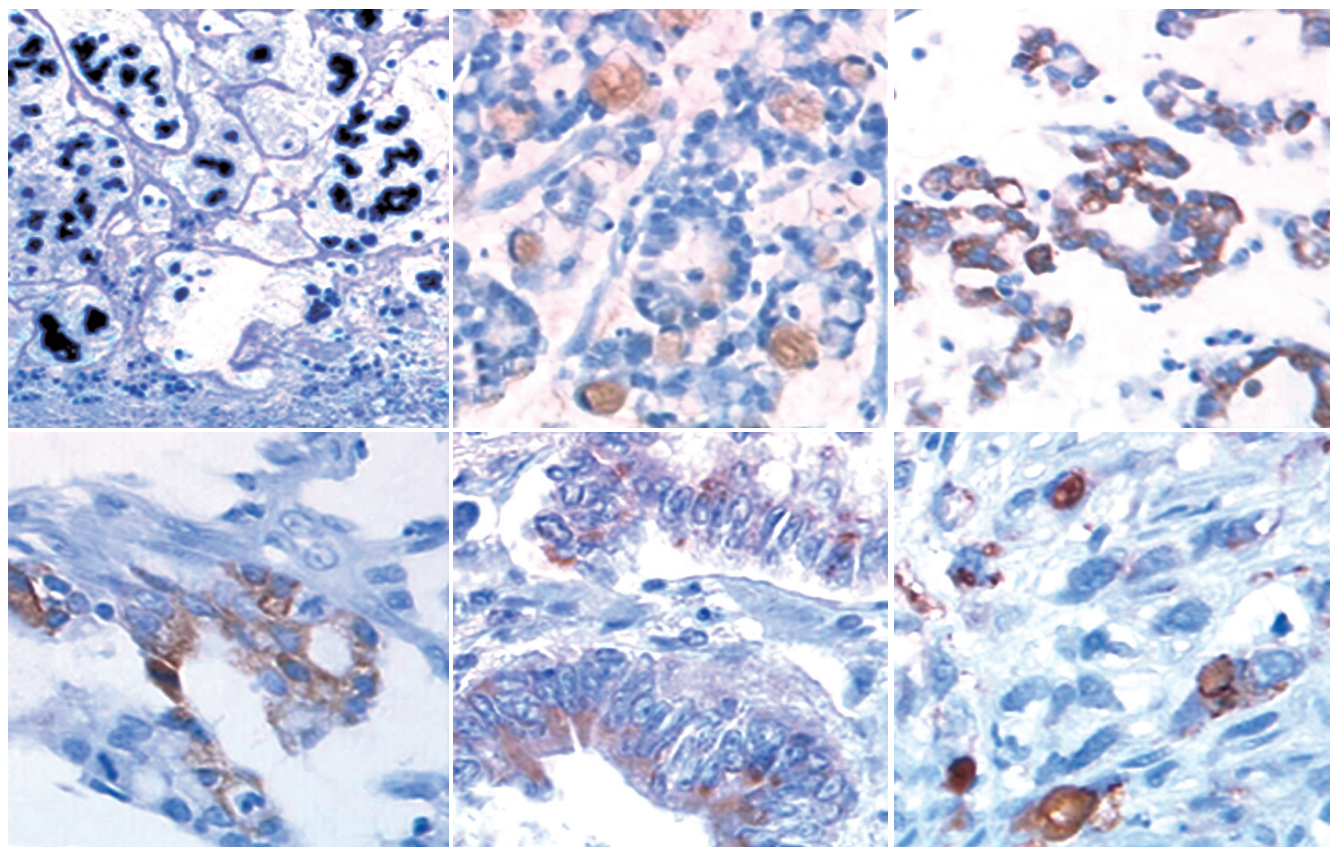


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 6 月 28 日 第 14 卷 第 18 期 (Volume 14 Number 18)



18 / 2006

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

| | |
|-------|----|
| 潘伯荣教授 | 西安 |
|-------|----|

社长/总编辑

| | |
|-------|----|
| 马连生教授 | 北京 |
|-------|----|

副总编辑

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

常务编委

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

编委

| | |
|---------|-----|
| 白爱平主治医师 | 广州 |
| 别平教授 | 重庆 |
| 白文元教授 | 石家庄 |
| 白玉贤教授 | 哈尔滨 |
| 蔡淦教授 | 上海 |
| 蔡开琳副教授 | 武汉 |
| 曹洁副教授 | 上海 |
| 陈海龙教授 | 大连 |

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

| | |
|----------|-----|
| 洪天配教授 | 北京 |
| 侯晓华教授 | 武汉 |
| 黄恒青主任医师 | 福州 |
| 黄金华副教授 | 广州 |
| 黄晓东副主任医师 | 武汉 |
| 黄颖秋教授 | 本溪 |
| 黄裕新教授 | 西安 |
| 黄志勇副教授 | 武汉 |
| 季国忠副教授 | 南京 |
| 季加孚教授 | 北京 |
| 姜慧卿教授 | 石家庄 |
| 蒋龙元副教授 | 广州 |
| 金瑞教授 | 北京 |
| 匡安仁教授 | 成都 |
| 兰平教授 | 广州 |
| 蓝宇教授 | 北京 |
| 劳绍贤教授 | 广州 |
| 李定国教授 | 上海 |
| 李东辉教授 | 厦门 |
| 李方儒教授 | 天津 |
| 李国威教授 | 西安 |
| 李继强教授 | 上海 |
| 李靖副教授 | 重庆 |
| 李军祥教授 | 北京 |
| 李奇林教授 | 广州 |
| 李胜研究员 | 济南 |
| 李涛主治医师 | 北京 |
| 李晓宇主任医师 | 北京 |
| 李旭副教授 | 广州 |
| 李延青教授 | 济南 |
| 李永哲副研究员 | 北京 |
| 李瑗教授 | 南宁 |
| 李玉民教授 | 兰州 |
| 李增山副教授 | 西安 |
| 李兆申教授 | 上海 |
| 李志霞教授 | 北京 |
| 李宗芳教授 | 西安 |
| 梁力建教授 | 广州 |
| 林胜璋副教授 | 温州 |
| 林勇讲师 | 上海 |
| 刘宝瑞教授 | 南京 |
| 刘彬彬副研究员 | 上海 |
| 刘冰熔教授 | 哈尔滨 |
| 刘成海研究员 | 上海 |
| 刘平教授 | 上海 |
| 刘杞教授 | 重庆 |
| 刘铁夫教授 | 哈尔滨 |
| 刘颖斌副教授 | 杭州 |
| 刘占举教授 | 郑州 |
| 刘正稳教授 | 西安 |

世界华人消化杂志®

编辑委员会

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

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2006 年 6 月 28 日 第 14 卷 第 18 期 (总第170期)

述 评

1755 肝癌的病因与诊疗研究进展 曹志成

基 础 研 究

1762 电针四白穴对神经阻断大鼠胃肌电的影响

常小荣, 严洁, 赵艳玲, 李江山, 刘建华, 何军锋

1766 VEGF在大鼠慢性酒精性肝损伤中的表达

李伟平, 任浩洋, 张宝阳, 虞朝辉, 厉有名

1771 复方中药安胃汤提高大鼠胃溃疡愈合质量的机制

林寿宁, 韦维, 黄贵华

1775 HSP70-肿瘤肽复合物的纯化及其对肝癌细胞株HepG-2增殖的作用

隋春阳, 李航宇, 胡勇, 宗志红, 李洪秀, 郭仁宣

临 床 研 究

1780 抗癌胚抗原单链抗体的原核表达及对人胃癌的检测

徐宏勇, 徐立, 高建宏, 杨建军, 李开宗, 窦科峰

1785 螺旋CT在胃癌术前TNM分期中的应用价值

赵志清, 郑可国, 许达生

1790 5-羟色胺转运体基因多态性与肠易激综合征的相关性

张晓敏, 林志辉

1795 溃疡性结肠炎肠黏膜组织CD8、Fas/FasL和Bcl-2/Bax的表达及关系

张姮, 夏冰, 杨桂芳, 李瑾

文 献 综 述

1799 活性氧簇在肝脏移植缺血再灌注中的作用

刘现忠, 李相成

1805 人肝癌相关新基因LAPTM4B研究进展

孙丽, 张青云

1810 胰腺癌组织VEGF和MVD表达与CT灌注成像的关系

刘悦, 李艳英, 张在人, 王淑红

1813 ERCP术后急性胰腺炎并发症的危险因素及预防研究进展

韩兵, 王宝仁

临 床 经 验

1819 食管癌化疗患者生活质量评价133例

钱勇, 张从军, 陈振东

1824 特异性免疫治疗母婴传播所致慢性乙型肝炎23例

郑鹏远, 娄海山, 王永红, 唐芙爱, 白蓉, 司方明, 白经修, 琚新

1828 胶囊内镜检查对双气囊小肠镜进镜方式选择的指导作用

李晓波, 戈之铮, 戴军, 高云杰, 刘文忠, 胡运彪, 萧树东

1833 乙型肝炎病毒家族聚集性感染者的基因型和基因变异特征分析

刘成永, 高玉金, 侯远沛, 杨友国, 钱秀梅, 孙庆, 宋丽

1836 丙型肝炎肝硬化CD56⁺T细胞和NK细胞数量及抗肿瘤活性

范荣山, 于德军, 孙德荣

1839 胆总管十二指肠吻合术治疗胆总管结石远期疗效326例

杨维良, 闫朝岐, 王夫景, 马玉林, 杨金友

1843 自体DC体外增强结肠腺癌患者TDLN细胞的抗肿瘤活性

彭正, 陈凇, 李荣, 李力, 董艳芬, 张磊

| | |
|------|---|
| 附 录 | 1847 世界华人消化杂志投稿须知 |
| 致 谢 | 1852 致谢世界华人消化杂志编委 |
| 消 息 | 1770 第十一届全国普通外科学术会议征文通知 1774 第十一届全国胰腺外科学术研讨会征文 1784 2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告 1789 第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会第二轮通知 1794 专家门诊 1798 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 1804 第八届中西医结合实验医学研讨会 1809 更正与说明专栏 1827 2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知 1832 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会 1842 技法与经验 |
| 封面故事 | Emmanuelle Leteurre, Farid Zerimech, Guillaume Piessen, Agnès Wacrenier, Xavier Leroy, Marie-Christine Copin, Christophe Mariette, Jean-Pierre Aubert, Nicole Porchet, Marie-Pierre Buisine. Relationships between mucinous gastric carcinoma, MUC2 expression and survival. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(21): 3324-3331 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/3324.asp |
| 国际会议 | 7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference 71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006 XXX pan-american congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx |

| | | | |
|--|----------------------------|---|---|
|  <p>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</p> <p>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</p> <p>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2006-06-28 原刊名 新消化病学杂志</p> <p>名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁 电子编辑 张敏 李琪 本期审读 王瑾晖</p> | | <p>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 出版 世界胃肠病学杂志社 100023, 北京市2345信箱 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</p> <p>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)</p> <p>订购 全国各地邮电局 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部 (100023, 北京市2345信箱) 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</p> | <p>《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。</p> <p>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。</p> <p>2006年版权归世界胃肠病学杂志社所有</p> |
| ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R | 邮发代号 82-262 国外代号 M 4481 | 国内定价 每期24.00元 全年864.00元 | 广告经营许可证 1401004000050 |

World Chinese Journal of Digestology

June 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 18

| | |
|--------------------------|--|
| EDITORIAL | 1755 Research progress on pathogenesis, diagnosis and treatment of liver cancer <i>Cao ZC</i> |
| BASIC RESEARCH | <p>1762 Influences of electroacupuncture at Sibai point on gastric myoelectricity in rats with nerve blockage <i>Chang XR, Yan J, Zhao YL, Li JS, Liu JH, He JF</i></p> <p>1766 Expression of vascular endothelial growth factor in chronic alcoholic liver fibrosis in rats <i>Li WP, Ren HY, Zhang BY, Yu CH, Li YM</i></p> <p>1771 Effect of <i>Anweitang</i> on gastric ulcer and its mechanism in experimental rats <i>Lin SN, Wei W, Huang GH</i></p> <p>1775 Purification of heat shock protein 70 peptide complex and its effect on proliferation of HepG-2 cells <i>Sui CY, Li HY, Hu Y, Zong ZH, Li HX, Guo RX</i></p> |
| CLINICAL RESEARCH | <p>1780 Prokaryotic expression of anti-carcinoembryonic single-chain variable fragment and its value in detection of gastric carcinoma cells <i>Xu HY, Xu L, Gao JH, Yang JJ, Li KZ, Dou KF</i></p> <p>1785 Value of spiral computed tomography in preoperative TNM staging for gastric cancer <i>Zhao ZQ, Zheng KG, Xu DS</i></p> <p>1790 Relationship between serotonin transporter gene polymorphism and irritable bowel syndrome <i>Zhang XM, Lin ZH</i></p> <p>1795 Distribution of CD8 T cells and expression of Fas/FasL and Bcl-2/Bax in ulcerative colitis <i>Zhang H, Xia B, Yang GF, Li J</i></p> |
| REVIEW | <p>1799 Role of reactive oxygen species in ischemia and reperfusion during liver transplantation <i>Liu XZ, Li XC</i></p> <p>1805 Advance in human hepatocellular carcinoma associated gene <i>LAPTM4B</i> <i>Sun L, Zhang QY</i></p> <p>1810 Correlations of vascular endothelial growth factor and microvessel density expression with computed tomography with perfusion imaging <i>Liu Y, Li YY, Zhang ZR, Wang SH</i></p> <p>1813 Risk factors of acute pancreatitis and its preventive treatment after endoscopic retrograde cholangiopancreatography <i>Han B, Wang BR</i></p> |
| CLINICAL PRACTICE | <p>1819 Assessment of life quality of esophageal cancer patients received chemotherapy <i>Qian Y, Zhang CJ, Chen ZD</i></p> <p>1824 Potential effect of specific immunotherapy on chronic hepatitis B of vertical maternal-fetal transmission: an analysis of 23 cases <i>Zheng PY, Lou HS, Wang YH, Tang FA, Bai R, Si FM, Bai JX, Ju X</i></p> <p>1828 Directive role of capsule endoscopy in determining the route for double-balloon enteroscopy <i>Li XB, Ge ZZ, Dai J, Gao YJ, Liu WZ, Hu YB, Xiao SD</i></p> <p>1833 Analysis of hepatitis B virus genotypes and gene mutation in patients with family infection <i>Liu CY, Gao YJ, Hou YP, Yang YG, Qian XM, Sun Q, Song L</i></p> |

| | |
|-------------------------------|--|
| | <p>1836 Numbers and activities of CD56⁺ T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C <i>Fan RS, Yu DJ, Sun DR</i></p> <p>1839 Long-term effect of choledochoduodenostomy in treatment of common bile duct stone: an analysis of 326 cases <i>Yang WL, Yan CQ, Wang FJ, Ma YL, Yang JY</i></p> <p>1843 Autologous dendritic cells enhance anti-tumor activity of tumor-draining lymph node cells from colonic adenocarcinoma patients <i>in vitro</i> <i>Peng Z, Chen L, Li R, Li L, Dong YF, Zhang L</i></p> |
| APPENDIX | 1847 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology |
| ACKNOWLEDGMENT | 1852 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology |
| COVER | <p><i>Emmanuelle Leteurtre, Farid Zerimech, Guillaume Piessen, Agnès Wacrenier, Xavier Leroy, Marie-Christine Copin, Christophe Mariette, Jean-Pierre Aubert, Nicole Porchet, Marie-Pierre Buisine.</i></p> <p>Relationships between mucinous gastric carcinoma, MUC2 expression and survival. <i>World J Gastroenterol</i> 2006; 12(21): 3324-3331 http://www.wjgnet.com/1007-9327/12/3324.asp</p> |
| INTERNATIONAL MEETINGS | <p>7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference</p> <p>71st ACG Annual Scientific Meeting and Postgraduate Course October 20-25, 2006</p> <p>XXX pan-american congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de anfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx</p> |

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date June 28, 2006

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjgd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

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

Copyright © 2006 by The WJG Press

肝癌的病因与诊疗研究进展

曹志成

曹志成, 伊利沙伯医院临床肿瘤科 香港特别行政区
曹志成, 香港浸会大学中医药学院博士, 国际认证自然疗法博
士, 加拿大注册自然疗法医师, 伊利沙伯医院临床肿瘤科肿瘤研
究部科学主任. 主要从事临床恶性肿瘤的研究.

通讯作者: 曹志成, 香港九龙加士居道30号伊利沙伯医院R座13
楼1305室, 临床肿瘤科肿瘤研究部. williamcscho@gmail.com
电话: 852-94720348 传真: 852-27156139
收稿日期: 2006-03-28 接受日期: 2006-04-13

摘要

作为癌症第三号杀手, 肝癌的发生、发展是经历多阶段和多因素作用, 通过癌基因启动、促癌和演进等步骤. 目前已知不少基因与肝癌相关, 并开展了前沿性的分子治疗研究, 有些在动物和临床实验中已取得了初步成效. 另一方面, 传统中西医诊疗也随着科技发达而有长足进展, 近年更积极推行综合治疗手段. 在分子诊疗的年代, 本文除了对各诊疗方法及其综合应用方案有较详尽的阐述外, 还就最新的分子诊疗进行了探讨, 期望不久的将来, 人类能更有效地防治这威胁着生命的恶性肿瘤.

关键词: 肝癌; 致癌基因; 抑癌基因; 中西医结合治疗; 综合诊疗; 分子治疗

曹志成. 肝癌的病因与诊疗研究进展. 世界华人消化杂志
2006;14(18):1755-1761
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1755.asp>

0 引言

肝癌为世界第六大常见恶性肿瘤, 据世界卫生组织2002年数据显示, 全球每年新症约63万宗, 死亡人数约60万人, 为癌症第三号杀手. 我国年发病人数约35万, 每年约有32万人死于此病, 发病率和死亡率均占癌症中的第二位^[1].

1 病因及高危因素

肝癌的发生是一个多阶段、多因素累积作用, 经过启动、促癌和演进等步骤, 以及多个基因参与和突变的结果. 其病因尚未清楚, 相信与下列因素有关: (1)肝炎病毒. 大量实验和临床研究发现乙型肝炎病毒(HBV)与肝癌发病关系甚为密切. ①HBV与肝癌流行地理分布接近, HBV

高发区同样是肝癌高发区, 肝癌患者血清HBV表面抗原(HBsAg)阳性率逾90%; ②HBsAg携带者患肝癌的危险性比正常人群高100倍, 经济条件较好的国家已实行普及性HBV预防疫苗注射, 大大减低肝癌的发病率^[2-4]; ③肝癌细胞中存在着HBV DNA的整合, 可激活致癌基因并使抑癌基因发生突变, 其致癌机制主要有两种, 一为顺式启动作用, HBV DNA插入肝细胞原癌基因附近, 直接启动或增强原癌基因的表达, 另一种为反式启动作用, HBV DNA随机整合到肝细胞基因组上, 通过转录并翻译成蛋白质后, 再启动自身基因(启动因子为HBV X抗原)或肝细胞原癌基因^[5-6]; ④丙型肝炎病毒(HCV)是发达国家肝癌的主要病因之一, 其患者血清抗HCV阳性率多超过50%. (2)肝硬化. 主要是肝炎(病毒性、酒精性、药物性)演变发展的结果, 肝癌发生的危险率和预后随肝纤维化严重程度而增加^[7], 约2%-5%肝硬化患者发展为肝癌患者. (3)长期酒精中毒, 容易造成肝硬化而变成肝癌. (4)发霉食物中的黄曲霉毒素(AFT)可诱发肝癌, AFT B1诱发肝癌最小剂量仅需10 µg/d, AFT经肝脏代谢成AFT-2, 3-环氧化物后会攻击DNA, 修饰DNA上的碱基, 使DNA遗传讯息发生错误而失去正常调控功能, 动物实验发现AFT引起在p53第249位的G-T突变, 导致精氨酸密码变为丝氨酸密码而引发肝癌, 亦有动物实验显示AFT与HBV有协同作用, 他们的存在与转化DNA表达有关, HBV是始动因子, 而AFT是促进因子. (5)经进食受感染肝吸虫的生鱼虾后, 肝吸虫在肝胆管中可存活20-30 a, 严重者可引起肝脓肿或门脉性肝硬化, 甚至可发展成肝癌. (6)分子变异. 早于1994年, 人类肝癌中染色体13q14上发现RB1基因失活并检出与染色体13q杂合缺失相关的RB1蛋白质缺陷, 证实RB1为肝癌相关的抑癌基因^[8]; 有研究发现, 肝癌患者的基因缺失常出现在染色体4q21, 6q14和8p22上^[9]; 目前已知的致肝癌基因有ras, c-myc mRNA过量表达或基因重排和放大等, 超过50%肝癌中的N-ras呈过

■背景资料

肝癌为世界第六大常见恶性肿瘤, 大部分患者在初诊时病情已进入中、晚期, 治愈率低, 欲攻克这恶性肿瘤, 需利用高科技平台, 如基因组学和蛋白质组学, 开发早期诊断分子标志, 结合中西医诊疗和分子治疗, 以期取得更佳疗效.

■研究前沿

本文对目前肝癌的中西医综合诊疗做了详尽的介绍,还剖析肝癌的成因,并对前沿性的分子治疗作了具体的阐述。

高表达, *ras* 有两个活化突变点, 一是第12号密码的第2个核苷酸由原癌基因的GGT变成CGT, 另一为改变第61号密码的编码蛋白质PP21的结构, 使之无法结合GTP或GDP来调节细胞的生长与分化, 此外, 肝癌内部转移与*c-met*的过量表达有关, 多个抑癌基因(如*M6P/IGFIIr*)同时杂合缺失与肝癌分化有显著相关性^[10], 而*p53*的杂合缺失率最高, 并且与肝癌分化程度密切相关^[11], 可见多个抑癌基因的异常积累导致低分化肝癌克隆形成, 并促进肝癌发生; 研究人员亦发现, 两个在肝癌中丢失的抑癌基因*DLC-1*^[12]和*DLC-2*^[13-14], 他们在细胞中起监察作用; 另有研究发现, 在肝癌细胞中染色体17p13.3有高频率杂合性缺失, 继而成功地克隆名为*HCCS1*的新基因, 动物实验证明该基因有抑制癌细胞生长功能^[15]; 亦有研究应用差异显示聚合酶链反应法获得一组肝癌高表达基因(*HCCA1*, *HCCA2*和*MXR7*等)^[16]; 此外, 采用逆转录酶聚合链反应法, 发现了一个新的蛋白质HCC-2, 能有效地区分低分化和高分化的肝癌组织^[17]; 研究人员运用肝癌系统扫描得到33个染色体缺失区, 并成功利用缺失区的交互作用定义出两种致癌途径, 一为伴随*p53*突变及其他晚期肝癌特征的高度癌化不稳定DNA, 二为伴随*β-catenin*突变及与其他晚期肝癌症状呈相反特征的低度癌化较稳定DNA^[18]; 亦有报告显示肝癌的发展和*CHFR*基因甲基化导致表达沉默有关^[19]。另一方面, 处于蛋白质组学年代, 近年研究显示一些蛋白质与肝癌也有密切关系, 如14-3-3 γ ^[20]、增殖细胞抗原和stathmin 1^[21]在肝癌中呈高表达, 亦有研究利用蛋白质组学发现前载脂蛋白、 α 2-HS糖蛋白、载脂蛋白A-IV前体蛋白和PRO1708/PRO2044在肝癌治疗后呈上升趋势^[22], 而肝癌的生长也发现和PPAR γ 的调控有关^[23], 血清CK-19的上升则与肝癌的转移和预后不良呈正相关^[24]; 此外, p28GANK在肝癌中mRNA检出率为96.9%^[25], 其通过与Rb, CDK4, S6b ATPase的结合参与了信号转导通路, 在肝细胞增殖和凋亡中起着重要作用^[26]; 另一方面, 肝癌组织中有*ets-2*^[27], *c-fms*^[28]及IGF- II mRNA^[29]的过量表达, 可见肝癌发病与一些生长因子的表达有关; 近年亦有研究显示, 肝癌患者的树突状细胞呈异常表达^[30]; 蛋白质组学研究显示岩藻糖基化与肝癌的发展也密切相关^[31]。

2 临床诊断

2.1 临床症状 肝脏只有表面包膜才有神经, 除非癌组织侵犯到包膜, 否则再大的肿瘤也不会痛, 而肝脏只要剩下1/5大小仍可维持正常功能, 故到肝脏被破坏了80%时, 才会产生肝功能失调症状, 因此肝癌除非到了中、晚期, 否则不会痛、也没有症状, 此期间的肝癌称为亚临床期, 只可通过甲胎蛋白(AFP)健康普查才可被发现。当肿瘤逐渐增大时, 肝癌进入临床期, 患者可能出现下列症状: (1)右上腹有间歇性或持续性钝痛或刺痛; (2)右叶下段的肝癌常可于右肋上直接扣及肿块, 左叶肝癌有剑突下肿块或左肋下肿块表现; (3)因肝脏扩大, 肿瘤侵犯膈肌, 刺激横膈膜神经致右肩疼痛; (4)因胆管闭塞, 胆汁在血液积聚引致黄疸; (5)有腹腔积水现象; (6)食欲不振、恶心、体质量下降、疲倦、身体虚弱及发热; (7)旁癌综合征, 如红细胞增多、低血糖等。

2.2 实验室检查 由于大部分患者在初诊时病情已进入中、晚期, 通常不能接受任何治疗, 所以及早诊断尤为重要^[32]。(1)甲胎蛋白检查。AFP是怀孕期肝脏合成的一种胚胎血清蛋白, 健康成人及儿童血液内只有20 μ g/L以下, 如AFP持续4 wk ≥ 400 μ g/L, 便有可能患上肝癌, 但仅凭AFP含量很难早期诊断, 通过对外周血AFP mRNA含量的检测, 则可以早期诊断, 又可判断治疗效果, 是目前诊断肝癌预后的重要分子生物学标志, 可惜其灵敏度不高(54%)^[33]。(2)铁蛋白。近年发现肝癌含有一种酸性的癌胚异铁蛋白, 可能有助于早期诊断; (3)其他肿瘤相关抗原。部分患者CEA、CA19-9呈阳性表现^[34], γ -谷氨酰转移酶mRNA、血管内皮生长因子(VEGF)和白介素-8等也可用作预后生物标志物^[35]。(4)超声波检查。HBV携带者更应定期接受AFP测试及超声波检查; (5)计算机断层扫描; (6)肝动脉造影; (7)活组织检查; (8)HBV拷贝数数量度。采用高特异性的实时聚合酶链反应技术计算血清中HBV拷贝数, 可监测病毒量, 为肝癌预后之重要检验标志^[36]。

2.3 中医辨证分型 中医学早于二千多年前对肝癌已有认识, 本病属于中医肝积、肥气、症积、膨胀、癥黄等范畴。《难经·五十六难》: “肝之积, 名曰肥气。在胁下, 如覆杯, 有头足, 久不愈。”从中医的观点, 肝癌的辨证分型可归纳为: (1)肝郁气滞、瘀积成块。胁下胀痛或刺痛, 右侧为剧, 上腹肿块, 扪之质硬, 表面不平, 疲乏无力, 纳食低下, 暖气呕逆, 失眠心烦, 舌质正常或偏腻, 时有瘀点或瘀斑, 苔薄白或薄黄, 脉弦细或涩;

(2)湿遏热郁、瘀结毒聚. 胁下肿块, 质硬坚实, 痛如锥刺, 脘腹胀满, 或腹大如鼓, 目肤黄疸, 日渐加深, 烦热口干, 小便赤黄, 大便干结, 舌红有瘀斑, 苔黄腻, 脉弦滑数或涩; (3)热积毒聚、灼阴损络. 腹大胀满, 肿块膨隆, 形体羸瘦, 头晕耳鸣, 潮热盗汗, 或高热烦渴, 或牙痛鼻衄, 大便干结, 小便短赤, 舌红少津, 苔薄黄或光剥, 脉弦细数; (4)肾阴亏虚、水不涵木. 五心烦热, 低热盗汗, 胁肋隐痛, 头晕目眩, 腰酸腿软, 纳少消瘦, 倦怠无力, 舌红少苔, 或光剥有裂纹, 脉细弦数或细涩无力; (5)脾虚失运、水湿停留. 神疲乏力, 纳呆消瘦, 胁痛腹胀, 面浮肢肿, 腹泻时作, 或伴腹水, 舌淡胖有齿痕, 脉弦滑或濡细^[37].

3 治疗

大部分肝癌患者在诊断时已进入中、晚期, 而且肝脏的血液供应丰富, 容易在器官内外作血源性转移, 导致治疗上的困难, 其治疗方式应为多样化组合, 须视乎患者情况而选择不同的治疗方式或综合治疗.

3.1 西医治疗 (1)外科根治手术. 是医治肝癌的首选方法, 一般人留下1/5肝脏就可以维持生命, 手术后1 a生存率达70 %, 但只有约20%患者能接受手术治疗; (2)药物治疗. 化学药物对肝癌的治疗效果有限, 患者的Mcl-1高表达可影响化疗效果^[38], 故化疗多用于姑息性治疗, iv doxorubicin为一代表药物, 近年更引进联合化疗, 如doxorubicin, cisplatin和capecitabine联合使用^[39], gemcitabine和cisplatin联合化疗晚期肝癌患者更进入临床试验第二期^[40], 但药物治疗虽具缓解效果, 却无法根治, 其主要方法有三, 一为肝动脉栓塞疗法, 先把化疗药物由动脉导管选择性地注入肝癌的营养血管, 再利用栓塞剂将支配肝癌之动脉栓塞, 以阻止癌肿继续生长或缩小其体积; 二为乙醇注射疗法, 是目前局部治疗肝癌最有效方法之一, 经皮肤把纯乙醇直接注入肿瘤以吸干细胞的水分, 使肿瘤枯死, 适用于直径小于3 cm或手术后复发的早期肿瘤; 三为免疫疗法, 干扰素、肿瘤坏死因子、白介素-2和淋巴因子激活杀伤细胞治疗肝癌有一定疗效^[41], 更有尝试注射抗CD40抗体以增强免疫治疗的效果^[42], 近年亦有研究用辐射免疫抗VEGF的单株纯种抗体, 利用磁性纳米颗粒作为载体, 在裸鼠模型上取得了满意疗效^[43], 另有用乙型肝炎^[44-45]和丙型肝炎^[46]疫苗来防治肝癌; (3)放射治疗. 过去由于定位困难, 且放疗对肝肿瘤疗效不佳, 更

对临近正常肝组织造成严重伤害, 所以一般不建议此法, 但随着计算机三维空间定位技术的进步^[47-48], 能有效地将放疗剂量集中在肝癌组织而避免伤害附近的正常组织, 故局部肿瘤放疗仍有临床治疗价值, 而碳离子束放疗更藉着其生物和物理学优势, 对肝癌治疗具一定成效^[49]; (4)其他姑息性外科治疗. 适用于较大或分布在大血管区的癌肿, 包括冷冻治疗、激光治疗、微波治疗^[50]等; (5)肝脏移植. 适用于<5 cm的肿瘤, 全部肿瘤要局限在肝脏内, 且并未侵入血管^[51].

3.2 中医治疗 中医治疗辨证论治, 以补虚泻实, 调整阴阳为原则, 肝癌的主要治则治法有: (1)气滞血瘀者, 治宜疏肝理气, 活血化瘀, 可用小柴胡汤合大黄蛰虫丸加减; (2)湿热瘀结者, 治宜清热利湿, 解毒破结, 可用茵陈蒿汤合膈下逐瘀汤加减; (3)热毒伤阴者, 治宜养阴清热, 解毒化瘀, 可用犀角地黄汤加减; (4)脾虚湿困者, 治宜益气健脾, 化湿消积, 可用参苓白术散加减, 实验证明, 健脾祛湿中药能有效治疗肝癌腹水症状^[52]; (5)肝肾阴虚者, 治宜柔肝滋肾, 育阴潜阳, 可用一贯煎合杞菊地黄丸加减; (6)和法调理. 肝癌患者脏腑虚衰, 气血失和, 阴阳失调, 虚实并见, 寒热错杂, 经祛瘀、解毒、消导无效者, 可采用和解少阳(代表方为小柴胡汤)、调和肠胃(代表方为半夏泻心汤)、调和肝脾(代表方为四逆散)等法, 或多法灵活并用; (7)针灸疗法. 施于肝癌疼痛者, 主穴足三里, 配穴阳陵泉、期门、章门、三阴交.

3.3 中西医结合治疗 手术、化疗、放疗是目前治疗肝癌的主要方法, 配合中医治疗, 可减轻毒副作用, 加强抗癌作用, 增强免疫功能, 防止复发转移, 提高生存质量和生存率, 因此积极运用综合治疗是提高疗效的重要途径^[53-54]. (1)中医与手术结合. 术前中医扶正治疗, 旨在控制肝癌发展, 提高手术切除率和减少并发症, 多用补气养血、健脾补肾方, 如当归地黄汤、四君子汤、八珍汤、十全大补汤等, 术后促进机体及肝功能的恢复可用小柴胡汤, 益气固表可用玉屏风散, 养阴生津可用增液汤, 调理脾胃可用香砂六君子汤; (2)中医与化疗结合. 化疗损气伤血, 中医防治毒副作用以补气养血、健脾和胃、滋补肝肾为主, 全身反应或骨髓抑制者, 可用八珍汤或升血调元汤, 消化道反应可用香砂六君子汤, 中毒性肝炎可用茵陈蒿汤, 肾功能损伤可用六味地黄汤, 炎症反应可加用清热解毒药(如银花、连翘、板蓝根、蒲公英、黄连等).

■创新盘点

一般综述在介绍肝癌的病因和诊治时, 很少从分子层面加以剖析, 本文对肝癌患者的中西医综合诊疗及分子治疗做了较多的论述.

■应用要点

本文对肝癌的成因与诊疗做了较全面的总结和资料汇编, 对临床研究有一定参考价值.

■名词解释

综合治疗：根据患者的机体状况和病情，合理地应用现有的诊疗手段，包括传统中医诊疗和前沿性分子治疗，以期提高治愈率，改善患者生存质量。

另一方面，一些扶正中药具化疗增敏作用，动物与临床实验证实猪苓多糖能增强化疗效果，中药配合铂类化疗药物治疗肝癌能增强疗效^[55]；(3)中医与放疗结合。放射线为热毒之邪、耗气伤阴，治以养阴益气、清热解毒、凉补气血为主，骨髓抑制可用八珍汤或升血调元汤，放射性脑反应可用五苓散合六味地黄丸，放射性肝炎可用茵陈蒿汤，放射性胃肠道反应可用香砂六君子汤，另一方面，中药配合放疗有一定协同增效作用，动物与临床实验证明汉防己甲素为有效的放射增敏剂，川芎红花注射液及扶正增效方(含黄芪、枸杞、女贞子、太子参、红花、苏木等)通过改善癌细胞的缺氧状态起增敏作用。此外，坚持长期服用扶正中药是提高远期疗效和减少肿瘤复发的关键，西医治疗后以益气养阴扶正辅以清热解毒散结等祛邪疗法，可提高治愈效果；(4)临床试验证明，人参黄芪中药结合微波治疗能消灭肝癌细胞，增强机体免疫力，预防转移，为中晚期不能手术治疗病例的有效疗法，有助改善生存质量，延长患者生存期^[56]。

3.4 饮食调理 《素问·骨空论》：“调其阴阳，不足则补，有余则泻。”肝癌的病因为邪毒郁积、湿热伤脾、肝肾阴虚，中医食疗以健脾祛湿、滋养肝肾为主。(1)鸡汁苡米粥。用于晚期气短乏力、不思饮食者，具补中益气、健脾利水功效；(2)鲜藕旱莲汁。用于烦热口苦、便血量少者，具凉血止血、补肾益阴功效；(3)田七生地水蛇汤。用于疼痛不适、或有黄疸发斑者，具滋阴养血、祛瘀消征功效；(4)荷菊蒸田鸡。用于黄疸腹水、腹胀纳呆者，具清热解毒、健脾养胃功效；(5)泥鳅黑豆瘦肉汤。用于口干纳呆或伴黄疸腹水者，具补中健脾、滋阴祛湿功效；(6)于术田螺兔肉饮。用于晚期口干纳呆并腹水、黄疸者，具健脾利水、清热解毒功效；(7)半枝莲水鱼汤。用于晚期上腹肿痛、形体虚弱者，具散瘀清热、滋阴补虚功效；(8)土茯苓龟汁。用于晚期腹水肢肿、形体虚弱者，具解毒祛湿、滋阴补血功效；(9)淮山田七茨实乌龟汤。用于晚期体虚疼痛不适者，具滋补脾肾、祛瘀消瘤功效；(10)参麦牛奶饮。用于晚期烦热口干、形体虚衰者，具清肝健脾、补气养阴功效。

3.5 分子治疗 肝癌常在瘤体不大时就发生血管内侵犯，门静脉瘤栓形成，肝内播散及出现新癌病灶等，严重影响疗效及预后，分子治疗有助防止复发与转移，在综合治疗中发挥着独特的作用。(1)抑癌基因治疗。利用重组腺病毒载体，将

抑癌基因导入肝癌细胞株中，可抑制肿瘤生长和诱导癌细胞凋亡，在研究中的抑癌基因有*p53*、*DCC*、*NF1*、*NF2*、*RB*、*p16*、*WT1*、*APC*和*VHL*等^[57]。(2)联合分子治疗。研究表明，多基因的联合应用优于单基因的抗癌效果，包括抑癌基因和自杀基因联合应用，或自杀基因和免疫基因联合应用，选择两种密切相关的基因作为靶基因，联合两种有协同作用的凋亡基因或蛋白质，比单用一种凋亡基因或蛋白质有更强的杀伤和抑制肝癌细胞生长作用，如已知VP22蛋白质在细胞间转运中起重要作用，把P53和VP22融合蛋白质的逆转录病毒表达载体注射入肝癌荷瘤小鼠，发现P53-VP22蛋白质的转录活性远比单独P53高，具有更强的抗癌活性^[58]。(3)反义疗法。有报告显示，siRNA-1和siRNA-7能有效抑制HBV的基因表达^[59]，亦有研究发现VEGF RNA在裸鼠上能有效抑制肿瘤血管生成，若RNA未能与所有靶基因mRNA结合，可应用RNAi技术^[60-61]。(4)调控治疗。利用药物对癌细胞内功能核酸3'或5'调控区进行表达调控治疗，可把癌细胞恶性度减弱^[62]。(5)细胞因子基因治疗。用逆转录病毒包装株将细胞因子基因注射入肝癌细胞系，以增强癌细胞对外周血单核细胞的敏感性，诱导机体抗癌免疫效应，导致体内肝癌自发消退，主要研究的细胞因子有白介素-2，白介素-12，IFN- γ ，TNF- α 和NKG5-SV等^[63-64]。(6)共刺激分子治疗。把共刺激分子DNA插入肝癌细胞中使其表达，刺激机体产生免疫反应。近年受到重视的共刺激信号有CD28，4-1BB和B7-1的单独或协同表达，动物实验证明共刺激分子治疗可降低接种成瘤率，诱导机体产生针对亲本野生型肿瘤的长期免疫^[65]。此外，肝癌细胞表面缺乏肿瘤特异性抗原及组织相容性复合物类抗原，将小鼠*MHC-I*和*mIL-12*基因导入人肝癌细胞以提高MHC抗原表达，可促进机体对抗原的识别和应答，荷瘤裸鼠体内T细胞对转*MHC*肝癌细胞的杀伤明显增强^[66]。(7)抑制血管生成。研究证实，抑制肿瘤新生血管生成能够大大减缓肿瘤的发展，可采用血管生成抑制剂来改变肿瘤血管生成，进而抑制体内肿瘤生长^[67]。(8)免疫治疗。临床试验证明，联合化疗结合bevacizumab能有效治疗晚期肝癌患者^[68]。

肝癌是极严重的疾病，近年治疗效果虽然不断改善，但非手术疗法尚难望达到根治效果，治愈者仍只占少数。尽管分子靶向治

疗研究取得了很多有意义的结果^[69],但仍存在着许多问题尚待解决,如缺乏高效载体系统、缺乏特异性导向性载体、肝癌动物模型与人体肿瘤存在差异等。随着分子生物学、免疫学、纳米技术和肿瘤学研究的不断深入^[70-71],基因组学和蛋白质组学等高通量技术平台的迅猛进展^[72],外源基因转导和表达技术的提高,细胞靶向性与位点靶向性载体的构建^[73-74],生物信息数据库的日趋完备,期望肝癌的分子治疗能结合现有的治疗手段,成为一种具有广泛临床应用前景的综合性疗法。

4 参考文献

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- 2 Chang MH, Chen TH, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Ni YH, Chen CJ, Chen DS. Prevention of hepatocellular carcinoma by universal vaccination against hepatitis B virus: the effect and problems. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 7953-7957
- 3 Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 1: S1-S3
- 4 Roper AM, Danovaro-Holliday MC, Andrus JK. Progress in vaccination against hepatitis B in the Americas. *J Clin Virol* 2005; 34 Suppl 2: S14-S19
- 5 Wei W, Huang W, Pan Y, Zhu F, Wu J. Functional switch of viral protein HBx on cell apoptosis, transformation, and tumorigenesis in association with oncoprotein Ras. *Cancer Lett* 2006
- 6 Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med* 2006; 147: 58-66
- 7 Vince A. Hepatitis B and C: natural course of disease. *Acta Med Croatica* 2005; 59: 389-392
- 8 Zhang X, Xu HJ, Murakami Y, Sachse R, Yashima K, Hirohashi S, Hu SX, Benedict WF, Sekiya T. Deletions of chromosome 13q, mutations in Retinoblastoma 1, and retinoblastoma protein state in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 4177-4182
- 9 Huang SF, Hsu HC, Fletcher JA. Investigation of chromosomal aberrations in hepatocellular carcinoma by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1999; 111: 21-27
- 10 De Souza AT, Hankins GR, Washington MK, Fine RL, Orton TC, Jirtle RL. Frequent loss of heterozygosity on 6q at the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor locus in human hepatocellular tumors. *Oncogene* 1995; 10: 1725-1729
- 11 Zhu GN, Zuo L, Zhou Q, Zhang SM, Zhu HQ, Gui SY, Wang Y. Loss of heterozygosity on chromosome 10q22-10q23 and 22q11.2-22q12.1 and *p53* gene in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1975-1978
- 12 Ng IO, Liang ZD, Cao L, Lee TK. DLC-1 is deleted in primary hepatocellular carcinoma and exerts inhibitory effects on the proliferation of hepatoma cell lines with deleted *DLC-1*. *Cancer Res* 2000; 60: 6581-6584
- 13 Ching YP, Wong CM, Chan SF, Leung TH, Ng DC, Jin DY, Ng IO. Deleted in liver cancer (*DLC*) 2 encodes a RhoGAP protein with growth suppressor function and is underexpressed in hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2003; 278: 10824-10830
- 14 Ng DC, Chan SF, Kok KH, Yam JW, Ching YP, Ng IO, Jin DY. Mitochondrial targeting of growth suppressor protein *DLC2* through the *START* domain. *FEBS Lett* 2006; 580: 191-198
- 15 Zhao X, Li J, He Y, Lan F, Fu L, Guo J, Zhao R, Ye Y, He M, Chong W, Chen J, Zhang L, Yang N, Xu B, Wu M, Wan D, Gu J. A novel growth suppressor gene on chromosome 17p13.3 with a high frequency of mutation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 7383-7387
- 16 Zeng JZ, Wang HY, Chen ZJ, Ullrich A, Wu MC. Molecular cloning and characterization of a novel gene which is highly expressed in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2002; 21: 4932-4943
- 17 Nissom PM, Lo SL, Lo JC, Ong PF, Lim JW, Ou K, Liang RC, Seow TK, Chung MC. Hcc-2, a novel mammalian ER thioredoxin that is differentially expressed in hepatocellular carcinoma. *FEBS Lett* 2006; 580: 2216-2226
- 18 Jou YS, Lee CS, Chang YH, Hsiao CF, Chen CF, Chao CC, Wu LS, Yeh SH, Chen DS, Chen PJ. Clustering of minimal deleted regions reveals distinct genetic pathways of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64: 3030-3036
- 19 Sakai M, Hihi K, Kanazumi N, Nomoto S, Inoue S, Takeda S, Nakao A. Aberrant methylation of the *CHFR* gene in advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 52: 1854-1857
- 20 Lee IN, Chen CH, Sheu JC, Lee HS, Huang GT, Yu CY, Lu FJ, Chow LP. Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *J Proteome Res* 2005; 4: 2062-2069
- 21 Li C, Tan YX, Zhou H, Ding SJ, Li SJ, Ma DJ, Man XB, Hong Y, Zhang L, Li L, Xia QC, Wu JR, Wang HY, Zeng R. Proteomic analysis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma: Identification of potential tumor markers. *Proteomics* 2005; 5: 1125-1139
- 22 Kawakami T, Hoshida Y, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ikenoue T, Obi S, Sato S, Teratani T, Shiina S, Kawabe T, Suzuki T, Hatano N, Taniguchi H, Omata M. Proteomic analysis of sera from hepatocellular carcinoma patients after radiofrequency ablation treatment. *Proteomics* 2005; 5: 4287-4295
- 23 Yu J, Qiao L, Zimmermann L, Ebert MP, Zhang H, Lin W, Rocken C, Malfertheiner P, Farrell GC. Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* 2006; 43: 134-143
- 24 Li Y, Tang ZY, Tian B, Qin LX, Ye SL, Sun RX. Study on the relationship between serum cytokeratin 19 level in hepatocellular carcinoma patients and the clinico-pathologic characteristics. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004; 12: 341-342
- 25 Fu XY, Wang HY, Tan L, Liu SQ, Cao HF, Wu MC. Overexpression of p28/gankyrin in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 638-643
- 26 Krzywda S, Brzozowski AM, Higashitsuji H, Fujita J, Welchman R, Dawson S, Mayer RJ, Wilkinson AJ. The crystal structure of gankyrin, an oncoprotein

■同行评价

本文对肝癌的病因、诊断及综合治疗进行了较全面的阐述,尤其是谈及到中西医结合的治疗,有意义。文章的编排、视角、论述的方式和语言等,均有香港的特色。

- found in complexes with cyclin-dependent kinase 4, a 19 S proteasomal ATPase regulator, and the tumor suppressors *Rb* and *p53*. *J Biol Chem* 2004; 279: 1541-1545
- 27 Ito Y, Miyoshi E, Takeda T, Nagano H, Sakon M, Noda K, Tsujimoto M, Monden M, Matsuura N. Linkage of elevated *ets-2* expression to hepatocarcinogenesis. *Anticancer Res* 2002; 22: 2385-2389
- 28 Yang DH, Huang W, Cui J, Shu JC, Tang SH, Zhang WJ, Liang JH. The relationship between point mutation and abnormal expression of *c-fms* oncogene in hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 86-89
- 29 Dong ZZ, Yao DF, Yao DB, Wu XH, Wu W, Qiu LW, Jiang DR, Zhu JH, Meng XY. Expression and alteration of insulin-like growth factor II-messenger RNA in hepatoma tissues and peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4655-4660
- 30 Tang TJ, Vukosavljevic D, Janssen HL, Binda RS, Mancham S, Tilanus HW, Ijzermans JN, Drexhage H, Kwekkeboom J. Aberrant composition of the dendritic cell population in hepatic lymph nodes of patients with hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 2006; 37: 332-338
- 31 Comunale MA, Lowman M, Long RE, Krakover J, Philip R, Seeholzer S, Evans AA, Hann HW, Block TM, Mehta AS. Proteomic analysis of serum associated fucosylated glycoproteins in the development of primary hepatocellular carcinoma. *J Proteome Res* 2006; 5: 308-315
- 32 Colli A, Fraquelli M, Casazza G, Massironi S, Colucci A, Conte D, Duca P. Accuracy of ultrasonography, spiral CT, magnetic resonance, and alpha-fetoprotein in diagnosing hepatocellular carcinoma: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 513-523
- 33 Farinati F, Marino D, De Giorgio M, Baldan A, Cantarini M, Cursaro C, Rapaccini G, Del Poggio P, Di Nolfo MA, Benvegna L, Zoli M, Borzio F, Bernardi M, Trevisani F. Diagnostic and prognostic role of alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma: both or neither? *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 524-532
- 34 Sasaki A, Kawano K, Inomata M, Shibata K, Matsumoto T, Kitano S. Value of serum carbohydrate antigen 19-9 for predicting extrahepatic metastasis in patients with liver metastasis from colorectal carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2005; 52: 1814-1819
- 35 Zhou L, Liu J, Luo F. Serum tumor markers for detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1175-1181
- 36 Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65-73
- 37 Yu EX. Restoring the harmony and order of the body: treatment of cancer patients according to syndrome differentiation. *ZhongXiYi JieHe XueBao* 2003; 1: 165-167
- 38 Fleischer B, Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, Weber A, Biesterfeld S, Muller M, Krammer PH, Galle PR. Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2006; 28: 25-32
- 39 Park SH, Lee Y, Han SH, Kwon SY, Kwon OS, Kim SS, Kim JH, Park YH, Lee JN, Bang SM, Cho EK, Shin DB, Lee JH. Systemic chemotherapy with doxorubicin, cisplatin and capecitabine for metastatic hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer* 2006; 6: 3
- 40 Parikh PM, Fuloria J, Babu G, Doval DC, Awasthy BS, Pai VR, Prabhakaran PS, Benson AB. A phase II study of gemcitabine and cisplatin in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Trop Gastroenterol* 2005; 26: 115-118
- 41 Lejeune FJ, Lienard D, Matter M, Ruegg C. Efficiency of recombinant human TNF in human cancer therapy. *Cancer Immun* 2006; 6: 6
- 42 Ryschich E, Marten A, Schmidt E, Linnebacher M, Wentzensen N, Eisold S, Klar E, Buchler MW, Schmidt J. Activating anti-CD40 antibodies induce tumour invasion by cytotoxic T-lymphocytes and inhibition of tumour growth in experimental liver cancer. *Eur J Cancer* 2006; 42: 981-987
- 43 Chen J, Wu H, Han D, Xie C. Using anti-VEGF McAb and magnetic nanoparticles as double-targeting vector for the radioimmunotherapy of liver cancer. *Cancer Lett* 2006; 231: 169-175
- 44 Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Hepatitis B vaccination coverage among adults-United States, 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55: 509-511
- 45 Degos F. Vaccination against hepatitis B virus. *Presse Med* 2006; 35: 347-352
- 46 Shiina M, Rehmann B. Hepatitis C vaccines: Inducing and challenging memory T cells. *Hepatology* 2006; 43: 1395-1398
- 47 Fritz P, Kraus HJ, Dolken W, Muhlneckel W, Muller-Nolte F, Hering W. Technical note: gold marker implants and high-frequency jet ventilation for stereotactic, single-dose irradiation of liver tumors. *Technol Cancer Res Treat* 2006; 5: 9-14
- 48 Hsu WC, Chan SC, Ting LL, Chung NN, Wang PM, Ying KS, Shin JS, Chao CJ, Lin GD. Results of three-dimensional conformal radiotherapy and thalidomide for advanced hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2006; 36: 93-99
- 49 Ishikawa H, Tsuji H, Tsujii H. Clinical experience of carbon ion radiotherapy for malignant tumors. *Gan To Kagaku Ryoho* 2006; 33: 444-449
- 50 Lu MD, Xu HX, Xie XY, Yin XY, Chen JW, Kuang M, Xu ZF, Liu GJ, Zheng YL. Percutaneous microwave and radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: a retrospective comparative study. *J Gastroenterol* 2005; 40: 1054-1060
- 51 Belghiti J. Transplantation for liver tumors. *Semin Oncol* 2005; 32: 29-32
- 52 Wu D, Bao WG, Ding YH. Clinical and experimental study of xiaoshui decoction in the treatment of primary liver cancer caused ascites. *Zhongguo zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2005; 25: 1066-1069
- 53 Deng G, Cassileth BR. Integrative oncology: complementary therapies for pain, anxiety, and mood disturbance. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 109-116
- 54 Hui KK, Hui EK, Johnston MF. The potential of a person-centered approach in caring for patients with cancer: a perspective from the UCLA center for East-West medicine. *Integr Cancer Ther* 2006; 5: 56-62
- 55 To KK, Ho YP, Au-Yeung SC. *In vitro* and *in vivo* suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by novel traditional Chinese medicine-

- platinum anti-cancer agents. *Anticancer Drugs* 2005; 16: 825-835
- 56 Lin JJ, Jin CN, Zheng ML, Ouyang XN, Zeng JX, Dai XH. Clinical study on treatment of primary hepatocellular carcinoma by Shenqi mixture combined with microwave coagulation. *Chin J Integr Med* 2005; 11: 104-110
- 57 Guan YS, Liu Y, Sun L, Li X, He Q. Successful management of postoperative recurrence of hepatocellular carcinoma with p53 gene therapy combining transcatheter arterial chemoembolization. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3803-3805
- 58 Zender L, Kuhnelt F, Kock R, Manns M, Kubicka S. VP22-mediated intercellular transport of p53 in hepatoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 489-496
- 59 Guo Y, Guo H, Zhang L, Xie H, Zhao X, Wang F, Li Z, Wang Y, Ma S, Tao J, Wang W, Zhou Y, Yang W, Cheng J. Genomic analysis of anti-hepatitis B virus (HBV) activity by small interfering RNA and lamivudine in stable HBV-producing cells. *J Virol* 2005; 79: 14392-14403
- 60 Hao JH, Yu M, Li HK, Shi YR, Li Q, Hao XS. Inhibitory effect of antisense vascular endothelial growth factor RNA on the profile of hepatocellular carcinoma cell line *in vitro* and *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1140-1143
- 61 Zhang PH, Zou L, Tu ZG. RNAi-hTERT inhibition hepatocellular carcinoma cell proliferation via decreasing telomerase activity. *J Surg Res* 2006; 131: 143-149
- 62 Wheeler VC, Aitken M, Coutelle C. Modification of the mouse mitochondrial genome by insertion of an exogenous gene. *Gene* 1997; 198: 203-209
- 63 Stefani AL, Barzon L, Castagliuolo I, Guido M, Pacenti M, Parolin C, Farinati F, Palu G. Systemic efficacy of combined suicide/cytokine gene therapy in a murine model of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2005; 42: 728-735
- 64 Su C, Peng L, Sham J, Wang X, Zhang Q, Chua D, Liu C, Cui Z, Xue H, Wu H, Yang Q, Zhang B, Liu X, Wu M, Qian Q. Immune gene-viral therapy with triplex efficacy mediated by oncolytic adenovirus carrying an interferon-gamma gene yields efficient antitumor activity in immunodeficient and immunocompetent mice. *Mol Ther* 2006; 13: 918-927
- 65 Qian C, Prieto J. Gene therapy of cancer: induction of anti-tumor immunity. *Cell Mol Immunol* 2004; 1: 105-111
- 66 Wang KM, Xia AD, Chen SS. Combination therapy of experimental murine hepatoma with mIL-12 gene and MHC I gene mediated by liposome. *Aizheng* 2002; 21: 1041-1046
- 67 Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Apoptotic and anti-angiogenic strategies in liver and gastrointestinal malignancies. *J Surg Oncol* 2005; 90: 249-259
- 68 Zhu AX, Blaszkowsky LS, Ryan DP, Clark JW, Muzikansky A, Horgan K, Sheehan S, Hale KE, Enzinger PC, Bhargava P, Stuart K. Phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in combination with bevacizumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24: 1898-1903
- 69 Thomas MB, Abbruzzese JL. Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8093-8108
- 70 Chan WC. Bionanotechnology progress and advances. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006; 12: 87-91
- 71 Lam SH, Gong Z. Modeling liver cancer using zebrafish: a comparative oncogenomics approach. *Cell Cycle* 2006; 5: 573-577
- 72 Cho WC, Yue KK, Leung AW. Proteomics-leading the postgenome era. *China Biotechnology* 2005; 25: 33-38
- 73 Guan M, Rodriguez-Madoz JR, Alzuguren P, Gomar C, Kramer MG, Kochanek S, Prieto J, Smerdou C, Qian C. Increased efficacy and safety in the treatment of experimental liver cancer with a novel adenovirus-alphavirus hybrid vector. *Cancer Res* 2006; 66: 1620-1629
- 74 Liang HF, Chen CT, Chen SC, Kulkarni AR, Chiu YL, Chen MC, Sung HW. Paclitaxel-loaded poly(gamma-glutamic acid)-poly(lactide) nanoparticles as a targeted drug delivery system for the treatment of liver cancer. *Biomaterials* 2006; 27: 2051-2059

电编 李琪 编辑 潘伯荣

电针四白穴对神经阻断大鼠胃肌电的影响

常小荣, 严洁, 赵艳玲, 李江山, 刘建华, 何军锋

■背景资料

四白穴位于头面部, 隶属足阳明经。《针灸学》教材中均提到了该穴主治“目赤肿痛、口眼喎斜”等局部病症, 但少见其治疗与之相关脏腑胃疾患的报导。实验研究对四白穴与相关脏腑胃之间的联系以及作用的探讨亦较少。本文课题组以往研究发现针刺足阳明经头面、躯干、下肢三个不同节段的穴位对胃功能活动均有着明显的调整和治疗作用, 其中以四白穴对胃功能的影响较为明显, 提示四白穴与所属经脉相关脏腑胃有着相对特异性的调控作用。

常小荣, 严洁, 赵艳玲, 李江山, 刘建华, 何军锋, 湖南中医学院针灸推拿系 湖南省长沙市 410007

常小荣, 湖南中医学院教授, 针灸学教研室主任, 针灸重点学科学术带头人, 主要从事针灸经络及针灸治病机理的研究。

国家973计划中医理论基础研究专项, No. 2005-CB523308

通讯作者: 常小荣, 410007, 湖南省长沙市, 湖南中医药大学针灸推拿学院. xrchang1956@sina.com

电话: 0731-5381163 传真: 0731-5557891

收稿日期: 2006-03-16 接受日期: 2006-05-08

Influences of electroacupuncture at Sibai point on gastric myoelectricity in rats with nerve blockage

Xiao-Rong Chang, Jie Yan, Yan-Lin Zhao, Jiang-Shan Li, Jian-Hua Liu, Jun-Feng He

Xiao-Rong Chang, Jie Yan, Yan-Lin Zhao, Jiang-Shan Li, Jian-Hua Liu, Jun-Feng He, Acupuncture and Massage College, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Supported by the Basic Research Special Item on Traditional Chinese Medicine Theory in the National 973 Plan, No. 2005-CB523308

Correspondence to: Acupuncture and Massage College, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China. xrchang1956@sina.com

Received: 2006-03-16 Accepted: 2006-05-08

Abstract

AIM: To explore the mechanism of electroacupuncture (EA) at Sibai point in the excitement of gastric myoelectricity.

METHODS: Thirty-two rats were randomly divided into group A, B, C and D. All the rats were electroacupunctured at Sibai Point. Meanwhile, the rats in group A, B, C and D were intraperitoneally injected with normal saline, atropine, hexamethonium and reserpine, respectively. The effects of EA at Sibai point on the gastric myoelectric activities in the rats were observed.

RESULTS: After intraperitoneal injection of atropine and hexamethonium, the average amplitude and ratio of period to time in the phase of high activity of gastric myoelectric slow wave, and the average numbers of the peaks of

gastric myoelectric fast wave were significantly decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$), while after intraperitoneal injection of reserpine, the above three parameters were increased ($P < 0.01$, $P > 0.05$, $P < 0.01$). EA at Sibai point partially relieved the inhibitory effect of atropine and hexamethonium on the gastric myoelectric activities in the rats ($P < 0.05$ or $P > 0.05$).

CONCLUSION: All the cholinergic, sympathetic and adrenergic nervous systems participate in the regulation and control of EA at Sibai point of Foot-Yangming meridian on gastrointestinal tract.

Key Words: Electroacupuncture; Sibai point; Nerve blockage; Gastric myoelectric activities; Rats

Chang XR, Yan J, Zhao YL, Li JS, Liu JH, He JF. Influences of electroacupuncture at Sibai point on gastric myoelectricity in rats with nerve blockage. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1762-1765

摘要

目的: 探讨电针四白穴, 对大鼠胃肌电兴奋途径。

方法: 大鼠32只, 随机分为4组。选用ip抗胆碱能M受体阻断剂阿托品、交感神经节阻断剂六羟季胺和肾上腺素能神经阻断剂利血平, 观察电针四白穴对神经阻断大鼠胃肌电的影响。

结果: 大鼠腹腔注射阿托品、六羟季胺后, 慢波高活动相平均振幅、慢波高活动相时程/慢波周期比值以及快波平均峰簇数下降($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$); 注射利血平后, 以上三种参数分别升高($P < 0.01$, $P > 0.05$, $P < 0.01$)。针刺四白穴能部分取消阿托品、六羟季胺对大鼠胃肌电的抑制效应($P < 0.05$ 或 $P > 0.05$)。

结论: 电针足阳明经四白穴对胃调控作用的外周通路既有胆碱能神经、交感神经系统的参与, 又有肾上腺素能神经系统的参与。

关键词: 电针; 四白穴; 神经阻断; 胃肌电; 大鼠

常小荣, 严洁, 赵艳玲, 李江山, 刘建华, 何军锋。电针四

白穴对神经阻断大鼠胃肌电的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1762-1765

http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1762.asp

0 引言

我们以往的研究结果显示: 电针四白穴, 对大鼠胃肌电慢波高活动相平均振幅、慢波高活动相时程/慢波周期比值、快波平均峰簇数均有较明显的兴奋作用, 而电针非经穴对照点, 则无明显兴奋效应, 提示经脉-脏腑相关规律存在着相对特异性^[2-4]. 那么, 产生这种针刺效应的作用途径是什么? 是我们本次研究的主要目的. 因此我们对32只大鼠, 选用ip抗胆碱能M受体阻断剂阿托品、交感神经节阻断剂六羟季胺和肾上腺素能神经阻断剂利血平, 观察电针四白穴对神经阻断大鼠胃肌电的影响, 进一步探讨产生上述效应的作用途径.

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠32只, 雌雄不限, 体质量200-300 g, 随机分为4组, 每组8只. (1)电针四白加生理盐水组: 先予电针双侧四白穴30 min, 同步记录胃肌电60 min作为基线(对照值), 然后分别缓慢ip生理盐水2 mL, 再行电针四白穴30 min, 记录胃肌电60 min; (2)电针四白穴+阿托品组; (3)电针四白穴+六羟季胺(15 mg/kg)组; (4)电针四白穴+利血平(0.5 mg/kg)组. 以上(2)-(4)除ip药物分别为阿托品、六羟季胺、利血平外, 其余步骤均同电针四白穴加生理盐水组操作. 利血平组大鼠分别于记录前48 h和24 h ip利血平各1次. 穴位定位参照林文注《实验针灸学》^[1]

“动物针灸穴位图谱”, 结合比较解剖学方法进行大鼠穴位定位. 电针刺激参数: 疏密波(疏波: 4 Hz; 密波: 50 Hz), 脉冲宽度0.5 ms, 输出电压2-4 V, 输出电流4-6 mA, 0-60峰幅(1 k Ω 负载), 强度以毫针出现轻微颤动为度, 刺激时间30 min, 电针期间每隔10 min调整输出强度1次, 以维持适当的刺激强度.

1.2 方法 实验用大鼠禁食24 h(自由饮水)后称质量, 100 g/L乌拉坦5 mL/g ip麻醉后, 仰卧固定于鼠台, 无菌条件下沿腹正中线切开腹腔, 将直径2 mm铂金电极一枚置于胃窦部浆膜下, 距幽门括约肌0.5 cm, 另一枚置于胃体部, 距胃窦部电极约1 cm, 将导线通过皮下从两肩胛骨之间引出体外, 用一小塑料套管将其固定在颈部, 防止其被咬断而脱落, 同时注射青霉素防止感染,

饲养7 d后进行实验. 实验前24 h禁食, 自由饮水. 记录时用100 g/L乌拉坦(5 mL/g)ip麻醉, 将体内电极的两根体外导线分别连于二道生理记录仪的前置放大器, 同步记录胃肌电的快波和慢波. 快波记录参数: 时间常数0.02 s, 高频滤波30 Hz, 灵敏度1 mV/cm; 慢波记录参数: 时间常数2 s, 滤波10 Hz, 灵敏度5 mV/cm或2 mV/cm. 记录纸速10 mm/min. 慢波高活动相平均振幅(mV): 以慢波波形明显、规则、波幅最大的3 min为一区段, 共取4个区段, 计算各区段振幅的平均值. 慢波高活动相时程/慢波周期比值: 取3段节律明显慢波周期, 测量每一周期持续时间及高活动相出现时程, 并计算两者比值. 快波平均峰簇数: 以连续10 min内的所有快波为一区段, 测取3个区段, 计算各区段内峰簇数的平均值(次/min), 并计算处理前后快波平均峰簇数的差值. 大鼠在禁食24 h空腹状态下, 胃电慢波多呈正弦波, 呈周期性节律变化, 一般可分为高活动相和低活动相, 高活动相明显可见到持续时间较长的连续不规则的大峰簇, 在一次记录中呈周期对称的峰波, 波幅高耸, 呈双向不对称针型波, 单个或成簇状发放, 峰簇多发生于慢波平台上, 频率变化较为恒定; 低活动相波幅低平, 与高活动相交替出现.

统计学处理 实验数据以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 组内自身前后比较采用配对 t 检验, 组间比较(方差齐)采用方差分析, 方差不齐则用秩和检验和 q' 检验, 全部数据用SPSS11.5软件进行处理.

2 结果

2.1 电针对慢波高活动相平均振幅的影响 各组电针后(阻断前)组间比较, 慢波高活动相平均振幅无显著性差异($P>0.05$). 禁食24 h空腹状态下大鼠腹注阿托品、六羟季胺后, 慢波高活动相平均振幅明显降低(表1), 较电针后(阻断前)有显著性差异($P<0.01$), 与生理盐水组组间比较亦有显著性差异($P<0.01$); 生理盐水组较处理前无显著性差异; 电针四白穴后(图1), 被抑制的慢波高活动相振幅有一定程度的恢复, 与阻断前比较有显著性差异($P<0.05$); 阻断前后差值组间比较, 均无显著性差异. ip利血平后, 大鼠慢波高活动相平均振幅升高, 与电针后(阻断前)比较有显著性差异($P<0.05$), 与生理盐水组组间比较亦有显著性差异($P<0.05$); 针刺四白穴后(图1), 慢波高活动相振幅有一定程度的增强, 与电针后(阻断前)

■创新盘点

本文从经络(穴)-脏腑效应-效应机制等角度, 进一步探讨足阳明经与所属脏腑胃之间的相关性, 为“经脉(穴)-脏腑相关”研究提供新的理论与实验依据.

■应用要点

本实验结果表明, 腹注阿托品及六羟季胺均可明显减弱电针四白穴对胃运动的增强效应, 从而表现为对大鼠胃电活动的抑制效应, 说明胆碱能神经和交感神经均不同程度地参与了电针足阳明经穴对胃运动功能的调整作用; 针刺四白穴能部分拮抗阿托品、六羟季胺对大鼠胃电的抑制效应, 使被抑制的胃电活动得到一定程度的恢复。

表 1 电针四白穴对大鼠慢波高活动相平均振幅的影响 (mean \pm SD, mV)

| 分组 | 电针后① | 阻断剂② | 阻断剂+电针③ | ②-① | ③-① |
|-------|---------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| +生理盐水 | 5.4 \pm 0.3 | 5.2 \pm 0.8 | 5.4 \pm 0.3 | 0.1 \pm 0.3 | 0.0 \pm 0.1 |
| +阿托品 | 5.3 \pm 0.4 | 2.4 \pm 0.7 ^b | 5.2 \pm 0.5 ^a | 2.9 \pm 0.4 ^d | 0.1 \pm 0.1 |
| +六羟季胺 | 5.3 \pm 0.5 | 2.7 \pm 0.7 ^b | 5.2 \pm 0.6 ^a | 2.6 \pm 0.4 ^d | 0.1 \pm 0.1 |
| +利血平 | 5.3 \pm 0.6 | 5.6 \pm 0.5 ^a | 5.6 \pm 0.6 ^a | 0.6 \pm 0.2 ^c | 0.3 \pm 0.2 ^c |

^a P <0.05, ^b P <0.01 vs 电针后; ^c P <0.05, ^d P <0.01 vs 四白+生理盐水。

表 2 针刺四白穴对大鼠慢波高活动相时程/慢波周期比值的影响 (mean \pm SD, mV)

| 分组 | 电针后① | 阻断剂② | 阻断剂+电针③ | ②-① | ③-② |
|-------|---------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------|
| +生理盐水 | 0.5 \pm 0.0 | 0.5 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 |
| +阿托品 | 0.5 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.0 ^a | 0.5 \pm 0.1 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 |
| +六羟季胺 | 0.5 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.0 ^a | 0.5 \pm 0.1 | 0.0 \pm 0.0 | 0.0 \pm 0.0 |
| +利血平 | 0.5 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 | 0.5 \pm 0.1 ^a | 0.0 \pm 0.0 ^c | 0.0 \pm 0.0 |

^a P <0.05 vs 电针后; ^c P <0.05 vs 四白+生理盐水。

表 3 针刺四白穴对大鼠快波平均峰簇数的影响 (mean \pm SD, mV)

| 组别 | 电针后① | 阻断剂② | 阻断剂+电针③ | ②-① | ③-② |
|-------|-----------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------|
| +生理盐水 | 36.9 \pm 10.9 | 36.1 \pm 9.6 | 36.3 \pm 9.7 | 0.8 \pm 1.0 | 0.6 \pm 0.9 |
| +阿托品 | 36.4 \pm 11.8 | 34.3 \pm 10.6 ^b | 36.1 \pm 11.3 | 2.1 \pm 1.0 ^c | 0.3 \pm 0.9 |
| +六羟季胺 | 37.0 \pm 11.1 | 35.2 \pm 10.2 ^b | 36.7 \pm 11.1 | 1.8 \pm 0.9 ^c | 0.4 \pm 0.9 |
| +利血平 | 37.3 \pm 9.7 | 38.2 \pm 10.1 ^a | 38.3 \pm 11.1 ^a | 0.9 \pm 0.9 | 1.0 \pm 0.9 |

^a P <0.05, ^b P <0.01 vs 电针后; ^c P <0.05 vs 四白+生理盐水。

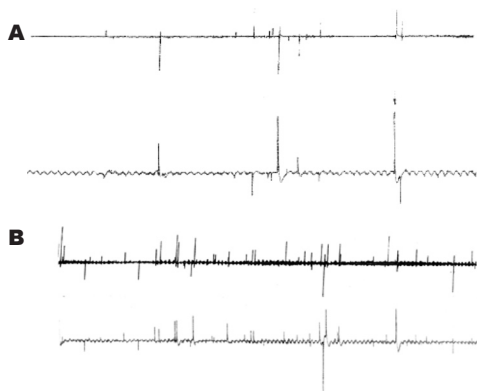


图 1 电针“四白”穴前后大鼠胃肌电慢波和快波示意图. A: 电针前; B: 电针后。

比较有显著性差异(P <0.05); 阻断前后差值组间比较, ip利血平组与生理盐水组组间比较有显著性差异(P <0.05)。

2.2 针刺对慢波高活动相时程/慢波周期比值的影响 各组电针后(阻断前)组间比较(表2), 慢波高活动相时程/慢波周期比值无显著性差异(P >0.05)。禁食24 h空腹状态下大鼠ip阿托品、六羟季胺后, 慢波高活动相时程/慢波周期比

值下降, 与电针后(阻断前)比较有显著性差异(P <0.05); 电针四白穴后慢波高活动相时程/慢波周期比值有一定程度的增加, 但与电针后(阻断前)比较均无显著性差异。腹注利血平后, 大鼠慢波高活动相时程/慢波周期比值增加, 但与电针后(阻断前)比较无显著性差异。针刺四白穴后慢波高活动相时程/慢波周期比值, 与电针后(阻断前)比较有统计学意义(P <0.05)。阻断前后差值组间比较, 均无统计学意义。

2.3 针刺对快波平均峰簇数的影响 各组电针后(阻断前)组间比较, 快波平均峰簇数均无显著性差异。禁食24 h空腹状态下大鼠腹注阿托品、六羟季胺后快波平均峰簇数下降(表3), 与电针后(阻断前)有显著性差异(P <0.01), 与生理盐水组组间比较也有显著性差异(P <0.05)。电针四白穴后(图1)快波峰簇发放有一定程度的增强, 但与电针后(阻断前)比较均无显著性差异。阻断前后差值组间比较, 均无统计学意义。

3 讨论

根据祖国医学的经络理论和脏象学说关于“夫

十二经脉者, 内属腑脏, 外络肢节”, “经脉所过, 主治所及”的指导, 在针灸临床实践中, 多采用“循经取穴”的原则来选穴施治, 临床也证实不同经穴的针刺效果不一样, 这体现了体表穴位与所系脏腑的相关性, 以及经穴具有相关的特异性。但是这种相关特异性的联系途径是什么? 是我们本次研究观察的主要目的。我们用ip注射抗胆碱能M受体阻断剂阿托品、交感神经节阻断剂六羟季胺和肾上腺素能神经阻断剂利血平, 观察电针四白穴对神经阻断大鼠胃电的影响。实验结果表明, 腹注阿托品及六羟季胺均可明显减弱电针四白穴对胃运动的增强效应, 从而表现为对大鼠胃电活动的抑制效应, 即慢波高活动相平均振幅、慢波高活动相时程/慢波周期比值、快波平均峰簇数发放明显下降, 说明胆碱能神经和交感神经均不同程度地参与了电针足阳明经穴对胃运动功能的调整作用; 针刺四白穴能部分拮抗阿托品、六羟季胺对大鼠胃电的抑制效应, 使被抑制的胃电活动得到一定程度的恢复, 表现为慢波高活动相平均振幅、慢波高活动相时程/慢波周期比值和快波平均峰簇数的发放均有一定程度的增强, 从而说明电针兴奋胃肌电的针刺效应, 既可能通过节后胆碱能途径, 又可能通过节前交感神经而起作用。进一步的探讨发现, 电针四白穴引起胃电活动兴奋的针刺效应被明显减弱而不被上述神经阻断剂完全取消, 提示在副交感神经及交感神经中还可能含有抗神经阻断的非胆碱能等兴奋纤维。也就是说, 在迷走胆碱能M受体、交感神经节被阻断后, 针刺对内脏的调整作用得以实现还存在着第3种成与介导, 肽能神经很可能参与这一效应。电针四白穴可能通过激发肽能神经释放各种肽类物质, 促使被抑制的胃电得到部分恢复, 从而实现对胃肠道的调整作用。现有研究资料已表明^[5-6,8]: 针刺对胃肠运动的影响与肽类物质密切相关, 如电针足阳明经足三里、天枢、梁门可明显增强胃窦、十二指肠及近段空肠移行性复合运动(MMC), 并可使MTL, GAS, SP浓度增加, 针刺能部分取消M受体阻断剂如阿托品等对胃运动的抑制等^[7,9-10], 本实验与此结论有一致性。

利血平是肾上腺素能神经阻断剂, 能够耗竭中枢及外周神经系统及其组织的儿茶酚胺和5羟色胺等递质^[11-13], ip利血平后, 表现出胃运动的加强效应, 提示电针对胃电的调整作用同时受肾上腺素能神经的影响, 并有儿茶酚胺等神经递质的参与; 针刺效应的产生, 可能是由于去除肾上腺素能神抑制作用以后, 迷走神经等兴奋性神经活动占优势的缘故。

4 参考文献

- 1 林文注, 王佩. 实验针灸学. 第1版. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 3-5
- 2 严洁, 常小荣, 黄必群, 林亚平, 易受乡, 阳仁达. 针刺足阳明经不同穴点对胃窦面积影响的结果分析. 中国针灸 1999; 19: 167-169
- 3 常小荣, 严洁, 易受乡, 林亚平, 阳仁达. 针刺足阳明经四白及内庭穴对胃蠕动能的影响. 中国中西医结合脾胃杂志 1999; 7: 12-13
- 4 易受乡, 阳仁达, 严洁, 常小荣, 林亚平. 针刺足三阳经穴对胃黏膜损伤家兔生长抑素受体基因表达影响的比较. 中国针灸 2004; 24: 785-788
- 5 易受乡, 林亚平, 严洁, 常小荣, 杨昱. 针刺足阳明经穴对大鼠胃运动影响及其与P物质的关系. 湖南中医药大学学报 2000; 20: 65-67
- 6 易受乡, 严洁, 林亚平, 常小荣, 刘建华, 张弘, 邓元江. 针刺胃经穴对M受体阻断大鼠胃电及脑肠肽的影响. 中国中西医结合消化杂志 2002; 10: 203-205
- 7 朱金照, 陈东风, 冷恩仁. 胃肠肽在胃肠运动途径中的作用. 世界华人消化杂志 1999; 7: 687-689
- 8 常小荣, 严洁, 林亚平, 易受乡, 刘辉. 针刺足阳明经穴对健康人血浆胃动素、胃泌素含量的影响. 中国中医药科技 2001; 9: 69-70
- 9 Scott RB, Strasberg SM, El-Sharkawy TY, Diamant NE. Fasting canine biliary secretion and the sphincter of Oddi. *Gastroenterology* 1984; 87: 793-804
- 10 Nabae T, Takahata S, Konomi H, Deng ZL, Yokohata K, Chijiwa K, Tanaka M. Effect of Prepyloric gastric transection and anastomosis on sphincter of Oddi cyclic motility in conscious dogs. *J Gastroenterol* 2001; 36: 530-537
- 11 Ohtsuka T, Yokohata K, Inoue K, Nabae T, Takahata S, Tanabe Y, Sugitani A, Tanaka M. Biliary sphincter motility after neural isolation of the pancreatoduodenal region in conscious dogs. *Surgery* 2002; 131: 139-148
- 12 Nabae T, Yokohata K, Otsuka T, Inoue K, Yamaguchi K, Chijiwa K, Tanaka M. Effect of truncal vagotomy on sphincter of oddi cyclic motility in conscious dogs. *Ann Surg* 2002; 236: 98-104
- 13 Tanaka M. Advances in research and clinical practice in motor disorders of the sphincter of Oddi. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002; 9: 564-568

■同行评价

本实验选用腹腔注射抗胆碱能M受体阻断剂阿托品、交感神经节阻断剂六羟季胺和肾上腺素能神经阻断剂利血平, 观察电针四白穴对神经阻断大鼠胃电的影响。结果表明针刺四白穴能部分拮抗阿托品、六羟季胺对大鼠胃电的抑制效应, 使被抑制的胃电活动得到一定程度的恢复, 从而说明电针兴奋胃肌电的针刺效应, 既可能通过节后胆碱能途径, 又可能通过节前交感神经而起作用。题目表达准确, 设计合理, 结论可信。

电编 李琪 编辑 潘伯荣

VEGF在大鼠慢性酒精性肝损伤中的表达

李伟平, 任浩洋, 张宝阳, 虞朝辉, 厉有名

■背景资料

在西方国家, 酒精性肝病是其肝病的主要类型之一。在我国, 随着生活水平的提高, 临床发现酒精性肝病的发病率呈上升趋势, 浙江省酒精性肝病流行病学调查的人群中酒精性肝病患病率达4.34%。

李伟平, 张宝阳, 浙江省湖州市中心医院消化科 浙江省湖州市 313000
任浩洋, 解放军总医院西院药局 北京市 100853
虞朝辉, 厉有名, 浙江大学医学院附属第一医院消化科 浙江省杭州市 310009
李伟平, 1982年毕业于浙江大学医学院附属第一医院, 副主任医师, 主要从事消化系统疾病的研究。
通讯作者: 厉有名, 310009, 浙江省杭州市庆春路79号, 浙江大学医学院附属第一医院消化科. zlym@zju.edu.cn
收稿日期: 2006-04-13 接受日期: 2006-05-25

Expression of vascular endothelial growth factor in chronic alcoholic liver fibrosis in rats

Wei-Ping Li, Hao-Yang Ren, Bao-Yang Zhang,
Chao-Hui Yu, You-Ming Li

Wei-Ping Li, Bao-Yang Zhang, Department of Digestive Diseases, Huzhou Central Hospital, Huzhou 313000, Zhejiang Province, China
Hao-Yang Ren, General Hospital of Chinese PLA, 100853 Beijing, China
Chao-Hui Yu, You-Ming Li, Department of Digestive Diseases, the First Hospital of Zhejiang University Medical College, Hangzhou 310009, Zhejiang Province, China
Correspondence to: You-Ming Li, Department of Digestive Diseases, the First Hospital of Zhejiang University Medical College, Hangzhou 310009, Zhejiang Province, China. zlym@zju.edu.cn
Received: 2006-04-13 Accepted: 2006-05-25

Abstract

AIM: To investigate the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its role in the pathogenesis and development of chronic alcoholic liver fibrosis in rats.

METHODS: Liver fibrosis models were established in 24 SD rats by intragastric administration (7 g/kg) of alcohol (56°, 560 mL/L) every morning, and 10 normal rats served as controls. The rats in model group were killed by exsanguination from femoral vein at 4, 12 and 24 wk. Pathological changes of liver tissues in rats were identified by Masson staining, and the expression of VEGF mRNA was detected by semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: VEGF mRNA expression was not detected in the control rats. The expression of VEGF mRNA in model rats was the highest at 4 wk, reaching 83.3% (5/6), which was significantly higher than that in the controls ($P < 0.01$). The positive rate of VEGF mRNA expression dropped to 18.2% (2/11) at 12 wk, and then rose up again to 57.1% (4/7) at 24 wk, which was markedly higher than that in the controls. The expression of VEGF mRNA was also notably different between 4 and 12 wk ($P < 0.01$), but not between 4 and 24 wk ($P > 0.05$). Fatty and vacuole-like degeneration, necrosis and production of collagen were observed in the model rats.

CONCLUSION: VEGF plays an important role in the pathogenesis and development of chronic alcoholic liver fibrosis.

Key Words: Vascular endothelial growth factor; Alcoholic liver disease; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Li WP, Ren HY, Zhang BY, Yu CH, Li YM. Expression of vascular endothelial growth factor in chronic alcoholic liver fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1766-1770

摘要

目的: 观察大鼠慢性酒精性肝损伤过程中VEGF的表达, 探讨其在慢性酒精性肝损伤发生、发展中的作用。

方法: 56度的白酒(560 mL/L)平均以7 g/kg的剂量每日早晨灌胃一次制备肝纤维化模型, 灌胃4 wk、12 wk及24 wk采用股静脉放血法分别处死大鼠, 观察肝脏病理变化并采用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测VEGF mRNA的表达。

结果: 对照组的VEGF未见表达, 饮酒4 wk组表达VEGF mRNA比例最高, 达到83.3%(5/6), 与对照组相比有非常显著性差异($P < 0.01$), 12 wk时下降到18.2%(2/11), 且其表达与对照组相比无差异($P > 0.05$), 而至24 wk VEGF表

达阳性率上升到57.1%(4/7), 与对照组相比有非常显著性差异($P<0.01$). 另外, 饲酒4 wk组VEGF表达阳性率与12周相比差异也有非常显著性($P<0.01$), 而与24 wk相比无统计学差异. 试验组大鼠肝细胞出现明显脂肪、空泡变性, 坏死及胶原增生等病变.

结论: VEGF可能在酒精性肝病中起重要作用, 主要与酒精性肝炎及酒精性肝纤维化有关.

关键词: 血管内皮生长因子; 酒精性肝病; 逆转录聚合酶链反应

李伟平, 任浩洋, 张宝阳, 虞朝辉, 厉有名. VEGF在大鼠慢性酒精性肝损伤中的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1766-1770
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1766.asp>

0 引言

在西方国家, 酒精性肝病是其肝病的主要类型之一. 在我国, 乙肝疫苗等病毒性肝炎预防的逐步普及, 乙肝等病毒性肝炎的发病率开始下降; 同时随着生活水平的提高, 临床发现酒精性肝病的发病率呈上升趋势, 浙江省酒精性肝病流行病学调查的人群中酒精性肝病患病率达4.34%^[1]. 尽管酒精性肝病病因单一, 但其发病机制复杂, 尚未完全明了.

1983年Senger *et al*^[2]首先从肿瘤腹水中发现血管内皮生长因子(VEGF), 并证实他是一种分子量为40-50 kDa的分泌性糖蛋白, 有强烈提高血管通透性的作用, 能引起血浆蛋白(包括纤维蛋白原)渗出血管, 其效果相当于组织胺的5000倍. 进一步的研究证实, 他是内皮细胞的一种特异性丝裂原, 具有选择性诱导内皮细胞增殖、血管生成的作用, 其与各种肝病的关系也越来越受到关注. 在蛋白及分子水平各类肝病中VEGF的作用已被广泛研究, 已证实VEGF在肝窦内皮细胞的生长, 肝细胞再生以及原发性、继发性的肝癌发生、发展, 各种良性肝病如血管瘤、肝炎等中起重要作用, 但至今VEGF在酒精性肝病中的研究尚不多, 且对其在其中所起的作用了解甚少. 我们利用大鼠长期摄入酒精, 复制慢性酒精性肝损伤的动物模型, 通过RT-PCR检测VEGF mRNA表达水平的变化, 探讨其在酒精性肝病发病机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 采用健康, 性成熟, 一级质量标准的S-D大鼠34只, 体质量180-210 g, 分笼喂养. 大鼠由

浙江大学医学院动物中心提供并以清洁II级饲养. 红星牌56度二锅头白酒(560 mL/L)由北京酿酒总厂生产, Trizol试剂、M-MLV逆转录酶试剂盒由GIBCOBRL公司提供, 无水乙醇购自杭州长征化工厂, 异丙醇购自杭州双林化工试剂厂, 氯仿购自浙江迪耳药业有限公司, DEPC水、琼脂糖、三羟甲基氨基甲烷(TRIS)及Taq酶购自上海生工生物工程有限公司, 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)购自广东安平化学厂, 25 mmol/L氯化镁购自Promega公司.

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理 大鼠分为2组, 模型组24只, 正常对照组10只. 模型组以红星牌56度二锅头白酒平均以7 g/kg的剂量每日早晨灌胃一次, 正常对照组则以等量生理盐水灌注. 各组大鼠实验期间均予以饮用水及全价营养颗粒饲料喂养. 模型组在4, 12及24 wk采用股静脉放血法分别处死6只、11只及7只, 取肝脏标本, 一部分置于液氮中快速冷冻, -80℃冰箱保存待测; 另一部分于40 g/L福尔马林固定, 用于纤维化组织病理学检测.

1.2.2 肝脏组织病理学检测 肝组织石蜡包埋, 常规病理检测, 并行Masson三色染色检测肝纤维化程度.

1.2.3 RNA抽提及RT-PCR 用Trizol提取肝脏组织总RNA, 按GIBCOBRL公司M-MLV逆转录酶试剂盒说明书逆转录成cDNA, 并进行PCR扩增, VEGF引物: 正义: 5'-TGC ACC CAC GAC AGA AGG GGA-3', 反义: 5'-TCA CCG CCT TGG CTT GTC ACA T-3', 扩增片段为568 bp. “看家基因”磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照, 正义: 5'-CAT GGT CTA CAT GTT CCA GT-3', 反义: 5'-GGC TAA GCA GTT GGT GGT GC-3', 扩增片段为349 bp. 以上引物均由上海生工生物工程有限公司合成. 取逆转录产物2 μL为模板, 1 U Taq酶, 上下游引物各0.1 μg, 10 mmol/L dNTP 0.8 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μL(终浓度为1.5 mmol/L) 10×Buffer 2 μL, 加水至总反应体积为20 μL, 混匀. 置PCR仪94℃ 5 min, 以后94℃ 45 s→66℃ 45 s (GAPDH退火温度为61℃)→72℃ 45 s, 共30个循环, 72℃ 5 min终止反应. 取5 μL PCR产物经20 g/L琼脂糖凝胶(含0.5 mg/L溴化已锭)电泳, 所得目标条带用紫外快速成像仪拍照, 计所得目标条带数, 与各组总数相比求得其阳性率.

统计学处理 所有数据用SPSS 10.0统计软件

■ 研发前沿

尽管酒精性肝病病因单一, 但其发病机制复杂, 尚未完全明了. 血管内皮生长因子(VEGF)是内皮细胞的一种特异性丝裂原, 具有选择性诱导内皮细胞增殖、血管生成的作用, 其与各种肝病的关系也越来越受到关注.

■创新盘点

本实验通过对酒精性肝纤维化小鼠模型的病理观察及对VEGF表达变化研究,证实VEGF在酒精性肝病中起重要作用,主要与酒精性肝炎及酒精性肝纤维化有关。

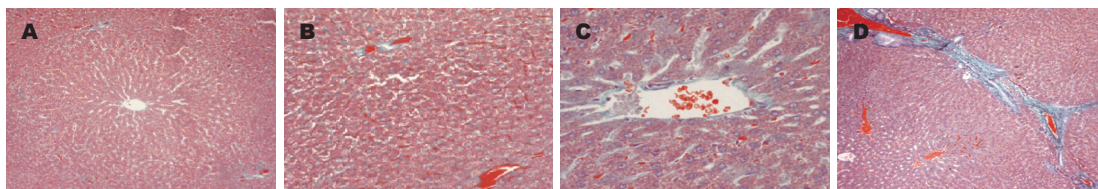


图1 酒精对不同时间组大鼠肝组织所致病理损伤(Masson三色染色 $\times 100$)。A: 正常对照组S-D大鼠肝板成条索状以肝小叶中央静脉为中心放射样排列,其间有不规则肝窦,中央静脉及肝窦壁未见明显绿色胶原组织沉积;B: 12 wk酒精组S-D大鼠肝组织,肝细胞肿胀,肝窦瘀血,轻度窦周纤维化;C: 24 wk酒精组S-D大鼠肝组织,可见中央静脉扩张、纤维化,血管壁增厚;肝细胞肿胀,肝窦瘀血,轻度窦周纤维化;D: 24 wk酒精组S-D大鼠肝组织,可见汇管区及周围纤维化,汇管区静脉瘀血,两处汇管区绿色胶原组织连接成间隔。

进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 酒精致大鼠肝脏损伤病理分析 长期摄入酒精后,大鼠肝细胞浆出现不同程度的空泡变性,重者胞体肿大气球样变;肝细胞脂肪变性分布于小叶各带(主要位于小叶3区带),内含脂滴以中小脂滴为主,小叶各带可见不同程度的点状坏死,主要见于中央静脉周围带,肝小叶的坏死灶及肝窦内可见较多量多核细胞、淋巴细胞及单核细胞浸润。

正常对照组大鼠Masson三色染色观察肝小叶,除中央静脉外少见绿染胶原纤维分布,汇管区管壁偶尔有少许细小的绿染胶原纤维包围,但未见明显增生。实验4 wk末,可见少数大鼠汇管区边缘有绿染胶原纤维少量包绕增生,肝窦中几乎无绿染胶原纤维分布。实验12 wk末,肝小叶中央静脉外也可见散在绿染胶原纤维分布,汇管区周围有明显绿染胶原纤维包绕,其中某些汇管区周围所包绕的纤维组织则向周围肝小叶内浸润,呈星状放射,少量切片中可见中央静脉管壁增厚现象。而至实验24 wk末,则可见汇管区胶原增多或扩大,轻中度的窦周纤维化、轻中度静脉周纤维化明显,可见少数纤维间隔形成(图1)。

肝纤维化(SSS)半定量计分结果表明,4 wk酒精组大鼠肝脏SSS计分与正常对照组大鼠比较,无统计学差异。实验12及24 wk末,大鼠肝脏SSS计分与正常对照组及实验第4周末大鼠比较,均明显增高,具显著统计学意义($P<0.01$)。且大鼠肝脏SSS计分值与饮酒时间呈明显的相关性(表1)。

2.2 大鼠肝组织中VEGF mRNA的表达 提取实验大鼠肝组织RNA,以RT-PCR方法检测VEGF在正常及酒精致肝损伤过程中的表达及变化情况。正常对照组大鼠肝组织中未见表达,饮酒组中

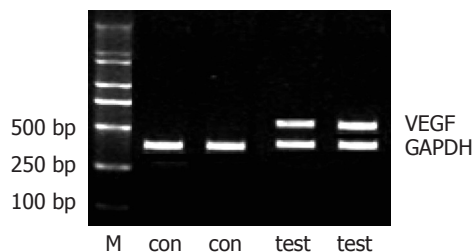


图2 RT-PCR检测VEGF、GAPDH在1例正常对照大鼠及1例饮酒4 wk大鼠肝组织中的表达。从电泳图中可见看家基因GAPDH在正常对照大鼠及饮酒4 wk大鼠肝组织中表达情况基本一样;VEGF在正常对照大鼠肝组织中未见表达,而在饮酒4 wk大鼠肝组织中表达(RT-PCR产物重复上样2孔)。M: DL2000 Marker; con: 正常对照大鼠; test: 饮酒4 wk大鼠。

表1 不同组别大鼠肝纤维化(SSS)半定量计分结果

| 组别 | n | SSS计分 |
|----------|----|---------------------------|
| 正常对照组 | 10 | 0.30 ± 0.48 |
| 4 wk酒精组 | 6 | 0.50 ± 0.55 |
| 12 wk酒精组 | 11 | 1.45 ± 0.52 ^{bd} |
| 24 wk酒精组 | 7 | 3.71 ± 0.76 ^{bd} |

^b $P<0.01$ vs 正常对照组; ^d $P<0.01$ vs 4 wk酒精组。

部分大鼠肝组织检测到VEGF表达(以看家基因GAPDH为内参照,电泳结果见图2)。

考察各实验组中VEGF表达阳性大鼠所占比例。对照组的VEGF未见表达,饮酒4 wk组VEGF表达阳性率最高,达到83.3% (5/6),与对照组相比有非常显著的统计学差异($P<0.01$);饮酒12 wk时下降到18.2% (2/11),且其表达与对照组相比无统计学意义($P>0.05$);饮酒24 wk VEGF表达阳性率上升到57.1% (4/7),与对照组相比有非常显著的统计学意义($P<0.01$)。另外,饮酒4 wk组VEGF表达阳性率与12 wk相比也有非常显著的统计学意义($P<0.01$),与24 wk相比无统计学意义(图3)。

3 讨论

VEGF能提高毛细血管通透性, 肝细胞再生及新生血管形成, 肝脏炎症急性期反应包括细胞因子IL-1, IL-6, TNF- α 的释放和血浆急性期蛋白浓度的改变. 由于提高了毛细血管的通透性, VEGF增强了这些蛋白的释放, 从而在急性炎症期起关键作用.

Akiyoshi *et al*^[3]用酶联免疫吸附法测得急性肝炎患者血清VEGF平均值为172.7 ng/L, 显著高于对照组(65.0 ng/L)和慢性肝炎组(58.0 ng/L). 在CCl₄所致的大鼠急性肝坏死模型中VEGF mRNA表达增加, 免疫组化显示VEGF主要位于激活的肝星状细胞、枯否细胞及巨噬细胞, 并发现在肝坏死区血管内皮细胞数量丰富, 而在肝坏死恢复时则以肝窦内皮细胞为主, VEGF主要位于肝细胞, 提示来源于非实质细胞的VEGF有助于血管内皮细胞增生, 而肝细胞来源的VEGF促进肝窦内皮细胞再生, 说明VEGF在肝病组织血管生成中起关键作用^[4]. 250例慢性乙肝患者肝组织通过免疫组化发现VEGF在肝炎轻度组表达阳性占多数, 而在肝炎较重组强阳性占多数, 且在肝内血管炎症、破坏及阻塞部位尤其在碎屑坏死区的肝细胞及窦间隙表达较明显, 表明VEGF在肝组织内表达随肝组织变性坏死加重而上升^[5]. 本实验发现在饲酒4 wk后VEGF的表达率达最高峰(83.3%), 与其他研究结果基本一致, 其机制可能是在持续酒精的刺激下, 肝组织缺血缺氧, 肝细胞变性坏死, 炎症细胞浸润, VEGF表达的增加刺激血管增生, 增加血管的通透性, 并减少细胞凋亡和坏死, 有利于组织修复. 随着饲酒时间的进一步延长, VEGF的表达率开始下降, 12 wk时与对照组相比无统计学差异, 认为可能是因为在这一阶段肝组织缺氧有所减轻所致. 但关于VEGF在急慢性肝炎中的确切作用仍需作进一步研究.

窦周纤维化为酒精性肝病的较特征性变化. 肝窦内皮具有大量窗孔及高通透性, 可通过循环中的大分子而进行代谢物质交换. 酒精性肝纤维化时细胞外基质合成增多, 引起窦周纤维化及肝窦毛细血管化, 后者即肝血窦呈现毛细血管的结构特征, 窦内皮细胞的窗孔消失, 并在窦内皮细胞下形成基底膜. 250例慢性乙肝患者肝组织通过免疫组化发现VEGF表达阳性组多数集中在肝纤维化指数1分段, 而表达强阳性组则多数集中在肝纤维化指数2-4分段, 表明VEGF在肝组织内表达的强弱与肝纤维化程度有关.

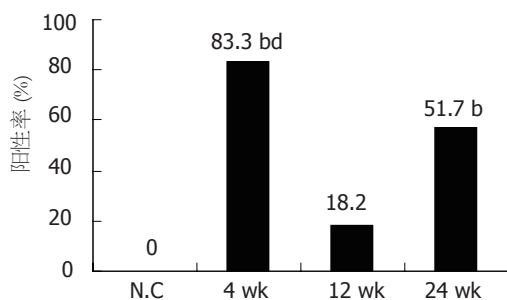


图3 各实验组中大鼠VEGF表达阳性率比较. N.C.: 正常对照组; 4 wk: 饲酒4 wk组; 12 wk: 饲酒12 wk组; 24 wk: 饲酒24 wk组; ^b $P < 0.01$ vs 正常对照组; ^d $P < 0.01$ vs 饲酒12 wk组.

我们的实验也发现一旦肝纤维化显著(24 wk), VEGF的表达率就明显上升, 和4 wk时相当, 并与上述研究一致. 而类似的报道也见于其他纤维化脏器中. Kang *et al*^[6]发现在进行性肾衰大鼠中加入VEGF可促进肾小球内皮细胞和肾小管周毛细血管内皮细胞的增生. 而在博莱霉素所致的大鼠肺纤维化中, 用免疫组化证实VEGF及其受体的表达增加^[7]. 同样, 有慢性肾移植排斥反应的患者存在间质纤维化和血管病变, 实验证实VEGF存在于巨噬细胞中, 在间质其蛋白水平显著上升, 提示VEGF的上调对纤维化和炎症起重要作用^[8]. 肝纤维化时肝内血流减少, 氧分压降低, 其他因子如TGF- β 等强力上调VEGF的表达, VEGF从而诱导肝窦内皮细胞、肝细胞、血管内皮细胞有丝分裂, 有利于肝纤维化.

总之, 我们的实验进一步证实了VEGF可能在酒精性肝病中起重要作用, 主要与酒精性肝炎及酒精性肝纤维化有关, 但对于VEGF的来源、确切的作用机制以及一些细胞因子对其调节作用等尚需进一步阐述, 而这些更深入的研究将有助于更好的防治酒精性肝病.

4 参考文献

- 1 厉有名, 陈卫星, 虞朝辉, 乐敏, 刘有特, 徐根云, 季峰, 李舒丹. 浙江省酒精性肝病流行病学调查概况. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 647-649
- 2 Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983; 219: 983-985
- 3 Akiyoshi F, Sata M, Suzuki H, Uchimura Y, Mitsuyama K, Matsuo K, Tanikawa K. Serum vascular endothelial growth factor levels in various liver diseases. *Dig Dis Sci* 1998; 43: 41-45
- 4 Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S, Inao M, Matsui A, Ikeda H, Ohno A, Shibuya M, Fujiwara K. Expressions of vascular endothelial growth factor in nonparenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun*

■应用要点

本实验进一步证实了VEGF可能在酒精性肝病中起重要作用, 主要与酒精性肝炎及酒精性肝纤维化有关, 为进一步提高对酒精性肝病的基础研究和防治措施提供线索.

■同行评价

本文研究提示 VEGF可能在酒精性肝病中起重要作用,可能与酒精性肝炎及酒精性肝纤维化有关。论文书写规范,表述准确,行文流畅,论证层次分明,理论依据充分。不足之处是设计内容较少,研究方法单一。

- 1999; 254: 587-593
- 5 严家春, 陈文笔, 马勇, 孙新华. 血管内皮细胞生长因子与乙型肝炎病变的关系. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 150-152
- 6 Kang DH, Hughes J, Mazzali M, Schreiner GF, Johnson RJ. Impaired angiogenesis in the remnant kidney model: II. Vascular endothelial growth factor administration reduces renal fibrosis and stabilizes renal function. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 1448-1457
- 7 Fehrenbach H, Haase M, Kasper M, Koslowski R, Schuh D, Muller M. Alterations in the immuno-histochemical distribution patterns of vascular endothelial growth factor receptors Flk1 and Flt1 in bleomycin-induced rat lung fibrosis. *Virchows Arch* 1999; 435: 20-31
- 8 Pilmore HL, Eris JM, Painter DM, Bishop GA, McCaughan GW. Vascular endothelial growth factor expression in human chronic renal allograft rejection. *Transplantation* 1999; 67: 929-933

电编 张敏 编辑 张海宁

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

• 消息 •

第十一届全国普通外科学术会议征文通知

本刊讯 中华普通外科杂志编辑部将于2006-07下旬在内蒙古呼和浩特市召开“第十一届全国普通外科学术会议”。本次会议将围绕普通外科手术并发症与外科再手术的主题就普通外科临床与基础研究、外科并发症、以及外科再手术等问题进行研讨。会议邀请国内外著名外科专家,对热点问题做专题演讲,参会代表进行学术交流,经验介绍、开展讨论。

1 征文内容

征文内容包括: (1)腹部外科手术并发症和外科再手术经验; (2)普通外科的新进展、新诊断、新技术、新方法、新手术、新经验; (3)临床研究、基础研究、实验研究; 手术适应证、禁忌证问题; (4)腹腔镜手术; (5)肿瘤的放化疗; (6)手术并发症和再手术的营养支持; (7)手术并发症和再手术的护理等。

2 征文要求

征文要求包括: (1)请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要各1份,并附拷贝软盘,寄到100034,北京西城区阜内大街133号 齐老师 收,联系电话: 010-66168321转3126, 010-66164704。 (2)来稿请注明单位、作者姓名、邮编及联系电话(请自留底稿,恕不退稿),请在信封左下角注明“普外会议征文”字样。参会代表将获得国家级继续医学教育一类学分。 (3)截稿日期: 2006-06-30。

复方中药安胃汤提高大鼠胃溃疡愈合质量的机制

林寿宁, 韦 维, 黄贵华

林寿宁, 广西中医学院瑞康医院消化内科 广西壮族自治区南宁市 530011

韦维, 黄贵华, 广西中医学院 广西壮族自治区南宁市 530001
林寿宁, 教授, 硕士生导师, 主要从事消化系统疾病的临床和实验研究。

通讯作者: 林寿宁, 530011, 广西壮族自治区南宁市市华东路10号, 广西中医学院瑞康医院消化内科. lsn77766@sina.com

电话: 0771-2188105 传真: 0771-3137377

收稿日期: 2006-04-20 接受日期: 2006-05-11

Effect of Anweitang on gastric ulcer and its mechanism in experimental rats

Shou-Ning Lin, Wei Wei, Gui-Hua Huang

Shou-Ning Lin, Department of Gastroenterology, Ruikang Affiliated hospital of Guangxi TCM University, Nanning 530011, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Wei Wei, Gui-Hua Huang, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Shou-Ning Lin, Department of Gastroenterology, Ruikang Hospital, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. lsn77766@sina.com

Received: 2006-04-20 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To investigate the mechanism of *Anweitang* in the improvement of gastric ulcer healing quality.

METHODS: Forty Wistar rats were randomly and averagely divided into group A, B, C and D. Acetic acid was used to establish the model of gastric ulcer in the rats of group B, C and D. The rats in group A and B were treated (ig) with normal saline while those in group C and D were treated (ig) with *Anweitang* and Ranitidine, respectively. Radioimmunoassay was used to determine the expression of serum epidermal growth factor (EGF), and immunohistochemistry was applied to detect the expression of EGF, EGF receptor, and transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) in the gastric mucosa.

RESULTS: In comparison with that in the group B, the expression of serum EGF was evidently enhanced in group C and D (1.12 ± 0.24 , 0.99

± 0.15 $\mu\text{g/L}$ vs 0.52 ± 0.13 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$), and serum EGF expression was also significantly different between group C and D ($P < 0.01$). Furthermore, the expression of mucosal EGF, EGFR and TGF- β_1 were markedly higher in group C and D than those in group B (EGF: $29.7\% \pm 1.9\%$, $26.5\% \pm 1.6\%$ vs $18.4\% \pm 2.0\%$, $P < 0.01$; EGFR: $29.6\% \pm 2.6\%$, $25.9\% \pm 1.0\%$ vs $20.4\% \pm 1.8\%$, $P < 0.01$; TGF- β_1 : $67.0\% \pm 2.0\%$, $49.5\% \pm 1.1\%$ vs $27.3\% \pm 1.0\%$, $P < 0.01$). There were also significant differences between group C and D in the expression of mucosal EGF, EGFR and TGF- β_1 (all $P < 0.01$).

CONCLUSION: *Anweitang* may improve the healing quality of gastric ulcer by enhancing the expression serum EGF and mucosal EGF, EGFR, and TGF- β_1 .

Key Words: *Anweitang*; Epidermal growth factor; Epidermal growth factor receptor; Transforming growth factor- β_1

Lin SN, Wei W, Huang GH. Effect of *Anweitang* on gastric ulcer and its mechanism in experimental rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1771-1774

摘要

目的: 通过实验性乙酸大鼠胃溃疡模型, 研究复方中药安胃汤提高慢性胃溃疡愈合质量机制。

方法: 40只Wistar大鼠随机平均分为正常对照组、模型组、安胃汤组和雷尼替丁。采用乙酸浸渍法建立胃溃疡模型, 造模3 d后前两组分别用生理盐水灌胃, 后两组分别用安胃汤和雷尼替丁灌胃。采用放射免疫方法和免疫组织化学方法观察复方中药安胃汤对大鼠胃溃疡模型愈合时血清表皮生长因子(EGF)和胃黏膜EGF, 表皮生长因子受体(EGFR)及转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)表达的影响。

结果: 模型组相比, 安胃汤组和雷尼替丁组可提高血清EGF(1.12 ± 0.24 , 0.99 ± 0.15 $\mu\text{g/L}$ vs 0.52 ± 0.13 $\mu\text{g/L}$, $P < 0.01$), 安胃汤组与雷尼替丁组相比差异也有显著意义($P < 0.05$)。与

■背景资料

提高慢性胃溃疡愈合质量是目前胃溃疡研究的重点和难点, 目前很多学者运用中医药方法提高慢性胃溃疡愈合质量取得较好的临床效果, 但其机制有待进一步的研究。

■研发前沿

复方中药对在体动物模型血清EGF和胃黏膜EGF, EGFR及TGF- β_1 表达的影响是近期提高慢性胃溃疡愈合质量机制的研究热点。

■相关报道

通过整理林沛湘教授治疗慢性胃病临床经验, 对其治疗慢性胃病的学术理论进行了归纳总结, 认为本病的基本病机为多属寒热虚实夹杂, 气血失和占大多数, 气机阻滞、升降失调是其共同特征。

模型组相比, 安胃汤组和雷尼替丁组可显著增强胃黏膜EGF、EGFR及TGF- β_1 表达(EGF: $29.7\% \pm 1.9\%$, $26.5\% \pm 1.6\%$ vs $18.4\% \pm 2.0\%$, $P < 0.01$; EGFR: $29.6\% \pm 2.6\%$, $25.9\% \pm 1.0\%$ vs $20.4\% \pm 1.8\%$, $P < 0.01$; TGF- β_1 : $67.0\% \pm 2.0\%$, $49.5\% \pm 1.1\%$ vs $27.3\% \pm 1.0\%$, $P < 0.01$), 安胃汤组强于雷尼替丁组(均 $P < 0.01$)。

结论: 安胃汤可能通过提高血清EGF和增强胃黏膜EGF、EGFR及TGF- β_1 表达, 增强胃黏膜保护作用而提高溃疡愈合质量。

关键词: 安胃汤; 表皮生长因子; 表皮生长因子受体; 转化生长因子 β_1

林寿宁, 韦维, 黄贵华. 复方中药安胃汤提高大鼠胃溃疡愈合质量的机制. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1771-1774
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1771.asp

0 引言

复方中药安胃汤是在全国著名老中医、广西中医学院林沛湘教授治疗慢性胃病验方基础上组方而成, 临床疗效显著^[1]. 我们分别采用放射免疫方法和免疫组织化学方法观察该方对实验性乙酸大鼠胃溃疡愈合时血清表皮生长因子(EGF)及胃黏膜表皮生长因子(EGF)、表皮生长因子受体(EGFR)和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)表达的影响, 探讨其提高慢性胃溃疡愈合质量的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Wistar大鼠40只, 雌雄各半, 体重 180 ± 50 g, 广西中医学院实验动物中心提供. 安胃汤中药颗粒剂(由江苏江阴天江药业有限公司生产)药物组成黄连5 g, 干姜5 g, 制半夏10 g, 百合15 g, 乌药10 g, 丹参15 g, 白芍15 g, 薏苡仁15 g, 木香7 g, 甘草5 g. 雷尼替丁胶囊(江苏晨牌药业有限公司出品). 链霉菌抗生素蛋白-过氧化酶免疫组织化学染色超敏试剂盒(Ulttrasensitire™ S-P kit-9710, 福建迈新公司); 液体DAB酶底物显色试剂盒, 美国Matim Biotech. Inc公司产品, 按照试剂盒说明书制备和使用. 0.01 mol/L PBS (pH 7.2)(粉剂), 福州迈新生物技术开发公司产品. EGF, EGFR, TGF- β_1 免疫组织化学染色抗体试剂盒(福建迈新公司提供). EGF放射免疫分析盒(中国原子能科学研究所提供). HB-2型奥林巴斯显微照相系统、英国珊顿切片机、Motic images软件系统. 721分光光度计(上

表 1 胃溃疡大鼠胃黏膜再生血清EGF(mean \pm SD, $n = 10$)

| 分组 | 再生黏膜厚度(μ m) | 黏膜肌层缺损度(μ m) | 血清EGF(μ g/L) |
|------|-------------------|-------------------|----------------------|
| 模型 | 257 ± 18 | 250 ± 37 | 0.52 ± 0.13 |
| 雷尼替丁 | 329 ± 15^b | 185 ± 23^b | 0.99 ± 0.15^b |
| 安胃汤 | 343 ± 16^{bc} | 153 ± 25^{bc} | 1.12 ± 0.24^{bc} |
| 正常对照 | | | 0.67 ± 0.06^a |

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 模型; ^c $P < 0.05$ vs 雷尼替丁.

海精密仪器有限公司), FJ2003/50p γ 放射免疫计数器(国营二六二厂).

1.2 方法 Wistar大鼠40只称质量, 标记, 完全随机分为4组, 每组10只, 除正常对照组外, 其余3组按照醋酸浸渍法^[2]造模, 造模后3 d开始治疗, 雷尼替丁溶液浓度为3 g/L, 安胃汤2.5 kg/L, 按10 mL/kg灌胃, 1次/d; 正常对照组、模型组生理盐水10 mL/kg灌胃, 1次/d. 每组均连续灌胃13 d后停药, 各组大鼠禁食24 h, 断头处死取血, 静置2-3 h后分离血清, 置EP管中, -20°C 冰箱保存待测; 剪开大鼠腹腔, 分别结扎贲门、幽门端后取出胃, 沿胃大弯剪开, 冰生理盐水冲洗, 以溃疡瘢痕平行于胃长轴方向的最长径为中心取材, 迅速置于40 g/L中性甲醛中固定24 h. 按照常规脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 5 μ m厚度, 以瘢痕的最长径为中心连续切片. 再生黏膜厚度及黏膜肌缺损宽度测定: 参照杨雪松 *et al*^[3]方法, 在HE染色的切片上, 用低倍镜找到溃疡部位, 在高倍镜下(40倍物镜)观察测量, 取5个视野测量计算平均值. 血清EGF的测定: 采用放射免疫法, 严格按照试剂盒说明书步骤操作, SP免疫组织化学染色操作程序按照试剂盒说明书进行. SP免疫组织化学染色检测结果判定: 细胞质或细胞膜呈现棕黄色颗粒为阳性表达. 运用计算机图像分析仪定量测定, 每组随机抽取5只大鼠切片各1张, 每张随机选取5个视野作图像分析, 以每个像素点0.389 μ m长, 在 $4.306 \mu\text{m} \times 104 \mu\text{m}$ 测量窗下测量并记录积分吸光度值(AU)及阳性细胞占总面积百分比。

统计学处理 所有资料均用mean \pm SD表示, 多组均数比较采用ANOVA检验。

2 结果

2.1 再生黏膜厚度和黏膜肌层缺损度 安胃汤组与雷尼替丁组均较模型组明显增加再生黏膜厚度($P < 0.01$), 安胃汤组与雷尼替丁组比较差异有

表 2 胃溃疡大鼠胃黏膜EGF, EGFR, TGF- β_1 表达 (mean \pm SD, $n = 10$)

| 分组 | EGF | | EGFR | | TGF- β_1 | |
|------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 积分吸光度值 | 阳性率 (%) | 积分吸光度值 | 阳性率 (%) | 积分吸光度值 | 阳性率 (%) |
| 模型 | 32.9 \pm 1.8 | 18.4 \pm 2.0 | 1.19 \pm 0.07 | 20.4 \pm 1.8 | 92.0 \pm 2.1 | 27.3 \pm 1.0 |
| 雷尼替丁 | 48.7 \pm 1.2 ^b | 26.5 \pm 1.6 ^b | 1.51 \pm 0.06 ^b | 25.9 \pm 1.0 ^b | 80.6 \pm 2.3 ^b | 49.5 \pm 1.1 ^b |
| 安胃汤 | 60.5 \pm 1.9 ^{bd} | 29.7 \pm 1.9 ^{bd} | 1.77 \pm 0.13 ^{bd} | 29.6 \pm 2.6 ^{bd} | 72.6 \pm 1.9 ^{bd} | 67.0 \pm 2.0 ^{bd} |
| 正常对照 | 20.9 \pm 1.7 ^b | 10.4 \pm 1.8 ^b | 0.91 \pm 0.06 ^b | 15.8 \pm 0.9 ^b | 121.8 \pm 5.1 ^b | 8.5 \pm 0.6 ^b |

^b $P < 0.01$ vs 模型; ^d $P < 0.01$ vs 雷尼替丁.

显著意义($P < 0.05$); 安胃汤组和雷尼替丁组均能较模型组明显减少黏膜肌层缺损度($P < 0.01$), 安胃汤组与雷尼替丁组比较差异有显著性意义($P < 0.05$, 表1).

2.2 大鼠血清EGF 安胃汤组和雷尼替丁组均能较模型组和正常对照组明显增加大鼠胃溃疡血清EGF水平($P < 0.01$), 安胃汤组与雷尼替丁组比较差异有显著意义($P < 0.05$, 表1).

2.3 胃溃疡大鼠黏膜EGF表达 正常对照组大鼠EGF的表达为弱阳性, 定位于细胞质, 主要集中在胃腺颈部, 阳性表达以胃黏膜的壁细胞、颈部细胞为主. 模型组、雷尼替丁组和安胃汤组溃疡边缘组织阳性表达的细胞逐渐增多, 强阳性表达细胞可见. 雷尼替丁组和安胃汤组表达强于模型组及正常对照组($P < 0.01$), 安胃汤组表达强于雷尼替丁组($P < 0.01$, 表2).

2.4 胃溃疡大鼠黏膜EGFR表达 正常对照组大鼠胃黏膜EGFR表达分布在胃腺颈部、基底部, 以弱阳性为主, 定位于胃黏膜的壁细胞、颈黏液细胞的胞质及胞膜, 但以后者为主. 其余各组观察距溃疡边缘2 mm范围内黏膜层EGFR表达增强. 安胃汤组和雷尼替丁组均能较模型组和正常对照组明显增加大鼠胃溃疡EGFR的图像分析积分光密度、百分比($P < 0.01$), 安胃汤组与雷尼替丁组比较差异有显著意义($P < 0.01$, 表2).

2.5 胃溃疡大鼠黏膜TGF- β_1 表达 正常对照组大鼠TGF- β_1 的表达为弱阳性, 定位于细胞质, 在胃腺颈部、基底部都有表达, 阳性表达以胃黏膜的壁细胞、颈部细胞为主. 模型组、雷尼替丁组和安胃汤组溃疡边缘组织阳性表达的细胞逐渐增多, 强阳性表达细胞可见. 雷尼替丁组和安胃汤组表达强于模型组及正常对照组($P < 0.01$), 安胃汤组表达强于雷尼替丁组($P < 0.01$, 表2).

3 讨论

本结果表明, 安胃汤可以使再生黏膜厚度增加,

黏膜肌层缺损宽度减少, 说明有促进上皮组织再生和改善瘢痕修复能力的作用, 有提高再生黏膜结构成熟度的作用, 且安胃汤组优于雷尼替丁组($P < 0.05$). EGF是一种重要的生物活性肽, 不仅在血液中能检出, 还广泛存在消化道内, 能抑制胃酸分泌和促进组织、细胞内DNA、RNA及蛋白质的合成, 加速适应性溃疡的愈合^[4]. 同时EGF具有促进上皮增殖, 组织修复和细胞保护作用, 在保护胃黏膜免受损伤因子破坏, 维持胃肠黏膜完整性方面起着非常重要的作用^[5], 这些作用是由EGFR介导的. 人及其他哺乳动物的胃肠道广泛存在EGFR, 以黏膜层的含量较高, 胃黏膜受到损伤时(如溃疡), 其黏膜层EGFR表达大量增加^[6], EGFR的增加除了介导黏膜上皮细胞的分裂、修复外, 还介导减少胃酸的分泌^[7]. 本组结果显示, 安胃汤和雷尼替丁治疗后, 安胃汤能显著增加血清EGF水平, 胃溃疡周围EGF和EGFR表达增强, 说明安胃汤可刺激腺上皮细胞分泌EGF, 并且通过显著增加胃溃疡周围EGF和EGFR表达, 加速溃疡的愈合. 另外, 我们发现大鼠胃黏膜组织EGF与胃黏膜EGFR的表达有同步性, 且与胃溃疡愈合质量一致, 进一步说明EGF与EGFR的有效结合, 增加了细胞内DNA、RNA和蛋白质合成, 抑制了胃酸的分泌, 增加了胃黏膜血流量, 从而提高了胃溃疡的愈合质量, 发挥了抗溃疡作用, 且安胃汤优于雷尼替丁($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$). 我们观察到安胃汤增强胃溃疡周围组织的EGF及胃溃疡边缘上皮细胞EGFR的表达, 由此推测安胃汤提高胃溃疡愈合质量可能是由受体介导的, 同时表明安胃汤可通过促进或稳定胃黏膜上皮细胞膜EGFR水平来促进胃溃疡愈合的.

TGF- β 为多功能的多肽生长因子, 哺乳动物的TGF- β 有 β_1 , β_2 , β_3 三种亚单位, 其中以TGF- β_1 的含量最高, 作用最重要^[8], 其在溃疡病中, 除

■创新盘点

本文应用在体动物模型, 深入、系统地 从血清EGF、胃黏膜EGF、EGFR及TGF- β 探讨中药治疗慢性胃溃疡的作用机制, 从细胞分子水平上阐释名老中医学术理论的科学性, 为更好的研究和继承提供新的思路.

■应用要点

本研究为将复方中药安胃汤开发成防治慢性胃溃疡的中药新药提供理论和基础实验依据. 该项目预期成果将有益于广大消化性溃疡患者的治疗和提高溃疡愈合质量. 临床应用还表明该方治疗费用经济, 仅为国内现投入于临床应用同类抗溃疡中成药费用的1/3.

■同行评价

本文讨论了安胃汤对乙酸所致胃溃疡模型的干预与治疗作用,方法尚可行,科学性、先进性较好,但于本量小和方法稍显单一。

作为化学趋化剂趋化炎症细胞与组织修复细胞向创面聚集外,本身还能直接作用于成纤维细胞、刺激细胞外基质(ECM)中I型前胶原合成、肉芽组织生长及修复后期的组织改建^[9]。本结果显示,正常组胃黏膜层、黏膜下层和肌层即有较弱的TGF- β_1 表达,实验性胃溃疡愈合时,除正常组外TGF- β_1 的表达都增高,其阳性染色可见于肉芽组织,故推测TGF- β_1 可能通过自分泌和旁分泌的方式参与炎症细胞和成纤维细胞的迁移,由此诱导肉芽组织的形成,从而在胃溃疡组织的重建中起重要作用。

血清EGF水平和胃黏膜EGF、EGFR及TGF- β_1 的表达同属增强黏膜保护因子,本实验研究发现大鼠血清EGF水平和胃黏膜EGF、EGFR及TGF- β_1 的表达与溃疡愈合呈正相关,以此我们推测,安胃汤可能通过提高血清EGF水平和增强胃黏膜EGF、EGFR及TGF- β_1 的表达而促进溃疡愈合,可能是安胃汤提高溃疡愈合质量的重要机制。

4 参考文献

- 1 林寿宁. 中医临床家-林沛湘. 北京: 中国中医药出版社, 2001: 99-117
- 2 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1333-1334
- 3 杨雪松, 李益农, 叶嗣懋, 董秀云. 大鼠胃溃疡愈合质量与抗强的松再损伤关系的实验研究. 北京医科大学学报 1996; 28: 454-456
- 4 许春娣. 表皮生长因子在消化性溃疡愈合中的作用. 国外医学儿科学分册 1997; 24: 123-126
- 5 Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, Ernst H. Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha: role in protection and healing of gastric mucosal lesions. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 933-937
- 6 Tarnawski A, Stachura J, Durbin T, Sarfeh IJ, Gergely H. Increased expression of epidermal growth factor receptor during gastric ulcer healing in rats. *Gastroenterology* 1992; 102: 695-698
- 7 Joshi V, Ray GS, Goldenring JR. Inhibition of parietal cell acid secretion is mediated by the classical epidermal growth factor receptor. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1194-1198
- 8 Takenoshita S, Fukushima T, Kumamoto K, Iwade M. The role of TGF- β in digestive organ disease. *Gastroenterology* 2002; 37: 991-999
- 9 Lempinen M, Inkinen K, Wolff H, Ahonen J. Connective tissue growth factor in indomethacin-induced rat gastric ulcer. *Eur Surg Res* 2002; 34: 232-238

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

第十一届全国胰腺外科学术研讨会征文

本刊讯 中华医学会外科学分会胰腺外科学组定于2006-09-08/11在西部高原城市青海省西宁市举行第十一届全国胰腺外科学术研讨会,届时将邀请全国普外科百位知名专家到会就胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范进行专题讨论,欢迎全国普外科同仁参加此次研讨会,共同商定我国胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范。

投稿及联系事项: 北京协和医院基本外科, 李丽君. 截稿日期2006-06-30. 通信地址: 北京市东城区王府井大街帅府园1号, 邮编: 100730. 联系电话: 010-65296021, 010-65296016; 传真: 010-65296021.

HSP70-肿瘤肽复合物的纯化及其对肝癌细胞株HepG-2增殖的作用

隋春阳, 李航宇, 胡 勇, 宗志红, 李洪秀, 郭仁宣

隋春阳, 胡勇, 李洪秀, 郭仁宣, 中国医科大学第一临床学院
普外二科 辽宁省沈阳市 110001

李航宇, 中国医科大学第二临床学院微创外科 辽宁省沈阳市 110001

宗志红, 中国医科大学生化教研室 辽宁省沈阳市 110001

隋春阳, 2004年中国医科大学博士, 主治医师, 主要从事肝胆外科疾病的研究。

通讯作者: 郭仁宣, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院普外科, sui-chun@163.com

电话: 024-23256666

收稿日期: 2006-05-08 接受日期: 2006-05-22

Purification of heat shock protein 70 peptide complex and its effect on proliferation of HepG-2 cells

Chun-Yang Sui, Hang-Yu Li, Yong Hu, Zhi-Hong Zong, Hong-Xiu Li, Ren-Xuan Guo

Chun-Yang Sui, Yong Hu, Hong-Xiu Li, Ren-Xuan Guo, the Second Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

Hang-Yu Li, Department of Minimally Invasive Surgery, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

Zhi-Hong Zong, Department of Biochemistry, China Medical University, Shenyang 110001, China

Correspondence to: Dr. Ren-Xuan Guo, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China. sui-chun@163.com

Received: 2006-05-08 Accepted: 2006-05-22

Abstract

AIM: To separate and purify heat shock protein 70 (HSP70) peptide complex from hepatocellular carcinoma (HCC) tissues by fast protein liquid chromatography (FPLC), and investigate its effect on the proliferation of HepG-2 cells.

METHODS: The mixture of proteins was derived from HCC tissues by means of splitting and centrifugation. Then the proteins were purified by affinity chromatography on concanavalin A-Sepharose and ion exchange chromatography with DEAE-Sepharcel. The obtained protein was identified by SDS-PAGE and Western blot for its molecular weight and property. Bradford meth-

od was used to measure the concentration of the protein. The growth of HepG-2 cells, which were stimulated by HSP-70 peptide complex (0.1, 0.5, 1, and 5 mg/L), was observed by MTT assay.

RESULTS: A protein band with a molecular weight of about 70 kDa was obtained and shown by SDS-PAGE, and it was confirmed to be the HSP70 by Western blot. Bradford method showed that a quantity of 1.5 mg HSP70 protein was obtained from every 10 g HCC tissues. After treatment with HSP-70 peptide complex, the value of optical density (OD) in HSP70 group was significantly higher at 24, 48, and 72 h than that in control group (0.1 mg/L: $t = -0.2500$, $P = 0.00$; $t = -0.1777$, $P = 0.001$; $t = -0.3094$, $P = 0.001$; 0.5 mg/L: $t = -0.2878$, $P = 0.00$; $t = -0.2044$, $P = 0.00$; $t = -0.3285$, $P = 0.00$; 1 mg/L: $t = -0.3118$, $P = 0.00$; $t = -0.2592$, $P = 0.00$; $t = -0.1994$, $P = 0.025$; 5 mg/L: $t = -0.4007$, $P = 0.00$; $t = -0.1302$, $P = 0.016$; $t = -0.2537$, $P = 0.005$), and the cell livability in HSP70 group was also significantly higher ($P < 0.01$).

CONCLUSION: The pure HSP70-peptide complex is obtained, and it can promote the growth of HepG-2 cells.

Key Words: HSP70-peptide complexes; Purification; Hepatocellular carcinoma; HepG-2; MTT; Western blot

Sui CY, Li HY, Hu Y, Zong ZH, Li HX, Guo RX. Purification of heat shock protein 70 peptide complex and its effect on proliferation of HepG-2 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1775-1779

摘要

目的: 应用快速蛋白液相色谱(FPLC)系统从肝癌组织中分离和纯化HSP70-肽复合物, 并研究其对肝癌细胞系HepG-2增殖的影响。

方法: 将组织进行匀浆、高速离心提取总蛋白后依次进行ConA-Sepharose亲和层析和DEAE-Sepharcel离子交换层析分离纯化, 所得

■背景资料

热休克蛋白70是生物界广泛存在的具有高度保守性质的蛋白, 他在肿瘤细胞中过度表达, 不仅对肿瘤细胞的保护、维持细胞的稳定有重要的作用, 而且在肿瘤细胞的免疫中也有重要的作用。因此, 建立一种简便可行的提取肿瘤细胞中的HSP70-肽复合物的方法并研究其对肿瘤细胞的作用机制成为今后更好的应用HSP70-肽复合物的一个前提。

■研究前沿

提取并纯化肿瘤组织中的HSP70-肽复合物是研究HSP70作用机制的一个重要前提,细胞外的HSP70-肽复合物对肿瘤细胞的作用上不清楚,因此探讨细胞外的HSP70-肽复合物对肝癌细胞系HepG-2增殖的影响成为我们研究的重点。

蛋白经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和Western blot进行蛋白分子质量及性质鉴定,Bradford法测定蛋白浓度;利用MTT方法检测HSP70-肽复合物对HepG-2细胞增长的情况。

结果:分离、纯化得到的蛋白经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、考马斯蓝鉴定为单一带,分子质量为70 kDa;Western blot结果证实为HSP70,每10 g组织最终获得1.5 mg的HSP70;HSP70刺激组12, 48, 72 h与对照组的A值之间有显著差异(0.1 mg/L: $t = -0.2500$, $P = 0.00$; $t = -0.1777$, $P = 0.001$; $t = -0.3094$, $P = 0.001$; 0.5 mg/L: $t = -0.2878$, $P = 0.00$; $t = -0.2044$, $P = 0.00$; $t = -0.3285$, $P = 0.00$; 1 mg/L: $t = -0.3118$, $P = 0.00$; $t = -0.2592$, $P = 0.00$; $t = -0.1994$, $P = 0.025$; 5 mg/L: $t = -0.4007$, $P = 0.00$; $t = -0.1302$, $P = 0.016$; $t = -0.2537$, $P = 0.005$),细胞存活率明显高于对照组($P < 0.01$)。

结论:使用本分离纯化方法可获得高纯度HSP70肽复合物;HSP70肽复合物可以促进HepG-2细胞的生长。

关键词: HSP70-肿瘤肽复合物; 纯化; 肝癌; HepG-2细胞系; Western blot; MTT

隋春阳, 李航宇, 胡勇, 宗志红, 李洪秀, 郭仁宣. HSP70-肿瘤肽复合物的纯化及其对肝癌细胞株HepG-2增殖的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1775-1779

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1775.asp>

0 引言

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是广泛存在于生物界(从原核生物到真核生物)中具有高度保守性质的蛋白质^[1]。大量的研究表明HSP70在包括肝癌在内的大多数的肿瘤中均有高表达^[2-6]。HSP70在肿瘤细胞中过度表达,不仅对肿瘤细胞的保护、维持细胞的稳定有重要的作用,而且在抑制肿瘤细胞凋亡的过程中也发挥着重要的作用^[7-12]。同时,源自肿瘤组织的HSP-肿瘤肽免疫宿主可激发持久的T细胞免疫,产生特异的抗肿瘤免疫效应^[13-16]。我们应用快速蛋白液相色谱(FPLC)系统从肝癌组织中分离和纯化HSP70-肿瘤肽复合物,并研究其对肝癌细胞系HepG-2增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 伴刀豆凝集素A琼脂糖凝胶(ConA-Sepharose)及DEAE-Sephacel (Pharmacia);兔抗人HSP70多克隆抗体(武汉博士德);HepG-2细胞

株(我院肿瘤研究所);标准胎牛血清(天津TBD生物技术有限公司);RPMI 1640培养液(美国Hyclone公司);FPLC层析系统。

1.2 方法 取肝癌组织(我院肝癌患者行手术切除后的肝癌组织)10 g剪碎后,加入10倍体积的Buffer A (NaHCO₃ 30 mmol/L pH 7.1, 内含0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L DTT及0.5 mmol/L PMSF),匀浆,4℃ 150 000 r/min超速离心3 h;取上清,过ConA-Sepharose 4B亲和层析柱(柱高15 cm,直径1.5 cm),收集不结合的洗脱液,透析液1 (Tris-HCl 10 mmol/L, 乙酸钠10 mmol/L, NaCl 10 mmol/L, EDTA 0.1 mmol/L, pH 7.5)过夜;Buffer C (Tris-HCl 20 mmol/L, 乙酸钠20 mmol/L, NaCl 20 mmol/L, EDTA 0.1 mmol/L, pH 7.5)平衡DEAE柱(DEAE-Sephacel, 柱高15 cm,直径1.0 cm),取浓缩后的样品上样,Buffer B (Tris-HCl 20 mmol/L, pH 7.4, 内含0.5 mmol/L NaCl)洗脱后,再用FPLC系统,Buffer D (NaCl 0.5 mol/L用Buffer C调)梯度洗脱后,收集各洗脱峰的蛋白,透析液2 (Tris-HCl 10 mmol/L)透析。上述洗脱液经100 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分子量及纯度的鉴定。常规制备100 g/L分离胶及40 g/L浓缩胶,样品经煮沸、离心处理后上样,浓缩胶电泳电压70 V,分离胶电压110 V,电泳时间约3 h,电泳后采用考马斯亮蓝染色。根据电泳结果,取含70 kDa蛋白的样品,用于Western blot试验:常规100 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至硝酸纤维素薄膜上,50 g/L脱脂奶粉包被2 h,兔抗人HSP70多克隆抗体(1:300)为一抗,辣根过氧化物标记的羊抗兔抗体(1:2000)作为二抗,DAB进行显色,观察并记录结果。蛋白质浓度测定采用Bradford法^[17]。HepG-2肝癌细胞株在含100 mL/L胎牛血清(FBS)的RPMI 1640培养基中常规培养,95%湿度,50 mL/L CO₂, 37℃。选生长状态好,处于对数生长期的细胞,按 5×10^7 /L的细胞浓度接种于96孔板,每孔100 μ L,培养24 h后更换培养基,对照组继续用RPMI 1640培养基,第2, 3, 4, 5组分别用含0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg/L HSP70-肿瘤肽复合物的RPMI 1640培养液继续培养,分别于24, 48, 72 h后行MTT分析。每孔加入MTT 20 μ L, 37℃继续培养4 h,小心吸弃孔内培养液,每孔加DMSO 200 μ L,震荡15 min,分别于0, 10, 30 min在酶标仪上测出波长570 nm处的吸光度A值。每组设3个复孔,取3次实验的平均数,比较各组细胞的存活率。各组

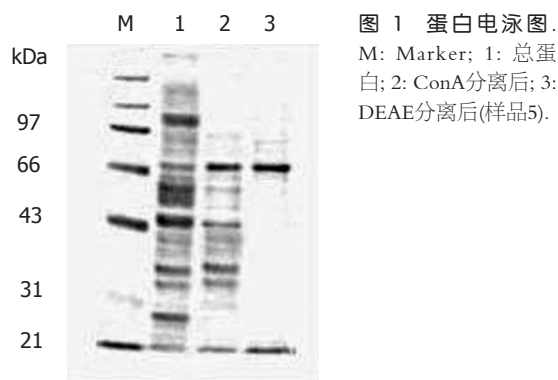


图1 蛋白电泳图。
M: Marker; 1: 总蛋白; 2: ConA分离后; 3: DEAE分离后(样品5)。

细胞存活率(%) = (实验组吸光度-空白组吸光度)/对照组吸光度-空白组吸光度) × 100%。

统计学处理 结果用SPSS 13.0软件包进行统计学分析, 各组间进行 t 检验; $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 HSP70-肿瘤肽复合物的纯化 细胞裂解液经ConA-Sepharose 4B层析后, 可分为ConA结合部分和不结合部分。不结合部分经电泳后在70 000处有一淡染的条带, 而在43 000以下也可见几条淡染的条带(图1)。将ConA不结合部分进一步用FPLC经DEAE柱进行分离, 梯度盐洗脱, 收集各洗脱峰的蛋白, 共有2个蛋白洗脱峰(图2), 电泳后于第2个峰发现为70 000的蛋白。上述 M_r 70 000的蛋白质用特异性Western blot法鉴定, 证实该蛋白确系热休克蛋白HSP70(图3)。10 g肝癌组织经上述分离纯化过程最终获得HSP70-肿瘤肽复合物总量为1.5 mg。

2.2 HSP70-肿瘤肽复合物对HepG-2的作用 不同浓度在不同时间点的各组与对照组相比较, HSP70-肿瘤肽复合物均对肝癌细胞株HepG-2有促进增殖作用($P < 0.01$, 表1, 图4)。而各浓度在同一时间内各组之间对肝癌细胞株HepG-2增殖的影响则无明显差异($P > 0.05$)。

3 讨论

HSP70是分子质量在70 kDa左右的热休克蛋白, 是热休克蛋白家族中最重要的一员, 被称为主要热休克蛋白。HSP70被称为分子伴侣, 因为他不参与目的蛋白的构成, 但可以通过与目的蛋白质或多肽在细胞中构成复合体, 并通过这种复合体的形成和解离而参与相关蛋白质的构象、折叠、跨膜转运及降解等重要生理功能^[18-20]。更为重要的是在应激状态下HSP可以为细胞提供保护^[1,21]。正常细胞中, HSP70的表达受

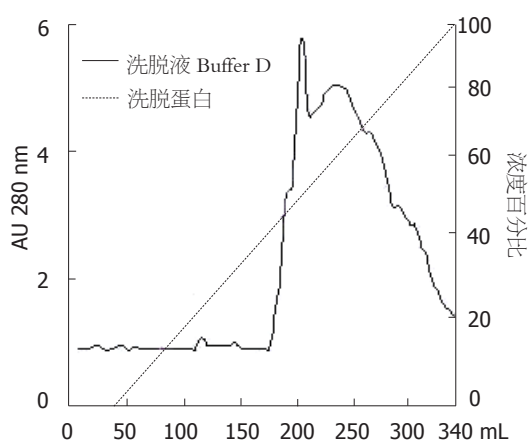


图2 DEAE离子交换层析洗脱蛋白峰。

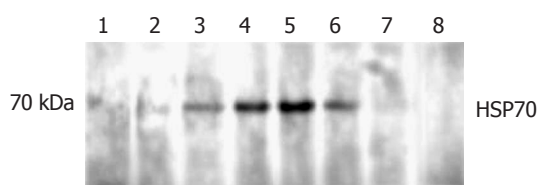


图3 Western blot显示洗脱蛋白3, 4, 5, 6含有HSP70。

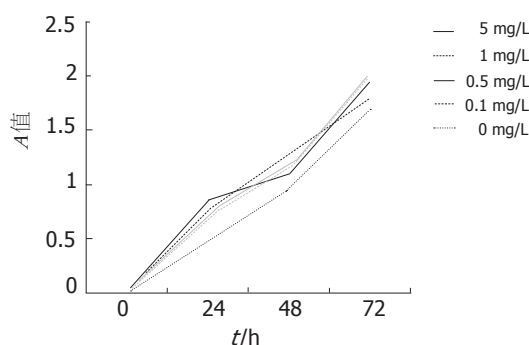


图4 不同浓度对肝癌细胞株HepG-2生长曲线。

细胞周期调控, 而肿瘤细胞中突变或异常蛋白质的存在刺激HSP70的合成, 使其呈现持续的高表达。研究结果显示肝癌组织中HSP70蛋白的表达与肿瘤的肝癌分化程度密切相关, 低分化的肝癌组织中HSP70蛋白的表达显著高于高分化的肝癌组织。可见, HSP70蛋白与肝癌的进展密切相关^[22-24]。HSP70在肿瘤细胞中过度表达, 不仅对肿瘤细胞的保护、维持细胞的稳定有重要的作用, 而且在抑制肿瘤细胞凋亡的过程中也发挥着重要的作用^[7-12]。同时, 源自肿瘤组织的HSP-肿瘤肽免疫宿主可激发持久的T细胞免疫, 产生特异的抗肿瘤免疫效应^[13-16]。然而, HSP70在肿瘤细胞中的作用机制及其对肿瘤细胞的发生、发展的影响, 仍有许多不清楚甚至矛盾的

■创新盘点

本研究借鉴国外一些研究方法, 结合国内一般实验室的条件, 建立了一种较方便有效的提取纯化方法, 同时证明了不仅细胞内的HSP70可以保护肝癌细胞, 细胞外的HSP70-肽复合物同样也可以促进肝癌细胞的增殖。

■名词解释

层析分离技术: 是一种物理分离方法, 利用混合物中各组分物理化学性质的差别(如吸引力、分子形状和大小、分子极性、分子亲和力等), 使各组分以不同程度分布在固定相和流动相中, 从而使各组分以不同的速度移动而达到分离。

表 1 HSP70-肿瘤肽复合物对肝癌细胞株HepG-2的影响

| | (mg/L) | <i>n</i> | <i>A</i> 平均值 (mean ± SD) | 细胞存活率 (%) | <i>t</i> | <i>P</i> |
|------|--------|----------|--------------------------|-----------|------------|----------|
| 24 h | 0 | 24 | 0.446 ± 0.174 | 100.0 | | |
| | 0.1 | 9 | 0.696 ± 0.855 | 156.1 | -0.250 000 | 0.00 |
| | 0.5 | 9 | 0.733 ± 0.864 | 164.6 | -0.287 778 | 0.00 |
| | 1 | 9 | 0.757 ± 0.123 | 170.0 | -0.311 778 | 0.00 |
| | 5 | 9 | 0.846 ± 0.091 | 190.0 | -0.400 667 | 0.00 |
| 48 h | 0 | 24 | 0.971 ± 0.112 | 100.0 | | |
| | 0.1 | 9 | 1.149 ± 0.207 | 118.3 | -0.177 653 | 0.001 |
| | 0.5 | 9 | 1.176 ± 0.134 | 121.1 | -0.204 431 | 0.00 |
| | 1 | 9 | 1.230 ± 0.064 | 126.7 | -0.259 208 | 0.00 |
| | 5 | 9 | 1.101 ± 0.148 | 113.4 | -0.130 208 | 0.016 |
| 72 h | 0 | 24 | 1.698 ± 0.200 | 100.0 | | |
| | 0.1 | 9 | 2.007 ± 0.307 | 118.2 | -0.309 389 | 0.001 |
| | 0.5 | 9 | 2.026 ± 0.266 | 119.4 | -0.328 500 | 0.00 |
| | 1 | 9 | 1.897 ± 0.181 | 111.7 | -0.199 389 | 0.025 |
| | 5 | 9 | 1.952 ± 0.155 | 114.9 | -0.253 722 | 0.005 |

地方, 因此, 提取肿瘤细胞中的HSP70-肽复合物成为进一步研究其作用的前提。

HSP70在细胞中的含量低, 提取HSP70-肽复合物工艺极其复杂。我们采用二步蛋白纯化法, 即ConA亲和层析法、阴离子交换蛋白亲和层析法等二个步骤, 从人肝癌组织中成功提取了HSP70-肽复合物并获得较高的效率。ConA亲和层析法选择性强、分离效率高, 是提取过程中的一个重要环节。已知糖蛋白可与ConA特异性结合, 利用这种生物大分子与其配体之间所具有的专一性亲和力作亲和层析, 能产生纯化作用, 而且其分离快速的优点对分离含量少又极不稳定的活性物质更有利。本实验中, 样品经过ConA亲和层析柱后, 能与ConA相互作用的糖蛋白则被阻留在柱上, 从而将糖蛋白与非糖蛋白分离。DEAE层析应用快速蛋白纯化仪可缩短实验准备和运行所需的时间, 减少HSP70蛋白降解, 提高实验结果的可靠性和重复性。对蛋白质进一步的定性定量分析证实: 采用此分离纯化方法得到的蛋白质确系HSP70。肿瘤在发生、发展过程中同时也伴随着肿瘤细胞的死亡, 这也就意味着有大量的HSP70-肽复合物释放到肿瘤细胞外, 这些细胞外的HSP70-肽复合物对肿瘤细胞的直接作用目前尚不清楚。本实验通过从肝癌组织中提取的HSP70-肽复合物刺激肝癌细胞株HepG-2, 利用MTT方法观察HSP70-肽复合物对肝癌细胞株HepG-2增殖的影响。实验结果表明, 与对照组相比, 不同浓度组在不同的观察时间点均显示出HSP70-肽复合物可以促进肝癌

细胞株HepG-2增殖($P < 0.01$), 各浓度之间对肝癌细胞株HepG-2增殖的影响则无差异($P > 0.05$)。

本结果表明不仅细胞内的HSP70可以保护肝癌细胞, 细胞外的HSP70-肽复合物同样也可以促进肝癌细胞的增殖。至于HSP70-肽复合物如何作用于肝癌细胞, 我们考虑可能是HSP70-肽复合物通过肝癌细胞表面表达的某些受体(如TLR4, CD40等)或直接穿过细胞膜而对细胞的增殖发生影响。Novoselova *et al*^[25]的研究表明HSP70可以通过穿过细胞膜而保护细胞、抑制凋亡。Jones *et al*^[26]的研究表明外源性HSP70是前列腺凋亡的抑制子。至于细胞外的HSP70-肽复合物对肝癌细胞株HepG-2增殖的影响是否也与细胞内的HSP70的作用机制一样, 则需进一步的实验证实。

4 参考文献

- 1 Jaattela M. Heat shock proteins as cellular lifeguards. *Ann Med* 1999; 31: 261-271
- 2 Garcia-Bermejo L, Vilaboa NE, Perez C, Galan A, De Blas E, Aller P. Modulation of heat-shock protein 70 (HSP70) gene expression by sodium butyrate in U-937 promonocytic cells: relationships with differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res* 1997; 236: 268-274
- 3 Lebre T, Watson RW, Molinie V, O'Neill A, Gabriel C, Fitzpatrick JM, Botto H. Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 970-977
- 4 Wang XP, Qiu FR, Liu GZ, Chen RF. Correlation between clinicopathology and expression of heat shock protein 70 and glucose-regulated protein 94 in human colonic adenocarcinoma. *World J*

- Gastroenterol* 2005; 11: 1056-1059
- 5 Joo M, Chi JG, Lee H. Expressions of HSP70 and HSP27 in hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci* 2005; 20: 829-834
- 6 Wang XP, Wang QX, Li HY, Chen RF. Heat shock protein 70 chaperoned alpha-fetoprotein in human hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5561-5564
- 7 Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, Teshigawara K, Uchida A. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat-shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 40: 73-78
- 8 Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jaattela M. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 7871-7876
- 9 Nylandsted J, Wick W, Hirt UA, Brand K, Rohde M, Leist M, Weller M, Jaattela M. Eradication of glioblastoma, and breast and colon carcinoma xenografts by Hsp70 depletion. *Cancer Res* 2002; 62: 7139-7142
- 10 Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2004; 101: 227-257
- 11 Didelot C, Schmitt E, Brunet M, Maingret L, Parcellier A, Garrido C. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol* 2006; 171-198
- 12 Schmitt E, Maingret L, Puig PE, Rerole AL, Ghiringhelli F, Hammann A, Solary E, Kroemer G, Garrido C. Heat shock protein 70 neutralization exerts potent antitumor effects in animal models of colon cancer and melanoma. *Cancer Res* 2006; 66: 4191-4197
- 13 Li Z. Priming of T cells by heat shock protein-peptide complexes as the basis of tumor vaccines. *Semin Immunol* 1997; 9: 315-322
- 14 傅庆国, 孟凡东, 郭克建, 郭仁宣. 肿瘤热休克蛋白70对几种Th1型细胞因子的诱升作用. *肿瘤防治杂志* 2003; 10: 250-252
- 15 Wang XH, Qin Y, Hu MH, Xie Y. Dendritic cells pulsed with hsp70-peptide complexes derived from human hepatocellular carcinoma induce specific anti-tumor immune responses. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5614-5620
- 16 Robert J. Evolution of heat shock protein and immunity. *Dev Comp Immunol* 2003; 27: 449-464
- 17 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2001: 41-46
- 18 Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002; 295: 1852-1858
- 19 Arispe N, Doh M, Simakova O, Kurganov B, De Maio A. Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability. *FASEB J* 2004; 18: 1636-1645
- 20 Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 670-684
- 21 Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993; 259: 1409-1410
- 22 王小平, 刘国贞, 宋爱利, 廖静, 陈瑞芬, 郎振为. 人肝癌组织热休克蛋白70的表达. *首都医科大学学报* 2004; 25: 186-188
- 23 Lim SO, Park SG, Yoo JH, Park YM, Kim HJ, Jang KT, Cho JW, Yoo BC, Jung GH, Park CK. Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2072-2079
- 24 吴顺华, 成军, 郑玉建. 热休克蛋白家族与肝癌的关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1725-1730
- 25 Novoselova TV, Margulis BA, Novoselov SS, Sapozhnikov AM, van der Spuy J, Cheetham ME, Guzhova IV. Treatment with extracellular HSP70/HSC70 protein can reduce polyglutamine toxicity and aggregation. *J Neurochem* 2005; 94: 597-606
- 26 Jones EL, Zhao MJ, Stevenson MA, Calderwood SK. The 70 kilodalton heat shock protein is an inhibitor of apoptosis in prostate cancer. *Int J Hyperthermia* 2004; 20: 835-849

■同行评价

肝癌组织HSP70表达与肝癌分化密切相关,并在维持肝癌细胞稳定及抑制凋亡中起重要作用,本研究采用二步纯化法获得高比率HSP70-肽复合物,并证明可促进HepG-2细胞生长,故对肝癌实验研究具有重要意义.设计观测科学,结论可信,能较好地反映我国或国际胃肠病学基础研究的先进水平.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

抗癌胚抗原单链抗体的原核表达及对人胃癌的检测

徐宏勇, 徐立, 高建宏, 杨建军, 李开宗, 窦科峰

■背景资料

癌胚抗原(CEA)是胃肠道恶性肿瘤产生的一种肿瘤标志物。人们通过检测CEA以判断肿瘤的性质及预后,也可通过获取CEA单抗治疗肿瘤。本文采用抗CEA单抗筛选胃癌细胞,检测胃癌组织,进而为进一步胃癌的治疗奠定基础。

徐宏勇, 高建宏, 杨建军, 解放军第451医院肝胆普外科 陕西省西安市 710054

徐立, 第四军医大学西京医院全军消化病研究所 陕西省西安市 710032

李开宗, 窦科峰, 第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西安市 710032

徐宏勇, 2003年第四军医大学博士, 主治医师, 主要从事肝胆肿瘤疾病及免疫学治疗、肝移植等研究。

国家自然科学基金项目, No. 39900068

西安市科技攻关计划项目, No. GG05168

通讯作者: 徐宏勇, 710054, 陕西省西安市友谊东路269号, 解放军第451医院肝胆普外科. hongyongxu@medmail.com
电话: 029-84734128

收稿日期: 2006-04-16 接受日期: 2006-05-11

Prokaryotic expression of anti-carcinoembryonic single-chain variable fragment and its value in detection of gastric carcinoma cells

Hong-Yong Xu, Li Xu, Jian-Hong Gao, Jian-Jun Yang, Kai-Zong Li, Ke-Feng Dou

Hong-Yong Xu, Jian-Hong Gao, Jian-Jun Yang, Department of Hepatobiliary Surgery, the 451st Hospital of Chinese PLA, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China

Li Xu, Institute of Digestive Disease, Xijing Hospital, the Fourth Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Kai-Zong Li, Ke-Feng Dou, Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39900068 and the Key Project from Science and Technology Foundation of Xi'an, Shaanxi Province, No. GG05168

Correspondence to: Dr. Hong-Yong Xu, Department of Hepatobiliary Surgery, the 451st Hospital of Chinese PLA, 269 Youyi East Road, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China. hongyongxu@medmail.com.cn

Received: 2006-04-16 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To study the prokaryotic expression of the anti-carcinoembryonic antigen (CEA) single-chain fragment variable (scFv) antibody T84.66 and its specific affinity to gastric cancer cell lines and tissues.

METHODS: The cDNA of anti-CEA scFv antibody was inserted into pCANTAB5E to obtain phage vector T84.66-scFv-pCANTAB5E,

and then the vector was transferred into *E. coli* HB2151. Isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) was used to induce the expression of anti-CEA scFv antibody. SDS-PAGE and Western blot were used identify the anti-CEA scFv antibody. Human gastric cancer cells were cultured, and CEA was determined with the obtained scFv by immunohistochemistry in the cells and paraffin-embedded gastric carcinoma tissues.

RESULTS: SDS-PAGE and Western blot showed that the anti-CEA scFv antibody T84.66 was successfully expressed. T84.66 could bind to gastric carcinoma cell lines KATOIII, MKN45 and HGC-27, but not to SGC7901, GC803 and BGC823, suggesting that KATOIII, MKN45 and HGC-27 cells expressed CEA. For the 42 cases gastric carcinoma tissues, the positive rate of CEA in the early and progressive stage was 55% (6/11) and 61% (19/31), respectively, but no CEA expression was found in the 10 normal cases. CEA expression was significantly different between gastric cancer and normal tissues ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The prokaryotic expression of anti-CEA scFv antibody T84.66 is successfully achieved, and can be used to identify CEA. CEA is highly expressed in gastric cancer, but not in normal mucosa.

Key Words: Gastric carcinoma; Single-chain fragment variable antibody; Prokaryotic expression; Carcinoembryonic antigen

Xu HY, Xu L, Gao JH, Yang JJ, Li KZ, Dou KF. Prokaryotic expression of anti-carcinoembryonic single-chain variable fragment and its value in detection of gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1780-1784

摘要

目的: 探讨T84.66单链抗体的原核表达及对6种胃癌细胞系及胃癌组织的特异性亲和力。

方法: 将抗CEA单链抗体T84.66的cDNA插入噬菌粒载体pCANTAB5E, 获得噬菌粒载体T84.66-scFv-pCANTAB5E. 将后者转化入

E.coli HB2151, 经 β , D-异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达. 采用细胞培养及免疫细胞/组织化学方法, 检测胃癌细胞中及石蜡包埋的胃癌组织中的癌胚抗原表达.

结果: SDS-PAGE及Western blot证实, T84.66单链抗体蛋白分子正确表达. T84.66单链抗体可结合KATOⅢ, HGC-27和MKN45, 表明这3种细胞表达了特异性肿瘤抗原; 单链抗体不能结合SGC7901, GC803, BGC823. 42例胃癌组织癌胚抗原阳性率早期和进展期分别为55%(6/11)和61%(19/31), 在正常胃黏膜组织标本中无表达, 二者之间存在显著性差异($P<0.05$).

结论: KATOⅢ等胃癌细胞系可表达癌胚抗原. 后者在胃癌组织表达水平较高, 而正常胃组织不表达.

关键词: 胃癌细胞; 单链抗体; 原核表达; 癌胚抗原

徐宏勇, 徐立, 高建宏, 杨建军, 李开宗, 窦科峰. 抗癌胚抗原单链抗体的原核表达及对人胃癌的检测. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1780-1784

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1780.asp>

0 引言

癌胚抗原(CEA)是在胃肠道肿瘤的发生、发展过程中, 细胞表面及细胞内产生的一种正常细胞不能产生的肿瘤标志物^[1-2]. CEA的出现是胃肠道肿瘤的一个重要生物学特性, 通过对其进行检测就可判断肿瘤的性质及预后. 针对CEA获得的单克隆抗体/单链抗体在对肿瘤的诊治中的作用不容忽视^[3]. 我们用原核表达得到T84.66单链抗体^[4], 分别对6种胃癌细胞和胃癌组织进行检测, 以期初步明确抗CEA单抗对胃癌细胞组织的特异性识别, 并结合情况为进一步利用该抗体进行重组制备胃癌特异性杀伤淋巴细胞奠定基础^[5].

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌细胞系KATOⅢ, HGC-27, SGC7901, GC803, MKN45和BGC823均购自上海细胞生物研究所. KATOⅢ为悬浮生长, HGC-27, SGC7901, GC803, MKN45和BGC823均为贴壁生长. 上述细胞系均培养于含胎牛血清的RPMI 1640培养液中, 37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度条件下, 在其对数生长期传代. KATOⅢ细胞传代后将其经甩干机甩干载玻片, 其他

细胞贴壁于载玻片后用固定液固定20 min, 晾干备染. 胃癌与正常胃黏膜标本, 均取自第四军医大学西京医院2000/2003手术切除, 并经病理学检查证实的组织. 42例胃癌按国际病理学分级, 高、中和低分化型分别为7例、17例和18例. 患者按胃癌的临床分期, 早期和进展期分别为11例和31例. 同时, 取10例正常胃黏膜组织为活检后证实组织, 切片均经40 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 5 μ m连续切片, 贴于已经APES防脱片胶处理的载玻片上备染. 抗CEA特异性T84.66单链抗体由Anna Wu教授提供^[6-7]. 抗E-tag mAb/HRP购自Pharmacia公司.

1.2 方法 T84.66单抗的原核表达. 将抗CEA单链抗体T84.66的cDNA插入噬菌粒载体pCANTAB5E, 下游接有E-tag DNA序列, 得到噬菌粒载体T84.66-scFv-pCANTAB5E. 将后者转化入*E.coli* HB2151, 经 β , D-异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达, 单链抗体表达于细菌的胞质中^[8]. 经过冻干、纯化后, 用SDS-PAGE电泳, 可获得含E-tag的抗CEA scFv融合蛋白, 通过蛋白的原核表达, 并通过SDS-PAGE及Western blot检测E-tag分子标签(用抗E-tag mAb/HRP为抗体), 证实抗CEA单链抗体T84.66的蛋白分子的表达. 免疫组织化学方法操作步骤按文献^[9]所述, 稍有改动. 将二抗用抗E-tag mAb/HRP替代, 阳性对照为已知CEA表达阳性的大肠癌, 空白对照用PBS代替一抗, 阴性对照用无关抗体(抗乙脑病毒mAb)代替一抗. 将细胞贴壁并经固定的载玻片经PBS振洗3次后, 加入抗CEA scFv为一抗, 其他操作相同. 结果判定: 标本中细胞染色呈棕黄色, 且阳性细胞多于10%者为阳性; 无阳性细胞或阳性细胞少于10%, 或背景同空白对照者均判为阴性.

2 结果

2.1 T84.66单链抗体的原核表达 将在原核表达的抗CEA单链抗体T84.66蛋白粗提物经冻干纯化后, 得到抗CEA scFv-E-tag融合蛋白. 在SDS-PAGE电泳显示分子质量为29 kDa, 与理论值相符. 经过Western blot检测E-tag的表达, 证实位于E-tag分子标签上游的CEA特异性T84.66单链抗体蛋白分子得以正确表达(图1).

2.2 免疫细胞化学染色单链抗体可识别的CEA抗原阳性物质呈棕黄色细颗粒状, 主要分布在胃癌细胞及组织的细胞膜及细胞质中. 在胃癌细胞KATOⅢ, HGC-27和MKN45中, CEA抗原表

■ 研发前沿

癌胚抗原的研究一直是肿瘤学的热点问题. 单克隆抗体的使用由于受排异问题的影响受到限制, 对其改造不但解决了过敏反应, 而且保持了mAb的Fab段, 具有分子小、穿透力强等特点, 并且可以进行基因工程改造. 但目前易出现亲和力和下降、特异性差的问题, 因而使抗体扬长避短是十分重要的问题.

■创新亮点

本文使用T84.66单链抗体获取有效的表达方法,证明表达产物的生物活性,并对多种胃癌细胞、组织进行检测。

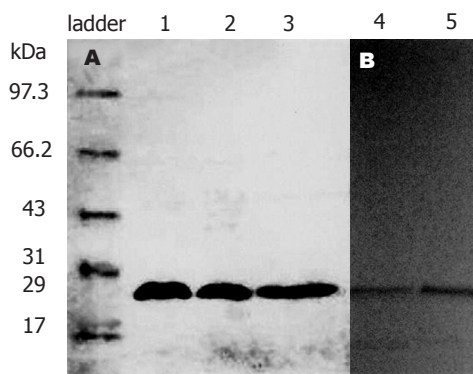


图1 A: SDS-PAGE; 抗CEA-单链抗体在SDS-PAGE电泳图谱; 1, 2, 3: 抗CEA-单链抗体; B: Western blot; 4, 5: 29 kDa 阳性条带。

达于细胞膜及细胞质中(图2A-B); 在SGC7901, GC803, BGC823中表达为阴性, 在胃癌组织癌巢周围呈散在分布(图2C). 空白及替代对照切片均为阴性. 42例胃癌组织阳性率分别为55%(6/11)和61%(19/31); 在正常胃黏膜组织标本中无表达。

3 讨论

胃肠道肿瘤发病率很高, 早期胃癌的手术切除率低, 辅助化疗疗效不满意^[10], 对CEA^[11-12], AFP^[13], CA199^[14], CA125^[15]和TAG-72^[16]等肿瘤特异性抗原的检测已广泛应用于临床诊治和判断肿瘤预后. 抗CEA mAb有包括来源于杂交瘤T84.66等数种^[17-18]. 将单克隆抗体进一步小型化将更利于生物工程改造, 或者可以得到抗CEA的diabody^[19], 这些T84.66单链抗体都避免了应用单克隆抗体的种属间过敏反应, 保持了mAb的Fab段, 具有分子小、穿透力强等特点, 尤其在放射诊治方面显示了优点^[20-22]. 嵌合微型抗体cT84.66是分子质量80 kDa的二价生物工程抗体, 对CEA的亲和力为 $4 \times 10^{10} \text{ m}^{-1}$ ^[23]. 将cT84.66进行同位素标记已经用于I期临床, 以治疗CEA阳性的原发癌及转移癌患者^[24-25]. 通过用CEA抗原锚定肿瘤细胞, 用免疫细胞以杀伤肿瘤是一种新的免疫治疗方案^[26]. 我们通过基因工程原理已构建了靶向性癌胚抗原T84.66的scFv融合基因的真核表达载体^[5], 为便于检测其表达, 通过单链抗体的原核表达, 往往在其cDNA分子下游有 $6 \times \text{His}$ ^[27]或E-tag分子标签, 我们得到的重组抗体通过检测E-tag可以明确T84.66 scFv的表达. 为明确T84.66单链抗体的亲和力及识别胃癌细胞及组织的阳性结合率, 通过用原核表达获得的T84.66单链抗体对6种胃癌细胞的亲和力鉴定, 证实可以和MKN45, KATOIII, HGC-27

■应用要点

证实单链抗体的活性对基因工程改造十分关键. 人们可以在此基础上通过创造性的引用治疗消化道肿瘤。

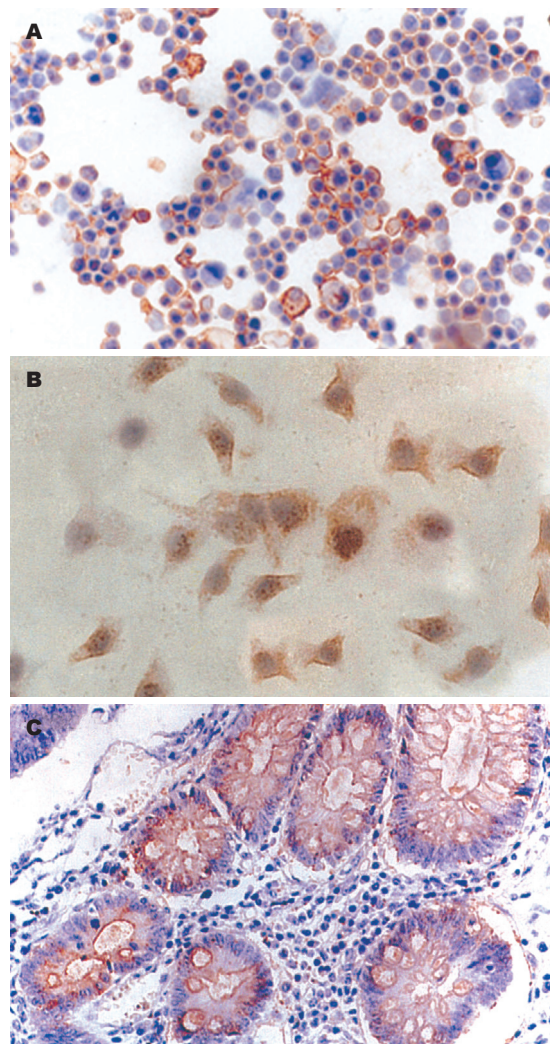


图2 胃癌中CEA的表达. A: KATO III; B: HGC-27; C: 胃癌组织。

特异性结合, 即上述几种胃癌细胞分化过程中产生了T84.66单链抗体可识别的CEA抗原, 证明胃癌细胞系中表达CEA阳性率较高, 这同时为胃癌的研究获取了宝贵的实验数据. 同时发现, T84.66单链抗体在胃癌中有较好的阳性率, 较高的亲和力, 而在胃黏膜正常组织不会结合, 即具有肿瘤识别特异性, 表明在胃癌组织和细胞中有较高的阳性率, 可望应用于临床实践。

通过构建单链抗体我们获取了表达的方法, 证实后者在胃癌等多种消化道肿瘤中有良好的表达, 这为我们构建的肿瘤特异性真核表达载体^[5]并制备特异性杀伤T细胞奠定了基础。

4 参考文献

- 1 Chau I, Allen MJ, Cunningham D, Norman AR, Brown G, Ford HE, Tebbutt N, Tait D, Hill M, Ross PJ, Oates J. The value of routine serum carcino-embryonic antigen measurement and computed

- tomography in the surveillance of patients after adjuvant chemotherapy for colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1420-1429
- 2 Wichmann MW, Lau-Werner U, Muller C, Hornung HM, Stieber P, Schildberg FW. Carcinoembryonic antigen for the detection of recurrent disease following curative resection of colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 4953-4955
- 3 Li L, Yazaki PJ, Anderson AL, Crow D, Colcher D, Wu AM, Williams LE, Wong JY, Raubitschek A, Shively JE. Improved biodistribution and radioimmunoimaging with poly(ethylene glycol)-DOTA-conjugated anti-CEA diabody. *Bioconjug Chem* 2006; 17: 68-76
- 4 Yazaki PJ, Sherman MA, Shively JE, Ikle D, Williams LE, Wong JY, Colcher D, Wu AM, Raubitschek AA. Humanization of the anti-CEA T84.66 antibody based on crystal structure data. *Protein Eng Des Sel* 2004; 17: 481-489
- 5 徐立, 徐宏勇, 樊代明. 胃肠道肿瘤靶向抗癌胚抗原单抗抗体与T细胞表面受体基因的融合分子构建. *中华消化杂志* 2004; 24: 75-77
- 6 Carmichael JA, Power BE, Garrett TP, Yazaki PJ, Shively JE, Raubitschek AA, Wu AM, Hudson PJ. The crystal structure of an anti-CEA scFv diabody assembled from T84.66 scFvs in V(L)-to-V(H) orientation: implications for diabody flexibility. *J Mol Biol* 2003; 326: 341-351
- 7 Olafsen T, Cheung CW, Yazaki PJ, Li L, Sundaresan G, Gambhir SS, Sherman MA, Williams LE, Shively JE, Raubitschek AA, Wu AM. Covalent disulfide-linked anti-CEA diabody allows site-specific conjugation and radiolabeling for tumor targeting applications. *Protein Eng Des Sel* 2004; 17: 21-27
- 8 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 2002: 49-56
- 9 梁英杰, 黎红, 赖英荣. 免疫组织化学LDP染色法在病理诊断中的应用. *中华病理学杂志* 1999; 28: 60-61
- 10 Chong G, Cunningham D. Gastrointestinal cancer: recent developments in medical oncology. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 453-460
- 11 Vernava AM 3rd, Longo WE, Virgo KS, Coplin MA, Wade TP, Johnson FE. Current follow-up strategies after resection of colon cancer. Results of a survey of members of the American Society of Colon and Rectal Surgeons. *Dis Colon Rectum* 1994; 37: 573-583
- 12 Yazaki PJ, Wu AM, Tsai SW, Williams LE, Ikler DN, Wong JY, Shively JE, Raubitschek AA. Tumor targeting of radiometal labeled anti-CEA recombinant T84.66 diabody and t84.66 minibody: comparison to radioiodinated fragments. *Bioconjug Chem* 2001; 12: 220-228
- 13 Cillo U, Navaglia F, Vitale A, Molari A, Basso D, Bassanello M, Brolese A, Zanusi G, Montin U, D'Amico F, Ciarleglio FA, Carraro A, Brida A, Burra P, Carraro P, Plebani M, D'Amico DF. Clinical significance of alpha-fetoprotein mRNA in blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 2004; 347: 129-138
- 14 Takeda M, Sakuragi N, Okamoto K, Todo Y, Minobe S, Nomura E, Negishi H, Oikawa M, Yamamoto R, Fujimoto S. Preoperative serum SCC, CA125, and CA19-9 levels and lymph node status in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2002; 81: 451-457
- 15 Gadducci A, Cosio S, Carpi A, Nicolini A, Genazzani AR. Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer. *Biomed Pharmacother* 2004; 58: 24-38
- 16 徐宏勇, 徐立, 李开宗, 窦科峰, 付由池, 刘彦仿. 靶向性肿瘤相关抗原TAG-72的scFv-CD28融合基因的真核表达载体的构建. *中国普外基础与临床杂志* 2002; 9: 398-401
- 17 Pavoni E, Flego M, Dupuis ML, Barca S, Petronzelli F, Anastasi AM, D'Alessio V, Pelliccia A, Vaccaro P, Monteriu G, Ascione A, De Santis R, Felici F, Cianfriglia M, Minenkova O. Selection, affinity maturation, and characterization of a human scFv antibody against CEA protein. *BMC Cancer* 2006; 6: 41
- 18 Kenanova V, Olafsen T, Crow DM, Sundaresan G, Subbarayan M, Carter NH, Ikle DN, Yazaki PJ, Chatziioannou AF, Gambhir SS, Williams LE, Shively JE, Colcher D, Raubitschek AA, Wu AM. Tailoring the pharmacokinetics and positron emission tomography imaging properties of anti-carcinoembryonic antigen single-chain Fv-Fc antibody fragments. *Cancer Res* 2005; 65: 622-631
- 19 Perez L, Ayala M, Pimentel G, Bell H, Canaan-Haden L, Bequet M, Gonzalez LJ, Miranda M, Ravelo R, Roque L, Acevedo B, Oliva JP, Gavilondo JV. A multivalent recombinant antibody fragment specific for carcinoembryonic antigen. *Biotechnol Appl Biochem* 2006; 43: 39-48
- 20 Wu AM, Yazaki PJ, Tsai S, Nguyen K, Anderson AL, McCarthy DW, Welch MJ, Shively JE, Williams LE, Raubitschek AA, Wong JY, Toyokuni T, Phelps ME, Gambhir SS. High-resolution microPET imaging of carcinoembryonic antigen-positive xenografts by using a copper-64-labeled engineered antibody fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 8495-8500
- 21 Yazaki PJ, Shively L, Clark C, Cheung CW, Le W, Szpikowska B, Shively JE, Raubitschek AA, Wu AM. Mammalian expression and hollow fiber bioreactor production of recombinant anti-CEA diabody and minibody for clinical applications. *J Immunol Methods* 2001; 253: 195-208
- 22 Williams LE, Wu AM, Yazaki PJ, Liu A, Raubitschek AA, Shively JE, Wong JY. Numerical selection of optimal tumor imaging agents with application to engineered antibodies. *Cancer Biother Radiopharm* 2001; 16: 25-35
- 23 Wong JY, Chu DZ, Williams LE, Yamauchi DM, Ikle DN, Kwok CS, Liu A, Wilczynski S, Colcher D, Yazaki PJ, Shively JE, Wu AM, Raubitschek AA. Pilot trial evaluating an 123I-labeled 80-kilodalton engineered anticarcinoembryonic antigen antibody fragment (cT84.66 minibody) in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5014-5021
- 24 Wong JY, Shibata S, Williams LE, Kwok CS, Liu A, Chu DZ, Yamauchi DM, Wilczynski S, Ikle DN, Wu AM, Yazaki PJ, Shively JE, Doroshov JH, Raubitschek AA. A Phase I trial of 90Y-anti-carcinoembryonic antigen chimeric T84.66 radioimmunotherapy with 5-fluorouracil in patients with metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5842-5852
- 25 Wong JY, Chu DZ, Williams LE, Liu A, Zhan J, Yamauchi DM, Wilczynski S, Wu AM, Yazaki PJ, Shively JE, Leong L, Raubitschek AA. A phase I trial of (90)Y-DOTA-anti-CEA chimeric T84.66 (cT84.66) radioimmunotherapy in patients with

同行评价

该研究起点与层面较高, 研究内容特色, 结论有启发性, 有一定的学术价值。

- metastatic CEA-producing malignancies. *Cancer Biother Radiopharm* 2006; 21: 88-100
- 26 Arakawa F, Shibaguchi H, Xu Z, Kuroki M. Targeting of T cells to CEA-expressing tumor cells by chimeric immune receptors with a highly specific single-chain anti-CEA activity. *Anticancer Res* 2002; 22: 4285-4289
- 27 Wu AM, Wu JH, Singh T, Chu KC, Peumans WJ, Rouge P, Van Damme EJ. A novel lectin (Morniga M) from mulberry (*Morus nigra*) bark recognizes oligomannosyl residues in N-glycans. *J Biomed Sci* 2004; 11: 874-885

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告

本刊讯 由上海市胃肠肿瘤重点学科、日本早期胃癌检诊协会、上海交通大学瑞金医院消化肿瘤学科群共同主办“2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会”将于2006-11-09/11在上海召开。

1 会议内容

由日本及香港专家主讲: 功能性消化不良和早期胃癌的临床识别; 根除*H pylori*预防胃癌研究; 内镜诊断早期胃癌的深度及组织学类型; 早期胃癌EMR、ESD及外科手术治疗; 早期胃癌和大肠癌标本处理及病理检查规范及国际共识意见; 大肠锯齿状腺瘤、大肠癌及新生癌的诊断, 外科手术及综合治疗。

由中国专家主讲: 放大内镜诊断早期胃癌; 中国早期胃癌临床现状及前景; 胃肠肿瘤腹腔镜治疗; 大肠侧向生长型肿瘤诊治; 大肠癌早期诊断及筛查; 胶囊内镜、双气囊小肠镜及小肠超声内镜诊断小肠肿瘤及临床评估。

2 征文

征文内容包括胃癌、大肠癌、小肠肿瘤基础研究、流行病学调查, 早期胃肠癌诊断及治疗。论文(电子版)按中华消化杂志格式书写附500字以内中文摘要, 欢迎网上投稿。截止日期: 2006-08-10。来稿寄至: 上海市瑞金二路197号上海瑞金医院消化科 汤美萍 (请写明2006胃肠肿瘤大会稿件), 邮政编码: 200025。联系电话: 021-64370045-665246, E-mail: wuyunlin1951@163.com。

会议将授予国家继续教育 I 类学分8分。

螺旋CT在胃癌术前TNM分期中的应用价值

赵志清, 郑可国, 许达生

赵志清, 郑可国, 许达生, 中山大学附属第一医院放射科 广东省广州市 510080

赵志清, 1998年东南大学医学院学士, 2005年中山大学附属第一医院硕士, 医师, 现在深圳沙井人民医院放射科工作, 主要从事消化系统疾病的影像诊断。

通讯作者: 赵志清, 510080, 广东省广州市, 中山大学附属第一医院放射科. zq4480@yahoo.com.cn

电话: 0755-27722241-3808

收稿日期: 2006-04-28 接受日期: 2006-05-08

Value of spiral computed tomography in preoperative TNM staging for gastric cancer

Zhi-Qing Zhao, Ke-Guo Zheng, Da-Sheng Xu

Zhi-Qing Zhao, Ke-Guo Zheng, Da-Sheng Xu, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sun University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Correspondence to: Zhi-Qing Zhao, Department of Radiology, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-Sun University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China. zq4480@yahoo.com.cn

Received: 2006-04-28 Accepted: 2006-05-08

Abstract

AIM: To explore the accuracy of spiral computed tomography in the staging of gastric cancer, and to provide clinical guide for the treatment and prognosis analysis.

METHODS: Forty-five patients with gastric cancer received TNM staging by spiral computed tomography before operation. The results were comparatively analyzed with the surgical pathology.

RESULTS: The accuracy of SCT for T stage, N stage and M stage and total TNM staging were 75.6%, 73.3%, 86.7%, and 75.6%, respectively. If the attenuation values of more than or equal to 25 Hu in plain scan, or 70 Hu in arterial phase, or 80 Hu in venous phase were used as a criterion to detect the metastasis-positive lymph nodes, the sensitivity and specificity were 98.4% and 64.0%, respectively.

CONCLUSION: Spiral computed tomography is accurate in the preoperative TNM staging for

gastric cancer.

Key Words: Gastric cancer; Spiral computed tomography; TNM staging; Lymphadenopathy

Zhao ZQ, Zheng KG, Xu DS. Value of spiral computed tomography in preoperative TNM staging for gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1785-1789

摘要

目的: 探讨螺旋CT对胃癌术前TNM分期的准确性, 指导临床合理地制订治疗方案和进行预后分析。

方法: 术前对45例胃癌患者的腹部SCT资料进行TNM分期, 并与术后病理进行对照研究。

结果: 螺旋CT对胃癌T分期、N分期、M分期和TNM分期的准确率分别为75.6%、73.3%、86.7%和75.6%。如以平扫CT值 ≥ 25 Hu或动脉期CT值 ≥ 70 Hu或静脉期CT值 ≥ 80 Hu为诊断阳性淋巴结标准, 则阳性淋巴结的敏感性高达98.4%, 特异性为64.0%。

结论: 螺旋CT对胃癌的术前TNM分期可提供较高的准确率。

关键词: 胃癌; 螺旋CT; TNM分期; 淋巴结转移

赵志清, 郑可国, 许达生. 螺旋CT在胃癌术前TNM分期中的应用价值. *世界华人消化杂志* 2006;14(18):1785-1789

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1785.asp>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤, 其预后主要与肿瘤的TNM分期、组织学类型和分化程度等有关^[1-3]。能否彻底清除已有转移的淋巴组织是决定患者预后的最主要因素之一, 因此胃癌的术前分期对临床治疗方案的制定、估计预后等有着非常重要的意义^[4-7]。我们探讨螺旋CT(SCT)对胃癌术前TNM分期的准确性, 指导临床合理地制定胃癌的治疗方案和进行预后分析。

■背景资料

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤, 能否彻底清除已有转移的淋巴组织是决定患者预后的最主要因素之一, 因此胃癌的术前分期对临床治疗方案的制定、估计预后等有着非常重要的意义。本文旨在探讨SCT对胃癌术前TNM分期的准确性, 指导临床合理地制定胃癌的治疗方案和进行预后分析。

■同行评价

尽管有关螺旋CT在胃癌TNM分期中的研究国内外已见报道,但本文研究结果对指导胃癌治疗方案及预后评估仍有一定意义。文章逻辑性较强,数据客观,影像资料真实,有一定学术价值。

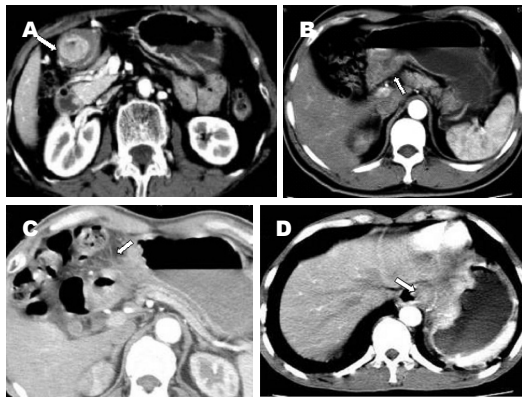


图1 胃癌的术前螺旋CT分期。A: T1期,胃窦部Borrmann I型; B: T2期,局部胃壁增厚,轻度强化,外缘光整,相邻脂肪间隙清晰(箭头); C: T3期,局部胃壁增厚,外缘不规则,相邻脂肪间隙密度增高,并见条状致密影(箭头); D: T4期,贲门癌侵犯食管腹段,形成突向食管腔内的肿块。



图2 胃癌淋巴结转移的螺旋CT表现。A: 第3组阳性淋巴结(箭头); B: 阳性淋巴结(病理证实),动脉期CT值135 Hu,明显强化; C: 阴性淋巴结(病理证实),静脉期CT值为-6 Hu,轻度强化。

1 材料和方法

1.1 材料 2003-2005年胃癌患者45例,男31例,女14例。年龄30-78(平均56)岁。所有患者术前均经胃镜活检证实,术后进行病理分期。

1.2 方法 CT检查采用的是东芝Xpress/sx螺旋CT机。全部病例于术前10 d内行螺旋CT检查。CT扫描前患者禁食8-12 h,检查前口服饮用水800-1000 mL。扫描层厚0.5 cm,扫描条件120 kV, 250 mAs,矩阵512×512,螺距为1。先行平扫,然后行双期增强扫描,对比剂用碘普胺注射液, I 浓度为300 g/L,总量按1.5 mL/kg,采用EN Vision CT高压注射器,流速3 mL/s,经肘静脉注射对比剂后27 s开始动脉期和60 s开始静脉期扫描。螺旋CT图像术前经两位腹部放射学高年资医师认真观察、测量和术前分期,并与手术病理进行对照。胃癌T分期主要参照

表1 T分期:螺旋CT与手术病理对照 (n = 45)

| 病理T分期 | 螺旋CT - T分期 | | | |
|-------|------------|----|----|----|
| | T1 | T2 | T3 | T4 |
| T1 | 3 | 2 | 1 | |
| T2 | | 2 | 1 | |
| T3 | | 2 | 20 | 2 |
| T4 | | | 3 | 9 |

表2 N分期:螺旋CT与手术病理对照 (n = 45)

| 病理N分期 | 螺旋CT - N分期 | | | |
|-------|------------|----|----|----|
| | N0 | N1 | N2 | N3 |
| N0 | 14 | 3 | | |
| N1 | 4 | 10 | | |
| N2 | | 2 | 5 | |
| N3 | | 2 | 1 | 4 |

Lee *et al*^[8]的螺旋CT诊断标准,胃癌N分期的标准采用国际抗癌联盟(international union control cancer, IUCC)公布的第5版为标准^[9]。淋巴结转移用其长径≥1.0 cm或增强后CT值≥100 Hu为转移阳性的标准^[3-10]。

统计学处理 测量所得的数据用SPSS 11.0统计学软件进行处理,各组间的数据以mean±SD表示,计量资料各组间均数比较用t检验,计数资料的比较用R×C表资料的 χ^2 检验,以 $P<0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T分期 胃癌45例螺旋CT的T分期准确率分别为: T1期50.0%(图1A), T2期66.7%(图1B), T3期83.3%(图1C), T4期75.0%(图1D),总T分期准确率为75.6%(表1)。

2.2 N分期 胃癌45例螺旋CT的N分期准确率分别为: N0期82.4%, N1期71.4%, N2期71.4%, N3期57.1%。总的N分期准确率为73.3%(表2)。

胃癌45例根治性手术者共摘取淋巴结869个。病理证实淋巴结转移阳性308个,阳性率为35.4%。螺旋CT共检出493个淋巴结,以第3组淋巴结最易被检出(图2A);术后病理报告为全阳性或全阴性的各组淋巴结共267个,阳性淋巴结123个(图2A-B),阴性淋巴结144个(图2C);其中平扫CT值≥25 Hu或动脉期CT值≥70 Hu或静脉期CT值≥80 Hu的淋巴结共有173个,其中阳性淋巴结有121个,阴性淋巴结有52个(表3)。

2.3 M分期 胃癌45例螺旋CT的M分期准确率分

别为: M0期100%, M1期45.5%(表4). 总的M分期准确率为86.7%.

2.4 总的TNM分期 45例胃癌螺旋CT TNM分期准确率为75.6%(表5).

3 讨论

本组结果显示螺旋CT对T1的准确率较低, 仅50%, 主要是因为相当于黏膜下层的低密度带观察不满意, 误判为肿瘤已侵犯黏膜下层. 螺旋CT对T2的准确率亦较低, 为66.7%, 主要是因为息肉型或隆起型病灶在螺旋CT图像上能见到完整的黏膜下层而误为T1, 而在病理检查时发现病灶已侵犯肌层, 因此确认相当于黏膜下层的低密度带完整性是区分T1和T2的关键, 有时这是很困难的, 因为这层低密度带可能是水肿, 也可能是脂肪沉积引起, 而非真正的黏膜下层^[10-13]. 螺旋CT对T3的准确率为83.3%, 相对较高; 误诊原因主要有2例胃癌病灶在螺旋CT图像上显示有光滑的边界而误为T2, 1例因胃壁与胰腺之间的脂肪层消失误为T4, 1例因胃壁与肝脏之间的脂肪层消失而误为T4. 螺旋CT对T4的准确率为75.0%, 晚期胃癌常侵犯胰腺、左肝、横结肠及肠系膜等邻近组织、器官, 最常侵犯的脏器是胰腺, 表现为胃胰间的脂肪层消失, 胰腺实质内出现低密度的异常强化灶. 胃癌对肝脏侵犯的CT表现为肿块与肝左叶黏连、分界不清或两者之间的脂肪层消失, 肝左叶实质内出现低密度灶, 在静脉期因正常肝实质明显强化而利于肝脏病灶显示^[14-20]. 本组研究提示螺旋CT总的T分期准确率较高(75.6%), 但早期胃癌T分期的准确性偏低, 如何提高早期胃癌的准确分期有待今后进一步研究.

淋巴结转移是胃癌的主要转移方式, 也是影响胃癌术前分期、手术方式选择和预后的一个重要因素, 因而术前影像学判断有无淋巴结转移具有重要的临床意义^[21-23]. 螺旋CT常低分胃癌的N分期, 且准确率不高. 主要是螺旋CT估断有无淋巴结转移较困难, 缺乏统一标准, 文献报道主要是依据淋巴结最大直径的大小、短轴与长轴之比、增强时有无强化等为标准. 而各学者的标准又互不相同, 部分学者以淋巴结的最大直径 $\geq 0.8-1.5$ cm为标准, 但绝大多数以直径 ≥ 1.0 cm为标准, 亦有以直径 ≥ 0.5 cm为标准者^[1-9, 13-18]. 以往文献绝大多数都是事先设定淋巴结的直径大于一定的值为转移, 再来评价胃癌淋巴结的转移情况, 众所周知, 标准以上的淋

表 3 以CT值平扫 ≥ 25 Hu或动脉期 ≥ 70 Hu或静脉期 ≥ 80 Hu为阳性淋巴结的判断标准: 病理与螺旋CT的对照 ($n = 267$)

| 淋巴结 | 螺旋CT | | 共计 |
|-----|-------|-------|-----|
| | 阳性淋巴结 | 阴性淋巴结 | |
| 阳性 | 121 | 2 | 123 |
| 阴性 | 52 | 92 | 144 |
| 共计 | 173 | 94 | 267 |

表 4 M分期: 螺旋CT与手术病理对照 ($n = 45$)

| 病理M分期 | 螺旋CT - M分期 | |
|-------|------------|----|
| | M0 | M1 |
| M0 | 34 | 0 |
| M1 | 6 | 5 |

表 5 TNM分期: 螺旋CT与手术病理对照 ($n = 45$)

| 病理分期 | 螺旋CT分期 | | | |
|------|--------|----|-----|----|
| | I | II | III | IV |
| I | 7 | 2 | | |
| II | 1 | 4 | 1 | |
| III | | 1 | 11 | 2 |
| IV | | | 4 | 12 |

巴结不全都是转移, 而部分转移的淋巴结的直径并不一定增大. 我们以平扫和增强后淋巴结的CT值为依据来判断淋巴结是否转移, 可见本组术后病理诊断为全阳组或全阴组的淋巴结共267个, 如以平扫CT值 ≥ 25 Hu或动脉期CT值 ≥ 70 Hu或静脉期CT值 ≥ 80 Hu为诊断阳性淋巴结标准, 则阳性淋巴结的敏感性高达98.4%, 特异性约为64.0%; 阳性淋巴结的敏感性和特异性均较理想, 值得推荐.

胃癌的M分期是指胃癌远处脏器的转移情况, 主要有腹腔内种植转移、血行转移. 当胃癌种植到卵巢时, 叫Krukenberg瘤, 常见于胃印戒细胞癌. 腹膜转移CT表现为网膜、系膜脂肪密度增高、模糊、腹壁结节、网膜饼、污垢样腹膜及腹水等. 胃癌血行转移时, 最常见的是转移至肝, 其次为肺、肾上腺、肾、骨和脑^[24-25]. 本组45例胃癌中M1期11例, 其中有4例手术发现有盆腔转移, 因仅作上腹部CT扫描, 而误为M0期, 有2例腹膜转移但无腹水患者, 在CT图像上因结节细小未发现, 而误为M0期. 胃癌总的TNM分

期的准确率取决于各分期的准确率,尤其是T分期与N分期的准确率。本组结果显示,螺旋CT具有较高的TNM分期准确率(75.6%),但对早期胃癌(I、II期胃癌)的分期准确率较低,主要与螺旋CT对早期胃癌的T分期准确率较低有关。从目前发表的文献来看,螺旋CT对胃癌总的TNM分期的准确率较EUS,普通CT, MRI的准确率高^[26-27],且为无创性检查,因此,螺旋CT是胃癌治疗前进行准确分期的首选检查方法。

总之,胃癌的术前螺旋CT检查具有较高的TNM分期准确率,目前已成为胃癌术前分期的一项常规检查。应用平扫CT值 ≥ 25 Hu或动脉期CT值 ≥ 70 Hu或静脉期CT值 ≥ 80 Hu为诊断阳性淋巴结标准,可提高对阳性淋巴结的判断。但对小淋巴结是否转移尚有一定的难度,有待今后进一步研究。

4 参考文献

- Sohn KM, Lee JM, Lee SY, Ahn BY, Park SM, Kim KM. Comparing MR imaging and CT in the staging of gastric carcinoma. *AJR Am J Roentgenol* 2000; 174: 1551-1557
- Gossios K, Tsianos E, Prassopoulos P, Papakonstantinou O, Tsimoyiannis E, Gourtsoyiannis N. Usefulness of the non-distension of the stomach in the evaluation of perigastric invasion in advanced gastric cancer by CT. *Eur J Radiol* 1998; 29: 61-70
- Motohara T, Semelka RC. MRI in staging of gastric cancer. *Abdom Imaging* 2002; 27: 376-383
- Tunaci M. Carcinoma of stomach and duodenum: radiologic diagnosis and staging. *Eur J Radiol* 2002; 42: 181-192
- Lim JS, Yun MJ, Kim MJ, Hyung WJ, Park MS, Choi JY, Kim TS, Lee JD, Noh SH, Kim KW. CT and PET in stomach cancer: preoperative staging and monitoring of response to therapy. *Radiographics* 2006; 26: 143-156
- Kim AY, Kim HJ, Ha HK. Gastric cancer by multidetector row CT: preoperative staging. *Abdom Imaging* 2005; 30: 465-472
- Tschmelitsch J, Weiser MR, Karpeh MS. Modern staging in gastric cancer. *Surg Oncol* 2000; 9: 23-30
- Lee DH, Seo TS, Ko YT. Spiral CT of the gastric carcinoma: staging and enhancement pattern. *Clin Imaging* 2001; 25: 32-37
- Yoo CH, Noh SH, Kim YI, Min JS. Comparison of prognostic significance of nodal staging between old (4th edition) and new (5th edition) UICC TNM classification for gastric carcinoma. *International Union Against Cancer. World J Surg* 1999; 23: 492-497; discussion 497-498
- Nishimata H, Maruyama M, Shimaoka S, Nishimata Y, Ohi H, Niihara T, Nioh T, Matsuda A, Tashiro K, Torimaru H. Early gastric carcinomas in the cardiac region: diagnosis with double-contrast x-ray studies. *Abdom Imaging* 2003; 28: 486-491
- Kim HJ, Kim AY, Oh ST, Kim JS, Kim KW, Kim PN, Lee MG, Ha HK. Gastric cancer staging at multi-detector row CT gastrography: comparison of transverse and volumetric CT scanning. *Radiology* 2005; 236: 879-885
- Gamon Giner R, Escrig Sos J, Salvador Sanchis JL, Ruiz del Castillo J, Garcia Vila JH, Marcote Valdivieso E. Helical CT evaluation in the preoperative staging of gastric adenocarcinoma. *Rev Esp Enferm Dig* 2002; 94: 593-600
- Stabile Ianora AA, Pedote P, Scardapane A, Memeo M, Rotondo A, Angelelli G. Preoperative staging of gastric carcinoma with multidetector spiral CT. *Radiol Med (Torino)* 2003; 106: 467-480
- Shimizu K, Ito K, Matsunaga N, Shimizu A, Kawakami Y. Diagnosis of gastric cancer with MDCT using the water-filling method and multiplanar reconstruction: CT-histologic correlation. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 185: 1152-1158
- Matsushita M, Oi H, Murakami T, Takata N, Kim T, Kishimoto H, Nakamura H, Okamoto S, Okamura J. Extraserosal invasion in advanced gastric cancer: evaluation with MR imaging. *Radiology* 1994; 192: 87-91
- D'Elia F, Zingarelli A, Palli D, Grani M. Hydrodynamic CT preoperative staging of gastric cancer: correlation with pathological findings. A prospective study of 107 cases. *Eur Radiol* 2000; 10: 1877-1885
- Kumano S, Murakami T, Kim T, Hori M, Iannaccone R, Nakata S, Onishi H, Osuga K, Tomoda K, Catalano C, Nakamura H. T staging of gastric cancer: role of multi-detector row CT. *Radiology* 2005; 237: 961-966
- Wei WZ, Yu JP, Li J, Liu CS, Zheng XH. Evaluation of contrast-enhanced helical hydro-CT in staging gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4592-4595
- Kang BC, Kim JH, Kim KW, Lee DY, Baek SY, Lee SW, Jung WH. Value of the dynamic and delayed MR sequence with Gd-DTPA in the T-staging of stomach cancer: correlation with the histopathology. *Abdom Imaging* 2000; 25: 14-24
- Yun M, Lim JS, Noh SH, Hyung WJ, Cheong JH, Bong JK, Cho A, Lee JD. Lymph node staging of gastric cancer using (18)F-FDG PET: a comparison study with CT. *J Nucl Med* 2005; 46: 1582-1588
- Mani NB, Suri S, Gupta S, Wig JD. Two-phase dynamic contrast-enhanced computed tomography with water-filling method for staging of gastric carcinoma. *Clin Imaging* 2001; 25: 38-43
- Rossi M, Broglia L, Maccioni F, Bezzi M, Laghi A, Graziano P, Mingazzini PL, Rossi P. Hydro-CT in patients with gastric cancer: preoperative radiologic staging. *Eur Radiol* 1997; 7: 659-664
- Lakadamyali H, Oto A, Akmangit I, Abbasoglu O, Sivri B, Akhan O, Besim A. The role of spiral CT in the preoperative evaluation of malignant gastric neoplasms. *Tani Girisim Radyol* 2003; 9: 345-353
- Cereceda Perez CN, Urbasos Pascual MI, Romero Castellanos C, Carreira Gomez C, Pinto Varela JM. Helical CT of the stomach: differentiation between benign and malignant pathologies, together with the staging of gastric carcinoma. *Rev Esp Enferm Dig* 2002; 94: 601-612
- Blackshaw GR, Stephens MR, Lewis WG, Boyce J, Barry JD, Edwards P, Allison MC, Thomas GV. Progressive CT system technology and experience improve the perceived preoperative stage of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2005; 8: 29-34

- 26 Habermann CR, Weiss F, Riecken R, Honarpisheh H, Bohnacker S, Staedtler C, Dieckmann C, Schoder V, Adam G. Preoperative staging of gastric adenocarcinoma: comparison of helical CT and endoscopic US. *Radiology* 2004; 230: 465-471
- 27 Chen F, Ni YC, Zheng KE, Ju SH, Sun J, Ou XL, Xu MH, Zhang H, Marchal G. Spiral CT in gastric carcinoma: comparison with barium study, fiberoptic gastroscopy and histopathology. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1404-1408

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会第二轮通知

本刊讯 第六届全国消化道恶性病变介入治疗研讨会于2006-09-15/18在浙江省杭州市举行. 本届会议由上海同仁医院和浙江省中医院联合主办, 中华放射学杂志、中华消化内镜杂志、世界华人消化杂志和介入放射学杂志共同协办. 会议将邀请众多著名专家围绕消化疾病介入诊治新热点及消化道内支架治疗的热门技术和疑难问题进行专题演讲和实例操作, 并就消化道支架治疗中的疑难病例和出现问题以沙龙形式深入研讨. 参会代表可获国家级继续教育 I 类学分12分.

1 会议主要议题

消化疾病诊治进展、消化内镜治疗新技术应用、化疗药物应用新进展、上消化道吻合口梗阻和瘘的综合治疗、胸腔胃穿瘘的支架封堵技术、肠道支架临床应用、肝门部胆道梗阻的内支架治疗、食管及胃肠道支架难点研讨以及其他介入新技术应用等.

2 征文内容

征集消化道恶性病变内镜治疗、介入放射治疗、外科治疗、肿瘤化学治疗、生物治疗及免疫治疗等方面的论著、文献综述、临床经验、个案报告等稿件. 欢迎消化、介入放射、肿瘤、普外胸外及、肝胆外科等相关学科医师投稿参会.

3 投稿要求

专题讲座由组委会约稿. 论著需1000字以内的标准论文摘要, 包括目的、方法、结果与结论四要素. 经验交流、短篇报道等全文限1000字以内. 所有稿件一律要求电脑打印用E-mail投稿, 邮寄者需附WORD格式软盘(请自留稿底, 恕不退稿).

4 报名地址及要求

联系地址: 杭州市邮电路54号(浙江省中医院)吕宾 收, 邮编: 310006, 电话: 0571-87032028, 手机: 13906515409, E-mail: lvlin@medmail.com.cn; 上海市愚园路786号(上海同仁医院)茅爱武 收, 邮编: 200050, 电话: 021-62524259-3397, 手机: 13371936559, E-mail: maoaw@sohu.com. 会议收费800元, 提前注册收费700元, 截稿日期: 2006-08-15.

5-羟色胺转运体基因多态性与肠易激综合征的相关性

张晓敏, 林志辉

■背景资料

人体95%的5-HT位于肠道, 5-HT与受体结合发挥作用后, 主要通过5-羟色胺转运体(SERT)再摄取, 以清除突触间多余的5-HT, 作为5-HT活动的终点。SERT基因中研究较多的是启动子区5-HTTLPR和内含子2 VNTRs。不同的等位基因转录活性明显不同。国内外关于5-HTTLPR和内含子2 VNTRs与肠易激综合征的研究较多, 但结果尚不一致。

张晓敏, 林志辉, 福建医科大学省立临床学院胃肠病研究所
福建省福州市 350001

张晓敏, 福建医科大学2003届硕士研究生, 主要从事功能性肠病的研究。

通讯作者: 张晓敏, 350001, 福建省福州市东街134号, 福建省立医院胃肠病研究所。07091980557@sina.com.cn

电话: 0591-87699780

收稿日期: 2006-04-11 接受日期: 2006-04-29

Relationship between serotonin transporter gene polymorphism and irritable bowel syndrome

Xiao-Min Zhang, Zhi-Hui Lin

Xiao-Min Zhang, Zhi-Hui Lin, Institute of Gastrointestinal Diseases, Fujian Provincial Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Xiao-Min Zhang, Institute of Gastrointestinal Diseases, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China. 07091980557@sina.com.cn
Received: 2006-04-11 Accepted: 2006-04-29

Abstract

AIM: To investigate the relationship between serotonin transporter gene polymorphism and irritable bowel syndrome (IBS).

METHODS: Polymerase chain reaction (PCR) was used to comparatively analyze the polymorphisms of serotonin transporter gene 5-HTTLPR and VNTRs within intron 2 in patients with diarrhea-predominant IBS (D-IBS, $n = 51$), constipation-predominant IBS (C-IBS, $n = 58$), and alternating diarrhea and constipation IBS (A-IBS, $n = 38$) and healthy controls ($n = 48$).

RESULTS: The frequencies of L/L genotype and L allele in C-IBS patients were significantly higher than those in the controls (31.0% vs 8.3%, $\chi^2 = 8.229$, $P < 0.05$; 47.4% vs 29.2%, $\chi^2 = 7.342$, $P < 0.05$). The frequencies of S/S genotype and S allele in D-IBS patients were significantly higher than those in C-IBS and A-IBS patients (S/S: 56.9% vs 36.2%, 36.8%, $P < 0.05$; S: 71.6% vs 52.6%, 56.6%, $P < 0.05$), but the frequency of L/L genotype was markedly lower (9.8% vs 31.0%, 23.7%, $P < 0.05$). However, no significant

difference was found in VNTRs polymorphism between the subgroups of IBS and controls ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The presence of L/L genotype and L allele probably increases the susceptibility of individuals to C-IBS, while S/S genotype and S allele probably increases that to D-IBS. L/L genotype may be a protective factor against D-IBS.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Serotonin transporter; Gene polymorphism

Zhang XM, Lin ZH. Relationship between serotonin transporter gene polymorphism and irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1790-1794

摘要

目的: 探讨SERT基因启动子区5-HTTLPR和内含子2 VNTRs多态性在肠易激综合征(IBS)中的意义。

方法: 采用PCR方法对51例腹泻型IBS(D-IBS)、58例便秘型IBS(C-IBS)、38例便秘腹泻交替型IBS(A-IBS)患者与48例健康对照者SERT基因启动子区5-HTTLPR和内含子2 VNTRs多态性进行比较分析。

结果: C-IBS组L/L基因型及L等位基因频率显著高于对照组(31.0% vs 8.3%, $\chi^2 = 8.229$, $P < 0.05$; 47.4% vs 29.2%, $\chi^2 = 7.342$, $P < 0.05$), D-IBS组S/S基因型频率和S等位基因频率显著高于A-IBS和C-IBS组(S/S: 56.9% vs 36.8%, 36.2%, $P < 0.05$; S: 71.6% vs 52.6%, 56.6%, $P < 0.05$), L/L基因频率显著低于A-IBS和C-IBS组(9.8% vs 28.1%, $P < 0.05$)。IBS各组与对照组之间内含子2 VNTRs多态性分布无显著性差异($P > 0.05$)。

结论: 具有L/L基因型和L等位基因的人更易患C-IBS, 具有S/S基因型和S等位基因的人更易患D-IBS, L/L基因型可能是D-IBS的保护因素之一。

关键词: 肠易激综合征; 5-羟色胺转运体; 基因多态性

张晓明, 林志辉. 5-羟色胺转运体基因多态性与肠易激综合征的相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1790-1794
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1790.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种原因不明的,以腹痛或腹部不适及大便性状改变和排便习惯改变为特征的功能性肠病(functional bowel disease, FBDs). 根据临床症状分为腹泻型(D-IBS)、便秘型(C-IBS)和腹泻便秘交替型(A-IBS). 5-HT是胃肠道及中枢的重要神经递质, 他参与调节胃肠功能及中枢情感. 5-羟色胺转运体(serotonin transporter, SERT)是一种对5-HT有高度亲和力的跨膜转运蛋白, 可将效应部位的5-HT迅速再摄取. Coates *et al*^[1]研究发现IBS患者肠黏膜5-羟色胺转运体mRNA, 蛋白以及其免疫反应性较健康对照组都有所降低, 说明了SERT在IBS中发挥了一定的作用. 我们通过研究IBS及健康对照组患者5-羟色胺转运体(5-hydroxytryptamine transporter, 5-HTT)基因相关多态区(5-HTT gene-linked polymorphic region, 5-HTTLPR)和内含子2可变串联重复区(variable number tandem repeats, VNTRs)多态性的特点, 旨在探寻SERT基因与IBS的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 福建省立医院门诊2004-09/2006-01就诊的IBS患者147例, 男55例, 女92例, 年龄 41.9 ± 11.9 岁. 对照组来自健康查体者和部分健康志愿者, 共48例, 男25例, 女23例, 年龄 41.1 ± 9.7 岁, 他们均为福建地区汉族人. 对门诊以排便习惯和/或性状改变就诊的患者, 详细询问病史, 进行全面体格检查, 并经结肠镜和其他相关检查排除器质性疾病. IBS患者诊断标准为罗马II标准. 对照组入选标准: 无消化道症状及全身性疾病, 无腹部手术史, 各组间性别及年龄比较差异无显著性. 取外周静脉血5 mL, 2 g/L EDTA抗凝, 用UNIQ-10柱血液基因组抽提试剂盒(上海生工生物工程有限公司)抽提基因组DNA.

1.2 方法 SERT基因5-HTTLPR多态性检测, PCR扩增引物如下: 上游5'-ATG CCA GCA CCT AAC CCC TAA TGT-3', 下游5'-GG ACC GCA AGG TGG GCG GGA-3'^[2], 由上海英骏生物技术有限公司合成. PCR反应体系为50 μ L, 试剂均来自

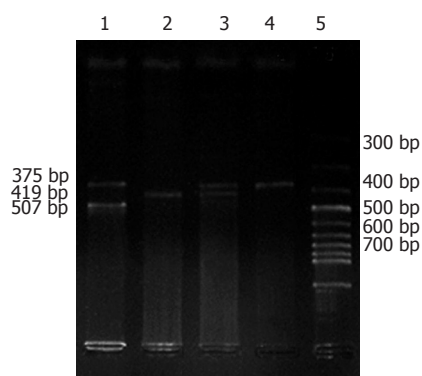


图1 SERT基因5-HTTLPR多态性位点PCR产物电泳图. 1: S/XL; 2: L/L; 3: L/S; 4: S/S; 5: 100 bp DNA ladder.

上海博亚生物公司, 10 \times PCR反应缓冲液5 μ L, dNTP 1 μ L, 上游引物1 μ L, 下游引物 1 μ L, MgCl₂ 4 μ L, 模板DNA 5 μ L, Taq酶0.5 μ L, 灭菌双蒸水32.5 μ L. 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 4 min, 1个循环 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 30 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 2个循环 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 30 s, 61 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 2个循环 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 30 s, 59 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 2个循环 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 2个循环 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30个循环 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10 min, 1个循环. SERT基因内含子2 VNTRs多态性检测, PCR扩增引物如下: 上游5'-GTC AGT ATC ACA GGC TGC GAG -3', 下游5'-TGT TCC TAG TCT TAC GCC AGT G-3'^[6], 由上海英骏生物技术有限公司合成. PCR反应体系为50 μ L, 试剂均来自上海英骏生物技术有限公司, 10 \times PCR反应缓冲液5 μ L, dNTP 1 μ L, 上游引物 1 μ L, 下游引物1 μ L, MgCl₂ 4 μ L, 模板DNA 5 μ L, Taq酶0.5 μ L, 灭菌双蒸水32.5 μ L. 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 1个循环 \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 35个循环 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 10 min, 1个循环. PCR产物通过1.5 g/L琼脂糖水平凝胶电泳分离鉴定基因型, 电泳后, 经凝胶数码成像系统照相并读取基因型.

统计学处理 基因型和等位基因以%表示, 差异显著性检验采用SPSS 11.5软件分析, χ^2 检验, $P < 0.05$ 为显著性差异.

2 结果

2.1 PCR产物检测结果 启动子区5-HTTLPR多态性位点PCR产物电泳结果共检出3个等位基因片段, 长度分别为375 bp (S), 419 bp (L), 507 bp (XL)以及5种基因型: L/XL, L/L, S/XL, L/S, S/S(图1); 内含子2区VNTRs多态性位点PCR产物电泳结果共检出2个等位基因片段, 长度分别为

■研究前沿

遗传易感性与肠易激综合征的关系为当前研究热点, 亟待研究的问题是遗传易感性是否与其他相关因素在肠易激综合征发病中发挥作用.

■创新盘点

研究结果显示L/L基因型与C-IBS有关与国内相关报道一致,同时也发现S/S基因型与D-IBS有关。

301 bp (S Tin.2.12), 267 bp (S Tin.2.10)以及3种基因型: S Tin.2.12/Tin.2.12 (12/12), S Tin.2.12/S Tin.2.10 (12/10), S Tin.2.10/S Tin.2.10 (10/10)(图2). 2.2 IBS三种亚型与对照组之间基因型与等位基因分布有显著性差异($\chi^2 = 14.971, P < 0.05$; $\chi^2 = 13.577, P < 0.05$), C-IBS组L/L基因型频率显著高于对照组($\chi^2 = 8.229, P < 0.05$), L等位基因频率显著高于对照组($\chi^2 = 7.342, P < 0.05$), D-IBS组L/L基因频率显著低于A-IBS, C-IBS组($\chi^2 = 6.058, P < 0.05$), D-IBS组S/S基因型和S等位基因频率显著高于A-IBS, C-IBS组($\chi^2 = 8.738, P < 0.05$; $\chi^2 = 9.769, P < 0.05$). 在D-IBS组中发现2例L/XL基因型. IBS各亚型与对照组之间VNTRs基因型与等位基因分布没有显著性差异($\chi^2 = 3.689, P > 0.05$; $\chi^2 = 2.587, P > 0.05$)(表1).

3 讨论

5-HT是由肠嗜铬细胞和5-羟色胺神经元合成并分泌的,他与胃肠道的多种5-HT受体结合,通过一系列神经反射或旁分泌、内分泌作用调节胃肠活动,因此5-HT的合成、释放及再摄取的改变均可能影响胃肠功能. 人体95%的5-HT位于肠道, 5-HT与受体结合发挥作用后,主要通过一种特殊的转运体蛋白即5-羟色胺转运体(SERT)再摄取,以清除突触间多余的5-HT,作为5-HT活动的终点. 目前的资料表明SERT只有一种基因,人类SERT基因位于染色体17q11.12,跨度37.8 kb,由14个外显子组成,编码约630个氨基酸组成的蛋白. SERT基因包括多个单核苷酸多态性和序列长度多态性,其中研究较多的是5-HTTLPR和内含子2 VNTRs. 5-HTTLPR由14-16个基本重复单元构成,每个重复单元包含22个碱基对,插入或缺失由44个碱基对组成的重复片段,可形成长型(L)和短型(S) 2种常见等位基因, L/L, L/S及S/S 3种常见基因型,罕见的超长型等位基因由5-HTTLPR内部片段的复制形成,一些研究报告中国汉族人群中存在加长型、超长型等罕见片段^[3-4],我们在研究中发现D-IBS组有2例L/XL; Lesch *et al*^[5]研究发现5-HTTLPR多态性L和S等位基因分别调节SERT启动子的转录活动,使人类淋巴细胞、血小板和脑中SERT mRNA和蛋白的浓度,以及5-HT再摄取的活性有所不同. L/L基因型的转录活性高于L/S和S/S基因型. 目前研究结果显示不同的人群5-HTTLPR基因型分布不同,北美和欧洲人群中L等位基因频率为57%, S等位基因频率为

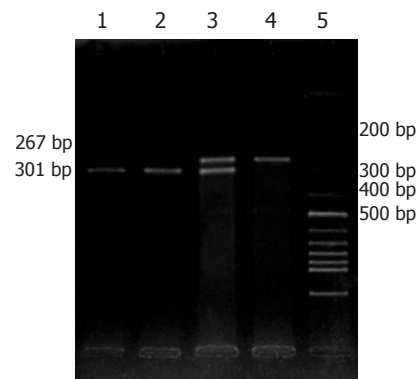


图2 SERT基因内含子2 VNTRs多态性位点PCR产物电泳图. 1: 12/12; 2: 12/12; 3: 12/10; 4: 10/10; 5: 100 bp DNA ladder.

43%, L/L基因型占32%, L/S基因型占49%, S/S基因型占19%, 而亚洲有超出两倍的S/S基因型频率^[5-7]. 我们的研究结果显示, 福建地区汉族人群中, L/L基因型占8.3%, L/S基因型占41.7%, S/S基因型占50%, 其中S/S基因型频率约为欧美地区人群的两倍, 与以上研究相似.

目前关于SERT基因5-HTTLPR多态性与IBS研究结果尚不完全一致. 最早的报道是Pata *et al*^[8]以土耳其54名IBS患者和91名健康对照为研究对象, 他们发现, SERT基因5-HTTLPR和内含子2 VNTRs多态性在健康对照组和IBS组分布相似, 但S/S基因型增加了患C-IBS的危险, 而L/S基因型增加了患D-IBS的危险. Kim *et al*^[9]报道5-HTTLPR L/L和L/S基因型在功能性胃肠病中的优势比并不显著, 但是他们确认了联合基因多态性与高躯体症状评分有关联. 来自韩国的报道是SERT基因型分布在IBS、IBS亚型和健康对照间没有差异^[10]. Yeo *et al*^[11]以北女性D-IBS患者与健康对照组为研究对象, 发现S/S基因型与D-IBS有显著关联, 表明SERT基因多态性是女性D-IBS发病的潜在因素. 国内Wang *et al*^[13]研究发现具有L/L基因型的人群可能更易患C-IBS; 具有L/S基因型的人群可能更易患D-IBS, A-IBS, 谢军 *et al*^[12]研究亦发现具有L/L基因型的人群可能更易患C-IBS. 我们的结果也显示, C-IBS患者有较高的L/L基因型频率和L等位基因频率, 与国内有关报道一致, 推测可能由于L/L转录活性较高, 导致肠道5-HT的过度再摄取使突触间隙5-HT浓度下降, 易导致便秘; 在IBS组内, D-IBS患者具有较高的S/S基因型频率和S等位基因频率. 由于S/S的转录活性较低, 导致肠道SERT低表达, 进而引起5-HT的过量, 增加了肠道运动及分泌.

■应用要点

本文进一步明确肠易激综合征的发病机制, 对IBS的基因型诊断、个体化治疗以及临床新药筛选等有重要的意义.

表 1 SERT基因5-HTTLPR及VNTRs多态性位点基因型频数和等位基因频数分布

| 分组 | n | 启动子区5-HTTLPR n (%) | | | | | | | 内含子2 VNTRs n (%) | | | | |
|-------|----|---------------------------|--------------|-------------------------|------------|--------------|---------------------------|------------|------------------|--------------|------------|---------------|--------------|
| | | S/S | L/S | L/L | L/XL | S | L | XL | 12/12 | 12/10 | 10/10 | 12 | 10 |
| D-IBS | 51 | 29 (56.9) | 15 (29.4) | 5 (9.8) ^c | 2 (3.9) | 73 (71.6) | 27 (26.4) ^c | 2 (2.0) | 43 (84.3) | 7 (13.7) | 1 (2.0) | 93 (91.2) | 9 (8.8) |
| C-IBS | 58 | 21 (36.2) ^a | 19 (32.8) | 18 (31.0) | 0 | 61 (52.6) | 55 (47.4) ^a | 0 | 45 (77.6) | 10 (17.2) | 3 (5.2) | 100 (86.2) | 16 (13.8) |
| A-IBS | 38 | 14 (36.8) | 15 (39.5) | 9 (23.7) | 0 | 43 (56.6) | 33 (43.4) | 0 | 32 (84.2) | 4 (10.5) | 2 (5.3) | 68 (89.5) | 8 (10.5) |
| 对照组 | 48 | 24 (50.0) | 20 (41.7) | 4 (8.3) | 0 | 68 (70.8) | 28 (29.2) | 0 | 35 (72.9) | 11 (22.9) | 2 (4.2) | 81 (84.4) | 15 (15.6) |

^aP<0.05 vs 对照组; ^cP<0.05 vs C-IBS.

内含子2 VNTRs含有9-12个由17个碱基对组成的重复单元串联结构, 包括10 (STin2.10)、12 (STin2.12)个重复的常见序列和9 (STin2.9)个重复的罕见序列, 我们的研究未发现STin2.9. Keating *et al*^[13]报道在转基因胚胎小鼠和增强活性的胚胎干细胞中内含子2 VNTRs具有STin2.12等位基因小鼠较具STin2.10等位基因小鼠SERT表达增强. Ogilvie *et al*^[21]认为, SERT基因VNTRs区重复串联数目越少, 其转录出的SERT mRNA稳定性越差, SERT的表达量就越少. Pata *et al*^[8]报道, SERT基因内含子2 VNTRs多态性在对照组与IBS间无显著性差异, 而国内Wang *et al*^[3]报道STin2.12/10基因型与IBS关系密切, 并且具有12/12-L/L联合基因型的人群易患C-IBS, 他们认为可能由于12/12和L/L的协调作用导致SERT的过度表达所致, 而谢军 *et al*^[12]认为VNTRs与IBS无关. 我们的研究结果显示与Pata及谢军 *et al*研究结果一致, 没有发现VNTRs多态性与IBS明显相关.

许多研究表明, SERT基因5-HTTLPR和内含子2 VNTRs多态性位点与许多精神心理疾病有关, 既然IBS与心理素质和心理类型有关, SERT基因是否为其两者联系的相关基因, 值得进一步研究. Smulevich *et al*^[14]认为精神因素与IBS存在因果关系, 抑郁、焦虑和IBS可能具有共同的发病基础. Hudson *et al*^[15]研究发现包括IBS与抑郁症等在内的一系列情感障碍型疾病(affective spectrum disorder, ASD)有明显的家族聚集倾向, 表明不同类型ASD可能具有共同的遗传病理生理学特征. 我们的研究结果提示, SERT基因多态性在IBS的发生和发展中可能发挥了重要的作用, 但是IBS的病因和病理生理机制复杂并非单

一因素可以解释, 对于SERT基因在IBS发病中的地位还需要进一步深入研究确定.

4 参考文献

- Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, Crowell MD, Sharkey KA, Gershon MD, Mawe GM, Moses PL. Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 126: 1657-1664
- Ogilvie AD, Battersby S, Bubb VJ, Fink G, Harmar AJ, Goodwin GM, Smith CA. Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *Lancet* 1996; 347: 731-733
- Wang BM, Wang YM, Zhang WM, Zhang QY, Liu WT, Jiang K, Zhang J. Serotonin transporter gene polymorphism in irritable bowel syndrome. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2004; 43: 439-441
- Zhao AL, Su LY, Zhang YH, Tang BS, Luo XR, Huang CX, Su QR. Association analysis of serotonin transporter promoter gene polymorphism with ADHD and related symptomatology. *Int J Neurosci* 2005; 115: 1183-1191
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996; 274: 1527-1531
- Delbruck SJ, Wendel B, Grunewald I, Sander T, Morris-Rosendahl D, Crocq MA, Berrettini WH, Hoehe MR. A novel allelic variant of the human serotonin transporter gene regulatory polymorphism. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 79: 214-220
- Gelernter J, Kranzler H, Cubells JF. Serotonin transporter protein (SLC6A4) allele and haplotype frequencies and linkage disequilibria in African- and European-American and Japanese populations and in alcohol-dependent subjects. *Hum Genet* 1997; 101: 243-246
- Pata C, Erdal ME, Derici E, Yazar A, Kanik A, Ulu O. Serotonin transporter gene polymorphism in irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 1780-1784
- Kim HJ, Camilleri M, Carlson PJ, Cremonini F,

■名词解释

5-羟色胺转运体 (SERT): 5-羟色胺 (5-HT)是脑-肠轴中的关键递质, 他在胃肠运动和感觉, 以及中枢情感调节中有重要意义. 5-羟色胺转运体(SERT)是一种对5-HT有高度亲和力的跨膜转运蛋白, 可将效应部位的5-HT迅速再摄取. 大量的证据表明, SERT在IBS的发生和发展中发挥重要的作用.

■同行评价

本文对肠易激综合征进行PCR方法的病因学研究,研究深入,数据可靠详实,立题较新,对临床有指导意义。

- Ferber I, Stephens D, McKinzie S, Zinsmeister AR, Urrutia R. Association of distinct alpha(2) adrenoceptor and serotonin transporter polymorphisms with constipation and somatic symptoms in functional gastrointestinal disorders. *Gut* 2004; 53: 829-837
- 10 Lee DY, Park H, Kim WH, Lee SI, Seo YJ, Choi YC. Serotonin transporter gene polymorphism in healthy adults and patients with irritable bowel syndrome. *Korean J Gastroenterol* 2004; 43: 18-22
- 11 Yeo A, Boyd P, Lumsden S, Saunders T, Handley A, Stubbins M, Knaggs A, Asquith S, Taylor I, Bahari B, Crocker N, Rallan R, Varsani S, Montgomery D, Alpers DH, Dukes GE, Purvis I, Hicks GA. Association between a functional polymorphism in the serotonin transporter gene and diarrhoea predominant irritable bowel syndrome in women. *Gut* 2004; 53: 1452-1458
- 12 谢军, 李瑜元, 聂玉强, 梁培智, 张龙. 肠易激综合征5-羟色胺转运蛋白基因多态性研究. *广州医学院学报* 2005; 33: 1-4
- 13 Keating E, Lemos C, Monteiro R, Azevedo I, Martel F. The effect of a series of organic cations upon the plasmalemmal serotonin transporter, SERT. *Life Sci* 2004; 76: 103-119
- 14 Smulevich AB, Rappoport SI, Syrkin AL, Ovcharenko SI, Ivanov SV, Drobyzhev MIu, Ishchenko EN, Baturin KA. Visceral neuroses: clinical approaches to the problem. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 2002; 102: 15-21
- 15 Hudson JI, Mangweth B, Pope HG Jr, De Col C, Hausmann A, Gutweniger S, Laird NM, Biebl W, Tsuang MT. Family study of affective spectrum disorder. *Arch Gen Psychiatry* 2003; 60: 170-177

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台,欢迎副主任医师以上的消化内科、普通外科专家为专栏撰稿(附单位介绍信),免收出版费,写作格式如下:

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言

1 诊断

2 治疗

3 特色

4 门诊时间

溃疡性结肠炎肠黏膜组织CD8、Fas/FasL和Bcl-2/Bax的 表达及关系

张 姮, 夏 冰, 杨桂芳, 李 瑾

张姮, 武汉市中心医院消化内科 湖北省武汉市 430014
夏冰, 李瑾, 杨桂芳, 武汉大学中南医院内科与病理科, 武汉大学医学院消化系病研究中心、过敏与免疫相关疾病研究中心 湖北省武汉市 430071
张姮, 1997年武汉大学医学院本科毕业, 2004年武汉大学医学院硕士毕业, 现为消化内科主治医师。
通讯作者: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市东湖路169号, 武汉大学中南医院内科. bingxia@public.wh.hb.cn
收稿日期: 2005-12-09 接受日期: 2005-12-31

Distribution of CD8 T cells and expression of Fas/FasL and Bcl-2/Bax in ulcerative colitis

Heng Zhang, Bing Xia, Gui-Fang Yang, Jin Li

Heng Zhang, Department of Gastroenterology, Wuhan Central Hospital, Wuhan 430014, Hubei Province, China
Bing Xia, Gui-Fang Yang, Jin Li, Department of Internal Medicine and Pathology, Zhongnan Hospital of Wuhan University; Research Center of Digestive Diseases and Allergic and Immune Diseases, Wuhan University Medical College, Wuhan 430071, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Bing Xia, Department of Internal Medicine, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 169 Donghu Road, Wuhan 430071, Hubei Province, China. bingxia@public.wh.hb.cn
Received: 2005-12-09 Accepted: 2005-12-31

Abstract

AIM: To investigate the expression of Fas/FasL and Bcl-2/Bax and distribution of CD8 T cells as well as their correlations in ulcerative colitis (UC).

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of CD8, Bcl-2/Bax and Fas/FasL in intestinal mucosal tissues from UC ($n = 60$) and normal controls ($n = 60$).

RESULTS: The positive rate of CD8 was significantly higher in the epithelia of UC tissues than that in the controls (52% vs 78%, $P < 0.01$), and rate in the active UC was also significantly lower than that in the remissive UC (20% vs 74%, $P < 0.01$). The positive rate of CD8 in the lamina propria tissues of UC at active stage was markedly higher than that at remissive stage (80% vs 34%,

$P = 0.0006$). The expression of Fas was remarkably higher in the epithelia of UC tissues than that in the controls (62% vs 30%, $P < 0.01$), and its expression at active UC was also dramatically higher than that at remissive stage (84% vs 45%, $P < 0.01$). The expression of FasL was significantly increased in the inflammatory cells from the lamina propria of UC tissues as compared with that from normal mucosa (62% vs 7%, $P < 0.01$), and it was also a significant different between the active and remissive stage (88% vs 43%, $P < 0.01$). Furthermore, there was a correlation between the expression CD8 and FasL in the inflammatory cells from the lamina propria ($\chi^2 = 7.3$, $P < 0.01$). The expression of Bcl-2/Bax was not different between UC and normal mucosa ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The expression of Fas/FasL is up-regulated in UC, but the expression of Bcl-2/Bax is not obviously changed. CD8 T cells play important roles in the development of UC and they are closely related with Fas/FasL system.

Key Words: Fas/FasL; Bcl-2/Bax; CD8; Ulcerative colitis

Zhang H, Xia B, Yang GF, Li J. Distribution of CD8 T cells and expression of Fas/FasL and Bcl-2/Bax in ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1795-1798

摘要

目的: 研究溃疡性结肠炎(UC)肠黏膜CD8 T细胞Fas/FasL、Bcl-2/Bax蛋白表达以及相互关系, 探讨细胞凋亡机制在UC发病中的作用。

方法: 采用免疫组化SP法检测60例UC肠黏膜组织以及60例正常肠黏膜组织CD8, Fas/FasL, Bcl-2/Bax蛋白表达。

结果: CD8阳性细胞在上皮间的浸润在UC组为52%, 正常组为78%, 两组相比差异显著($P < 0.01$); 急性期较缓解期也显著减少(20% vs 74%, $P < 0.01$)。CD8在UC患者急性期黏膜固有层的表达为80%, 高于缓解期的34%($P =$

■背景资料

目前认为T细胞免疫在溃疡性结肠炎发病机制中起重要作用, UC肠黏膜的损伤与细胞毒T细胞(CTL)密切相关。CD8分子是CTL的重要表面标志, 其作用机制与Fas及穿孔素有关。近年发现UC上皮细胞损伤和黏膜溃疡还与细胞凋亡有关。有研究发现UC中Fas系统调控的肠上皮细胞凋亡增加, 并参与上皮细胞损伤和炎症, 而Bax/Bcl-2系统可能不参与UC上皮细胞凋亡的调控。至今尚未见CD8细胞与UC细胞凋亡相关性研究的报道。

0.0006). Fas在UC上皮中表达62%, 正常组织30%, 两组相比差异显著($P < 0.01$); 急性期高于缓解期(84% vs 45%, $P < 0.01$). FasL在固有膜炎性细胞中的表达UC组为62%, 正常组7%, 两组相比差异显著($P < 0.01$); 急性期(88%)高于缓解期(43%), 而且CD8与FasL在黏膜固有层炎性细胞的表达呈正相关($\chi^2 = 7.3$, $P < 0.01$). Bcl-2/Bax在UC肠黏膜上皮的表达率与正常组相近, 差异无显著性.

结论: UC肠黏膜组织Fas/FasL表达增强, Bcl-2/Bax表达无明显变化, CD8细胞与UC急性期Fas/FasL表达相关.

关键词: CD8细胞; Fas/FasL; Bcl-2/Bax; 溃疡性结肠炎

张姮, 夏冰, 杨桂芳, 李瑾. 溃疡性结肠炎肠黏膜组织CD8、Fas/FasL和Bcl-2/Bax的表达及关系. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1795-1798

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1795.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是病因不明的结肠黏膜慢性炎症, 主要累及直肠和乙状结肠, 亦可累及全结肠. UC的病理表现有黏膜和黏膜下层的慢性炎性细胞浸润、隐窝脓肿、黏膜溃疡以及腺体和上皮的损伤. UC患者临床上有关节炎、硬化性胆管炎等免疫异常的肠外表现, 血清pANCA及抗结肠黏膜抗体阳性率增高, 肠黏膜T淋巴细胞激活以及Th1/Th2炎性细胞比例失衡, 以上观察和研究提示UC发病机制主要与T细胞免疫作用有关^[1]. 研究表明细胞毒T细胞(CTL)在UC肠黏膜的损伤中起着重要作用^[2-3]. CD8分子是CTL的重要表面标志^[4], 其作用机制与Fas及穿孔素有关^[5]. 近年发现UC上皮细胞损伤和黏膜溃疡与细胞凋亡有关^[6], 而Bcl-2基因家族、Fas与其配体在细胞凋亡中起调节作用. 有研究发现UC中Fas系统调控的肠上皮细胞凋亡增加, 并参与上皮细胞损伤和炎症^[7], 而Bcl-2/Bax系统可能不参与UC上皮细胞凋亡的调控^[8]. 至今尚未见CD8细胞与UC细胞凋亡相关性研究的报道. 我们探讨UC患者黏膜组织内CD8阳性细胞与细胞凋亡分子表达的关系, 研究Bcl-2/Bax及Fas/FasL二个细胞凋亡系统在UC发病机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 1996/2000武汉大学中南医院门诊及住

院部明确诊断的UC患者60例, 诊断标准参照中华医学会消化分会2001年“对炎症性肠病诊断治疗规范的建议”^[9]. 年龄13-62(平均39)岁, 病程1/12-25(平均10.5) a. 男34例, 女26例. 复习和阅读临床资料及病理切片, 根据组织学标准^[10], 将UC分为活动期及缓解期. 活动期镜下表现为肠上皮及隐窝上皮变性、中性白细胞浸润、隐窝脓肿以及溃疡, 固有膜内弥漫性淋巴细胞、浆细胞、单核细胞浸润. 缓解期表现为黏膜面呈绒毛样外观, 隐窝变短、不规则、潘氏细胞化生, 隐窝基底部下方小淋巴细胞及浆细胞增多. 同时选取存档组织蜡块用于免疫组化测定. 对照组为正常肠黏膜60例, 取自结肠肿瘤10 cm以外的正常组织, 年龄为20-64(平均42)岁, 男37例, 女23例, 与UC组差别无统计学意义. CD8, Bcl-2, Bax鼠抗人mAb, Fas, FasL兔抗人多克隆抗体, 超敏SP(鼠/兔)试剂盒均购自福州迈新生物技术公司.

1.2 方法 采用SP法进行免疫组化染色. 切片常规脱蜡水化, PBS冲洗, 热微波法修复10 min, 过氧化物阻断溶液, 室温10 min, PBS冲洗; 非免疫性动物血清50 μ L, 室温10 min, 去血清; 滴加一抗50 μ L 4 $^{\circ}$ C过夜; 生物素标记第二抗, 室温10 min; 链亲和素-过氧化物酶溶液, 室温10 min, PBS冲洗; DAB显色; 苏木素复染; 中性树胶封片, 阴性对照以PBS代替一抗作阴性对照. 购买福州迈新生物技术公司提供的阳性照片作阳性对照, 每次实验均设对照组. CD8, Fas, Bcl-2定位表达于胞膜和胞质; FasL, Bax定位表达于细胞质. 着色强度评分标准: 无着色, (-), 为0分; 浅黄色, (+), 为1分; 棕黄色, (++), 为2分; 深棕色, (+++), 为3分. 阳性细胞数评分标准: 无细胞着色为0分; 阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为1分; 11%-50%为2分; 51%-75%为3分; $> 75\%$ 为4分. 2次得分相乘 > 3 者, 定为阳性病例. CD8阳性细胞数占炎性细胞的比例, 作为CD8阳性细胞数评分标准.

统计学处理 采用 χ^2 和Fisher's exact检验, $P < 0.05$ 为有显著性统计学意义.

2 结果

2.1 CD8阳性细胞 CD8阳性染色定位于细胞膜和胞质. UC的肠上皮细胞间CD8阳性细胞总表达率低于正常对照组(52% vs 78%, $P = 0.0038$, $OR = 3.382$, 95% CI = 1.525-7.498), 且活动期UC低于缓解期UC (20% vs 74%, $P < 0.0001$,

$OR = 0.0865$, 95% $CI = 0.025-0.299$). 肠固有膜UC活动期的CD8阳性细胞表达率高于缓解期(80% vs 34%, $P = 0.0006$, $OR = 7.667$, 95% $CI = 2.301-25.541$). 肠上皮细胞间与肠固有膜UC的CD8阳性细胞表达率无显著性差别(52% vs 53%, $P = 0.233$, $OR = 1.565$, 95% $CI = 0.800-3.061$).

2.2 Fas, FasL阳性细胞 Fas阳性细胞染色定位于胞质和胞膜, FasL表达定位于胞质. UC肠上皮Fas表达(62%)明显高于正常肠上皮(30%), 且活动期(84%)高于缓解期(45%). UC及正常肠黏膜上皮几乎不表达FasL, 然而, Fas及FasL在UC及正常肠黏膜固有膜内炎性细胞均有表达. Fas阳性在UC及正常肠黏膜固有膜炎性细胞中表达无显著性差别(70% vs 83%, $P = 0.13$). 然而, UC肠黏膜固有层炎性细胞FasL的表达(62%)显著高于正常肠黏膜(7%), 且活动期(88%)高于缓解期(43%).

CD8与FasL在UC固有膜的表达如表1所示, 经 χ^2 检验, 二者具有相关性.

2.3 Bcl-2, Bax阳性细胞 Bcl-2阳性细胞染色定位于胞质和胞膜, Bax表达定位于胞质. Bcl-2在UC病变肠黏膜表达率为60%, 与正常肠黏膜(67%)相比差异无显著性($P = 0.500$), 且活动期与缓解期相近(64% vs 57%), Bax在UC肠黏膜与正常肠黏膜中的表达也无显著性差别(57% vs 58%, $P = 0.50$), 且活动期与缓解期相比差异无显著性($P = 0.63$).

3 讨论

溃疡性结肠炎发病机制尚不明确, 目前认为细胞免疫起主要作用, T细胞是主要的免疫细胞, T细胞介导的免疫效应有迟发型超敏反应以及细胞毒淋巴细胞(CTL)介导的特异性细胞毒作用. CD8 T细胞亚群为职业性细胞毒细胞, 其作用机制与Fas及穿孔素有关, 以穿孔素-颗粒酶为基础的CTL杀伤作用, 必须直接接触靶细胞才能发挥细胞毒作用. 我们观察到UC组肠上皮CD8细胞数量较正常组明显减少且活动期减少较缓解期明显. 据此推测, UC患者急性期肠黏膜的破坏较少涉及到CTL的穿孔素-颗粒酶为基础的参与机制.

细胞凋亡是由基因控制的细胞自主性死亡方式, 是机体自身稳定的重要调节机制. Bcl-2属原癌基因, 是研究最早的与细胞凋亡有关的分子. Bcl-2及Bcl-xL抑制caspase激活的细胞凋亡, 延长细胞存活时间. 相反, 凋亡前分子Bax则通

表 1 CD8与FasL在UC固有膜表达的相关性

| CD8 | FasL | |
|-----|------|----|
| | 阳性 | 阴性 |
| 阳性 | 28 | 4 |
| 阴性 | 10 | 18 |

$$\chi^2 = 7.3, P < 0.01.$$

过作用于线粒体, 调节caspase活性, 以二聚体或多聚体形式与Bcl-2结合, 拮抗Bcl-2的作用. 一些研究发现Bcl-2与Bax, 这两种蛋白表达比例对控制细胞凋亡的强弱起到关键作用^[11]. Bax增高, 促进细胞凋亡; Bcl-2增高, 抑制细胞凋亡. 日本Iimura *et al*^[8]观察到UC肠黏膜中Bax蛋白及mRNA表达均下调, 而Bcl-2与正常对照无明显差异, 提示Bax/Bcl-2系统不参与UC肠上皮细胞凋亡的调控. 我们观察到Bcl-2、Bax表达在UC组与正常组肠黏膜上皮细胞的表达无差异, 支持上述结论. Fas、FasL是近年来认识较深入的与细胞凋亡信号传递有关的分子系统. Fas与其相应配体的相互作用是诱导细胞凋亡的重要途径之一^[12]. Apo-1/Fas是一种跨膜糖蛋白分子, 是肿瘤坏死因子受体和神经生长因子受体家族的细胞表面分子. Fas配体是肿瘤坏死因子家族的细胞表面分子, FasL与其受体结合导致携带Fas的细胞凋亡^[13]. 我们观察到UC肠上皮Fas表达明显高于正常肠上皮, 且活动期高于缓解期, UC组肠黏膜固有膜中Fas表达与正常组相比无明显差异, FasL在UC组及正常组织上皮细胞仅有少量表达, 而FasL在UC组固有膜中炎性细胞的表达明显高于正常组, 且与CD8的表达呈正相关, 并且FasL表达活动期高于缓解期, 推测FasL在UC的发病中作为病理因子而导致UC患者肠上皮细胞的损害, 与CD8有一定的关联. 基于本实验的结果, 我们认为Fas及FasL介导的细胞凋亡在UC的发病中起重要作用, 并且CD8细胞与Fas, FasL有关.

4 参考文献

- Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK. Immune networks in animal models of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003; 9: 246-259
- Sunagawa T, Yonamine Y, Kinjo F, Watanabe M, Hibi T, Saito A. HLA class-I-restricted and colon-specific cytotoxic T cells from lamina propria lymphocytes of patients with ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 2001; 21: 381-389
- Yonamine Y, Watanabe M, Kinjo F, Hibi T. Genera-

- tion of MHC class I-restricted cytotoxic T cell lines and clones against colonic epithelial cells from ulcerative colitis. *J Clin Immunol* 1999; 19: 77-85
- 4 Bisping G, Luger N, Lutke-Brintrup S, Pauels HG, Schurmann G, Domschke W, Kucharzik T. Patients with inflammatory bowel disease (IBD) reveal increased induction capacity of intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) in peripheral CD8+ lymphocytes co-cultured with intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol* 2001; 123: 15-22
- 5 Suzuki A, Sugimura K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Suzuki K, Ishizuka K, Mochizuki T, Honma T, Narisawa R, Asakura H. Fas/Fas ligand expression and characteristics of primed CD45RO+ T cells in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1278-1283
- 6 Hagiwara C, Tanaka M, Kudo H. Increase in colorectal epithelial apoptotic cells in patients with ulcerative colitis ultimately requiring surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17: 758-764
- 7 Yukawa M, Iizuka M, Horie Y, Yoneyama K, Shirasaka T, Itou H, Komatsu M, Fukushima T, Watanabe S. Systemic and local evidence of increased Fas-mediated apoptosis in ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 70-76
- 8 Iimura M, Nakamura T, Shinozaki S, Iizuka B, Inoue Y, Suzuki S, Hayashi N. Bax is downregulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. *Gut* 2000; 47: 228-235
- 9 中华医学会消化病学分会. 对炎症性肠病诊断治疗规范的建议. *中华消化杂志* 2001; 21: 236-239
- 10 Goldman H. *Gastrointestinal Mucosal Biopsy*. New York: Churchill Livingstone, 1996: 412
- 11 Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993; 341: 1251-1254
- 12 Mitsiades N, Poulaki V, Kotoula V, Mastorakos G, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA, Tsokos M. Fas/Fas ligand up-regulation and Bcl-2 down-regulation may be significant in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 2199-2203
- 13 Gratas C, Tohma Y, Barnas C, Taniere P, Hainaut P, Ohgaki H. Up-regulation of Fas (APO-1/CD95) ligand and down-regulation of Fas expression in human esophageal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 2057-2062

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

欢迎订阅 2006 年《世界华人消化杂志》

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

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

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

活性氧簇在肝脏移植缺血再灌注中的作用

刘现忠, 李相成

刘现忠, 李相成, 南京医科大学第一附属医院肝脏外科 江苏省南京市 210029

江苏省科委优秀青年基金资助项目, No. BQ98012

通讯作者: 李相成, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院肝脏外科, 中国活体肝移植研究所. Doclix@hotmail.com
电话: 025-83718836-6476

收稿日期: 2006-02-25 接受日期: 2006-04-30

摘要

肝移植缺血再灌注是一个复杂的、多因子参与的病理生理过程, 包括活性氧、细胞因子、枯否细胞和中性粒细胞的激活。氧化应激是许多肝病的主要发病机制, 在肝脏移植中是缺血再灌注引起肝损伤的主要原因。氧分子和活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的化学、生理功能, 以及促氧化物和抗氧化物之间的平衡对正常的线粒体和细胞功能是至关重要的。ROS的主要来源是肝脏中的线粒体和细胞色素P450酶, 以及库氏细胞和中性粒细胞, 其在缺血再灌注和缺血预处理过程中对损伤的决定性作用存在争议。

关键词: 活性氧簇; 氧化应激; 缺血再灌注; 肝脏移植

刘现忠, 李相成. 活性氧簇在肝脏移植缺血再灌注中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1799-1804
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1799.asp>

0 引言

氧本身就是一个弱氧化剂, 细胞内存在氧和ROS感受器并有利用氧的系统, 而氧化酶使氧的利用更为有效。在细胞凋亡和程序性线粒体破坏中均可观察到线粒体嵴的断裂, 这可能与ROS的参与有关。氧化应激是ROS的产生和细胞抗氧化能力的失衡引起的^[1], 他将影响细胞大多数成分, 如脂质、蛋白质和DNA。ROS是外源性氧化剂或细胞内有氧代谢过程中产生的具有很高生物活性的含氧化合物的总称, 其中最常见的是超氧化物, 过氧化氢, 单线态氧, 氢氧根阴离子等^[2]。正常状态下体内存在抗氧化物质(氧化还原系统如还原型谷胱甘肽, 维生素, 白蛋白和球蛋白, 游离脂肪酸, 特别是不饱和脂肪

酸等)抵御过多的ROS。促氧化物质和抗氧化物质处于动态平衡状态, 使得促氧化物质处于某种稳定水平, 这对正常的细胞功能是重要的^[3]。ROS的产生和细胞抗氧化能力的失衡引起氧化应激, 这一现象和许多疾病联系密切, 包括心血管疾病, 糖尿病, 癌症, 神经变性疾病^[4-5]和几乎全部肝脏疾病^[6-9]。各种损伤的发展如肝脏缺血再灌注期间的损伤, 也与短时间暴露于高浓度的ROS下有关^[10-11]。已知过多促氧化剂造成氧化应激导致不良后果(衰老和死亡), 同样, 过多的抗氧化剂也会导致致命的后果^[12]。值得强调的是, ROS的相互转变(超氧化物通过歧化作用转变为过氧化氢, 再通过Fenton反应转变为氢离子)导致ROS中某些成分的氧化电位发生明显改变。这种相互转变也能导致ROS作用的改变: 从抗氧化转变为促氧化^[13]。

除产生细胞损伤外, ROS还作为细胞内的第二信使发挥作用, 在特定的细胞反应中细胞因子、激素、生长因子和其他可溶性介质(如细胞外ATP)均能触发ROS生成^[14]。

1 氧自由基及其衍生物

非吞噬细胞中线粒体是产生细胞内ROS的主要场所。氧化磷酸化期间, 正常细胞和组织产生低水平潜在毒性的氧代谢产物^[15]。正常水平的ROS参与细胞的许多生理功能, 包括基因表达、信号转导和抵御病原体的侵入。据估计, 在正常状态下, 高达1%的线粒体电子流主要作用是使氧分子单价还原形成超氧阴离子。这一过程通过酶(如NADP(H)氧化酶或黄嘌呤氧化酶)介导, 或通过非酶(如线粒体电子传递链的半辅酶Q)的氧化还原复合物介导完成。电子传递链的干扰能明显增加超氧化物的生成。在细胞内超氧化物歧化酶(SODs)的作用下超氧化物迅即被转化为H₂O₂和O₂。H₂O₂能进一步生成对细胞损害性更大的活性羟基分子。H₂O₂可被过氧化氢酶或谷胱甘肽过氧化物酶转化为水。在谷胱甘肽过氧化物酶反应中, 谷胱甘肽可被氧化为二硫化谷胱甘肽, 后者可在谷胱甘肽还原酶作用下消耗

■背景资料

肝移植技术已经取得了快速的发展, 目前的矛盾是供肝短缺和日益增多的需要肝移植的患者, 该项技术中关键的问题是如何防止肝脏的缺血再灌注损伤。目前已经提出了很多保护机制, 例如从实践上可分为3种: 术中干预、药物方法和基因治疗。其中药物方法中除了在器官保存液中加入抗氧化剂外, 还没有将抑制氧化应激的药物方法应用于临床的常规工作中, 部分原因是因为对肝移植中活性氧的作用机制了解不多。肝移植缺血再灌注是一个复杂的、多因子参与的病理生理过程, 包括活性氧、细胞因子、枯否细胞和中性粒细胞的激活。氧化应激是许多肝病的主要发病机制, 在肝脏移植中是缺血再灌注引起肝损伤的主要原因。氧分子和活性氧簇的化学、生理功能, 以及促氧化物和抗氧化物之间的平衡对线粒体和细胞功能至关重要。

■研究前沿

肝移植缺血再灌注损伤的机制相当复杂,近年来,活性氧簇在缺血再灌注损伤中的作用受到重视,其中氧化应激中蛋白酶(如黄嘌呤氧化酶和超氧化物歧化酶等)和线粒体功能的研究成为热点,尽管活性氧自由基在许多肝病中的作用被广为接受,但其确切的机制尚存在争议。自Xanthoudakis *et al* 于1992年发现Ref-1在细胞氧化还原中的重要作用以来,Ref-1成为研究细胞氧化还原状态的一个新的突破点,然而,氧化损伤中Ref-1基因表达诱导的分子机制和翻译后修饰在体外对Ref-1功能的影响目前还不清楚,氧化应激时Ref-1基因表达的始动因素以及其活化的信号途径了解不多。另外,ROS作为第二信使在细胞凋亡和恶性肿瘤发生、发展中起一定的作用。

NADPH还原为谷胱甘肽。

2 氧化应激反应

ROS存在于细胞和组织中的量很微弱,但可测得,其大小取决于ROS的产生和不同抗氧化酶及复合物清除ROS的比例。氧化应激时,多种蛋白的功能发生改变^[16-18],特别是作为ROS直接作用位点的氨基酸(如色氨酸,酪氨酸,组氨酸和半胱氨酸)改变引起的蛋白质修饰^[19]。ROS介导的蛋白质修饰可影响蛋白质的结构,功能及其稳定性。已知,ROS能影响细胞信号传导机制并最终影响细胞基因表达^[20]。越来越多的研究证明,哺乳动物细胞可以通过激活氧化还原敏感性转录因子(如Egr-1, NF- κ B, AP-1和G蛋白)和通过激活细胞激酶(如细胞分裂素活化蛋白激酶(MAPK)家族)来调整蛋白质表达模式以适应氧化应激^[21]。这种氧化依赖的细胞信号途径的改变常会导致肝细胞的凋亡。目前,可检测到对H₂O₂和其他ROS特异的多肽感受器,但对生物大分子调节ROS诱导的细胞效应的早期作用仍知之甚少。

氧化应激可能引起敏感性蛋白的可逆或不可逆的改变。可逆的改变常发生在半胱氨酸残基。ROS诱导的不可逆性改变,如酪氨酸丢失,蛋白质铰链或赖氨酸和精氨酸羧基化,将引起蛋白质功能的永久性丧失,导致受损蛋白的降解或过多聚集形成细胞质内含物。

2.1 肝细胞内氧化还原敏感性作用点的重要作用 1992年, Xanthoudakis *et al*^[22]从Hela细胞中纯化得到转录因子AP-1的胞内还原因子,命名为氧化还原因子-1(redox factor-1, Ref-1),并克隆得到其全长cDNA,测序结果表明Ref-1其实就是1991年Robson和Hickson克隆的人无嘌呤/嘧啶核酸内切酶1(Ape1)。由此拉开了这个具有多功能蛋白在细胞氧化调控中所起作用的序幕。作为DNA无嘌呤/嘧啶核酸位点(DNA氧化诱导损伤引起)碱基切除修复的主要参与者和许多重要的转录因子(如NF- κ B, AP-1, HIF-1 α 和Pax蛋白)活性的氧化还原调节剂^[23-25], Ref-1蛋白在ROS诱导的细胞效应中起重要作用。氧化应激状态下Ref-1不只是作为ROS清除剂来影响细胞功能^[26]。Ref-1包含2个不同的功能域。氨基末端功能域含有对氧化还原活性必要的核定位序列,而核酸内切酶活性的控制点位于羧基末端功能域。Ref-1可在翻译水平和翻译后水平被调节。关于翻译水平的调节,ROS对Ref-1的诱导已有较多的研究。目前的研究表明,氧化因子(如H₂O₂)

和ROS产生的损伤促进了Ref-1 mRNA的迅速诱导表达,这与其核酸内切酶和氧化还原活性的增加有关。目前尚不知道氧化应激时Ref-1基因表达的始动因素以及其活化的信号途径^[27]。由于Ref-1的表达是氧化应激的分子标志,所以,研究Ref-1在ROS诱导的细胞反应中作用的信号途径有重要意义。翻译后Ref-1活性的调节似乎存在两种机制,即亚细胞定位和磷酸化程度。一方面,不同细胞中的Ref-1在ROS作用下由细胞质向核移位^[28];另一方面,至少在体外,磷酸化和乙酰化似乎在决定蛋白质功能方面有重要作用。然而,氧化损伤中Ref-1基因表达诱导的分子机制和翻译后修饰在体外对Ref-1功能的影响都还不清楚。最近有研究称, Akt (PKB)抗氧化,抗凋亡的机制是: Akt使Rac-1磷酸化而失活,并减少在氧合肝细胞中Rac-1诱导的ROS产物,抑制低氧/再氧合诱导的细胞凋亡^[29-30]。研究Ref-1水平与肝脏氧化应激病理之间的联系,不仅对于了解Ref-1在这些病理起始和发展中的作用机制,而且对寻找诊断标志和治疗方法都是至关重要的。

2.2 线粒体膜通透性转运孔和ROS在细胞凋亡和线粒体凋亡中的作用 线粒体在细胞凋亡中起重要作用,各种因素诱导的细胞凋亡均出现线粒体功能紊乱,尤其是线粒体跨膜电位($\Delta\Psi$ m)的破坏。目前已清楚,造成 $\Delta\Psi$ m下降的原因是线粒体膜通透转运孔(mitochondrial permeability transition, MPT)的开放。MPT位于线粒体内、外膜之间,由一组蛋白复合体构成。许多因素可影响MPT的开关,其中,线粒体内膜的腺嘌呤核苷酸转位蛋白(ANT)起重要作用。ANT构象的改变影响MPT的开关:当相邻的巯基氧化为二硫键或类似于二硫键的交联复合物时, MPT开放,反之, MPT关闭^[31]。因此MPT的开放及 $\Delta\Psi$ m的破坏与细胞的氧化状态,如巯基氧化、细胞GSH减少及ROS的堆积密切相关。关于ROS诱导MPT开放作用的研究有对立之处。已知在离体线粒体,即使在很低的氧分压下钙离子也可诱导MPT开放^[32-33]。另一方面,在大鼠心肌细胞中ROS可原位诱导MPT开放^[34]。很可能是当位于其他诱导物上游时,ROS调节基序被忽略,或者是存在诱导途径的重叠,当一种途径缺失时不排除其他诱导途径。目前,认为MPT在许多情况下是肝细胞凋亡级联反应中不可缺少的要素^[35-38]。MPT诱导最可能的危害是线粒体ROS过度生成,称之为ROS诱导的ROS释放^[20],他是一种线粒体的ROS级联放大反应,机制仍不清楚。因此,ROS既是

促发和加速MPT开放的重要因素, 又是MPT开放的产物, 这种正反馈机制使MPT开放具有自我放大效应和“全”或“无”的特点. 线粒体大的通道和MPT诱导的同源性提示: 大通道的开放(可能由于过多的ROS产生)是程序性线粒体死亡的一个信号^[39-40], 这将为解决线粒体及细胞溶解这一问题提供理论基础. 这一观念被Skulachev进一步发展为所谓的线粒体凋亡, Zorov *et al*^[34]证明了线粒体凋亡概念的正确性. 作为生命系统中结构组织死亡级联反应的起始相, 这一级联反应从线粒体凋亡, 细胞凋亡到机体衰亡(phenoptosis), 贯穿有机体死亡全过程^[41]. 机体衰亡以及ROS在机体衰亡中的作用有待进一步证实. 另外, ROS在凋亡中的作用和凋亡调控蛋白Bcl-2有关^[42]. Bcl-2基因所编码的蛋白质属于胞内膜整合蛋白, 他对大多数因素诱导的细胞凋亡具有负性调节作用. 近来在对Bcl-2作用机制研究中发现Bcl-2抑制细胞凋亡作用可能涉及Bcl-2对凋亡过程中ROS产生的影响^[43-44]. Hochman *et al*^[45]认为Bcl-2蛋白是一种ROS清除剂, 能有效清除超氧阴离子等氧自由基, 抑制过氧化物产生及ROS对细胞的损伤. 有研究称Bcl-2并不能降低氧化应激引起的ROS产生, 但能阻止线粒体 $\Delta\Psi_m$ 的下降^[46]. 另外, 在酵母和植物的细胞凋亡中也涉及ROS的参与, 提示氧化还原敏感性凋亡信号通路可能并不依赖于Bcl-2^[44]. 总之, Bcl-2可能并不能抑制凋亡诱导因子引起的细胞内初次ROS的产生, 但Bcl-2能够阻断第2次大量ROS的产生(主要是由线粒体功能改变引起的ROS产生).

3 缺血, 再氧合和缺血预处理

肝脏可发生3种缺血再灌注的损伤: 分别为冷、热、复热3型, 冷缺血几乎只发生在肝移植的手术中, 该技术中有意的降低肝移植物的代谢, 从而延长器官存活时间^[47-48]. 热缺血主要发生于肝移植、肝损伤、休克、创伤及肝手术. 复热型缺血主要发生在肝移植的操作过程或是在将移植物移植到受体的过程中. 冷缺血的损伤主要发生于窦状上皮细胞^[48], 窦状上皮细胞分离, 失去细胞质变成圆形, 脱离细胞外基质和细胞骨架而进入窦腔中. 内皮细胞壁的破坏会导致白细胞和血小板的黏附, 从而导致微循环障碍^[49-51]. 同冷缺血相比, 热缺血的耐受性更差, 很快导致细胞的死亡. 再灌注时, 库氏细胞被激活, 同时再灌注早期因子与相应受体结合和氧自由基的

释放启动凋亡导致肝细胞的死亡^[50]. 再灌注后, 白细胞快速地与裸露的窦细胞相结合导致损伤. 激活的库氏细胞释放的TNF- α 和IL-1, 导致了CD11B在白细胞的表达上调并聚集这些细胞到窦细胞, 损伤的机制是活性氧的释放. 复热型对于肝结构的完整性和这种类型的损伤机制还不清楚, 可能是冷和热损伤的合并.

ROS产生于缺血组织再灌注后早期, 引起的氧化应激是细胞损伤的主要因素. 缺血期, 黄嘌呤脱氢酶转变成黄嘌呤氧化酶. 再灌注时, 黄嘌呤氧化酶与分子氧反应产生ROS. 因此, 缺血再灌注期间主要的氧化爆发发生在恢复氧供后. 在肝细胞中, 许多炎症介质如TNF- α , IL-1或干扰素可以导致活性氧自由基的合成, 库氏细胞表面的Toll-like受体(TLR)可能触发缺血再灌注损伤前期炎症反应^[52], 提示阻断TLR下游信号通路是有效防止移植肝缺血再灌注损伤的一种方法. 尽管活性氧自由基在许多肝病中的作用被广为接受, 但其确切的机制尚存在争议. 在肝细胞中, 活性氧被认为参与了肝细胞和内皮细胞的死亡, 一个原因是氧化应激导致了线粒体膜的通透性的提高, 而这是一个细胞死亡前的重要事件^[24], 另一个潜在的靶位可能是半胱天冬酶(caspase), 半胱天冬酶可被低剂量的氢氧自由基激活, 然而大剂量的氢氧自由基反而会抑制他, 因此活性氧是促进还是抑制细胞凋亡依赖于氧化应激发生的程度^[53]. 但是, 缺血再灌注中细胞反应的分子机制尚不完全清楚. 肝中的Ref-1和NF- κ B蛋白可能起主要作用, 在小鼠模型中, 通过腺病毒载体介导的Ref-1高表达可抑制再灌注氧化应激^[54]. 在氧含量正常的情况下线粒体能量供应是由呼吸提供的, 然而低氧情况下, 线粒体通过ATP酶反应的逆反应仍保持能量供应^[55]. 这就会使蓄积的ATP在需氧期造成浪费, 也造成无氧期的糖酵解. 很明显, 当线粒体膜电位这最后一道防线瓦解后细胞死亡在所难免. 在心肌细胞, 星形胶质细胞中, 用可渗透入线粒体的荧光染料染色并用中等强度的激发光照射后, 可观察到线粒体内光促作用下的ROS的产生, 表现为这部分线粒体膜电位的长时间的波动^[56], 但最后细胞也会死亡. 在常态下有人观察到线粒体膜电位类似的波动^[57]. 毫无疑问, 这种线粒体膜电位的波动作为一种病理状态对细胞将产生致命影响, 但这种波动可被细胞ATP缓冲. 低氧本身对细胞极端危险, 在神经组织中, 轻微的低氧很快就引起大量谷氨酸释放^[58], 由于酪氨酸甲酯的

■创新盘点

缺血再灌注损伤的报道已有许多, 以往多侧重于细胞因子和转录因子方面以及组织结构形态学改变的阐述, 其中活性氧簇作用的综述文献目前很少. 本文首次结合肝脏移植, 综述再灌注损伤中活性氧簇的作用机制.

■应用要点

许多临床疾病中存在着缺血再灌注损伤,特别是在心肌缺血、脑缺血和器官移植中,低氧和再氧合诱发的损伤更为明显。随着器官移植的迅速发展,理解再灌注损伤中活性氧簇的作用,将有助于指导临床肝移植中缺血再灌注损伤的预防和术后抗损伤药物的应用,减少术后并发症,提高移植存活率,并可促进活体肝移植和边缘性供肝肝移植的开展,缓解临床移植供肝短缺。全面理解ROS在缺血再灌注损伤中的作用,不仅对于器官移植有重要意义,而且对许多临床疾病发病机制的阐明和临床治疗的改进起到促进作用。

作用导致神经元不可逆死亡。在其他组织如心脏和肾脏,低氧本身并不引起细胞溶解,而是在组织再氧合时造成ROS爆发性产生^[59]。可见,由低氧到正常氧供这一过程比低氧本身对细胞会造成更大的损伤。

大体而言,细胞可通过短期的低氧然后短期的再氧合,也就是所谓的缺血预处理,来应对这种由低氧到再氧合的变化。尽管肝缺血预处理的益处已经在先期的临床研究被阐述,但其分子机制仍不清楚。许多的介质如腺苷、NO、氧应激、某些心脏抑制因子、TNF- α 、血红素加氧酶等被认为在保护途径中起关键作用^[52]。尽管短周期的缺血可启动保护机制,也可能产生损伤分子(如氧化应激和CO),这种损伤的作用可能会超过他的保护作用,从这一点上讲,非特异性的缺血预处理可能不是最有效的治疗方法,进一步的研究应着重于缺血预处理肝内机制的研究,发现能够阻止缺血预处理损伤作用的药物,这些药物可以特异诱导保护作用,同时可抵消短期的缺血预处理的副作用。肝移植是目前终末期肝病的有效治疗方法,移植肝缺血再灌注损伤是原发性移植无功能或功能低下的主要原因。另外,老年供肝和伴有中到重度肝硬化的供肝更易受到缺血再灌注的损伤。因此,阐明移植后早期缺血再灌注损伤的分子机制,将有利于寻找保护移植物的方法,改善移植效果,并可拓展供体器官的选择标准。

总之,由于氧化应激是多种肝脏疾病的共同发病机制,因此,在氧化损伤早期鉴别分子结构的改变将有助于监测疾病的进展程度并可早期识别。为定位这一重要的作用位点,就要辨别那些表达和功能被氧化应激直接改变的基因。基因表达的改变可以通过两种方法检查。一种方法是研究已知的氧化应激作用的单个候选基因的表达,如c-jun^[29]和NF- κ B^[60]。但是,已知氧化应激的生物反应是通过复杂的基因排列的改变介导的^[61],因此,研究单个候选基因不足以阐明基于氧化应激的肝病复杂机制。另一种方法包括DNA微阵列、差异显示和蛋白质组学,能够同时检测许多基因产物的改变。目前,对肝细胞氧化应激时参与的蛋白质类了解不多,因为以往的大部分研究多是在RNA水平。蛋白质组学的出现,使得研究各种细胞单个蛋白的基因表达成为可能^[62]。应用蛋白质组学技术,最近研究了人类上皮细胞氧化应激早期分子作用位点^[63]。这一研究表明,蛋白质组学方法有望检出氧化应激早期

分子标记物。氧化还原基因治疗已证明能够解决肝移植后与缺血再灌注期间氧化损伤的有关问题^[64],而蛋白质组学技术正好满足了这一治疗方法对于最佳作用位点识别的需求。

4 参考文献

- 1 Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 2006; 43: S63-S74
- 2 Nohl H, Jordan W. The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide. *Eur J Biochem* 1980; 111: 203-210
- 3 Wheeler MD. Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 300-306
- 4 Bray TM. Antioxidants and oxidative stress in health and disease: introduction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 195
- 5 Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev* 2005; 24: 55-99
- 6 Loguercio C, Federico A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1-10
- 7 Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 231-242
- 8 Kang KJ. Mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury and protection against reperfusion injury. *Transplant Proc* 2002; 34: 2659-2661
- 9 Siegmund SV, Dooley S, Brenner DA. Molecular mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Dig Dis* 2005; 23: 264-274
- 10 Berrevoet F, Schafer T, Vollmar B, Menger MD. Ischemic preconditioning: enough evidence to support clinical application in liver surgery and transplantation? *Acta Chir Belg* 2003; 103: 485-489
- 11 McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-163
- 12 MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 23-33
- 13 Zorov DB, Krasnikov BF, Kuzminova AE, Vysokikh MYu, Zorova LD. Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria. *Biosci Rep* 1997; 17: 507-520
- 14 Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 1997; 11: 118-124
- 15 Mikkelsen RB, Wardman P. Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms. *Oncogene* 2003; 22: 5734-5754
- 16 Staal FJ, Anderson MT, Staal GE, Herzenberg LA, Gitler C, Herzenberg LA. Redox regulation of signal transduction: tyrosine phosphorylation and calcium influx. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 3619-3622
- 17 Sun X, Majumder P, Shioya H, Wu F, Kumar S, Weichselbaum R, Kharbada S, Kufe D. Activation of the cytoplasmic c-Abl tyrosine kinase by reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2000; 275: 17237-17240
- 18 Nakamura K, Hori T, Sato N, Sugie K, Kawakami T, Yodoi J. Redox regulation of a src family protein

- tyrosine kinase p56lck in T cells. *Oncogene* 1993; 8: 3133-3139
- 19 Cairo G, Recalcati S, Pietrangelo A, Minotti G. The iron regulatory proteins: targets and modulators of free radical reactions and oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 1237-1243
 - 20 Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G583-G589
 - 21 Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95
 - 22 Xanthoudakis S, Curran T. Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J* 1992; 11: 653-665
 - 23 Hu Y, Jin X, Snow ET. Effect of arsenic on transcription factor AP-1 and NF-kappaB DNA binding activity and related gene expression. *Toxicol Lett* 2002; 133: 33-45
 - 24 Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 351-369
 - 25 Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40
 - 26 Tell G, Damante G, Caldwell D, Kelley MR. The intracellular localization of APE1/Ref-1: more than a passive phenomenon? *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 367-384
 - 27 Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res* 2005; 97: 967-974
 - 28 Tell G, Zecca A, Pellizzari L, Spessotto P, Colombatti A, Kelley MR, Damante G, Pucillo C. An 'environment to nucleus' signaling system operates in B lymphocytes: redox status modulates BSAP/Pax-5 activation through Ref-1 nuclear translocation. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 1099-1105
 - 29 Czaja MJ, Liu H, Wang Y. Oxidant-induced hepatocyte injury from menadione is regulated by ERK and AP-1 signaling. *Hepatology* 2003; 37: 1405-1413
 - 30 Matsuzawa A, Ichijo H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7: 472-481
 - 31 Marchetti P, Decaudin D, Macho A, Zamzami N, Hirsch T, Susin SA, Kroemer G. Redox regulation of apoptosis: impact of thiol oxidation status on mitochondrial function. *Eur J Immunol* 1997; 27: 289-296
 - 32 Kuzminova AE, Zhuravlyova AV, Vyssokikh MYu, Zorova LD, Krasnikov BF, Zorov DB. The permeability transition pore induced under anaerobic conditions in mitochondria energized with ATP. *FEBS Lett* 1998; 434: 313-316
 - 33 Krasnikov BF, Kuzminova AE, Zorov DB. The Ca²⁺-induced pore opening in mitochondria energized by succinate-ferricyanide electron transport. *FEBS Lett* 1997; 419: 137-140
 - 34 Zorov DB, Koblinsky E, Juhaszova M, Sollott SJ. Examining intracellular organelle function using fluorescent probes: from animalcules to quantum dots. *Circ Res* 2004; 95: 239-252
 - 35 Pouliquen D, Bellot G, Guihard G, Fichet P, Meflah K, Vallette FM. Mitochondrial membrane permeabilization produced by PTP, Bax and apoptosis: a 1H-NMR relaxation study. *Cell Death Differ* 2006; 13: 301-310
 - 36 Armstrong JS. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. *Bioessays* 2006; 28: 253-260
 - 37 Kim JS, He L, Qian T, Lemasters JJ. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes. *Curr Mol Med* 2003; 3: 527-535
 - 38 Kim JS, He L, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 463-470
 - 39 Kinnally KW, Zorov D, Antonenko Y, Perini S. Calcium modulation of mitochondrial inner membrane channel activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 1183-1188
 - 40 Honda HM, Korge P, Weiss JN. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1047: 248-258
 - 41 Skulachev VP. Programmed death phenomena: from organelle to organism. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959: 214-237
 - 42 Ouyang YB, Giffard RG. Changes in astrocyte mitochondrial function with stress: effects of Bcl-2 family proteins. *Neurochem Int* 2004; 45: 371-379
 - 43 Takahashi A, Masuda A, Sun M, Centonze VE, Herman B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pHm). *Brain Res Bull* 2004; 62: 497-504
 - 44 Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 2002; 84: 131-141
 - 45 Hochman A, Sternin H, Gorodin S, Korsmeyer S, Ziv I, Melamed E, Offen D. Enhanced oxidative stress and altered antioxidants in brains of Bcl-2-deficient mice. *J Neurochem* 1998; 71: 741-748
 - 46 Tang XQ, Feng JQ, Chen J, Chen PX, Zhi JL, Cui Y, Guo RX, Yu HM. Protection of oxidative preconditioning against apoptosis induced by H₂O₂ in PC12 cells: mechanisms via MMP, ROS, and Bcl-2. *Brain Res* 2005; 1057: 57-64
 - 47 Casillas-Ramirez A, Ben Mosbah I, Franco-Gou R, Rimola A, Rosello-Catafau J, Peralta C. Ischemia-reperfusion syndrome associated with liver transplantation: an update. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 306-313
 - 48 Huet PM, Nagaoka MR, Desbiens G, Tarrab E, Brault A, Bralet MP, Bilodeau M. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology* 2004; 39: 1110-1119
 - 49 Quintana AB, Guibert EE, Rodriguez JV. Effect of cold preservation/reperfusion on glycogen content of liver. Concise review. *Ann Hepatol* 2005; 4: 25-31
 - 50 Ohkohchi N, Shibuya H, Tsukamoto S, Sakurada M, Oikawa K, Terashima T, Satomi S. Kupffer's cells modulate neutrophil activity by superoxide anion and tumor necrosis factor-delta in reperfusion injury of liver transplantation-mechanisms of radical generation and reperfusion injury after cold ischemia. *Transplant Proc* 1999; 31: 1055-1058
 - 51 Colina F. The role of histopathology in hepatic transplantation. *Semin Diagn Pathol* 1992; 9: 200-209
 - 52 Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Ischemia

■名词解释

1 活性氧簇: 是外源性氧化剂或细胞内有氧代谢过程中产生的具有很高生物活性的含氧化合物的总称, 包括超氧阴离子(O²⁻)、过氧化氢(H₂O₂)和羟自由基(HO•)等。

2 氧化还原因子-1: 37 kDa的蛋白质, 是DNA损伤碱基切除修复途径中重要的核酸内切酶和细胞内氧化还原调节的关键点, 此外还可激活许多转录因子、诱导药物肝内代谢。

3 Toll-like受体: TLRs是果蝇属Toll蛋白的哺乳动物同系物, 在先天性宿主防御反应和炎症反应种起重要作用。TLRs是IL-1超家族成员, 在结构上, 以富含亮氨酸胞外结构域和Toll/IL-1R(TIR)胞内结构域为特征, 目前已发现11种TLRs。

■同行评价

组织再灌注损伤的机制研究是个老课题, 结合肝移植的再灌注损伤具有一定的临床意义; 再灌注损伤的分子机制很复杂, 活性氧簇的研究是个较新的切入点。

- and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 1653-1656
- 53 Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006; 43: S31-S44
- 54 Ozaki M, Suzuki S, Irani K. Redox factor-1/APE suppresses oxidative stress by inhibiting the rac1 GTPase. *FASEB J* 2002; 16: 889-890
- 55 Di Lisa F, Blank PS, Colonna R, Gambassi G, Silverman HS, Stern MD, Hansford RG. Mitochondrial membrane potential in single living adult rat cardiac myocytes exposed to anoxia or metabolic inhibition. *J Physiol* 1995; 486 (Pt 1): 1-13
- 56 Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J Exp Med* 2000; 192: 1001-1014
- 57 Aon MA, Cortassa S, Marban E, O'Rourke B. Synchronized whole cell oscillations in mitochondrial metabolism triggered by a local release of reactive oxygen species in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2003; 278: 44735-44744
- 58 Isaev NK, Andreeva NA, Stel'mashuk EV, Zorov DB. Role of mitochondria in the mechanisms of glutamate toxicity. *Biochemistry (Mosc)* 2005; 70: 611-618
- 59 Darley-Usmar VM, Stone D, Smith D, Martin JF. Mitochondria, oxygen and reperfusion damage. *Ann Med* 1991; 23: 583-588
- 60 Tacchini L, Radice L, Pogliaghi G, Bernelli-Zazzera A. Differential activation of heat shock and nuclear factor kappaB transcription factors in postischemic reperfused rat liver. *Hepatology* 1997; 26: 186-191
- 61 Morgan KT, Ni H, Brown HR, Yoon L, Qualls CW Jr, Crosby LM, Reynolds R, Gaskill B, Anderson SP, Kepler TB, Brainard T, Liv N, Easton M, Merrill C, Creech D, Sprenger D, Conner G, Johnson PR, Fox T, Sartor M, Richard E, Kuruvilla S, Casey W, Benavides G. Application of cDNA microarray technology to in vitro toxicology and the selection of genes for a real-time RT-PCR-based screen for oxidative stress in Hep-G2 cells. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 435-451
- 62 Zhu H, Bilgin M, Snyder M. Proteomics. *Annu Rev Biochem* 2003; 72: 783-812
- 63 Paron I, D'Elia A, D'Ambrosio C, Scaloni A, D'Aurizio F, Prescott A, Damante G, Tell G. A proteomic approach to identify early molecular targets of oxidative stress in human epithelial lens cells. *Biochem J* 2004; 378: 929-937
- 64 Wheeler MD, Kono H, Yin M, Rusyn I, Froh M, Connor HD, Mason RP, Samulski RJ, Thurman RG. Delivery of the Cu/Zn-superoxide dismutase gene with adenovirus reduces early alcohol-induced liver injury in rats. *Gastroenterology* 2001; 120: 1241-1250

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

● 消息 ●

第八届中西医结合实验医学研讨会

本刊讯 第八届中西医结合实验医学研讨会将于2006-10在南京举行, 现将征文通知如下:

1 截稿日期

2006-08-31截稿

2 联系方式

南京中山东路305号南京军区总医院 齐名; 邮编: 210002; 电话: 025-52926620.

人肝癌相关新基因LAPTM4B研究进展

孙丽, 张青云

孙丽, 锦州医学院生化教研室 辽宁省锦州市 121001
张青云, 北京大学临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院检验科 北京市 100036

通讯作者: 张青云, 100036, 北京市, 北京大学临床肿瘤学院, 北京肿瘤医院检验科. qingyuzhang@btamail.net.cn
电话: 010-88196336

收稿日期: 2006-04-07 接受日期: 2006-04-16

摘要

LAPTM4B是北京大学基础医学院细胞生物学教研室新近克隆的一个在肝细胞癌中高表达的新基因, 具有癌基因特性. 本文将对其发现过程、结构、理化性质、功能研究及其多态性与肿瘤的关系等方面进行初步总结.

关键词: LAPTM4B; 肝细胞癌; 癌基因; 多态性

孙丽, 张青云. 人肝癌相关新基因LAPTM4B研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1805-1809

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1805.asp>

0 引言

肝癌的发生是由多基因、多因素参与, 不同基因在不同时期的表达及功能发生紊乱的复杂过程. 目前发现的与肝癌发生、发展有着密切关系的基因还不多^[1]. 寻找新的肝癌相关基因并深入研究这些基因在肝癌发生、发展过程中的作用, 对于阐明肝癌的发病机制以及诊断、预防和治疗均具有重要意义. 溶酶体相关4次跨膜蛋白质B (lysosome-associated protein transmembrane 4 beta, LAPTM4B)基因是通过荧光差异显示技术筛选出的在成人正常肝中低表达而在绝大多数肝癌组织中表达高度上调的cDNA片段^[2-4]. 基于其表达产物存在4个穿膜区、有典型的溶酶体定位信号及与LAPTM4A同源46%这样一些结构特性, 被HUGO命名为溶酶体相关4次跨膜蛋白质B, 即LAPTM4B^[5]. 由于LAPTM4B基因编码的蛋白明显与细胞的分化、增殖、黏附、迁移和癌变相关, 还能与多种细胞表面的信号分子形成复合物, 提示其很可能作为一个原癌基因在生命的进化过程中发挥作用. 本文将对其发现过程、结构、理化性

质、功能研究及其多态性与肿瘤的关系等方面作以论述.

1 LAPTM4B基因的发现及结构特点

北京大学基础医学院细胞生物学教研室刘军建、邵根泽 *et al*通过荧光差异显示技术, 选择增殖/分化状态不同的4种肝组织: 终末分化的正常肝组织、旺盛增殖的胎肝组织、异常分化的HCC组织及其配对非癌肝组织进行筛选, 得到110多条在4种组织中差异表达的cDNA片段^[6]. 从所得片段中选取48条, 进行序列测定, 并将测得结果逐条与GenBank数据库作同源性比较 (Blast), 发现其中5条片段比较有意义: 与已知GenBank序列同源性高(>86%), 基因功能与结构未知; 为了排除差异显示技术的假阳性, 同时采用RNA狭缝杂交技术验证测序的48条差异表达的部分片段在不同肝组织中的表达, 发现4条片段在4种组织中表达有一定规律, 其中2条在正常肝和胎肝中表达较弱, 随着肝组织由正常向恶性转变, 其表达的比率和表达程度均有上调. 综合Blast结果, 得到与已知GenBank序列有高度同源性的、但基因结构与功能均未知的在正常组织中表达较弱、在肝癌组织中高度表达的cDNA片段, 并用ESTs拼接和5' RACE技术克隆了其全长cDNA^[7]. 该基因是一个定位于染色体8q22.1的未知新基因, 具有7个外显子, 6个内含子, cDNA全长含2245个核苷酸, 推导编码溶酶体相关4次LAPTM4B.

研究发现LAPTM4B存在两种等位基因: LAPTM4B*1和LAPTM4B*2. 二者的区别在于第一外显子5'UTR内一段19 bp的序列. LAPTM4B*1只有一个19 bp序列, 而LAPTM4B*2有两个且紧密串连. LAPTM4B基因在其转染的真核细胞中具有两种编码产物: LAPTM4B-35和LAPTM4B-24. LAPTM4B-35是LAPTM4B基因完整的ORF的编码产物, 而LAPTM4B-24则是LAPTM4B基因中从第二个ATG翻译的产物, 二者N端相差91个氨基酸序列. 前者与肝癌的低分化有关, 且促进细胞增殖、

■背景资料

LAPTM4B基因是通过荧光差异显示技术筛选出的在绝大多数肝癌组织中表达高度上调的cDNA片段, 其编码的蛋白明显与细胞的分化、增殖、黏附、迁移和癌变有关, 还能与多种细胞表面的信号分子形成复合物, 提示其很可能作为一个原癌基因在肿瘤的发生、发展中起重要的作用. 目前, 研究较多的是LAPTM4B基因多态性与肿瘤易感性的关系, 其能否作为肝细胞癌标志物应用于临床诊断及评估预后正在研究中.

■ 研发前沿

目前,研究较多的是*LAPTM4B*基因表达调控、活性以及该基因多态性与肿瘤易感性的关系。亟待研究阐明其在肿瘤发生、发展中的作用以及*LAPTM4B*基因多态性与肿瘤易感性相关的机制。

迁移和侵袭,导致细胞癌变,后者恰恰相反,可见二者表达丰度的平衡可能是调控细胞增殖与分化的重要因素^[8-9]。

生物信息学研究发现,*LAPTM4B*蛋白的N端和C端富含脯氨酸,尤其是N端的那一段不仅富含脯氨酸,而且其两侧均为疏水性氨基酸,这一结构是SH3配体的典型结构特征。迄今发现的所有SH3配体都含有一个“PXXP”结构(P代表脯氨酸,X代表任一氨基酸残基)。许多蛋白质包括信号转导分子、蛋白激酶和磷酸酶、磷脂酶、接头蛋白和细胞骨架蛋白等都含有SH3结构域^[10]。因此这种富含脯氨酸的结构在其两侧氨基酸残基的参与下,能直接与多种蛋白质包括多种信号分子(如Src家族, Sos, Grb-2, PLC- γ , PI3K及STAT41等)的SH3结构域相互作用,介导细胞信号转导、细胞内蛋白的定位与隔离等多个过程^[11]。*LAPTM4B*蛋白的“PXXP”及其毗邻氨基酸序列与PI3K、丝/苏氨酸蛋白磷酸酶2A、蛋白激酶C、鸟苷酸环化酶等蛋白中富含脯氨酸的区域很类似,这可能是其参与细胞信号转导等重要功能的提示。此外,*LAPTM4B*蛋白N端还含有数个潜在的磷酸化位点,如两个cAMP/cGMP依赖的蛋白激酶位点和两个蛋白激酶C位点,C端有一个酪氨酸残基磷酸化位点。这些位点可能与该分子的功能活化有关。*LAPTM4B*的酪氨酸残基磷酸化可生成SH2结构域的结合位点,在信号转导中发挥重要作用。

和许多溶酶体跨膜蛋白一样,*LAPTM4B*蛋白的胞质尾中含有多个保守基序结构:3个“YXX ϕ ”(Y为酪氨酸,X为任一氨基酸残基, ϕ 为疏水性氨基酸残基),一个“VL”和一个“LL”。这些基序是溶酶体蛋白典型的膜定位和分选信号^[12]。如对*LAPTM4A*的研究发现,其C端的两个“YXX ϕ ”和一个“VL”是重要的溶酶体膜靶向信号^[13]。而差速离心分离的亚细胞组分和Triton X-114相抽提物的Western blot分析都表明*LAPTM4B*蛋白属于膜中的整合蛋白质。其4个穿膜序列可能负责将整个分子整合于膜脂双层中。*LAPTM4B*稳定转染的BHK细胞的免疫细胞化学分析和BEL-7402细胞免疫荧光抗体的共聚焦显微分析表明,*LAPTM4B*存在于细胞质膜和胞内囊泡,如内吞体、溶酶体及其他膜相关的细胞器^[6]。

2 *LAPTM4B*的生物学功能

*LAPTM4B*基因在进化中高度保守,人与小鼠

*LAPTM4B*基因在蛋白水平上有92%的同源性。人*LAPTM4B*有一个同源基因*LAPTM4A*,二者在氨基酸水平同源性为46%。研究表明,*LAPTM4A*是一个溶酶体四次跨膜蛋白,小鼠*LAPTM4A*是细胞内膜系统上的一个核苷酸转运蛋白,能介导药物敏感性酵母菌的多药耐药性表型^[14]。*LAPTM4B*还与其他溶酶体跨膜蛋白如*LAPTM5*有许多相同的特征^[15-19]。以上这些特点提示,*LAPTM4B*可能是一个重要的溶酶体跨膜蛋白,在细胞中具有重要的功能。

2.1 参与细胞分化 *LAPTM4B*在大部分患者的肝癌组织不同程度高表达,而在相应的癌旁非癌组织中表达低。进一步研究发现,其表达水平与肿瘤的分化状态相关:即在低分化肝癌中高表达;在中分化肝癌中表达中度升高;而在高分化肝癌中表达水平无明显变化。这表明*LAPTM4B*对于细胞生长、增殖和分化起重要作用,其高表达可能参与或促进了肝癌的发生与发展。*LAPTM4B*在睾丸、卵巢等生殖腺组织上调表达这一现象与许多癌基因相似,提示他也有可能是一个潜在的癌基因,对于肿瘤的发生起重要作用。

2.2 促进细胞增殖 研究发现稳定转染*LAPTM4B*后使HLE细胞的生长速度和DNA合成明显增加,其原因可能是核内转录因子c-Fos和c-Jun的过度表达激活了细胞周期调控蛋白基因的转录。细胞周期调控蛋白如cyclin D1、cyclin E及CDK, PCNA和P53等的转录受AP-1 (c-Fos和c-Jun的异二聚体)调控。其中cyclin D1和cyclin E蛋白是细胞周期G₁期及G₁/S期演进的关键蛋白质,为G₁/S细胞周期中检验点的主要正向调控因子。研究表明cyclin D1和cyclin E蛋白的表达异常不仅将导致细胞周期的调控失常,也与肿瘤细胞的增殖、发展有关。有报道甲状腺腺瘤、食管癌、直肠癌及乳癌中均存在11q13D的扩增并伴有cyclin D1蛋白的过度表达。cyclin E蛋白也发现在HCC中过度表达,而且发现在肝硬化结节和靠近HCC肿瘤的肝组织中高表达,表明该蛋白的过度表达与正常和恶性肝细胞增殖有关^[20]。同时在结肠癌、胃癌、乳癌、卵巢癌和急性淋巴细胞白血病中都能检测到cyclin E蛋白的过度表达^[21]。在稳定转染*LAPTM4B*的HLE细胞中不仅检测到S期细胞的百分比增加,而且检测到细胞周期蛋白cyclin D1和cyclin E的表达大幅上调,提示*LAPTM4B*促进HLE细胞的增殖可能是由于cyclin D1和cyclin E蛋白的过度表达而加速了细胞通过G₁检验点进入S期,从而推动细胞周期加

速运行, 使细胞持续性增殖加快。

2.3 导致细胞恶变 *LAPTM4B*过表达不仅仅使细胞的增殖加速, 而且可进一步向恶性的增殖失控转化。 *LAPTM4B*转染的HLE细胞在低血清(10 mL/L小牛血清)条件下仍以高速增殖, 而对照的MOCK细胞基本停止增殖。这种差别说明 *LAPTM4B*的过表达使细胞对生长因子的依赖性降低, 可能自分泌生长因子。 *LAPTM4B*过表达的细胞还表现出极强的在软胶中形成集落的倾向, 细胞集落不但比对照大, 而且重叠生长, 说明不仅丧失了生长的接触抑制, 而且也丧失了迁移的接触抑制。这种表型通常与成瘤性一致。 *LAPTM4B*转染的小鼠NIH3T3细胞已证明其具有在NIH小鼠形成纤维肉瘤的性质^[22]。

2.4 迁移性和侵袭性增强 用Boyden Chamber法测定 *LAPTM4B*转染的HLE细胞和MOCK细胞的体外迁移能力。结果表明: 作用18 h后, MOCK细胞迁移穿过膜孔的细胞总数为1216.5 ± 403.8个, 而 *LAPTM4B*转染的HLE细胞为4082.5 ± 748.8个, *LAPTM4B*转染的HLE细胞的迁移能力比MOCK增加了2.36倍^[23]。这说明稳定转染 *LAPTM4B*的HLE细胞的迁移性和侵袭性增强, 即水解破坏人工基底膜、穿过支撑膜的膜孔从Boyden小室的上室向下迁移的能力明显增强, 提示 *LAPTM4B*蛋白的高表达对于增强HLE细胞的迁移和侵袭性有重要的作用, 促进了恶性转化的发展。

2.5 形成信号分子复合物 刘歆荣 *et al*^[6]通过免疫共沉淀已经证明 *LAPTM4B*蛋白可与整合素 α_6 亚单位形成复合物, 免疫荧光共聚焦显微术也证实二者在细胞周边也有共同分布, 而且当肝癌细胞种植在层黏连蛋白基质时, *LAPTM4B*- α_6 复合物的生成增多^[24-25], 这提示 *LAPTM4B*蛋白可能具有将细胞外基质及生长因子两方面的增殖信号在质膜中整合在一起的独特作用。

3 *LAPTM4B*的组织分布和在肿瘤中的表达

*LAPTM4B*基因mRNA在人的多种正常组织中广谱表达: 主要在睾丸、心肌和骨骼肌高水平表达; 在卵巢、肾和胰腺中度表达; 在脾、胸腺和肝低表达; 在肺和外周血细胞表达水平最低^[7,26]。87.3% (48/55)人肝癌组织中 *LAPTM4B*表达上调, 其mRNA水平与肝癌分化状态密切相关^[27]。用 *LAPTM4B* N端胞质域中99个氨基酸的兔源多克隆抗体: *LAPTM4B*-N₁₋₉₉-pAb对 *LAPTM4B*-35的表达水平进行检测, 发现 *LAPTM4B*-35的表达

水平与肝癌组织的病理分级存在相关性, 即在高分化的肝癌中 *LAPTM4B*-35低表达; 中分化的肝癌中 *LAPTM4B*-35中表达; 而在低分化肝癌中 *LAPTM4B*-35高表达, 并且 *LAPTM4B*-35主要表达于癌组织中的肝癌细胞, 而在间质则无明显表达^[28]。免疫组织化学发现 *LAPTM4B*-35明显表达于乳癌、胃癌、肺癌和结肠癌中, 而基本不表达于食管癌和直肠癌中^[29-31]。

4 *LAPTM4B*的基因多态性与肿瘤的关系

*LAPTM4B*的两个等位基因 *LAPTM4B**1和 *LAPTM4B**2的区别在于第一外显子5'UTR内一段19 bp的序列的拷贝数, 即*1有一个拷贝, 而*2有两个并紧密串连。

正常人群 *LAPTM4B*有三种基因型: *1/1、*1/2和*2/2。为了探讨 *LAPTM4B*基因型与肝癌的易感性, 邵根泽 *et al*^[32]通过基于PCR的 *LAPTM4B*基因分型方法, 对211例正常人和57例肝癌患者 *LAPTM4B*分型。结果表明: 肝癌组*2/2基因型频率(23%)显著高于正常对照组(11%)($P < 0.01$, $OR = 2.888$); 而*1/1基因型频率显著低于正常组。这提示*2/2基因型个体具有较高的肝癌患病风险, 可能是肝癌的易感基因。此外, 邓丽娟 *et al*^[33]的研究结果也显示肺癌人群*2/2基因型频率显著高于正常对照组($P < 0.01$, $OR = 3.26$)。相反, 对广东潮汕食管癌高发地区118例正常人和116例食管癌 *LAPTM4B*基因的研究发现, 二者并无相关性^[6]。这表明 *LAPTM4B*基因多态性与肿瘤的相关性有一定的肿瘤特异性, 并非所有肿瘤的易感性都与 *LAPTM4B*基因相关^[20], 可能只与肝癌或部分肿瘤的易感性相关。进一步研究发现, *LAPTM4B**2基因的启动子活性比*1低20%, 表明第一外显子19 bp DNA序列对基因的转录起调节作用, 提示他可能作为负性顺式调控元件影响基因的表达调控。更为重要的一点是由于19 bp DNA这一额外序列的存在, *2等位基因mRNA预期编码的蛋白比*1等位基因在N端多出53个氨基酸残基, 这可能是 *LAPTM4B*基因型与肿瘤易感性相关的物质基础^[3], 从而使等位基因*2比*1更容易遭受病毒、免疫和环境等因素的攻击而导致基因的失控表达, 从而在肿瘤的启动中发挥作用或者推动肿瘤的演进; 相对而言, 等位基因*1更具保护性。

总之, 目前对 *LAPTM4B*基因的研究已经显示出该基因的重要性, 对该基因及其不同的等位基因的进一步研究将有助于阐明其在肿瘤的

■应用要点

*LAPTM4B*基因有望成为肝细胞癌的肿瘤标志物, 用于肿瘤的诊断、治疗效果的监测及判断预后等的实验依据。随着对 *LAPTM4B*基因结构研究的深入, *LAPTM4B*作为肿瘤诊断及治疗的靶基因也将会应用于临床。

■同行评价

寻找与肝癌发生、发展关系密切的基因,以阐明肝癌的发病机制对肝癌的诊断、治疗与预防具有非常重要的意义, *LAPTM4B*即其中之一。本研究系统论述其发现、结构、理化性质、功能研究及与肝癌关系,创新性及科学性强,对于肿瘤相关基因的发现及深入研究有意义。

发生、发展中的作用以及基因多态性与肿瘤易感性相关的机制。今后有望将其作为肿瘤标志物,检测患者血中此基因表达产物的水平,用于临床诊断及评估预后;同时亦可作为肿瘤基因治疗的新靶点。

5 参考文献

- 1 Goldenberg D, Ayesh S, Schneider T, Pappo O, Jurim O, Eid A, Fellig Y, Dadon T, Ariel I, de Groot N, Hochberg A, Galun E. Analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma using cDNA arrays. *Mol Carcinog* 2002; 33: 113-124
- 2 刘军建, 张杰, 张宁, 芮静安, 金城, 周柔丽. 用荧光差异显示法分离新的肝细胞癌相关基因. 北京医科大学学报 2000; 32: 411-414
- 3 刘军建, 张杰, 周柔丽, 金城. LHS cDNA的部分克隆及其表达对肝癌细胞行为的影响. 北京医科大学学报 2000; 32: 526-529
- 4 Shao GZ, Zhou RL, Zhang QY, Zhang Y, Liu JJ, Rui JA, Wei X, Ye DX. Molecular cloning and characterization of LAPTM4B, a novel gene upregulated in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 5060-5069
- 5 Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997; 11: 428-442
- 6 刘歆荣, 周柔丽, 张青云, 张页, 邵根泽, 金月英, 张莎, 林明, 芮静安, 叶大雄. 人肝癌相关新基因编码产物 LAPTM4B的鉴定及其生物学特性. 北京大学学报(医学版) 2003; 35: 340-347
- 7 Liu J, Zhou R, Zhang N, Rui J, Jin C. Biological function of a novel gene overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2000; 113: 881-885
- 8 Kohzato N, Dong Y, Sui L, Masaki T, Nagahata S, Nishioka M, Konishi R, Tokuda M. Overexpression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 is correlated with development of hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 2001; 21: 27-39
- 9 Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, Dawson S, Nonoguchi K, Kido T, Mayer RJ, Arii S, Fujita J. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nat Med* 2000; 6: 96-99
- 10 Cohen GB, Ren R, Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* 1995; 80: 237-248
- 11 Kay BK, Williamson MP, Sudol M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* 2000; 14: 231-241
- 12 Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacio JS. Lysosome-related organelles. *FASEB J* 2000; 14: 1265-1278
- 13 Hogue DL, Nash C, Ling V, Hobman TC. Lysosome-associated protein transmembrane 4 alpha (LAPTM4 alpha) requires two tandemly arranged tyrosine-based signals for sorting to lysosomes. *Biochem J* 2002; 365: 721-730
- 14 Hogue DL, Ellison MJ, Young JD, Cass CE. Identification of a novel membrane transporter associated with intracellular membranes by phenotypic complementation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 1996; 271: 9801-9808
- 15 Yunta M, Lazo PA. Tetraspanin proteins as organizers of membrane microdomains and signalling complexes. *Cell Signal* 2003; 15: 559-564
- 16 Cook GA, Longhurst CM, Grgurevich S, Cholera S, Crossno JT Jr, Jennings LK. Identification of CD9 extracellular domains important in regulation of CHO cell adhesion to fibronectin and fibronectin pericellular matrix assembly. *Blood* 2002; 100: 4502-4511
- 17 Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 89-109
- 18 Yunta M, Rodriguez-Barbero A, Arevalo MA, Lopez-Novoa JM, Lazo PA. Induction of DNA synthesis by ligation of the CD53 tetraspanin antigen in primary cultures of mesangial cells. *Kidney Int* 2003; 63: 534-542
- 19 Yunta M, Lazo PA. Apoptosis protection and survival signal by the CD53 tetraspanin antigen. *Oncogene* 2003; 22: 1219-1224
- 20 Yauch RL, Hemler ME. Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochem J* 2000; 351 Pt 3: 629-637
- 21 Ohashi R, Gao C, Miyazaki M, Hamazaki K, Tsuji T, Inoue Y, Uemura T, Hirai R, Shimizu N, Namba M. Enhanced expression of cyclin E and cyclin A in human hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* 2001; 21: 657-662
- 22 何静, 邵根泽, 周柔丽. 肝癌中高表达的新基因 LAPTM4B对细胞增殖及成瘤性的影响. 北京大学学报(医学版) 2003; 35: 348-352
- 23 陈学清, 杨晓鸥, 潘国宗, 朱峰. 酸性磷酸酶法检测体外培养细胞数. 细胞生物学杂志 1999; 21: 197-200
- 24 Hemler ME. Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 578-585
- 25 Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME. Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 106-112
- 26 Morris DG, Musat M, Czirjak S, Hanzely Z, Lillington DM, Korbonits M, Grossman AB. Differential gene expression in pituitary adenomas by oligonucleotide array analysis. *Eur J Endocrinol* 2005; 153: 143-151
- 27 Kasper G, Vogel A, Klamann I, Grone J, Petersen I, Weber B, Castanos-Velez E, Staub E, Mennerich D. The human LAPTM4b transcript is upregulated in various types of solid tumours and seems to play a dual functional role during tumour progression. *Cancer Lett* 2005; 224: 93-103
- 28 Adra CN, Zhu S, Ko JL, Guillemot JC, Cuervo AM, Kobayashi H, Horiuchi T, Lelias JM, Rowley JD, Lim B. LAPTM5: a novel lysosomal-associated multispinning membrane protein preferentially expressed in hematopoietic cells. *Genomics* 1996; 35: 328-337
- 29 彭聪. 一个新的四次跨膜蛋白, LAPTM4B-35, 在肝癌等多种癌组织中的表达与肝癌组织分化的相关性, 以及Ets-1对LAPTM4B启动子转录活性的影响. 北京: 北京大学医学部, 2004
- 30 Peng C, Zhou RL, Shao GZ, Rui JA, Wang SB, Lin M, Zhang S, Gao ZF. Expression of lysosome-associated protein transmembrane 4B-35 in cancer

- and its correlation with the differentiation status of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2704-2708
- 31 Liu XR, Zhou RL, Zhang QY, Zhang Y, Jin YY, Lin M, Rui JA, Ye DX. Structure analysis and expressions of a novel tetra-transmembrane protein, lysosome-associated protein transmembrane 4 beta associated with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1555-1559
- 32 邵根泽. 人肝细胞癌相关基因LPTM4B的克隆及其功能研究. 北京: 北京大学医学部, 2003
- 33 邓丽娟, 张青云, 刘波, 周柔丽. LPTM4B基因多态性与肺癌易感性的关系. 北京大学学报(医学版) 2005; 37: 302-305

电编 张敏 编辑 张海宁

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

• 消息 •

更正与说明专栏

本刊讯《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道, 特设“更正与说明”固定专栏, 包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目, 不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正、就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明, 而且针对文章的学术水平等进行讨论. 在此, 我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》, 给更正与说明栏目投稿. 投稿者凭文章的编号, 可免费注册(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/39.doc>)使用中国生物医学基金论文摘要库3年. 中国生物医学基金论文摘要库(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)收录了1994-2005年国内发表在1204种生物医学类期刊总计20万以上的论文摘要. 这些论文受国家、军队和省部级自然科学基金、杰出青年基金、重大计划项目基金资助, 内容丰富、数据准确, 体现了我国生物医学的发展历程、脉络和方向, 可为相关领域广大学者和研究人员了解并掌握当前研究动态、开辟新的研究领域提供思路.

胰腺癌组织VEGF和MVD表达与CT灌注成像的关系

刘悦, 李艳英, 张在人, 王淑红

■背景资料

新生血管的形成是肿瘤发展和转移的关键步骤。其瘤体的血管生成主要包括新生成的微血管数量增多, 在病理组织学上微血管密度(MVD)的增多等。另外血管内皮生成因子(VEGF)作为肿瘤血管生成的一种主要调控因子与微血管密度密切相关, 是肿瘤血管形成和维持的重要因子之一。CT灌注可间接在活体反映瘤体的血管生成状况。将胰腺癌的影像学表现应用于评价肿瘤血管的血管生成与发生、发展及预后相关性的研究已逐步得到重视。

刘悦, 李艳英, 张在人, 王淑红, 哈尔滨医科大学附属二院CT室, 黑龙江省哈尔滨市 150086

通讯作者: 刘悦, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属二院CT室, liu_yuext@163.com

收稿日期: 2006-03-22 接受日期: 2006-05-08

摘要

血管内皮生长因子作为肿瘤血管生成的一种主要调控因子, 与微血管密度密切相关。胰腺癌组织的血管内皮生长因子和微血管密度的测定对于判断患者的预后, 指导临床治疗和判断疗效等具有重要作用。CT灌注成像可以通过无创伤检查反映胰腺癌的肿瘤血管构成, 在治疗前后提供有价值依据, 对胰腺癌的诊治有重要意义。

关键词: 胰腺癌; VEGF; CT灌注

刘悦, 李艳英, 张在人, 王淑红. 胰腺癌组织VEGF和MVD表达与CT灌注成像的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1810-1812

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1810.asp>

0 引言

胰腺癌是常见的恶性肿瘤之一, 死亡率高, 生存期短。手术切除率仅为5%-25%。早期诊断和正确评价其良恶性有重要临床意义。近年来, 对肿瘤血管生成的研究成为肿瘤研究的热点。一些学者报道^[1-5]瘤体内新生微血管和肿瘤的发生、发展和恶性程度有必然联系。新生血管的形成是肿瘤发展和转移的关键步骤。其瘤体的血管生成主要包括新生成的微血管数量增多, 在病理组织学上微血管密度(microvessel density, MVD)的增多等。另外血管内皮生成因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)作为肿瘤血管生成的一种主要调控因子与微血管密度密切相关, 是肿瘤血管形成和维持的重要因子之一^[6]。CT灌注(computed tomograph perfusion)可间接在活体反映瘤体的血管生成状况。将胰腺癌的影像学表现应用于评价肿瘤血管的生成与发生、发展及预后相关性的研究已逐步得到重视。

1 VEGF的结构和作用

VEGF是Ferrara *et al*^[7]在1989年从牛垂体滤泡细胞液中分离出来的一种高度特异性促血管内皮细胞有丝分裂的生长因子。VEGF是由两个相同的亚基以二硫键交联结合成的二聚体糖蛋白, 有4种变异是由VEGF mRNA剪接方式的不同而产生的蛋白形式。

正常胚胎发育时VEGF有广泛表达, 正常成年者的组织呈低水平表达。在豚鼠和人的一些成熟组织中均发现有VEGF mRNA检出, 并证实肺、肾、肾上腺、肝、胃、心肌细胞及腹腔巨噬细胞中有VEGF的表达^[8-10]。在正常组织中, VEGF的主要作用为维持原有血管密度及血管对运输营养物质所必需的通透性。正常情况下, 内皮细胞处于休眠状态, 是体内极度静止的细胞。在肿瘤和非肿瘤的病理过程中VEGF广泛表达, 其表达作用与转化因子 β (FGF- β)、血小板源性生长因子(PDGF)、NO及一些重金属离子有关, 此外还受缺血和缺氧环境的调节^[11-12]。在肿瘤的病理状态下, 一旦血管生成启动VEGF就诱导强烈的血管生成作用, 表现为MVD。另外, VEGF增加肿瘤新生血管的通透性, 这在肿瘤的发生和转移中比促内皮细胞增生可能更为重要。

2 VEGF MVD和肿瘤血管的生成过程

大量研究表明^[13-14]大部分人体肿瘤MVD与VEGF表达呈正相关, 并且明显高于非肿瘤组织。今年研究发现肿瘤血管生成由正负性调控因子控制, 当正性调控因子上调时, 才能启动血管生成机制, 而在肿瘤血管生成因子中, 只有VEGF直接刺激内皮细胞分裂增殖, 是高度特异的血管内皮细胞增殖分裂素, 最直接参与诱导肿瘤血管生成。肿瘤血管的生成是一个多因素、级联、整体、动态的过程, 取决于促血管生成因子和血管生成抑制因子之间的平衡。

肿瘤细胞可以合成分泌VEGF。大量研究发现, 在脑肿瘤、乳腺癌、结肠腺癌、卵巢癌及骨肉瘤等多种肿瘤中均有VEGF的高表达, 且表达水平与肿瘤的恶性程度呈正相关^[15-19]。

VEGF不仅能促进肿瘤血管形成,增加肿瘤血管的通透性,还可干扰树突细胞的成熟而影响肿瘤免疫,使肿瘤细胞逃避免疫监视,在肿瘤的侵袭和转移过程中起重要作用. Weidner *et al*^[20]提出组织和血液中VEGF mRNA表达和(或)蛋白水平以及MVD可作为评价肿瘤状况和预后不良的指标. Seo *et al*^[21]报道142例胰腺癌中VEGF蛋白(以VEGF121、VEGF165为主)的阳性率为93%,主要位于癌细胞质中,阳性表达的细胞多位于癌旁组织,说明VEGF具有异质性. 且VEGF表达与MVD密切相关,VEGF阳性的胰腺癌患者的生存期明显短于VEGF阴性患者,提示VEGF可作为胰腺癌的预后指标.

3 胰腺癌CT灌注相关研究

CT灌注成像(computed tomography perfusion imaging, CTP)是指在iv对比剂的同时,对选定层面行同层动态扫描,以获得该层面内每一像素的时间-密度曲线(time-density curve, TDV),根据该曲线利用不同的数学模型计算出各种灌注参数^[22-23],包括血流量(blood flow, BF)、血容量(blood volume, BV)、平均通过时间(mean transit time, MTT)、表面通透性(permeability surface, PS)等组织血流灌注的各种参数,以此评价组织器官的灌注状态. 灌注成像技术代表着现代影像学从原来的主要反映解剖形态学改变向着既能反映宏观的大体形态,又能揭示微观的代谢和功能状态演变的这样一种发展态势. 目前国内外胰腺CT灌注的临床研究还较少,但是CT灌注成像是唯一能获得人类胰腺灌注绝对值的技术,反映的是器官实质水平的血供情况. 文献报道CT灌注技术参数中PS和BF价值最大^[24-26],PS这个参数主要应用于肿瘤的评价,并且PS与肿瘤的不良性有关^[27].

CT灌注成像可以更进一步地了解肿瘤的血供情况、血管分布和血管通透性情况,从而十分有助于对肿瘤的诊断及鉴别诊断、恶性肿瘤的分期以及对肿瘤治疗疗效的评价等. 肿瘤灌注不同于正常组织的灌注,一方面是因为肿瘤组织内有大量的促血管生成因子,如VEGF的高表达促进肿瘤血管生成,使恶性肿瘤呈现为高血流量和血容量的高灌注状态;另一方面是因为这些新生微血管壁的内皮细胞发育不成熟,细胞间隙较大,且血管基底膜不完整,血管的通透性较大,因而对比剂外渗较快^[25,28]. 胰腺灌注有其独特的特点与肝癌、肺癌等有所不同. 因

为胰腺主要由胰十二指肠动脉和脾动脉供血,血供比较丰富,其灌注信息非常有助于了解胰腺的内、外分泌功能及胰腺的病理变化. 而胰腺癌多为少血管性肿瘤,表现为低灌注. 王中秋 *et al*^[29]报道这是由于胰腺癌瘤体的微血管构成和其他部位的肿瘤不同,有自身的特点,即实质肿瘤细胞散在分布于纤维间质和正常胰腺组织中,其比例成分因肿瘤的恶性度高低而不同. 此时,胰腺癌的CT灌注程度和形式取决于瘤体内肿瘤实质、纤维间质、残存胰腺组织和坏死组织内微血管的总和. 高分化腺癌的组织学观察示瘤体内为少量的肿瘤细胞散在分布在中等量的纤维组织间质和大量残存的胰腺正常组织中. 瘤体一般无坏死,瘤体主要成分为残存的胰腺组织. 因残存胰腺组织的微血管密度极为丰富,高分化腺癌肿瘤实质细胞处的微血管密度计数少. 所以,对瘤体微血管呈绝对影响作用是瘤体内的残存胰腺组织微血管密度数(MVD). 因此,高分化胰腺癌灌注BF和BV值较低分化的胰腺癌高,反映了瘤体实质残存胰腺组织微血管密度数较多,间接反应瘤体实质细胞的微血管密度少. 提示该肿瘤恶性程度为高分化腺癌可能性大.

血管生成在肿瘤的发生、发展及预后方面起着重要的作用. 有研究应用各种方法抑制VEGF的合成与分泌,干预其血管生成作用对肿瘤进行治疗,收到良好的疗效. CT灌注方法可以通过胰腺肿瘤和胰腺正常组织的血供情况、血供分布和血管通透性,鉴别肿瘤的不良性及有效的预测病情的发展和预后,在胰腺癌的诊断中起着极为重要的作用. 对血管生长因子的研究将会加深影像学与临床、病理、分子生物等学科的联系,促进影像学的发展和诊断水平.

4 参考文献

- 1 Kasper HU, Ebert M, Malfertheiner P, Roessner A, Kirkpatrick CJ, Wolf HK. Expression of thrombospondin-1 in pancreatic carcinoma: correlation with microvessel density. *Virchows Arch* 2001; 438: 116-120
- 2 Bruns CJ, Harbison MT, Davis DW, Portera CA, Tsan R, McConkey DJ, Evans DB, Abbruzzese JL, Hicklin DJ, Radinsky R. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 plus gemcitabine results in regression of human pancreatic carcinoma growing orthotopically in nude mice by antiangiogenic mechanisms. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1936-1948
- 3 Bruns CJ, Solorzano CC, Harbison MT, Ozawa S, Tsan R, Fan D, Abbruzzese J, Traxler P, Buchdunger E, Radinsky R, Fidler IJ. Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine

■应用要点

CT灌注方法可以通过胰腺肿瘤和胰腺正常组织的血供情况、血供分布和血管通透性,鉴别肿瘤的不良性及有效的预测病情的发展和预后,在胰腺癌的诊断中起着极为重要的作用. 对血管生长因子的研究将会加深影像学与临床、病理、分子生物等学科的联系,促进影像学的发展和诊断水平.

同行评价

本文综述了胰腺癌组织中VEGF和MVD表达与CT灌注成像的关系,对临床研究有一定参考价值.

- kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 2926-2935
- 4 Banerjee SK, Zoubine MN, Mullick M, Weston AP, Cherian R, Campbell DR. Tumor angiogenesis in chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma: impact of K-ras mutations. *Pancreas* 2000; 20: 248-255
- 5 Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6
- 6 Okada K, Yokoyama K, Okihara K, Ukimura O, Kojima M, Miki T, Takamatsu T. Immunohistochemical localization of platelet-derived endothelial cell growth factor expression and its relation to angiogenesis in prostate. *Urology* 2001; 57: 376-381
- 7 Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161: 851-858
- 8 Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992; 114: 521-532
- 9 Lachgar S, Moukadiri H, Jonca F, Charveron M, Bouhaddioui N, Gall Y, Bonafe JL, Plouet J. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for hair dermal papilla cells. *J Invest Dermatol* 1996; 106: 17-23
- 10 Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 1992; 3: 211-220
- 11 Gleadle JM, Ebert BL, Firth JD, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenic growth factor expression by hypoxia, transition metals, and chelating agents. *Am J Physiol* 1995; 268: C1362-1368
- 12 Kourembanas S, McQuillan LP, Leung GK, Faller DV. Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J Clin Invest* 1993; 92: 99-104
- 13 El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, Nabika T, Nagasue N. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 1998; 27: 1554-1562
- 14 Mise M, Arai S, Higashitani H, Furutani M, Niwano M, Harada T, Ishigami S, Toda Y, Nakayama H, Fukumoto M, Fujita J, Imamura M. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor. *Hepatology* 1996; 23: 455-464
- 15 Uthoff SM, Duchrow M, Schmidt MH, Broll R, Bruch HP, Strik MW, Galandiuk S. VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 2002; 101: 32-36
- 16 Kaya M, Wada T, Kawaguchi S, Nagoya S, Yamashita T, Abe Y, Hiraga H, Isu K, Shindoh M, Higashino F, Okada F, Tada M, Yamawaki S, Ishii S. Increased pre-therapeutic serum vascular endothelial growth factor in patients with early clinical relapse of osteosarcoma. *Br J Cancer* 2002; 86: 864-869
- 17 Strugar J, Rothbart D, Harrington W, Criscuolo GR. Vascular permeability factor in brain metastases: correlation with vasogenic brain edema and tumor angiogenesis. *J Neurosurg* 1994; 81: 560-566
- 18 Lutgendorf SK, Johnsen EL, Cooper B, Anderson B, Sorosky JI, Buller RE, Sood AK. Vascular endothelial growth factor and social support in patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 2002; 95: 808-815
- 19 Anan K, Morisaki T, Katano M, Ikubo A, Kitsuki H, Uchiyama A, Kuroki S, Tanaka M, Torisu M. Vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor are potential angiogenic and metastatic factors in human breast cancer. *Surgery* 1996; 119: 333-339
- 20 Weidner N. Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow. *J Pathol* 1998; 184: 119-122
- 21 Seo Y, Baba H, Fukuda T, Takashima M, Sugimachi K. High expression of vascular endothelial growth factor is associated with liver metastasis and a poor prognosis for patients with ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 2000; 88: 2239-2245
- 22 Miles KA. Perfusion CT for the assessment of tumour vascularity: which protocol? *Br J Radiol* 2003; 76 Spec No 1: S36-42
- 23 Koseoglu K, Ozsunar Y, Taskin F, Karaman C. Pseudolesions of left liver lobe during helical CT examinations: prevalence and comparison between unenhanced and biphasic CT findings. *Eur J Radiol* 2005; 54: 388-392
- 24 Dugdale PE, Miles KA, Bunce I, Kelley BB, Leggett DA. CT measurement of perfusion and permeability within lymphoma masses and its ability to assess grade, activity, and chemotherapeutic response. *J Comput Assist Tomogr* 1999; 23: 540-547
- 25 Brix G, Bahner ML, Hoffmann U, Horvath A, Schreiber W. Regional blood flow, capillary permeability, and compartmental volumes: measurement with dynamic CT-initial experience. *Radiology* 1999; 210: 269-276
- 26 Purdie TG, Henderson E, Lee TY. Functional CT imaging of angiogenesis in rabbit VX2 soft-tissue tumour. *Phys Med Biol* 2001; 46: 3161-3175
- 27 Cenic A, Nabavi DG, Craen RA, Gelb AW, Lee TY. A CT method to measure hemodynamics in brain tumors: validation and application of cerebral blood flow maps. *AJNR Am J Neuroradiol* 2000; 21: 462-470
- 28 Dugdale PE, Miles KA, Bunce I, Kelley BB, Leggett DA. CT measurement of perfusion and permeability within lymphoma masses and its ability to assess grade, activity, and chemotherapeutic response. *J Comput Assist Tomogr* 1999; 23: 540-547
- 29 王中秋, 黎介寿, 卢光明, 张新华. 胰腺癌的CT增强和瘤体微血管密度及病理分级的相关性研究. *中华医学杂志* 2003; 83: 1882-1886

电编 张敏 编辑 潘伯荣

ERCP术后急性胰腺炎并发症的危险因素及预防研究进展

韩兵, 王宝仁

韩兵, 王宝仁, 天津港口医院 天津市塘沽区 300456
通讯作者: 韩兵, 300456, 天津市, 天津港口医院.
hanbing710526@126.com
电话: 022-25706777
收稿日期: 2006-04-22 接受日期: 2006-04-30

摘要

内镜逆行性胰胆管造影(ERCP)以及相关治疗技术已成为胆胰疾病的重要治疗手段, ERCP术后急性胰腺炎(AP)是常见且严重的并发症之一, 目前研究发现, 治疗性ERCP、Oddi括约肌运动功能障碍、Oddi括约肌压力检测、内镜下乳头括约肌气囊扩张术、插管困难与多次胰管注射、操作者的经验不足为ERCP术后急性胰腺炎的常见危险因素. 关于预防ERCP术后AP的药物研究被广泛开展, 生长抑素和加贝酯被多数学者认为对AP有显著的预防作用. 更广泛的药物研究其具体效果尚待进一步的研究证实. 在内镜技术方面, 选择性插管技术的改进、胰管支架和胆道引流技术被认为可有效地防止ERCP术后AP的发生.

关键词: 内镜下逆行胰胆管造影; 胰腺炎; 并发症; 预防

韩兵, 王宝仁. ERCP术后急性胰腺炎并发症的危险因素及预防研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1813-1818
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1813.asp>

0 引言

内镜逆行性胰胆管造影(ERCP)以及相关治疗技术已成为胆胰疾病的重要治疗手段, 虽然此项技术临床应用日臻成熟, 但ERCP存在一定的并发症. ERCP术后急性胰腺炎(AP)是常见且严重的并发症之一, 发生率在1%-24.4%^[1-4]. 探讨ERCP术后的危险因素及其预防, 对于提高ERCP诊断治疗水平及安全性有着重要的意义. 以下对ERCP并发症的危险因素、药物及内镜技术预防做一综述.

1 危险因素

1.1 诊断性ERCP与治疗性ERCP 目前诊断性ERCP主要应用于组织标本的获取与Oddi括约

肌运动功能失调的诊断, 其应用领域已部分为磁共振胆胰管造影(MRCP)所取代^[5]. 多数学者认为治疗性ERCP急性胰腺炎发生率高于诊断性ERCP^[6-7]. 主要与十二指肠乳头括约肌切开术(EST)相关. Cheng *et al*^[8]收集美国中西部15个中心胰胆治疗组1115例ERCP资料, 分析EST行小切开为AP的独立危险因素, 而EST行大切开这种临床征象则很少出现. 考虑与切开不充分, 切开后乳头水肿, 胰液引流不畅有关. 关于EST切开使用切开与混合电流问题, Macintosh *et al*^[9]研究认为电流类型的选择并不改变AP发生的风险, 选择何种电流, 取决于操作者的经验与习惯. 但在乳头开口处行切开操作时应避免使用高功率凝固电流, 以免热传导损伤导致胰管开口处凝固而增加AP发生的风险. 但也有学者认为诊断性ERCP与治疗性ERCP术后AP发生率无显著差异^[10].

1.2 Oddi括约肌运动功能障碍(SOD)是Oddi括约肌运动异常导致胆汁、胰液排出受阻, 使胆胰管内压升高, 临床上表现为胆源性腹痛、梗阻性黄疸、胰源性腹痛与AP. 多数学者认为对疑有SOD患者行ERCP, 术后有较高的AP发生率^[8,11-13].

1.3 Oddi括约肌压力由包绕胆管、胰管开口处及胆管和胰管共同通道周围的括约肌组成, 起到调节胆道压力、胆汁流向作用. 目前, SOD已得到普遍认可. 而Oddi括约肌压力检测(SOM)作为SOD最有价值的诊断方法, 有助于选择适宜EST的SOD患者. 以往文献报道SOM为AP的危险因素, 而近期某些学者报道SOM并不作为AP的独立危险因素^[8,11,14]. Wong *et al*^[15]研究表明, SOM后AP发生率为9%, 其相关危险因素为既往ERCP急性胰腺炎史、括约肌基础压力增高(≥ 40 mmHg)、括约肌基础波频率增高(≥ 7 次/min). Wehrmann *et al*^[16]认为采用带有微型换能器测压法相比标准的灌注测压法, 发生AP的风险减少.

1.4 应用内镜下乳头括约肌气囊扩张术(EPBD)可有效减少EST所致出血的风险, 并可保留Oddi

■背景资料

内镜逆行性胰胆管造影以及相关治疗技术已成为胆胰疾病的重要治疗手段, ERCP术后急性胰腺炎是常见且严重的并发症之一, 探讨ERCP术后的危险因素及其预防, 对于提高ERCP诊断治疗水平及安全性有着重要的意义.

■研究前沿

ERCP术后急性胰腺炎的危险因素及其预防是当今研究热点问题,近年开展更广泛的药物研究,多种药物用于临床研究,但具体效果尚待进一步的研究证实,尤其胰管支架的应用研究也是当今研究热点问题。

括约肌功能^[17],对于治疗10 mm以下的胆总管结石有满意的效果。有学者研究认为,EPBD较EST有较高的AP发生率^[18-20]。主要是扩张气囊反复多次对乳头括约肌及胰管开口部位的机械性刺激及损害,造成胰液引流不畅发生胰腺炎。但也有作者认为EPBD术后AP主要与患者年龄、术前高淀粉酶血症以及胆道巨大/多发结石等因素相关^[21]。Lin *et al*^[22]对104例胆总管结石患者进行了EPBD与EST对照研究,结果显示两组患者在术后淀粉酶水平及AP发生率方面无显著差异。

1.5 插管困难与多次胰管注射 ERCP操作过程中因插管困难而多次插管易造成乳头水肿,伴有导丝引导插管可能造成乳头部损伤,导致胰液引流不畅;胰管多次注射,特别是胰腺显影及造影附件导致胰管损伤,与ERCP术后AP相关,已得到公认^[23-25]。

1.6 病例选择相关因素 ERCP患者年龄为AP危险因素,年轻人群有较高的AP发生率^[26-27]。疑有SOD患者,有复发性胰腺炎及既往有ERCP术后AP史者,亦有较高的AP发生率^[8,12]。

1.7 操作者的经验 诊断性ERCP与治疗性ERCP因人因解剖异常因素,都有很大难度,尤以治疗性ERCP为著,现多数学者认为操作者的经验和操作水平与AP的发生率明显相关^[28-30]。

2 药物预防研究

近年来,关于预防ERCP术后AP的药物研究被广泛开展,生长抑素(somatostatin)和加贝酯(gabexate)被多数学者认为对AP有显著的预防作用^[1,31-33]。Poon *et al*^[34]对270例施行ERCP患者进行了前瞻性对照研究。在研究组于ERCP后立即给予somatostatin 250 mg iv。在实验组与对照组高淀粉酶血症发生率为26.0% vs 38.5%, $P = 0.036$; AP发生率为4.4% vs 13.3%, $P = 0.010$,显示有显著差异。认为ERCP术后即刻给予单剂量静脉途径somatostatin可明显降低高淀粉酶血症和AP的发生率。Arvanitidis *et al*^[35]对372例ERCP进行了随机双盲对照研究,实验组一在ERCP前30 min开始给予somatostatin行持续12 h静脉滴注;实验组二在乳头插管同时予somatostatin单剂量静脉注射。结果实验组与对照组AP发生率为1.7% vs 9.8% ($P < 0.05$),且血清淀粉酶在实验组明显低于对照组,显示有显著差异。认为somatostatin可明显降低高淀粉酶血症和AP的发生率,对于药物使用的成本核算与用药剂量、

用药途径的研究应进一步开展。Tsujino *et al*^[36]对406例施行ERCP患者进行了多中心随机双盲对照研究,实验组在ERCP开始前10 min给予乌司他丁(ulinastatin) 15万U静脉滴注。随后在ERCP后4和18 h采取血清胰腺生化酶学检测。结果显示,实验组与对照组相比高血清酶血症发生率明显降低(淀粉酶 $P = 0.011$; 脂肪酶 $P = 0.008$), AP发生率为2.9% vs 7.4%, $P = 0.041$ 。认为ulinastatin短期用药可明显降低高血清酶血症和AP发生率。Fujishiro *et al*^[37]研究139例ERCP患者,认为低剂量(15万U)与高剂量(45万U) ulinastatin和高剂量gabexate (900 mg)在预防ERCP后AP方面同样有效。

Xiong *et al*^[38]对193例ERCP患者进行对照研究。实验组于ERCP开始前0.5 h开始静脉点滴gabexate维持至术后4 h,总剂量为300 mg。结果显示,实验组与对照组高淀粉酶发生率为33.7% vs 43.7% ($P = 0.133$); AP发生率为3.1% vs 10.5% ($P = 0.040$); 胰源性腹痛发生率为15.3% vs 29.5% ($P = 0.018$)。认为4.5 h的加贝酯静脉滴注可能可以防止ERCP术后AP和胰源性腹痛。Masci *et al*^[39]比较了gabexate在剂量与给药持续时间的不同与AP的关系。在434例患者,实验组与对照组均在ERCP开始前30 min予gabexate静脉点滴,共维持6.5 h(总剂量500 mg),此后实验组给予安慰剂,对照组继续予gabexate 500 mg静脉点滴维持至13 h(总剂量1000 mg)。结果表明,在术后腹痛发生、血清酶血症和AP发生率均无显著差异。Testoni *et al*^[40]认为静脉途径使用1000 mg gabexate可明显减少ERCP术后AP发生率,尤其对于存在高危因素的患者,但gabexate不能减少重型胰腺炎的发生率。然而部分学者对于生长抑素和加贝酯对ERCP术后AP的预防意义提出不同意见。Andriulli *et al*^[41-42]对somatostatin和gabexate在ERCP短期用药(somatostatin 750 mg, gabexate 500 mg, 于术前开始持续静脉点滴2 h)与长期用药(somatostatin 750 mg, gabexate 500 mg, 于术前开始持续静脉点滴6.5 h)进行研究,认为均对ERCP术后AP无预防作用。Vila *et al*^[43]也认为在乳头插管前给予somatostatin 250 mg iv对AP无预防作用。

硝酸甘油(glyceryl trinitrate)可以降低Oddi括约肌压力,增加经乳头的胆汁引流,研究认为,可以预防ERCP术后AP^[44]。Moreto *et al*^[45]在ERCP前经皮使用glyceryl trinitrate 15 mg进行对照研究,结果实验组与对照组AP发生率为4.2%

vs 15.1% ($P<0.05$), 显示有明显差异. 皮质类固醇具有减轻组织水肿和抑制炎症反应作用, 被用于AP的治疗, Kwanngern *et al*^[46]报道单剂量corticosteroid可预防ERCP术后AP. 但近期多数学者研究表明其对ERCP术后AP并无预防作用^[47-50]. 口服别嘌呤醇(allopurinol)的预防作用存在争议, 有研究报道大剂量allopurinol (ERCP前15 h, 3 h口服600 mg)可降低AP发生率, 但尚需更广泛的研究观察^[51-52]. Fan *et al*^[53]在一组160例ERCP患者对照研究中, 证明5-fluorouracil组与对照组AP发生率为2.5% vs 10.0%, 有显著差异, 提示5-fluorouracil对ERCP术后AP有预防意义.

近年开展更广泛的药物研究, 多种药物用于临床研究, 但具体效果尚待进一步的研究证实. 目前, 多数学者认为低分子肝素(low-molecular-weight heparin)、乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine)、硝苯地平(nifedipine)、 β -胡萝卜素(beta-carotene)、利多卡因(lidocaine)对ERCP术后AP无预防作用^[54-59].

3 内镜技术预防

3.1 选择性插管技术 选择性胆管插管在一些情况下是困难的, 多次插管造成乳头水肿, 伴有导丝引导插管可能造成乳头部损伤, 导致胰液引流不畅, 因此, 插管困难可能引发ERCP术后AP. 在近年的文献中, 许多学者对因插管困难的病例将传统的插管技术进行了改进, 以减少ERCP术后AP的发生. Goldberg *et al*^[60]采用胰管支架协助选择性胆管插管. 对此报道2004例ERCP中选择性胆管插管困难39例患者, 行胰管支架置入, 引导选择性胆管插管的成功率为97.4%, 术后仅两例发生轻型AP(5.3%). 认为该技术安全有效. 乳头旁憩室, 尤其乳头完全进入憩室内, 通常认为选择性胆管插管困难. Fogel *et al*^[61]报道, 采用主胰管支架结合胆管括约肌预切开技术, 提高选择性胆管插管成功率, 减少反复插管的次数. Lella *et al*^[24]分析了一种新的插管方法: 采用带有尖端柔软的Teflon踪迹导丝(0.035英寸)的6 F双腔括约肌切开刀行插管、注射造影剂和括约肌切开术, 以区别传统方法的对照研究. 结果显示, 实验组和对照组的AP发生率为0% vs 4% ($P<0.01$), ERCP后24 h血清淀粉酶大于正常五倍的发生率为4.5% vs 19.5% ($P<0.001$). 这种方法主要避免了反复多次插管对乳头的影响. Lella *et al*^[23]报道, 在胆囊结石合并胆总管结石的病例, 在腹腔镜胆囊切除术(LC)中采用“会师技术”

协助内镜行胆管插管, 并与传统的先行ERCP而后行LC的治疗方式进行对照研究. 结果显示, 实验组和对照组的AP发生率为0% vs 10% ($P=0.0274$), 认为该项技术可明显降低ERCP术后AP的发生率. 考虑与顺行置入的导丝使选择性胆管插管易于完成, 避免了乳头水肿和胰管损伤有关. 对于选择性胆管插管失败患者, 有学者研究证明, 采用针型切开刀行乳头上括约肌切开术安全可靠^[62-64].

3.2 胰管支架和胆道引流 目前普遍认为胰管支架对ERCP术后AP有预防作用, 尤其是对于具有AP高危因素的ERCP者^[65-66]. 疑有SOD的患者行ERCP, 术后AP发生率明显高于无SOD者, SOD患者中约有75%存在胰管括约肌基础压力增高, 在施行胆管括约肌切开术时, 由于胰管括约肌未被完全切开而导致暂时性水肿, 使原来基础上的胰管括约肌压力进一步升高, 导致胰液引流不畅而发生AP. Fogel *et al*^[13]认为对此类患者单独行胆管括约肌切开术具有很高的AP发生率, 而采用胰管支架, 并行胰胆管括约肌联合切开术, 可有效地降低AP的发生率. Tarnasky^[67]认为ERCP术后AP病理生理中最重要的是胰腺引流不畅. 胰管支架可以降低AP的发生率和AP的严重程度. 胰管支架适用于疑有SOD的年轻人、先前有AP病史者、插管困难者、乳头预备切开者和胰管括约肌切开术者. 支架可以在1 wk内移除. 胰管支架可以降低AP的发生率, 但由于胰管狭小、曲折而使导丝或支架置入失败, 则大大地提高了AP的发生率. Freeman *et al*^[68]报道了一种改良的支架置入技术, 以解决由于胰管解剖原因造成的支架置入的技术困难. 这种改良技术, 采用短小支架(2-3 cm, 3-5 F), 以0.018英寸镍钛合金尖端的导丝引导, 支架远端越过胰管括约肌1-2 cm, 可明显提高困难的胰管支架置入成功率, 从而避免了因支架置入失败造成的风险. Rashdan *et al*^[69]认为3-4 F胰管支架与传统使用的5-6 F的胰管支架相比, 对于预防ERCP术后AP更为有效. EPBD较EST有较高的AP发生率, 主要是扩张气囊反复多次对乳头括约肌及胰管开口部位的机械性刺激及损害, 造成胰液引流不畅发生胰腺炎. Sato *et al*^[20]在34例胆总管结石行EPBD术后行经内镜鼻胆管引流术(ENBD), 无一例AP发生, EPBD术后ENBD可有效减少AP的发生率, 推测是由于ENBD防止了因残余结石或乳头水肿所致胰管梗阻而起到预防作用.

■创新盘点

对于ERCP术后急性胰腺炎的预防, 目前较为一致的观点是, 对于存在高危因素的患者, 提倡预防性胰管支架的应用, 文章从这个角度出发, 分析了技术上的要点, 以及胰管支架的类型和多位学者的创新方法.

■应用要点

目前, ERCP技术已在国内县级以上医院普遍开展, 而急性胰腺炎作为ERCP术后常见、严重的并发症, 探讨ERCP术后的危险因素及其预防, 对于提高ERCP诊断治疗水平及安全性有着重要的意义。文章通过对ERCP术后急性胰腺炎的危险因素及其预防的研究综述, 对ERCP的临床应用有一定的指导作用。

4

参考文献

- 1 Pande H, Thuluvath P. Pharmacological prevention of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis. *Drugs* 2003; 63: 1799-1812
- 2 Testoni PA. Why the incidence of post-ERCP pancreatitis varies considerably? Factors affecting the diagnosis and the incidence of this complication. *JOP* 2002; 3: 195-201
- 3 Cheng CL, Fogel EL, Sherman S, McHenry L, Watkins JL, Croffie JM, Gupta SK, Fitzgerald JF, Lazzell-Pannell L, Schmidt S, Lehman GA. Diagnostic and therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography in children: a large series report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41: 445-453
- 4 Enns R, Eloubeidi MA, Mergener K, Jowell PS, Branch MS, Pappas TM, Baillie J. ERCP-related perforations: risk factors and management. *Endoscopy* 2002; 34: 293-298
- 5 Hafner M, Schofl R. Diagnostic endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Endoscopy* 2005; 37: 133-138
- 6 Gomutbutra T. Risk factors and techniques affecting surgical outcome of therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography difficulties. *J Med Assoc Thai* 2005; 88: 1103-1109
- 7 Akashi R, Kiyozumi T, Tanaka T, Sakurai K, Oda Y, Sagara K. Mechanism of pancreatitis caused by ERCP. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 50-54
- 8 Cheng CL, Sherman S, Watkins JL, Barnett J, Freeman M, Geenen J, Ryan M, Parker H, Frakes JT, Fogel EL, Silverman WB, Dua KS, Aliperti G, Yakshe P, Uzer M, Jones W, Goff J, Lazzell-Pannell L, Rashdan A, Temkit M, Lehman GA. Risk factors for post-ERCP pancreatitis: a prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 139-147
- 9 Macintosh DG, Love J, Abraham NS. Endoscopic sphincterotomy by using pure-cut electrosurgical current and the risk of post-ERCP pancreatitis: a prospective randomized trial. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 551-556
- 10 Ong TZ, Khor JL, Selamat DS, Yeoh KG, Ho KY. Complications of endoscopic retrograde cholangiography in the post-MRCP era: a tertiary center experience. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5209-5212
- 11 Singh P, Gurudu SR, Davidoff S, Sivak MV Jr, Indaram A, Kasmin FE, Nozduk V, Wong RC, Isenberg G, Stark B, Bank S, Chak A. Sphincter of Oddi manometry does not predispose to post-ERCP acute pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 499-505
- 12 Masci E, Mariani A, Curioni S, Testoni PA. Risk factors for pancreatitis following endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a meta-analysis. *Endoscopy* 2003; 35: 830-834
- 13 Fogel EL, Eversman D, Jamidar P, Sherman S, Lehman GA. Sphincter of Oddi dysfunction: pancreaticobiliary sphincterotomy with pancreatic stent placement has a lower rate of pancreatitis than biliary sphincterotomy alone. *Endoscopy* 2002; 34: 280-285
- 14 Singh P. Is sphincter of Oddi manometry a risk factor for pancreatitis? A different view. *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7: 141-146
- 15 Wong GS, Teoh N, Dowsett JD, Bell CJ, Kellow JE. Complications of sphincter of Oddi manometry: biliary-like pain versus acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 147-153
- 16 Wehrmann T, Stergiou N, Schmitt T, Dietrich CF, Seifert H. Reduced risk for pancreatitis after endoscopic microtransducer manometry of the sphincter of Oddi: a randomized comparison with the perfusion manometry technique. *Endoscopy* 2003; 35: 472-477
- 17 Takezawa M, Kida Y, Kida M, Saigenji K. Influence of endoscopic papillary balloon dilation and endoscopic sphincterotomy on sphincter of oddi function: a randomized controlled trial. *Endoscopy* 2004; 36: 631-637
- 18 Baron TH, Harewood GC. Endoscopic balloon dilation of the biliary sphincter compared to endoscopic biliary sphincterotomy for removal of common bile duct stones during ERCP: a metaanalysis of randomized, controlled trials. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1455-1460
- 19 Disario JA, Freeman ML, Bjorkman DJ, Macmathuna P, Petersen BT, Jaffe PE, Morales TG, Hixson LJ, Sherman S, Lehman GA, Jamal MM, Al-Kawas FH, Khandelwal M, Moore JP, Derfus GA, Jamidar PA, Ramirez FC, Ryan ME, Woods KL, Carr-Locke DL, Alder SC. Endoscopic balloon dilation compared with sphincterotomy for extraction of bile duct stones. *Gastroenterology* 2004; 127: 1291-1299
- 20 Sato D, Shibahara T, Miyazaki K, Matsui H, Yanaka A, Nakahara A, Tanaka N. Efficacy of endoscopic nasobiliary drainage for the prevention of pancreatitis after papillary balloon dilatation: a pilot study. *Pancreas* 2005; 31: 93-97
- 21 Sugiyama M, Abe N, Izumisato Y, Masaki T, Mori T, Atomi Y. Risk factors for acute pancreatitis after endoscopic papillary balloon dilation. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1796-1798
- 22 Lin CK, Lai KH, Chan HH, Tsai WL, Wang EM, Wei MC, Fu MT, Lo CC, Hsu PI, Lo GH. Endoscopic balloon dilatation is a safe method in the management of common bile duct stones. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 68-72
- 23 Lella F, Bagnolo F, Rebuffat C, Scalambra M, Bonassi U, Colombo E. Use of the laparoscopic-endoscopic approach, the so-called "rendezvous" technique, in cholecystocholedocholithiasis: a valid method in cases with patient-related risk factors for post-ERCP pancreatitis. *Surg Endosc* 2006; 20: 419-423
- 24 Lella F, Bagnolo F, Colombo E, Bonassi U. A simple way of avoiding post-ERCP pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 830-834
- 25 Friedland S, Soetikno RM, Vandervoort J, Montes H, Tham T, Carr-Locke DL. Bedside scoring system to predict the risk of developing pancreatitis following ERCP. *Endoscopy* 2002; 34: 483-488
- 26 Christensen M, Matzen P, Schulze S, Rosenberg J. Complications of ERCP: a prospective study. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 721-731
- 27 Christoforidis E, Goulimaris I, Kanellos I, Tsalis K, Demetriades C, Betsis D. Post-ERCP pancreatitis and hyperamylasemia: patient-related and operative risk factors. *Endoscopy* 2002; 34: 286-292
- 28 Murray WR. Reducing the incidence and severity of post ERCP pancreatitis. *Scand J Surg* 2005; 94: 112-116
- 29 Testoni PA. Preventing post-ERCP pancreatitis: where are we? *JOP* 2003; 4: 22-32
- 30 Rabenstein T, Hahn EG. Post-ERCP pancreatitis: is

- the endoscopist's experience the major risk factor? *JOP* 2002; 3: 177-187
- 31 Mariani A. Pharmacological prevention of post-ERCP pancreatitis: which therapy is best? *JOP* 2003; 4: 68-74
 - 32 Andriulli A, Leandro G, Niro G, Mangia A, Festa V, Gambassi G, Villani MR, Facciorusso D, Conoscitore P, Spirito F, De Maio G. Pharmacologic treatment can prevent pancreatic injury after ERCP: a meta-analysis. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 1-7
 - 33 Andriulli A, Caruso N, Quitadamo M, Forlano R, Leandro G, Spirito F, De Maio G. Antisecretory vs. antiproteasic drugs in the prevention of post-ERCP pancreatitis: the evidence-based medicine derived from a meta-analysis study. *JOP* 2003; 4: 41-48
 - 34 Poon RT, Yeung C, Liu CL, Lam CM, Yuen WK, Lo CM, Tang A, Fan ST. Intravenous bolus somatostatin after diagnostic cholangiopancreatography reduces the incidence of pancreatitis associated with therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography procedures: a randomized controlled trial. *Gut* 2003; 52: 1768-1773
 - 35 Arvanitidis D, Anagnostopoulos GK, Giannopoulos D, Pantes A, Agaritsi R, Margantinis G, Tsiakos S, Sakorafas G, Kostopoulos P. Can somatostatin prevent post-ERCP pancreatitis? Results of a randomized controlled trial. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 278-282
 - 36 Tsujino T, Komatsu Y, Isayama H, Hirano K, Sasahira N, Yamamoto N, Toda N, Ito Y, Nakai Y, Tada M, Matsumura M, Yoshida H, Kawabe T, Shiratori Y, Omata M. Ulinastatin for pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a randomized, controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 376-383
 - 37 Fujishiro H, Adachi K, Imaoka T, Hashimoto T, Kohge N, Moriyama N, Suetsugu H, Kawashima K, Komazawa Y, Ishimura N, Ishihara S, Amano Y, Kinoshita Y. Ulinastatin shows preventive effect on post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis in a multicenter prospective randomized study. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1065-1069
 - 38 Xiong GS, Wu SM, Zhang XW, Ge ZZ. Clinical trial of gabexate in the prophylaxis of post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography pancreatitis. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39: 85-90
 - 39 Masci E, Cavallini G, Mariani A, Frulloni L, Testoni PA, Curioni S, Tittobello A, Uomo G, Costamagna G, Zambelli S, Macarri G, Innocenti P, Dragonetti C. Comparison of two dosing regimens of gabexate in the prophylaxis of post-ERCP pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2182-2186
 - 40 Testoni PA, Mariani A, Masci E, Curioni S. Frequency of post-ERCP pancreatitis in a single tertiary referral centre without and with routine prophylaxis with gabexate: A 6-year survey and cost-effectiveness analysis. *Dig Liver Dis* 2006
 - 41 Andriulli A, Clemente R, Solmi L, Terruzzi V, Suriani R, Sigillito A, Leandro G, Leo P, De Maio G, Perri F. Gabexate or somatostatin administration before ERCP in patients at high risk for post-ERCP pancreatitis: a multicenter, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 488-495
 - 42 Andriulli A, Solmi L, Loperfido S, Leo P, Festa V, Belmonte A, Spirito F, Silla M, Forte G, Terruzzi V, Marengo G, Ciliberto E, Sabatino A, Monica F, Magnolia MR, Perri F. Prophylaxis of ERCP-related pancreatitis: a randomized, controlled trial of somatostatin and gabexate mesylate. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 713-718
 - 43 Vila JJ, Jimenez FJ, Prieto C, Borobio E, Juanmartinena JF, Borda F. Utility of bolus somatostatin administration in preventing pancreatitis after endoscopic retrograde cholangiopancreatography: a controlled, non-randomized study. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 231-236
 - 44 Velosy B, Madacsy L, Szepes A, Pavics L, Csernay L, Lonovics J. The effects of somatostatin and octreotide on the human sphincter of Oddi. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 897-901
 - 45 Moreto M, Zaballa M, Casado I, Merino O, Rueda M, Ramirez K, Urcelay R, Baranda A. Transdermal glyceryl trinitrate for prevention of post-ERCP pancreatitis: A randomized double-blind trial. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 1-7
 - 46 Kwanngern K, Tiyapattanaputi P, Wanitpukdeedecha M, Navicharern P. Can a single dose corticosteroid reduce the incidence of post-ERCP pancreatitis? A randomized, prospective control study. *J Med Assoc Thai* 2005; 88 Suppl 4: S42-45
 - 47 Manolakopoulos S, Avgerinos A, Vlachogiannakos J, Armonis A, Viazis N, Papadimitriou N, Mathou N, Stefanidis G, Rekoumis G, Vienna E, Tzourmakliotis D, Raptis SA. Octreotide versus hydrocortisone versus placebo in the prevention of post-ERCP pancreatitis: a multicenter randomized controlled trial. *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 470-475
 - 48 Sherman S, Blaut U, Watkins JL, Barnett J, Freeman M, Geenen J, Ryan M, Parker H, Frakes JT, Fogel EL, Silverman WB, Dua KS, Aliperti G, Yakshe P, Uzer M, Jones W, Goff J, Earle D, Temkit M, Lehman GA. Does prophylactic administration of corticosteroid reduce the risk and severity of post-ERCP pancreatitis: a randomized, prospective, multicenter study. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 23-29
 - 49 Budzynska A, Marek T, Nowak A, Kaczor R, Nowakowska-Dulawa E. A prospective, randomized, placebo-controlled trial of prednisone and allopurinol in the prevention of ERCP-induced pancreatitis. *Endoscopy* 2001; 33: 766-772
 - 50 Testoni PA, Bagnolo F, Andriulli A, Bernasconi G, Crotta S, Lella F, Lomazzi A, Minoli G, Natale C, Prada A, Toti GL, Zambelli A. Octreotide 24-h prophylaxis in patients at high risk for post-ERCP pancreatitis: results of a multicenter, randomized, controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 965-972
 - 51 Mosler P, Sherman S, Marks J, Watkins JL, Geenen JE, Jamidar P, Fogel EL, Lazzell-Pannell L, Temkit M, Tarnasky P, Block KP, Frakes JT, Aziz AA, Malik P, Nickl N, Slivka A, Goff J, Lehman GA. Oral allopurinol does not prevent the frequency or the severity of post-ERCP pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 245-250
 - 52 Katsinelos P, Kountouras J, Chatzis J, Christodoulou K, Paroutoglou G, Mimidis K, Beltsis A, Zavos C. High-dose allopurinol for prevention of post-ERCP pancreatitis: a prospective randomized double-blind controlled trial. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 407-415
 - 53 Fan WT, Wang QW, Li QL. Preventive effect of

同行评价

本文系统总结了 ERCP 及其相关治疗后 AP 发生的危险因素及预防, 引用文献较新, 有一些新的观点, 对临床有较好的指导作用。

- 5-fluorouracil on post-ERCP pancreatitis. *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2004; 29: 201-203
- 54 Rabenstein T, Fischer B, Wiessner V, Schmidt H, Radespiel-Troger M, Hochberger J, Muehldorfer S, Nusko G, Messmann H, Scholmerich J, Schulz HJ, Schonekas H, Hahn EG, Schneider HT. Low-molecular-weight heparin does not prevent acute post-ERCP pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 606-613
- 55 Katsinelos P, Kountouras J, Paroutoglou G, Beltsis A, Mimidis K, Zavos C. Intravenous N-acetylcysteine does not prevent post-ERCP pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 105-111
- 56 Prat F, Amaris J, Ducot B, Bocquentin M, Fritsch J, Choury AD, Pelletier G, Buffet C. Nifedipine for prevention of post-ERCP pancreatitis: a prospective, double-blind randomized study. *Gastrointest Endosc* 2002; 56: 202-208
- 57 Lavy A, Karban A, Suissa A, Yassin K, Hermesh I, Ben-Amotz A. Natural beta-carotene for the prevention of post-ERCP pancreatitis. *Pancreas* 2004; 29: e45-50
- 58 Schwartz JJ, Lew RJ, Ahmad NA, Shah JN, Ginsberg GG, Kochman ML, Brensinger CM, Long WB. The effect of lidocaine sprayed on the major duodenal papilla on the frequency of post-ERCP pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 179-184
- 59 Rabenstein T, Roggenbuck S, Framke B, Martus P, Fischer B, Nusko G, Muehldorfer S, Hochberger J, Ell C, Hahn EG, Schneider HT. Complications of endoscopic sphincterotomy: can heparin prevent acute pancreatitis after ERCP? *Gastrointest Endosc* 2002; 55: 476-483
- 60 Goldberg E, Titus M, Haluszka O, Darwin P. Pancreatic-duct stent placement facilitates difficult common bile duct cannulation. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 592-596
- 61 Fogel EL, Sherman S, Lehman GA. Increased selective biliary cannulation rates in the setting of periampullary diverticula: main pancreatic duct stent placement followed by pre-cut biliary sphincterotomy. *Gastrointest Endosc* 1998; 47: 396-400
- 62 Katsinelos P, Beltsis A, Paroutoglou G, Pilpilidis I, Mimidis K, Vradelis S, Soufleris K, Tsolkas P, Arvaniti M, Papadimitriou A, Baltagiannis S. Needle-knife suprapapillary sphincterotomy avoids postprocedure pancreatitis in patients with sphincter of Oddi dysfunction of biliary type II: a report of three cases. *Surg Endosc* 2004; 18: 868-870
- 63 Park SH, Kim HJ, Park do H, Kim JH, Lee JH, Lee SH, Chung IK, Kim HS, Kim SJ. Pre-cut papillotomy with a new papillotome. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 588-591
- 64 Espinel-Diez J. Access to the biliary tract through transpancreatic sphincterotomy. *Gastroenterol Hepatol* 2006; 29: 281-285
- 65 Freeman ML. Understanding risk factors and avoiding complications with endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Curr Gastroenterol Rep* 2003; 5: 145-153
- 66 Fazel A, Quadri A, Catalano MF, Meyerson SM, Geenen JE. Does a pancreatic duct stent prevent post-ERCP pancreatitis? A prospective randomized study. *Gastrointest Endosc* 2003; 57: 291-294
- 67 Tarnasky PR. Mechanical prevention of post-ERCP pancreatitis by pancreatic stents: results, techniques, and indications. *JOP* 2003; 4: 58-67
- 68 Freeman ML, Overby C, Qi D. Pancreatic stent insertion: consequences of failure and results of a modified technique to maximize success. *Gastrointest Endosc* 2004; 59: 8-14
- 69 Rashdan A, Fogel EL, McHenry L Jr, Sherman S, Temkit M, Lehman GA. Improved stent characteristics for prophylaxis of post-ERCP pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 322-329

电编 张敏 编辑 潘伯荣

食管癌化疗患者生活质量评价133例

钱勇, 张从军, 陈振东

钱勇, 张从军, 陈振东, 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科 安徽省合肥市 230022

安徽省科技厅2005年度重点资助项目, No. 05021002

通讯作者: 陈振东, 230022, 安徽省合肥市, 安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科. chenzhendong@cscsco.org.cn

电话: 0551-3620262 传真: 0551-3620262

收稿日期: 2006-04-25 接受日期: 2006-05-11

Assessment of life quality of esophageal cancer patients received chemotherapy

Yong Qian, Cong-Jun Zhang, Zhen-Dong Chen

Yong Qian, Cong-Jun Zhang, Zhen-Dong Chen, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China
Supported by the Key Foundation of Science and Technology Department of Anhui Province during the Year 2005, No. No. 05021002

Correspondence to: Professor Zhen-Dong Chen, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, Anhui Province, China. chenzhendong@cscsco.org.cn

Received: 2006-04-25 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To evaluate the quality of life (QOL) in esophageal cancer patients and investigate the differences in QOL with respect to social and medical characteristics.

METHODS: Structured questionnaires (EORTC QLQ-C30 and QLQ-OES18) were used for data collection in 133 consecutive esophageal cancer patients. The t-test and one-way analysis of variance (ANOVA) were used to compare the differences in QOL at a 5% significance level.

RESULTS: Without regard to the effectiveness of chemotherapy, almost all the patients' QOL declined slightly at the end of the 1st week, but returned to the baseline level at the end of the 4th wk. The scores for physical function, role function, cognitive function, social function and overall health status were remarkably higher in the patient less than 55 years old ($P < 0.05$). The scores of symptoms were increased with the ages of patients, and fatigue, insomnia and

appetite loss made sense statistically. More civilized patients had higher scores of social function and lower score of financial difficulties ($P < 0.05$). The patients with constrictive type esophageal cancer had lower scores of QLQ-C30 function while the patients with fungoid type had higher scores of physical function, role function, cognitive function, and social function. With the increase of clinical stages, most of QLQ-C30 function scores such as physical, role, cognitive, and social function as well as the overall health status decreased tremendously ($P < 0.05$), while the scores of symptom such as fatigue, pain, insomnia, appetite loss increased a little bit ($P < 0.05$). The score of function in KPS ≥ 80 group was significantly higher than that in KPS < 80 group, while the scores of symptoms such as fatigue, pain, insomnia and appetite loss were strikingly lower than those in the < 80 group.

CONCLUSION: The establishment of QOL judgment standard in chemotherapy may help to select a suitable therapeutic method for patients with esophageal cancer.

Key Words: Quality of life; Esophageal cancer; EORTC quality of life; Questionnaires; Chemotherapy

Qian Y, Zhang CJ, Chen ZD. Assessment of life quality of esophageal cancer patients received chemotherapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1819-1823

摘要

目的: 评估食管癌化疗患者的生活质量及影响因素。

方法: 采用EORTC QLQ问卷表访问133例食管癌患者。影响生活质量的因素经t检验和单变量方差检验处理。

结果: 无论化疗有效与否, 入组患者化疗后1 wk生活质量得分多稍有降低, 但4 wk后可恢复至化疗前水平。<55岁年龄组躯体、角色、认知、社会功能和总体状况得分较高($P < 0.05$)。症状得分随年龄增加而有所增加, 在疲乏、失眠和食欲丧失有统计学意义。

■背景资料

本研究在国内首次研究接受新辅助化疗、辅助化疗和姑息化疗的食管癌患者的QOL, 通过问卷形式研究年龄、疾病临床分期、KPS评分等对患者生活质量的影响。

■应用要点

采用的EORTC QLQ问卷为国际标准, 比较全面、规范、严谨, 所得结果真实可信, 结果可为临床医生提供一个评价此类患者QOL的有效工具。

($P<0.05$); 文化程度较高者有较高的社会功能得分和较低的经济困难得分($P<0.05$); 缩窄型食管癌患者QLQ-C30功能得分较其它型为低, 失眠、食欲丧失得分显著高于其它类型($P<0.05$)。蕈伞型有较高的躯体、角色、认知和社会功能得分($P<0.05$); 随着临床分期的增加, 大部分QLQ-C30功能得分如躯体、角色、认知及社会和总体健康状况得分显著下降($P<0.05$), 而疲乏、疼痛、失眠及食欲丧失等症得分则有所增加($P<0.05$); KPS ≥ 80 分组QLQ-C30功能得分明显高于 <80 分组, 而症状得分如疲乏、疼痛、失眠及食欲丧失显著低于 <80 分组($P<0.05$)。

结论: 对食管癌化疗患者的生活质量及影响因素进行了分析, 结果对建立食管癌化疗患者生活质量的评价标准及临床医生选择合适的治疗方式有一定的指导意义。

关键词: 生活质量; 食管肿瘤; EORTC QLQ; 问卷; 化疗

钱勇, 张从军, 陈振东. 食管癌化疗患者生活质量评价133例. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1819-1823

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1819.asp>

0 引言

我国食管癌的发病率、死亡率居世界首位^[1]. 相当多数的食管癌患者确诊时已失去手术机会, 这时化疗就有较大的价值. 目前, 国内对于化疗过程中生活质量变化的报道不多, 本研究通过欧洲癌症研究与治疗组织(EORTC)编制的的生活质量问卷调查以评价中晚期食管癌化疗患者生活质量的变化情况及影响因素, 为临床选择合适治疗方法、评估疗效及提高健康水平提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-11/2005-12安徽医科大学第一附属医院肿瘤内科诊断并接受治疗的食管癌患者. 患者一般情况见表1. 男102例, 女31例; 年龄 <55 岁33例, 55-65岁46例, >65 岁54例; 临床分期II期13例, III期73例, IV期47例; X线分型髓质型59例, 溃疡型62例, 缩窄型6例, 蕈伞型6例; 行新辅助化疗68例, 辅助化疗41例, 姑息化疗24例; KPS ≥ 80 分111例, <80 分22例. FLP方案: 四氢叶酸钙(CF)100 mg d1-5; 5-氟脲嘧啶(5-FU)500 mg d1-5; 顺铂(PDD)20 mg d1-5.

1.2 方法 本描述性横断面研究的目的是评估影

表 1 食管癌患者的一般情况

| | <i>n</i> | % |
|---------------|----------|------|
| 男 | 102 | 76.7 |
| 女 | 31 | 23.3 |
| 年龄 <55 | 33 | 24.8 |
| 55-65 | 46 | 34.6 |
| >65 | 54 | 40.6 |
| 文盲 | 29 | 21.8 |
| 小学 | 34 | 25.6 |
| 初中 | 28 | 21.1 |
| 高中及以上 | 42 | 31.5 |
| 临床分期 II期 | 13 | 9.8 |
| III期 | 73 | 54.9 |
| IV期 | 47 | 35.3 |
| X线分型 | | |
| 髓质型 | 59 | 44.4 |
| 溃疡型 | 62 | 46.6 |
| 缩窄型 | 6 | 4.5 |
| 蕈伞型 | 6 | 4.5 |
| 新辅助化疗 | 68 | 51.1 |
| 辅助化疗 | 41 | 30.8 |
| 姑息化疗 | 24 | 18.1 |
| KPS ≥ 80 | 111 | 83.5 |
| <80 | 22 | 16.5 |

响食管癌患者生活质量的相关因素. 资料收集通过使用标准问卷访问患者获得. EORTC开发的生活质量核心量表(EORTC QLQ-C30)是一种适用于各类癌症患者的标准问卷, 已广泛的应用于多种癌症研究. 食管癌补充模式表(EORTC QLQ-OES18)是一种补充于核心量表使用的食管癌特异性及与治疗相关的补充模式表, 他包含测定食管癌相关症状及治疗副作用的18个项目^[2]. QLQ-C30及QLQ-OES18的各项原始得分经线性公式转换成0-100, 功能量表得分越高提示功能状态越好, 整体生活质量量表得分越高提示生活质量越好, 而症状量表及单项条目得分越高提示症状越明显^[3]. 所有患者予化疗前1 d, 化疗开始后1 wk、化疗后4 wk进行3次评估。

统计学处理 所有数据均经双人检查核对后录入计算机, 采用SPSS13.0进行统计学处理, 影响生活质量因素的差异程度经 t 检验及单变量方差检验处理。

2 结果

不同年龄组核心量表QLQ-C30得分比较, 躯体、角色、认知、社会功能和总体状况有统计学意义, <55 岁年龄组得分较高($P<0.05$, 表2). 症状得分随年龄增加而有所增加, 在疲乏、失眠和食欲丧失有统计学意义($P<0.05$, 表2). 以性别分组, 两性得分无显著差异. 不同文化程度QLQ-C30得分存在差异, 文化程度较高者有较高的社会

表 2 食管癌患者人口统计学特征及疾病与治疗特征与EORTC QLQ-C30得分间的关系

| 特征 | 功能 | | | | | 总体状况 | 症状 | | | | | 单一条目 | | | | |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------|-------------------|-------------------|------|------|-------------------|--|
| | 躯体 | 角色 | 情绪 | 认知 | 社会 | | 疲乏 | 恶心呕吐 | 疼痛 | 呼吸困难 | 失眠 | 食欲丧失 | 便秘 | 腹泻 | 经济困难 | |
| 年龄 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <55 | 86.4 | 82.8 | 74.2 | 73.9 | 67.4 | 75.9 | 19.5 | 22.6 | 19.9 | 11.1 | 18.7 | 16.3 | 12.5 | 11.6 | 38.2 | |
| 55-65 | 82.9 | 77.9 | 72.5 | 69.7 | 62.3 | 72.4 | 22.5 | 21.3 | 20.2 | 11.9 | 19.5 | 22.8 | 13.7 | 10.9 | 38.5 | |
| >65 | 77.6 ^a | 70.2 ^a | 70.7 | 66.1 ^a | 56.7 ^a | 67.8 ^a | 30.5 ^a | 21.5 | 18.9 | 13.9 | 27.1 ^a | 28.2 ^a | 14.7 | 10.0 | 36.7 | |
| 性别 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 男 | 81.2 | 76.8 | 71.8 | 69.2 | 60.8 | 71.0 | 25.4 | 22.1 | 19.7 | 12.1 | 22.8 | 23.6 | 14.0 | 11.2 | 37.2 | |
| 女 | 82.8 | 73.4 | 73.6 | 69.7 | 62.9 | 72.7 | 23.6 | 20.3 | 19.9 | 13.8 | 21.2 | 22.6 | 13.1 | 9.2 | 39.5 | |
| 文化 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 82.0 | 77.6 | 74.1 | 66.7 | 58.1 | 70.7 | 26.8 | 22.4 | 20.9 | 11.5 | 20.8 | 22.0 | 14.1 | 9.6 | 54.2 | |
| 2 | 80.6 | 75.0 | 72.9 | 68.6 | 61.8 | 72.0 | 24.5 | 22.1 | 19.2 | 12.8 | 20.5 | 23.6 | 14.2 | 10.3 | 39.3 | |
| 3 | 82.6 | 74.6 | 72.2 | 70.4 | 60.1 | 71.6 | 23.6 | 20.6 | 18.3 | 11.7 | 22.9 | 22.1 | 13.3 | 11.1 | 33.3 | |
| 4 | 81.5 | 76.6 | 70.3 | 70.9 | 63.9 ^a | 71.3 | 25.1 | 21.6 | 19.9 | 13.5 | 24.7 | 25.1 | 13.6 | 11.5 | 27.9 ^a | |
| X线 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| (1) | 82.7 | 77.2 | 73.9 | 70.6 | 62.2 | 72.4 | 23.6 | 20.9 | 18.1 | 12.1 | 21.0 | 20.6 | 14.1 | 10.5 | 37.3 | |
| (2) | 80.7 | 75.0 | 70.6 | 68.1 | 59.3 | 69.9 | 25.9 | 22.7 | 21.1 | 13.2 | 23.5 | 25.6 | 13.6 | 11.0 | 38.2 | |
| (3) | 76.2 | 71.9 | 69.9 | 65.9 | 57.9 | 68.6 | 28.5 | 21.8 | 20.2 | 11.0 | 26.7 | 27.8 | 13.5 | 10.6 | 37.8 | |
| (4) | 85.5 ^a | 78.6 ^a | 74.3 | 72.3 ^a | 76.5 ^a | 79.9 ^a | 26.0 | 19.1 | 18.3 | 10.7 | 20.5 ^a | 23.8 ^a | 13.2 | 9.7 | 36.4 | |
| 分期 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| II | 88.0 | 83.2 | 75.2 | 75.0 | 69.1 | 82.4 | 17.1 | 22.1 | 11.7 | 13.0 | 15.1 | 14.3 | 12.8 | 11.6 | 36.9 | |
| III | 82.9 | 76.9 | 72.3 | 69.5 | 61.2 | 72.2 | 24.8 | 22.2 | 18.7 | 11.9 | 21.2 | 22.0 | 13.4 | 10.8 | 38.1 | |
| IV | 77.8 ^a | 72.6 ^a | 71.2 | 67.4 ^a | 59.3 ^a | 67.1 ^a | 27.5 ^a | 20.8 | 23.2 ^a | 13.3 | 26.3 ^a | 28.1 ^a | 14.7 | 10.3 | 37.3 | |
| 目标 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ① | 83.1 | 76.0 | 71.8 | 68.7 | 59.9 | 71.0 | 26.7 | 24.3 | 22.0 | 13.1 | 26.6 | 26.5 | 14.9 | 10.3 | 39.3 | |
| ② | 84.5 | 76.9 | 74.3 | 72.1 | 66.3 | 75.8 | 19.5 | 16.2 | 13.2 | 12.4 | 11.4 | 14.6 | 11.6 | 12.3 | 35.5 | |
| ③ | 72.5 ^a | 74.5 | 69.6 | 66.2 ^a | 56.7 ^a | 64.9 ^a | 29.8 ^a | 23.5 ^a | 23.8 ^a | 11.1 | 29.4 ^a | 29.4 ^a | 14.7 | 8.9 | 36.9 | |
| KPS | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <80 | 72.7 | 64.5 | 59.5 | 56.1 | 50.2 | 56.7 | 35.1 | 18.2 | 25.7 | 14.5 | 31.0 | 41.1 | 14.8 | 9.7 | 36.7 | |
| ≥80 | 83.4 ^c | 78.3 ^c | 74.7 ^c | 71.9 ^c | 63.5 ^c | 74.3 ^c | 23.0 ^c | 22.4 | 18.4 ^c | 12.1 | 20.7 ^c | 19.9 ^c | 13.6 | 10.9 | 37.9 | |

^a $P<0.05$ by one-way ANOVA; ^c $P<0.05$ by independent t test. 1文化: 1 = 文盲, 2 = 小学, 3 = 初中, 4 = 高中及以上; 2X线分型: (1) = 髓质型, (2) = 溃疡型, (3) = 缩窄型, (4) = 蕈伞型; 3目标: ① = 新辅助化疗组, ② = 辅助化疗组, ③ = 姑息性化疗组。

功能得分和较低的经济困难得分($P<0.05$, 表2)。以X线类型分组, 缩窄型QLQ-C30功能得分较其他型为低, 蕈伞型较高, 在躯体、角色、认知和社会功能有统计学意义($P<0.05$, 表2); 缩窄型患者在失眠、食欲丧失得分显著高于其他类型($P<0.05$, 表2)。随着临床分期级别的增加, 大部分QLQ-C30功能得分如躯体、角色、认知及社会 and 总体健康状况得分显著下降($P<0.05$, 表2), 而症状得分则有所增加, 在疲乏、疼痛、失眠及食欲丧失有统计学意义($P<0.05$, 表2)。新辅助化疗、辅助化疗、姑息化疗3组QLQ-C30得分比较, 辅助化疗组功能得分和总体状况均高于其他两组, 在躯体、认知、社会及总体状况有显著性差异($P<0.05$, 表2), 姑息化疗组症状得分较高, 在疲乏、疼痛、失眠、食欲丧失有统计学意义($P<0.05$, 表2)。以KPS<80和≥80分为2组, ≥80分组QLQ-C30功能得分明显高于<80组, 而症状得分如疲乏、疼痛、失眠及食欲丧失显著低于<80组($P<0.05$, 表2)。食管癌专用量表显示三组在吞咽困难、进食、反流、疼痛、吞咽

表 3 食管癌患者不同治疗组EORTC QLQ-OES18得分的比较

| QLQ-OES18 | mean ± SD | | |
|-----------|-----------|-------------------|-------------------|
| | 新辅助化疗组 | 姑息化疗组 | 辅助化疗组 |
| 吞咽困难 | 32.2 | 37.5 ^c | 11.8 ^a |
| 进食 | 33.3 | 36.8 | 12.1 ^a |
| 反流 | 14.7 | 14.8 | 20.5 ^a |
| 疼痛 | 22.2 | 28.9 ^c | 12.8 ^a |
| 吞咽口水 | 11.2 | 14.6 | 9.8 ^b |
| 吞咽梗阻 | 20.3 | 30.1 ^c | 10.6 ^a |
| 口干 | 26.8 | 18.9 ^c | 18.2 ^a |
| 食欲减退 | 29.1 | 32.1 | 14.1 ^a |
| 咳嗽 | 14.8 | 14.9 | 13.2 |
| 言语 | 13.4 | 14.7 | 14.5 |

^a $P<0.05$ 新辅助化疗组; ^b $P<0.05$ vs 姑息化疗组; ^c $P<0.05$ vs 新辅助化疗组。

口水、吞咽梗阻和食欲减退得分差异有统计学意义($P<0.05$, 表3)。

3 讨论

QOL对于肿瘤治疗效果评价有重要意义, 他可以用来比较两个治疗模式对患者QOL的影响,

同行评价

该文采用EORTC QLQ问卷表访问133例食管癌患者, 评价食管癌化疗患者的生活质量并探究与生活质量相关的影响因素。研究目的明确, 设计基本合理, 研究手段较新颖, 研究结果可信, 有临床指导意义。

并以此做出取舍. Ross *et al*^[4]使用丝裂霉素+顺铂+氟脲嘧啶静脉持续滴注(MCF方案)与表柔比星+顺铂+氟脲嘧啶静脉持续滴注(ECF方案)治疗食管癌和胃癌,发现两者疗效相当,但ECF方案QOL更好,故推荐ECF方案作为首选. 1985年美国食品和药品管理局决定新药评价既要有提高生存时间、又要有改善生活质量的资料,1989年建议QOL应作为在生存率之后评价所有新的肿瘤治疗方法的第二项标准. 预计QOL评价将成为肿瘤临床研究终点(endpoint)之一. 食管癌患者生活质量的研究最早可追溯到1977年, Stoller *et al*^[5]采用问卷对食管癌患者治疗后生活质量进行评估,主要评测4个领域: 吞咽能力、工作习惯、享受闲暇和睡眠情况. 本研究使用EORTC QLQ-C30及QLQ-OES18用于食管癌化疗患者生活质量评价. 我们收集了化疗前1 d、化疗开始后1 wk、化疗后4 wk 3个时间点的资料,分析结果显示无论化疗有效与否,本研究组患者化疗后第1 wk生活质量得分多稍有降低,但4 wk后可恢复至化疗前水平. 说明化疗对患者生活质量的负性影响是暂时的,一段时间后即可恢复. 年龄是影响生活质量的一个重要因素,一般说来,在病期相同的情况下,年轻患者的QOL应高于年长者^[6]. 性别对QOL的影响不同作者的意见相左^[7-8]. 本研究显示性别对功能量表及症状量表得分没有影响,但高龄组患者功能量表得分多低于低龄组,而症状子量表得分多较高,后一结果与Hjermstad *et al*^[9]的研究相吻合. 在本研究中,高中及以上文化程度者的QOL优于文化程度较低者. 这可能是文化程度较高者职业、经济收入相对好于低学历者,因而其生活水平、接受医疗保健服务能力优于后者,导致其QOL水平相对较高,也可能是因为文化程度较高者能够更好地理解量表提出的问题所造成的假象. 文化程度对QOL的影响需要进一步深入研究. 我们以X线类型将患者分为4组,缩窄型食管癌患者的QOL明显低于其他类型的患者,这可能系缩窄型食管癌症状更重、化疗相对不敏感所致. 目前对食管癌进行T分期较为困难,我们采用通过食管病变长度结合食管吞钡X线片、CT确定临床分期^[10]. 比较了不同分期食管癌患者的QLQ-C30得分,发现随着期别的增加,大部分功能量表和总体健康状况量表得分有显著的下降趋势,而症状量表得分在疲乏、疼痛、失眠、食欲丧失方面则明

显增加. 预示临床分期是影响生活质量的一个重要的指标. 我们对QLQ-C30量表得分和KPS水平进行相关性分析,结果显示KPS高分组功能子量表得分及总体健康状况得分明显高于低分组,而大部分症状子量表得分低于低分组,表明KPS评分高患者其生活质量较好. 结果与王建平 *et al*^[11]的研究相似. 根据临床经验, KPS评分较高的患者,生活质量各个方面及总体应较好,结果基本证实了我们的预期,这也说明QLQ-C30量表对治疗过程中临床变化反应性较好. 根据治疗目标的不同将患者分为新辅助化疗、辅助化疗、姑息化疗3组. 对于没有转移的早期食管癌患者应尽可能进行根治性切除手术,术前给予1-2个周期的新辅助化疗理论上可起到降低临床分期、帮助术后选择化疗方案并评价预后、防止远处转移及提高手术切除率的作用,国外两个大样本的随机对照临床试验结果^[12-13]也报告新辅助化疗可提高术后2 a生存率; Leonard *et al*^[14]进行的多中心临床试验报告辅助化疗可改善食管鳞癌患者术后无病生存期,本研究显示辅助化疗患者生活质量较好,故应在术后3 wk左右尽早给予足量化疗,疗程一般为4-6周期;而对晚期或已有转移的食管癌患者,姑息性化疗是主要的治疗手段,通常认为治疗可明显改善生活质量,适当延长生存时间. 德国学者Geissler *et al*^[15]报告对于IVb期食管癌患者姑息性治疗目标应主要是改善肿瘤相关症状和维持营养状态. 我们的研究结果显示姑息性化疗对患者生活质量影响不大,且部分患者化疗后吞咽困难等症状有不同程度改善,因此对于晚期食管癌患者给予姑息性化疗也是适当的.

EORTC QLQ-C30及其针对某一癌症的附加量表,已在世界范围内广泛应用,他使QOL研究之间具有可比性. 但各国文化背景、宗教信仰,患者受教育程度、性格、社会地位和职业、年龄,肿瘤并发症及与肿瘤无直接关系的夹杂症、填写量表的时点等,都会干扰患者的精神状态,进而影响量表的填写及其后的评估. 我国患者直接理解国外的量表有困难,即便是华语地区和国家的版本,不一定能完全贴近我国不同地区的患者,这一点从食管癌QOL评价量表的各版本中不难看出. 因此,我们需要自己的译本. 实际操作中,多数患者还可能需医务人员给予一定帮助才能完成^[16].

4 参考文献

- 1 全国肿瘤防治研究办公室, 卫生部卫生统计信息中心. 中国恶性肿瘤危险因素研究. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2003: 235-236
- 2 Blazeby JM, Conroy T, Hammerlid E, Fayers P, Sezer O, Koller M, Arraras J, Bottomley A, Vickery CW, Etienne PL, Alderson D. Clinical and psychometric validation of an EORTC questionnaire module, the EORTC QLQ-OES18, to assess quality of life in patients with oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1384-1394
- 3 Fayers PM, Asronson NK, Bjordal K. On behalf of the EORTC Quality of Life Study Group. The EORTC QLQ-C30 scoring manual. 3rd ed. Brussels: EORTC, 2001: 6-7
- 4 Ross P, Nicolson M, Cunningham D, Valle J, Seymour M, Harper P, Price T, Anderson H, Iveson T, Hickish T, Loftis F, Norman A. Prospective randomized trial comparing mitomycin, cisplatin, and protracted venous-infusion fluorouracil (PVI 5-FU) With epirubicin, cisplatin, and PVI 5-FU in advanced esophagogastric cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1996-2004
- 5 Stoller JL, Samer KJ, Toppin DI, Flores AD. Carcinoma of the esophagus: a new proposal for the evaluation of treatment. *Can J Surg* 1977; 20: 454-459
- 6 顾昉. 233例癌症患者生活质量的调查研究. *中国肿瘤* 1999; 8:356-358
- 7 Michelson H, Bolund C, Nilsson B, Brandberg Y. Health-related quality of life measured by the EORTC QLQ-C30-reference values from a large sample of Swedish population. *Acta Oncol* 2000; 39: 477-484
- 8 Blazeby JM, Brookes ST, Alderson D. Prognostic value of quality of life scores in patients with oesophageal cancer. *Br J Surg* 2000; 87: 362-373
- 9 Hjerstad MJ, Fayers PM, Bjordal K, Kaasa S. Health-related quality of life in the general Norwegian population assessed by the European Organization for Research and Treatment of Cancer Core Quality-of-Life Questionnaire: the QLQ=C30 (+ 3). *J Clin Oncol* 1998; 16: 1188-1196
- 10 祝淑钗, 李任, 李娟, 邱嵘, 韩春, 万钧. 非手术治疗胸段食管癌临床分期与预后关系的初步探讨. *中华放射肿瘤学杂志* 2004; 13:189-192
- 11 王建平, 陈仲庚, 林文娟, 崔俊南. 中国癌症患者生活质量的测定-EORTC QLQ-C30在中国的试用. *心理学报* 2000; 32: 438-442
- 12 MRC Oesophageal Cancer Working Party. Surgical resection with or without preoperative chemotherapy in oesophageal cancer a randomized controlled trial. *Lancet* 2002; 359:1727-1733
- 13 Kaklamanos IG, Walker GR, Ferry K, Franceschi D, Livingstone AS. Neoadjuvant treatment for resectable cancer of the esophagus and the gastroesophageal junction: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 754-761
- 14 Leonard GD, Reilly EM. Post-operative chemotherapy improves disease-free survival, but not overall survival in people with oesophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Treat Rev* 2004; 30:473-477
- 15 Geissler M, Schwacha H, Eggstein S, Usadel H, Harder J, Opitz O, Arnold C, Grimm CF, Blum HE. Esophageal carcinoma: non-surgical therapy. *Schweiz Rundsch Med Prax* 2004; 93: 2057-2064
- 16 Blazeby JM, Nicklin J, Brookes ST, Winstone K, Alderson D. Feasibility of quality of life assessment in patients with upper gastrointestinal tract cancer. *Br J Cancer* 2003; 89: 497-501

电编 李琪 编辑 潘伯荣

特异性免疫治疗母婴传播所致慢性乙型肝炎23例

郑鹏远, 娄海山, 王永红, 唐芙爱, 白 蓉, 司方明, 白经修, 琚 新

■背景资料

母婴传播所致的慢乙肝是我国慢乙肝治疗中的重点、难点, 特别是一个家庭中多成员患病, 经济和心理负担较重, 应给予积极关注, 利用HBsAg冲击致敏的树突状细胞, 联合乙肝免疫球蛋白治疗母婴传播所致慢乙肝国内未见报道, 对其中HBeAg(+)者疗效较好, 且应答反应持久, 是一种适合我国国情的疗法。

郑鹏远, 唐芙爱, 司方明, 白经修, 郑州大学第二附属医院消化科 河南省郑州市 450014
娄海山, 王永红, 琚新, 许昌市人民医院感染科 河南省许昌市 461000
白蓉, 郑州大学第五附属医院内科 河南省郑州市 450052
河南省卫生厅医学创新人才工程项目, No. 2004-45
河南省科技厅科技攻关项目, No. 0324410006
通讯作者: 郑鹏远, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化科. medp7123@yahoo.com
电话: 0371-65261035
收稿日期: 2006-04-28 接受日期: 2006-05-17

Potential effect of specific immunotherapy on chronic hepatitis B of vertical maternal-fetal transmission: an analysis of 23 cases

Peng-Yuan Zheng, Hai-Shan Lou, Yong-Hong Wang, Fu-Ai Tang, Rong Bai, Fang-Ming Si, Jing-Xiu Bai, Xin Ju

Peng-Yuan Zheng, Fu-Ai Tang, Fang-Ming Si, Jing-Xiu Bai, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China
Hai-Shan Lou, Yong-Hong Wang, Xin Ju, Department of Infectious Diseases, Xuchang People's Hospital, Xuchang 461000, Henan Province, China
Rong Bai, Department of Internal Medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Supported by Medical Innovation Talent Program of Health Department, Henan Province, No. 2004-45, and the Key Item of Science and Technology Department of Henan Province, No. 0324410006
Correspondence to: Peng-Yuan Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. medp7123@yahoo.com
Received: 2006-04-28 Accepted: 2006-05-17

Abstract

AIM: To study the efficacy of specific immunotherapy in the treatment of patients with chronic hepatitis B (CHB) of vertical maternal-fetal transmission.

METHODS: HBsAg vaccine-loaded dendritic cells (DC, 10^6) and HBIg (200 U) were injected respectively into 23 patients with CHB of vertical transmission. Six months were considered as one course, and there were two courses in total.

At the end of treatment, liver function, HBV DNA level and HBV markers in the patients were measured.

RESULTS: Of the 9 patients with HBeAg(+) CHB, 1 case showed a complete response, and 7 showed partial responses. Of the 4 patients with HBeAg(-) CHB, partial responses occurred in 2 cases. No responses were observed in the 5 chronic HBV carriers. Of the 5 inactive HBsAg carriers, 1 case showed a complete response, while the rest showed no responses.

CONCLUSION: The specific immunotherapy is effective in the treatment of CHB transmitted from the mothers.

Key Words: Chronic hepatitis B; Dendritic cells; Hepatitis B immunoglobulin; Immunotherapy

Zheng PY, Lou HS, Wang YH, Tang FA, Bai R, Si FM, Bai JX, Ju X. Potential effect of specific immunotherapy on chronic hepatitis B of vertical maternal-fetal transmission: an analysis of 23 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1824-1827

摘要

目的: 观察特异性免疫疗法对母婴传播所致慢性乙型肝炎的疗效。

方法: 母婴传播的慢乙肝患者23例每月1次注射乙肝表面抗原负载的树突状细胞 10^6 , 乙肝免疫球蛋白200 U。6次为1疗程, 共2个疗程。疗程结束后6, 12mo复查肝功能, 乙肝标志, HBV-DNA定量(PCR法)。

结果: 在HBeAg阳性慢乙肝9例中有1例治疗后显示完全应答, 7例显示部分应答。HBeAg阴性慢乙肝4例中有2例出现部分应答。HBV携带者5例未见应答。非活动性HBsAg携带者5例中有1例显示完全应答, 其余4例未应答。

结论: 特异性免疫疗法对母婴传播所致慢乙肝有一定疗效。

关键词: 慢性乙型肝炎; 树突状细胞; 乙肝免疫球蛋白

白; 免疫疗法

郑鹏远, 姜海山, 王永红, 唐芙蓉, 白蓉, 司方明, 白经修, 琚新. 特异性免疫治疗母婴传播所致慢性乙型肝炎23例. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1824-1827

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1824.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)所致慢性乙型肝炎(CHB)是世界范围的人类健康问题, 母婴传播是其慢性感染的主要途径之一. 我国CHB患者约30%-50%为母婴传播所致^[1], 因母婴传播而感染HBV的家庭, 父母及孩子的心理负担都较重, 日后肝硬化、肝癌的高发率时刻威胁着他们, 故这部分患者迫切要求治疗, 而目前所用的抗病毒药物如干扰素, 其疗效有限, 不良反应较大; 核苷类似物虽然抗病毒作用强而快, 但疗程难以确定, 长期治疗均可产生耐药突变, 在治疗过程中引起ALT和HBV DNA的突破(breakthrough)致使病情恶化^[2]. 以及长期用药费用较高, 皆严重影响了抗病毒药物及时广泛合理应用. 故探索新的治疗方法仍是当务之急. 慢乙肝免疫学发病机制的深入研究, 为CHB治疗带来了新的方法. 已知机体对HBV形成免疫耐受是HBV持续感染的主要原因. CHB患者树突状细胞(DC)功能低下^[3-4], 导致机体内T、B淋巴细胞呈耐受状态, 故如何打破免疫耐受状态, 诱导有效的机体免疫, 抑制并清除HBV是CHB免疫治疗的关键^[5]. 部分HBV患者接种含HBsAg或其他HBV相关蛋白后可检测到特异性的细胞免疫反应, 并有一定的抗病毒作用^[6-7]. 汪晓莺 *et al*^[8]以HBsAg疫苗冲击DC可使DC成熟度升高, MHC分子、共刺激分子表达增加, 免疫功能增强. 我们利用HBsAg疫苗负载的DC, 联合乙肝免疫球蛋白应用于母婴传播的CHB患者共23例, 结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 按慢性乙型肝炎防治指南(中华医学会肝病学会, 感染病学分会联合修订)^[9]和病毒性肝炎防治方案(中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝病学会联合修订, 2000-09西安)为标准, 选择可能为母婴传播的CHB患者23(男16, 女7)例. 年龄15-41岁, 病程15-41 a. 其中HBeAg(+)CHB 9(男8, 女1)例, 年龄18-30岁, 血清乙肝标志物皆为HBsAg, HBeAg, 抗HBc 3项阳性, HBV DNA $>10^8$ - $<10^{12}$ 拷贝/L, ALT

2000-10 002 nkat/L. HBeAg(-)CHB 4(男4)例, 年龄18-41岁, 血清乙肝标志物皆为HBsAg, 抗HBe, 抗HBc 3项阳性, HBV DNA $>10^6$ - $<10^{12}$ 拷贝/L. ALT在正常834-2000 nkat/L之间. 慢性HBV携带者5(男3, 女2)例, 年龄15-32岁, 血清乙肝标志物HBsAg, HBeAg, 抗HBc 3项阳性者3例, HBsAg, 抗HBe, 抗HBc 3项阳性者2例, HBV DNA $>10^6$ - $<10^{12}$ 拷贝/L, 肝功能正常1 a以上. 非活动性HBsAg携带者5(女4, 男1)例, 年龄17-30岁, 血清乙肝标志物皆为HBsAg, 抗HBe, 抗HBc 3项阳性, HBV DNA阴性, 肝功能正常1 a以上.

1.2 方法 评定CHB患者为母婴传播的标准是(1)患者母亲为慢乙肝患者, 或为HBV DNA阳性的肝癌患者; (2)患者无手术史及输血史; (3)病程与年龄相当; (4)发现患病时的年龄小于6岁, 多于入幼儿园或小学体检时发现; (5)同胞兄弟姐妹中有乙肝患者(为参考项). 每患者每次sc HBsAg疫苗(含preS₁) 86 μ g冲击致敏的树突状细胞 10^6 , 乙肝免疫球蛋白200 IU, im, 每月1次, 6次为1疗程, 共2个疗程. 每个疗程结束后及结束后6, 12 mo复查乙肝表面标志, 肝功能及HBV DNA定量(PCR法).

2 结果

在HBeAg(+)CHB 9例中, 4/9 DNA阴转, 4/9 DNA降低, 4/9发生HBeAg/抗HBe转换, 3/9肝功能复常, 1/9 ALT升高. 治疗结束时应答(包括单项应答)8/9, 治疗结束后12 mo疗效维持不变. 于治疗1 a后再检测完全应答1/9, 部分应答7/9, 1/9无应答. 在4例HBeAg(-)CHB患者中治疗结束时2/4 ALT复常, 结束1 a后之肝功能维持正常, 即为部分应答, 另2/4无应答.

慢性HBV携带者5例在治疗期间及治疗结束, 以及结束治疗后1 a随访中乙肝五项和HBV DNA检测未见明显改变. 非活动性HBsAg携带者5例中1例由治疗前HBsAg(+), 抗HBe(+), 抗HBc(+), 经12 mo的治疗后未见改变, 但结束治疗1 a后乙肝标志全部阴转. 另1例, 抗HBe于治疗结束时阴转. 根据“慢性乙型肝炎防治指南”中的抗病毒治疗应答标准^[9]统计列于表1.

3 讨论

免疫耐受是慢乙肝形成的机制, 在围产期和婴儿期感染HBV者中, 分别有90%和25%-30%发展为慢性感染, 至40-50岁约60%发生肝硬化. 而母婴传播途径中除父母种系传播外, 妊娠期宫

表 1 母婴传播慢乙肝患者23例治疗后应答情况

| 诊断 | n | 单项应答 | | | 时间顺序应答 | | | | 联合应答(治疗结束1 a后) | | | |
|--------------|---|------|-----|-----|--------|-------|----|----|----------------|----------------|----|----------------|
| | | 病毒学 | 血清学 | 生化学 | 早期 | 治疗结束时 | 持久 | 维持 | 复发 | 完全 | 部分 | 无 |
| HBsAg(+)慢乙肝 | 9 | 8 | 4 | 5 | | 8 | 8 | | | 1 | 7 | 1 |
| HBsAg(-)慢乙肝 | 4 | | | 2 | | 2 | 2 | | | | 2 | 2 |
| 慢性HBV携带者 | 5 | | | | | | | | | | | 5 |
| 非活动性HBsAg携带者 | 5 | | 1 | | | | 1 | | | 1 ¹ | | 4 ² |

¹女, 20岁, 治疗结束1 a后乙肝标志全部阴性, ²其中1例女, 23岁, 治疗结束后抗HBe阴转, 呈HBsAg, 抗HBc二项阳性. 但“指南”中未有抗HBe阴转为应答指标, 故仍列入无应答项.

内经感染HBV的母血和胎盘滋养层细胞皆可有机会感染胎儿. 分娩时含有HBV的母血及产道分泌物也可使胎儿感染HBV, 婴幼儿喂养过程中与母体密切接触也是造成HBV水平传播的常见原因. 此外婴幼儿免疫系统发育不成熟, 功能不健全, 无能力及时清除感染的HBV, 如此长期的HBV抗原刺激导致免疫耐受形成. 由此可知母婴传播所引起的CHB患者预后较差, 家庭成员中多人患病, 心理负担较重, 治疗要求最迫切, 尽可能为这类患者解除痛苦是医务工作者的当务之急.

我们采用特异性免疫疗法对23例母婴传播所致CHB患者的治疗结果显示: 处于免疫激活状态的HBeAg(+)CHB患者经治疗后8/9 (88.8%)显示应答, 4/9 (44.4%)发生HBeAg/抗HBe血清学转换, 达到治疗终点^[10]. 5/9例有乏力, 纳差, 食欲不振, 消化不良, 腹胀, 易感冒等症状于治疗过程中逐渐消失. 说明该疗法对母婴传播的HBeAg(+)CHB有较好的治疗作用(短期目标). 在HBeAg(-)CHB中仅2/4 (50%)显示ALT恢复正常. 而处于免疫耐受状态的携带者中, 仅1/10 (10.0%)显示应答. 故从疗效分析可以看出HBsAg疫苗冲击致敏的DC, 联合乙肝免疫球蛋白可用于母婴传播所致CHB的治疗, 尤其适用于HBeAg(+)者. 推测其机制可能是在主动免疫刺激条件下DC数量增加, DC表面分子如CD1a、CD80、CD83、HLA-DR表达增加, DC成熟度增加, IFN、IL-2等水平升高, 提高了DC的抗原呈递功能, 特异性激活CD8⁺T细胞, 诱导HBsAg特异的CTL反应以清除HBV及表达HBsAg抗原的感染了HBV的肝细胞^[11-12]. 联合应用乙肝免疫球蛋白可中和循环中HBV, 通过抗原呈递细胞, 增加对HBsAg的内吞数量, 增强HBsAg特异性CTL克隆的增殖反应, 有利于HBV的清除^[13-14].

有1例非活动性HBsAg携带者(女, 20岁)经

2个疗程治疗后1 a乙肝标志全部呈阴性, 未出现抗HBs. 这可能是机体免疫功能增强或由于乙肝免疫球蛋白的应用, 增加了Th1型细胞分化, 促进体内IFN、IL-12分泌, 有效清除HBV后使HBsAg阴性^[15], 确切机制尚需进一步探讨.

总之, 该疗法从提高母婴传播所致CHB患者的免疫功能为出发点, 有效提高了机体的免疫功能, 对HBeAg(+)CHB患者有较好疗效. 由于该方法使用简便, 费用低廉, 无明显毒副作用, 只需每月注射一次, 适合广大农村及城镇社区应用, 是一种有前景的CHB治疗方法. 但随着CHB新的抗病毒药物不断开发, 从提高机体免疫功能入手, 旨在打破免疫耐受的免疫调节治疗也应更深入更广泛的展开. 特别是结合肝穿组织病理学, 分子生物学方法的研究更亟待深入^[16-17].

4 参考文献

- 1 朱启镛. 重视乙型肝炎病毒母婴传播的阻断. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 199-200
- 2 斯崇文. 对当前慢性乙型肝炎抗病毒治疗的想法. 中华传染病杂志 2005; 23: 73-74
- 3 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
- 4 Lipscomb MF, Masten BJ. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 2002; 82: 97-130
- 5 俞海俐, 施光峰. 乙型肝炎的慢性化和慢性乙型肝炎的免疫学治疗. 中华传染病杂志 2004; 22: 142-144
- 6 郑佳. 乙型肝炎疫苗的应用进展. 中国计划免疫 2005; 11: 155-158
- 7 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
- 8 汪晓莺, 孙晓雷, 汤伟, 孙伟红, 苏丽, 张学光. HBsAg体外冲击的慢性乙肝患者树突状细胞的生物学特性及其对HBV特异性CTL的诱导作用. 中国免疫学杂志 2003; 19: 850-853

- 9 中华医学会肝病学会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝病杂志 2005; 13: 881-891
- 10 任红. 中国慢性乙型肝炎治疗策略——2004年全国乙型肝炎治疗策略专家峰会纪要. 中华肝病杂志 2005; 13: 326-328
- 11 刘惠萍, 郑曲波, 祖萍, 张宜俊, 汪恩浩, 曾滢. 高剂量乙型肝炎疫苗对体内血树突状细胞的影响. 上海免疫学杂志 2003; 23: 351-356
- 12 曲建慧, 张玲霞, 成军, 辛绍杰. 乙型肝炎治疗的新靶点与新方法. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1663-1666
- 13 Shouval D, Samuel D. Hepatitis B immune globulin to prevent hepatitis B virus graft reinfection following liver transplantation: a concise review. *Hepatology* 2000; 32: 1189-1195
- 14 刘崇柏, 苏崇鳌. 对乙型肝炎免疫球蛋白阻断母婴围产期传播的浅见. 中国计划免疫 2006; 12: 148-150
- 15 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
- 16 姜海山, 白经修, 司方明, 刘岩, 徐建强, 李俊红, 范毅凯, 熊灵军, 段芳龄. 树突状细胞疫苗治疗慢性乙型肝炎的临床观察. 中华传染病杂志 2005; 23: 203-204
- 17 姚希贤, 崔东来. 进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1645-1649

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知

本刊讯 为了进一步推动华北地区(北京、天津、河北、山西和内蒙)的消化学术交流与发展、帮助广大消化专业工作者全面了解国内外消化基础和临床研究进展, 提高消化疾病诊治和研究水平. 第十二届华北地区消化学术会议, 将于2006-10-27/29在河北省石家庄举办. 会议由北京、天津、河北、山西和内蒙医学会消化病学分会联合主办, 河北省医学会消化病学分会承办. 本次会议将就近年来国内外消化领域的研究进展、诊断和治疗方面的新技术、新方法进行广泛的学术交流, 大会将邀请国内著名消化病学专家作专题学术报告. 欢迎消化界各位专家和同仁积极投稿参会, 参会者可获得国家级 I 类继续教育学分.

1 征文内容

会议征集的论文内容包括: (1)消化系统疾病流行病学、发病机制、诊断和治疗的研究进展; (2)消化系统肿瘤的发病机制、诊断和治疗以及预防的进展; (3)消化内镜的应用现状及内镜下诊断和治疗的临床操作表演; (4)慢性肝病及肝癌近年来的发病情况治疗研究进展; (5)当前医源性疾病在消化疾病方面的表现与现状; (6)消化疾病在当前临床研究中热点、难点, 需要解决的问题.

2 征稿要求

来稿要求是未在国内外刊物上公开发表过的论文, 800字摘要一份, 摘要应包括: 目的、材料和方法、结果和结论4个部分. 来稿一律使用A4纸打印、WORD格式, 并附软盘或发电子邮件至: huabeixiaohua@yahoo.com.cn.

截稿日期: 2006-08-30, 以当地邮戳为准. 请务必在信封右上角注明“华北区消化会议”字样.

会议地址: 河北医科大学第二医院图书馆楼三楼会议室.

联系人: 河北省医学会学术会务部(邮政编码050011) 徐辉 电话: 0311-85988457; 河北医科大学第二医院(邮政编码050000)蒋树林 电话: 0311-87222301; 0311-87222951.

胶囊内镜检查对双气囊小肠镜进镜方式选择的指导作用

李晓波, 戈之铮, 戴军, 高云杰, 刘文忠, 胡运彪, 萧树东

■背景资料

胶囊内镜和双气囊小肠镜检查是近年开展应用的小肠疾病诊治领域新方法。胶囊内镜和双气囊小肠镜联合应用日益受关注。

李晓波, 戈之铮, 戴军, 高云杰, 刘文忠, 胡运彪, 萧树东, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科 上海市消化疾病研究所 上海市 200001

上海市重点学科建设项目资助, No. Y0205

通讯作者: 戈之铮, 200001, 上海市, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化内科. zhizhengge@yahoo.com.cn

电话: 021-58752345-3219 传真: 021-63200879

收稿日期: 2006-04-07 接受日期: 2006-05-11

Directive role of capsule endoscopy in determining the route for double-balloon enteroscopy

Xiao-Bo Li, Zhi-Zheng Ge, Jun Dai, Yun-Jie Gao, Wen-Zhong Liu, Yun-Biao Hu, Shu-Dong Xiao

Xiao-Bo Li, Zhi-Zheng Ge, Jun Dai, Yun-Jie Gao, Wen-Zhong Liu, Yun-Biao Hu, Shu-Dong Xiao, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Medical college of Shanghai Jiaotong University; Shanghai Institute of Digestive Diseases, Shanghai 200001, China

Supported by Key Subject Foundation of Shanghai, China, No. Y0205

Correspondence to: Zhi-Zheng Ge, Department of Gastroenterology, Renji Hospital, Medical college of Shanghai Jiaotong University, 200001 Shanghai, China. zhizhengge@yahoo.com.cn

Received: 2006-04-07 Accepted: 2006-05-11

Abstract

AIM: To evaluate the role of capsule endoscopy in determining the route for double-balloon enteroscopy.

METHODS: Twenty patients with negative or equivocal evaluation after capsule endoscopy received double-balloon enteroscopy (under anesthesia with propofol) by oral or anal route. The choice of the insertion route of the endoscope for the first attempt at double-balloon enteroscopy was made according to a time index (the value of the time in minutes for transit of the capsule endoscope from the pylorus to the lesion divided by the value of the time for transit of the capsule endoscope from the pylorus to the cecum). An anal route was indicated when the time index was more than 0.50. A second procedure was undertaken through the alternative route several days later when the lesion of inter-

est was not found during the first one. The accuracy for choosing the route of double-balloon enteroscopy according to the capsule time index was then analyzed.

RESULTS: Five patients with negative evaluation after capsule endoscopy received double-balloon enteroscopy, and a lesion was detected in 1 of these patients when a second procedure by the anal route was performed. Fifteen patients with equivocal evaluation after capsule endoscopy received double-balloon enteroscopy, and the suspected findings were confirmed in 12 (80.0%) of these patients by double-balloon enteroscopy combined with pathological examination. An anal route of the endoscopy at the first attempt with double-balloon enteroscopy was selected on 4 patients (0.99, 0.8, 0.65, and 0.59, respectively), and the lesions were detected in the latter two (with a time index of 0.65 and 0.59, respectively) when a second procedure by the oral route was performed. If the time index of more than 0.75 (with consideration of another report) was used, no further attempts would be needed in these two patients, and the lesions of the other two patients were assumed to be located in the distal ileum and reached by double-balloon enteroscopy via anal route exactly.

CONCLUSION: The outcome of capsule endoscopy can direct the choice of routes for double-balloon enteroscopy. A time index of more than 0.75 appears to indicate an anal route as the first procedure.

Key Words: Capsule endoscopy; Double-balloon enteroscopy; Anal route; Oral route

Li XB, Ge ZZ, Dai J, Gao YJ, Liu WZ, Hu YB, Xiao SD. Directive role of capsule endoscopy in determining the route for double-balloon enteroscopy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1828-1832

摘要

目的: 探讨胶囊内镜检查对双气囊小肠镜进镜方式选择的指导作用。

方法: 胶囊内镜检查阴性或可疑病变者20例

行双气囊小肠镜检查(均在麻醉下进行), 包括经口和经肛进镜方式. 根据胶囊内镜时间指数(胶囊内镜从幽门至病灶的通过时间/幽门至回盲瓣的通过时间)选择首次进镜方式, 时间指数 >0.50 时首先考虑经肛进镜检查, 对未发现异常者择期改换方式再行检查. 分析按胶囊内镜时间指数选择双气囊小肠镜进镜方式的准确性.

结果: 胶囊内镜检查阴性者5例, 行经口双气囊小肠镜检查, 有1例在改为经肛检查后检出病灶. 胶囊内镜检查怀疑小肠病变者15例, 有12例(80.0%)经双气囊小肠镜结合活检病理确诊. 以时间指数 >0.50 为标准, 4例(分别为0.99, 0.8, 0.65和0.59)首选经肛进镜检查, 后二者(时间指数分别为0.65和0.59)需换从口侧进镜检查而检出病灶; 如以时间指数 >0.75 为标准, 该2例不再需要改换方式再行检查, 另2例病变部位被判断为回肠远端, 经肛进镜即可准确到达病灶.

结论: 胶囊内镜检查可指导对双气囊小肠镜进镜方式的选择, 时间指数 >0.75 提示首选经肛进镜检查.

关键词: 胶囊内镜; 双气囊小肠镜; 经口进镜; 经肛进镜

李晓波, 戈之铮, 戴军, 高云杰, 刘文忠, 胡运彪, 萧树东. 胶囊内镜检查对双气囊小肠镜进镜方式选择的指导作用. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1828-1832

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1828.asp>

0 引言

双气囊小肠镜检查是近年开展应用的小肠疾病诊治领域的新方法^[1-10], 其检查范围和对小肠疾病的诊断率均远高于传统的推进式小肠镜^[11-12]. 双气囊小肠镜检查包括经口和经肛进镜方式, 通过二种方式的结合可完成全小肠检查. 对怀疑小肠疾病者, 病变部位的准确判断有助于双气囊小肠镜检查方式的选择, 从而减少或避免改换方式再行检查所带来的不良反应发生率增高、费用增高和患者依从性降低等后果. 由于传统的影像学等检查对小肠疾病诊断率均远低于胶囊内镜检查^[13], 后者已逐渐成为怀疑小肠疾病者首选的检查方法, 而双气囊小肠镜检查更适合作为胶囊内镜检查后补充检测手段^[14-16], 因此胶囊内镜下判断小肠病变部位的准确性可能成为双气囊小肠镜检查方式选择的重要影响因素. 本研究通过对原因不明的怀疑小肠病变患

者分别行胶囊内镜和双气囊小肠镜检查, 分析胶囊内镜检查对双气囊小肠镜检查方式选择的指导作用.

1 材料和方法

1.1 材料 2004-01/2006-01经B超、胃镜、结肠镜、上消化道钡餐、钡剂灌肠、小肠钡灌、CT、血管造影或核素扫描等检查未发现病因, 而要求进一步检查的消化道出血、腹痛或腹泻患者中, 先后行胶囊内镜和双气囊小肠镜检查者20例. 男8例, 女12例, 平均年龄51.9 (29-76)岁. 胶囊内镜检查5例未检出病灶, 15例发现可疑小肠病变. 双气囊小肠镜检查包括经口和经肛进镜方式, 对胶囊内镜未检出病灶者, 首先选择经口进镜; 对胶囊内镜发现可疑病变者, 根据时间指数(胶囊内镜从幽门至病灶的通过时间/从幽门至回盲瓣的通过时间)结合胶囊内镜二维轨迹图决定首次小肠镜检查方式, 时间指数 >0.50 时首先考虑经肛检查. 对初次检查未检出病灶者, 择期改换进镜方式再行检查.

1.2 方法

1.2.1 胶囊内镜检查 采用以色列Given影像公司生产的操作系统, 包括M2A胶囊内镜、数据记录仪组件和Rapid工作站. 每例患者采集50 000张左右的图像, 保存在与传感器相连的数据记录仪中. 检查结束后, 从记录仪中下载图像数据至Rapid工作站进行处理, 然后分别由2位有经验的消化科医师进行独立回顾分析. 患者在检查前至少禁食8 h. 检查结束时, 要求其仔细检查粪便以确认胶囊内镜排出体外.

1.2.2 双气囊小肠镜检查 采用富士能EN450 P5型双气囊电子小肠镜操作系统, 由术者和助手配合进行操作. 当内镜前端超过空回肠交界区而仍未发现病灶时, 即向黏膜下注射靛胭脂(10 g/L) 2 mL, 作为从另侧进镜检查的范围标记. 经专用活检钳(外径1.8 mm)取病理标本. 检查前1 d流质饮食, 检查前8 h禁食, 经肛方式检查者检查前4 h服用复方聚乙二醇电解质溶液(含聚乙二醇118 g, 深圳万和制药有限公司)以清洁肠道. 整个操作过程均在静脉内异丙酚麻醉下进行, 由2位麻醉科医师负责麻醉操作和心电监护.

2 结果

胶囊内镜检查阴性者5例接受经口双气囊小肠镜检查, 有1例在改为经肛检查后检出病灶. 15例胶囊内镜检查怀疑小肠病变者中, 8例时间指数未超过0.50者首选经口进镜检查, 其中5例检出

■相关报道

Gay *et al*研究发现, 根据胶囊内镜检查结果除可筛选双气囊小肠镜检查指征外, 还可作为双气囊小肠镜检查方式的可靠选择依据.

■应用要点

根据简易指标选择双气囊小肠镜进镜方式,从而减少或避免改换方式再行检查所带来的不良后果.

表 1 对胶囊内镜怀疑小肠病变者根据时间指数等因素选择双气囊小肠镜进镜方式的结果

| No | 经口双气囊 小肠镜检查 | 经肛双气囊 小肠镜检查 | 胶囊内镜从口腔至病灶的 通过时间 (min) | 胶囊内镜 时间指数 ¹ |
|----|----------------|----------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 十二指肠降段孤立溃疡 | | 65 | 0.28 |
| 2 | | 回肠远端孤立溃疡 | 415 | 0.99 |
| 3 | 空肠中段血管发育不良 | | 71 | 0.13 |
| 4 | 空肠远端恶性肿瘤 | | 72 | 滞留 |
| 5 | 空肠中段恶性肿瘤 | | 266 | 滞留 |
| 6 | 空回肠交界区恶性肿瘤 | | 73 | 滞留 |
| 7 | | — | 113 | 0.59 |
| | 空回肠交界区多发血管发育不良 | | | |
| 8 | 空肠上段血管瘤 | | 82 | 0.20 |
| 9 | 空肠上段血管瘤 | | 42 | 0.03 |
| 10 | | — | 281 | 0.65 |
| | 空回肠交界区克罗恩病 | | | |
| 11 | | 回肠远端克罗恩病 | 224 | 0.80 |
| 12 | 空肠上段血管发育不良 | | 118 | 0.06 |
| 13 | — | | 120 | 0.35 |
| | | — | | |
| 14 | — | | 10 | 0.01 |
| | | — | | |
| 15 | — | | 73 | 0.31 |
| | | — | | |

¹时间指数 = 胶囊内镜从幽门至病灶的通过时间/从幽门至回盲瓣的通过时间.

病灶并明确诊断, 3例换从肛侧进镜检查后仍未检出病灶; 3例胶囊内镜滞留于病灶者(至检查结束时胶囊内镜仍停留于病灶处, 3-5 d后自行排出体外; 全消化道钡餐和CT检查未发现病灶)选择经口进镜检查后均检出病灶(均为恶性肿瘤); 4例时间指数超过0.50者(分别为0.99, 0.8, 0.65和0.59)首选经肛进镜检查, 其中前二者(时间指数为0.99和0.8)小肠镜到达病灶部位并明确诊断; 后二者(时间指数为0.65和0.59)未发现异常, 换从口侧进镜检查后检出病灶, 如以时间指数>0.75(结合文献报道)为标准, 该2例不再需要改换方式再行检查. 胶囊内镜和双气囊小肠镜检查平均间隔时间为12.9 (2-50) d, 后者平均检查时间79 (65-105) min(表1). 胶囊内镜检查者未出现任何不适反应. 20例患者行30次双气囊小肠镜检查后, 70.0% (21/30)出现头晕、咽喉轻微疼痛、腹胀气、轻微腹痛、恶心或呕吐等不适反应, 均自行缓解, 未出现出血、穿孔、胰腺炎、感染等操作相关并发症.

3 讨论

作为一种非损伤性检查方法, 胶囊内镜的应用

使全小肠检查成为可能^[17-26], 且多项研究结果表明, 胶囊内镜检查可作为怀疑小肠疾病, 尤其是不明原因消化道出血的首选检查方法; 而同样作为小肠疾病诊治的有效方法, 双气囊小肠镜具有活检功能、随意控制移动方向、注气、冲洗和治疗等多项胶囊内镜所缺乏的特点, 可作为胶囊内镜检查后很好的补充检测手段^[14-16]. 双气囊小肠镜经口进镜可到达回肠中段, 经肛进镜可到达回盲瓣上方100-150 cm, 通过二种方式的结合亦可完成全小肠检查^[1,27]. 因此对胶囊内镜检查未检出病变, 尤其是发现可疑病变者再行双气囊小肠镜检查将成为小肠疾病的首选诊治策略. 由于双气囊小肠镜检查大多需静脉麻醉下进行, 操作时间较长, 需二位医师配合进行, 有一定的不良反应发生率, 少数还可发生穿孔等并发症^[28], 且患者依从性远低于胶囊内镜检查, 部分初次检查未明确病因者可能因费用增加或担心不良反应等而不愿再接受第2次小肠镜检查, 因此对怀疑小肠疾病者, 提高初次检查成功率无疑具有重要的临床意义. 双气囊小肠镜首次检查时, 二种进镜方式的选择取决于对病变部位的预先判断. 根据上述小肠疾病诊治

策略, 胶囊内镜下判断小肠病变部位的准确性, 从而可能成为双气囊小肠镜检查方式选择的重要影响因素, 同时也利于术前定位和进一步随访的解剖定位。

胶囊内镜检查过程中, 根据二维轨迹图可初步判断胶囊内镜到达病灶的可能部位, 但准确性并不理想, 仅能作为参考^[29]。本研究中, 在胶囊内镜怀疑小肠病变者中, 80.0% (12/15)经双气囊小肠镜找到病灶并明确诊断。虽然大部分病变通过经口方式检查即可检出, 还是有2例需经肛方式检查获得诊断。与经口进镜比较, 由于可能出现结肠襻曲而使经肛进镜操作难度更大, 插入距离相对较短, 因此更有必要选择合适的初次检查方式。胶囊内镜到达病灶的通过时间受胃排空时间和小肠转运速度等多种因素影响, 如根据胶囊内镜从口腔至病灶的通过时间, 3例最长者中1例病变位于空肠中段, 需经口进镜检查, 因此准确性不够高。Gay *et al*^[16]研究发现, 根据胶囊内镜检查结果除可筛选双气囊小肠镜检查指征外, 胶囊内镜时间指数>0.75可作为双气囊小肠镜经肛方式检查的可靠选择依据。本研究中, 根据时间指数>0.50, 4例患者首选经肛小肠镜检查, 准确性仅50.0% (2/4); 而采用上述时间指数>0.75的标准, 准确性即达到100%。由于先后行胶囊内镜和双气囊小肠镜检查者数量有限, 该标准还有待更大样本的研究证实。

总之, 本研究结果初步表明, 胶囊内镜检查结果可指导对双气囊小肠镜进镜方式的选择, 从而减少盲目检查所带来的诸多不良后果。时间指数>0.75提示病变位于回肠远端, 提示首选经肛进镜检查; 反之则首选经口进镜检查。

4 参考文献

- 1 Yamamoto H, Yano T, Kita H, Sunada K, Ido K, Sugano K. New system of double-balloon enteroscopy for diagnosis and treatment of small intestinal disorders. *Gastroenterology* 2003; 125: 1556
- 2 Di Caro S, May A, Heine DG, Fini L, Landi B, Petruzzello L, Cellier C, Mulder CJ, Costamagna G, Ell C, Gasbarrini A. The European experience with double-balloon enteroscopy: indications, methodology, safety, and clinical impact. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 545-550
- 3 Ell C, May A, Nachbar L, Cellier C, Landi B, di Caro S, Gasbarrini A. Push-and-pull enteroscopy in the small bowel using the double-balloon technique: results of a prospective European multicenter study. *Endoscopy* 2005; 37: 613-616
- 4 Yamamoto H, Kita H. Enteroscopy. *J Gastroenterol* 2005; 40: 555-562
- 5 May A, Nachbar L, Ell C. Double-balloon enteroscopy (push-and-pull enteroscopy) of the small bowel: feasibility and diagnostic and therapeutic yield in patients with suspected small bowel disease. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 62-70
- 6 Su MY, Liu NJ, Hsu CM, Chiu CT, Chen PC, Lin CJ. Double balloon enteroscopy-the last blind-point of the gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 1041-1045
- 7 Sunada K, Yamamoto H, Kita H, Yano T, Sato H, Hayashi Y, Miyata T, Sekine Y, Kuno A, Iwamoto M, Ohnishi H, Ido K, Sugano K. Clinical outcomes of enteroscopy using the double-balloon method for strictures of the small intestine. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1087-1089
- 8 May A, Nachbar L, Schneider M, Neumann M, Ell C. Push-and-pull enteroscopy using the double-balloon technique: method of assessing depth of insertion and training of the enteroscopy technique using the Erlangen Endo-Trainer. *Endoscopy* 2005; 37: 66-70
- 9 Matsumoto T, Esaki M, Moriyama T, Nakamura S, Iida M. Comparison of capsule endoscopy and enteroscopy with the double-balloon method in patients with obscure bleeding and polyposis. *Endoscopy* 2005; 37: 827-832
- 10 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
- 11 Matsumoto T, Moriyama T, Esaki M, Nakamura S, Iida M. Performance of antegrade double-balloon enteroscopy: comparison with push enteroscopy. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 392-398
- 12 Ge ZZ, Hu YB, Xiao SD. Capsule endoscopy and push enteroscopy in the diagnosis of obscure gastrointestinal bleeding. *Chin Med J (Engl)* 2004; 117: 1045-1049
- 13 Friedman S. Comparison of capsule endoscopy to other modalities in small bowel. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2004; 14: 51-60
- 14 Hadithi M, Heine GD, Jacobs MA, van Bodegraven AA, Mulder CJ. A prospective study comparing video capsule endoscopy with double-balloon enteroscopy in patients with obscure gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 52-57
- 15 Nakamura M, Niwa Y, Ohmiya N, Miyahara R, Ohashi A, Itoh A, Hirooka Y, Goto H. Preliminary comparison of capsule endoscopy and double-balloon enteroscopy in patients with suspected small-bowel bleeding. *Endoscopy* 2006; 38: 59-66
- 16 Gay G, Delvaux M, Fassler I. Outcome of capsule endoscopy in determining indication and route for push-and-pull enteroscopy. *Endoscopy* 2006; 38: 49-58
- 17 Iddan G, Meron G, Glukhovskiy A, Swain P. Wireless capsule endoscopy. *Nature* 2000; 405: 417
- 18 Carlo JT, DeMarco D, Smith BA, Livingston S, Wiser K, Kuhn JA, Lamont JP. The utility of capsule endoscopy and its role for diagnosing pathology in the gastrointestinal tract. *Am J Surg* 2005; 190: 886-890
- 19 Carey EJ, Fleischer DE. Investigation of the small bowel in gastrointestinal bleeding-enteroscopy and capsule endoscopy. *Gastroenterol Clin North Am* 2005; 34: 719-734
- 20 Pennazio M. Diagnosis of small-bowel diseases in the era of capsule endoscopy. *Expert Rev Med*

■同行评价

本文文章设计合理, 研究方法得当, 资料详实可靠, 有较高临床工作指导价值。

- Devices* 2005; 2: 587-598
- 21 Bhuket T, Takami M, Fisher L. The use of wireless capsule endoscopy in clinical diagnostic gastroenterology. *Expert Rev Med Devices* 2005; 2: 259-266
- 22 Triester SL, Leighton JA, Leontiadis GI, Fleischer DE, Hara AK, Heigh RI, Shiff AD, Sharma VK. A meta-analysis of the yield of capsule endoscopy compared to other diagnostic modalities in patients with obscure gastrointestinal bleeding. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 2407-2418
- 23 Fireman Z, Paz D, Kopelman Y. Capsule endoscopy: improving transit time and image view. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5863-5866
- 24 Viazis N, Papaxoinis K, Theodoropoulos I, Sgouros S, Vlachogiannakos J, Pipis P, Markoglou C, Avgerinos A. Impact of capsule endoscopy in obscure small-bowel bleeding: defining strict diagnostic criteria for a favorable outcome. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 717-722
- 25 Rondonotti E, Herrerias JM, Pennazio M, Caunedo A, Mascarenhas-Saraiva M, de Franchis R. Complications, limitations, and failures of capsule endoscopy: a review of 733 cases. *Gastrointest Endosc* 2005; 62: 712-716; quiz 752, 754
- 26 Lewis BS, Eisen GM, Friedman S. A pooled analysis to evaluate results of capsule endoscopy trials. *Endoscopy* 2005; 37: 960-965
- 27 Yamamoto H, Sekine Y, Sato Y, Higashizawa T, Miyata T, Iino S, Ido K, Sugano K. Total enteroscopy with a nonsurgical steerable double-balloon method. *Gastrointest Endosc* 2001; 53: 216-220
- 28 Yamamoto H, Kita H, Sunada K, Hayashi Y, Sato H, Yano T, Iwamoto M, Sekine Y, Miyata T, Kuno A, Ajibe H, Ido K, Sugano K. Clinical outcomes of double-balloon endoscopy for the diagnosis and treatment of small-intestinal diseases. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2: 1010-1016
- 29 Delvaux M, Gerard Gay. Capsule endoscopy in 2005: facts and perspectives. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2006; 20: 23-39

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会

本刊讯 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会将于2006年秋季在重庆将行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文及摘要800字(附软盘), 2006-07-15截稿。

2 联系方式

重庆市第三军医大学西南医院消化科赵晶京收(邮编: 400038); E-mail: zhaojingjing-1@sina.com.

乙型肝炎病毒家族聚集性感染者的基因型和基因变异特征分析

刘成永, 高玉金, 侯远沛, 杨友国, 钱秀梅, 孙庆, 宋丽

刘成永, 侯远沛, 钱秀梅, 孙庆, 宋丽, 江苏省徐州市传染病医院检验科 江苏省徐州市 221004

高玉金, 杨友国, 江苏省徐州市传染病医院肝病科 江苏省徐州市 221004

通讯作者: 刘成永, 221004, 江苏省徐州市, 传染病医院检验科. liucy0913@126.com

电话: 0516-83668716 传真: 0516-83668717

收稿日期: 2006-04-15 接受日期: 2006-05-29

Analysis of hepatitis B virus genotypes and gene mutation in patients with family infection

Cheng-Yong Liu, Yu-Jin Gao, Yuan-Pei Hou, You-Guo Yang, Xiu-Mei Qian, Qing Sun, Li Song

Cheng-Yong Liu, Yuan-Pei Hou, Xiu-Mei Qian, Qing Sun, Li Song, Clinical Laboratory of Xuzhou Infectious Disease Hospital, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China
Yu-Jin Gao, You-Guo Yang, Department of Hepatology, Xuzhou Infectious Disease Hospital, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Cheng-Yong Liu, Clinical Laboratory of Xuzhou Infectious Disease Hospital, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China. liucy0913@126.com

Received: 2006-04-15 Accepted: 2006-05-29

Abstract

AIM: To investigate the genotypes and gene mutation of hepatitis B virus (HBV) in family infection.

METHODS: Eighty-four members from 27 families, whose internal genotypes were completely the same, were selected, including 29 cases of asymptomatic HBV carriers (ASC), 23 cases of chronic active hepatitis (CAH), 21 cases of liver cirrhosis (LC) and 11 cases of hepatocellular carcinoma (HCC). Gene chip technique was applied to detect the mutation in HBV pre-core region (nt1896), and basic core promoter (BCP, nt1762, nt1764) and DNA sequencing technique was used to detect the genotypes of HBV. The control group of corresponding genotypes was also designed.

RESULTS: The rate of ASC with genotype B

family infection was significantly higher than that with genotype C infection ($\chi^2 = 5.0734$, $P = 0.0243$, $P < 0.05$), but the rate of BCP1762 and 1764 double mutation was significantly lower than that with genotype C ($\chi^2 = 22.4000$, $P = 0.0000$, $P < 0.001$). The clinical types of patients with genotype B and C family infection were not significantly different from those of the corresponding controls.

CONCLUSION: It is helpful to detect the genotypes and BCP1762, 1764 double mutation of HBV in family infection in the predictive analysis of the disease.

Key Words: Hepatitis B virus; Genotype; Mutation; Family infection

Liu CY, Gao YJ, Hou YP, Yang YG, Qian XM, Sun Q, Song L. Analysis of hepatitis B virus genotypes and gene mutation in patients with family infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1833-1835

摘要

目的: 研究HBV家族聚集性感染者的基因型和基因变异特征。

方法: 选择HBV聚集性感染家族成员内部基因型完全相同的共27个家族84人, 其中HBV携带者(ASC)29例; 慢性活动性肝炎(CAH)23例; 肝硬化(LC)21例; 肝细胞癌(HCC)11例; 用基因芯片法检验前C1896和BCP1762, 1764双突变; 用测序法检验HBV基因型, 并设相应基因型的HBV感染对照组。

结果: B型HBV家族聚集感染者ASC率显著大于C型家族($\chi^2 = 5.0734$, $P = 0.0243$, $P < 0.05$); 其BCP1762, 1764双突变的发生率也显著低于C基因型($\chi^2 = 22.4000$, $P = 0.0000$, $P < 0.001$)。两种基因型的家族聚集感染者组与相应的对照组相比在疾病临床类型方面均无显著差异。

结论: 检验HBV家族聚集感染者的基因型和/或BCP区1762、1764基因的双突变可以协助

■背景资料

乙型肝炎病毒基因型是S区基因长期的点突变累积而成的, 并根据其S基因序列的同源性, 分为A、B、C、D、E、F等基因型, 乙型肝炎病毒基因型的分布有独特的地理特征。HBV引起肝损伤的过程受宿主、病毒等多个因素影响。由于病毒基因控制着抗原的表达, 不同毒株出现某些变异的频率不同, 对机体的免疫清除能力也不同。已有许多作者研究证实HBV基因型以及C、P、X读码框架区内其他位点的变异对乙型肝炎病毒感染后的自然病史、疾病的严重程度、抗病毒药物的敏感程度、病毒标志物的血清学转换以及疾病的预后等都有一定的影响。

■研发前沿

对于乙型肝炎病毒基因型、各种位点变异检测方法的研究是个重点,因为只有方法的更先进、更敏感、更易于操作才能够以多方位、大样本量的数据进一步阐明其意义。对于乙肝病毒基因型和部分位点变异与乙型肝炎病毒感染后的自然病史、疾病的严重程度、抗病毒药物的敏感程度、病毒标志物的血清学转换以及疾病预后的关系等等,是目前的研究热点,已经有大量的研究报告。

■创新盘点

与其他研究相比较,本文注重于研究HBV家族聚集性感染的基因型和部分重要位点的变异特征,以此方面探讨家族聚集感染者的发病规律和病后转归以及不同临床表现及发生机制,其他的文章未见报道。

疾病的预测分析。

关键词: 乙型肝炎病毒; 基因型; 变异; 家族聚集感染

刘成永, 高玉金, 侯远沛, 杨友国, 钱秀梅, 孙庆, 宋丽. 乙型肝炎病毒家族聚集性感染者的基因型和基因变异特征分析. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1833-1835

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1833.asp>

0 引言

HBV引起肝损伤的过程受宿主、病毒等多个因素影响。由于病毒基因控制着抗原的表达,不同毒株出现某些变异的频率不同,对机体的免疫清除能力也不同。已有许多作者研究证实HBV基因型以及C, P, X读码框架区内其他位点的变异对乙型肝炎病毒(HBV)感染后的自然病史、疾病的严重程度^[1]、抗病毒药物的敏感程度^[2-3]、病毒标志物的血清学转换^[4]以及疾病的预后等都有一定的影响^[5],被证实是病毒与宿主相互作用的重要影响因素。我们用这些成果来研究HBV家族聚集性感染,期望能够解释一些家族聚集性感染的不同临床表现及发生机制如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选择具有家族聚集感染特征家族30个,所谓家族聚集性乙型肝炎,是指乙肝患者的父亲或母亲以及同胞中有2个以上感染了HBV,并包括家庭内水平传播和垂直传播,且HBV DNA结果 $\geq 1.00 \times 10^7$ copies/L,去除基因型或基因变异检测失败的病例,共94例,其中HBV携带者(ASC) 30例;慢性活动性肝炎(CAH) 27例;肝硬化(LC) 29例;肝细胞癌(HCC) 8例;所选病例无急性肝炎,故不列表分析。选择无明显家族聚集性的B和C型HBV感染者各50例做对照分析,其诊断均符合2000年第10次全国传染病与寄生虫病学会和肝病学会联合修订的病毒性肝炎防治方案^[6]。取新鲜或-20℃冰冻贮存血清。

1.2 方法

HBV DNA定量检查用Roche Lightcycler荧光定量扩增仪,试剂由深圳匹基公司提供,结果 $\geq 1.00 \times 10^7$ copies/L为阳性;HBV基因分型方法用测序的方法,分析步骤:(1)抽提核酸,取血清标本50 μ L,加入50 μ L核酸提取液,振荡10 s,99℃干浴或水浴10 min,13 000 r/min离心10 min,保留上清备用;(2)PCR扩增,以上述抽提的核酸为模板,分别加入引物B61, B62和PCR mix反应液进行扩增;(3)测序, B61作为测

表 1 B型和C型家族84人临床类型分析n (%)

| 类别 | n | ASC(n: 29) | CAH(n: 23) | LC(n: 21) | HCC(n: 11) |
|------|----|------------|------------|-----------|------------|
| B型家族 | 21 | 12(57.1) | 5(23.8) | 3(14.3) | 1(4.8) |
| C型家族 | 63 | 17(27.0) | 18(28.6) | 18(28.6) | 10(15.9) |
| B型对照 | 50 | 24(48.0) | 11(22.0) | 9(18.0) | 6(12.0) |
| C型对照 | 50 | 7(16.0) | 12(24.0) | 22(44.0) | 9(18.0) |

表 2 前C区1896和BCP1762, 1764双突变状况n (%)

| 类别 | n | 前C区1896 | 1762和1764双突变 |
|------|----|-----------|--------------|
| B型家族 | 21 | 12 (57.1) | 4 (19.0) |
| C型家族 | 63 | 42 (66.7) | 50 (79.4) |
| B型对照 | 50 | 32 (64.0) | 13 (26.0) |
| C型对照 | 50 | 33 (66.0) | 38 (76.0) |

序引物,用测序仪Mgeabace-500进行测序;(4)分析,测序分析软件为Chromas,序列比对软件为Clustalx,由上海之江生物科技有限公司协助完成。HBV基因变异的检测用基因芯片的方法,HBV基因多态性分析芯片由宁波瑞芯生物科技有限公司提供。

统计学处理 用PEMS 3.1软件统计分析。

2 结果

家族成员内部基因型完全相同的共27个家族84人;其中B型和C型(表1)分别为21人和63人(25.0%和75.0%),其余3个家族均检出不同基因型。B型家族ASC率大于C型家族($\chi^2 = 5.0734$, $P = 0.0243$, $P < 0.05$);B型家族LC率和CAH率均小于C型家族($\chi^2 = 1.0370$ 和 0.0200 , $P = 0.3085$ 和 0.8877 ; $P > 0.05$)。B型家族与B型对照组相比,其ASC, CAH, LC率均无显著性差异($\chi^2 = 0.1964$, 0.0209 和 0.0021 , $P = 0.6576$, 0.8850 和 0.9727 , P 值均 > 0.05)。C型家族ASC率和CAH率均大于C型对照组($\chi^2 = 2.0868$ 和 0.1103 , $P = 0.1486$ 和 0.7398 , $P > 0.05$);LC率小于对照组($\chi^2 = 2.2663$, $P = 0.1322$, $P > 0.05$)。B型对照ASC率大于C对照组($\chi^2 = 11.9682$, $P = 0.0005$, $P < 0.001$),差异显著;而LC率小于对照组($\chi^2 = 6.7321$, $P = 0.0095$, $P > 0.05$)。

1762和1764双突变两种基因型家族与对照组相比均无显著差异($\chi^2 = 0.1036$ 和 0.0400 , $P = 0.7476$ 和 0.8416 , P 值均 > 0.05)。而两种家族之间和两组对照之间相比差异显著($\chi^2 = 22.4000$ 和 23.0492 , $P = 0.0000$ 和 0.0000 , $P < 0.001$, 表2)。前C区1896变异率各组相近。

3 讨论

乙型肝炎病毒基因型是S区基因长期的点突变累积而成的, 并根据其S基因序列的同源性, 分为A、B、C、D、E、F等基因型, 许多研究表明, 基因型对乙型肝炎病毒感染后的自然病史、疾病的严重程度、抗病毒药物的敏感程度、病毒标志物的血清学转换以及疾病的预后等都有一定的影响^[8]; 乙型肝炎病毒基因型的分布也有独特的地理特征^[7], 我国大部分地区以B和C型为主, 例如作者所处徐州地区主要为B、C型, 且有部分D型和由B、C、D组成的混合型^[9]. 目前认为, 不同地区的优势基因型反映了HBV自然史发生的变异特点, 是病毒变异后进化的结果. 根据HBV基因型和一些重要位点变异的不同, 许多作者进行了对乙型肝炎的诊断和治疗的个性化的论述^[10]. 本文对HBV家族聚集感染的基因型特征以及部分重要位点的基因变异特征^[13-14]进行研究, 发现在30个家族中有27个家族的HBV基因型是相同的, 说明了家族聚集感染的特征途径, 从其中84个成员的基因型检测结果来看, B型者25%, 而C型者75%, 与本地域的报道相近, 但可能因病例的选择问题, 未检出其他型. B型家族聚集感染者ASC率显著大于C型家族, 较严重的肝脏损害低于C型者, B和C型对照组情况也类似, 这与两种基因型的致病特征有关, B基因型与C型相比更倾向于温和的感染^[11], 其BCP1762, 1764双突变的发生率也显著低于C基因型, C基因型更易于向严重方向发展, 而双突变发生后复制能力增强, HBeAg表达减少, HBeAg和HBcAg有共同的表位^[12], 后者在体内更易诱发强烈的免疫反应, 加重肝脏损害^[15]. 因此基因型C和BCP1762, 1764双突变相辅相成, 加重肝脏损害.

两种基因型的家族聚集感染者组与相应的对照组相比在疾病临床类型方面均无显著差异, 以C型家族聚集感染者与对照组相比, 虽然其ASC率高于和HLC率低于对照组, 但并不能说明家族聚集感染HBV能有更稳定的感染状态和更不易于肝损害严重化. 这从BCP1762, 1764双突变的发生率来看, 也只有基因型的差异, 而无聚集感染与否的差异.

总之, 家族性聚集感染和非家族性聚集感染临床类型差异不大, B基因型HBV家族聚集感染者发病情况和肝损害程度显著低于C型者, 因此对于HBV家族聚集感染者, 检查基因型和/或BCP区1762, 1764基因的双突变可以协助疾病的预测分析.

4 参考文献

- 1 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: 11-13
- 2 许正锯, 杨红, 张启华, 陈先礼, 李树清, 王崇国. 乙型肝炎病毒基因型与拉米夫定疗效关系的研究. 临床肝胆病杂志 2005; 21: 157-158
- 3 周建良, 吴诗品. 拉米夫定治疗乙型肝炎病毒B、C基因型疗效比较. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 489-490
- 4 徐蓓, 姚光弼, 程新建, 朱玫. 乙型肝炎病毒基因型对拉米夫定长期疗效影响的评估. 肝脏 2005; 10: 76-78
- 5 侯金林, 曾国兵. 乙型肝炎病毒基因型流行病学与临床. 中华内科杂志 2005; 44: 707-708
- 6 中华医学会传染病与寄生虫病学分会和肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案(2000年西安). 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 7 Hou J, Liu Z, Gu F. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Int J Med Sci* 2005; 2: 50-57
- 8 李卓, 李洪权, 李俊红, 刘英, 刘芳, 勾春燕, 高冀容, 单晶, 郭新会, 殷继明, 刘道洁, 谢贤春, 李辉. 北京地区乙型肝炎病毒基因型与其感染临床表型的相关性. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2823-2827
- 9 刘成永, 杨友国, 梅存金, 钱秀梅, 宋丽, 孙庆. 徐州地区乙型肝炎病毒基因型分布及其意义. 中华微生物学和免疫学杂志 2004; 24: 432
- 10 许红梅, 任红. 乙型肝炎病毒基因型的分子生物学及临床意义. 国外医学·流行病学与传染病学分册 2003; 30: 20-22
- 11 魏来. 乙型肝炎病毒的基因型: 研究的进展, 临床的方向. 中华医学杂志 2005; 85: 1160-1162
- 12 房继莲, 丛旭, 李若冰, 许军, Sablon E, 孙焱, 王豪, 王宇, 魏来. 乙型肝炎病毒基本核心启动子及前C区突变对疾病进展的影响. 中国实用内科杂志 2005; 25: 233-235
- 13 Fang ZL, Yang J, Ge X, Zhuang H, Gong J, Li R, Ling R, Harrison TJ. Core promoter mutations (A(1762)T and G(1764)A) and viral genotype in chronic hepatitis B and hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *J Med Virol* 2002; 68: 33-40
- 14 Yotsuyanagi H, Hino K, Tomita E, Toyoda J, Yasuda K, Iino S. Precore and core promoter mutations, hepatitis B virus DNA levels and progressive liver injury in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2002; 37: 355-363
- 15 Nishizono A, Kohno K, Takita-Sonoda Y, Hiraga M, Terao H, Fujioka T, Nasu M, Mifune K. Sequential analyses of the mutations in the core upstream and precore regions of hepatitis B virus genome in anti-HBe positive-carriers developing acute exacerbation. *J Med Virol* 1997; 53: 266-272

■应用要点

本研究发现家族性聚集感染和非家族性聚集感染临床类型差异不大, B基因型HBV家族聚集感染者发病情况和肝损害程度显著低于C型者, 因此对于HBV家族聚集感染者, 检查基因型和/或BCP区1762, 1764基因的双突变可以协助疾病的预测分析.

■同行评价

本文提出了乙型肝炎家族聚集倾向, 分析有科学性.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

丙型肝炎肝硬化CD56⁺T细胞和NK细胞数量及抗肿瘤活性

范荣山, 于德军, 孙德荣

■背景资料

通过流行病学调查研究, 慢性丙型肝炎发展为肝硬化和肝癌的比例较高, 其确切机制目前还不清楚。肝脏局部的免疫环境在肝癌的发生、发展中的作用越来越受到人们的重视。肝脏中分布着大量天然和获得性的T细胞、NK细胞和CD56⁺T细胞(NKT), NKT同时表达T细胞受体 and NK细胞受体, 是抗肿瘤早期起作用的效应细胞, 其重要性受到广泛的关注。

■相关报道

Kawarabayashi *et al* 研究了手术得到的标本, 分析了肝癌和非肝癌患者肝脏中NK和NKT细胞数量及抗肿瘤活性; Ogasawara *et al* 认为IFN- γ 是NK及NKT发挥抗肿瘤作用的重要的细胞因子。

范荣山, 孙德荣, 大庆市第二医院内科 黑龙江省大庆市 163461

于德军, 大庆市第二医院检验科 黑龙江省大庆市 163461

通讯作者: 范荣山, 163461, 黑龙江省大庆市红岗区解放一街, 大庆市第二医院内科. rsfan519@163.com

电话: 0459-5202419

收稿日期: 2005-07-11 接受日期: 2005-08-11

Numbers and activities of CD56⁺ T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C

Rong-Shan Fan, De-Jun Yu, De-Rong Sun

Rong-Shan Fan, De-Rong Sun, Department of Internal Medicine, the Second Hospital of Daqing City, Daqing 163461, Heilongjiang Province, China

De-Jun Yu, Department of Laboratory, the Second Hospital of Daqing City, Daqing 163461, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Rong-Shan Fan, Department of Internal Medicine, the Second Hospital of Daqing City, Daqing 163461, Heilongjiang Province, China. rsfan519@163.com
Received: 2005-07-11 Accepted: 2005-08-11

Abstract

AIM: To study the numbers and anti-tumor activities of CD56⁺ T cells and natural killer (NK) cells in cirrhotic liver with hepatitis C (HC).

METHODS: Hepatic mononuclear cells (MNC) were isolated from liver specimens obtained from the patients ($n = 16$) with HC-induced cirrhosis by liver biopsy. In addition, the numbers of CD56⁺ T cells and natural killer cells were determined by flow cytometry. Liver MNC and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were co-cultured with the interleukin-2 (IL-2), respectively, and the production of interferon- γ (IFN- γ) and the antitumor activity were measured.

RESULTS: The percentages of CD56⁺ T cells among hepatic MNC in health individuals, HC and HC-induced cirrhosis patients were 20.4% \pm 6.2%, 11.2% \pm 3.1% and 5.0% \pm 1.6%, respectively; the proportions of NK cells among liver MNC in the three groups were 31.1% \pm 9.7%, 31.6% \pm 8.3% and 18.3% \pm 5.4%, respectively; the

productions of IFN- γ in the three groups were 7.4 \pm 2.4, 3.2 \pm 1.8 and 1.9 \pm 0.5 μ g/L, respectively; the anti-tumor activities hepatic MNC in the three groups were 61.1% \pm 17.1%, 59.2% \pm 14.6%, and 26.7% \pm 8.5%, respectively. For the above four groups of parameters, the changes in HC-induced cirrhosis patients was the most significant ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The numbers and anti-tumor activities of CD56⁺T cells and NK cells are decreased in cirrhotic livers with HC.

Key Words: Hepatitis C; Liver cirrhosis; CD56⁺ T cell; Natural killer cell; Cell number; Activity

Fan RS, Yu DJ, Sun DR. Numbers and activities of CD56⁺ T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1836-1838

摘要

目的: 研究CD56⁺T细胞和NK细胞在丙型肝炎肝硬化时的数量及抗肿瘤细胞活性变化。

方法: 丙型肝炎肝硬化患者18例, 快速肝穿获得肝组织, 分离肝脏单个核细胞(MNC), 流式细胞仪分析CD56⁺T细胞及NK细胞数量, 肝脏MNC和外周血单个核细胞(PBMC)分别与IL-2混合培养, 检测IFN- γ 含量及抗肿瘤细胞活性。

结果: 健康志愿者、慢性丙型肝炎患者、丙型肝炎肝硬化患者肝脏MNC中CD56⁺T细胞数量百分比分别是20.4% \pm 6.2%, 11.2% \pm 3.1%和5.0% \pm 1.6%; NK细胞比例分别是31.1% \pm 9.7%, 31.6% \pm 8.3%和18.3% \pm 5.4%; 肝脏MNC的IFN- γ 产量分别是7.4 \pm 2.4, 3.2 \pm 1.8和1.9 \pm 0.5 μ g/L; 抗肿瘤细胞的细胞毒性分别是61.1% \pm 17.1%, 59.2% \pm 14.6%, 26.7% \pm 8.5%。以上四组数据均以肝炎肝硬化患者变化最为显著($P < 0.05$)。

结论: 丙型肝炎肝硬化时肝脏CD56⁺T细胞和NK细胞数量及抗肿瘤细胞活性分别下降。

关键词: 丙型肝炎; 肝硬化; CD56⁺T细胞; NK细胞;

细胞数量; 细胞活性

范荣山, 于德军, 孙德荣. 丙型肝炎肝硬化CD56⁺T细胞和NK细胞数量及抗肿瘤活性. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1836-1838
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1836.asp>

0 引言

丙型肝炎多无症状, 据日本和美国对输血后丙型肝炎患者随访10-29 a, 发现35.1%-51%的患者发展为肝硬化, 10.6%-23.4%发展为肝癌, 死于肝病的占15.3%^[1]. CD56⁺T细胞和NK细胞在丙型肝炎肝细胞受损伤机制中有重要作用^[2-3], CD56⁺T细胞和NK细胞在丙型肝炎肝硬化时的免疫监视作用还不清楚.

1 材料和方法

1.1 材料 1组健康志愿者12例; 2组病毒性肝炎丙型肝炎慢性患者16例; 3组丙型肝炎肝硬化患者18例. 诊断标准: 2000-09中华医学会传染与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订的病毒性肝炎防治方案. 并排除HAV、HBV、HDV、HEV等病毒感染, 无自身免疫性肝炎, 无饮酒及用过对肝脏有损伤性的药物史. 采用快速肝穿法, 获取肝组织; 通过静脉采集外周血. 用剪刀将肝组织标本剪成小碎块, 然后用胶原酶(0.5 g/L)和DNase (0.1 mg/L)在37℃ 20 min, 200目不锈钢网过滤, RPMI 1640细胞培养液悬浮, 洗涤3次, 以含100 kU/L肝素的330 g/L Percoll溶液悬浮, 离心2 000 r/min 15 min, 室温. 然后放在红细胞溶解液中, 50 mL/L FBS-RPMI冲洗2次, 得MNC, 用淋巴细胞分离液将外周血标本离心得PBMC.

1.2 方法 肝脏MNC或PBMC用FITC标记的抗NKR-P1抗体染色, PE标记的抗CD56抗体染色, 藻红蛋白-花青甘标记的抗 $\alpha\beta$ TCR抗体染色, 用流式细胞仪分析, 0.1 L (0.01 mg/L)抗CD3抗体在4℃平底96孔细胞培养板培养过夜使抗体化, 培养前冲洗3次. 肝脏MNC和PBMC放在含有100 mL/L血浆的RPMI 1640液0.2 mL, 与固定的抗CD3抗体在96孔细胞培养板共同培养, 50 mL/L CO₂, 37℃. 肝脏MNC加入IL-2 (20 mg/L), 48 h后, 收集上清液储存在-80℃以备ELISA检测, 肝脏MNC培养5 d后, 做细胞毒性试验. ELISA kit法检测MNC培养上清液内IFN- γ 水平, 按试剂盒说明书操作, 试剂盒由晶美生物工程有限公司提供. 对NK细胞敏感的YAC-1细胞为靶细胞, 放入含有100 mL/L FBS的RPMI 1640细胞培养液, 与3.7 MBq Na₂(⁵¹Cr)O₄

共孵育60 min, 37℃, 肝脏MNC和PBMC为效应细胞, E/T = 10:1, 孵育4 h后离心, 收集上清, Gamma计数器计数, 自然释放率<15%.

统计学处理 两组数据分析用 t 检验, 3组数据分析用方差分析.

2 结果

2.1 肝脏MNC中CD56⁺T和NK细胞 (1)肝脏MNC中的CD56⁺T细胞的比例在每组中依次是: 1组20.4% \pm 6.2%, 2组11.2% \pm 3.1%, 3组5.0% \pm 1.6% ($P<0.05$). (2)肝脏MNC中的NK细胞的比例在每组依次是: 1组31.1% \pm 9.7%, 2组31.6% \pm 8.3%, 3组18.3% \pm 5.4% ($P<0.05$). 丙型肝炎肝硬化时下降明显, 相反, CD56⁺T细胞不下降. PBMC中这些细胞成分在每组无显著性差异.

2.2 肝脏MNC在IL-2刺激下产生IFN- γ 肝脏MNC在IL-2刺激下产生IFN- γ 量依次是: 1组7.4 \pm 2.4 μ g/L, 2组3.2 \pm 1.8 μ g/L, 3组1.9 \pm 0.5 μ g/L ($P<0.05$). PBMC在IL-2刺激下产生IFN- γ 量各组无显著差异.

2.3 肝脏MNC在IL-2刺激下抗肿瘤细胞毒性 在IL-2刺激下肝脏MNC对肿瘤细胞YAC-1细胞的细胞毒性依次是: 1组61.1% \pm 17.1%, 2组59.2% \pm 14.6%, 3组26.7% \pm 8.5% ($P<0.05$). PBMC在IL-2刺激下产生的抗肿瘤细胞毒性, 各组无显著差异.

3 讨论

本项研究证明, 肝脏MNC具有产生IFN- γ 的潜在能力, 也具有抗肿瘤细胞毒性, 肝脏MNC比PBMC有更强的产生IFN- γ 和抗肿瘤细胞毒性. 更重要的是肝脏MNC中的CD56⁺T和NK细胞数量在肝炎和肝硬化时逐步下降, 与此相一致的是肝脏MNC产生IFN- γ 量也逐渐减少, 肝脏MNC对肿瘤细胞毒性也逐步下降. 以往研究证实, CCl₄诱导的实验性肝硬化小鼠肝脏NKT细胞数量比正常减少, 肝脏MNC抗小鼠HCC细胞株的细胞毒性也降低^[4]. 肝脏MNC紧密地黏附在肝脏实质细胞, 提示肝细胞对NKT细胞有基质样细胞作用^[5]. 肝细胞能够表达IL-7 mRNA, IL-7是影响NKT发育的重要细胞因子^[6]. 成年鼠肝脏中含有多源祖细胞, 可以分化成各种淋巴细胞^[7], 人和鼠肝脏NKT和NK来自骨髓或肝脏, 肝硬化抑制了这些细胞的增殖^[8-10].

IFN- γ 在抗肿瘤免疫中有重要作用^[11-12], 事实上IFN- γ 受体缺失变异小鼠容易受到病毒感

■创新盘点

本文研究了丙型肝炎、肝硬化患者肝活检组织中的NK和NKT数量和活性, 从不同的角度证明NK和NKT在丙型肝炎肝硬化时数量减少及活性下降减弱了肝脏局部抗肿瘤免疫功能.

■应用要点

改善肝脏局部的抗肿瘤免疫功能,可能成为预防肝炎肝硬化发生肝癌的有效措施。

染^[13-14]。虽然CD56⁺T、CD56⁻T和NK细胞在HCV抗原刺激时都产生IFN- γ 、IL-2和IL-12,但是在丙型肝炎及肝硬化时CD56⁺T细胞数量不减少^[15],所以IFN- γ 的减少可以认为是肝脏MNC中的CD56⁺T和NK细胞减少引起的。

最近有报道小鼠肝脏CD56⁺T和NK细胞在体外可以被IL-2或IL-12激活,产生IFN- γ ,具有潜在的抗肿瘤活性,抑制肿瘤转移和生成^[16-17]。人PBMC中CD56⁺T和NK细胞被IL-2或IL-12活化,也可以获得抗肿瘤细胞活性^[18]。本研究进一步证明人肝脏CD56⁺T和NK细胞在体外产生IFN- γ ,并且对肿瘤细胞有杀伤性,有重要的抗肿瘤免疫作用,而在丙型肝炎肝硬化时CD56⁺T和NK细胞的抗肿瘤作用减弱,这可能是丙型肝炎肝硬化时易发生癌变的一个原因。

4 参考文献

- 王豪. 丙型肝炎的流行病学与预防. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 366-367
- 邱大鹏, 邱双健, 吴志全, 樊嘉, 叶胜龙, 余耀, 周俭, 蔡晓燕. NKT细胞在肝癌组织中的分布状况与肝癌局部免疫的研究. 中国临床医学 2004; 11: 567-569
- Kawachi Y, Watanabe H, Moroda T, Haga M, Iiai T, Hatakeyama K, Abo T. Self-reactive T cell clones in a restricted population of interleukin-2 receptor beta⁺ cells expressing intermediate levels of the T cell receptor in the liver and other immune organs. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2272-2278
- Kawachi Y, Arai K, Moroda T, Kawamura T, Umezumi H, Naito M, Ohtsuka K, Hasegawa K, Takahashi-Iwanaga H, Iwanaga T. Supportive cellular elements for hepatic T cell differentiation: T cells expressing intermediate levels of the T cell receptor are cytotoxic against syngeneic hepatoma, and are lost after hepatocyte damage. *Eur J Immunol* 1995; 25: 3452-3459
- Lombard C, McKallip RJ, Hylemon PB, Nagarkatti PS, Nagarkatti M. Fas Ligand-dependent and -independent mechanisms of toxicity induced by T cell lymphomas in lymphoid organs and in the liver. *Clin Immunol* 2003; 109: 144-153
- Miyaji C, Watanabe H, Osman Y, Kuwano Y, Abo T. A comparison of proliferative response to IL-7 and expression of IL-7 receptors in intermediate TCR cells of the liver, spleen, and thymus. *Cell Immunol* 1996; 169: 159-165
- Tavian M, Peault B. Embryonic development of the human hematopoietic system. *Int J Dev Biol* 2005; 49: 243-250
- Watanabe H, Miyaji C, Seki S, Abo T. c-kit⁺ stem cells and thymocyte precursors in the livers of adult mice. *J Exp Med* 1996; 184: 687-693
- Massa S, Balciunaite G, Ceredig R, Rolink AG. Critical role for c-kit (CD117) in T cell lineage commitment and early thymocyte development *in vitro*. *Eur J Immunol* 2006; 36: 526-532
- Shimizu T, Bannai M, Kawamura H, Yamamoto S, Oya H, Maruyama S, Minagawa M, Kawamura T, Watanabe H, Hatakeyama K, Abo T. Organ specificity of c-kit⁺ lymphoid precursors in the liver, thymus, and bone marrow. *Eur J Haematol* 2000; 64: 416-425
- Banerjee D, Liou HC, Sen R. c-Rel-dependent priming of naive T cells by inflammatory cytokines. *Immunity* 2005; 23: 445-458
- Heink S, Ludwig D, Kloetzel PM, Kruger E. IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9241-9246
- Schijns VE, Wierda CM, van Hoeij M, Horzinek MC. Exacerbated viral hepatitis in IFN-gamma receptor-deficient mice is not suppressed by IL-12. *J Immunol* 1996; 157: 815-821
- Khan S, Zimmermann A, Basler M, Groettrup M, Hengel H. A cytomegalovirus inhibitor of gamma interferon signaling controls immunoproteasome induction. *J Virol* 2004; 78: 1831-1842
- Kawarabayashi N, Seki S, Hatsuse K, Ohkawa T, Koike Y, Aihara T, Habu Y, Nakagawa R, Ami K, Hiraide H, Mochizuki H. Decrease of CD56(+)T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 32: 962-969
- Kenna T, Golden-Mason L, Porcelli SA, Koezuka Y, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG. NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells. *J Immunol* 2003; 171: 1775-1779
- Ogasawara K, Takeda K, Hashimoto W, Satoh M, Okuyama R, Yanai N, Obinata M, Kumagai K, Takada H, Hiraide H, Seki S. Involvement of NK1⁺ T cells and their IFN-gamma production in the generalized Shwartzman reaction. *J Immunol* 1998; 160: 3522-3527
- Satoh M, Seki S, Hashimoto W, Ogasawara K, Kobayashi T, Kumagai K, Matsuno S, Takeda K. Cytotoxic gamma delta or alpha beta T cells with a natural killer cell marker, CD56, induced from human peripheral blood lymphocytes by a combination of IL-12 and IL-2. *J Immunol* 1996; 157: 3886-3892

电编 张敏 编辑 潘伯荣

胆总管十二指肠吻合术治疗胆总管结石远期疗效326例

杨维良, 闫朝岐, 王夫景, 马玉林, 杨金友

杨维良, 闫朝岐, 王夫景, 马玉林, 杨金友, 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
通讯作者: 杨维良, 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. wlyang_2008@163.com
收稿日期: 2006-05-29 接受日期: 2006-06-12

Long-term effect of choledochoduodenostomy in treatment of common bile duct stone: an analysis of 326 cases

Wei-Liang Yang, Chao-Qi Yan, Fu-Jing Wang,
Yu-Lin Ma, Jin-You Yang

Wei-Liang Yang, Chao-Qi Yan, Fu-Jing Wang, Yu-Lin Ma, Jin-You Yang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Correspondence to: Wei-Liang Yang, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China. wlyang_2008@163.com

Received: 2006-05-29 Accepted: 2006-06-12

Abstract

AIM: To summarize the long-dated curative effect of choledochoduodenostomy in the treatment of common bile duct stone.

METHODS: The clinical data of 326 patients received choledochoduodenostomy from 1962 to 2002 were analyzed respectively.

RESULTS: Before 1982, there were 178 patients received choledochoduodenostomy, and postoperative cholangitis or blindloop syndrome occurred in 36 cases for anastomotic stricture, 4 of which died. The mortality rate was 2.2% (4/178). Since 1983, the low and large-sized anastomotic stoma was emphasized. There were 5 cases with postoperative cholangitis or blindloop syndrome and all of them were cured without complications. The anastomotic stoma of 85 cases was less than 2.0 cm in diameter, 153 cases from 2.0 to 2.5 cm, 83 cases between 2.6 and 3.0 cm, and 5 cases without records. There were totally 278 cases (85.3%) who had been followed up for 3 to 20 years, and the excellent curative rate reached

96.6% (143/148) after the year 1983.

CONCLUSION: In order to avoid converse infection and blindloop syndrome, the low anastomotic stoma with a diameter of larger than 2.5 cm is a better choice in choledochoduodenostomy.

Key Words: Common bile duct stone; Choledochoduodenostomy

Yang WL, Yan CQ, Wang FJ, Ma YL, Yang JY. Long-term effect of choledochoduodenostomy in treatment of common bile duct stone: an analysis of 326 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1839-1842

摘要

目的: 总结胆总管十二指肠吻合术的远期疗效。

方法: 回顾性分析1962-2002年胆总管十二指肠吻合术326例的临床资料。

结果: 1982年以前178例, 其中36例因吻合口狭窄致胆管炎或胆总管盲端综合征, 其中4例死亡, 死亡率为2.2%(4/178); 1983后强调低位大口径吻合, 其中5例出现胆管炎或胆总管盲端综合征, 无死亡病例。吻合口径<2.0 cm 85例, 2.0-2.5 cm 153例, 2.6-3.0 cm 83例, 资料不详5例。经3-20 a随访278例, 随访率为85.3%, 其中1983年以后手术效果的优良率达到96.6% (143/148)。

结论: 胆总管十二指肠吻合口径要>2.5 cm, 吻合口位置要低, 才可避免逆行性感染和盲端综合征。

关键词: 胆总管结石; 胆总管十二指肠吻合术

杨维良, 闫朝岐, 王夫景, 马玉林, 杨金友. 胆总管十二指肠吻合术治疗胆总管结石远期疗效326例. *世界华人消化杂志* 2006;14(18):1839-1842

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1839.asp>

0 引言

胆总管十二指肠吻合术(choledochoduodenostomy,

■背景资料

胆总管十二指肠吻合术(choledochoduodenostomy, CDS)是胆道外科的一种内引流术式。自1888年Riedel首创这一手术, 已有100多年。长期以来, 一直存在争议。

■研究前沿

国内外对治疗胆总管结石方法进行了研究,但是内引流术在胆道外科中有一定地位,尤其是CDS成为了探讨热点之一。

CDS)是胆道外科的一种内引流术式,或称胆道重建的一种方式。自1888年Riedel首创这一手术,已有100 a余。长期以来,一直存在争议,有人认为CDS有较好的远期疗效;有人认为有严重的并发症,主张废弃。我院1962-2002年共施行CDS 326例,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 胆总管结石326例,男132例,女194例。年龄38-86(平均54)岁。1962-1982年第1阶段178例,第1次手术165例,第2次手术13例;1983-2002年第2阶段148例,第1次手术125例,第2次手术23例。2次手术率为11.0% (36/326)。手术原因: (1)胆总管明显扩张(直径 ≥ 2.5 cm)的原发性胆管结石以及多发性胆管结石或胆色素泥沙样结石,并且无肝内胆管狭窄206例; (2)胆总管扩张(直径 ≥ 2.0 cm),壶腹部结石嵌顿伴Oddi括约肌炎性狭窄41例; (3)胆总管结石合并胆总管远端狭窄,上段扩张(直径 ≥ 2.0 cm) 25例; (4)胆总管结石合并慢性胰腺炎所致胆总管胰腺段狭窄33例; (5)肝内胆管泥沙样结石,但无胆管狭窄,有结石复发的可能,特别是胆管探查,结石未冲洗取净者21例,其中属于老年、高危、体弱或急症患者共271例,占83.1%。

1.2 方法 (1)胆总管十二指肠前侧侧吻合术: 在十二指肠上缘横形切开胆总管与十二指肠前壁的横向或纵形切口相吻合225例^[1-2]; (2)胆总管十二指肠端侧吻合术: 在十二指肠上缘切断胆总管与十二指肠前壁的横向或纵形切口相吻合13例; (3)胆总管十二指肠后壁孔洞式吻合术: 在十二指肠一段与二段交界处斜形切开十二指肠前壁,显露十二指肠后壁,距十二指肠乳头上1.0-1.5 cm处,用刀切穿十二指肠后壁和胆总管前外壁,去除一块1.5-1.8 cm的卵圆形组织,使两个管腔相沟通,周边用可吸收的“4-0”线间断缝合,即成孔洞式吻合33例^[3]; (4)经十二指肠低位胆总管十二指肠扩大吻合术: 即在胆总管切口下方的两缘,连同十二指肠上缘接壤部分别贯穿缝合、牵引,在两牵引线之间,顺胆总管下方切口,将十二指肠前后壁一并剪开1.5-2.0 cm,此时显露十二指肠后壁与胆总管前壁的切缘,继续向下剪开,达乳头上1.5 cm处,最后将十二指肠后壁和胆总管前壁的切口用“4-0”的可吸收线间断侧侧吻合55例^[4-5]。

2 结果

2.1 远期疗效 3-20 a随访278例,随访率85.3%,

其中随访3-4 a 201例, 5-6 a 43例, 7-13 a 20例, 14-20 a 14例。远期疗效标准: (1)优: 无胆道结石症状190例,占68.3%; (2)良: 术后偶有右上腹微痛,伴低热,无黄疸48例,占17.3%; (3)差: 逆行性感染,加上难以控制的反复发作的严重胆管炎或盲端综合征。出现典型Charcot三联征或Reynolds五联征,导致肝功能衰竭、死亡。本组第1阶段36例发生严重并发症,占12.9%,其中肝功能衰竭、休克死亡4例,占1.4%; 第2阶段发生严重并发症5例,占1.8%,无死亡病例。

2.2 术式与疗效 本组278例随访患者中有41例出现严重并发症,占1.5%。采用胆总管十二指肠前侧侧吻合术,造成术后发生严重并发症36例,占12.9%; 相反,采用胆总管十二指肠端侧吻合术13例,胆总管十二指肠后壁孔洞式吻合术33例,经十二指肠低位胆总管十二指肠扩大吻合术55例,后3种吻合术出现严重并发症5例,占1.8%。第1、2阶段总手术优良率为85.6%; 第2阶段手术优良率为96.6%。吻合口径 < 2.0 cm 85例, 2.0-2.5 cm 153例, 2.6-3.0 cm 83例,资料不详5例。本组第1阶段中有36例为胆总管十二指肠前侧侧吻合术后的严重胆管炎或盲端综合征,其根本原因是吻合口径 $< 1.5-2.0$ cm,即吻合口狭窄或严重狭窄,本组32例; 胆总管前侧侧吻合口位置偏高,致胆总管残留盲管有结石或残留食物残渣酿成盲端综合征2例; 另有2例并无吻合口狭窄,存在胆总管十二指肠吻合口严重返流,经钽剂透视肠胆返流到二级胆管以上,经30-60 min不能完全排空,因此出现反复发作的严重胆管炎。本组第2阶段有5例发生严重并发症的原因仍为吻合口径 ≤ 1.5 cm的狭窄,特别是胆总管十二指肠后壁孔洞式吻合术,操作不当,更易造成狭窄,本组5例均为孔洞式吻合术所致。

3 讨论

通过本组病例的观察, CDS的适应证是: (1)胆总管明显扩张(直径 ≥ 2.5 cm)的原发性胆管结石以及多发性胆管结石或胆色素泥沙样结石,并无肝内胆管狭窄; (2)胆总管结石合并胆总管远端狭窄,上段扩张(直径 ≥ 2.0 cm); (3)胆总管扩张(直径 ≥ 2.0 cm),壶腹部结石嵌顿伴Oddi括约肌炎性狭窄; (4)胆总管结石合并慢性胰腺炎所致胆总管胰腺段狭窄; (5)肝内胆管泥沙样结石,但无胆管狭窄,有结石复发的可能,特别是胆管探查结石未冲洗取净者; (6)高龄、高危、体弱或急重症(急性重症化脓性胆管炎)。CDS后肠

胆返流是不可避免的, 有人认为其再手术率为49.4%^[6]; 本组有36例, 再手术率11.0%. 2次手术后, 由于吻合口直径为2.5 cm以上, 因此无逆行性感染, 也很少发生盲端综合征, 再手术的原因: (1)手术适应证选择不当: 因胆囊结石及胆总管结石行胆囊切除, 胆总管切开取石, 胆总管十二指肠侧侧吻合术. 术后2 a内多次反复发作的胆管炎, 经口服钽剂透视证实有严重的胆胆返流并严重胆管炎, 进入胆管的钽剂在30-60 min不能完全排空. ERCP检查胆管无病, 术中探查Oddi括约肌可通8号探条, 胆道镜亦证实肝内外胆管无结石, 此乃说明第一次手术无CDS的适应证, 多余的CDS酿成严重后果. 二次手术拆除原吻合口, 重新修复十二指肠, 胆总管置T形管引流, 术后痊愈, 本组3例; (2)吻合口以上胆管结石、狭窄: 术中再次切开胆总管取石, 胆总管狭窄切开成形术^[7-8], 并置T形管引流. 拆除原侧侧吻合口, 再行经十二指肠低位胆总管十二指肠吻合术, 吻合口径 ≥ 2.5 cm, 本组10例均痊愈; (3)胆总管十二指肠侧侧吻合口狭窄: 由于吻合口的狭窄并严重胆管炎, 手术拆除原侧侧吻合口, 经十二指肠低位胆总管十二指肠吻合术, 吻合口径 ≥ 2.0 cm, 本组5例均痊愈; 拆除原侧侧吻合口, 行胆总管十二指肠后壁孔洞式吻合, 口径为1.5-2.0 cm, 本组4例均痊愈; 拆除原吻合口, 行扩大的胆总管十二指肠侧侧吻合, 吻合口径 ≥ 2.5 cm, 本组6例均痊愈. 多数作者认为只要吻合口径 > 2.0 cm, 就可避免发生胆管炎^[9]; 而且也有人认为只要胆总管直径 ≥ 2.5 cm, 才能保证吻合口径不会狭窄^[10]; (4)胆总管“盲端综合征”: CDS后的残留盲管是产生胆管炎等症状的“盲端综合征”的重要原因, 本组4例胆总管盲端有结石或残留食物, 盲端胆总管壁和吻合口均有不同程度的炎性水肿, 与狭窄并存. 二次手术拆除原侧侧吻合口, 行经十二指肠低位胆总管十二指肠吻合术, 吻合口径为2.0 cm, 术后均痊愈; (5)胆总管十二指肠吻合口严重返流: 本组4例侧侧吻合无狭窄, 经钽剂透视证实可返流到二级肝管以上, 尽管体位改变可以排空, 但排空时间迟缓, 存在反复发作的严重胆管炎, ERCP检查Oddi括约肌狭窄. 因此, 不得不采用Billroth II法胃部分切除术, 消除了胆道逆行性感染症状, 痊愈.

本组第1阶段165例采用胆总管十二指肠前侧侧吻合术, 其中64例吻合口径 < 2.0 cm, 15例吻合口径 ≤ 1.5 cm. 经随访有36例出现严重发作

的胆管炎和胆总管盲端综合征, 其中有4例因急性化脓性胆管炎, 肝功能衰竭并休克死亡. 有32例经再次扩大吻合口径等处理后, 均痊愈. 有13例胆总管十二指肠前侧侧吻合术, 经随访无严重并发症, 这是因为胆总管远端不留下盲管并胆总管扩张直径 ≥ 2.5 cm, 不能发生胆总管远端结石或残留食物, 也不会引起胆管炎或胆总管盲端综合征. 第2阶段148例中采用胆总管十二指肠后壁孔洞式吻合术33例, 吻合口径1.5 cm; 经十二指肠低位胆总管十二指肠扩大吻合术55例, 吻合口径在2.5-4.0 cm之间; 胆总管十二指肠前侧侧吻合51例, 吻合口径在2.5-3.0 cm. 有5例出现严重并发症, 是由于胆总管十二指肠后壁孔洞式吻合术的吻合口径 ≤ 1.5 cm. 由此可见, 第2阶段148例中采用的术式吻合口径较第1阶段的吻合口径大, 并吻合口的位置较低, 是不发生吻合口狭窄、盲端综合征等的基本原因. 从而认识到CDS发生吻合口狭窄与胆管扩张直径 ≤ 2 cm的胆肠吻合后口径肯定要 < 2 cm或1.5 cm, 这是远期疗效不良的原因之一; 再者侧侧吻合易残留盲管, 必然酿成盲端综合征. 因此, 1983-2002年第2阶段开始根据胆总管扩张直径的不同, 分别采用: (1)胆总管直径扩张 ≥ 2.5 cm, 胆总管内单发结石并Oddi括约肌狭窄, 同时为老年、高危体弱者或急症患者, 多采用胆总管十二指肠前侧侧吻合术; (2)胆总管轻度扩张直径 ≤ 2.0 cm或泥沙样结石, 多采用胆总管十二指肠后壁孔洞式吻合术; (3)胆总管扩张2.0-3.0 cm或胆总管多发性结石并Oddi括约肌狭窄, 胆总管胰腺段狭窄, 患者状态良好, 采用经十二指肠低位胆总管十二指肠扩大吻合术.

CDS确实有发生胆管炎或胆总管盲端综合征的可能性, 所以是一个争议未决的术式, 一些学者认为CDS具有逆行性感染的潜在危险或残留盲管, 酿成盲端综合征, 远期疗效差, 再手术率较高(49.4%), 不宜选择CDS, 甚至认为此手术有被淘汰的趋势^[6-8]. 另外一些学者认为CDS的优点在于手术操作简单、安全、创伤小、手术时间短、病死率较低、远期疗效优良^[9-14]. 逆行性感染(重症胆管炎)和盲端综合征的发生率在第1阶段为21.8%; 第2阶段术式改进, 注意到吻合口径 ≥ 2.5 cm或吻合口位置应尽量低位, 其优良率达96.6%, 严重并发症(重症胆管炎或盲端综合征)仅占3.4%. 目前认为胆肠吻合术效果优良的胆管空肠Roux-en-Y形的“半口径同步”吻合的曾宪九法, 也不可能完全避免逆行性感

■创新盘点

本文对不能耐受重创的老年、高危体弱者或急症胆总管结石患者进行了CDS治疗, 取得了满意的疗效.

■应用要点

CDS是胆总管结石及狭窄的一种胆道重建方法之一, 在胆道外科尚有一定地位. 胆总管十二指肠吻合口径要 > 2.5 cm, 吻合口位置要低, 才可避免逆行性感染和盲端综合征.

■同行评价

本文回顾性分析1962-2002年326例胆总管十二指肠吻合术的临床资料,分两个时期比较不同术式的疗效、并发症及死亡率,提出了胆总管十二指肠吻合口径要>2.5 cm,位置要低,才可避免逆行性感染和盲端综合征。虽然本文提出的结论并无创新,但本文总结的病例数较大,随访时间长、随访率高,临床分析较为全面,客观评价了胆总管十二指肠吻合术的临床价值,故仍对临床有一定指导意义。

染和盲端综合征。所以CDS对不能耐受重创的老年、高危体弱者或急症患者比较合适。总之,CDS是治疗胆总管结石及狭窄的一种内引流或胆道重建的方法之一,在胆道外科尚有一定地位,不能完全摒弃,术式的选择要严格掌握适应证是明智之举。

4 参考文献

- 1 de Aretxabala X, Bahamondes JC. Choledochoduodenostomy for common bile duct stones. *World J Surg* 1998; 22: 1171-1174
- 2 Aramaki M, Ikeda M, Kawanaka H, Nishijima N, Tsutsumi N, Kano T. Choledochoduodenostomy: simple side-to-side anastomosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 486-488
- 3 张伯超, 张印霞, 王泰来. 胆总管十二指肠后壁孔洞式吻合术治疗原发性胆道结石. *中华外科杂志* 1988; 26: 29
- 4 赵复康, 吴少英. 胆总管十二指肠扩大吻合术. *中华外科杂志* 1990; 28: 209-210
- 5 张祖荀, 陈国玉. 经十二指肠低位胆总管十二指肠吻

合术的体会. *普外临床* 1992; 7: 241-242

- 6 李海民, 窦科峰, 周景师, 高志清, 李开宗, 傅由池. 不同胆肠吻合术式与远期疗效比较分析. *中国实用外科杂志* 2003; 23: 364-366
- 7 Huang JF, Qian W, Peng GB. Surgical treatment of hilar strictures in hepatolithiasis. *Hepatogastroenterology* 1997; 44: 322-327
- 8 郑光瑞. 胆总管十二指肠吻合术后再手术的原因及处理. *腹部外科* 2004; 17: 40-41
- 9 李刚, 孙红戈. 胆总管十二指肠吻合术后逆行感染16例再手术体会. *中国实用外科杂志* 1997; 17: 333
- 10 刘锦修, 蔡景修, 郑英键, 何安兵, 任德发. 胆总管十二指肠吻合术后再手术的临床分析(附35例报告). *中国普通外科杂志* 2002; 11: 126-127
- 11 傅德庄. 胆总管十二指肠吻合术后再手术原因探讨. *云南医药* 2001; 22: 86-87
- 12 郑勇. 胆总管十二指肠吻合术口径与疗效及反流的关系. *现代医药卫生* 2004; 20: 1377
- 13 杨维良, 王夫景, 裴建华, 于作泰. 胆总管十二指肠吻合术治疗胆石病的远期疗效及评价. *黑龙江医学* 1991: 5-7
- 14 吴孟超, 陈汉. 胆总管十二指肠吻合术的适应症. *解放军医学杂志* 1986; 11: 321

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

技法与经验

本刊讯 《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏,及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验。我们热烈欢迎各位作者踊跃投稿,免费刊登照片。写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法: 1.1 原理; 1.2 适应证; 1.3 器材准备; 1.4 步骤; 1.5 实例

2 结果

3 讨论: 3.1 并发症; 3.2 优点和缺点; 3.3 经验与技巧

4 参考文献

自体DC体外增强结肠腺癌患者TDLN细胞的抗肿瘤活性

彭正, 陈凇, 李荣, 李力, 董艳芬, 张磊

彭正, 陈凇, 李荣, 董艳芬, 解放军总医院普通外科 北京市 100853

李力, 张磊, 解放军总医院普通外科研究所 北京市 100853
彭正, 1994年第四军医大学学士, 2003年解放军总医院硕士, 主治医师。

通讯作者: 彭正, 100853, 北京市, 解放军总医院普通外科。
pengzham@yahoo.com.cn

电话: 010-66875143

收稿日期: 2006-05-19 接受日期: 2006-06-14

Autologous dendritic cells enhance anti-tumor activity of tumor-draining lymph node cells from colonic adenocarcinoma patients *in vitro*

Zheng Peng, Lin Chen, Rong Li, Li Li, Yan-Fen Dong, Lei Zhang

Zheng Peng, Lin Chen, Rong Li, Yan-Fen Dong, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Li Li, Lei Zhang, Institute of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Zheng Peng, Department of General Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. pengzham@yahoo.com.cn

Received: 2006-05-19 Accepted: 2006-06-14

Abstract

AIM: To explore the enhancement of the anti-tumor activity of tumor-draining lymph node (TDLN) cells induced by autologous dendritic cells (DCs) *in vitro*.

METHODS: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were separated from the patients with colonic adenocarcinoma and then induced with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interleukin-4 (IL-4) and TNF- α for maturation. Thereafter, the autologous tumor lysate was used to sensitize DCs. TDLN cells were isolated from regional lymph nodes of the patients, purified, and incubated with interleukin-2 (IL-2). Finally, the TDLN cells were activated by the sensitized DCs or autologous tumor lysate, respectively, and the TDLN cells without activation served as controls. The cytotoxic activity of

the activated TDLN cells to colonic adenocarcinoma cell line LS174T and human melanoma cell line A375 were comparatively analyzed.

RESULTS: The cytotoxicities of the DCs-activated TDLN cells to LS174T cells were significantly stronger than those of TDLN cells activated by autologous tumor lysate or without activation ($56.13\% \pm 7.33\%$ vs $42.46\% \pm 7.68\%$, $33.50\% \pm 7.00\%$, $P < 0.001$, as the ratio of TDLN cells to tumor cells was 20 : 1; $44.85\% \pm 6.50\%$ vs $30.50\% \pm 9.17\%$, $26.75\% \pm 8.88\%$, $P < 0.001$, as the ratio of TDLN cells to tumor cells was 10 : 1). However, for A375 cells, the cytotoxic activities had no significant difference among the TDLN cells activated by DCs and autologous tumor lysate, and without activation.

CONCLUSION: The specific anti-tumor activity of TDLN cells can be enhanced by autologous DCs *in vitro*.

Key Words: Tumor-draining lymph node cells; Dendritic cells; Anti-tumor activity; Colonic adenocarcinoma

Peng Z, Chen L, Li R, Li L, Dong YF, Zhang L. Autologous dendritic cells enhance anti-tumor activity of tumor-draining lymph node cells from colonic adenocarcinoma patients *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(18):1843-1846

摘要

目的: 探讨自体树突状细胞(DC)体外对结肠腺癌患者肿瘤引流区淋巴结(TDLN)细胞抗肿瘤活性的增强作用。

方法: 分离肿瘤患者的外周血单个核细胞(PBMC)经IL-4, GM-CSF和TNF- α 诱导其成熟, 并以自体肿瘤冻融抗原预致敏, 诱导其中的DC。另外, 分离结肠癌患者的TDLN细胞, 在含有IL-2的培养体系中培养, 并将TDLN细胞分为3组: 第1组为肿瘤抗原致敏的DC加TDLN细胞(DC组); 第2组冻融的肿瘤抗原加TDLN细胞(Ag组); 第3组不加DC及肿瘤抗原作为对照组(L组)。比较3组TDLN细胞对结肠

■背景资料

手术、放疗和化疗等三大治疗模式都着眼于直接杀伤肿瘤细胞, 但常难于彻底消灭肿瘤细胞, 且易于损伤正常组织, 特别是伤害在抗肿瘤机制中起重要作用的免疫系统。因此肿瘤生物治疗作为肿瘤治疗的第四模式而引起人们的普遍关注。肿瘤生物治疗主要是通过肿瘤宿主防御机制或生物制剂的作用以调节机体自身的生物学反应, 从而抑制或消除肿瘤。1986年, 第一例从病人肿瘤获得的自体CTL过继免疫治疗的实验, 开启了肿瘤免疫治疗的新纪元。

■研发前沿

关于CTL的研究始终是过继性细胞免疫治疗的重点, T细胞过继免疫治疗的核心问题是如何获得CTL并进一步增强T细胞的肿瘤特异性杀伤效应。

■创新盘点

TDLN中的特异性CD8⁺前效应T细胞已经肿瘤抗原的长期致敏,具备了针对肿瘤细胞的敏感性或者很容易被疫苗致敏,但由于肿瘤环境的影响,使得CTL激活信号转导功能发生障碍,处于“失能”状态。我们设想根据“双信号激活理论”,在TDLN细胞中添加高表达共刺激因子的树突状细胞(DC),从而为已致敏的T细胞提供激活所需要的第二类信号,提高其特异性杀伤能力。

腺癌细胞系LS174T和黑色素瘤细胞系A375的杀伤作用。

结果: DC组对LS174T细胞系的杀伤作用明显优于Ag组与L组(效靶比为20:1时, 56.13%±7.33% vs 42.46%±7.68%, 33.50%±7.00%, $P<0.001$; 效靶比为10:1时, 44.85%±6.50% vs 30.50%±9.17%, 26.75%±8.88%, $P<0.001$);而对A375细胞,各组细胞的杀伤作用没有明显差异。

结论: 自体DC可明显增强结肠癌患者TDLN细胞的杀伤作用。

关键词: 肿瘤引流区淋巴结细胞; 树突状细胞; 抗肿瘤活性; 结肠腺癌

彭正, 陈凇, 李荣, 李力, 董艳芬, 张磊. 自体DC体外增强结肠腺癌患者TDLN细胞的抗肿瘤活性. 世界华人消化杂志 2006;14(18):1843-1846

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1843.asp>

0 引言

肿瘤引流区淋巴结(tumor-draining region lymph nodes, TDLN)作为体内抗肿瘤免疫发生的最初也是最关键的场所,在机体肿瘤免疫中具有重要作用^[1]. TDLN细胞中的特异性CTL虽可被肿瘤抗原刺激而致敏,但由于缺乏协同激活信号而处于“失能”状态,不能有效地发挥其杀伤肿瘤细胞的作用^[2]. 肿瘤患者外周血及TDLN细胞中DC的数量明显减少,并缺乏成熟DC的表面标志,其数量与质量与肿瘤患者的病理分期及预后明显相关^[3-5]. 因此,我们推测在TDLN细胞中添加高表达共刺激因子的成熟DC,为T细胞活化提供第二类信号,有可能提高其特异性杀伤活性。

1 材料和方法

1.1 材料 2005-01/07在本科住院确诊为结肠腺癌并行手术切除的患者20例,术后病理证实为Duke B或C期,均处于肿瘤进展期,但仍限于局部而无远位转移. 年龄26-55(平均47.6)岁,男13例,女7例. 取外周血及TDLN标本. Hnaks液及RMPI1640培养液为Gibco公司产品. 小牛血清购于浙江金华生物制品厂. 淋巴分离液购自上海试剂二厂. IL-2、IL-4及TNF- α 为Peprotech公司产品. GM-CSF为Schering-Plough公司产品. 抗CD83、抗CD86、抗CD1a及抗CD14mAb均为Immunotech Frunch公司产品. 抗CD3/抗CD4/抗CD8mAb为

Caltag公司产品. 抗CD3/抗CD16+56/抗CD45mAb为B&D公司产品. MTT为Sigma公司产品. 结肠癌细胞株LS174T及黑色素瘤细胞株A375均由解放军总医院基础所免疫室提供. 无菌抽取患者外周血10 mL,用Ficoll密度梯度离心法直接分离和纯化PBMC,并以2 g/L台盼蓝染色计算活细胞的百分率. 将手术获得的TDLN除去附着的脂肪,以含抗菌素的培养基冲洗后,剪碎、研磨、过筛并以RPMI1640悬浮. 用淋巴细胞分离液进行密度梯度离心(2 000 r/min×30 min),即获得TDLN细胞. 取肿瘤患者自体肿瘤组织机械剪碎,置-80℃反复冻融3次,研磨、过筛. 加RPMI1640悬浮后,以10 000 r/min离心30 min,取上清过滤除菌,用紫外分光光度计在波长280 nm及265 nm处测标本的蛋白含量. 再以无血清RPMI1640调整蛋白浓度至2 g/L,置-4℃保存备用。

1.2 方法 将所得PBMC计数后种入培养瓶中,置37℃, 50 mL/L CO₂温箱中贴壁2 h. 轻微震荡后,倒去上清及悬浮的细胞,加入含50 mL/L小牛血清的RPMI1640 6 mL, GM-CSF(终浓度 1×10^6 U/L)及IL-4(终浓度 2×10^5 U/L). 置37℃, 50 mL/L CO₂的温箱中培养7 d,以刺激DC优势增殖. 于d4时换液, d6加入肿瘤冻融抗原100 mg/L,同时加入TNF- α (终浓度2 mg/L),促进DC成熟. d7收获细胞并计数. 将TDLN细胞分为3组, ①DC组: 以体外制备的自体DC诱导TDLN细胞活化. 即在RPMI1640培养基中,加入IL-2(终浓度 2×10^5 U/L),将经DC定向扩增的细胞与TDLN细胞按1:50的比例混合后,于37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养3 d. ②Ag组: 以肿瘤抗原诱导TDLN细胞活化. 即在RPMI1640培养基中,加入IL-2(终浓度 2×10^5 U/L), TDLN细胞与冻融的肿瘤抗原25 mg/L混合,于37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养3 d. ③L组: 单纯用IL-2刺激TDLN细胞. 即在RPMI1640培养基中,加入IL-2(终浓度 2×10^5 U/L), TDLN细胞于37℃、50 mL/L CO₂条件下培养3 d. 用流式细胞仪分别测定上述3组细胞中CD4⁺, CD8⁺及CD16+56⁺细胞的数量. 关于DC与TDLN细胞混合的比例,根据国内文献^[6-8]和我们前期研究结果^[9]确定将DC定向扩增的PBMC贴壁细胞与TDLN细胞按1:50的比例混合. 分别以结肠癌细胞系LS174T及黑色素瘤细胞系A375作为靶细胞包板,每孔的细胞数为 1×10^4 . 用各组TDLN细胞作为效应细胞,按10:1及20:1的比例与靶细胞混合. 每组3个复孔,于37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养72 h. 以MTT比色法^[10]检测TDLN细胞的杀伤活

性, 结果以 $A_{590\text{ nm}}$ 表示. 杀瘤率(%) = $[1 - \text{实验孔}A\text{值}/(\text{靶细胞}A\text{值} + \text{效应细胞}A\text{值})] \times 100\%$.

统计学处理 应用STATA 7.0软件法进行分析. 3组中 $CD8^+$ 、 $CD16+56^+$ 细胞的百分比采用单因素方差分析, $CD4^+$ 细胞的百分比因为方差不齐采用多样本秩和检验(Kruskal-Wallis检验), 然后分别进行组间检验, 其中DC组与Ag组、DC组与L组进行单因素方差分析, Ag组与L组进行Wilcoxon-Mann-Whitney检验. 3组 $CD4^+/CD8^+$ T细胞的相对比也采用多样本秩和检验, 然后分别进行组间检验, 其中DC组与L组、DC组与Ag组采用Wilcoxon-Mann-Whitney检验, Ag组与L组采用单因素方差分析. 3组细胞对两种靶细胞的杀伤结果首先采取多因素方差分析, 研究TDLN细胞的不同激活方法、效靶比及靶细胞对3组TDLN细胞的杀伤率的影响, 以及各因素之间有无交互影响. 然后采取两因素方差分析方法分别分析分组及效靶比因素对每种靶细胞的杀伤率的影响. 最后, 采取单因素方差分析方法分别分析效靶比为10:1和20:1时各组TDLN细胞对LS174T细胞系的杀伤率的差异性. $P < 0.05$ 时认为有差异性显著.

2 结果

2.1 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD16+56^+$ 细胞数 DC组中 $CD8^+$ 细胞与Ag组、L组均存在显著差异($P < 0.01$), 而Ag组、L组之间无统计学差异($P = 0.612$, 表1). $CD4^+$ 细胞在3组间比较时显示存在显著差异($P < 0.05$), 组间比较显示DC组与L组存在显著差异($P < 0.01$), 而DC组与Ag组, Ag组与L组之间无统计学差异($P > 0.05$). $CD16+56^+$ 细胞在3组间比较时无统计学差异($P > 0.05$). 对于 $CD4^+/CD8^+$ T细胞的相对比, 3组间比较时显示存在显著差异($P < 0.001$), 组间比较显示DC组与L组、DC组与Ag组均存在显著差异($P < 0.001$), 而Ag组与L组之间无统计学差异($P = 0.95$).

2.2 对靶细胞的杀伤率结果 TDLN细胞的激活方法、效靶比及靶细胞的差异对3组TDLN细胞的杀伤率的存在显著性影响, 而且激活方法与靶细胞、效靶比与靶细胞之间存在交互影响($P < 0.001$, 表2). 说明各组TDLN细胞对LS174T细胞系与A375细胞系的杀伤率存在显著差异, 各组TDLN细胞对LS174T细胞系的杀伤率均大于对A375细胞系的杀伤率, 而且以DC组在高效靶比对LS174T细胞系的杀伤效果最佳($P < 0.001$). 对于A375细胞的杀伤能力各组细胞间没有明显

表1 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD16+56^+$ 细胞百分比及 $CD4^+/CD8^+$ T细胞的相对比 (mean \pm SD)

| 分组 | $CD4^+$ (%) | $CD8^+$ (%) | $CD4^+/CD8^+$ | $CD16+56^+$ (%) |
|-----|------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| DC组 | 48.43 ± 5.45 | 22.00 ± 4.46 | 2.27 ± 0.48 | 1.88 ± 0.82 |
| Ag组 | 48.50 ± 7.55 | 15.67 ± 4.63 | 3.32 ± 0.99 | 1.76 ± 0.83 |
| L组 | 53.12 ± 3.78 | 17.09 ± 4.49 | 3.30 ± 0.81 | 1.89 ± 0.98 |

表2 TDLN细胞对不同靶细胞杀伤率的组间比较 (mean \pm SD, %)

| 分组 | LS174T | | A375 | |
|-----|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| | E : T = 20 : 1 | E : T = 10 : 1 | E : T = 20 : 1 | E : T = 10 : 1 |
| DC组 | 56.13 ± 7.33 | 44.85 ± 6.50 | 19.00 ± 11.70 | 17.17 ± 8.78 |
| Ag组 | 42.46 ± 7.68 | 30.50 ± 9.17 | 19.15 ± 10.93 | 17.23 ± 8.44 |
| L组 | 33.50 ± 7.00 | 26.75 ± 8.88 | 17.30 ± 9.84 | 15.22 ± 8.57 |

差异, 而且在不同效靶比时的杀伤率也没有明显差异($P > 0.05$). 对LS174T细胞系的杀伤率的分析显示, 总体上各组TDLN细胞在不同效靶比时杀伤率均存在显著性差异($P < 0.001$). 但对不同效靶比进行分析则发现, 在效靶比为10:1时DC组与Ag组、L组均存在显著差异($P < 0.001$), 而Ag组与L组之间无统计学差异($P > 0.05$); 效靶比为20:1时三组间均存在显著差异($P < 0.001$).

3 讨论

过继性细胞免疫治疗(adoptive cellular immunotherapy, ACI)是通过输注免疫活性细胞增强肿瘤患者的免疫功能达到抗肿瘤的效果. 已经证实 $CD8^+$ CTL是主要的抗肿瘤效应细胞. 因此, 关于细胞毒性T细胞的研究始终是过继性细胞免疫治疗的重点, T细胞过继免疫治疗的核心问题是如何获得CTL并进一步增强T细胞的肿瘤特异性杀伤效应. 用于杀伤性T细胞来源的细胞主要有外周血单个核细胞(PBMC)、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)及肿瘤引流区淋巴结(TDLN)细胞, 其中对PBMC和TIL研究较多. TDLN细胞作为过继性细胞免疫治疗的细胞来源, 具备一些独特的优势: (1)与PBMC相比有更强的特异性. TDLN中的T细胞已经肿瘤抗原长期致敏, 具备针对自体肿瘤细胞特异性的识别能力. TDLN细胞是由个体肿瘤直接致敏, 所以对个体化的肿瘤细胞具有更好的特异性; (2)与TIL相比TDLN细胞的来源及数量与TIL相比更为广泛; (3)TDLN作为体内抗肿瘤免疫的主要场所, 从其中提取的各种细胞比率更接近于外周免疫系统的比率, 对于免疫系统而言, 发挥抗肿瘤效应并非是有有一种细胞起决定性的作用, 而

■应用要点

TDLN细胞在体外经短期激活和扩增就能用于治疗, 虽然用TDLN细胞进行过继免疫治疗目前在临床应用仍然很少, 但因为其具有良好的抗肿瘤活性, 可以作为抗肿瘤效应细胞的一种很好来源, 具备较好的发展前景.

■同行评价

本文采用患者自体树突状细胞(DC)在体外对结肠腺癌患者肿瘤引流区淋巴结(TDLN)细胞抗肿瘤活性作用的影响结果表明DC具有明显增强对结肠腺癌细胞LS174T细胞系的杀伤作用,其作用亦比对黑色素瘤细胞系A375的杀伤作用为强。实验进一步对其作用机制进行了探讨。这一研究为临床应用过继性细胞免疫治疗选用TDLN细胞作为细胞来源提供了理论依据。故本文具有临床参考价值。

是多种细胞相互协调、相互制约共同形成一个免疫网络系统,从而是免疫效应产生最合理的效益并控制负面作用的程度^[11-12]。

流式细胞仪检查结果表明,DC诱导的TDLN细胞中CD8⁺T细胞的比率高与肿瘤抗原联合IL-2或单纯使用IL-2冻融肿瘤抗原诱导的TDLN细胞,CD4⁺/CD8⁺比例也有显著差异,而后两者之间无明显差异,即以DC诱导时可产生更多的CTL。对于CD4⁺T细胞,只在DC诱导和单纯使用IL-2诱导之间存在差异,而DC诱导与冻融肿瘤抗原的诱导、冻融肿瘤抗原的诱导与单纯使用IL-2诱导之间却无存在差异,推测DC对于CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞的影响可能有所不同。未能显示出统计学的差异。CD16+56为自然杀伤细胞(natural killer cells, NK细胞)的表面标志,在淋巴结中NK细胞所占比例很小,在我们的实验中各组CD16+56⁺细胞比例均值小于2%且不同诱导方法间不存在显著差异。这也说明了TDLN细胞中起杀伤作用的主要是以CD8⁺T细胞为主体的CTL。

我们在TDLN细胞加IL-2培养体系的基础上,分别用负载肿瘤抗原的DC刺激与用肿瘤冻融抗原刺激的方法进行对比,比较了3组TDLN细胞对LS174T细胞系和A375细胞系杀伤的作用。结果表明,3组TDLN细胞对LS174T细胞系杀伤率均高于对A375细胞系的杀伤率,提示TDLN细胞可能在患者体内已被结肠癌细胞预致敏,具有一定特异性。3组TDLN细胞对LS174T细胞系的杀伤率存在明显差异,在较低效靶比时,肿瘤冻融抗原刺激对杀伤率的影响不显著,但在高效靶比例的情况下,肿瘤冻融抗原刺激的TDLN细胞的杀伤率也有显著提高。说明对结肠腺癌患者的TDLN细胞来说肿瘤抗原联合IL-2的激活效果也优于单纯使用IL-2的方法。我们既往的研究结果显示对胃腺癌患者TDLN细胞冻融肿瘤抗原刺激则无此效果,两者差异可能与结肠癌细胞的抗原性强于胃癌细胞有关^[13]。DC刺激的TDLN细胞对LS14T细胞的杀伤率高于其他两组,说明以自体成熟的DC激活TDLN细胞的方法,优于肿瘤抗原联合IL-2或单纯使用IL-2的方法,各组TDLN细胞对A375细胞的杀伤率相似。说明TDLN细胞对LS174T细胞的杀伤作用具有一定的特异性。有研究证实人实体肿瘤内的肿瘤浸润树突状细胞(TIDC)的研究发现其表型特征与功能成熟的DC明显不同,大多数TIDC不表达或低表达

共刺激因子B7-1(CD80)和B7-2(CD86),而且与正常DC不同的是IL-4, GM-CSF, TNF- α 等细胞因子不能解除肿瘤浸润对DC在B7分子表达上的抑制。这可能是TIDC不能有效激活CTL的原因之一^[3,14]。以体外培养并以自体冻融的肿瘤抗原致敏的DC,代替TDLN细胞中受肿瘤抑制的DC,可增强TDLN细胞的抗肿瘤活性,其效果优于肿瘤抗原联合IL-2或单纯使用IL-2的方法。

4 参考文献

- 1 Santi AD. Lymph node metastases: the Important of the Microenvironment. *Cancer* 2000; 88: 175-179
- 2 Cohen PA, Peng L, Kjaergaard J, Plautz GE, Finke JH, Koski GK, Czerniecki BJ, Shu S. T-cell adoptive therapy of tumors: mechanisms of improved therapeutic performance. *Crit Rev Immunol* 2001; 21: 215-248
- 3 Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JL, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1755-1766
- 4 Pinedo HM, Buter J, Luykx-de Bakker SA, Pohlmann PR, van Hensbergen Y, Heideman DA, van Diest PJ, de Gruijld TD, van der Wall E. Extended neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer combined with GM-CSF: effect on tumour-draining lymph node dendritic cells. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1061-1067
- 5 郭建巍, 秦力维, 吕同德, 杨霄鹏, 刘斌, 昌业伟. 胃癌组织CD1 α 和Survivin表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1425-1428
- 6 陈翔, 汪森明, 孙海, 何威. 结肠癌LS174细胞培养上清对树突状细胞诱导CTL杀伤效应的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1131-1133
- 7 刘剑勇, 吴飞翔, 张春燕, 唐凯, 张力图, 李挺. 树突状细胞对肿瘤浸润淋巴细胞的抗肿瘤活性的影响. *中国肿瘤临床* 2003; 30: 841-843
- 8 李东复, 王艳芬, 杨春荣, 申吉子, 闫峻. 肝癌细胞抗原负载树突状细胞激活TIL的抗肿瘤活性. *中华肝胆外科杂志* 2005; 11: 14-16
- 9 彭正, 李荣, 李力, 张磊, 金婷. 胃肠道腺癌患者与正常人PBMC诱导DC差异性研究. *解放军医学杂志* 2003; 28: 1100-1102, 1106
- 10 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版社, 1996: 186-187
- 11 Li Q, Yu B, Grover AC, Zeng X, Chang AE. Therapeutic effects of tumor reactive CD4⁺ cells generated from tumor-primed lymph nodes using anti-CD3/anti-CD28 monoclonal antibodies. *J Immunother* 2002; 25: 304-313
- 12 Li Q, Grover AC, Donald EJ, Carr A, Yu J, Whitfield J, Nelson M, Takeshita N, Chang AE. Simultaneous targeting of CD3 on T cells and CD40 on B or dendritic cells augments the antitumor reactivity of tumor-primed lymph node cells. *J Immunol* 2005; 175: 1424-1432
- 13 彭正, 李荣, 李力, 张磊, 金婷. 自体树突状细胞体外增强肿瘤患者引流淋巴结细胞抗肿瘤活性的作用. *细胞与分子免疫学杂志* 2004; 20: 595-597, 607
- 14 Dallal RM, Christakos P, Lee K, Egawa S, Son YI, Lotze MT. Paucity of dendritic cells in pancreatic cancer. *Surgery* 2002; 131: 135-138

世界华人消化杂志投稿须知

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版。世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、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、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01。世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号。

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综

述6 000字以内, 研究快报4 000以内字, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

2.2 名词术语 应标准化, 前后统一, 如原词过长且多次出现者, 可于首次出现时写出全称加括号内注简称, 以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准, 药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准, 国家食品药品监督管理局批准的新药, 采用批准的药名; 创新性新药, 请参照我国药典委员会的“命名原则”, 新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用, 如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误, 外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则: (1)有对等词者, 直接采用原有英语词, 如中风stroke, 发热fever; (2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词, 如八法eight principal methods; (3)英语中没有对等词或相应词者, 宜用汉语拼音, 如阴yin, 阳yang, 阴阳学说yinyangology, 人中renzhong, 气功qigong; 汉语拼音要以词为单位分写, 如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸), guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 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核心期刊, 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》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊。世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig. s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H. pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T_{1/2}, Vmax不能Vmax, μ不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数*K*; 一些统计学符号(如样本数*n*, 均数mean, 标准差SD, *F*检验, *t*检验和概率*P*, 相关系数*r*); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如*N*, *O*, *P*, *S*, *d*, *l*)如*n*-(normal, 正), *N*-(nitrogen, 氮), *o*-(ortho, 邻), *O*-(oxygen, 氧, 习惯不译), *d*-(dextro, 右旋), *p*-(para, 对), 例如*n*-butyl acetate(醋酸正丁酯), *N*-methylaniline(*N*-甲基乙酰胺), *o*-cresol(邻甲酚), 3-*O*-methyl-adrenaline(3-*O*-甲基肾上腺素), *d*-amphetamine(右旋苯丙胺), *l*-dopa(左旋多巴), *p*-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写*in vitro*, *in vivo*, *in situ*; *Ibid*, *et al*, *po*, *vs*; 用外文字母代表的物理量, 如*m*(质量), *V*(体积), *F*(力), *p*(压力), *W*(功), *v*(速度), *Q*(热量), *E*(电场强度), *S*(面积), *t*(时间), *z*(酶活性, kat), *t*(摄氏温度, °C), *D*(吸收剂量, Gy), *A*(放射性活度, Bq), *ρ*(密度, 体积质量, g/L), *c*(浓度, mol/L), *φ*(体积分数, mL/L), *w*(质量分数, mg/g), *b*(质量摩尔浓度, mol/g), *l*(长度), *b*(宽度), *h*(高度), *d*(厚度), *R*(半径), *D*(直径), *T*_{max}, *C*_{max}, *V*_d, *T*_{1/2} *CI*等. 基因符号通常用小写斜体, 如*ras*, *c-myc*; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如 30 kDa 改为*M_r* 30 000或30kDa(*M*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); “原子量”应改为相对原子质量, 即*A_r*(*A*大写斜体, *r*小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, *t* =28.4±0.2°C. BP用kPa(mmHg), RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. *M_r*明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改为1 mol/L硫酸, 1

N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10⁻³ g与5×10⁻⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写χ²; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*ν*; (6)样本数用英文小写*n*; (7)概率用英文斜体大写*P*. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^a*P*<0.05, ^b*P*<0.01(*P*>0.05不注). 如同一表中另有一套*P*值, 则^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01; 第三套为^e*P*<0.05, ^f*P*<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字,如1 000-1 500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度,例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字,只允许最后一位有误差,前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如 $3\ 614.5 \pm 420.8$ g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成 3.6 ± 0.4 kg,过多的位数并无意义。又如 8.4 ± 0.27 cm,其SD/3=0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12;1985年4月,写作1985-04;从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00;从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 ≤ 100 ,百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq 1\ 000$,百分数到小数点后1位;余类推。小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末。标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体。

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容,鲜明而有特色,阿拉伯数字不宜开头,不用副题名,一般20个字左右,最好不超过26个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

3.2 作者 论文署名作者不宜过多,一般不超过8人,主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者,对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列,多作者时姓名间用逗号,如是单名,则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献。第一方面是直接参与,包括:(1)酝酿和设计实验;(2)采集数据;(3)分析/解释数据。第二方面是文章撰写,包括:(1)起草文章;(2)对文章的知识性内容作批评性审阅。第三方面是工作支持,包括:(1)统计分析;(2)获取研究经费;(3)行政、技术或材料支持;(4)指导;(5)支持性贡献。每个人必须在第一至第三方面至少具备一条,才能成为文章的署名作者。世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者。

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码。格式如:张旭晨,梅立新,承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如:张旭晨,男,1966-02-26生,河北省定县人,汉族。1994年北京中医药大学硕士,讲师。主要从事消化系统疾病的病理研究。

3.5 基金资助项目 格式如:国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 通讯作者 格式如:通讯作者:马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心。wcjd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅,方便检索,英文题名以不超过10个实词为宜,应与中文题名一致。

作者 署名一般不超过8人。作者姓名汉语拼音拼写法规定为:先名,后姓;首字母大写,双名之间用半字线“-”分开,多作者时姓名间加逗号。格式如:“潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”。

单位 先写作者,后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China
基金资助项目 格式如: Supported by National

World Journal of Gastroenterology
自2005-01-01起为周刊发行,每月7、14、21、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号: 82-261。WJG出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行,每月8、18、28日出版。北京报刊发行局发行,邮发代号:82-262。《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版。免费通过<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文。

Natural Science Foundation of China, No.30224801
通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjcd@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:
摘要 包括目的、方法、结果、结论,书写要求与中文摘要一致。格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象。应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度。研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征。如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准。如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 P ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值),中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨,高瑞丰,李炳庆,马连生,梅立新,吴玉珍,刘凤芹,廖振林.胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. *世界华人消化杂志* 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言;1 材料和方法,1.1 材料,1.2 方法;2 结果;3 讨论;4 参考文献。序号一律左顶格写,后空1格写标题;2级标题后空1格接正文。正文内序号连排用(1), (2), (3)。

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相

关研究的关系。

1 材料和方法 应尽量简短,但应让其他有经验的研究者能够重复该实验。对新的方法应该详细描述,以前发表过的方法引用参考文献即可,有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可。

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示,在结果中应避免讨论。

3 讨论 要简明,应集中对所得的结果做出解释而不是重复叙述,也不应是大量文献的回顾。

图表 图表的数量要精选。表应有表序和表题,并有足够具有自明性的信息,使读者不查阅正文即可理解该表的内容。表内每一栏均应有表头,表内非公知通用缩写应在表注中说明,表格一律使用三线表(不用竖线),在正文中该出现的地方应注出。图应有图序、图题和图注,以使其容易被读者理解,所有的图应在正文中该出现的地方注出。同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图,统一用一个注解分别叙述。如:图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化。A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: …。曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号。统计学显著性用: $^aP<0.05$, $^bP<0.01$ ($P>0.05$ 不注)。如同一表中另有一套 P 值,则 $^cP<0.05$, $^dP<0.01$; 第3套为 $^eP<0.05$, $^fP<0.01$ 。 P 值后注明何种检验及其具体数字,如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等,注在表的左下方。表内采用阿拉伯数字,共同的计量单位符号应注在表的右上方,表内个位数、小数点、±、-应上下对齐。“空白”表示无此项或未测,“-”代表阴性未发现,不能用同左、同上等。表图勿与正文内容重复。表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达。黑白图请附黑白照片,并考入磁盘内;彩色图请提供冲洗的彩色照片,请不要提供计算机打印的照片。彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$,必须使用双面胶条黏贴在正文内,不能使用浆糊黏贴。

致谢 致谢后加冒号,排在讨论后及参考文献前,左齐。

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;

PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准,引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达,请附引用文献网上摘要打印件,包括PMID编号(摘要的左下方)。按顺序编号装订,并考入磁盘内。在引用参考文献页码末尾注明PMID编号;无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者,请附首页复印件)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者), 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。参考文献格式如下:

- 1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gas-troenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]
- 2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863
- 3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450
- 4 尚克中, 陈九如. 胃肠道造影原理与诊断. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部, 所有来稿均需接受同行审阅。

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的。

投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员。审稿过程大约需要1 mo。

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理。录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬)。

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删节时, 本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改。当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

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

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分为题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期; (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分为0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献。

4.7 投稿地址 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>。邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27 国科发信字(95)225号批准国内外公开发行。1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号。2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号。

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!

陈积圣 教授
中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科

陈贻胜 教授
福建省立医院消化内科

陈治水 教授
中国人民解放军第二一一医院中医科

党双锁 副教授
西安交通大学医学院第二附属医院

邓长生 教授
武汉大学中南医院消化内科

杜群 副研究员
广州中医药大学脾胃研究所

房静远 教授
上海交通大学医学院附属仁济医院消化疾病研究所

傅春彬 主任医师
吉化集团公司总医院消化内科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

谷俊朝 主任医师
首都医科大学附属北京友谊医院普外科

管冬元 副教授
上海中医药大学基础医学院实验中医教研室

郭晓钟 教授
沈阳军区总医院消化内科

黄颖秋 教授
本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

黄志勇 副教授
华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心

李靖 副教授
第三军医大学新桥医院肝胆外科

李岩 教授
中国医科大学附属第二医院消化内科

梁力建 教授
中山大学附属第一医院普通外科

刘冰熔 教授
哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科

刘正稳 教授
西安交通大学医学院第一附属医院

禄韶英 主治医师
西安交通大学医学院第一附属医院普外科

吕宾 教授
浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)

任建林 教授
厦门大学附属中山医院消化内科厦门市消化疾病研究所

施瑞华 教授
南京医科大学第一附属医院消化内科

谭学瑞 教授
汕大医学院第一附属医院院长室

王小众 教授
福建医科大学附属协和医院消化内科

王效民 教授
厦门大学附属中山医院肝胆外科

闻勤生 教授
第四军医大学唐都医院消化科

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

徐列明 教授
上海中医药大学肝病研究所

杨希山 教授
广东省中医药局

姚登福 教授
南通大学附属医院分子医学中心

郁宝铭 教授
上海市第八人民医院结直肠外科

张群华 教授
复旦大学华山医院外科

邹小明 教授
哈医大附属第二医院胃肠乳腺外科