005; 13: 724-729
- 27 陈公英, 邵俊斌, 徐岱, 陈洁, 黄劲松, 余吉仙, 谢蕾, 刘春涛, 俞哲, 吴惟一. 浙江省乙型肝炎病毒B、C基因型感染者临床和肝组织病理的比较. *中华传染病杂志* 2006; 24: 113-115

电编 何基才 编辑 张焕兰

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

• 消息 •

2007 年原位肝脏移植新技术及进展学习班通知

本刊讯 为促进国内肝脏移植领域的交流与合作, 为拟开展肝脏移植的同道提供技术支持, 提高我国肝移植的技术水平, 推动肝移植的健康发展, 中山大学附属第三医院肝脏移植中心将于2007-08-29/09-02与世界华人消化杂志合作举办“原位肝脏移植新技术及进展”学习班, 由中山大学器官移植研究所所长陈规划教授主持, 并邀请海内外肝移植知名专家授课, 就目前我国肝移植存在的重点和难点问题以及近几年来肝移植技术的新进展进行学术讲座。

中山大学附属第三医院肝脏移植中心是广东省器官移植研究所和中山大学器官移植研究所挂靠单位, 也是广东省卫生厅重点专科和广东省器官移植学会主任委员单位。目前, 已开展近1000例肝脏移植术, 术后1 a生存率超过80%, 居国内领先水平。本中心已举办三期肝脏移植技术学习班, 并协助国内60余家单位开展了肝脏移植术。本项目为2007年国家继续医学教育项目, 项目编号为: 2007-04-10-024, 授予 I 类学分14分。授课内容主要涉及肝脏移植手术技巧、高危受者的麻醉管理、重症感染病人的无肝素化持续血液净化治疗、个体化免疫抑制方案、术后随访管理系统、抗乙肝病毒治疗新策略、西罗莫司及超声造影技术在肝脏移植中的应用等方面。学习对象为省级、地市级医院的医护人员。

收费标准: 培训费900元/人(统一安排食宿, 费用自理)

通讯地址: 广州市天河路600号, 中山大学附属第三医院肝脏移植中心 邮编: 510630 联系人: 汪根树 电话: 020-87595523 传真: 020-87595523 E-mail: chengying_827@163.com.

快速乙型肝炎疫苗接种程序分析

陈仕珠, 张晋红, 任菊香, 温风玲, 刘振霞, 任雪莲

陈仕珠, 张晋红, 任菊香, 温风玲, 刘振霞, 任雪莲, 中国人民解放军第451医院感染病科 陕西省西安市 710054
通讯作者: 陈仕珠, 710054, 陕西省西安市友谊东路269号, 中国人民解放军第451医院感染病科. chenshizhu34419@126.com
电话: 029-84734222
收稿日期: 2007-04-06 接受日期: 2007-04-28

Analysis on accelerated hepatitis B immunization schedule

Shi-Zhu Chen, Jin-Hong Zhang, Ju-Xiang Ren, Feng-Ling Wen, Zhen-Xia Liu, Xue-Lian Ren

Shi-Zhu Chen, Jin-Hong Zhang, Ju-Xiang Ren, Feng-Ling Wen, Zhen-Xia Liu, Xue-Lian Ren, Department of Infectious Diseases, Chinese PLA 451st Hospital, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Shi-Zhu Chen, Department of Infectious Diseases, Chinese PLA 451st Hospital, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China. chenshizhu34419@126.com
Received: 2007-04-06 Accepted: 2007-04-28

Abstract

AIM: To analyze the effect of accelerated immunization schedule for those who have no responses to standard hepatitis B vaccination schedule.

METHODS: Healthy subjects were divided into group A ($n = 53$) and B ($n = 48$), vaccinated by 30 μg (20 μg for those less than 12 years old) recombinant hepatitis B vaccine with the accelerated schedule (immunized on day 0, 7, 14) and standard schedule (immunized in month 0, 1, 6), respectively. The efficacy was detected 1, 3, 7, 12, 24 and 36 months after the first vaccination.

RESULTS: The seroconversion rates and protection rates in group A were significantly higher than those in group B 1, 3 and 7 month after the first vaccination (64.2%, 66.0%, 61.5% vs 0%, 16.7%, 52.1%; 54.7%, 54.7%, 47.3% vs 0%, 4.1%, 40.1%; $P < 0.01$). The completion rate and geometric titer (GMT) of anti-HBs 1 and 3 month after the first dose in group A were also markedly higher than those in group B (100% vs 60.4%; 66.8, 68.2 IU/L vs 0, 5.4 IU/L, $P < 0.01$). One month after the third vaccination, another dose

was given to those without responses or with weak responses, and the protective effect was observed in all the subjects of both groups.

CONCLUSION: The accelerated immunization schedule is simple and effective, with a higher completion rate, earlier appearance of seroconversion and peak anti-HBs GMT. Booster dose is necessary for those who have low or no responses to the vaccine.

Key Words: Hepatitis B vaccine; Accelerated immunization; Immunization response; Vaccination schedule

Chen SZ, Zhang JH, Ren JX, Wen FL, Liu ZX, Ren XL. Analysis on accelerated hepatitis B immunization schedule. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(16):1865-1867

摘要

目的: 观察快速乙肝疫苗接种方案对标准方案无反应者的免疫效果。

方法: 健康受试者分快程序组($n = 53$)和对照组($n = 48$), 分别按d 0, 7, 14程序和标准程序(mo 0, 1, 6)三角肌内接种30 μg CHO乙肝疫苗, 于首针接种后1, 3, 7, 12, 24和36 mo分别查抗-HBs滴度等。

结果: 首针接种后1, 3和7 mo组1血清抗-HBs阳转率(64.2%, 66.0%, 61.5%)和抗-HBs保护率(54.7%, 54.7%, 47.3%)分别显著高于组2(0%, 16.7%, 52.1%; 0%, 4.1%, 40.1%)($P < 0.01$); 组1全程接种完成率和血清抗-HBs几何平均滴度(GMT)显著高于组2(100% vs 60.4%; 66.8, 68.2 IU/L vs 0, 5.4 IU/L, $P < 0.01$)。3针完成后1 mo无及弱反应者追加1针后两组均为保护反应(100%), 组1和组2无反应者分别有54.5%和50.0%阳转。

结论: d 0, 7, 14方案接种方便; 全程接种完成率高; 抗-HBs阳转和GMT峰值出现早。对标准程序弱或无反应者接种4针可提高反应率。

关键词: 乙型病毒性肝炎疫苗; 快速免疫; 免疫应

背景资料
HBV疫苗中纳入免疫接种以来, 新生儿和儿童HBV携带率和慢HBV发病率已明显下降, 但在其他人群重复标准方案接种效果不理想。

应用要点
对常规方案接种后无反应者采用快速乙肝疫苗接种方案具有方便、快速、总体效果好、安全而实惠等特点。

答: 接种方案

陈仕珠, 张晋红, 任菊香, 温风玲, 刘振霞, 任雪莲. 快速乙型肝炎疫苗接种程序分析. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1865-1867
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1865.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)疫苗纳入免疫接种以来, 世界范围内的新生儿和儿童HBV携带率和慢HBV发病率均已明显下降^[1-3]. 但在其他人群常规免疫后约10%的人无反应^[4]. 重复标准方案接种效果不理想, 其中因标准方案接种间隔时间太长而未完成全程接种使免疫失败者不在少数^[5]. 为提高对常规HBV疫苗免疫方案接种后无反应者的HBV疫苗免疫成功率, 本文前瞻性地研究了d 0, 7, 14方案免疫的效果和随访结果.

1 材料和方法

1.1 材料 受试者为2002-06/2005-12连续收集的经常规(mo 0, 1, 6)接种方案接种乙肝疫苗后无反应者, 分2组. 快程序组(组1)53名, 男26, 女27; 年龄5-57(平均22.3)岁; 家族中有慢性乙型肝炎患者或HBV/HBsAg携带者14例. 对照组(组2)48名, 男25, 女23; 年龄5-58(平均23.5)岁; 家族中有慢性HBV患者或HBV/HBsAg携带者12例. 所有受试者营养、健康状况良好, 无免疫性疾病或应用免疫抑制剂等其他急慢性疾病, 肝功能(丙氨酸氨基转移酶等)正常, 甲-戊型肝炎病毒标志均阴性. 所有受试者均接种北京华尔盾生物技术公司生产的重组仓鼠卵细胞(CHO)乙肝疫苗(批号为S19990072, 每支10 μ g, 1 mL). ELISA试剂(上海科华生物有限股份公司生产); 免疫后血清抗-HBs滴度(北京生物制品研究所生产的固相放射免疫测定试剂盒).

1.2 方法 快程序组和对照组分别按0, 7, 14 d和0, 1, 6 mo程序, 上臂三角肌内接种乙肝疫苗, 每针30 μ g(<12岁或体质量<45 kg者20 μ g). 对完成3针接种后1 mo仍为无或弱反应者追加接种1针(共4针), 方法和剂量同上. 组1和组2分别有1针未在限定时间当日接种和7 d内接种者按未及时发现完成全程接种计. 于首针接种后1, 3, 7, 12, 24和36 mo分别取静脉血查抗-HBs滴度等, 同时记录接种后的不良反应、完成全程接种和感染HBV情况. 完成接种后各时间段人数按实际复查人数计算和分析. 接种前和随访期间血清HBV等标志物用ELISA试剂检测, 免疫后血清抗-HBs滴

度检测按说明书进行. 抗-HBs滴度<2 IU/L为阴性, ≥ 2.1 IU/L为阳性, ≥ 10 IU/L为有保护阳性^[5].

统计学处理 用SPSS12.0统计软件作统计学处理, 计数资料用 χ^2 检验, 计量资料用方差分析.

2 结果

2.1 全程接种完成率 组1和组2完成全程接种分别为100%(53/53), 60.4%(29/48), 差异显著($P<0.01$).

2.2 血清抗-HBs阳转率, 保护率 抗-HBs GMT组1首针接种后1, 3和7 mo血清抗-HBs阳转率和有效保护率均显著高于对照组(64.2%, 66.0%和61.5% vs 0%, 16.7%和52.1%; 54.7%, 54.7%和47.3% vs 0%, 4.1%和40.1%, $P<0.01$), 12 mo后各时间段组1仍高于组2, 但差异不显著(表1). 组1首针接种后血清抗-HBs GMT峰值出现早(表2).

2.3 对完成3针接种后1 mo无和弱反应者追加接种(共4针)的效果 完成3针接种后1 mo无和弱反应者组1分别有18和5名, 组2分别有23和7名. 追加接种1针后组1分别有10/18(55.5%)和5/5(100%)、组2分别有12/23(52.2%)和7/7(100%)有保护反应. 两组分别有8和11名加强免疫后仍无反应.

2.4 接种后不同反应与家族中HBV感染状况的关系 组1和组2无反应者中分别有6/8(75.0%), 7/11(63.6%)名家族中有HBV/HBsAg携带或HB患者, 另分别有3和2名的配偶为HBV/HBsAg携带者. 无反应者的家族和配偶中无HBV/HBsAg携带者两组分别为1和2名(9.1%和12.5%). 有HBV/HBsAg携带家族史者对HBV疫苗无反应率显著高于无HBV/HBsAg携带家族史者($P<0.05$).

3 讨论

对常规(标准)HBV疫苗免疫方案接种后无反应者的成功免疫是一棘手问题, 迄今尚无理想方法. 影响免疫成功的因素众多^[4,6], 在年龄等因素相当或相同的情况下, 接种方案和剂量为其重要因素之一^[5,7]. 标准接种方案为世界卫生组织早先推荐的主要用于新生儿的乙肝免疫方案, 近20 a的临床实践表明, 该方案除因间隔时间太长使部分人不能完成全程接种外^[8], 即便是完成全程接种者亦存在免疫应答率偏低的问题^[7,9]. 此前的经验表明, 对标准方案接种后无反应者重复标准方案接种效果不佳, 而采用快程序接种可提高反应率^[9]. 为此, 我们采用目前最

表 1 首针接种后血清抗-HBs阳转率

分组	1 mo			3 mo			7 mo			12 mo			24 mo			36 mo		
	n	+	%	n	+	%	n	+	%	n	+	%	n	+	%	n	+	%
组1	53	34	64.2 ^b	53	35	66.0 ^b	52	32	61.5 ^b	52	25	48.1 ^a	50	15	30.0	41	5	12.2
组2	48	0	0.0	48	8	16.7	48	25	52.1	45	20	44.4	45	15	28.9	40	4	10.0

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 组2.

表 2 首针接种血清抗-HBsGMT(IU/L)

分组	1 mo		3 mo		7 mo		12 mo		24 mo		36 mo	
	n	GMT	n	GMT	n	GMT	n	GMT	n	GMT	n	GMT
组1	34	66.8 ^b	35	68.2 ^b	32	63.4	25	51.7	15	26.6	5	2.5
组2	0	0.0	8	5.4	25	60.6	20	54.2	15	29.5	4	3.8

^b $P < 0.01$ vs 组2.

快速的HBV疫苗接种方案和较大剂量HBV疫苗对此前按标准方案接种后无反应者作了接种观察. 本资料中两组年龄等条件相一致, 因条件引起的误差较小. 结果表明, 0, 7, 14 d免疫程序因间隔时间短, 便于记忆, 易于接种者掌握, 使全程接种完成率明显高于标准方案者; 该方案接种后不但抗-HBs阳转和GMT峰值出现早, 所获得的抗-HBs阳转率、保护率和GMT均明显高于标准方案者. 其原因可能与免疫记忆和每次出现免疫反应的时间与再次接触抗原间隔时间越短相对越明显, 越强烈的免疫特点有关. 进一步表明对标准方案接种后无反应者重复标准方案接种效果欠佳. 本资料还表明, 对完成三针接种后无或弱反应者, 追加一针几乎可使所有弱反应者明显反应, 使近半数无反应者出现反应. 此外, 本结果还显示, 有携带HBV家族史者对HBV疫苗无反应率显著高于无携带HBV家族史者, 这对判断接种效果和是否应用更大剂量疫苗等有一定帮助. 其原因可能与家族对HBV免疫(反应)力低下的基因遗传给受试者有关^[10]. 至于两方案接种后抗-HBs的持续时间, 不同个体差异甚大, 从数月到近20 a不等^[5], 故须继续追踪观察比较. 据目前观察, 接种后12 mo始抗-HBs GMT下降稍快些, 但从与标准方案接种的时间差来说, 则下降并不快. 按该方案接种以来未发现明显不良反应或其他异常或意外. 对常规方案接种后无反应者的成功免疫本方案不失为一方便, 快速, 总体效果好, 安全而实用的HB免疫方案.

4 参考文献

- Jacobs RJ, Meyerhoff AS. Effect of middle school entry requirements on hepatitis B vaccination coverage. *J Adolesc Health* 2004; 34: 420-423
- Barata RB, de Moraes JC, Antonio PR, Dominguez M. Immunization coverage survey: empirical assessment of the cluster sampling method proposed by the World Health Organization. *Rev Panam Salud Publica* 2005; 17: 184-190
- Skifte TB. Childcare immunization programme--to what extent are children covered by vaccinations in Greenland? *Int J Circumpolar Health* 2004; 63 Suppl 2: 252-255
- Das K, Gupta RK, Kumar V, Singh S, Kar P. Association of HLA phenotype with primary non-response to recombinant hepatitis B vaccine: a study from north India. *Trop Gastroenterol* 2004; 25: 113-115
- 陈仕珠, 韩永战. 影响乙肝疫苗免疫效果的因素. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2701-2707
- Joshi N, Kumar A, Raghu MB, Bhav S, Arulprakash R, Bhusari P, Rao R. Immunogenicity and safety of hepatitis B vaccine (Shanvac-B) using a novel pre-filled single use injection device Unijet in Indian subjects. *Indian J Med Sci* 2004; 58: 472-477
- 陈仕珠. 乙型肝炎病毒疫苗免疫现状及存在的问题. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2661-2667
- Wright NM, Campbell TL, Tompkins CN. Comparison of conventional and accelerated hepatitis B immunisation schedules for homeless drug users. *Commun Dis Public Health* 2002; 5: 324-326
- 陈仕珠, 张晋红, 张增平, 任菊香, 温风玲, 韩永战, 任雪莲, 陈鹰军. 常规和快速乙肝免疫接种效果比较. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1884-1888
- Goncalves L, Albarran B, Salmen S, Borges L, Fields H, Montes H, Soyano A, Diaz Y, Berrueta L. The nonresponse to hepatitis B vaccination is associated with impaired lymphocyte activation. *Virology* 2004; 326: 20-28

同行评价
本文报道结果对
改善按常规接种
方案效果不佳者
有重要的临床参
考价值.

电编 张敏 编辑 程剑侠

吉西他滨联合卡培他滨一线治疗晚期胰腺癌的Meta分析

谢德荣, 梁汉霖, 杨琼, 郭双双, 江志敏, 陈邓林

背景资料
GEM单药化疗为晚期胰腺癌标准的一线治疗, 前期Meta分析提示GEM联合化疗优于标准的GEM单药化疗。在此基础上, 对GEM联合CAP这亚一组进行Meta分析, 以探讨GEMCAP化疗方案一线治疗晚期胰腺癌的地位和价值。

谢德荣, 杨琼, 郭双双, 江志敏, 陈邓林, 中山大学附属第二医院肿瘤科 广东省广州市 510120
梁汉霖, 中山大学附属中山市人民医院化疗科 广东省中山市 528403
通讯作者: 谢德荣, 510120 中山大学附属第二医院肿瘤科。derongxie@126.com
电话: 020-81332616 传真: 020-84110956
收稿日期: 2007-03-16 接受日期: 2007-03-31

Gemcitabine plus capecitabine as a front-line therapy for advanced pancreatic cancer: a meta-analysis

De-Rong Xie, Han-Lin Liang, Qiong Yang Shuang-Shuang Guo, Zhi-Min Jiang, Deng-Lin Chen

De-Rong Xie, Qiong Yang Shuang-Shuang Guo, Zhi-Min Jiang, Deng-Lin Chen, Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China
Han-Lin Liang, Department of Chemotherapy, Zhongshan People's Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhongshan 528403, Guangdong Province, China
Correspondence to: De-Rong Xie, Department of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China. derongxie@126.com
Received: 2007-03-16 Accepted: 2007-03-31

Abstract

AIM: To use a meta-analysis to explore the therapeutic effects of gemcitabine (GEM) plus capecitabine (CAP) as a front-line therapy in patients with advanced pancreatic cancer (APCa).

METHODS: A meta-analysis of all previously published and some unpublished studies were performed with a comprehensive search of the literatures included in MEDLINE, EMBASE, ASCO and ECCO. The meta-analysis included all randomized evidence to compare GEM plus CAP (GEMCAP) with GEM alone with respect to overall survival rate, objective remission rate and toxicities in APCa patients.

RESULTS: Of 316 reports, three randomized controlled trials involving 932 APCa patients were identified by two reviewers. The GEMCAP

combination group showed a significant improvement in 6-month survival rate ($RD = 0.07$, 95%CI 0.01-0.13, $P = 0.03$) and objective remission rate ($RD = 0.06$, 95%CI 0.02-0.10, $P = 0.004$). The incidence of WHO 3/4 grade hand-foot syndrome was higher in the GEMCAP combination group ($RD = 0.02$, 95%CI 0.00-0.04, $P = 0.02$). No significant differences were observed for other toxicities between the two arms.

CONCLUSION: GEMCAP combination chemotherapy may improve the six-month survival rate without significantly increasing toxicities besides that of hand-foot syndrome. Based on the available evidence, GEMCAP may be considered a standard front-line therapy for patients with APCa. Our results raise a critical issue that needs evaluating in future clinical trials.

Key Words: Pancreatic neoplasms; Chemotherapy; Gemcitabine; Capecitabine; Meta-analysis

Xie DR, Liang HL, Yang Q, Guo SS, Jiang ZM, Chen DL. Gemcitabine plus capecitabine as a front-line therapy for advanced pancreatic cancer: a meta-analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(16):1868-1871

摘要

目的: 通过Meta分析, 探讨吉西他滨(GEM)与卡培他滨(CAP)联合化疗方案(GEMCAP)一线治疗晚期胰腺癌的地位和价值。

方法: 通过MEDLINE、EMBASE、ASCO、ECCO等数据库及论文集检索国内外已发表和未发表的相关文献。选择治疗组为GEMCAP方案化疗, 对照组为GEM单药化疗的晚期胰腺癌随机对照试验(randomized controlled trial, RCT)。由2位评价者分别按上述检索策略收集资料, 按纳入标准筛选文献, 主要对总生存率、其次是客观缓解率和毒副反应进行Meta分析。

结果: 从316篇文献中筛选出符合纳入标准的3个RCT, 涉及932例患者。GEMCAP联合化疗与GEM单药化疗相比, 联合化疗组半年生存率提高7%($RD = 0.07$, 95% CI 0.01-0.13, $P =$

0.03), 客观缓解率提高6%($RD = 0.06$, 95% CI 0.02-0.10, $P = 0.004$); 3/4度毒手足综合征增加2%($RD = 0.02$, 95% CI 0.00-0.04, $P = 0.02$), 其他毒副反应两组差别无统计学意义。

结论: GEMCAP方案治疗晚期胰腺癌, 可以改善患者的半年生存率, 没有明显增加毒副反应。现有的证据支持GEMCAP方案用于晚期胰腺癌的一线治疗, 值得进一步的临床试验。

关键词: 胰腺肿瘤; 化学疗法; 吉西他滨; 卡培他滨; Meta分析

谢德荣, 梁汉霖, 杨琼, 郭双双, 江志敏, 陈邓林. 吉西他滨联合卡培他滨一线治疗晚期胰腺癌的Meta分析. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1868-1871
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1868.asp>

0 引言

晚期胰腺癌化疗效果差, Meta分析显示吉西他滨(GEM)联合化疗优于标准的GEM单药化疗^[1-3], 联合化疗是今后的发展方向^[4], 但由于纳入分析的联合化疗方案包括GEM联合顺铂、奥沙利铂、5-氟尿嘧啶(5-FU)、卡培他滨(CAP)以及伊立替康等, 而Meta分析反映的仅仅是这些方案的总效应, 因而对临床缺乏实际的指导意义。因此有必要进行亚组分析, 寻找确切有效的联合化疗方案, 现有的证据不支持GEM联合5-FU^[5]、顺铂^[6-7]以及伊立替康^[8]。2005年第13届欧洲肿瘤年会报道GEM联合CAP治疗晚期胰腺癌, 可以显著改善患者的1 a生存率^[9], 美国NCCN将此研究结果引入新版(2006v.2)指引, 建议晚期胰腺癌可选用GEM与CAP两药联合的化疗方案(GEMCAP), 但证据级别较低(2A)。本文试图通过Meta分析, 探讨GEMCAP方案一线治疗晚期胰腺癌的地位和价值。

1 材料和方法

1.1 材料 以MEDLINE(1966-), EMBASE(1966-), 中国生物医学文献数据库(CBMdisc, 1981-), ASCO(1995/2006), ECCO论文集(2005/2006)等为主要来源, 文献截止日期为2006-10-20。中文检索词“胰腺肿瘤”, “胰腺癌”, “吉西他滨”, “健择”, “卡培他滨”, “希罗达”等; 英文检索词“pancreas”, “pancreatic neoplasms”, “pancreatic cancer”, “pancreatic carcinoma”, “pancreatic adenocarcinoma”, “gemzar”, “gemcitabine”, “capecitabine”, “xeloda”等,

表 1 纳入研究的3项前瞻性随机临床研究

研究	分组	n	生存率(%)		Jadad评分 (分)
			6 mo	1 a	
Cunnin- gham ^[9]	GEM	266	50	19	3
	GEM+ CAP	267	62	26	
Scheith- auer ^[11]	GEM	42	59.4	37.2	3
	GEM+ CAP	41	67.7	31.8	
Herma- nn ^[12]	GEM	157	62	27	3
	GEM+ CAP	159	60	31	

应用要点
GEMCAP联合化疗方案半年生存率提高7%, 而没有明显增加毒副反应, 现有证据支持GEMCAP方案用于晚期胰腺癌的一线治疗。

语种不限。结果共检出文献316篇。

1.2 方法

1.2.1 纳入标准 原始研究类型为前瞻性随机对照临床研究(RCT); 研究对象为不可切除的胰腺癌(局部晚期和远处转移), 有病理诊断, 无胰腺癌以外的肿瘤, 血象、肝肾功能基本正常, 能耐化疗; 研究内容为晚期胰腺癌GEMCAP方案化疗与GEM单药化疗对比的RCT, 治疗组为GEMCAP方案化疗, 对照组为GEM单药化疗, 均为一线治疗, 无接受研究内容以外的其他抗癌治疗。原始文献有明确的随访截尾时的存活例数或有清晰的生存曲线, 随访率>95%。

1.2.2 资料收集与分析 由2位评价者分别按上述检索策略收集资料, 严格按纳入标准进行文献筛选, 纳入研究的文献质量评价采用Jadad质量记分法^[10]。从316条文献中, 经2位评价者共同讨论, 最后有3项前瞻性随机临床研究纳入分析(表1)。对纳入研究的3篇文献的参考文献进行扩大检索, 未发现新的符合纳入标准的文献。

统计学处理 由Meta分析软件RevMan4.28完成(从Cochrane图书馆下载)。所有变量都采用离散型模式来分析, 其结局变量为接受GEMCAP联合化疗的患者和接受GEM单药化疗的患者生存率和各种毒副反应等的差值, 即治疗优势(risk difference, RD), 部份生存率由生存曲线获得。研究结果的异质性分析: 指各研究的一致性 or 趋向性分析, 用检验统计量 q 表示。

2 结果

2.1 疗效分析 所有观察指标的异质性检验, P 值均大于0.05, 提示各个研究间具有良好的同质性。GEMCAP联合化疗组生存率、客观有效率均优于GEM单药组(表2)。

2.2 毒副反应分析 主要对WHO 3/4度毒副反应

名词解释

Meta分析, 又称汇总分析或荟萃分析, 是汇总多个研究结果而进行总体效应评价的一种分析方法。Meta分析是对传统综述的一种改进, 通过回顾性和观察性地对多个研究结果效应合并, 从而变相地增大了样本含量, 增大了检验效能, 在现有资料基础上产生新知识的综合, 从而解决研究结果的矛盾、改善效应估计值, 对某一问题的综合研究提供系统的可接受的客观方法。

表 2 GEMCAP联合与GEM单药化疗疗效比较

疗效	例数(n/M)		异质性检验		RD(fixed)95% CI		显著性检验	
	联合组	单药组	χ^2	P			Z	P
6 mo SR	289/467	255/465	4.20	0.12	0.07	0.01-0.13	2.20	0.03
1 a SR	133/467	109/465	1.67	0.43	0.05	-0.01-0.11	1.77	0.08
1 a SR ¹	120/426	93/423	0.29	0.59	0.06	0.00-0.12	2.09	0.04
ORR	68/466	41/448	1.89	0.37	0.06	0.02-0.10	2.84	0.004

¹剔除Scheithauer试验后结果。

表 3 GEMCAP联合与GEM单药化疗主要毒副反应比较

疗效	例数(n/M)		异质性检验		RD(fixed)95% CI		显著性检验	
	联合组	单药组	χ^2	P			Z	P
粒细胞减少症	83/462	62/458	0.58	0.75	0.04	0.00-0.09	1.86	0.06
血小板减少症	16/462	10/458	2.00	0.37	0.01	-0.01-0.03	1.15	0.25
贫血	14/462	15/458	2.24	0.33	0.00	-0.03-0.02	0.22	0.83
恶心/呕吐	11/462	10/458	1.37	0.50	0.00	-0.02-0.02	0.20	0.85
腹泻	13/462	6/458	4.08	0.13	0.01	0.00-0.03	1.57	0.12
手足综合征	7/307	0/305	0.01	0.94	0.02	0.00-0.04	2.36	0.02

进行分析, 除手足综合征GEMCAP联合化疗组高于单药组2%外, 其他毒副反应两组差异无统计学意义(表3)。

3 讨论

CAP为5-FU前体药物, 在体内经过一系列的酶促反应如胸苷磷酸化酶(TP)作用而活化, 经二氢嘧啶脱氢酶(DPD)降解而灭活。有研究表明, 胰腺癌组织中TP的含量平均为癌旁正常组织的74倍, TP/DPD比值也较正常胰腺组织明显升高, 提示CAP在胰腺癌组织中选择性活化, 对治疗胰腺癌有一定的应用价值^[13]。I/II期临床试验也显示GEMCAP治疗胰腺癌无严重的毒副反应、耐受性良好, 且有一定的疗效^[14]。2003年Scheithauer *et al*^[11]报道第一个GEMCAP与GEM单药比较的随机临床试验, 结果联合化疗未能改善患者的生存; 2005年Herrmann *et al*^[12]的研究也为阴性结果, 但Cunningham *et al*^[9]的研究却取得了显著的生存获益, 1 a生存率联合组高达26%, 优于单药组的19%。可见目前仅有的3个RCT结果不甚一致, 因此有必要进行Meta分析, 探讨联合化疗在治疗晚期胰腺癌的地位和价值, 为临床提供高级别的证据。我们对国内外多个医学数据库、重要的肿瘤学术会议资料进行多重检索, 严格按研究前制定的纳入标准进行筛选, 最后共有3个(1个II期、2个III期)RCT符合纳入标准, Jadad

评分均为3分, 可见本分析的原始研究均为高质量的临床研究。3个研究中有2个为阴性结果, 推测发表偏倚的可能性较小。2个III期临床试验的研究方案相似, GEM单药组的剂量及用法相同, 联合化疗组Cunningham *et al*^[9]采用每周一次的GEM 1000 mg/m², 连用3 wk, CAP 1660 mg/m²连用21 d, 4 wk重复; 而Herrmann *et al*^[12]则为第1、8天应用GEM 1000 mg/m², CAP 1300 mg/m²连用14 d, 3 wk重复; 前者的剂量强度高于后者, 这可能是Cunningham *et al*^[9]的研究为阳性结果而Herrmann *et al*^[12]的研究为阴性结果的原因之一, 但异质性检验, $P>0.05$, 提示研究间同质性良好, 因而本研究具有较高的可信度。

晚期胰腺癌的化疗似乎到了一个平台期, 生存情况难有大幅度的改善。因此, 本Meta分析将生存率的改善作为研究的主要终点指标。联合化疗可以提高患者半年生存率7%(95% CI: 0.01-0.13, $P=0.03$), 1 a生存率提高5%(95% CI: -0.01-0.10, $P=0.08$)也有改善的趋势。考虑到Scheithauer *et al*^[11]的研究为II期临床研究, 且GEM的用法为探索性研究, 即2200 mg/m², 双周重复, 目前临床上基本上不采用该用法, 因此可以将该研究从Meta分析中剔除, 剔除后的分析结果显示联合化疗组1 a生存率提高6%(95% CI: 0.00-0.12), 具有统计学意义($P=0.04$)。客观有效率为本研究的次要观察指标, 结果联合化疗组

也有统计学意义地提高6%(95% CI: 0.02-0.10, $P = 0.004$). 可见, GEMCAP联合化疗方案, 可以提高客观有效率, 且有效率的提高可转化为生存获益. 晚期胰腺癌为不可治愈性疾病, 现有措施均为姑息性治疗, 因此改善生活质量为评价疗效的另一个重要指标, 但3个研究均未涉及生活质量的评价. 临床获益反应率(CBR)可部分反映生活质量的改善情况, 但仅有1个研究^[11]提供CBR相关数据, 联合组48.4%(15/31), 似高于单药组的33.3%(10/30).

联合化疗是否增加毒副反应自然成为临床医生关注的另一个问题. 联合化疗3/4度骨髓毒性包括粒细胞减少症、血小板减少症及贫血, 以及消化道毒性恶心/呕吐、腹泻等并没有明显提高, 与单药组比较差别无统计学意义; 手足综合征是CAP的主要毒性之一, 联合组发生率2.3%, 较单药组高2% (95% CI: 0.00-0.04, $P = 0.02$), 但与其他疾病单药应用CAP相似^[15], 联合GEM并没有增加CAP的相关毒副反应.

总之, GEMCAP方案治疗晚期胰腺癌, 可以改善患者的半年生存率, 而没有明显增加毒副反应. 现有证据支持GEMCAP方案用于晚期胰腺癌的一线治疗, 值得进一步的临床试验.

4 参考文献

- 1 Liang HL. Comparing gemcitabine-based combination chemotherapy with gemcitabine alone in Inoperable Pancreatic Cancer: A meta-analysis. *J Clin Oncol*, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings, 23 (16 suppl): 4110
- 2 梁汉霖, 王羽, 谢德荣. 关于晚期胰腺癌的Meta分析: 吉西他滨联合化疗与吉西他滨单药. 循证医学 2005; 5: 156-165
- 3 Xie DR, Liang HL, Wang Y, Guo SS, Yang Q. Meta-analysis on inoperable pancreatic cancer: a comparison between gemcitabine-based combination therapy and gemcitabine alone. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6973-6981
- 4 王羽, 梁汉霖, 郭双双, 谢德荣. 正在进行的晚期胰腺癌临床试验. 中国肿瘤临床 2005; 32: 1197-1199
- 5 郭双双, 王羽, 杨琼, 谢德荣. 吉西他滨联合5-FU或卡培他滨与吉西他滨单药治疗晚期胰腺癌对比的Meta分析. 循证医学 2006; 6: 42-47
- 6 Xie de R, Liang HL, Wang Y, Guo SS. Meta-analysis of inoperable pancreatic cancer: gemcitabine combined with cisplatin versus gemcitabine alone. *Chin J Dig Dis* 2006; 7: 49-54
- 7 谢德荣, 梁汉霖, 王羽, 郭双双, 杨琼, 江志敏. 吉西他滨联合顺铂与吉西他滨单药化疗治疗晚期胰腺癌比较的Meta分析. 中国肿瘤临床 2006; 33: 1424-1427
- 8 杨琼, 江志敏, 郭双双, 王羽, 梁汉霖, 谢德荣. 吉西他滨联合伊立替康一线治疗晚期胰腺癌随机对照临床试验的Meta分析. 岭南现代临床外科 2007; 7: 101-103
- 9 Cunningham D, Chau I, Stocken D, Davies C, Dunn J, Valle J, Smith D, Steward W, Harper P, Neoptolemos. Phase III randomised comparison of gemcitabine (GEM) versus gemcitabine plus capecitabine (GEM-CAP) in patients with advanced pancreatic cancer. European Cancer Conference (ECCO 13), presentation/abstract PS11, Paris, France, 2005 November 2. *Eur J Cancer Supplements* 2005; 3: 4
- 10 Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, Reynolds DJ, Gavaghan DJ, McQuay HJ. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: is blinding necessary? *Control Clin Trials* 1996; 17: 1-12
- 11 Scheithauer W, Schull B, Ulrich-Pur H, Schmid K, Raderer M, Haider K, Kwasny W, Depisch D, Schneeweiss B, Lang F, Kornek GV. Biweekly high-dose gemcitabine alone or in combination with capecitabine in patients with metastatic pancreatic adenocarcinoma: a randomized phase II trial. *Ann Oncol* 2003; 14: 97-104
- 12 Herrmann R, Bodoky G, Ruhstaller T, Glimelius B, Saletti P, Bajetta E, Schueller J, Bernhard J, Dietrich D, Scheithauer D. Gemcitabine (G) plus capecitabine (C) versus G alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer. A randomized phase III study of the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) and the Central European Cooperative Oncology Group (CECOG). *J Clin Oncol*, 2005 ASCO Annual Meeting Proceedings, 23 (16 suppl): 4010
- 13 虞先浚, 蒋永剑, 傅德良, 倪泉兴. 胰腺癌中胸苷磷酸化酶和二氢嘧啶脱氢酶含量及其比值的测定. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 618-620
- 14 Hess V, Salzberg M, Borner M, Morant R, Roth AD, Ludwig C, Herrmann R. Combining capecitabine and gemcitabine in patients with advanced pancreatic carcinoma: a phase I/II trial. *J Clin Oncol* 2003; 21: 66-68
- 15 管忠震, 刘冬耕, 郁宝铭, 吴唯勤, 时德, 赵瑜, 魏于全, 邹立群, 伍晓汀, 庄文, 冯奉仪, 张频, 于世英, 熊慧华, 付强, 郑树, 黄建瑾, 伍钢, 杨传永, 孙圣荣, 阮庆兰. 希罗达 一线治疗晚期或复发性结直肠癌. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 119-121

同行评价
本文设计合理, 统计学处理正确, 讨论客观, 行文流畅. 对胰腺癌吉西他滨联合卡培他滨方案化疗进行Meta分析. 国内这方面的文章尚少. 对临床有重要指导价值.

电编 何基才 编辑 王晓瑜

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

曹洁 副教授

第二军医大学微生物学教研室

陈卫昌 教授

苏州大学附属第一医院消化内科

程爱群 主任医师

上海华东医院普外科

党双锁 副教授

西安交通大学第二医院感染科

邓长生 教授

武汉大学中南医院消化内科

董蕾 教授

西安交通大学第二附属医院消化内科

范建高 教授

上海交通大学附属第一人民医院消化内科/脂肪肝诊治中心

冯志杰 教授

河北医科大学第二医院消化内科

高润平 教授

吉林大学第一医院肝病科

戈之铮 教授

上海交通大学医学院附属仁济医院消化科

郭晓钟 教授

沈阳军区总医院消化内科

黄志勇 副教授

华中科技大学同济医院普外科

匡安仁 教授

四川大学华西医院核医学科

李淑德 教授

第二军医大学长海医院消化内科

李涛 主治医师

北京大学人民医院肝胆外科

刘彬彬 副研究员

复旦大学附属中山医院、复旦大学肝癌研究所

刘杞 教授

重庆医科大学病毒性肝炎研究所

刘绍能 主任医师

中国中医科学院广安门医院消化科

刘作金 副教授

重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

宁琴 教授

同济医院感染科

牛建昭 教授

北京中医药大学

孙秀发 教授

华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系

谭学瑞 教授

汕大医学院第一附属医院 院长室

王健生 副教授

西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

王晓艳 副教授

中南大学湘雅三医院消化内科

许文燮 教授

上海交大学生命科学院生物医学工程系文选医学楼328室

姚登福 教授

南通大学附属医院分子医学中心

张小晋 主任医师

北京积水潭医院

张占卿 主任医师

上海市(复旦大学)公共卫生中心

赵平 副教授

第二军医大学微生物学教研室