PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):273-275
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•述评 COMMENTARY•

肝细胞永生化:进展与挑战

陈耀凯

陈耀凯, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038
陈耀凯, 男, 1966-12-27 生, 河南省固始县人, 汉族.第三军医大学西南医院全军感染病研究所副教授、副主任医师.先后承担及参加国家自然科学基金等基金资助项目5项, 发表综述及论文70篇, 获重庆市及军队科技进步奖各1项.现为多家杂志常务编委、编委及审稿人.
国家自然科学基金资助, No. 30100080
国家自然科学基金资助, No. 30370391
项目负责人: 陈耀凯, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街29号, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. yaokaichen@hotmail.com
电话: 023-68754475-8006 传真: 023-65461319
收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-01-22

摘要

基于活性肝细胞为主要生物成分的肝细胞治疗学已逐渐成为治疗肝衰竭及先天性肝脏代谢性疾病的重要手段，但其关键是获得理想的肝细胞材料.肝细胞永生化是解决肝细胞来源的重要途径之一，这一领域的研究进展较为迅速.目前已经建立的肝细胞株包括肿瘤源性肝细胞株、由正常肝细胞经胶原凝胶夹心培养系统培养后而获得的肝细胞株、由正常肝细胞经转染/转导而获得的肝细胞株，以及p53或p19基因敲除而建立的肝细胞株等.上述肝细胞株多由肝肿瘤细胞衍变而来或经病毒转导而获得，因此存在安全性之虑.另外，多数肝细胞株的分化功能与原代细胞相比有不同程度地下降.为克服上述缺陷，国内外学者开始采用可回复性永生化方法，其基本原理是先将永生化基因SV40T导入原代细胞以获得永生化细胞株，使其获得体外增生能力，然后再以特异性位点重组技术切除SV40T基因，使细胞株回复到永生化前的状态.这样，肝细胞株既具有了永生化特性，又可解决安全性与分化功能差的缺点.从这一技术的发展现状及趋势看，进一步改善载体设计将是近期研究的热点.

关键词: 肝细胞; 永生化

陈耀凯. 肝细胞永生化:进展与挑战. 世界华人消化杂志 2005;13(3):273-275
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/273.asp

0 引言

当前，基于活性肝细胞为主要生物成分的肝细胞治疗学已逐渐成为治疗肝衰竭及先天性肝脏代谢性疾病的重要手段，其中以体外生物人工肝支持系统及肝细胞移植发展最为迅速，而上述疗法成功的关键是获得理想的肝细胞材料.理想的肝细胞应具有以下特征[1]:(1)人源性;(2)表型正常;(3)易于获得;(4)易于培养且能迅速生长至高密度;(5)具有良好的分化状态及成熟肝细胞的全部生物代谢功能.现阶段肝细胞材料在来源、代谢活性及安全性等方面均远未达到理想程度，已成为限制肝细胞治疗学发展的瓶颈问题，这一问题的解决必将大大提升体外生物人工肝支持系统及肝细胞移植的临床实用价值，也将为肝细胞治疗学开辟更广阔的前景.目前研究中使用的肝细胞包括同种肝细胞(人肝细胞)、异种肝细胞(哺乳动物肝细胞)及肝细胞株.理论上讲，人肝细胞(包括成人肝细胞及人胎肝细胞)最为理想，但成人供肝来源极其有限且仅用于肝移植，加之成人肝细胞在体外增生能力差,故大量获得成人肝细胞几无可能.胎肝的利用因涉及伦理问题，亦难以大量推广应用[2-3].动物肝细胞存在发生免疫反应及传播动物病毒的危险[4-5].鉴于上述原因，肝细胞永生化成为解决肝细胞来源的重要途径之一，尽管该方法亦存在诸多问题、面临巨大挑战，但这一领域的进展仍较为迅速，且随着研究策略的不断改进，前景也变得愈加光明.

1 肿瘤源性肝细胞株

原代肝细胞在体外培养时存在生长条件要求严格、存活时间有限、不能增生、传代困难等缺点，而由肝肿瘤细胞衍变而来的肝细胞株在体外培养时增生能力很强，且具有正常肝细胞的某些主要功能.肝肿瘤细胞株 Hep G2细胞株是从肝母细胞瘤分离出来的，具有肝细胞的代谢解毒功能，C3A细胞株由Hep G2衍化而来，具有良好的分泌白蛋白、参与尿素及糖原合成等肝细胞特异性功能.C3A细胞株增生能力极强，在人工肝中空纤维生物反应器中接种2 g细胞，可增生到200 g.将C3A用于治疗狗肝衰竭模型，获得良好疗效，并见人血清白蛋白、甲胎蛋白及凝血因子Ⅴ增高.用C3A人工肝治疗7例Ⅲ-Ⅳ度肝性脑病患者，结果4例脑病症状改善，其中1例存活.肿瘤源性肝细胞株的缺点是安全性问题，另外其特异性功能的分化亦较差，目前多数用于实验研究，仅C3A细胞株少量用于临床治疗.

2 正常肝细胞源性肝细胞株

Kono *et al*[6]从人正常肝组织中分离原代肝细胞，经胶原凝胶夹心培养系统培养后获得细胞株HHY41，该细胞株的获得既未用病毒转导，也未经致癌物处理.HHY41具有典型肝细胞的形态特征，细胞表面有肝细

胞特异性抗原;具有葡萄糖-6-磷酸酶活性，能分泌白蛋白、转铁蛋白、甲胎蛋白等肝特异性蛋白，细胞色素P450活性正常;Northern转印分析证实了胞质内存在白蛋白mRNA，细胞核型与正常肝细胞相同;体外培养时具有快速增生能力.但有学者认为这种肝细胞株很可能是正常肝细胞在体外培养过程中受到病毒感染而导致的永生化，因此同样存在安全性之虑.

3 正常肝细胞经转染/转导而获得的肝细胞株

正常肝细胞经质粒转染或病毒感染而永生化是目前采用较多的永生化方法.Werner *et al*[7]从肝活检标本中分离人肝细胞，经细胞转染试剂将反义pRB及反义p53基因转染入肝细胞而获得肝细胞株HepZ，具有细胞色素P450活性等肝细胞特异性代谢功能，能长期传代且增生能力强.Wege *et al*[8]研究了端粒酶介导的永生化方法对于人胎肝细胞永生化的可行性.端粒酶是一种细胞内核糖核蛋白，对于维持端粒长度及染色体稳定起关键作用，包括人肝细胞在内的体细胞不表达端粒酶活性，因而细胞端粒随细胞周期进行性缩短，最终导致细胞老化.我们利用逆转录病毒将端粒酶逆转录酶(催化亚单位)基因导入人胎肝细胞，并对转导细胞的端粒酶活性、端粒长度、增生能力、肝细胞功能、致瘤性及分化潜能进行了鉴定.结果端粒酶逆转录酶的表达使人胎肝细胞端粒酶活性得以恢复，细胞能保持端粒长度，体外培养中倍增300多倍后仍能保持肝细胞的特异性功能，肝细胞生长因子及受体、转录因子、白蛋白及糖原合成、尿素合成、葡萄糖-6-磷酸酯酶、细胞色素P450活性等均与原代细胞相近.该研究未发现该细胞株的致瘤性，无c-Myc(原癌基因)上调，在免疫缺陷小鼠体内成功定植，初步显示了其安全性.在众多转染/转导方法中，目前应用较多的方法是将SV40T基因导入成熟肝细胞或胚胎肝细胞，该基因可编码SV40大T抗原，后者与细胞生长抑制基因p53、pRB结合使其功能丧失，最终导致细胞永生化.Liu *et al*[9]将SV40T转导入原代猪肝细胞，获得一株非瘤源性、可无限传代且高度分化的猪肝细胞株.该细胞株可连续培养传代2 a，氨甲酰磷酸合成酶(尿素循环的关键酶)、细胞角蛋白(CK)18、P450代谢活性、白蛋白合成能力等特征性标志仍保持完好.Allain *et al*[10]利用逆转录病毒载体将SV40T基因导入具有双表型(肝细胞表型与胆管上皮细胞表型)的原代猕猴胎肝上皮细胞，获得永生化细胞株.这种细胞株在体外培养时可无限生长，表达肝上皮细胞标志CK8、CK18，肝细胞特异性标志白蛋白、甲胎蛋白，胆管细胞特异性标志CK7、CK19，内源性端粒酶持续表达.将细胞株通过无胸腺小鼠门静脉移植后，约50%的外源细胞整合入肝实质，且无致瘤性.3 wk后，定植于肝实质的外源细胞表达白蛋白与甲胎蛋白，但不表达CK19，表明双潜能的细胞株已经分化为肝细胞.总体看来，经转染/转导而获得的肝细胞株特异性功能分化较好，但由于病毒基因及其他外源性基因留在肝细胞内，并未解决肝细胞株的安全性问题.

4 基因敲除的永生化肝细胞株

一些学者采用p53或p19基因敲除方法使肝细胞永生化，p53基因敲除可使细胞周期越过Hayflick极限而永生化，p19基因缺失调低了p53基因的生长抑制功能从而使细胞永生化.Dumble *et al*[11]利用p53基因敲除小鼠建立了一株永生化的肝卵圆细胞株，与原代肝卵圆细胞基因表达及表型相近，在无胸腺裸鼠体内可形成肿瘤.Mikula *et al*[12]从p19基因敲除小鼠肝脏分离建立了肝细胞株MIM，该细胞株表达肝细胞的特异性标志，植入肝损伤SCID小鼠脾脏后可在肝脏定植并增生，表明细胞株参与了肝组织重建.理论上，基因敲除的肝细胞株可能会由于p53或p19基因的敲除而丧失其基因稳定性，因而这种肝细胞株的安全性尚需进一步研究.

5 可回复肝细胞株

近几年来，国外学者设计了一种可回复性永生化程序(reversible immortalization)，为解决细胞材料问题提供了新的思路及手段.其基本原理是先将永生化基因SV40T导入原代细胞以获得永生化细胞株，使其获得体外增生能力，然后再以特异性位点重组技术切除SV40T基因，使细胞株回复到永生化前的状态(图1)，这样细胞既得到了增生又不具有致癌性及病毒感染的可能性.目前这一方法已被用于人生肌细胞、人肝窦内皮细胞、人肝细胞及其他哺乳动物体细胞的永生化[4, 13-19].Kobayashi *et al*[4, 16]采用该方法建立的肝细胞株具有肝实质细胞的形态学特征及肝细胞特异性功能基因，再利用腺病毒或逆转录病毒载体将重组酶Cre基因导入，SV40T基因被成功切除，细胞株回复到永生化前的状态，这种由肝细胞株回复而来的

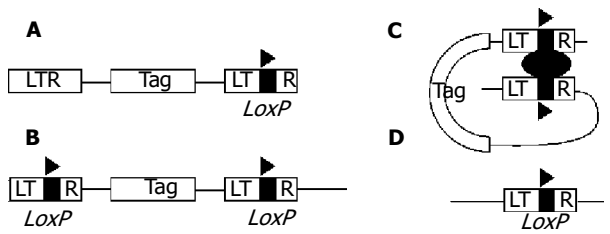


图1 特异性基因位点重组原理. A: 逆转录病毒载体; B: 整合原病毒; C: Cre介导位点重组; D: 重组后剩余载体序列.

细胞称为回复肝细胞(reverted hepatocytes).Weber *et al* 还利用可回复性永生化方法建立了猴肝祖细胞株，该细胞株具有双向分化潜能，同时表达肝细胞及胆管细胞表型.将细胞株植入无胸腺小鼠体内，50%左右的细胞定植成功，数天后停止增生并向肝细胞分化.采用表达Cre的逆转录病毒感染后细胞即停止生长并老化死亡.

6 今后的研究策略

与传统永生化方法相比，可回复性永生化显然具有较大的优势.但该方法目前仍存在一些缺陷:细胞必须经过两次病毒载体转导;不能保证永生化基因的彻底清除;第二次转导后重组酶基因留在细胞内，仍有可能与内源性序列发生重组导致染色体移位等;对重组酶活性不能实施有效控制.从这一技术的发展现状及趋势看，进一步改善载体设计将是近期研究的热点.我们曾提出采用一种新策略构建逆转录病毒载体(图2)，并以此实现人胎肝细胞的永生化与回复.主要特点是:(1)将永生化基因SV40T与重组酶Cre基因置于同一载体，转导一次完成;(2)SV40T与Cre均位于两个LoxP位点之间，将一同被切除;(3)Cre基因与雌激素受体(ER)配体结合区(LBD)编码基因构成融合基因，其产生融合蛋白(由Cre重组酶与LBD组成)的酶活性受配体(雌二醇，E_2)控制，因而可通过E_2控制Cre重组酶;(4)潮霉素磷酸转移酶与单纯疱疹病毒胸苷激酶的融合基因(HyTK)将使少数未发生重组的细胞在昔洛韦(GCV)的选择下死亡，进一步保证了回复肝细胞的安全性.对这一设想的研究目前仍在进行中，虽取得了一些重要进展，但尚未达到最终目标.

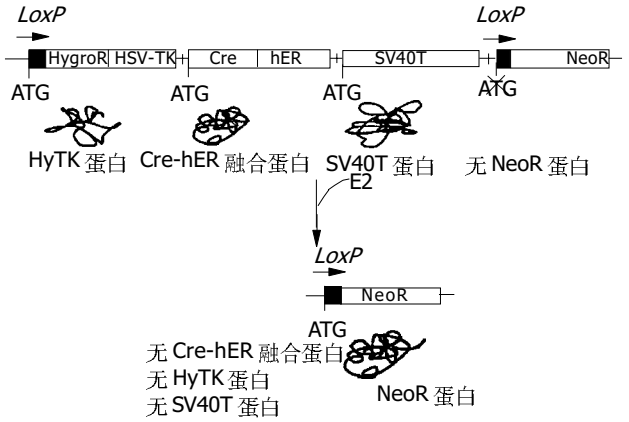


图2 本项目载体构建策略.

7 参考文献

1 Jauregui HO. The technology of biological extracorporeal liver assist devices: from infancy to adolescence. *Artif Organs* 1997;21:1163-1168

2 Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, McGavran L, Ostrowska A, Durham J. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 2000;6:32-40

3 Davenport A. Artificial hepatic support. Where are we now? *Blood Purif* 2001;19:1-3

4 Kobayashi N, Okitsu T, Nakaji S, Tanaka N. Hybrid bioartificial liver:establishing a reversibly immortalized human hepatocyte line and developing a bioartificial liver for practical use. *J Artif Organs* 2003;6:236-244

5 Tsiaoussis J, Newsome PN, Nelson LJ, Hayes PC, Plevris JN. Which hepatocyte will it be? Hepatocyte choice for bioartificial liver support systems. *Liver Transpl* 2001;7:2-10

6 Kono Y, Yang S, Letarte M, Roberts EA. Establishment of a human hepatocyte line derived from primary culture in a collagen gel sandwich culture system. *Exp Cell Res* 1995;221:478-485

7 Werner A, Duvar S, Muthing J, Buntemeyer H, Kahmann U, Lunsdorf H, Lehmann J. Cultivation and characterization of a new immortalized human hepatocyte cell line, HepZ, for use in an artificial liver support system. *Ann N Y Acad Sci* 1999;875:364-368

8 Wege H, Le HT, Chui MS, Liu L, Wu J, Giri R, Malhi H, Sappal BS, Kumaran V, Gupta S, Zern MA. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology* 2003;124:432-444

9 Liu J, Pan J, Naik S, Santangini H, Trenkler D, Thompson N, Rifai A, Chowdhury JR, Jauregui HO. Characterization and evaluation of detoxification functions of a nontumorigenic immortalized porcine hepatocyte cell line(HepLiu). *Cell Transplant* 1999;8:219-232

10 Allain JE, Dagher I, Mahieu-Caputo D, Loux N, Andreoletti M, Westerman K, Briand P, Franco D, Leboulch P, Weber A. Immortalization of a primate bipotent epithelial liver stem cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3639-3644

11 Dumble ML, Croager EJ, Yeoh GC, Quail EA. Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells:oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2002;23:435-445

12 Mikula M, Fuchs E, Huber H, Beug H, Schulte-Hermann R, Mikulits W. Immortalized p19ARF null hepatocytes restore liver injury and generate hepatic progenitors after transplantation. *Hepatology* 2004;39:628-634

13 Berghella L, De Angelis L, Coletta M, Berarducci B, Sonnino C, Salvatori G, Anthonissen C, Cooper R, Butler-Browne GS, Mouly V, Ferrari G, Mavilio F, Cossu G. Reversible immortalization of human myogenic cells by site-specific excision of a retrovirally transferred oncogene. *Hum Gene Ther* 1999;10:1607-1617

14 Noguchi H, Kobayashi N, Westerman KA, Sakaguchi M, Okitsu T, Totsugawa T, Watanabe T, Matsumura T, Fujiwara T, Ueda T, Miyazaki M, Tanaka N, Leboulch P. Controlled expansion of human endothelial cell populations by Cre-loxP-based reversible immortalization. *Hum Gene Ther* 2002;13:321-334

15 Kobayashi N, Noguchi H, Westerman KA, Matsumura T, Watanabe T, Totsugawa T, Fujiwara T, Leboulch P, Tanaka N. Efficient Cre/loxP site-specific recombination in a HepG2 human liver cell line. *Cell Transplant* 2000;9:737-742

16 Kobayashi N, Noguchi H, Fujiwara T, Tanaka N. Establishment of a reversibly immortalized human hepatocyte cell line by using Cre/loxP site-specific recombination. *Transplant Proc* 2000;32:1121-1122

17 Kobayashit N, Tanaka N. Engineering of human hepatocyte lines for cell therapies in humans: prospects and remaining hurdles. *Cell Transplant* 2002;11:417-420

18 Salmon P, Oberholzer J, Occhiodoro T, Morel P, Lou J, Trono D. Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol Ther* 2000;2:404-414

19 Sato Y, Endo H, Ajiki T, Hakamata Y, Okada T, Murakami T, Kobayashi E. Establishment of Cre/LoxP recombination system in transgenic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:1197-1202

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):276-279
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•述评 COMMENTARY•

肝包虫囊肿周围纤维囊壁病理结构的再认识

彭心宇, 吴向未, 张示杰, 牛建华

彭心宇, 吴向未, 张示杰, 牛建华, 石河子大学医学院第一附属医院普外一科, 新疆地方与民族高发性疾病省部共建教育部重点实验室
新疆维吾尔族自治区 832008
国家自然科学基金资助项目, No. 30260108
新疆生产建设兵团科研攻关课题, No. NKB01SDXNK30YX
彭心宇, 男, 1959-01-06生, 湖南省祁东县人, 汉族.1989年武汉同济医科大学外科学硕士毕业, 教授.主要从事普通外科, 专于肝胆胰疾病临床研究.
项目负责人: 彭心宇, 832008, 新疆维吾尔族自治区, 石河子大学医学院第一附属医院普外一科. pengxy2000@yahoo.com
电话: 0993-2859449 传真: 0993-2859443
收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-01-20

摘要

肝包虫病又称肝棘球蚴病，是畜牧地区的地方性流行性寄生虫病.肝包虫病有两种类型，一种是细粒棘球蚴引起的细粒棘球蚴病，亦称肝囊性包虫病;另一种是泡状棘球蚴感染所致的泡状棘球蚴病，前者多见.目前药物治疗肝囊性包虫病尚不确切，确诊后需手术治疗.在外科实践中发现，肝包虫囊肿周围纤维性囊壁中，肝包虫外囊与肝实质间还存在着一层新的膜样纤维结构,外囊与此膜之间有一新的潜在可分离间隙,沿此间隙可完整摘除包虫囊肿及外囊，这是传统理论所不能解释的.通过病理组织学、免疫组织化学及分子生物学等技术,证实了这层新的膜样纤维结构的存在,并初步对肝包虫囊肿周围纤维囊壁病理结构形成机制提出了新的认识.

关键词: 肝色虫病; 囊肿; 纤维囊壁

彭心宇, 吴向未, 张示杰, 牛建华. 肝包虫囊肿周围纤维囊壁病理结构的再认识. 世界华人消化杂志 2005;13(3):276-279
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/276.asp

0 引言

肝包虫病(hepatic hydatid disease)是人类感染棘球绦虫的幼虫所致的疾病，故又称肝棘球蚴病，是一种严重危害人类健康和畜牧业发展的人畜共患寄生虫病,临床以细粒棘球蚴病最为常见.新疆是高发区[1].近年来随着诸多因素的影响，包虫病已成为全世界流行性疾病，并带来了世界范围的公共卫生和经济等一系列问题.业已引起了国内外医疗卫生行业的高度重视，因为该病的预防难度极大,临床治疗显得尤为重要.由于受传统肝包虫囊肿周围纤维囊壁病理理论的束缚，近年来，在一些国家开展的肝包虫外囊完整切除这一根治性术式无法普及.实践中发现，肝包虫囊肿周围纤维囊壁分层的现象是传统理论所不能解释的，显然有必要重新认识肝包虫囊肿周围纤维囊壁病理结构.

1 肝包虫病外科治疗现状

目前尚无有效药物治疗肝包虫病，故外科手术治疗仍为首选[2-3].传统的内囊摘除术在肝包虫病的治疗上有着很重要的历史地位，他具有操作简单、安全、便于开展等许多优越之处，但同时也存在许多不足之处，主要有术后复发率、残腔并发症高和术中发生过敏等.由于目前尚无既能杀死包虫头节又不损伤机体和周围健康肝组织的有效制剂，因此，在内囊摘除的过程中，难免出现包虫头节的外溢和残留，这是术后复发率高的重要原因，各家报道在4.5-20.2%[4-7].此外，残腔由一层致密的纤维组织构成，其抗感染和愈合能力远不及健康肝组织，加之常伴有胆漏，必然导致很高的残腔并发症(10.8-65.8%)[5, 8-9]，如残腔感染、积液、胆漏等，术后患者长期带管引流，极大地影响了手术的疗效和患者术后的生存质量.再次,术中包虫液外溢会引起过敏性休克，甚至死亡.经皮穿刺介入手段同样也存在剖腹内囊摘除术所存在的问题，极大地影响了肝包虫患者的疗效和生存质量.

随着医学的发展和肝脏外科技术的提高，肝切除术技术日益普及，手术并发症和死亡率已明显降低.针对肝包虫内囊摘除术所存在的问题，近年来提出应用肝切除技术一次完整切除包虫内外囊的“根治性手术”的概念[10]，但对于肝脏的良性疾病是否有必要行肝切除各家意见不一.因此，有人提出在有条件地区可行肝切除术，无条件的地区行内囊摘除术.为了尽可能多保留正常肝组织，有人又提出肝包虫囊肿完整切除术(即紧靠包虫外囊壁完整切除)，他即解决了术后复发、并发症两大难题也避免了术中过敏的问题，但增加了手术的难度和风险，因其肝脏创面往往大于常规肝切除术;同时，也增加了损伤被挤压在外囊周围的肝内重要管道的风险，增加术后并发症(17.1-19.7%)及死亡率(1-2%)[11-13].

可见，肝包虫病外科治疗的方法很多，且各有利弊.内囊摘除术及一些“微创术式”有高复发、高残腔并发症的不足，但操作简单、手术风险低;而“根治性术式”很好地解决了复发、残腔并发症问题，却增加了手术难度和风险.因此，寻找一种低复发、低残腔并发症且操作简单、安全的手术方法成为目前肝包虫病治疗的主要研究课题之一.

自1999年开展了肝包虫根治性手术，在实践中发现，在肝包虫外囊与肝实质间还存在着一层新的模样纤维结构-“外膜”，外囊与“外膜”间有一新的潜在可分离间隙，沿此间隙可完整摘除外囊-“肝包虫外膜内完整摘除术”[14]. 该术式从根本上解决了包虫病复发和残腔并发症的问题，而且最大程度地减少了手术对肝实质的损伤并降低了手术的风险. 上述发现是传统理论不能解释的.

2 肝包虫囊肿周围纤维囊壁形成机制的传统观点

目前，对肝包虫囊肿周围纤维囊壁形成机制的认识观点略有差异. 吴少廷[15]认为“细粒棘球蚴寄生定位于肝脏后，发育成囊肿，并不断增大，挤压周围肝实质致成纤维细胞不断增生，逐渐形成胶原纤维和纤维包膜即外囊，外囊是肝实质纤维化的结果”. Farrokh[16]认为“外囊是一层被挤压的非上皮细胞化的纤维组织，他与周围肝实质之间无解剖性分离间隙”. 顾树南[17]提出，“细粒棘球蚴寄生定位于肝脏后，由于人体免疫功能及肝脏的屏蔽作用，在棘球蚴周围的局部组织首先发生异物反应，炎性细胞包括嗜酸性粒细胞，浆细胞及多核巨细胞浸润渗出，由新生的成纤维细胞形成纤维结缔组织包膜，包裹在棘球蚴周围，形成外囊，这种纤维性的外囊与所寄生的肝脏组织无明显的分界不能分开. 外囊壁并非虫体，而是人体脏器组织发生局部纤维化所形成的屏壁”. Milicevic[18]认为肝包虫囊肿的外囊来源于宿主器官组织，内部包裹着血管及一些小的胆管，外层为挤压萎缩的肝细胞. 他与周围肝实质之间无明确界线，故外囊切除是非常困难的.

上述观点均支持外囊是人体防御反应和肝实质纤维化的结果，按此理论可推断:(1)肝实质移行至外囊为逐渐纤维化的过程，肝实质与外囊是不可分的. (2)当包虫突出肝表面后，肝表面外的包虫外囊将失去肝实质的不断纤维化作用，也将失去大部分来之于肝实质的营养供应，突出肝表面的包虫外囊囊壁应比肝实质内包虫外囊囊壁生长慢且壁薄. 然而，我们观察到的现象却恰恰相反:(1)外囊与肝实质间存在另一层纤维结构即“外膜”，且外囊与“外膜”的移行为突变，分界明确并可分离. (2)突出肝表面的包虫外囊仍在继续生长且厚度与肝实质内的外囊相当. 此外，我们还观察到其他脏器(如腹腔包虫，脾包虫等)的包虫外囊结构与肝包虫外囊相同. 可见传统肝包虫外囊形成机制的理论不准确.

因此，我们认为，肝包虫外囊为一层机体受虫体刺激后而新生的纤维结构，并有其独立的生长调节机制. 随着包虫的不断增大其周围的肝细胞受压出现变性，坏死并被组织所吸收，而肝内的Glisson系统和肝静脉系统及其所属纤维结构被挤压在外囊的周围，同时不断增生进而形成了术中所见到的“外膜”. 为了验证这种假设，通过肝纤维化相关因子:Ⅳ型胶原、纤维连接蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)、转化生长因子-β1(TGF-β1)及肿瘤坏死因子-α(TNF-α)在肝包虫囊肿周围纤维囊壁及其邻近肝实质中的表达情况，并结合病理形态学观察，来探讨肝包虫外囊、“外膜”以及二者之间潜在可分离间隙的形成机制.

3 肝纤维化的形成机制及其相关因子

肝纤维化是指肝脏内纤维性结缔组织异常增生，是一个慢性、渐进性的过程，其机制是肝脏细胞合成细胞外基质(ECM)产生过量和降解减少，导致ECM在肝脏沉积，形成纤维化，包括肝内管道系统的纤维化和肝实质的纤维化. Ⅳ型胶原、FN、LN、TGF-β1和TNF-α等细胞因子是目前公认的反映ECM代谢、肝纤维化与否的较为敏感指标. Ⅳ型胶原在ECM沉积增多是肝纤维化早期阶段的病理改变，并启动参与肝纤维化的各种因子，继而导致Ⅰ、Ⅲ型胶原沉积[19-23]. FN为非胶原糖蛋白，能通过纤维母细胞表面黏附受体将信息传入细胞内，在肝纤维化过程中起着“起搏点”样启动作用. 肝纤维化时，肝组织中FN明显增加[24-25]. LN是ECM中的主要糖蛋白，大量沉积则引起肝窦毛细血管化，并可反映肝窦的毛细血管化和汇管区纤维化的范围[20-23]. 大量的临床实验表明在众多的细胞因子中，TGF-β1对肝纤维化的作用最为重要. 其由肝脏细胞、单核巨噬细胞产生，通过旁分泌和自分泌作用使贮脂细胞(FSC)中胶原基因的转录增加，刺激FSC增生、激活ECM合成，又抑制胶原降解酶类的合成，同时刺激胶原酶抑制物的合成，因而是强有力的促纤维增生细胞因子[26-31]. 原位杂交显示TGF-β1 mRNA出现在炎症和肝纤维化区[32]. 肿瘤坏死因子-α(TNF-α)主要由肝脏细胞、单核巨噬细胞产生，有抗肿瘤、调节免疫和代谢的生物学作用，可直接抑制贮脂细胞胶原合成和对抗TGF-β1诱导的胶原合成，刺激胶原酶合成从而促进胶原降解，有调节肝纤维化发生与发展的作用[33-34].

4 肝包虫囊肿周围纤维囊壁分层的实验证据

通过研究显示:大体病理组织学观察在肝包虫外囊与肝实质之间还存在着另一层明确的纤维膜即“外膜”，肝包虫囊肿外周的外囊、“外膜”二者层次清晰而非渐变;外囊与“外膜”之间可分离间隙存在. 外囊为灰白色，厚约0.5-2 cm，未见血管，外囊紧密包裹虫体(内囊)，内面可成片的坏死絮状物，质地坚硬. 突出肝表面的外囊厚度(0.70 ± 0.10 cm)与肝

实质内的外囊厚度(0.75±0.12 cm)相当(P>0.05).切除外囊后，可见肉红色“外膜”，厚约0.1-0.5 cm，内见粗大的血管、胆管走行，质地柔韧.突出肝表面的“外膜”厚度(0.12±0.05 cm)小于肝实质内的“外膜”厚度(0.35±0.09 cm)(P<0.05).苏木素-伊红染色镜下病理组织学观察显示肝包虫外囊与肝实质之间“外膜”明确存在，外囊、“外膜”界限清晰，为突变.外囊为一层致密、排列紊乱的纤维组织，常玻璃样变(6/40)和不同程度的钙化(5/40)，无血管.外囊虫体侧可见成片的纤维素坏死区.周围有单核细胞、淋巴细胞及嗜中性粒细胞浸润.突出肝表面的外囊与肝实质内的外囊病理形态一致.而“外膜”为肝组织与外囊之间一层排列规律的增生纤维膜，疏松或致密排列，无玻璃样变和钙化.其内有较多扩张小血管、小胆管、神经、小淋巴管及淋巴细胞散在浸润.小叶间胆管扩张，淋巴、浆细胞浸润.“外膜”与邻近受挤压的肝汇管区、肝静脉系统无明确界限，并与Glisson鞘相延续.Ⅳ型胶原、FN和LN免疫组织化学染色结果显示:表达主要定位在“外膜”及其邻近汇管区，呈棕黄色片状分布;肝细胞未见明确表达;外囊偶有表达，且多为浅黄色散在分布;外囊与“外膜”染色分界清晰.三个指标在“外膜”和邻近汇管区表达阳性率均无显著差异.三个指标在外囊表达阳性率均显著低于“外膜”.此外，三个指标在外囊和“外膜”表达阳性分级程度的差异也有显著意义.原位杂交结果显示:TGF-β1mRNA和TNF-α mRNA表达主要定位在“外膜”和邻近汇管区内的单核细胞、巨噬细胞和嗜中性粒细胞及其邻近肝细胞胞质中，呈棕褐色颗粒状;外囊偶有表达.TGF-β1mRNA和TNF-α mRNA 在“外膜” 阳性细胞率的表达均显著高于外囊.此外，TGF-β1的表达多为成簇片状分布;而TNF-α的表达多为散在分布.二者在“外膜”、邻近汇管区和肝细胞中的表达均有显著差异.

5 肝纤维化与“外膜”的形成

评价肝纤维化的众多细胞因子中，Ⅳ型胶原、FN、LN 、TGF-β1和TNF-α等被公认是较为敏感指标.免疫组织化学染色结果显示:Ⅳ型胶原、FN和LN在“外膜”表达阳性率均显著高于外囊(P<0.01);三个指标在“外膜”和外囊表达阳性分级程度的差异也有显著性(P<0.05);同时，原位杂交结果显示:TGF-β1mRNA和TNF-α mRNA 在“外膜”阳性细胞率的表达均显著高于外囊(P<0.01)，均提示肝纤维化与“外膜”的形成相关.此外，突出肝表面包虫“外膜”的厚度低于肝实质内的“外膜”也间接证明“外膜”与肝组织的纤维化有关.

肝纤维化包括肝内管道系统的纤维化和肝实质的纤维化.研究结果发现:(1)镜下病理组织学观察到的“外膜”内可见较多扩张小血管、小胆管、神经、小淋巴管，“外膜”与邻近受挤压的肝汇管区、肝静脉系统无明确界限，并与Glisson鞘相延续;(2)免疫组织化学和原位杂交结果显示的上述肝纤维化指标在“外膜”和邻近汇管区表达无显著差异，提示“外膜”主要来源于肝内管道系统(Glisson系统、肝静脉系统)的纤维化.

6 人体防御反应与外囊的形成

研究发现肝包虫外囊与“外膜”病理组织形态有差异，且二者间分界明确;肝纤维化指标在外囊与“外膜”表达有差异，且二者间染色分界明确，提示外囊与“外膜”的形成机制不同.肝纤维化指标在外囊低表达;突出肝表面的包虫外囊已失去肝脏的纤维化作用，但仍在继续生长且厚度与肝实质内的外囊一样，表明肝组织的纤维化不是外囊形成的主要原因，外囊有其独立的生长调节机制.镜下病理组织学显示外囊为一层致密、排列紊乱的纤维组织，囊壁靠虫体侧可见成片的坏死区，周围有单核细胞、淋巴细胞及嗜中性粒细胞浸润.刘瑾厚*et al*发现外囊内可见包绕虫体的角皮层碎片、上皮样细胞及多核巨细胞浸润，形成规则的肉芽肿样改变，周围有单核细胞、淋巴细胞及嗜中性粒细胞浸润.提示外囊可能为棘球蚴寄生定位于宿主脏器后，宿主由于其免疫功能而发生异物反应，形成肉芽肿样组织并不断纤维化增生的结果.外囊应是机体受虫体刺激后新生出的纤维结构，而不是真正意义上的肝组织的纤维化.

7 外囊与“外膜”之间潜在可分离间隙的形成机制

外囊与“外膜”之间潜在可分离间隙的形成机制主要为:(1)外囊与“外膜”的形成机制不同:“外膜”主要来源于肝内管道系统(Glisson系统、肝静脉系统)的纤维化.外囊应是机体受虫体刺激后，由人体防御反应而新生出的纤维结构.(2)质地不同:“外膜”的内容物主要为管道组织，质地柔韧.外囊常出现坏死、玻璃样变性，且常有钙化，质地坚硬.(3)外囊与“外膜”之间无血管穿行.镜下病理组织学观察“外膜”富含血管，外囊内未见血管，外囊与“外膜”之间无血管穿行.

8 临床应用

目前，已成功地沿外囊与“外膜”间潜在可分离间隙完整摘除外囊与虫体百余例，验证了该新理论并证实了外囊完整摘除的可行性.临床观察显示:该术式可彻底治愈肝包虫病，又不损伤肝包虫囊肿周围的

管道组织(血管、胆管)，最大限度地减少了术中出血以及手术对肝组织的损伤，同时避免了术后复发和残腔并发症，兼具操作简单、手术风险低和复发率、残腔并发症低的优点.

9 展望

上述研究尚属初步，对于外囊与“外膜”层生长的动态观察、邻近包虫囊肿肝细胞的调亡在外囊与“外膜”形成过程中的作用、肝包虫病不同病理类型人体局部组织的反应、人体其他脏器局部组织的反应等有待于进一步研究.

10 参考文献

1 Al Karawi MA, El-Shickh Mohamed AR, Yasawi ML. Advance in diagnosis and management of hydatid disease. *Hepatogastroenterology* 1990;37:327-331

2 Gil-Grande LA, Boixeda D, Garcia-Hoz F, Barcena R, Lledo A, Suarez E, Pascasio JM, Moreira V. Treatment of liver hydatid disease with mebendazole:a prospective study of thirteen cases. *Am J Gastroenterol* 1983;78:584-588

3 Morris DL. Pre-operative albendazole therapy for hydatid cyst. *Br J Surg* 1987;74:805-806

4 徐明谦. 1314例肝包虫病临床分析. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 1993;11:215-218

5 Uhl W, Loffler H, Zimmermann A, Tcholakov O, Gloor B, Buchler MW. Surgical treatment of echinococcosis of the liver. *Swiss Surgry* 1999;5:126-132

6 Akin ML, Erenoglu C, Uncu EU, Basekim C, Batkin A. Surgical management of hydatid disease of the liver:a military experience. *J R Army Med Corps* 1998;144:139-143

7 Safioleas M, Misiakos E, Manti C, Katsikas D, Skalkeas G. Diagnostic evaluation and surgical management of hydatid disease of the liver. *World J Surg* 1994;18:859-865

8 Demirci S, Eraslan S, Anadol E, Bozatli L. Comparison of results of different surgical techniques in the management of hydatid cysts of the liver. *World J Surg* 1989;13:88-90

9 Nazyrov FG, Vakhidov AV, Ilkhamov FA, Abdurakhmanov BA. The surgical treatment of echinococcosis of the diaphragmatic surface of the liver. *Khirurgiia* 1999;6:35-37

10 Gonzalez EM, Meneu-Diaz JC, Moreno-Elola A. Echinococcal Cysts: Personal approach to the surgical treatment of echinococcal cysts. In: Baker RJ, Fischer JE. Mastery of surgery. 4th ed. *Philadelphia:Lippincott Williams Wilkins Inc* 2001:1100-1107

11 Cangiotti L, Giulini SM, Muiesan P, Nodari F, Begni A, Tiberio G. Hydatid disease of the liver:long term results of surgical treatment. *G Chir* 1991;12:501-504

12 Alfieri S, Doglietto GB, Pacelli F, Costamagna G, Carriero C, Mutignani M, Liberatori M, Crucitti F. Radical surgery for liver hydatid disease:a study of 89 consecutive patients. *Hepatogastroenterology* 1997;44:496-500

13 Prousalidis J, Tzardinoglou E, Kosmidis C, Katsohis K, Aletras O. Surgical management of calcified hydatid cysts of the liver. *HPB Surg* 1999;11:253-259

14 彭心宇, 张示杰, 牛建华, 吴向未, 潘惠忠, 莫拉提, 陈裕, 杨宏强. 肝包虫外膜内完整摘除术. 中华普通外科杂志 2002;17:529-530

15 吴少廷. 包虫病. 梁扩寰. 肝脏病学. 第1版. 北京人民卫生出版社, 1995:870-876

16 Saidi F. Echinococcal cysts:etiology, diagnosis, complications, and medical and surgical treatment. In:Baker RJ, Fischer JE. Mastery of surgery. 4th ed. *Philadelphia:Lippincott Williams Wilkins Inc* 2001:1082-1099

17 顾树南, 黄志强. 肝包虫囊肿手术. 腹部外科手术学. 第1版. 长沙:湖南科学技术出版社, 2001:639-649

18 Milicevic MN. Hydatid disease. In:L. H. Blumgart. Surgery of the Liver and Biliary Tract. 3rd ed. *Health Science Asia, Elservier Science* 2001:1167-1204

19 王要军, 孙自勤. 肝窦内皮细胞与纤维化. 临床肝胆病杂志 1996;12:115

20 Ryhanen L, Stenback F, Ala-Kokko L, Savolainen ER. The effect of malotilate on type III and type IV collagen IV, laminin and fibronectin metabolism in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in the rat. *J Hepatol* 1996;24:238-245

21 Nakayama Y, Takahara T, Miyabayashi CR, Itoh H, Watanabe A, Sasaki H, Muragaki Y, Ooshima A, Inoue K. Ultrastructural localization of type IV collagen IV and laminin in the Disse space of rat liver with carbon tetrachloride induced fibrosis. *Liver* 1991;11:260-271

22 Murawaki Y, Ikuta Y, Koda M, Yamada S, Kawasaki H. Comparison of serum 7S fragment of type IV collagen IV and serum central triple-helix of type IV collagen IV for assessment of liver fibrosis in patients with chronic viral liver disease. *J Hepatol* 1996;24:148-154

23 Tsutsumi M, Takase S, Urashima S, Ueshima Y, Kawahara H, Takada A. Serum markers for hepatic fibrosis in alcoholic liver disease:which is the best marker, type III procollagen IV, type IV collagen IV, laminin, tissue inhibitor of metalloproteinase, or prolyl hydroxylase? *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20:1512-1517

24 Simon K, Zalewska M, Gladysz A, Rotter K, Piszko P, Glowacki A. Plasma fibronectin in chronic liver disease-marker of fibrosis? *Przegl Lek* 1995;52:129-132

25 Yamauchi M, Nakajima H, Ohata M, Hirakawa J, Mizuhara Y, Nakahara M, Kimura K, Fujisawa K, Kameda H. Detection of fibronectin receptor in sera:Its clinical significance as a parametar of hepatic fibrosis. *Hepatology* 1991;14:244

26 Lebensztejn DM, Sobaniec-Lotowska M, Kaczmarski M, Werpachowska I, Sienkiewicz J. Serum concentration of transforming growth factor(TGF)-beta 1 does not predict advanced liver fibrosis in children with chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology* 2004;51:229-233

27 Akahoshi T, Hashizume M, Tanoue K, Shimabukuro R, Gotoh N, Tomikawa M, Sugimachi K. Role of the spleen in liver fibrosis in rats may be mediated by transforming growth factor beta-1. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:59-65

28 Nakamura T, Sakata R, Ueno T, Sata M, Ueno H. Inhibition of transforming growth factor beta prevents progression of liver fibrosis and enhances hepatocyte regeneration in dimethylnitrosamine-treated rats. *Hepatology* 2000;32:247-255

29 Rieder H, Armbrust T, Meyer zum Buschenfelde KH, Ramadori G. Contribution of sinusoidal endothelial liver cells to liver fibrosis: expression of transforming growth factor-beta 1 receptors and modulation of plasmin-generating enzymes by transforming growth factor-beta 1. *Hepatology* 1993;18:937-944

30 Qi Z, Atsuchi N, Ooshima A, Takeshita A, Ueno H. Blockade of type beta transforming growth factor signaling prevents liver fibrosis and dysfunction in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2345-2349

31 Okuno M, Moriwaki H, Imai S, Muto Y, Kawada N, Suzuki Y, Kojima S. Retinoids exacerbate rat liver fibrosis by inducing the activation of latent TGF-β in liver stellate cells. *Hepatology* 1997;26:913

32 Annoni G, Weiner FR, Zern MA. Increased transforming growth factor-beta 1 gene expression in human liver disease. *J Hepatol* 1992;14:259-264

33 贾继东, 王惠吉, 漆德芳. 肝纤维化. 肝硬化. 第1版. 北京: 北京科学技术出版社, 2000:85-112

34 Itamura K, Nakamoto Y, Akiyama M, Fujii C, Kondo T, Kobayashi K, Kaneko S, Mukaida N. Pathogenic roles of tumor necrosis factor receptor p55-mediated signals in dimethylnitrosamine-induced murine liver fibrosis. *Lab Invest* 2002;82:571-583

编辑 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):280-285
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•述评 COMMENTARY•

续述幽门螺杆菌感染与胃肠激素的联系

黄象谦

黄象谦, 天津医科大学总医院消化内科 天津市 300052
黄象谦, 男, 1923-07-03 生, 山东省即墨市人, 汉族.1951 年南京大学医学院本科毕业, 教授.主要从事消化内科.
项目负责人: 黄象谦, 300052, 天津市, 天津医科大学总医院消化内科.
电话: 022-60363615
收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-01-24

摘要

文献复习近4 a来幽门螺杆菌感染时有关胃肠激素的研究.涉及的疾病有萎缩性胃炎、胃癌、MALT 淋巴瘤、大肠癌、肺癌、胃溃疡等.涉及的激素主要是促胃液素，还有 Ghrelin、生长抑素、促胆囊收缩素、胃动素、胰多肽等.探讨幽门螺杆菌感染时，胃肠激素在疾病中所起的作用.

关键词: 幽门螺杆菌; 胃肠激素

黄象谦. 续述幽门螺杆菌感染与胃肠激素的联系. 世界华人消化杂志 2005; 13(3):280-285
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/280.asp

0 引言

2000 年，笔者在本刊写过一篇类似的文章[1]，叙述文献上 8 个胃肠激素的相关资料. 4 a 之后，收集 PubMed 数据库资料，发现促胃液素的文章仍然很多，同时有一个 Ghrelin，是近来新发现的、非常重要的胃肠激素，也有其相关的研究;而有关其他胃肠激素的文章就极少.因此，本文即以 Ghrelin 和促胃液素为主题，进行叙述.

1 幽门螺杆菌(*H pylori*)感染与 Ghrelin

1.1 Ghrelin 的基本情况[2-6] Ghrelin 是 1999 年发现的、28 个氨基酸的多肽，他是生长激素(GH)促分泌剂(secretagogue)受体的内源性配体.他作用于生长激素受体(GHS-R)，促进 GH 分泌.GHS-R 在组织中分布极广，并有不同亚型.Ghrelin 主要由胃体的内分泌细胞分泌，下丘脑、肠道、肾和胎盘也有少量分泌，他以内分泌形式释放至血液，同时也以旁分泌和自分泌方式作用于细胞.

关于 Ghrelin 的生理、病理作用，自其发现 5 a 来，研究论文颇多，兹述其主要的作用二项:(1)保持人体能量平衡稳定;(2)增强食欲.

Ghrelin 的结构与胃动素近似，能引起胃动力和胃酸分泌增加;他是一个脑肠肽，通过下丘脑影响垂体激素轴，因此能增加食欲;对身体有广泛影响，包括碳水化物代谢、脂肪代谢、细胞增生、生殖组织和行为影响等.涉及肥胖、食欲、能量代谢的内分泌激素有很多，按来源分有脑肽、肠肽、脑肠肽、脂肪细胞分泌的激素等，后者有瘦素(leptin)、脂联素(adiponectin)、抵抗素(resistin).这些激素有传递代谢信号的作用，参与能量代谢.肥胖、多食、厌食等是因为能量代谢异常、失去平衡;通过饥饿和饱食，以了解诸激素的规律，是目前寻找治疗这些病疗法的思路.逐日增多的资料提示，在限制能量出入的情况下，Ghrelin 保持能量平衡稳定的作用是关键性的.所以，Ghrelin 在诸多参与能量代谢的激素中，已初露其独特优势，将来可能发现其巨大、广泛的功能.

1.2 幽门螺杆菌感染 -Ghrelin

1.2.1 *H pylori* 感染时，人体血浆 Ghrelin 水平呈出现有意义的下降，同时，血清胃蛋白酶原 I 与胃蛋白酶原 I/II 比值的降低程度能代表萎缩性胃炎的范围，从观察数据分析，也可以理解，血浆 Ghrelin 水平的下降，与血清胃蛋白酶原 I、II 水平，有同样反映萎缩性胃炎的意义[7-8].

Nwokolo 观察一组 10 例无症状、*H pylori* 感染者，发现根除 *H pylori* 后，其血浆 Ghrelin 水平和胃内酸度，均呈有意义的上升;而同时测定血浆瘦素和胰岛素，则数值改变无意义.推论，根除 *H pylori* 后，Ghrelin 增高，致食欲增加、肥胖，胃酸多，于是容易发生反流性食管炎，使 Barrett 食管形成加剧，最后食管腺癌生成，这可能是西方世界近 30 a 来食管腺癌增多的原因[9].

1.2.2 *H pylori* 感染时，人胃黏膜的 Ghrelin 含量呈有意义的下降.于根除 *H pylori* 治疗之前及后 3 mo，作胃窦和胃体黏膜活检，经相关组织化学染色，计数单位面积下含 Ghrelin 细胞的数目;发现治疗后，Ghrelin阳性细胞数呈有意义的增加.这种现象，可导致食欲和体重增加[10].

1.2.3 *H pylori* 感染沙鼠的实验观察[11] 沙鼠 Ghrelin 的氨基酸顺序结构，93% 与人同源，96% 与小鼠或大鼠同源，所检 4 种中氨基酸的差异，只在 34 或 35 位置上，如此小的分子片段，不会影响其功能.其 N 端 5 个氨基酸，即具备全部 Ghrelin 的功能.

本试验 *H pylori* 感染的沙鼠，其全胃标本 Ghrelin

(无论总量或活性部分)水平，与对照组在同一范围.17，23 wk后，则呈有意义的下降.*H pylori*感染日久，胃黏膜炎症加重，胃的Ghrelin表达更趋于下降.血浆Ghrelin主要来自胃，禁食时，血浆Ghrelin升高.胃Ghrelin含量较小肠高出74倍以上.推测，血浆Ghrelin来自胃以外的可能性不大.*H pylori*感染17 wk时，血浆Ghrelin出现有意义的上升，可能是代偿性的.

2 幽门螺杆菌感染与促胃液素

*H pylori*感染时，有关促胃液素的观察很多，为了方便，按下列范围叙述.

2.1 萎缩性胃炎　患者男性95岁，患胃体萎缩性胃炎，*H pylori*感染，血浆促胃液素水平，高达2 078 ng/L，是本病难以达到的高度[12].老年人随年龄增高而血浆促胃液素水平也随之增高，是*H pylori*感染与萎缩性胃炎发病增高所致，而萎缩性胃炎自家免疫所形成的抗体是一重要因素[13].

萎缩性胃炎的血清学(非胃镜)诊断[14-17]需测定血清、胃蛋白酶原Ⅰ(S-PGI)、促胃液素(S-G-17)、*H pylori*抗体(或^{13}碳尿素呼吸实验)，以诊断萎缩性胃炎.前两项可诊断萎缩性胃炎的中、重型(而非轻型)，最后一项确定是否有*H pylori*感染(或是否根除成功).S-PGI主要代表胃体病变，S-G-17主要代表胃窦病变.*H pylori*(+)时，S-PGI、S-G-17的水平较高；*H pylori*(-)时，则较低.

非胃镜诊断萎缩性胃炎的研究，是根据胃镜所取病理和化验资料，选取其最好分辨线而形成的.Vaananen *et al*提出其敏感性是83%，特异性95%(对胃窦、或胃体、或二者兼有)；对其试验的阳性估值为75%、阴性估值97%；诊断胃窦萎缩，空腹S-G-17的敏感性和特异性略逊于餐后的S-G-17；结论为，S-G-17、S-GPI、和*H pylori*抗体诊断萎缩性胃炎，与胃镜病理有良好的一致性[15].

2.2 胃癌　有关*H pylori*感染与促胃液素对胃癌的研究较多，都是探讨胃癌的病因一致的意见是，胃癌的致病因素以*H pylori*感染为主，其继发的高促胃液素血症，也起较重要的作用[18-26].现在文献基本都是多因素研究，兹简述其他因素(都是*H pylori*感染下的观察).

带CagA的*H pylori*感染率，胃癌患者为对照组的2倍，同时也认为，CagA阳性者的胃癌危险性更大[19-20，23，26].

环氧化酶-2(COX-2)的高表达与胃癌的形成有关[18，20-22，25].*H pylori*感染致血浆、胃黏膜促胃液素增多.促胃液素能使胃黏膜细胞有丝分裂，从而诱导COX-2生成.COX-2是一个肿瘤和血管促成因子，能抑制细胞凋亡；他在胃癌组织和*H pylori*感染者的胃窦黏膜有表达，在正常胃黏膜无表达.*H pylori*感染和胃癌患者，经根除*H pylori*，胃黏膜COX-2即呈有意义的下降.因此，根除*H pylori*或用COX-2阻滞剂，有预防胃癌或减轻萎缩性胃炎的意义.

促胃液素在*H pylori*感染的胃癌患者，其血浆和胃腔的含量，均较对照组高出许多倍，其胃腔的高含量能刺激*H pylori*生长.促胃液素在胃癌组织含量特别高，有报道比胃黏膜高出20倍.胃癌细胞能释放促胃液素，并具有促胃液素的特异受体(CCKB-R)，同时有自分泌作用，以促进自身生长.胃腔促胃液素的增高，主要来自胃癌细胞.根除*H pylori*，促胃液素在血浆、胃腔、和胃癌组织的含量，呈明显下降，这对胃癌有治疗意义[25-26].

*H pylori*感染时，致炎作用的白介素(IL-1，IL-8)在血浆升高[21，23].*H pylori*感染伴胃黏膜萎缩时，胃黏膜的鸟氨酸脱羧酶、COX-2等均升高，*H pylori*根除后，则呈有意义的下降[22].

*H pylori*感染的胃癌组织中，转化生长因子(TGFα)、肝细胞生长因子(HGF)，比无癌的胃黏膜，呈有意义的高表达；调整细胞凋亡的基因系统(bax/bcl-2)中，bcl-2是抗凋亡基因，见于100%的胃癌组织，而促进凋亡的基因bax只见于50%的例数.由于生长因子高表达，和凋亡基因失去平衡，癌组织生长增强，凋亡减弱，便于胃癌生长[20，23].黏膜相关性淋巴样组织淋巴瘤(MALT lymphoma)的发生机制，也与本文所述胃癌的生长因子和凋亡基因失衡相类似[20].

*H pylori*感染-胃癌　生成发展的因素

*H pylori*感染----

胃癌组织----促胃液素(增多)----高促胃液素血症----营养*H pylori*

胃腔促胃液素(增多)

(营养性生长因子)

胃癌组织----COX-2(增多)----抑制凋亡，促进血管增生

TGFα(增多)，HGF(增多)，bax(减少)，bax/bcl-2(失去平衡)

促进炎性细胞生长因子(IL-1，IL-8)血浆增多----萎缩性胃炎

萎缩性胃炎---- 中性白细胞(增多)---表示活动性

单核白细胞(增多)---表示严重程度

胃萎缩黏膜---- 鸟氨酸脱羧酶(增多)，

COX-2(增多)，

促胃液素(增多)

根除*H pylori*----

诸多异常指标，均能出现某种程度的缓解

2.3 MALT淋巴瘤[27-29]　共43例，均系早期轻度胃黏膜病变.*H pylori*感染率高(90%)，CagA(70%)远高于对照.促胃液素含量与对照相比，血清中高出6倍，胃腔中高出70倍，肿瘤组织中高出胃窦黏膜约10倍.促胃液素及其受体(CCKB-R)，在瘤组织和胃窦、胃

底黏膜，均有增强表达.组胺刺激胃液分泌，只有对照的30%.瘤组织能合成、释放促进生长的促胃液素.*H pylori*感染时，促胃液素增多，可能是*H pylori*的组胺成分和细胞因子(TNFalpha，IL-8)刺激G细胞所致.本病与*H pylori*(尤其CagA)密切相关，而促胃液素及其受体是发病学的有关因子，COX-2也与发病有关.根除*H pylori*，这些轻型病变，均可消失，促胃液素和COX-2下降至正常.复发时，促胃液素亦同时升高.

2.4 *肠癌* 肠癌的发病学与胃癌近似[18, 30].80例大肠腺癌，切除手术前后观察，发现:(1)血浆*H pylori*(尤其CagA)阳性，有意义地高于对照;(2)血浆细胞因子(TNFalpha，IL-beta，IL-8)，术后有意义地下降;(3)癌组织和肠切边缘的促胃液素及其受体(CCKB-R)，可以测到;同样，COX-2见于大多数的癌瘤及其肠切边缘，但不见于完整的大肠黏膜;完整大肠黏膜中只能测到COX-1;(4)大肠癌的促胃液素含量比肠切边缘多数倍，比完整大肠黏膜多很多倍.结论为，大肠腺癌及其肠切边缘，过量表达促胃液素及其受体CCKB-R和COX-2;*H pylori*感染通过促胃液素和COX-2过分表达，助长癌的形成.促胃液素、和COX-2，能刺激肿瘤生长，并减少凋亡(抗凋亡基因bcl-2表达相对增加).

2.5 *肺癌*[31] 肺癌90%以上来自气管，而气管和消化道，均来自胚胎内胚层.消化道上皮能产生促胃液素，成为主要的增生刺激来源，于是形成肿瘤.因而推想，源于气管的肺癌，是否与胃癌相似？是否与*H pylori*、促胃液素、COX-2有关？Gocyk *et al*选50例肺癌患者、100例对照，基本按本文所述肠癌的方案进行研究:肺癌组*H pylori*(尤其CagA)感染，有意义地高于健康对照;促胃液素和CCKB-R均于肺癌组织和肺切边缘检出;COX-2于大多数肺癌组织和肺切边缘有表达，但于气管黏膜无表达，气管黏膜只有COX-1表达;肺癌组织和肺切边缘比完整气管黏膜含有高出很多倍的促胃液素[31].本研究所获促胃液素、CCKB-R、COX-2等在肺癌的高表达很有价值，可以作为基础进一步研究，有可能作者的原始想法符合事实.

2.6 *胃溃疡* *H pylori*感染的高产量促胃液素，是胃黏膜细胞的有丝分裂素，能诱导COX-2表达，并产生前列腺素(PG).Konturek *et al*对20例胃溃疡的研究[32]:(1)*H pylori*(尤其CagA)有意义地高于对照组;(2)促胃液素、及其受体CCKB-R于胃溃疡边缘均可测到;(3)*H pylori*感染者，促胃液素于其胃窦黏膜中有过分表达，而CCKB-R于胃体黏膜，有过分表达;(4)COX-2于溃疡边缘*H pylori*感染的胃窦、胃体黏膜中均可以测到;根除*H pylori*的胃黏膜无COX-2表达;(5)CCKB-R只存在于胃体黏膜,(6)COX-1存在于胃窦、胃体黏膜;(7)*H pylori*阳性溃疡患者与*H pylori*阴性者相比，血浆促胃液素高出3倍，胃腔促胃液素高出50%;根除*H pylori*，即恢复正常;(8)根除*H pylori*，COX-2即完全消失;促胃液素、CCKB-R于6 wk后，呈有意义的下降.结论是:*H pylori*感染致促胃液素及其受体CCKB-R、COX-2增多，并存在于溃疡边缘，起致病作用.COX-2和同时增多的前列腺素，也有助于溃疡修复.

2.7 *动物实验* 蒙古沙鼠最多[33-37]，也有大鼠、犬[38-39]等.方法是以动物为模型，灌胃感染*H pylori*，测定感染前后促胃液素等的变化，主要阐述促胃液素等在*H pylori*感染下的有关机制.

感染*H pylori*的沙鼠:(1)胃窦黏膜先有凋亡短暂加强，继上皮细胞增生达顶峰，并与促胃液素增加，有意义地相一致，提示上皮细胞的增生机制，是促胃液素依赖性的[33];(2)血清促胃液素增加，同时胃酸减少，是由*H pylori*感染引致的白介素(IL-1 beta)所介导的[34];(3)以CagA-*H pylori*感染，18 mo、24 mo发生胃癌，24 mo发生类癌(肠嗜铬样细胞瘤)，同时，显著泌酸区萎缩性胃炎，胃黏膜内分泌细胞不典型增生;血清促胃液素的平均值，从开始实验时的86.2 ng/L增加到498 ng/L(18 mo)、989 ng/L(24 mo)，而对照组无改变;此高促胃液素血症是胃类癌的病因;本动物模型对胃癌、胃类癌的研究大有用处[35];(4)*H pylori*感染，引起胃炎、胃溃疡、肠上皮化生，ST(sterigmatocystin，ST，是一种霉菌毒素)能增强肠上皮化生，增加促胃液素水平[36];(5)*H pylori*感染后4 wk，胃炎从胃窦开始向胃体发展，胃酸开始减少;6 wk后，血清促胃液素、和胃体的生长基因，均呈有意义的增加;胃体生长基因表达、血清促胃液素水平、胃体炎症程度，三者间呈有意义的符合性;根除*H pylori*后，促胃液素和炎症均恢复正常,生长基因亦消失;生长基因与高促胃液素血症、胃体黏膜炎症的相关性，可能是*H pylori*性胃炎引起的[37].

大鼠经夹住腹腔动脉、再灌注、*H pylori*感染等步骤，形成缺血—再灌注(ischaemix/reperfusion，I/R)模型.开始，因缺血胃黏膜形成表浅糜烂，日久则形成深溃疡.这一模型，可用于研究*H pylori*的发病机制和胃溃疡的治疗等[38].

取犬胃窦G细胞和*H pylori*的组成部分，予以培育，发现其基础的和蛙皮素刺激后的促胃液素释放，均有增强;从而推想，胃窦的G细胞与*H pylori*直接接触，是*H pylori*感染时高促胃液素血症的原因[39].

2.8 儿童 有2项研究:(1)*H pylori*感染的十二指肠溃疡(DU)患者,其空腹和餐后血清促胃液素均呈有意义的增高,根除*H pylori*,即恢复;但其增高的胃酸,维持如故;提示,胃酸是患者的体质因素,而促胃液素的水平变化是*H pylori* 感染所致[40];(2)CagA-*H pylori*感染儿童的血清胃蛋白酶原I、II水平(胃黏膜炎症所致)均呈有意义的增高,而促胃液素水平,则无影响[41];此后一结果与一般不同,有待验证.

2.9 高促胃液素血症 主要探讨其发生因素:(1)*H pylori*感染的DU和非溃疡性消化不良为观察对象,*H pylori*阴性NUD为对照,比较其血清促胃液素水平和单位胃窦面积淋巴细胞的密度,发现前2组间无统计差异,但与对照组间,有意义的差异(淋巴细胞密度、促胃液素,均较对照高),而且淋巴细胞密度和促胃液素间,呈有意义的相关性;提示,*H pylori*感染时,胃窦淋巴细胞密度增高,损伤了促胃液素的生产[42];(2)高促胃液素血症的主要原因是*H pylori*感染和长期应用质子泵抑制剂(PPIs);长期应用PPIs之前,检测*H pylori*并根除,有防止促胃液素血症过高之效[43];(3)*H pylori*感染时,血清促胃液素水平增高与胃体黏膜急性炎症伴发有关,与胃窦黏膜无关;胃窦黏膜*H pylori*密度越高,引起越严重的胃体炎症,从而引起更高的空腹血清促胃液素水平[44].

3 幽门螺杆菌感染与生长抑素(SS)

3.1 促胃液素-SS与*H pylori*感染[1,45-49] 促胃液素和SS是关系极为密切的两个胃肠激素,他们的内分泌细胞(G细胞分泌促胃液素,D细胞分泌SS)均交错分布于胃窦黏膜(D细胞尚有部分在胃体黏膜).G、D细胞数目间,和促胃液素、SS释放活性间,可能有反馈抑制作用,但因同时有*H pylori*感染、黏膜炎症等许多因素,致难以确定.*H pylori*感染时,促胃液素分泌增加(高促胃液素血症)是肯定事实,其原因可能为胃炎或*H pylori*刺激,D细胞数目减少(SS释放减少);SS对所有内外分泌均有抑制作用,此时,G细胞和泌酸细胞的抑制减少,于是胃酸大增,成为溃疡基础.关于 G、D细胞计数,Tzaneva[45] 观察32例*H pylori*相关慢性胃炎,发现,D细胞数目在所有*H pylori*相关胃炎的胃黏膜上均减少;而G细胞数目只在中度萎缩胃黏膜中才下降,其余较轻病例无改变;认为D细胞数目减少为高促胃液素血症的原因.*H pylori*感染时促胃液素增高(基础,餐后),SS下降;根除*H pylori*,则全恢复.

*H pylori*感染有2个类型:一型是高胃酸,炎症限于胃窦,根除后DU痊愈,高胃酸和胃肠激素均恢复正常;另一型是胃体炎,SS释放减少,低胃酸;虽然有些因素还不清楚,但注意胃炎和萎缩胃黏膜的分布部位、SS的受累是必要的[47].*H pylori*能抑制SS分泌[49].

3.2 根除*HP*对SS的影响 一组*H pylori*阳性胃溃疡28例,根除*H pylori*前后,比较胃黏膜活检和四肽促胃液素—胃液分析发现,治前胃酸量与胃液SS量都降低,分别和胃体与胃窦的中性细胞浸润程度,成反比关系.根除*H pylori*后,主要是胃黏膜炎症改善[50]:(1)基础胃酸(BAO)恢复,是由于胃体中性细胞浸润改善,并非由于壁细胞数目增加,或黏膜萎缩有何改变;(2)基础和促胃液素刺激后的胃液SS含量增高(D细胞活性增强)是胃窦中性细胞浸润改善的缘故.*H pylori*感染胃黏膜炎症出现,SS释放减少;根除*H pylori*,胃黏膜炎症改善,SS释放增加;这可能是一项普遍规律.

SS可能是人体效应最广泛的胃肠激素,他的效应主要是保护性的,对多种病理、生理现象,都有影响,SS及其类似物,已广泛用于临床[51].但目前价格太贵,如果排除价格障碍,有可能成为最常用的药物之一.

4 幽门螺杆菌感染与其他胃肠激素

4.1 *H pylori*感染与促胆囊收缩素(CCK)DU患者,胃排空加快,是DU发病机制之一;根除*H pylori*,则胃排空恢复(时间延长),原来胃液中降低的SS也恢复.研究认为*H pylori*感染,导致内源性CCK缺陷、SS量减,遂失去CCK对胃动力的抑制作用;根除*H pylori*后,CCK对胃动力的抑制作用恢复,胃SS浓度和胃排空也恢复[52].

4.2 *H pylori*感染与促胃液素、胃动素、胰多肽 对19例无症健康人,进行研究,其中8例(42%)为*H pylori*阳性.观察项目有*H pylori*阳性和*H pylori*阴性的餐间、餐后的胃肠动力、胰外分泌、胃肠激素(促胃液素,胃动素,胰多肽)等,胰外分泌收集十二指肠液测定.所获结果,只两项呈有意义的差别,即*H pylori*阳性的餐间胰外分泌高($P<0.05$)、餐后血浆促胃液素高($P<0.05$).本组例数虽不多,但检查难度不小.*H pylori*感染影响胰腺是新发现,值得探讨[53].

5 参考文献

1 黄象谦. 幽门螺杆菌感染与胃肠激素的联系. 世界华人消化杂志 2000;8:1079-1083

2 毛微波. Ghelin, 一个促生长激素分泌及调节能量代谢的新多肽. 国外医学, 内分泌学分册 2002;22:174-177

3 Meier U, Gressner AM. Endocrine regulation of energy metabolism:review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, Ghrelin, adiponectin, and resistin. *Clin Chem* 2004;50:1511-1525

4 Lnui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A,

Meguid MM, Fujimiya M. Ghrelin, appetite, and gastric motility:the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB J* 2004;18:439-456
5 Hellstrom PM, Geliebter A, Naslund E, Schmidt PT, Yahav EK, Hashim SA, Yeomans MR. Peripheral and central signals in the control of eating in normal, obese and binge-eating human subjects. *Br J Nutr* 2004;92:S47-57
6 Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, Grossman AB. Ghrelin-a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol* 2004;25:27-68
7 Isomoto H, Nakazato M, Ueno H, Date Y, Nishi Y, Mukat H, Mizuta Y, Ohtsuru A, Yamashita S, Kohno S. Low plasma Ghrelin levels in patients with *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Am J Med* 2004;117:429-432
8 Suzuki H, Masaoka T, Hosoda H, Nomura S, Ohara T, Kangawa K, Ishii H, Hibi T. Plasma Ghrelin concentration correlates with the levels of serum pepsinogen I and pepsinogen 1/11 ratio—a possible novel and non-invasive marker for gastric atrophy. *Hepatogastroenterology* 2004;51:1249-1254
9 Nwokolo CU, Freshwater DA, O' Hare P, Randeva HS. Plasma Ghrelin following cure of *Helicobacter pylori*. *Gut* 2003;52:637-640
10 Tatsuguchi A, Miyake K, Gudis K, Futagami S, Tsukui T, Wada K, Kishida T, Fukuda Y, Sugisaki Y, Sakamoto C. Effect of *Helicobacter pylori* infection on Ghrelin expression in human gastric mucosa. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2121-2127
11 Suzuki H, Masaoka T, Hosoda H, Ota T, Minegishi Y, Nomura S, Kangawa K, Ishii H. *Helicobacter pylori* infection modifies gastric and plasma Ghrelin dynamics in Mongolian gerbils. *Gut* 2004;53:187-194
12 Huang SM, Lin HH, Wen TY, Hsu YH. Extreme hypergastrinemia caused by atrophic gastritis and *Helicobacter pylori* infection-a case report. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1215-1216
13 Jassel SV, Ardill JE, Fillmore D, Bamford KB, O' Connor FA, Buchanan KD. The rise in circulating gastrin with age is due to increases in gastric autoimmunity and *Helicobacter pylori* infection. *QJM* 1999;92:373-377
14 Sipponen P, Ranta P, Helske T, Kaariainen I, Maki T, Linnala A, Suovaniemi O, Alanko A, Harkonen M. Serum levels of amidated gastrin-17 and pepsinogen I in atrophic gastritis:an observational case-control study. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:785-791
15 Vaananen H, Vauhkonen M, Helske T, Kaariainen I, Rasmussen M, Tunturi-Hihnala H, Koskenpato J, Sotka M, Turunen M, Sandstrom R, Ristikankare M, Jussila A, Sipponen P. Non-endoscopic diagnosis of atrophic gastritis with a blood test. Correlation between gastric histology and serum levels of gastrin-17 and pepsinogen I:a multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:885-891
16 Ohkusa T, Miwa H, Nomura T, Asaoka D, Kurosawa A, Sakamoto N, Abe S, Hojo M, Terai T, Ogihara T, Sato N. Improvement in serum pepsinogens and gastrin in long-term monitoring after eradication of *Helicobacter pylori*:comparison with *H pylori*-negative patients. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20(Suppl 1):25-32
17 Sipponen P, Harkonen M, Alanko A, Suovaniemi O. Diagnosis of atrophic gastritis from a serum sample. *Clin Lab* 2002;48:505-515
18 Konturek SJ, Konturek PC, Hartwich A, Hahn EG. *Helicobacter pylori* infection and gastrin and cyclooxygenase expression in gastric and colorectal malignancies. *Regul Pept* 2000;93:13-19
19 Konturek SJ, Starzynska T, Konturek PC, Karczewska E, Marlicz K, Lawniczak M, Jaroszewicz-Heigelman H, Bielanski W, Hartwich A, Ziemniak A, Hahn EG. *Helicobacter pylori* and CagA status, serum gastrin, inter leukin-8 and gastric acid secretion in gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:891-898
20 Konturek PC, Konturek SJ, Pierzchalski P, Bielanski W, Duda A, Marlicz K, Starzynska T, Hahn EG. Cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected stomach-role of growth factors, apoptosis and cyclooxygenases. *Med Sci Monit* 2001;7:1092-1107
21 Konturek PC, Kania J, Konturek JW, Nikiforuk A, Konturek SJ, Hahn EG. *H pylori* infection, atrophic gastritis, cytokines, gastrin, COX-2, PPAR gamma and impaired apoptosis in gastric carcinogenesis. *Med Sci Monit* 2003;9:SR53-66
22 Konturek PC, Rembiasz K, Konturek SJ, Stachura J, Bielanski W, Galuschka K, Karcz D, Hahn EG. Gene expression of ornithine decarboxylase, cyclooxygenase-2, and gastrin in atrophic gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori* before and after eradication therapy. *Dig Dis Sci* 2003;48:36-46
23 Konturek PC, Konturek SJ, Sulekova Z, Meixner H, Bielanski W, Starzynska T, Karczewska E, Marlicz K, Stachura J, Hahn EG. Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, apoptosis related proteins Bax and Bcl-2, and gastrin in human gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:989-999
24 Verhulst ML, Hopman WP, Peters WH, Jansen JB. Effects of *Helicobacter pylori* infection on endocrine and exocrine mucosal functions in the upper gastrointestinal tract. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2000;232:21-31
25 Konturek PC, Hartwich A, Zuchowicz M, Labza H, Pierzchalski P, Karczewska E, Bielanski W, Hahn EG, Konturek SJ. *Helicobacter pylori*, gastrin and cyclooxygenases in gastric cancer. *J Physiol Pharmacol* 2000;51:737-749
26 Konturek PC, Konturek SJ, Bielanski W, Karczewska E, Pierzchalski P, Duda A, Starzynska T, Marlicz K, Popiela T, Hartwich A, Hahn EG. Role of gastrin in gastric cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected humans. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:857-873
27 Konturek PC, Konturek SJ, Starzynska T, Marlicz K, Bielanski W, Pierzchalski P, Karczewska E, Hartwich A, Rembiasz K, Lawniczak M, Ziemniak W, Hahn EC. *Helicobacter pylori*-gastrin link in MALT lymphoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1311-1318
28 Ohashi S, Segawa K, Okamura S, Urano F, Kanamori S, Hosoi T, Ishikawa H, Kanamori A, Kitabatake S, Sano H, Kobayashi T, Maeda M. Gastrin and *Helicobacter pylori* in low-grade MALT lymphoma patients. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:279-286
29 Konturek PC, Konturek SJ, Pierzchalski P, Starzynska T, Marlicz K, Hartwich A, Zuchowicz M, Darasz Z, Papiez D, Hahn EG. Gastric MALT-lymphoma, gastrin and cyclooxygenases. *Acta Gastroenterol Belg* 2002;65:17-23
30 Hartwich A, Konturek SJ, Pierzchalski P, Zuchowicz M, Labza H, Konturek PC, Karczewska E, Bielanski W, Marlicz K, Starzynska T, Lawniczak M, Hahn EG. *Helicobacter pylori* infection, gastrin, cyclooxygenase-2, and apoptosis in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2001;16:202-210
31 Gocyk W, Niklinski T, Olechnowicz H, Duda A, Bielanski W, Konturek PC, Konturek SJ. *Helicobacter pylori*, gastrin and cyclooxygenase-2, in lung cancer. *Med Sci Monit* 2000;6:1085-1092
32 Konturek SJ, Konturek PC, Plonka A, Duda A, Sito E, Zuchowicz M, Hahn EG. Implication of gastrin in cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori* infected gastric ulceration. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2001;66:39-51
33 Peek RM Jr, Wirth HP, Moss SF, Yang M, Abdalla AM, Tham KT, Zhang T, Tang LH, Modlin IM, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* alters gastric epithelial cell cycle events and gastrin secretion in Mongolian gerbils. *Gastroenterology* 2000;118:48-59
34 Takashima M, Furuta T, Hanai H, Sugimura H, Kaneko E. Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Gut* 2001;48:765-773
35 Kagawa J, Honda S, Kodama M, Sato R, Murakami K, Fujioka T. Enterocromaffin-like cell tumor induced by *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2002;7:390-397
36 Ma F, Misumi J, Zhao W, Aoki K, Kudo M. Long-term treatment with sterigmatocystin, a fungus toxin, enhances the development of intestinal metaplasia of gastric mucosa in *Helicobacter pylori*- infected Mongolian gerbils. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:360-369
37 Fukui H, Franceschi F, Penland RL, Sakai T, Sepulveda AR,

Fujimori T, Terano A, Chiba T, Genta RM. Effects of *Helicobacter pylori* infection on the link between regenerating gene expression and serum gastrin levels in Mongolian gerbils. *Lab Invest* 2003;83:1777-1786
38 Konturek SJ, Brzozowski T, Konturek PC, Kwiecien S, Karczewska E, Drozdowicz D, Stachura J, Hahn EG. *Helicobacter pylori* infection delays healing of ischaemia-reperfusion induced gastric ulcerations:new animal model for studying pathogenesis and therapy of *H pylori* infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:1299-1313
39 Beales IL, Calam J. *Helicobacter pylori* increases gastrin release from cultured canine antral G-cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:641-644
40 Kato S, Ozawa K, Koike T, Sekine H, Ohara S, Minoura T, Linuma K. Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and meal-stimulated serum gastrin in children. *Helicobacter* 2004;9:100-105
41 Fukuda Y, Isomoto H, Ohnita K, Omagari K, Mizuta Y, Murase K, Murata I, Moriuchi H, Kohno S. Impact of CagA status on serum gastrin and pepsinogen I and II concentrations in Japanese children with *Helicobacter pylori* infection. *J Int Med Res* 2003;31:247-252
42 De Francesco V, Zullo A, Rinaldi V, Hassan C, Ballanti P, Winn S, Diana F, Morini S, Attili AF. Relationship between antral lymphocyte density and basal gastrin levels in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Dig Liver Dis* 2000;32:676-681
43 Gurbuz AK, Ozel AM, Yazgan Y, Gunay A, Polat T. Does eradication of *Helicobacter pylori* reduce hypergastrinaemia during long term therapy with proton pump inhibitors? *East Afr Med J* 2003;80:150-153
44 Chuang CH, Sheu BS, Yang HB, Kao AW, Cheng HC, Yao WJ. Hypergastrinemia after *Helicobacter pylori* infection is associated with bacterial load and related inflammation of the oxyntic corpus mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:988-993
45 Tzaneva M. Light and electron microscopic immunohistochemical investigation on G and D cells in antral mucosa in *Helicobacter pylori*-related gastritis. *Exp Toxicol Pathol* 2001;52:523-528
46 Zavros Y, Rieder G, Ferguson A, Samuelson LC, Merchant JL. Hypergastrinemia in response to gastric inflammation suppresses somatostatin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G157-183
47 Kaneko H, Konagaya T, Kusugami K. *Helicobacter pylori* and gut hormones. *J Gastroenterol* 2002;37:77-86
48 Zavros Y, Paterson A, Lambert J, Shulkes A. Expression of progastrin-derived peptides and somatostatin in fundus and antrum of nonulcer dyspepsia subjects with and without *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci* 2000;45:2058-2064
49 Mihaljevic S, Katicic M, Karner I, Vuksic-Mihaljevic Z, Dmitrovic B, Ivandic A. The influence of *Helicobacter pylori* infection on gastrin and somatostatin values present in serum. *Hepatogastroenterology* 2000;47:1482-1484
50 Hayakawa T, Kaneko H, Konagaya T, Shinozaki K, Kasahara A, Funaki Y, Mori S, Yokoi T, Hirooka Y, Kusugami K, Kakumu S. Enhanced somatostatin secretion into the gastric juice with recovery of basal acid output after *Helicobacter pylori* eradication in gastric ulcers. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:505-511
51 黄象谦. 生长抑素－可能是人体内影响最广泛的一个胃肠激素. 华人消化杂志 1998;6:93-96
52 Konturek JW, Stoll R, Menzel J, Konturek M, Konturek SJ, Domschke W. Eradication of *Helicobacter pylori* restores the inhibitory effect of cholecystokinin on gastric motility in duodenal ulcer patients. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:241-246
53 Dominguez-Munoz JE, Malfertheiner P. Effect of *Helicobacter pylori* infection on gastrointestinal motility, pancreatic secretion and hormone release in asymptomatic humans. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1141-1147

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志2005年由月刊改为半月刊

本刊讯 中国科技期刊引证报告(2003年版): 2002年度世界华人消化杂志总被引频次4151，影响因子1.926，即年指标0.424，他引总引比0.45，引用刊数173，扩散因子4.2，被引半衰期2.99，地区分布数26，机构数138，国际论文比0.03，基金论文比0.27. 2002年度各学科影响因子较高的3种期刊排名: 世界华人消化杂志影响因子1.926，临床医学排名第2位. 2002年度总被引频次较高的20种期刊排名: 世界华人消化杂志总被引频次4151，排名第1位. 世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊，《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，2001年度第一届中国百种杰出学术期刊. 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. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展，从2005年开始，世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊，大16开，160页，每月1，15日出版，24元/期，全年24期，邮发代号82-262，北京报刊发行局发行. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):286-289
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•述评 COMMENTARY•

胰腺干细胞研究的现状与展望

洪天配

洪天配, 北京大学第三医院内分泌科, 北京大学干细胞研究中心, 北京大学糖尿病中心 北京市 100083
洪天配, 男, 1963-07-28生, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师, 福建省南安市人, 汉族.1985年毕业于福建医科大学医学系, 获医学学士学位, 1991年毕业于北京医科大学, 获医学博士学位, 1997-09-06至1999-10-07在丹麦Steno糖尿病中心从事客座研究.主要从事胰岛损伤与功能重建的研究, 参与编写专著和教材4部, 发表论文及综述50篇.现任中华医学会糖尿病分会青年委员、北京糖尿病防治协会理事、北京医学会糖尿病专业委员会委员、中华糖尿病杂志编委、世界华人消化杂志编委等.
国家自然科学基金项目, No. 30040022, No. 30170443
"211 工程" 建设项目人体干细胞工程学学科群项目
美国纽约中华医学基金专项人才基金项目
国家973项目子课题, No. 2001CB510105
项目负责人: 洪天配, 100083, 北京市花园北路49号, 北京大学第三医院内分泌科. tpho66@bjmu.edu.cn
电话: 010-62017691 传真: 010-62017700
收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-01-19

摘要

干细胞根据其来源的不同，可分为胚胎干(ES)细胞和成体干细胞.临床胰岛移植的成功引发了胰岛组织来源不足的巨大压力，从而促使胰腺干细胞研究成为当前的热门课题.理论上，胰腺干细胞可能存在于胰腺组织(如导管上皮)中或由ES细胞分化而来，胰岛细胞还可能来源于其他组织干细胞的横向分化.有关成年胰腺组织中是否存在胰腺干细胞、巢蛋白是否为胰腺干细胞的特异性标志物、巢蛋白阳性细胞在体外是否能真正诱导分化为胰岛素分泌细胞等焦点问题，目前存在激烈的争论.晚近，已从胰腺组织中成功建立了单克隆的多能胰腺干细胞，并在单细胞水平上对胰腺干细胞的体外分化规律进行了初步的描述.同时，多数学者认为巢蛋白不是胰腺干细胞高度特异性的一种标志物，单独应用巢蛋白不足以作为胰腺干细胞的鉴定标准.此外，在有外源性胰岛素存在的培养条件下，单独检测胰岛素的含量和释放反应对于干细胞分化而来的胰岛素产生细胞的鉴定不够可靠，可能出现假阳性结果，建议联合采用多种不同的检测方法.尽管胰腺干细胞研究取得的成果仅仅是初步的，但随着干细胞研究的深入发展和技术突破，必将为糖尿病治疗学领域开辟一片崭新的天地.

关键词: 胰腺干细胞; 糖尿病; 胰岛素

洪天配. 胰腺干细胞研究的现状与展望. 世界华人消化杂志 2005;13(3):286-289
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/286.asp

0 引言

糖尿病是严重危害人类健康和生命常见的内分泌代谢性疾病，近年来其患病率在全球呈现快速增长的趋势，在大多数国家已成为继心血管疾病和肿瘤之后的第三大疾病.目前几乎所有1型糖尿病和部分2型糖尿病患者都需要长期注射胰岛素治疗，常规治疗方案发生全身血管并发症的危险性较高，而强化治疗方案虽可使糖尿病并发症的危险性降低，但却不能完全避免其发生，且容易出现低血糖反应甚至昏迷而危及生命[1-2].2000年，胰岛移植取得了突破性进展，来自加拿大Edmonton的研究小组改良了抗免疫排斥的用药方案，取得连续7例胰岛移植的成功，可使1型糖尿患者完全停用胰岛素治疗超过1 a以上[3].然而，Edmonton方案中每次移植的胰岛组织需要来自两个或两个以上的供体胰腺，且移植后需要长期的抗免疫排斥治疗，故而限制了胰岛移植的广泛开展.

干细胞是既具有无限或较长期自我更新、不断增生的能力，又具有多向分化潜能的一类特殊细胞.2000年，Ramiya *et al*[4]报道了从成年小鼠胰腺导管中分离得到的胰腺干细胞在体外扩增和诱导分化为胰岛后进行移植，可以逆转小鼠的胰岛素依赖型糖尿病.2001年，Zulewski *et al*[5]首次提出巢蛋白(nestin)是胰腺干细胞的标志物.随后，围绕成年胰腺组织中是否存在胰腺干细胞，巢蛋白是否为胰腺干细胞的特异性标志物，巢蛋白阳性细胞在体外是否能真正诱导分化为胰岛素分泌细胞等一系列问题，在学术界展开了激烈的争论.本文就胰腺干细胞研究领域的若干焦点问题和发展趋势进行评述，相信随着干细胞研究的深入和干细胞技术的发展，干细胞体外扩增和诱导分化为胰岛细胞将成为解决供体胰岛来源不足的希望所在，为糖尿病治疗展示了美好的前景.

1 干细胞研究的概况

干细胞根据分化能力的不同，可以分为全能干细胞、多能干细胞、单能干细胞.根据来源的不同，又可分为胚胎干细胞(embryonic stem cells，ES细胞)和成体干细胞(somatic stem cells).ES细胞是从着床前的早期胚胎(囊胚)内细胞团中分离获得的一种二倍体细胞，理论上具有可发育成各种组织器官的潜能，成体干细胞理论上在特定条件下可分化为特定的组织器官，是修复和再生的基础.1998年，人类ES细胞首次由美国威斯康星大学Thomson *et al*[6]分离培养成功，并由此推动了干细胞研究热潮的兴起.2004年，韩国和美国的科学家利用克隆人胚胎技术获得了人类ES细胞

系[7]，为开展治疗性克隆研究奠定了坚实的理论基础，并提供了有益的技术指导.上述两项成果被认为是干细胞研究领域中具有里程碑意义的重大突破.

2 胰腺干细胞研究的现状

理论上，胰腺干细胞可能存在于胎胰或成年胰腺组织(胰腺导管上皮细胞)中，也可来源于ES细胞的进一步分化[8].此外，胰岛内分泌细胞还可能来源于其他组织特异性干细胞的横向分化，譬如肝脏干细胞、脾脏干细胞、骨髓间充质干细胞等[8-10].本文重点讨论前两种情况.

2.1 关于成年胰腺组织中是否存在胰腺干细胞的争议

2000年，Ramiya *et al*[4]从未发病的成年非肥胖糖尿病(NOD)小鼠的胰导管上皮结构中分离出胰腺干细胞，经体外扩增并诱导分化为胰岛后，移植到NOD小鼠的肾囊或皮下组织，可以逆转其胰岛素依赖型糖尿病.同样，成人胰导管上皮细胞也可在体外进行扩增并诱导分化为胰岛[11].另有研究发现，成年大鼠和人胰岛中均存在巢蛋白阳性细胞，该细胞具有干细胞的特性，体外培养可分化为胰腺内分泌细胞、外分泌细胞和导管细胞以及肝细胞[5].上述研究结果提示，成年胰腺组织尤其是胰导管上皮细胞中存在胰腺干细胞.

2004-05，美国哈佛大学Melton教授的实验室报道，利用胰岛素启动子控制的他莫昔芬(tamoxifen)依赖性Cre重组酶表达系统(RIP-CreER)和Cre活性报告系统(Z/AP)作为细胞谱系示踪方法，制备转染双基因(RIP-CreER;Z/AP)小鼠，发现成年期小鼠和胰腺部分(70%)切除术后小鼠的胰岛β细胞主要来自原有β细胞自我复制，而不是来自多能胰腺干细胞的分化[12].上述结果提示，终末分化的β细胞在体内仍保留明显的增生能力，同时对成体干细胞在β细胞补充中发挥显著作用这种观点提出质疑.该报道在学术界引发了激烈的争论，不少学者认为其结论过于武断，理由是:(1)该示踪方法本身存在稳定性不足的缺陷;(2)胰腺切除比例太低，可能无法激活胰腺干细胞的增生和分化;(3)未对新生期小鼠胰岛β细胞的来源进行研究;(4)人类或其他哺乳动物与小鼠之间可能存在种属差异.

晚近的许多研究支持成年小鼠胰腺组织中存在胰腺干细胞[13-16].特别值得一提的是，已从成年小鼠胰腺组织中建立了单克隆的多能胰腺干细胞，并且在体外可诱导分化为胰岛素分泌细胞[14-15].另据2004-11 Gershengorn *et al*的最新报道，来源于成人胰岛的成纤维细胞样细胞在体外很容易增生，这种间充质表型的细胞虽无激素表达，但可诱导分化为表达激素的胰岛样细胞聚集体，并重现胰岛细胞典型的上皮样特征.不论是在单个细胞或是在群体细胞中，免疫组织化学、原位杂交及mRNA检测均证实胰岛内上皮细胞在体外培养时先转变为间充质细胞，然后转变为表达胰岛素的上皮细胞.此外，我们已从人胎胰组织中分离获得胰腺干细胞，并建立了单克隆人胰腺干细胞系，两类细胞均具有间充质表型特征，在体外有很强的增生能力，并可被诱导分化为胰岛素产生细胞[17-19].其他研究者也报道了人胎胰组织来源的胰腺干细胞可诱导分化为胰腺内分泌细胞，将分化后细胞移植到糖尿病小鼠体内可纠正高血糖[20-21].上述结果进一步支持胰腺组织中存在胰腺干细胞，并且在适当的环境下可向胰岛内分泌细胞分化.

2.2 关于巢蛋白是否为胰腺干细胞特异性标志物的争议

巢蛋白在神经发育的研究中被确定为神经干细胞的标志物[22].由于神经组织与胰岛在发育过程中有许多相似之处，故使人们联想到其作为胰腺干细胞标志物的可能性.Hunziker *et al*于2000年首先报道在成年胰岛内存在巢蛋白阳性细胞，其后发现巢蛋白阳性细胞广泛存在于胚胎期和成年胰岛、胰导管及中心腺泡内[23-24].Zulewski *et al*[5]在2001年发现成年大鼠和人胰岛中均存在巢蛋白阳性细胞，该细胞具有多向分化的潜能，体外培养可分化为胰腺内分泌细胞、外分泌细胞和导管细胞以及肝细胞，从而提出巢蛋白是胰腺干细胞的标志物.我们和其他研究者均发现，从人胎胰组织中可分离获得巢蛋白阳性细胞，其在体外培养时具有很强的增生能力，并可诱导分化为表达胰岛素、胰升糖素等内分泌标志物的细胞[18-22].诱导分化后的细胞在高浓度葡萄糖的刺激下具有一定的胰岛素释放反应，细胞移植后可降低糖尿病小鼠的血糖水平[20-21].

另一方面，Treutelaar *et al*[25]利用转基因(巢蛋白启动子-Cre;LoxP)细胞标记示踪技术进行的体内发育生物学研究中观察到，在胚胎发育期，巢蛋白阳性细胞发育为胰腺间充质的血管;出生后，胰腺巢蛋白阳性细胞可发育成胰岛的微血管结构，但不能发育为胰岛内分泌细胞.采用相同的示踪技术，发现巢蛋白在胰腺外分泌细胞系中表达，而恒定的巢蛋白表达并不是胰腺内分泌前体细胞的主要特征[26].体外实验也发现，导管上皮细胞可分化形成胰岛样结构并分泌胰岛素，而巢蛋白阳性细胞并不能向胰岛内分泌细胞分化[25, 27].此外，通过巢蛋白启动子分离和纯化人胎胰组织中的巢蛋白阳性细胞，经体外诱导和体内移植后未分化为胰岛内分泌细胞[28].Street *et al*[29]的研究显示，巢蛋白阳性细胞在胰腺中分布广泛，巢蛋白在外分泌腺泡部分中的表达水平高于胰岛和导管，巢蛋白尚可分别与包括腺泡细胞、导管细胞、间充质

细胞、血管平滑肌细胞等多种不同类型细胞的特异性标志物存在不同程度的共表达，因此仅仅巢蛋白本身可能不足以作为识别胰腺干细胞的标志物.

上述似乎矛盾的研究结果仅可提示巢蛋白可能不是胰腺干细胞的一种高度特异性的标志物，尚不足以得出巢蛋白阳性细胞肯定不是胰腺干细胞的结论.理由是:(1)发育生物学的证据显示巢蛋白阳性细胞可发育成为胰岛微血管结构、胰腺外分泌细胞等，表明其具有干细胞的特性，不能排除在其他适当的体内或体外环境下向胰腺内分泌细胞分化的可能性，目前也还没有体外诱导胰腺干细胞向胰岛细胞分化的标准方案;(2)巢蛋白阳性细胞的非均质性和巢蛋白表达的不恒定性提示可能只有部分巢蛋白阳性细胞可分化为胰岛素产生细胞，我们和其他研究者建立的单克隆胰腺干细胞中仍有巢蛋白表达支持这种推论[14-15,18];(3)在诱导ES细胞向胰岛素产生细胞分化的过程中，先有巢蛋白的表达，后有胰岛素等胰岛细胞标志物的出现[30-32].因此，在今后胰腺干细胞的研究中，应积极寻找胰腺干细胞特异性的其他标志物，避免单纯使用巢蛋白作为鉴定胰腺干细胞唯一的标志物.同时，还应进一步探索诱导胰腺干细胞分化为胰岛β细胞的条件.

2.3 关于ES细胞向胰岛素产生细胞分化的争议 2001年Lumelsky *et al*[30]首次报道了应用五步法将小鼠ES细胞体外诱导分化为胰岛素分泌细胞，分化后的细胞在体外自动形成胰岛样结构.随后的研究发现，3-磷酸肌醇激酶抑制剂可促使小鼠ES细胞分化为胰岛素产生细胞，并聚集成胰岛样结构，其体外胰岛素释放反应呈葡萄糖依赖性;移植到糖尿病小鼠体内可升高血中胰岛素水平、缓解体重下降、改善血糖控制以及完全避免动物死亡，切除移植物很快使病情复发，并出现死亡;未发现移植细胞形成肿瘤[31].另有报道显示，小鼠ES细胞表达Pax-4可促使其向巢蛋白阳性前体细胞和胰岛素产生细胞分化，并形成含有胰岛素分泌颗粒的胰岛样球形结构[32].同样，已有研究证实，人类ES细胞也可自发或诱导分化为胰岛素产生细胞[33].

2003年，Melton领导的实验室通过在培养液中加入异硫氰酸荧光素(FITC)标记的胰岛素，发现ES细胞诱导分化后的细胞和小鼠胚胎成纤维细胞均可检测到胰岛素着染，而在不含胰岛素的培养液处理细胞时则未检测到，并且胰岛素着染的细胞出现核固缩、变小和TUNEL染色阳性.据此认为，检测到的胰岛素可能是由于诱导分化过程中凋亡细胞从培养液摄取和浓集而来，而非真正的胰岛素表达.并且提出，为了避免单独胰岛素染色的假阳性结果，确保胰岛素表达鉴定结果真实、可靠，应该联合采用几种不同的检测方法，其中包括C-肽染色、电子显微镜观察分泌颗粒、Northern分析、原位杂交、代谢标记检测、证实胰岛素双相分泌、移植实验证实降血糖作用超过1 mo等.2004-10，Serup及其同事也发现，在ES细胞分化而来的细胞中可检测到免疫反应性的胰岛素和程度不恒定的葡萄糖刺激胰岛素释放的反应，但细胞内C-肽含量和C-肽释放反应均未能测到;此外，该细胞可摄取培养液中FITC标记的胰岛素，且许多胰岛素免疫反应细胞正在出现凋亡或坏死.因此，他们认为要说明胰岛素产生是来自ES细胞的子代，就应该证实有C-肽的合成和分泌.

由此看来，尽管目前绝大多数学者确信ES细胞可分化为胰岛β细胞，但上述研究的某些阳性结果有待于进一步证实，而体外诱导ES细胞分化为胰岛素分泌细胞的技术条件更是亟待完善.迄今为止，ES细胞来源的胰岛素产生细胞移植到体内还不能完全排除肿瘤形成的可能性.除了学术上的争议之外，人ES细胞研究本身目前仍然存在剧烈的伦理学争论.然而，ES细胞研究的终极目标是治疗性克隆，理论上这是同时解决供体胰岛组织来源不足和移植后免疫排斥反应两大难题最有希望的途径.

2.4 关于干细胞研究中如何定义胰岛β细胞的意见 前文已述及，在有外源性胰岛素存在的培养条件下，单独检测胰岛素的含量和释放反应可能高估干细胞向真正胰岛β细胞分化的实际情况，并可能出现假阳性结果.目前文献中常用于识别胰岛β细胞的标志物包括:(1)葡萄糖感受分子，如葡萄糖激酶(GCK)、葡萄糖转运子2(GLUT2)等;(2)调控胰岛β细胞发育和胰岛素合成的转录因子，如Pax6、Beta2/NeuroD、PDX-1、Nkx2.2、Nkx6.1、Isl-1等;(3)与葡萄糖刺激胰岛素释放相关的事件，如细胞内钙离子浓度增加、C-肽释放、胰淀素释放等.迄今为止，在几乎所有的研究中，干细胞来源的胰岛素产生细胞的胰岛素含量和分泌能力似乎远远低于原代胰岛β细胞，且其特征尚未完全阐明，故有人建议将其命名为“原β细胞”[16].那么，这类细胞究竟比真正的胰岛β细胞缺少什么？真正的胰岛β细胞还应该具有以下特征:应表达ATP-敏感性钾通道Kir6.1;应含有专门的线粒体能量运转机制;应有将大量胰岛素储存于特征性颗粒的超凡能力，对小鼠而言，还应同时含有胰岛素I和II;应有葡萄糖刺激胰岛素分泌的剂量-反应曲线，其K_M值大约为8 mmol/L;移植后可逆转糖尿病动物模型的高血糖，遗憾的是，目前在多数研究中仍难以出现该效应.

3 胰腺干细胞研究的展望

尽管胰腺干细胞研究近年来已经取得了一定的进展和

成果，但应该看到这些成果仅仅是初步的，距离最终用于治疗糖尿病患者仍有许多问题需要进一步探索. 未来需要着重解决的问题有:(1)利用高通量的现代分子生物学技术如基因芯片、蛋白质组学方法等，寻找胰腺干细胞特异性的标志物，为其鉴定和纯化提供技术保障;(2)探索干细胞向真正的胰岛细胞分化的最佳体外诱导条件;(3)深入开展 ES 细胞定向分化为胰岛细胞和治疗性克隆的研究;(4)评估干细胞来源的胰岛素分泌细胞移植到体内的长期安全性，如肿瘤形成的可能性该加以排除. 总之，随着干细胞研究的深入发展和技术的不断完善，相信干细胞技术必将为糖尿病治疗学领域开辟一片崭新的天地.

4 参考文献

1 Diabetes Control and Complication Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-986

2 UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes(UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837-853

3 Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343:230-238

4 Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG. Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nat Med* 2000;6:278-282

5 Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Moritz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK, Habener JF. Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 2001;50:521-533

6 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocytes. *Science* 1998;282:1145-1147

7 Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, Jeon HY, Lee BC, Kang SK, Kim SJ, Ahn C, Hwang JH, Park KY, Cibelli JB, Moon SY. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004;303:1669-1674

8 Soria B, Skoudy A, Martin F. From stem cell to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* 2001;44:407-415

9 洪天配. 干细胞在糖尿病治疗中的应用前景. 国外医学内分泌学分册 2004;24:278-279

10 Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:3016-3020

11 Bonner-Weir S, Taneja M, Weir GC, Tatarkiewicz K, Song KH, Sharma A, O'Neil JJ. In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:7999-8004

12 Dor Y, Brown J, Martinez OI, Melton DA. Adult pancreatic β-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 2004;429:41-46

13 Choi Y, Ta M, Atouf F, Lumelsky N. Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny. *Stem Cells* 2004;22:1070-1084

14 Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, Enikolopov G, Asghar Z, Wheeler MB, Korbutt G, van der Kooy D. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* 2004;22:1115-1124

15 Suzuki A, Nakauchi H, Taniguchi H. Prospective isolation of multipotent pancreatic progenitors using flow-cytometric cell sorting. *Diabetes* 2004;53:2143-2152

16 Weir GC, Bonner-Weir S. β-cell precursors-a work in progress. *Nat Biotechnol* 2004;22:1095-1096

17 张玲, 洪天配, 胡江, 吴永华, 李凌松. 胎儿胰腺组织中巢蛋白阳性细胞的分离和体外增生以及诱导分化. 中国糖尿病杂志 2003;11:416-420

18 张玲, 洪天配, 胡江, 刘羿男, 吴永华, 李凌松. 从胎儿胰腺组织建立单克隆胰腺前体细胞的研究. 中华糖尿病杂志 2004;12:442-445

19 Zhang L, Hong TP, Hu J, Liu YN, Wu YH, Li LS. Nestin-positive progenitor cells isolated from human fetal pancreas have phenotypic markers identical to mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol*(in press)

20 Huang H, Tang X. Phenotypic determination and characterization of nestin-positive precursors derived from human fetal pancreas. *Lab Invest* 2003;83:539-547

21 Wu F, Jagir M, Powell JS. Long-term correction of hyperglycemia in diabetic mice after implantation of cultured human cells derived from fetal pancreas. *Pancreas* 2004;29:e23-e29

22 Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990;60:585–595

23 Hunziker E, Stein M. Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of Langerhans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:116-119

24 夏修金, 鲍卫汉, 陈东明, 洪天配, 张玲, 郑宗梅, 郭文媛. 巢蛋白在人胚胎胰腺中的表达. 中国糖尿病杂志 2003;11:204-207

25 Treutelaar MK, Skidmore JM, Dias-Leme CL, Hara M, Zhang L, Simeone D, Martin DM, Burant CF. Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes* 2003;52:2503-2512

26 Delacour A, Nepote V, Trumpp A, Herrera PL. Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages. *Mech Dev* 2004;121:3–14

27 Gao R, Ustinov J, Pulkkinen MA, Lundin K, Korsgren O, Otonkoski T. Characterization of endocrine progenitor cells and critical factors for their differentiation in human adult pancreatic cell culture. *Diabetes* 2003;52:2007-2015

28 Humphrey RK, Bucay N, Beattie GM, Lopez A, Messam CA, Cirulli V, Hayek A. Characterization and isolation of promoter-defined nestin-positive cells from the human fetal pancreas. *Diabetes* 2003;52:2519-2525

29 Street CN, Lakey JR, Seeberger K, Helms L, Rajotte RV, Shapiro AM, Korbutt GS. Heterogenous expression of nestin in human pancreatic tissue precludes its use as an islet precursor marker. *J Endocrinol* 2004;180:213-225

30 Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001;292:1389-1394

31 Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, Heit JJ, Cahoy JD, Kim SK. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:16105-16110

32 Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, Wobus AM. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100: 998-1003

33 Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001;50:1691-1697

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):290-293
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

• [illegible] COMMENTARY •

[illegible]

[illegible]

[illegible], 430030
[illegible], 1945-04 [illegible]
[illegible], 430030, [illegible] 13 [illegible]. sunxiufa@yahoo.com
[illegible]: 027-83653307 [illegible]: 027-83653307

[illegible]: 2004-12-30 [illegible]: 2005-01-12

[illegible]

[illegible] 70 [illegible]

[illegible]

[illegible]. [illegible] 2005;13(3):290-293
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/290.asp

0 [illegible]

[illegible] (2002 [illegible]) [illegible] [1]. [illegible] [2-4]. [illegible]

1 [illegible]

1.1 [illegible] 1 d [illegible] 12 g [illegible] 8%[5]. [illegible] [6-10]. [illegible] [11-12]. [illegible] [13-15]. [illegible]

1.2 [illegible]. Wei et al [illegible]: Q1(1-61.8 g/wk, 5 [illegible]/wk [illegible]), Q2(61.9-122.7 g/wk, 5-10 [illegible]/wk), Q3(122.8-276.6 g/wk, 10-22 [illegible]/wk) [illegible] Q4 [illegible] (>276.6 g/wk, 22 [illegible]/wk [illegible]). [illegible] Q2 [illegible] Q3 [illegible] Q4 [illegible] Q2 [illegible] 2.2 [illegible] 2.4 [illegible] Q1 [illegible] Q2 [illegible] 1.8 [illegible] 1.4 [illegible] BMI [illegible] HDL [illegible][16]. [illegible][17-19] [illegible] BMI [illegible][20-22]. [illegible][23].

[illegible]

2 ÊµÑéÑо¿

2.1 ¾ÆÞ¼«¶ÔÒÈÇ´ÚÐ»µÄ¼±ÐÔ×÷ÓÃ ¾ÆÞ¼«¶ÔÒÈ¼Ë®»¯°ÏÏì´ÚÐ» µÄÓ°ÏìÊÇ¸´ÔÓµÄ£¬ Ä¿Ç°»¹Ã»ÓÐÍêÈ«Ã÷°× .Ò»·½ÃæÓëÒÒ ´¼¼°Æä´úÐ»²úÎïÒÒÈ©¡¢ ÒÒËáµÄÖ±½Ó×÷ÓÃÓÐ¹Ø£¬ ÁíÒ»·½ ÃæÓëÒÒ´¼ÓÖµ¼ÖÂÎï¸°ÛÄÚ NADH/NAD[+]±ÈÂÊÉý¸ßÓÐ¹Ø .¸ÎÏ¸°ÛÖÐµÄÎÍÇâÃ¸ÓÚ½«ÒÒ´¼´úÐ»Îª ÒÒÈ©¡¢ ÒÒËá¹ý³ÌÖÐ£¬ Ê¹ NADH(»¹Ô-ÐÍÑÌõ°·¶þºËÜÕËá)µÄÉú³ÉÔö¶à£¬ NADH/NAD[+] µÄ±ÈÂÊÉÏÉý£¬ ²úÉú¹ýÁ¿µÄ H[+][24].NADH/NAD[+]±ÈÂÊ µÄ¸Ä±ä¿ÉÒÔÓ°ÏìÆäÛÃÊËáÑ-»·¹ÍÖ¬·¾ËáµÄ β Ñõ»¯£¬ µ¼Ö Ò°Ù½ø±ûÍªËá×ª»¯ÎªÈéËá .NADH/NAD[+]°ÎÈéËá /±ûÍªËá ±ÈÂÊµÄÉý¸ß¿ÉÒÔÒÖÖÆÌÇÒìÉú .ÔÚÊÈë 48 g ¾ÆÞ¼«ºóÈ£¬ ¸Î ÔàµÄÌÇÒìÉú×÷ÓÃ¼µÍ 45%[25].Õý³£Çé¿öÏÂ£¬ ÑªÌÇ¼µÍ Ê±£¬ ¸ÎÌÇÔ-¿ÉÒÔ·Ö½â³ÉÆÏÌÑÌÇÀ´Âú×ã»úÌåµÄÐèÒª£¬ ¶ø¾ÆÞ¼«¿ÉÒÔÒÖÖÆÌÇÔ-µÄ·Ö½â .µ±Éã¼ÈëÒÒµÄ¾ÆÁ¿¾ÆÞ¼« Ê±£¬ ¸ÎÔàÆÏÌÑÌÇµÄÊä³ö¼µÍ 12%£¬´ËÊ±¸ÎÌÇÔ-´¢±¸ ³ä×ãÔò°ÜÉÙ·¢ÉúµÍÑªÌÇ£¬ ¶øÌÇÔ-´¢±¸ØÑ·¦Ê±£¬ ½«Ð ·¨Î¬³ÖÕý³£ÑªÌÇË®Æ½¶ø·¢ÉúµÍÑªÌÇ .ÕâÖÖÌÇÔ-´¢±¸ºÄ ½ß²»½öÓ°ÏìÓÚÑø²»Á¼µÄÐì¾ÆÕß£¬ »¹³£¼ûÓÚµÍÌ¼Ë®»¯ °ÏÎïÒûÊ³ºÍ¿Õ¸¹Òû¾ÆµÄÈËÈÇ[26].

ÁíÒ»ÖÖÀàÐÍµÄµÍÑªÌÇ±»ÈÏÎªÊÇ¾ÆÞ¼«×÷ÓÃºóµÄ·´Ó¦ ÐÔµÍÑªÌÇ .ÉãÈë¸»º¬Ì¼Ë®»¯°ÏÎïÒûÁÏ³µÄÎ¬Ê±ÒÔÒº¾Æ£¬ ÑªÌÇË®Æ½µÄÉý¸ß¿ÉÒ½ÖÂ¹ý·Ö¿ÇÒÈÁµºÒÈµº·ÖÃÚ·´Ó¦¶ø·¢ÉúµÍ ÑªÌÇ£¬ ÕâÖ÷Òª·¢ÉúÔÚÒû¾ÆºóµÄ 2-3 h[27].Õâ¸öÏÖÏóÌáÊ¾ÆÞ ¾«¶ÔÒÈÏÙ β Ï¸°û¿ÉÄÜ¾ßÓÐ´Ì¼¤×÷ÓÃ .¾²Âö¸øÓèÆÏÌÑÌÇ ºÍ¾ÆÞ¼«£¬ ·¢ÏÖ¾ÆÞ¼«Ê×ÏÈÑõ»¯¹ÒÂÜ£¬ ÕâÔì³É¿ª¶ÊÆÊ±ÆÏÌÑ ÌÇµÄÀûÓÃÂÊ¼µÍ¶øµ¼ÖÂ¸ßÑªÌÇºÍ¸ßÒÈµºËØÑªÖ¢ [28-29].¾Æ ¾«ÓÕµ¼µÄ·´Ó¦ÐÔµÍÑªÌÇÔÚºÜ´ó³Ì¶È»ÏÓëÈËÈ¡µÄÌ¼Ë®»¯ °ÏÎïÖÖÀàÓÐ¹Ø [30].Òò´Ë£¬ ¾ÆÞ¼«¿ÉÒÔÒÖÖÆÆÏÌÑÌÇµÄÀûÓÃ£¬ ¶øÌ¼Ë®»¯°ÏÎïÖÖÀàÓëÑªÌÇÉý¸ßµÄËÙ¶ÈºÍ³Ì¶ÈÓÐ ¹Ø£¬ ½ø¶ø¶ÔÒÈÏÙµÄºÐÑ·´Ó¦ .µ«ÊÇÒ»ÐÐÑо¿²¢Ã»ÓÐÏÔÊ¾ ¾ÆÞ¼«×÷ÓÃºóÒÈµºËØ»ò C- ëÄË®Æ½Éý¸ß£¬ ¶øÇÒÕý³£ÈËºÍ ·ÇÒÈµºËØÒÀÀµÐÍ»¼ÕßµÄ±íÏÖ»¹ÓÃ [31-32].

2.2 ³¤ÆÚ¾ÆÞ¼«×÷ÓÃ¶ÔÒÈµºº¯Êý¹¦ ¹¦ÄÜµÄÓ°Ïì

2.2.1 ¾ÆÞ¼«¶ÔÒÈµºÐÎÌ¬½á¹¹µÄÓ°Ïì ³¤ÆÚ¹ýÁ¿¾ÆÞ¼«ÉãÈë ¿ÉÒÔµ¼ÖÂ´ÓÊÓÒÈµºµÄÐÎÌ¬½á¹¹·¢Éú¸Ä±ä .ÏÔÃ¿¼ÆÚµÄ ÑÐ¾¿½á¹ûÏÔÊ¾ 50% ¾ÆÞ¼«¹àÎ¸×é´óÊó£¬ ÒÈµºÖÑë²¿Ï¸°û (β Ï¸°û)Ìå»ýÔö´ó£¬ ¶àÊýÏ¸°ûºËÈÊÈëÈíÎ×´£¬ Ï¸°ûÅÅÁÐÃ÷ÏÔÎÉÂÒ£¬ ÁºËÈ÷¼äµÄÃ¾Ï¶ÑªÁ¹Üç»Ã÷ÏÔ±äÐ¡£¬ ÓÐ Ð©´¦ÓÐ¼ûºÕ±ÕÈµÄ×´Ì¬ .Koko µÄÑÐ¾¿Ëµ·Ã÷ÂýÐÔ¾ÆÞ¼«ÖÐ ¶¾µÄ´óÊó×ÜÒÈµºÌå»ýÃ÷ÏÔÉÙ¡¢ β Ï¸°ûµÄÖ±¾¶¡¢ ±íÃæ»ý¡¢ Ìå»ý¼° β Ï¸°ûºËµÄÃ÷ÏÔÉÙ£¬ β Ï¸°ûµÄºËÄ¤²»¹æÔò¿ØØº¼ ÏÝ¢ Ï¸°û±ä¸ß³ö¿ÖÒÌÈÆ«ÕÊÔÒÒ¼°Ï¸°ûÄÚ´æÔÚÍ¶Ìà¿Õ¿Å ÁÆ»òÃ»ÓÐÇåÎúµÄÒÈµºËØÒÔÂÁÚ½â¾§ºµ¿ÅÁ£[33].

2.2.2 ¾ÆÞ¼«¶ÔÑªÌÇ¡¢ ÒÈµºËØµÄÓ°Ïì ÒÈµºËØÐÎÌ¬½á¹¹ µÄÄ ±ä»¯±Ø½«Ó°ÏìµÄÒÈµºËØµÄ¹¦ÄÜ .ÑªÌÇ¢ ÑªÒÈµºËØË®Æ½ÊÇ ·Ó³ β Ï¸°û¹¦ÄÜµÄÖØÒªÖ¸±ê [34].ÏÔÃ¿µÄ¶¯ÎïÊµÑéÑо¿·¢ ÏÖ³¤ÆÚ¹ýÁ¿¾ÆÞ¼«ÉãÈë¿ÉÒÔÒýÆðÑªÌÇ¢ ÐÛ´óÊó¿Õ¸¹ÑªÌÇ®Æ½Éý ¸ß£¬ ÌÇÄÍÁ¿Òì³£££¬ ¶øÑªÇåÒÈµºËØË®Æ½È´ÏÂ½µ [35-37].ÏÔ ÃÇÈüº×ÓµÄ´ÓÊÓÒÈµºº¯Êý¹²²ÎÊÝÃÖÒ×éÓ¯»¯ÑÐ§·ÖÎö½á¹ûÒ² ÌáÊ¾³¤ÆÚ¸ß¾ÆÁ¿¾ÆÞ¼«××÷ÓÃÎÂÒÈµº β Ï¸°ûºÏ³ÉÒÈµºËØµÄ ÄÜÁ¦¼µÍÉ£¬ ±íÏÖÎªÒÈµºËØ·ÖÃÚ½µµÍ [36].ÔÚ½ûÆÚµÄÏ¸°û Ñ§ÑÐ¾¿ÖÐ£¬ ÏÔÃÇÓÃ²»Í¬¼ÁÁ¿¾ÆÞ¼« (0£¬50£¬100£¬200£¬400 mmol/L)×÷ÓÃÚ NIT-1(×ª»¯ÒÈµºÐÍÉÓÈµº β Ï¸°û)Ï¸°û6£¬12£¬24 h£¬·¢ÏÖ¾ÆÞ¼«¶Ô NIT-1 ´úÐ»»îÐÔµÄÓ°ÏìÓÐ¾Æ ¾«×÷ÓÃÊ±¼ä¢ ×÷ÓÃÁ¿ÓÐ¹Ø£¬ ¾ÆÞ¼«¶ÌÊ±¼ä (6 h)×÷ÓÃ¿É ÒÔ´Ì¼¤ÒÈµºËØ·ÖÃÚ£¬ ³¤Ê±¼ä (12£¬24 h)×÷ÓÃÒÖÖÆÒÈµºËØ ·ÖÃÚ ;µÍ¼ÁÁ¿¶ÔÒÈµºËØ·ÖÃÚºÏÌ¼²»Ã÷ÏÔ£¬ ¸ß¼ÁÁ¿ÒÖÖÆÒÈµº ËØ·ÖÃÚ£¬ ¾ÆÞ¼«×÷ÓÃÐÃ÷ÏÔµÄÊ±¼ä£¬¼ÁÁ¿ÒÀÀµ¹ØÏµ Ïµ.

Æä»úÖÆ¿ÉÄÜÓëÈËÑÐ¾¿µÄ½á¹ûÊ±£¬ ÓÐµÄ¼á¹ûÌáÊ¾¾ÆÞ¼«ÒÖÖÆ ÆÏÌÑÌÇ´Ì¼¤µÄÒÈµºËØ·ÖÃÚ [38]£¬¶øÓÐµÄÑÐ¾¿½á¹ûÈ´ÏÔ Ê¾¾ÆÞ¼«´ÙË½øÆÏÌÑÌÇ´Ì¼¤µÄÒÈµºËØ·ÖÃÚ [39-40]£¬»¹ÓÐ µÄ·¢ÏÖ¶ÔÓÚÌåÍâÅàÑøµÄÒÈµº β Ï¸°û (HIT-T15)£¬ÒÈµº ËØµÄ»ù´¡·ÖÃÚ±»¾ÆÞ¼«ÒÖÖÆÁË 30%£¬¶øÆÏÌÑÌÇ´Ì¼¤µÄÒÈ µºËØ·ÖÃÚ²¢Ã»ÓÐ±»¾ÆÞ¼«ÒÖÖÆ [41].ÕâÐ©²»Í¬µÄÊµÑé½á¹û ¿ÉÄÜÓë²»Í¬ÊµÑéÉè¼Æ¡¢µÄ¾ÆÞ¼«Å¨¶ÈÈ¡¢ ÊµÑéÊ±¼ä³¤¶ÌµÈ ÒòËØÓÐ¹Ø .

2.2.3 ³¤ÆÚ¾ÆÞ¼«ÉãÈë¶ÔÒÈµºº¯Êý¹¦ÄÜ¹ÊÕÏµÄ»úÖÆ ÏÔ ÃÇÈÏÎª¿ÉÄÜÓëÒÔÏÂÀàÒòËØÓÐ¹Ø :(1)¾ÆÞ¼«¶ÔÌÇ½Í½âÏà¾Ã¶ÓÐ ¼ùÃ¸»îÐÔµÄÓ°ÏìÌÇ½Í½â·Ó¦¹ý³ÌÖÐ´æÔÚÈý¸ö¹Ø¼üÃ¸£¬ ÆÏÌÑÌÇ¼¤Ã¸ (GK)»òÒ¼ºÌÇ¼¤Ã¸ (HK)¡¢Á×Ëá¹ûÌÇ¼¤Ã¸ (PFK)ºÍ±ûÍªËá¼¤Ã¸ (PK)£¬Æä¾ÐÐ×ÎÌØÒªµÄÊÇ PFK.GK ÊÇHK ½Ó×ÅÔÚµÄÒ»Ô±£¬ ËüÌÎÒÈÐÔ´æÔÚÓÚ³ÉÊì¸ÎÏ¸°ûºÍ ÒÈµº β Ï¸°ûÐ .ÓÉÓÚÆÏÌÑÌÇ´úÐ»ÓëÒÈµºËØ·ÖÃÚÏàñî Æ£¬ GK »îÐÔ¾¶¨ÆÏÌÇ´úÐ»ºÍÒÈµºËØ·ÖÃÚµÄ·ùÆ¶È£¬ ÔÚ Î¬³ÖÑªÌÇÎÈ¶¨¹ý³ÌÖÐ·¢»Ó×ÅÖØÒª×÷ÓÃ .ÏÔÃÇÑо¿·¢ÏÖ ³¤ÆÚ¹ýÁ¿¾ÆÞ¼«ÉãÈë¿ÉÊ¹ GK ºÍPFK »îÐÔÃ÷ÏÔµÍÓÚÕýÖÓ£¬ ÇÒÓë¾ÆÞ¼«¼ÁÁ¿¿³ÊÏÔÖø¸ºÏà¹Ø [42]£¬¶øÇÒ¾ÆÞ¼«»¹¹¿ÉÊ¹ NIT-1 Ï¸°ûÐ GK mRNA µÄ±í´ï¼µÍ .Òò´Ë£¬ ¶ÔÌÇ½Í½â Í¾¾¶¹Ø¼üÃ¸µÄÓ°Ïì¿ÉÄÜÊÇ¾ÆÞ¼«Éý¸ßÑªÌÇ£¬ Ê¹ÑªÌÇµ÷ ½Ú»úÖÆÎÉÂÒÐ£¬ ½ø¶øµ¼ÖÂÌÇÄò²¡µÄ»úÖÆÖ®Ò» .(2)Ñõ»¯Ó¦¼¤Í¾¾¶¶ÔÕý³£Çé¿öÏÂ£¬ »ýÌå»áÂ»îÐÔÑõ (reactive oxygen species£¬ROS)²úÉúë ROS Çå³ý´¦ÓÚ¶¯Ì¬Æ½ºâ£¬ Æ½ºâ±»ÆÆ»µ¼ÓÖÂ»úÌåÑõ»¯Ó¦¼¤ (oxidative stress)Ëð É˹.¾ÆÞ¼«ÊÇÒ»ÖÖÓÐÐ§Ï¸°ûÄÚÑõ»¯Ó¦¼¤µÄ´Ù±íÐÔÎÌïÊ .ÏÔ ÃÇµÄÕûÌå¶¯ÎïÊµÑéÑÐ·¢ÏÖ¾ÆÞ¼«¿Éµ¼ÖÂ´óÊóÒÈÏÙÑõ»¯¿¹ Ñõ»¯ÏµºâºÃ£¬ 50% ¾ÆÞ¼«¼ÁÁ¿×é´óÊó´óÊóÒÈÏÙ×éÖÐ ÒÈµÄ×Ü ³¬Ñõ»¯ÎïÆç»¯Ã¸ (T-SOD)½µµÍ£¬ NO¡¢»îÐÔÑõ¼°±û¶þ È©(MDA)º¬Á¿Éý¸ß [36].ÔÚÓÃÒÈÏÙÈçÏ»ì¹Ï·ÖÃÚÏÙÊ£¬ ¾Æ ÊÇ·ñ¶ÔÃÚ·ÖÃÚÏÙÏà¹ØËº£¬ ÓÃÆäÊÇÒÈµº β Ï¸°û²úÉýÆøÑõ»¯Ó¦¼¤ÈÕÊÉËÇÏÔÃÇ¹Ø×¢µÄÎÊÌâ .ÏÔÃÇµÄÏ¸°ûÊµÑé¹¤×÷ËµÃ÷£¬ ÔÚ¾ÆÞ¼«×÷ÓÃ 24 h ºó£¬ Ëæ×Å¾ÆÞ¼«¼ÁÁ¿µÄÉý¸ß£¬ NIT-1 Ï¸°û MDA º¬Á¿Éý¸ß£¬ SOD¡¢GSH-Px »îÐÔ ÏÂ½µ£¬ GSH

º¬Á¿ÏÂ½µ£¬ ÔÚÊµÑéÖÐ»¹¹Û²ìµ½ Caspase-3 »îÐÔµÄ±ä»¯Óë¾Æ¾«×÷ÓÃµÄÊ±¼äºÍ¼ÁÁ¿ÓÐ¹Ø£¬ ×÷ÓÃÊ±¼ä³¤£¬ ¼ÁÁ¿¸ß£¬ Caspase-3 »îÐÔÏÔÖøÔö¼Ó¸ß. ÕâÐ©½á¹û±íÃ÷¸ß¼ÁÁ¿¾Æ¾«µ¼ÖÂ NIT-1 Ï¸°ûÑõ»¯¿¹Ñõ»¯ÏµÍ³£¬ ´¦ÓÚÑõ»¯Ó¦¼¤Ì¬£¬ ´ÓÆøÖÐ¶Ï¸°ûµòÍö. µòÍöÊÇÒ»ö¸´ÔÓµÄ¡¢ ÓÉ Caspases ½Ó×å³ÉÔ±½éµ¼µÄµ°°×Ã¸¼¶Áª·´Ó¦¹ý³Ì[43]£¬ Caspase-3 ÔÚCaspase ¼¶Áª·´Ó¦ÖÐ´¦ÓÚºËÐÄµØÎ»£¬ Caspase-3»î»¯ÊÇÏ¸°û¼¼«¢ÉúµòÍöÇ°µÄÉú»¯¸Ä±ä[44]£¬»î»¯ºóµÄ Caspase-3ÊÇÏ¸°ûµòÍöµÄÖ÷ÒªÐ§Ó¦Òò×Ó[45]. ¾Æ¾«ÓÕµ¼µÄÐ¡Êó NIT-1 Ï¸°ûµòÍö¹ý³ÌÊÜ Caspases ½Ó×å¾ ¿Ø£¬ Caspase-3 »îÐÔÔö¼Ó¿ÉÄÜÊÇ¾Æ¾«ÓÕµ¼Ð¡Êó NIT-1 Ï¸°ûµòÍöµÄÖØÒªÎ¼¾¶Ö®Ò». µ«ÊÇ£¬ Ñõ»¯ÓëÊÍ·Å¹ý³ÌÏÖÐÅºÅ´«µ¼Í¾¾¶Ö¼»î Caspase-3 ²¢µ¼ÖÂÏ¸°ûµòÍö¿ÉÇ°ÓÐ²»Êë®·ÖÇå³þ. ÒòË¹£¬ ¹ý¿¿ÒÔ¾Æ¾«ÉÌ·¨¹ýÒÔÆäÒÈµºËØÑõ»¯ÓëÊÍÆÔÖ°ÒÈµºÏ¸°ûµòÍöµÄ¶ÔÊ±¹ÒÈµº¹¦ÄÜËðÉË£¬ Õâ¿ÉÄÜÊÇ¾Æ¾«ÒýÆð»ýÉÙÁ¿Ôì³ÉÒÈµºËØ·ÖÃÚ²»×ãµÄÖØÒª»úÖÆÖ®Ò». ¶Ô²¢Ä£ÊÊÁ¿ÒÔ ¾ÆÈ£Ê¹¿¹Ñõ»¯ÄÜÁ¦Ôö¼Ó£¬ ¶Ô»ùÌåÓÐÒ»¶¨µÄ±£»¤×÷ÓÃ. (3) Ï¸°ûÒò×ÓÍ¾¾¶: Ï¸°ûÒò×ÓÔÚÒÈµºËØÉÉÈ¹ý³ÌÖÐÆð×ÅÖØÒªµÄ×÷ÓÃ£¬ Öþ±ÁÓ»òË¼½ÓµÄØ²ÎÓëÁËÏÇÒò²¡µÄ·¢²¡. ³¤ÆÚÑý¿ ¾Æ¾«ÉãÈë¿ÉÒÔµ¼ÖÂÒÈµºÏÌÙ×éÖ¯ÖÐ TNF-α¡¢IL-1β ºÍIL-6 µÄË®Æ½Éý¸ß[37]. Òò´Ë£¬ ÕâÐ©Ï¸°ûÒò×Ó¿ÉÄÜÓÕµ¼ÈËÀ¡¢Ð·Í¬×÷ÓÃ»òÒÔÍøÂçµÄÐÎÊ½¶ÔÒÈµº β Ï¸°ûµÄ¹¦ÄÜ²úÉúÓ°Ïì£¬ ¶Ôµ¼ÖÂÒÈµºËØµÄ·ÖÃÚ¼õÉÙ. ³¤ÆÚ¾Æ¾«×÷ÓÃÏÂÒÈµºÏÙ×éÖ¯ÖÐÏ¸°ûÒò×ÓÖ¶¶àµÄ×ÜÓÆ»¹ÓÐ´ýÓÚ½øÒ»²½Ì½Ë÷.

2.3 ³¤ÆÚ¾Æ¾«×÷ÓÃ¶ÔÒÈµºËØÊÜÌå¼°ÊÜÌåºóÐÅºÅ×ª¼µÄÍ¾¾¶µÄÓ°Ïì ÒÈµºËØÍ¨ÊÜÒÈµº β Ï¸°û·ÖÃÚºó£¬ ¾ÑªÒºÑ»·µ½´ïÍâÖÜ°ÐÏ¸°û£¬ ÓëÏàÓ¦°ÐÏ¸°ûµÄÒÈµºËØÊÜÌå½áºÏÒÔ·¢»Ó×÷ÓÃ£¬ »î»¯ÒÈµºËØÊÜÌåµÄÀÒ°±Ëáµ°°××ª¤Ã£¬ Ê¹Æä×ÔÉíÁ×Ëá»¯²¢Á×Ëá»¯ÊÜÌåµ×Îï (IRS)£¬Á×Ëá»¯µÄÒÈµºËØÊÜÌåµ×Îï¿ÉÒÔ×÷ÎªÁ÷½Óµ°°×£¬ Í¨¹ýÆä·Ö×ÓÄÚ SH2 ºÍSH3 ½á¹¹Óò½áºÏ²¢»î»¯ÏÂÓÎÐÅºÅµ°°×£¬ ÈçÁ×Ëá¼¡´¼ 3 ¼¤Ã¸ (PI3-kinase)£¬Í¨¹ýÒ»ÏµÁÐµÄµ°°×ÖÊÁ×Ëá»¯¼¶Áª·´Ó¦½«ÒÈµºËØ´Ì¼¤ÐÅºÅ×ª»µ¼ÖÁÏ¸°ûÄÚ£¬ ×î ÖÕ½éµ¼ÒÈµºËØÉúÎïÐ§Ó¦µÄ·¢Éú. ÔÚÒÈµºËØµÍ¿¹»ýÑÓÆäµÄÑÐ¾¿ÖÐ·¢ÏÖÒÈµºËØÐÅºÅ×ª¼µ¼Í¾¾¶ÖÐÄ³Ð©¹Ø¼ü·Ö×ÓµÄ»îÐÔ»òÊý Á¿µÄ±ä»¯ÊÇÓ°ÏìÒÈµºËØÃô¸ÐÐÔµÄÖØÒª»úÖÆ. ÒÑÓÐÑÐ¾¿ÏÔ Ê¾ÒòÒÔ¾Æ¿ÉÒÔ´ÙÒ»½Ó´ÙÌ¼×ÏÒÈµºËØÃ´Ð©·Ö×ÓµÄ»îÐÔºÍ /»òÊý Á¿£¬½ø¶ø¶ÔÓ°ÏìÒÈµºËØÐÅºÅ×ª¼µ¼. ÈçÃÀ¼ÓÐÔ¾Æ¾«ÉãÈë¿ÉÒÔÊ¹¸ÎÏ¸°ûÌ±¼õÃæÒÈµºËØÊÜÌå½ÓÊÜ¼õÉÙ ;ÔÚÖÆÒÈµºËØ´Ì¼¤ÒÈµºËØ ÊÜÌåµ×Îï -1(IRS-1)ÀÒ°±ËáÁ×Ëá»¯£¬ ¸ÉÈÅÒÈµºËØÊÜÌå ºóµÄÐÅºÅ×ª¼µ£¬ ÒÖÖÆÒÈµºËØ´Ì¼¤µÄ DNA ºÏ³É¡¢ Ôö´ÙÏ¸ °ûºËÔ¿¹Ìå (PCNA)ºÍ3-Á×ËáÃ¸ÉÓÍÈ©ÍÑÇâÃ¸ (GAPDH)µÄ ±í´ï£¬ ËüÃÑÕ½ºÅ»¯µ°°×¼¤Ã¸ (MAPK)µÄ»î»¯µÈ[48-50]. ÎÒÃÇ µÄÑÐ¾¿ÏÔÊ¾¾Æ¾«¿ÉÒÔÔÚ°Ï¹ÇÈÀ¼¡ IRS-1mRNA±í´ïÌ®Æ½£¬ ÓëÒÔÇ°ÆäËÁÁ¿³Ê J ÐÍ¹ØÏµ£¬ ¶øÇÒ¾Æ¾«µÄÖ±½Ó×÷ÓÃÊÇÈ·¶¨ µÄ[51]. Ä¿Ç°¹ØÓÚÕâ·½ÃæµÄÑÐ¾¿²»»¶à£¬ ¾Æ¾«ÈçºÎ ·Ö×ÓÆä Ó°Ïì×÷ÓÃ»¹Çå³þ£¬ ÐèÒªÊ½Ó¦»Ø²¿ÌÈÈ«ÑµÑÐÎ¿ÎÌâ½«Êµ²ÁÑÐ¾¿ .

×ÛÉÏ£¬ÏÓÔÃÇÈÏÎª¾Æ¾«¿ÉÒÔÍ¨¹ýÓ°Ïì°Ð¸ÎÌÇÏ½ÍÃ¾¹ý³ÌÓ°Ïì ÒÈÐÑÕ»¯¯¼°¼ÆÊÖÊËÊ¢£¬ ÆÓ°¡µÓ ºÍ¸ß¹ÇÐÔÌå¡¢ ÔÚÆäÒÇÆ÷µÄ»úÖÆÖÐÏÖÏó¡¢ ÒìÉÏ»¹ÊÜ¼äÏÖÆÕÑÐ¾¿ÃÐ¾¿¡¢ ÒÈÁ¼µÄ¡¢ ¹ØÏµÃ¹ÑÐ¾¿²¢²»ÁË·ÖÎö .

ÁÔÐÐ²¡Ñ§ÑÐ¾¿ÒÑÖÊµÃ÷¹ýÁ¿Òû¾ÆÓÐÒÔÂÌÇÄò²¡µÄ×÷ÓÃ£¬ µ«ÓÐ¹ØÊÊ¾Æ¾«ÓëÌÇÄò²¡¹ØÏµµÄÊµÑéÑÐ¾¿»¹ºÜÉÙ£¬ ¶øÇÒÒÈ±¦ÏµÍ³ÐÔ .½ñºóµÄ¹¤×÷¿ÉÒÔ´ÓÒÔÏÂÁ½¸ö·½Ãæ³ö·¢: ¾Æ¾«¶ÔÒÈµºËØÊÜÌåÇ°ÐÅºÅÍ¨Â·µÄÓ°Ïì¼°ÆäÑÐ¾¿£¬ ÈçºÎÃ¿ÈÕµÄÈÕ¶ÔÒÈµºËØ ÊÜ»úÖÆ»ýÒ¿ÀÈ¡¢ ×ªÂ¼¼º·Òë¡¢ ¶ÔÒÈµºËØ´ÎÑªµÄÂÊÑÐ¾¿µÄÈ ; ¾Æ¾«¶ÔÒÈµºËØ×÷ÓÃÍ¨Â·µÄÑÐ¾¿£¬ Ä¿Ç°ÓÐ¹ØÕâ·½ÃæµÄÑÐ¾¿ºÜÉÙ£¬ Õâ½«³ÉÎªÒ»¸öÐÂµÄÑÐ¾¿ÈÈµã . ¾Æ¾«ÓëÌÇÄò²¡·¢²¡ÎÊÌâÕ®ÂäÄ´ÓÃÖÚ UÐÍÌà¹ØÏµµÄÊÂÊµÌáÊ¾£¬ Í¨¹ýµ÷ÕûÒûÖÆÏ¹ß¿ÉÒÔÔ¤·ÀÐ§ÂÊµ¼µÍÌÈËÈºÖÐÌÇÄò²¡µÄ·¢²¡ ÂÊ. Ïà¹Ø»ùÖÆµÄÑÐ¾¿½«ÓÐÖúÓÚÎª´ËÌá¹©¿ÆÑ§µÄÒÀ¾Ý£¬ ²¢ÎªÌÇÄò²¡µÄÔ¤·ÀÒ¹ÒÔÊ¾°ÐµãÓÐ¹À½¡¿µµÄÎÊ£º¦£¬ ÌáÐ©ÐÂµÄË¼Â·ºÍ·½·¨ .

3 ²Î¿¼ÎÄÏ×

1 ÍõÐ¡ÏÍ, ÕÅÂ×Ã·. Òû¾Æ¡¢ ÂýÐÔ¾Æ¾«ÖÐ¶¾¼°ÆäÏà¹ØÎÊÌâ. ÊÀ½çÒ½ÑÐÔÓÖ¾ 2000;4:56-59
2 Luchsinger JA, Tang MX, Siddiqui M, Shea S, Mayeux R. Alcohol intake and risk of dementia. *J Am Geriatr Soc* 2004;52:540-546
3 ×Þ . ¾Æ¾«ÐÔ¸Î²¡µÄÁÆÐÂ²¡ÑÐ§ . ÖÐ»ª¸ÎÔà²¡ÔÓÖ¾ 2003;11:689
4 ÎâÃÀËÙ , ºÍÊ¹â , ÀÁú , ÎÕÑ . ¾Æ¾«ÐÔ¼±ÐÔÖÐÈÌÎñ× 53 Àý±¨¸æ . ÅÐ²ÒÁÑÐ§Ê¦¼Ú 2003;12:746-747
5 Mayer EJ, Newman B, Quesenberry CPJr, Frieman GD, Selby JV. Alcohol consumption and insulin concentrations. Role of insulin in associations of alcohol intake with high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides. *Circulation* 1993;88:2190-2197
6 Razay G, Heaton KW. Alcohol consumption and cardiovascular risk factors in middle aged men. *Cardiovasc Risk Factors* 1995;5:200-205
7 Kiechl S, Willeit J, Poewe W, Egger G, Oberhollenzer F, Muggeo M, Bonora E. Insulin sensitivity and regular alcohol consumption:large, prospective, cross sectional population study(Bruneck study). *Br Med J* 1996;313:1040-1044
8 Konrat C, Mennen LI, Caces E, Lepinay P, Rakotozafy F, Forhan A, Balkau B;D. E. S. I. R. Study Group. Alcohol intake and fasting insulin in French men and women. The D. E. S. I. R. Study. *Diabetes Metab* 2002;28:116-123
9 Flanagan DE, Moore VM, Godsland IF, Cockington RA, Robinson JS, Phillips DI. Alcohol consumption and insulin resistance in young adults. *Eur J Clin Invest* 2000;30:297-301
10 Davies MJ, Baer DJ, Judd JT, Brown ED, Campbell WS, Taylor PR. Effects of moderate alcohol intake on fasting insulin and glucose concentrations and insulin sensitivity in postmenopausal women:a randomized controlled trial. *JAMA* 2002;287:2559-2562
11 Facchini F, Chen YDI, Reaven GM. Light-to-moderate alcohol intake is associated with enhanced insulin sensitivity. *Diabetes Care* 1994;17:115-119
12 Goude D, Fagerberg B, Hulthe J. Alcohol consumption, the metabolic syndrome and insulin resistance in 58-year-old clinically healthy men(AIR study). *Clin Sci* 2002;102:345-352

13 Razay G, Heaton KW. Alcohol consumption and cardiovascular risk factors in middle aged men. *Cardiovasc Risk Factors* 1995;5:200-205

14 Lazarus R, Sparrow D, Weiss ST. Alcohol intake and insulin levels. The normative aging study. *Am J Epidemiol* 1997; 145:909-916

15 Bell RA, Mayer-Davis EJ, Martin MA, D'Agostino RB, Haffner SM. Associations between alcohol consumption and insulin sensitivity and cardiovascular disease risk factors:Insulin Resistance and Atherosclerosis Study. *Diabetes Care* 2000;23:1630-1636

16 Wei M, Gibbons LW, Mitchell TL, Kampert JB, Blair SN. Alcohol intake and incidence of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care* 2000;23:18-22

17 de Vegt F, Dekker JM, Groeneveld WJ, Nijpels G, Stehouwer CD, Bouter LM, Heine RJ. Moderate alcohol consumption is associated with lower risk for incident diabetes and mortality: the Hoorn Study. *Diabetes Res Chini Pract* 2002;57:53-60

18 Holbrook TL, Barrett-Connor E, Wingard DL. A prospective population-based study of alcohol and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Epidemiol* 1990;132:902-909

19 Balkau B, Randrianjohany A, Papoz L, Eschwege E. Re:"A prospective population-based study of alcohol use and non-insulin-dependent diabetes mellitus". *Am J Epidemiol* 1991; 134:1469-1470

20 Tsumura K, Hayashi T, Suematsu C, Endo G, Fujii S, Okada K. Daily alcohol consumption and the risk of type 2 diabetes in Japanese men:the Osaka Health Survey. *Diabetes Care* 1999; 22:1432-1437

21 Wannamethee SG, Shaper AG, Perry IJ, Alberti KG. Alcohol consumpation and the incidence of type II diabetes. *J Epidemiol Community Health* 2002;56:542-548

22 Watanabe M, Barzi F, Neal B, Ueshima H, Miyoshi Y, Okayama A, Choudhury SR. Alcohol consumption and the risk of diabetes by body mass index levels in a cohort of 5, 636 Japanese. *Diabetes Res Clin Pract* 2002;57:191-197

23 Carlsson S, Hammar N, Efendic S, Persson PG, Ostenson CG, Grill V. Alcohol consumption, type 2 diabetse mellitus and impaired glucose tolerance in middle-aged Swedish men. *Diabet Med* 2000;17:776-781

24 Lieber CS. Alcohol and the liver. *Hepatology* 1984;4:1243-1260

25 Siler SQ, Neese RA, Christiansen MP, Hellerstein MK. The inhibition of gluconeogenesis following alcohol in humans. *Am J Physiol* 1998;275:897-907

26 Vrij-Standhardt WG. Effects of alcohol on the metabolism of macronutrients In Biomedical and Social Aspects of Alcohol Use:A Review of the Literature. Van der Heij DG, Schaafsma G(eds). *Pudoc Wageningen* 1995:62-71

27 O'Keefe SJD, Marks V. Lunchtime gin and tonic. A cause of reactive hypoglycaemia. *Lancet* 1997;1:1286-1288

28 Yki-Jarvinen H, Nikkila EA. Ethanol decreases glucose utilization in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:941-945

29 Shelmet JJ, Reichard GA, Skutches CL, Hoeldtke RD, Owen OE, Boden G. Ethanol causes acute inhibition of carbohydrate, fat and protein oxidation and insulin resistance. *J Clin Invest* 1988;81:1137-1145

30 Joffe BI, Shires R, Lamprey JM, Baker SG, Seftel HC. Effect of drinking bottled beer on plasma insulin and glucose responses in normal subjects. *S Afr Med J* 1982;62:95-97

31 Avogaro A, Watanabe RM, Gottardo L, Kreutzenberg S, Tiengo A, Pacini G. Glucose tolerance during moderate alcohol intake: insights on insulin action from glucose/lactate dynamics. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1233-1238

32 Christiansen C, Thomsen C, Rasmussen O, Hauerslev C, Balle M, Hansen C, Hermansen K. Effect of alcohol on glucose, insulin, free fatty acid and triacylglycerol responses to a light meal in non-insulin-dependent diabetic subjects. *Br J Nutr* 1994;71:449-454

33 Koko V, Todorovic V, Nikolic JA, Glisic R, Cakic M, Lackovic V, Petronijevic L, Stojkovic M, Varagic J, Janic B. Rat pancreatic B-cells after chronic alcohol feeding. A morphometric and fine structural study. *Histol Histopathol* 1995;10:325-337

34 Àî¹âÎ° .ÒÈµº β Ï¸°û¹¦ÄÜÓëÀ¹À .¹úÍâÒ½Ñ§ÄÚ·ÖÃÚ·Ö²á 2001;21: 225-227

35 Õź¼ü ,ËÕ¾Ó¿¢ ,ÌïÃö .³¤ÆÚÉãÈë¾Æ¾«¶Ô´óÊóÑªÌÇºÍÒÈµºËØµÄÓ°Ïì . ÎÀÉúÑÐ¾¿ 2002;31:88-90

36 ¸¶Ô»ª ,ËÕ¾Ó¿¢ ,ÇÇÎ¡ ,¹ù¾üÆì ,ÁõÁÖ¸Õ ,Ó¦³¿½ ,ºÂÀöÆ¼ ,ÑîÎÑ©æ . ³¤ÆÚ¾Æ¾«ÉãÈë¶Ô´óÊóÒÈµºµÄÓ°Ïì¼°ÓëÑõ»¯Ó¦¼¤¹ØÏµµÄÌ½ÌÖ .ÎÀÉú ÑÐ¾¿ 2004;33:440-443

37 ÇÇÎ¡ ,ËÕ¾Ó¿¢ ,¸¶Ô»ª ,¹ù¾üÆì ,ÁõÁÖ¸Õ ,ºÂÀöÆ¼ ,Ã«ÀöÃ· ,ÑîÎÄêºì . ¹ýÁ¿¾Æ¾«ÉãÈë¶Ô´óÊóÏ¸°ûÒò×Ó¼°ÒÈµºµÄÓ°Ïì .ÖÐ¹ú¹«¹²ÎÀÉú 2004;20:1174-1175

38 Tiengo A, Valerio A, Molinari M, Meneghel A, Lapolla A. Effect of ethanol, acetaldehyde and acetate on insulin and glucagons secretion in the perfused rat pancreas. *Diabetes* 1981;30:705-709

39 Walsh CH, O'Sullivan DJ, Cork I. Effect of moderate alcohol intake on control of diabetes. *Diabetes* 1974;23:440-442

40 Holley DC, Bagby GJ, Curry DL. Ethanol-insulin interrelationships in the rat studies in vitro and in vivo:evidence for direct ethanol inhibition of biphasic glucose-induced insulin secretion. *Metabolism* 1981;30:894-899

41 Shin JS, Lee JJ, Yang JW, Kim CW. Ethanol decreases basal insulin secretion from HIT-T15 cells. *Life sci* 2002;70:1989-1997

42 ÅÓºì ,Õź¼ü ,Ã«ÀöÃ· ,ÑîÎÄêºì ,Ó¦³¿½ ,ºÂÀöÆ¼ ,ËÕ¾Ó¿¢ .³¤ÆÚ¾Æ¾« ÉãÈë¶Ô´óÊóÌÇ½Í½âÎ³¾¶¹Ø¼üÃ¸»îÐÔµÄÓ°Ïì .ÎÀÉúÑÐ¾¿ 2004;33: 195-197

43 Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases:killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997;22:299-306

44 Cohen GM. Caspases:the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16

45 Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases:enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316

46 Tsiotra PC, Tsigos C, Raptis SA. TNFalpha and leptin inhibit basal and glucose-stimulated insulin secretion and gene transcription in the HIT-T15 pancreatic cells[J]. *Int Obes Relat Metab Disord* 2001;25:1018-1026

47 Southern C, Schulster D, Green IC. Inhibition of insulin secretion from rat islets of Langerhans by interleukin-6. An effect distinct from that of interleukin-1[J]. *Biochem J* 1990;272:243-245

48 Patel BC, D'Arville C, Iwahashi M, Simon FR. Impairment of hepatic insulin receptors during chronic ethanol administration. *Am J Physiol* 1991;261(2 Pt 1):G199-205

49 de la Monte SM, Ganju N, Tanaka S, Banerjee K, Karl PJ, Brown NV, Wands JR. Differential effects of ethanol on insulin-signaling through the insulin receptor substrate-1. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:770-777

50 Hong-Brown LQ, Frost RA, Lang CH. Alcohol impairs protein synthesis and degradation in cultured skeletal muscle cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:1373-1382

51 ÕÅÐñÕÕ ,Ó¦³¿½ ,ÁõÁÖ¸Õ ,ÕÅÎÝÆ½ ,ËÕ¾Ó¿¢ .¾Æ¾«¶Ô´óÊóÒÈµºËØÃô ¸ÐÐÔºÍ¹Ç÷À¼¡ÒÈµºËØÊÜÌåµ×Îï mRNA ±í´ïµÄÓ°Ïì .ÖÐ»ªÔ¤·ÀÒ½ Ñ§ÔÓÖ¾ 2004;38:335-338

±à¼ ÅË²®ÈÙ É¶Á ÕÅº£Äþ

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):294-298
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

二烯丙基二硫诱导人胃癌 MGC803 细胞的分化

凌 晖, 张良运, 梁晓秋, 宋 颖, 周建国, 苏 琦

凌晖, 梁晓秋, 宋颖, 周建国, 苏琦, 南华大学肿瘤研究所
湖南省衡阳市 421001
张良运, 广东省佛山市人民医院病理科 广东省佛山市 528000
凌晖, 女, 1972-11-08 生, 湖南省衡阳市人, 汉族, 讲师, 2004 年南华大学肿瘤研究所病理学博士生, 主要从事胃癌病因、发病机理及防治的研究.
湖南省自然科学基金资助项目, No. 02JJY2026
湖南省科技厅重大专项, No. 04SK1004
湖南省教育厅科研重点项目, No. 01A016
项目负责人: 苏琦, 421001, 湖南省衡阳市, 南华大学肿瘤研究所. suqi1@hotmail.com
电话: 0734-8281547 传真: 0734-8281547
收稿日期: 2004-11-01 接受日期: 2004-11-17

Diallyl disulfide induces differentiation of human gastric carcinoma MGC803 cell line

Hui Ling, Liang-Yun Zhang, Xiao-Qiu Liang, Ying Song, Jian-Guo Zhou, Qi Su

Hui Ling, Xia-Qiu Liang, Ying Song, Jian-Guo Zhou, Qi Su , Institute of Oncology, Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China
Liang-Yun Zhang, Department of Pathology, People's Hospital, Foshan 528000, Guangdong Province, China
Supported by Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 02JJY2026; the Key Project of Science and Technology Bureau of Hunan Province, No.04SK1004; and the Key Project of Hunan Education Bureau, No.01A016
Correspondence to: Dr. Qi Su, Institute of Oncology, Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province China. suqi1@hotmail.com
Received: 2004-11-01 Accepted: 2004-11-17

Abstract

AIM: To explore the differentiation induced by diallyl disulfide (DADS) of human gastric carcinoma MGC803 cell line.

METHODS: The DADS-induced differentiation of human gastric carcinoma MGC803 cells was examined by means of ConA-mediated cell agglutination, alkaline phosphatase activity detection, cytochemical and immunocytochemical staining, and scrape-loading/dye transfer technique (SLDT).

RESULTS: After treated with DADS, ConA-mediated cell agglutination rate was significantly decreased (79.1% *vs* 27.0%, $P<0.05$). Specific alkaline phosphatase activity was decreased by 66.1%, from 2.00 nkat/g to 0.67 nkat /g ($F = 207.6$, $P<0.05$). Filament-like cytoskeleton protein radiated regularly from the nuclei into cytoplasm, indicating its increased synthesis and reconstruction. SLDT revealed no dye transfer among MGC803 cells in the absence of DADS, while positive transfer of LY dye was found among the cells in the presence of DADS, suggesting that intercellular communication was restored. Immunocytochemisty showed that p21WAF1 expression was increased, with mutant p53, Rasp21 and C-myc expression decreased and pRb unchanged.

CONCLUSION: DADS can induce differentiation of MGC803 cells, in which oncogenes and anti-oncogenes may play important roles.

Key Words: Diallyl disulfide; Gastric carcinoma; MGC803 cell line; Scrape-loading/dye transfer technique; ConA-mediated agglutination; Alkaline phosphatase activity; Cytochemistry

Ling H, Zhang LY, Liang XQ, Song Y, Zhou JG, Su Q. Diallyl disulfide induces differentiation of human gastric carcinoma MGC803 cell line. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):294-298

摘要

目的: 研究二烯丙基二硫(DADS)诱导人胃癌 MGC803 细胞分化作用及其机制.

方法: 采用 ConA 凝集实验、碱性磷酸酶(ALP)比活性测定、免疫荧光染色细胞化学、免疫细胞化学及划痕标记荧光染料示踪技术(SLDT)等方法，观察 DADS 诱导人胃癌 MGC803 细胞分化的作用.

结果: 人胃癌 MGC803 细胞对 ConA 的凝集率从 79.1% 下降为 27.0%($\chi^2 = 29.78$，$P<0.05$);ALP 比活性由 2.00 nkat/g 降至 0.67 nkat /g($F = 207.6$，$P<0.05$)，下降率为 66.1%;细胞骨架蛋白呈细丝状，由胞核向胞质规则、放射状伸展，表明其合成增加与重组;SLDT 表明人胃癌 MGC803 细胞不显示荧光染料的传播，失去细胞间通讯功能，DADS处理后黄色荧光分布在伤沿细胞列和相邻的数列细胞内,表示细胞间通讯功能恢复.免疫细胞化学结果显示，p21WAF1 表达增加，突变型 p53、Ras-p21、C-myc 表达降低，而 pRb 表达无改变.

结论: DADS 可以诱导 MGC803 细胞分化，癌基因与抑癌基因在此过程中起着重要作用.

关键词: 二烯丙基二硫; 胃癌; MGC803 细胞; 划痕标记荧光染料示踪技术; 胃癌 ConA 凝集实验; 碱性磷酸酶比活性; 细胞分化

凌晖, 张良运, 梁晓秋, 宋颖, 周建国, 苏琦. 二烯丙基二硫诱导人胃癌MGC803细胞的分化. 世界华人消化杂志 2005;13(3):294-298
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/294.asp

0 引言

二烯丙基二硫(diallyl disulfide，DADS)是大蒜中的一种脂溶性的有效成分，对白血病[1]、乳腺癌[2]、肝癌[3]和神经胶质瘤[4]等多种肿瘤均有明显的抑制作用，是一种很有开发潜力的抗肿瘤药物.我们已发现二烯丙基二硫诱导了人白血病HL-60细胞分化[5];能显著抑制人胃癌MGC803细胞增生[6]，并且通过激活p38通路引起细胞周期G2/M期阻滞[7-9]，同时对小鼠肾包膜下移植人胃癌细胞的生长起抑制作用[10].现观察不同浓度的DADS对体外培养的人胃癌MGC803细胞的诱导分化作用.

1 材料和方法

1.1 材料 MGC803细胞为人胃低分化黏液癌，山东师范大学生物系建株，从湖南医科大学肿瘤所引进.DADS为Fluka公司产品(d_4^{20} = 1.0，M_r146.28，纯度80%，含10-20%DAS).ConA，抗管蛋白抗体α-Tubulin，FITC-羊抗兔IgG二抗和Lucifer Yellow均为Sigma产品.双缩脲法检测试剂盒碱性磷酸酶检测试剂盒为南京建成生物工程公司生产.p21^{WAF1}，p53，Rasp21，C-myc，pRb(均为鼠抗mAb)，Ultrasensitive™S-P Kit和DAB Kit均购于福州迈新公司.细胞用含100 mL/L小牛血清的RPMI1640培养液置37℃，含50 mL/L CO_2，恒湿、恒温培养箱中培养.取对数生长期细胞，按所需细胞浓度接种于培养瓶或培养板内，待细胞完全贴壁6 h后，换用含或不含药物的培养液培养至预定时间.实验设立不同浓度的DADS以及常规培养的阴性对照组.

1.2 方法

1.2.1 ConA凝集性实验 将培养至预定时间的细胞消化，吹打并两次通过7号针头，调整细胞密度为10^8/L，另用PBS将ConA稀释终浓度为25、50、100、200 mg/L.分别取0.1 mL ConA/PBS液与等量细胞悬液混合于96孔板内，每剂量4复孔，充分振荡后，静置观察细胞凝集现象，分别记录ConA浓度为100 mg/L时凝集细胞数.根据公式:细胞凝集率(%) = (无ConA时单细胞数－有ConA时单细胞数)/无ConA时单细胞数×100%

1.2.2 间接免疫荧光染色 盖片培养细胞经0.01 mol/L pH7.4 PBS洗去培养液，滤纸吸去水分，空气中干燥，立即投入冷氯仿:甲醇(V∶V,2∶1)混合液内，在-5℃以下固定20 min后，空气中干燥;滴加3 g/L Triton X-100/PBS液制成的不同稀释度的抗管蛋白抗体α-Tubulin，密闭容器内37℃温育1 h;取出盖片，PBS洗去残留的抗体，再按PBS→1%Triton X-100/PBS→PBS顺序洗涤，每次5 min;吸水干燥;滴加FITC-羊抗兔IgG二抗(用前以1 g/LTriton X-100/PBS液稀释)，37℃温育1 h;PBS洗去残留的抗体，同前洗涤，最后盖片过一次去离子水，洗去盐分，干燥;用甘油/PBS液封固盖片，Leitz落射荧光显微镜观察和照相.

1.2.3 考马斯亮蓝染色 盖片培养细胞经25 g/L戊二醛固定15 min后，三蒸水洗3次×5 min，用考马斯亮蓝染液染色1 h，镜下观察细胞颜色变深后，倾去染液，同前洗涤，甲醇醋酸分化液分化，镜下观察细胞内微丝明显、背景清晰时即终止分化，三蒸水洗3次×5 min;酒精梯度脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，显微镜下观察.

1.2.4 碱性磷酸酶比活性测定 准备样本，常规胰酶消化制成单细胞悬液，1 000 r/min离心10 min;PBS液重悬细胞，1 000 r/min离心10 min，重复1次;然后加入2.5 g/L脱氧胆酸钠/PBS液0.5 mL裂解细胞.测定前将细胞裂解混合液1 500 r/ min离心15 min，取上清进行测定.按蛋白总量(双缩脲法)检测试剂盒进行检测蛋白总量，蛋白总含量计算:蛋白总含量(g/L) = 测定管吸光度/标准管吸光度×标准管浓度(g/L)(紫外分光光度计Perklin elmer lambda bio 2.2，PE com USA).按ALP检测试剂盒进行检测ALP活性，根据公式计算:ALP(nkat/L) = 测定管吸光度/标准管吸光度×酚含量(0.005)×稀释倍数(100/0.05)(以吸光度为纵坐标，酶活力单位为横坐标绘制ALP活性标准曲线).ALP比活性 = ALP酶活力/细胞蛋白总量.

1.2.5 细胞间缝隙连接通讯功能检查采用划痕标记荧光染料示踪技术.常规消化传代，接种细胞于6孔培养板内培养，至细胞生长达密度饱和;除去培养基，室温下以PBS洗3次，细胞浸在2 mL含0.5 g/L Lucifer Yellow的PBS液中;用手术刀片轻轻划痕数条，计时，标记3 min;吸尽荧光染液，以PBS洗3-4次以去尽游离的剩余染料;细胞浸于PBS液内;沿划痕线观察沿线细胞导入荧光物质情况，并用荧光显微镜测定细胞间荧光染料扩散程度.

1.2.6 免疫细胞化学 载玻片先用多聚L-赖胺酸处理，石蜡切片脱蜡入水后，用柠檬酸缓冲液直接煮沸法进行抗原修复.0.01 mol/L pH7.2 PBS冲洗3次，每次5 min;每张切片加过氧化酶阻断剂50 μL，室温孵育10 min;PBS冲洗3次，每次5 min;每张切片加非免疫性动物血清50 μL，室温孵育5 min;PBS洗1次×5 min;每张切片加一抗50 μL，4℃过夜;PBS洗3次×5 min;每张切片加链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶溶液50 μL，室温孵育10 min;PBS洗3次×5 min;每张切片加新鲜配制的DAB溶液100 μL，显色5-10 min;

自来水冲洗，苏木素浅染，酒精脱水，二甲苯透明，中性树胶封片.

统计学处理 采用SPSS 10.0统计学软件进行χ^2检验和方差分析，$P<0.05$为差异有显著性统计学意义.

2 结果

2.1 ConA凝集率 ConA借助细胞表面的凝集素受体介导细胞间的凝集反应，MGC803细胞对ConA的凝集率间接反映细胞表面微绒毛数量.结果显示，DADS浓度由35 mg/L降至20 mg/L时，MGC803细胞对ConA的凝集率(图1)则由27.0%递增至37.5%，表现出浓度依赖性；χ^2检验，各组间两两比较均有显著性差异(χ^2 = 29.78，$P<0.05$，表1).

2.2 细胞骨架结构观察 间接免疫荧光染色显示，未处理组MGC803细胞微丝微管蛋白荧光微弱；DADS处理的MGC803细胞内荧光增强，呈花环样围绕胞核分布；考马斯亮蓝染色则证实，细胞内骨架蛋白呈细丝状，从胞核表面向胞质胞膜呈放射状伸展，表明处理后的MGC803细胞骨架蛋白重新合成与组装(图2).

2.3 ALP比活性 未处理组MGC803细胞内ALP比活性为2.00 nkat/g，20-35 mg/LDADS处理后，细胞内ALP比活性由1.70 nkat/g下降至0.67 nkat/g (F = 207.6，$P<0.05$)，下降率为15.7%至66.1%，表明DADS具有抑制MGC803细胞内ALP比活性的作用，并呈现浓度依赖效应(表2).

表1 DADS处理后MGC803细胞ConA凝集率

	MGC803	DADS(mg/L)			
		20	25	30	35
有ConA单细胞数	28	150	68	59	46
无ConA单细胞数	134	240	105	85	63
细胞凝集率(%)	79.1	37.5	35.2	30.6	27.0

表2 DADS处理后MGC803细胞ALP比活性

	MGC803细胞	DADS(mg/L)			
		20	25	30	35
ALP比活性	0.120	0.102	0.066	0.059	0.040
比活性下降率(%)		15.7	15.5	51.2	66.1

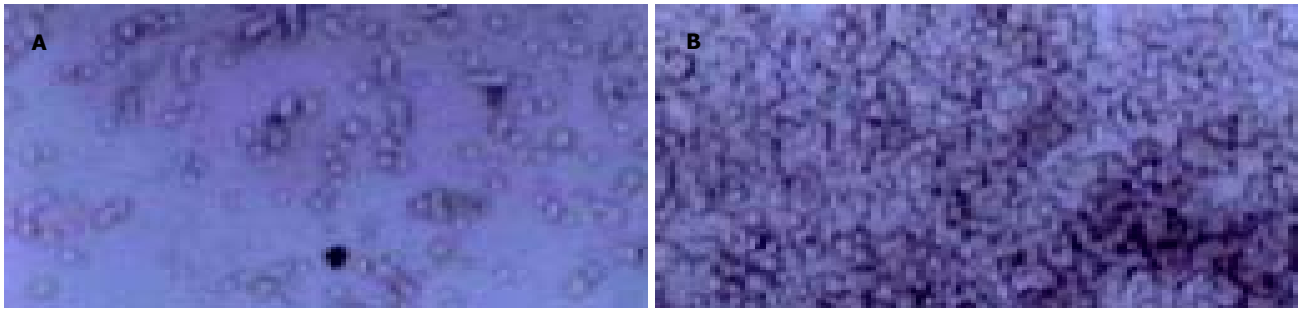


图1 MGC803细胞对ConA的凝集性. A: 未处理组; B: 处理组 ×20.

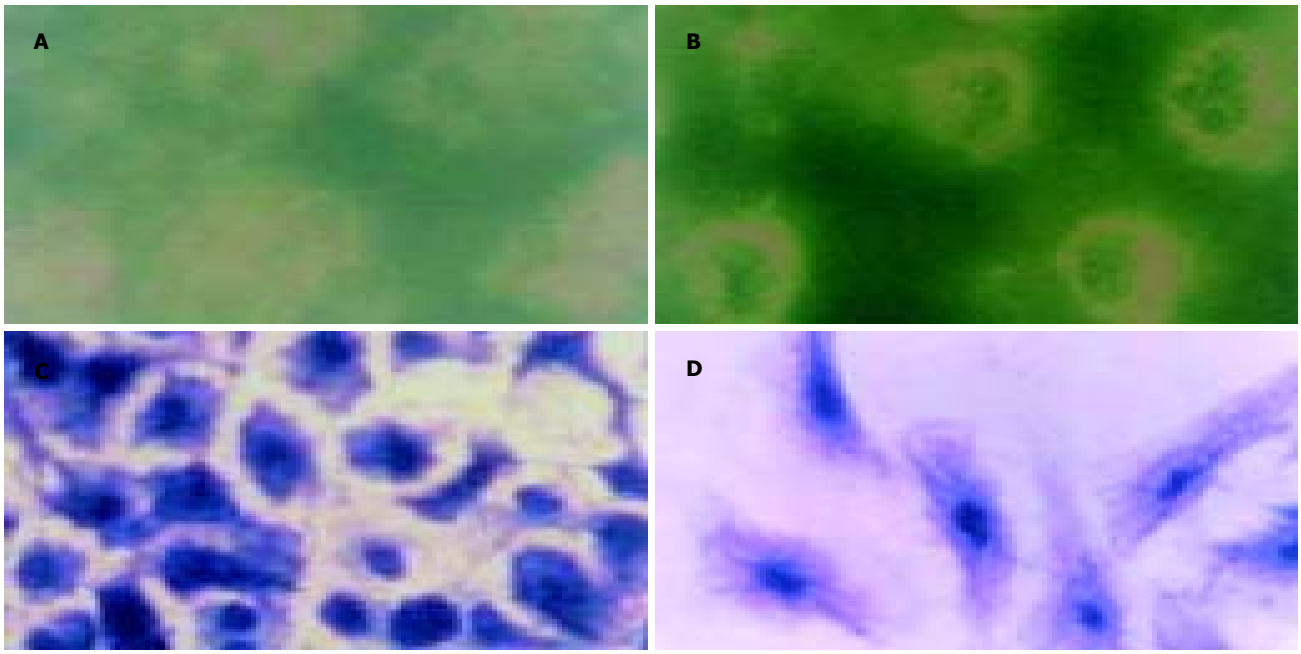


图2 细胞骨架结构观察. 未处理组(左), 处理组(右). A, B: 间接免疫荧光; C,D: 考马斯亮蓝, ×40

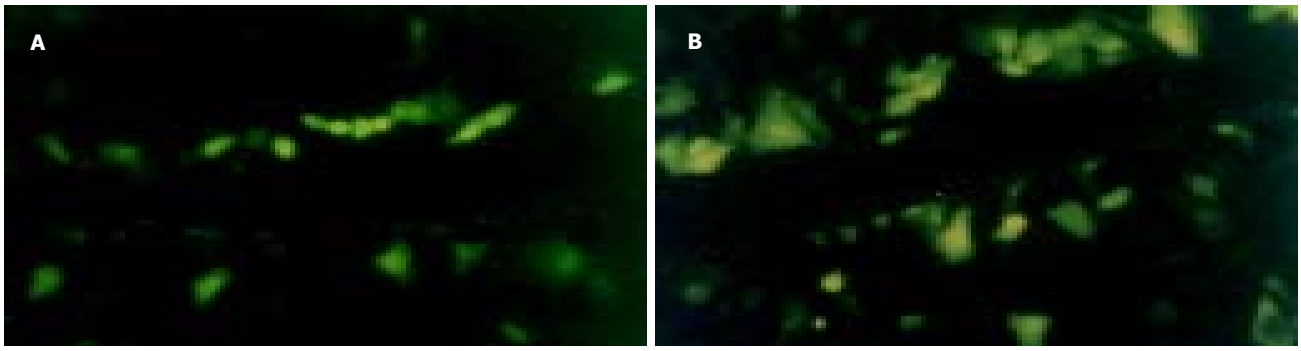


图3 间缝隙连接通讯功能观察. A: 未处理组; B: 处理组. Lucifer Yellow ×10

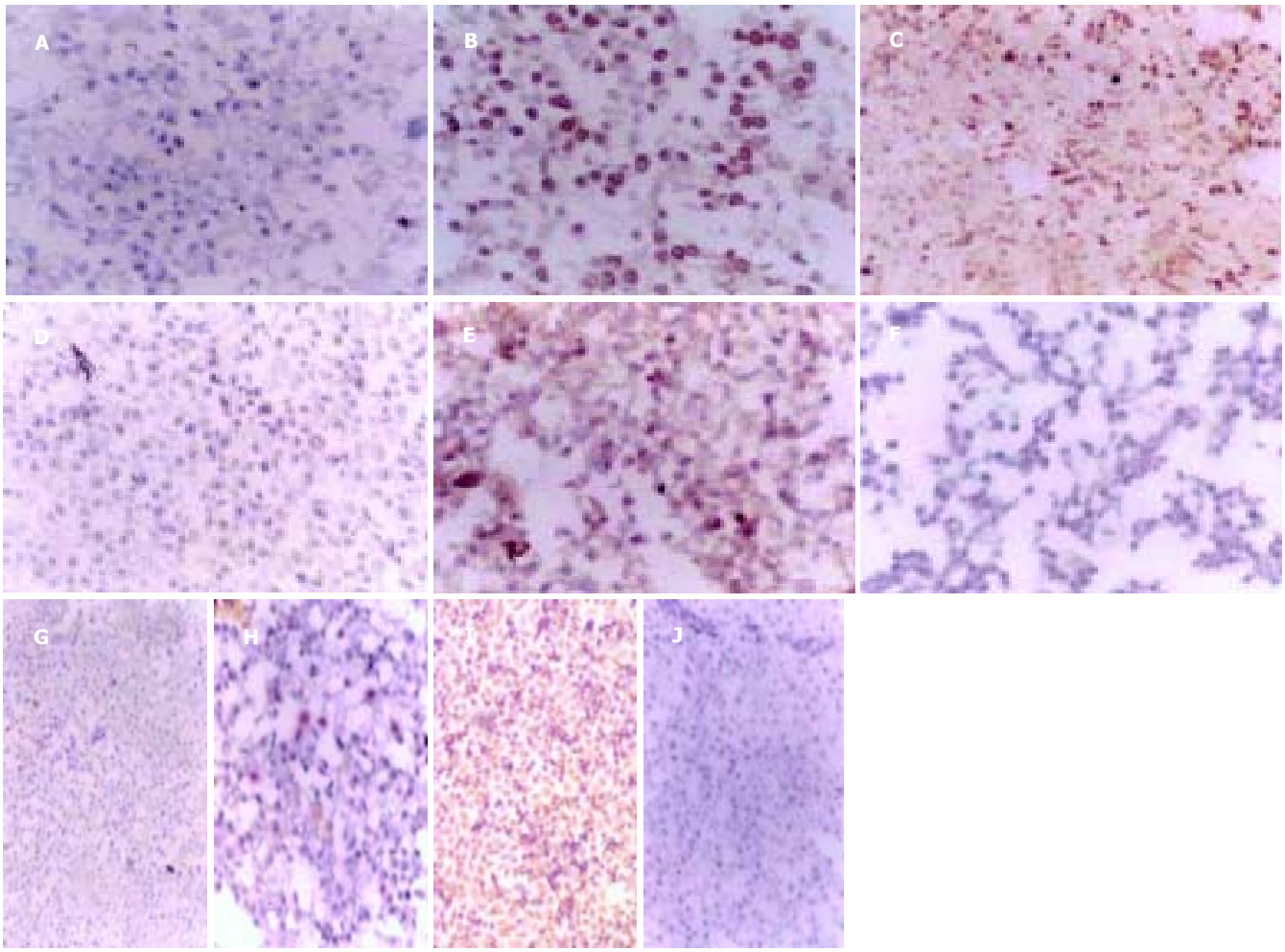


图4 免疫组化结果. 未处理组(左). 处理组(右). A,B: p21^{WAF1}; C,D: p53; E,F:rasp21; G,H: Rb; I,J: c-myc SP ×10

2.4 划痕标记荧光染料示踪技术 划痕标记后数分钟即可观察到黄色荧光传播. 人胃癌MGC803细胞不显示荧光染料的传播，表明无间缝隙连接通讯功能;DADS处理后黄色荧光分布在伤沿细胞列和相邻的数列细胞内，表示有间缝隙连接通讯功能，荧光强度从伤沿细胞列到临近数列细胞逐渐减弱，以伤沿细胞列最强(图3).

2.5 免疫组化 DADS作用后的MGC803细胞，其癌基因与抑癌基因的表达发生如下变化:P21WAF1表达增加，突变型P53、Rasp21、C-myc表达降低，而pRb表达无改变(图4).

3 讨论

研究证实，二烯丙基二硫(DADS)可促进过氧化氢产生，caspase-3活化及DNA降解，从而诱导白血病HL-60细胞凋亡[1]，通过诱导乳腺癌细胞凋亡抑制癌细胞增生[2]，并可通过增进胞核中组蛋白乙酰化，促进大鼠肝癌细胞分化[3]，可使H-ras表达下降抑制神经胶质瘤细胞增生[4]. DADS抑制MGC803细胞生长是由于细胞增生速度的减慢而不是因为DADS直接杀伤细胞，使进入分裂增生的细胞数量减少，我们观察到ConA凝集性实验发现DADS处理后细胞恶性行为下降;DADS

处理的MGC803细胞出现微丝微管合成增加与重组装，呈现规则的放射状分布，提示瘤细胞恶性表型下降和去恶化.研究表明，DADS可增加鼠肝细胞的细胞间通讯功能[11];维生素D3 可以通过维持细胞间通讯预防肾细胞癌变[12].本实验结果显示，人胃癌细胞无荧光染料的传播，表明其缺乏细胞间缝隙连接通讯功能，证实人胃癌细胞连接通讯抑制，与癌细胞增生的失控有关.DADS处理人胃癌MGC803细胞后，在伤沿细胞列和相邻的数列细胞内出现黄色荧光，并且，荧光强度从伤沿细胞列到临近数列细胞表现级差，以伤沿细胞列最强，提示DADS抑制细胞增生与其诱导的细胞间缝隙连接通讯功能恢复有关.肿瘤细胞的恶性表现还与细胞代谢失调密切相关.在胃癌及其癌前病变的酶学研究中发现，ALP(碱性磷酸酶)是胃癌细胞分化的一种标志酶.本研究显示，DADS可使MGC803细胞的ALP活性呈现不同程度下降，且随DADS浓度的升高，ALP比活性亦随之下降，提示MGC803细胞在DADS作用后发生了再分化而向正常细胞方向发展.

癌基因与抑癌基因在细胞分化过程中起着重要作用.p53基因是与人类肿瘤关系最密切的抑癌基因之一，他是癌症治疗中关键的靶子[13-14]，通过调节细胞凋亡过程[15-16]及肿瘤细胞分化[17-19]起作用.野生型 p53可增加人肝癌Bel7402/5-FU耐药细胞株的化疗敏感性[20].p21WAF1是p53的一个下游基因，p21蛋白的表达与p53的表达刚好相反，但分化细胞中p21的表达并不必定反映p21在细胞分化过程中的作用，他的表达与生长抑制有关且早于终末分化.β-Catenin通过激活化 p53-p21WAF1 通路诱导子宫内膜癌细胞分化[21].另一个抑癌基因Rb使细胞由G1期进入S期，三者之间相互调节.c-Myc蛋白属即刻早期应答基因的编码产物，在细胞处于G0期向G1期过渡时已有表达且一直持续到DNA合成期，使G1 期持续时间缩短而加速进入S 期，是G1期的“进展因子”反义寡核苷酸抑制人肝癌HepG2 和Morris 5123 细胞生长过程中c-Myc表达下调.(非类固醇抗炎药)通过上调c-Myc表达诱导人胃癌细胞凋亡.Ras基因在细胞的恶性转化过程中的作用机制复杂并表现与c-Myc基因协同作用.p53介导的G1/S期监测点机制中，p53上游的信号传导在H-ras转导的细胞中保持正常，但其下游的信号传导通路则被改变.本实验中检测到p21WAF1、pRb表达增强，突变型p53、p21ras、c-Myc表达减弱表明他们在MGC803细胞周期演进中有着积极作用并最终诱导细胞分化.

4 参考文献

1 Kwon KB, Yoo SJ, Ryu DG, Yang JY, Rho HW, Kim JS, Park JW, Kim HR, Park BH. Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Bioch Pharmacol* 2002;63:41-47

2 Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K, Senzaki H, Tanaka K, Hioki K, Tsubura A. Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis* 2001;22:891-897

3 Lea MA, Randolph VM. Induction of histone acetylation in rat liver and hepatoma by organosulfur compounds including diallyl disulfide. *Anticancer Res* 2001;21:2841-2845

4 Perkins E, Calvert J, Lancon JA, Parent AD, Zhang J. Inhibition of H-ras as a treatment for experimental brain C6 glioma. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;111:42-51

5 武明花, 苏琦, 程爱兰, 谭晖, 宋颖. 二烯丙基二硫诱导人白血病细胞系HL-60细胞分化的实验研究. 中国药理学通报 2003;19:319-322

6 张良运, 凌晖, 苏琦, 宋颖, 梁晓秋. 二烯丙基二硫对人胃癌MGC803细胞生长的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:1290-1293

7 袁静萍, 凌晖, 张孟贤, 苏琦, 程爱兰, 刘瑶, 周建国. 二烯丙基二硫对人胃癌MGC803细胞G2/M期的阻滞作用. 中国药理学通报 2003;19:1147-1151

8 袁静萍, 凌晖, 张孟贤, 刘瑶, 宋颖, 苏琦. p38通路在二烯丙基二硫诱导人胃癌MGC803细胞G2/M期阻滞中的作用. 癌症 2004;23:169-172

9 Yuan JP, Wang GH, Ling H, Su Q, Yang YH, Song Y, Tang RJ, Liu Y, Huang C. Diallyl disulfide-induced G2/M arrest of human gastric cancer MGC803 cells involves activation of p38 MAP kinase pathways. *World J Gastroenterol* 2004;10:2731-2734

10 刘瑶, 黄卫国, 袁静萍, 黄琛, 唐荣军, 宋颖, 周秀田, 凌晖, 何洁, 苏琦. 二烯丙基二硫对小鼠肾包膜下移植人胃癌细胞的生长抑制作用. 中国药理学通报 2004;20:835-836

11 Huard C, Druesne N, Guyonnet D, Thomas M, Pagniez A, Le Bon AM, Martel P, Chaumontet C. Diallyl disulfide (DADS) enhances gap-junctional intercellular communication by both direct and indirect mechanisms in rat liver cells. *Carcinogenesis* 2004;25:91-98

12 Fujioka T, Suzuki Y, Okamoto T, Mastushita N, Hasegawa M, Omori S. Prevention of renal cell carcinoma by active vitamin D3. *World J Surg* 20000;24:1205-1210

13 Bottone FG Jr, Baek SJ, Nixon JB, Eling TE. Diallyl disulfide (DADS) induces the antitumorigenic NSAID-activated gene (NAG-1) by a p53-dependent mechanism in human colorectal HCT 116 cells. *J Nutr* 2002;132:773-778

14 Salvatella X, Martinell M, Gairi M, Mateu MG, Feliz M, Hamilton AD, De Mendoza J, Giralt E. A tetraguanidinium ligand binds to the surface of the tetramerization domainof protein p53. *Angewandte Chemie* 2004;43:196-198

15 Li PX, Wong J, Ayed A, Ngo D, Brade AM, Arrowsmith C, Austin RC, Klamut HJ. Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumor cells to DNA damage and p53 overexpression. *J Biol Chem* 2000;275:20127-20135

16 Hsu YL, Kuo PL, Chiang LC, Lin CC. Isoliquiritigenin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of human non-small cell lung cancer a549 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004;31:414-418

17 May P, May E. Twenty years of p53 research:structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999;18:7621-7636

18 Gonda G, Bajtai A, Nagy P, Szanto I, Kiss J. Quantitative analysis of p53 expression and cell proliferation in gastric carcinomas. An immunohistochemical study. *Hepatogastroenterology* 2004;51:273-276

19 Amannllah A, Liebermann DA, Hoffman B. P53-independent apoptosis associated with c-Myc-mediated block in myeloid cell differentiation. *Oncogene* 2000;19:2967-2977

20 Li YX, Lin ZB, Tan HR. Wild type p53 increased chemosensitivity of drug-resistant humanhepatocellular carcinoma Bel7402/5-FU cells. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25:76-82

21 Saegusa M, Hashimura M, Kuwata T, Hamano M, Okayasu I. β-Catenin simultaneously induces activation of the p53-p21waf1 pathway and overexpression of cyclin D1 during squamous differentiation of endometrial carcinoma cells. *Am J Pathol* 2004;164:1739-1749

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):299-302
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

胃癌组织 Angiopoietin-2 及 MMP-9 表达的意义

钱 颉, 刘南植, 程胜平

钱颉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科
湖北省武汉市 430030
刘南植, 程胜平, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所
湖北省武汉市 430030
项目负责人: 钱颉, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. xuer_qian@163.com
电话: 027-83645986
收稿日期: 2004-09-22 接受日期: 2004-10-11

Expression of Angiopoietin-2 and Matrix metalloproteinase-9 in gastric carcinoma

Jie Qian, Nan-Zhi Liu, Sheng-Ping Cheng

Jie Qian, Department of Digestive Diseases, Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Nan-Zhi Liu, Sheng-Ping Cheng, Institute of Live Diseases, Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Jie Qian, Institute of Liver Diseases, Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. xuer_qian@163.com
Received: 2004-09-22 Accepted: 2004-10-11

Abstract

AIM: To investigate the expression of angiopoietin-2 (Ang-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gastric carcinoma.

METHODS: The expression of Ang-2 and MMP-9 was detected in tissues of gastric cancer (n = 50) and non-cancerous gastric mucosa (n = 10) by immunohistochemistry.

RESULTS: The positive rates of Ang-2 and MMP-9 in gastric cancer were 56% and 60%, which were significantly higher than those in non-cancerous mucosa. The level of Ang-2 and MMP-9 expression had a negative correlation with the differentiation degree (25% *vs* 71%, χ^2 = 9.18, P<0.01; 31% *vs* 74%, χ^2 = 8.10, P<0.01), but a positive correlation with TNM stage (30% *vs* 78%, P<0.01; 35% *vs* 81%, P<0.01), lymphatic metastasis (39% *vs* 70%, P<0.05; 43% *vs* 74%, P<0.05), or microvascular density (Ang-2: 74.9±11.8 *vs* 65.6±11.5, P<0.05). In addition, the level of MMP-9 expression was correlated with the invasion depth (33% *vs* 79%, P<0.01). Also, there was a significant correlation between the expression of Ang-2 and MMP-9 (χ^2 = 13.0, P<0.01).

CONCLUSION: Ang-2 and MMP-9 play a synergistic role in the invasion and metastasis of gastric carcinoma. Their colocalization may be a useful indicator for the prognosis of the disease.

Key Words: Angiopoietin-2; Matrix metalloproteinase-9; Gastric carcinoma; Immunohistochemistry

Qian J, Liu NZ, Cheng SP. Expression of Angiopoietin-2 and Matrix metalloproteinase-9 in gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):299-302

摘要

目的: 观察血管生成素-2(angiopoietin-2)和金属基质蛋白酶-9(MMP-9)在胃癌组织中的表达, 并探讨其临床意义.

方法: 用免疫组化染色法检测了 50 例胃癌患者癌组织, 10 例非癌胃黏膜组织中 angiopoietin-2(Ang-2), MMP-9, CD-34 蛋白的表达.

结果: 胃癌组织中Ang-2, MMP-9的阳性率分别为56%和 60%, 显著高于非癌胃黏膜. 他们的表达水平与胃癌的分化程度呈负相关(25% *vs* 71%, χ^2 = 9.18, P<0.01; 31% *vs* 74%, χ^2 = 8.10, P<0.01), 与肿瘤的 TNM 分期(30% *vs* 78%, P<0.01; 35% *vs* 81%, P<0.01), 淋巴结转移(39% *vs* 70%, P<0.05; 43% *vs* 74%, P<0.05), 微血管密度(Ang-2: 74.9 ± 11.8 *vs* 65.6 ± 11.5, P<0.05)成正相关(此外, MMP-9 的表达水平还与肿瘤浸润的深度成正相关(33% *vs* 79%, χ^2 = 10.73, P<0.01). Ang-2、MMP-9 在胃癌中的阳性表达率之间存在一定相关性(χ^2 = 3.0, P <0.01).

结论: Ang-2、MMP-9 在胃癌的侵袭与转移中起重要作用, 并且他们之间存在相互诱导或是协同效应, 其共位表达可作为判断预后的指标.

关键词: 血管生成素 -2;金属基质蛋白酶 -9;胃癌;免疫组化

钱颉, 刘南植, 程胜平. 胃癌组织 Angiopoietin-2 及 MMP-9 表达的意义. 世界华人消化杂志 2005;13(3):299-302
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/299.asp

0 引言

Ang-2 是新发现的一种与肿瘤血管生成相关的细胞因子，他能特异性地与 Tie-2 结合，促进新血管的生

成[1-8]. 研究表明，在肿瘤组织远处浸润的区域，Ang-2高表达的同时，也伴随着MMPs的高表达[9-10]. 为此我们通过免疫组化技术对50例经手术治疗的胃癌患者组织标本进行血管生成素-2(Ang-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和微血管密度(MVD)的检测，探讨Ang-2，MMP-9与胃癌生物学特性的关系，并对二者的相关性进行分析，旨在为临床治疗及判断预后提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 2003-01/2003-10同济医院根治性手术切除胃癌标本50例. 男30例，女20例，年龄28-84(平均年龄52.5)岁. 高/中分化组16例，低分化组34例:按UICC新TNM分期标准分为Ⅰ期9例，Ⅱ14例，Ⅲ/Ⅳ27例;有淋巴结转移27例，阴性23例. 另良性溃疡胃切除组织标本10例作为对照组. 标本为常规石蜡包埋切片，留做HE及免疫组化染色. 兔抗angiopoietin-2多克隆抗体(R&D公司产品，1∶200 PBS稀释)，兔抗MMP-9多克隆抗体(Neomakers公司产品，1∶300 PBS稀释)，鼠抗CD34mAb(Zymed公司产品，1∶150 PBS稀释)，相应的SP试剂盒购于北京中山公司.

1.2 方法 免疫组化用常规SP法，最后以DAB显色，用PBS代替一抗做阴性对照. 以细胞胞质或血管内皮出现棕黄色颗粒，且其着色强度高于背景非特异性染色者判断为阳性. 对于Ang-2与MMP-9免疫组化染色的判定以每例切片中阳性细胞数与全部细胞数的比例计算:无阳性细胞为(-);阳性细胞数＜25%为(+);26-75%为(++);≥76%为(+++). CD34阳性为血管内皮细胞胞质着色，采用Weidner[11]微血管记数方法:在200×视野下计数阳性血管数，每例选择10个不重复视野计算单位视野(200×视野)的平均微血管数，即间质微血管密度(MVD)，单位为个/200×，结果用mean±SD表示. 根据数据类型分别使用χ^2检验、t检验及相关分析，检测标准a = 0.05，a = 0.01.

2 结果

2.1 Ang-2，MMP-9的分布 在50例胃癌组织中有28例Ang-2染色阳性，30例MMP-9染色阳性. Ang-2、MMP-9阳性表达主要位于肿瘤细胞胞质，呈散在、片状或灶状分布，大部分都位于癌肿侵袭正常组织的边缘以及血管的附近，也有侵犯到胃壁淋巴小结的肿瘤细胞呈阳性反应(图1-6). 另外，Ang-2在血管内皮细胞，平滑肌细胞也有少量的表达，但其阳性强度低于肿瘤细胞;MMP-9在纤维母细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞也呈部分弱阳性表达. 在10例非癌胃黏膜组织中，有9例Ang-2，MMP-9完全不表达仅1例呈弱阳性表达.

2.2 Ang-2，MMP-9表达与胃癌临床病理的关系 Ang-2的表达强度与胃癌的浸润深度无明显相关性(P>0.05)，与胃癌的分化程度、临床分期、淋巴结转移密切相关(25% *vs* 71%，χ^2 = 9.18，P<0.01;30% *vs* 78%，χ^2 = 11.28，P<0.01;39% *vs* 70%，χ^2 = 4.92，P<0.05). MMP-9的表达强度则与胃癌的浸润深度、分化程度、临床分期以及淋巴结转移都有显著的相关性(33% *vs* 79%，χ^2 = 10.73，P<0.01;31% *vs* 74%，χ^2 = 8.10，P<0.01;35% *vs* 81%，χ^2 = 11.29，P<0.01;43% *vs* 74%，χ^2 = 4.84，P<0.05)(表1).

2.3 Ang-2与胃癌微血管密度之间的关系 Ang-2阳性组与Ang-2阴性组比较，MVD值有显著性差异(74.9±11.8 *vs* 65.6±11.5，t = 2.79，P<0.05). 在Ang-2阳性率高的切片，微血管密度也高，而且，在恶性程度越高的病例，Ang-2的表达越高，间质中的血管也越丰富. 说明Ang-2的表达可以诱导胃癌组织新血管的生成，且与肿瘤的恶性程度有一定相关性.

2.4 Ang-2、MMP-9阳性表达之间的关系 在28例Ang-2阳性病例中，有23例MMP-9阳性，在22例Ang-2阴性病例中有15例MMP-9阴性，即Ang-2(+)/MMP-9(+)23例，Ang-2(+)/MMP-9(-)5例，Ang-2(-)/MMP-9(-)15例，Ang-2(-)/MMP-9(+)7例. 组间比较，具有显著性差异(χ^2 = 13.0，P<0.01).

3 讨论

新生血管的形成在肿瘤发生发展过程中有重要的作用[12-15]，Angiopoietin-2是新发现的一种促进肿瘤血管生成的细胞因子. 他特异性表达于人体多种肿瘤边缘的血管重建区，参与肿瘤血管新生的起始及延续过程，从而影响肿瘤的生长与转移[16-20]. 金属基质蛋白酶(MMPs)则是一类发现比较早的，结构中含有Zn^{2+}、Ca^{2+}等金属离子的蛋白水解酶类，能水解胶原蛋白、弹性蛋白、氨基葡聚糖等多种细胞外基质，参与多种肿瘤的侵袭与转移[21-29]. MMP-9是基质金属蛋白酶家族的很重要的一员，他与MMP-2同属于明胶酶，其作用底物是Ⅳ、Ⅴ型胶原、凝胶、弹力蛋白等. 有研究表明Ang-2，MMP-9分别与胃癌的发生、发展有一定的相关性，但是目前，对于Ang-2，MMP-9在胃癌的血管形成、侵袭与转移过程中所起的作用是否具有协同性，尚无研究. 我们用免疫组化的方法检测了50例胃癌患者癌组织及5例非癌胃黏膜组织中Ang-2、MMP-9蛋白的表达. 结果表明，在10例非癌胃黏膜中仅有1例有少量细胞表达Ang-2及MMP-9，阳性表达率低于25%，且该病例为胃窦部巨大溃疡行胃大部切除手术，尚不能排除其有恶变倾向. 在50例胃癌中有28例Ang-2强阳性表达，其中9例早期胃癌有4例阳性表达，与晚期相比具有统计学意义(P<0.05)，表明Ang-2能出现在胃癌早期. Ang-2

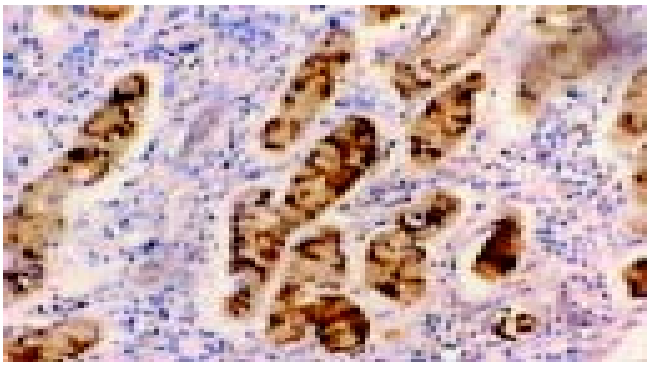


图 1 胃癌细胞 Ang-2 蛋白阳性表达(SP 法×100 倍).

图 2 浸润胃壁前沿及血管内的癌细胞 Ang-2 蛋白阳性表达(SP 法×40 倍).

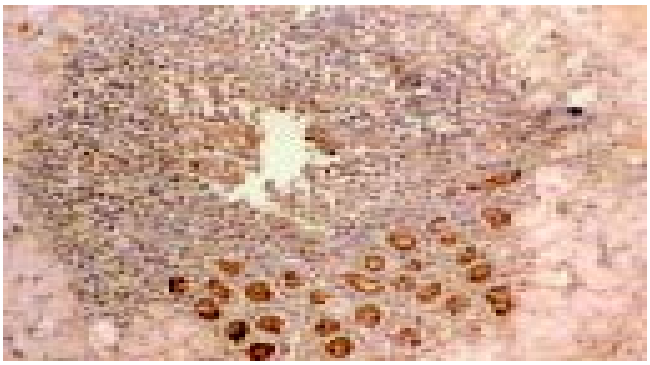


图 3 侵犯到胃壁淋巴小结的肿瘤细胞 MMP-9 蛋白阳性表达(S-P 法×40 倍).

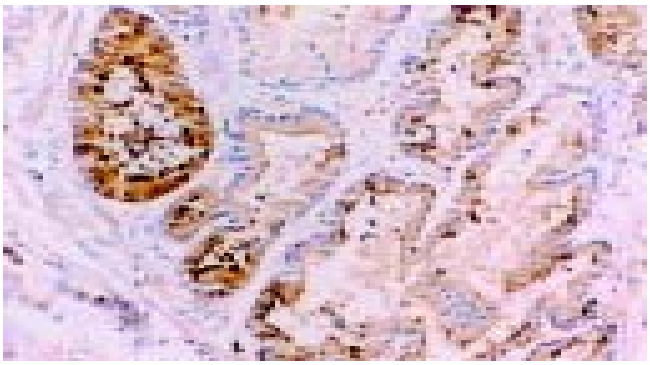


图 4 侵犯到黏膜下层的 MMP-9 蛋白阳性表达(S-P 法×100 倍).

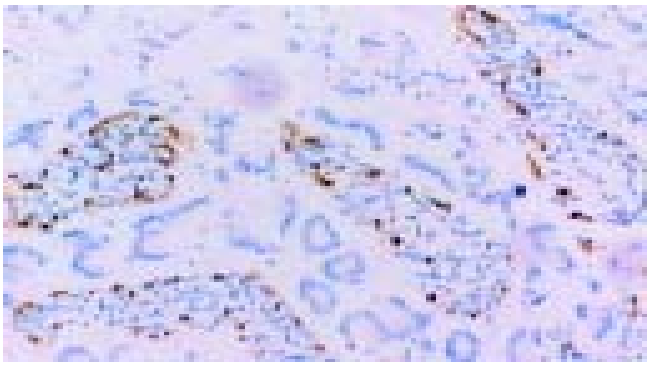


图 5 胃癌细胞 MVD(S-P 法×100 倍).

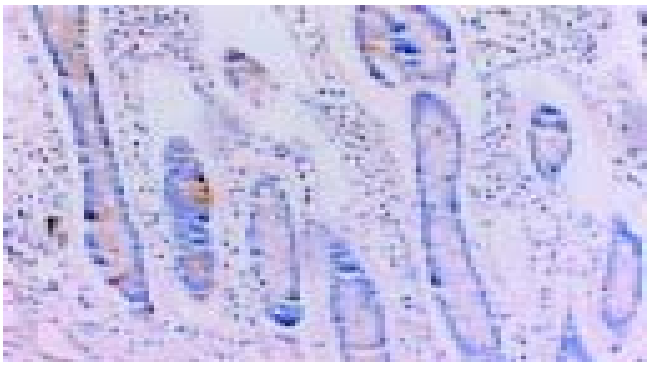


图 6 正常黏膜 Ang-2 蛋白弱阳性表达(S-P 法×100 倍).

表 1 Ang-2，MMP-9 与胃癌临床病理的关系

参数	n	Ang-2		MMP-9	
		-/+	+/+++	-/+	+/+++
分化程度高 / 中	16	12(7.0)	4(9.0)	11(6.4)	5(9.6)
低	34	10(15.0)	24(19.0)[b]	9(13.6)	25(20.4)[b]
TNM 分期 I/II	23	16(10.1)	7(12.9)	15(9.2)	8(13.8)
Ⅲ / Ⅳ期	27	6(11.9)	21(15.1)[b]	5(10.8)	22(16.2)[b]
浸润深度 T_1/T_2	21	12(9.2)	9(11.8)	14(8.4)	7(12.6)
T_3/T_4	29	10(12.8)	19(16.2)	6(11.6)	23(17.4)[b]
淋巴结转移(-)性	23	14(10.1)	9(12.9)	13(9.2)	10(13.8)
(+)性	27	8(11.9)	19(15.1)[a]	7(10.8)	20(16.2)[a]

[a] $P<0.05$；[b] $P<0.01$.

的表达主要位于癌灶边缘与正常组织交界处以及血管的附近，多数表达于肿瘤细胞胞质，也有少量的单核细胞和血管内皮细胞着色，说明不仅是内皮细胞，胃癌细胞也可以分泌Ang-2.我们的研究结果还表明，Ang-2的表达还与胃癌的分化程度、病理分级、MVD及淋巴结转移密切相关.由此可见，Ang-2在胃癌的发生、发展及远处转移过程中起着重要的作用.这与Eoth *et al*[30]的研究结果一致.在50例胃癌中有30例MMP-9强阳性表达，其表达与胃癌的分化程度、病理分级、浸润深度及淋巴结转移也有一定相关性.由于肿瘤细胞存在着异质性，所以Ang-2、MMP-9在肿瘤组织的表达并不均一.

我们的实验结果还表明Ang-2及MMP-9在胃癌组织中的表达有一定的相关性，在28例Ang-2阳性病例中，有23例MMP-9阳性.Ang-2表达阳性率高的切片，MMP-9的阳性率也高，并且表达的部位基本一致.但究竟是不是同Hu[9]的研究一样，Ang-2的表达可以上调MMP-9的表达，还需要进一步的研究.倘若这种猜想是正确的，则可为胃癌的基因治疗开辟新的道路.由于Ang-2除女性生殖器官外，在机体的正常组织不表达或低表达，若作为抗肿瘤治疗的靶点，预计全身影响也比较小.另一方面，Ang-2，MMP-9在胃癌的侵袭和转移中起着重要的作用，其共位表达可望成为判断预后的指标.

4 参考文献

1 Asahara T, Chen DH, Takahashi T, Fujikawa K, Kearney M, Magner M, Yancopoulos GD, Isner JM. Tie2 receptor ligands, angiopoietin-1 and angiopoietin-2, modulate VEGF-Induced postnatal neovascularization. *Circulation Research* 1998;83:233-240

2 Ferrara N. Vascular endothelial growth factor:molecular and biological aspects. *Curr Top Micobiol Immunol* 1999;237:1-30

3 Huang XL, Takakura N, Suda T. In vitro effects of angiopoietins and VEGF on hematopoietic and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:133-138

4 Mezquita J, Mezquita P, Montserrat P, Mezquita B, Francone V, Vilagrasa X, Mezquita C. Genomic structure and alternative splicing of chicken angiopoietin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275:643-651

5 Horner A, Bord S, Kelsall AW, Coleman N, Compston JE. Tie2 ligands angiopoietin-1 and angiopoietin-2 are coexpressed with vascular endothelial cell growth factor in growing human bone. *Bone* 2001;28:65-71

6 Kampfer H, Pfeilschifter J, Frank S. Expressional regulation of angiopoietin-1 and -2 and the tie-1 and -2 receptor tyrosine kinases during cutaneous wound healing:a comparative study of normal and impaired repair. *Lab Invest* 2001;81:361-373

7 Sato T, El-Assal ON, Ono T, Yamanoi A, Dhar DK, Nagasue N. Sinusoidal endothelial cell proliferation and expression of angiopoietin/Tie family in regenerating rat liver. *J Hepatol* 2001;34:690-698

8 Tscheudschilsuren G, Aust G, Nieber K, Schilling N, Spanel-Borowski K. Microvascular endothelial cells differ in basal and hypoxia-regulated expression of angiogenic factors and their receptors. *Microvasc Res* 2002;63:243-251

9 Hu B, Guo P, Fang Q, Tao HQ, Wang D, Nagane M, Huang HJ, Gunji Y, Nishikawa R, Alitalo K, Cavenee WK, Cheng SY. Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloprotease-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8904-8909

10 Das A, Fanslow W, Cerretti D, Warren E, Talarico N, McGuire P. Angiopoietin/Tek interactions regulate mmp-9 expression and retinal neovascularization. *Lab Invest* 2003;83:1637-1645

11 Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G. Tumor angiogenesis:a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1875-1887

12 高国林, 杨原, 杨思凤, 任彩文. 血管内皮细胞增生是胃癌相关性病变. 世界华人消化杂志 2000;8:282-284

13 Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 2000;5:37-44

14 吴静, 樊代明. 肿瘤血管生成与肿瘤血管抑制治疗. 世界华人消化杂志 2001;9:316-321

15 陶厚权, 邹寿椿, 王瑞年, 林言箴. 血管生成与胃癌发生之间关系的实验研究. 世界华人消化杂志 2003;11:43-46

16 Chen L, Yang Z, Wang G, Wang C. Expression of angiopoietin-2 gene and its receptor Tie2 in hepatocellular carcinoma. *J Tongji Med Univ* 2001;21:228-230

17 Currie MJ, Gunningham SP, Turner K, Han C, Scott PA, Robinson BA, Chong W, Harris AL, Fox SB. Expression of the angiopoietins and their receptor Tie2 in human renal clear cell carcinomas;regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia. *J Pathol* 2002;198:502-510

18 Gale NW, Thurston G, Davis S, Wiegand SJ, Holash J, Rudge JS, Yancopoulos GD. Complementary and coordinated roles of the VEGFs and angiopoietins during normal and pathologic vascular formation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002;67:267-273

19 Xing L, Zhang Z, Xu Y. Expression of angiopoietin-2 gene in non-small cell lung cancer. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003;23:362-364

20 Caine GJ, Blann AD, Stonelake PS, Stonelake PS, Ryan P, Lip GY. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2 and Tie-2 in breast and prostate cancer:a comparison with VEGF and Flt-1. *Eur J Clin Invest* 2003;33:883-890

21 李楠, 徐采朴, 宋波, 房殿春, 杨仕明, 门荣莆. 人胃癌组织中金属蛋白酶类基因的过度表达. 华人消化杂志 1998;6:118-120

22 洪照友, 俞金龙, 张云生, 高毅. 基质金属蛋白酶-9, CD34的表达与肝癌侵袭转移的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:170-174

23 Kabashima A, Yao T, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. Relationship between biologic behavior and phenotypic expression in intramucosal gastric carcinomas. *Hum Pathol* 2002;33:80-86

24 Wroblewski LE, Pritchard DM, Carter S, Varro A. Gastrin-stimulated gastric epithelial cell invasion:the role and mechanism of increased matrix metalloproteinase 9 expression. *Biochem J* 2002;365:873-879

25 Caudroy S, Polette M, Nawrocki-Raby B, Cao J, Toole BP, Zucker S, Birembaut P. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:697-702

26 Shin EY, Ma EK, Kim CK, Kwak SJ, Kim EG. Src/ERK but not phospholipase D is involved in keratinocyte growth factor-stimulated secretion of matrix metalloprotease-9 and urokinase-type plasminogen activator in SNU-16 human stomach cancer cell. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:596-602

27 Nyberg P, Moilanen M, Paju A, Sarin A, Stenman UH, Sorsa T, Salo T. MMP-9 activation by tumor trypsin-2 enhances in vivo invasion of human tongue carcinoma cells. *J Dent Res* 2002;81:831-835

28 Albo D, Shinohara T, Tuszynski GP. Up-regulation of matrix metalloproteinase 9 by thrombospondin 1 in gastric cancer. *J Surg Res* 2002;108:51-60

29 郑伟达, 王小众. 基质金属蛋白酶及其抑制物与实验性肝纤维化. 世界华人消化杂志 2004;12:428-431

30 Etoh T, Inoue H, Tanaka S, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiopoietin-2 is related to tumor angiogenesis in gastric carcinoma:possible in vivo regulation via induction of proteases. *Cancer Res* 2001;61:2145-2153

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):303-307
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

槲皮素联合顺铂对胃癌 SGC-7901 细胞增生和凋亡的影响

王海忠, 王 沁

王海忠, 兰州军区总医院肿瘤科 甘肃省兰州市 730050
王沁, 兰州医学院附属一院消化内科 甘肃省兰州市 730030
王海忠, 男, 1968-10-22 生, 山西省阳泉市人, 汉族, 主治医师, 1990 年第三军医大学本科毕业, 兰州医学院附属一院消化专业2002级硕士生, 主要从事胃肠道肿瘤的研究.
项目负责人: 王海忠, 730050, 甘肃省兰州市, 兰州军区总医院肿瘤科.
Wang20678@hotmail.com
电话: 0931-8975260
收稿日期: 2004-10-21 接受日期: 2004-11-04

Effects of quercetin combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 cells

Hai-Zhong Wang, Qin Wang

Hai-Zhong Wang, Department of Oncology, Lanzhou General Hospital, Lanzhou 730050, Gansu Province, China
Qin Wang, Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Lanzhou Medical College, Lanzhou 730030, Gansu Province, China
Correspondence to: Hai-Zhong Wang, Department of Oncology, Lanzhou General Hospital, Lanzhou 730050, Gansu Province, China.
wang20678@hotmail.com
Received: 2004-10-21 Accepted: 2004-11-04

Abstract

AIM: To investigate the effects of quercetin combined with cisplatin on the proliferation and apoptosis of, and the expression of apoptosis-related gene Bcl-X_L in human gastric cancer SGC-7901 cells.

METHODS: After treated with quercetin (QU), cisplatin (DDP) or both (QU-DDP), the viability of SGC-7901 cells was evaluated by MTT assay. Cell cycle distribution and apoptosis were detected by flow cytometry. Cell morphology was examined under light microscope and electron microscope. The expression of Bcl-X_L mRNA was detected by the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: After exposure to different drugs for 24 h, SGC-7901 cells manifested typical morphological features of apoptosis. Both DDP and QU inhibited the proliferation and induced the apoptosis of SGC7901 cells in a time and concentration-dependent manner. QU combined with DDP synergistically enhanced cell death. The apoptosis was more pronounced in cells treated with both drugs (QU: 1 μmol/L, DDP: 80 μmol/L) than DDP alone (80 μmol/L) (19.93±0.07 *vs* 5.16±0.11, $P<0.01$). After exposure to DDP for 48 h, Bcl-X_L mRNA expression was down-regulated, which was promoted by QU.

CONCLUSION: QU combined with DDP effectively inhibits proliferation and induces apoptosis of the human gastric cancer SGC-7901 cells *in vitro* in a dose-dependent manner.

Key Words: Quercetin; Cisplatin; Gastric cancer; SGC-7901 cells; Proliferation; Apoptosis

Wang HZ, Wang Q. Effects of quercetin combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):303-307

摘要

目的: 探讨槲皮素(quercetin，QU)联合顺铂(DDP)对胃癌 SGC-7901 细胞增生、凋亡及凋亡相关基因 Bcl-X_L mRNA 表达的影响.

方法: 用槲皮素和顺铂处理胃癌SGC-7901细胞后，应用光镜、电镜、MTT 法、流式细胞仪和 RT-PCR 技术研究胃癌细胞的形态学变化、生长抑制、诱导凋亡和对凋亡相关基因 Bcl-X_L mRNA 表达的影响.

结果: 药物作用于细胞 24 h 后，可看到较为典型的细胞凋亡形态学变化.DDP和QU均可以抑制胃癌SGC-7901细胞增生或诱导其凋亡，且有时间和剂量依赖效应，联合应用具有协同效应.联合组的诱导凋亡率及增生抑制效应显著高于单用 DDP 组($P<0.01$)，干预 48 h 后，Bcl-X_L mRNA 的表达下调，QU 可以加强下调作用.

结论: 人胃癌SGC-7901细胞体外实验中，QU和顺铂可以抑制其增生并诱导凋亡，二者联合应用有一定的协同效应，且呈剂量依赖关系.

关键词: 槲皮素; 顺铂; 胃癌; SGC-7901 细胞系; 增生; 凋亡

王海忠, 王沁. 槲皮素联合顺铂对胃癌SGC-7901细胞增生和凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3):303-307
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/303.asp

0 引言

胃癌是严重危害人类健康最常见的癌症之一[1-2]，占我国恶性肿瘤死亡率之首[3-4]. 槲皮素(quercetin，QU)是一种天然的黄酮类化合物，化学名为3，3'，4'，5，7-五羟基黄酮，广泛分布于蔬菜、水果、干

果、饮料及中草药中.Erlund *et al*[5]研究表明，QU没有毒副作用.1971年NCI首次发现槲皮素对P388白血病具有抑制作用，近年来的研究表明QU在体外、体内动物实验模型中均显示出抗癌活性[6-9].我们观察槲皮素和顺铂联合使用对体外培养胃腺癌SGC-7901细胞增生和凋亡的影响，并通过检测凋亡率和Bcl-X_L mRNA的表达用药前后的变化，探讨两种药物的合用是否可增强抗癌作用及可能的机制，为临床治疗提供理论与实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株SGC-7901(中分化腺癌)购自中科院上海细胞生物研究所.RPMI 1640培养液和胰蛋白酶(Gibco)，小牛血清(杭州四季青公司)，噻唑兰(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)及L-谷酰胺(Sigma)，RNA提取液(Trizol，Life Technologies)，RT-PCR试剂盒(Takara公司)，注射用顺铂(0.01 g/支，山东齐鲁制药厂，50 g/L葡萄糖溶，培养基释)配制为1 mmol/L溶液存储在-4℃的冰箱内，五羟黄酮(Sigma，DMSO溶，培养基释)配制为0.1 mol/L 存储在-20℃的冰箱内待用，DMSO在递质中的浓度为0.2 g/L,不影响细胞的正常生长[10].人胃癌SGC-7901细胞培养在含100 ml/L的灭活小牛血清、100 kU/L青霉素G，100 mmol/L链霉素和2 mmol/L L-谷酰胺的RPMI 1640完全培养基中，置37℃，50 mL/L CO_2饱和湿度、1个大气压的孵箱内培养.

1.2 方法

1.2.1 细胞增生 单药处理:取对数生长期细胞，接种于96孔板，调整细胞浓度为3×10^4/孔，培养24 h后，加入不同浓度的处理因素(QU浓度分别为20，40，60，80，100 umol/L;DDP浓度分别为1，2，4，8 umol/L)，保持总体积为200 μL/孔，每一剂量组设4个复孔.同时设试验对照组:SGC-7901细胞+同等剂量的培养基.分别于24，48，72 h加入MTT(5 g/L，15 μL/孔)，继续培养4 h，弃去培养液，每孔加200 μL的DMSO/异丙醇(1∶1)混合液，以DMSO调零，用酶联免疫检测仪以570 nm波长测定各孔的吸光度(*A*)，计算平均*A*值.联合处理:1，2 μmol/L浓度的DDP分别与以上5种不同浓度的QU联合(QU在加入顺铂后40 min加入)培养，其余具体步骤相同.选择1，2，4 μmol/L浓度的DDP分别与20，40，80 μmol/L的QU联合处理并行台盼兰染色计算细胞活力,按照Chou *et al*[11]方法进行合成指数(CI)的计算，CI>1、CI = 1、CI <1分别代表拮抗、相加、协同效应.形态学观察:分别培养细胞至培养瓶70-80%铺满后，根据加入的药物和浓度实验分4组:对照组(未处理)，40，80 μmol/L QU，1 μmol/L DDP，1 μmol/L DDP +40，80 μmol/L QU，继续培养24 h，倒置显微镜下观察细胞形态变化;收集单层附壁细胞爬片，常规HE染色后观察.方法同前，24 h后收集细胞，离心弃上清，25 g/L戊二醛固定，制备超薄切片，双铅染色，电镜(日本JEM100CX型)下观察并照相.

1.2.2 细胞周期和凋亡 试验分组及前期处理同形态学观察，收集药物处理后的胃癌细胞5×10^5，PBS洗涤2次后，用4℃乙醇固定12 h以上，离心除去乙醇，加入10 g/L RNA酶溶液200 mL，37℃水浴15 min，加入碘化丙啶，室温下避光孵育15 min，上流式细胞仪检测凋亡百分率和各细胞周期所占百分比.实验重复3次.Bcl-X_L mRNA表达的前期处理同形态学观察，实验分为对照组(未处理)，1 μmol/L DDP，60 μmol/L QU，1 μmol/L DDP +60 μmol/L QU，收获1×10^6细胞，按照试剂盒操作说明用RNA提取液(Trizol)提取总RNA，逆转录合成cDNA，Bcl-X_L引物序列:5'-CAATGGACTGGTGAGCCCA-3'和5'-AGTTCAAACTCGTCGCCTG-3',307 bp;内参β-actin(β-2 mic roglubulin)引物序列为:5'-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3'和5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3',120 bp.扩增条件:94℃预变性5 min，94℃变性1 min，56℃退火1 min，72℃延伸1 min，35个循环后，72℃延伸10 min.PCR产物5 μL在2 g/L琼脂糖上电泳(含0.5 mg/L溴化乙锭)，经凝胶图像分析仪分析结果，将Bcl-X_L和β-actin的比值做为Bcl-X_L表达的参数，对Bcl-X_L的PCR产物进行相对定量，取未处理的SGC-7901细胞做对照，实验重复3次.

统计学处理 采用SPSS 10.0进行作图和统计分析，吸光度(*A*)用方差分析，均数比较用 *t* 检验.

2 结果

2.1 细胞增生 QU或DDP(单位μmol/L)单药作用后出现相似的影响结果:同一时间点不同浓度组*A*值不同，趋势均为高浓度组低于低浓度组;同一浓度不同时间点*A*值不同，所有浓度下均为随着时间的延长，*A*值逐渐增大(图1-2).24 h时低浓度之间或高浓度之间(QU20与40，80与100;DDP1与2，4与8)*A*值差别无统计学意义;随着时间延长，低浓度组(QU 20及40;DDP 1，2)与对照组*A*值差别无统计学意义;不同的是在48 h处，QU4与QU 8A值差别无统计学意义;但在72 h处，对照组与DDP4 *A*值差别无统计学意义，对照组与QU 40 μmol/L *A*值有差别性，其余两浓度组间均有显著差别.QU与DDP联合使用的交互作用有统计学意义($P<0.0\ 001$)，固定DDP浓度下不同浓度QU组A值不同，DDP1时，QU五个浓度组间A值差别均有统计学意义;DDP2时，QU80与100间A值差别无统

计学意义;趋势均为高浓度组低于低浓度组. 固定 QU 浓度下 DDP 不同浓度组 A 值不同，QU2 时，DDP1 与 DDP 2 间 A 值差别无统计学意义;其余两浓度组间差别均有统计学意义，趋势均为高浓度组低于低浓度组(图 3). 联合处理组按照 Chou *et al* 方法进行合成指数(CI)的计算 CI<1 提示二者之间具有协同效应(表 1).

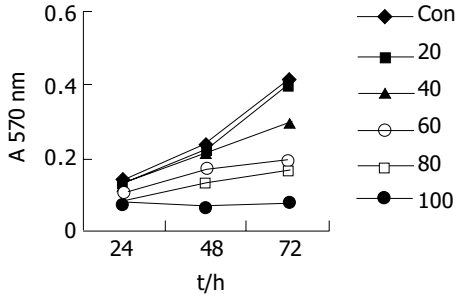


图 1 QU(μmol/L)对 SGC-7901 细胞的作用.

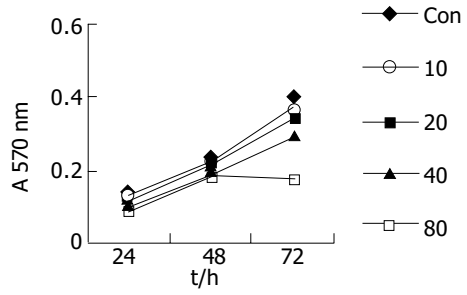


图 2 DDP(μmol/L)对 SGC-7901 细胞的作用.

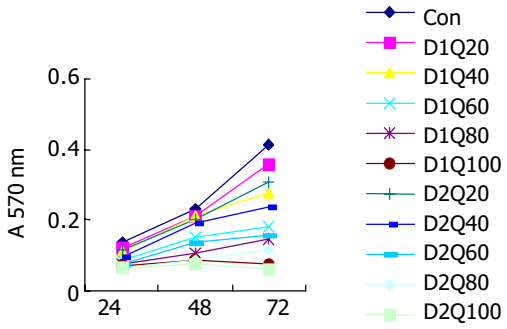


图 3 QU(μmol/L)加 DDP(μmol/L)对 SGC-7901 细胞的作用.

表 1 台盼兰染色计算 CI 值

Agent(umol/L)	Viability(%)	CI
DDP1+Q20	73.4 ± 5.6	0.484
DDP1+Q40	41.5 ± 3.4	0.631
DDP1+Q80	35.2 ± 2.7	0.628
DDP2+Q20	63.8 ± 4.5	0.628
DDP2+Q40	56.1 ± 2.9	0.598
DDP2+Q80	35.5 ± 1.08	0.674
DDP4+Q20	45.2 ± 3.2	1.042
DDP4+Q40	31.5 ± 1.02	0.998
DDP4+Q80	21.4 ± 0.4	0.954

CI>1, CI = 1 and CI<1 indicate antagonism, additive and synergism, respectively.

2.2 细胞形态学的改变 光镜下未处理组细胞形态呈多角形、圆形、细胞体积大，边缘不清，多形性明显，胞质较丰富饱满而透亮;核大小不一，可见核分裂、双核及核仁;细胞生长紧密甚至呈堆叠生长(图 4A). QU 与 DDP 处理组细胞形态变化明显，由多角形为主变为形态一致、以梭形为主，胞质丰富透亮，可见部分圆形漂浮的细胞，其胞质内见许多颗粒;大部分细胞体积小，贴壁紧密，分散存在，细胞境界清楚;细胞核明显变小(图 4B). 透射电镜证实，正常细胞的细胞膜完整，细胞核和细胞器等结构清晰(图 5A)，药物处理后 24 h 开始出现较为典型的细胞凋亡的形态学变化:胞质浓缩，内质网变疏松并与细胞膜融合，形成空泡，晚期核碎裂，染色质片断化，产生凋亡小体等(图 5B).

2.3 细胞周期的分布和凋亡率的改变 药物作用 24 h 后，流式细胞仪检测凋亡率和细胞周期分布，可见细胞凋亡率明显增加，且联合组细胞凋亡率明显高于单药组及对照组($P<0.01$). 对细胞周期分布的影响:单独使用 QU 使 SGC-7901 细胞 G2/M 期明显增多，S 和 G0/G1 期细胞减少;SGC-7901细胞被顺铂阻滞在S和G2/M期;联合使用 QU 和顺铂治疗组细胞的增生周期均有不同程度的下降(表 2).

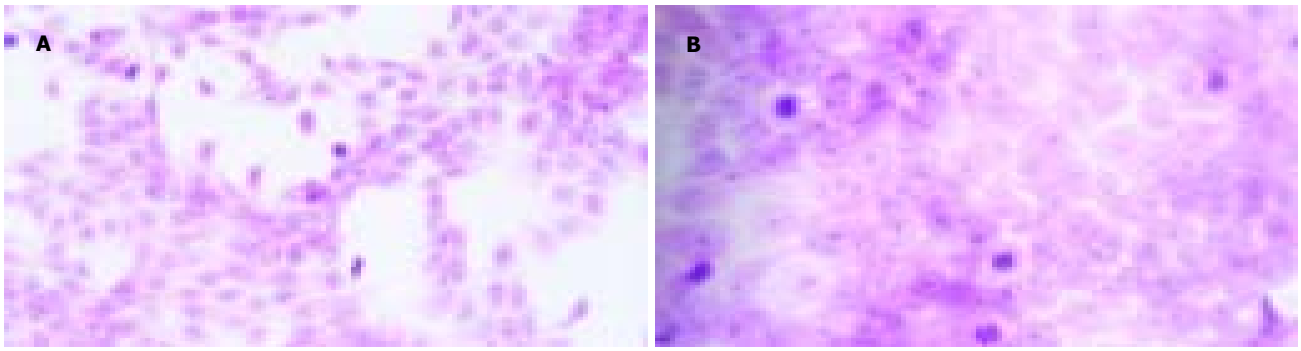


图 4 SGC-7901 细胞光镜. A: 未处理 ×100; B: QU 与 DDP 处理 ×100.

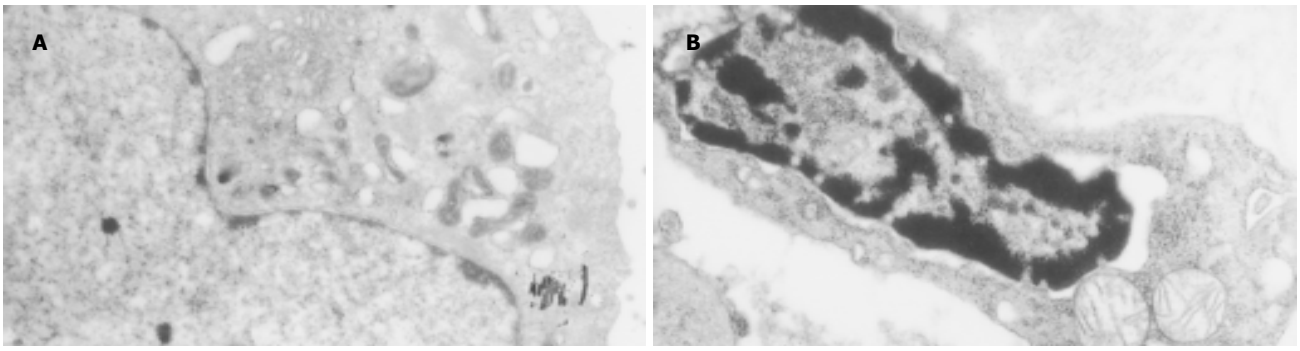


图5 SGC-7901细胞电镜. A: 对照×10 000; B: QU和DDP处理×7 000.

表2 药物对SGC-7901细胞凋亡及周期的影响(mean ± SD, n = 3)

Group	Apoptosis(%)	G_0/G_1	S	G_2/M
Control	0.34 ± 0.05	56.43 ± 0.81	31.50 ± 1.25	12.06 ± 0.46
1uM DDP	6.64 ± 0.12[b]	42.56 ± 0.75	36.28 ± 1.52	15.14 ± 0.56
40uM QU	3.72 ± 0.09[b]	51.67 ± 0.79	28.81 ± 1.12	15.61 ± 0.78
80uM QU	5.16 ± 0.11[b]	47.54 ± 0.67	26.72 ± 1.11	20.37 ± 0.63
1uM DDP +40uM QU	11.52 ± 0.08[d]	49.51 ± 0.75	29.23 ± 1.73	10.74 ± 0.41
1uM DDP +80uM QU	19.93 ± 0.07[d]	45.26 ± 0.66	26.14 ± 1.38	8.92 ± 0.55

[b]P<0.01 *vs* Control; [d]P<0.01 *vs* DDP.

2.4 Bcl-X_L mRNA的表达 RT-PCR产物电泳显示，药物作用48 h后，对照组和处理组在307 bp处均出现特异性Bcl-X_L条带，实验组Bcl-X_L mRNA的表达均达明显低于对照组(P<0.05，图6).经凝胶图像分析仪分析结果，将Bcl-X_L和β-actin的比值做为Bcl-X_L表达的参数，对Bcl-X_L的PCR产物进行相对定量，对照0.95±0.04，DDP1 0.65±0.02，QU60 0.54±0.02，联合用药组0.18±0.01降低较单药显著(P<0.05).

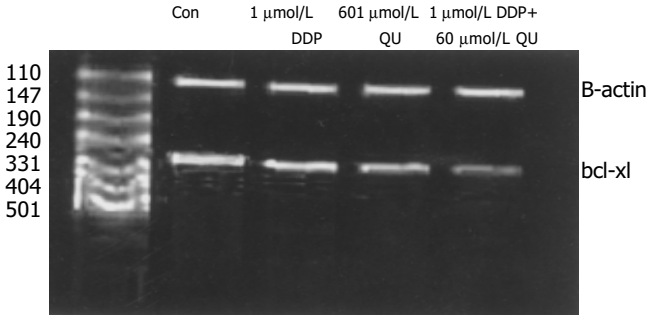


图6 Bcl-X_L mRNA的表达. lane 1: marker，2: CON，3: DDP1，4: QU60，5: DDP1+QU60.

3 讨论

肿瘤细胞的增生与其丧失凋亡能力有关[12-16]，并且存在多种因素导致了肿瘤细胞凋亡能力的丧失，逃避凋亡机制的调控在肿瘤细胞对常规化疗药物耐药中起关键作用[17-18].临床上许多患者在确诊时已丧失了手术机会，而化疗和放疗的效果不佳、毒副作用较大.因此，寻找一种高效低毒的药物作为化疗治疗或是辅助治疗晚期肿瘤就是许多学者研究的方向[19].我们采用体外细胞培养的方法研究发现，微摩尔浓度槲皮素能明显抑制体外培养的胃癌SGC-7901细胞的生长，且其抑制细胞增生在一定范围内，随槲皮素的浓度而增加，作用时间延长，细胞增生抑制率相应增加，具有时效及量效关系，这一浓度约在20-100 μmol/L之间，高于此浓度抑制作用太强，细胞难以增生;低于此浓度则基本没有显示抑制增生作用，而且可能有部分的增强效应(未报告数据).MTT试验证实随时间的延伸，低浓度QU时间效应逐渐消失，但在72 h处，40 μmol/L组与对照组再次出现显著性差异，机制不明，较高浓度组的时间效应比较明显.经DDP处理的SGC-7901细胞，量效关系比较明显，较高浓度组有一定的时间相关性，而低浓度组(1，2)随着作用时间的延长，48 h后1，2 μmol/L组与对照组比较差异性消失，72 h后4 μmol/L组与对照组比较差异性也消失，这可能与肿瘤细胞的耐药机制产生有关.联合使用QU后良效关系仍然存在，时间效应则一直延续到72 h后，表明QU可以加强顺铂的抑制增生效应，也可能部分的对抗肿瘤细胞的耐药性.同时经过台盼兰染色计算活细胞数目使用合用指数分析二者之间的确存在一定范围内的协同效应，说明QU联合DDP治疗胃癌可能起到增效、减毒作用，这一结论与文献[20]报道基本一致.

QU可诱导白血病细胞、大肠癌细胞、肝癌细胞

凋亡. 在我们的实验中，经HE染色和电子显微镜检查，单独或联合处理24 h开始出现凋亡的形态学改变，并随药物浓度、联合作用、时间凋亡细胞明显增多，HE染色和电子显微镜均可观察到较为典型的细胞凋亡过程的形态学改变. 流式细胞仪检查在DNA直方图上G1峰前出现凋亡峰，细胞周期分析表明，单独使用QU使SGC-7901细胞G2/M期明显增多，S和G0/G1期细胞减少;SGC-7901细胞被顺铂阻滞在S和G2/M期;联合使用QU和顺铂治疗组细胞的增生周期均有不同程度的下降，细胞凋亡率明显高于DDP同一浓度的单独使用，表明QU可以通过加强DDP诱导凋亡的途径抑制肿瘤细胞的生长,具有抗增生促凋亡作用[14].

近年来，关于bcl-2基因家族与肿瘤细胞凋亡的关系已成为新的研究热点[21-22]，Bcl-X_L是bcl-2基因家族中Bcl-X两种亚型之一[23]，Bcl-X_L cDNA编码一种含233个氨基酸的蛋白质，其分子质量为21 ku，能够抑制不同细胞中由多种刺激所诱发的凋亡，其抑制凋亡的作用明显强于bcl-2和其他bcl-2家族成员，在调控许多细胞群的凋亡中发挥着更为重要的作用[24-25]. 许多肿瘤细胞，包括胃癌[26]Bcl-X_L表达升高，肿瘤细胞凋亡减少、增值明显以及耐药的产生可能与此有关. 我们的研究发现，实验组Bcl-X_L mRNA的表达均达明显低于对照组，且QU具有加强DDP下调Bcl-X_L mRNA的表达的作用，这可能是QU抗肿瘤的作用机制之一.

4 参考文献

1 Yin T, Ji XL, Shen MS. Relationship between lymph node sinuses with blood and lymphatic metastasis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:40-43

2 Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001;2:533-543

3 Deng DJ, Z E. Overview on recent studies of gastric carcinogenesis:human exposure of N-nitrosamides. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:250-252

4 Zhao GH, Li TC, Shi LH, Xia YB, Lu LM, Huang WB, Sun HL, Zhang YS. Relationship between inactivation of p16 gene and gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:905-909

5 Erlund I, Kosonen T, Alfthan G, Maenpaa J, Perttunen K, Kenraali J, Parantainen J, Aro A. Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2000;56:545-553

6 López-Lázaro M. Flavonoids as Anticancer agents: structure-activity relationship study. *Curr Med Chem Anti Cancer Agents* 2002;2:691-714

7 Ranelletti FO, Maggiano N, Serra FG, Ricci R, Larocca LM, Lanza P, Scambia G, Fattorossi A, Capelli A, Piantelli M. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. *Int J Cancer* 2000;85:438-445

8 Shi M, Wang FS, Wu ZZ. Synergetic anticancer effect of combined quercetin and recombinant adenoviral vector expressing human wild type P53, GM-CSF and B7-1gene on hepatocellula cells in vitro. *World J Gastroentrerol* 2003;9:73-78

9 Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids:Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 1999;65:337-353

10 Courage C, Budworth J, Gescher A. Comparison of ability of protein kinase C inhibitors to arrest cell growth and to alter cellular protein kinase C localisation. *Br J Cancer* 1995;71:697-704

11 Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships:the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 1984;22:27-55

12 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392

13 Tao HQ, Zou SC. Effect of preoperative regional artery chemotherapy on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:451-454

14 Liu S, Wu Q, Ye XF, Cai JH, Huang ZW, Su WJ. Induction of apoptosis by TPA and VP-16 is through translocation of TR3. *World J Gastroenterol* 2002;8:446-450

15 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Grow th inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800

16 Huang J, Cai MY, Wei DP. HLA class I expression in primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:654-657

17 郭晓钟, 邵晓冬, 徐建华, 赵佳钧, 李宏宇, 王迪. 肝癌组织中bcl-xL mRNA的表达. 世界华人消化杂志 2002;10:530-532

18 梁云, 陆斌, 崔贞福, 李晓冬, 郭亚军, 刘彦君. 肝细胞癌中Fas/FasL表达的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1364-1368

19 Kasibhatla S, Tseng B. Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Cancer Ther* 2003;2:573-580

20 Cipak L, Rauko P, Miadokova E, Cipakova I, Novotny L. Effects of flavonoids on cisplatin-induced apoptosis of HL-60 and L1210 leukemia cells. *Leuk Res* 2003;27:65-72

21 Pellecchia M, Reed JC. Inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins by natural polyphenols:new avenues for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Curr Pharm Des* 2004;10:1387-1398

22 Xu AG, Li SG, Li JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and c-*myc* in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:403-406

23 Ogata Y, Takahashi M. Bcl-xL as an antiapoptotic molecule for cardiomyocytes. *Drug News Perspect* 2003;16:446-452

24 Ochs K, Kaina B. Apoptosis induced by DNA damage O6-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and fas/caspase-8 independent. *Cancer Res* 2000;60:5815-5824

25 Iwata M, Harada K, Kono N, Kaneko S, Kobayashi K, Nakanuma Y. Expression of Bcl-2 familial proteins is reduced in small bile duct lesions of primary biliary cirrhosis. *Hum Pathol* 2000;31:179-184

26 Litvak DA, Papaconstantinou HT, Hwang KO, Kim M, Evers BM, Townsend CM Jr. Inhibition of gastric cancer by camptothecin involves apoptosis and multiple cellular pathways. *Surgery* 1999;126:223-230

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):308-311
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

对正常胃、胃溃疡及胃癌组织中弹力纤维分布规律的观察

关 维, 纪小龙, 徐 薪, 马亚敏, 尹 彤, 申明识

关维, 申明识, 中国人民解放军总医院病理科 北京市 100853
纪小龙, 徐薪, 中国武警总医院病理科 北京市 100039
马亚敏, 中国人民解放军总医院老年病研究所 北京市 100853
尹彤, 中国人民解放军总医院老年心学管病研究所 北京市 100853
关维. 女, 1976 – 06 – 22 生, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 满族.2002 年军医进修学院硕士生, 主要从事肿瘤病理的研究.
项目负责人: 纪小龙, 100039, 北京市永定路 69 号, 中国武警总医院病理科. xlji@huahai.com.cn
电话: 010–68188061 传真: 010–68188061
收稿日期: 2004–10–15 接受日期: 2004–11–04

Distribution of elastic fiber in tissues of normal stomach, stomach ulcer and stomach carcinoma

Wei Guan, Xiao-Long Ji, Xin Xu, Ya-Min Ma, Tong Yin, Ming-Shi Shen

Wei Guan, Ming-Shi Shen, Department of Pathology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Xiao-Long Ji, Xin Xu, Department of Pathology, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China
Ya-Min Ma, Institute of Geriatrics, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Tong Yin, Institute of Geriatric Cardiology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Xiao-Long Ji, Department of Pathology, General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China. xlji@huahai.com.cn
Received: 2004-10-15 Accepted: 2004-11-04

Abstract

AIM: To study the distribution of elastic fiber (EF) in tissues of normal stomach, gastric ulcer and gastric carcinoma.

METHODS: Tissue samples, including 40 cases of stomach carcinoma, 17 cases of normal stomach and 7 cases of stomach ulcer, were studied using hematoxylin and eosin (HE) staining and EF staining. The distributions of EF were analyzed under light microscope.

RESULTS: In tissues of stomach ulcer, EF, with a deep staining, was mainly located in the muscularis mucosa adjacent to the ulcer lesion. No EF was observed in carcinoma zone, but a great amount was found in the smooth muscle and connective tissue around the lesion. EF was increased significantly in stomach carcinoma specimens, compared with that in normal tissues (P = 0.0042). Hyperplasia of small vessel endothelia was observed in cancer tissues but not in ulcer tissues.

CONCLUSION: The distribution patterns of EF are different in normal stomach, gastric ulcer and gastric carcinoma. The increase of EF in gastric ulcer may be related to the stimulation of chronic inflammation; while in carcinoma, in addition to the chronic inflammatory stimulation, the EF increase in the surrounding tissues may also result from augmented EF production triggered by the cancer cells indirectly through releasing stimulatory factors or directly via regulating gene expression in EF-producing cells. The increase of EF in the stomach wall lesion is a chronic process.

Key Words: Elastic fiber; Stomach ulcer; Stomach Carcinoma; HE staining

Guan W, Ji XL, Xu X, Ma YM, Yin T, Shen MS. Distribution of elastic fiber in tissues of normal stomach, stomach ulcer and stomach carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):308-311

摘要

目的: 通过对正常胃组织、胃溃疡及胃癌所在胃壁组织中弹力纤维(EF)的观察，总结EF在其中的分布规律及异同并分析EF增多的原因.

方法: 正常胃标本17例，胃溃疡标本7例，胃癌标本40例.进行常规取材、固定、包埋、石蜡切片、HE染色和改良的Weigert染色，对染色结果进行观察、对比、分析.

结果: 正常胃壁中EF呈规律性分布，主要位于黏膜肌层和肌层临近黏膜下层侧，纤维毛细状，数量少，分布均匀.胃溃疡EF只在溃疡旁的黏膜肌层有显著增多，纤维增粗，着色深，排列紊乱，当溃疡深达肌层时，其中EF增多不明显.胃癌EF在平滑肌细胞和成纤维细胞分布区域均有不同程度增多，纤维增粗，着色深，排列紊乱.胃癌组与溃疡组增多的EF数量上存在显著差异(P = 0.0042, P<0.05).胃癌组织中小血管内皮细胞增生，而胃溃疡组中未见血管内皮细胞增生现象.

结论: EF在正常胃组织、胃溃疡及胃癌周围组织中均呈规律性分布，且三者存在显著不同.胃溃疡组织EF增多可能与慢性炎症的刺激有关;胃癌周围组织中EF的增多除慢性炎症外还应该存在其他刺激因素，癌细胞还可能向外发出某种刺激因子，这些因子不仅作用于癌旁组织，还可以渗透到癌组织周围至胃壁浆膜层，作用于沿途的平滑肌细胞、成纤维细胞，使其生成EF

的能力增强，从而使其中的EF增多、增粗.癌组织还可能刺激周围组织，直接通过基因的调节使胃壁中能生成EF的细胞功能激活并增强，EF生成增多.胃壁中EF增多是一个慢性过程.胃癌组织中小血管内皮细胞增生是肿瘤相关性病变.

关键词: 胃溃疡; 胃癌; 弹力纤维

关维, 纪小龙, 徐薪, 马亚敏, 尹彤, 申明识. 对正常胃、胃溃疡及胃癌组织中弹力纤维分布规律的观察. 世界华人消化杂志 2005;13(3):308-311
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/308.asp

0 引言

弹力纤维(elastic fiber，EF)是一种存在于结缔组织中的细胞外间质成分，由成纤维细胞、平滑肌细胞、某些软骨细胞等产生，赋予器官以良好的弹性[3-4, 9]. 在未染色的结缔组织铺片上，EF细长而有折射性，其直径为0.2-1.0 μm，数量较少，纤维常有分支，且彼此吻合成网状，这点可以与数量众多的胶原原纤维相鉴别. 在常规染色的组织学标本上，通常不能辨认EF，但可以通过Verhoeff染色、Weigert雷锁辛复红染色或Halmi醛复红方法等作特殊染色清晰显示出来. 一些器官(肺、结肠、乳腺等)[1-17]的某些恶性肿瘤中EF的分布情况对于疾病的分型、诊断、鉴别诊断及预后都做过相应的报道. 胃壁组织中富含平滑肌细胞和结缔组织，但是良、恶性病变的胃壁组织内的EF分布情况目前国内外文献很少有报道，那么，EF在良性及恶性病变所在胃壁组织中的分布有无规律、有什么价值呢？我们研究如下.

1 材料和方法

1.1 *材料* 正常胃标本17例，胃溃疡标本7例，胃癌标本40例. 胃癌组男33例，女7例，年龄24-78(平均57.3岁). 胃溃疡7例，正常17例，年龄24-64(平均51.5岁).

1.2 *方法* 取癌组织、癌组织与正常组织交界部位、溃疡、溃疡与正常组织交界部位及远离病变的正常组织部位的组织，常规固定、脱水、包埋、石蜡切片、HE染色和改良的Weigert染色[1]，对染色结果进行观察、对比、分析.

统计学处理 采用STAT8.0软件进行统计分析，记数资料采用χ^2检验，以$P<0.05$确定差异是否具有统计学意义.

2 结果

正常胃组织中EF在黏膜肌层、肌层临近黏膜下层侧狭窄区域及个别肌层平滑肌束之间的结缔组织中分布，纤维毛细状，断续或交织成网状，数量较少，着色较浅(图1A). 溃疡周围的胃壁组织中，黏膜肌层内EF明显增多，纤维增粗，排列紊乱，着色加深，而当溃疡深达肌层时，肌层内EF增多不明显，新鲜肉芽组织中未见到EF(图1B)，陈旧瘢痕中可以见到少量EF. 胃癌所在胃壁组织中，癌组织内无EF，他主要分布于癌周组织和癌组织内残留的平滑肌组织内，肌层临近黏膜下层侧EF也增多且分布范围增宽、EF显著增粗、排列更紊乱，着色更深，肌层平滑肌束间的结缔组织中EF也增多(图1C). 胃癌组织中EF增多的程度明显高于对照组

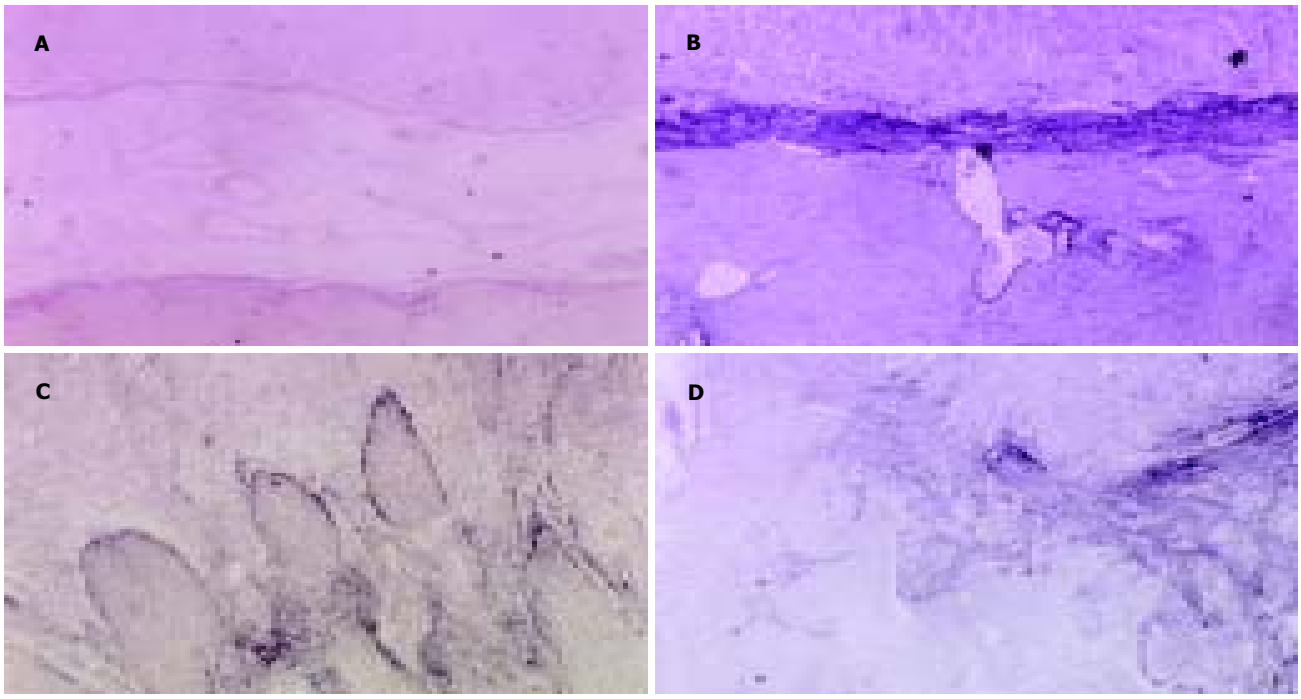


图1 EF在不同组织中的分布状况. A: 正常; B: 胃癌黏膜层; C: 胃癌肌层; D: 胃溃疡及黏膜层.

表1 胃癌与胃溃疡胃壁组织中弹力纤维的分布 n(%)

部位分组	黏膜肌层			肌层			
	+	++	+++	−	+	++	+++
胃溃疡	1(14.29)	2(28.57)	4(57.14)	1(14.29)	3(42.86)	2(28.57)	1(14.29)
胃癌	12(30)	16(40)	12(30)	5(12.5)	14(35)	15(37.5)	6(15)

表2 各型胃癌胃壁组织中弹力纤维分布情况比较 n

部位分型	黏膜肌层			肌层			
	+	++	+++	−	+	++	+++
高分化	2	3	0	1	0	2	2
中分化	0	6	4	1	4	4	1
低分化	8	4	2	2	8	3	1
未分化	2	0	2	0	2	2	0
印戒细胞	0	3	4	1	0	4	2

(P = 0.0 042，P<0.05，表1).两组增多的EF分布区域也不同:胃癌组涉及胃壁全层平滑肌、成纤维细胞分布区域;而溃疡组分布在黏膜肌层的EF增多较明显，而肌层变化程度很小.胃癌组织中小动脉内皮细胞明显增生，管腔狭窄，甚至堵塞，血管弹力膜也明显增厚，EF增多;溃疡组则未见小血管内皮细胞增生改变.

各型胃癌组织中EF增多程度不同，但他们之间没有显著差异(P = 0.1 170，P>0.05表2)，但这一结果可能与本实验标本数量有限有关，EF分布区域基本一致.我们还可以观察到:在一些胃癌组织中，癌组织尚未侵及肌层时，其中的EF数量就已经明显增多了(图1D).一些成团巢分布的癌组织及印戒细胞癌中黏液湖周围有一层完整的EF包裹，随着癌巢和黏液湖的不断增大，这层“包裹”渐渐地被破坏，癌细胞随即蔓延出来.

3 讨论

EF由两种成分构成:一种是周围围绕微原纤维的无定形成分.他由具有独特化学结构的弹性蛋白构成，这种化学结构决定了纤维的弹性[11-14, 16].我们认为这在一定程度上也起到阻止有害物质蔓延的作用.我们发现，正常胃壁组织中EF的分布是有规律的.与正常胃壁组织内EF分布情况比较，胃癌和胃溃疡所在胃壁组织中EF分布数量均有不同程度增多，形态增粗，着色加深，而且EF主要分布于病变组织周围或邻近区域的平滑肌细胞间和肌束间的结缔组织中，而远离病变的组织中，EF分布情况与正常胃组织基本一致，说明EF增多与溃疡和癌组织的刺激有关.我们观察到胃溃疡的新鲜肉芽组织中无EF，而陈旧瘢痕中可以见到略增多的EF，新鲜肉芽组织中的毛细血管壁结构简单，无肌层，就不会有EF生成，故没有EF着色，癌组织和溃疡的刺激都是长期、缓慢的作用过程，所以我们认为EF增多也是一个慢性过程.严家春 *et al*[17] 研究认为，肝脏病变长期处于活动期，在基因调节下，就可能使肝内多种有纤维分泌功能的细胞激活，纤维组织分泌增加，导致肝纤维化加重.我们推测:癌组织刺激癌周组织，在基因的调节下使胃壁内多种有分泌纤维功能的细胞激活，纤维组织分泌增加，以修补受损组织或阻止癌细胞的蔓延，导致EF增多.我们在各型胃癌组织内部均未见到EF，说明癌组织本身不能合成EF，但是，我们还发现1例胃间质瘤伴溃疡形成的病例，位于溃疡底部的间质瘤组织中的EF明显增多，说明胃间质瘤细胞是可以合成EF的.我们认为这种差别可能与肿瘤细胞起源的细胞类型有关.

还有一些癌组织还未侵破黏膜肌层，其下方的肌层内的EF就已经增多了.这提示我们，癌组织本身可能释放出某种促进EF生成的因子，以类似于旁分泌方式作用于肿瘤组织附近的平滑肌细胞、成纤维细胞等细胞，使其生成EF的能力增加，故在癌组织还未侵及的区域，EF已经明显增多了.我们还观察到:一些成团巢分布的癌组织(包括印戒细胞癌中伴有黏液湖形成的)，癌巢或黏液湖在较小和中等大小时其周围有一圈完整的平滑肌包裹，在这圈平滑肌组织中可见到有一圈明显、完整的EF层，渐渐的随着黏液湖的扩大，其周围的平滑肌破裂、减少、消失，其中的EF也随着逐渐减少直至消失.此现象说明，癌组织破坏或吞噬他周围的平滑肌，当癌巢增大到破坏他周围的平滑肌时，平滑肌内的EF自然也被破坏掉了，癌细胞随即扩散开来.由此我们认为，以上提到的EF反应可能是人体组织对癌组织刺激的防御性反应，EF可能在一

定程度上能够抵制癌组织的浸润. 各型胃癌组织内部及与正常组织交界处大部分小血管的弹力膜也有不同程度的增厚. 这一现象可能是对癌细胞经血行传播的阻挡. Fukushima *et al*[7]研究发现:尽管没有有力证据证明EF增多与肿瘤的浸润程度有关系，但是从肺腺癌患者的生存曲线可以看出伴有EF增多的肺腺癌患者预后明显好于没有EF增多的肺腺癌患者. Yachida *et al*[6]报道了1例微小胰腺癌病例，显微镜下发现大导管旁一8 × 8 mm大小的低分化腺癌病灶，已经侵及了其周围的小静脉和神经，但该大导管没有被累及，只表现为管壁增厚，管腔狭窄. 增厚的管壁中为大量的EF和增生的成纤维细胞. 胃癌血管壁弹力膜的完整性对于判断有无静脉侵袭更为有效[2]. 这些说明EF很可能有一定抵制癌细胞浸润、扩散的能力.

4 参考文献

1 徐薪, 纪小龙. EFs在肺细支气管肺泡癌和腺癌诊断中的意义. 诊断病理学杂志 2004;11:78-80

2 钟志玖, 金小明. Hart改良法在判断有否胃癌脉管侵袭中的应用. 哈尔滨医科大学学报 2001;35:17-18

3 Midwood KS, Schwarzbauer JE. Elastic fibers: building bridges between cells and their matrix. *Curr Biol* 2002;12:R279-81

4 Lzumi M, Suda K, Torrii A, Inadama E. Pancreatic ductal myofibroblasts proliferative panterns in various pathologic situations. *Virchows Arch* 2001;438:442-450

5 Yamasak S, Suda K. Intraductal spread of pancreatic cancer. *Pancreatology* 2002;2:407-412

6 Yachida S, Fukushima N, Nakanishi K. Minute pancreatic adenocarcinoma presenting with stenosis of the main pancreatic duct. *Pathol Int* 2002;52:607-611

7 Fukushima M, Fukuda Y. Elastosis in lung carcinoma: Immunohistochemical, ultrastructural and clinical studies. *Pathol Int* 2000;50:1004-1013

8 汪美华, 汪水生. 乳腺癌患者弹力纤维反应的意义. 伤残医学杂志 2002;10:39-41

9 Honda T, Ota H, Arai K, Hayama M. Three-dimensional analysis of alveolar structure in usual interstitial pneumonia. *Virchows Arch* 2002;441:47-52

10 Yamasaki S, Suda K, Nobukawa B, Sonoue H. Intraductal spread of pancreatic cancer. Clinicopathologic study of 54 pancreatectomized patients. *Pancreatology* 2002;2:407-412

11 Kielty1 CM, S herratt MJ. Elastic fibres. *J Cell Sci* 2002;115:2817-2828

12 Bunton TE, Biery NJ. Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of marfan syndrome american heart association. *Inc* 2001;88:37

13 Zanetti M, Braghetta P, Sabatelli P. EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects molecular and cellular biology. *January* 2004;30:638-650

14 Kuang PP, Goldstein RH, Liu Y. Coordinate expression of fibulin-5/DANCE and elastin during lung injury repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L1147-1152

15 Sterner-Kock A, Thorey IS, Koli K. Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4)causes abnormal lung development, cardiomyopathy, andcolorectal cancer. *Genes Dev* 2002;16:2264-2273

16 Inoue Y, King TE Jr, Barker E. Basic fibroblast growth factor and its receptors in idiopathic pulmonary fibrosis and lymphangioleiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:765-773

17 严家春, 马勇, 陈文笔, 孙新华. 乙型肝炎肝纤维化及肝硬变的动态观察. 华人消化杂志 1998;6:699-702

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 审稿要点

《*World Journal of Gastroenterology*，WJG》根据编委的审稿意见，来稿分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审等项处理. WJG为了确保其出版的每篇论文的学术质量，特制定了以下评审要点. (1)题名: 是否准确反映了研究工作的科学问题，内容是否简明而有特色. 若不符，请提出具体修改意见. (2)摘要: 是否明确指出了研究的背景与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论，创新点和重点科学问题是否与目的、材料和方法、结果(包括重要数据)和结论相符. (3)引言: 是否包括该研究的目的和与其他相关研究的关系. (4)材料和方法: 有无特色，如大样本、安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验、特殊病例、细胞或组织样品; 研究方法和技术有无创新性、系统性或特色. 改进和创新方法的描述是否达到了他人可以重复或验证的要求，实验对照的设计是否合理可靠，统计学处理方法的使用是否恰当. (5)结果: 是否能得出较明确的科学结论，实验证据是否充足. 临床研究重点应看其样本大小和统计学分析结果. (6)讨论: 是否条理分明，有无系统的理论分析和有价值的科学结论. (7)参考文献: 文献引用是否恰当和充分，特别是最新文献的引用情况. (8)综合评价: 论文的科学性、创新性和可读性是否能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平.

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):312-316
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

胃癌组织中 c-Met 蛋白过表达与 EBV 的相关性

李 莉, 王 云, 赵 鹏, 黄葆华, 罗 兵

李莉, 青岛市市立医院检验科 山东省青岛市 266011.
王云, 罗兵, 青岛大学医学院微生物学教研室 山东省青岛市 266021.
赵鹏, 青岛大学医学院附属医院病理科 山东省青岛市 266003.
黄葆华, 烟台市毓璜顶医院肿瘤科 山东省烟台市 264000
李莉, 女, 1971-02-05 生, 山东省青岛市人, 汉族, 2004 年青岛大学医学院硕士, 主管技师, 主要从事病原生物学研究.
项目负责人: 罗兵, 266021, 山东省青岛市登州路 38 号, 青岛大学医学院微生物学教研室. qdluobing@yahoo.com
电话: 0532-3812423 传真: 0532-3812423
收稿日期: 2004-10-25 接受日期: 2004-11-12

Relationship between Epstein-Barr virus and overexpression of c-Met protein in gastric carcinoma

Li Li, Yun Wang, Peng Zhao, Bao-Hua Huang, Bing Luo

Li Li, Clinical Laboratory, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China
Yun Wang, Bing Luo, Department of Microbiology, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266021, Shandong Province, China
Peng Zhao, Department of Pathology, Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China
Bao-Hua Huang, Department of Oncology, Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, Shandong Province, China
Correspondence to: Dr. Bing Luo, Department of Microbiology, Medical college of Qingdao University, 38 Dengzhou Road, Qingdao 266021, Shandong Province, China. qdluobing@yahoo.com
Received: 2004-10-25 Accepted: 2004-11-12

Abstract

AIM: To detect the amplification and expression of c-Met in Epstein-Barr virus (EBV)-associated gastric carcinoma (EBVaGC) and EBV-negative gastric carcinoma (EBVnGC), and to investigate the relationshi pof the amplification and expression of c-Met with EBV infection in the process of gastric carcinogenesis.

METHODS: The amplification of c-Met gene and the expression of c-Met protein in the tissues of EBVaGC (n = 13) and EBVnGC (n = 45) were detected by semi-quantitative polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemical methods, respectively.

RESULTS: The amplification of c-Met was observed in both EBVaGC and EBVnGC. The overamplification rates were 53.8% (7/13) in EBVaGC and 44.4% (20/45) in EBVnGC. There was no significant difference between the two types of caners. c-Met protein was positive in 76.9% (10/13) EBVaGC, and 64.4% (29/45) EBVnGC tissues. The difference between them was not significant either. The overexpression rate of c-Met protein in EBVaGC was significantly higher than that in EBVnGC (69.2% *vs* 37.8%, P = 0.0 446). No significant correlation was observed between the amplification and expression of c-Met with the tumor size, location, lymph node metastasis, differentiation degree or clinical staging.

CONCLUSION: c-Met is amplified in both EBVaGC and EBVnGC tissues. The amplification level of c-Met gene and the positive rate of c-Met protein are not significantly different between EBVaGC and EBVnGC. However, the overexpression rate of c-Met protein in EBVaGC is higher than that in EBVnGC.

Key Words: Epstein-Barr virus; Gastric carcinoma; Amplification; c-Met gene; c-Met protein

Li L, Wang Y, Zhao P, Huang BH, Luo B. Relationship between Epstein-Barr virus and overexpression of c-Met protein in gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):312-316

摘要

目的: 研究 EBV 相关胃癌(EBV associated gastric carcinomas，EBVaGC)和 EBV 阴性胃癌(EBV negative gastric carcinomas，EBVnGC)组织中 c-Met 基因的扩增及表达，探讨 c-Met 基因扩增和表达与 EBV 感染的相关性以及二者在胃癌发生发展中的作用.

方法: 应用半定量多聚酶链反应(PCR)检测EBVaGC 13 例和 EBVnGC 45 例组织中 c-Met 基因的扩增，免疫组化抗原热修复技术检测 c-Met 蛋白表达.

结果: EBVaGC 和 EBVnGC 组织中均检测到 c-Met 基因扩增，EBVaGC 组织与 EBVnGC 组织间 c-Met 基因的扩增水平无显著性差异.EBVaGC癌组织c-Met基因过度扩增率为53.8%(7/13)，EBVnGC癌组织c-Met基因过度扩增率为 44.4%(20/45)，两组之间无差异. EBVaGC和EBVnGC癌组织中c-Met蛋白阳性率分别为76.9%(10/13)和64.4%(29/45)，两组之间无显著性差异.EBVaGC 和 EBVnGC 癌组织中 c-Met 蛋白过表达率分别为 69.2%(9/13)和 37.8%(17/45)，统计学分析表明EBVaGC癌组织中c-Met蛋白的过表达高于EBVnGC组，两组之间有差异(χ^2 = 4.0 345，P = 0.0 446). EBVaGC和EBVnGC癌组织中c-Met基因的表达和扩增与肿瘤大小、肿瘤部位、淋巴结转移、分化程度以及临床分期等均无相关性.

结论: 胃癌组织中均存在c-Met基因的扩增，EBVaGC与EBVnGC组织中c-Met基因扩增水平和c-Met蛋白阳性率无明显差异，但EBVaGC癌组织中c-Met蛋白的过表达率高于EBVnGC组.

关键词: EB病毒; 胃癌; 扩增; c-Met基因; c-Met蛋白

李莉, 王云, 赵鹏, 黄葆华, 罗兵. 胃癌组织中c-Met蛋白过表达与EBV的相关性. 世界华人消化杂志 2005;13(3):312-316
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/312.asp

0 引言

约7-10%的胃癌与EBV感染相关，这种相关性以胃癌组织中存在EBV基因组为特征，并常常伴有基质中的淋巴细胞浸润，其组织学分型类似于鼻咽部上皮细胞癌. EBV感染在胃癌发生发展过程中的作用尚未阐明，EBV相关胃癌中EBV与癌基因的相互作用成为EBV致癌机制研究的热点[1-4]. c-Met原癌基因是一种具有酪氨酸酶活性的生长因子受体，编码190 ku的跨膜糖蛋白，具有经典的信号肽序列、细胞外位点结构、跨膜位点结构以及酪氨酸激酶位点结构. HGF/SF(肝细胞生长因子/分散因子，hepatocyte growth factor/scatter factor，HGF/SF)可以刺激c-Met基因编码蛋白的β亚单位发生快速的酪氨酸磷酸化. HGF/SF与c-Met系统所介导的信号转导系统，不仅可作为一种有丝分裂原促进肝细胞等上皮细胞进行有丝分裂必需的正常信号转导过程，而且还与一系列肿瘤的发生发展过程有关. 我们采用半定量聚合酶链反应(PCR)和免疫组化抗原热修复技术检测c-Met基因在EBV相关胃癌(EBV associated gastric carcinoma，EBVaGC)组织及EBV阴性胃癌(EBV negative gastric carcinoma，EBVnGC)组织中的扩增和表达，探讨c-Met基因扩增、c-Met蛋白表达以及EBV感染在胃癌发生发展中的作用及相互关系.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-01/2002-12手术切除的新鲜胃癌组织185例，PBS-40 g/L甲醛固定后石蜡包埋，用以制备组织切片进行病理学分析、原位杂交和免疫组化检测. 另取新鲜组织，用酚-氯仿-异戊醇法常规提取组织DNA，4℃保存备用. 全部病例均经病理诊断证实. PCR-Southern技术检测胃癌组织中EBV DNA，然后采用原位杂交技术检测PCR阳性胃癌组织石蜡切片中EBV编码小RNA(EBER1)的表达，EBER1阳性者确定为EBV相关胃癌[5]. PCR-Southern结合原位杂交(ISH)技术共确证EBVaGC 13例，将13例EBVaGCs作为EBV阳性组，选择临床指标和组织类型与之匹配的45例EBVnGCs作为EBV阴性组进行c-Met基因扩增和c-Met蛋白表达的检测. 统计学分析表明，EBVaGC组和EBVnGC组病例在年龄、性别、肿瘤部位、组织学类型、分化程度、有无淋巴结转移以及临床分期等方面均无显著性差异.

1.2 方法

1.2.1 半定量PCR检测c-Met基因的扩增 引物设计与合成参照文献[6]设计扩增c-Met基因和内参照GAPDH基因的特异性引物，由上海生工生物工程技术服务有限公司合成，引物序列和PCR产物长度:c-Met: 5'primer;TTC ACC GCG GAA ACA CCC ATC,3'primer; GTC TTC CAG CAC AGG CCC AGT，141 bp;GAPDH:5' primer;CTC AGA CAC CAT GGG GAA GGT GA,3'primer; ATG ATC TTG AGG CTG TTG TCA TA,450 bp. PCR反应体系为30 μL，包括10×buffe 3 μL，$MgCl_2$终浓度1.5 mmol/L，4×dNTP终浓度为0.2 mmol/L，Taq DNA聚合酶1U，目的基因引物和内参照基因引物浓度均为0.4 μmol/L，模板DNA 2.0 μL，无菌去离子水补充至30 μL. 扩增参数为94℃预变性5 min;然后94℃变性45 s，58℃复性45 s，72℃延伸1 min，共35个循环;最后72℃延伸5 min. 取PCR扩增产物10 μL于含EtBr(0.5 mg/L)的20 g/L琼脂糖凝胶中电泳，80 V，1 h，紫外透射仪下观察电泳结果并照相记录. 在光密度扫描仪下扫描照片，计算曲线下峰面积作为PCR产物的相对含量. 每份标本均观察到内参照基因GAPDH和目的基因c-Met的特异性扩增条带，用c-Met峰面积与GAPDH峰面积的比值表示c-Met基因的相对扩增水平，若该比值大于或等于全部肿瘤标本该比值的平均值则视为c-Met基因的过度扩增.

1.2.2 免疫组化检测c-Met蛋白的表达 石蜡切片常规脱蜡至水，30 mL/L过氧化氢消除内源性过氧化物酶活性，0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液微波修复抗原8 min×2次，PBS冲洗后滴加1∶200稀释的兔抗人c-Met多克隆抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc，USA.)4℃过夜. 过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)染色后常规DAB溶液显色，苏木素复染，封片后观察结果. PBS代替一抗设为阴性对照，已知c-Met阳性的乳腺癌组织标本作为阳性对照. c-Met免疫组化染色阳性信号以细胞膜(主要是腺腔面)出现棕黄色着色为特征，可同时伴有胞质的棕黄色颗粒. 参照文献[7]确定c-Met蛋白表达判断标准，根据染色深浅可分为强阳性、中等强度阳性、弱阳性和阴性结果. 若同一切片阳性细胞数>30%同类病变细胞则视为阳性病例，以强阳性和中等强度阳性为c-Met过表达.

统计学处理 c-Met基因扩增的半定量PCR检测结果采用两组计量资料的t检验，过度扩增采用四格表χ^2检验，免疫组化结果采用四格表χ^2检验进行统计学分析，$P<0.05$表示有显著性差异.

2 结果

2.1 EBVaGC和EBVnGC组织中c-Met基因扩增 部分EBVaGC组织中c-Met基因扩增电泳结果(图1)，扫描凝胶电泳照片中c-Met基因与GAPDH基因扩增条带的吸光度值，并计算每例标本二者的吸光度比值(表1). 应用计量资料的 t 检验对13例EBVaGCs组织和45例EBVnGCs组织中c-Met基因的扩增水平进行统计分析，结果显示EBVaGC和 EBVnGC 癌组织中c-Met基因的扩增水平无显著性差异(t = 0.1 359 $t_{0.05(56)}$ = 2.000 P>0.05). 有7例EBVaGCs癌组织c-Met基因过度扩增，占53.8%(7/13);20例EBVnGCs癌组织c-Met基因过度扩增，为44.4%(20/45). 统计学分析表明c-Met基因的过度扩增在EBVaGC和EBVnGC两组之间无显著差异(χ^2 = 0.3583，P = 0.5 494).

2.2 EBVaGC和EBVnGC组织中c-Met蛋白的表达 免疫组化检测c-Met蛋白阳性信号定位于细胞膜或胞质(图2A-C)，根据阳性细胞的数量和阳性细胞染色强度确定c-Met蛋白的表达水平. EBVaGC癌组织c-Met蛋白阳性率为76.9%(10/13);EBVnGC癌组织c-Met蛋白阳性率为64.4%(29/45)，统计学分析表明c-Met蛋白的表达率在EBVaGC和EBVnGC两组之间无差异(χ^2 = 0.2 590，P = 0.6 108). EBVaGC癌组织中c-Met蛋白过表达率为69.2%(9/13);EBVnGC癌组织中c-Met蛋白过表达率为37.8%(17/45). 统计学分析表明EBVaGC癌组织中c-Met蛋白的过表达高于EBVnGC组，两组之间有差异(χ^2 = 4.0345，P = 0.0446).

2.3 c-Met基因扩增和c-Met蛋白表达与临床资料的相关性 我们分别对13例EBVaGCs和45例EBVnGCs组织中c-Met基因扩增和c-Met蛋白表达与患者临床病

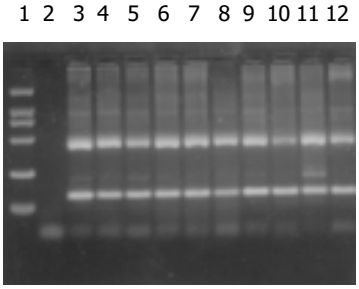


图1 半定量PCR检测EBVaGC组织中c-Met基因的扩增. 1: DNA marker DL2000; 2: negative control; 3-12: EBVaGC specimens.

表1 EBVaGC和EBVnGC组织中c-Met基因扩增的检测结果

标本号	吸光度比值(c-Met/GAPDH)	标本号	吸光度比值(c-Met/GAPDH)
GA2[1]	1.32	GA46	0.72
GA37[1]	1.08	GA50	1.07
GA53[1]	1.16	GA54	0.86
GA78[1]	0.72	GA56	0.76
GA79[1]	1.26	GA58	0.83
GA93[1]	1.02	GA59	0.51
Y13A[1]	0.79	GA60	0.84
Y20A[1]	0.88	GA61	0.78
Y28A[1]	1.03	GA64	0.89
Y32A[1]	0.70	GA66	0.96
13133A[1]	0.68	GA71	0.92
12284A[1]	0.72	GA72	0.90
13139A[1]	0.74	GA81	1.06
GA3	1.02	GA94	0.77
GA4	0.96	GA95	0.56
GA5	0.78	GA103	1.04
GA6	1.23	Y1A	0.64
GA7	0.83	Y2A	0.53
GA8	0.88	Y8A	0.70
GA9	1.06	Y9A	0.98
GA17	1.14	Y11A	0.64
GA19	0.50	Y12A	0.73
GA20	0.72	Y15A	0.84
GA21	0.65	Y17A	0.92
GA23	0.92	Y19A	0.62
GA33	0.56	Y22A	0.87
GA38	1.18	Y23A	1.18
GA42	0.83	Y26A	0.59
GA45	0.79	Y29A	1.21

[1]为EBVaGC组织，其余为EBVnGC组织.

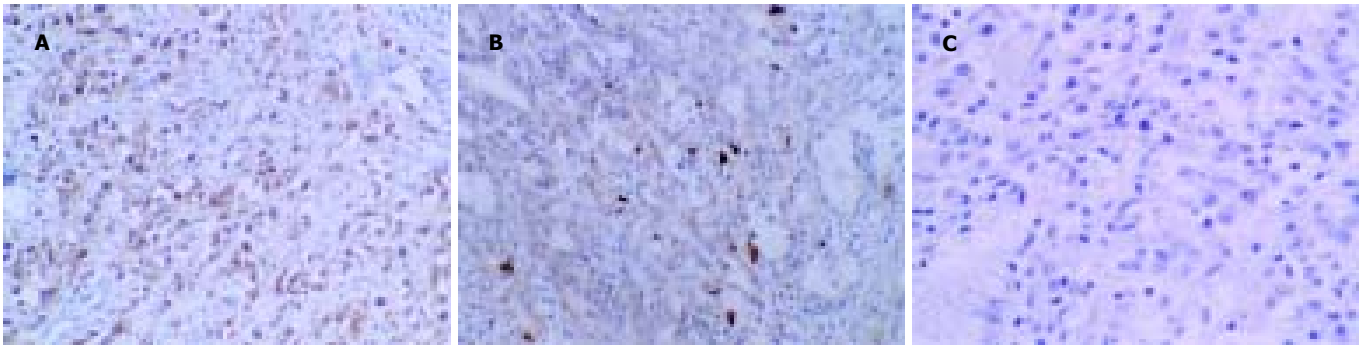


图2 EBVaGC组织c-Met蛋白表达SP × 200.A:EBVaGC组织c-Met蛋白过表达;B:EBVaGC组织c-Met蛋白低表达;C:EBVaGC组织c-Met蛋白表达阴性.

理资料的相关性进行分析，统计结果分析表明EBVaGC及EBVnGC组织中c-Met基因的扩增和c-Met蛋白表达与肿瘤大小、肿瘤部位、分化程度、淋巴结转移以及浸润程度之间均无显著性差异(表2).

3 讨论

肿瘤组织中有关EBV感染与c-Met基因扩增和c-Met蛋白表达的研究报道较少，主要见于何杰金病(HD)等淋巴系统恶性增生性疾病. Weimar *et al*[8]研究证实EBV感染可诱发c-Met阴性的正常外周血B淋巴细胞c-Met基因的表达，而在EBV感染正常B细胞诱导建立的B细胞系，c-Met基因的表达至少可持续3 mo. HD患者淋巴结组织切片免疫组化检测结果显示:c-Met原癌基因表达与EBV感染密切相关，8例EBV阳性的HD患者标本中有6例检测到c-Met原癌基因的表达，而10例EBV阴性HD患者淋巴结组织切片中均未检测到c-Met基因的表达. Teofili *et al*[9]的研究结果则与之相反，他们对来自HD患者的45例淋巴结和12份骨髓活检标本中c-Met，EBER1和LMP1的表达进行检测，结果表明EBV阳性和EBV阴性HD标本中c-Met蛋白的免疫反应性没有差异，即HD淋巴结组织中c-Met表达不依赖于EBV感染. 本研究结果显示EBVaGC和EBVnGC癌组织中c-Met基因扩增水平和c-Met蛋白表达没有差异，但在EBVaGC的癌组织中c-Met蛋白的过表达要高于EBVnGC组，提示EBV感染可能诱发胃癌组织中c-Met蛋白的过表达. Kijima *et al*[6]将393例行胃切除术的胃癌分为EBVaGC 组和EBVnGC组，采用竞争性PCR和免疫组化技术检测c-Met基因在EBVaGC和EBVnGC组织中的扩增与过表达. 分析结果显示EBVaGC组织中c-Met基因的扩增和过表达只与肿瘤的深度浸润有关($P<0.05$)，而与肿瘤部位、是否淋巴结转移、淋巴浸润和静脉浸润无关. EBV阴性胃癌c-Met基因的扩增和过表达表达则与肿瘤部位、深度浸润、淋巴结转移、淋巴浸润和静脉浸润均有相关性(P均<0.05)，表明c-Met基因在EBVaGC和EBVnGC中对肿瘤的发展与转移起着不同的作用，目前还不清楚c-Met基因这种不同作用是否提示EBV相关胃癌预后较好. 本研究结果表明EBVaGC及EBVnGC组织中c-Met基因的扩增和表达与肿瘤的大小、肿瘤部位、分化程度、淋巴结转移及浸润程度之间均无明显相关性，与Kijima *et al*[6]的研究结果不完全一致，分析认为与取材时肿瘤处于不同的临床分期有关，在本次研究中大多数患者属癌症的晚期(57/58)，推测EBV感染在胃癌的早期和晚期发挥不同的作用.

表2 EBV相关胃癌和EBV阴性胃癌患者临床病理资料分析

	n	EBVaGC(n = 13)	EBVnGC(n = 45)	P值
平均年龄(年)	58	59.76 ± 10.17	57.31 ± 14.05	P = 0.5 622(t = 0.5 844)
性别				P = 0.1 563(χ^2_c = 2.1 070)
男		13	35	
女		0	10	
平均直径(mm)	58			P = 0.6 688(χ^2_c = 0.1 959)
≥5 cm		9	36	
<5 cm		4	9	
肿瘤部位	58			P = 0.1 610(χ^2_c = 2.0 566)
贲门、胃体和残胃		9	21	
胃窦		4	24	
组织类型	58			P = 0.6 784(χ^2_c = 0.1 811)
腺癌		12	41	
印戒细胞癌		1	4	
分化程度	58			P = 0.7 912(χ^2_c = 0.0 716)
中分化		1	7	
低分化		11	38	
淋巴结转移	58			P = 1.0 000(χ^2_c = 0.0 098)
有		10	33	
无		3	12	
临床分期	58			P = 1.0 000(确切概率法)
早期(黏膜及黏膜下层)		0	1	
晚期(透过黏膜下层)		13	44	

EBV潜伏感染和细胞转化能力被广泛认为是其致癌的基础，目前已知引起细胞转化的基因主要有潜伏性基因中的核抗原家族基因(EBNAs，包括EBNA1，EBNA2，EBNA3，EBNA4和EBNA6)和潜伏膜蛋白基因LMP1.目前上皮性恶性肿瘤细胞中c-Met基因表达与EBV感染的相关性研究报道尚少，近年来对鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma，NPC)的研究发现，c-Met原癌基因产物作为肝细胞生长因子/分散因子(HGF/SF)的一种高亲和力受体，可以促进多种细胞运动和侵袭能力，其表达与NPC患者颈部淋巴结转移密切相关[10].LMP1是EBV编码的一种癌蛋白，在大约50-70%的鼻咽癌标本中可检测到.在鼻咽癌的发生发展过程中LMP1起重要作用[11].Horikawa *et al*[10]的研究发现LMP1可通过活化Ets-1转录因子诱导c-Met基因的表达，从而与NPC的高转移特性有关.本研究中c-Met蛋白过表达与EBV感染相关，但大多数的研究表明EBVaGCs标本中潜伏期基因LMP1表达缺失[5, 12-13].由于EBV感染与胃癌相关性的研究起步较晚，EBVaGC组织中病毒基因的表达规律尚未完全明确，因此EBV的何种基因诱导胃癌组织c-Met蛋白过表达有待于进一步研究.

4 参考文献:

1 王笑峰, 罗兵, 王云, 阎丽平, 黄葆华, 赵鹏. EB病毒相关胃癌细胞凋亡与bcl-2的表达. 世界华人消化杂志 2004;12:2028-2032

2 闫丽萍, 罗兵, 王笑峰, 赵鹏, 黄葆华. EBV相关胃癌组织中bcl-2和ki-67蛋白表达的检测. 青岛大学医学院学报 2004;40:57-59

3 Ishii H, Gobe G, Kawakubo Y, Sato Y, Ebihara Y. Interrelationship between Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas and the expression of apoptosis-associated proteins. *Histopathology* 2001;38:111-119

4 Kume T, Oshima K, Shinohara T, Takeo H, Yamashita Y, Shirakusa T, Kikuchi M. Low rate of apoptosis and overexpression of bcl-2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Histopathology* 1999;34:502-509

5 王云, 罗兵, 赵鹏, 黄葆华. EB病毒相关胃癌组织中病毒基因表达的研究. 癌症 2004;23:782-787

6 Kijima Y, Hokita S, Yoshinaka H, Itoh T, Koriyama C, Eizuru Y, Akiba S, Aikou T. Amplification and overexpression of c-met gene in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Oncology* 2002;62:60-65

7 Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, Swanson PE, Ratliff TL, Vollmer RT, Day ML. Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma. *Am J Pathol* 1995;147:386-396

8 Weimar IS, de Jong D, Muller EJ, Nakamura T, van Gorp JM, de Gast GC, Gerritsen WR. Hepatocyte growth factor/scatter factor promotes adhesion of lymphoma cells to extracellular matrix molecules via alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 integrins. *Blood* 1997;89:990-1000

9 Teofili L, Di Febo AL, Pierconti F, Maggiano N, Bendandi M, Rutella S, Cingolani A, Di Renzo N, Musto P, Pileri S, Leone G, Larocca LM. Expression of the c-met proto-oncogene and its ligand, hepatocyte growth factor, in Hodgkin disease. *Blood* 2001;97:1063-1069

10 Horikawa T, Sheen TS, Takeshita H, Sato H, Furukawa M, Yoshizaki T. Induction of c-Met proto-oncogene by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 and the correlation with cervical lymph node metastasis of nasopharyngeal carcinoma. *Am J Pathol* 2001;159:27-33

11 Yoshizaki T. Promotion of metastasis in nasopharyngeal carcinoma by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1. *Histol Histopathol* 2002;17:845-850

12 zur Hausen A, Brink AA, Craanen ME, Middeldorp JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BARF1 gene. *Cancer Res* 2000;60:2745-2748

13 Hoshikawa Y, Satoh Y, Murakami M, Maeta M, Kaibara N, Ito H, Kurata T, Sairenji T. Evidence of lytic infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-positive gastric carcinoma. *J Med Virol* 2002;66:351-359

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 影响因子

影响因子是国际通行的期刊评价指标之一，是反映期刊重要性的宏观定量指标. 通常影响因子越大，期刊的学术影响力和作用也越大. 总被引频次是指期刊自创刊以来所刊登的全部论文在统计当年被引用的总次数，是一个非常客观实际的评价指标，可以显示该刊被使用和重视的程度，以及在科学交流中的作用和地位. 美国科学信息研究所(ISI)出版的期刊引证报告(JCR): 《*World Journal of Gastroenterology*，WJG》 2002年影响因子为2.532，被引频次为1 535. WJG 2002年影响因子在国际胃肠病学和肝病学领域的45种期刊中排名第13位，在SCI收录的所有5876种国际科学期刊中排名第797位. WJG 2001年影响因子1.445，被引频次为722; WJG 2000年影响因子0.993，被引频次327次. 1998年以来发表的全文电子版(ASP，PDF) 已与PubMed中的文摘进行了链接，全世界的读者在利用PubMed检索时即可免费阅读到WJG发表的全文，使本刊作者发表的论文在全球得到及时广泛的传播，期刊的影响因子逐年上升，国际影响逐年扩大.

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):317-320
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

苦参素治疗慢性乙型肝炎 312 例

张学武, 胡国启, 李春玉, 周 敏

张学武, 安徽医科大学附属医院感染病科 安徽省合肥市 230022
张学武, 胡国启, 李春玉, 周敏, 界首市人民医院感染病科
安徽省界首市 236500
张学武, 男, 1963-09-10 生, 安徽省临泉县人, 2002 年安徽医科大学硕士生, 副主任医师, 主要从事病毒性肝炎的临床研究, 发表论文 25 篇.
项目负责人: 张学武, 236500, 安徽省界首市, 界首市人民医院感染病科. jsxyxk@sina.com
电话: 0558-3170445 传真: 0558-4823808
收稿日期: 2004-10-18 接受日期: 2004-11-22

Effect of Oxymatrine on chronic hepatitis B: an analysis of 312 cases

Xue-Wu Zhang, Guo-Qi Hu, Chun-Yu Li, Min Zhou

Xue-Wu Zhang, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 236000, Anhui Province, China
Xue-Wu Zhang, Guo-Qi Hu, Chun-Yu Li, Min Zhou, Department of Infectious Diseases, Jieshou People's Hospital, Jieshou 236500, Anhui Province, China
Correspondence to: Xue-Wu Zhang, Department of Infectious Diseases, Jieshou People's Hospital, Jieshou 236500, Anhui Province, China. jsxyxk@sina.com
Received: 2004-10-18 Accepted: 2004-11-22

Abstract

AIM: To evaluate the efficacy and safety of Oxymatrine in the treatment of chronic hepatitis B.

METHODS: Patients treated with Oxymatrine (n = 203) or with the combination of Oxymatrine and Lamivudine (n = 109) were retrospectively studied. The therapeutic response and the affecting factors were analyzed.

RESULTS: Of the 312 patients, complete response (CR) rate, sustained response (SR) rate and exacerbation (EB) rate were 36.5%, 32.4% and 8.0%, respectively. The CR and SR rates of the patients with baseline ALT<1 334 nkat/L (upper normal limit), 1 334 nkat/L≤ALT<3 335 nkat/L, 3 335 nkat/L≤ALT<6 670 nkat/L and ALT≥6670 nkat/L were 21.4%, 33.8%, 39.7% and 59.5%, 14.3%, 31.6%, 38.5% and 47.6%, respectively (P = 0.0 012 and 0.0 027 for CR and SR, respectively); The CR and SR rates of the patients with HBV DNA<10^8copies/L, 10^8 copies/L≤HBV DNA≤10^{11} copies /L, and HBV DNA >10^{11} copies /L were 57.9%, 37.4% and 26.5%, 50.0%, 28.9% and 8.2%, respectively (P = 0.0262 and 0.0070 for CR and SR, respectively). The highest response occurred 6 months after treated with Oxymatrine, and further treatment did not yield higher response rate. The treatment with the combination of Oxymatrine and lamivudine led to higher CR, SR rates and lower EB rate than with Oxymatrine alone (46.8%, 41.3%, 1.8% *vs* 31. 0%, 27.6%, 11.3%, P = 0.0 048, 0.0 020, 0.0 009, respectively).

CONCLUSION: Oxymatrine is safe and effective in the treatment of chronic hepatitis B. The response rates are positively correlated with base-line ALT level, but negatively correlated with HBV DNA level before treatment. Combination with lamivudine can increase the response rate and reduce the exacerbation rate.

Key Words: Oxymatrine; Lamivudine; Chronic hepatitis B; Response

Zhang XW, Hu GQ, Li CY, Zhou M. Effect of Oxymatrine on chronic hepatitis B: an analysis of 312 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):317-320

摘要

目的: 探讨苦参素治疗慢性乙型肝炎的疗效、安全性及影响应答反应的相关因素.

方法: 采取回顾性分析方法，对203例单独接受苦参素治疗与 109 例接受苦参素联合拉米夫定治疗的慢性乙型肝炎患者的临床资料进行回顾性分析，观察应答反应情况及影响应答反应的相关因素.

结果: 312 例患者完全应答率(CR)为 36.5%，持续应答(SR)率 32.4%;恶化率 8.0%;基线 ALT<1334nkat/L、1 334 nkat/L ≤ ALT < 3 335 nkat/L、3 335 nkat/L ≤ ALT < 6 670 nkat/L及ALT ≥ 6 670 nkat/L的患者CR和 SR 分别为 21.4%，33.8%，39.7%及 59.5%和 14.3%，31.6%，38.5%及 47.6%(P = 0.0 012和0.0 027); HBVDNA < 10^8copies/L、10^8copies/L ≤ HBVDNA ≤ 10^{11}copies /L及 HBVDNA > 10^{11} copies /L 的患者完全应答和持续应答率分别为 57.9%，37.4%及 26.5%和 50.0%，28.9%及 8.2%(P = 0.0 262和 0.0 070);苦参素治疗乙肝疗程以 6 mo 时应答反应率最高，延长疗程应答率进一步提高有限;联合拉米夫定治疗的患者完全应答和持续应答率分别为 46.8%和 41.3%高于单用苦参素的 31.0%和 27.6%(P = 0.0 048和0.0 020)，而恶化病例发生率明显低于单用苦参素组(11.3% *vs* 1.8%，P = 0.0 009).

结论: 苦参素治疗慢性乙型肝炎有肯定的疗效，应答反应随基线ALT水平的升高而升高，而与治疗前HBV

DNA水平呈负相关;苦参素单用治疗乙肝部分病例可发生病情恶化，联合拉米夫定治疗可提高应答反应率并降低恶化病例的发生率.

关键词: 苦参素; 拉米夫定; 慢性乙型肝炎; 应答

张学武, 胡国启, 李春玉, 周敏. 苦参素治疗慢性乙型肝炎312例. 世界华人消化杂志 2005;13(3):317-320
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/317.asp

0 引言

随着拉米夫定的问世，抗病毒治疗已渐成为慢性乙型肝炎治疗的主流.然而，IFN-α对中国人慢性乙型肝炎的低应答反应及较多的不良反应、拉米夫定治疗过程中致耐药变异的发生及停药后肝炎的复发已成为乙型肝炎抗病毒治疗进一步推广的瓶颈.慢性乙型肝炎的治疗急需探讨新的手段及方案.近年来，国内苦参素制剂随着生产工艺的改进，氧化苦参碱的提纯度已达98%以上，其抗乙型肝炎病毒的效应已被越来越多的基础研究与临床研究[1-18]所证实.我们自1999年以来开展了拉米夫定治疗慢性乙型肝炎的系列研究，取得了一定的临床疗效[8-10]，但缺乏系统、长期的疗效总结.现对几年来在我院接受苦参素治疗并有完整纪录的312例患者的临床资料进行回顾性分析，以探讨苦参素治疗慢性乙型肝炎的有效性、安全性以及影响应答反应的相关因素.

1 材料和方法

1.1 *材料* 1999-10/2003-12我院接受苦参素或与拉米夫定联合治疗的慢性乙型肝炎患者，诊断符合2000年西安会议标准，年龄12-60岁;ALT>667 nkat/L(正常值上限)，TBil<85.5 mmol/L，HBeAg阳性，HBV DNA阳性或定量> 1×10^6copies / L;治疗前6 mo内未用抗病毒及免疫调节治疗;有完整纪录312例，男201例，女111例;年龄12-60(平均28 ± 16)岁;轻度128例，中度112例，重度32例，代偿性肝硬化40例.

1.2 *方法* 所有病例均接受苦参素(宁夏博尔泰力公司生产的苦参素注射液400-600 mg，im，qd，或苦参素胶囊200-300 mg，po，tid)治疗，3 mo为1个疗程;其中109例患者同时接受拉米夫定(100 mg，po，qd)联合治疗;治疗前或治疗过程中ALT>3335nkat/L、TBil>34.2 mmol/L的患者加用甘利欣、茵栀黄、护肝片、肝泰乐等保肝对症治疗.分别于治疗前、治疗1 mo、疗程结束、及随访过程中每3 mo复查一次ALT，TBil;治疗前、治疗及随访过程中每3 mo复查一次HBeAg/抗HBe，HBV DNA(PCR 定性或免疫荧光定量).完全应答(complete response，CR):HBeAg，HBV DNA阴转，ALT正常;部分应答(partial response，PR):HBeAg，HBV DNA一项阴转，或肝功能正常;无应答(nonresponse，NR):HBeAg，HBV DNA均未阴转，肝功能未复常但也未见恶化;恶化(exacerbation，EB):至少满1个疗程后HBV DNA定量无明显下降(下降低于2个对数级)，而ALT反跳达6 670 nkat/L或为基线水平的3倍以上，并排除治疗过程中ALT暂时的升高;持续应答(sustained response，SR):达完全应答的患者随访6 mo时仍保持完全应答.

统计学方法 采用SPSS12.0 进行处理，计数资料用χ^2检验，显著性水平α = 0.05.

2 结果

CR114例，占36.5%;PR152例，占48.7%;NR16例，占5.1%;EB25例，占8.0%.SR101例，占32.4%.以治疗前ALT水平分为4组，应答反应不同(表1).治疗前有HBV DNA定量者179例，HBV DNA低水平组(HBV DNA ≤ 10^8copies/L)、中水平组(10^8<HBV DNA ≤ 10^{11} copies/L)，高水平组(HBV DNA>10^{11} copies/L)完全应答率及持续应答率有差异(表2).

表1 基线ALT对应答反应的影响

ALT水平(nkat/L)	*n*	CR(%)	SR(%)	EB(%)
-1334	56	12(21.4)	8(14.3)	1(1.8)
1334-				
3335-	136	46(33.8)	43(31.6)	5(3.7)
3335-	78	31(39.7)	30(38.5)	12(15.4)
6670-	42	25(59.5)	20(47.6)	6(14.3)
χ^2		15.8612	14.1839	14.8302
P		0.0012	0.0027	0.0020

表2 HBV DNA水平与应答的关系

HBVDNA水平 (copies / L)	*n*	CR(%)	SR(%)	EB(%)
-10^8	38	22(57.9)	19(50.0)	2(5.3)
10^8-	107	40(37.4)	31(28.9)	11(10.3)
10^{11}-	34	9(26.5)	3(8.2)	8(23.5)
χ2		7.2860	14.6496	6.3229
P		0.0262	0.0007	0.0424

联用拉米夫定(OML)组CR，SR，EB分别为46.8%(51/109)，41.3%(45/109)，和1.8%(2/109)，而单用苦参素(OM)组分别为31.0%(63/203)，27.6%(56/203)和11.3%(23/203)，差异均有非常显著性意义(P = 0.0048，0.0 020，0.0 090).接受1个疗程治疗的98例，2个疗程的148例，3个疗程的60例，4个疗程的6例.应答反应以2个疗程为佳(表3).

表3 苦参素疗程与应答反应的关系

疗程	*n*	CR(%)	SR(%)	EB(%)
1个	98	31(31.6)	26(26.5)	13(13.3)
2个	141	66(46.8)	63(44.7)	10(7.1)
3个	62	14(22.6)	10(16.1)	2(3.2)
4个	15	3(20.0)	2(13.3)	0(0.0)
χ2		14.4591	23.1502	11.9123
P		0.0023	0.0000	0.0077

有25例患者病情发生恶化，4例联合用药的患者在发生病情恶化后均停用苦参素，继续用拉米夫定治疗并加用古拉丁或甘利欣等保肝及对症处理，21例接受苦参素治疗的患者均停用苦参素，在使用古拉丁或甘利欣等保肝及对症处理的基础上，16例改用拉米夫定治疗，9例未再使用其他抗病毒药物或免疫调节药物.所有病例肝功能分别在2-16 wk后复常;用拉米夫定者有13例(65.0%)、未用其他抗病毒药物者有2例(40.0%)分别在恶化后的0.25-1 a内后出现了完全应答.其他不良反应和副作用有:32例患者治疗2-4 wk出现ALT一过性升高，分别超过基线水平333-2 000 nkat/L(最高达5 202 nkat/L)，经保肝对症治疗，多在2 wk内下降;另外部分病例出现注射部位疼痛、硬结形成、口苦、上腹部不适、腹泻等，均较轻微，无1例因此而终止治疗.

3 讨论

苦参素作为抗HBV治疗的药物之一，近年来已在慢性乙型肝炎的治疗中得到了广泛的应用，其抗病毒作用与干扰素-α相近.本结果显示，苦参素单用或联用拉米夫定治疗慢性乙型肝炎完全应答率达36.5%，持续应答率为32.4%，只有5.1%的病例对治疗无应答，表明苦参素治疗慢性乙型肝炎具有一定的作用.但另有8.0%(单用苦参素者高达11.3%)的患者接受苦参素治疗后出现病情恶化，尽管这部分病例经对症治疗或换用其他抗病毒药物治疗后，病情都得到控制，未发生进行性恶化或死亡，而且出现病情恶化的病例对随后的拉米夫定治疗应答反应良好(CR:65.0%)，即使不使用抗病毒治疗，也有40.0%的患者发生了HBeAg的阴转，但也提醒我们在使用苦参素治疗慢性乙型肝炎时应严密观察,充分考虑到病情加重的可能.苦参素在治疗慢性乙型肝炎的过程中，也会出现暂时性的ALT升高的现象,其发生机制多认为因接受治疗后，患者机体发生了特异性的抗HBV免疫应答.恶化病例具有以下特点:(1)多在治疗后8-12 wk发生;(2)HBV DNA不下降或下降小于2 log10;(3)ALT升高明显，且多伴有TBil升高，患者可出现明显的临床症状;(4)多发生于ALT基线水平较高(ALT ≥ 5-6 670 nkat/L)的病例;(5)联合拉米夫定治疗可降低恶化病例的发生率;(6)进一步积极治疗远期预后较好.这种恶化病例的发生机制尚不甚明了，可能与以下几方面的因素有关:(1)部分乙肝患者可能存在对苦参素原发耐药的病毒株，其恶化与病程中病情自然波动有关.联用拉米夫定的患者发生率明显降低支持这一点，但另一方面本组资料只有5.1%的患者对治疗无应答，而恶化率高达8.0%，又不支持对苦参素耐药的假说;(2)苦参素对免疫功能的影响.多数研究认为苦参素对免疫功能有抑制作用，但这方面的研究结果存在着矛盾[3, 19-20];(3)个人特异性体质.高作文 *et al*[11] 曾报告2例慢性乙型肝炎患者在接受苦参素注射液治疗后肝功能损害加重并出现黄疸,但其发生时间较早分别在用药后3-7 d内发生，其中1例第2次用苦参素后当日即出现恶心、呕吐、胸闷，ALT及TBil明显上升.作者认为首先应考虑抗病毒引起的肝细胞损害，其次应考虑病情的自然演变或与个人特异性体质有关.

影响苦参素应答反应的因素有治疗前ALT水平、HBV DNA水平、疗程和联合用药.治疗前高ALT、低HBV DNA水平是影响苦参素治疗慢性乙型肝炎的主要因素，治疗前低水平的HBVDNA与治疗后的完全应答率增高相关，这与Chen *et al*[21] 的结论一致;随基线ALT升高,完全应答率及持续应答率都相应升高(P = 0.0 012和0.0 027)，至ALT大于6 670 nkat/L时，完全应答率及持续应答率分别达59.5%和47.6%,只是高基线水平的ALT也与治疗后病情恶化直接相关(P = 0.002);本文结果也表明，苦参素治疗慢性乙型肝炎完全应答反应以6 mo时为最高，随疗程进一步延长，应答反应进一步提高的程度有限，也就是说苦参素治疗慢性乙型肝炎以6 mo为1个疗程较为理想.Chen *et al*[4] 用苦参素治疗以包含完整HBV基因组的4.2 kb基因片段制成乙肝的转基因小鼠，研究发现200 mg/kg的剂量和20 d的疗程可使HBsAg，HBcAg及Dane颗粒在免疫组织化学检测中消失，增加剂量或延长疗程并不能获得更好的疗效.本结果与此研究不谋而合.

联合抗病毒治疗是目前乙型肝炎治疗研究的新方向，在众多的联合方案诸如拉米夫定+泛昔洛韦、IFN-α+病毒唑、IFN-α+单磷酸阿糖腺苷、IFN-α+泛昔洛韦、拉米夫定+IFN-α、拉米夫定+苦参素、IFN-α+苦参素、IFN-α+阿德福韦、拉米夫定+阿德福韦等中，临床应用较多的是IFN-α、拉米夫定、苦参素三者之间两两联用，尤以IFN-α+苦参素[15]、拉米夫定+苦参素两种方案在临床应用最为广泛.自张学武*et al*[8]在2001年首次报告拉米夫定联合苦参素治疗乙型肝炎以来，近年来该方案已得到广泛的

认可，发表的临床报告文章逐年递增，二者联用的方式有:(1)开始即联用，拉米夫定续用至停药[8, 14];(2)先用苦参素治疗，待ALT升高时加用拉米夫定;(3)先用拉米夫定，出现拉米夫定耐药时加用苦参素[10, 13](4)先用拉米夫定，至停药前1-3 mo加用苦参素，以防止拉米夫定停药后肝炎的发生[17]. 本结果进一步证实了该方案的疗效，联合组完全应答率、持续应答率分别为46.8%和41.3%，而单用苦参素组仅为31.0%和27.6%,差异有非常显著的统计学意义(P = 0.0 048, 0.0 020)，更为重要的是联合治疗组恶化率仅为1.8%，而单独用药组为11.3%(P = 0.009)，说明联用拉米夫定能显著地降低苦参素治疗慢性乙型肝炎时恶化病例的发生率. 综上所述，苦参素治疗慢性乙型肝炎疗效肯定,副作用小,值得临床推广应用;联用拉米夫定可有效地降低恶化病例的发生率.

4 参考文献

1 蔡雄, 王国俊, 翟瑶, 樊成辉, 张瑞祺, 徐文胜. 苦参素注射液治疗慢性乙型肝炎的临床疗效分析. 第二军医大学学报 1997;18:47-49

2 李继强, 陈萦晅, 曾民德, 陆伦根, 邱德凯, 茅益民, 范竹萍, 华静. 氧化苦参碱抗乙肝病毒的体外实验研究. 中华消化杂志 2001;21:550-552

3 Dong Y, Xi H, Yu Y, Wang Q, Jiang K, Li L. Effects of oxymatrine on the serum levels of T helper cell 1 and 2 cytokines and the expression of the S gene in hepatitis B virus S gene transgenic mice:a study on the anti-hepatitis B virus mechanism of oxymatrine. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1299-306

4 Chen XS, Wang GJ, Cai X. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine in vivo. *World J Gastroenterol* 2001;7:49-52

5 Lu LG, Zeng MD, Mao YM, Li JQ, Wan MB, Li CZ, Chen CW, Fu QC, Wang JY, She WM, Cai X, Ye J, Zhou XQ, Wang H, Wu SM, Tang MF, Zhu JS, Chen WX, Zhang HQ. Oxymatrine therapy for chronic hepatitis B: A randomized double-blind and placebo-controlled multi- center trial. *World J Gastroenterol* 2003;9:2480-2483

6 于岩岩, 斯崇文, 曾争. 苦参素制剂治疗慢性乙型肝炎的临床试验. 中华内科杂志 2001;40:843-846

7 Yu YY, Wang QH, Zhu LM. A clinical research on oxymatrine for the treatment of chronic hepatitis B. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2002;10:280-281

8 张学武, 周敏, 胡国启. 拉米夫定联合博尔泰力治疗慢性乙型肝炎临床研究. 临床肝胆病杂志 2001;17:165-166

9 张学武, 周敏, 胡国启. 博尔泰力治疗乙型肝炎活动性肝硬化的临床研究. 中西医结合肝病杂志 2002;12:141-143

10 张学武, 周敏, 胡国启. 博尔泰力治疗拉米夫定耐药性乙型肝炎的临床研究. 临床肝胆病杂志 2003;19:106-107

11 高作文, 张瑞琪, 缪晓辉. 苦参素注射液致慢性乙肝患者肝功能损害加重2例. 药物不良反应杂志 2002;2:120-121

12 李忠, 杨丽, 张平, 姜波, 许红萍. 拉米夫定与苦参素联合序贯治疗慢性乙型肝炎的疗效观察. 遵义医学院学报 2003;26:371-372

13 方广强, 甄中锋. 氧化苦参碱联合胸腺肽治疗拉米夫定所致YMDD变异后的慢性乙型肝炎疗效观察. 传染病信息 2002;15:139-140

14 周和龙, 杨小铭, 何生松, 朱华斌, 黄华芳. 拉米夫定单用或联合苦参素治疗慢性乙型肝炎. 医药导报 2003;22:845-847

15 郭西萍, 杜亚平, 钟基大, 李国军. 干扰素联合苦参素治疗慢性乙型肝炎疗效观察. 中国抗感染化疗杂志 2001;1:89-97

16 邹桂舟, 李旭, 叶珺, 叶英, 李鸿宾. 苦参素联合干扰素对慢性乙肝病毒定量的影响. 安徽医药 2003;7:13-14

17 季瑜, 唐家槐. 苦参素缓解拉米夫定停药反跳效果观察. 现代中西医结合杂志 2004;13:776-777

18 Lu LG, Zeng MD, Mao YM, Fang JY, Song YL, Shen ZH, Cao AP. Inhibitory effect of oxymatrine on serum hepatitis B virus DNA in HBV transgenic mice. *World J Gastroenterol* 2004;10: 1176-1179

19 孙永年, 龚守军, 黄祝青. 苦参素对慢性乙型肝炎血清肿瘤坏死因子－α、白介素－6、白介素－8的影响. 中国综合临床 2003;19:908-909

20 甘建和, 朱翔, 赵卫峰, 罗二平. 苦参素治疗慢性乙型肝炎疗效观察. 苏州医学院学报 2001;21:698-699

21 Chen YX, Mao BY, Jiang JH. Relationship between serum load of HBV-DNA and therapeutic effect of oxymatrine in patients with chronic hepatitis B. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2002;22:335-336

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):321-324
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

胃肠道间质瘤 c-*kit* 基因突变体的研究

刘晓红, 谢 强, 冯 菲, 白辰光, 马大烈

刘晓红, 中国人民解放军第二军医大学长海医院胸心外科 上海市 200433
谢强, 白辰光, 冯菲, 马大烈, 中国人民解放军第二军医大学长海医院病理科 上海市 200433
刘晓红, 女, 1976-09-04 生, 山东济宁人, 汉族. 1999 年济宁医学院本科毕业, 2002 年第二军医大学硕士研究生毕业, 主要从事肿瘤的病理研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30070743
项目负责人: 马大烈, 200433, 上海市杨浦区长海路 187 号, 中国人民解放军第二军医大学长海医院病理科. daliema@yahoo.com.cn
电话: 021-25070660 传真: 021-25072135
收稿日期: 2004-09-24 接受日期: 2004-11-04

Cell transformation effect of mutant *c-kit* gene in gastrointestinal stromal tumor

Xiao-Hong Liu, Qiang Xie, Chen-Guang Bai, Fei Feng, Da-Lie Ma

Xiao-Hong Liu, Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433,China
Qiang Xie, Fei Feng, Chen-Guang Bai, Da-Lie Ma, Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433,China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30070743
Correspondence to: Da-Lie Ma, Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China. Daliema@yahoo.com.cn
Received: 2004-09-24 Accepted: 2004-11-24

Abstract

AIM: To investigate the implication in tumorigenesis of a novel *c-kit* gene mutant, which was identified recently in gastrointestinal stromal tumor (GIST), by examining its effect on cell proliferation and cell cycle.

METHODS: Recombinant plasmids, which contained mutant or wile-type *c-kit* gene, were stably transfected into human embryonic kidney (HEK) cells. The expression of c-kit protein was detected by Western blot. The proliferation and cell cycle of the transfected cells were detected by MTT colorimetic assay and flow cytometry, respectively.

RESULTS: In comparison with the cells transfected with wild-type *c-kit* cDNA and empty pcDNA3 vector, the proliferation of the cells transfected with mutant *c-kit* cDNA was increased significantly. The percentages of cells in proliferation phase (S+G2+M) were 48.34%, 48.24%, 42.03% and 42.16% in test, positive control, negative control and empty control group, respectively.

CONCLUSION: The mutant *c-kit* gene can promote human cell proliferation, which may play an important role in the malignant transformation of GIST.

Key Words: Mutant c-*kit* gene; Gastrointestinal stromal tumor; MTT assay; Flow cytometry

Liu XH, Xie Q, Feng F, Bai CG, Ma DL. Cell transformation effect of mutant *c-kit* gene in gastrointestinal stromal tumor. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):321-324

摘要

目的: 研究突变型c-*kit*基因对细胞增生及细胞周期的影响从而揭示突变型 c-*kit* 基因对人体细胞的恶性转化作用.

方法: 将构建于 pcDNA3 的突变型 c-*kit* cDNA 和野生型 c-*kit* cDNA 重组质粒及空白 pcDNA3 质粒(空白对照)通过脂质体法稳定转染人胚胎肾细胞(human embryonic kidney cell, HEK)细胞.用 Western blot 方法检测 c-*kit* 蛋白的表达情况, 观测转染细胞的生长曲线变化, 用 MTT 法检测细胞增生活性的变化, 并用流式细胞仪检测 c-*kit* 基因突变体对细胞周期的影响.

结果: 与阴性对照、空白对照相比, 实验组细胞生长速度明显增快, 细胞增生活性明显增强, 细胞周期检测显示:实验组和阳性对照组处于增生期细胞(S+G2－M)比例明显高于阴性对照组和空白对照组, 各组处于增生期的细胞比例依次为:48.34%(实验组)、48.24%(阳性对照组)、42.03%(阴性对照组)、42.16%(空白对照组).

结论: c-*kit*基因突变可使人类细胞的增生活性明显增强, 并可以使更多的细胞由静止期进入增生期, 提示c-*kit*基因突变有可能是引起 GIST 的恶性转化的关键机制之一.

关键词: 突变 c-*kit* 基因; 胃肠道间质瘤; 流式细胞术; MTT 法

刘晓红, 谢强, 冯菲, 白辰光, 马大烈. 胃肠道间质瘤c-*kit*基因突变体的研究. 世界华人消化杂志 2005;13(3):321-324
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/321.asp

0 引言

胃肠道间质瘤(gastrointestinal stromal tumor, GIST)中有 c-*kit* 基因突变, 位于 exon11 Codon550-560 之间的突变型 c-*kit* 基因表达产物可不依赖配体而引发自身激活[1-7]. 我们[8-9]借助 PCR, DNA 测序技术

检出3例GIST c-*kit*基因突变，其中1例插入型突变处于国外已报道的突变热点区之外，既在c-*kit*蛋白肽链第579位密码子插入4个氨基酸:Leu-Pro-Tyr-Asp(亮氨酸－脯氨酸－酪氨酸－天冬氨酸).为了进一步探讨该突变是否也是获得性功能突变，我们构建出含野生型及突变型c-*kit* cDNA的重组质粒并转染人胚肾(human embryo kidney，HEK)细胞，通过观察突变型c-*kit*基因对HEK细胞增生及细胞周期的影响，推断其功能状态;并通过观察稳定转染重组质粒HEK细胞在裸鼠内的致瘤性来检测其对人体细胞的恶性转化作用.

1 材料和方法

1.1 材料 腺病毒永生化的HEK细胞系购于中科院细胞研究所，并培养于含100 mL/L胎牛血清DMEM培养基;pcDNA3质粒[Invitrogen公司];重组质粒pcDNA3-KIT-W(野生型c-*kit* cDNA与真核表达载体pcDNA3重组质粒)，pcDNA3-KIT-MW(c-*kit* codon559-560缺失突变cDNA与pcDNA3载体重组质粒)，pcDNA3-KIT-NW(c-*kit* codon579插入性突变cDNA与pcDNA3载体重组质粒)由本实验室制备;Balb/c裸鼠[上海中科院动物实验中心].G418抗生素(上海生工公司);λ-*Eco*T14 DNA Marker(Takara公司);限制性内切酶、T4 DNA连接酶(Takara公司);Qiagen 质粒小量抽提试剂盒(基因公司);脂质体转染试剂盒(lipofective 2000)(Invitrogen公司);鼠抗人c-kit mAB，生物素标记的抗鼠IgG，碱性磷酸酶标记亲和素等(Dako公司);NBT/BCIP显色系统(上海增健公司);MTT(溴化二甲噻唑二苯四氮唑上海生工公司).

1.2 方法 使用Qiagen质粒小量抽提试剂盒提取和纯化质粒(见说明书).质粒pcDNA3及重组质粒pcDNA3-KIT-W，pcDNA3-KIT-MW，pcDNA3-KIT-NW，经*XhoI*和*BamH1*双酶切，反应体系置37℃水浴2 h，30 μL表反应体系如下:ddH_2O 14 μL，10×buffer 3 μL，Plasmid DNA 10 μL，*Bam*H1(10 μmol/L)1.5 μL，*XhoI*(10 μmol/L)1.5 μL.使用*Xho*I和*Bam*H1双酶切后，各取10 μL 10g/L琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察酶切片段大小.实验分4组，A:转染pcDNA3空载体组(空白对照组)，B:转染pcDNA3-KIT-W重组质粒组(阴性对照组)，C:转染pcDNA3-KIT-MW重组质粒组(阳性对照组)，D:转染pcDNA3-KIT-NW重组质粒组(实验组)，脂质体法稳定转染HEK细胞，观察细胞生长状况;筛选出G418阳性克隆;筛选出的工程细胞使用200 mg/L;G418的DMEM培养基维持培养.转染后HEK细胞用Western blot法分析c-kit蛋白表达，MTT法检测细胞增生活性并测定HEK细胞生长曲线.用2.5 g/L胰蛋白酶分别消化4株细胞，离心，用培养液重新悬浮、计数，每孔加入2×10^5个细胞，于CO_2孵箱，37℃培养24 h;用2.5 g/L胰蛋白酶消化各孔细胞，离心，培养液重悬，计数.每孔收集收集5×10^5个细胞，PBS洗涤2次，用750 mL/L乙醇固定过夜;离心，弃上清，用PBS洗涤2次，加入PI(碘化吡啶)200 μL，暗处孵育30 min.流式细胞仪检测细胞周期改变.

统计学处理 采用SPSS统计软件对数据进行处理.

2 结果

2.1 重组质粒酶切鉴定 质粒pcDNA3经*Bam*H1酶切后表现为5.4 kb大小的片段，重组质粒pcDNA3-W，pcDNA3-NW，pcDNA3-MW经*Xho*I/*Bam*HI双酶切后，均可得3 kb片段和5.4 kb大小片段(图1)，表明重组质粒含c-*kit* cDNA片段.

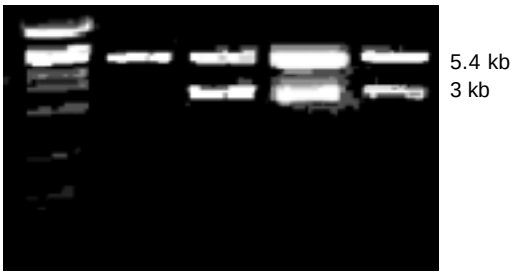


图1 c-kit cDNA和pcDNA3载体重组质粒双酶切鉴定. M: λ-EcoT14 DNA Marker, 1 pcDNA3 vector disgested by *Xho* I, 2 pcDNA3-KIT-W disgested by *Xho* I/*BamH* I, 3 pcDNA3-KIT-MW disgested by *Xho* I/*BamH* I, 4 pcDNA3- KIT-NW disgested by *Xho* I/*BamH* I.

2.2 c-kit蛋白在HEK细胞中的表达 Western blot免疫印迹结果显示转染pcDNA3的HEK工程细胞c-kit蛋白表达为阴性，转染重组质粒pcDNA3-KIT-W，pcDNA3-KIT-MW，pcDNA3- KIT-NW在HEK工程细胞均有c-kit蛋白表达.(图2).

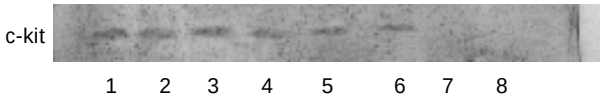


图2 Western blot免疫印迹结果. 1-2: pcDNA3-KIT-W; 3 - 4: pcDNA3-KIT-MW; 5 - 6: pcDNA3-KIT-NW; 7-8: pcDNA3.

2.3 重组质粒对HEK细胞生长的影响 细胞生长曲线(图3)显示稳定转染质粒pcDNA3和pcDNA3-KIT-W组HEK工程细胞在4 d出现快速增长期，转染pcDNA3-KIT-MW和pcDNA3-KIT-NW HEK工程细胞3 d出现快速增长期;导入突变型c-*kit*基因组生长速度显著变快.将转染各质粒的HEK工程细胞生长曲线拟合为直线并求其直线回归方程:pcDNA3空载体:$Y = -17.73+9.93X$

($P<0.05$);pcDNA3-KIT-W: $Y=-18.34+10.44X$($P<0.05$);pcDNA3-KIT-MW: $Y=-17.7+11.73X$($P<0.05$);pcDNA3-KIT-NW: $Y=-19.0+12.51X$($P<0.05$).

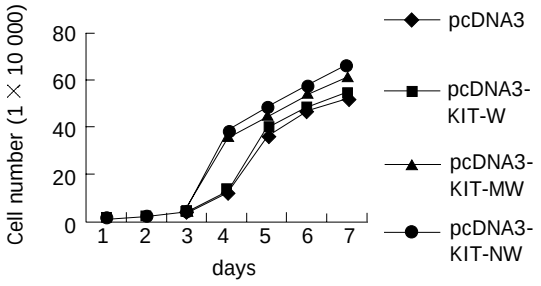


图3 突变c-*kit*基因对HEK细胞生长速度的影响.

2.4 转染后各组细胞增生活性比较 将稳定转染pcDNA3, pcDNA3-KIT-W, pcDNA3-KIT-MW, pcDNA3-KIT-NW质粒HEK细胞吸光度检测结果，使用SPSS统计软件进行单向方差(One-way ANOVA)分析(表1). 多重均数比较(LSD法)显示:转染pcDNA3与pcDNA3-KIT-W两组之间差异无统计学意义($P>0.05$);转染pcDNA3-KIT-MW与pcDNA3-KIT-NW两组之间差异无统计学意义($P>0.05$). 转染pcDNA3-KIT-MW与pcDNA3-KIT-NW组分别和pcDNA3与pcDNA3-KIT-W组有显著统计学意义($P<0.05$)，以上结果显示转染含突变型c-*kit* DNA的HEK细胞比转染野生型c-*kit*及空白pcDNA3载体HEK细胞增生活性明显增强.

2.5 重组质粒对HEK细胞周期的影响 实验组、阳性对照组、阴性对照组和空白对照组细胞周期中位于增生期(S + G_2-M)的细胞比例依次为48.3%、48.2%、42.0%、42.2%. 与空白对照组和阴性对照组，转染含突变c-*kit*基因重组质粒的实验组和对照组处于增生期比例明显升高(表2).

表2 各转染组细胞周期检测结果

HEK cell	G_0-G_1期	S期	G_2-M期	S + G_2-M期
空白对照组	57.0%	10.4%	31.8%	42.2%
阴性对照组	58.0%	9.6%	32.4%	42.0%
阳性对照组	51.6%	3.7%	44.5%	48.2%
实验组	50.8%	6.3%	42.0%	48.3%

3 讨论

许多学者证实exon11 Condon550-560是GIST中c-*kit*基因突变热点，该区域的突变均为“获得性功能突变”，他有可能是可能成为判断GIST恶性变的独立预后指标[2, 10-21]. 由于发现GIST和c-*kit*原癌基因之间的关系使理解GIST发病机制迈出了关键的一步，该基因经过转录、翻译成c-*kit*蛋白，深入细胞膜作为酪氨酸的跨膜受体. 目前关于生理状态下c-*kit*癌基因相关的信号传导途径已有报道[22-28]，主要表现为c-*kit*蛋白与其配体结合可以使两个相邻的Kit受体分子出现二聚体化，导致蛋白分子结构发生改变，使得c-*kit*受体酪氨酸激酶区相互作用，引起对方的酪氨酸残基磷酸化，被磷酸化的酪氨酸残基可结合信号传导通路中的下游底物，或者通过磷酸化作用于胞内其他蛋白底物，从而激活相应的信号传导通路. 我们对82例GIST研究中发现41.5%的GIST存在c-*kit*基因突变，而且突变主要发生在恶性GIST，其中一例GIST在突变热点区域之外检测到c-*kit*蛋白肽链第579位密码子插入4个氨基酸:Leu-Pro-Tyr-Asp(亮氨酸－脯氨酸－酪氨酸－天冬氨酸). 本课题将深入了解该突变体是否也存在类似的获得性功能突变及其在GIST发生、发展过程中的作用机制，我们用分子生物学手段分别从细胞水平，蛋白水平了解该突变体所引起的c-*kit*蛋白生物活性的改变.

HEK细胞系虽含有c-*kit*原癌基因，但蛋白表达率极低，Western blot免疫印迹方法不能检测出[29-30]，本研究根据所检测出的突变位点以及文献所报道的codon559-560缺失性突变人工突变野生型c-*kit* cDNA，同时设置阴性对照，空白对照，转染HEK肾细胞. Western blot免疫印迹方法检测四种质粒在HEK细胞的表达，结果显示转染pcDNA3空白对照组未显示条带，而其余各组在相同位置均显示一淡兰色条带，这说明除空白对照组外，其余各组均有c-*kit*蛋白表达，从而证实各重组质粒已在HEK细胞中稳定表达.

随后，观察C-Kit基因突变体的cDNA对HEK增生活性和细胞周期的影响，结果显示:转染pcDNA3、pcDNA3-KIT-W、pcDNA3-KIT-NW和pcDNA3-KIT-MW质粒各组HEK细胞的细胞周期中位于增生期(S＋G_2-M)的细胞比例依次为42.2%、42.0%、48.3%、48.2%;MTT检测表明以上各组细胞吸光度均值依次为0.1 947 ± 3.537×10^{-3};0.1 830 ± 6.034×10^{-3};0.1 340 ± 2.353×10^{-3};0. 1 274 ± 3.537×10^{-3}. SPSS单向方差分析结果显示实验组和阳性对照组之间无统计学意义($P>0.05$);而空白对照组和阴性对照组之间无统计学

表1 各组细胞吸光度平均值检测单向方差分析结果

HEK cell	pcDNA3	pcDNA3-KIT-NW	pcDNA3-KIT-MW	pcDNA3-KIT-W
平均值	0.1 274	0.1 830	0.1 947	0.1 340
标准误	3.537×10^{-3}	3.888×10^{-3}	6.034×10^{-3}	2.353×10^{-3}

意义($P>0.05$). 实验组和阳性对照组分别与空白对照组和阴性对照组之间有统计学意义($P<0.05$)，实验组和阳性对照组与空白对照组和阴性对照组相比，前二者吸光度明显高于后二者. 以上结果表明稳定转染c-*kit*突变体与转染空白pcDNA3载体及转染野生型c-*kit* cDNA组的HEK细胞系相比，细胞生长速度加快，增生活性更强，处于增生期的细胞比例明显较高. 该结果提示，GIST中的c-*kit*基因突变可使人类细胞的增生活性明显增强，并可以使更多的细胞进入细胞周期中的增生期;而野生型c-*kit*基因表达对细胞功能状态无明显影响，这说明突变型c-*kit*可影响人类正常细胞周期调节机制，促进更多的细胞由静止期进入增生期，从而对GIST的发生、发展起推动作用.

4 参考文献

1 Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y, Hashimoto K, Nishida T, Ishiguro S, Kawano K, Hanada M, Kurata A, Takeda M, Muhammad Tunio G, Matsuzawa Y, Kanakura Y, Shinomura Y, Kitamura Y. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577-580

2 Taniguchi M, Nishida T, Hirota S, Isozaki K, Ito T, Nomura T, Matsuda H, Kitamura Y. Effect of c-kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 1999;59:4297-4300

3 Berman J, O Leary TJ. Gastrointestinal stromal tumor workshop. *Hum Pathol* 2001;36:578-582

4 Lasota J, Jasinski M, Sarlomo-Rikala M, Miettinen M. Mutations in exon 11 of c-kit occur preferentially in malignant versus benign gastrointestinal stromal tumors and do not occur in leiomyomas or leiomyosarcomas. *Am J Pathol* 1999;154:53-60

5 Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M, Rys J, Kordek R, Nassar A, Sobin LH, Miettinen M. Mutations in exon 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors a study of 200 cases. *Am J Surg Pathol* 2000;157:1091-1095

6 Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal Stromal Tumors of the Stomach:A Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Genetic Study of 1765 Cases With Long-term Follow-up. *Am J Surg Pathol* 2005;29:52-68

7 Metaxa-Mariatou V, Papadopoulos S, Papadopoulou E, Passa O, Georgiadis T, Arapadoni-Dadioti P, Leondara V, Nasioulas G. Molecular analysis of GISTs:evaluation of sequencing and dHPLC. *DNA Cell Biol* 2004;23:777-782

8 马大烈, 刘晓红, 蔡在龙, 谢强. 胃肠道间质瘤中原癌基因c-kit突变及其蛋白表达. 中华肿瘤杂志 2002;24:461-464

9 Feng F, Liu XH, Xie Q, Liu WQ, Bai CG, Ma DL. Expression and mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2003;9:2548-2551

10 Wong NA, Young R, Malcomson RD, Nayar AG, Jamieson LA, Save VE, Carey FA, Brewster DH, Han C, Al-Nafussi A. Prognostic indicators for gastrointestinal stromal tumours:a clinicopathological and immunohistochemical study of 108 resected cases of the stomach. *Histopathology* 2003;43:118-126

11 Nagasako Y, Misawa K, Kohashi S, Hasegawa K, Okawa Y, Sano H, Takada A, Sato H. Evaluation of malignancy using Ki-67 labeling index for gastric stromal tumor. *Gastric Cancer* 2003;6:168-172

12 Lin SC, Huang MJ, Zeng CY, Wang TI, Liu ZL, Shiay RK. Clinical manifestations and prognostic factors in patients with gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2003;9:2809-2812

13 Kim MK, Lee JK, Park ET, Lee SH, Seol SY, Chung JM, Kang MS, Yoon HK. Gastrointestinal stromal tumors:clinical, pathologic features and effectiveness of new diagnostic criteria. *Korean J Gastroenterol* 2004;43:341-348

14 Goldblum JR. Gastrointestinal stromal tumors. A review of characteristics morphologic, immunohistochemical, and molecular genetic features. *Am J Clin Pathol* 2002;117(Suppl):S49-61

15 Corless CL, Fletcher JA, Heinrich MC. Biology of gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* 2004;22:3813-3825

16 Ma DL, Liu XH, Bai CG, Xie Q, Feng F. Effect of c-kit gene mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumor. *Zhonghua Waike Zazhi* 2004;42:140-144

17 Joensuu H, Kindblom LG. Gastrointestinal stromal tumors—a review. *Acta Orthop Scand Suppl* 2004;75:62-71

18 Theou N, Tabone S, Saffroy R, Le Cesne A, Julie C, Cortez A, Lavergne-Slove A, Debuire B, Lemoine A, Emile JF. High expression of both mutant and wild-type alleles of c-kit in gastrointestinal stromal tumors. *Biochim Biophys Acta* 2004;1688:250-256

19 Beghini A, Tibiletti MG, Roversi G, Chiaravalli AM, Serio G, Capella C, Larizza L. Germline mutation in the juxtamembrane domain of the kit gene in a family with gastrointestinal stromal tumors and urticaria pigmentosa. *Cancer* 2001;92:657-662

20 Lee JH, Zhang X, Jung WY, Chae YS, Park JJ, Kim I. DNA ploidy and c-Kit mutation in gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* 2004;10:3475-3479

21 Lee JR, Joshi V, Griffin JW Jr, Lasota J, Miettinen M. Gastrointestinal autonomic nerve tumor:immunohistochemical and molecular identity with gastrointestinal stromal tumor. *Am J Surg Pathol* 2001;25:979-987

22 Jalal Hosseinimehr S, Inanami O, Hamasu T, Takahashi M, Kashiwakura I, Asanuma T, Kuwabara M. Activation of c-kit by stem cell factor induces radioresistance to apoptosis through ERK-dependent expression of survivin in HL60 cells. *J Radiat Res(Tokyo)* 2004;45:557-561

23 Maulik G, Bharti A, Khan E, Broderick RJ, Kijima T, Salgia R. Modulation of c-Kit/SCF pathway leads to alterations in topoisomerase-I activity in small cell lung cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2004;23:237-251

24 Catalano A, Rodilossi S, Rippo MR, Caprari P, Procopio A. Induction of stem cell factor/c-Kit/slug signal transduction in multidrug-resistant malignant mesothelioma cells. *J Biol Chem* 2004;279:46706-46714

25 Hollenbeck ST, Sakakibara K, Faries PL, Workhu B, Liu B, Kent KC. Stem cell factor and c-kit are expressed by and may affect vascular SMCs through an autocrine pathway. *J Surg Res* 2004;120:288-294

26 Fletcher JA. Role of KIT and platelet-derived growth factor receptors as oncoproteins. *Semin Oncol* 2004;31:4-11

27 Wandzioch E, Edling CE, Palmer RH, Carlsson L, Hallberg B. Activation of the MAP kinase pathway by c-Kit is PI-3 kinase dependent in hematopoietic progenitor/stem cell lines. *Blood* 2004;104:51-57

28 Heissig B, Werb Z, Rafii S, Hattori K. Role of c-kit/Kit ligand signaling in regulating vasculogenesis. *Thromb Haemost* 2003;90:570-576

29 Ronnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2535-2548

30 Yajima T, Kanda T, Yoshiike K, Kitamura Y. Retroviral vector targeting human cells via c-Kit-stem cell factor interaction. *Hum Gene Ther* 1998;9:779-787

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):325-329
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

甘草酸苷对小鼠暴发性肝损伤细胞凋亡的抑制作用

杨宝山, 陈立艳, 马英骥, 毕蔓茹

杨宝山, 陈立艳, 马英骥, 毕蔓茹, 哈尔滨医科大学第一临床医学院传染科 黑龙江省哈尔滨市 150001
杨宝山, 男, 1963-07-22 生, 黑龙江省伊春人, 汉族.2002 年哈尔滨医科大学博士.
黑龙江省十五攻关重大课题, No. 200101031-00
项目负责人: 马英骥, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街 23 号, 哈尔滨医科大学第一临床医学院传染科.
电话: 0451-53601171 传真: 0451-53621909
收稿日期: 2004-09-09 接受日期: 2004-10-11

Effects of SNMC on inhibiting hepatocyte apoptosis in mice with fulminant hepatic failure

Bao-Shan Yang, Li-Yan Chen, Ying-Ji Ma, Man-Ru Bi

Bao-Shan Yang, Li-Yan Chen, Ying-Ji Ma, Man-Ru Bi, Department of Infectious Disease, First Clinical Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China
Supported by the Key Program during the 10th Five-Year Plan of Heilongjiang Province, No. 200101031-00
Correspondence to: Ying-Ji Ma, 23 Youzheng Street Nangang District, Department of Infectious Disease, First Clinical College of Harbin Medical University Harbin 150001, China.
Received: 2004-09-07 Accepted: 2004-10-11

Abstract

AIM: To study the effects of SNBC on inhibiting hepatocyte apoptosis in mice with fulminant hepatic failure (FHF).

METHODS: Mice were given lipopolysaccharide (LPS, ip) and D-galactosamine (D-GalN, 1 000 mg/kg, ip) to establish FHF model. Hepatocyte apoptosis was observed by pathological section. After treated with SNMC, the level of serum TNFα were tested by radioimmunoassay. The expression of caspase-3 in liver tissue was determined by *in situ* hybridization.

RESULTS: The level of serum ALT and total bilirubin (TBiL) remarkably increased in FHF mice. Hepatocyte apoptosis was observed at 6 hours and the level of serum TNFα and caspase-3 expression increased significantly (3.75±0.50 *vs* 0.77±0.08, P<0.01; 3 *vs* 0, P<0.01) in comparison with those in normal mice. Hepatocyte apoptosis were inhibited and hepatocyte necrosis decreased significantly after SNBC administration. And serum TNFα level and caspase-3 expression was significantly decreased as compared with those in mice of model group (P<0.01). Hepatocyte apoptosis was gradually decreased with the action time of SNMC in mice. However, there was no significant difference between groups with different action time and doses of SNMC (P>0.05).

CONCLUSION: SNMC can protected hepatocytes from apoptosis in mice with FHF and the mechanism was associated with its inhibitory effect on the pathway of hepatocyte apoptosis.

Key Words: SNMC; Tumor necrosis factor; Caspase-3; Fulminant hepatic failure

Yang BS, Chen LY, Ma YJ, Bi MR. Effects of SNMC on inhibiting hepatocyte apoptosis in mice with fulminant hepatic failure. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):325-329

摘要

目的: 探讨甘草酸苷(SNMC)对小鼠暴发性肝损伤细胞凋亡的抑制作用.

方法: 用 D-氨基半乳糖(D-galactosamin, D-Galn) 1 000 mg/kg 一次 ip 致敏, 以脂多糖(Lipopolysacharide, LPS)ip构建暴发性肝损伤(FHF)小鼠模型.通过病理切片观察SNMC 对小鼠实验性肝损伤中细胞凋亡的抑制作用, 放免法检测肿瘤坏死因子 -α(TNF-α);原位杂交法检测肝组织内caspase-3的表达.并观察不同给药时间及用药剂量的差别.

结果: D-氨基半乳糖和脂多糖可以构建暴发性肝损伤的模型, 血清 ALT 和总胆红素(TBiL)水平显著升高. 6 h 病理切片中可见肝细胞水肿和凋亡, 与正常对照组相比, 血清 TNF-α(0.77 ± 0.08 *vs* 3.75 ± 0.50, P<0.01)水平显著升高, caspase-3 表达显著增加(0 *vs* 3).12 h 可见肝细胞大量碎屑样坏死.给予SNMC后可以抑制细胞凋亡及减少细胞坏死, 并使血清 TNF-α 水平降低(F = 52.48, P<0.01), 肝组织内 caspase-3 表达下降(P<0.01). SNMC 抑制细胞凋亡以小剂量预保护组效果最好.三个剂量组(F = 0.051, P>0.01)及三个时间段(F = 2.043, P>0.01)之间无差异性.

结论: SNMC 对小鼠暴发性肝损伤有明显的保护作用, 可以改善 D-氨基半乳糖和脂多糖所致的肝细胞病理性凋亡及坏死, 并证明 SNMC 可能是抑制了细胞凋亡的细胞内途径.

关键词: 甘草酸苷; 肿瘤坏死因子 -α; caspase-3; 暴发性肝损伤; 细胞凋亡

杨宝山,陈立艳,马英骥,毕蔓苑.甘草酸苷对小鼠暴发性肝损伤细胞凋亡的抑制作用.世界华人消化杂志 2005;13(3):325-329
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/325.asp

0 引言

暴发性肝损伤(FHF)是一种由于各种因素导致的急性或亚急性大块肝细胞坏死，临床上引起凝血酶原时间显著延长及肝性脑病等为其特征.各种急、慢性肝病的发病过程除了与细胞免疫直接导致的炎症坏死有关以外，还与各种原因导致的肝细胞异常凋亡有着密切的关系.以甘草酸为主要成分的甘草酸苷(SNMC)注射剂具有抗炎及抗过敏，并具有类激素样作用[1].并证明SNMC有明确的肝细胞保护作用[2-3].但对重症肝炎治疗的研究尚未见报告.近年来我们根据本药的药理学作用将其试用于治疗重症肝炎获得了较好的疗效.并且通过动物实验证实应用SNMC可以显著地降低FHF小鼠转氨酶及血清中的各种细胞因子，并且使小鼠的存活率提高到60%.我们以建立小鼠的暴发性肝衰竭模型为基础深入地探讨SNMC对FHF细胞凋亡的抑制作用及作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 昆明种小白鼠，清洁级由本校实验动物中心提供，6-7周龄，质量18-20 g，雌雄各半，雌性未孕未产.复方甘草酸苷由日本米诺发源制药株式会社生产，深圳健安医药有限公司总经销提供.D-氨基半乳糖和脂多糖购自Sigma公司.TNF-α放免试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所.caspase-3试剂盒购自武汉博士德生物公司.ALT、IBIL、用日立7070全自动生化仪进行检测 日本SANYO公司MDF-38IE超低温冰箱一台.DR-HW-1恒温水浴箱，北京西域区医疗器械厂.Q/BL001-91离心机，北京医学离心机厂.

1.2 方法 昆明种小白鼠(哈尔滨医科大学附属第一医院动物实验中心提供)110只，随机分11组.A:正常对照组(10只)给予生理盐水0.1 mL 2次/d ip.B:模型组(10只)给予D-GlaN 1 000 mg/kgip致敏后再给予LPS100 μg/kg ip[4,5].C:预保护大剂量组(10只)给予SNMC 0.36 mL(相当于人2 mL/kg) 2次/d ip预保护1 wk后给予LPS 100 μg/kg和D-GlaN 1 000 mg/kg ip.D:预保护中剂量组(10只)给予SNMC 0.26 mL(相当于人2.9 mL/kg)2次/d ip，预保护1 wk后给予LPS 100 μg/kg和D-GlaN1 000 mg/kg ip.E:预保护小剂量组(10只)给予SNMC 0.18 mL(相当于人4 mL/kg) 2次/d ip预保护1 wk后给予LPS 100 μg/kg和D-GlaN 1 000 mg/kg ip.F:同时保护大剂量组(10只)给予SNMC 0.36 ml2次/d ip，后立即给予LPS 100 μg/kg和D-GlaN 1 000 mg/kg ip.G:同时保护中剂量组(10只)给予SNMC 0.26 mL 2次/d ip后立即给予LPS 100 μg/kg和D-GlaN 1 000 mg/kg一次ip.H:同时保护小剂量组:(10只)给予SNMC 0.18 mL 2次/d ip后立即给予LPS 100 μg/kg和D-GlaN 1 000 mg/kg ip.I:后保护大剂量组(10只)给予LPS 100 μg/kg和D-GlaN 1 000 mg/kg ip，8 h后给予SNMC 0.36 mL i-2次/d ip.J:后保护中剂量组(10只)给予LPS-100 μg/kg和D-GlaN 1 000 mg/kg ip 8，小时后给予SNMC 0.26 m l2次/d ip.K:后保护小剂量组(10只)给予LPS 100 μg/kg和D-GlaN 1 000 mg/kg ip，8 h后给予SNMC 0.18 m l2次/d ip各组动物摘眼球无菌无热源取血.3 000 r/min离心10 min后吸取血清或血浆-20度冻存待检.肝脏取肝左叶2块，置25 g/L戊二醛中用于电镜分析和caspase-3的检测.甘草甜素共用1 wk后观察小鼠的存活率.观察SNMC用后8 h，11 h，1 d，3 d，7 d肝脏电镜病理变化，TNF-α水平用放免法.按说明书操作及caspase-3表达.caspase-3寡核苷酸探针序列如下:(1)5’AGGATAATCCATTTTATAACTGTTGTCCAG3’;(2)5’TCCAGTTCTGTACCACGGCAGGCCTGAATA 3’;(3)5’GACTCAAATTCTGTTGCCACCTTTCGGTTA-3’.实验步骤按试剂盒说明书进行，对石蜡包埋的肝组织切片进行原位杂交后DAB显色,染色后细胞质呈棕褐色染色的为阳性细胞，细胞质无棕褐色染色的为阴性细胞.caspase-3原位杂交阳性细胞记数分3级:低倍(×10)镜1 cm^2视野阳性细胞数小于1/3为(+)，1/3-2/3为(++)，大于2/3为(+ + +).

统计学处理 数据用mean ± SD，不同组别间用SPSS12.0软件进行单因素方差分析，并进行两两比较，$P<0.05$认为差异有显著性.采用χ^2检验进行caspase-3阳性表达率的比较.

2 结果

预实验结果表明，单纯给予D-GlaN或LPS在用药24 h内无死亡发生，且肝组织无FHF的病理变化，给予D-GlaN+LPS后6 h电镜:肝细胞核缩小染色质边集核膜下，线粒体轻度肿胀，糖元堆积.可见部分坏死的肝细胞核崩解，质膜和细胞内膜结构明显紊乱(图1A-B).给予D-GlaN+LPS后8 h电镜肝细胞膜结构损伤更为明显，部分细胞完全溶解,细胞核固缩成小团块壮(黑色箭头)，内膜溶解，也可见凋亡的肝细胞，细胞核膜清晰，核内染色质凝聚成班块状,线粒体嵴肿胀或空泡变性(红色箭头)(图1C-D).模型组ALT，TBil，TNF-α水平显著升高,与正常组相比有显著差异($P<0.01$).各治疗组ALT，TBil，TNF-α水平都有不同程度的降低，与模型组比较有显著差异($P<0.01$).但各组间比较无差异($P>0.05$，表1).正常组caspase-3无表达，模型组caspase-3表达明显增多，不同治疗组caspase-3表达较模型组明显降低($P<0.01$).各治疗组间caspase-3

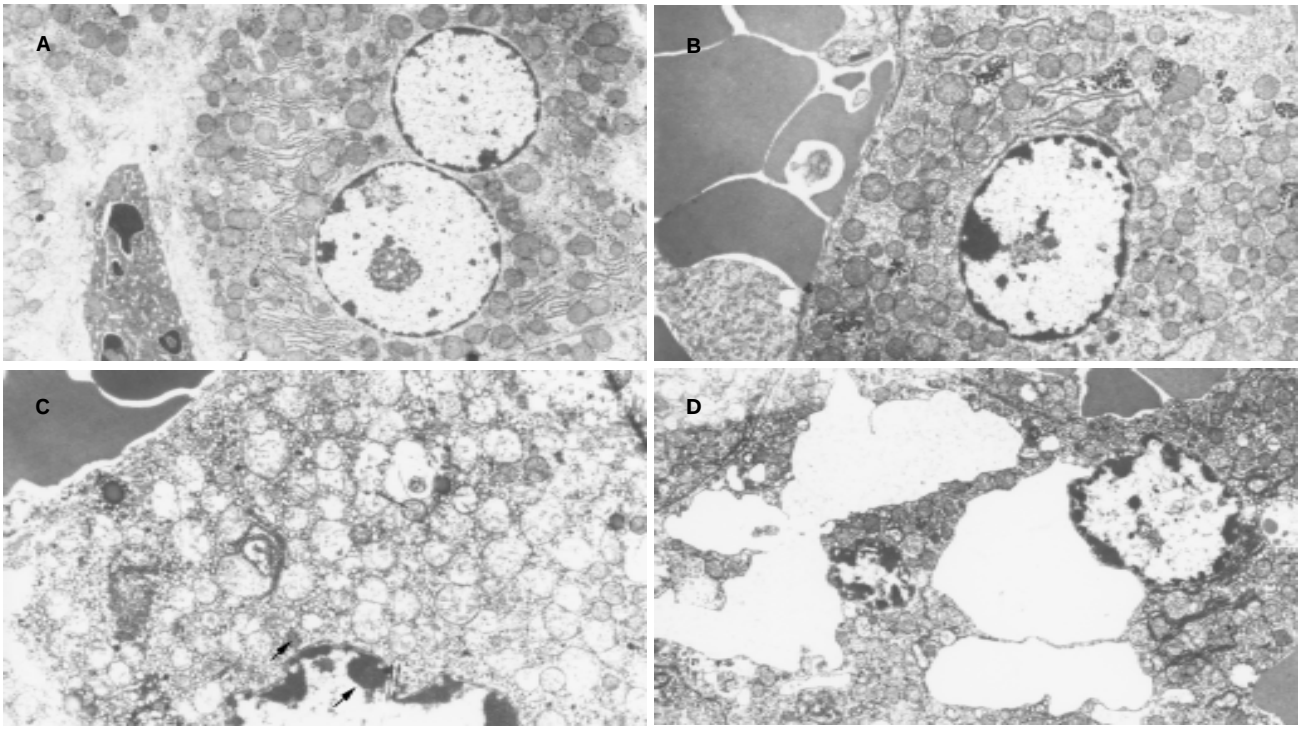


图1 模型组肝细胞，电镜检查结果. A，B: 6 h，×6 000; C: 8 h，×8 000; D: 8 h,×5 000.

表1 各组 ALT，TBil，TNF-α 比较(mean ± SD，n = 10)

分组	ALTnkat\l	TBil nkat\l	TNF-αμg\mL
A	1 119 ± 210	153 ± 145	0.77 ± 0.08
B	23 443 ± 790	1 167 ± 287	3.75 ± 0.50
C	16 153 ± 4 413	420 ± 308	1.16 ± 0.25
D	14 869 ± 7 472	320 ± 206	1.20 ± 0.14
E	13 319 ± 2 853	147 ± 14	1.34 ± 0.31
F	432 ± 105	983 ± 488	1.35 ± 0.17
G	19 482 ± 2499	455 ± 49	1.34 ± 0.31
H	405 ± 133	36 ± 12	1.27 ± 0.27
I	1 661 ± 508	36 ± 12	1.30 ± 0.25
J	10 263 ± 2 802	210 ± 86	1.43 ± 0.24
K	19 064 ± 1 895	453 ± 95	1.25 ± 0.09
	F = 63.60	F = 16.32	F = 52.48

$F_{0.01(9,\ 50)}$ = 4.51.

表达无明显差异(P>0.05，表2)电镜:治疗组T6h细胞坏死状态仍然很严重，窦腔内有许多的吞噬细胞，细胞膜结构呈溶解状态，粗面内质网扩张脱颗粒(红色箭头)，细胞核浓缩的染色质紧靠核膜下，造成细胞的通透功能不良(图2A-B). 治疗组T8h细胞出现凋亡状态，细胞核形成新月体(黑色箭头)，核膜清晰完好，细胞内膜状态欠佳(图2C-D). 治疗组T11h肝细胞板层结构清晰可见，窦内可见吞噬细胞，仍有细胞核的新月体形成，但细胞内膜结构恢复，线粒体单位膜结构完好，内膜絮状变，滑面内质网丰富，有少量容酶体出现，粗面内质网扩张状态脱颗粒，但结构清晰. 肝细胞开始恢复(图2E). 治疗组T1d肝细胞膜结构基本接近正常组，细胞核膜下有轻度的染色质的边集，核周可见少量脂滴的堆积，组面内质网发达，线粒体嵴清晰可见(图2F). 治疗组T3d肝细胞双层核膜结构清晰，线粒体嵴密集(黑色箭头)，基质密度适中，毛细胆管内微绒毛和两端的紧密连接清晰可见，窦内皮结构完好(图2G). 治疗组T7d肝细胞膜结构同正常组，细胞器丰富，尤以粗面内质网发达，数量增多(黑色箭头)，说明肝细胞合成蛋白的功能代偿性的增强，窦内细胞膜结构完好，狄氏间隙可见肝细胞的微绒毛伸入(图2H).

表2 各组 caspase-3 比较

组别	表达(+ + +)	表达(+ +)	表达(+)	表达(-)
A	0	0	0	3
B	3	0	0	0
C	1	2	2	0
D	1	2	2	0
E	1	2	2	0
F	1	1	1	0
G	1	1	2	0
H	0	1	1	0
I	2	1	3	0
J	2	1	3	0
K	2	2	3	0

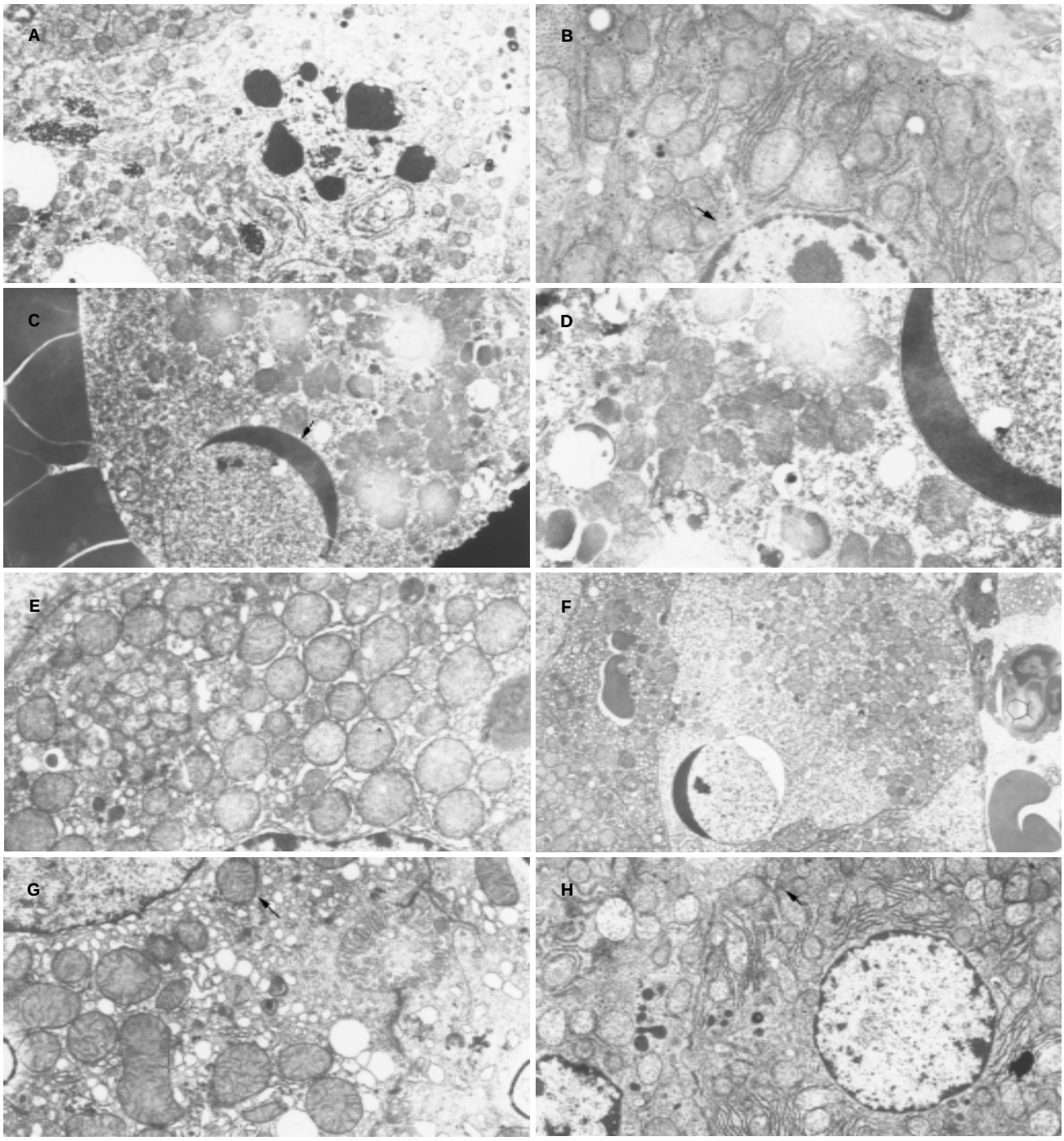


图2 治疗组肝组织电镜检查结果. A: 6 h, ×5 000; B: 6 h, ×8 000; C: 8 h, ×5 000; D: 8 h, ×10K; E: 11 h, ×10K; F: 1 d, ×3 000; G: 3 d, ×10K; H: 7 d, ×6 000.

3 讨论

LPS与D-GaLN联合应用时可复制出类似人类暴发性肝衰竭的损伤模型，并且在肝脏损伤过程中有细胞凋亡的发生，尤其在损伤的早期凋亡特别明显[6-7]. 细胞凋亡(apoptosis)是一系列高度的半胱氨酸蛋白酶caspase级联反应事件的结果. 经典的细胞凋亡途径有两条，分别为细胞外途径(或称细胞表面死亡受体途径)和细胞内途径(或称线粒体引发途径)[8-9]. 在细胞外途径中caspase-3与其他下游的caspase成员是凋亡事件的真正执行者[10-11]. 受体介导是肝细胞凋亡细胞外途径的最主要途径之一. 目前已知参与肝肝细胞凋亡在开始时必须有肝细胞表达的死亡基因受体(death domain receptor)和淋巴细胞表达的相应配体结合才能开始. 这其中包括肿瘤坏死因子(TNF)及其受体TNFR[12-13]. TNF在肝衰竭的发病机制中具有重要的作用意义. 肝衰竭患者血清中TNF含量比正常人及其他类型肝炎患者显著升高，外周血单核细胞产生TNF的活性也显著升高. 肝衰竭时，引起TNF升高的因素很多. TNF虽然参与了肝细胞的损坏，但并不能引起明显肝细胞坏死，他需要其他因素的协同作用在暴发性肝

损伤时. 如 FHF 中所产生的细胞因子及其所介导的炎症反应和免役损伤[14-15].

结果表明，甘草酸苷不但能减低转氨酶和胆红素，最主要的是他能够降低 TNF 及 caspase-3，既降低了细胞凋亡中细胞外途径的开始因素和执行者，最终抑制了细胞凋亡. 本实验单纯从细胞凋亡的细胞外途径角度进行了研究. 但甘草酸苷治疗FHF的作用是非常复杂的，他不光是对于细胞凋亡有抑制作用，很可能也抑制 FHF 过程中各种细胞因子和内毒素(LPS)的产生，以及 FHF 中肝血窦内微血栓形成及肝内微循环障碍的发生. 从而减轻了FHF中的免疫损伤和LPS对肝细胞二次损伤作用. 即使抑制细胞凋亡也不能排除有细胞内途径的参与. 因此还需进行更深入的研究和探讨.

4 参考文献

1 向晓星, 王国俊, 蔡雄. 暴发型肝炎肝细胞凋亡的阻断治疗研究. 肝脏 2001;6:64-65

2 宋方闻, 李学俊, 江元森. 复方甘草甜素(SNMC)对肝病理改变观察. 中华现代医学杂志 2001;11:24-27

3 汪俊韬, 于少军, 肖炜. 复方甘草甜素(美能)在肝病领域的临床应用. 中国药房 2002;13:500-502

4 Yarovinsky TO, Powers LS, Butler NS, Bradford MA, Monick MM, Hunninghake GW. Adenoviral infection decreases mortality from lipopolysaccharid-induced liver failurevia induction of TNF-alpha tolerance. *J Immunol* 2003;171:2453-2460

5 Inoue T, Horiai H, Aoki C, Kawamura I, Ota M, Mizuhara H, Tomoi M, Mutoh S. Insulin-like growth factor-I prevents lethal acute liver failure induced by D-galacto and lipopolysacchride in rats. *In Vivo* 2003;17:293-299

6 Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Yamauchi K, Yonehara S, Nagata S, Hayashi N. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1993;3664:806

7 Ryo K, Kamogawa Y, Ikeda I. Significance of Fas antigen-mediated apoptosis in human fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2047:2055

8 汪爱莲, 李懿萍, 苏宁, 邓红. 线粒体和凋亡. 国外医学临床生物化学与检验学分册 2000;21:27-30

9 陈绪军, 艾中立, 刘志苏, 肖琦. 肝细胞损伤、细胞凋亡及肝细胞保护. 国外医学外科学分册 2000;27:21-25

10 周卫平, 张定凤. 肝细胞凋亡在暴发性肝炎发病中的作用. 重庆医科大学学报 1996;21:1996-1999

11 何志巍, 姚开泰. Caspases 与细胞凋亡研究进展. 国外医学生理、病理科学与临床分册 1999;19:15-19

12 郑昕, 杨东亮, 郝连杰. 肝细胞凋亡机制及调控因素的研究进展, 国外医学・生理、病理科学与临床分册 2000;1:22-25

13 王玉梅, 冯国和, 黄芬, 李颖, 赵桂珍. 肿瘤坏死因子 -α 及 caspase-3 表达与暴发性肝衰竭细胞凋亡. 中华内科杂志 2003;8:566-569

14 陈乃玲, 邓涛, 白玲, 张昶, 陈佩兰, 李琳, 陈旻. 慢性肝病肝组织凋亡蛋白 TNF-α TNFR、Bcl-2 家族表达的研究. 临床肝胆病杂志 2002;18:342-344

15 甘建和, 江敏华, 赵卫峰, 徐杰, 罗二平. 重型肝炎患者血清 TNF-α 的变化及临床意义. 中国血液流变学杂志 2001;11:299-301

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004 年版编委会，依据文献计量学的原理和方法，经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析，并通过学科专家评审，世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊，编入《中文核心期刊要目总览》2004年版(第四版). 本版核心期刊研究，被列为“2001 年国家社会科学基金项目”. 该书定于 2004 年 7 月由北京大学出版社出版.

该书已于 1992，1996，2000 年出版过三版，在社会引起了较大反响、图书情报界、学术界、 出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高平价，普遍认为他适应社会需要，为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据，促进了中文期刊编辑和出版质量的提高，已成为具有一定权威性的参考工具书. 为了及时反映中文期刊发展变化的新情况，《中文核心期刊要目总览》2004 年版编委会，开展了新一版核心期刊的研究工作，课题组认真总结了前三版的研究经验，对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究，在此基础上，进一步改进评价方法，使之更加科学合理，力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况. 本版核心期刊定量评价，采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标，选作评价指标统计源的数据库达 51 种，统计文献量达到 943 万余篇次(1999-2001 年)，涉及期刊 1 万 2 千种. 本版还加大了专家评审力度，1873 位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审，从我国正在出版的中文期刊中评选出 1800 种核心期刊，分属七大编 75 个学科类目. 该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成，不仅可以查询学科核心期刊，还可以检索正在出版的学科专业期刊，是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书.

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编，北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编，北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学书报资料中心等相关单位的百余名专家和期刊工作参加了研究.(世界胃肠病学杂志 2004-05-05)

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):330-335
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

温阳中药复方肝之福对大鼠肝纤维化形成的影响

王丽春, 赵连三, 唐 红, 刘 丽, 刘 聪, 张红英, 尧 凡

王丽春, 赵连三, 唐红, 刘丽, 刘聪, 四川大学华西医院感染性疾病中心, 人类疾病生物治疗教育部重点实验室 四川省成都市 610041
张红英, 四川大学华西医院病理科 四川省成都市 610041
尧凡, 四川大学华西医院中药制剂室 四川省成都市 610041
王丽春, 女, 1972-02-18 生, 汉族, 1994 年华西医科大学本科毕业, 1997 年北京中日友好医学研究所硕士研究生毕业, 2004年四川大学博士研究生毕业, 讲师, 主要从事肝纤维化的临床及实验研究, 发表论文 30 余篇.
四川省卫生厅科研基金资助项目, No.F0196
项目负责人: 王丽春, 610041, 四川省外南国学巷 37 号, 四川大学华西医院感染性疾病中心. mindywang0218@163.com
电话: 028-85422641 传真: 028-85422635
收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-12-08

Effect of Chinese drug compound *Ganzhifu* on liver fibrosis in rats

Li-Chun Wang, Lian-San Zhao, Hong Tang, Li Liu, Cong Liu, Hong-Ying Zhang, Fan Yao

Li-Chun Wang, Lian-San Zhao, Hong Tang, Li Liu, Cong Liu, Department of Infectious Diseases, , Key Laboratory of Biotherapy of Human Diseases, Ministry of Education, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Hong-Ying Zhang, Department of Pathology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Fan Yao, Department of Traditional Chinese Pharmaceutics, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by Research Projects of Sichuan Province, No.F0196
Correspondence to: Dr.Li-Chun Wang, Department of Infectious Disease of West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. mindywang0218@163.com
Received: 2004-11-23 Accepted: 2004-12-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of compound *Ganzhifu* on experimental hepatic fibrosis and its possible mechanism.

METHODS: Forty-five Wistar rats were randomly divided into four groups: normal (N) group, *Ganzhifu* (G) group, colchicine (C) group and model (M) group.All the rats, except those in N group, were given CCl_4 by subcutaneous injection and alcohol (10%) by oral administration to establish the model of hepatic fibrosis. At the same time, the rats in G, C or M group were treated through stomach irrigation with *Ganzhifu*, colchicine or saline, respectively. Blood was collected for the examination of liver function and serum fibrosis markers. Hydroxyproline (Hyp), malondial dehyde (MDA) content, and superoxide disumutase (SOD) activity were determined in liver tissues. HE, Masson and Gorden-Sweet staining were used to examine the pathological changes in liver tissue sections. Inflammation and fibrosis were evaluated by semi-quantitative scoring system (SSS). In addition, The expression of typeI, III, IV collagens was detected by immunohistochemistry.

RESULTS: Compared with that in M group, liver function was improved remarkably in G group, and there were significant decreases in the liver fibrosis markers (Hyp: 1.52±0.35 mg/g *vs* 1.12±0.29 mg/g, $P<0.05$; MDA: 16.3±6.0 μmol/g *vs* 8.8±2.1 μmol/g, $P<0.01$). However, the SOD activity was notably elevated (86.33±17.74 nkat/g *vs* 122.01±19.12 nkat/g, $P<0.01$).Less inflammation, lower degree of fibrosis and reduced content of typeI, III, IV collagens were observed in G group than in M group. No significant difference was found between the effects of *Ganzhifu* and colchicines against fibrosis.

CONCLUSION: *Ganzhifu* can protect liver from fibrosis and the mechanism may be related to its anti-oxidative effect.

Key Words: Compound *Ganzhifu*; Hepatic fibrosis; Immunohistochemistry; Inflammation; Semi-quantative scoring system

Wang LC, Zhao LS, Tang H, Liu L, Liu C, Zhang HY, Yao F. Effect of Chinese drug compound *Ganzhifu* on liver fibrosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):330-335

摘要

目的: 观察温阳中药复方肝之福在实验性肝纤维化形成过程中的防治作用，并探讨其疗效机制.

方法: Wistar 大鼠 45 只随机分为 4 组:正常对照组、肝之福组、秋水仙碱组及模型对照组.除正常组外，其余 3 组均采用 CCl_4 SC 及饮用 100 mL/L 乙醇的方法制备大鼠肝纤维化模型.在造模的同时，肝之福组予肝之福灌胃，秋水仙碱组予秋水仙碱灌胃，模型对照组则予等量生理盐水灌胃，1 次 /d，共 30 d.实验结束后分别采血测定肝功能、肝纤维化指标，取肝组织测定羟脯氨酸(Hyp)含量、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性，并根据炎症活动度及纤维化半定量计分系统(SSS)评分，以观察预防用药组与模型对照组的组织学变化，同时对肝组织内Ⅰ、Ⅲ、Ⅳ型胶原进行染色并定量分析.

结果: 与模型对照组相比，肝之福组的肝功能明显改善，肝纤维化指标显著降低，Hyp 含量由 1.52 ± 0.35 mg/g 减少到 1.12 ± 0.29 mg/g($P<0.05$)，MDA 含量由 16.3 ±

6.0 μmol/g减少到8.8 ± 2.1 μmol/g(P<0.01)，而SOD活性则由86.33 ± 17.74 nkat/g升高至122.01 ± 19.12 nkat/g (P<0.01);同时，SSS评分炎症活动度及肝纤维化程度明显改善，肝组织内Ⅰ型、Ⅲ型、Ⅳ型胶原含量下降.经比较，肝之福抗肝纤维化的上述疗效与秋水仙碱相当.

结论: 肝之福可保护肝脏，预防或缓解肝纤维化的形成，抗脂质过氧化是其可能的作用机制.

关键词: **复方肝之福; 肝纤维化; 免疫组化; 炎症; 定量计分系统**

王丽春, 赵连三, 唐红, 刘丽, 刘聪, 张红英, 尧凡. 温阳中药复方肝之福对大鼠肝纤维化形成的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3):330-335
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/330.asp

0 引言

肝纤维化存在可逆性[1]，早期采取干预措施阻断肝纤维化的发展，对预防肝硬化的形成具有重要意义. 中药复方肝之福可改善肝脏微循环，增加肝脏及肠系膜静脉血流量，减低肝脏纤维化程度[2]. 其方义为温肾祛寒，健脾利水，有别于目前常用的活血化瘀类中药复方. 我们利用大鼠肝纤维化模型作为实验动物，探讨了肝之福对阻断肝纤维化形成过程的影响及其可能的作用机制.

1 材料和方法

1.1 *材料* 肝之福复方制剂(含干姜、桂枝、制附子、黄芪、柴胡、枳壳、白芍、甘草)系由我院中药制剂室煎制浓缩而成的混悬液，每毫升含生药量0.366 g. 秋水仙碱浓度为17 mg/L(云南西双版纳制药厂产). Beckman Dur 530分光光度计，Nikon TE2000-U倒置生物显微镜，FJ 630-Gγ免疫计数器. 健康Wistar大鼠共45只，体质量180-220 g，雌雄各半，购自四川大学华西医学实验动物中心. 随机分为4组:模型对照组12只，肝之福组12只，秋水仙碱组12只及正常对照组9只. 上述前3组动物SC 400 mL/L CCl_4(用前用橄榄油临时配制)，首次剂量为5 mL/kg，以后为3 mL/Kg;2次/wk，共14次;同时，以100 mL/L乙醇代替常水供动物饮用. 正常对照组则SC等量橄榄油，正常饮水. 在造模的同时，肝之福组灌喂肝之福液3 mL(含生药量1.1 g)，1次/d，至造模结束，共30 d. 秋水仙碱组则同法灌喂秋水仙碱液3 mL(含秋水仙碱0.05 mg). 模型对照组则同法予等量生理盐水灌喂.

1.2 *方法* 上述造模及处理过程结束日，禁食12 h后称质量，股静脉取血，分离血清置-20℃保存;并立刻完整摘取肝脏及脾脏，称质量后用生理盐水漂洗肝左叶数次，滤纸拭干后，切取0.2 g置于冰浴中的组织匀浆器内，加入冰生理盐水2 mL，制备成100 g/L肝组织匀浆，4 000 r/min 4℃离心，取上清液保存于-20℃. 肝右叶置于40 g/L中性甲醛液中常规固定后，石蜡包埋，用于制作组织芯片，测定血清肝功能包括TB(总胆红素)、ALT、ALB、A/G，检测HA(透明质酸)，PC Ⅲ(Ⅲ型前胶原)，C Ⅳ(Ⅳ型胶原)，LN(层粘蛋白)含量(放射免疫分析法，试剂盒购自上海海军医学研究所);肝匀浆检测SOD(超氧化物歧化酶)活性(黄嘌呤氧化酶法)、MDA(丙二醛)含量(硫代巴比妥酸法)、Hyp(羟脯氨酸)含量(二甲氨基苯甲醛法). 以上检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所，均按试剂盒说明书操作. 组织芯片分别行常规HE染色，Masson三色染色(染胶原纤维)及网织纤维染色，由病理专业医师读片，光镜下观察，并根据我国学者王泰龄 *et al* 改进的肝纤维化半定量评分系统(SSS)进行炎症活动度及肝纤维化程度计分. 采用SABC法免疫组织化学染色，DAB显色，镜下观察肝组织内Ⅰ，Ⅲ，Ⅳ型胶原的表达，并采用下列方法进行定量分析:每个组织标本随机选取10个视野，使用美国Image-Pro Plus专业图像分析软件，测定每视野阳性染色面积占整个视野面积的百分比，取其均值.

统计学处理 实验结果数据以mean ± SD表示，经SPSS软件包11.12版本进行方差分析.

2 结果

正常组9只大鼠均活动如常，毛发有光泽，饮食量及体质量均增加，肝质量/体指数为3.32 ± 0.23，脾/体指数为2.46 ± 0.78;模型组随病程进展，12只大鼠均逐渐出现活动减少，皮毛松弛蓬乱，毛色晦暗，精神萎靡，进食减少，体质量减轻等病态，至造模结束时已陆续死亡3只. 剩余9只均显示肝脾肿大，肝/体指数为5.92 ± 0.94，脾/体指数为4.34 ± 2.09，均明显高于正常对照组(P<0.05，0.01);治疗组至造模结束时，肝之福组已陆续死亡3只;其余9只的肝/体指数为5.03 ± 0.59，脾/体指数为4.15 ± 1.12;秋水仙碱组已陆续死亡2只，剩余10只的肝/体指数为5.23 ± 0.76，脾/体指数为3.51 ± 0.46. 两治疗组的肝/体指数之间无明显差异，但均明显低于模型对照组(P<0.05)，提示经肝之福组或秋水仙碱治疗后，虽然仍有肝肿大，但肿大程度较未治疗者明显减轻. 不过，脾/体指数在三组之间均无显著差异，提示脾肿大未受上述治疗的影响.

2.1 *血清肝功能和肝纤维化指标* 与正常对照组相比，模型对照组的肝功能显示显著异常(P<0.01);而肝之福或秋水仙碱治疗组肝功能则明显改善(P<0.05，0.01)，已接近正常肝功能. 上述疗效在两治疗组之间无明显差异，表明肝之福有保护肝功能的作用，其疗效与秋水仙碱相当(表1).

模型组HA，PCⅢ，CⅣ和LN均较正常对照组明显升高($P<0.01$)；而肝之福组和秋水仙碱治疗组的上述肝纤维化指标虽仍然高于正常对照组，但均明显低于模型对照组.其中HA，PCⅢ的降低具有统计学意义($P<0.05$或0.01，表2).

2.2 肝组织MDA，SOD和羟脯氨酸含量 正常组MDA(丙二醛)含量为3.2±0.5 μmol/g，SOD(超氧化物歧化酶)活性为164.6±34 nkat/g，肝之福组MDA含量(8.8±2.1 μmol/g)较正常组升高，但明显低于模型对照组(16.3±6.0 μmol/g，$P<0.01$)和秋水仙碱组(13.3±2.6 μmol/g，$P<0.01$)；而SOD活性(122.01±19.12 nkat/g)较正常组降低，但明显高于模型对照组(86.33±17.74 nkat/g，$P<0.01$)和秋水仙碱组(100.56±13.72 nkatu/g，$P<0.05$)，表明肝之福可降低肝组织内MDA含量，提高SOD活性，而秋水仙碱不具有这种作用.模型对照组Hyp含量为1.52±0.35 mg/g，明显高于正常对照组0.85±0.15mg/g($P<0.01$)；而治疗组(肝之福组1.12±0.29 mg/g，秋水仙碱组1.21±0.20 mg/g)虽仍然高于正常对照组，但均明显低于模型对照组($P<0.05$或0.01)，表明肝之福可显著减少胶原在肝脏内的沉积.

2.3 肝组织病理组织学 模型对照组肝小叶结构破坏，由广泛增生的纤维组织将原有肝小叶分割包绕成大小不等的假小叶结节.假小叶内肝细胞索排列紊乱，肝细胞肿胀，胞质疏松，可见气球样变；肝窦扩张，汇管区明显扩大，可见大量炎细胞浸润(图1A)，纤维组织明显增生并伸向小叶内，形成粗大的纤维隔分割小叶(图1B).与模型组相比，肝之福组和秋水仙碱组的肝组织病变明显减轻，肝小叶结构轻度紊乱，仅在少数区域见有不完整的假小叶形成.肝细胞脂肪变性较轻，散在点状坏死.肝窦扩张不明显，汇管区稍扩大，仅见少量炎细胞浸润，纤维组织轻度增生，部分视野可见少量细纤维隔(图2，3).炎症活动度SSS计分：肝之福组10.00±1.41，秋水仙碱组11.40±2.12，均明显低于模型对照组13.33±1.73($P<0.05$或0.01)，但两组之间无显著差异.纤维化程度计分：肝之福组

表1 大鼠血清肝功能比较 (mean ± SD)

分组	n	TB(μmol/L)	ALT(nkat/L)	ALB(g/L)	A/G
正常对照	9	0.84 ± 0.09[b]	805 ± 51[b]	44.2 ± 3.3[b]	1.44 ± 0.17[b]
肝之福	10	4.26 ± 4.47[a]	2 249 ± 1 518[b]	42.5 ± 6.1[b]	1.35 ± 0.29[b]
秋水仙碱	9	2.94 ± 1.70[a]	3 372 ± 1 963[b]	42.9 ± 4.6[b]	1.44 ± 0.30[b]
模型对照	9	11.86 ± 12.34	12 289 ± 9 233	34.9 ± 5.2	0.97 ± 0.12

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* 模型对照组.

表2 大鼠血清肝纤维化四项指标比较 (mean ± SD，μg/L)

分组	n	HA	PCIII	CIV	LN
正常对照	9	184 ± 34	22 ± 5	11.7 ± 2.3	30.2 ± 5.6
肝之福	10	275 ± 48[da]	36 ± 9[db]	18.7 ± 6.0[c]	45.9 ± 14.8[c]
秋水仙碱	9	259 ± 48[da]	32 ± 7[db]	20.8 ± 9.4[c]	42.6 ± 11.6[c]
模型对照	9	336 ± 80[d]	50 ± 13[d]	24.6 ± 5.2[d]	51.4 ± 13.8[d]

[a]$P<0.05$，[b]$P<0.01$ *vs* 模型对照组；[c]$P<0.05$，[d]$P<0.01$ *vs* 正常对照组.

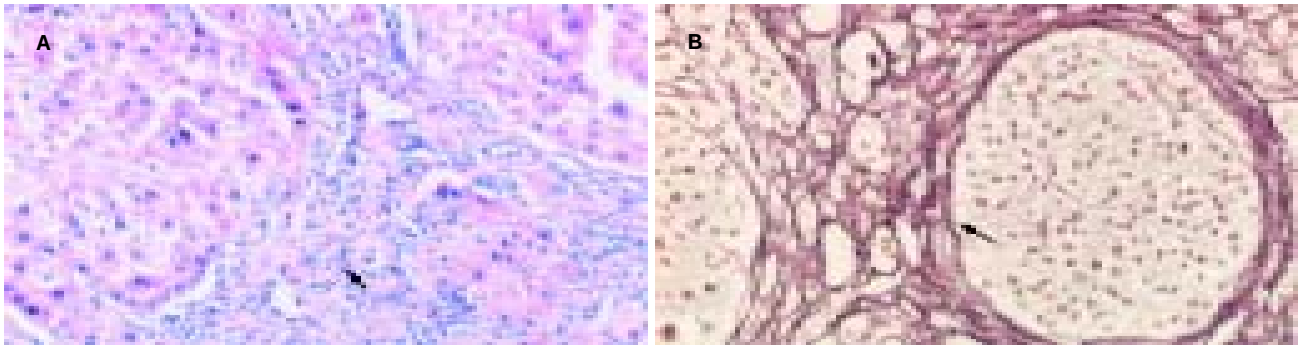


图1 模型组肝组织. A: 假小叶形成，汇管区纤维增生大量炎细胞 HE×100; B: 增生的纤维组织形成粗大的纤维隔网织 ×100.

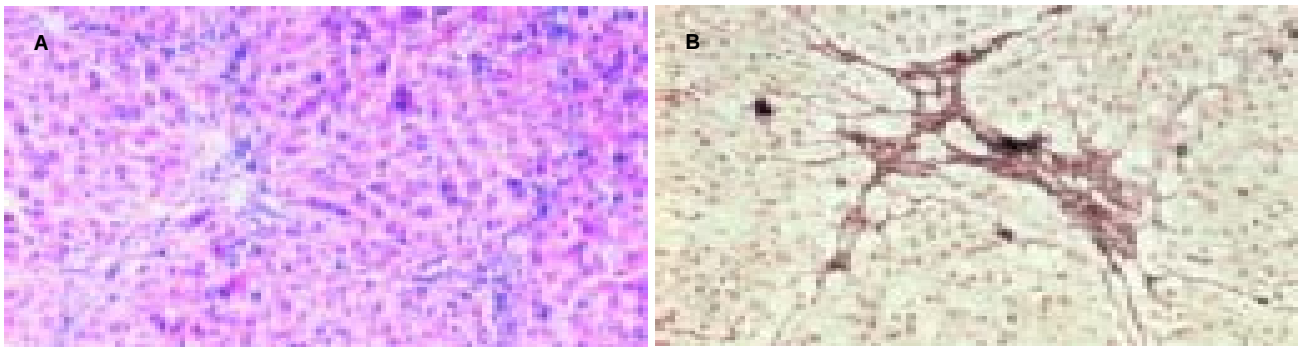


图 2 肝之福组肝组织. A: 肝小叶结构轻度紊乱，纤维组织增生形成细纤维隔 HE×100; B: 汇管区纤维组织增生形成稀疏的纤维隔网织 ×100.

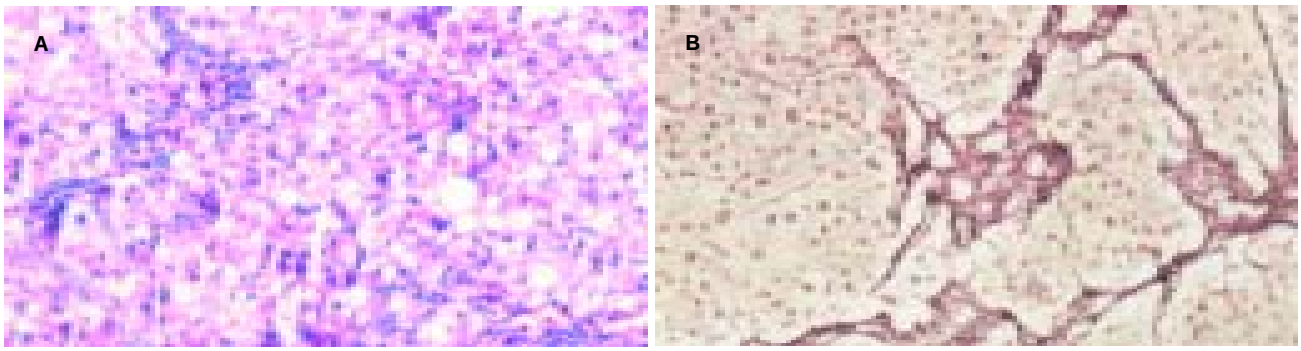


图 3 秋水仙碱组肝组织. A: 肝细胞脂肪变性，汇管区轻度扩大，少量炎细胞 HE×100. B: 肝小叶结构紊乱，假小叶形成不完整网织 ×100.

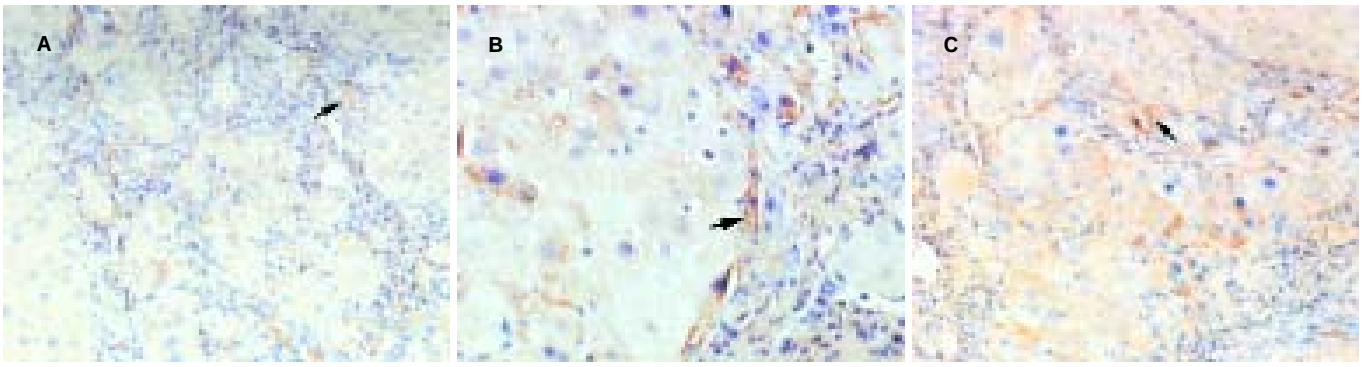


图 4 模型组. A: I 型胶原表达增强(SABC×100); B: III 型胶原阳性; C: 大量 IV 型胶原强阳性.

13.11 ± 1.27，秋水仙碱组 12.90 ± 1.73，也明显低于模型对照组 20.11 ± 2.20($P<0.01$)，两组之间仍无显著差异.

2.4 肝组织胶原变化 Ⅰ型胶原:模型对照组肝组织在假小叶中央静脉周围、汇管区、Disse间隙等部位均可见强阳性染色，棕黄色的Ⅰ型胶原呈束状粗纤维，主要位于炎症坏死区、增生的纤维间隔及肝窦周围，明显加宽分割包绕肝小叶(图4A).而在肝之福组和秋水仙碱组，虽然血管周围及汇管区、Disse间隙亦呈均匀阳性染色，但较模型对照组着色轻，且无明显纤维间隔形成(图 5A).Ⅲ型胶原:在模型对照组，可见Ⅲ型胶原由中央静脉周围向小叶周边延伸，纤维间隔内大量条索状强阳性染色，纤维堆积，大部分Disse间隙有胶原纤维沉积，呈强阳性染色(图4B).而在肝之福组和秋水仙碱组，纤维间隔均匀阳性染色，Disse间隙内阳性染色，与模型对照组比着色程度及范围均明显减弱(图 5B).Ⅳ型胶原:在模型对照组，可见大量的Ⅳ型胶原位于增生的纤维间隔内，呈束状强阳性染色，甚至连成片状，在血窦呈连续分布，在细胞外基质中有Ⅳ型胶原阳性细胞存在(图4C);而在肝之福组和秋水仙碱组，Ⅳ型胶原在基膜及血窦内呈连续分布，纤维间隔窄而且薄，着色程度较模型对照组减弱(图 5C).经 Image-Pro Plus 专业图像软件分析，模型对照组肝组织的Ⅰ，Ⅲ，Ⅳ型胶原含量均明显高于正常对照组($P<0.01$);而治疗组(肝之福组及秋水仙碱组)虽仍然明显高于正常对照组，但均明显低于模型对照组($P<0.01$)，而肝之福组与秋水仙碱组两组之间无显著性差异(表3).

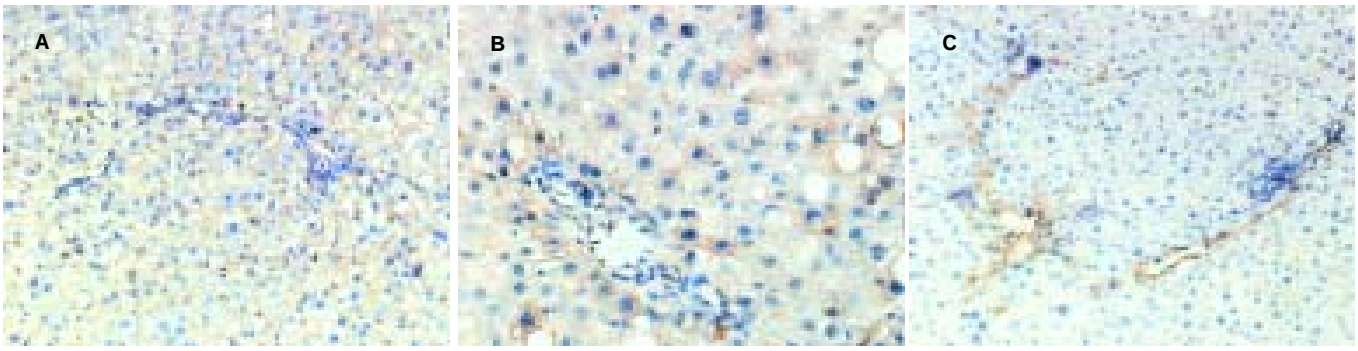


图5 肝之福组. A: I型胶原呈丝状染色浅(SABC×100); B: III型胶原部分阳性着色; C: IV型胶原成窄而细的纤维间隔.

表3 大鼠肝组织各型胶原图像分析结果比较 (mean ± SD, %)

分组	*n*	I型胶原	III型胶原	IV型胶原
正常对照	9	0.54 ± 0.14	0.24 ± 0.10	0.34 ± 0.09
肝之福	10	2.01 ± 0.64[bd]	1.10 ± 0.27[ad]	1.38 ± 0.44[bd]
秋水仙碱	9	1.80 ± 0.73[bd]	1.27 ± 0.42[ad]	1.20 ± 0.29[bd]
模型对照	9	4.65 ± 1.49[b]	3.34 ± 1.36[b]	1.96 ± 0.66[b]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs*正常对照组; [d]$P<0.01$ *vs*模型对照组.

3 讨论

在祖国医学实践中，用干姜、桂枝、制附子治疗慢性肝病已有悠久历史.肝之福就是以干姜、桂枝、制附子等温阳药物为主药，辅以保肝药物组成的复方制剂.方中附子、干姜辛热，桂枝辛甘温，通行十二经全身，附子温补肾阳，干姜温补脾胃，桂枝温经络散寒，改善局部末梢微循环;黄芪甘温补气，使气得温则行，血得气以之推动;柴胡微辛苦寒;白芍敛阴补血;枳壳苦辛微宣行气消滞;甘草调和诸药.以上各药合用共奏温阳益气、疏肝健脾之功，使肝脾气血流畅，肝组织获得充分的的营养供给，损伤的肝细胞得以修复，达到防治肝纤维化的目的，已得到临床及实验研究的证实.我们的实验结果表明，在以CCL_4进行致肝纤维化造模的同时，给予肝之福或秋水仙碱进行预防性处理，均可明显改善造模鼠的肝功能指标(降低总胆红素、谷丙转氨酶，提高血清白蛋白水平和白球比值)，减少血清中的羟脯氨酸含量.而且，病理组织学观察、SSS计分、及各型胶原的图像定量分析的结果也表明，与模型对照组相比，肝之福组的肝脏炎症坏死和肝纤维化程度亦均明显缓解，SSS计分显著下降($P<0.05$或0.01)，三种胶原的含量也明显降低($P<0.01$).上述疗效指标在肝之福组与秋水仙碱组之间无明显差异.

模型对照组中Ⅰ，Ⅲ和Ⅳ型胶原在纤维组织增生和增宽的汇管区及纤维间隔中有较强的阳性着色，甚至形成纤维细索，提示病变处于由肝纤维化向肝硬化的发展过程中;而我们观察到，肝之福组及秋水仙碱组中Ⅰ，Ⅲ和Ⅳ型胶原的阳性表达较模型组明显减弱，着色少而浅，定量分析结果显示三种胶原含量均明显低于模型组($P<0.01$).以上结果显示，肝之福在实验性肝纤维化形成过程中具有明显的保护作用，可显著减轻肝细胞的变性坏死，抑制肝脏炎症，缓解肝纤维化的形成，与对照治疗药秋水仙碱的疗效相当.但秋水仙碱是一个典型的有丝分裂毒素，对分裂旺盛的细胞作用更强;因此存在较大的毒副作用，例如，骨髓抑制、肾损害、消化系症状等.尤其是在晚期慢性肝病患者，长期服用秋水仙碱(1 mg/d)可发生明显的毒副作用.与秋水仙碱相比，肝之福不良反应很低，用于治疗肝纤维化具有显著的优点.

目前的研究认为，肝纤维化的病理改变是细胞外基质(ECM)的增生和降解失衡所致，而病理情况下细胞外基质的主要细胞来源是肝星状细胞(HSC)，他的激活和增生在肝纤维化过程中起主要作用[3-4].HSC的活化过程受许多因素调控，包括细胞因子和氧化应激，特别是脂质过氧化物，可能是HSC活化和增生的重要媒介[5-7].目前，所有临床和实验性肝纤维化都被证实与氧化应激有关[8-9].而CCl_4/乙醇致肝纤维化的主要机制就是活性氧自由基的产生及其引发的脂质过氧化，损伤肝细胞[10-11]，产生脂质过氧化物MDA等，促进HSC转化、增生和合成ECM，同时抑制ECM降解，导致肝纤维化.鉴于氧化应激和脂质过氧化是引起肝细胞损伤及HSC活化的重要机制[12]，而SOD是广泛存在于生物体内的一种金属酶，主要功能是清除体内多余的氧自由基，因此，抑制脂质过氧化则

是抗肝纤维化的重要环节. 我们发现与模型组相比，预防性使用肝之福可明显降低肝组织中的 MDA 含量($P<0.01$)，提高 SOD 活性($P<0.05$)，而秋水仙碱不具有这种抗脂质过氧化作用，显示肝之福抗肝纤维化的作用机制与秋水仙碱有所不同. 组织芯片又称组织微阵列，是一种高通量、多样本的分析工具，可同时对几百甚至上千种正常、疾病或疾病发展不同阶段的组织样本进行基因及其表达产物的研究，比较传统的单组织切片，具有反应条件均一、结果参比性好的优势，有助于保障本研究结果的可靠性.

4 参考文献

1 Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Niioka M, Arai M, Maruyama K. Reversibility of hepatic fibrosis:from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery. *Keio J Med* 2001;50:58-65

2 王丽春, 雷秉钧, 李林, 赵静波. 温阳中药对实验性肝纤维化治疗作用的研究. 四川大学学报(医学版) 2004;35:532-535

3 Sakata R, Ueno T, Nakamura T, Sakamoto M, Torimura T, Sata M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhiplatelet-derived growth factor-induced proliferation human hepatic stellate cell line LI90. *J Hepatol* 2004;40:52-59

4 Isono M, Soda M, Inoue A, Akiyoshi H, Sato K. Reverse transformation of hepatic myofibroblast-like cells by TGFbetal/LAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:959-965

5 Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 2002;50:891-896

6 Pinzani M, Marra F. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:397-416

7 Liu XJ, Yang L, Mao YQ, Wang Q, Huang MH, Wang YP, Wu HB. Effects of the tyrosine protein inhibitor genistein on the proliferation, activation of cultured rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:739-745

8 Zhong Z, Froh M, Wheeler MD, Smutney O, Lehmann TG, Thurman RG. Viral gene delivery of superoxide dismutase attenuates experimental cholestasis-induced liver fibrosis in the rat. *Gen Ther* 2002;9:183-191

9 Cui YH, Wang XL, Liu Q, Liu P. Influences of anti-oxidation of salvianolic acid B on proliferation of rat cultured hepatic stellete cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:317-319

10 Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M, Chagoya de Sanchez V. Possible role of all redox state on collagen metabolism in carbon tetrachloride-induced cirrhosis as evidenced by adenosine administration to rats. *Biochem Biophys Acta* 1994;1200:93-99

11 Liu SL, Degli Esposti S, Yao T, Diehl AM, Zern MA. Vitamin E therapy of acute CCl_4-induced hepatic injury in mice is associated with inhibition of nuclear factor kappa B binding. *Hepatology* 1995;22:1474-1481

12 Svegliati Baroni G, D'Ambrosio L, Ferretti G, Casini A, Disario A, Salzano R, Ridolfi F, Saccomanno S, Jezequel AM, Benedetti A. Fibrogenic effect of oxidative stress on rat hepatic stellete cells. *Hepatology* 1998;27:720-726

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 2005 年由半月刊改为周刊

本刊讯 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展，以及日益增多的国际科技交流的需要，从 2005 年开始，*World Journal of Gastroenterology*(WJG)由半月刊改为周刊出版. 每月 7，14，21，28 日出版，50 元 / 期，全年 48 期，邮发代号 82-261，北京报刊发行局发行. 2002-10-11 获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金. 2003-01 获得第二届国家期刊奖百种重点期刊. 2003-01-15 由月刊改为半月刊. 2003-04-15 WJG(http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp)(http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp)全文电子版免费开通，截至 2004-06-15 点击次数 为 1816277. 2003-04-15 世界胃肠病学杂志社稿件处理系统开发成功，并开始使用.作者通过用户名和密码在网上查找到稿件的全部处理记录. 2004-05-06 自然出版集团出版的《*Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*》收录 WJG. 经过多项学术指标综合评定及同行多位专家评审推荐，WJG 被收录为国家科技部中国科技论文统计源期刊和中国科技核心期刊，时间为 2004-03/2006-03. 1998-01-15 / 2004-03-01 ISI SCI 收录期刊 389 种引用 WJG 出版的论文 687 篇分布 39 个国家. 引用 WJG 的 SCI 高影响因子期刊包括自然医学 28.740 (Nature Medicine)，细胞 27.254 (Cell)，自然神经科学综述 24.047(Nature Reviews Neuroscience)，自然细胞生物学 20.699(Nature Cell Biology)，基因与发育(Genes & Development)18.772，柳叶刀 15.397(Lancet)，自然神经科学 14.857(Nature Neuroscience)，神经元 13.846 (Neuron)，自然癌症综述 13.625(Nature Reviews Cancer)，胃肠病学 13.440(Gastroenterology)，肝脏学 9.825(Hepatology)，等国际顶级期刊. 引用 WJG 的作者分布于 687 个机构，其中包括华盛顿大学医学院(Washington Univ，Sch Med)，耶鲁大学(Yale Univ)，康奈尔大学(Cornell Univ)，明尼苏达大学(Univ Minnesota)，斯坦福大学医学中心(Stanford Univ，Ctr Med)，加州大学旧金山分院(Univ Calif San Francisco)，美国国立卫生研究院(National Institute of Health)，伦敦帝国大学等国际著名大学或研究机构. 2004-06-11 被 CAB Abstracts，CAB Global Health 收录.(世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):336-340
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

大鼠肝卵圆细胞参与肝损伤的修复过程和癌变

龚加庆, 李 雅, 方驰华

龚加庆, 李雅, 成都军区总医院全军普外中心 四川省成都市 610083
方驰华, 中国人民解放军第一军医大学珠江医院肝胆外科
广东省广州市 510282
龚加庆, 男, 1971-03-27生, 湖南常德人, 汉族, 医学硕士, 主治医师, 主要从事普外基础与临床工作.
广东省自然科学基金资助项目, No. 2001.010593
广东省重点自然科学基金资助项目, No. 2002.020097
项目负责人: 方驰华, 510282, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学肝胆外科. fangch@sohu.com
电话: 020-84360607
收稿日期: 2004-09-07 接受日期: 2004-09-24

Role of oval cells in the repair of liver injury and hepatocarcinogenesis

Jia-Qing Gong, Ya Li, Chi-Hua Fang

Jia-Qing Gong, Ya Li, Center of General Surgery, General Hospital of Chengdu Command of Chinese PLA, Chengdu, 610083, China
Chi-Hua Fang, Depautment of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Procince, China
Supported by Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 2001.010593;and the Key Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 2002.020097
Correspondence to: Chi-Hua Fang, Depautment of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Procince, China. fangch@sohu.com
Received: 2004-09-07 Accepted: 2004-09-24

Abstract

AIM: To explore the role of oval cells in progressing hepatic injury and repair as well as hepatocarcinogenesis.

METHODS: SD rats were randomly divided into normal group(n = 20)and test group(n = 40). Hepatocarcinoma model was established by feeding the rats with 3, 3-diaminobenzidine(DAB). Pathological changes in the liver were examined under light microscope. The expression of c-kit and proliferating cell nuclear antigen(PCNA)were determined by immunohistochemistry.

RESULTS: In the normal group, smooth surface and normal histology of the liver were observed, and little expression of c-kit and PCNA was detected. In the test group, oval cells with positive expression of c-kit and PCNA were first observed in the portal area two weeks after liver injury. The oval cells proliferated along with the bile duct epithelia. With the progress of hepatic injury, the oval cells extended into the centrilobular regions, and the liver cells gradually deflated and disappeared. When hepatocarcinoma occurred, a great number of oval cells were found inside and outside the cancer nodule.

CONCLUSION: The oval cells play a leading role in the progressing hepatic injury and repair, and in the process of hepatocarcinogenesis.

Key Words: Oval cells;c-kit;PCNA;Hepatic injury

Gong JQ, Li Y, Fang CH. Role of oval cells in the repair of liver injury and hepatocarcinogenesis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):336-340

摘要

目的: 探索卵圆细胞在参与实验性肝损伤修复过程中的作用和地位.

方法: 清洁型 SD 大鼠随机分为正常组 20 只和实验组 40 只，各组于肝癌造模后的不同时段取肝组织标本进行常规病理和 C-kit，PCNA 免疫组化检测.

结果: 正常组大鼠肝脏表面光滑，组织学形态正常，偶见C-kit和PCNA阳性细胞.实验组于肝脏染毒2 wk，首先于汇管区发现卵圆细胞沿胆管上皮依次排列增生，这些卵圆细胞呈 C-kit 和 PCNA 阳性表达.随着染毒加重，大量卵圆细胞以汇管区为中心向肝小叶穿插生长，正常肝细胞逐渐固缩、消亡.肝癌形成时，癌结节内外均见有卵圆细胞聚集.

结论: 卵圆细胞在肝损伤修复中发挥主导作用;与肝癌的发生密切相关.

关键词: 卵圆细胞; C-kit; 增生细胞核抗原; 肝损伤

龚加庆, 李雅, 方驰华. 大鼠肝卵圆细胞参与肝损伤的修复过程和癌变. 世界华人消化杂志 2005;13(3):336-340
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/336.asp

0 引言

肝细胞损伤修复是一个复杂的、有机的、协调的过程，目前有观点认为肝卵圆细胞在肝损伤时可向肝细胞和胆管上皮细胞分化，被称为肝干细胞，卵圆细胞在参与肝损伤修复过程中的作用和地位到底怎样？目前存在很大争论;在肝细胞进行性受损过程中，肝损伤的异常修复意味着可能癌变，卵圆细胞是否也参与了原发性肝细胞癌(HCC)的形成？这一问题还不清

楚;卵圆细胞的起源怎样？这一问题也存在较大的争议. 本实验行大鼠肝癌造模，研究卵圆细胞的肝内起源、在肝损伤过程中的作用及其与肝癌的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁型SD大鼠60只，雌雄不限，体质量120±20 g，为中山医科大学动物实验中心提供. 3’-甲基-4-二甲基氨偶氮苯(3，3-diaminobenzidine DAB)，上海化工厂产品;PCNA免疫组化试剂盒(SP法)，北京宝洁公司提供. C-kit多克隆抗体，Sigma公司提供. 即用型免疫组化试剂盒(SABC法)，武汉博士德公司提供.

1.2 方法 随机分正常组20只和实验组40只，正常组大鼠常规喂饲和饮水;实验组大鼠喂饲0.6 g/L的DAB饲料，常规饮水. 两组大鼠于肝癌造模后2，4，6，8，10，12，14，16，20，24 wk分别随机活杀2只和4只. 开腹取右肝叶甲醛固定，左肝叶置-80℃保存. 右肝叶经固定、脱水、透明、浸蜡等过程制成蜡块. 蜡块连续切片，厚度为5 μm，分别作常规HE染色和免疫组化染色. PCNA免疫组化用SP法，C-kit免疫组化采用S-ABC法，均用DAB显色. PCNA和C-kit蛋白均呈棕黄色.

2 结果

2.1 大鼠肝脏组织形态 正常组大鼠肝脏表面光滑，质地柔软，呈褐色，光泽明显. HE染色后镜下观察，肝细胞排列呈索状，围绕中央静脉呈放射状排列，肝细胞呈多边形，边界不十分清晰，多为单核，嗜碱性，位于细胞中央，胞质微嗜酸性. 实验组大体病变早期(1-8 wk):肝脏形态基本正常，轻度增大，肝脏表面可见针尖样细小颗粒，呈局灶性，色泽没有明显变化，偶见肝脏有轻度充血及小出血点;中期(9-14 wk):肝脏肿大，呈暗褐色，肝表面出现为数不多的灰白色圆形病灶，直径多在1 mm以内，至12 wk病灶数目渐多，肝脏质地变硬，至14 wk呈典型的肝硬化表现，个别结节直径可达0.3 cm;晚期(15-24 wk):肝脏呈结节状增大，最大的肿块可延伸至盆腔，肝脏表面及切面布满了灰白色结节，最大直径可达3.0 cm，质地硬，结节间有时可见纤维隔，个别大结节可见黑色的出血灶.

2.2 卵圆细胞的分布特点 实验组肝组织炎性变期(1-8 wk):肝小叶结构基本完整，肝细胞水肿样变性、气球样变性逐渐加重，细胞核增大(图1). 炎性变后期，肝细胞呈明显气球样变，部分肝细胞核固缩甚至消失(图2). 肝细胞索排列较整齐，肝实质内可见散在坏死灶和炎性细胞浸润;肝窦充血明显，汇管区有大量淋巴细胞浸润;诱癌2 wk，于汇管区首先可见卵圆细胞沿胆管上皮依次排列增生，并逐渐向上皮周围游离生长(图1)，随着时间的推移，卵圆细胞逐渐增多，破坏附近肝板，呈溪流样向肝实质内穿梭漂移(图2). 肝组织增生纤维化期(9-14 wk):光镜下可见有大量形态不一、细胞排列不齐、肝实质内纤维组织增生的假小叶形成;有些结节细胞排列紊乱，细胞大小不一，核深染，失去正常肝组织结构，呈非典型增生改变，偶见核分裂相;汇管区有大量卵圆细胞增生，或呈河带样，或呈溪流样横七竖八、纵横交错的向肝实质内穿插，肝细胞呈逐渐固缩、消亡趋势，残存的肝细胞零星夹杂在增生的卵圆细胞之间(图3). 癌变期(15-24 wk):以混合细胞癌多见，癌细胞核大小不等，核分裂相常见;癌细胞向肝组织周围浸润，并有灶内出血，灶内坏死明显;癌结节外可见有较多

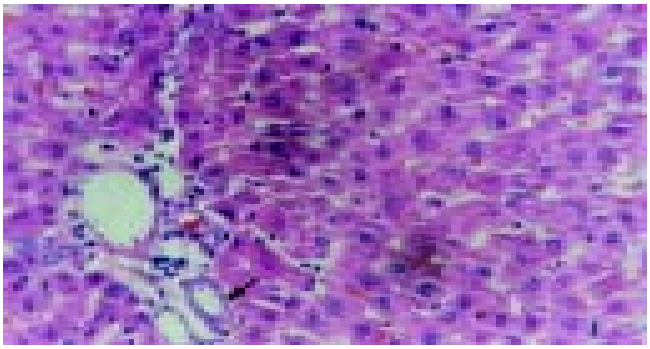


图1 诱癌第2 wk，肝细胞呈轻度水肿样变性，卵圆细胞沿汇管区胆管上皮依次排列增生(HE×200).

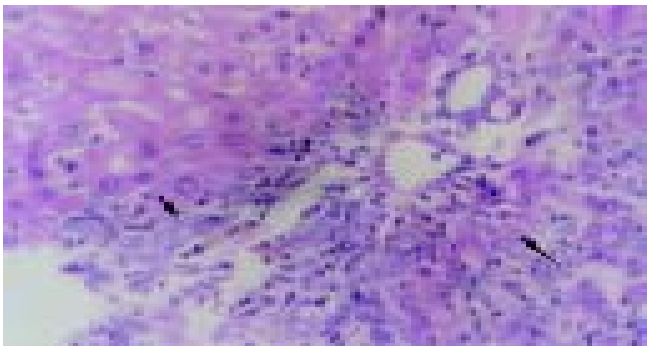


图2 诱癌第8 wk，肝细胞呈明显气球样变，汇管区卵圆细胞大量增生(HE×200).

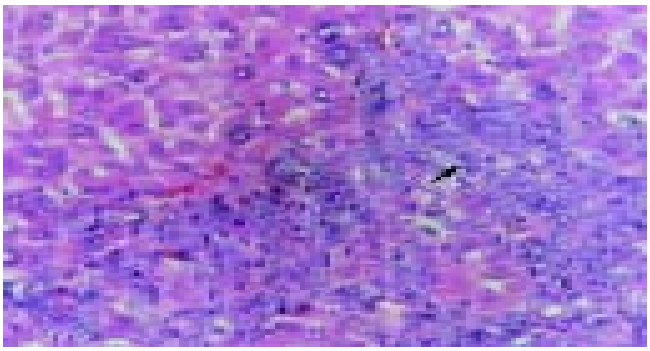


图3 诱癌第12 wk，大量卵圆细胞向肝实质内穿插生长(HE×200).

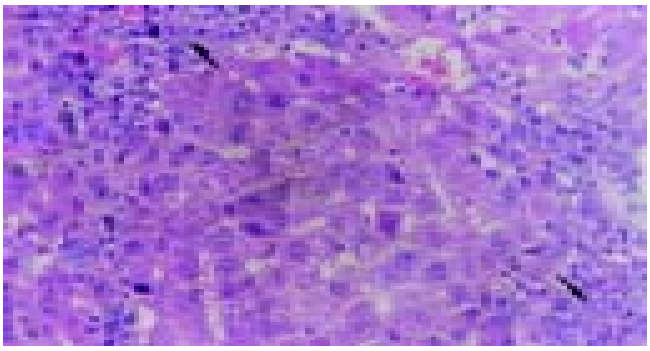


图4 诱癌第20 wk，癌结节形成，结节外聚集大量卵圆细胞(HE×200).

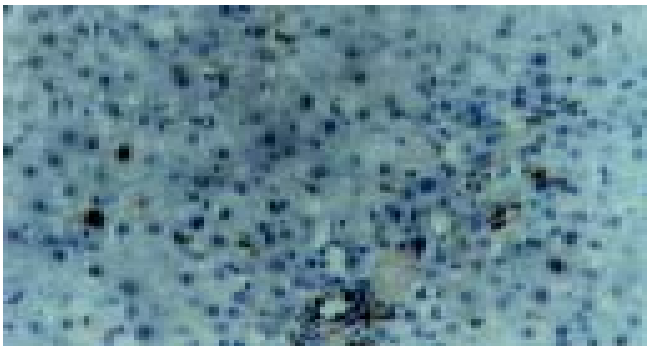


图5 诱癌第2 wk，C-kit阳性表达的卵圆细胞沿汇管区胆管上皮横断面环状排列增生(SABC×200).

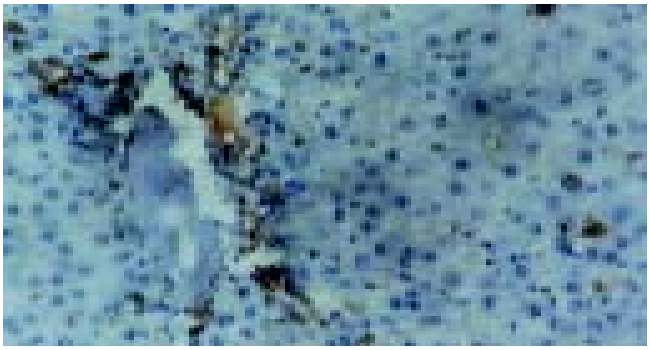


图6 诱癌第8 wk，汇管区大量卵圆细胞呈C-kit阳性表达，并向肝小叶内穿插生长(SABC×200).

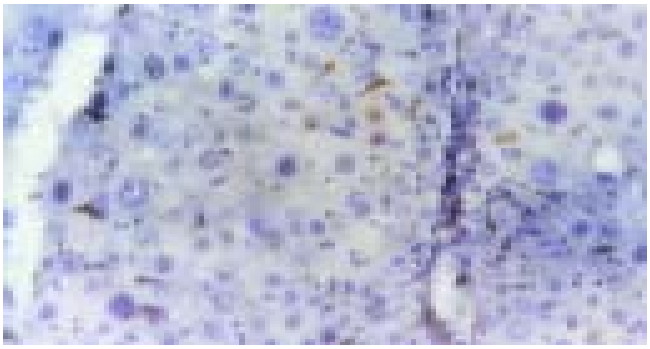


图7 诱癌第22 wk，肝癌组织的c-kit表达(SABC×200).

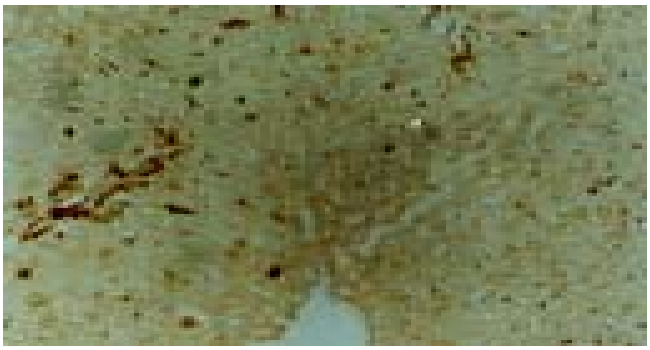


图8 诱癌第2 wk，呈PCNA阳性表达细胞的卵圆细胞沿汇管区胆管上皮排列增生(SP×200).

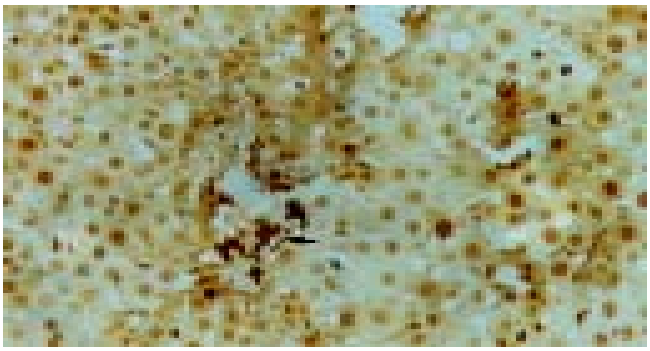


图9 诱癌第8 wk，肝细胞普遍呈PCNA阳性表达，汇管区卵圆细胞呈PCNA过阳性表达(SP×200).

卵圆细胞聚集，癌结节内也可见卵圆细胞出现(图4).

2.3 C-kit阳性细胞的分布 C-kit阳性着色定位于细胞质，呈均匀弥漫性棕黄色，正常组肝细胞偶见阳性染色，通常为正处于分裂增生期的肝细胞，汇管区未见有阳性着色.实验组染毒2 wk开始，汇管区卵圆细胞首先呈c-kit阳性着色，镜下可见部分阳性细胞沿胆管上皮横断面呈环状排列(图5).染毒的8 wk，汇管区C-kit阳性细胞连成片状，并向肝小叶内穿插生长(图6).增生纤维化期，肝组织的正常结构已被大量的假小叶取代，此期c-kit阳性细胞仍呈大量表达，以汇管区明显.染毒22 wk，癌结节大量形成，镜下可见细胞核异形性相当明显，阳性细胞较前有所减少，仍主要集中在汇管区，癌结节内也可见散在的阳性细胞(图7).

2.4 PCNA阳性细胞的分布 PCNA阳性着色定位于细胞核，呈颗粒状或弥漫性，部分为细胞质着色.在正常肝组织内偶见阳性染色细胞，多位于肝小叶内.染毒2 wk，实验组汇管区的卵圆细胞首先呈PCNA阳性染色，这些阳性细胞多沿胆管上皮依次排列生长(图8).随着肝损伤加重，小叶内大量的肝细胞也呈阳性表达，但仍以汇管区卵圆细胞阳性着色为重(图9).增生纤维化期，部分肝纤维呈轻度阳性淡染，沿肝纤维生长呈过阳性表达的细胞类似卵圆细胞(图10).肝癌形成期，部分癌结节PCNA呈过度阳性表达，结节内癌细胞的阳性强度存在较大的异质性，癌旁PCNA阳性细胞的异质性不如癌细胞明显，癌旁PCNA阳性细胞明显少于癌组织且分布散在，以近癌旁组织相对较多.

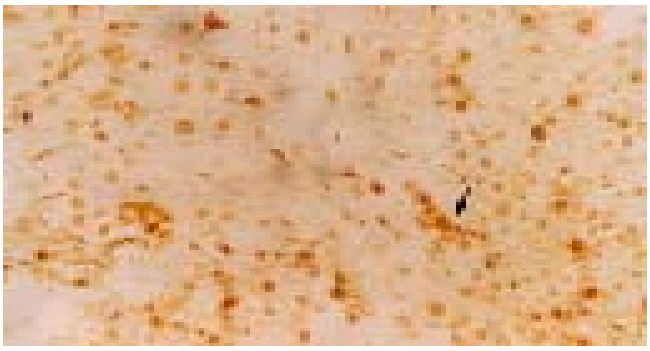


图10 诱癌第12 wk，部分肝纤维呈轻度PCNA阳性淡染，沿肝纤维生长的部分细胞呈过阳性表达，其形态类似卵圆细胞(SP×200).

3 讨论

卵圆细胞呈圆形或卵圆形，胞质少，嗜碱性，核圆形或卵圆形，着色淡，核膜及核仁均清晰，在肝细胞严重受损或分裂增生受抑制时可向肝细胞和胆管上皮细胞分化[1-9]，所以卵圆细胞是一种具有双向分化潜能的祖细胞，我们习惯称之为肝干细胞. 在肝细胞正常衰亡时，通常认为由正常肝细胞通过再生方式来填补消亡细胞的空白[10-13]，而在本实验中，我们发现肝卵圆细胞不仅是肝组织内对进行性受损反应最敏感的一种细胞，也是参与肝损伤修复的主导细胞. 证据:(1)我们发现在炎性变早期，肝细胞呈轻度的水肿样变性时，卵圆细胞沿汇管区胆管上皮增生，随着肝损伤进行性加重，汇管区卵圆细胞逐渐增多，并以汇管区为中心向肝实质内穿插生长，破坏临近肝板，以增生纤维化期最为明显;(2)C-kit作为一种干细胞的特异性表面抗原[14-18]，我们应用他对卵圆细胞进行定位. 炎性变早期，我们发现 C-kit阳性着色首先表达于汇管区的卵圆细胞，这些阳性细胞沿胆管上皮呈依次排列生长，随着肝损伤进行性加重，C-kit阳性细胞向肝小叶内穿插，癌变期，C-kit阳性表达仍以汇管区为主，这表明汇管区从肝损伤初期到癌变期一直在源源不断的向外输送卵圆细胞;(3)PCNA作为细胞增生指标，其合成明显与细胞周期相关[19-23]. 我们发现PCNA阳性染色也首先表达于汇管区卵圆细胞，这些阳性细胞多沿胆管上皮生长，而小叶内肝细胞呈现迟发性PCNA阳性表达.

我们发现在致癌因素存在的情况下，肝癌的形成与卵圆细胞异常分化密切相关. 卵圆细胞为肝组织内对损伤反应最敏感的一种细胞，他的出现贯穿于肝癌发生、发展全过程，癌结节内外也可见大量卵圆细胞聚集，可见卵圆细胞对肝癌的发生、发展起到重要作用;C-kit和PCNA免疫组化证实卵圆细胞为一个增生活跃的幼稚细胞群体，在其分化成熟过程中，如果致癌因素存在的情况下，其基因完全有可能发生突变，向癌细胞转化;卵圆细胞可向肝细胞和胆管上皮细胞分化，从理论上说，卵圆细胞如果可向癌细胞转变，其癌细胞类型应以混合型多见，这与我们的肝癌形成期的病理检查结果相符.

成体肝组织内存在干细胞已是不争的事实，但干细胞究竟来源于何处？一直以来仍无定论. 我们发现，汇管区胆管上皮为卵圆细胞的肝内发源地. 病理观察发现，卵圆细胞首先出现于汇管区的胆管上皮层，随着肝脏染毒的加重，卵圆细胞以汇管区为中心向肝实质内穿插生长;C-kit和PCNA免疫组化发现，这些阳性细胞最初均沿汇管区胆管上皮依次排列生长，随着染毒的加重，阳性细胞向肝小叶内穿插. 严格的说，卵圆细胞仅只是肝内的一种祖细胞，我们的研究证实卵圆细胞起源于汇管区胆管上皮，有关这一点，我们在以前的文献中也作过表述[24-25]真正的卵圆细的前体—肝干细胞究竟起源于何处，许多作者进行了有益的探索，但仍存在很大的争论[26-29].

4 参考文献

1 Weiss MC, Strick-Marchand H. Isolation and characterization of mouse hepatic stem cells in vitro. *Semin Liver Dis* 2003;23:313-324

2 Alison MR. Characterization of the differentiation capacity of rat-derived hepatic stem cells. *Semin Liver Dis* 2003;23:325-336

3 Zheng YW, Taniguchi H. Diversity of hepatic stem cells in the fetal and adult liver. *Semin Liver Dis* 2003;23:337-348

4 Grompe M. The role of bone marrow stem cells in liver regeneration. *Semin Liver Dis* 2003;23:363-372

5 Strain AJ, Crosby HA, Nijjar S, Kelly DA, Hubscher SG. Human liver-derived stem cells. *Semin Liver Dis* 2003;23:373-384

6 Lemmer ER, Vessey CJ, Gelderblom WC, Shephard EG, Van Schalkwyk DJ, Van Wijk RA, Marasas WF, Kirsch RE, Hall Pde L. Fumonisin B1-induced hepatocellular and cholangiocellular tumors in male Fischer344 rats:potentiating effects of 2-acetylaminofluorene on oval cellproliferation and neoplastic development in a discontinued feeding study. *Carcinogenesis* 2004;25:1257-1264

7 Hisatomi Y, Okumura K, Nakamura K, Matsumoto S, Satoh A, Nagano K, Yamamoto T, Endo F. Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology* 2004;39:667-675

8 He ZP, Tan WQ, Tang YF, Zhang HJ, Feng MF. Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers. *Cell Prolif* 2004;37:177-187

9 Matthews VB, Klinken E, Yeoh GC. Direct effects of interleukin-6 on liver progenitor oval cells in culture. *Wound Repair Regen* 2004;12:650-656

10 Caldwell SH, Crespo DM, Kang HS, Al-Osaimi AM. Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127:S97-103

11 Oberholzer C, Oberholzer A, Tschoeke SK, Minter RM, Bahjat FR, LaFace D, Hutchins B, Moldawer LL. Influence of recombinant adenovirus on liver injury in endotoxicosis and its modulation by IL-10 expression. *J Endotoxin Res* 2004;10:393-401

12 Al-Mulhim AS, Mohammad HA. Non-operative management of blunt hepatic injury in multiply injured adult patients. *Surgeon* 2003;1:81-85

13 Labori KJ, Raeder MG. Diagnostic approach to the patient with jaundice following trauma. *Scand J Surg* 2004;93:176-183

14 Suarez-Rodriguez R, Belkind-Gerson J. Cultured nestin-positive cells from postnatal mouse small bowel differentiate ex

vivo into neurons, glia, and smooth muscle. *Stem Cells* 2004; 22:1373-1385
15 Maulik G, Bharti A, Khan E, Broderick RJ, Kijima T, Salgia R. Modulation of c-Kit/SCF pathway leads to alterations in topoisomerase-I activity in small cell lung cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2004;23:237-2351
16 Miyazaki M, Masaka T, Akiyama I, Nakashima E, Sakaguchi M, Huh NH. Propagation of adult rat bone marrow-derived hepatocyte-like cells by serial passages in vitro. *Cell Transplant* 2004;13:385-391
17 Schonfeldt V, Wistuba J, Schlatt S. Notch-1, c-kit and GFRalpha-1 are developmentally regulated markers for premeiotic germ cells. *Cytogenet Genome Res* 2004;105:235-239
18 Potti A, Ganti AK, Foster H, Knox S, Hebert BJ, Tendulkar K, Sholes K, Koch M, Kargas S. Immunohistochemical detection of HER-2/neu, c-kit(CD117)and vascular endothelial growth factor(VEGF)overexpression in soft tissue sarcomas. *Anticancer Res* 2004;24:333-337
19 Zhu Z, Xing S, Cheng P, Li G, Yang Y, Zeng F, Lu G. The relationship of expression of bcl-2, p53, and proliferating cell nuclear antigen(PCNA)to cell proliferation and apoptosis in renal cell carcinoma. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2004;24:354-357
20 Corrette-Bennett SE, Borgeson C, Sommer D, Burgers PM, Lahue RS. DNA polymerase delta, RFC and PCNA are required for repair synthesis of large looped heteroduplexes in Saccharomyces cerevisiae. *Nucleic Acids Res* 2004;32:6268-6275
21 Yeung CK, Chiang SW, Chan KP, Lam DS, Pang CP. The transfer of ocular cells using collagen. *Cell Transplan* 2004;13:5885-5894
22 Shimoji Y, Sugie S, Kohno H, Tanaka T, Nanda K, Tamura Y, Nishikawa Y, Hayashi R, Uenakai K, Ohigashi H. Extract of vinegar "Kurosu" from unpolished rice inhibits the development of colonic aberrant crypt foci induced by azoxymethane. *J Exp Clin Cancer Res* 2003;22:591-597
23 Menon MM, Simha MR. Telomerase and telomere length in normal and malignant human endometrium as prognostic markers. *Indian J Pathol Microbiol* 2003;46:394-398
24 Fang CH, Gong JQ, Zhang W. Function of oval cells in hepatocellular carcinoma in rats. *World J Gastroenterol* 2004;10:2482-2487
25 Gong JQ, Fang CH, Li Y, Tian FZ. The experimental study on the oval cells participating in hepatocarcinogenesis. *Zhonghua Waike Zazhi* 2004;42:291-295
26 Thena A, Deb N, Oertel M, Grozdanov PN, Sandhu J, Shah S, Guha C, Shafritz A, Dabeva MD. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured iver. *Stem Cells* 2004;22:1049-1061
27 Masson S, Harrison DJ, Plevris JN, Newsome PN. Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology:a critical review. *Stem Cells* 2004;22:897-907
28 Ozturk MA, Guven GS, Haznedaroglu IC. How hematopoietic stem cells know and act in cardiac microenvironment for stem cell plasticity? Impact of local renin-angiotensin systems. *Med Hypotheses* 2004;63:866-874
29 Gelderblom WCA, Marasas WFO, Lebepe MS. Interaction of fumonisin B(1)and aflatoxin B(1)in a short-term carcinogenesis model in rat liver. *Toxicology* 2002;71:161-173

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 稿件来源及论文资助情况

随着我国科学研究整体水平的提高，质量较高的论文逐年增加，来自名牌大学、研究院所，特别是具有良好科学记录的实验室、课题组和科学家的论文增长幅度较大. 2003-04-01/2003-10-01 以来《*World Journal of Gastroenterology*，WJG》共收到论文618篇，其中国内论文501篇(81.06%)，国际论文117篇(18.93%). WJG 2003年1-10期共发表论文521篇，其中文献综述21篇，食管癌27篇，胃癌54篇，肝癌65篇，大肠癌39篇，病毒性肝炎46篇，幽门螺杆菌20篇，基础研究115篇，临床研究62篇，研究快报62篇，病例报告8篇，读者来信2篇. 发表国内论文450篇(86.37%)，发表国际论文71篇(13.62%). 作者共2949人，国际作者占14.41%，国内作者占85.90%. 发表论文分布34个国家和地区，包括阿根延、澳大利亚、巴基斯坦、巴西、比利时、波兰、丹麦、德国、法国、芬兰、韩国、荷兰、加拿大、克罗地亚、美国、南非、南斯拉夫、日本、瑞典、瑞士、沙特阿拉伯、泰国、土耳其、西班牙、希腊、新加坡、匈牙利、伊朗、意大利、印度、英国、中国、中国台湾、中国香港. 基金资助论文292篇(56.04%)，各项目基金论文共440篇(84.45%)，其中国际基金论文25篇(4.79%)，国家973、863、国家自然科学基金资助论文180篇(34.54%)，部、省级基金资助论文235篇(45.10%). WJG 2002年共发表论文226篇，分布为26个地区，国内论文占93.36%，国际论文占6.63%，基金论文占60.61%. WJG 2001年共发表论文173篇，分布20个地区，112个机构，国际论文占35%，基金论文占55%. WJG 2000年共发表论文205篇，基金论文占50%. WJG 1999年共发表论文144篇，分布20个地区，100个机构，国际论文占23%，基金论文占50%. WJG 1998年共发表论文183篇，11个地区分布，国际论文占9.84%，基金论文占59.56%.

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):341-345
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

红景天甙对肝纤维化大鼠肝组织 CBP、Smad 基因表达的影响

曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 王丕龙, 褚桂珍

曾维政, 蒋明德, 成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083
吴晓玲, 王丕龙, 重庆医科大学附一院消化内科 重庆市 400016
褚桂珍, 四川大学华西医学中心细胞生物学教研室 四川省成都市 610054
曾维政, 男, 1961-12-20生, 湖南邵阳人, 汉族. 主任医师, 教授, 第三军医大学研究生导师. 主要从事肝纤维化防治的基础与临床研究.
成都军区"十五"医药科研基金课题, No. 01A009
项目负责人: 曾维政, 610083, 四川省成都市天回镇, 成都军区总医院消化内科. zengweizheng@163.com
电话: 028-83577558
收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-12-08

Effect of Salidroside on gene expression of CBP and Smad in CCl_4-induced liver fibrosis in rats

Wei-Zheng Zeng, Xiao-Ling Wu, Ming-De Jiang, Pi-Long Wang, Gui-Zhen Chu

Wei-Zheng Zeng, Ming-De Jiang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China
Xiao-Ling Wu, Pi-Long Wang, First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China
Gui-Zhen Chu, West China Center of Medical Sciences, Sichuan University, Chengdu 610054, Sichuan Province, China
Supported by Medical Science Foundation of Chengdu Command in the 10th Five Year Plan, No.01A009
Correspondence to: Wei-Zheng Zeng, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. zengweizheng@163.com
Received: 2004-11-23 Accepted: 2004-12-08

Abstract

AIM: To study the effect of Salidroside on gene expression of CREB binding protein (CBP), Smad 3 and Smad 7 in rat hepatic fibrosis induced by CCl_4.

METHODS: Healthy male SD rats were randomly divided into three groups: normal group (n = 10), Salidroside therapeutic group (n = 40)and fibrosis model group (n = 40). Liver fibrosis was induced by CCl_4 subcutaneous injection (300 mL/L, 3 mL/kg, twice per wk for 8 wks). Rats in therapeutic group received Salidroside (5mg/kg)celiac injection twice a week. The deposition of collagen was examined using Masson staining. The gene expression of Smad 3, Smad 7 and CBP were detected by *in situ* hybridization and immunohistochemistry.

RESULTS: The reduction of collagen deposition and rearrangement of the parenchyma were observed in the livers of rats in the therapeutic group, in comparison with those in model group (semi-quantitative histological scores: 2.1±0.3 *vs* 3.6±0.8, P = 0.041;average area of collagen: 138±66 μm^2 *vs* 691±189 μm^2, P = 0.046). The positive rate of Smad 3 mRNA expression was significantly lower in therapeutic group than that in model group (0.18±0.03 *vs* 0.62±0.23, P = 0.026), while the positive rate of Smad 7 protein expression was markedly higher (4.27±0.43% *vs* 2.86±0.86%, P = 0.035). The OD value of CBP mRNA expression was significantly decreased in therapeutic group, as compared with that in model group (0.092±0.032 *vs* 0.235±0.025, P = 0.00012).

CONCLUSION: Salidroside can effectively reduce CCl_4-induced liver fibrosis in rats. The mechanism may be related to its inhibition of Smad 3 and CBP expression, and its promotion of Smad 7 expression.

Key Words: Salidroside;CBP gene;Smad gene;liver fibrosis

Zeng WZ, Wu XL, Jiang MD, Wang PL, Chu GZ. Effect of Salidroside on gene expression of CBP and Smad in CCl_4-induced liver fibrosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):341-345

摘要

目的: 研究红景天甙对 CCl_4 诱导的肝纤维化大鼠肝组织 CBP、Smad 基因表达的影响.

方法: SD 大鼠 90 只分为 3 组:正常对照组(C 组)、模型组(M组)和红景天甙干预组(T组).以 CCl_4 sc诱导肝纤维化，T 组在造模同时给予红景天甙溶液 ip.HE 和 Masson 染色观察肝脏胶原沉积情况，原位杂交和免疫组化检测肝组织 Smad 3，Smad 7 和 CBP 基因表达.

结果: T 组肝脏组织学积分减少(2.1±0.3 *vs* 3.6±0.8，P = 0.041)，胶原平均面积显著减少(138±66 *vs* 691±189 μm^2，P = 0.046);肝脏 Smad 7 蛋白表达阳性率增加[(4.27±0.43)% *vs* (2.86±0.86)%，P = 0.035，P<0.05];Smad 3mRNA 表达阳性率减少(0.18±0.03 *vs* 0.62±0.23，P = 0.026)，CBP mRNA 表达吸光度值亦明显减少(0.092±0.032 *vs* 0.235±0.025，P = 0.00012).

结论: 红景天甙能有效抑制 Smad 3 和 CBP 基因表达，促进 Smad 7 表达，从而干扰肝纤维化的形成.

关键词: 红景天甙;Smad 基因;CBP 基因;肝纤维化

曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 王丕龙, 褚桂珍. 红景天甙对肝纤维化大鼠肝组织 CBP、Smad 基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3):341-345
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/341.asp

0 引言

肝纤维化是多种慢性肝脏疾病发展为肝硬化的中间环节，积极地控制肝纤维化的进展具有极为重要的临床意义.寻找有效的治疗药物是目前肝病领域研究的热点[1-2].红景天具有保护肝细胞、调节机体免疫功能等多种功效，在前期的动物实验观察到其具有良好的干预CCl_4诱导的肝纤维化作用[3-5].我们观察了红景天的主要单体成分—红景天甙对CCl_4诱导的肝纤维化大鼠肝脏胶原沉积的影响，了解其对大鼠肝脏CBP，Smad3，Smad7基因表达的影响，进一步从分子水平探讨红景天甙干预实验性大鼠肝纤维化的可能分子机制.

1 材料和方法

1.1 材料 健康♂SD大鼠质量150±10 g，购自华西医科大学实验动物中心;化学纯CCl_4(成都联合化工试剂研究所)，红景天甙粉剂(纯度80%，昆明同持医药有限公司，批号2003011016)，Smads抗体及免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程公司)，CBP探针及原位杂交试剂盒(上海申能生物工程公司).

1.2 方法 健康♂SD大鼠随机分为3组:正常对照组(C组)10只，红景天甙干预组(T组)40只，模型组(M组)40只，各组间暴露因素无差别($P>0.05$).用300 mL/L CCl_4石蜡油溶液，3 mL/kg sc， 2次/wk，共8 wk诱导大鼠肝纤维化模型.红景天甙干预组在造模的同时给予100 g/L红景天甙灭菌水溶液，5 mg/kg，ip，2次/wk，共8 wk，CCl_4模型组在造模同时予生理盐水ip，正常对照组予等量石蜡油sc和生理盐水ip处理.各组动物在最后一次CCl_4注射后48 h处死，肝组织以中性甲醛溶液固定、石蜡包埋，多聚赖氨酸涂布的载玻片制作5 μm组织切片，进行HE染色和Masson胶原染色作组织病理学检查;免疫组织化学(immunohistochemistry，IH)方法检测Smad 7蛋白表达水平，原位杂交法(*in situ* hybridization，ISH)检测Smad 3，CBP mRNA表达水平，检测步骤参考试剂说明书进行.Smad 3 mRNA探针序列(5'→3'):Biotin-GAA GGC CGG CTC ACA GTA GGT GAC TGG CTG (981-1 010 bp，GC% = 63.33)，以生物素标记探针，碱性磷酸酶搭桥，BCIP/NBT显色反应;CBP mRNA探针序列(5'→3'):Dig-TGA CAG TTG TTT ATG TTT GGA CGC (371-394bp，GC% = 41.67)，以地高辛标记探针，辣根过氧化物酶搭桥，DAB显色反应，显微镜下观察结果，胶原纤维染色、Smads表达水平的ISH，IH检测结果均使用日本Nikon TE2000-H倒置显微镜采集图像，美国Image-Pro Plus专业图像分析软件进行数据采集和分析.

统计学处理 胶原面积、IH，ISH表达阳性率均以mean±SD表示，Excel 2000统计软件进行 t 检验.

2 结果

2.1 肝组织病理学改变 HE染色光镜下可见正常大鼠肝组织肝小叶结构清晰,肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列，肝纤维化大鼠肝细胞广泛脂肪变性、坏死，炎性细胞浸润以汇管区及中央静脉周围为重,肝小叶结构破坏，胶原纤维明显增生;Masson染色见蓝色胶原纤维明显增多，汇管区-中央静脉区纤维间隔宽大，包绕分隔肝小叶，部分形成假小叶，肝纤维化半定量组织学积分为3.6±0.8;红景天甙干预治疗组大鼠肝细胞变性、坏死较轻，有少量纤维组织增生，形成纤细的纤维间隔，肝小叶结构基本完整，半定量组织学积分为2.1±0.3，与模型组比较差异显著(P = 0.041，$P<0.05$,)计算机图象分析模型大鼠肝脏平均胶原面积为(691±189 μm^2)，干预组胶原面积则减少为(138±66 μm^2)，二者差异显著(P = 0.046，$P<0.01$，表1，图1A-B).

2.2 肝组织Smad 3和Smad 7表达 原位杂交检测显示，Smad 3 mRNA在正常大鼠肝脏仅有少许间质细胞显示阳性结果,为胞质细小的蓝紫色颗粒,且表达强度微弱;CCl_4 sc使大鼠肝脏Smad 3mRNA表达明显增加，间质细胞和肝细胞均有表达，计算机图像分析其表达阳性率为0.62±0.23，而红景天甙干预性治疗使大鼠肝组织Smad 3 mRNA表达阳性率下降为0.18±0.03，与模型组比较差异显著(P = 0.026，$P<0.05$).免疫组化检测表明，正常大鼠肝脏未检测出Smad 7阳性表达;模型大鼠肝脏Smad 7蛋白表达水平低下，仅在汇管区见少数间质细胞阳性显色，为胞质棕黄色的颗粒(图2A)，计算机图像分析其阳性率为2.86±0.86%;

表1 各组大鼠肝组织检测结果

分组	组织学积分	胶原面积(μm^2)	Smad 7阳性率(%)	Smad 3阳性率	CBP吸光度值
正常组	0^b	$56±21^b$	0^b	$0.06±0.02^b$	$0.016±0.004^b$
模型组	3.6±0.8	691±189	2.86±0.86	0.62±0.23	0.235±0.025
干预组	$2.1±0.3^a$	$138±66^b$	$4.27±0.43^a$	$0.18±0.03^a$	$0.092±0.032^b$

$^aP<0.05$，$^bP<0.01$ *vs* 模型组.

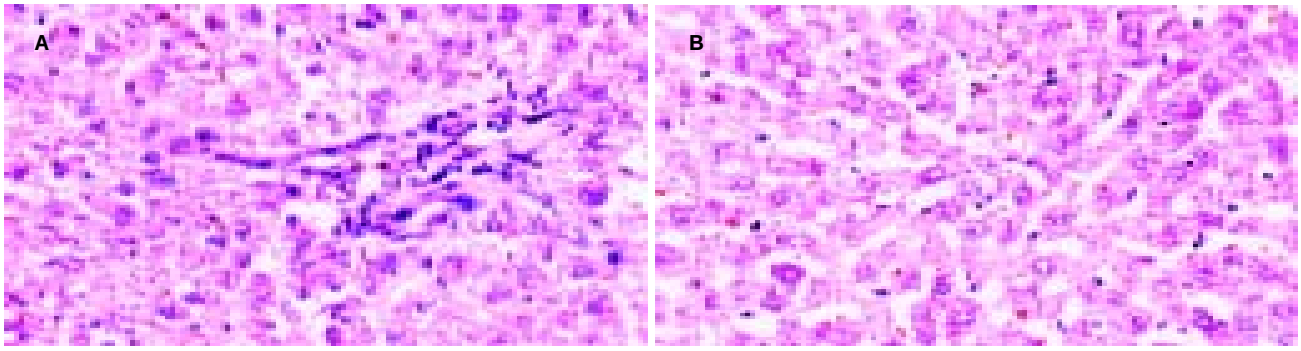


图1 肝脏 HE 染色(× 200). A: 模型组; B: 红景天甙组.

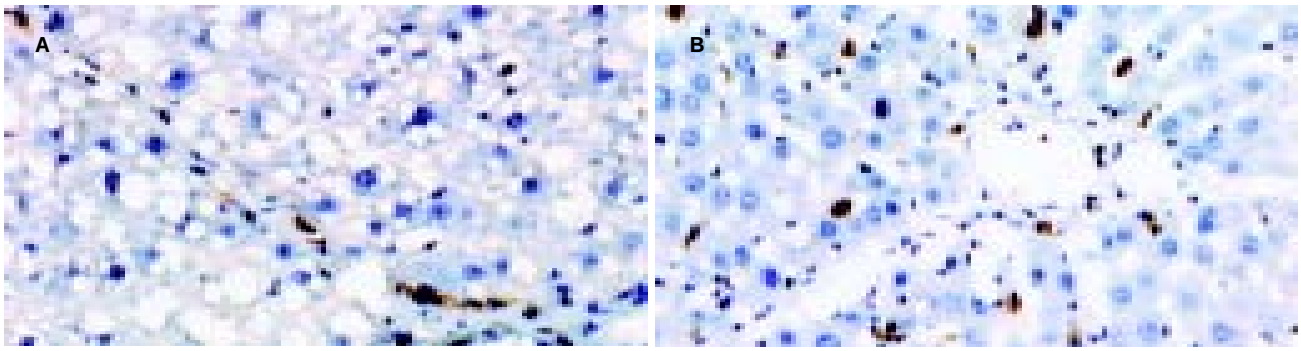


图2 肝脏 Smad 7 蛋白表达(IH × 200). A: 模型组; B: 红景天甙组.

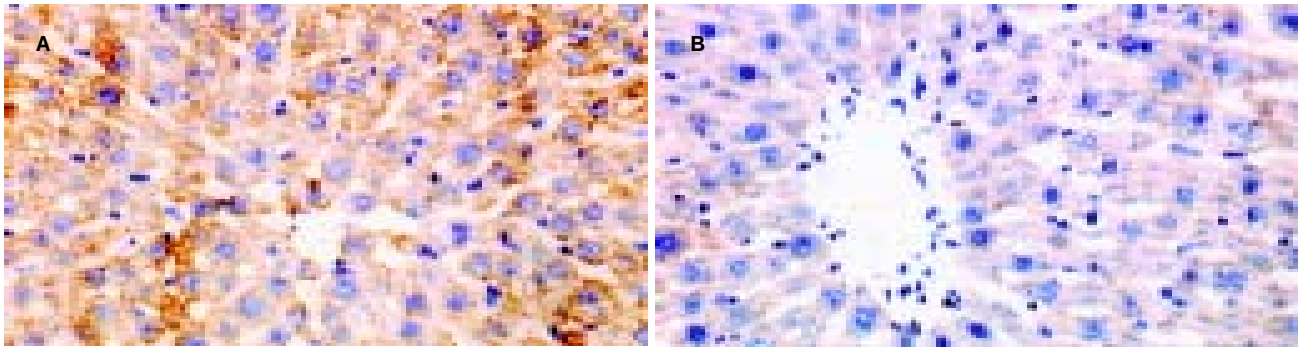


图3 肝脏 CBP mRNA 表达(ISH × 200). A: 模型组; B: 红景天甙组.

而红景天甙干预组肝脏Smad7蛋白阳性表达亦位于间质细胞(图 2B)，阳性率增加为 4.27±0.43%，与模型组比较差异显著(P = 0.035，P<0.05).

2.3 肝组织 CBP mRNA 表达 原位杂交检测表明，正常对照组大鼠肝脏 CBP mRNA 表达水平低下，显色信号微弱;CCl_4sc 使大鼠肝脏 CBP mRNA 表达明显增加，棕黄色的阳性颗粒主要位于肝实质细胞胞质，间质细胞表达较少，且着色深、表达强度高(图 3A);红景天甙干预性治疗使 CBP mRNA 表达明显减少(图 3B)，计算机图像分析其平均吸光度值分别为 0.092±0.032，0.235±0.025(P = 0.00012，P<0.01).

3 讨论

TGFβ(transforming growth factor-β，转化生长因子β)-Smad信号传导通路是肝纤维化主要的信号传导途径[6-12]. Smad 蛋白家族是 TGFβ 受体后信息分子，参与调控细胞的增生、转化、合成、分泌和凋亡，其成员根据功能不同分为三类:受体激活 Smad(R-Smad)，共用 Smad(Co-Smad)，和抑制性 Smad(I-Smad). 来自 TGFβ 的信号与细胞膜表面的Ⅰ、Ⅱ型受体结合后使 R-Smad(Smad2，3)磷酸化而活化，Smad2，3 再和胞质中的Smad 4(Co-Smad)结合为多聚体转位入细胞核，进而与一系列的转录辅激活蛋白或转录辅阻遏分子结合调节靶基因表达[13-16];Smad6，7(I-Smad)则分别抑制 Smads 多聚体形成和抑制 R-Smads 磷酸化而阻止该信号转导过程[17]，其表达下调可能与慢性肝病的持续化及进展为肝纤维化有关[18]. CREB(cAMP response element(CRE)-binding protein，cAMP 反应元件结合蛋白)是一重要的核转录因子，为 bZIP 家族成员之一. CREB受多种信号转导通路的调控，除经典的 cAMP

调控通路外，还有Ras-Raf-MAPK通路、Ca^{2+}-CaMK通路、应激相关的P38通路等.活化的CREB需同转录辅激活因子CBP(CREB binding protein)相结合，才能激活转录发生.CBP是将TGFβ信号转化为生物学效应的关键分子，通过激活AP-1等转录因子促进靶基因表达，引起胶原蛋白合成、肝细胞再生、肝小叶重建等生物效应[19-20].对TGFβ-Smad信号传导通路及其关键分子表达状况的深入研究不仅有助于进一步阐明肝纤维化的发病机制[21-25]，也为肝纤维化的防治提供了一个新的途径.

Flanders[26]认为，TGFβ的促纤维化效应主要是由Smad3介导的，因此，促进抑制性分子Smad7的过度表达或者使用小分子物质halofuginone抑制Smad3的功能将是非常有效的抗纤维化措施.国内梁志清*et al*[27-28]通过门静脉灌注将高滴度的反义Smad4重组腺病毒载体导入大鼠纤维化肝脏，结果转基因鼠肝脏内源性Smad4表达降低，且肝脏Ⅰ型胶原明显减少，表明抑制Smad4的表达有潜在抗肝纤维化价值.张国*et al*[29]研究发现，中药活血软坚方能够减少肝星状细胞合成Smad3;宋仕玲*et al*[30]则在中药金三莪的抗肝纤维化实验中观察到促进Smad7表达、抑制Smad3表达的作用.这些研究初步证实，调节Smads分子的表达是行之有效的抗肝纤维化途径.

中药红景天的主要成分为红景天甙、甙元酪醇以及多种氨基酸，在抗缺氧、抗疲劳、调节免疫、抗缺血等方面广为应用.前期研究证实，红景天能保护肝细胞、减少肝脏胶原合成，有效抑制CCl_4诱导的实验性大鼠肝纤维化[3-5].红景天甙是红景天的主要活性成分，细胞培养实验显示红景天甙对肝星状细胞增生、活化有抑制作用，能减少肝星状细胞合成胶原.我们以红景天甙溶液ip干预大鼠肝纤维化，研究药物干预作用下Smad基因及其下游关键的分子CBP的表达状况，初步探讨红景天甙对大鼠肝纤维化的防治作用及其分子机制，结果表明红景天甙能有效抑制CCl_4诱导的肝组织损害和肝脏胶原沉积，干预组大鼠肝脏胶原平均面积由691 μm^2减少为138 μm^2($P<0.01$);Smad3 mRNA表达阳性率由62%下降为18%($P<0.05$)，CBP mRNA表达平均吸光度值由0.235下降为0.092($P<0.01$);同时，Smad7蛋白表达阳性率则由2.86%增加为4.27%($P<0.05$).这些结果表明，红景天甙干预性治疗能够有效调节实验性大鼠肝纤维化TGFβ-Smad信号转导通路中关键信息分子的基因表达，进而其下游的基因CBP表达亦明显减少，从而干扰了TGFβ介导的肝纤维化信号向细胞内传递及下游效应基因的表达.本研究中Smads分子主要表达于间质细胞，符合星状细胞、Kupffer等间质细胞在肝纤维化发病中的关键地位;但CBP处于该信号通路中较下游的位置，其表达以肝实质细胞为主，反映肝细胞也是细胞外基质的重要细胞来源，可能通过某种未知的通路或者不同的细胞信号通路之间的交互作用(cross-talk)放大了来自TGFβ1的肝纤维化信号，使其效应在实质细胞与间质细胞均有表达，该信号转导通路的分子传导细节以及红景天甙抗实验性大鼠肝纤维化的确切分子机制有待进一步研究阐明.

4 参考文献

1 伍建业, 郭传勇. 肝纤维化药物治疗进展. 同济大学学报(医学版) 2004;25:165-168

2 吴丽, 魏伟. 肝纤维化的动物模型及治疗药物研究. 中国药理学通报 2004;20:481-485

3 曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 陈晓斌, 徐辉, 王钊, 熊碧君. 复方红景天对大鼠肝组织转移生长因子-β1 mRNA表达的影响. 中国中西医结合消化杂志 2002;10:138-141

4 曾维政, 吴晓玲, 蒋明德, 邓桂英, 陈晓斌, 张勇, 秦建平, 徐辉. 复方红景天干预肝纤维化大鼠胶原代谢. 世界华人消化杂志 2003;11:975-978

5 Wu XL, Zeng WZ, Wang PL, Lei CT, Jiang MD, Chen XB, Zhang Y, Xu H, Wang Z. Effect of compound rhodiola sachalinensis A Bor on CCl_4-induced liver fibrosis in rats and its probable molecular mechanisms. *World J Gastroenterol* 2003;9:1559-1562

6 吴晓玲, 曾维政, 王丕龙. TGFβ-Smad信号转导通路与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2003;11:1601-1605

7 阎文昭, 李兵顺, 刘金星, 裴秀. 转化生长因子β_1与肝纤维化的研究状况. 国外医学内科学分册 2003;30:154-158

8 王连升, 陈颖伟, 李定国. TGF-β_1激活与肝纤维化. 国外医学消化系疾病分册 2003;23:222-225

9 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣. TGF-β及Smad与肝纤维化. 国外医学消化系疾病分册 2003;23:206-209

10 姜虹, 李定国. TGF-β1与肝纤维化. 世界华人消化杂志 2003;11:326-329

11 姚桢, 栾昌海. 肝纤维化的研究现状与进展. 日本医学介绍 2003;24:88-91

12 郭顺根, 戴敏, 张玮, 谢艳爽. 肝纤维化发生发展与信号转导途径. 中国组织化学与细胞化学杂志 2003;12:106-111

13 Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:793-807

14 张国, 王天才, 唐望先, 王颖, 李勤, 梁扩寰. Smad3, Smad7基因表达与肝纤维化发病关系研究. 中华消化杂志 2002;22:647-650

15 Liu C, Gaca MDA, Swenson ES, Vellucci VF, Reiss M, Wells RG. Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor-beta (TGF-beta)in quiescent and activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 2003;278:11721-11728

16 ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004;29:265-273

17 Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, Wiercinska E, Said HM, Lorenzen J, Ten Dijke P, Gressner AM. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology* 2003;125:178-191

18 Kitamura Y, Ninomiya H. Smad expression of hepatic stellate cells in liver cirrhosis in vivo and hepatic stellate cell line in vitro. *Pathol Int* 2003;53:18-26

19 畅晓燕, 方家椿. 核蛋白CREB的转录调控机制. 国外医学分子生物学分册 2002;24:136-139

20 Janknecht R, Wells NJ, Hunter T. TGF-beta-stimulated cooperation of smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev* 1998;12:2114-2119

21 吴建新, 孟祥军, 陈源文, 程计林, 李定国, 陆汉明. Smad 7与转化生长因子β_1受体后信息调控. 中华肝脏病杂志 2003;11:315-317

22 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣. 实验性大鼠肝纤维化TGFβ1及其受体mRNA与Smad3, 7的表达. 世界华人消化杂志 2004;12:676-679

23 杨隽, 司书毅, 张月琴. Smad 在 TGFβ 超家族信号通路中的调控作用. 中国生物工程杂志 2003;23:9-12
24 张文岚, 邢德利, 李广生. Smad 蛋白家族与 TGF-β 信号传导. 深圳中西医结合杂志 2003;13:178-180
25 王启伟, 朴英杰. Smad 蛋白信号网络. 国外医学分子生物学分册 2003;25:206-209
26 Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 2004;85:47-64
27 梁志清, 徐新宝, 何振平. 反义 Smad 4 对大鼠纤维化肝脏金属蛋白酶及其抑制剂的调节. 重庆医学 2004;33:716-717
28 徐新保, 何振平, 梁志清, 林凯, 魏玉华, 于鑫, 冷希圣. 腺病毒介导反义 Smad 4 基因大鼠体内转移对实验性肝纤维化的治疗作用. 中华消化杂志 2004;24:370-371
29 张国, 张法灿, 王天才, 梁扩寰. 活血软坚方对肝星状细胞 Smad 信号的影响及意义. 中华肝脏病杂志 2004;12:213-215
30 宋仕玲, 龚作炯, 张全荣. 金三莪对肝纤维化大鼠 TGF-β1 及其 Ⅰ、Ⅱ型受体 mRNA 与 Smad 3、Smad 7 表达的影响. 中医药学刊 2004;22:1044-1047

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 的编辑

经《*World Journal of Gastroenterology*，WJG》编委审稿后，非常优秀的论文可直接录用，通知作者按照编委审稿意见及本刊的书写格式进行修改，符合本刊要求的论文经第一和第二编辑语言处理后方可进行排版. 排版后校样由责任编辑审读全文，无语法及拼写错误方可付印. WJG 为了确保其出版的每篇论文的编辑质量，特制定了编辑要点.

1 题名

应简明扼要有特色，突出主题，不宜过长; 应直入主题，避免使用“探讨、研究、分析、观察、调查、探索”等词语; 不用定冠词 The，一般不使用缩写字(常用缩写字例外). 具体写作的要求见《科技论文英文题名的撰写》 http: //www.wjgnet.com/1009-3079/new/26.asp.

2 摘要

采用结构式摘要. 目的部分应直入主题，如 To investigate the，可简要交代背景或该课题目前开展情况; 方法(包括材料)和结果(包括重要数据)部分使用过去时，结论部分使用一般现在时. 人称和语态使用应自然，避免使用“悬垂分词”. 摘要的第一句不要重复文章题名，应增加变化，补充一些细节. 具体写作要求见《科技论文英文摘要的撰写》http: //www.wjgnet.com/1009-3079/new/25.asp.

3 正文

(1) 短句子: 提倡使用短句子，尽量避免一个句子使用多个从句. 拼写正确，时态一致、准确. 方法及结果部分一般使用过去时. 讨论部分，引用文献叙述一般使用过去时，结论性语言使用一般现在时. 要注意主句和从句的时态呼应及文中上下文含意的呼应; 应尽量对照其中文稿以求如实表达其原意; 使用分词短语作状语和定语时，一定要注意其语态的正确使用，以求其前后呼应; 应注意用词的对照一致及词语的固定搭配等; 在编辑过程中，一定要核对各基本数据及其百分比. 此外，还应注意标点符号的正确使用与拉丁语名词的单复数. (2) 数字: 出现在句首的数字应写为: Sixteen cases… 或A total number of 16 cases而不能写为: 16 cases，100 patients，等. (3) 缩略词: 首次使用词语时，应先写出全称然后在括号内写出其缩写词. (4) 斜体: 细菌、病毒、动植物的拉丁学名、统计学符号、基因符号、内切酶(前 3 个字符)、量符号、拉丁词如 *in vivo*，*in situ*，*et al* 等及参考文献中的刊名应使用斜体. (5) 图表: 不要重复使用，已用图表示的内容不再使用表格. 表和图题的说明应与正文的文题一样，文内图表的标注使用句子表示时应使用一般现在时而不使用过去时，如 The data are shown in Table 1. 图表置正文内，图表内注解首字母大写，其余小写.

4 参考文献

应按先后顺序在正文内标出. 参考文献全体作者是否与首页一致，题名与首页是否一致，刊名与首页是否一致，年与首页是否一致，卷号与首页是否一致，起页 - 止页与首页是否一致，PMID 号是否与首页一致.

5 其他

(1)注意字符间空格，文稿要隔行打印. (2) 使用正式文体，不用口语体和非规范缩写词. 如 isn’t，aren’t，hasn’t，hadn’t，haven’t，don’t，can’t，wouldn’t，a lot of，a bit，too (also)，thru (through)，exam (examination)，lab (laboratory) 等. (3) 要客观地叙述方法和结果，用词要质朴无华，避免使用带感情色彩或广告式宣传的词语. (4) 可用动词时应尽量避免使用动词的名词形式. (5) 正确使用冠词，对可数词应尽量使用复数形式. (6) 应多用预置短语分开或用连字符断开名词词组，避免使用长系列形容词或名词修饰名词. (7) 尽量应用重要的事实开头，避免短语或从句开头. (8) 涉及他人的工作或研究成果时，尽量列出其姓名，两名以上的作者一定要用“*et al*”. 具体写作要求见《科技论文的写作要点》http: //www.wjgnet. com/1009-3079/new/31.asp.

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):346-350
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

亚硝酸盐还原成一氧化氮保护肝脏对抗缺血再灌注损伤

吕 平, 刘 芳, 王春友, 姚 忠, 陈道达, 田 源, 张锦辉, 吴毅华

吕平, 王春友, 陈道达, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科 湖北省武汉市 430022.
刘芳, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科 湖北省武汉市 430022.
姚忠, 冷泉港实验室 美国纽约 11724.
田源, 张锦辉, 吴毅华, 华中科技大学同济医学院附属协和医院普外科实验室 湖北省武汉市 430022.
吕平, 男, 1968-06-30生, 广西桂平市人, 汉族, 1999年同济医科大学博士, 主治医师. 主要从事普外基础与临床研究, 现在胰腺外科中心.
项目负责人: 吕平, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心. luliu@public.wh.hb.cn
电话: 027-85726273 传真: 027-85726830
收稿日期: 2004-11-12 接受日期: 2004-11-25

Nitrite reduction to nitric oxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury

Ping Lv, Fang Liu, Chun-You Wang, Zhong Yao, Dao-Da Chen, Yuan Tian, Jin-Hui Zhang, Yi-Hua Wu

Ping Lv, Chun-You Wang, Dao-Da Chen, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Fang Liu, Department of Radiology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Zhong Yao, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 11724, USA
Yuan Tian, Jin-Hui Zhang, Yi-Hua Wu, General Surgery Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Ping Lv, Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. luliu@public.wh.hb.cn
Received: 2004-11-12 Accepted: 2004-11-25

Abstract

AIM: Xanthine oxidoreductase (XOR) catalyzes the reduction of nitrite (NO_2^-) to nitric oxide (NO•). This study was designed to determine whether NO_2^--derived NO• by XOR protects against hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury.

METHODS: Wistar rats pretreated with saline, nitric oxide synthase (NOS) inhibitor N^{ω}-nitro-L-arginine-methyl ester (L-NAME), XOR inhibitor allopurinol, L-NAME + allopurinol or NO• scavenger carboxy-PTIO (12 animals per group) were subjected to total liver ischemia for 40 min followed by reperfusion. Blood samples and liver tissues were obtained for analysis after 3 h of reperfusion. Survival was also investigated.

RESULTS: In comparison with saline-treated controls, allopurinol-treated mice exhibited further increased serum ALT levels and liver myeloperoxidase (MPO) activities, but further decreased liver ATPstores after I/R (13 845 ± 1 805 *vs* 8 432 ± 3 071 nkat/L, t = -3.722, P<0.01; 942 ± 184 *vs* 692 ± 170 nkat/g, t = -2.443, P<0.05; 1.93 ± 0.47 *vs* 3.05 ± 0.55 μmol/g, t = 3.802, P<0.01; respectively). The hepatocyte injury was further exacerbated and the survival rate was significantly decreased in allopurinol-treated mice (t = -2.474 and Log Rank = 4.15; P<0.05). The animals co-treated with L-NAME and allopurinol showed more severe liver injury (t = 2.488 and -4.194 or t = 2.883 and -3.68; P<0.05 and 0.01) and even lower survival rate (Log Rank = 5.23 or 4.26; P<0.05) than those treated with L-NAME or allopurinol alone. There was no significant difference between carboxy-PTIO treated and L-NAME/allopurinol co-treated mice.

CONCLUSION: NO_2^--derived NO• by XOR protects against liver I/R injury.

Key Words: Xanthine oxidoreductase; Nitrite; Ischemia/reperfusion; Nitric oxide

Lv P, Liu F, Wang CY, Yao Z, Chen DD, Tian Y, Zhang JH, Wu YH. Nitrite reduction to nitric oxide protects against hepatic ischemia/reperfusion injury. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):346-350

摘要

目的: 黄嘌呤氧化还原酶 (xanthine oxidoreductase, XOR) 可催化亚硝酸盐 (nitrite, NO_2^-) 还原生成一氧化氮 (nitric oxide, NO·).研究 XOR 催化 NO_2^- 生成的 NO·能否保护肝脏对抗缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 损伤.

方法: Wistar 鼠分别予以生理盐水、一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 抑制剂 N^{ω}-硝基-L-精氨酸甲基酯 (N^{ω}-nitro-L-arginine-methyl ester, L-NAME), XOR 抑制剂别嘌呤醇 (allopurinol)、L-NAME + allopurinol 以及 NO·清除剂 carboxy-PTIO 预处理 (每组动物 12 只), 然后行全肝缺血 40 min 接着再灌注.再灌注 3 h 后取血液标本及肝组织用作分析, 并作生存研究.

结果: Allopurinol预处理动物与生理盐水预处理动物相比, I/R 后血清 ALT 水平及肝脏髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)活性进一步升高, 而肝脏 ATP

含量进一步降低 (13 845±1 805 *vs* 8 432±3 071 nkat/L, 942±184 *vs* 692±170 nkat/g 及 1.93±0.47 *vs* 3.05±0.55 μmol/g; t = −3.722, −2.443 及 3.802; P<0.01, 0.05 及 0.01), 肝细胞损伤进一步加剧而整体生存率显著降低 (t = −2.474, Log Rank = 4.15; P<0.05). L-NAME 和 allopurinol 联合预处理动物比L-NAME或allopurinol单独预处理动物表现出更严重的肝脏损伤 (t = 2.488 和 −4.194 或 t = 2.883 和 −3.68; P<0.05 和 0.01) 及进一步降低的整体生存率 (Log Rank = 5.23 或 4.26; P<0.05), 但与 carboxy-PTIO 预处理动物无明显差异.

结论: XOR 催化 NO_2^- 生成的 NO・能保护肝脏对抗 I/R 损伤.

关键词: 黄嘌呤氧化还原酶; 亚硝酸盐; 缺血再灌注; 一氧化氮

吕平, 刘芳, 王春友, 姚忠, 陈道达, 田源, 张锦辉, 吴毅华. 亚硝酸盐还原成一氧化氮保护肝脏对抗缺血再灌注损伤. 世界华人消化杂志 2005;13(3):346-350
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/346.asp

0 引言

非依赖一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的一氧化氮(nitric oxide, NO・)生成机制, 可能在常规 NO・生成受损的情况下起作用[1-2]. 研究表明有氧存在的情况下, NO・被氧化而迅速生成无机的亚硝酸盐(nitrite, NO_2^-)[3]. 然而在酸性条件下, NO_2^- 能被化学还原成 NO・[4], 目前发现这种反应在低氧条件下也可依赖于黄嘌呤氧化还原酶(xanthine oxidoreductase, XOR)的催化[5-6].

最近有研究表明在心肌缺血过程中XOR以一种pH及浓度依赖的方式催化 NO_2^- 生成NO・, 并且这种NO・保护隔离的鼠心脏对抗缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤效应[7]. 肝脏是XOR浓度最高的器官之一[8], 然而在肝脏I/R所导致的低氧及酸化环境中XOR能否催化 NO_2^- 生成NO・却不知晓. 本研究表明, 由XOR催化 NO_2^- 生成的NO・可保护肝脏对抗I/R损伤.

1 材料和方法

1.1 *材料* 正常♂和♀Wistar鼠, 质量290-350 g, 购于华中科技大学同济医学院实验动物中心. 亚硝酸钠, N^{ω}-硝基-L-精氨酸甲基酯(N^{ω}-nitro-L-arginine-methyl ester, L-NAME)及别嘌呤醇 (allopurinol) (均购自Sigma公司). 2-(4-羧基苯基)-4, 4, 5, 5-四甲基咪唑-1-氧自由基 3-氧化物(carboxy-PTIO) (Cayman化学公司). 采用全肝缺血再灌注模型[9]. 缺血40 min后移除血管夹开始再灌注. 假手术对照鼠除不夹闭血管外处理方式相同. 关闭腹腔, 待动物恢复并自由饮食. 接着对鼠每天进行观察至术后7 d以评价生存或术后3 h处死并获取肝组织和血液样本进行分析. 肝I/R损伤指标血清ALT用商业试剂(Sigma)检测. 另外肝组织切除后, 称质量后迅速冻存于液氮中, 然后保存于-70℃用于髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性(PMN浸润的准确和客观指标)和ATP检测, 或者保存于40 g/L PBS缓冲甲醛中用于病理组织学评估.

1.2 *方法* 动物随机分为6个实验组(每组12只动物). 为了轻微提高动物 NO_2^- 水平, 所有鼠在开腹前45 min予以腹腔注射2 mg/kg亚硝酸钠(溶于0.2 mL生理盐水). 除假手术动物外, 所有鼠进行缺血再灌注. 所有实验组在剖腹前45 min(除特别说明外)接受不同处理. 实验组组成如下: 1组, 假手术动物, 2 mL生理盐水静脉注射(S组); 2组, 2 mL生理盐水静脉注射(saline组); 3组, NOS抑制剂L-NAME(10 mg/kg)溶于2 mL生理盐水, 静脉注射 (L-NAME组); 4组, XOR抑制剂别嘌呤醇(1.5 mg/kg)开腹前4 h口服 + 2 mL生理盐水静脉注射(allopurinol组); 5组, L-NAME (10 mg/kg)溶于2 mL生理盐水, 静脉注射 + 别嘌呤醇(1.5 mg/kg)开腹前4 h口服(L-NAME + allopurinol组); 及6组, NO・清除剂carboxy-PTIO(0.6 mg/kg)溶于2 mL生理盐水, 静脉注射(carboxy-PTIO组). 每组中半数动物(6只动物)用于生存分析, 剩余6只动物再灌注3 h后取肝组织和血液标本用于分析. 肝组织在10 g/L HTAB缓冲液中匀浆, 超声裂解并用15 000 *g* 离心. 上清(5 μL)与1.6 mmol/L的四甲基氨基联苯(溶于DMSO) 1.5 mL、3 mmol/L稀释于80 mmol/L磷酸盐缓冲液的过氧化氢(pH 5.4)孵育. 结果用中性粒细胞MPO(Sigma公司)校准并以蛋白含量进行标准化. 取整块肝组织在冰上用冰冷的高氯酸匀浆, ATP含量用商业试剂盒(Sigma)按厂商说明书以发光光度计测量. 切除的肝标本固定于40 g/L甲醛并包埋于石蜡. 苏木精-曙红染色切片(5 mm)在放大200倍下采用点计数法以顺序等级评价肝损伤严重程度[10] (n = 4). 肝损伤严重程度由轻到重分为0, 1, 2和3级.

统计学处理 数据以mean±SD表示, 两组参数之间的显著性差异评价采用非配对Student's t 检验. 生存分析采用Kaplan-Meier方法, 整体生存率的差异评价采用Log Rank检验. P<0.05被认为有统计学差异.

2 结果

2.1 *大鼠生存和肝细胞损伤程度* 中位生存时间分别为S组>7 d, saline组6 d, L-NAME组2 d, allopurinol组2.5 d, L-NAME + allopurinol组1 d及carboxy-PTIO组1 d. 与S组相比, saline组肝脏I/R后整体生存率显著下降(Log Rank = 5.45; P<0.05). 与saline组相比, L-NAME或allopurinol组行L-NAME或

别嘌呤醇预处理进一步降低I/R后整体生存率(Log Rank = 6.34或4.15;$P<0.05$).L-NAME组和allopurinol组整体生存率相似.L-NAME和别嘌呤醇联合处理动物整体生存率较L-NAME或别嘌呤醇单独处理动物进一步降低(Log Rank = 5.23或4.26;$P<0.05$),但与carboxy-PTIO处理动物相似.S组肝结构保存良好,肝细胞形态正常具有典型的盘状外观.I/R后肝脏病理组织学表现与血清ALT水平及肝脏MPO活性相关性较好(用顺序等级点计数法决定,表1).

2.2 血清ALT,肝脏MPO及ATP含量 Saline组I/R后血清ALT水平及肝脏MPO活性较S组显著升高(8 432±3 071 *vs* 881±145 nkat/L及692±170 *vs* 317±71 nkat/g;t = -6.017及-4.982;$P<0.01$),而肝脏ATP含量较S组显著降低(3.05±0.55 *vs* 4.05±0.51 μmol/g;t = 3.279;$P<0.01$).与Saline组生理盐水处理的鼠相比,NOS抑制剂L-NAME或XOR抑制剂别嘌呤醇预处理的鼠肝I/R后血清ALT水平及肝脏MPO活性进一步升高(13 770±1 835或13 845± 1 805 *vs* 8 432±3 071 nkat/L及953±175或942±184 *vs* 692±170 nkat/g;t = -3.655或-3.722及t = -2.615或-2.443;$P<0.01$及0.05),而肝ATP含量进一步降低(2.07±0.38或1.93±0.47 *vs* 3.05±0.55 μmol/g;t = 3.608或3.802;$P<0.01$).Allopurinol组与L-NAME组血清ALT水平、肝脏MPO活性及肝ATP含量无统计学差异.我们还发现L-NAME和别嘌呤醇联合处理动物I/R后血清ALT水平及肝脏MPO活性显著高于L-NAME或别嘌呤醇单独处理的动物(16 201±1 834 *vs* 13 770±1 835或13 845±1 805 nkat/L及1 217±229 *vs* 953±175或942±184 nkat/g;t = -2.295或-2.243及t = -2.243或-2.297;$P<0.05$),而肝ATP水平显著低于L-NAME或别嘌呤醇单独处理动物(1.32±0.26 *vs* 2.07±0.38或1.93±0.47 μmol/g;t = 3.987或2.833;$P<0.01$或0.05).另外我们观测到NO·清除剂carboxy-PTIO预处理动物I/R后血清ALT、肝脏MPO活性及ATP含量与L-NAME + allopurinol预处理动物相比无显著性差异(图1-3).

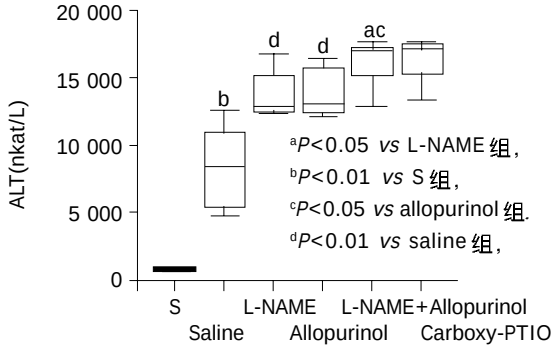


图1 各组(n = 6)血清ALT水平.

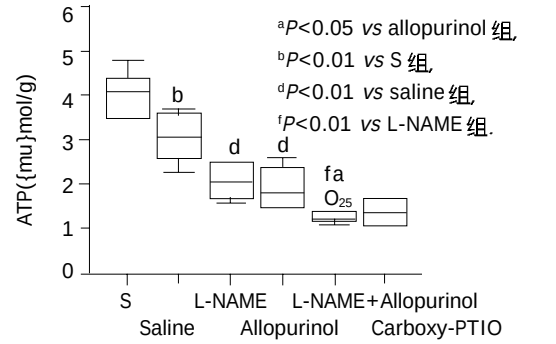


图2 各组(n = 6)肝脏ATP含量.

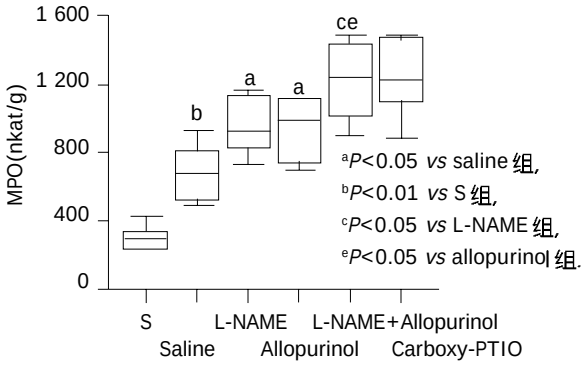


图3 各组(n = 6)肝脏MPO活性.

3 讨论

我们证明NOS抑制剂L-NAME和XOR抑制剂别嘌呤醇联合处理的动物全肝I/R后肝损伤较L-NAME或别嘌呤醇单独处理的动物更严重,但与NO·清除剂carboxy-PTIO处理的动物相似.在鼠心脏I/R模型中,Webb *et al*[7]研究表明缺血期间NO_2^-还原成NO·并对抗I/R损伤,

表1 肝细胞损伤程度(用顺序等级点计数法决定)(n = 4, mean±SD)

分组	0级(%)	1级(%)	2级(%)	3级(%)
S	99.4±0.2	0.6±0.2	0	0
Saline	1.4 ±0.6[b]	21.4±9.1[b]	63.6±6.2[b]	13.6±3.7[b]
L-NAME	0.9±0.4	10.9±6.3	73.6±5.1[a]	14.7±2.7
Allopurinol	1.0±0.4	11.6±7.4	73.8±5.0[a]	13.7±4.1
L-NAME+Allopurinol	0.4±0.1[c e]	6.3±3.3	70.8±4.8	22.5±2.6[d f]
Carboxy-PTIO	0.4±0.2	6.2±2.9	70.6±3.0	22.8±2.4

[a]$P<0.05$ *vs* saline组; [b]$P<0.01$ *vs* S组; [c]$P<0.05$, [d]$P<0.01$ *vs* L-NAME组; [e]$P<0.05$, [f]$P<0.01$ *vs* allopurinol组.

并且NO·产生的量随NO_2^-浓度的增加、酸化(pH降低)及低氧而增加.这种NO·产生增加是由XOR催化的简单化学酸化的结果.上述结果表明XOR催化NO_2^-生成的NO·可对抗I/R损伤.最近报道，XOR在无氧条件下有NADH或黄嘌呤作为还原底物时，能催化NO_2^-还原生成NO·[5].尽管NO·可在氧化条件下产生，研究表明有氧NO·产生率仅为无氧水平的15-30%(pH 5.5时)[7].在常规结构型eNOS活性受损时，无氧条件下黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase，XO)催化NO_2^-还原可能是NO·的重要来源，可扮演一个“救护兵”以维持NO·水平.

一般认为常规结构型eNOS来源NO·在多种疾病中起保护作用[11-15].在肝脏缺血再灌注(ischemia-reperfusion，I/R)早期没有诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase，iNOS)信使的表达，而结构表达的内皮细胞一氧化氮合酶(endothelial cell nitric oxide synthase,eNOS)对限制活体全肝I/R模型肝I/R损伤起重要作用[9,16].NOS抑制剂L-NAME预处理可进一步加剧动物I/R后肝脏损伤并降低整体生存率.我们观察到别嘌呤醇处理的动物较生理盐水处理的动物I/R后肝脏损伤加重且生存率降低，但与L-NAME处理的动物无显著差别.这样看来似乎肝脏I/R期间XOR催化NO_2^-生成的NO·对限制肝脏损伤的重要作用不亚于eNOS来源的NO·，后者在这一过程中被削弱.我们还发现与L-NAME或别嘌呤醇单独处理的动物相比，当eNOS和NO_2^-来源的NO·大部分被L-NAME和别嘌呤醇联合处理抑制时，动物在肝脏I/R后表现出更严重的肝脏损伤以及升高的死亡率.我们的结果暗示着XOR催化NO_2^-生成的NO·将补偿肝脏I/R早期受损的eNOS来源的NO·以保护肝脏对抗I/R损伤.为了进一步证实eNOS和NO_2^-来源的NO·对限制肝脏I/R损伤的保护效应，我们还用NO·清除剂carboxy-PTIO预处理动物.研究表明应用carboxy-PTIO进一步增加了肝脏损伤和死亡率，其程度与联合应用L-NAME和别嘌呤醇所增加的程度相当.这提供了进一步的证据表明eNOS和NO_2^-来源的NO·在肝脏I/R期间介导保护效应对抗肝脏损伤.另外需要特别指出的是，Webb *et al*[7]是在离体的鼠心脏灌注系统(Langendorff preparation)中采用特殊的装置来采集生成的NO进行检测，而我们采用的是活体鼠肝缺血再灌注模型(Pringle's maneuver)，无法直接实时检测在体肝脏所产生的NO含量，这也正是本实验的不足所在.或许以后我们或者其他研究者也可以先采用离体的鼠肝灌注系统来进行进一步的研究.

尽管对低浓度NO·起保护作用这一概念有相当多的支持，但NO·保护动物避免I/R损伤效应的确切机制有待确定.一个可能的机制可能与NO·的抗氧化特性有关[17].现在普遍认为肝脏I/R损伤初期的特征是库否细胞激活并释放反应性氧自由基(reactive oxygen species，ROS).已知NO·可抑制活性氧基团(reactive oxygen species，ROS)-介导的反应，并且NO·对诸如O_2^-、OH-和/或高铁血红蛋白ROS的解毒能力被认为是各种情况下保护效应的原因[18].另有研究认为，NO·通过与呼吸链特定的复合体相互作用而致细胞ATP浓度改变来调整线粒体呼吸以提供保护[19-20].这可能是本研究中当eNOS和/或NO_2^-来源的NO·因L-NAME和/或别嘌呤醇预处理而受损时，肝脏I/R后肝脏ATP水平为什么进一步降低的主要原因之一.

我们在开腹前45 min对所有动物进行腹腔注射2 mg/kg的亚硝酸钠(溶于0.2 mL生理盐水).我们这里所使用的亚硝酸钠剂量仅是一次常规静脉注射剂量的1/6至1/3，在我们的预实验中该剂量未发现给鼠带来任何异常反应.本发现表明如果有NO_2^-作为不同的底物，XOR在I/R中的最终效应并不预先就确定是损伤的.总之，本研究结果表明在肝脏I/R导致的低氧及酸化环境中XOR催化NO_2^-生成的NO·可对抗肝脏I/R损伤.

4 参考文献

1 Bjorne H H, Petersson J, Phillipson M, Weitzberg E, Holm L, Lundberg JO. Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness. *J Clin Invest* 2004;113:106-114

2 Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO 3rd, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 2003;9:1498-1505

3 Lauer T, Preik M, Rassaf T, Strauer BE, Deussen A, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12814-12819

4 Gabel SA, Cross HR, London RE, Steenbergen C, Murphy E. Decreased intracellular pH is not due to increased H+ extrusion in preconditioned rat hearts. *Am J Physiol* 1997;273(5 Pt 2):H2257- H2262

5 Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL. Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues. *J Biol Chem* 2001;276:24482-24489

6 Godber BL, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* 2000;275:7757-7763

7 Banerjee S, Paul P, Talib VJ. Serum prolactin in seizure disorders. *Indian Pediatr* 2004;41:827-831

8 Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic Biol Med* 2002;33:774-797

9 吕平, 陈道达, 田源, 张景辉, 吴毅华. 肝缺血预处理保护作用与一氧化氮/内皮素-1系统有关. 中国病理生理杂志 2000;16:901-905

10 Camargo CA Jr, Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology* 1997;26:1513-1520
11 Varadarajan R, Golden-Mason L, Young L, McLoughlin P, Nolan N, McEntee G, Traynor O, Geoghegan J, Hegarty JE, O'Farrelly C. Nitric oxide in early ischaemia reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 2004;78:250-256
12 Gong JP, Tu B, Wang W, Peng Y, Li SB, Yan LN. Protective effect of nitric oxide induced by ischemic preconditioning on reperfusion injury of rat liver graft. *World J Gastroenterol* 2004;10:73-76
13 Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003;199:8-17
14 宁守斌, 张忠兵, 沈茜, 谢渭芬, 杨秀疆, 赵新, 信栓力. 胃肠道平滑肌细胞作为eNOS基因转移靶细胞的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:986-989
15 郭津生, 古永亮, 王吉耀, 曹之宪. 结构型与诱生型一氧化氮合酶在大鼠胃溃疡模型中的表达和活性变化. 世界华人消化杂志 2001;9:288-292
16 Kawachi S, Hines IN, Laroux FS, Hoffman J, Bharwani S, Gray L, Leffer D, Grisham MB. Nitric oxide synthase and postischemic liver injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:851-854
17 Wink DA, Miranda KM, Espey MG, Pluta RM, Hewett SJ, Colton C, Vitek M, Feelisch M, Grisham MB. Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. *Antioxid Redox Signal* 2001;3:203-213
18 Grisham MB, Jourd'Heuil D, Wink DA. Nitric oxide I Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites:implications in inflammation. *Am J Physiol* 1999;276(2 Pt 1):G315-321
19 Moncada S, Erusalimsky JD. Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:214-20
20 Beltran B, Mathur A, Duchen MR, Erusalimsky JD, Moncada S. The effect of nitric oxide on cell respiration: A key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:14602-14607

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2005年全国胃病诊治研讨会征文通知

为了推动消化内镜及相关专业对各种胃病的诊断与治疗研究进展，中华医学会消化内镜学分会定于2005年6月在大连召开全国胃病诊治研讨会。会议将安排专题报告，论文交流，图像演示及自由讨论等内容。现将征文内容及有关事宜通知如下:

1 征文内容

(1)各种胃病的内镜，病理诊断及分类；分型；(2)各种胃病与*Hp*；(3)各种胃病与胃肠激素；(4)各种胃病与胃肠动力学；(5)放大内镜对胃良性病变，癌前病变及早期胃癌的诊断应用；超声内镜对胃良性，恶性疾病的诊断应用；(6)各种胃病的药物治疗(胃黏膜保护剂，药物根除*Hp*，各种抗酸，抑酸剂，改善胃动力失常药剂及抗癌剂等)；(7)内镜下对某些胃炎，溃疡病，早期胃癌的治疗；对各种胃病的诊断与治疗以及其他临床研究与基础研究.

2 稿件要求全文及摘要

摘要800-1000字，均用中文打印(要求有光盘)；截稿日期为2005-03-20.

3 投稿地址及联系方式

地址：辽宁省沈阳市和平区砂阳路252号，中华医学会辽宁分会学术会务部(邮编：110015)
联系人：刘敏杰 电话：024-23391410，传真：024-23391410(稿件注明:"全国胃病学术会")
主办：中华医学会消化内镜学分会
承办：中华医学会辽宁分会

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):351-354
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

新生牛促肝细胞生长素对 HL-60 细胞增生的影响

朱宏丽, 卢学春, 范 辉, 辛 宏, 庄晓萌, 姚善谦

朱宏丽, 卢学春, 范辉, 辛宏, 庄晓萌, 姚善谦, 中国人民解放军总医院南楼血液科 北京市 100853
项目负责人: 朱宏丽, 100853, 北京市海淀区复兴路 28 号, 中国人民解放军总医院南楼血液科. bjzhl202_cn@sina.com
电话: 010-66936403
收稿日期: 2003-10-21 接受日期: 2003-12-06

Effect of hepatocyte growth-promoting substance on proliferation of HL-60 cell line

Hong-Li Zhu, Xue-Chun Lu, Hui Fan, Hong Xin, Xiao-Mei Zhuang, Shan-Qian Yao

Hong-Li Zhu, Xue-Chun Lu, Hui Fan, Hong Xin, Xiao-Mei Zhuang, Shan-Qian Yao, Department of Hematology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Hong-Li Zhu, Department of Hematology, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Haidian District, Beijing 100853, China. bjzhl202_cn@sina.com
Received: 2003-10-21 Accepted: 2003-12-06

Abstract

AIM: To explore the effect of hepatocyte growth-promoting substance(HGS)on the proliferation of HL-60 cell line and its possible mechanism.

METHODS: HL-60 cells were cultured with different concentrations of HGS, As2O3, or As2O3 (107 mol/L) plus HGS(40 mg/L). At day 0, 1, 2 and 3, cell growth was examined by MTT assay and Trypan blue, cell cycle was measured by flow cytometry. Meanwhile, DNA damage and repair was determined by men single-cell gel eiectrophoresis.

RESULTS: HGS inhibited the growth of HL-60 cells in a dose-dependent manner at concentrations ranging from 11.5 to 40 mg/L, with 40 mg/L HGS exhibiting the strongest inhibitory effect. HGS(40 mg/L)not only prevented HL-60 cells from entering G1 phase but also inhibited. DNA damage repair. (-HGS and As_2O_3 synergically inhibited the growth of HL-60 cells.

CONCLUSION: HGS can inhibit the proliferation of HL-60 cells at a rather low concentration, which may be related to its effect on the control of cell cycle and the inhibition of DNA repair.

Key Words: Hepatocyte growth-promoting substance; As_2O_3;DNA repair

Zhu HL, Lu XC, Fan H, Xin H, Zhuang XM, Yao SQ. Effect of hepatocyte growth-promoting substance on proliferation of HL-60 cell line. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):351-354

摘要

目的: 研究促肝细胞生长素(hepatocyte growth-promoting substance, HGS)对急性早幼粒细胞白血病细胞系HL-60 增生的影响, 并探讨可能的作用机制.

方法: 体外悬浮培养法培养 HL-60 细胞, 分为空白对照组、三氧化二砷组、HGS 组以及三氧化二砷(10^{-7}mol/L)加HGS(40 mg/L)组共四个实验组进行培养;在培养的第 1、2、3 和第 4 d 分别利用台盼蓝染色和 MTT 法检测细胞增生情况;采用流式细胞技术检测细胞周期动态变化;利用单细胞凝胶电泳技术检测细胞 DNA 损伤情况.

结果: HGS 终浓度在 11.5-45 mg/L 之间时对 HL-60 细胞的增生有剂量相关性抑制作用, 以11.5 mg/L抑制作用最弱, 22.5 mg/L 组次之, 40 mg/L 有最大的抑制作用;浓度为 40 mg/L 的 HGS 能够推迟 HL-60 细胞由 G0 期向 G1 期转化, 减少进入细胞周期的细胞数量;浓度为40 mg/L的 HGS 能够抑制 HL-60 细胞 DNA 损伤后的修复;40 mg/L 的 HGS 与 10^{-7}mol/L 浓度的三氧化二砷对 HL-60 细胞的抑制有一定协同作用.

结论: HGS 在较低浓度时即对 HL-60 细胞的增生有抑制作用, 这种抑制作用可能是通过细胞周期调控和抑制细胞 DNA 损伤修复来实现的.

关键词: 促肝细胞生长素;三氧化二砷;DNA 修复

朱宏丽, 卢学春, 范辉, 辛宏, 庄晓萌, 姚善谦. 新生牛促肝细胞生长素对 HL-60 细胞增生的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3):351-354
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/351.asp

0 引言

1975 年 LaBrecque *et al* 首次报道幼龄动物肝内存在一种能特异性促进肝细胞生长的小分子蛋白活性物质，当时称之为肝再生刺激物质(hepatic stimulatory substance，HSS)，此后 LaBrecque 进一步研究认为HSS 是一种耐热的、仅存在于生长状态肝脏中的小分子活性蛋白，其作用没有种属特异性，但有组织特异性[1]. 国内有报道大鼠肝再生过程中HSS提取物对

大鼠原代肝细胞有刺激作用，但对大鼠原代脾细胞、人早幼粒细胞(HL-60)、人肺癌细胞(PLA801D)无刺激作用[2]. 近年来，我国军事医学科学院研究人员从健康未哺乳新生牛肝脏提取分子质量在10 ku以下的生物活性肽制成的促肝细胞生长素(hepatocyte growth-promoting substance，HGS)，其作用和性质与肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor，HGF)类似，具有明显的刺激肝细胞DNA合成和促进肝细胞再生、加速肝脏组织修复的生物学活性. 由于这种生物活性肽有组织特异性，尽管其对人肝癌细胞也有促进增生作用，但在预实验中我们观察到HGS对白血病细胞系的增生有抑制作用，为此我们系统地观察了不同浓度HGS对HL-60细胞系生长的影响，并对可能的作用机制进行了探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 新生牛HGS由军事医学科学院辛宏博士馈赠(分子质量小于10 ku，活性分析为10.8-11.3倍(与生理盐水相比)，蛋白含量为9.14-9.47 mg/mL);高糖型RPMI 1640培养基(Sigma);淋巴细胞分离液(天津TBD);台盼蓝(Sigma);碘化丙啶(Sigma);HL-60为本科备存细胞系;CO_2培养箱(Heraeus);FACS Calibur流式细胞仪(Becton Dickinson);CK2倒置显微镜(olympus).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HL-60细胞在无血清RPMI 1640培养基(青霉素100 U/mL，链霉素100 mg/L)中培养24 h后将细胞浓度调整为2.5×10^8 / L，后加入终浓度50 mL/L的胎牛血清和一定终浓度的HGS在24孔培养板中继续培养，实验分为11.5 mg/L、22.5 mg/L和40 mg/L 3个药物剂量组及1个空白对照组，每组细胞共设3个平行孔. 台盼蓝染色法计数生长指数曲线.

1.2.2 台盼蓝染色法检测细胞活性 4 g/L台盼蓝，按实验室操作常规进行.

1.2.3 细胞周期的检测 取不同培养阶段和不同剂量组HL-60细胞悬液加入750 mL/L乙醇在-20℃中冻存，碘化丙啶(PI)染色，利用流式细胞仪进行细胞周期测定.

1.2.4 单细胞凝胶电泳检测HL-60细胞DNA损伤 方法参照文献[3]进行.

1.2.5 HGS和三氧化二砷对HL-60细胞生长的影响 采用空白对照、用HGS(40 mg/L)和三氧化二砷(10^{-7} mol/L，Promega)

统计学分析 采用重复采样的方差分析计算各组间的统计学差异，以$P<0.05$为差异具有显著性，以上分析均用SPSS11.0软件完成.

2 结果

2.1 HGS对HL-60细胞生长的影响 HL-60细胞在含有50 mL/L胎牛血清中生长良好. 与空白对照组相比，浓度为11.5 mg/L的HGS对HL-60细胞的生长即有抑制作用，而终浓度为40 mg/L的HGS对HL-60细胞的抑制作用最强(图1).

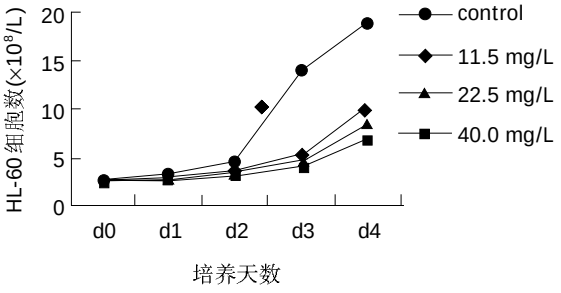


图1 不同浓度HGS对HL-60细胞生长的影响.

2.2 MTT法检测HGS对HL-60细胞生长的抑制作用 与生长曲线结果类似，MTT法检测结果表明HGS对HL-60细胞的生长有明显抑制作用，且这种抑制作用呈现剂量相关性，以11.5 mg/L抑制作用最弱，22.5 mg/L组次之，40 mg/L有最大的抑制作用(表1).

2.3 HGS对HL-60细胞周期的影响 以二倍体细胞内的DNA含量作为DNA的相对含量1，利用流式细胞仪检测细胞内DNA含量，根据DNA相对含量来推算处于不同细胞周期的细胞数量. 与对照组相比，终浓度为40 mg/L的HGS处理过的细胞能够推迟HL-60细胞由G0期向G1期转化，减少进入细胞周期的细胞数量(图2).

表1 MTT比色法检测不同浓度HGS与HL-60细胞的共同培养结果

分组(mg/L)	A_{490}			
	0 d	第1 d	第2 d	第3 d
0	0.496 ± 0.006	0.560 ± 0.010	0.803 ± 0.011	0.890 ± 0.020
11.5	0.493 ± 0.006	0.530 ± 0.010	0.570 ± 0.020[b]	0.617 ± 0.015[b]
22.5	0.493 ± 0.006	0.516 ± 0.011	0.536 ± 0.015[b]	0.603 ± 0.006[b]
40.0	0.493 ± 0.006	0.507 ± 0.021[a]	0.510 ± 0.010[b]	0.557 ± 0.006[b]

[a]$P<0.05$ *vs* 对照组，[b]$P<0.01$ *vs* 对照组.

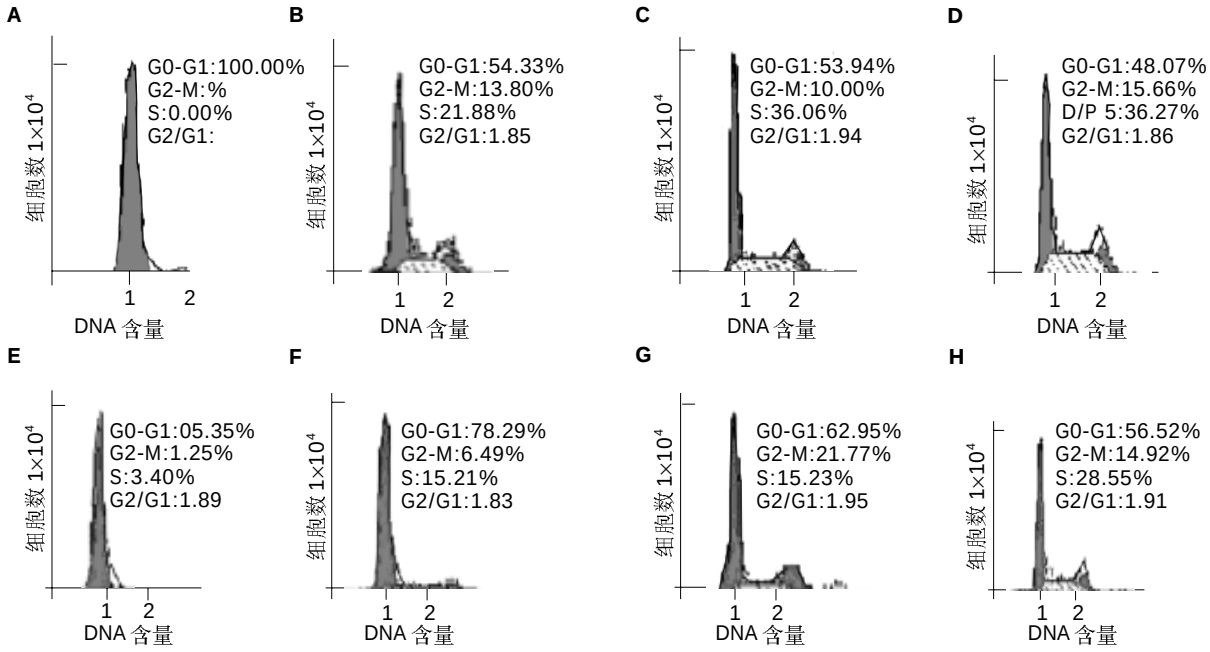


图 2 HGS 对 HL-60 细胞周期的影响. A: control, 0 d; B:control, 第 1 d; C: control, 第 2 d; D: control, 第 3 d; E: HGS, 0 d; F: HGS, 第 1 d; G: HGS, 第 2 d; H: HGS, 第 3 d.

2.4 SCGE 法检测 HGS 对 HL-60 细胞 DNA 损伤修复的影响 以 SCGE 法检测 HL-60 细胞的 DNA 损伤情况, 结果浓度为 40 mg/L 的 HGS 对 HL-60 细胞 DNA 损伤的修复有抑制作用, 这种作用要弱于三氧化二砷, 且二者对 HL-60 细胞 DNA 损伤的修复有协同抑制作用(图 3).

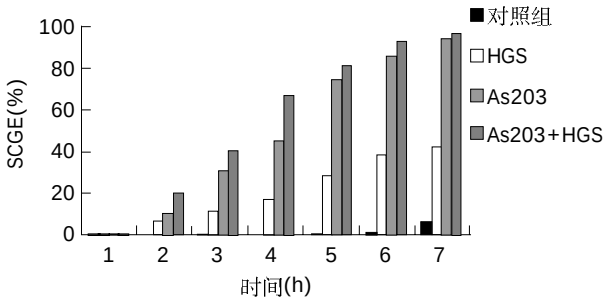


图 3 HGS 和三氧化二砷对 HL-60 细胞 SCGE 的影响.各组与对照相比均 $P<0.01$.

3 讨论

HGS 来源于肝脏, 但也有人[3]认为某些白血病细胞可能也能分泌 HGS. 研究发现, HGS 具有双向性作用, 能促进某些种类细胞的增生, 但却抑制另外一些细胞的生长. 不同作用取决于不同组织和细胞类型, 即 HGS 作用具有组织特异性. 对肝脏来源细胞, 包括正常肝组织细胞和肝癌细胞, HGS 有显著性促进增生作用, 而对其他肿瘤细胞, 既可能是促进作用也可能是抑制作用, 目前尚缺乏系统研究. 就白血病而言, HGS对不同白血病亚型的作用也不一致. Aref *et al*[4] 检测了 63 例髓系白血病患者和 15 名健康人血清游离肝细胞生长因子(sHGF)浓度, 结果发现不同类型初诊白血病患者血清 sHGF 的浓度各不相同, 以 M5 为最高(1 425 μg/L), M4(1 295 μg/L)次之, 且 sHGF 水平与外周血白细胞数量相关(r = 0.718; P = 0.000). 从所观察的病例来看, sHGF 与疾病的预后密切相关. 死亡患者在初诊时的sHGF水平要显著高于缓解和复发者. sHGF是白血病预后不良的指征之一. 在白血病初诊时测定 sHGF 浓度, 可能有助于白血病预后判断和选择适当治疗方案以期获得尽可能好的疗效. 对于骨髓增生异常综合征(MDS), HGF也有重要的临床意义. 为此, 需要对 HGF 在白血病诊治中的潜在作用进行深入研究.

我们在进行 HGS 功能对比试验时发现, HGS 能够抑制 HL-60、K562 以及某些肺癌细胞系的增生. 但尤以对 HL-60 的抑制作用最强, 目前还未见到相关文献报道. 通过对不同剂量 HGS 作用的对比研究发现, 即便是很小剂量, HGS 对 HL-60 细胞也具有抑制作用, 说明 HGS可能在急性早幼粒细胞白血病的治疗方面具有潜在的应用价值. 因大多数化疗药物对肝脏的毒副作用是限制白血病强化治疗的制约因素, 也是影响白血病的预后因素之一. 选择一种既能够杀伤或者抑制白血病细胞的生长, 同时又能够保护肝脏, 甚至是促进肝细胞修复的药物, 需进一步的大样本临床试验加以证实.

在观察到 HGS 抑制 HL-60 生长的同时, 利用流式细胞仪检测了 HL-60 细胞周期的变化情况, G0 期的延迟出现可能部分解释了 HGS 发挥作用的途径, 而 HL-60 细胞 DNA 损伤修复的抑制从更深层次阐明了 HGS 对 HL-60细胞生长抑制的机制. 由于细胞周期与细胞增生和细胞分化密切相关, 我们正积极在前面实验的基础上进行 HGS 对 HL-60 细胞分化影响方面的研究, 以期

能进一步明确HGS在白血病诊治中的重要意义，阐明HGS的作用机制，提高白血病疗效.总之，HGS有可能是某些类型白血病新的理想治疗药物，如急性早幼粒细胞白血病，需进一步深入研究.

4 参考文献

1 罗运权,吴孟超.肝细胞生长因子.新消化病学杂志 1997;5:198-199

2 邱华,贺福初,杨晓明.大鼠肝再生过程中肝再生刺激物质及其mRNA的动态变化.中国应用生理学杂志 1996;12:236-238

4 Mabed M, Aref S, Aladle DA. Hepatocellular carcinoma of a short malignant transformation time in a patient with acute myeloblastic leukemia. *Ann Hematol* 2003;82:318-320

5 Aref S, Mabed M, Sakrana M. Soluble hepatocyte growth factor (sHGF)and vascular endothelial growth factor(sVEGF)in adult acute myeloid leukemia:relationship to disease characteristics. *Hematology* 2002;7:273-279

6 Albitar M. Angiogenesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 2001;106:170-176

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第六届全国胃肠动力学术研讨会征文通知

胃肠动力障碍性疾病是消化病学领域最常见的疾病之一，近年来该领域的研究进展十分迅速，为提高国内胃肠动力障碍性疾病临床和基础研究水平，吸取国外最新研究成果，加强对外交流与合作，中华医学会消化病学分会胃肠动力学组定于2005-11上旬在武汉召开全国第六届胃肠动力学术会议，届时将邀请国内外胃肠动力学专家就本学科的基础和临床研究进展作专题演讲，并进行广泛的学术交流.现将征文有关事项通知如下:

1 征文内容

(1)胃肠动力障碍性疾病的基础和临床研究;(2)胃肠功能性疾病的基础和临床研究;(3)胃肠神经系统功能与胃肠动力学基础研究;(4)胃肠动力学检测方法的临床应用.

2 征文要求

(1)论文摘要不得超过800字，电脑打印(附软盘)，格式为:题目，作者，单位，邮编，目的，方法，结果和结论，附联系电话及E-mail地址;(2)已在全国公开发表的论文不予受理.

3 投稿地址

武汉市解放大道1277号协和医院消化科 刘劲松收(邮编:430022)，电话:027-85726381;2 武汉市丁字桥路100号湖北省医学会 林勇 胡丽萍收(邮编:430064)，电话:027-87893467.

4 截稿日期

2005-07-30

5 会议具体时间地点

另行通知.会议信息，论文投搞，表格下载请登陆网站:http://hubeiyiyuan.go.nease.net.

中华医学会消化病学分会

消化病学分会胃肠动力学组

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):355-357
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

木苏丸对大鼠二甲基亚硝胺肝纤维化肝组织 TIMP-1, MMP-2 mRNA 表达的作用

高 峰, 程留芳, 王志强, 杨云生

高峰, 程留芳, 王志强, 杨云生, 中国人民解放军总医院消化内科 北京市 100853
高峰, 女, 1971-05-29 生, 山东省济南市人, 汉族, 2002 年中国人民解放军总医院博士生, 主要从事消化系统疾病的临床工作和肝硬化及门脉高压的基础研究.
项目负责人: 程留芳, 100853, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军总医院消化内科.
电话: 010-66937096
收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-10-27

Effects of *musuwan* on TIMP-1 and MMP-2 expression in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats

Feng Gao, Liu-Fang Cheng, Zhi-Qiang Wang, Yun-Sheng Yang

Feng Gao, Liu-Fang Cheng, Zhi-Qiang Wang, Yun-Sheng Yang, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Liu-Fang Cheng, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China.
Received: 2004-09-18 Accepted: 2004-10-27

Abstract

AIM: To investigate the effects of *musuwan* on the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in rat liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine (DMN).

METHODS: Male SD rats were randomly divided into three groups: normal control group (n = 10), model group (n = 10) and *musuwan* group (n = 10). In all the rats, except those in control group, DMN (10 mg/kg) were given by intraperitoneal injection to establish fibrosis model. Rats in the *musuwan* group were subsequently treated with *musuwan* (3.125 g/kg, stomach perfusion). Blood from the heart was collected for the examinations of liver function, serum hyaluronic acid (HA), superoxide dismutase (SOD), and malonaldehyde (MDA). MMP-2, and TIMP-1 mRNA were detected by reverse transcription polymerase chain reaction.

RESULTS: Compared with those in control group, serum ALP, MDA, and HA were significantly higher, whereas serum levels of Alb and SOD were significantly lower. In *musuwan* treated rats, serum ALP, MDA, and HA were remarkably reduced, while Alb and SOD were markedly elevated. The levels of MMP-2 and TIMP-1 mRNA in model group were significantly higher than those in control group (0.70±0.22 *vs* 0.63±0.08, P = 0.02; 1.38 ±0.48 *vs* 0.99±0.14, P = 0.02). *Musuwan* significantly down-regulated TIMP-1 mRNA (0.71±0.34 *vs* 0.99±0.14, P = 0.03); however, the level of MMP-2 mRNA showed no significant difference between *musuwan* group and model group.

CONCLUSION: *Musuwan* can effectively inhibit the expression of TIMP-1, but not MMP-2, in DMN-induced liver fibrosis in rats.

Key Words: *Musuwan*; Matrix metalloproteinase-2; Tissue inhibitor of metalloproteinase 1; Dimethylnitrosamine; Liver fibrosis

Gao F, Cheng LF, Wang ZQ, Yang YS. Effects of *musuwan* on TIMP-1 and MMP-2 expression in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3):355-357

摘要

目的: 研究二甲基亚硝胺（DMN）肝纤维化模型 MMP-2，TIMP-1 mRNA 表达以及木苏丸的干预作用.

方法: ♂ SD 大鼠分为正常对照组 10 只(ip 生理盐水)，模型组及治疗组各 10 只，每周连续 3 d，每天 ip 二甲基亚硝胺 10 mg/kg，共 3 wk.造模同时模型组每天蒸馏水灌胃，治疗组木苏丸3.125 g/kg蒸馏水溶解后每天灌胃，治疗 4wk.心脏取血观察肝功能、血清透明质酸(HA)、超氧化酶歧化物(SOD)及丙二醛(MDA)的改变，以逆转录多聚酶链反应方法观察肝纤维化模型肝组织 MMP-2，TIMP-1 mRNA 的表达水平及木苏丸的干预作用.

结果: DMN 大鼠肝纤维化模型组 MMP-2 mRNA 为 1.38 ± 0.48，TIMP-1 mRNA 为 0.99 ± 0.14，均高于正常对照组(0.70 ± 0.22 *vs* 0.63 ± 0.08，P = 0.02); 木苏丸治疗组 TIMP-1 mRNA 为 0.71 ± 0.34，低于模型对照组(0.99 ± 0.14，P = 0.03); MMP-2 mRNA 为 1.29 ± 0.68，与模型对照组无显著差异.

结论: DMN 肝纤维化模型肝组织 MMP-2，TIMP-1 mRNA 表达水平增高，木苏丸能抑制肝组织 TIMP-1 mRNA 的表达，从而延缓肝纤维化的形成.

关键词: 木苏丸;二甲基亚硝胺;金属蛋白酶2;金属蛋白酶抑制因子1;肝纤维化

高峰, 程留芳, 王志强, 杨云生. 木苏丸对大鼠二甲基亚硝胺肝纤维化肝组织TIMP-1, MMP-2 mRNA表达的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(3):355-357
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/355.asp

0 引言

肝纤维化是慢性肝病重要的病理特征，也是进一步向肝硬化发展的主要中心环节，轻型肝炎中肝纤维化发生率64%，中、重型肝炎100%发生肝纤维化[1]，因此，阻断或逆转肝纤维化是肝病治疗的关键，也是目前医学研究的重要课题之一. 二甲基亚硝胺(DMN)模型是一较有价值的模型，可用于评价中西药对伴有活动性病变的慢性肝病所致肝纤维化及肝癌的防治作用[2]. 我们应用半定量反转录PCR方法，观察DMN肝纤维化模型肝组织中金属蛋白酶(MMP-2)、金属蛋白酶组织抑制因子(TIMP-1)mRNA表达以及木苏丸的干预作用.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂SD大鼠30只，体质量180-250 g，购自解放军军事医学科学院实验动物中心. 木苏丸(由当归、鳖甲、茵陈、红枣、黑豆等组成)由同仁堂研制成粉末，以蒸馏水溶解成适当浓度. 二甲基亚硝胺购自日本东京化成工业株氏会社. 总RNA提取试剂盒、RT-PCR试剂购自Promega公司;PCR引物由上海生工生物制品公司合成;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒为南京建成生物制品公司产品.

1.2 方法 按文献[3]方法复制二甲基亚硝胺肝纤维化模型. 将30只SD大鼠分为3组，正常对照组10只(ip生理盐水)，模型组及治疗组各10只，每周连续3 d，每天ip二甲基亚硝胺10 mg/kg，共3 wk. 造模同时模型组每天蒸馏水灌胃，治疗组木苏丸3.125 g/kg蒸馏水溶解后每天灌胃，治疗4 wk处死大鼠，取血清和肝脏组织备用. 肝功能检测采用全自动生化仪测定;HA应用放免法测试;SOD、MDA测定按照试剂盒说明操作;肝组织MMP-2，TIMP-1 mRNA 表达用一步法总RNA提取试剂盒提取肝组织总RNA，采用分光光度计测定提取的总RNA含量及纯度，$A260/A280$在1.8-2.0之间. MMP-2引物序列:上游5’-GCTGATACTGACACTGGTACT-3’下游5’-CAATCTTTTCTGGGAGCTC-3’合成片段长度217 bp. TIMP-1引物序列:上游5’-CATGGAGAGCCTCTGTGGAT-3’下游5’-GTTCAGGCTTCAGCTTTTGC-3’合成片段长度393 bp. GAPDH引物序列:上游5’-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3’;下游5’TCCACACCCTGTTGCTGTA-3’合成片段长度454 bp. MMP-2，TIMP-1 mRNA PCR反应体系为50 uL. PCR反应参数:94℃预变性2 min，94℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸30 s，25个循环;72℃后延伸7 min. 扩增产物在1.2%琼脂糖凝胶上进行电泳，以Quantity One凝胶成像系统进行半定量分析，用MMP-2、TIMP-1与GAPDH的比值表示其相对表达水平.

统计学处理 计数资料用mean ± SD描述，采用STATA7.0统计软件进行数据分析.

2 结果

DMN ip 2 wk动物出现乏力、嗜睡、皮毛皱而不洁、进食减少、尿黄，个别大鼠趾甲易出血，造模结束时3只大鼠出现腹水. 模型组大鼠死亡2只，木苏丸治疗组大鼠死亡3只，木苏丸治疗组一般状况较模型组好. 与正常对照组比较，模型对照组血清ALP，MDA均明显增高;Alb，SOD明显降低($P<0.01$);HA增高($P<0.05$). 木苏丸治疗组较模型对照组ALP，MDA明显下降($P<0.01$，$P<0.05$);Alb，SOD明显增高($P<0.01$);HA降低($P<0.05$，表1). 与正常对照组比较，DMN大鼠肝纤维化模型组MMP-2 mRNA 1.38 ± 0.48，TIMP-1 mRNA 0.99 ± 0.14，均高于正常对照组(0.70 ± 0.22 *vs* 0.63 ± 0.08，$t = 2.56$，$P = 0.02<0.05$);木苏丸治疗组TIMP-1 mRNA 0.71 ± 0.34，低于模型对照组(0.99 ± 0.14，$t = 2.35$，$P = 0.03<0.05$)，MMP-2 mRNA 1.29 ± 0.68与模型对照组无显著差异(图1).

3 讨论

在正常肝脏纤维组织中存在着细胞外基质(ECM)的合成与降解的动态平衡，肝纤维化及肝硬化时纤维结缔组织的形成，是各种不同致病因子导致ECM合成与降解的失衡所致. 因此，研究肝纤维化的可逆性，在注意胶原合成过程的同时，应加强基质金属蛋白酶

表1 大鼠血清ALP，Alb，HA水平及SOD，MDA含量(mean ± SD)

分组	*n*	ALP nKat/L	Alb g/L	HA ug/L	SOD u/mL	MDA umol/L
正常对照	10	3779 ± 2255	30.1 ± 4.9	323 ± 147	362 ± 93	7.4 ± 1.4
模型对照	8	9832 ± 2819[b]	21.1 ± 4.4[b]	3865 ± 525[a]	171 ± 52[b]	9.9 ± 0.5[b]
木苏丸治疗	7	3589 ± 632[d]	29.2 ± 3.0[d]	332 ± 99[c]	322 ± 75[d]	8.4 ± 1.8[c]

[a]$P<0.05$，[b]$P<0.01$ *vs*正常对照;[c]$P<0.05$，[d]$P<0.01$ *vs*模型对照.

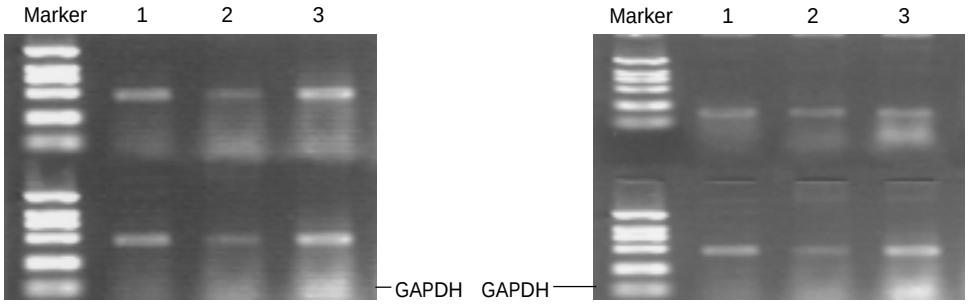


图1 TIMP-1和MMP-2基因电泳图. A: TIMP-1; B: MMP-2; 1: 正常对照组; 2: 木苏丸治疗组; 3: 模型对照组.

(MMPs)及其抑制物(TIMPs)在细胞外基质降解的调节过程中的作用研究，加强观察药物对胶原降解研究，将为防治肝纤维化的有效药物的发现提供一个重要途径. 肝纤维化早期MMP-2在肝组织中的表达增加，MMP-2主要降解Ⅴ，Ⅵ型胶原和弹性硬蛋白(elastin)、纤维连接蛋白(fibronectin)及变性的Ⅰ，Ⅲ型胶原，而Ⅳ胶原是构成基底膜的主要成分，MMP-2增多可破坏Diss间隙的基底膜，降解正常肝组织，破坏肝小叶的排列，激活窦周细胞，进一步促进纤维化的进展[4-5]. 陈治新 *et al*[6]研究在体外激活的大鼠HSC中MMP-1、TIMP-1均有较高表达. 谢彦华 *et al*[7]研究证实肝纤维化时MMP-2明显增高，并随造模时间延长而进行性增加，说明MMP-2与肝纤维化关系密切，可能起促进作用. 本实验研究发现DMN诱导肝纤维化大鼠肝脏组织MMP-2 mRNA表达升高，与国内李东 *et al*[8-9]报道的四氯化碳大鼠肝纤维化模型MMP-2的改变相符. TIMP-1是抑制基质金属蛋白酶活性的一组多功能因子家族的主要成员之一，他在调节胶原的降解代谢中发挥着重要作用. TIMP-1主要抑制MMP-1的功能，而后者是Ⅰ型胶原的主要降解酶. HSC在静息状态下，TIMP-1的表达很低，而一旦被激活，TIMP-1表达进行性升高. TIMP-1不但与MMP-1以1∶1形式结合抑制其活性，而且可以抑制酶原激活、增加活性酶的灭活，从而使MMP-1对Ⅰ型胶原的降解作用减弱、沉积增加，ECM合成与降解的失衡促进了肝纤维化乃至肝硬化的形成[10-11]. 因此，TIMP-1与细胞外基质的降解有着密切的关系. 本实验结果表明，与正常对照组比较，DMN模型组TIMP-1 mRNA表达增高，进一步验证了国内外关于四氯化碳、DMN、胆管结扎肝纤维化大鼠模型TIMP-1表达变化的报道[8-9]. 研究表明随着大鼠肝纤维化的发生、发展，肝组织TIMP-1的基因表达逐渐增强，并与肝纤维化程度密切相关[12]. 本研究显示模型对照组MMP-2及TIMP-1mRNA均有较高表达，木苏丸治疗后MMP-2 mRNA表达无明显改变，而TIMP-1 mRNA表达降低. 上述结果与本课题前期试验免疫组织化学结果相符，进一步证实木苏丸缓解肝纤维化的作用可能与其抑制TIMP-1 mRNA表达，从而促进胶原降解有关，而不是通过影响MMP-2mRNA的表达起作用. TIMP的生物合成与活性受很多因素影响，但主要是通过改变基因转录来调节的[13]. 有必要研究TIMP-1的表达调控机制，选择以抑制TIMP-1的表达作为抗肝纤维化的作用靶点，为逆转纤维化机制及药物研究提供有利依据.

4 参考文献

1 李东, 李兵顺. 肝纤维化逆转研究近况. 实用肝脏病杂志 2003;6:53-55

2 George J, Rao KR, Stern R, Chandrakasan G. Diethylnitrosamine-inducedliverinjury in rats:the early deposition of collagen. *Toxicology* 2001;156:129-138

3 杨文卓, 曾民德, 范竹萍, 茅益民, 陆伦根, 曹爱平. 氧化苦参碱防治二甲基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化的实验研究. 中华消化杂志 2003;23:165-168

4 黄月红, 张丽娟, 李丹, 陈治新, 王小众. IL-10对实验性肝纤维化大鼠基质金属蛋白酶-2影响的研究. 肝脏 2001;6:162-164

5 曹名波. 基质金属蛋白酶-2、-9在大鼠肝纤维化中的表达及意义. 新乡医学院学报 2004;21:252-254

6 陈治新, 陈运新, 翁山耕, 黄月红, 张莉娟, 王小众. PDGF对肝星状细胞表达MMP-2及TIMP-1的影响. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:46-48

7 谢彦华, 李里, 王立娥, 刘春荣, 傅宝玉. 基质金属蛋白酶-2、-9与肝纤维化. 临床肝胆病杂志 2002;18:82-83

8 李东, 李兵顺, 刘金星, 甄真. 大鼠肝纤维化逆转机制研究. 肝脏 2002;7:183-184

9 李东, 李兵顺, 刘金星. 晚期肝硬化大鼠停止造模后MMP-2, TIMP-1表达的动态变化. 实用医学杂志 2002;18:572-573

10 王宇, 高毅, 黄宇琦, 方石岗, 杨继震. 实验性肝纤维化间质胶原酶表达的研究. 中华消化杂志 2000;20:67

11 段志军, 胡祥. 免疫性肝纤维化中肝组织中基质金属酶1及其抑制因子1的表达. 中华消化杂志 2002;22:566-567

12 朱跃科, 申凤俊, 王宝恩, 马红, 贾继东. 二甲基亚硝胺肝纤维化过程中金属蛋白酶组织抑制因子1基因表达的动态变化. 临床和实验医学杂志 2002;1:147-150

13 林海燕, 王红梅, 祝诚. 转化生长因子-β对基质金属蛋白酶及其组织抑制因子调控的研究进展. 生物化学与生物物理进展 2003;30:7-11

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):358-362
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

去甲肾上腺素对一氧化氮在小鼠十二指肠肌条收缩中作用的影响机制

王晓敏, 胡还忠, 余承高, 马立群, 汪长东, 田 琴

王晓敏, 胡还忠, 余承高, 马立群, 汪长东, 田琴, 华中科技大学同济医学院生理系 湖北省武汉市 430030
王晓敏, 女, 1978-12-01 生, 湖北省黄石市人, 汉族, 华中科技大学同济医学院生理学硕士, 主要从事消化道电生理研究.
项目负责人: 胡还忠, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院生理系. huhuanzh@163.com
电话: 027-83630850
收稿日期: 2004-11-09 接受日期: 2004-12-08

Effect of noradrenaline on nitric oxide action in the contraction of mouse duodenal muscle strips

Xiao-Min Wang, Huan-Zhong Hu, Cheng-Gao Yu, Li-Qun Ma, Chang-Dong Wang, Qin Tian

Xiao-Min Wang, Huan-Zhong Hu, Cheng-Gao Yu, Li-Qun Ma, Chang-Dong Wang, Qin Tian, Department of Physiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Huan-Zhong Hu, Department of Physiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. huhuanzh@163.com
Received: 2004-11-09 Accepted: 2004-12-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of nitric oxide (NO) on the contraction of isolated mouse duodenal muscle strip (DMS), and the influence of noradrenaline (NA) on the action of NO.

METHODS: DMS isolated from mice were suspended in tissue chambers containing Krebs solution (10 mL, 37±1℃), with a continuing supply of gas mixture (950 mL/LCO_2, 50 mL/LO_2) from the bottom. L-Arg was used to produce NO. Contraction of DMS in the presence of NO and NA was recorded with tension transducer. ODQ (inhibitor of sGC), L-NNA (general inhibitor of NOS), and phentolamine (blocker of α adrenergic receptor) were used to explore the relationship between NO and NA.

RESULTS: L-Arg at concentrations from 2×10^{-5} to 2×10^{-2} mol/L decreased the DMS contractile amplitude in a dose-dependent manner ($P<0.001$). No significant effect was observed when L-Arg was used at the concentration of 2×10^{-6} mol/L. Similarly, NA dose-dependently decreased the DMS contractile amplitude at concentrations ranging from 1.2×10^{-7} to 1.2×10^{-4} mol/L ($P<0.001$), but no significant effect was noted at 2×10^{-8} mol/L. At 1.2×10^{-8} mol/L, NA increased the effect of L-Arg at concentrations from 2×10^{-6} to 2×10^{-3} mol/L on the contraction of DMS ($P<0.001$); Furthermore, at 1.2×10^{-6} mol/L, NA enhanced the effect L-Arg at all concentrations from 2×10^{-6} to 2×10^{-2} mol/L ($P<0.001$). This effect of L-Arg was inhibited by L-NNA, ODQ and phentolamine ($P<0.001$).

CONCLUSION: NO can inhibit the contraction of the DMS, which can be synergized by NA through augmenting NO synthase activity or via a post-receptor mechanism.

Key Words: Noradrenaline; Nitric oxide; Duodenal muscle strips; Contraction;

Wang XM, Hu HZ, Yu CG, Ma LQ, Wang CD, Tian Q. Effect of noradrenaline on nitric oxide action in the contraction of mouse duodenal muscle strips. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(3): 358-362

摘要

目的: 观察一氧化氮(nitric oxide，NO)对离体小鼠十二指肠肌条收缩幅度及去甲肾上腺素(noradrenaline，NA)对NO作用的影响;探讨NA和NO之间的关系及影响机制.

方法: 将分离的小鼠十二指肠肌标本置于10 mL 37 ± 1℃新鲜配置的Krebs液的浴槽中，从浴槽底部持续通入950 mL/LCO_2和50 mL/LO_2的混合气体.通过张力换能器记录张力变化，观察NO对十二指肠肌条收缩幅度及NA对NO作用的影响，用多种拮抗剂或抑制剂左旋－硝基精氨酸(L-NNA)、酚妥拉明、ODQ探讨NA与NO之间的关系.

结果: L-Arg对肌条的收缩幅度有明显的抑制作用，在浓度2×10^{-2}–2×10^{-6} mol/L范围内呈剂量－效应关系.除2×10^{-6} mol/L组外，其余各浓度的L-Arg与对照组均有显著性差异($P<0.001$).NA对肌条的收缩幅度有明显的抑制作用，在浓度1.2×10^{-4}–1.2×10^{-8} mol/L范围内呈剂量－效应关系.除1.2×10^{-8} mol/L组外，其余各浓度的NA与对照组均有显著性差异($P<0.001$).用无反应剂量1.2×10^{-8} mol/L的NA孵育标本后加入浓度为2×10^{-3}，2×10^{-4}，2×10^{-5}，2×10^{-6} mol/L的L-Arg对肌条收缩幅度的抑制作用明显增强，与单独L-Arg组的作用相比差异有显著性($P<0.001$);而2 ×

10^{-2} mol/L L-Arg组与单独L-Arg组的作用相比差异无显著性.用1.2×10^{-6}mol/LNA孵育标本后加入L-Arg，各浓度的L-Arg与单独L-Arg组相比差别有显著性(P<0.001).分别用一氧化氮合酶(NOS)的抑制剂L-NNA，可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)抑制剂ODQ，α肾上腺素能受体阻断剂酚妥拉明均使NO对肌条收缩幅度抑制效应明显减弱，与对照组比较有显著性差异(P<0.001).

结论: L-Arg经NOS催化生成NO，NO与sGC结合，激活了NO的下游途径，从而抑制了十二指肠肌收缩.而NA可以增强NO的抑制效应，可能是通过α受体直接或间接影响了NOS的活性或者NO受体后机制.

关键词: 去甲肾上腺素; 一氧化氮; 十二指肠肌条收缩

王晓敏, 胡还忠, 余承高, 马立群, 汪长东, 田琴. 去甲肾上腺素对一氧化氮在小鼠十二指肠肌条收缩中作用的影响机制. 世界华人消化杂志 2005;13(3):358-362
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/358.asp

0 引言

NO是引起胃肠道舒张的非胆碱能非肾上腺素能(nonadrenergic noncholingeric, NANC)神经递质[1-2].近年研究发现，外源性NO对大鼠空肠环形肌，豚鼠结肠纵行肌，大鼠结肠环形肌，小鼠胃电活动和机械活动均有明显的抑制作用[3-4].电刺激离体肌条或内脏神经使NANC神经兴奋，导致消化道平滑肌舒张，同时NO生成明显增加.研究表明，整个消化道肌间神经丛中均有NOS阳性神经元分布.除多数NOS阳性神经元之间有突起相连外，个别NOS神经元与NOS阴性神经元之间也有突起相连，提示NO作为一种神经递质不仅可单独发挥作用，也可以与其他的神经递质或神经肽，如ACh，ATP，GABA，VIP等[5-8]相互协调，共同影响消化道的生理功能.NA是胃肠道中经典的神经递质，对胃肠道的运动有抑制作用.目前尚未见到小鼠十二指肠运动中NO与NA之间关系的报道.我们观察NO对小鼠十二指肠肌条收缩活动的影响，探讨NO与NA之间的关系以及可能的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 昆明小鼠40只，质量15-20 g，由华中科技大学同济医学院动物中心提供.ODQ(H-[1，2，4]Oxadiazolo[4，3-a]quinoxaline-1-one)，L-Arg，L-NNA(L^W-nitro-L-arginine)粉剂均购于Sigma公司.L-Arg和L-NNA由蒸馏水配制，ODQ溶解在二甲亚砜中.酚妥拉明购于上海旭东海浦药业有限公司，NA购自武汉远大制药集团股份有限公司.NaCl，KCl，$CaCl_2$，$MgSO_4$，$NaHCO_3$，KH_2PO_4，葡萄糖均为国产分析纯试剂.MS2000生物信号记录分析系统购于广州飞龙科技有限公司.张力换能器(JH-2.5 g)购于北京航天医学工程研究所.

1.2 方法 实验前小鼠禁食24 h，自由饮水.用颈椎脱臼法处死，沿腹白线迅速打开腹腔，暴露全胃，以胃幽门为起点剪取约5 cm长的全层肌条.迅速将肌条置于装有Krebs液的烧杯中.再制成约1 cm长的标本，将标本的一端固定于盛有10 mL，37±1℃新鲜配置的Krebs液的浴槽中，从浴槽底部持续通入950 mL/LCO_2和50 mL/LO_2的混合气体，pH = 7.4.Krebs液成分(mol/L):NaCl 119，KCl 4.5，$CaCl_2$ 2.5，$MgSO_4$ 2.5，KH_2PO_4 1.2，$NaHCO_3$ 25，葡萄糖 11.1[9].标本另一端与张力换能器相连，将肌条的收缩活动转化为电信号后，输入到MS2000生物信号分析记录系统，记录收缩曲线.标本置于浴槽后，给予200 mg的前负荷，平衡60 min，记录到有规律的收缩活动，中间每隔15 min换Krebs液1次.用微量注射器将一定浓度的药物在孵育液面下1-2 mm处沿管壁注入.观察和记录每种药物作用后，用37±1℃ Krebs液冲洗3次，平衡10-15 min，标本可完全恢复其节律性收缩.观察一组试剂的作用效果后，更换标本重复试验.在实验中根据不同试剂的浓度和作用时间段进行分组.观察L-Arg作用，分六组，每组10例.其中一组为Krebs液对照组，其余为剂量分别是2×10^{-6}，2×10^{-5}，2×10^{-4}，2×10^{-3}，2×10^{-2} mol/LL-Arg实验组.将NA分为1.2×10^{-8}，1.2×10^{-7}，1.2×10^{-6}，1.2×10^{-5}，1.2×10^{-4} mol/L 5个浓度组，每组各12例.再分别用1.2×10^{-8} mol/L和1.2×10^{-6} mol/L NA作用标本，以1 min为观察时间段，分为1 min，2 min，3 min，4 min，5 min 5个组，每组各10例.观察NA对NO作用，分两组，即1.2×10^{-8} mol/LNA孵育后L-Arg组;1.2×10^{-6} mol/LNA孵育后L-Arg组.组内将L-Arg的浓度分为5种，即2×10^{-6}，2×10^{-5}，2×10^{-4}，2×10^{-3}，2×10^{-2} mol/L(每种浓度n = 10).数据分析以曲线变化高度作为肌条收缩幅度.观察单一药物的作用，以给药前10 min内收缩幅度平均值为对照值，以给药稳定后收缩幅度平均值为效应值.药物孵育标本后给药，对照值为给药前的药物孵育稳定后收缩幅度平均值，效应值为给药稳定后收缩幅度平均值.以收缩幅度抑制比为指标，即抑制比 = (对照值-效应值)/对照值×100%.

统计学处理 数据以平均值±标准差(mean±SD)表达，由SPSS11.5软件进行统计学分析，用配对t检验判断加药前后的差异，用ANOVA检验组内和组间各浓度和各时间段之间差异，P<0.05有统计学差异.

2 结果

2.1 L-Arg对肌条收缩活动的影响 加入与L-Arg溶液

等温等体积的Krebs液对肌条收缩活动无影响. 2×10^{-6}–2×10^{-2} mol/L L-Arg对肌条收缩幅度有抑制作用(图1). 加药10 min稳定后，收缩幅度抑制比分别为0.72±0.81%，24.67±5.41%，39.05±2.49%，52.36±9.84%，67.35±9.54%. 除2×10^{-6} mol/L组加药前后无显著性差异外，其余各组加药前后均有显着性差异($P<0.001$). 随着浓度的减少，L-Arg对肌条收缩幅度的抑制减小，呈剂量—效应关系(图2).

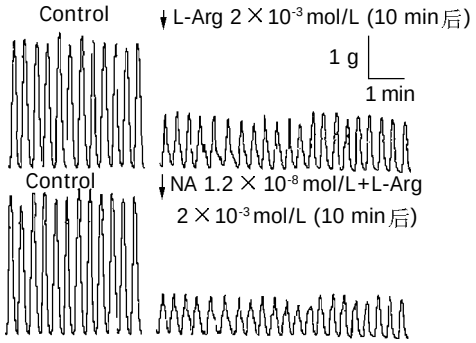


图1 2×10^{-3} mol/L L-Arg及NA孵育后2×10^{-3} mol/L L-Arg作用后小鼠十二指肠收缩曲线.

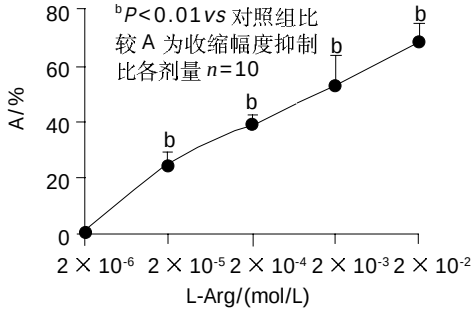


图2 L-Arg抑制小鼠十二指肠肌条收缩的剂量－效应曲线.

2.2 NA对NO抑制效应的影响 1.2×10^{-8}–1.2×10^{-4} mol/LNA对肌条收缩幅度的抑制比分别为0.02±0.06%，23.72±2.74%，36.89±5.82%，86.15±10.51%，100±1.00%. 除1.2×10^{-8} mol/L组加药前后无显著性差异外，其余各组加药前后均有显著性差异($P<0.001$). 各组之间均有显著性差异($P<0.001$). 随着NA浓度增加对肌条收缩幅度的抑制作用也增强，呈剂量—效应关系(图3). 以下实验NA选择1.2×10^{-6} mol/L和无反应剂量1.2×10^{-8} mol/L. 再分别用1.2×10^{-8} mol/L和1.2×10^{-6} mol/LNA作用标本，观察不同时间段作用. 其中3 min和4 min组，4 min和5 min组之间无显著性差异，其余各组均有显著性差异($P<0.001$). 表明孵育浓度NA在3 min抑制效果已趋于稳定(图4). 1.2×10^{-8} mol/LNA孵育肌条3 min，加入2×10^{-6}–2×10^{-2} mol/LL-Arg. L-Arg对肌条收缩幅度的抑制程度明显增加，抑制比分别为18.27±3.05%，36.93±6.84%，48.06±10.99%，56.36±9.84%，68.25±3.90%. 其中NA孵育后2×10^{-3}，2×10^{-4}，2×10^{-5}，2×10^{-6} mol/L L-Arg组与对应各浓度单独的L-Arg组之间有显著性差异($P<0.001$，图5). 而2×10^{-2} mol/L浓度孵育组与对应浓度单独的L-Arg组间无显著性差异. 表明1.2×10^{-8} mol/LNA可以增强较低浓度L-Arg的抑制效应. 1.2×10^{-6} mol/LNA孵育肌条3 min加入2×10^{-6}–2×10^{-2} mol/L L-Arg. 观察到L-Arg对肌条收缩幅度的抑制程度明显增强，抑制比分别为28.14±5.45%，46.93±6.24%，63.23±9.84%，74.36±8.40%，78.13±11.54%. 各组与对应各浓度单独的L-Arg组之间有显著性差异($P<0.001$). 表明1.2×10^{-6} mol/LNA可以增强各浓度L-Arg的抑制效应.

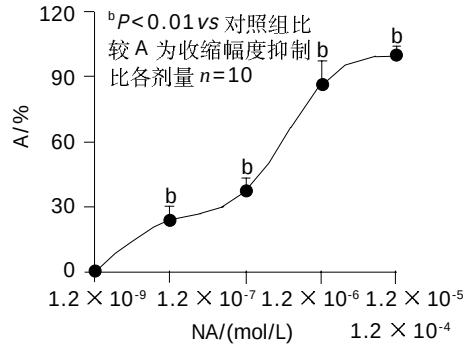


图3 去甲肾上腺素对小鼠十二指肠肌条收缩的剂量－效应曲线.

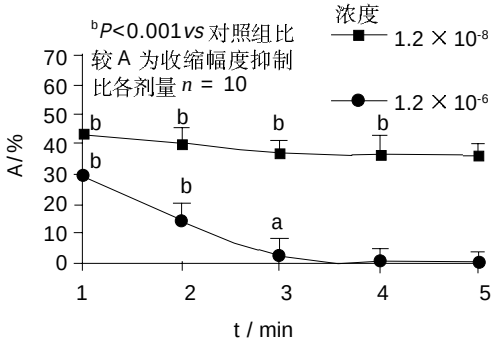


图4 孵育浓度NA的时间效应曲线.

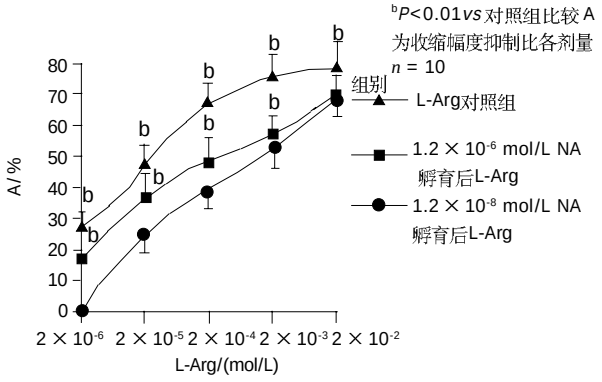


图5 NA孵育后L-Arg与L-Arg的曲线比较.

2.3 NO作用的影响因素 广谱NOS的抑制剂3×10^{-4} mol/L L-NNA孵育肌条5 min对收缩有增强作用(-18.15±

4.77%，$P<0.05$)，表明内源性NO参与了肌条的活动.再加入2×10^{-3} mol/L L-Arg(n = 10)则抑制肌条收缩幅度的效应减弱，其抑制比为7.64±3.34%，与单独L-Arg组(52.36±9.84%)之间有显著性差异($P<0.001$，图6).sGC的抑制剂3×10^{-6} mol/L ODQ孵育肌条5 min能增强收缩活动(-13.25±3.65%)，与加药前比较有统计学差异($P<0.05$).再加入2×10^{-3} mol/L L-Arg(n = 10)则抑制肌条收缩幅度的效应减弱，抑制比为43.64±8.63%，与单独L-Arg组(52.36±9.84%)之间有显著性差异($P<0.001$，图6).表明L-Arg的抑制作用中有sGC参与.4×10^{-6} mol/L酚妥拉明孵育肌条5 min能增强收缩幅度(-9.65±3.82%)，与加药前比较有显著性差异($P<0.001$).再加入2×10^{-3} mol/LL-Arg(n = 10)则抑制肌条收缩幅度的效应减弱，抑制比为47.29±5.26%，与单独L-Arg组(52.36±9.84%)之间有差异($P<0.05$，图6).表明酚妥拉明可以部分抑制L-Arg的作用.3×10^{-4} mol/L L-NNA孵育肌条5 min加入2×10^{-3} mol/LL-Arg，则抑制肌条收缩幅度的效应减弱，抑制比为7.64±3.34%，与单独L-Arg组(52.36±9.84%)之间有差异($P<0.001$，图6).3×10^{-4}mol/L L-NNA孵育肌条5 min加入1.2×10^{-8}mol/L NA，2 min后再加入2×10^{-3} mol/L L-Arg，抑制比为21.79±6.77%，与单独L-Arg组(52.36±9.84%)以及NA1.2×10^{-8}和L-Arg2×10^{-3} mol/L组(56.36±9.84%)都有显著性差异($P<0.001$，图6).

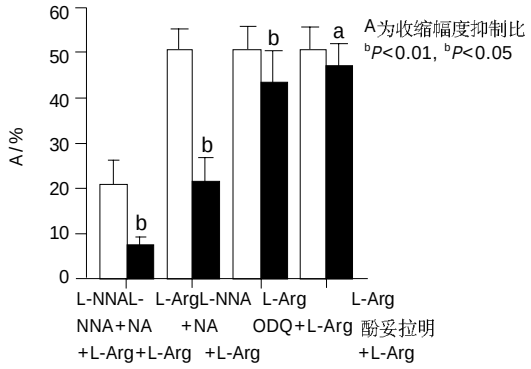


图6 拮抗剂/阻断剂对L-Arg抑制剂条收缩幅度效应的影响.

3 讨论

L-Arg经NOS催化生成胍氨酸和NO.我们的结果表明，NO对肌条自发节律性收缩幅度有抑制作用.L-Arg在浓度2×10^{-2}-2×10^{-6} mol/L范围内呈浓度-效应关系.低浓度L-Arg(2×10^{-6} mol/L)对肌条收缩幅度无影响，而高浓度(2×10^{-2} mol/L)对肌条收缩有明显的抑制作用.用L-NNA孵育肌条，观察到肌条的收缩幅度增加，说明肠道中有内源性NO的存在并发挥作用;然后再加入L-Arg，发现NO的作用将近90%被抑制，而无100%抑制，推测是因为L-NNA的浓度不足以全部抑制NO的生成.ODQ是sGC的抑制剂，加入ODQ后，使肌条的收缩幅度增加，表明sGC也参与影响肠道运动;然后再加入L-Arg，NO的抑制作用减弱，可见NO的作用途径中需要sGC的参与.近年的研究表明，NOS为一个双区结构，C端为还原酶区，含有钙调蛋白(CaM)结合位点;N端为氧化酶区，含有L-Arg的结合位点，此区也与酶的催化活性有关.L-Arg进入神经末梢后，激活电压依赖式Ca^{2+}通道，Ca^{2+}内流，使得末梢内的[Ca^{2+}]增加.Ca^{2+}与CaM结合，激活NOS[10].L-Arg在NOS的催化下，生成NO.而L-NNA是L-精氨酸的类似物，为广谱的NOS的抑制剂，可与L-Arg竞争NOS N端的结合位点，从而减少NO的生成.由神经细胞生成的NO从神经末梢自由穿出，与效应细胞中的最初受体即sGC血红素基序结合，使酶发生变构效应而被激活，使得cGMP生成增加，进一步激活了cGMP依赖性蛋白激酶[11]，导致Ca^{2+}通道关闭和Ca^{2+}依赖性K^+通道的开放[12]，使得肌肉收缩减弱.

交感神经末梢释放NA，通过NA受体对胃肠运动起抑制作用.NAα，β均为G蛋白偶联受体，其中α受体主要分布在肠肌间神经丛中的神经元上.NA对小肠运动的抑制性影响，是通过α受体作用[13].A的浓度在1.2×10^{-4}-1.2×10^{-8} mol/L对小鼠十二指肠肌条的收缩幅度有明显的抑制作用，呈剂量-效应关系.提示NA是十二指肠运动中非常重要的抑制性神经递质.分别用无反应剂量(1.2×10^{-8} mol/L)和有效剂量(1.2×10^{-6} mol/L)的NA孵育肌条后再加入L-Arg，L-Arg的抑制作用明显增强;酚妥拉明是αNA受体的抑制剂，他可以部分阻断NA的作用.用酚妥拉明孵育肌条后，再加入L-Arg，L-Arg的抑制作用明显减弱，说明NA与NO抑制作用增强有关.L-NNA加入后再加入L-Arg(7.64±3.34%)，与L-NNA加入后再加入NA和中效量L-Arg(21.79±6.77%)相比，L-Arg抑制比前者比后者要小.可见L-NNA对NO作用的抑制要比对NA孵育后的NO作用的抑制要大.推测可能是由于NA通过某种途径直接或间接增强了NOS的活性，而L-NNA不足以抑制NOS，使得NO的生成增多，也有可能促进了NO的释放或者通过α受体影响NO的受体后机制，而对于NA促进NO作用的确切机制有待进一步的研究.

总之，NO和NA均可抑制小鼠十二指肠肌条收缩，并且NA尚有增强NO的作用，这些效应可能是通过增强神经元末梢的NOS的活性或影响NO的受体后机制实现的.

4 参考文献

1 Martin MJ, Jimenez MD, Motilva V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. *Curr Pharm*

Des 2004;10:2483-2497
2 Curro D, Preziosi P. Non-adrenergic non-cholinergic relaxation of the rat stomach. *Gen Pharmacol* 1998;31:697-703
3 Vanneste G, Robberecht P, Lefebvre RA. Inhibitory pathways in the circular muscle of rat jejunum. *Br J Pharmacol* 2004;143:107-118
4 Mule F, Serio R. NANC inhibitory neurotransmission in mouse isolated stomach:involvement of nitric oxide, ATP and vasoactive intestinal polypeptide. *Br J Pharmacol* 2003;140:431-437
5 Van Geldre LA, Lefebvre RA. Interaction of NO and VIP in gastrointestinal smooth muscle relaxation. *Curr Pharm Des* 2004;10:2483-2497
6 Peng X, Feng JB, Yan H, Zhao Y, Wang SL. Distribution of nitric oxide synthase in stomach myenteric plexus of rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:852-854
7 Pluja L, Fernandez E, Jimenez M. Neural modulation of the cyclic electrical and mechanical activity in the rat colonic circular muscle:putative role of ATP and NO. *Br J Pharmacol* 1999;126:883-892
8 Allescher HD, Kurjak M, Huber A, Trudrung P, Schusdziarra V. Regulation of VIP release from rat enteric nerve terminals:evidence for a stimulatory effect of NO. *Am J Physiol* 1996;271:G568-574
9 Boeckxstaens GE, Pelckmans PA, Bult H, Deman JG, Herman AG, Van Maercke YE. Evidence for nitric oxide as mediator of non-adrenergic non-cholinergic relaxation induced by ATP and GABA in the canine gut. *Br J Pharmacol* 1991;102:434-438
10 Busse R, Mulsch A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett* 1990;265:133-136
11 Rapoport RM, Murad F. Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracicaorta may be mediated through cyclic GMP. *Circ Res* 1983;52:352-357
12 Craven PA, Derubertis FR. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide and related activators by heme and heme proteins:evidence for the involvement of the paramagnetic nitrosylheme complex in enzyme activation. *J Biol Chem* 1978;253:8433-8443
13 周吕, 柯美云. 自主神经系统与胃肠运动. 胃肠动力学基础与临床. 北京:科学出版社, 1999:55-56

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库. 该库收录自1995-2004年，国内生物医学期刊1191种发表的各类基金资助论文摘要155115条，其中国家基金资助的论文为70167条(45.23%)，其他基金资助的论文为84948条(54.76%).

1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索，高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助)，期刊搜索(A-Z排序). **论文排序**: 期刊论文数，点击论文数.

2 网址

中国生物医学基金论文摘要(http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp)

3 论文摘要格式

贺修胜，陈主初，田芳，肖志强，贺智敏，关勇军，李峰，何春梅，袁建辉.鼻咽癌中染色体3p21区域一个表达下调的EST的鉴定. 癌症 2003年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体3p21区域一个表达下调的EST的鉴定

贺修胜，陈主初，田芳，肖志强，贺智敏，关勇军，李峰，何春梅，袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287，30000188)

背景与目的:研究显示鼻咽癌细胞3p14-25存在高频率杂合性丢失位点. 本研究拟寻找与筛选染色体3p21区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(express ed sequence tag，EST)，为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础. 方法:充分利用网上的生物信息资源，采用定位查找ESTs，对ESTs进行同源性比较分析、筛选;运用逆转录PCR(reverse transcription-PCR，RT-PCR)方法，检测ESTs在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达;并用Northern blot杂交方法，检测EST在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况. 结果:在3p21区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的EST(N31985)，在60.00%(3/5)的鼻咽癌细胞株及47.06% (16/34)的鼻咽癌活检组织检测到有EST(N31985)表达下调，与正常鼻咽上皮组织相比较，差异有统计学意义(P<0.05). 结论:染色体3p21区域EST(N31985)在鼻咽癌中表达下调，提示其可能参与鼻咽癌癌变过程. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):363-366
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 文献综述 REVIEW •

高强聚焦超声技术对肝癌血道播散的影响

李 宁,李富宇,肖路加

李宁,李富宇,肖路加,四川大学华西医院普外科,海扶治疗中心
四川省成都市 610041
项目负责人:李富宇,610041,四川省成都市,四川大学华西医院普外科、海扶治疗中心.lfy_74@vip.163.com
收稿日期:2004-11-01 接受日期:2004-12-21

摘要

高强度焦超声技术在毁损肝癌病灶的同时,是否促进肝癌细胞的血道播散?鉴于高强度焦超声技术对肿瘤及其营养血管的迅速凝固毁损和对机体免疫力的调节作用,该技术可能并不增加肝癌细胞血道转移的机率,反而可能会抑制其血道转移.

李宁,李富宇,肖路加.高强聚焦超声技术对肝癌血道播散的影响.世界华人消化杂志 2005;13(3):363-366
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/363.asp

0 引言

在我国原发性肝癌已成为死亡率占第二位的恶性肿瘤.其侵袭转移是影响肝癌患者6 199预后的重要因素,也是肝癌治疗失败的主要原因之一.目前肝癌的治疗仍首推早期手术切除.但由于手术对肝癌患者有一定的特殊要求,使中、晚期肝癌,特别是伴有肝硬化、肝功不全及术后复发和转移性肝癌的治疗非常困难.仅有20%的肝癌患者可以接受以手术为主的综合治疗[1].非手术疗法已成为多数肝细胞癌(HCC)患者的重要治疗手段.

近年来,介入栓塞、激光、冷冻、微波、射频和酒精注射等非手术疗法在治疗无法手术切除的HCC患者中取得了一定的疗效,但目前这些技术尚存在非适行性、有创性、治疗范围不易控制和较难使治疗区剂量均匀分布等局限性[1-2].与上述非手术疗法相比,高强度焦超声技术(HIFU)可能有更广阔的临床应用前景.HIFU虽为非侵入性治疗技术,但却可根据外科切除肿瘤的原则,利用高能量超声波产生的瞬态高温(肿瘤局部骤升达70℃以上)和空化效应,对任意大小和形状的肿瘤实行三维运动性扫描的适形治疗,直至完全覆盖、"破坏"病灶,因而又被称为聚焦超声外科技术.HIFU治疗中可实时监控,使整个治疗成为一个可视和可控的过程,而且靶区内的能量分布均匀,这充分的保证了其治疗的安全性、有效性和优越性.但该方法是否促进肝癌细胞血行播散,本文综述如下.

1 HIFU对肝癌治疗的总体疗效

临床和实验研究均表明,HIFU可凝固、杀死肝癌细胞,抑制肿瘤的生长和复发,被认为是十分有前途的肝癌非手术疗法[3-8].Haar和Yang *et al*[9-10]对大鼠移植性肝癌进行HIFU治疗的一系列研究发现,治疗后3、7、14、21、28 d的肿瘤抑制率分别为65.4%,88.2%,92.1%,89.2%,93.1%,治疗组8只大鼠中有6只在28 d处死时发现肿瘤停止生长,肿瘤体积小于接种时.增加治疗次数可提HIFU扶的疗效.Yang和Prat *et al*[11-13]的研究表明,单次HIFU治疗的治愈率为47-76.3%,若经两次HIFU治疗的治愈率则可增加到67-94.2%.在HIFU的临床研究方面,亦证实了其治疗能够使肝癌肿瘤凝固坏死、体积缩小,血清AFP明显下降,且患者的临床症状也均有不同程度改善[4-6].

HIFU对晚期肝癌亦有较好的疗效.他不仅可能达到完全凝固肝肿瘤或明显抑制肿瘤的生长的效果,而且具有延长肝癌荷瘤鼠的生存时间和减少肿瘤复发、转移的作用[8-16].近期,Yang *et al*[10]的研究又发现,如将HIFU与阿霉素联合应用,荷瘤大鼠的生存时间将进一步延长,疗效明显优于单独应用阿霉素或HIFU治疗,联合应用组的12只大鼠中有3只取得了150 d无肿瘤生长的接近治愈标准的治疗效果.另外,肝癌细胞体外培养的研究也证实了HIFU与化疗药物的协同杀伤作用[17],因而临床中可考虑将HIFU与化疗联合应用以提高疗效,并进一步抑制肿肿瘤的复发和转移.

2 HIFU对肝癌血道转移的影响

肿瘤的血道转移是一个多步骤的复杂过程.由于肿瘤细胞间的吸附力较正常组织差,因而易脱落入血.但肿瘤自原发灶脱落、播散入血循环仅是发生转移的前提,肿瘤细胞还需经受机体的免疫监视和血流机械力的破坏,在远离其原有的激素和营养环境处附着、入侵、渗透,最终形成具有血管的肿瘤转移灶[18-19].研究表明,循环血中0.01%的癌细胞可沉积形成转移灶,而绝大多数的癌细胞则被清除[20-21].目前,国外大多数实验研究支持HIFU治疗并不增加血道转移的机率.

Frat *et al*[22]在应用HIFU治疗兔Vx_2肝癌的研究结果提示,HIFU在抑制肿瘤生长的同时,可减少肿瘤的复发和转移机率.孔凡斌*et al*[15]的研究表明,HIFU可使具有高度远处转移倾向性的兔晚期Vx_2肝癌达到接近治愈的标准.Bouvier *et al*[23]用HIFU治疗兔体表Brow-pierce瘤时也发现,用HIFU破坏肿瘤后,其播散结节也随之消失.Osterhof *et al*[14]的实验结果亦表明HIFU在毁损肿瘤的同时,并不增加其血道转移的机率.我们[24]曾通过观察HIFU治疗前后外周血AFP mRNA的变化,来探讨其对肝癌细胞血道播散的影响,发现治疗前AFPmRNA

阳性的病例，部分患者可于术后7 d时转为阴性，肿瘤直径≤8 cm的患者的AFPmRNA阴转率明显高于肿瘤直径＞8 cm的患者，这可能是HIFU对直径≤8 cm的肿瘤毁损较完全缘故.19例患者中仅有2例术前AFPmRNA阴性的病例于术后转为阳性，提示HIFU不仅不增加血道转移的机率，反而可能会抑制肝癌细胞的血道转移.

3 HIFU抑制肝癌血道转移的作用机制

3.1 HIFU对机体免疫力的调节作用 HIFU在杀死癌细胞，造成肿瘤大部分或全部坏死，即从机能上切除肿瘤的同时，解除了癌肿对机体免疫功能的抑制，提高宿主的抗肿瘤免疫.对荷瘤鼠经HIFU治疗后的免疫功能的检测表明，术后的粒细胞计数、NK细胞、T淋巴细胞转化功能均明显增强，这种效应于术后1 wk时达到高峰[25-26].另对W_{256}肝癌鼠经HIFU治疗后肿瘤周围CD_4^+/ CD_8^+免疫T淋巴细胞的免疫组化研究表明，HIFU治疗可使肿瘤与正常组织交界处CD_4^+、CD_8^+细胞数量明显增加，甚至高于正常肝脏数量，提示HIFU可改善和纠正肿瘤导致的机体免疫紊乱状态，促进免疫细胞的局部抗肿瘤免疫反应[27].Rosberger *et al*[28]的研究也得出类似结果.

HIFU可通过多种途径增强机体的免疫力，发挥抗肿瘤免疫和防止其血道转移的作用，其他可能的免疫调节机制为:(1)HIFU可通过其热效应和空化效应使肝癌细胞表面抗原决定簇暴露，增加肝癌细胞的抗原性，使之易于刺激宿主产生免疫应答，诱发抗肿瘤免疫，这有利于预防肝癌的复发和转移[16，25-26].另外，HIFU的空化效应可通过其焦点处产生的强烈负压力破坏细胞膜结构，将肿瘤撕裂成碎片.理论上讲，这种非热效应产生的细胞碎片的蛋白质结构相对保持完整，成为更具有免疫原性的抗原，为机体提供了自体灭活的肿瘤疫苗.有研究报道HIFU照射不仅为肿瘤疫苗的制备提供了新途径[29].(2)HIFU可促进肿瘤组织合成热休克蛋白，刺激宿主产生免疫应答.(3)HIFU产生的热效应，可以解除肿瘤细胞分泌的封闭因子、巨噬细胞移动抑制因子等对宿主免疫系统的抑制作用，使宿主恢复对肿瘤的免疫应答反应.(4)HIFU可以使一些生物活性物质如IL-1、IL-2等在肿瘤组织中聚集，对宿主的抗肿瘤免疫进行调节[10，25，30].HIFU对机体免疫功能的这些正向调节机制均有利于延长肿瘤患者的生存时间和减低肿瘤复发、血道播散转移的机率.

3.1 HIFU对肝癌血管的破坏作用 肿瘤的营养血管是肿瘤生长和转移的形态学基础.研究表明，肿瘤生长到2-3 mm大小时即需要通过微血管网获得营养[31]，营养血管不仅向肿瘤提供充足的营养物质和生长所需的细胞因子，而且也是肿瘤侵袭转移的重要环节.由于肿瘤营养血管的自身基质不完善、缺乏平滑肌支持、通透性增高等原因，肿瘤可通过微血管不断向宿主输出肿瘤细胞[32-34].HIFU可在完全覆盖整个肝癌病灶的情况下，使肿瘤的营养血管凝固坏死，达到“肿瘤良性化”的目的.其中直径小于0.2 mm的营养血管立即被破坏，而肿瘤附近的大血管并无明显副损伤，说明HIFU在治疗大血管附近的肝癌是安全的[35-36].对HIFU治疗后实验动物肝肿瘤的连续切片发现，肿瘤及其营养血管可达到完全凝固坏死的标准;血管造影亦显示肝癌血管影明显减少或消失[37-39].临床上也观察到肝癌患者经HIFU治疗后，MRI显示靶区内血供消失，靶区边缘出现环状增强带，证明肿瘤及其血供破坏完全[40].

HIFU对血管内皮生长因子(VEGF)等血管再生因子的多环节阻断，也有利于减少肿瘤的生长和转移.VEGF是目前已知作用最强和最特异性的血管生成因子.研究表明，肝癌患者外周血和癌组织中VEGF表达水平与肝癌生长、转移呈正相关.VEGF已成为预测肝癌预后和远处转移的一项理想指标[41-45].HIFU可使肿瘤组织凝固坏死并阻止其产生VEGF等血管再生因子;且对已经产生的血管再生因子具有灭活作用.HIFU还可破坏再生的血管内皮及其形成的管腔[11,14,36].

4 HIFU与介入栓塞对肝癌血道播散影响的对比.

HIFU对肝癌及其营养血管的毁损作用方式与介入栓塞(TACE)不同.后者主要通过阻断肿瘤的主要血供，使肿瘤继发性缺血、缺氧和慢性坏死.但TACE在使肿瘤发生慢性坏死的同时，也因缺氧、酸中毒等因素促进肝癌分泌VEGF增多[46].另外，TACE并不能完全保证对肿瘤内微血管的栓塞.肿瘤微血管的栓塞不全、血管再通及侧支循环的建立均可发生缺血再灌注损伤，产生TNF-2，从而诱导肝癌大量分泌VEGF[47-48].有些研究表明，TACE术后VEGF表达增高，可促进肝癌细胞的血道播散[49-50].HIFU则主要是通过肿瘤局部温度骤升至70℃以上的热效应和空化效应迅速凝固毁损肿瘤及其营养血管，对肿瘤及其微血管的毁损较TACE更加完全，而且肿瘤组织的迅速凝固也不利于其侧支循环的建立.HIFU治疗不存在TACE治疗中的肿瘤慢性缺血，缺氧和再灌注损伤等刺激，因而可能不增加VEGF的产生，而且其对VEGF的灭活作用，可能会减低VEGF的表达.

鉴于TACE可能促进肿瘤的血管播散，有学者建议联合应用HIFU治疗来提高疗效.研究表明，TACE所应用的碘油可阻截HIFU声束，使之最大强度地将能量集中于碘油聚集的肿瘤部位，可以提高HIFU的热效应[51].与应用血管内注射微气泡的方法相比，碘油可更大程度的提高HIFU的空化效应[52]，使其对肝癌微血管的破坏更完全、更具靶向性.HIFU与TACE联合应用，不仅解决了TACE术后肝癌细胞转移的倾向，而且解决了HIFU治疗前的定位问题，HIFU与碘化油的协同升温效应也有助于更彻底毁损肿瘤[51，53].临床中已有联合应用HIFU与TACE来提高肝癌治疗效果的报道[54].

目前，大多数研究认为HIFU不增加血道转移.鉴于HIFU对免疫系统的正向调节及其对肿瘤和营养血管的同时毁损作用，HIFU可能会抑制肿瘤的血道转移.而且随着超声技术的不断提高，HIFU的性能有了较大改善，可完全毁损肿瘤的直径逐渐增加，目前最大已达13 cm.但

对于那些由于肿瘤直径较大或技术原因不能一次完全毁损的肝癌，可能有促进肝癌血道转移的倾向. 对这部分病例可考虑近期内再次行HIFU治疗直至病灶完全毁损，也可考虑联合应用化疗或加大剂量至IFN-1b，以抑制其血道转移[13, 55]. 尽管如此HIFU还是为晚期肝癌的治疗提供了一种全新、有效的治疗途径，亦为晚期肝癌的无创性治疗开创了新篇章，其三维运动性扫描的热效应与空化效应、可控性、微创性等优点是其他非手术疗法无法比拟的. 随着超声医学和计算机科学的进步，HIFU的性能将有更大的提高，其临床应用前景也将更加广阔.

5 参考文献:

1 Farmer DG, Rosove MH, Shaked A, Busuttil RW. Current treatment modalities for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 1994;219:236-247

2 Nagasue N, Galizia G, Kohno H, Chang YC, Hayashi T, Yamanoi A, Nakamura T, Yukaya H. Adverse effect of preoperative hepatic artery chemoembolization for respectable hepatocellular carcinoma:retrospective comparision of 138 liver resection. *Surgery* 1998;106:81-86

3 五智彪, 伍烽, 王芷龙, 张吉, 杜永红, 刘渝根, 陈迅, 刘川. 高强度聚焦超声抑制H_{22}肝癌生长的作用. 中国超声医学杂志 1997;13:5-7

4 伍烽, 王智彪, 陈文直, 白晋, 朱辉, 邹建中, 黎克全, 张吉, 曹友德, 高根五. 高强度聚焦超声体外破坏原发性肝癌的病理改变. 中华肿瘤杂志 2001;23:237-239

5 伍烽, 陈殖, 白晋, 刘长安, 邹建中, 徐昆, 朱辉, 王芷龙, 五智彪. 高强度聚焦超声治疗肝癌及疗效的初步临床观察. 中华超声影像医学 1999;8:213-216

6 邹建中, 伍烽, 李佩希, 廖翠容, 陈文直, 朱辉, 谢昭鹏, 彭剑萍, 张欲晓, 曹玲, 卢岷, 白晋, 王芷龙, 五智彪. 超声监控超声聚焦刀治疗肝癌及疗效评价观察. 中国超声医学 2000;16:766-768

7 李传行, 徐国良, 黎建军, 罗广裕. 高强度聚焦超声治疗肝癌的近期疗效分析. 中华肿瘤杂志 2003;25:94-96

8 姚和瑞, 谢德荣, 滕虹, 祁超, 李志花, 江志敏, 林显敢, 梁新文, 刘天浩. 高强度聚焦超声热疗治疗晚期原发性肝癌疗效观察. 新医学 2003;34:303-305

9 Hear G, Rivens I, Chen L, Riddler S. High intensity focused ultrasound for the treatment of rat tumor. *Phy Med Biol* 1991;36:1495-1501

10 Yang R, Reilly CR, Rescorla FJ, Sanghvi NT, Fry FJ, Franklin TD Jr, Grosfeld JL. Effect of high-intensity focused ultrasound in the treatment of experimental neurablastoma. *J Ped Surg* 1992;27:246-250

11 Yang R, Reilly CR, Rescorla FJ, Faught PR, Sanghvi NT, Fry FJ, Franklin TD Jr, Lumeng L, Grosfeld JL. High intensity focused ultrasound in the treatment of experimental liver cancer. *Arch Surg* 1991;126:1002-1009

12 Prat F, Ponchon T, Berger F, Chapelon JY, Gagnon P, Cathignol D. Hepatic lesions in the rabbit induced by acoustic cavitation. *Gastroenterology* 1991;100:1345-1350

13 伍烽, 王芷龙, 张吉, 杜永洪, 马渝根, 陈迅, 刘川, 王智彪. 高强度聚焦超声治疗剂量与抑制H_{22}肝癌生长效应的关系. 中国超声医学 1999;13:1-4

14 Oosterhof GO, Cornel EB, Smits GA, Debruyne FM, Schalken JA. Influence of high-intensity focused ultrasound on the of metastases. *Eur Urol* 1997;32:91-95

15 孔凡斌, 伍烽, 白晋, 王芷龙, 王见文, 王智彪. 术中高强度超声治疗晚期实验性肝癌. 中华超声影像杂志 1999;8:251-253

16 Prat F, Centarti M, Sibille A, Abou el Fadil FA, Henry L, Chapelon JY, Cathignol D. Extracorporeal high intensity focused ultrasound for VX2 liver tumors in the rabbit. *Hepatology* 1995;21:832

17 Sibille A, Prat F, Chapelon JY, abou el Fadil F, Henry L, Theilliere Y, Ponchon T, Cathignol D. Characterization of extracorporeal ablation of normal and tumor bearing liver tissue by high intensity focused ultrasound. *Med Biol* 1993;19:803-813

18 薛开先. PCR技术与实体瘤微转移的研究. 国外医学、遗传学分册 1997;20:227-230

19 Fadlon EJ, Rees RC, McIntyre C, Sharrard RM, Lawry J, Hamdy FC. Detection of circulating prostate-specific antigen-positive cells in patients with prostate cancer by flow cytometry and reverse transcription polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1996;74:400-405

20 Hamdy FC, Lawry J, Anderson JB, Parsons MA, Rees RC, Williams JL. Circulating prostate specific antigen-positive cells correlate with metastatic prostate cancer. *Br J Urol* 1992;69:392-396

21 Adachi E, Maeda T, Matsumata T, Shirabe K, Kinukawa N, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. Risk factors for intrahepatic recurrence in human small hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1995;108:768-775

22 Prat F, Centarti M, Sibille A, Abou el Fadil FA, Henry L, Chapelon JY, Cathignol D. Extracorporeal high intensity focused ultrasound for Vx_2 liver tumor in the rabbit. *Hepatology* 1995;21:832-836

23 Gelet A, Chapelon JY, Bouvier R, Pangaud C, Souchon R, Blanc E, Cathignol D, Dubernard JM. Preliminary results of the treatment of 44 patients with localized cancer of the prostate using transrectal focused ultrasound. *Prog Urol* 1998;8:68-77

24 李富宇, 刘红, 李宁, 龙泉伊, 蒋力生, 许瑞华. 高能聚焦超声技术对肝癌患者外周血AFPmRNA的影响. 中国普外基础与临床杂志 2004;11:243-246

25 贾瑞鹏, 周性明, 张忠林, 蒋峰, 梅菊芳, 王祥富, 任岗. 高能聚焦超声对小鼠移植性膀胱肿瘤的杀伤效应及免疫功能的影响. 中华泌尿外科杂志 1998;19:270-272

26 杨渊峰, 王国民, 孙立安, 徐志兵, 徐叶青. 高强度聚焦超声联合丝裂霉素治疗对荷瘤小鼠T细胞水平的影响. 复旦学报·医学版 2002;29:483-485

27 王文见, 欧阳茂, 罗亿治, 伍烽, 孔凡斌, 王智彪. 高强度聚焦超声对荷W_{256}肝癌鼠局部组织T淋巴细胞亚群的影响. 中华普通外科 2000;15:536-539

28 Rosberger DF, Coleman DJ, Silverman R, Woods S, Rondeau M, Cunningham-Rundles S. Immunomodulation in choroidal melanoma:reversal of inverted CD4/CD8 ratios following treatment with ultrasonic hyperthermia. *Biotechnol Ther* 1994;5:59-68

29 周颦, 付敏, 王智彪, 白晋, 胡凯. 高强度聚焦超声固化疫苗的实验研究. 中国超声医学杂志 2002;18:569-571

30 Pontigga P. The biological responses to heat. *Adv Exp Med Biol* 1990;267:271-291

31 Yamamoto H, Itob F, Adachi Y. Immumomodualtion in choroidal melanoma: reverse of inverted CD_4^+/CD_8^+ ratios following treatment with ultrasound hyperthermia. *Gastrtoenterology* 1997;112:1290-1297

32 Falkman J. Clinical application of research on angiogenesis. *Engl J Med* 1995;333:1757-1763

33 Kohn E, Liotta L. Molecular insights into cancer invasion:strategies for prevention and intervention. *Cancer Res* 1995;55:1856-1862

34 Folkman J. Angiongenesis in cancer, vascular, rheumoid and other disease. *Nature Med* 1995;1:27

35 Yang R, Reilly CR, Rescorla FJ, Sanghvi NT, Fry FJ, Franklin TD Jr, Grosfeld JL. Effect of high-intensity focused ultrasound in the treatment of experimental neuroblastoma. *J Ped Surg* 1992;27:246-247

36 Vaezy S, Martin R, Kaczkowski P, Keilman G, Goldman B, Yaziji H, Carter S, Caps M, Crum L. Use of high-intensity focused ultrasound to control bleeding. *J Vasc Surg* 1999;29:253

37 伍烽, 陈文直, 白晋, 朱辉, 邹建中, 黎克全, 张吉, 曹友德, 高根五. 高强度聚焦超声对恶性实体肿瘤血管的破坏作用. 中华实验外科杂志 2002;19:314-315

38 Yang R, Sanghvi NT, Rescorla FJ, Kopecky KK, Grosfeld JL. Liver cancer ablation with extracorporeal high-intensity fo-

cused ultrasound. *Eur Urol* 1993;23:17
39 关利铭, 喻明宪, 伍烽, 白晋, 李艳, 李崇雁, 杜永鸿. 高强度聚焦超声对兔肝肿瘤血管的破坏作用及数字减影血管造影变化. 中华超声医学影像 2001;10:121
40 伍烽, 王智彪, 陈文直, 白晋, 朱辉, 邹建中, 黎克全, 张吉, 曹友德, 高根五. 高强度超声治疗55例原发性肝癌的早期影像学变化. 中华普通外科杂志 2002;17:523
41 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
42 李晓明, 汤钊猷. 血管内皮生长因子及其受体与肿瘤血管形成. 国外医学、肿瘤学分册 1997;24:11
43 Suzuki K, Hayashi N, Miyamoto Y, Yamamoto M, Ohkawa K, Ito Y, Sasaki Y, Yamaguchi Y, Nakase H, Noda K, Enomoto N, Arai K, Yamada Y, Yoshihara H, Tujimura T, Kawano K, Yoshikawa K, Kamada T. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:3004-3009
44 Jinno K, Tanimizu M, Hyodo I, Nishikawa Y, Hosokawa Y, Doi T, Endo H, Yamashita T, Okada Y. Circulating vascular endothelial growth factor(VEGF)is a possible tumor marker for metastasis in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 1998;33:376-382
45 Li XM, Tang ZY, Zhou G, Lui YK, Ye SL. Significance of vascular endothelial growth factor mRNA expression in invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 1998;17:13-17
46 Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and vivo. *Lab Invest* 1994;71:374-379
47 Yamaguchi R, Yano H, Iemura A, Ogasawara S, Haramaki M, Kojiro M. Expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998;28:68-77
48 Higuchi T, Kikuchi M, Okazaki M. Hepatocellular carcinoma after transcatheter hepatic arterial embolization;a histopathologic study of 84 resected cases. *Cancer* 1994;73:2259-2267
49 Nagasue N, Galizia G, Kohno H, Chang YC, Hayashi T, Yamanoi A, Nakamura T, Yukaya H. Adverse effect of preoperative hepatic artery chemoembolization for respectable hepatocellular carcinoma:retrospective comparision of 138 liver resection. *Surgery* 1998;106:81-86
50 Suzuki H, Mori M, Kawaguchi C, Adachi M, Miura S, Ishii H. Serum vascular endothelial growth factor in the course of transcatheter arterial embolization of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 1999;14:1087-1090
51 程树群, 周信达, 汤钊猷, 余耀, 鲍苏苏. 碘化油与高功率聚焦超声破坏肝组织的协同开温效应研究. 中国超声医学杂志 1997;13:1-4
52 Prat F, Ponchon T, Berger F, Chapelon JY, Gagnon P, Cathignol D. Hepatic lesions in the rabbit induced by acoustic cavitation. *Gastroenterology* 1991;100:1345-1350
53 熊树华, 刘宝琴, 胡凯. 碘油对肝脏高强度聚焦超声治疗剂量的影响. 中华实验外科杂志 2003;20:182
54 赵建农, 王智彪, 郭大静. 肝癌经肝动脉碘油化疗药物栓塞联合高强度聚焦超声治疗后的CT评价及临床意义. 中华肝脏病杂志 2001;9:61-63
55 Wang L, Tang ZY, Qin LX, Wu XF, Sun HC, Xue Q, Ye SL. High-dose and long-term therapy with interferon-alfa inhibits tumor growth and recurrence in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma xenografts with high metastatic potential. *Hepatology* 2000;32:43-48

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物，可作为理工科研究生的教学用书或自学教材，也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览.

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍，介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求. 从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作，通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则-准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity)，分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写，举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项，总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范.

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题，结合实例举证，从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达，较为详尽地总结了英文标点符号的使用，从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系，综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动.

本书论述缜密、案例丰富. 为方便读者进一步追溯和研读相关资料，书中按章节形式标引了参考文献约220篇(次).

编著: 任胜利，理学博士，《自然科学进展》责任编辑，1998年以来先后在Science，Nature，Scientometrics，Learned Publishing，《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文30余篇. 出 版:科学出版社. 定 价: 28元+2元(邮费). 邮购地址: 100085，国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室，北京市海淀区双清路83号. 联 系 人: 刘俐，程宇. 联系电话: 010-62327204; 传真: 010-62326921.开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行 开 户 名: 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社，帐 号: 0200010009200062483. (国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):367-370
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•文献综述 REVIEW•

药物治疗肝纤维化现状

朱颖炜, 朱 焱, 林 勇, 谢渭芬

朱颖炜, 朱 ▮, 林勇, 谢渭芬, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科 上海市 200003
项目负责人: 林勇, 200003, 上海市凤阳路415号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科. linyongmd@yahoo.com.cn
电话: 021-63610109-73253
收稿日期: 2004-11-29 接受日期: 2004-12-21

摘要

肝纤维化为一动态过程，可以逆转，是发展为肝硬化的中间过程，阻断、抑制或逆转肝纤维化是治疗慢性肝病的一个十分重要的目标.随着肝纤维化的细胞分子生物学机制研究不断取得突破，近年来从肝纤维化发生、发展的不同环节入手研制抗肝纤维化药物，抗肝纤维化药物研究不断取得进展.本文对目前药物治疗肝纤维化现状作一综述.

朱颖炜, 朱焱, 林勇, 谢渭芬. 药物治疗肝纤维化现状. 世界华人消化杂志 2005;13(3):367-370
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/367.asp

0 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis)是肝脏对慢性损伤的一种修复反应，是慢性肝病共有的病理改变，其特征是以胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix，ECM)在肝内过多沉积.肝脏炎症激活肝星状细胞(hepatic stellate cell，HSC)导致胶原生成、沉积形成肝纤维化，进一步发展到肝硬化.一般认为肝硬化为不可逆阶段，肝纤维化为一动态过程，属可逆性病变，因此，阻断、抑制或逆转肝纤维化是治疗慢性肝病的一个十分重要的目标.目前，肝纤维化的药物治疗主要集中在1、抑制肝脏炎症;2、抑制HSC激活、增生和诱导HSC凋亡;3、降解肝脏ECM[1-2].现综述如下.

1 抑制肝脏炎症

干扰素(interferon，IFN)是由病毒等诱导剂作用于寄生细胞而产生的一类具有生物活性的糖蛋白，有抗病毒、抗肿瘤和调节免疫反应等活性，可分为α、β、γ和复合干扰素，其中α、β的化学结构相同，称为抗病毒干扰素，又称为Ⅰ型干扰素，IFN-α又分为IFN-α2 a、1 b、2 b;IFN-γ的化学结构与IFN-α、β不同，受体亦不相同，但生物活性与Ⅰ型干扰素相类似，称为Ⅱ型干扰素;复合干扰素是一种新型干扰素，是应用基因重组技术，对干扰素各种亚型进行重组而得到的非天然干扰素.目前临床上主要使用的是α、γ和复合干扰素.实验与临床研究表明，IFN在抗病毒的同时，还具有抗炎症和肝纤维化的作用.Madro *et al*[3]在动物实验中用IFN-α治疗四氯化碳诱导的肝纤维化小鼠，结果显示，能改善肝功能、降低肝纤维化程度.Abe *et al*[4]评价用IFN-α2b治疗80例丙型肝炎患者，1 a后血清PⅢP、Ⅳ型胶原水平明显下降($P<0.05$)，肝活检亦显示肝纤维化程度有明显改善，对治疗后血清ALT正常的患者效果更好.Weng *et al*[5]在动物实验中用高、中、低三种不同剂量的IFN-γ治疗四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠，结果显示三种不同剂量的IFN-γ均有抗肝纤维化作用，且所用剂量越高，效果越好.研究发现，HSC活化早期IL-10增加，对缺乏IL-10的小鼠予以四氯化碳，引起更严重的肝损害，表明IL-10有抗纤维化活性，机制可能为减少Ⅰ型胶原的表达和增加间质胶原酶.体外研究表明IL-13能激活成纤维细胞形成胶原[6-7]，Chiaramonte *et al*[8]证实IL-13在血吸虫引起肝纤维化的过程中高表达，IL-13拮抗剂能改善血吸虫性肝纤维化大鼠纤维化程度.

拉米夫定(lamivudine)是核苷类抗病毒药，对乙型肝炎病毒有较强的抑制作用.长期应用可显著改善肝脏炎症，并减轻或阻止肝纤维化的进展.Jin *et al*[9]研究101例ALT异常、乙型肝炎病毒e抗原阳性、肝组织符合病理评价要求患者，口服拉米夫定1 a后肝脏组织学活动指数(histological activity index，HAI)、坏死炎症和纤维化积分.结果表明，治疗后53.5%(54/101)患者肝组织学改善，HAI积分由治疗前的8.0±4.7下降至治疗后的5.2±3.3($P<0.01$);51.5%(52/101)患者坏死炎症程度改善，坏死炎症积分由5.9±3.8下降至3.6±2.5;31.7%患者纤维化改善，纤维化积分由2.1±1.2下降至1.6±1.2($P<0.01$)，无论治疗结束后是否发生HBeAg血清转换，患者的肝组织学均有明显改善.亦有研究表明，拉米夫定治疗慢性乙肝患者，可以减缓疾病的进展，减低Child-Pugh评分，减低肝细胞肝癌的发生率，可引起YMDD变异.马洛替酯(malotilate)属二硫戊环衍生物，是肝脏蛋白合成的诱导剂，也是一种抗炎药物，能促进肝细胞蛋白质的合成，研究表明其通过抑制炎症递质的产生，可阻止由四氯化碳、二甲基亚硝胺及酒精引起的实验性肝纤维化肝脏ECM合成和沉积，抑制PⅢP血清水平和肝内羟脯氨酸含量，减轻肝脏炎症和纤维化.临床确切效果尚需进一步证实.Nomura *et al*[10]体外研究马洛替酯对外周血单核细胞的毒性作用，结果表明，导致乳酸脱氢酶的异常增高，可能是马洛替酯的代谢产物起作用，引起的肝脏损害和慢性活动性肝炎引起的程度一致.

2 抑制HSC激活、增生和诱导HSC凋亡

已有研究表明在肝纤维化进程中活化的HSC是ECM的主要来源.HSC存在于肝细胞、巨噬细胞和肝窦内皮细胞之间的Disse间隙内，储存了人体80%的视黄醇，HSC激活后，丧失视黄醇，合成多种ECM成分[11].细胞凋亡(apoptosis)是一种由基因调控的，具有特征性的细胞主动死亡过程.通过神经生长因子途径、死亡因子/死亡因子受体途径、活性氧途径等诱导HSC凋亡，活化的肝巨噬细胞通过半胱氨酸9和相互作用的受体蛋白途径有效的诱导HSC凋亡，HSC在肝纤维化形成过程中起重要作用[2].

IFN-α治疗四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠，能减轻肝纤维化程度，HSC数明显减少，凋亡的HSC数量增加，细胞的凋亡指数增加，表明IFN-α在体内可诱导HSC凋亡，这可能亦是IFN-α抗肝纤维化的作用机制之一.Saile *et al*[12]用IFN-α作用于原代活化的小鼠HSC，结果显示，IFN-α可能通过激活JAK2途径诱导HSC的凋亡.

血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor agent，ACE-I)对改善肝纤维化有一定的作用[13]，培哚普利(perindopril，PE)是一个前体药，在体内水解为其活性代谢物培哚普利拉(perindoprilat)，是一种竞争性的ACE-I，有研究表明，PE治疗实验性肝纤维化小鼠，可明显降低血清HA、LN和Ⅲ型胶原的水平，下调TGF-β和SMA的表达，起到抗纤维化作用[14].体外研究表明，通过AT-1受体可诱导HSC的活化、增生和上调TGF-β1的表达[15].氯沙坦(losartan)是一种非肽类血管紧张素Ⅱ1型(AT-1)受体拮抗剂，可能通过减少AT-1受体和TGF-β阻止肝纤维化的进展.用氯沙坦治疗四氯化碳诱导的肝纤维化小鼠，可明显降低血清HA和PCⅢ的水平，肝纤维化程度明显改善[16]，Ramalho *et al*[17]用氯沙坦治疗胆管结扎肝纤维化小鼠，结果表明，可增加门脉的血流量，减少Ⅳ型胶原和HSC的活化，抑制肝纤维化程度.

生长抑素八肽(octreotide，奥曲肽)是一种人工合成的八肽环状化合物，具有与天然内源性生长抑素类似的作用.Wang *et al*[18]用奥曲肽治疗四氯化碳诱导的肝纤维化小鼠，治疗组HA、LN和PCⅢ水平比对照组明显降低($P<0.05$)，肝纤维化分级评分亦明显改善($P<0.05$)，表明奥曲肽能抑制HSC的激活，改善肝纤维化.有研究表明，生长抑素(somatostatin)既能抑制HSC的激活，亦能诱导HSC凋亡.Pan *et al*[19]用生长抑素作用于活化的小鼠HSC，结果表明，生长抑素浓度在10^{-6}-10^{-9}间可抑制HSC的增生，浓度在10^{-6}-10^{-7}间可促进其凋亡($P<0.05$-0.01).

有研究表明，内皮素-1(endothelin-1)在肝损后高表达，其通过内皮素A、B受体刺激TGF-β1和胶原的合成，激活HSC收缩，调节肝内血流[20].实验研究显示波沙坦(bosentan)一种内皮素A和B受体拮抗剂，能减少实验性肝纤维化HSC活化，抑制胶原的合成[21-22].

研究表明，选择性的Na^+/H^+交换抑制剂通过抗氧化作用可抑制HSC的激活、增生和胶原沉积而减轻胆管结扎、二乙基亚硝胺所致的大鼠肝纤维化程度.坎利酸内脂(canrenone)是醛固酮竞争性抑制剂螺内脂的活性代谢物，能阻断Na^+/H^+交换，能减少TGF-β诱导的Ⅰ、Ⅳ型胶原的合成及抑制HSC的激活，有一定的抗肝纤维化作用[23].

胶毒霉素(gliotoxin)是一种真菌的代谢物，Dekel *et al*[24]研究表明，胶毒霉素可以减少活化的HSC，逆转硫代乙醇胺诱导的小鼠肝纤维化，但不能改善肝功能，并减少肝细胞的数量.小剂量的胶毒霉素可以通过改变细胞膜通透性和细胞色素C的释放诱导活化的人HSC凋亡，较大剂量的胶毒霉素导致活化的人HSC死亡[25-26].

松弛肽(relaxin)是一种参与分娩过程的天然多肽类激素，能减少胶原合成，增加基质降解，抑制肝纤维化的发展.体外研究表明，松弛肽能减少HSC中α平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin，SMA)的水平，减少胶原的含量和合成，增加胶原酶的活性[27-28].

来氟米特(leflunomide，LEF)又称雷抑素，是异恶唑的衍生物，有研究表明，其能降低四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠血清ALT、AST、HA和PCⅢ水平，减少羟脯氨酸的含量、TGF-β1和一氧化氮水平，有一定抗纤维化作用[29]，LEF在体内半衰期可达10-16 d，临床效果有待进一步验证.

有研究表明，交感神经系统调节活化的HSC成为肌成纤维样细胞，用去甲肾上腺素治疗多巴胺β-羟化酶缺乏的鼠，可导致HSC的增生，上调TGF-β活性并增加胶原合成，加重肝纤维化[30-31].Nakade *et al*[32]研究表明脑池内的一种促肾上腺皮质激素释放因子受体拮抗剂能降低四氯化碳诱导的肝损伤小鼠的血清ALT水平，防止肝纤维化的形成，切除交感神经后这种影响被终止.交感神经拮抗剂可能具有抗肝纤维化作用.

己酮可可碱(pentoxifylline)是甲基黄嘌呤的衍生物，磷酸二脂酶的抑制剂，在生物体内能抑制HSC的激活和前胶原的合成，Raetsch *et al*[33]研究表明己酮可可碱可抑制胆管结扎肝纤维化小鼠Ⅰ型胶原的合成，转化生长因子-β(transforming growth factor-beta，TGF-β)活性下降了60-70%，而MMP-1活性提高了2倍，故其有良好的抗纤维化作用.

水飞蓟素(silymarin)是从菊科植物水飞蓟果实中提取分离得到的一种具有抗氧化性的黄酮类化合物，具有明显保护和稳定肝细胞膜的作用.其能抑制胆管结扎肝纤维化大鼠模型Ⅰ型前胶原的合成和TIMP-1的活性，具有抗纤维化效果，对酒精性肝病亦有积极疗效[34-36].在人的对照性实验研究中，有效性未得到确认.

维生素E是一种很强的抗氧化剂，能抗脂质过氧化、抗氧化应激并减少HSC的增生和胶原的合成.对改善实验性肝纤维化有明显效果，亦有研究表明其对非酒精性脂肪肝患者也有较好疗效[37].

3 降解肝脏ECM

肝纤维化的特征是ECM在肝内过多沉积，因此，促进ECM

的降解是抗肝纤维化的又一重要途径，通过降解ECM，可以逆转肝纤维化的进程，促进肝功能的恢复. 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase，MMP)是肝脏ECM的主要降解酶，而组织基质金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitors of matrix metalloproteinase，TIMP)和其作用相反，MMP和TIMP的平衡是阻止ECM沉积的一个重要因素，TIMP通过抑制MMP可阻止活化的HSC凋亡，通过调节MMP和TIMP的比率，可调节ECM的沉积，有助于促进肝纤维化的逆转[38-39].

Ninomiya *et al*[40]用IFN-α治疗27例慢性丙型肝炎患者，测定患者血清MMP-1、MMP-2和TIMP-1、TIMP-2的水平并比较治疗前后肝组织学，经6 mo治疗后，治疗组9例患者MMP-1/TIMP-1比率明显提高，肝纤维化程度均得到改善，对照组MMP-1/TIMP-1比率下降，且TIMP-2水平明显提高，TIMP-1水平有增加趋势，未改善肝纤维化，表明IFN-α可通过提高MMP-1/TIMP-1改善肝纤维化程度.

此外，有研究表明肝纤维化发生发展过程中有病态血管生成，影响肝灌注，加重肝纤维化[41]. 血管他丁(Angiostatin)是一种内皮依赖性血管舒张的负性调节剂，纤维蛋白溶解原的水解片段，能抑制血管的生成[42]. Vogten *et al*[43]在动物实验中研究血管他丁对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠的治疗作用，发现治疗组比对照组病态血管的数量减少了69%($P<0.001$)，肝纤维化区域减少了63 ±0.1%($P<0.001$)，未影响细胞的增生，认为血管他丁抗纤维化作用可能是抑制了肝病态血管的生成.

4 药物联合治疗

药物联合治疗因其多环节、多靶点、多成分的药理学作用，理论上能有更加好的抗纤维化效果，目前已有联合治疗的方案，但疗效和机制有待进一步研究.

有研究表明IFN和利巴韦林合用可减缓、甚至逆转一些丙型肝炎患者的肝损害，增加肝炎患者的应答率和改善肝纤维化. Afif *et al*[44]用IFN-α和利巴韦林联合治疗52例初治和79例复治丙型肝炎患者，治疗后完全应答率分别达到了37%和22%，肝纤维化和肝脏炎症程度有明显改善($P<0.05$).

Selimoglu *et al*[45]用IFN-α和拉米夫定联合治疗慢性乙型肝炎儿童患者，可明显降低血清ALT水平，HAI亦明显下降($P<0.005$)，但应答率无明显差异.

总之，近年来，关于肝纤维化药物治疗的研究有不少报道，但临床尚无抗肝纤维化的特效药物，随着肝纤维化的细胞分子生物学机制研究不断取得突破，从肝纤维化发生、发展的不同环节入手研制抗肝纤维化药物，将会为肝纤维化药物治疗开辟新的前景.

5 参考文献

1 Iredale JP. Cirrhosis:new research provides a basis for rational and targeted treatment. *BMJ* 2003;327:143-147

2 Dodig M, Mullen KD. New mechanism of selective killing of activated hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003;38:1051-1053

3 Madro A, Slomka M, Celinski K, Chibowski D, Czechowska G, Kleinrok Z, Karpinska A. The influence of interferon alpha on the rat liver injured by chronic administration of carbon tetrachloride. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska* 2002;57:55-60

4 Abe S, Tabaru A, Ono M, Tai M, Narita R, Moriyama A, Otsuki M. High-dose interferon-alpha therapy lowers the levels of serum fibrogenesis markers over 5 years in chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 2003;25:22-31

5 Weng HL, Cai WM, Liu RH. Animal experiment and clinical study of effect of gamma-interferon on hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:42-48

6 Chiaramonte MG, Mentink-Kane M, Jacobson BA, Cheever AW, Whitters MJ, Goad ME, Wong A, Collins M, Donaldson DD, Grusby MJ, Wynn TA. Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. *J EXP Med* 2003;197:675-679

7 Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ, McKenzie AN. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13:IL-13 is a profibrotic agent. *J Immunol* 2000;164:2585-2591

8 Chiaramonte MG, Cheever AW, Malley JD, Donaldson DD, Wynn TA. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology* 2001;34:273-282

9 Jin RH, Lang ZW, Yao GB, Guo XH. Liver histological changes after lamivudine treating in chronic hepatitis B patients with HBeAg positive. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2003;11:555-557

10 Nomura F, Ohnishi K, Ohto M. Detection of malotilate toxicity in vitro with periphera blood mononuclear cells as targets. A preliminary report. *J Hepatol* 1990;11:65-69

11 Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001;21:427-436

12 Saile B, Eisenbach C, E1-Armouche H, Neubauer K, Ramadori G. Antiapoptotic effect of interferon-alpha on hepatic stellate cells(HSC):a novel pathway of IFN-alpha signal transduction via Janus kinase 2(JAK2)and caspase-8. *Eur J Cell Biol* 2003;82:31-41

13 Yoshiji H, Kuriyama S, Fukui H. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitors may be an alternative anti-angiogenic strategy in the treatment of liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. Possible role of vascular endothelial grow factor. *Tumour Biol* 2002;23:348-356

14 Li X, Meng Y, Yang XS, Zhang ZS, Wu PS, Zou JL. Perindopril attenuates the progression of CCl4-inducing rat hepatic fibrosis. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004;12:32-34

15 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;34:745-750

16 Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCL(4). *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545

17 Ramalho LN, Ramalho FS, Zucoloto S, Castro-e-Silva Junior O, Correa FM, Elias Junior J, Magalhaes JF. Effect of losartan, an angiotensin II antagonist, on secondary biliary cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1499-1502

18 Wang ZR, Li DG, Chen XM, Huang X, Wei HS, Wang YQ, Xu QF, Lu HM. Therapeutic effects of octreotide on hepatofibrosis-induced with carbon tetrachloride in rats. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2003;11:408-411

19 Pan Q, Li DG, Lu HM, Lu LY, Wang YQ, Xu QF. Antiproliferative and proapoptotic effects of somatostatin on activated hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:1015-1018

20 Moore K. Endothelin and vascular function in liver disease. *Gut* 2004;53:159-161

21 Sogni P, Moreau R, Gomola A, Gadano A, Cailmail S, Calmus Y, Clozel M, Lebrec D. Beneficial hemodynamic effects of bosentan, a mixed ET(A)and ET(B)receptor antagonist, in portal hypertensive rats. *Hepatology* 1998;28:655-659

22 van Giersbergen PL, Popescu G, Bodin F, Dingemanse J. Influence of mild liver impairment on the pharmacokinetics and metabolism of bosentan, a dual endothelin receptor antagonist. *J Clin Pharmacol* 2003;43:15-22
23 Caligiuri A, De Franco RM, Romanelli RG, Gentilini A, Meucci M, Failli P, Mazzetti L, Rombouts K, Geerts A, Vanasia M, Gentilini P, Marra F, Pinzani M. Antifibrogenic effects of canrenone, an antialdosteronic drug, on human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2003;124:504-520
24 Dekel R, Zvibel I, Brill S, Brazovsky E, Halpern Z, Oren R. Gliotoxin ameliorates development of fibrosis and cirrhosis in a thioacetamide rat model. *Dig Dis Sci* 2003;48:1642-1647
25 Kweon YO, Paik YH, Schnabl B, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA. Gliotoxin-mediated apoptosis of activated human hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003;39:38-46
26 Orr JG, Leel V, Cameron GA, Marek CJ, Haughton EL, Elrick LJ, Trim JE, Hawksworth GM, Halestrap AP, Wright MC. Mechanism of action of the antifibrogenic compound gliotoxin in rat liver cells. *Hepatology* 2004;40:232-242
27 Williams EJ, Benyon RC, Trim N, Hadwin R, Grove BH, Arthur MJ, Unemori EN, Iredale JP. Relaxin inhibits effective collagen deposition by cultured hepatic stellate cells and decreases rat liver fibrosis in vivo. *Gut* 2001;49:577-583
28 Bennett RG, Kharbanda KK, Tuma DJ. Inhibition of markers of hepatic stellate cell activation by the hormone relaxin. *Biochem Pharmacol* 2003;66:867-874
29 Yao HW, Li J, Chen JQ, Xu SY. Inhibitory effect of leflunomide on hepatic fibrosis induced by CCl4 in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2004;25:915-920
30 Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut* 2004;53:438-445
31 Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Li Z, Torbenson M, Thomas SA, Diehl AM. Norepinephrine induces hepatic fibrogenesis in leptin deficient ob/ob mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:284-292
32 Nakade Y, Yoneda M, Yokohama S, Tamori K, Nakamura K, Watanobe H, Kono T, Makino I, Terano A. Central injection of astressin inhibits carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Eur J Pharmacol* 2003;460:135-138
33 Raetsch C, Jia JD, Boigk G, Bauer M, Hahn EG, Riecken EO, Schuppan D. Pentoxifylline downregulates profibrogenic cytokines and procollagen I expression in rat secondary biliary fibrosis. *Gut* 2002;50:241-247
34 Jia JD, Bauer M, Cho JJ, Ruehl M, Milani S, Boigk G, Riecken EO, Schuppan D. Antifibrotic effect of silymarin in rat secondary biliary fobrosis is mediated by downregulation of procollagen alphal(I)and TIMP-1. *J Hepatol* 2001;35:392-398
35 Lucena MI, Andrade RJ, de la Cruz JP, Rodriguez-Mendizabal M, Blanco E, Sanchez de la Cuesta F. Effects of silymarin MZ-80 on oxidative stress in patients with alcoholic cirrhosis. Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2002;40:2-8
36 Lieber CS, Leo MA, Cao Q, Ren C, DeCarli LM. Silymarin retards the progression of alcohol-induced hepatic fibrosis in baboons. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:336-339
37 Harrison SA, Torgerson S, Hayashi P, Ward J, Schenker S. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2348-2350
38 McCrudden R, Iredale JP. Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Histol Histopathol* 2000;15:1159-1168
39 Nie QH, Duan GR, Luo XD, Xie YM, Luo H, Zhou YX, Pan BR. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:86-90
40 Ninomiya T, Yoon S, Nagano H, Kumon Y, Seo Y, Kasuga M, Yano Y, Nakaji M, Hayashi Y. Significance of serum matrix metalloproteinases and their inhibitors on the antifibrogenetic effect of interferon-alfa in chronic hepatitis C patients. *Intervirology* 2001;44:227-231
41 Jung SP, Siegrist B, Wang YZ, Wade MR, Anthony CT, Hornick C, Woltering EA. Effect of human Angiostatin protein on human angiogenesis in vitro. *Angiogenesis* 2003;6:233-240
42 Cao Y, Xue L. Angiostatin. *Semin Thromb Hemost* 2004;30:83-93
43 Vogten JM, Drixler TA, Te Velde EA, Schipper ME, Van Vroonhoven TJ, Voest EE, Borel Rinkes IH. Angiostatin inhibits experimental liver fibrosis in mice. *Int J Colorectal Dis* 2004;19:387-394
44 Arif A, Levine RA, Sanderson SO, Bank L, Velu RP, Shah A, Mahl TG, Gregory DH. Regression of fibrosis in chronic hepatitis C after therapy with interferon and ribavirin. *Dig Dis Sci* 2003;48:1425-1430
45 Selimoglu MA, Aydogdu S, Unal F, Zeytinoglu A, Yuce G, Yagci RV. Alpha interferon and lamivudine combination therapy for chronic hepatitis B in children. *Pediatr Int* 2002;44:404-408

编辑 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):371-375
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•文献综述 REVIEW•

非酒精性脂肪性肝炎的发病机制及治疗的研究进展

丁效蕙, 赵景民

丁效蕙, 赵景民, 中国人民解放军 302 医院病理科 北京市 100039
项目负责人: 赵景民, 100039, 北京市, 中国人民解放军 302 医院病理科, 北京市西四环中路 100 号. jmzhao@hotmail.com
电话: 010-66933259 传真: 010-63816020
收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-12-16

摘要

非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)作为非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver diseases, NAFLD)关键性的中间阶段, 其发病机制的探讨可为临床治疗提供重要依据. 大量研究认为胰岛素抵抗、氧应激、细胞因子是发病环节中的重要因素, 目前有前景的治疗方案多数围绕NASH的关键性致病因子及发生环节展开.

丁效蕙, 赵景民. 非酒精性脂肪性肝炎的发病机制及治疗的研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(3):371-375
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/371.asp

0 引言

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver diseases, NAFLD)是指由肝细胞脂肪变性发展到炎症、纤维化的一组疾病谱. 单纯性脂肪肝是良性的、相对静止的状态, 而非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)则能发展成肝纤维化、肝硬化, 二者在临床和影像学上难以分辨, 目前尚无一种敏感的无创性检查方法可区分他们, 肝活检是明确诊断及判断预后的必要手段. 1980 年病理学家 Ludwig[1]发现在无固定饮酒史及其他肝病的患者身上出现了类似酒精性脂肪性肝炎的肝损伤表现, 非酒精性脂肪性肝炎由此得以命名. NASH 成为继丙型肝炎、原发性胆汁性肝硬化之后隐源性肝硬化的重要原因之一. 有研究表明, 50% 的NASH 会发展成肝纤维化, 15-30% 发展成肝硬化, 而 3% 将发展成肝功能衰竭[2]. 大多数 NASH 病例发生于脂肪过剩、高脂血症、高血糖患者, 胰岛素抵抗可能是其发病的核心因素. 针对NASH 目前尚无明显有效的治疗方法, 因此发病机制的阐述有望是治疗突破的关键所在.

1 发病机制

1.1 肝细胞脂肪变性的发生机制

1.1.1 胰岛素抵抗(insulin resistance, IR) 有研究表明, 几乎所有的 NAFLD 患者都存在肝脏和脂肪组织的胰岛素抵抗, 而且并非皆伴有糖耐量异常和肥胖, 胰岛素抵抗的严重程度与 NAFLD 的病情进展有关[3]. 1988 年关于 NAFLD 发病机制的“二次打击假说”提出, 第一次打击是脂肪贮积, 第二次打击是氧应激和异常细胞因子作用导致肝脏坏死性炎症和纤维化, 而近年来研究发现, 胰岛素抵抗可能才是真正的“第一次打击”[4]. IR 使血清中游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs)增多, 当过量的 FFA 超出肝脏通过线粒体氧化反应及低密度脂蛋白形式排放入血的代谢能力时, 将导致肝细胞脂肪变性. 有学者认为脂肪积聚一方面来源于基因缺陷, 另一方面主要来源于 IR、卡路里的过量摄入、内脏性肥胖以及脂肪细胞因子如 TNF-α、瘦素、脂联素等的作用[5]. IR 可被看作肥胖和非胰岛素依赖型糖尿病的背景. 也有很多学者认为 NASH 是胰岛素抵抗代谢综合征(X 综合征)的临床表现之一.

1.1.2 胰岛素抵抗的分子细胞学基础和脂肪组织的作用 脂肪组织是调节胰岛素敏感性的细胞因子 TNF-α 的重要来源, 而 TNF-α 能抑制调节脂肪酸代谢的蛋白质的表达如脂肪酸结合蛋白 aP5、胰岛素应答性转糖载体-4 (GLUT4), 从而影响胰岛素效应, TNF-α 尚能通过下调维持胰岛素敏感性的过氧化物酶体增生物活化受体(PPARγ)促进胰岛素抵抗[6-8]. 实验证明, TNF-α mRNA 在 NASH 患者的脂肪组织和肝组织内表达, 与 IR 相关的 TNF-α 等位基因(TNF-α allele)表达明显上调[9]. Hirano *et al*[10]研究发现 TNF-α 能诱导 NF-κB 的活化及 RANTES 的表达, 在肝细胞损伤中发挥重要作用. NF-κB(neuclear factor κB)是一种具有转录激活功能的蛋白质, 激活后进入细胞核启动基因转录, 导致大量炎症递质产生, 引发炎症反应. 有研究发现抑制枯否氏细胞中的 NF-κB 激活, 可下调 TNF-α 等炎症递质基因的表达, 进而抑制肝脏的炎症反应[11]. 此外, 一种脂肪细胞来源的激素-瘦素(Leptin)经证明是通过消弱胰岛素受体底物 1(IRS-1)的酪氨酸磷酸化作用来抑制胰岛素活动, 当瘦素水平升高时, IR 和脂肪变性开始加重. 瘦素还能增强枯否氏细胞对 TNF-α、IL-6、IL-12 等细胞因子的分泌, 促进肝细胞的变性坏死. Faggioni *et al*[12]人的实验证明瘦素缺乏可减少 TNF-α 的生成. 新近发现的脂肪细胞因子-脂联素(adiponectin)是由脂肪细胞特异性分泌的具有类似胶原结构的蛋白, 经研究发现在 IR、肥胖、2 型糖尿病及动脉粥样硬化的患者浓度明显下降, 被认为是 IR 和动脉粥样硬化的保护因子, 受胰岛素、TNF-α、肾上腺激素调节[13-15]. Fasshauer *et al*[16]研究发现胰岛素可能通过激活 P42/44、MAPK、P13、P7056 激酶对 adiponectin 起时间、剂量依赖性的抑制作用. 另有研究表明交感神经系统兴奋性增加儿茶酚胺分泌增多是发生胰岛素抵抗的重要因素, 而β-肾上腺素可能通过 G(S)蛋白 PKA 途径抑制 adiponectin 基因的表达[17].

其他脂肪组织来源的细胞因子如IL-6在IR中的作用还不明确，然而在肥胖病例中被认为关系密切.

1.2 炎症、坏死的发生机制

1.2.1 氧应激(oxidative stress) 研究显示从脂肪肝到脂肪性肝炎的进展过程是前炎症因子与抗炎症因子失平衡触发氧应激和脂质过氧化反应的结果[5].氧应激在NAFLD中起重要作用，不断增强的氧应激及前炎症因子(TNF-α)的介入导致NAFLD发病的“第二次打击”.其机制是胰岛素抵抗和腹内型肥胖使血清FFA增多，肝脏对FFA摄取增加，线粒体β氧化速度代偿性增加，进而增加反应氧的产出.反应氧与膜磷脂的不饱和脂肪酸反应形成脂质过氧化物(LPO)，引起线粒体DNA损伤、前炎症因子(如TNF-α)释放、肝内抗氧化酶不断消耗等并形成恶性循环.当肝抗氧化能力不足时，线粒体功能失常和TNF-α将导致炎症和纤维化.CYP2E1和CYP4A表达增强是氧应激另一来源.CYP2E1(cytochrome P450 2E1)是肝细胞微粒体酒精氧化系统的主要成分，在酒精性肝病的发病机制中起关键作用，能产生一些超氧离子、羟自由基并参与脂肪酸在微粒体的ω氧化.CYP2E1表达的调节非常复杂，部分依赖于胰岛素的负调节，有人猜测CYP2E1在NASH患者中过表达由于IR使肝细胞对胰岛素敏感性下降[18].此外，有研究发现CYP2E1能诱导枯否氏细胞，导致枯否氏细胞激活和炎症因子(包括TNF-α)的释放[19].

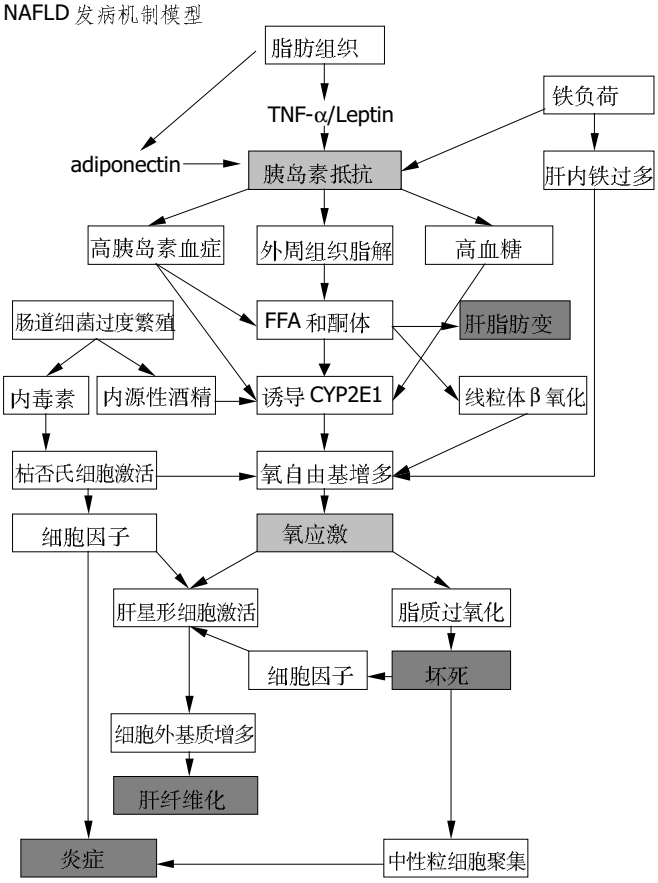
1.2.2 铁负荷(iron overload) Bacon *et al*[20]首次发现许多NAFLD患者存在血清铁升高、铁负荷现象，也有研究显示铁负荷并非NAFLD的危险因素.HFE基因突变可能是NAFLD患者铁负荷增加的主要原因，有报道NASH患者中，C282Y、H63D等位基因与转氨酶水平及肝组织病理学改变严重程度有关[21].铁负荷通过催化羟自由基产生、激活枯否氏细胞诱导氧应激和脂质过氧化.Tsukamoto *et al*[22]研究认为，不断增加的肝内铁沉积还能激活巨噬细胞内的NF-κB和TNF-α表达.

1.2.3 内毒素、内源性酒精、枯否氏细胞和细胞因子 几项研究显示NASH可被抗生素逆转，Wigg *et al*[23]进一步证实NASH患者存在着小肠内细菌过繁殖，小肠内细菌过繁殖在NASH的发病机制中可能发挥一定的作用.Cope *et al*[24]在NASH动物模型中发现胃肠源性酒精，因此考虑小肠内微生物通过产生酒精发挥效应.内毒素或内源性酒精使枯否氏细胞被激活产生大量中间产物如前列腺素、反应氧、细胞因子、NO及各种蛋白酶诱导一系列类似于酒精性肝病的表现.然而还没有证据表明小肠细菌过繁殖与血内毒素、TNF-α水平存在关系.

1.3 NASH肝纤维化的发生机制 肝星形细胞(hepatic stellate cell，HSC)位于内皮细胞和肝细胞之间的Disse隙中，通过产生细胞因子、生长因子及表达细胞因子受体相互联系，活化后产生大量细胞外基质(extracellular matrix，ECM)成分，是肝纤维化发展过程中的关键细胞.实验证明活化的HSC与肝纤维化程度有关[25].激活HSC的因素有氧应激、转化生长因子β1(transforming growth factorβ1，TGF-β1)、结缔组织生长因子(connective tissue growth factor，CTGF)等.有研究发现活化的HSC与CYP2E1、CYP2A、CYP4A的表达部位同位于肝腺泡3带，表明CYP2E1可能与HSC的活化有关[26].Nieto *et al*[27]的研究也证明CPY2E1抑制剂的应用能阻止HSC的活化.TGF-β1来源于HSC和激活的枯否氏细胞，是HSC和纤维母细胞的生长因子并是促使HSC活化的最强有力因子，介导静止型HSC转化成肌成纤维细胞，产生大量包括Ⅰ型胶原在内的细胞外基质，调节ECM代谢水解酶如基质金属蛋白酶及其组织抑制物的产生和活性，是肝纤维化发病机制中最重要的细胞因子.Hasegawa *et al*[28]在NASH患者与单纯性脂肪肝患者血清TGF-β1水平比较的研究证明TGF-β1与纤维化发病机制关系密切.此外，有研究发现在HSC早期激活阶段，转录因子NF-κB参与了HSC的基因调控和活化，并通过触发或加剧炎症基因转录细胞因子TGF-β1进一步激活HSC，并维持HSC的持续活化[29].CTGF在TGF-β1的诱导下由HSC、成纤维细胞等间质细胞产生，又介导TGF-β1对HSC促进其增生及细胞外基质合成的作用.Paradis *et al*[30]观察到CTGF在NASH患者的肝组织内的过表达，并与纤维化有关.用葡萄糖或胰岛素孵育HSC能够上调CTGF mRNA及蛋白质的水平表明胰岛素能直接影响纤维化的发展.另一项实验室研究发现TNF-α能诱导HSC中CTGF的表达[31].

此外，Ikejima *et al*[32]在动物模型中发现由活化HSC产生的瘦素能促进肝的炎性坏死和纤维化，可能

NAFLD发病机制模型



的机制是通过 JAK-STAT 信号系统，增加了 TGF-β1 的表达，激活 HSC 从而增强了肝纤维化，因此瘦素在肝纤维化的进展中起重要作用. 泛素 - 蛋白酶体(ubiquitin proteasome)途径是一种清除氧应激产生的有害蛋白质的细胞保护机制. 泛素(Ubiquitin)作为分子配体在细胞间基质的降解中发挥重要作用. Riley[33]的研究认为细胞角蛋白及其他各种蛋白的沉积构成 Mallory 小体是由于 Ubiquitin 蛋白酶降解途径的中断，热休克蛋白也被认为参与这一途径. Savas *et al*[34]在 NASH 患者的研究中发现，血清 Ubiquitin 水平能预示组织细胞针对氧应激作出的保护性反应的程度而非肝损伤程度.

2 治疗

关于 NAFLD 的治疗问题目前尚无明确有效的治疗方法. 治疗主要针对 NASH 的致病危险因素以及应用护肝药物. 肝脏生化指标的改善可通过降低体重、锻炼、健康减肥、医学控制血糖及降脂药物的应用等. 近年来，建立在发病机制的基础上改善胰岛素敏感性及氧应激的治疗越来越受到重视.

2.1 控制体重

2.1.1 控制体重是当前惟一公认的 NASH 的治疗方法. 缓慢持续的体重降低可逆转 NAFLD 患者(即使已有肝硬化的存在)的脂肪变性，其机制是改善 IR 及糖耐量异常，增加糖利用，并能减轻氧应激和脂质过氧化[35]. 快速的降低体重可导致脂肪性肝炎进展，炎症、纤维化程度加重; 此外空 - 回肠旁路术后不宜降低体重 - 有可能导致“急性”NASH 和肝功能衰竭.

2.1.2 *有氧锻炼* Bergasa *et al*[36]研究发现有氧锻炼可改善慢性肝病患者疲劳症状及 NASH 的进展. 其机制是通过肾上腺素能系统影响内脏脂肪的分解，下丘脑 - 垂体 - 肾上腺轴的激活、氢化可的松、儿茶酚胺等激素的释放与 IR 密切相关，内脏脂肪的积聚(中心性肥胖)可作为胰岛素抵抗独立相关因素.

2.2 增强胰岛素敏感性

2.2.1 *二甲双胍*(metformin) 主要用于非胰岛素依赖型糖尿病的治疗，能有效的降低血糖，在 NASH 的治疗中也是一种胰岛素增效剂. 有研究发现二甲双胍能改善 NASH 患者的胰岛素抵抗、脂肪变性及肝功能异常，但应慎用于进展型肝病，以防引起高乳酸血症[37].

2.2.2 TZDs(thiazolidinedions) 是一种 PPAR-γ 配体，通过激活 PPAR-γ 增加糖利用和促进脂质代谢，减少 FFA 和 TNF-α 的释放，改善胰岛素敏感性和脂肪变性，用做胰岛素增效剂. 其中 Troglitazone 由于其严重的肝毒性已不提倡使用，而 Resiglitazone 和 Pioglitazone 则相当安全，少有肝毒性报道，即使有也是轻微可逆的[38]. Kawaguchi *et al*[39]在 NASH 动物模型中研究发现，用 TZDs 类药物治疗后能阻止 HSC 活化、明显降低 I 型胶原、MMP-2、TIMP-1、TIMP-2 mRNA 的表达，对于改善肝细胞脂肪变性、阻止肝纤维化、减少癌前病变的发生有积极疗效，提出 TZDs 对于 NASH 的治疗非常有利. 此外，Maeda *et al*[40]的研究发现 TZDs 可增加 adiponectin mRNA 的表达并抑制 TNF-α 减少 adiponectin 表达的作用.

2.2.3 *治疗高甘油三酯血症* 以 Fibrate 类药物为主. 常用 Bezafibrate、Fenofibrate. 机制是作为 PPAR-γ 受体激活物，改善线粒体 β 氧化，降低肝酶及甘油三酯水平. 此外有研究发现 Fibrate 能降低 TNF-α 诱导的 NF-κB 活化和 RANTES 表达，因而认为 Fibrate 可能是 RANTES 诱导的炎细胞迁移的抑制因素[10].

2.3 氧应激的治疗

2.3.1 *抗氧化剂* 维生素 E 又称 α- 生育酚(α-Tocopherol)功能主要是清除生物膜上的氧自由基，并对心肌保护起一定作用. 在 Hasegawa *et al*[28]的研究发现，NASH 患者经用 α-Tocopherol 治疗，血清转氨酶及 TGF-β1 水平均明显降低，推断其作用机制可能在于影响 TGF-β1 的作用.

2.3.2 *甜菜碱*(betaines) 其机制是作为甲基供体构成 VLDL 的前体物质，而 VLDL 是肝细胞输出脂质的重要形式，从而降低肝内脂质积聚. Abdelmalek *et al*[41]实验发现，Betaines 能有效的改善转氨酶水平及肝细胞脂肪变性、坏死性炎症、纤维化.

2.4 *熊去氧胆酸*(ursodeoxycholic acid, UDCA) 具有细胞保护、修复细胞膜、拮抗氧应激 / 脂质过氧化损伤、免疫调节等作用，提高单纯性脂肪肝防范“二次打击”的能力，减轻 NASH 时肝细胞损伤和炎症坏死程度，持续长期使用可改善肝脂肪变性[42]. 当前的研究表明 UDCA 防治 NAFLD 的前景最好，在基础治疗的同时加用 UDCA 可改善 NAFLD 患者的临床症状以及血清生化和纤维化指标.

2.5 *阿卡波糖*(acarbose) 是一种 α 糖苷酶抑制剂. Lieber *et al*[43]研究发现，阿卡波糖在 NASH 动物模型中的应用能明显降低 TNF-α mRNA 及其蛋白质的表达，以及 CYP2E1 和前胶原 mRNA 的表达，改善脂肪变性和炎症.

2.6 *肝移植* 美国关于移植的一项调查显示，有 3% 的肝移植由于 NASH 晚期的肝功能衰竭; 移植后脂肪变性出现在 2/3 的受体中，而其他肝病的出现率仅为 5-15%; 移植后 1 a，1/3 的患者会再发 NASH 及明显的纤维化，12.5% 的患者进展成为肝硬化[44]. 研究表明合并胰岛素抵抗综合征如糖尿病、高血压、高脂血症、中心性肥胖的患者移植后再发 NAFLD/NASH 的可能性较大[45]. 此外，有专家建议，NASH 再发后应早期应用抗氧化剂和 UDCA.

3 结语

国外学者认为 NAFLD 有可能成为欧美等发达国家第一大肝病，并且儿童及青少年 NAFLD/NASH 发病率亦呈快速递增趋势，NASH 青少年肝纤维化的发生率为 70%，并有部分发生肝硬化[45]. 虽然迄今我国尚无 NASH 的流行病学调查资料，但近年来随着我国肥胖群体的迅速增长，NASH 发病率不容乐观. 当前 NASH 诊治方面仍有许多问题，NASH 发病机制的研究亟待进一步的突破. 研究表明胰岛素抵抗与 NAFLD 关系密切，然而关于胰岛素信号通路与 NAFLD 之间的关系值得研究，细胞因子在 NAFLD 发生进

展中的作用和地位、氧应激与细胞损伤和肝纤维化的关系以及如何检测和预测NASH进展性肝纤维化皆为亟待解决的重要课题，上述问题的解决，无疑将对NAFLD的防治发挥重要的推动作用.

4 参考文献

1 Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-438

2 Angulo P, Keach JC, Batts KP, Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1999;30:1356-1362

3 Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001;50:1844-1850

4 Te Sligte K, Bourass I, Sels JP, Driessen A, Stockbrugger RW, Koek GH. Non-alcoholic steatohepatitis: review of a growing medical problem. *Eur J Intern Med* 2004;15:10-21

5 Bugianesi E, Zannoni C, Vanni E, Marzocchi R, Marchesini G. Non-alcoholic fatty liver and insulin resistance: a cause-effect relationship? *Dig Liver Dis* 2004;36:165-173

6 Hotamisligil GS, Johnson RS, Distel RJ, Ellis R, Papaioannou VE, Spiegelman BM. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 1996;274:1377-1379

7 Stephens JM, Pekala PH. Transcriptional repression of the C/EBP-alpha and GLUT4 genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. Regulations is coordinate and independent of protein synthesis. *J Biol Chem* 1992;267:13580-13584

8 Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, Moller DE. Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol* 1996;10:1457-1466

9 Crespo J, Cayon A, Fernandez-Gil P, Hernandez-Guerra M, Mayorga M, Dominguez-Diez A, Fernandez-Escalante JC, Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology* 2001;34:1158-1163

10 Hirano F, Kobayashi A, Makino I. Inhibition of TNF-alpha-induced RANTES expression in human hepatocyte-derived cells by fibrates, the hypolipidemic drugs. *Int Immunopharmacol* 2003;3:225-232

11 Shimohashi N, Nakamuta M, Uchimura K, Sugimoto R, Iwamoto H, Enjoji M, Nawata H. Selenoorganic compound, ebselen, inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production by the modulation of jun-N-terminal kinase and the NF-kappab signaling pathway in rat Kupffer cells. *J Cell Biochem* 2000;78:595-606

12 Faggioni R, Jones-Carson J, Reed DA, Dinarello CA, Feingold KR, Grunfeld C, Fantuzzi G. Leptin-deficient(ob/ob)mice are protected from T cell-mediated hepatotoxicity: role of tumor necrosis factor alpha and IL-18. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:2367-2372

13 Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1595-1599

14 Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM. Plasma adiponectin levels in overweight and obese Asians. *Obes Res* 2002;10:1104-1110

15 Hotta K, Funahashi T, Bodkin NL, Ortmeyer HK, Arita Y, Hansen BC, Matsuzawa Y. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes* 2001;50:1126-1133

16 Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:1084-1089

17 Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M, Paschke R. Adiponectin gene expression is inhibited by beta-adrenergic stimulation via protein kinase A in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Lett* 2001;507:142-146

18 Woodcroft KJ, Hafner MS, Novak RF. Insulin signaling in the transcriptional and posttranscriptional regulation of CYP2E1 expression. *Hepatology* 2002;35:263-273

19 Lieber CS. New concepts of the pathogenesis of alcoholic liver disease lead to novel treatments. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:60-65

20 Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, Neuschwander-Tetri BA. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994;107:1103-1109

21 Bonkovsky HL, Jawaid Q, Tortorelli K, LeClair P, Cobb J, Lambrecht RW, Banner BF. Non-alcoholic steatohepatitis and iron: increased prevalence of mutations of the HFE gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999;31:421-429

22 Tsukamoto H. Iron regulation of hepatic macrophage TNFalpha expression. *Free Radic Biol Med* 2002;32:309-313

23 Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor alpha in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut* 2001;48:206-211

24 Cope K, Risby T, Diehl AM. Increased gastrointestinal ethanol production in obese mice: implications for fatty liver disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000;119:1340-1347

25 Washington K, Wright K, Shyr Y, Hunter EB, Olson S, Raiford DS. Hepatic stellate cell activation in nonalcoholic steatohepatitis and fatty liver. *Hum Pathol* 2000;31:822-828

26 MacDonald GA, Bridle KR, Ward PJ, Walker NI, Houglum K, George DK, Smith JL, Powell LW, Crawford DH, Ramm GA. Lipid peroxidation in hepatic steatosis in humans is associated with hepatic fibrosis and occurs predominately in acinar zone 3. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:599-606

27 Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2002;35:62-73

28 Hasegawa T, Yoneda M, Nakamura K, Makino I, Terano A. Plasma transforming growth factor-beta1 level and efficacy of alpha-tocopherol in patients with non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1667-1672

29 Schwabe RF, Schnabl B, Kweon YO, Brenner DA. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol* 2001;166:6812-6819

30 Paradis V, Perlemuter G, Bonvoust F, Dargere D, Parfait B, Vidaud M, Conti M, Huet S, Ba N, Buffet C, Bedossa P. High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2001;34(4 Pt 1):738-744

31 Liu X, Wu H, Liu F, Huang M, Qiang O, Huang S. Effects of tumor necrosis factor alpha on the expression of connective tissue growth factor in hepatic stellate cells. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001;9(Suppl):15-17

32 Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:1399-1410

33 Riley NE, Li J, McPhaul LW, Bardag-Gorce F, Lue YH, French SW. Heat shock proteins are present in mallory bodies (cytokeratin aggresomes)in human liver biopsy specimens. *Exp Mol Pathol* 2003;74:168-172
34 Savas MC, Koruk M, Pirim I, Yilmaz O, Karakok M, Taysi S, Yilmaz A. Serum ubiquitin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatogastroenterology* 2003;50:738-741
35 Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab* 2000;26:98-106
36 Bergasa NV, Mehlman J, Bir K. Aerobic exercise: a potential therapeutic intervention for patients with liver disease. *Med Hypotheses* 2004;62:935-941
37 Uygun A, Kadayifci A, Isik AT, Ozgurtas T, Deveci S, Tuzun A, Yesilova Z, Gulsen M, Dagalp K. Metformin in the treatment of patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:537-544
38 Isley WL. Hepatotoxicity of thiazolidinediones. *Expert Opin Drug Saf* 2003;2:581-586
39 Kawaguchi K, Sakaida I, Tsuchiya M, Omori K, Takami T, Okita K. Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:187-195
40 Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 2001;50:2094-2099
41 Abdelmalek MF, Angulo P, Jorgensen RA, Sylvestre PB, Lindor KD. Betaine, a promising new agent for patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2711-2717
42 Bernal-Reyes R, Escudero RB. Treatment of non-alcoholic steatohepatitis(NASH). A comparative study of ursodeoxycholic acid and alpha-tocopherol. A preliminary report. *Rev Gastroenterol Mex* 2002;67:70-75
43 Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Acarbose attenuates experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:699-703
44 Contos MJ, Cales W, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Mills AS, Fisher RA, Ham J, Sanyal AJ. Development of non-alcoholic fatty liver disease after orthotopic liver transplantation for cryptogenic cirrhosis. *Liver Transpl* 2001;7:363-373
45 Burke A, Lucey MR. Non-alcoholic fatty liver disease, non-alcoholic steatohepatitis and orthotopic liver transplantation. *Am J Transplant* 2004;4:686-693

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 栏目设置

《*World Journal of Gastroenterology*，WJG》主要开设以下栏目. (1)文献综述: 基于作者自己研究为主的综述性论文. (2)特色栏目 如食管癌、胃癌、肝癌、病毒性肝炎、中医中药、中西医结合等，具有我国特色及国际领先水平的原创性研究论文. (3)基础研究 报道学术价值高、实验数据完整、具有原始性和创新性的研究成果. (4)临床研究 报道安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验的临床研究论文. (5)研究快报 报道具有原始性和创新性的阶段性成果. (6)病例报告: 报道对临床工作者有指导意义的个案.

World Journal of Gastroenterology 稿件管理

为了加快《*World Journal of Gastroenterology*，WJG》稿件管理的信息化、电子化进程，提高办刊质量，规范编辑工作流程，提高工作效率，我们成功开发了世界胃肠病学杂志社稿件管理系统，并于2003-04-15投入使用，来稿登记、 稿件回执、稿件初审、二审(包括选择审稿专家和发送审稿通知书)、审稿意见、终审定稿、发送录用通知书、退稿、编辑加工、数据交换、网上投稿查询等，全部实现了自动生成，电子化处理. 作者在WJG网上投稿查询系统内提交用户名(第一作者)和密码(文章编号)后可查询到稿件的处理状态，如编号、刊名、题名、作者、收稿日期、送审日期、接受日期、退稿日期、发票编号、待发表日期、入卷(期)和出版页码等在内的28个项目.

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):376-380
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

·文献综述·

胰星状细胞与胰纤维化发生机制的研究进展

万远太, 王天才

万远太, 王天才, 华中科技大学同济医学院同济医院肝病研究所
湖北省武汉市 430030
湖北省教育厅重点科研项目基金资助课题, No. 2004X032
项目负责人: 王天才, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院同济医院肝病研究所. wyt9304_cn@sina.com
电话: 027-68862317
收稿日期: 2004-12-10 接受日期: 2004-12-21

摘要

胰纤维化是慢性胰腺炎的主要病理特征，胰星状细胞(PSC)的活化在胰纤维化发生发展过程中起着关键作用.细胞因子如肿瘤坏死因子α(TNF-α)、转化生长因子β(TGF-β)、血小板生长因子(PDGF)、白介素(IL)和瘦素(Leptin)等在PSC增生、活化和细胞外基质(ECM)产生的过程中通过相应的信号途径发挥不同作用.信号级联最终通过转录因子如核转录因子κB(NF-κB)、过氧化物酶体增生物激活受体γ(PPARγ)和Krüppel样转录因子(KLF)家族成员等，与特定的DNA“靶位”结合对致纤维化靶基因发挥调控作用.

万远太, 王天才. 胰星状细胞与胰纤维化发生机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(3):376-380
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/376.asp

0 引言

慢性胰腺炎(chronic pancreatitis，CP)是一种慢性、进行性胰腺疾病，组织病理学上以纤维化和腺组织萎缩为特征，后期导致胰腺内、外分泌功能紊乱[1]. 作为慢性胰腺炎的中心病理环节，胰纤维化发生发展的分子机制还远未阐明. 最近研究表明，胰星状细胞(pancreatic stellate cell，PSC)在胰纤维化发生发展过程中起着关键作用[2-7]. 促炎因子和抑炎因子等细胞因子可作用于PSC调控胶原的表达，与此相关的细胞信号通路的分子机制研究已成为揭开胰纤维化产生之谜和探寻新的治疗途径的热门课题. 我们对细胞因子与PSC活化之间的关系在胰纤维化形成过程中的影响作一综述.

1 PSC与胰纤维化

1982年，Watari *et al*[8]发现大剂量维生素A饲养小鼠的胰腺中存在一种胞质中富含维生素A的细胞，以后证实这种维生素A储存细胞也存在于正常人胰腺中，并且可被激活转化为肌纤维母细胞而与胰纤维化形成有关[9]. 其具有以下的生物学特性[10]：(1)呈现典型“星芒状”形态，胞质中含有大量维生素A脂滴；(2)细胞骨架蛋白洁蛋白(desmin)和胶质原纤维酸性蛋白(GFAP)染色阳性；(3)促炎因子、氧化紧张(oxidative stress)等可使之活化转型为肌纤维母细胞，活化的细胞胞质中脂滴逐渐减少，可表达α平滑肌肌动素(α-SMA)，并产生大量细胞外基质(extracellular matrix，ECM)如I和III型胶原、层黏素、纤连蛋白等. 由于上述特性与肝星状细胞(hepatic stellate cell，HSC)非常类似，故命名为胰星状细胞. 研究显示[11]，星状细胞除存在于肝脏和胰腺外，也存在于肺、肾、小肠等部位. 但后者数量极少，且不能发生肌纤维母细胞表型转换，其作用尚不清楚. 动物实验和临床研究证实[12]，PSC活化与胰纤维化形成密切相关，细胞因子、乙醇、胰胆管阻塞等因素均可使之激活产生大量ECM，因而推测PSC可能与HSC有相似的生物学作用，在器官纤维化的发生发展中起关键作用.

2 细胞因子与PSC活化

细胞因子具有诱导增加生长因子的表达、活化炎性递质和调控免疫应答等生物学效应[13]. 肿瘤坏死因子(TNF)、白介素(IL)、转化生长因子(TGF)、血小板生长因子(PDGF)等细胞因子不仅与急性胰腺炎(acute pancreatitis，AP)炎症过程有关，而且可通过不同信号转导途径参与PSC的活化. 在实验诱导的胰腺炎症、坏死和纤维化动物模型中，多种细胞因子对体外分离培养的原代PSC具有激活效应，可诱导PSC增生、分化和迁移. 有关细胞因子受体如TGFβR，PDGFβR等在大鼠和人纤维化胰腺组织切片中mRNA和蛋白质表达水平也呈现不同程度上调[14-15].

2.1 TNF-α TNF-α属促炎因子，主要产生于急性胰腺炎早期阶段，在血液和胰腺组织中含量较高，血清中TNF-α含量与急性胰腺炎的严重程度呈明显正相关. 最近研究表明[12]，TNF-α可刺激PSC增生，诱导α-SMA的表达和胶原合成，在CP的发生中也起重要作用. TNF-α对PSC具有丝裂原作用，与其他丝裂原如PDGF一起作用于靶细胞诱导细胞增生. 在AP时和CP早期阶段，TNF-α表达升高，主要定位表达于胰腺小叶内腺细胞和炎性细胞内[16]. 有人观察到[17]，慢性进行性酒精性胰腺炎患者外周血单核细胞中TNF-α及其受体TNFR p55和p75表达明显上调，说明慢性胰腺炎过程中TNF-α强烈的细胞毒素作用对免疫应答具有明显影响.

2.2 TGF-β 纤维化形成的病理生理基础是由于ECM过量沉积导致组织功能紊乱和器官功能衰竭. 胰腺疾病，特别是慢性胰腺炎和胰腺癌，和纤维化过程关系非常密切. 越来越多的证据表明胰纤维化主要表现为损伤后修复过程失调. 这一概念基于纤维化和组织修复的生物学效应都涉及类似的分子调节机制，上述两个过程均与TGF-β家族成

员参与有关.TGF-β1是高度同源的TGF-β家族成员中的主要代表，具有刺激ECM表达、促进胶原沉积和抑制ECM降解的能力.近年来，生长因子介导纤维化形成的靶细胞已被锁定为PSC.有关TGF-β在肝纤维化分子机制中的作用近年来取得了很大进展.业已证实，TGF-β1通过活化HSC在肝纤维化的发生发展中起着重要作用[14].他不仅刺激ECM的产生，而且通过PI-3K途径调控PDGF激活HSC的生物学效应[18].有证据表明，TGF-β1与胰纤维化的形成也关系密切，在胰腺损伤修复过程中，内皮细胞通过自分泌机制使TGF-β1合成增加，同时TGF-β1可诱导胰腺中自身受体的表达[14].有人采用单克隆抗体分别检测健康和慢性胰腺炎小鼠胰腺中胞质型TGF-β1的表达，结果出现两种不同的现象:正常组仅在小叶中心和周边胰管的内皮细胞中染色阳性;CP模型组在所有胰管的内皮细胞中都呈阳性反应[19].Vogelmann *et al*也发现[20]，TGF-β1转基因小鼠胰腺中TGF-β1 mRNA明显升高，同时I和III型胶原表达显著上调，组织学上也呈现出慢性胰腺炎的形态学变化.研究显示[21]，TGF以自分泌和旁分泌方式调控细胞的生物学行为，在组织修复和ECM生成过程中发挥关键效应.Smad基因家族成员是TGF信号转导通路中关键的信号分子，受体激活的Smad2和Smad3进入核内与收缩蛋白Smad4结合形成寡聚复合体，作为转录调节子在复杂的信号网络中调控基因的表达.

2.3 PDGF CP时，PDGF和PDGF-βR除在小叶内腺细胞，胰管、血管和胰岛的内皮细胞中表达外，在PSC和炎性细胞中也广泛表达，PDGF及其受体同时过度表达的现象提示细胞中可能存在PDGF依赖性自分泌和旁分泌环[15].Bachem *et al*证实[3]，TGF-α，TGF-β1和PDGF可诱致原代培养的PSC活化使ECM产生增加，其中以TGF-β1的作用最为明显，由此推测TGF-β1可能是刺激基质合成的主要递质，而PDGF似乎起着关键的丝裂原作用.Schneider *et al*[22]从蛙皮素处理Wistar大鼠胰腺中分离培养PSC，采用PDGF-AB，TGF-β1和纤维母细胞生长因子bFGF等作用于培养激活的PSC，结果发现除TGF-β1外，PDGF-AB也是刺激PSC产生ECM的重要致纤维化递质.多肽生长因子PDGF含A链B链，可构成同源或异源二聚体，其与特异性受体酪氨酸蛋白激酶结合而发挥丝裂原效应[23].与配体结合后，PDGFR发生二聚化和自磷酸化进一步激活下游信号分子.对人HSC研究结果表明[24-25]，小G蛋白Ras，丝/苏氨酸特异性蛋白激酶Raf-1，细胞外信号调节激酶(extracellular-signal regulated kinase，ERK)，磷酸肌醇3激酶(PI3K)，黏附斑激酶(focal adhesion kinase，FAK)等是PDGF信号通路中重要的信号分子，其中ERK(包括ERK1和ERK2)调控细胞生长、增生和运动的作用尤其关键.受体激活后通过Ras-Raf-ERK通路触发磷酸化转录因子Elk-1和鞘脂类活化蛋白1(SAP-1)等转录因子的活化，最终诱致靶基因如c-Fos的表达.体外研究表明，PDGF不仅刺激PSC增生，而且也诱导PSC中ECM的合成[22, 26].与HSC相比，TGF-β1和PDGF调控PSC生物学行为的分子机制还远未探明.尽管大量体外研究显示，TGF-β1和PDGF在刺激PSC增生、分化和迁移等方面发挥了重要作用，但还需要进一步的体内研究和临床研究来证实.

2.4 IL IL种类繁多，与炎症、损伤、缺血、肿瘤等病变相关，其中大多属于炎性递质的范畴.有研究显示多种IL可能与CP的发生发展有关.

2.4.1 IL-1 AP时，IL-1主要来源于胰腺中的炎性细胞，发挥促炎作用.体外IL-1与PSC共孵育可促进α-SMA的表达[12]，推测IL-1可能参与了CP的发展过程，但IL1与PSC活化和胰纤维化的关系目前尚难定论.

2.4.2 IL-6 在体内，IL-1和TNF-α分泌增加可促使多种类型的细胞产生IL-6，IL-1和IL-6都属于早期促炎递质，他们与TNF-α在AP时发挥协同作用.IL-6的一般特性包括[27]:调节IL-1和TNF-α的分泌;在肝脏中具有抑炎特性;诱导肾上腺糖皮质激素合成而调节内分泌功能;在循环系统中可检出.HSC受IL-1和TNF-α刺激活化后可产生IL-6，PSC是否有类似效应还有待于进一步研究.然而，IL-6作用于PSC后可抑制PSC的增生并减少胶原合成，但却增加α-SMA的表达[12]，这一矛盾现象似乎反映了细胞因子在CP发生进程中的作用非常复杂.

2.4.3 IL-8 AP时，炎症浸润细胞包括中性粒细胞、巨噬细胞和单核细胞可分泌细胞因子IL-8，在实验性CP胰腺中，IL-8主要存在于小叶细胞、胰管分化细胞和间质细胞中，而正常胰腺细胞中未见IL-8的表达.结果提示，IL-8在CP发生的起始环节可能发挥潜在作用，这一过程往往同时伴有其他趋化因子和细胞因子的参与[28].

2.4.4 IL-10 AP时，IL-10是潜在的抑炎因子，通过内在反馈机制调节炎症性反应和炎症过程[29].他可抑制单核细胞和巨噬细胞中TNF-α，IL-1，IL-6和IL-8的合成.据报道，HSC受TNF-α或内毒素等因素激活后可产生IL-10，而且用中和抗体阻断内源性IL-10的活性后，“静止性”和活性HSC中胶原的合成明显增加[30].Demols *et al*[31]对IL-10缺失的转基因小鼠采用蛙皮素诱导AP模型，观察IL-10在调节急性炎症、再生和纤维化过程中的作用.研究发现，IL-10缺失组病变程度和纤维化程度比IL-10正常组都更为严重，而且血浆和胰腺中TGF-β1表达上调，胰腺中活化的PSC数量也明显增加.结果提示，内源性IL-10可调控AP时组织的再生修复，限制纤维化进程.Mews *et al*证实[12]，外源性IL-10可促进PSC中胶原的合成，结果与内源性IL-10的作用明显矛盾，目前尚不能对此作出合理解释，可能间接提示IL-10在CP发生发展过程中作用复杂.

2.5 Leptin 最近有学者提出leptin是促进肝纤维化的因子，他是一种主要由脂肪组织分泌的肽类激素[32].有学者报道，激活的HSC也可分泌leptin，敲除leptin基因或leptin受体缺失的ob/ob小鼠可耐受多种致纤维化因子如四氯化碳和硫代乙酰胺(TAA)等的攻击，不易发生肝纤维化，认为leptin可能通过上调PDGFR的表达而

发挥促纤维化的作用[33-34]. Leptin可通过激活多种信号通路如c-Jun氨基末端激酶/信号转导激活转录因子3(JNK/STAT3)信号级联[35]、PDGF通路或PI3K通路[36]，调控靶细胞的生长、增生和分化等生物学活动，其在PSC活化和ECM产生中的作用目前还不明确.

3 核转录因子在胰纤维化中的作用

核转录因子是一组正常情况下存在于胞质中的蛋白质，具有5-7个特异的核酸结合序列，经激活后能够转移至核内与双链DNA结合，激活结合序列下游多种基因的转录与表达. 目前研究表明多种核转录因子如NF-κB，蛋白活化转录因子1(AP-1)，过氧化物酶体增生物激活受体γ(PPAR-γ)和Krüppel样转录因子6(KLF6)等对于PSC的激活以及调节胶原的表达具有重要作用.

3.1 NF-κB 多效性转录因子NF-κB由Rel蛋白家族(p65，p50，p53，c-Rel和RelB)组成同源或异源二聚体，是众多促炎递质(如TNF-α和IL-1)基因表达的主要调控子[37]. 在哺乳动物细胞中典型的NF-κB由p65/p50构成异源二聚体，细胞因子、丝裂原、紫外线等刺激因素可诱导其合成. 细胞内NF-κB的活力取决于内源性抑制蛋白IκB-α的特性[38]，IκB-α与NFκB在胞质内结合成无活性的复合体，直接使NF-κB失活. 在各种刺激因素作用下，细胞因子介导的细胞信号通路激活，蛋白酶自磷酸化导致IκB-α降解，活性NF-κB从复合体中释放. 此时，活性NF-κB二聚体转运至核内，与特异性DNA序列(包括IκB-α编码基因)结合调控基因的转录[37]. 在刺激开始的数小时内，随着NF-κB活性的增强，通过负反馈机制IκB-α表达增加并在胞质中逐渐积聚，IκB-α与NF-κB再次结合使之回复到无活性状态[39]. 研究表明，IL-6，IL-8，KC等细胞因子启动子中存在NF-κB结合位点，多种细胞株中这些细胞因子的表达都受到NF-κB的调控[40-41]. 许多研究证实，HSC的活化与NF-κB活性升高有关[42]，在活化的HSC中NF-κB活性升高，主要是经典的p65/p50表达升高，同时p65同源二聚体呈低水平升高，此外一种未明的NF-κB DNA结合物也显著升高. 活化NF-κB的调控机制尚不清楚，可能与胞质内和核内IκB-α的表达持续减少有关[43]. NF-κB在炎症、损伤和细胞凋亡中起关键作用，其在AP炎症早期阶段活性快速升高，并可被TNF-α中和抗体所抑制从而改善蛙皮素诱导的胰腺炎症过程[44]. NF-κB在胰腺中的作用目前知之甚少，对PSC是否具有和HSC类似的活化作用还有待于进一步研究证实.

3.2 PPAR-γ 过氧化物酶体增生物激活受体γ(Peroxisome proliferator-activated receptor-γ，PPAR-γ)属核激素受体超家族成员，最早报道其在脂肪组织中高水平表达，并在脂肪细胞增生中起关键作用[45-46]. PPAR-γ属于配体激活的转录因子，可调控组织的生长、增生和炎症反应. 核受体PPAR-γ的配体包括多链不饱和脂肪酸的氧化代谢产物和前列腺素J类物质[47]. 实验研究表明，PPAR-γ配体罗格列酮和15 d-PGJ2可抑制PDGF诱导的PSC增生，减少α-SMA和α1前胶原mRNA的表达，其中15 d-PGJ2可抑制IκB-α的降解而降低NFκB的活性[48]. PPAR-γ配体可明显减轻胰腺炎症和纤维化进程，初步显示其在慢性胰腺炎和纤维化的治疗上具有较好的应用前景.

3.3 Krüppel样转录因子 Krüppel样转录因子(Krüpple-like transcription factor，KLF)家族成员包括SP1，基本转录元件结合蛋白1(BTEB1)和KLF6(前称Zf9)等，具有调控α1 I型胶原基因转录的生物学作用[49-51]. 在活化的HSC中，许多致纤维化因子如α1I型胶原、TGFβ1、TGFβR I和II等编码基因调控区都富含GC序列和GT或CACCC盒，这些序列是KLF转录因子基因家族成员的识别位点. 该家族成员以含3个锌指结构为共同特征，可与上述特定的DNA识别位点相结合调控基因的表达[52]. 在活化的HSC中，SP1 DNA结合活性和蛋白表达受转录后机制调节. 最近研究发现，KLF6可能就是一种潜在的关键调控子，在活化的“肌纤维母细胞样”HSC中，KLF6基因转录在HSC活化的超早期阶段即被诱导，并且持续表达[51]. 除了刺激α1 I型胶原基因转录外，KLF6也是TGF-β1通路中几种关键信号分子基因转录的调控子[53-54]. KLF家族在PSC活化和胰纤维化发生中的作用目前还不清楚，着眼于KLF家族各成员对活化PSC中ECM表达的影响，以找出胰纤维化形成的关键作用“靶点”，可能对于调控胰纤维化进程具有重要意义.

4 小结

胰纤维化的形成与PSC活化密切相关，而PSC活化和ECM的产生是由复杂的信号网络通路所介导的，多种细胞因子、核转录因子参与了这一重要过程[55-60]. IL与炎症反应有关，其中IL-1，IL-6和IL-8主要发挥促炎作用，可能是潜在的活化PSC的递质; IL-10则具有抑炎效应，并且调控星状细胞中胶原的合成，可能具有部分阻断早期纤维化进程的作用. 生长因子TGF-β1和PDGF在PSC生长、增生、分化、迁移和促进ECM合成过程中发挥了关键作用，信号分子Smad家族成员和ERK分别在两种不同而又相互联系的信号通路中扮演了重要角色. 信号级联最终通过活化的转录因子，与特定的DNA“靶位”结合而发挥对靶基因表达的调控作用. NF-κB和 KLF 家族能促进PSC分化、增生和增加ECM合成，而PPAR-γ及其配体可抑制纤维化相关基因的表达，转录因子在靶基因调控方面的作用值得重视. 进一步找出PSC活化和致纤维化关键的细胞因子、信号分子和调控子可能是今后研究胰纤维化的分子发生机制和探索新的有效治疗方法的重要课题.

5 参考文献

1 Stevens T, Conwell DL, Zuccaro G. Pathogenesis of chronic pancreatitis:an evidence-based review of past theories and recent developments. *Am J Gastroenterol* 2004;99:2256-2270

2 Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas:identification, isolation, and culture. *Gut* 1998;43:128-133

3 Bachem M, Schneider E, Grobe H, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Siech M, Beger H, Grunert A, Adler G. Identification, culture and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans. *Gastroenterology* 1998;115:421-432

4 Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL, Crawford DH, Pirola RC, McCaughan GW, Ramm GA, Wilson JS. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol* 1999;155:1087-1095

5 Apte MV, Haber PS, Darby SJ, Rodgers SC, McCaughan GW, Korsten MA, Pirola RC, Wilson JS. Pancreatic stellate cells are activated by proinflammatory cytokines:implications for pancreatic fibrogenesis. *Gut* 1999;44:534-541

6 Masamune A, Satoh M, Kikuta K, Suzuki N, Shimosegawa T. Establishment and characterization of a rat pancreatic stellate cell line by spontaneous immortalization. *World J Gastroenterol* 2003;9:2751-2758

7 Kikuta K, Masamune A, Satoh M, Suzuki N, Shimosegawa T. 4-hydroxy-2, 3-nonenal activates activator protein-1 and mitogen-activated protein kinases in rat pancreatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:2344-2351

8 Watari N, Hotta Y, Mabuchi Y. Morphological studies on a vitamin A-storing cell and its complex with macrophage observed in mouse pancreatic tissues following excess vitamin A administration. *Okajimas Folia Anat Jpn* 1982;58:837-858

9 Ikejire N. The vitamin A-storing cells in the huaman and rat pancreas. *Kurume Med J* 1990;37:67-81

10 Wells RG, Crawford JM. Pancreatic stellate cells:the new stars of chronic pancreatitis? *Gastroenterology* 1998;115:491-493

11 Schuppan D, Koda M, Bauer M, Hahn EG. Fibrosis of liver, pancreas and intestine: common mechanisms and clear targets? *Acta Gastroenterol Belg* 2000;63:366-370

12 Mews P, Phillips P, Fahmy R, Korsten M, Pirola R, Wilson J, Apte M. Pancreatic stellate cells respond to inflammatory cytokines:potential role in chronic pancreatitis. *Gut* 2002;50:535-541

13 Berberat PO, Friess H, Buchler MW. Chronic pancreatitis-new pathophysiological concepts. *Swiss Surg* 2000;6:227-230

14 Menke A, Geerling I, Giehl K, Vogelmann R, Reinshagen M, Adler G. Transforming growth factor-beta-induced upregulation of transforming growth factor-beta receptor expression in pancreatic regeneration. *Biochim Biophys Acta* 1999;1449:178-185

15 Ebert M, Kasper HU, Hernberg S, Friess H, Buchler MW, Roessner A, Korc M, Malfertheiner P. Overexpression of platelet-derived growth factor(PDGF)B chain and type beta PDGF receptor in human chronic pancretitis. *Dig Dis Sci* 1998;43:567-574

16 Xie MJ, Motoo Y, Su SB, Sawabu N. Expression of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6 and interferon-gamma in spontaneous chronic pancreatitis in the WBN/Kob rat. *Pancreas* 2001;22:400-408

17 Hanck C, Rossol S, Hartmann A, Singer MV. Cytokine gene expression in peripheral blood mononuclear cells reflects a systemic immune response in alcoholic chronic pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1999;26:137-145

18 Marra F, Gentillini A, Pinzani M, Choudhury GG, Parola M, Herbst H, Dianzani MU, Laffi G, Abboud HE, Gentilini P. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for platelet-derived growth factor's actions on hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997;112:1297-1306

19 Slater SD, Williamson RC, Foster CS. Expression of transforming growth factor-beta 1 in chronic pancreatitis. *Digestion* 1995;56:237-241

20 Vogelmann R, Ruf D, Wagner M, Adler G, Menke A. Effects of fibrogenic mediators on the development of pancreatic fibrosis in a TGF-β1 transgenic mouse model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G164-G172

21 Kruse ML, Hildebrand PB, Timke C, Folsch UR, Schmidt WE. TGFβ1 autocrine growth control in isolated pancreatic fibroblastoid cells/stellate cells *in vitro*. *Regul Pept* 2000;90:47-52

22 Schneider E, Schmid-Kotsas A, Zhao J, Weidenbach H, Schmid RM, Menke A, Adler G, Waltenberger J, Grunert A, Bachem MG. Identification of mediators stimulating proliferation and matrix synthesis of rat pancreatic stellate cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C532-C543

23 Claesson-Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* 1994;269:32023-32026

24 Carloni V, Pinzani M, Giusti S, Romanelli RG, Parola M, Bellomo G, Failli P, Hamilton AD, Sebti SM, Laffi G, Gentilini P. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase by PDGF is dependent on ras in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:131-140

25 Lewis TS, Shapiro PS, Ahn SG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 1998;74:49-139

26 Luttenberger T, Schmid-Kotasis A, Menke A, Siech M, Beger H, Adler G, Grunert A, Bachem MG. Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells:implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Lab Invest* 2000;80:47-55

27 Di Sebastiano P, Di Mola FF, Di Febbo C, Baccante G, Porreca E, Innocenti P, Friess H, Buchler MW. Expression of interleukin 8(IL-8)and substance P in human chronic pancreatitis. *Gut* 2000;47:423-428

28 Madro A, Celinski K, Slomka M. The role of pancreatic stellate cells and cytokines in the development of chronic pancreatitis. *Med Sci Monit* 2004;10:RA166-RA170

29 Cook JW, Karakozis S, Kim D, Provido H, Gongora E, Kirkpatrick JR. Interleukin-10 attenuates proinflammatory cytokine production and improves survival in lethal pancreatitis. *Am Surg* 2001;67:237-241

30 Wang SC, Ohata M, Schrum L, Rippe RA, Tsukamoto H. Expression of interleukin 10 by *in vitro* and *in vivo* activated hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1998;273:302-308

31 Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, Degraef C, Delhaye M, Geerts A, Deviere J. Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G1105-G1112

32 Saxena NK, Ikeda K, Rockey DC, Friedman SL, Anania FA. Leptin in hepatic fibrosis:evidence for increased collagen production in stellate cells and lean littermates of ob/ob mice. *Hepatology* 2002;35:762-771

33 Ikejima K, Takei Y, Honda H, Hirose M, Yoshikawa M, Zhang YJ, Lang T, Fukuda T, Yamashina S, Kitamura T, Sato N. Leptin receptor-mediated signaling regulates hepatic fibrogenesis and remodeling of extracellular matrix in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:1399-1410

34 Potter JJ, Mezey E. Leptin deficiency reduces but does not eliminate the development of hepatic fibrosis in mice infected with schistosoma mansoni. *Liver* 2002;22:173-177

35 Lang T, Ikejima K, Yoshikawa M, Enomoto N, Iijima K, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin facilitates proliferation of hepatic stellate cells through up-regulation of platelet-derived growth factor receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;323:1091-1095

36 Baldwin AS Jr. The NF-κB and IκB proteins:new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:469-481

37 Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-κB and Rel proteins:evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:225-260

38 Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF-κB activity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:621-663

39 Ohmori Y, Fukumoto S, Hamilton TA. Two structurally distinct κB sequence motifs cooperatively control LPS-induced KC gene transcription in mouse macrophages. *J Immunol* 1995;155:3593-3600

40 Wulczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF-κB/Rel and IκB gene families:mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 1996;74:749-769

41 Hellerbrand C, Jobin C, Licato LL, Sartor RB, Brenner DA. Cytokines induce NF-κB in activated but not in quiescent rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol* 1998;275(2Pt1):G269-G278
42 Hellerbrand C, Jobin C, Iimuro Y, Licato L, Sartor RB, Brenner DA. Inhibition of NF-κB in activated rat hepatic stellate cells by proteasome inhibitors and an IκB super-repressor. *Hepatology* 1998;27:1285-1295
43 Elsharkawy AM, Wright MC, Hay RT, Arthur MJ, Hughes T, Bahr MJ, Degitz K, Mann DA. Persistent activation of nuclear factor-kappa B in cultured rat hepatic stellate cells involves the induction of potentially novel Rel-like factors and prolonged changes in the expression of IκB family proteins. *Hepatology* 1999;30:761-769
44 Gukovsky I, Gukovskaya AS, Blinman TA, Zaninovic V, Pandol SJ. Early NF-κB activation is associated with hormone-induced pancreatitis. *Am J Physiol* 1998;275(6Pt1):G1402-G1414
45 Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240:889-895
46 Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994;79:1147-1156
47 Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995;83:803-812
48 Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Sakai Y, Satoh A, Shimosegawa T. Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-γ bock activation of pancreatic stellate cells. *J Biol Chem* 2002;277:141-147
49 Rippe RA, Almounajed G, Brenner DA. Sp1 binding activity increases in activated Ito cells. *Hepatology* 1995;22:241-251
50 Chen A, Davis BH. The DNA binding protein BTEB mediates acetaldehyde-induced Jun N-terminal kinase-dependent α1 (I)collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *Mol Cell Biol* 2000;20:2818-2826
51 Ratziu V, Lalazar A, Wong L, Dang Q, Collins C, Shaulian E, Jensen S, Friedman SL. Zf9, a Krüppel-like transcription factor up-regulated in vivo during early hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9500-9505
52 Turner J, Crossley M. Mammalian Kruppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci* 1999;24:236-240
53 Kim Y, Ratziu V, Choi SG, Lalazar A, Theiss G, Dang Q, Kim SJ, Friedman SL. Transcriptional activation of transforming growth factor beta1 and its receptors by the Kruppel-like factor Zf9/core promoter-binding protein and Sp1. Potential mechanisms for autocrine fibrogenesis in response to injury. *J Biol Chem* 1998;273:33750-33758
54 Kojima S, Hayashi G, Shimokado K, Suzuki Y, Shimada J, Crippa MP, Friedman SL. Transcriptional activation of urokinase by the Kruppel-like factor Zf9/COPEB activated latent TGF-beta 1 in vascular endothelial cells. *Blood* 2000;15:1309-1316
55 Ellenrieder V, Schneiderhan W, Bachem M, Adler G. Fibrogenesis in the pancreas. *Rocz Akad Med Bialymst* 2004;49:40-46
56 Jaster R. Molecular regulation of pancreatic stellate cell function. *Mol Cancer* 2004;3:26
57 Shimizu K, Shiratori K, Kobayashi M, Kawamata H. Troglitazone inhibits the progression of chronic pancreatitis and the profibrogenic activity of pancreatic stellate cells via a PPARgamma-independent mechanism. *Pancreas* 2004;29:67-74
58 Masamune A, Kikuta K, Satoh M, Suzuki N, Shimosegawa T. Protease-activated receptor-2-mediated proliferation and collagen production of rat pancreatic stellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:651-658
59 McCarroll JA, Phillips PA, Kumar RK, Park S, Pirola RC, Wilson JS, Apte MV. Pancreatic stellate cell migration:role of the phosphatidylinositol 3-kinase(PI3-kinase)pathway. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1215-1225
60 Ohnishi H, Miyata T, Yasuda H, Satoh Y, Hanatsuka K, Kita H, Ohashi A, Tamada K, Makita N, Iiri T, Ueda N, Mashima H, Sugano K. Distinct roles of Smad2-, Smad3-, and ERK-dependent pathways in transforming growth factor-beta1 regulation of pancreatic stellate cellular functions. *J Biol Chem* 2004;279:8873-8878

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February1;13(3):381-384
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

•文献综述 REVIEW•

血小板活化因子受体的研究进展

夏国栋, 夏时海

夏国栋, 夏时海, 中国人民武装警察部队医学院附属医院消化内科 天津市 300162
国家自然科学基金资助课题, NO. 30300456
项目负责人: 夏时海, 300162, 天津市, 中国人民武装警察部队医学院附属医院消化内科. xshhcx@sina.com
电话: 022-60578765 传真: 022-24370605
收稿日期: 2004-10-25 接受日期: 2004-11-12

摘要

血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)是目前发现的作用最强的脂质递质, 广泛存在各种组织, 并通过与其受体结合产生生物学效应.本文就血小板活化因子受体(platelet activating factor receptor, PAF-R)理化特征、信号传导机制及其拮抗剂的新进展进行了总结与概括, 并对其发展进行了展望.

夏国栋, 夏时海. 血小板活化因子受体的研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13(3):381-384
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/381.asp

0 引言

血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)是由磷脂酶A_2和乙酰基转移酶共同作用于细胞膜甘油磷酸胆碱而生成的一种生物活性磷脂, 是一种具有多种生物学活性的内源性磷脂递质, 其化学名称为1-0-烷基-2-乙酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱, 他是目前发现的作用最强的脂质递质, 广泛存在各种组织.PAF 主要由中性粒细胞、血小板、肥大细胞、内皮细胞和巨噬细胞等产生, 在体内具有广泛的生物活性, 可刺激粒细胞聚集、趋化、产生氧自由基;能抑制淋巴细胞再生, 降低IL-2产生;同时能刺激B 淋巴细胞产生Ig G 和Ig E;在炎症和应激反应中能诱导肝脏合成急性时相蛋白, 诱导巨噬细胞产生IL-1、IL-6和TNF.PAF还作为创伤、休克等多种疾病的重要因子, 与疾病的发生和转归密切相关.PAF的这些生物学效应是通过与其受体结合产生的.目前国内外许多学者就血小板活化因子受体(platelet activating factor receptor, PAF-R)进行了大量的研究, 本文就其理化特征、基因研究、信号传导机制及其拮抗剂作一综述.

1 PAF-R的理化特征

1.1 PAF受体的组织细胞分布 PAF受体是在[^{3}H]-PAF和PAF受体拮抗剂[^{3}H]-WEB2086的配体结合试验中发现的[1-2], 而且证实PAF受体存在于人与动物的许多细胞上, 如血小板、中性粒细胞、白血病分化细胞、T或B淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、枯否细胞和平滑肌细胞等.

1.2 PAF受体结构 人体多种细胞PAF受体的cDNA已经被克隆出来[3-7], 他们的基因编码相同, 位于第一对染色体上, 是一个具有342个氨基酸的蛋白质, 其分子质量为39 000 Ku, 是G偶联蛋白超家族中的一员, 其结构有着共同特点: 由胞外区、跨膜区、胞质结构区组成, 跨膜区是由与其他受体相似的7个疏水段组成, 但其中第二个疏水段的几个氨基酸高度保守.豚鼠肺组织的PAF受体与视紫红质类G蛋白偶联受体有广泛的同源性, 现确定PAF受体属于$G_{q/11}$和$G_{i/o}$的G蛋白偶联受体家族[8].PAF受体结构第三个细胞内袢环和羧基尾巴是与G蛋白相结合的部位.在受体羧基末端具有九个潜在的磷酸化位点, 这些磷酸化位点可能调节着受体与G蛋白相结合并且可能与PAF受体迅速脱敏有关系[9].Godfroid *et al*[10]对PAF受体进行了广泛研究, 认为存在下列构效关系:(1)在化学结构上1位上的疏水基团对产生激动作用是最主要的, C_{16}-C_{18}位基团可有效的引起血小板激活、低血压及血小板减少症, 而C_{14}基团可使支气管收缩;(2)2位上所连接的酯并不重要, 而在此位上的取代基的长度是关键;(3)3位上的磷酰基团很重要, 他的最佳长度是从氨基端开始n = 3.(4)甘油基的空间螺旋特征及长度很重要, 而与取代基的空间排列无关.PAF受体分子的疏水部分与细胞膜表面结合, 脂肪链插入膜内, 从而导致膜流动性的改变.

1.3 PAF受体数目 各种细胞表面的PAF受体及结合力均有很大差异如每个肝脏枯否细胞约有11 000个PAF受体, K_d值为0.45 nM(解离平衡常数Kd是受体亲和力的定量指标, K_d值越大则亲和力越小, 受体的K_d值一般在10^{-12}-10^{-8}mol/L, nM为nmol/L), 而每个HL-60细胞则只有5 200个, Kd值为0.7 nM.Nguer *et al*[11]发现, 不同B淋巴细胞表面PAF受体数目相差很大, 发现同一细胞株(Raji细胞)培养时间不同其PAF受体数目亦不同.这提示PAF受体的表达与B淋巴细胞激活和分化程度有关.同样, T淋巴细胞在受到OKT_3刺激后, 其PAF受体数目显著增多, 说明T淋巴细胞活化过程中亦可能有PAF受体参与.对于正常T淋巴细胞所检测到的PAF受体数目较少, 如OKT_3刺激T淋巴细胞使PAF受体数增多, 但不同时间数目相差很大.这说明T淋巴细胞活化过程中可能有PAF受体参与其细胞代谢.内毒素、多种细胞因子(如IL-2、IL-4、IL-5)、粒细胞、巨噬细胞集落刺激因子、INFα, 甚至PAF本身均可上调PAF受体表达.PKC可降低其表达.Carmody *et al*[12]用PKC激动剂-PMA与大鼠枯否细胞共同培养已证实了该结论.还有人报道, 脂

多糖(lipopolysaccharide，LPS)可以通过NF-κB下调PAF的表达[13].

1.4 PAF受体的亚型根据 PAF与不同细胞受体结合可发挥不同生物学效应，以及PAF受体拮抗剂对不同细胞的功能抑制力和结合力不同，Lambrecht[14] Hwang[15]提出PAF受体亚型学说.即PAF通过与不同亚型的PAF受体结合以发挥不同的生物学效应，如PAF诱导的Eos超氧阴离子和过氧化物酶的释放，就是由不同PAF受体亚型所介导的;Omingo *et al*[16]发现在沙鼠脑组织存在两类PAF特异性结合位点，其也具有专一性、可逆性和可饱和性，且这特异性结合可被其受体拮抗剂所阻断.在人血小板上存在两类明显不同的PAF结合位点.一类是对PAF显示出高亲和力，Kd 37±13 nmol/L表现出低活性;另一类表现出很强的亲和能力，对PAF亲和力差.家兔的血小板与人类相仿，对PAF高亲和位点的Kd为0.9±0.5 nmol/L[17-19].近年来，随着对PAF-R基因研究的深入，人们发现了人类PAF受体基因的突变[18].这也在基因方面为PAF受体亚型学说提供了依据.虽然如此，但是现在认为一个亚型PAF受体介导所有PAF的生物学效应[21-22].

2 PAF受体的基因研究

2.1 PAF受体基因的发现与定位 1991年Honda *et al*[23]建立了豚鼠肺PAF受体的cDNA克隆，并成功的进行了表达.以后相继有人从外周血白细胞[3]、心肌细胞[6]、Eol-1细胞[7]构建了PAF受体的cDNA文库及染色体组，获得了人PAF受体的cDNA[24].又有人从U-937幼单核细胞[4]、HL-60细胞[5] 获得了人PAF受体的cDNA.人多种细胞组织中PAF受体的cDNA编码序列相同.目前人、大鼠、小鼠的PAF受体cDNA文库都已经建立，恒河猴PAF受体部分基因已经清楚.人们通过cDNA编码PAF受体蛋白，两种不同的5'-非编码区被发现.研究人类基因库表明人类PAF受体基因产生两种不同的mRNA(transcrits1和2)，他们的表达是由不同的启动子来启动的.通过原位荧光杂交技术将PAF受体基因精确定位于1号染色体1p35至p34.3.小鼠的PAF受体基因也通过原位荧光杂交技术将其定位在第四号染色体D2.2段[25].猪的PAF受体定位在SSC6q26-27[23].

2.2 PAF受体基因多态性 在探索PAF受体基因多态性时，人们发现了他的新变化:在其编码的氨基酸序列上的第224个氨基酸(丙氨酸)由天冬氨酸代替，这个位置是位于PAF受体第三个细胞外环.根据调查，这种基因突变发生在7.8%的日本人口中[20].为了研究此种突变基因的特点，研究人员使中国仓鼠卵巢细胞转染并表达突变基因型受体或野生型受体.通过比较两种受体的信号转导变化，研究人员发现突变型受体明显对PAF的反应降低，说明突变受体对Gi和Gq蛋白结合力降低[20].

2.3 通过转基因小鼠对PAF受体的研究 近年来，为了更好的研究PAF和PAF受体生理、病理特点，人们通过应用转基因技术培育了PAF受体过度表达的PAFR-Tg小鼠[23]和PAF受体缺失的PAFR-KO小鼠[26].前者在心脏、骨骼肌中PAF受体处于高水平，在眼、皮肤、气管和大动脉中处于中度水平，但是在嗜中性粒细胞、脑、肺、肝、脾、小肠、子宫和睾丸表达很少.这可能是因为在胚胎期广泛过度表达PAF受体对胚胎有致死作用，而现在的表达谱类型则是自然选择的结果[26].后者通过Southern和Northern分析方法证实其嗜中性粒细胞未表达出具有活性的PAF受体，腹膜巨噬细胞和肺组织也没发现PAF拮抗剂WEB2086的结合位点[25].PAFR-KO小鼠体内激活的PAF不再诱使中性粒细胞内钙离子浓度升高也不使平均动脉压下降.这说明PAF受体是PAF 诱导胞内钙动员的必需因子[27].转基因小鼠可以方便PAF受体的研究.例如:转基因小鼠来探索小鼠低氧血症时PAF受体对呼吸机制的调节.他们发现在间断缺氧14 d后，PAFR(-/-)小鼠的通气量与PAFR(+/+)小鼠相比有明显的下降.后者表现出突出的通气时间延长.可以推论出PAF受体表达和功能是间断缺氧情况下诱导长时程通气的关键因素[28].

3 PAF受体的信号转导机制

PAF与受体结合后的细胞内信号转导可能有以下途经[29-34]:(1)通过G蛋白转导激活磷脂酶C(PLC_β)，第二信使为二酰甘油(DAG)和三磷酸肌醇(PI_3)，前者激活蛋白激酶C(PKC)，再激活转录因子NF-κB等，后者诱导细胞内Ca^{2+}浓度升高;(2) 通过G蛋白转导活化腺苷环化酶(AC)，第二信使cAMP激活蛋白激酶A(PKA);(3)通过直接或间接方式激活酪氨酸蛋白激酶(PTK)，再活化磷脂酶D(PLD)、PLC_γ、磷脂酰肌醇-3激酶(PI-3K)及丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)，前三者第二信使也为DAG和IP_3，而MAPK属于一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶.近来研究表明丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号传导途径调节两个关键酶:PLA2和乙酰转移酶，这两种酶与PAF的再修饰途径有关[33].PAF的合成有两条酶促途径[34]:(1)在磷脂酶A2(PAL2)和乙酰辅酶A作用下生成PAF，称再修饰(remodeling)途径，这是一种可逆性的病理过程;(2)从烷基甘油磷酸开始，经乙酰转移酶、磷酸胆碱转移酶等作用，最终合成PAF，称为新生(denovo)途径，为存在于体内的正常合成途径，这条途径是生理条件下产生PAF的主要途径.修饰途径是病理条件下合成PAF的主要途径:肝病时，在激动剂的刺激下，肝Kupffer细胞及肝内皮细胞会通过此途径合成大量PAF;修饰途径的前体底物为Sn_2位上带有长链脂肪酰基的磷脂甘油胆碱，他在磷脂酶A_2(PLA_2)的作用下，其Sn_2位上酯键断裂或脱酰基，生成无活性的LysoPAF和长链不饱和脂肪酸，前者的Sn2位在乙酰转移酶的作用下被乙酰化生成PAF，后者经环氧酶和脂氧酶的作用生成AA、前列腺素(PG)及血栓素B2(TXB2)等，此过程可逆且伴有大量花生四烯酸生成.而新生途径则是生理条件下合成PAF的主要途径，他的合成前体底物为烷基甘油磷酯，此过程不可逆，亦不伴AA的产生;脑肾等组织利用此途径合成PAF，调节人体血

压，维持自身器官稳定. 对于磷脂酰肌醇-3 激酶(PI-3K)，最新研究证明在胚胎的早期PAF起着关键的调控作用，他通过与其受体结合作用于磷脂酰肌醇途径来提高胚胎的生存率[37]. (4)同时也激活G蛋白受体激酶(GRK)，可以及时关闭信号传导;(5)不同信号途径可能存在交叉对话. 以上蛋白激酶激活后可引起相应靶蛋白磷酸化和/或激活靶基因转录，从而发挥生物学效应. 但是到目前为止尚无相关文献对这些信号转导途径有明确的报道.

4 PAF受体的抑制剂和拮抗剂

4.1 *抑制剂* 凡能抑制PAF合成及促进其降解的药物，均可影响其生物学效应的发挥，此类物质为抑制剂，按其作用机制可分为以下四类:(1) Ca^{2+}螯合剂EDTA，钙通道抑制剂异搏定，钙调素抑制剂三氟拉嗪，他们通过抑制具有钙依赖性的PAF合成酶PLA_2，而抑制PAF的合成;(2)具有调节环核苷酸(cAMP)水平的药物，如调节cAMP的PGI_2、PGE_2、β_2肾上腺素物质，调节cGMP磷酸双脂酶抑制剂，从而发挥间接作用;(3)PLA_2活性抑制物如可的松、强的松龙、柳氮磺胺吡啶、5-对氨水杨酸均能抑制由Ca^{2+}载体A 23187所致的PAF合成;(4)其他:色苷酸盐，促甲状腺释放激素、纳洛酮、Tidopidine、阿托品、异丙嗪的某些衍生物、C反应蛋白和TXA_2拮抗剂也具有对抗PAF的作用，能阻断PAF诱发的支气管收缩和血小板分泌.

4.2 *PAF受体拮抗剂* 他是能与PAF竞争受体，从而阻止PAF生物学效应的物质. 目前已知的PAF拮抗剂分为三大类:(1)PA F结构类似物，这是以PAF为模型设计的一系列甘油衍生物，主要有(1)CV3988、CV5898、CV6290;(2)NO6240;(3)SRI62-436、SIR62-586、SRI63-072、SIR63-073、SR163-119、SRI63-441;其中(1)为天然骨架;(2)为非天然骨架，是乙酰转移酶抑制剂，是将PAF环接而成，具中度拮抗PAF作用. (2)天然药物. 是一些从自然界存在的物质中分离提纯的物质. 包括:(1)来自中国银杏树中分离出的萜烯类化合物，如银杏苦内脂A、B、C，银杏苦内脂B又称BN52021，中国海风滕中提取的海风滕酮，从川芎中提取的川芎嗪;(2)木脂素和新木质素;支霉粘素和相关产物，是从真菌(S，phcafaciens)和微生物发酵中分离出，具有双烷硫呱嗪骨架，其中活性最强的为FR900452和FR49175. (1)和(2)类可与PLA_2分子上赖氨酸残基不可逆结合而抑制PAF合成. (3)人工合成化合物，主要有WEB2086、WEB2170、ORP4874、STY2108. 其中STY2108作用最强. 目前应用最广泛的有CV3988、BN52021、WEB2170、WEB2086. 应用放射性配体结合实验、RT-PCR、Western-blot分析方法发现结合在细胞膜上的[^{3}H]-PAF可以被[^{3}H]-PAF、三磷酸鸟嘌呤的非水解类似物(Gpp[NH]p)、溶解性PAF所替代. 在PAF受体的拮抗剂中，14-去氧穿心莲内酯和WEB2086对[^{3}H]-PAF抑制性结合位点结合性最强. 木脂素类的两种物质:五味子内酯甲和谷维素-五味子素对[^{3}H]-PAF抑制性结合位点也有影响. 但是银杏内脂(BN52020和BN52021)抑制[^{3}H]-PAF的能力仅为中等水平[38].

4.3 *受体拮抗剂与疾病* 新生儿坏死性小肠炎目前是世界新生儿专家所面临的问题. 在新生低体重儿，此病的发病率达到28%. 目前，有效的预防措施为PAF受体拮抗剂和生物制剂的应用[39]. Nawal *et al*[40]研究表明，HIV(人类免疫缺陷病毒)感染与炎症反应综合征和神经病学功能失调有关. AIDS的病理生理学的组织损伤与HIV感染和/或活化的巨噬细胞释放的各种前炎症细胞因子TNF-α和脂质递质PAF有关. 在脑脊液中PAF水平升高，改变了脑的免疫系统从而导致神经系统的受损. TNF-α和PAF被认为有神经毒性，但PAF水解酶和拮抗剂均可降低PAF和TNF-α的水平，在临床上表现为HIV相关的症状减轻. 这是因为PAF能上调TNF-α的合成，而TNF-α可上调HIV在脑组织中的复制，故PAF拮抗剂可减轻HIV感染的神经病学表现起重要作用.

5 展望

通过对动物、人及转基因动物PAF受体的进一步研究，充分认识到PAF和PAF受体可引起多种疾病如支气管炎、低血压、血管通透性升高、内毒素休克等. 利用生物技术以及新方法，PAF和PAF受体的致病机制越来越多的被了解. 在充分认识PAF受体介导的细胞内信号转导机制的基础上，对PAF受体拮抗剂需进一步研究. 通过阻断PAF受体的始动作用以阻止各类疾病的发生发展，对目前一些疑难疾病如SIRS、MODS、AIDS等防治有重要意义. 针对PAF和PAF受体新的系统治疗方法也将出现.

5 参考文献

1 Sugatani J, Lee DY, Hughes KT, Saito K. Development of a novel scintillation proximity radioimmunoassay for platelet-activating factor measurement:comparison with bioassay and GC/MS techniques. *Life Sci* 1990;46:1443-1450

2 Korth R, Zimmermann K, Richter WO. Lipoprotein-associated paf(LA-paf)was found in washed human platelets and monocyte/macrophage-like U937 cells. *Chem Phys Lipids* 1994;70:109-119

3 Nakamura M, Honda Z, Izumi T, Sakanaka C, Mutoh H, Minami M, Bito H, Seyama Y, Matsumoto T, Noma M. Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J Biol Chem* 1991;266:20400-20405

4 Kunz D, Gerard NP, Gerard C. The human leukocyte platelet-activating factor receptor. cDNA cloning, cell surface expression, and construction of a novel epitope-bearing analog. *J Biol Chem* 1992;267:9101-9106

5 Ye RD, Prossnitz ER, Zou AH, Cochrane CG. Characterization of a human cDNA that encodes a functional receptor for platelet activating factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;180:105-111

6 Sugimoto T, Tsuchimochi H, McGregor CG, Mutoh H, Shimizu T, Kurachi Y. Molecular cloning and characterization of the platelet-activating factor receptor gene expressed in the human heart. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189:617-624

7 Izumi T, Kishimoto S, Takano T, Nakamura M, Miyabe Y, Nakata M, Sakanaka C, Shimizu T. Expression of human platelet-activating factor receptor gene in EoL-1 cells following butyrate-induced differentiation. *Biochem J* 1995;305(Pt 3):829-835

8 贺师鹏, 胡雅儿, 夏宗勤. 受体研究技术. 第1版. 北京:北京大学

医学出版社, 2004:391-392
9 Nakamura M, Honda Z, Izumi T, Sakanaka C, Mutoh H, Minami M, Bito H, Seyama Y, Matsumoto T, Noma M. Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J Biol Chem* 1991;266:20400-20405
10 Godfroid JJ, Heymans F, Broquet C. Synthesis of ether phospholipids. *Pharmacol Res Commun* 1986;18(Suppl):1-10
11 Nguer CM, Pellegrini O, Galanaud P, Benveniste J, Thomas Y, Richard Y. Regulation of paf-acether receptor expression in human B cells. *J Immunol* 1992;149:2742-2748
12 Carmody RJ, Cotter TG. Signaling apoptosis:a radical approach [J]. *Redox Report* 2001;6:77
13 Hourton D, Stengel D, Chapman MJ, Ninio E. Oxidized low density lipoproteins downregulate LPS-induced platelet-activating factor receptor expression in human monocyte-derived macrophages:implications for LPS-induced nuclear factor-kappaB binding activity. *Eur J Biochem* 2001;268:4489-4496
14 Lambrecht G, Parnham MJ. Kadsurenone distinguishes between different platelet activating factor receptor subtypes on macrophages and polymorphonuclear leucocytes. *Br J Pharmacol* 1986;87:287-289
15 Hang W, Diehl JR, Grapes L, Rothschild MF, Roudebush WE. The pig platelet-activating factor receptor gene is expressed at the mRNA level in different tissues and is mapped to chromosome 6. *Anim Reprod Sci* 2002;70:277-282
16 Domingo MT, Spinnewyn B, Chabrier PE, Braquet P. Presence of specific binding sites for platelet-activating factor(PAF)in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;151:730-736
17 Homma H, Tokumura A, Hanahan DJ. Binding and internalization of platelet -activating factor 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine in washed rabbit platelets. *J Biol Chem* 1987;262:10582-10587
18 Shaw JO, Henson PM. The binding of rabbit basophil-derived platelet-activating factor to rabbit platelets. *Am J Pathol* 1980;98:791-810
19 Ukena D, Dent G, Birke FW, Robaut C, Sybrecht GW, Barnes PJ. Radioligand binding of antagonists of platelet-activating factor to intact human platelets. *FEBS Lett* 1988;228:285-289
20 Fukunaga K, Ishii S, Asano K, Yokomizo T, Shiomi T, Shimizu T, Yamaguchi K. Single nucleotide polymorphism of human platelet-activating factor receptor impairs G-protein activation. *J Biol Chem* 2001;276:43025-43030
21 Chen J, Giri SN. Differences in platelet-activating factor receptor mediated Ca++ response between hamster and guinea pig alveolar macrophages. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281:1047-1058
22 Centemeri C, Olli S, Tosarello D, Ciceri P, Nicosia S. Heterogeneous platelet-activating factor(PAF)receptors and calcium increase in platelets and macrophages. *Biochem Pharmacol* 1999;57:263-271
23 Honda Z, Nakamura M, Miki I, Minami M, Watanabe T, Seyama Y, Okado H, Toh H, Ito K, Miyamoto T. Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* 1991;349:342-346
24 Izumi T, Kishimoto S, Takano T, Nakamura M, Miyabe Y, Nakata M, Sakanaka C, Shimizu T. Expression of human platelet-activating factor receptor gene in EoL-1 cells following butyrate-induced differentiation. *Biochem J* 1995;305(Pt 3):829-835
25 Ishii S, Nagase T, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68:599-609
26 Ishii S, Nagase T, Tashiro F, Ikuta K, Sato S, Waga I, Kume K, Miyazaki J, Shimizu T. Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. *EMBO J* 1997;16:133-142
27 Ishii S, Kuwaki T, Nagase T, Maki K, Tashiro F, Sunaga S, Cao WH, Kume K, Fukuchi Y, Ikuta K, Miyazaki J, Kumada M, Shimizu T. Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J Exp Med* 1998;187:1779-1788
28 Reeves SR, Zal D. Platelet-activating factor receptor modulates respiratory adaptation to long-term intermittent hypoxia in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;287:R369-374
29 Wang X, Sun Z, Borjesson A, Haraldsen P, Aldman M, Deng X, Leveau P, Andersson R. Treatment with lexipafant ameliorates the severity of pancreatic microvascular endothelial barrier dysfunction in rats with acute hemorrhagic pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1999;25:45-52
30 Rivera JA, Werner J, Warshaw AL, Lewandrowski KB, Rattner DW, Fernandez del Castillo C. Lexipafant fails to improve survival in severe necrotizing pancreatitis in rats. *Int J Pancreatol* 1998;23:101-106
31 Vincent JL, Spapen H, Bakker J. Phase II multicenter clinical study of the platelet-activating factor receptor antagonist BB-882 in the treatment of sepsis. *Crit Care Med* 2000;28:638-642
32 de Souza LJ, Sampietre SN, Assis RS. Effect of platelet-activating factor antagonists(BN-52021, WEB-2170, and BB-882) on bacterial translocation in acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2001;5:364-370
33 Marques SA, Dy LC, Southall MD, Yi Q, Smietana E, Kapur R, Marques M, Travers JB, Spandau DF. The platelet-activating factor receptor activates the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and induces proliferation of epidermal cells through an epidermal growth factor-receptor-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:1026-1035
34 Ikeda O, Egami H, Ishiko T, Ishikawa S, Kamohara H, Hidaka H, Mita S, Ogawa M. Expression of proteinase-activated receptor-2 in human pancreatic cancer:a possible relation to cancer invasion and induction of fibrosis. *Int J Oncol* 2003;22:295-300
35 Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003;40:643-672
36 Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor(PAF)receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* 2000;39:41-82
37 Lu DP, Chandrakanthan V, Cahana A, Ishii S, O'Neill C. Trophic signals acting via phosphatidylinositol-3 kinase are required for normal pre-implantation mouse emlryo development. *J Cell Sci* 2004;117:1567-1576
38 Burgos RA, Hidalgo MA, Matthei SM, Hermosilla R, Folch H, Hancke JL. Determination of specific receptor sites for platelet activating factor in bovine neutrophils. *AmJ Vet Res* 2004;65:628-636
39 Kafetzis DA, Skevaki C, Costalos C. Neonatal necrotizing enterocolitis:an overview. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16:349-355
40 Serradji N, Bensaid O, Martin M, Kan E, Dereuddre-Bosquet N, Redeuilh C, Huet J, Heymans F, Lamouri A, Clayette P, Dong CZ, Dormont D, Godfroid JJ. Structure-activity relationships in platelet-activating factor(PAF). 10. From PAF antagonism to inhibition of HIV-1 replication. *J Med Chem* 2000;43:2149-2154

编辑 张海宁

PO Box 2345 Beijing 100023, China
Fax: +86-10-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

World Chin J Digestol 2005 February 1;13(3):385-388
世界华人消化杂志 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R
2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 文献综述 REVIEW •

蛋白质芯片在肿瘤以及恶性腹水诊断中的应用

于佳慧, 曲 波, 李宝杰

于佳慧, 曲波, 李宝杰, 哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086
项目负责人: 曲波, 李宝杰, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科. carolineyjh@yahoo.com.cn
电话: 0451-86673703
收稿日期: 2004-11-09 接受日期: 2004-11-29

摘要

腹水是一种临床常见病症，病因复杂，其病因诊断尤其是良、恶性腹水的鉴别具有重大意义.蛋白质芯片是近年来新兴起的生物学技术，具有高通量、高敏感性和高特异性的特点，可同时分析多个生物标本或检测多种疾病，被广泛应用于医学研究.本文介绍了蛋白质芯片基本原理、临床应用，尤其在肿瘤标志物的筛选和良、恶性腹水的鉴别诊断方面的研究进展.

于佳慧, 曲波, 李宝杰. 蛋白质芯片在肿瘤以及恶性腹水诊断中的应用. 世界华人消化杂志 2005;13(3):385-388
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/385.asp

0 引言

人类基因组(genome)排序工作的完成，是人类医学史上的里程碑.生物芯片技术将微加工技术和微电子技术结合起来，在固体芯片上构建微生物化学分析系统，以实现对细胞、蛋白质、DNA 以及其他生物组分的更加准确、快速、大批量信息分析，已经成为疾病诊断的重要手段.生物芯片包括基因芯片、蛋白质芯片和微缩实验室.基因芯片虽可在mRNA 水平上分析整个基因组表达的情况，但生命活动的主体是人体内存在的10万种以上的蛋白质，而蛋白表达水平并不是完全与mRNA 表达水平相一致，得到表达的蛋白要经过翻译后修饰，因此仅用基因芯片研究基因功能是不全面的.作为一种高通量、高灵敏度、高特异性且微型化的蛋白质分析技术，蛋白质芯片成为现阶段研究的热点之一.现就蛋白质芯片的原理及其在肿瘤及恶性腹水的早期诊断中的应用做以下综述.

1 蛋白质芯片基本原理

蛋白质芯片又名蛋白质阵列或蛋白质微阵列，大致类似于基因芯片，把成千上万种探针蛋白高密度排列在固相支持物表面上，通过探针蛋白特异性地捕获样品中的靶蛋白，洗去未结合的其他蛋白后，运用相应检测系统对靶蛋白进行定性、定量分析.

蛋白质芯片选用抗体、抗原、受体、酶作为探针蛋白，探针蛋白可事先合成或经纯化制备，也可在芯片上直接合成.芯片载体常用玻璃载片，另有纤维素膜、多孔凝胶块玻片以及微孔板等.

检测靶蛋白的方法分直接检测法和蛋白质标记技术.直接检测法通常是利用生物传感器，如基质辅助激光解析电离飞行时间、电喷雾质谱分析、表面等离子共振技术等来鉴定结合在芯片上的靶蛋白或小分子配体.表面增强激光解析及电离飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight，SELDI-TOF)因其具有方便、快速、灵敏度高、蛋白信息量多等优点是目前被广泛接受和应用的蛋白质芯片检测技术.蛋白质标记技术与基因芯片一样，预先标记待测样品中的蛋白质，如荧光物质或同位素，并以类似基因芯片的标准扫描仪照相技术、激光扫描系统等检测芯片信号，最后通过专门的计算机软件进行图像分析和结果解释.

2 蛋白质芯片的临床应用及进展

任何疾病在发生病理变化之前，细胞内的蛋白质在成分和数量上都会有相应的改变.所以从理论上讲，通过对蛋白质的动态观察可以筛选出对疾病早期诊断的指标和征兆.实现这种诊断的前提是要找到疾病的特殊标志分子.这种筛选是大通量的，传统的检测方法无法实现.蛋白组学的开展和研究以及新技术的兴起实现了大规模的筛选，同时也通过建立蛋白质组学质谱来动态观察一系列蛋白质的变化，从而指导临床的诊断和治疗.

蛋白质芯片是近年来蛋白组学研究中兴起的新研究方法.与传统的蛋白质研究方法相比，他可以在一次实验中提供相当大的信息量，使我们能够全面、准确的研究蛋白表达谱，这是传统的蛋白研究方法无法做到的.蛋白质组芯片具有高度灵敏性，可以检测出蛋白样品中微量蛋白的存在，检测水平已达μg/L 级.德国科学家Lueking *et al*[1]用人类甘油醛-3-磷酸盐脱氢酶(GAPDH，Swiss-Prot P04406)，人类热休克蛋白90_a C 末端片段(M_r 43 300)($HSP90_a$，Swiss-Prot P07900)和鼠免疫球蛋白重链结合蛋白(BIP，Swiss-Prot P06767)蛋白抗体制作成抗体阵列，可以检测某种蛋白达到10 nmol/L.美国科学家Haab *et al*运用绿色荧光(green fluorescence)标记抗体微阵列，用红色荧光(red fluorescence)标记蛋白混和物，并运用计算机识别(R/G)的信号强弱，来进行检测，检测水平可达到1 μg/L.因此，运用蛋白质芯片技术结合蛋白质谱或蛋白质差示分析，对疾病中一些上调或下调的蛋白质在数量和结构上进行定性和定量分析，从中发现疾病发生的特殊标志分子，进而指导临床，对疾病的筛选普查、早期诊断、治疗以及预后具有重大意义.

就应用而言，蛋白质芯片可分为两种类型:一种是蛋白质功能芯片(protein function chip)，他由成千上万的天然蛋白质固定在一平面载体上构建而成，这种芯片可以同时检测大量蛋白质的功能，故得名;另一种是蛋白质检测芯片(protein detecting chip)，他是由大量蛋白质结合物质构建的芯片.

2.1 蛋白质功能芯片 在蛋白质功能芯片中，每一个蛋白质位于芯片中的一个特定位点，他可用于同时研究大量天然蛋白质的功能，分析他们的生物化学活性，诸如酶的活性、抗体特异性等，此外，蛋白质芯片在整个基因组水平上使DNA 序列信息与蛋白质产物之间建立直接联系.蛋白质功能芯片在基础医学研究中应用比较广泛.

2.2 蛋白质检测芯片 蛋白质检测芯片上各位点并非天然蛋白质，而是各蛋白质的高特异性配体，这些配体可以在复杂的生物学溶液(如细胞提纯液)中识别他们的靶肽.这种芯片能够在同一生物学样本中同时检测大量蛋白质的水平，因此可作为一种分析工具，其应用领域将远远超过基础研究，被广泛应用于临床诊断、药物研究、环境监测等.

蛋白质芯片具有显示人体液中DNA、蛋白质、肽和抗体的能力，这将增加对健康及疾病的认识.例如，通过检测并对比人健康与患病状态下的血浆、脑脊液或其他体液成分，将有可能识别疾病相关蛋白，从而不仅可以加深对这种疾病的认识，而且可以借助这些疾病相关蛋白，分析此疾病的易感性，帮助其临床诊断、观察疾病进程、治疗效果和估计预后.

2.2.1 在肿瘤标志物筛选中的应用 肿瘤细胞的基因突变和多态性是肿瘤分子生物学的重要特征之一，有研究表明[2]，50%的乳腺癌，56%的前列腺癌，35%的结肠癌在转移之前，用常用的检测方法难以检测，而在肿瘤早期就在蛋白水平发生微小的变化.因此用高灵敏度的蛋白芯片技术寻找新的肿瘤标记物用于早期诊断和监测治疗效果，已成为临床医学研究的一项热门趋向[3-4].

2.2.2.1 卵巢癌 用传统的卵巢癌标志物CA125检测，仅有50-60%的I期卵巢癌患者其CA125浓度升高，且阳性预测值低，需与B超等其他诊断方法结合使用.由于卵巢内病理变化可以引起血清中蛋白质组的改变，Petricoin *et al*[5]利用SELDI/TOF MS对50名健康女性及50例卵巢癌患者的血清进行分析，发现荷质比为534，989，2 111，2 251，465处的5个波峰同时变化(与健康人相比，患者血清中2 251 波峰下降，其余均升高).将这一蛋白质波谱模型用于分析116个未标记的血清样本，诊断卵巢癌敏感性为100%，特异性为95%，阳性预测值为94%，而同样的样品用CA125检测，阳性预测值为35%.由此可见，该方法简单、迅速，敏感性及特异性高，用于高危人群筛查具有非常好的前景.

2.2.1.2 胰腺癌 Rosty *et al*[6] 使用SELDI-TOF MS对胰液及血清中的微量表达蛋白质进行测定，在67%(10/15)的胰腺癌患者及14%(1/7)的其他胰腺疾病患者中发现一个分子质量为M_r 16 570的蛋白质.蛋白质芯片免疫测定技术证明该种蛋白质为HIPPPAP Ⅰ(hepatocarcinoma-intestine pancreas pancreatitis associated protein I).与对照组相比胰腺癌患者血清及胰液中该蛋白质水平都明显升高，且胰液中HIPPPAP Ⅰ水平超出血清的1 000倍.胰液中HIPPPAP Ⅰ水平超过20 mg/L者患胰腺癌的危险性是低于20 mg/L者的21.9倍，预测胰腺癌的敏感性和特异性分别为75%、87%，其浓度与肿瘤大小、淋巴结转移、肿瘤分期无关.由此说明，在检测胰腺癌的标志物方面，血清的敏感性不如胰液，胰液中HIPPPAP Ⅰ的测定可能有助于胰腺癌的诊断.其局限性在于急性胰腺炎时该蛋白质水平亦升高.

2.2.1.3 大肠癌 Roboz *et al*采用SELDI-TOF分析了大肠癌患者与正常对照之间的血清蛋白图谱之间的差异，其中大肠癌患者高表达M_r 8 942蛋白，而M_r 9 300的蛋白呈低表达，正常对照组上述两个蛋白的表达情况与患者组正好相反.实验过程中用胰岛素作为内标参照.根据质谱检测结果患者组M_r 8 900表达量为正常对照组的3倍.实验结果表明M_r 8 900和M_r 9 300蛋白可作为检测大肠癌的肿瘤标记物.Watkins *et al*也报道发现M_r 13 800蛋白可作为结肠癌的肿瘤标记物.Zhao *et al*[7]用SELDI-TOF建立结肠癌蛋白质组指纹库对结肠癌患者血清进行双盲检测，结果显示准确率为96.8%(116/120)，敏感性和特异性分别为95.9%(70/73)、97.9%(46/47).

2.2.2 多种肿瘤标志物合成蛋白质芯片的应用 Veenstra[8]认为，疾病发生时，其细胞的蛋白的数量和结构均发生特征性变化，恶性肿瘤的生长是极其复杂的多病因过程，观察一系列的蛋白标志物的变化可提高疾病筛选和诊断的准确率和特异性.他提出用蛋白芯片来检测更多的蛋白标志物，从而对疾病做出早期明确诊断，尤其是对那些症状表现多样化或疾病早期症状不典型的患者更有意义.

上海数康生物公司开发多肿瘤标志物检测系统将最常见的12种肿瘤标志物集成在一张芯片上，使原来需要进行12次实验的操作一次完成.一次检测提供12种肿瘤标志物的信息，使医生可以更好的从相对全方位的信息角度做出准确判断.国内现已有研究将此蛋白芯片用于肿瘤筛选和早期诊断.

邓安梅 *et al*[9-10]采用12种肿瘤标志物蛋白质芯片(C12)对结肠癌、肺癌患者以及正常对照组、疾病对照组的血清进行检测分析，结果表明CEA，A19-9，A242联合检测结直肠癌患者血清阳性率可达83.3%;肺癌患者的C12阳性率显著高于正常对照、疾病对照组，其图像直观，易于鉴别，蛋白质芯片的反应强度与血清标本中含量具有较好的相关性.用蛋白质芯片试剂盒联合检测肺癌患者NSE、CEA、CA242和CA19-9，达到80%的阳性率，可为临床诊治提供有价值的依据.齐军 *et al*[11]用C12分析53例卵巢肿瘤患者、12例良性卵巢囊肿以及98名正常对照人群血清，结果表明，单一CA19-9检测各组差异无显著性，使用多肿瘤标志物检测系统时，肿瘤组与健康组，良性肿瘤组与健康组均差异有显著意义.张露 *et al*[12]使用多

肿瘤标志物检测系统结合人工智能用于肝癌诊断的研究之中，使用单一指标检测肝癌组的阳性检出率为66%，而使用多肿瘤标志物检测系统后检出率提高为92%，但存在假阳性，结合人工智能分析后，阳性降低，肝癌组的正确诊断率为88%，特异性明显升高. 王平 *et al*[13]用多肿瘤标志物蛋白质芯片检测系统，对正常人、胰腺癌和胰腺良性疾病患者血清中的肿瘤标志物进行检测，结果表明肿瘤标志物CA19-9和CA242对胰腺癌的诊断意义最大，CA125虽然被广泛认为是诊断卵巢癌的肿瘤标志物，但在胰腺癌中也有阳性表达. 运用蛋白质芯片系统联合检测，显著提高胰腺良、恶性疾病的敏感性和特异性，与传统的免疫化学发光法相比，结果差异均无显著意义. 在正常人组和胰腺良性疾病组，2种方法的检测结果一致率分别达100%和95%. 而蛋白质芯片系统检测方法更加便捷、快速，说明蛋白质芯片检测系统对胰腺癌的诊断具有更高的临床意义.

3 蛋白质芯片与腹水

腹水是非常常见的临床体征，其病因和发生机制非常复杂. 肝脏和门脉循环系统疾病如慢性肝病、门脉性肝硬变、肝癌等; 心血管系统疾病如充血性心力衰竭、心包炎、心包压塞等; 肾脏疾病如肾炎、肾病综合征等; 腹膜疾病如结核性腹膜炎、腹膜恶性肿瘤等; 女性生殖系统的许多良恶性疾病以及营养缺乏、淋巴系统疾病等均可导致腹水的出现. 对于腹水的病因诊断和良恶性腹水的鉴别具有非常重要的临床意义.

传统的腹水常规检查方法特异性和敏感性差，腹水细胞学检查特异性虽高，但敏感性低(约为40-60%). Fiegl *et al*[14]将细胞形态学和原位杂交荧光(fluorescence in situ hybridization，FISH)方法联合检测原发性恶性间皮瘤、转移性间皮瘤、反应性间皮瘤导致的腹水，敏感性从44%提高至61%.

肿瘤标志物是指肿瘤细胞合成、分泌或脱落到体液或组织中的生物活性物质，通过测定其含量对肿瘤有辅助诊断价值. 近年的研究表明血清及腹水肿瘤标志物等测定具有敏感性及特异性高，简单且无创的优点，已成为临床上判断良性和恶性腹水的重要方法之一. 目前公认诊断价值较高的标志物是AFP，CEA，CA19-9，CA50及CA125等. 国内外研究[15-16]表明，单一的肿瘤标志物在多种肿瘤中都有高表达，不具有器官特异性，因此，更多研究尝试运用多种肿瘤标志物联合检测，以提高诊断特异性. Jiang *et al*[17]联合TGF，CA19-9，CA242针对胰腺癌的诊断中，单一指标的灵敏度和特异性为91.6%和93.5%，联合检测后的灵敏性和特异性变为77.0%和100.0%. Wu *et al*研究表明联合CA242和CEA可提高结肠癌诊断的准确性并有助于临床预后的评价. Alexandrakis *et al*研究表明CA19-9，CA50，CEA的高分泌对胆管癌具有确诊性. Su *et al*[18]联合E-cadherin，CEA和calretinin检测93例细胞学检测无明显特异的浆膜积液，针对转移性间皮瘤，单一指标的敏感性为85.5%、79.6%和81.6%，特异性为100%、97.4%和87.2%，联合E-cadherin和CEA后的敏感性变为96%，结果表明，联合E-cadherin，CEA和calretinin可更有效的帮助在细胞学检测中无明显特异的浆膜积液进行鉴别诊断. 国内也有报道联合应用铁蛋白、癌胚抗原、人绒毛膜促性腺激素、对恶性胸腹水进行检测，得出多种肿瘤标志物联合检测可提高阳性率的结论.

消化系肿瘤多伴有腹膜转移，具有极高的致死率. 由于癌症的演变、转移是多阶段、多因素、多基因参与的复杂病理过程，具体机制尚未十分清楚. Sakakura *et al*[19]运用基因芯片技术针对消化系肿瘤以及恶性腹水中的细胞系进行检测，得到一系列肿瘤相关调控基因变化. 然而，癌变的最终效应由蛋白质表达来完成，目前已发现有200多种的翻译后加工模式能够影响蛋白质的稳定性、靶位点、半衰期及蛋白质-蛋白质、蛋白质-核酸间的相互作用，故仅在基因水平进行研究不能阐明癌症的病理机制，无法筛选出理想的标志物. 蛋白质芯片作为基因芯片技术的良好补充，成为目前研究的热点. Meiko *et al*[20]应用SELDI蛋白质芯片平台针对39个从肿瘤组织、腹水等体液中分离建立起的细胞系进行检测，寻找到一种潜在的具有高度特异性的结肠癌肿瘤标记物，同时证明，蛋白质芯片平台可以完成肿瘤标记物从发现到筛查、评估的全过程.

蛋白质芯片具有高灵敏性、高特异性、多指标并列的特点，可作为疾病早期诊断尤其肿瘤的早期筛选的强有力的工具. 同时，蛋白质芯片检测通过不同的表面修饰而选择性地捕获蛋白质，有效地降低了被检样品中蛋白质的复杂性，具有快速、简单、敏感、样品用量极少的优点，被广泛用于临床. 李新辉 *et al*[21]用多种肿瘤标志物蛋白质芯片系统针对126例腹水患者的腹水和血清进行检测，得出3项以上阳性对恶性腹水的敏感性为63%，特异性达96%. 结果表明，蛋白质芯片通过对血清、腹水、脑脊液等体液的检测来实现临床对肿瘤的快速准确诊断，病情鉴别及疗效动态观察和肿瘤分类、分期、定位，克服了腹水成因复杂以及肿瘤细胞生物学特征的复杂性和多态性等给诊断和治疗带来的困难.

4 蛋白质芯片的应用前景和存在问题

人类基因组计划测序完成之后，人类对疾病的认识和早期诊断及治疗上升到新的台阶. 由于蛋白质表达与活性基因表达的mRNA无直接相关性，蛋白质的表达、活性、空间构象等在疾病任何时期的基因转录后调节之后均可发生变化. 有研究表明，人类每种基因可产生六种以上的蛋白质. 所以，了解正常细胞阶段蛋白质的结构功能以及疾病发生之后蛋白质的一系列变化可以为疾病的诊断、预防与治疗提供一个内在的信息指导. 肿瘤发生之前，通过翻译后调节产生一系列的具有重要信息的蛋白质的变化，检测这些蛋白质的变化可以为肿瘤的早期诊断，治疗以及

预后提供一个更准确指导. 蛋白质组学作为疾病基因学研究的重要补充，既可以推动基因组学发展，验证基因组学方面的变化，同时还可以基于蛋白质特点发现新的基因. 推测疾病状态下基因的变化[22]，已成为现阶段研究热点.

蛋白质芯片技术是蛋白质组学中新兴起的重要蛋白质检测技术，受蛋白质空间构象和生物学活性的影响，蛋白质芯片在制作方面以及蛋白质的纯化方面还存在一系列的困难. 另外，为了方便种类繁多的蛋白质的功能检测和分析，通过不同途径或方式获取并用于制作蛋白芯片的蛋白质必须首先经过纯化. 正常和异常情况下蛋白质与蛋白质之间的相互作用的差别都需要我们进一步去探索.

总之，高通量分析平台蛋白芯片技术的建立将为蛋白质功能及其相关的研究提供快速、高信息量和更为直接的研究方法，与其他的分子生物学分析方法相比，蛋白芯片技术具有快速、平行的优越性. 但有芯片制作方面存在的问题，目前用于临床检测的蛋白质芯片还比较单一，有待于进一步开发和改进，以提高疾病诊断的准确性和特异性.

5 参考文献

1 Lueking A, Horn M, Eickhoff H, Bussow K, Lehrach H, Walter G. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Anal Biochem* 1999;270:103-111

2 Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumor-host interface. *Nature* 2001;411:375-379

3 李新华, 张万岱, 肖冰, 张振书. 微阵列技术及其在消化系疾病研究中的应用进展. 世界华人消化杂志 2003;11:1054-1058

4 翁永强, 邱双健, 刘银坤, 汤钊猷. 肿瘤标志物的蛋白质组学. 世界华人消化杂志 2004;12:1188-1190

5 Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, Mills GB, Simone C, Fishman DA, Kohn EC, Liotta LA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359:572-577

6 Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, Baldwin WM, Zahurak ML, Carnot F, Chan DW, Canto M, Lillemoe KD, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein I as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Res* 2002;62:1868-1875

7 Zhao G, Gao CF, Song GY, Li DH, Wang XL. Identification of colorectal cancer using proteomic patterns in serum. *Ai Zheng* 2004;23:614-618

8 Veenstra TD, Prieto DA, Conrads TP. Proteomic patterns for early cancer detection. *Drug Discov Today* 2004;9:889-897

9 邓安梅, 仲人前, 陈孙孝, 周晔, 孔宪涛. 用蛋白质芯片技术检测结直肠癌患者的肿瘤标志物. 中华消化杂志 2002;22:501-502

10 邓安梅, 仲人前, 陈孙孝, 周晔, 孔宪涛. 用蛋白质芯片联合检测肺癌患者血清中的肿瘤标志物. 中国免疫学杂志 2002;18:701-703

11 齐军, 车铁群. 使用多肿瘤标志物蛋白质芯片诊断系统检测卵巢肿瘤. 中华检验医学杂志 2003;26:358-360

12 张露, 丛冠宁, 杨小丽, 郑怀竞. 多肿瘤标志物蛋白质芯片检测系统结合人工智能在肝癌诊断研究中的初步评价. 中国医药导刊 2003;23:35-36

13 王平, 崔天盆, 刘涛, 谢俊丽, 高琼, 吴健民. 蛋白质芯片联合检测胰腺癌患者血清肿瘤标志物的意义. 中华检验医学杂志 2003;26:11-14

14 Fiegl M, Massoner A, Haun M, Sturm W, Kaufmann H, Hack R, Krugmann J, Fritzer-Szekeres M, Grunewald K, Gastl G. Sensitive detection of tumour cells in effusions by combining cytology and fluorescence in situ hybridisation(FISH). *Br J Cancer* 2004;91:558-563

15 黄跃, 林明芳, 邱小雪. 血清CA125, CA19-9, CA50含量对消化系肿瘤的诊断价值. 华人消化杂志 1998;6:1063-1064

16 冷爱民, 张桂英. CA125在肝硬化患者中的前瞻性观察. 世界华人消化杂志 2004;12:1759-1760

17 Jiang JT, Wu CP, Deng HF, Lu MY, Wu J, Zhang HY, Sun WH, Ji M. Serum level of TSGF, CA242 and CA19-9 in pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:1675-1677

18 Su XY, Li GD, Liu HB, Jiang LL. Significance of combining detection of e-cadherin, carcinoembryonic antigen, and calretinin in cytological differential diagnosis of serous effusion. *Ai Zheng* 2004;23:1185-1189

19 Sakakura C, Hagiwara A, Nakanishi M, Shimomura K, Takagi T, Yasuoka R, Fujita Y, Abe T, Ichikawa Y, Takahashi S, Ishikawa T, Nishizuka I, Morita T, Shimada H, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Yamagishi H. Differential gene expression profiles of gastric cancer cells established from primary tumour and malignant ascites. *Br J Cancer* 2002;87:1153-1161

20 Shiwa M, Nishimura Y, Wakatabe R, Fukawa A, Arikuni H, Ota H, Kato Y, Yamori T. Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI proteinchip platform. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;12:18-25

21 李新辉, 胡晖, 杨杰. C-12多肿瘤标志物检测对良恶性腹水鉴别诊断价值的探讨. 中国医师杂志 2004;6:934-936

22 褚福亮, 王福生. 蛋白质谱分析方法特点及其在蛋白组学研究领域中的应用. 世界华人消化杂志 2002;10:1431-1435

编辑 张海宁

·研究快报·

内源性一氧化氮对急性坏死性胰腺炎大鼠肠黏膜通透性的影响

杨永久,高乃荣

杨永久,辽宁朝阳市中心医院普通外科 辽宁省朝阳市 122000
高乃荣,东南大学附属中大医院普通外科 江苏省南京市 210009
项目负责人:杨永久,122000,辽宁省朝阳市朝阳大街二段6号,朝阳中心医院. doctoryyj@sohu.com
电话:0421-2816477
收稿日期:2004-11-09 接受日期:2004-12-08

摘要

目的: 探讨内源性一氧化氮(NO)对急性坏死性胰腺炎(ANP)大鼠肠黏膜通透性的影响.

方法: 84只Sprague-Dawley大鼠随机分为4组:假手术组,生理盐水组(ANP/NS),硫酸甲基异硫脲组(ANP/SMT),精氨酸组(ANP/L-Arg).测定12 h和24 h血浆和小肠黏膜组织NO含量,观察小肠的病理改变,肠黏膜通透性以及脏器细菌移位率.

结果: ANP大鼠病程中存在NO含量降低、肠黏膜损伤,出现肠黏膜通透性升高和细菌移位,应用SMT可使NO的含量更加减少,肠黏膜损伤更加严重,肠黏膜通透性和脏器细菌移位率显著增加;应用左旋精氨酸(L-Arg)后小肠的病理损害明显减轻,肠黏膜的通透性显著降低,脏器细菌移位率显著减少.

结论: ANP大鼠病程中存在内源性NO水平降低,肠黏膜通透性升高,适当调节内源性NO的水平对降低ANP肠黏膜通透性具有一定的保护作用.

杨永久,高乃荣.内源性一氧化氮对急性坏死性胰腺炎大鼠肠黏膜通透性的影响.世界华人消化杂志 2005;13(3):389-391
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/389.asp

0 引言

肠黏膜通透性的改变乃至细菌移位是急性坏死性胰腺炎(ANP)重症化的主要原因之一.我们观察了ANP大鼠肠黏膜组织一氧化氮(NO)含量及肠黏膜通透性的改变,以探讨NO对ANP大鼠肠黏膜通透性的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 84只Sprague-Dawley大鼠由东南大学医学院实验动物中心提供,体重160-200 g,平均体重185.6 g.牛磺胆酸钠、L-精氨酸(L-Arginine,L-Arg)、硫酸甲基异硫脲(Sulpha-Methylisothiourea,SMT)均为Sigma公司产品.NO检测试剂盒为南京建成生物工程公司产品,锝(^{99m}Tc)为中国原子能科学研究院同位素所产品.

1.2 方法

1.2.1 实验分组及模型制备 84只大鼠随机分组,假手术组12只,ANP实验组72只;ANP组再分为生理盐水组(ANP/NS),硫酸甲基异硫脲组(ANP/SMT),精氨酸治疗组(ANP/L-Arg),各组再分为12 h组24 h组,每组12只.参照Aho *et al*[1]的方法制备急性坏死性胰腺炎模型后,于近端空肠缓慢注入1.5 mCi ^{99m}Tc-DTPA.制模后10 min,每12 h腹腔内分别缓慢注射生理盐水或0.5 g/L的SMT或15 g/L的L-Arg 1.0 mL/100 g体重.放入代谢笼,留取尿液.假手术组大鼠,仅提起十二指肠,轻轻翻动胰腺三次.各ANP组分别于12 h和24 h处死采取标本,假手术组24 h处死采取标本.

1.2.2 观察指标及检测方法 病理学:腹腔内大体改变,末段回肠石蜡切片,观察组织学改变,回肠黏膜上皮电镜,观察肠黏膜上皮细胞超微结构改变;肠黏膜通透性:放免计数器检测尿^{99m}Tc-DTPA脉冲数[2];血浆和肠黏膜组织NO含量:取血浆和回肠黏膜组织匀浆用硝酸还原酶法检测NO含量;腹腔脏器细菌移位率:取胰腺、腹水、肠系膜淋巴结(MLN)、下腔静脉血作细菌需氧和厌氧培养,计算脏器细菌移位率.

统计学分析 采用SPSS10.0软件处理,计量资料采用t检验,以mean ± SD表示;计数资料采用χ^2检验.$P<0.05$有统计学意义.

2 结果

2.1 病理改变 假手术组大鼠腹腔内无腹水,胰腺和肠管未见明显异常改变;大鼠腹腔内可见较多血性腹水,肠系膜、大网膜出现大量皂化斑,胰腺可见充血水肿、出血坏死灶及皂化斑,结肠及小肠管壁充血水肿,部分肠管内可见血性内容物;ANP/SMT组胰腺和肠管病变较ANP/NS组改变更加严重;ANP/L-Arg治疗组大鼠腹腔内可见少量淡黄色腹水,肠系膜、大网膜可见少量皂化斑,胰腺可见轻度充血水肿及皂化斑,肠管壁轻度水肿.光镜下观察:假手术组肠黏膜无异常;ANP/NS组大鼠肠黏膜水肿、黏膜上皮变性、坏死、脱落,黏膜及黏膜下层可见血管扩张、出血及炎症细胞浸润;ANP/SMT组肠黏膜破坏更加严重,表面被覆假膜;ANP/L-Arg治疗组大鼠肠黏膜轻度水肿,黏膜及黏膜下层血管扩张充血及炎症细胞浸润减轻.电镜下见肠微绒毛坏死、脱落,线粒体肿胀,细胞紧密连接破坏,且随着时间的延长而加重;ANP/SMT组肠微绒毛坏死、脱落加重,线粒体显著肿胀,与ANP/NS组大鼠比较细胞紧密连接破坏更加严重;ANP/L-Arg治疗组肠微绒毛轻度坏死、脱落,线粒体轻度肿胀,细胞紧密连接破坏减轻.

2.2 血浆NO含量的测定值(表1),结果表明,胰腺炎大鼠存在NO含量减少,应用NO阻断剂SMT后血浆NO含

量降低更加明显，L-Arg 可以显著提高血浆中NO的含量甚至达正常水平.

表1 血浆NO的测定值(μmol/L)

组别	12 h	24 h
假手术组成		15.25 ± 0.7634
ANP/NS 组	11.48 ± 0.9593[ac]	8.94 ± 0.6529[ae]
ANP/SMT 组	11.25 ± 0.7013[ac]	7.59 ± 0.2937[ae]
ANP/L-Arg 组	15.16 ± 1.0190	16.32 ± 0.7433

[a]$P<0.05$ *vs* 假手术组，[c]$P<0.05$ *vs* ANP/L-Arg 12 h组，[e]$P<0.05$ *vs* ANP/L-Arg 24 h组.

2.3 肠黏膜组织NO含量的测定值(表2)结果表明，胰腺炎大鼠存在肠黏膜组织NO含量减少，应用SMT后肠黏膜组织NO含量降低更加明显，L-Arg 可以显著提高肠黏膜组织中NO的含量.

表2 各组大鼠肠黏膜组织NO含量的变化(μmol/g蛋白)

组别	12 h	24 h
假手术组		3.27 ± 0.3089
ANP/NS 组	2.08 ± 0.2209[ac]	1.39 ± 0.1655[ae]
ANP/SMT 组	2.19 ± 0.4245[ac]	1.36 ± 0.2485[ae]
ANP/L-Arg 组	3.19 ± 0.3826	3.20 ± 0.3859

[a]$P<0.05$ *vs*假手术组，[c]$P<0.05$ *vs* ANP/L-Arg 12 h组，[e]$P<0.05$ *vs* ANP/L-Arg 24 h组.

2.4 肠黏膜通透性的检测值(表3)结果表明，胰腺炎大鼠存在肠黏膜通透性升高，应用SMT后肠黏膜通透性升高更加明显，L-Arg 可以显著降低肠黏膜通透性.

2.5 细菌培养结果(表4)结果显示，胰腺炎大鼠病程中出现脏器细菌移位，应用SMT后细菌移位更加明显，随时间延长而加重，并以胰腺和MLN细菌移位为主，后期腹水细菌移位有显著增加，L-Arg 可以显著降低脏器细菌移位率.

表3 各组大鼠肠黏膜通透性的改变

组别	12 h	24 h
假手术组		0.0693 ± 0.0153
ANP/NS 组	0.2892 ± 0.1022[ac]	0.6615 ± 0.1359[ae]
ANP/SMT 组	0.4095 ± 0.1009[ac]	0.5950 ± 0.0736[ae]
ANP/L-Arg 组	0.1832 ± 0.0174	0.3379 ± 0.03738

[a]$P<0.05$ *vs*假手术组，[c]$P<0.05$ *vs* ANP/L-Arg 12 h组，[e]$P<0.05$ *vs* ANP/L-Arg 24 h组.

3 讨论

ANP时，机体处于严重的应激状态，肠黏膜的低灌流状态使他产生缺血缺氧改变，他所引起的缺血再灌注损伤是导致肠黏膜屏障功能障碍的主要原因之一[3].胰腺炎症程度愈重，肠黏膜毛细血管的灌注量下降愈明显[4].本实验病理学检查显示ANP时存在肠黏膜机械屏障的损伤.微循环的一些特定血管起到组织-血液屏障的作用，急性炎症时，这些血管通透性增加、屏障功能下降，引起组织水肿.Kurose *et al*[5] 研究大鼠肠系膜微循环，发现NO供体可显著减轻缺血-再灌注诱发的毛细血管后静脉的白细胞附壁、游出和白蛋白渗漏，认为维持微血管的完整性、减轻白细胞-血管内皮细胞的相互作用是NO对缺血再灌注损伤的保护机制之一.NO也能防止内毒素血症引起的肠血管通透性增加[6].

我们观察到，ANP/NS 组12 h和ANP/NS 24 h大鼠肠黏膜组织NO含量呈下降趋势.而ANP/SMT 12 h组和24 h组与相应时间点ANP/NS组比较，其肠黏膜组织中的NO含量有所降低，病理损害加重;ANP/L-Arg 12 h组和24 h组大鼠肠黏膜病理改变减轻，与相应两个时间点ANP/NS组比较，其肠黏膜组织中的NO含量有显著提高.我们还观察到，ANP大鼠发病后12 h即有肠黏膜通透性增加，而且随着病程延长而加重，应用SMT后肠黏膜通透性增加更严重，而应用L-Arg后肠黏膜通透性降低显著.同时ANP大鼠发病12 h时即有细菌移位，随着时间的延长细菌移位增加，应用SMT后，脏器细菌移位率显著增加，而应用L-Arg治疗后脏器细菌移位率显著降低.

表4 细菌培养结果(培养阳性数/培养标本数)

MLN		胰腺		MLN		腹水		血
组别	*n*	需氧	厌氧	需氧	厌氧	需氧	厌氧	需氧
假手术组	12	1	0	0	0	0	0	0
ANP/NS 12 h	12	6[ac]	3	4[ac]	0	3	1	1
ANP/SMT 12 h	12	7[ac]	4[ac]	5[ac]	1	3	2	2
ANP/L-Arg 12 h	12	1	0	1	0	1	0	0
ANP/NS 24 h	12	10[ae]	4[ae]	8[ae]	2	7[ae]	3	3
ANP/SMT 24 h	12	11[ae]	6[ae]	9[ae]	3	9[ae]	3	2
ANP/L-Arg 24 h	12	3	1	2	0	2	1	1

[a]$P<0.05$ *vs*假手术组，[c]$P<0.05$ *vs* ANP/L-Arg 12 h组，[e]$P<0.05$ *vs* ANP/L-Arg 24 h组.

我们的试验显示，ANP大鼠肠黏膜组织中的NO含量随ANP的病程延长而合成减少，应用SMT后可更加减少NO的含量，加重肠黏膜的损伤，增加肠黏膜通透性;而应用L-Arg后，肠黏膜组织NO含量增加，肠黏膜损伤显著减轻，肠黏膜通透性显著降低.这说明内源性NO具有维持肠黏膜微血管完整性的作用，这可能是NO改善ANP大鼠肠黏膜通透性的机制之一.

4 参考文献

1 Aho HJ, Koskensalo ML, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980;15:411-416

2 Resnick RH, Royal H, Marshall W, Barron R, Werth T. Intestinal permeability in gastrointestinal disorders, Use of oral [^{99}mTc]DTPA. *Dig Dis Sci* 1990;35:205-211

3 Ammori BJ, Leeder PC, King RF, Barclay GR, Martin IG, Larvin M, McMahon MJ. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis:correlation with endotoxemia, organ failure, and mortality. *J Gastrointest Surg* 1999;3:252-262

4 Hotz HG, Foitzik T, Roheder J, Schulzke JD, Fromm M, Runkel NS, Buhr HJ. Intestinal microcirculation and gut permeability in acute pancreatitis:early changes and therapeutic implications. *J Gastrointest Surg* 1998;2:518-525

5 Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Modulation of ischemia -reperfusion induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res* 1994;74:376-382

6 Dobosz M, Hac S, Wajda Z. Dose nitric oxide protect from microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis in rat? *Int J Microcirc Clin Exp* 1996;16:221-226

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

影响因子记录中国期刊进步足迹

《科学时报》2004-06-24报道: 美国科学信息研究所的《期刊影响因子 - 网络版》(The Journal Citation Reports on the Web) 6月18日公布了2003年度5907种来源期刊的影响因子. 中国期刊影响因子较2002年再创新高.

2003年SCI网络版收录中国学术期刊76种，2003年JCR网络版公布的是前两年在收的70种中国期刊(含中国机构主办由外国出版商代为出版的期刊)的影响因子. 经统计，70种期刊的影响因子总值为39.718，平均值为0.567; 若按收录期刊76种计算平均值为0.523.

中国学术期刊年年都有进步. 就整体而言，中国在1999年以前未曾有过影响因子达到1的期刊，2000年仅有1种期刊影响因子刚好为1，2001年有2种期刊影响因子超过1，2002年则有6种期刊影响因子超过1，而2003年共有11种期刊影响因子超过1.

从收录期刊数和影响因子平均值来看，1997年～2003年收录中国期刊总数分别为36种，45种，57种，63种，66种，70种和76种; 有影响因子的期刊分别为21种，32种，37种，48种，60种，64种和70种. 按收录期刊总数计算影响因子平均值，7年分别为: 0.125; 0.159; 0.178; 0.240; 0.351; 0.422和0.523，若仅按有影响因子的期刊数计算平均影响因子，则这7年分别为: 0.214; 0.224; 0.274; 0.313; 0.386; 0.452和0.567.

从各年度中国期刊影响因子最高值看，1997年～2003年分别是: 0.513(《中国科学: B辑》); 0.818(《高能物理与核物理》); 0.839(《生物医学与环境科学》); 1.000(《地质学报》); 2.102(《细胞研究》); 2.532(《世界胃肠病学杂志》); 3.318(《世界胃肠病学杂志》). 这几串单向变化的数字已清晰记录了中国期刊整体进步的足迹.

近两年连续排在中国期刊影响因子第一位的《世界胃肠病学杂志》(World Journal of Gastroenterology)，自1998年开始被SCI收录. JCR 2000年度报告中，该刊影响因子为0.993，2001年为1.445 在这两年也均是中国期刊中影响因子较高者. 该刊在SCI中归属“胃肠病学与肝脏病学”(Gastroenterology & Hepatology)类目，此类目2001年和2003年都是收录47种专业期刊，该刊影响因子在这两年中分别排在此类目第27位、第11位，可谓后起之秀.

中国期刊影响因子提高较快有以下原因: 一是国家对科研投入大幅增长，科研创新条件改善，使高水平科研成果不断增多，从而投送到国内期刊上发表的高质量研究成果相应增加，期刊质量得以提高. 二是经过各方面的努力，我国期刊编辑规范化程度和国际化程度有一定提高. 三是SCI近年新增入选中国期刊较多，中国期刊的增多开始产生了一定的”协同效应”. 四是部分期刊实现了印刷版、电子版并存发行的发展态势，提高了期刊的显示度和可获得性. 五是不少期刊出版周期有所缩短，增强了时效性. 六是中国期刊原有指标基数较低，在低指标基础上提高指标相对容易.

《世界胃肠病学杂志》等刊影响因子快速提升，除上述原因外，该刊编辑部的开放意识和网络技术帮了大忙. 该刊在中国学术期刊中不仅建设了比较理想的期刊网站，还率先加入了美国国立医学图书馆(National Library of Medicine，NLM)的PubMed系统，通过PubMed系统为读者提供1998年以来的全文免费查阅和下载. 随后又加入了Free Medical Journals免费查阅网站和Directory of Open Access Journals免费查阅网站，利用这些重要的期刊免费开放平台，广泛向全世界开放，让全世界同行不仅能检索到，还能免费下载使用其全文. 编辑部紧跟时代步伐的开放意识、利用网络技术的能力和服务作者、服务读者的精神，为作者投稿、读者查阅下载极大地提供了方便，同时也赢得了期刊声誉、期刊显示度和利用率的明显提高.

中国学术期刊进步很大，但相比国际名刊还有不小差距. 如2003年JCR中影响因子最高值为52.280; 6907种来源期刊的平均影响因子值为1.592. 显然中国期刊的发展仍是任重道远. 国家科技部、自然科学基金委员会、中国科学院等科技管理部门和学术机构应继续支持中国学术期刊; 各学科院士、学术带头人要积极关心中国学术期刊，为之献计献策，将自己高水平科研成果更多地投送到国内期刊上发表，使中国学术期刊获得进一步发展，取得更好的成效.

注: 由The Journal Citation Reports on the Web直接从“Peopls R China”检索只有67种期刊. 文中70种中国期刊是按我国通常采用的统计方法，计入了包含了由中国电子学会主办的《电子学报》(Chinese Journal of Electronics)、由中国化学学会主办的《高分子科学》(Chinese Journal of Polymer Science) 及《亚洲天然产品研究杂志》(Journal of Asian Natural Products Research) 3种在境外或国外出版的期刊. 按67种期刊统计，其影响因子总值为38.022，平均值也为0.567. (科学时报 2004-06-24 赵基明)

·研究快报·

补脾方药血清对离体脾虚大鼠壁细胞胞内[Ca^{2+}]i的影响

隋 峰, 王汝俊, 王建华, 杜 群, 巫燕丽

隋峰, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405
王汝俊, 王建华, 杜群, 巫燕丽, 广州中医药大学脾胃研究所
广东省广州市 510405
国家自然科学基金资助项目, No. 30271650
项目负责人: 王汝俊 510405, 广州市白云区三元里12号, 广州中医药大学脾胃研究所. PiWeiYaoL@gzhtcm.edu.cn
电话: 020-36585555 传真: 020-36586563
收稿日期: 2004-11-18 接受日期: 2004-12-08

摘要

目的: 探讨脾虚状态的分子病理机制及补脾方药对其的影响.

方法: 采用血清药理学方法对分离后的大鼠壁细胞在体外给药，并用荧光指示剂Fura-2/AM负载细胞，使用双波长荧光分光光度计分别检测静息状态下壁细胞内的[Ca^{2+}]i及胃泌素负荷后[Ca^{2+}]i动态变化情况.

结果: 静息状态下，脾虚模型组大鼠壁细胞胞内[Ca^{2+}]i (64.32 ± 12.82)明显低于正常组(76.64 ± 14.21)(P<0.05)，加入胃泌素(终浓度100 nM)后，胞内[Ca^{2+}]i的增高幅度模型组(13.43 ± 2.70)明显大于正常组(9.80 ± 2.12)(P<0.01);脾虚大鼠经补脾方药血清作用后各组的静息状态下[Ca^{2+}]i均介于正常组与模型组之间，胃泌素刺激后胞内[Ca^{2+}]i的增高幅度也有不同程度的减小，其中党参治疗组的增高幅度(11.13 ± 2.46)与模型组(13.43 ± 2.70)相比差异显著(P<0.05).

结论: 脾虚大鼠壁细胞胞内静息状态下[Ca^{2+}]i降低和胃泌素刺激后胞内[Ca^{2+}]i的异常变化可能是脾虚证病理机制之一，Ca^{2+}可能在分子水平上参与了脾虚证的形成.

隋峰, 王汝俊, 王建华, 杜群, 巫燕丽. 补脾方药血清对离体脾虚大鼠壁细胞胞内[Ca^{2+}]i的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3):392-394
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/392.asp

0 引言

我室自1999年建立大鼠壁细胞的分离和纯化方法后，对脾虚证与壁细胞的关系进行了一系列的研究. 前期我们分别采用整体和离体实验对大黄脾虚模型大鼠及补脾方药作用后的壁细胞胃泌素受体结合容量及亲和力进行了初步探讨，结果表明，脾虚大鼠胃泌素受体结合容量降低而亲和力升高. 为进一步从分子水平上深入揭示脾虚病理机制，建立大鼠壁细胞的体外研究方法，本实验又在原有基础上采用血清药理学方法对胞内受体后信号转导枢纽- Ca^{2+}进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料 Sprague-Dawley♂大鼠，体重200 ± 20 g，由广州中医药大学实验动物中心提供，动物合格证号: scxk(粤)2003-0001. 试剂:链霉蛋白酶(Sigma)、[Leu^{15}]-胃泌素(Sigma)、Fura-2 / AM(Biotium)均购于北京鼎国生物有限责任公司;Percoll(Pharmacia)购于华美生物工程公司. 主要仪器与设备:LS55荧光分光光度计(Perkinelmer)，HZS-H恒温水浴振荡器(哈尔滨东联电子有限公司)，XDS-1倒置显微镜(重庆光电仪器厂)，TDZ5-WS自动平衡离心机(长沙湘仪离心机仪器公司)，多头磁力搅拌器(常州国华电器厂).

1.2 方法

1.2.1 药物及含药血清的制备 补中益气汤依中国药典的处方，采用常规方法制备成100%水提液，党参、白术制备成66%水提液;按1 mL/100 g，连续给药5 d，1次/d，空白血清组给予等量的蒸馏水，末次给药后2 h，眶静脉丛穿刺采血，室温静置2 h后，3 000 r/min，10 min，离心分离血清，0.22微孔滤膜过滤除菌，置冰箱中保存备用[1-2].

1.2.2 动物分组与造模 大鼠随机分成正常对照和大黄脾虚组，模型的制备采用我室常规方法，大黄脾虚组用100%大黄水浸液1 mL / 100 g灌胃大鼠，2次/d，连续10 d，正常对照组给予等量蒸馏水. 以上各组均常规喂养，自由饮水，第11 d 处死动物，分离壁细胞.

1.2.3 大鼠壁细胞的分离与纯化 在本室以往基础上加以改进[3]:大鼠脱颈椎处死，剖腹取胃，结扎贲门和幽门. 在胃底部做一小切口，用玻璃棒将胃袋翻转，然后在胃底与胃体之间结扎，弃去胃底，用生理盐水将胃袋冲洗干净. 把预先配制好的链酶蛋白酶(Pronase)液约2.5 mL(1g/L)注入胃袋. 然后将胃袋放入预先通氧的Medium A(MA)中37℃水浴消化30 min后转入Medium B(MB)中37℃用磁力搅拌器搅拌两次，各10 min，收集每次MB中打下的细胞悬液;再重新将胃袋放入新鲜的MA中孵育20 min，用新鲜的MB搅拌两次，各10 min，每次收集MB中打下的细胞悬液;然后再次将胃袋放入新鲜的MA中孵育10 min，用新鲜的MB搅拌两次，各10 min，每次收集MB中打下的细胞悬液. 所有收集到的细胞悬液均用200目尼龙网过滤，过滤液4℃1 000 r/min离心5 min，倾出上清夜，沉淀用MediumC(MC)混悬以供纯化. 孵育过程皆充以950+50mL/LCO_2. 取10 mL 专用离心管，用吸管在管底分别铺2 mL 预先配制好的60%和40%Percoll液制成不连续密度梯度分离液，将细胞悬液1 mL左右铺在最上层，然后4℃、2 000 r/min、离心20 min进行纯化，收集40%与60%Percoll交界面处的壁细胞，MC洗两次，再用MC混悬备用.

1.2.4 壁细胞Fura-2/AM的负载及加药[4] 将纯化后的模型组细胞悬液随机分为脾虚模型组、补中益气汤治疗组、党参治疗组及白术治疗组. 将细胞悬液的浓度调整约为1.5×10^9 cells/L，正常及脾虚组给予终浓度200 mL/L的空白血

清，补中益气汤、党参及白术治疗组分别给予等量的药物血清，37℃作用20 min.用MC液洗两次后，加入终浓度1 μmol/L的Fura-2/AM，37℃避光孵育45 min，然后加入MC液重复两次洗去残存细胞外液的Fura-2/AM，重新加入2 mLMC液调整细胞数至1.5×10^9cells/L备用.

1.2.5 壁细胞胞内$[Ca^{2+}]i$的测定[5-6] 将负载Fura-2的细胞悬液2 mL加入双波长荧光分光光度计的专用石英杯内，分别测定给药前后的荧光强度变化.测定参数为:激发波长340 nm和380 nm，发射波长510 nm，狭缝5 nm.Ca^{2+}浓度的计算公式如下:$[Ca^{2+}]_i = Kd\times(S_{f2}/S_{b2})\times[(R-R_{min})/(R_{max}-R)]$，其中Kd:Fura-2与$Ca^{2+}$反应的解离常数，为224 nmol/L;R:每次所测得的荧光比值;S_{f2}:在无Ca^{2+}状态下380 nm激发的荧光强度;S_{b2}:在饱和Ca^{2+}状态下380 nm激发的荧光强度;R_{max}:指Fura-2的所有结合部位均为Ca^{2+}所饱和，即缓冲液中加终浓度1 mL/L的TritonX-100所测得的340 nm/380 nm;R_{min}:指所有Fura-2均为游离形式时所测得的荧光比值，即过量的EGTA存在下(本实验终浓度为5 nmol/L，pH>8.5)所测得的340 nm/380 nm(注:在计算Ca^{2+}之前，均减去在没有负载Fura-2/AM的细胞中测到的自发荧光).

统计学处理 采用统计软件SPSS11.0分析，实验数据均以mean±SD表示，用t检验处理，$P<0.05$为有统计学差异.

2 结果

静息状态下，脾虚模型组大鼠壁细胞胞内$[Ca^{2+}]i$明显低于正常对照组($P<0.05$)，各治疗组介于脾虚模型组与正常对照组之间;加入胃泌素后，细胞内$[Ca^{2+}]i$均有所升高，但模型组升高幅度明显高于正常组($P<0.01$)，各治疗组的增高幅度处于二者之间，其中党参治疗组与模型组相比差异显著($P<0.05$)(表1).

3 讨论

Ca^{2+}是细胞内最重要的第二信使，参与和调节多种生理和生化过程，细胞内$[Ca^{2+}]i$的变化可引起广泛的细胞效应[7];很多疾病或病理现象的产生均伴随着胞内Ca^{2+}浓度的异常，如心脑血管缺血缺氧、高血压、痴呆、糖尿病等均与胞内Ca^{2+}浓度的增高有关[8]，而慢性低钙血症及维生素D缺乏症时，肝细胞内Ca^{2+}浓度明显低于正常[9];铜缺乏症时，血小板内Ca^{2+}浓度降低等[10].

Ca^{2+}作为重要的胞内信号转导枢纽与壁细胞酸分泌功能的关系也已明确.胃泌素、组胺和乙酰胆碱等酸分泌刺激因子作为第一信使作用于壁细胞表面的各自受体均可引起胞内$[Ca^{2+}]i$的升高，从而激活各种Ca^{2+}/Calmodulin(钙调素)依赖性的蛋白激酶而最后引起H^+/K^+-ATPase(氢钾泵)的活化产生泌酸反应[11-12].有人用Ca^{2+}通道阻滞剂抑制胞内$[Ca^{2+}]i$的升高，结果发现五肽胃泌素刺激的酸分泌明显减少[13-14]，也有人将大鼠胚胎干细胞胃泌素受体的基因敲除，结果壁细胞胞内$[Ca^{2+}]i$增高了，基础和负荷(Carbacol或组织胺刺激)后的酸分泌亦有所增加[15]，可见Ca^{2+}作为胞内重要的信使与壁细胞泌酸的生理功能关系密切.

脾虚是以消化系统为主的多系统、多器官功能低下的一种病理状态，我们的研究表明脾虚大鼠壁细胞静息状态下胞内$[Ca^{2+}]i$明显低于正常大鼠($P<0.05$)，但胃泌素刺激后胞内$[Ca^{2+}]i$的增高幅度显著高于正常大鼠($P<0.01$)，各治疗组中，静息状态下胞内$[Ca^{2+}]i$及胃泌素刺激后的胞内$[Ca^{2+}]i$的增高幅度介于二者之间，这与我室前期整体研究结果基本一致，表明血清药理学方法应用于壁细胞的体外研究是可行的.该方法克服了整体实验操作复杂、用药时间长等缺点，同时又避免了直接加药非药物因素影响多等缺点，而且组内及组间易于保持平衡而导致样本间的离散度(标准差)较小阳性结果易于检出.

脾虚大鼠壁细胞静息状态下胞内$[Ca^{2+}]i$明显低于正常大鼠，说明脾虚大鼠壁细胞基础状态下在Ca^{2+}-泌酸环节上可能处于低能量代谢状态;胃泌素是一重要的酸分泌刺激因子[16]，脾虚大鼠壁细胞胃泌素刺激后胞内$[Ca^{2+}]i$增高幅度大于正常大鼠，又表明脾虚大鼠壁细胞反应敏感性高于正常大鼠，提示脾虚大鼠壁细胞胃泌素刺激的酸分泌通路在Ca^{2+}这一环节上可能出现了代偿，这又与我们前期实验得出的“脾虚大鼠壁细胞基础状态酸分泌低下，受刺激后亢进”的结论相一致，其机制是否与壁细胞上的胃泌素受体亲和力增高(我室前期研究结果)相关尚有待进一步深入探讨.脾虚经含药血清作用后的各组中，静息状态下$[Ca^{2+}]i$均有所升高，胃泌素刺激后的胞内

表1 静息状态$[Ca^{2+}]i$及胃泌素刺激后壁细胞内$[Ca^{2+}]i$变化

组别	n	$[Ca^{2+}]i$ (nmol/L，mean±SD)		增高幅度(%)
		静息状态	Gastrin刺激后	
正常对照组	15	76.64 ± 14.21	84.15 ± 15.53	9.80 ± 2.12
脾虚模型组	15	64.32 ± 12.82[a]	72.96 ± 13.96[a]	13.43 ± 2.70[b]
补中益气汤治疗组	15	67.14 ± 13.35	75.24 ± 14.06	12.06 ± 2.31
党参治疗组	15	69.75 ± 13.25	77.51 ± 13.54	11.13 ± 2.46[c]
白术治疗组	15	66.08 ± 10.88	74.37 ± 11.61	12.55 ± 3.19

[a]$P<0.05$，[b]$P<0.01$ *vs*正常对照组;[c]$P<0.05$ *vs*脾虚模型组.

$[Ca^{2+}]i$ 增高幅度也有一定程度的降低，其中党参治疗组胃泌素刺激后的胞内 $[Ca^{2+}]i$ 增高幅度与模型组相比差异显著，说明大鼠的脾虚状态经补脾方药作用后随着便溏、弓背、消瘦、背毛蓬松等整体状态恢复的同时微观病理指标亦有不同程度的恢复趋势.

总之，本实验采用血清药理学方法从中医方证角度对脾虚状态微观病理机制进行了初步探讨，表明:(1)脾虚大鼠壁细胞静息下胞内 $[Ca^{2+}]i$ 及刺激后 $[Ca^{2+}]i$ 的异常变化可能是脾虚证在分子水平上的病理机制之一，Ca^{2+} 的异常介导可能参与了脾虚证的病理形成过程;(2)补脾方药血清可从整体和微观不同程度调整脾虚大鼠的病理状态;(3)脾虚状态不仅仅表现为一种外在的整体的抽象概念，也与某些特定微观病理指标相联系.

4 参考文献

1 赵海磊, 刘成, 赵爱光. 中药复方胃肠安血清诱导肝癌SMMC-7721细胞分化. 世界华人消化杂志 2003;11:1345-1348
2 彭智聪, 黄静宁, 郭宝丽, 张红玲. 中药血清药理学实验方法研究进展. 中国实验方剂学杂志 2001;7:57-59
3 聂克, 王汝俊, 王建华. 大鼠胃壁细胞的分离方法. 世界华人消化杂志 1999;7:994-995
4 Scott DA, de Souza W, Benchimol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SN, Docampo R. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of Trypanosoma cruzi. *J Biol Chem* 1998;373:22151-22158
5 台卫平, 罗和生. 黄连素对HT-29人结肠癌细胞系 Ca^{2+} 的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11:1662-2664
6 Cobbold PH, Rink TJ. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J* 1987;248:313-328
7 Mansilla-Olivares A. Calcium, the atom triggering life and cellular function. *Cir Cir* 2004;72:139-151
8 Yorek MA, Davidson EP, Dunlap JA, Stefani MR. Effects of bradykinin on cytosolic Calcium in neuroblastoma cells using the fluorescent indicator fluo-3. *Biochim Biophys Acta* 1993;1177:215-220
9 Gascon-Barre M, Hoddad P, Provincher SJ, Bilodeau S, Pecker F, Lotersztajn S, Vallieres S. Chronic hypocalcemia of vitamin D deficiency leads to lower intracellular calcium concentrations in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1994;93:2159-2167
10 Johnson WT, Dufaut SN. Intracellular calcium mobilization in rat platelets is adversely affected by copper deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1993;1175:263-268
11 Sachs G. Physiology of the parietal cell and therapeutic implications. *Pharmacotherapy* 2003;23(10Pt2):68-73
12 Yao X, Forte JG. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu Rev Physiol* 2003;65:103-131
13 Niv Y, Vardi I. Calcium channel blocker decreases pentagastrin-stimulated alkaline-tide:a role for extracellular calcium in gastric acid secretion. *Isr J Med Sci* 1995;31:215-217
14 Niki S, Rokutan K, Nakamura K, Ogihara S, Kutsumi H, Saitoh T, Aoike A, Kawai K. Calcium-dependent signaling of acid secretion in isolated parietal cells from guinea pigs and its modification by ethanol. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1992;89:1484-1490
15 Hinkle KL, Bane GC, Jazayeri A, Samuelson LC. Enhanced calcium signaling and acid secretion in parietal cells isolated from gastrin-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G145-G153

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

NHE1基因调控细胞内酸碱平衡对胃癌细胞生物学行为的影响

滕小春, 刘海峰, 房殿春, 杨仕明, 陈 刚, 王国安, 杨孟华

滕小春, 刘海峰, 房殿春, 杨仕明, 陈刚, 王国安, 杨孟华, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038
项目负责人: 刘海峰, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心. HaiFengLIU333@hotmail.com
电话: 010-88276549
收稿日期: 2004-12-07 接受日期: 2004-12-28

摘要

目的: 通过基因转染技术，研究NHE1反义基因对SGC-7901胃癌细胞生物学行为的影响，探讨通过酸化细胞内环境诱导肿瘤细胞凋亡从而治疗胃癌的新方法.

方法: 利用亚克隆技术构建人NHE1反义结构基因哺乳动物真核表达质粒，通过DOTAP脂质体介导的转染技术将反义真核表达质粒和空载体分别转入SGC-7901胃癌细胞中，经聚合酶链反应(PCR)对转染基因的整合鉴定后，观察基因转染对细胞形态学、细胞内pH值、体外生长状况、细胞周期以及双层软琼脂克隆形成能力和裸鼠成瘤力的影响.

结果: 光镜及透射电镜下细胞形态恶性程度降低.Anti-7901细胞胞内pH值显著低于Zeo-7901细胞和空白对照组SGC-7901细胞内pH值(6.77±0.05 *vs* 7.24±0.03，7.26±0.03，$P<0.01$).Anti-7901细胞生长速度明显减慢，出现接触抑制，呈单层生长，细胞凋亡率显著高于Zeo-7901细胞和空白对照组SGC-7901凋亡率(26.1% *vs* 5.12%，4.48%，$P<0.01$). Anti-7901细胞在双层软琼脂中集落形成率显著低于Zeo-7901和空白对照组SGC-7901细胞(9 ± 3.54‰ *vs* 40 ± 4.53‰，38.6 ± 4.63‰，$P<0.01$).接种Zeo-7901细胞和空白对照组

$[Ca^{2+}]i$ 增高幅度也有一定程度的降低，其中党参治疗组胃泌素刺激后的胞内 $[Ca^{2+}]i$ 增高幅度与模型组相比差异显著，说明大鼠的脾虚状态经补脾方药作用后随着便溏、弓背、消瘦、背毛蓬松等整体状态恢复的同时微观病理指标亦有不同程度的恢复趋势.

总之，本实验采用血清药理学方法从中医方证角度对脾虚状态微观病理机制进行了初步探讨，表明:(1)脾虚大鼠壁细胞静息下胞内 $[Ca^{2+}]i$ 及刺激后 $[Ca^{2+}]i$ 的异常变化可能是脾虚证在分子水平上的病理机制之一，Ca^{2+} 的异常介导可能参与了脾虚证的病理形成过程;(2)补脾方药血清可从整体和微观不同程度调整脾虚大鼠的病理状态;(3)脾虚状态不仅仅表现为一种外在的整体的抽象概念，也与某些特定微观病理指标相联系.

4 参考文献

1 赵海磊, 刘成, 赵爱光. 中药复方胃肠安血清诱导肝癌SMMC-7721细胞分化. 世界华人消化杂志 2003;11:1345-1348
2 彭智聪, 黄静宁, 郭宝丽, 张红玲. 中药血清药理学实验方法研究进展. 中国实验方剂学杂志 2001;7:57-59
3 聂克, 王汝俊, 王建华. 大鼠胃壁细胞的分离方法. 世界华人消化杂志 1999;7:994-995
4 Scott DA, de Souza W, Benchimol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SN, Docampo R. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of Trypanosoma cruzi. *J Biol Chem* 1998;373:22151-22158
5 台卫平, 罗和生. 黄连素对HT-29人结肠癌细胞系 Ca^{2+} 的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11:1662-2664
6 Cobbold PH, Rink TJ. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J* 1987;248:313-328
7 Mansilla-Olivares A. Calcium, the atom triggering life and cellular function. *Cir Cir* 2004;72:139-151
8 Yorek MA, Davidson EP, Dunlap JA, Stefani MR. Effects of bradykinin on cytosolic Calcium in neuroblastoma cells using the fluorescent indicator fluo-3. *Biochim Biophys Acta* 1993;1177:215-220
9 Gascon-Barre M, Hoddad P, Provincher SJ, Bilodeau S, Pecker F, Lotersztajn S, Vallieres S. Chronic hypocalcemia of vitamin D deficiency leads to lower intracellular calcium concentrations in rat hepatocytes. *J Clin Invest* 1994;93:2159-2167
10 Johnson WT, Dufaut SN. Intracellular calcium mobilization in rat platelets is adversely affected by copper deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1993;1175:263-268
11 Sachs G. Physiology of the parietal cell and therapeutic implications. *Pharmacotherapy* 2003;23(10Pt2):68-73
12 Yao X, Forte JG. Cell biology of acid secretion by the parietal cell. *Annu Rev Physiol* 2003;65:103-131
13 Niv Y, Vardi I. Calcium channel blocker decreases pentagastrin-stimulated alkaline-tide:a role for extracellular calcium in gastric acid secretion. *Isr J Med Sci* 1995;31:215-217
14 Niki S, Rokutan K, Nakamura K, Ogihara S, Kutsumi H, Saitoh T, Aoike A, Kawai K. Calcium-dependent signaling of acid secretion in isolated parietal cells from guinea pigs and its modification by ethanol. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1992;89:1484-1490
15 Hinkle KL, Bane GC, Jazayeri A, Samuelson LC. Enhanced calcium signaling and acid secretion in parietal cells isolated from gastrin-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G145-G153

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

NHE1基因调控细胞内酸碱平衡对胃癌细胞生物学行为的影响

滕小春, 刘海峰, 房殿春, 杨仕明, 陈 刚, 王国安, 杨孟华

滕小春, 刘海峰, 房殿春, 杨仕明, 陈刚, 王国安, 杨孟华, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038
项目负责人: 刘海峰, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心. HaiFengLIU333@hotmail.com
电话: 010-88276549
收稿日期: 2004-12-07 接受日期: 2004-12-28

摘要

目的: 通过基因转染技术，研究NHE1反义基因对SGC-7901胃癌细胞生物学行为的影响，探讨通过酸化细胞内环境诱导肿瘤细胞凋亡从而治疗胃癌的新方法.

方法: 利用亚克隆技术构建人NHE1反义结构基因哺乳动物真核表达质粒，通过DOTAP脂质体介导的转染技术将反义真核表达质粒和空载体分别转入SGC-7901胃癌细胞中，经聚合酶链反应(PCR)对转染基因的整合鉴定后，观察基因转染对细胞形态学、细胞内pH值、体外生长状况、细胞周期以及双层软琼脂克隆形成能力和裸鼠成瘤力的影响.

结果: 光镜及透射电镜下细胞形态恶性程度降低.Anti-7901细胞胞内pH值显著低于Zeo-7901细胞和空白对照组SGC-7901细胞内pH值(6.77±0.05 *vs* 7.24±0.03，7.26±0.03，$P<0.01$).Anti-7901细胞生长速度明显减慢，出现接触抑制，呈单层生长，细胞凋亡率显著高于Zeo-7901细胞和空白对照组SGC-7901凋亡率(26.1% *vs* 5.12%，4.48%，$P<0.01$). Anti-7901细胞在双层软琼脂中集落形成率显著低于Zeo-7901和空白对照组SGC-7901细胞(9 ± 3.54‰ *vs* 40 ± 4.53‰，38.6 ± 4.63‰，$P<0.01$).接种Zeo-7901细胞和空白对照组

SGC-7901细胞裸鼠皮下长出肿瘤，成瘤率为100%，而接种Anti-7901细胞裸鼠皮下未长出肿瘤，成瘤率为0%.

结论: 反义技术干预可使NHE1基因表达下调，导致细胞内酸化，诱导细胞凋亡，达到了有效治疗胃癌的目的，为胃癌基因治疗提供了新的思路.

滕小春, 刘海峰, 房殿春, 杨仕明, 陈刚, 王国安, 杨孟华. NHE1基因调控细胞内酸碱平衡对胃癌细胞生物学行为的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3):394-397
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/394.asp

0 引言

胞膜离子交换蛋白Na^+-H^+交换泵(Na^+-H^+ exchanger, NHE)是存在于所有真核细胞的一种跨膜蛋白，是维持细胞内pH值(intracellular pH, pHi)在中性或偏碱性的重要膜蛋白[1]. 近年来，随着对NHE1研究在肿瘤学领域的不断深入，人们发现NHE1基因在肿瘤细胞中的活性明显增高，使肿瘤细胞内pH值为中性或偏碱性，与肿瘤的发生有着密切的关系[2]. 已有研究证实，pHi下降促进细胞凋亡，pHi升高抑制凋亡的发生[3]. 因此阻断肿瘤细胞NHE1基因的表达，导致肿瘤细胞内酸化，诱导细胞凋亡，不失为抗肿瘤治疗的新途径，具有重要的理论意义和实践意义. 我们前期研究发现[4]，在慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生、异型增生组织中均可检测到NHE1蛋白的表达，而且随着病变程度的增加，NHE1表达有增加的趋势，提示NHE1超表达的细胞，可能是一种癌前细胞，与胃癌的发生有着密切的关系. NHE1 mRNA及其蛋白在胃癌中的表达程度显著高于胃癌前病变，提示NHE1基因可能是基因治疗胃癌的一个理想靶点.

1 材料和方法

1.1 *材料* *E.Coli* DH5α细菌由第三军医大学西南医院烧伤研究所实验室提供;基因表达质粒PECE(PEAP-NHE1)由加拿大Jossete Noel(Montreaty University)博士惠赠，全长6.5 kb，携带包含人类NHE1结构基因的3.6 kb cDNA目的片段，经*Eco*RI、*Hind*Ⅲ位点插入(5′含*Hind*Ⅲ酶切位点，3′含*Eco*RI酶切位点)，含有Amp标志基因;哺乳动物真核表达载体pcDNA3.1(-)/Zeo为Invitrogen公司产品，含*Eco*RI、*Hind*Ⅲ酶切位点(5′含*Eco*RI酶切位点，3′含*Hind*III酶切位点);限制性内切酶*Eco*RI、*Hind*Ⅲ购自Takara公司;T4 DNA连接酶为Promega公司产品;转染细胞筛选所用抗生素Zeocin为Invitrogen公司产品;转染用脂质体DOTAP为Roche公司产品;DNA回收试剂盒由金泰生物技术(厦门)有限公司惠赠;快速质粒提取盒E.Z.N.A®Plasmid Miniprep Kit Ⅰ为omega Bio-Tek公司产品;BCECF荧光探针购自Eugene公司;Nigericin购自Sigma公司;Zeocin PCR引物根据文献由上海基康公司设计合成.

1.2 *方法* 采用亚克隆重组技术进行基因重组，pcDNA3.1(-)/Zeo用*Eco*RI、*Hind*Ⅲ酶切后，等体积酚/氯仿抽提1次，离心沉淀，用去离子水溶解，取1 μL电泳，余置-20℃备用. PECE用*Eco*RI、*Hind*III酶切电泳后，试剂盒回收目的片段，目的片段与酶切后pcDNA3.1(-)/Zeo在T4DNA连接酶作用下，进行定向反向连接，在16℃条件下连接16 h，然后进行酶切凝胶电泳鉴定. 重组成功后，采用脂质体法将质粒转染至SGC-7901胃癌细胞中. 采用PCR法扩增外源性ZeoR基因来鉴定转染成功. SGC-7901胃癌细胞在100 mL/L小牛血清1640培养基中，于37℃，50 mL/L CO2，饱合湿度下培养. 用缓冲液求细胞内pH值的标准曲线，缓冲液内含(Mm):KCl 90-130，NaCl 5，$MgSO_4$ 1，$CaCl_2$ 1，HEPES 10，将缓冲液分装6只试管中，每只5 mL，分别将pH调至不同的值，分别为5.5，6.0，6.5，7.0，7.5，8.0，6只试管中分别加入Nigericine和BCECF，浓度分别为30 μmol/L和0.25 μmol/L，将转染后48 h的细胞PBS洗2次，分别将相同数量的细胞加入上述试管中，37℃孵育12 min，用氩离子激光488 nm激发，记录530/640发射荧光，求出该比值(FIR)，以pH值为横坐标，FIR为纵坐标，求出标准曲线，根据标准曲线求出细胞内pH值[5]. 细胞周期及细胞凋亡用流式细胞仪检测. 利用酶联免疫吸附仪测定各细胞的吸光度值，绘制细胞生长曲线. 光镜和透射电镜观察细胞结构的变化. 镜下计数软琼脂中细胞集落形成数，镜下直径大于75 μm或细胞数大于50个以上的克隆才计数，求出克隆形成率. 裸鼠皮下分别接种Zeo-7901细胞、空白对照组SGC-7901和Anti-7901细胞悬液，观察裸鼠体内成瘤情况.

统计学处理 计量数据以平均数±标准差(mean±SD)表示，对相关资料进行t检验，采用SPSS程序包进行分析，$P<0.05$为差异显著，$P<0.01$为差异非常显著.

2 结果

2.1 *基因重组及鉴定* pEAP-NHE1用*Eco*RI、*Hind*III酶切后，形成2.9 kp和3.6 kp两条带. 根据对pEAP-NHE1质粒图谱的分析，用凝胶试剂盒回收含人类NHE1结构基因cDNA的3.6 kp目的片段. pcDNA3.1(-)/Zeo用*Eco*RI、*Hind*Ⅲ酶切后，形成5.0 kp的线性载体. 将其与目的片段进行定向反向连接，并经细菌转化和质粒抽提，获的重组质粒，再用*Eco*RI、*Hind*Ⅲ酶切后，形成5.0 kp、3.6 kp条带，提示目的片段成功插入载体中. 采用脂质体法将反义重组质粒及空载体转染至SGC-7901胃癌细胞中，Zeocin筛选出稳定的克隆后，NHE1反义基因转染的SGC-7901细胞命名为Anti-7901细胞，空载体pcDNA3.1(-)/Zeo转染的SGC-7901细胞命名为Zeo-7901细胞. 采用PCR法扩增外源性ZeoR基因，转染反义重组质粒及空载体的SGC-7901胃癌细胞组可各见一条特异性条带，大小为357 bp，而空白对照组SGC-7901胃癌细胞未见特异性条带，说明反义重组质粒及空载体已转染至胃癌细胞内.

2.2 细胞形态学的变化 光镜下观察:Anti-7901细胞胞体增大，胞质丰富，核大小相对一致，核浆比减少，核分裂相减少，异型性减小.而Zeo-7901和空白对照组SGC-7901细胞胞体大小不一，形态多样，胞质少，核大小不一，核浆比增大，核分裂相增多，异型性增大，出现较多巨核细胞和多核巨细胞.空白对照组SGC-7901和空载细胞相比无明显差别.透射电镜下观察:空白对照组SGC-7901细胞和空载细胞核大，核仁突出，核膜有皱缩，细胞器不发达，线粒体少，形状不规则，少见粗面内质网，可见大量的游离核糖体.而Anti-7901细胞器发达，线粒体丰富，形态较为成熟，并可见髓鞘样变，胞质内出现空泡样结构，高尔基体较发达，内质网扩张，核偏向一侧，极性增强.

2.3 细胞内pH的测定 以横坐标为pH值，纵坐标为发射荧光比值(FIR)，求出标准曲线，回归方程:$y = 0.2\ 144\chi - 0.4\ 248$($r = 0.96$)，根据标准曲线求出的Anti-7901细胞胞内pH值为6.77±0.05，而Zeo-7901细胞和 空白对照组SGC-7901细胞内pH值分别为7.24±0.03和7.26±0.03，统计学分析有显著差异($P<0.01$).

2.4 细胞周期及细胞凋亡检测 流式细胞仪检测显示，Anti-7901细胞凋亡率为26.1%，显著高于Zeo-7901细胞和空白对照组SGC-7901细胞凋亡率(5.12%，4.48%，$P<0.01$).Anti-7901细胞增生指数为40.43%，低于Zeo-7901细胞和空白对照组SGC-7901细胞增生指数(45.48%，44.86%)，但无统计学差异.Anti-7901细胞G_0/G_1期细胞较Zeo-7901细胞和SGC-7901轻度增加，S和G2M期细胞轻度减少.

2.5 生长曲线 生长曲线显示，Anti-7901 细胞较Zeo-7901细胞及空白对照组SGC-7901细胞在增生速度上明显减慢.在倒置显微镜下观察发现Anti-7901细胞有明显的接触抑制现象，细胞失去重叠生长的能力，且易发生脱落，而Zeo-7901细胞和空白对照组SGC-7901细胞则重叠生长显著，细胞丧失接触抑制.

2.6 软琼脂克隆形成率 软琼脂中培养，2 wk左右可见空白对照组SGC-7901细胞和Zeo-7901细胞成簇生长，且集落大，数目增多，形成率分别为38.6±4.63‰、40±4.53‰，而Anti-7901细胞在软琼脂中可见散在的细胞，形成集落少，形成率为9±3.54‰，显著少于SGC-7901细胞和Zeo-7901细胞($P<0.01$).

2.7 裸鼠体内致瘤性分析 在接种细胞约4×10^6个/只裸鼠的情况下，6 wk后接种Zeo-7901细胞和空白对照组SGC-7901细胞的3只裸鼠右下侧皮下长出肿瘤，成瘤率为100%，而接种Anti-7901细胞的3只裸鼠右上侧皮下未长出肿瘤，成瘤率为0%.移植瘤HE染色，细胞胞体大小不一，胞质少，核大小不一，核浆比增大，核分裂相多，异型性大，出现较多巨核细胞和多核巨细胞.

3 讨论

胃癌是严重危害人类健康最常见的恶性肿瘤之一，其死亡率在我国居恶性肿瘤的首位.和其他恶性肿瘤一样，原癌基因的激活、抑癌基因的突变是胃癌形成的重要分子基础之一，但胃癌的基因异常大多缺乏特异性，因此胃癌发生的分子机制仍然模糊不清[6].近年研究发现，细胞凋亡异常在肿瘤发生发展过程中具有重要的意义，胃黏膜癌变过程中不仅存在细胞过度增生，同时存在细胞凋亡异常，细胞凋亡与细胞增生平衡失调在胃癌发生中具有重要意义[7-8].对肿瘤的治疗可以通过诱导肿瘤细胞凋亡，而不单是抑制肿瘤的增生来实现.

自1989年Sardet实验室成功克隆人类NHE1 cDNA以来[9]，人们已知NHE有8个亚型，分别命名为NHE1-8，他们在结构上相似，功能上相关，共同构成膜交换蛋白的一个基因家族[10-13].NHE1主要存在于人类的所有组织中，是一种管家基因，定位于$1P^{35-36}$座位上，mRNA为3.8 kb.人类NHE1基因由12个外显子和11个内含子组成，cDNA全长为5 kb，开放阅读框长2 445 bp[14].我们前期研究发现[4]，NHE1基因表达在胃癌中显著增加，与胃癌的发生有着密切的关系.为进一步了解NHE1基因在胃癌细胞中的作用，探讨通过使细胞内酸化来诱导肿瘤细胞凋亡从而治疗胃癌的新方法，我们利用基因转染技术，构建NHE1反义真核表达载体，将NHE1反义基因转染入SGC-7901胃癌细胞，研究NHE1反义基因对SGC-7901胃癌细胞生物学行为的影响.

在实验中我们成功构建了NHE1反义基因哺乳动物真核表达质粒，并成功转染SGC-7901胃癌细胞.首次发现转染NHE1反义基因后，SGC-7901胃癌细胞细胞器发生数量和形态学方面的变化，胃癌细胞形态恶性程度降低.转染NHE1反义基因后，SGC-7901胃癌细胞生长速度明显减慢，出现接触抑制，呈单层生长，增生指数降低，细胞凋亡增加，细胞周期左移，在软琼脂培养其中的生长能力降低，裸鼠体内致瘤能力显著降低.提示NHE1反义基因对SGC-7901胃癌细胞的恶性行为有明显抑制作用.NHE1基因在胃癌中表达增加，形成细胞内碱外酸的微环境，可能是胃癌细胞增生、逃避凋亡的主要机制之一.

NHE1基因的超表达对癌细胞的pHi调节发挥重要作用，癌细胞通过增加胞膜上NHE1的数量分布，从而加强Na^+-H^+交换，是其pHi调节的主要分子机制和特点，对维持其pHi稳定及恶性生长具有重要的生物学意义[15].由于Na^+-H^+交换依赖于Na^+-K^+-ATP酶供能，这一耗能过程又反馈地刺激癌细胞对糖的摄取和对糖酵解的依赖，胞内H^+不断增多，从而使肿瘤细胞进行强大的Na^+-H^+交换，将大部分H^+泵出细胞外，形成肿瘤细胞组织间液的酸性环境，保持肿瘤细胞内pH为中性或偏碱性，从而使肿瘤细胞免遭凋亡.我们通过转染NHE1反义基因成功抑制了SGC-7901胃癌细胞的NHE1基因表达，使胃癌SGC-7901细胞内酸化，其Anti-7901细胞pHi值较SGC-7901胃癌细胞、Zeo-7901细胞明显降低.NHE1基因表达受限的胃癌细胞增生受抑，凋亡率增加，细胞恶性程度降低，裸鼠体内致瘤能力显著降低.表明转染的人NHE1反义基因

成功抑制了 Na^+-H^+ 交换，破坏了胃癌细胞的能量代谢模式，达到了有效治疗胃癌的目的. 我们的结果证实了通过使细胞内酸化诱导细胞凋亡从而治疗胃癌的可行性，为胃癌基因治疗提供了新的思路.

4 参考文献

1 Slepkov E, Fliegel L. Structure and function of the NHE1 isoform of the Na+/H+ exchanger. *Biochem Cell Biol* 2002;80:499-508
2 黄桂君, 厉为良, 钱桂生. 人肺癌组织细胞NHE1mRNA表达及其意义的研究. 激光杂志 2000;21:60-61
3 Lagana A, Vadnais J, Le PU, Nguyen TN, Laprade R, Nabi IR, Noel J. Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na+/H+ exchanger NHE1. *J Cell Science* 2000;113(Pt 20):3649-3662
4 滕小春, 刘海峰, 刘永生, 段丽, 王国安, 何俊堂. NHE1蛋白在胃癌和胃癌前病变中的表达及临床意义. 第三军医大学学报 2004;26:402-404
5 吴国明, 厉为良, 黄桂君, 钱桂生. 双甲基氨氯吡咪抑制人肺癌细胞株Na+/H+交换泵-1活性诱导肿瘤细胞酸化和凋亡. 第三军医大学学报 1998;12:476-479
6 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 门荣甫. bcl-2蛋白在胃癌组织中的表达及意义. 肿瘤防治研究 1997;24:269-271
7 刘海峰, 刘为纹, 房殿春. 胃黏膜癌前病变Hp感染与bax蛋白表达及细胞凋亡的关系. 第三军医大学学报 2001;23:1015-1017
8 刘海峰, 刘为纹, 房殿春. 胃癌及其癌前病变中细胞凋亡与细胞增生间关系的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:649-651
9 Sardet C, Counillon L, Franchi A, Pouyssegur J. Growth factors induce phosphorylation of the Na+/H+ antiporter, glycoprotein of 110 kD. *Science* 1990;247:723-726
10 Pedersen SF, King SA, Rigor RR, Zhuang Z, Warren JM, Cala PM. Molecular cloning of NHE1 from winter flounder RBCs: activation by osmotic shrinkage, cAMP, and calyculin A. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:1561-1576
11 Behne MJ, Meyer JW, Hanson KM, Barry NP, Murata S, Crumrine D, Clegg RW, Gratton E, Holleran WM, Elias PM, Mauro TM. NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. Microenvironment acidification assessed with fluorescence lifetime imaging. *J Biol Chem* 2002;277:47399-47406
12 Szaszi K, Paulsen A, Szabo EZ, Numata M, Grinstein S, Orlowski J. Clathrin-mediated endocytosis and recycling of the neuron-specific Na+/H+ exchanger NHE5 isoform, Regulation by phosphatidylinositol 3'-kinase and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2002;277:42623-42632
13 Goyal S, Vanden Heuvel G, Aronson PS. Renal expression of novel Na^+/H^+ exchanger isoform NHE8. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:467-473
14 Putney LK, Denker SP, Barber DL. The changing face of the Na^+/H^+exchanger, NHE1:Structure, regulation, and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:527-552
15 McLean LA, Roscoe J, Jorgensen NK, Gorin FA, Cala PM. Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:676-688

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠血液黏附分子CD44、CD54的影响

范 恒, 邱明义, 户菲菲, 梅家俊, 沈关心, 刘松林

范恒, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合 湖北省武汉市 430022
邱明义, 梅家俊, 刘松林, 湖北中医学院 湖北省武汉市 430061
户菲菲, 武汉市第一医院 湖北省武汉市 430020
沈关心, 华中科技大学同济医学院 湖北省武汉市 430022

湖北省教委资助项目, No. 99Z014

项目负责人: 邱明义, 430061, 湖北省武汉市, 湖北中医学院. fanheng001@hotmail.com
电话: 027-62083591

收稿日期: 2004-11-01 接受日期: 2004-11-17

摘要

目的: 观察理肠四方对溃疡性结肠炎(UC)大鼠血液黏附分子CD44、CD54的影响，比较四方疗效大小，并分析其作用机制.

方法: 应用2，4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立UC大鼠模型，将98健康SD大鼠(雌雄各半)，按雌雄随机分7组，分别为乌梅丸组、白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组、柳氮磺胺比啶(SASP)组、模型组和正常组，分别观察治疗后大鼠血液黏附分子CD44、CD54的变化，并进行统计学比较.

结果: 造模后血液黏附分子CD44、CD54升高(模型组 *vs* 正常组 $q = 4.78$，5.32，$P<0.01$)，而乌梅丸组比模型组下降(乌梅丸组 *vs* 模型组，$q = 4.63$，5.43，$P<0.01$)，其余各组比模型组下降，但不一定都有显著差异(表1)，除乌梅丸外，理肠四方之间比较无明显差异($P>0.05$).

结论: 理肠四方经两两比较后，乌梅丸疗效最好，他们可能均有下调血液黏附分子CD44、CD54的作用，从而使溃疡性结肠炎大鼠免疫功能恢复正常，达到治疗的目的.

范恒, 邱明义, 户菲菲, 梅家俊, 沈关心, 刘松林. 理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠血液黏附分子CD44、CD54的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3):397-400
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/397.asp

成功抑制了 Na^+-H^+ 交换，破坏了胃癌细胞的能量代谢模式，达到了有效治疗胃癌的目的. 我们的结果证实了通过使细胞内酸化诱导细胞凋亡从而治疗胃癌的可行性，为胃癌基因治疗提供了新的思路.

4 参考文献

1 Slepkov E, Fliegel L. Structure and function of the NHE1 isoform of the Na+/H+ exchanger. *Biochem Cell Biol* 2002;80:499-508
2 黄桂君, 厉为良, 钱桂生. 人肺癌组织细胞NHE1mRNA表达及其意义的研究. 激光杂志 2000;21:60-61
3 Lagana A, Vadnais J, Le PU, Nguyen TN, Laprade R, Nabi IR, Noel J. Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na+/H+ exchanger NHE1. *J Cell Science* 2000;113(Pt 20):3649-3662
4 滕小春, 刘海峰, 刘永生, 段丽, 王国安, 何俊堂. NHE1蛋白在胃癌和胃癌前病变中的表达及临床意义. 第三军医大学学报 2004;26:402-404
5 吴国明, 厉为良, 黄桂君, 钱桂生. 双甲基氨氯吡咪抑制人肺癌细胞株Na+/H+交换泵-1活性诱导肿瘤细胞酸化和凋亡. 第三军医大学学报 1998;12:476-479
6 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 门荣甫. bcl-2蛋白在胃癌组织中的表达及意义. 肿瘤防治研究 1997;24:269-271
7 刘海峰, 刘为纹, 房殿春. 胃黏膜癌前病变Hp感染与bax蛋白表达及细胞凋亡的关系. 第三军医大学学报 2001;23:1015-1017
8 刘海峰, 刘为纹, 房殿春. 胃癌及其癌前病变中细胞凋亡与细胞增生间关系的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:649-651
9 Sardet C, Counillon L, Franchi A, Pouyssegur J. Growth factors induce phosphorylation of the Na+/H+ antiporter, glycoprotein of 110 kD. *Science* 1990;247:723-726
10 Pedersen SF, King SA, Rigor RR, Zhuang Z, Warren JM, Cala PM. Molecular cloning of NHE1 from winter flounder RBCs: activation by osmotic shrinkage, cAMP, and calyculin A. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:1561-1576
11 Behne MJ, Meyer JW, Hanson KM, Barry NP, Murata S, Crumrine D, Clegg RW, Gratton E, Holleran WM, Elias PM, Mauro TM. NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. Microenvironment acidification assessed with fluorescence lifetime imaging. *J Biol Chem* 2002;277:47399-47406
12 Szaszi K, Paulsen A, Szabo EZ, Numata M, Grinstein S, Orlowski J. Clathrin-mediated endocytosis and recycling of the neuron-specific Na+/H+ exchanger NHE5 isoform, Regulation by phosphatidylinositol 3'-kinase and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2002;277:42623-42632
13 Goyal S, Vanden Heuvel G, Aronson PS. Renal expression of novel Na^+/H^+ exchanger isoform NHE8. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;284:467-473
14 Putney LK, Denker SP, Barber DL. The changing face of the Na^+/H^+exchanger, NHE1:Structure, regulation, and cellular actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002;42:527-552
15 McLean LA, Roscoe J, Jorgensen NK, Gorin FA, Cala PM. Malignant gliomas display altered pH regulation by NHE1 compared with nontransformed astrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:676-688

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠血液黏附分子CD44、CD54的影响

范 恒, 邱明义, 户菲菲, 梅家俊, 沈关心, 刘松林

范恒, 华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合 湖北省武汉市 430022
邱明义, 梅家俊, 刘松林, 湖北中医学院 湖北省武汉市 430061
户菲菲, 武汉市第一医院 湖北省武汉市 430020
沈关心, 华中科技大学同济医学院 湖北省武汉市 430022

湖北省教委资助项目, No. 99Z014

项目负责人: 邱明义, 430061, 湖北省武汉市, 湖北中医学院. fanheng001@hotmail.com
电话: 027-62083591

收稿日期: 2004-11-01 接受日期: 2004-11-17

摘要

目的: 观察理肠四方对溃疡性结肠炎(UC)大鼠血液黏附分子CD44、CD54的影响，比较四方疗效大小，并分析其作用机制.

方法: 应用2，4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立UC大鼠模型，将98健康SD大鼠(雌雄各半)，按雌雄随机分7组，分别为乌梅丸组、白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组、柳氮磺胺比啶(SASP)组、模型组和正常组，分别观察治疗后大鼠血液黏附分子CD44、CD54的变化，并进行统计学比较.

结果: 造模后血液黏附分子CD44、CD54升高(模型组 *vs* 正常组 $q = 4.78$，5.32，$P<0.01$)，而乌梅丸组比模型组下降(乌梅丸组 *vs* 模型组，$q = 4.63$，5.43，$P<0.01$)，其余各组比模型组下降，但不一定都有显著差异(表1)，除乌梅丸外，理肠四方之间比较无明显差异($P>0.05$).

结论: 理肠四方经两两比较后，乌梅丸疗效最好，他们可能均有下调血液黏附分子CD44、CD54的作用，从而使溃疡性结肠炎大鼠免疫功能恢复正常，达到治疗的目的.

范恒, 邱明义, 户菲菲, 梅家俊, 沈关心, 刘松林. 理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠血液黏附分子CD44、CD54的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3):397-400
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/397.asp

0 引言

黏附分子(adhesion molecules简称AMS)是一类位于细胞膜表面的介导细胞与细胞，细胞与基质间相互接触和结合的糖蛋白分子，在机体免疫和炎症反应过程中发挥重要作用[1].某些AMS在溃疡性结肠炎(UC)中存在异常表达，与炎症反应的发生、维持和转归关系密切. 其中CD44、CD54与UC关系最为密切[2-3].我们主要观察理肠四方对UC大鼠血浆CD44、CD54的影响，以探讨该四方治疗UC的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗大鼠CD44单克隆抗体(Mouse Anti Rat CD44:FITC McAb)克隆号OX-50，分类号MsIgG1，由Serotec公司生产;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠抗大鼠CD54单克隆抗体[Mouse Anti Rat CD54(ICAM-1):FITC McAb]克隆号1A29，分类号MsIgG1，由Serotec公司生产;异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠同型对照(Mouse IgG1 Isotype Control:FITC)克隆号15H6，分类号Mouse IgG1κ，由Southern Biotechnology公司生产.上述三种试剂由深圳晶美生物工程有限公司提供.溶血素(Ammonium Chloride Lysing Reagent)产品号35221E，由Pharmingen公司生产，华中科技大学同济医学院附属协和医院流式细胞室提供.用法:用蒸馏水稀释原液，稀释比为10∶1，现配现用.

磷酸盐缓冲液(PBS):将磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)及磷酸二氢钾(KH_2PO_4)按4∶1的比例加入2 000 mL蒸馏水配制而成，PH值为7.35.上述两种药品由武汉亚法生物技术有限公司提供，产品号1B0030.

乙二胺四乙酸二钠盐(EDTA-Na_2 Salt):将1gEDTA-Na2 Salt及0.7 gNaCL溶于100 mL蒸馏水中配制而成.此两种药品由武汉亚法生物技术有限公司提供，产品号0B0241.肝素钠(Heparin Na Salt):将0.1 g肝素钠粉末溶于10 mL蒸馏水中配制而成，pH值为5.0-7.5.肝素钠粉末由武汉亚法生物技术有限公司提供，产品号CH0081.

1.1.2 仪器 LD5-22A型离心机，北京医用离心机厂生产.流式细胞仪，美国Becton Dickinson公司生产，产品型号:FACSCALIBUR，由华中科技大学同济医学院附属协和医院流式细胞室提供.

1.1.3 药物 理肠四方(乌梅丸、白头翁汤、参苓白术散、痛泻要方)的成分和剂量如下.乌梅丸:乌梅16 g，细辛6 g，干姜10 g，黄连16 g，当归4 g，附子6 g，蜀椒4 g，桂枝6 g，生晒参6 g，黄檗6 g;白头翁汤:白头翁30 g，黄柏24 g，黄连10 g，秦皮24 g;参苓白术散:莲子肉10 g，薏苡仁10 g，缩砂仁10 g，桔梗10 g，白扁豆15 g，白茯苓20 g，生晒参20 g，甘草20 g，白术20 g，山药20 g;痛泻要方:炒白术30 g，白芍20 g，陈皮15 g，防风20 g.西药柳氮磺胺吡啶(SASP)批号为:200111002，由上海三维制药公司生产(250 mg/片).SD健康大鼠98只(雌雄各半，体质量300±50 g).

1.2 方法

1.2.1 分组与造模 按雌雄随机分7组，各组均为14只(雌雄各半)，第1、2、3、4、5、6为造模组，第7组为正常组，而第1、2、3、4、5、6组同时又分别为乌梅丸组、白头翁汤组、参苓白术散组、痛泻要方组、SASP组和模型组，各组体重统计学比较无显著性差异(P>0.05).应用2，4-二硝基氯苯(DNCB)免疫加醋酸局部灌肠法建立UC大鼠模型[4-7].将大鼠颈背部用100 g/L Na_2S脱毛后，以20 g/L DNCB丙酮液0.25 mL(5滴)滴背，1次/d，连续14 d，在第15 d以直径3 mm导尿管经肛门插入结肠8 cm处，注入1 g/L DNCB乙醇0.25 mL，在16 d时同部位注入80 mL/L醋酸溶液2 mL，准确计时10 s后，再用生理盐水5 mL冲洗.再饲养2 wk，每天继续观察大鼠大便性状、饮食、毛发、活动状态等，可以看到大鼠逐渐产生典型UC活动期症状，30 d后造模完成后，每组随机抽取大鼠2只，处死后取其结肠，病理的确认结肠出现的充血、水肿、炎细胞浸润、隐窝脓肿、杯状细胞减少、腺体破坏及小溃疡形成等一系列变化.乌梅丸组、白头翁汤组、参苓白术散、痛泻要方组、SASP组各组大鼠分别用以下方式给药等五组:乌梅丸液515 g/L、白头翁汤液562 g/L、参苓白术散液987 g/L、痛泻要方液216 g/L和SASP混悬液26 g/L各3 mL灌胃，1次/d;模型组、正常组大鼠均以蒸馏水3 mL灌胃，1次/d，以上均给药15 d.

1.2.2 观察指标与方法 7组大鼠分别给予药物及蒸馏水灌胃20 d后，用眼球采血的方法采集血液标本.(1)抗凝管的制备:用一次性注射器吸取0.1 mL浓度10 g/L的EDTA-Na_2溶液于容积为5 mL的塑料试管中，100℃下烘干，室温下贮存备用.另于采血前新鲜配制10 g/L肝素钠溶液，用微量移液器吸取50 μL该溶液加入上述试管中.(2)收集2 mL大鼠全血于抗凝管中，轻轻混匀.用微量移液器各吸取100 uL抗凝全血加入分别装有Mouse Anti Rat CD54(ICAM-1):FITC McAb、Mouse Anti Rat CD44:FITC McAb、Mouse IgG1 Isotype Control的三支塑料离心管中，充分混匀，室温下避光反应20-30 min.(3)各加入2 mL溶血素，立即充分混匀，室温下避光反应15 min.以1 000 r/min的速度离心5 min，弃去上清.(4)各加入2 mL PBS溶液，充分混匀，室温下避光反应25 min.以1 000 r/min的速度离心5 min，弃去上清.(5)各加入1 mL PBS溶液，充分混匀，制成单细胞悬液，并调整细胞浓度为106个/50 μL，4℃保存待机测试，时间不超过6 h.(6)上机测试前再次振荡使细胞悬浮均匀.淋巴细胞黏附分子表型用流式细胞仪检测.光源用488 nm的氩离子激光.上机前以标准微球调整仪器，使变异系数在2%以内，上机后收集106个细胞，荧光强度以对数放大，光散射数据存盘，测试后在Apple计算机上用Cell Qust Plot软件分析数据，由HP1 200 C/PC打印结果(以阳性细胞百分率表示).

统计学处理 所有数据均以mean ± SD表示，统计分析选用方差分析和q检验.

2 结果

2.1 造模动物于2 wk左右出现黏液稀便，且逐渐加重，4 wk左右症状更为严重，可见脓血便、消瘦、体重减轻、毛发无光泽、饮食明显减少、畏寒、懒动等.经理肠四方、SASP灌胃后，其症状均有不同程度改善.

2.2 理肠四方对UC大鼠血液中CD44、CD54(ICAM-1)含量的影响.

表1 理肠四方对UC对大鼠血液CD44、CD54(ICAM-1)含量的影响(mean ± SD，%)

组别	n	CD44	CD54(ICAM-1)
正常对照组	10	37.10 ± 13.05[d]	15.43 ± 5.02[d]
模型组	7	72.95 ± 5.29[b]	43.88 ± 4.24[b]
SASP组	8	63.87 ± 4.39[b]	33.07 ± 5.08b[d]
参苓白术散组	7	63.47 ± 11.67[b]	29.52 ± 5.67b[d]
白头翁汤组	7	65.95 ± 12.4[b]	41.18 ± 10.97[b]
乌梅丸组	7	52.68 ± 17.58[d]	27.08 ± 10.94[ad]
痛泻要方	7	53.71 ± 7.72b[c]	39.02 ± 11.96[b]

[a]$P<0.05$，[b]$P<0.01$ *vs* 正常组；[c]$P<0.05$，[d]$P<0.01$ *vs* 模型组.

3 讨论

UC与免疫调节异常密切相关，正常胃肠道内有大量的抗原物质存在，如致病菌、正常菌群、细菌毒素、病毒、代谢的化学物质及食物等，这些内容物均可能是潜在的免疫原.显然，肠免疫系统处于一种不断地反应状态，当机体免疫功能正常时，则诱发保护性免疫反应，炎症就不会发生.肠上皮细胞黏膜屏障的破坏为大量摄取肠抗原创造了条件，免疫调节失衡是UC的免疫学特性.Sartor[8]认为，UC的发病机制经过一系列的步骤，如始发事件、诱发事件、免疫调节异常、组织损伤及临床症状.始发因素可以是感染、毒素、非甾体簇类固醇药物等，破坏了肠上皮屏障使肠组织暴露在大量的肠抗原中，在遗传易感的宿主中诱发黏膜免疫反应.

目前的免疫调节异常学说认为[9]，肠黏膜通透性增加，肠腔内抗原大量摄入并反复刺激使得肠免疫系统过度反应和错误识别，激活巨噬细胞和淋巴细胞，一系列的细胞因子、炎性递质及黏附分子激活释放，导致机体细胞和体液免疫反应.免疫反应一旦被启动，就会逐级放大，最终发生了UC.

白细胞的黏附/聚集增加一直被认作是炎症活动性的主要标志，而白细胞的黏附聚集依赖黏附分子的参与，有研究表明[10]抗ICAM-1抗体能有效地抑制白细胞与上皮细胞的黏附，从而减轻炎症程度，用于治疗UC糖皮质激素和5-氨基水杨酸的作用机制部分与细胞AMS的合成与功能有关，所以对黏附分子的研究正日益受到重视.

ICAM-1/CD54为单链跨膜糖蛋白，核心多肽为55 KDa，由于不同种类细胞上该分子所含寡糖分子数有差异，其分子量可在80-114 Kda范围，属于免疫球蛋白超家族，可表达于T、B淋巴细胞及单核细胞表面.正常情况下，ICAM-1很少表达或不表达；当受到炎性细胞因子(如TNF-α、IL-1、IFN-γ等)、内毒素等刺激时呈高水平表达.参与抗原非依赖性淋巴细胞、单核细胞粘蛋白和抗原提呈过程，与淋巴细胞功能相关抗原(LFA-1)相互识别与结合，可促进白细胞与血管内皮细胞的黏附和白细胞向炎症部位游走，而共同介导免疫效应细胞与多种细胞及免疫细胞间的相互作用，在机体免疫系统中起重要作用.

CD44是一组广泛表达于多种细胞表面的糖蛋白，由于基因转录过程中mRNA的选择性剪接，形成标准型(CD44S)及变异型(CD44V1-10)，有人称之为CD44家族.CD44分子可与多种配体分子结合，具有广泛的生物学功能(1)与细胞骨架蛋白结合，参与细胞伪足形成及迁移运动；(2)参与周围细胞和细胞间质成分的黏附；(3)是T淋巴细胞的归巢受体，与高内皮静脉结合，参与淋巴细胞归位到淋巴组织；(4)参与T细胞活化；(5)参与上皮细胞增生、肿瘤转移.Rosenberg *et al*[11]用免疫组化法检测UC结肠隐窝上皮细胞CD44V6及V3，呈高强度表达.1991年Seth *et al*[12]用免疫印记法首次证实人血清中存在可溶性CD54，并具有膜表面CD54分子大部分细胞外功能区.江学良 *et al*[3,13]用流式细胞仪检测UC患者组织和血液中CD44和CD54较正常人明显升高，尤以活动期显著，缓解期则有所下降，表明其与UC活动转归有一定关系，并在UC发病机制中起一定作用.

本实验的结果显示：(1)模型组大鼠血液中CD44、CD54含量比正常对照组高，并有非常显著差别.(2)SASP组大鼠血液中CD44含量比正常组高，并有非常显著差别；与模型组无差别；SASP组大鼠血液中CD54含量比正常组高，比造模组低，并有非常显著差别.(3)参苓白术散组CD44、CD54含量与正常对照组比较高，并有非常显著差别；CD44含量与造模组无差别，CD54含量与造模组比较低，并有非常显著差别.(4)白头翁组CD44、CD54含量与正常对照组比较高，有非常显著差别；与造模组比较均无差别.(5)乌梅丸组CD44含量低于造模组，有显著差别；与正常组无差别.CD54含量高于正常组，有显著差别；低于造模组，有非常显著差别.(6)痛泻要方组血液中CD44含量高于正常对照组，有非常显著差别；低于模型组，有显著差别.CD54含量高于正常对照组，有非常显著差别；而低于模型组，但无显著差别.(7)组间比较乌梅丸组血液中CD44、CD54均明显低于其他各组，且有显著差异，说明：(1)CD44、CD54在UC发病中起一定的作用，且与UC活动转归有一定的关系，与炎症程度呈正相关[14]但不如其他的细胞因子更能反映其病变程度[15]；(2)从理肠四方治疗黏附分子变化看，仍以乌梅丸变化为剧，也说明乌梅丸疗效可能最好，与其他实验结果也基本一致[16]，这是因为该实验动物模型的复制符合

UC(“休息痢”)的特点，乌梅丸的组方特点与其中医病机基本一致[19]，故其疗效最好，也符合实际.

AMS在肠组织的表达受多种细胞因子的调节.有资料显示[20]，当受到炎性细胞因子如TNF-α(TNF-α诱发的炎症反应在很大程度上是通过诱导产生的以IL-8为代表的趋化因子所介导的)、IL-8等刺激时，ICAM-1等AMS呈高水平表达.TNF-α可增强或促进血管内皮细胞与白细胞(起初是中性粒细胞，随后是单核细胞、淋巴细胞)间的黏附，从而有助于白细胞聚集于炎症局部.IL-8在增加血管通透性的同时，也是一种很强的中性粒细胞趋化因子，诱导中性粒细胞趋化，增加AMS表达.故理肠四方对AMS的抑制作用，是否是通过抑制TNF-α、IL-8等细胞因子来实现的尚有待于进一步研究.笔者认为理肠四方降低了UC大鼠体内促炎细胞因子TNF-α、IL-8的含量[15, 21]，可能减少了TNF-α、IL-8对AMS的刺激诱导作用，从而阻止了AMS的异常表达，抑制了炎症细胞的黏附及迁徙能力，使得炎症及免疫活性细胞在局部黏膜组织的浸润减少，释放的各种炎症介质也减少，从而减轻局部免疫病理损伤，并抑制炎症反应的放大和持久化，起到调节免疫的作用.

4 参考文献

1 张继平.溃疡性结肠炎的免疫学研究进展.中国误诊学杂志 2002;2:57-59

2 费保莹,邓长生,朱尤庆.细胞黏附分子与炎症性肠病.国外医学消化系疾病分册 1999;19:15-17

3 江学良,权启镇,陈桂荣,尹格平,孙自勤,王要军.溃疡性结肠炎组织中黏附分子 CD_{54}、CD_{44} 的检测.中华消化内镜杂志 1998;15:292-294

4 江学良,权启镇,王东,孙自勤,王要军.复合法建立大鼠溃疡性结肠炎模型及其免疫和超微结构的变化. 世界华人消化杂志 1999;7:381

5 江学良,权启镇,王东,孙自勤,王要军,齐风.鱼腥草治疗溃疡性结肠炎大鼠对结肠压力的影响.世界华人消化杂志 1999;7:786-787

6 李林,王竹立,柯剑婷,张猛,邵剑锋,钟才能.实验性溃疡性结肠炎动物模型选择.世界华人消化杂志 2001;9:584-585

7 范恒,邱明义.溃疡性结肠炎大鼠实验模型的建立与评价.中医药学刊 2004;22:865-866

8 Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanism of chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1997;92(12 Suppl):S5-S11

9 余保平,王伟岸.消化系疾病免疫学.北京:科学出版社, 2000:52-53

10 Wong PY. Ulcerative colitis and cell adhesion moleculars . *J phamacol Exp Ther* 1995;274:475-480

11 Seth R, Raymond FD, Makgoba MW. Circulating ICAM-1 isofonns:diagnostic prospects for inflammatory and immune disirders. *Lancet* 1991;338:83-89

12 Resenberg WM, Prince C, Kaklamanis L, Fox SB, Jackson DG, Simmons DL, Champman RW, Trowell JM, Jewell DP, Bell JI. Increased expression of CD44v3 in ulcerative colitis but not Crohn's disease. *Lancet* 1995;345:1205-1209

13 江学良,权启镇,孙自勤,王要军,齐风.溃疡性结肠炎患者黏附分子的变化意义.华人消化杂志 1998;6:54-55

14 郑红斌,胡鸿毅,陆雄,马贵同.清肠栓防治大鼠溃疡性作用的实验研究.浙江中医学院学报 2001;25:47-51

15 姚茹冰,邱明义,蔡辉,胡兵.乌梅丸对溃疡性结肠炎大鼠病变结肠黏膜局部肿瘤坏死因子-α白介素-8及白介素-10的影响.中医杂志 2002;52:935-937

16 邱明义,范恒,梅家俊,沈关心,刘松林,赵映前.理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠结肠组织TNF-αmRNA表达的影响.世界华人消化杂志 2004;12:154-155

17 范恒,邱明义,杨胜兰,梅家俊,沈关心,刘松林.理肠四方治疗对大鼠溃疡性结肠炎疗效观察.中国中西医结合消化杂志 2004;12:155-156

18 范恒,邱明义,梅家俊,沈关心,刘松林.理肠中药方对溃疡性结肠炎大鼠结肠细胞凋亡及其调控基因表达的影响.世界华人消化杂志 2004;12:1119-1124

19 范恒,邱明义,段雪云,梅家俊,沈关心,刘松林.理肠四方治疗溃疡性结肠炎病机探讨.贵阳中医学院学报 2004;26:17-19

20 张世能,袁世珍.黏附分子与炎症性肠病.国外医学内科学分册 1998;25:177-179

21 范恒,邱明义,梅家俊,沈关心,刘松林.理肠四方对溃疡性结肠炎大鼠组织细胞因子TNF-α IL-6 IL-8 IL-10的影响.中医药学刊 2004;22:1624-1627

编辑 张海宁

·研究快报·

和胃冲剂促进胃肠动力机制的实验研究

张庆芳, 李 岩, 王启仪

张庆芳, 王启仪, 广东省人民医院消化内科 广东省广州市 510080
李岩, 中国医科大学附属第二医院消化内科 辽宁省沈阳市 110004
项目负责人: 李岩, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第二医院消化内科. liyan99@medmail.com
收稿日期: 2004-11-29 接受日期: 2004-12-18

摘要

目的: 探讨和胃冲剂对胃肠动力影响的作用机制及急性毒作用.

方法: 分别腹腔注射左旋精氨酸(L-Arg)和左旋麻黄碱制造胃肠动力障碍小鼠模型，观察和胃冲剂对两种模型胃肠动力及对正常大鼠血中胃动素(MOT)、一氧化氮(NO)的影响，并进行和胃冲剂的急性毒理实验.

结果: L-Arg和麻黄碱均可以导致小鼠胃内残留率增高，小肠推进比减低.和胃冲剂1组与左旋精氨酸组相比胃内残留率减低(62.62±17.1 *vs* 76.12±15.09)、小肠推进比增高(51.87±10.82 *vs* 44.61±7.93)($P<0.05$);和胃冲剂2组与麻黄碱组比较对小鼠胃肠动力的影响无统计学差异($P>0.05$).和胃冲剂组血浆MOT水平高于蒸馏水组(122.90 ± 33.14 *vs* 87.25 ± 14.75, $P<0.05$)，两组相比血清NO水平差异无统计学意义($P>0.05$).急性毒理实验中小鼠最大耐受倍数为240，未见中毒症状或死亡现象发生.

结论: 和胃冲剂可提高血浆MOT水平，调节NO合成，对肾上腺素能受体无明显影响，无急性毒副作用.

张庆芳, 李岩, 王启仪. 和胃冲剂促进胃肠动力机制的实验研究. 世界华人消化杂志 2005;13(3):401-403
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/401.asp

0 引言

前期研究中李岩 *et al*[1-5]以葡聚糖蓝作为标记物证实了砂仁能明显促进小鼠的胃排空功能，进而证实了砂仁、鸡内金、神曲、麦芽合煎剂有明显增强小鼠胃肠动力的作用. 我们[1-2]的研究结果证实和胃冲剂(由砂仁、鸡内金、神曲、麦芽四味中药组成)可以有效地促进正常小鼠的胃肠动力，含不同品种砂仁的和胃冲剂中，含阳春砂和胃冲剂效果较优.在此基础上，我们进一步讨论和胃冲剂促进胃肠动力的作用机制及急性毒作用.

1 材料和方法

1.1 材料 健康5周龄昆明系小白鼠120只，体重19-21 g，♂;健康4周龄昆明系小白鼠20只，体重17-19 g，雌雄各半;健康8周龄Wistar大鼠30只，体重180-220 g，雌雄各半.以上均由中国医科大学附属第二医院动物室提供.阳春砂购于亳州市远东药业有限公司(经辽宁中医学院采购办公室采办)，鸡内金、神曲、麦芽为市售，以上药材均经辽宁中医学院鉴定为正品.其他试剂和仪器:羧甲基纤维素钠(中国医药集团上海化学试剂公司，批号:F20010518)，L-Arg(上海康达氨基酸厂，批号:20020611)，左旋麻黄碱(沈阳市第一制药厂，批号:010601)，NO试剂盒(南京建成生物工程研究所)，MOT含量测定试剂盒(北京东亚免疫技术研究所)，CAY-I型液体快速混合器(北京长安仪器厂)，FT-613自动计算^{125}I放免测量仪(北京核仪器厂)，紫外光可见光连续分光光度仪(法国S500*P*型).营养性半固体糊制备[5-7]:羧甲基纤维素钠10 g，溶于250 mL蒸馏水中，然后分别加入16 g奶粉，8 g糖，8 g淀粉，每加一次搅拌均匀，最后加入1mL碳素墨水混合成300 mL约300 g的半固体糊状物，冰箱冷藏保存，用前2 h取出，恢复至室温.

1.2 方法

1.2.1 胃肠运动障碍小鼠模型的建立及和胃冲剂对模型胃肠运动的影响 小白鼠120只按体重分层、随机分成6组，每组20只，分别为蒸馏水1组，蒸馏水2组，左旋精氨酸(L-Arg)组，麻黄碱组，和胃冲剂1组，和胃冲剂2组.

L-Arg组，蒸馏水1组每日每只给予蒸馏水0.4 mL灌胃，和胃冲剂1组每日每只给予和胃冲剂0.4 mL灌胃.L-Arg组，和胃冲剂1组参照文献[8-9]给予腹腔注射L-Arg，第1 d不注射，第2 d 7.4 g/kg，第3-6 d 3.7 g/kg，蒸馏水1组第2 d开始给予腹腔注射同体积蒸馏水.实验前小鼠禁食24 h，各组动物每只分别给予相应药物0.4 mL灌胃，1 h后，灌服营养性半固体糊0.5 mL/只，15 min后脱颈椎处死，立即剖开腹腔，结扎胃贲门和幽门，从贲门处至回肠末端分离胃肠.取贲门至回肠末端肠管，将其自然拉直铺平，分别测量从幽门括约肌至半固体糊前端及至回盲部的小肠长度，计算幽门括约肌至半固体糊前端的距离占幽门括约肌至回盲部距离百分比(小肠推进比).取胃，用滤纸拭干后称重，沿胃大弯剪开胃体，洗去胃内容物后拭干，称重[7]，计算胃内残留物占所灌半固体糊(0.5 g)的重量百分比(胃内残留率).

麻黄碱组和蒸馏水2组每日每只给予蒸馏水0.4 mL灌胃，和胃冲剂2组每日每只给予和胃冲剂0.4 mL灌胃，喂养7 d.实验前所有小鼠禁食24 h，分别灌胃相应药物0.4 mL.40 min后，麻黄碱组和胃冲剂2组腹腔注射左旋麻黄碱(0.056 g/kg)[8]，蒸馏水2组腹腔注射同体积蒸馏水，20 min后灌服营养性半固体糊0.5 mL/只，30 min后脱颈椎处死，按上述方法计算胃内残留率和小肠推进比.

1.2.2 大鼠血浆MOT和血清NO的测定 正常Wistar大鼠30只，按体重分层、随机分为2组，每组15只.分

别为蒸馏水组(给予蒸馏水)，实验组(给予和胃冲剂溶液).上述大鼠每只分别给予相应制剂2 mL灌胃，1次/d，喂养1 wk.实验前所有大鼠禁食24 h(不禁水)，乌巴坦浅麻醉后经眶静脉丛采血4 mL.分别采用放射免疫法测定血浆内MOT含量，硝酸还原酶法测定血清NO含量.

1.2.3 和胃冲剂的急性毒理实验 健康4周龄、体重17-19 g昆明系小白鼠共20只，雌雄各半.喂食300%含阳春砂和胃冲剂每只0.4 mL两次，间隔2 h.给药后自然喂养1 wk，观察是否出现行动迟缓等中毒症状或死亡.

统计学处理 采用Excel统计软件 t 检验，数值用均数±标准差表示，$P<0.05$ 认为有统计学意义，$P<0.01$ 认为差异显著.

2 结果

2.1 造模结果 L-Arg组胃内残留率增高，小肠推进比减低，与蒸馏水1组比较差异显著($P<0.05$，表1，表2).麻黄碱组小肠推进比减低及胃内残留率增高与蒸馏水2组相比，统计学差异显著($P<0.01$，表1，表2).

2.2 和胃冲剂对胃肠运动障碍小鼠胃肠动力的影响 和胃冲剂1组与蒸馏水1组相比小鼠胃肠运动相近($P>0.05$)；与L-Arg组比较，胃内残留率减低，小肠推进比增高，统计学差异显著($P<0.05$，表1).和胃冲剂2组与麻黄碱组相比对小鼠胃肠动力影响的差异无统计学意义($P>0.05$)；与蒸馏水2组差异显著，和胃冲剂2组小鼠胃肠动力弱($P<0.01$，表2).

表1 和胃冲剂对L-Arg引起小鼠胃肠运动抑制的影响

组别	小肠推进比(%)	胃内残留率(%)
蒸馏水1组	52.35±8.31[a]	63.05±13.16[a]
L-Arg组	44.61±7.93	76.12±15.09
和胃冲剂1组	51.87±10.82[a]	62.62±17.1[a]

[a]$P<0.05$ vs L-Arg组.

表2 和胃冲剂对麻黄碱引起小鼠胃肠运动抑制的影响

组别	小肠推进比(%)	胃内残留率(%)
蒸馏水2组	64.08±11.74[a]	34.27±17.07[a]
麻黄碱组	34.93±11.47[b]	81.03±13.18[b]
和胃冲剂2组	40.93±12.28	77.00±12.06

[a]$P<0.05$ vs 麻黄碱组;[b]$P<0.01$ vs 蒸馏水组.

2.3 和胃冲剂对大鼠血浆MOT和血清NO的影响 正常对照组、和胃冲剂组血浆MOT水平分别为87.25±14.75 ng/L和122.90±33.14 ng/L.后者血浆MOT水平明显高于前者($P<0.01$).正常对照组与和胃冲剂组之间血清NO水平差异不显著($P>0.05$)(表3).

2.4 和胃冲剂的急性毒理实验 在1 wk时间内，未见腹泻、便秘、皮疹、竖毛、消瘦、精神症状等中毒症状或死亡，20只小鼠均健康活泼，平均体重由19 g增至24.7 g.小鼠最大耐受倍数 = (每只小鼠的耐受药量/小鼠平均体重)×(成人平均体重60 000 g/成人每日用量 30 g) = 240.远大于临床安全用药所需最大耐受倍数100.

表3 大鼠血浆MOT及血清NO测定结果

组 别	n	NO含量(μmol/L)	MOT含量ng/L
蒸馏水组	15	62.1±222.0	87.25 ± 14.75
和胃冲剂组	15	60.4±114.0	122.90 ± 33.14[d]

[d]$P<0.01$ vs 蒸馏水组.

3 讨论

NO是非肾上腺能和非胆碱能(NANC)神经递质，内源性NO是由其前体L-Arg在NO合酶(NOS)的作用下生成的.NO在胃肠道病理生理方面具有广泛影响，充当最终效应器神经元释放的神经递质和非神经细胞释放的递质.有研究认为外周血NO含量升高与功能性消化不良患者胃排空延迟有关[11-13].腹腔注射NO供体L-Arg能抑制小鼠胃肠运动，引起胃电节律失常，其异常可被NOS抑制剂逆转.我们采用小鼠连续6 d腹腔注射L-Arg[14]的研究表明，与正常对照组相比，模型组小鼠胃排空和小肠传输功能明显减弱，说明通过注射L-Arg提供NO前体可以引起胃肠平滑肌的超极化和松弛作用[8,11]，使胃肠运动功能减低.和胃冲剂对L-Arg所致小鼠胃肠运动的抑制有对抗作用，抑制NO过度释放，增加胃肠动力[15]，从而使胃排空和小肠推进功能恢复到正常水平；我们对30只Wistar大鼠的实验研究发现，该冲剂对正常大鼠血清NO的含量无明显影响，提示和胃冲剂对胃肠运动的作用可能是通过参与调节疾病状态氮能神经、降低异常升高的NO水平来实现的，而不影响正常状态氮能神经功能，因此服用该冲剂不会因升高血清NO水平而产生不良反应.

我们在实验中，给予和胃冲剂7 d后测定大鼠血浆MOT的水平，结果发现给药组MOT水平高于正常对照组.MOT主要分布于十二指肠、上段空肠，由M0细胞分泌，其主要生理功能与消化间期移行性运动综合波(MMC)密切相关[16]，表现为影响胃肠道的传输，加速胃的固体和液体的排空.MOT主要作用于胃平滑肌运动的起搏细胞(Cajal间质细胞，ICC)细胞膜上的受体[17]，通过ICC释放乙酰胆碱对胃肌收缩进行调节，阿托品和六羟季胺均可消除MOT的周期性释放和MMC第III相的出现，说明MOT作用与胆碱能神经有关.我们的研究已证实了砂仁能明显促进小鼠的胃排空功能[1-5]，砂仁、鸡内金、神曲、麦芽合煎剂有明显增强小鼠胃肠动力的作用，这种改善胃肠动力的作用机制可能与调节后胆碱能神经，提高血浆MOT水平有关.麻黄碱是肾上腺素能α、β受体兴奋剂，能促进肾上腺素能神经末梢释放递质，直接和间接地发挥拟肾上腺素作用，抑制胃肠平滑肌运动.我们的研究中，麻黄碱对小鼠胃肠抑制作用显著，与正常对照组比

$P<0.01$. 实验中，和胃冲剂不能对抗麻黄碱抑制胃排空和小肠传输的作用，提示该冲剂促进胃肠动力的机制可能与肾上腺素能受体无关，对胃部交感神经也无抑制作用.

在急性毒性实验中，给药后小鼠一般状态良好，毛色正常、体重增加、饮食及活动未见异常，未发现明显毒性反应，7 d内无一死亡，最大耐受倍数为240，大于临床用药所需最大耐受倍数100[18]. 这证明本药无急性毒副作用，口服用药安全可靠.

4 参考文献

1 李岩, 孙思予, 周卓. 消食行气中药对小鼠胃肠动力的影响. 新消化病学杂志 1997;5:153
2 李岩, 孙思予, 周卓, 陈苏宁, 王光尧. 健脾行气及消食中药组合对小鼠胃肠动力的影响. 华人消化杂志 1998;6(特刊7):208-209
3 王学清, 王秀杰, 李岩. 香砂平胃散对小鼠胃排空的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:571-574
4 李岩, 王学清, 张卫卫, 王江玥. 术香冲剂对小鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:575-5773
5 王贺玲, 李岩, 白菡, 张健. 理气中药对鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:1136-1138
6 Francis J, Crthley D, Dourish CT, Cooper SJ. Comparisons between the effects of 5-HT and DL-fenfluramine on food intake and gastric emptying in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;50:581-585
7 吴春福, 陈多. 小鼠胃排空模型的探讨. 中国药理学通报 1997;13:271-272
8 Delandy CP, McGeeney KF, Dervan P, Fitzpatrick JM. Pancreatic atrophy: A new model using serial intraperitoneal injections of L-arginine. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:1086-1090
9 Ozaki H, Blondfield DP, Hori M. Spontaneous release of nitric oxide inhibits electrical Ca2+ and mechanical transient in canine gastric smooth muscle. *J Physiol* 1992;445:231-247
10 Hull KM, Maher TJ. L-tyrosine potentiates the anorexia induced by mixed-acting sympathomimetic drugs in hyperphagic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255:403-409
11 唐红卫, 黄裕新, 徐海峰, 高巍, 周润锁, 尚磊, 王庆利, 高峰, 安晓丽. 功能性消化不良患者症状分型、胃排空功能、胃肠激素水平的相关性. 世界华人消化杂志 2003;11:1715-1719
12 丁西平, 王志华, 王巧民, 殷保书, 刘兰珍, 卫梅枝. 功能性消化不良患者血清一氧化氮水平及胃黏膜乙酰胆碱酯酶变化. 安徽医科大学学报 2004;39:59-62
13 王春虹, 黄颖秋. 功能性消化不良患者血清一氧化氮含量与食管动力变化特征研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:361-362
14 黄茂涛, 王振华, 陈代陆. 氮能神经在大鼠胃电节律失常中作用的研究. 中华消化杂志 1997;17(增刊):618
15 伍早安, 李国成, 胡道松. 肝胃不和型功能性消化不良大鼠幽门括约肌乙酰胆碱酯酶及一氧化氮合酶的表达. 中国中西医结合消化杂志 2004;12:8-10
16 Yang M, Fang DC, Li QW, Sun NX, Long QL, Sui JF, Gan L. Effects of gastric pacing on gastric emptying and plasma motilin. *World J Gastroenterol* 2004;10:419-423
17 周吕, 王礼建, 袁勃, 王玲. 胃动素对Cajal间质细胞引起的大鼠胃平滑肌收缩的作用. 中华医学杂志 2003;16:1422-1427
18 陈奇. 中药药理研究方法学. 第1版. 北京:人民卫生出版社, 1993:118

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

重组肠三叶因子对实验性结肠炎大鼠NO表达、MDA和SOD活性的影响

杨 天, 邹开芳

杨天, 邹开芳, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022
项目负责人: 邹开芳, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. tinan1010@yahoo.com.cn
电话: 027-85726113

收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-11-25

摘要

目的: 研究重组肠三叶因子(rhITF)对实验性结肠炎大鼠NO(一氧化氮)、MDA(丙二醛)、SOD(超氧化物歧化酶)的影响.

方法: 乙酸致结肠炎的大鼠给予rhITF灌肠后，肉眼及光镜下观察黏膜损伤程度及组织学变化，并检测结肠黏膜中iNOS mRNA和NO的表达及MDA、SOD活性.

结果: rhITF组的结肠黏膜损伤指数(CMDI)较模型组低(1.22 ± 0.67 *vs* 2.11 ± 0.60，$P<0.05$)，rhITF组iNOS mRNA较正常组和模型组表达增加，NO含量分别为(10.32 ± 1.95) μmol/g、(5.31 ± 1.31) μmol/g、(1.03 ± 0.40) μmol/g，rhITF组与正常组和模型组的差异均具有统计学意义($P<0.05$).rhITF组、模型组和正常组MDA含量分别为(10.82 ± 2.19)nmol/mg、(12.75 ± 0.76)nmol/mg、(8.06 ± 0.76)nmol/mg，SOD含量分别为(506.43 ± 54.01)nkat/mg、(496.93 ± 9.34)nkat/mg、(680.97 ± 35.51)nkat/mg，rhITF组与模型组的差异没有统计学意义.

结论: rhITF能减轻肠黏膜炎症反应，可能与iNOS和NO途径有关.

杨天, 邹开芳. 重组肠三叶因子对实验性结肠炎大鼠NO表达、MDA和SOD活性的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3):403-405
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/403.asp

0 引言

三叶肽是新近发现的一族富含半胱氨酸的小分子多肽，主要由乳腺癌相关肽(PS2或TFF1)、解痉多肽(SP或TFF2)和肠三叶因子(ITF或TFF3)组成，他们在人体胃

$P<0.01$. 实验中，和胃冲剂不能对抗麻黄碱抑制胃排空和小肠传输的作用，提示该冲剂促进胃肠动力的机制可能与肾上腺素能受体无关，对胃部交感神经也无抑制作用.

在急性毒性实验中，给药后小鼠一般状态良好，毛色正常、体重增加、饮食及活动未见异常，未发现明显毒性反应，7 d内无一死亡，最大耐受倍数为240，大于临床用药所需最大耐受倍数100[18]. 这证明本药无急性毒副作用，口服用药安全可靠.

4 参考文献

1 李岩, 孙思予, 周卓. 消食行气中药对小鼠胃肠动力的影响. 新消化病学杂志 1997;5:153
2 李岩, 孙思予, 周卓, 陈苏宁, 王光尧. 健脾行气及消食中药组合对小鼠胃肠动力的影响. 华人消化杂志 1998;6(特刊7):208-209
3 王学清, 王秀杰, 李岩. 香砂平胃散对小鼠胃排空的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:571-574
4 李岩, 王学清, 张卫卫, 王江玥. 术香冲剂对小鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:575-5773
5 王贺玲, 李岩, 白菡, 张健. 理气中药对鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:1136-1138
6 Francis J, Crthley D, Dourish CT, Cooper SJ. Comparisons between the effects of 5-HT and DL-fenfluramine on food intake and gastric emptying in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;50:581-585
7 吴春福, 陈多. 小鼠胃排空模型的探讨. 中国药理学通报 1997;13:271-272
8 Delandy CP, McGeeney KF, Dervan P, Fitzpatrick JM. Pancreatic atrophy: A new model using serial intraperitoneal injections of L-arginine. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:1086-1090
9 Ozaki H, Blondfield DP, Hori M. Spontaneous release of nitric oxide inhibits electrical Ca2+ and mechanical transient in canine gastric smooth muscle. *J Physiol* 1992;445:231-247
10 Hull KM, Maher TJ. L-tyrosine potentiates the anorexia induced by mixed-acting sympathomimetic drugs in hyperphagic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255:403-409
11 唐红卫, 黄裕新, 徐海峰, 高巍, 周润锁, 尚磊, 王庆利, 高峰, 安晓丽. 功能性消化不良患者症状分型、胃排空功能、胃肠激素水平的相关性. 世界华人消化杂志 2003;11:1715-1719
12 丁西平, 王志华, 王巧民, 殷保书, 刘兰珍, 卫梅枝. 功能性消化不良患者血清一氧化氮水平及胃黏膜乙酰胆碱酯酶变化. 安徽医科大学学报 2004;39:59-62
13 王春虹, 黄颖秋. 功能性消化不良患者血清一氧化氮含量与食管动力变化特征研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:361-362
14 黄茂涛, 王振华, 陈代陆. 氮能神经在大鼠胃电节律失常中作用的研究. 中华消化杂志 1997;17(增刊):618
15 伍早安, 李国成, 胡道松. 肝胃不和型功能性消化不良大鼠幽门括约肌乙酰胆碱酯酶及一氧化氮合酶的表达. 中国中西医结合消化杂志 2004;12:8-10
16 Yang M, Fang DC, Li QW, Sun NX, Long QL, Sui JF, Gan L. Effects of gastric pacing on gastric emptying and plasma motilin. *World J Gastroenterol* 2004;10:419-423
17 周吕, 王礼建, 袁勃, 王玲. 胃动素对Cajal间质细胞引起的大鼠胃平滑肌收缩的作用. 中华医学杂志 2003;16:1422-1427
18 陈奇. 中药药理研究方法学. 第1版. 北京:人民卫生出版社, 1993:118

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·研究快报·

重组肠三叶因子对实验性结肠炎大鼠NO表达、MDA和SOD活性的影响

杨 天, 邹开芳

杨天, 邹开芳, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科 湖北省武汉市 430022
项目负责人: 邹开芳, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. tinan1010@yahoo.com.cn
电话: 027-85726113

收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-11-25

摘要

目的: 研究重组肠三叶因子(rhITF)对实验性结肠炎大鼠NO(一氧化氮)、MDA(丙二醛)、SOD(超氧化物歧化酶)的影响.

方法: 乙酸致结肠炎的大鼠给予rhITF灌肠后，肉眼及光镜下观察黏膜损伤程度及组织学变化，并检测结肠黏膜中iNOS mRNA和NO的表达及MDA、SOD活性.

结果: rhITF组的结肠黏膜损伤指数(CMDI)较模型组低(1.22 ± 0.67 *vs* 2.11 ± 0.60，$P<0.05$)，rhITF组iNOS mRNA较正常组和模型组表达增加，NO含量分别为(10.32 ± 1.95) μmol/g、(5.31 ± 1.31) μmol/g、(1.03 ± 0.40) μmol/g，rhITF组与正常组和模型组的差异均具有统计学意义($P<0.05$).rhITF组、模型组和正常组MDA含量分别为(10.82 ± 2.19)nmol/mg、(12.75 ± 0.76)nmol/mg、(8.06 ± 0.76)nmol/mg，SOD含量分别为(506.43 ± 54.01)nkat/mg、(496.93 ± 9.34)nkat/mg、(680.97 ± 35.51)nkat/mg，rhITF组与模型组的差异没有统计学意义.

结论: rhITF能减轻肠黏膜炎症反应，可能与iNOS和NO途径有关.

杨天, 邹开芳. 重组肠三叶因子对实验性结肠炎大鼠NO表达、MDA和SOD活性的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3):403-405
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/403.asp

0 引言

三叶肽是新近发现的一族富含半胱氨酸的小分子多肽，主要由乳腺癌相关肽(PS2或TFF1)、解痉多肽(SP或TFF2)和肠三叶因子(ITF或TFF3)组成，他们在人体胃

肠道上皮细胞呈特异性表达，可以增加胃肠黏膜的防御能力，促进溃疡愈合，抑制肿瘤生长[1-2]. 目前国内外对三叶肽对胃黏膜的作用研究较多，而针对肠道三叶肽的研究则相对较少，我们通过研究重组肠三叶因子(rhITF)对乙酸诱导的大鼠结肠炎模型一氧化氮等表达的影响来探讨三叶肽对溃疡性结肠炎的治疗作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 重组肠三叶因子为北京大学生命科学院提供，超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及一氧化氮(NO)试剂盒购自南京建成生物工程研究所，Trizol试剂盒为Gibco公司产品. 逆转录酶M-MLV和Taq DNA聚合酶为Promega公司产品. 其他相关试剂均为分析纯产品. ♂Sprague-Dawley大鼠，体重200-220 g，由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供.

1.2 方法

1.2.1 溃疡性结肠炎动物模型制作 ♂Sprague-Dawley大鼠45只，200-220 g，25℃净化实验室，混合饲料喂养，自由饮水，随机分出15只作正常组，另外30只3 d后参照文献[3]方法制备大鼠结肠炎模型:禁食24 h，戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔麻醉后，用聚乙烯导管插入鼠结肠内距肛门口7-8 cm处，然后用注射器注入80 mL/L乙酸溶液1.5 mL，30 s后用生理盐水3 mL冲洗两次，苏醒后正常饮食.

1.2.2 实验方法 将造模成功的大鼠随机分成两组，一组给予重组TFF3灌肠(1 mg/kg，溶于生理盐水1 mL)，1次/d，共7 d，另一组作为空白对照给予生理盐水1 mL灌肠，同时正常组也给予生理盐水1 mL灌肠，1次/d，共7 d，在第8 d将所有大鼠处死. 造模后第2 d起每天观察腹泻及肉眼血便情况.

1.2.3 组织学观察及酶学检测 三组大鼠断颈处死后立即剖腹分离出整段结肠，沿肠系膜缘打开肠腔，用4℃生理盐水轻轻冲洗，按照文献[4]方法评价结肠黏膜损伤指数(CMDI)，评分标准为:0 =无损伤;1 = 轻度充血、水肿，表面光滑，无糜烂或溃疡;2 = 充血水肿，黏膜粗糙呈颗粒状，有糜烂或肠粘连;3 = 高度充血水肿，黏膜表面有坏死及溃疡形成，溃疡最大纵径小于1 cm，肠壁增厚或表面有坏死及炎症;4 = 在3分基础上溃疡最大纵径大于1 cm，或全肠壁坏死. 每段结肠自距肛门7-8 cm处取2块组织标本，另于炎症严重或溃疡处取至少1块组织. 标本用40 g/L甲醛固定，石蜡包埋，切片4 μm，常规HE染色，光镜下观察. 在处死两组大鼠的同时，距肛门7-9 cm处取3 mm×5 mm新鲜结肠组织标本，快速滤纸吸干后，置于液氮中冻存，供检测SOD、MDA及NO. SOD检测采用亚硝酸盐形成抑制法，MDA检测采用TBA显色法，NO检测采用硝酸还原酶法.

1.2.4 RT-PCR检测iNOS表达 总RNA抽提:50-100 mg肠黏膜组织捣碎→加入1mLTrizol溶液，匀浆→加200 μL氯仿→剧烈振荡15 s→12 000 g离心15 min→取上清0.5 mL→加入异丙醇0.5 mL→12 000 g离心10 min→弃上清，加入750 mL/L酒精洗沉淀→晾干.

取4 μL总RNA进行逆转录，取2 μL逆转录产物进行PCR扩增. iNOS上游引物为5'-GCATCCCAAGTACGAGTG-3'，下游引物为3'- TGACCTAAACCGACCAG-5'退火温度为49℃，扩增产物为400 bp，同时加入β-actin引物作为内对照，15 g/L琼脂糖凝胶电泳，观察PCR产物并用计算机凝胶电泳分析系统进行吸光度分析.

统计学处理 计量资料结果以平均值±标准差(mean ± SD)表示，比较采用方差分析，组间比较采用q检验. $P<0.05$为显著性检验标准.

2 结果

2.1 动物模型 正常组大鼠活动如常，反应机警，毛发有光泽，饮食量正常，体重增加;模型组大鼠出现血便或稀便、卷曲而卧、少动、体毛凌乱、精神萎靡、食量下降、体重下降等表现，有2只死亡;而治疗组除1只死亡外，其余大鼠一般状况随给药时间延长而逐渐好转，无血便或稀便、食量增加、体重逐渐增加.

2.2 组织学表现 肉眼观，生理盐水处理组结肠黏膜高度充血水肿，可见糜烂、点状或片状出血，光镜下观察黏膜及黏膜下层有中度炎性细胞浸润，以中性粒细胞为主，有糜烂及溃疡，病变部位腺体排列不整齐，杯状细胞萎缩或减少;rhITF处理组结肠黏膜固有层内有少数淋巴细胞、浆细胞等浸润，未见溃疡，腺体排列整齐，正常对照组黏膜光滑，腺体结构清晰，偶见充血、水肿，无糜烂及溃疡. rhITF可降低结肠黏膜CMDI评分，且较之模型组和正常组的差异均有统计学意义($P<0.05$).

2.3 iNOS mRNA表达 rhITF能增强iNOS基因表达，与正常组及模型组的差异有统计学意义($P<0.05$).

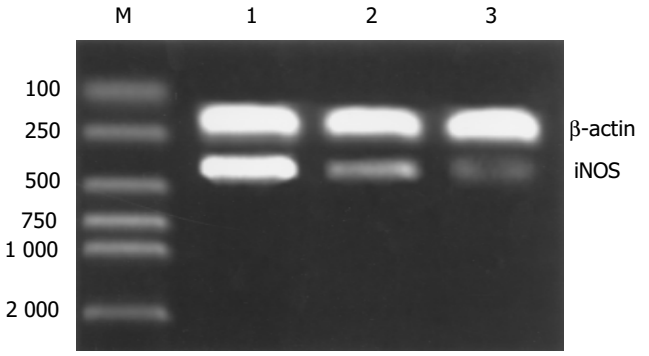


图1 结肠iNOS mRNA表达. 1: rhITF组; 2: 模型组; 3: 正常组; M: DNA marker(bp).

2.4 酶学检查结果 由表1可见，rhITF能使结肠黏膜中NO的表达显著增加，较之模型组和正常组的差异均有统计学意义($P<0.05$). 另外，结肠炎模型中MDA表达升高，而SOD降低，与正常组比较差异有统计学意义，但rhITF组与模型组的差异无统计学意义($P>0.05$).

表1 rhITF对CMDI评分、iNOS mRNA、NO表达、MDA、SOD活性的影响(mean ± SD)

组别	CMDI	iNOS /β-actin	NO(μmol/g)	MDA(nmol/mg)	SOD(nkat/mg)
正常组	0.50 ± 0.53	0.21 ± 0.03	1.03 ± 0.40	8.06 ± 0.76	680.97 ± 35.51
模型组	2.11 ± 0.60[a]	0.68 ± 0.06[a]	5.31 ± 1.31[a]	12.75 ± 0.76[a]	496.93 ± 9.34[a]
rhITF组	1.22 ± 0.67[ac]	0.75 ± 0.02[ac]	10.32 ± 1.95[ac]	10.82 ± 2.19[a]	506.43 ± 54.01[a]

[a]$P<0.05$ *vs* 正常组; [c]$P<0.05$ *vs* 模型组.

3 讨论

三叶肽家族是一类新近发现的、对胃肠道黏膜有保护作用的因子，能促进受损黏膜周围完好的上皮细胞向黏膜损伤表面迁移覆盖，促进损伤黏膜快速修复，或与黏液中的黏蛋白相互作用，加强黏液凝胶层，抵抗黏膜表层有害物质损伤，抑制肿瘤生长[5-7]，已有研究发现三叶肽能促进鼠实验性结肠炎黏膜修复[8]. 乙酸直接诱导大鼠化学性溃疡性结肠炎，其机制与增强血管通透性、激活激肽等炎症递质有关，是研究人类溃疡性结肠炎致炎机制的模型. 近年来自由基在溃疡性结肠炎发病机制中的作用已成为研究的重要课题. NO是一种相对稳定的气体自由基，由结构型(cNOS)和诱生型(iNOS)催化L-精氨酸所生成，各种NOS异构体产生的NO可能参与调节不同的炎症反应过程[9]. 研究发现iNOS抑制剂可加重急性肠道炎症[10]; 外源性NO参与减少白细胞募集和促炎性因子的释放[11]; 应激时NO减少可能导致肠道运动障碍和黏膜受损[12]，提示NO的防御功能[13-14]. 我们观察到，rhITF能提高iNOS mRNA表达，增加NO含量，能减轻黏膜炎症反应，与有些学者的研究结果相近[15]，我们认为NO可能通过调节肠道微血管通透性，维持生理性的血管张力，抑制血小板聚集和白细胞黏附，与PGE联合作用等机制保护肠黏膜，但又与以往的一些研究结果矛盾，这些结果表明NO能影响多种免疫活性物质的合成和分泌，能够激活和放大免疫/炎症反应，形成瀑布效应，损伤抗氧化物酶等，从而加重炎症和组织损伤[14,16-18]. 此外，我们未观察到rhITF能明显减少MDA和提高SOD的含量，提示重组肠三叶因子的黏膜保护作用可能与MDA和SOD关系不大，但仍需要进一步研究. 总之，我们发现rhITF能减轻肠黏膜炎症反应，增强iNOS表达从而增加NO含量，可能对于提高肠黏膜防御能力有积极的作用.

4 参考文献

1 Wong WM, Poulsom R, Wright NA. Trefoil peptides. *Gut* 1999;44:890-895

2 卢雅丕, 任建林. 三叶因子家族研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:2019-2021

3 邓长生, 夏冰, 陈德基, 周燕, 龚玲玲, 高志清. 超氧化物歧化酶对大鼠乙酸性结肠炎黏膜的保护作用. 中国病理生理杂志 1994;10:23-25

4 Millar AD, Rampton DS, Chander CL, Claxson AW, Blades S, Coumbe A, Panetta J, Morris CJ, Blake DR. Evaluating the antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut* 1996;39:407-415

5 Thim L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest* 2002;32:519-527

6 Podolsky DK. Mechanisms of regulatory peptide action in the gastrointestinal tract:trefoil peptides. *J Gastroenterol* 2000;35(Suppl 12):69-74

7 Hahm KB, Im YH, Parks TW, Park SH, Markowitz S, Jung HY, Green J, Kim SJ. Loss of transforming growth factor beta signaling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;49:190-198

8 Tran CP, Cook GA, Yeomans ND, Thim L, Giraud AS. Trefoil peptide TFF2(spasmolytic polypeptide)potently accelerates healing and reduces inflammation in a rat model of colitis. *Gut* 1999;44:636-642

9 Beck PL, Xavier R, Wong J, Ezedi I, Mashimo H, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK, Podolsky DK. Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G137-147

10 Dikopoulos N, Nussler AK, Liptay S, Bachem M, Reinshagen M, Stiegler M, Schmid RM, Adler G, Weidenbach H. Inhibition of nitric oxide synthesis by aminoguanidine increases intestinal damage in the acute phase of rat TNB-colitis. *Eur J Clin Invest* 2001;31:234-239

11 Salas A, Gironella M, Salas A, Soriano A, Sans M, Iovanna J, Pique JM, Panes J. Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Lab Invest* 2002;82:597-607

12 Takahashi A, Tomomasa T, Kaneko H, Watanabe T, Tabata M, Morikawa H, Tsuchida Y, Kuwano H. Intestinal motility in an in vivo rat model of intestinal ischemia-reperfusion with special reference to the effects of nitric oxide on the motility changes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33:283-288

13 Cross RK, Wilson KT. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:179-189

14 Rumi G, Tsubouchi R, Nishio H, Kato S, Mozsik G, Takeuchi K. Dual role of endogenous nitric oxide in development of dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2004;55:823-836

15 Tan XD, Liu QP, Hsueh W, Chen YH, Chang H, Gonzalez-Crussi F. Intestinal trefoil factor binds to intestinal epithelial cells and induces nitric oxide production:priming and enhancing effects of mucin. *Biochem J* 1999;338:(Pt3)745-751

16 Yoshida Y, Iwai A, Itoh K, Tanaka M, Kato S, Hokari R, Miyahara T, Koyama H, Miura S, Kobayashi M. Role of inducible nitric oxide synthase in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14(Suppl 1):26-32

17 Krieglstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen:divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 2001;194:1207-1218

18 Potoka DA, Nadler EP, Upperman JS, Ford HR. Role of nitric oxide and peroxynitrite in gut barrier failure. *World J Surg* 2002;26:806-811

编辑 张海宁

·临床经验·

高效毛细管电泳分离氨基酸对肝癌肝硬化的诊断价值

王跃国, 王惠民, 鞠少卿, 王忠慧, 宋红伟, 李 丽

王跃国, 王惠民, 鞠少卿, 王忠慧, 宋红伟, 李丽, 江苏省南通大学附属医院检验医学中心 江苏省南通市 226001
项目负责人: 王跃国, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 江苏省南通大学附属医院检验医学中心. jsq814@hotmail.com
电话: 0513-5052103 传真: 0513-5052102
收稿日期: 2004-11-09 接受日期: 2004-12-08

摘要

目的: 建立高效毛细管电泳分离氨基酸的方法探讨肝癌肝硬化患者血清氨基酸变化.

方法: 用毛细管电泳法对17种常见氨基酸的2，4-二硝基氟苯(DNFB)衍生物进行了分离研究，优化缓冲液浓度、pH、有机溶剂及表面活性剂对分离影响的条件，对正常人，肝癌及肝硬化患者各20例的血浆游离氨基酸进行测定.

结果: 在优化条件下，17种氨基酸除亮氨酸，异亮氨酸外均达到基线分离.9 min内分离18种氨基酸，线性在20-1 000 μmol/L范围，回收率为77.5-113.3%，批内精密度2.6-11.4%，批间精密度5.8-19.7%.肝硬化组酪氨酸、丝氨酸、色氨酸明显升高，丙氨酸明显下降;肝癌组酪氨酸、半胱氨酸、缬氨酸明显升高，脯氨酸明显下降.

结论: 以浓度为30 mmol/L pH9.9的硼砂溶液含150 g/L异丙醇为运行缓冲液，分离氨基酸DNFB衍生物效果最佳，分离时间30 min，出峰17个.毛细管电泳测定血浆游离氨基酸对肝癌肝硬化诊断和治疗有一定指导意义.

王跃国, 王惠民, 鞠少卿, 王忠慧, 宋红伟, 李丽. 高效毛细管电泳分离氨基酸对肝癌肝硬化的诊断价值. 世界华人消化杂志 2005;13(3):406-408
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/406.asp

0 引言

氨基酸测定对代谢性疾病、肾病、肝病的诊断和治疗具有重要的价值[1-4]，在评价患者营养状况方面亦受到广泛重视[5]. 毛细管电泳(CE)具有高效、快速、灵敏、低耗等优点，很快被用于氨基酸的分析[6-7]. 组成人体蛋白质的20种氨基酸多数没有紫外吸收峰，不产生荧光，一般需要衍生. 我们利用毛细管电泳检测2，4-二硝基氟苯衍生的氨基酸在360 nm波长处的吸收谱，探讨了缓冲液浓度、pH、有机溶剂及表面活性剂对其分离的影响. 在优化条件下，17种氨基酸除亮氨酸、异亮氨酸外均达到基线分离. 对肝癌肝硬化患者的血浆氨基酸进行检测，并与正常人比较如下.

1 材料和方法

1.1 材料 高效毛细管电泳仪:P/ACE™ MDQ配置二极管阵列(PDA)检测器，美国Beckman-Coulter公司;pH计:PHS-3TC型，上海天达仪器有限公司;石英毛细管:内径75 μm，总长度60 cm，有效长度50 cm，河北永年光导纤维厂生产. 氨基酸(甘氨酸和其他19种L-型氨基酸)标准物，Sigma公司生产;甲醇和乙腈(色谱纯)、乙二醇(上海国药集团化学试剂公司);硼砂、氢氧化钠、异丙醇、吐温20、吐温80(上海化学试剂厂);十六烷基三甲基溴化铵(天津化学试剂厂);TritonX-100、NP40(进口Fluka公司);Brij35(进口Koch-Light，批号:ML0553/01);2，4-二硝基氟苯(江苏省吴江市青云精细化工厂);未特别注出者均为分析纯. 50 mmol/L pH 9.5硼砂缓冲液;20，30，50 mmol/L pH 9.8硼砂缓冲液，30 mmol/L pH 9.3-10.1硼砂缓冲液均自配. 原发性肝癌患者20例，肝硬化患者20例，均为南通大学附属医院住院确诊患者，其中男24例，女16例，平均年龄50岁. 正常对照组20例，均为献血员，男11例，女9例，平均年龄27岁. 取空腹血液2 mL，离心后取血清0.5 mL，加乙腈0.5 mL，混匀，15 000 r/min离心10 min，取上清液备用. 不能及时分析的样品置-20℃冷冻保存.

1.2 方法 取2 mL的Eppendorf管，加50 mmol/L pH 9.5硼砂缓冲液0.5 mL，乙腈0.5 mL，氨基酸标准液0.5 mL，DNFB10 μL，振荡混匀，置50℃水浴40 min[8]. 运行缓冲液冲洗毛细管，275.6 kPa恒压2 min;3.45 kPa进样5 s;28 kV恒电压分离;采集360 nm波长下吸收谱图.

2 结果

我们把pH 9.8硼砂缓冲液配成20，30，50 mmol/L三个浓度作为运行缓冲液进行分离. 研究表明，在相同的pH条件下，从分离和峰形综合考虑，本实验选择30 mmol/L硼砂作运行缓冲液. 缓冲液pH值是控制物质解离程度进而影响其迁移行为的关键因素之一. 在pH 9.3-10.1的范围内详细考察分离度和迁移行为的变化，发现分离效果逐渐改善，pH 9.9时变化较明显，部分重叠峰有分开的趋势，因此最佳pH为9.9. 用甲醇、乙腈、乙二醇对DNFB-氨基酸衍生物分离选择性进行研究，发现没有明显作用，而异丙醇却对DNFB-氨基酸衍生物的分离选择性有一定的影响，浓度为150 g/L时，出峰17个，而且分析窗口也扩大了. 我们也试用两种有机溶剂同时加入作为运行缓冲液，也不能改善其分离选择性. 30 mmol/L pH 9.9硼砂溶液:异丙醇 = 85∶15(V/V)的分离效果(图1). 采用Brij35，Tween20，Tween80，TritonX-100，NP40，十六烷基三甲基溴化铵等表面活性剂作为添加剂进行实

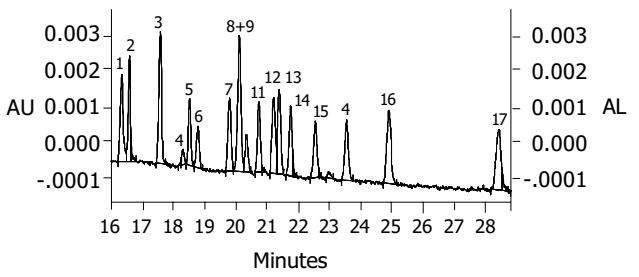


图1 异丙醇对分离的影响. 1: 酪氨酸 Tyr; 2: 组氨酸 His; 3: 赖氨酸 Lys; 4: 丝氨酸 Ser; 5: 色氨酸 Trp; 6: 半胱氨酸 Cys; 7: 苯丙氨酸 Phe; 8: 亮氨酸 Leu; 9: 异亮氨酸 Ile; 10: 谷氨酰胺 Gln; 11: 甲硫氨酸 Met; 12: 缬氨酸 Val; 13: 苏氨酸 Thr; 14: 天冬酰胺 Asn; 15: 脯氨酸 Pro; 16: 丙氨酸 Ala; 17: 甘氨酸 Gly.

验. 实验表明，Brij35 和Tween80 虽能缩短分离时间，但不能提高分离度，峰的个数无改善;Tween20 既不能缩短分离时间，也不能提高分离度，而且峰形不佳;NP40 和TritonX-100 虽可缩短分离时间，但对氨基酸分离起负作用，峰个数减少，峰形也不佳;十六烷基三甲基溴化铵加入后，无氨基酸吸收峰，考虑其为阳离子表面活性剂，可能改变电渗方向，故用反向电场再试，仍无氨基酸特异吸收峰. 总之，表面活性剂对DNFB- 氨基酸衍生物的分离无明显改善作用. 将20 种氨基酸标准液稀释成20，30，50，100，200，400，500，800和1 000 μmol/L 9 个不同浓度，以氨基酸浓度(μmol/L)为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，根据待测样品的峰面积计算得样品的氨基酸含量. 将18 种氨基酸标准液，精氨酸(Arg)、酪氨酸(Tyr)、赖氨酸(Lys)、半胱氨酸(Cys)、色氨酸(Trp)、组氨酸(His)、苯丙氨酸(Phe)、异亮氨酸(Ile)、亮氨酸(Leu)蛋氨酸(Met)、缬氨酸(Val)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、脯氨酸(Pro)、丙氨酸(Ala)、甘氨酸(Gly)、天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)各为100 μmol/L，进行衍生化反应，然后电泳分离. 在9min 内可分离出15 个峰，其中12 种氨基酸可完全分离(图2).

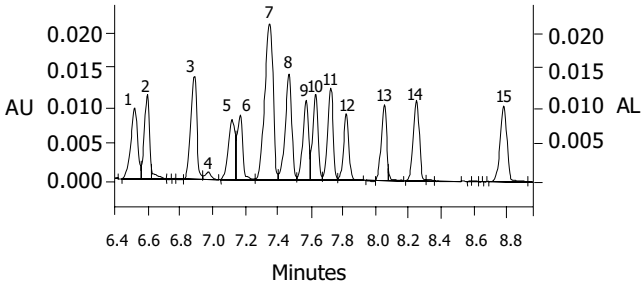


图2 氨基酸标准混合液电泳图谱. 1: Try; 2: His; 3: Lys; 4: Ser; 5: Cys; 6: Tyr; 7: Phe+Ile+Leu; 8: Met+Gln; 9: Val; 10: Thr; 11: Asn; 12: Pro; 13: Ser; 14: Ala; 15:Gly.

取一份正常人血清标本，进行批内和批间精密度测定. 批内精密度测定时，同一份样本同时测12 次，作为批内精密度观察指标，其变异系数为2.6-11.4%;批间精密度测定时，每天测1 次，共6 d，作为批间精密度观察指标，其变异系数为5.8-19.7%. 将20 种氨基酸标准液稀释成20，30，50，100，200，400，500，800和1 000 μmol/L 几个不同浓度，测定后进行线性回归，其相关系数 r = 0.938-0.954. 表明18 种氨基酸在20-1 000 μmol/L 范围内线性良好. 人血清标本经乙腈去蛋白衍生化反应后，直接进样分析. 可知，血清中其他成分对所要测定的氨基酸无明显的干扰. 取一份正常人血清标本，分别加入40 μmol/L 和360 μmol/L 两种浓度的氨基酸标准液，测得平均回收率为95.4%. 对20 名健康人血清中12 种游离氨基酸进行参考值调查，其中男性11 例，年龄18-45 岁;女性9 例，年龄18-42 岁. 血清氨基酸含量见表1. 结果采用 t 检验进行统计学处理，发现肝硬化组酪氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、丝氨酸明显升高，丙氨酸明显下降; 肝癌组酪氨酸、赖氨酸、色氨酸、缬氨酸、苏氨酸、天冬酰胺明显升高，脯氨酸明显下降(P<0.05).

表1 肝癌肝硬化患者12 种血清氨基酸测定结果(mean±SD，μmol/L，n = 20)

氨基酸	正常人	肝硬化	肝癌
酪氨酸	30.8±8.6	67.4±40.5[a]	56.8±23.0[a]
组氨酸	48.2±11.8	54.2±27.3	49.2±16.6
赖氨酸	97.6±30.2	97.8±28.2	127.0±40.1[a]
丝氨酸	111.0±35.6	130.2±31.5[a]	136.2±39.5
半胱氨酸	161.4±54.0	149.6±67.8	208.0±304.0
色氨酸	17.8±8.6	33.6±20.8[a]	45.8±14.2[a]
缬氨酸	137.2±41.4	138.0±31.4	187.6±32.3[a]
苏氨酸	98.0±29.2	110.0±41.6	115.6±31.7[a]
天冬酰胺	34.6±13.5	55.2±22.2[a]	51.8±22.6[a]
脯氨酸	121.4±47.1	126.8±54.8	105.6±30.8[a]
丙氨酸	227.4±67.8	160.4±57.0[a]	206.8±48.9
甘氨酸	216.6±67.8	228.4±80.3	212.0±38.2

[a]P<0.05 *vs*正常人.

3 讨论

氨基酸传统分析方法为离子交换色谱法和反相高效液相色谱法，这些方法操作繁琐，成本高费时. 高效毛细管电泳法是近几年发展起来的新技术，其分离效能高快速且试剂消耗低. Shen *et al*[8] 成功分离了16 种DNFB 衍生的氨基酸标准品并用此条件定量血清中16 种氨基酸的含量. 但组成人体蛋白质的氨基酸有20 种，仅分离16 种不能用于血清游离氨基酸定量. 我们用20 种氨基酸标准品，衍生物同样为DNFB. 从缓冲液浓度，pH，添加剂等几个方面观察其对氨基酸分离的影响，pH>9 的缓冲溶液分离氨基酸较容易，硼砂是此范围中最常用的缓冲溶液，我们比较了硼砂缓冲溶液与硼酸钠缓冲液[8]作为衍生缓冲液发现前者效果好，不使用添加剂情况下增加一个峰，但硼砂溶液溶解度低，可选浓度范围较小，随着缓冲液浓度增加，电流的增加，焦耳热增多，管内形成温度梯

度，影响分离结果；相同的pH条件下，从分离和峰形综合考虑，本实验选择30 mmol/L硼砂作运行缓冲液. pH对结果影响较大，在pH9.3-10.1的范围，分离效果逐渐改善，到pH 9.9时变化较明显. 我们选择了一些有机溶剂和表面活性剂，除150 g/L异丙醇，分离效果未见改善. 因此，用30 mmol/LpH9.9的硼砂溶液，150 g/L异丙醇作添加剂可成功分离17种氨基酸，缬氨酸和三种芳香族氨基酸基线分离，亮氨酸、异亮氨酸与其他成分基线分离，可准确定量15种氨基酸和支芳比，基本满足临床需要. 用18种氨基酸标准液进行电泳，其中12种氨基酸可达到完全分离，得到15个峰，苯丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸和谷氨酰胺无法单独分离，另外，丝氨酸出现两个峰. 我们采用的2，4-二硝基氟苯，最初被用来进行氨基酸的测序，该法稳定、摩尔吸光系数大，且能与二级氨基反应，其不足之处是与谷氨酸的衍生化反应较慢[8]，且衍生化反应容易使样品受到污染. 鉴于此，人们一直在寻找无需衍生、简易的氨基酸分析方法. 作为经典的判断肝病氨基酸代谢异常的指标，血清支链氨基酸与芳香氨基酸之比(BCAA/AAA)已被广泛应用. 肝病时血浆氨基酸变化主要表现为支链氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸又称BCAA)降低，芳香族氨基酸(苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸又称AAA)升高，支/芳比降低[9-10]. 在我们的研究中，支持这一结论. 在肝硬化组丙氨酸明显下降；肝癌组苏氨酸明显升高，脯氨酸明显下降，缬氨酸有代偿性升高.

4 参考文献

1 Ninomiya T, Yoon S, Sugano M, Kumon Y, Seo Y, Shimizu K, Nagano H, Kasuga M, Hayashi Y. Improvement of molar ratio of branched-chain amino acids to tyrosine(BTR)associated with liver fibrosis in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha. *Dig Dis Sci* 1999;44:1027-1033

2 Suzuki H, Mamata Y, Mizuno H, Tominaga T, Suga M, Suemori S, Sato A, Suzuki M. Influence of alcohol on branched-chain amino acid/tyrosine molar ratio in patients with cirrhosis. *Alcohol Clini Exp Res* 1998;22(3 Suppl):137S-140S

3 Marchesini G, Bianchi G, Rossi B, Brizi M, Melchionda N. Nutritional treatment with branched-chain amino acids in advanced liver cirrhosis. *J Gastroenterol* 2000;35(Suppl 12):7-12

4 Kawamura-Yasui N, Kaito M, Nakagawa N, Fujita N, Ikoma J, Gabazza EC, Watanabe S, Adachi Y. Evaluating response to nutritional therapy using the branched-chain amino acid/tyrosine ratio in patients with chronic liver disease. *J Clin Lab Anal* 1999;13:31-34

5 Barbul A. Arginine:biochemistry, physiology, and therapeutic implications.(review No abstract). *J Parenter Enteral Nutr* 1986;10:227-238

6 Yu M, Dovichi NJ. Attomole amino acid determination by capillary zone electrophoresis with thermooptical absorbance detection. *Anal Chem* 1989;61:37-40

7 Kuhr WG, Yeung ES. Indirect fluorescence detection of native amino acids in capillary zone electrophoresis. *Anal Chem* 1988;60:1832-1834

8 She Z, Sun Z, Wu L, Wu K, Sun S, Huang Z. Rapid method for the determination of amino acids in serum by capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* 2002;979:227-232

9 沈同, 王镜岩, 赵邦悌. 生物化学. 第二版. 北京:高等教育出版社, 1990:116-117

10 Kano T, Nagaki M, Takahashi T, Ohnishi H, Saitoh K, Kimura K, Muto Y. Plasma free amino acid pattern in chronic hepatitis as a sensitive and prognostic index. *Gastroenterol Jpn* 1991;26:344-349

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·临床经验·

胃癌高发区人群CagA$^+$幽门螺杆菌与胃黏膜病变的关系

卢启明, 张丽萍, 姜 瑞, 张岫兰, 李淑兰, 曹 萍, 石丽清, 陈 翔, 薛群基

卢启明, 张丽萍, 姜瑞, 张岫兰, 李淑兰, 曹萍, 石丽清, 陈翔, 甘肃省人民医院消化科 甘肃省兰州市 730000
薛群基, 中国科学院兰州化学物理研究所 甘肃省兰州市 730000
项目负责人: 卢启明, 730000, 甘肃省兰州市, 甘肃省人民医院消化科. luqim@163.com
收稿日期: 2004-11-16 接受日期: 2004-12-16

摘要

目的: 探讨胃癌高发区CagA$^+$*H pylori*菌株与胃黏膜病变的相关性.

方法: 对216例*H pylori*阳性的普通人群，行胃镜检查及胃黏膜HE染色明确胃黏膜病理学改变，同时用蛋白芯片技术检测*H pylori*的CagA抗体.

结果: 在216例标本中，浅表性胃炎23例，萎缩性胃炎189例，中度以上萎缩性胃炎164例，占75.93%(164/216)，中

度以上肠上皮化生(IM)31例，占14.81%(31/216)，中度以上异型增生33例，占15.28%(33/216)，胃癌4例.萎缩性胃炎、中度以上肠上皮化生和异型增生组CagA$^+$*H pylori*阳性率均较浅表性胃炎组显著升高(71.43%，67.74%，72.73% *vs* 17.39%，$P<0.05$).

结论: CagA$^+$*H pylori*具有较强的促进胃黏膜萎缩、肠型化生和异型增生作用，感染CagA$^+$*H pylori*可能是胃癌发生的危险因素之一.

卢启明,张丽萍,姜 瑞,张岫兰,李淑兰,曹 萍,石丽清,陈 翔,薛群基.胃癌高发区人群CagA$^+$幽门螺杆菌与胃黏膜病变的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(3):408-410
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/408.asp

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*，*H pylori*)感染与慢性胃炎、消化性溃疡及胃癌的发生密切相关，我国人群中*H pylori*感染率较高，发展为相关胃病的仍是少数，许多人感染*H pylori*可终生无症状，仅小部分*H pylori*感染者最终发展为胃癌.研究认为*H pylori*的毒力基因CagA与*H pylori*的致病密切相关[1-2]. CagA$^+$*H pylori*也是癌前病变萎缩性胃炎、肠上皮化生和异型增生的重要病因和促进因子，可增加胃癌发生的危险性[3-4]，但有血清流行病学研究得出不同的结论.在我国CagA$^+$*H pylori*菌株占绝大部分，未发现CagA$^+$*H pylori*与特定的疾病存在相关性[5].我们于2003年在胃癌高发区甘肃省河西走廊天祝县的*H pylori*感染流行病学调查中，开展了血清*H pylori*-CagA抗体测定及胃黏膜组织病理学检查，旨在探讨CagA$^+$*H pylori*感染与胃黏膜肠上皮化生、异型增生及胃癌发生的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 选天祝县县城及近郊的两个乡镇行*H pylori*感染的流行病学调研，所有人群均行问卷调查、^{14}C-UBT和测定*H pylori*-IgG抗体，共调查1 495人.^{14}C-UBT和*H pylori*-IgG均阳性者，即纳入本研究范围.入选病例共216例，其中男104例，女112例，平均年龄41.6岁.胃镜检查时距幽门5 cm以内钳取胃黏膜组织，40 g/L中性甲醛固定，石蜡包埋，切片行嗜伊红染色观察胃黏膜病理学改变，根据悉尼系统对胃黏膜进行组织学分型.

1.2 方法 血清金标渗滤斑点法测定*H pylori*-IgG抗体.抗-CagA抗体测定:采用深圳欣康基因数码科技有限公司生产的蛋白芯片技术，将*H pylori*特异性的五种蛋白(CagA、VacA、Ure、RdxA及*H pylori*s60)以微矩阵形成固定于硝酸纤维膜上，待检血清中的相应抗体与之结合形成抗原抗体复合物，再用胶体金标记后形成肉眼可见的红色斑点，用生物芯片阅读仪可对血清中的抗体进行分析.

统计学处理 采用SPSS10.0软件包处理数据，两个或两个以上的样本率比较采用χ^2检验，$P<0.05$为有显著性差异

2 结果

2.1 *H pylori*感染率 ^{14}C-UBT或*H pylori*-IgG阳性人数1106例，*H pylori*总感染率74.0%(1106/1495)，其中5-12岁儿童*H pylori*感染率为31.9%，13-19岁*H pylori*感染率达62.2%，20-39岁年龄组感染率最高，为75.0%，到60-70岁年龄组时降至67.7%.

2.2 胃镜检查结果 浅表性胃炎(CSG)124例，萎缩性胃炎(CAG)63例，胃溃疡10例，十二指肠溃疡15例，胃癌(GC)4例.

2.3 胃黏膜HE染色病理学检查结果 浅表性胃炎23例，萎缩性胃炎189例，胃腺癌4例，其中中度以上萎缩性胃炎164例，占75.93%(164/216)，肠上皮化生(IM)40例，中度以上31例，占14.35%(31/216)，异型增生(Dys)57例，中度以上33例，占15.28%(33/216).

2.4 不同年龄组胃黏膜组织病理学检查结果 CSG和CAG组在各年龄组均无差异($P>0.05$)，IM在各年龄组均有差异($P<0.01$)，Dys组在各年龄组均有差异($P<0.05$)，随着年龄增长肠上皮化生、异型增生及胃癌检出率明显上升(表1).

2.5 *H pylori*-CagA$^+$检出率 CagA$^+$总检出率为66.20%(143/216)，不同胃黏膜病变检出情况(表2)，其中萎缩性胃炎、中度以上肠化生、中度以上异型增生组CagA$^+$*H pylori*感染率均较浅表性胃炎组明显升高($P<0.05$)，4例胃癌CagA$^+$*H pylori*阳性率为100%.

表2 不同胃黏膜病变CagA$^+$*H pylori*检出结果

胃黏膜类型	*n*(%)	CagA$^+$*H pylori*(*n*)	CagA$^+$*H pylori*(%)
浅表性胃炎	23(10.65)	4	17.39
萎缩性胃炎	189(87.5)	135	71.43^a
中度以上肠化生	31(14.35)	21	67.74^c
中度以上异型增生	33(15.28)	24	72.73^e

$^aP<0.05$，$^cP<0.05$，$^eP<0.05$ *vs*浅表性胃炎.

3 讨论

*H pylori*有多种类型菌株，感染后能否致病，除了与宿

表1 不同年龄组胃黏膜病变检出率

年龄	*n*	CSG(%)	CAG(%)	IM(%)	Dys(%)	GC(%)
20-29	15	3(20.0)	12(80.0)	1(6.67)	2(13.33)	0(0)
30-39	67	10(14.92)	53(79.10)	6(8.96)	8(11.94)	0(0)
40-49	52	6(11.54)	43(82.70)	7(13.46)	13(25.0)	0(0)
50-59	48	7(14.58)	42(87.50)	16(33.33)	16(33.33)	1(2.08)
60以上	19	0(0)	18(60.0)	10(33.33)	10(33.33)	3(15.79)

主本身的遗传学因素及环境因素有关外，主要取决于*H pylori*产毒菌株[6]*H pylori*的两个毒力基因，即CagA基因和VacA基因，分别表达两个毒力因子，即120-140 ku的细胞毒素相关蛋白(CagA)和87 ku的细胞空泡毒素(VacA)，这两种毒力型菌株具有很强的致病毒力，其产生的细胞毒素，能导致机体产生炎症及免疫反应，从而产生胃黏膜及机体的损害.

一般认为，胃癌的发生是一个多因素参与的多步骤、多阶段的演变过程，即从慢性胃炎经历萎缩、肠上皮化生、异型增生，最终发展为癌.*H pylori*被认为是胃癌发生的启动因子和促进因子.王冠庭[7]报道了*H pylori*阳性慢性胃病患者149例，其中CagA和/或VacA*H pylori*阳性者75例，胃镜病检证实CAG35例，肠上皮化生25例，异型增生10例，随访中2例在癌前病变的基础上发生癌变，占3%;74例*H pylori*阳性而CagA/VacA毒力型菌株阴性组，胃镜病检大多为CSG或CSG+CAG，无1例异型增生和消化性溃疡发生.同时报道的135例*H pylori*阴性慢性胃病对照组经胃镜及活检证实，多为轻度CSG，无1例伴有肠上皮化生和异型增生，临床症状轻微.研究结果说明，*H pylori*毒力株感染可引起慢性胃黏膜炎症，引起胃黏膜萎缩、肠上皮化生、异型增生和胃癌，*H pylori*感染导致胃癌主要在早期阶段起作用.Parsonnet *et al*[8]研究发现，感染*H pylori*的胃癌患者CagA抗体阳性率为77.8%，感染$CagA^+$*H pylori*的患者发生胃癌的风险性是对照组的5.8倍，认为$CagA^+$*H pylori*与胃癌的发生明显相关.

本次*H pylori*流行病学调查，天祝县*H pylori*感染率高达74.0%(1106/1495)，这与当地地处干旱高寒地区，卫生状况和生活条件较差相关.$CagA^+$*H pylori*总阳性率为66.20%(143/216)，经胃镜病检证实为萎缩性胃炎、中度以上肠上皮化生和异型增生*H pylori*阳性的病例中，$CagA^+$*H pylori*阳性率分别为71.43%、67.74%、72.73%，而浅表性胃炎病例$CagA^+$*H pylori*阳性率仅17.39%，4例胃癌$CagA^+$*H pylori*阳性率为100%，表明$CagA^+$*H pylori*菌株可促进胃黏膜萎缩、肠上皮化生和异型增生癌前病变的发生，以上研究可解释$CagA^+$*H pylori*菌株感染进一步增加了*H pylori*致癌的危险性，$CagA^+$*H pylori*可能与胃癌的发生发展密切相关.

在我们的研究中，216例*H pylori*阳性的胃镜组织病理学检查中，萎缩性胃炎189例，占87.5%，中度以上肠化生31例，占14.35%，中度以上异型增生33例，占15.28%，胃癌检出率1.85%(4/216).在20-29岁年龄组萎缩性胃炎检出率高达80%，异型增生检出率13.33%，到40-49岁年龄组异型增生检出率达25.0%，50-70岁年龄组肠上皮化生和异型增生检出率达33.33%.我们的流行病学调查结果显示天祝县儿童5-12岁*H pylori*感染率为31.9%，13-19岁*H pylori*感染率高达62.2%.由于少年时期*H pylori*的高感染率，青年时期萎缩性胃炎及异型增生发生率就很高，随着年龄增长，肠上皮化生和异型增生癌前病变及胃癌的发生率明显增加，这符合*H pylori*感染后长期的慢性炎症易导致胃黏膜萎缩→肠化→异增生→胃癌这一病变模式，也与*H pylori*感染后主要作用在癌变的起始阶段的观点一致[9-11].Blaser *et al*[12]研究结果认为，感染*H pylori*的年龄越早，发生胃癌的危险性越大.在发展中国家，多数人获得感染的年龄在童年时期，因此感染期很长，30-40 a的持续炎症可导致胃黏膜组织完整性受损，引起胃体胃炎、萎缩、减少酸分泌，如果有合适的致癌协同因素就会发展为胃癌.

总之，$CagA^+$*H pylori*是*H pylori*的高毒力株，在胃癌高发区甘肃省河西走廊天祝县严重胃黏膜病变及胃癌的发生可能与$CagA^+$*H pylori*有关，$CagA^+$*H pylori*促癌变的详细机制尚不清楚.有文献报道认为可能与Pic基因及NF-kappaB有关[13].另报道[14-15] *H pylori*的CagA促癌变的原因之一，可能是通过癌基因(*bcl*-2)和抑癌基因(p53)蛋白表达异常使细胞增生与凋亡失衡，导致细胞恶变形成胃癌.

4 参考文献

1 Carratu R, Iuliano D, Ioverne MR, Ferraraccio F, Esposito P, Russo MI, Montella F, Abbate G, Tuffano MA. Peptic ulcer occurrence in follow-up of chronic gastritis in patients with treated and not eradicated CagA-positive *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci* 2001;46:581-586

2 Martin Guerrero JM, Hergueta Delgado P, Esteban Carretero J, Romero Castro R, Pellicer Bautista FJ, Herrerias Gutierrez JM. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* CagA-positive strains:gastroduodenal peptic lesions marker. *Rev Esp Enferm Dig* 2000;92:160-173

3 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 藤小春. 幽门螺杆菌感染与胃癌前病变演化的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:912-915

4 Shimoyama T, Fukuda S, Tanaka M, Mikami T, Munakata A, Crabtree JE. CagA seropositivity associated with development of gastric cancer in a Janpanese population. *J Clin Pathol* 1998;51:225-228

5 Pan ZJ, Van der Hulst RW, Feller M, Xiao SD, Tytgat GN, Dabkert J, van der Ende A. Equally high prevalence of infection with CagA-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. *J Clin Microbiol* 1997;35:1344-1347

6 潘秀珍. 幽门螺杆菌的毒力研究. 华人消化杂志 1998;6(特刊7):20-21

7 王冠庭. 幽门螺杆菌产毒菌株CagA/VacA与慢性胃病的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:1335-1337

8 Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997;40:297-301

9 Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, Lu XZ, Zhang XY, Zhao ZQ. Multiple genetic alternation and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: *Helicobacter pylori* infection, histological types and staging. *World J Gastroenterology* 2000;6:848-854

10 郭长青, 王玉萍, 刘国永, 马社旺, 丁贯一, 李继昌. 胃黏膜癌变过程中幽门螺杆菌感染与p53, C-erb-2基因表达的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:313-315

11 全俊, 范学工. 幽门螺杆菌感染与胃癌发生的实验研究进展, 世界华人消化杂志 1999;7:1068-1069

12 Blaser MJ, Chyou PH, Nomura A. Age at establishment of *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma, gastric ulcer, and duodenal ulcer risk. *Cancer Res* 1995;55:562-565

13 Munzenmaier A, Pahl HL, Covacei A, Bereswill S, Baeuerle PA, Kist M. *Helicobacter pylori* activates transcription factor NF-KB in CATO-III celles. *Gut* 1996;39:55

14 夏华向, 张贵水. 细胞凋亡与增生在幽门螺杆菌感染致胃癌中的重要作用, 世界华人消化杂志 1999;7:740-742

编辑 张海宁

·临床经验·

肠易激综合征临床筛查312例

江汉龙, 钟世顺, 张振书

江汉龙, 钟世顺, 中国人民解放军第四七六医院消化内科 福建省福州市 350002
张振书, 广州南方医院消化内科 广东省广州市 510515
项目负责人: 江汉龙, 350002, 福建省福州市洪山桥, 中国人民解放军第四七六医院消化内科. jianghl476@sina.com
电话: 0591-28376636
收稿日期: 2004-11-29 接受日期: 2004-12-21

摘要

目的: 探讨肠易激综合征(IBS)患者临床诊断的筛查方案.

方法: 对南方医院1990-2002年住院的312例IBS患者的临床检查资料进行回顾性分析.

结果: 312例IBS患者表现腹痛239例(76.6%), 腹泻146例(46.8%), 大便混有黏液125例(40.1%), 有神经精神症状138例(44.2%).X线钡灌肠检查63例均提示肠蠕动活跃、排空增快, 阳性率100%;全部患者均行结肠镜检查, 发现肠管痉挛、肠蠕动活跃、肠黏液增多86例, 结肠息肉23例, 盲肠憩室1例, 阳性率35.4%;胃镜检查238例, 发现慢性胃炎89例, 十二指肠溃疡28例, 十二指肠息肉2例, 阳性率50%;而腹部及盆腔CT检查43例均无异常.115例患者行肠道菌群分析, 46例(40%)呈I度菌群失调, 42例(36.5%)呈II度菌群失调.

结论: 除常规检查外, X线钡灌肠、结肠镜、胃镜、腹部或盆腔B超检查可作为IBS筛查常用的影像学方法, 肠道菌群分析可列入常规检查, 有必要进行心理因素的测评, CT可不作为常规检查.

江汉龙, 钟世顺, 张振书. 肠易激综合征临床筛查312例. 世界华人消化杂志 2005;13(3):411-413
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/411.asp

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是以腹痛或腹部不适伴大便异常为特征的一种功能性肠病. 由于其缺乏确切的形态学和生化异常改变, 病理生理机制也不大明确, 因而对其诊断缺乏统一的标准[1]. 我们回顾性地分析了南方医院1990-2002年以来收治住院的312例IBS患者的临床检查资料, 对IBS的临床筛查方案进行初步探讨.

1 材料与方法

1.1 材料 本组312例IBS患者中男139例, 女173例, 男女之比约为1∶1.24;年龄10-81岁, 平均43.9岁. 10-30岁组62例, 30-50岁组147例, 50-70岁组99例, 70岁以上4例. 病程3 mo-40 a. 全部病例均符合1986年全国慢性腹泻学术讨论会制定的肠易激综合征临床诊断标准. 312例IBS住院患者诊断排序及伴随疾病(表1).

表1 312例IBS患者住院的诊断排序及伴随疾病

IBS诊断排序及伴随疾病	n	%
IBS为第一诊断	265	84.9
单一诊断IBS	122	39.1
慢性胃炎	89	28.5
十二指肠溃疡	28	9.0
十二指肠息肉	2	0.64
盲肠憩室	1	0.32
IBS为第二诊断	47	15.1
高脂血症	9	2.88
高血压病	8	2.56
颈椎病	8	2.56
脑动脉硬化	8	2.56
更年期综合征	5	1.6
慢性支气管炎	4	1.28
慢性病毒性肝炎	4	1.28
葡萄糖6磷酸脱氢酶缺乏症	1	0.32

1.2 方法 收集南方医院1990-2002年收治住院的312例IBS患者的病历资料, 分析其临床症状及辅助检查结果, 发现阳性率较高的症状及检查方法, 以期对IBS的临床筛选检查提供有用的证据.

2 结果

2.1 临床主要症状特点 IBS患者往往有多种症状并存, 而且经常变换、反复发作. 本组312例主要临床症状特点(表2), 其中神经精神症状包括焦虑、疑病、神经过敏、神经衰弱等.

表2 312例IBS患者临床症状特点

临床主要症状	n	%
腹痛	239	76.6
下腹部痛	106	34.0
脐周痛	90	28.8
上腹部痛	43	13.8
腹泻	146	46.8
便秘或排便困难	73	23.4
大便混有黏液	125	40.1
腹胀、肛门排气增多	93	29.8
腹泻、便秘交替	36	11.5
嗳气、呕吐	23	7.4
神经精神症状	138	44.2
尿频、排尿不尽感	35	11.2

2.2 临床检查结果分析 本组312例IBS患者全部行血尿粪常规、粪潜血、粪寄生虫及血生化、血沉、心电图、胸片、腹部B超、结肠镜检查，部分患者行X线钡灌肠、胃镜、肠道菌群分析，检查异常的结果(表3). 大便细菌培养96例均未发现致病菌，血淀粉酶及脂肪酶检查45例均无异常，PPD试验86例均为阴性，免疫学及自身抗体检查67例均未发现异常，甲状腺功能检查(包括T_3、T_4、TSH、FT_3和FT_4)156例均无异常，肿瘤标志物检查(包括CEA、AFP、CA_{199}、CA_{242})138例均未发现异常，脑电图检查58例均未发现异常，腹部及盆腔CT检查43例均无异常.

表3 312例患者临床检查异常的结果分析

检查异常的结果	Total n	*n*	%
常规及生化			
血糖轻度升高(排除糖尿病)	312	1	0.32
血沉轻度升高(<30 mm/h)	312	12	3.85
粪潜血阳性	312	2	0.64
心电图			
轻度ST-T改变	312	10	3.20
逆钟向转位	312	1	0.32
左室高电压	312	4	1.28
腹部B超			
脂肪肝	312	12	3.85
肝内胆管小结石	312	18	5.77
胆囊小息肉	312	5	1.60
结肠镜			
肠管痉挛、蠕动活跃、黏液增多	312	86	27.6
结肠息肉	312	23	7.37
盲肠憩室	312	1	0.32
X线钡灌肠			
肠蠕动活跃、排空增快	63	63	100
胃镜			
慢性胃炎	238	89	37.4
十二指肠球部溃疡(H_1-S_2期)	238	28	11.8
十二指肠息肉	238	2	0.84
肠道菌群分析			
I度菌群失调	115	46	40.0
II度菌群失调	115	42	36.5

3 讨论

IBS近年来有明显增多的趋势，在消化内科门诊所处理的患者中，IBS患者已占到了三分之一[2]. IBS虽不是致死性疾病，对生活质量的影响很大[3]，与非IBS者相比，IBS患者生存质量明显下降[4]，故已引起临床重视. 本组312例IBS病例中，腹痛是最主要和最常见的症状，占239例(76.6%). 下腹部(34%)及脐周(28.8%)疼痛较常见，上腹部疼痛(13.8%)较少，上腹部疼痛可能与伴发的胃十二指肠疾病有关. 心理因素在IBS的发病中起重要作用，患者存在与精神症状相关的睡眠障碍[5]. 靖大道 *et al*[6]报道难治性IBS患者普遍存在抑郁、焦虑等情绪障碍，应用抗抑郁药治疗能显著改善IBS患者躯体和精神两方面的症状. 本组病例中138例(占44.2%)有神经精神症状，包括焦虑、疑病、神经过敏、神经衰弱等. 一般认为，患者的人格特质、精神状态、和应激性生活事件如身体或性虐待、亲人的死亡、夫妻离弃等与IBS症状的演变有关[7].

本组病例中，以IBS作为第一诊断者265例(84.9%)，伴有其他疾病143例; 另外，有47例(15.1%)不是以IBS作为第一诊断，这些患者是以其他疾病或症状为主在其他相关科室治疗. 在临床工作中，应尽可能的以器质性疾病本身解释症状，尽量避免器质性疾病与IBS共存的诊断; 只有通过有针对性的和/或特异性的检查可以肯定器质性疾病存在，而检查出的器质性疾病又不能完全解释患者腹部所有相关症状时，才可作出并存的诊断.

IBS诊断的重点是根据病史和临床特征作出初步诊断，诊断较明确者可行试验性治疗并进一步观察; 对诊断可疑和症状顽固、治疗无效者，应有选择地做一些必要的检查以排除器质性疾病. 不提倡一开始就做撒网式的检查[7]. 对年轻患者的胃肠道影像学检查应主要排除炎症性肠病; 而对老年患者，首先要除外结肠恶性肿瘤. 在本组病例中，X线钡灌肠检查63例均提示肠蠕动活跃、排空增快，阳性率100%; 结肠镜检查312例，发现肠管痉挛、肠蠕动活跃、肠黏液增多86例，结肠息肉23例，盲肠憩室1例，阳性率35.4%; 胃镜检查238例，发现慢性胃炎89例，十二指肠溃疡28例，十二指肠息肉(病理示黏膜下脂肪瘤)2例，阳性率50%; 而腹部及盆腔CT检查43例均无异常. 由此可见，X线钡灌肠检查是诊断IBS较敏感的措施，与结肠镜、胃镜、腹部或盆腔B超检查可作为IBS常用的影像学诊断方法. 腹部及盆腔CT检查阳性率低，只有在腹部或盆腔B超检查发现异常时，才有必要行CT检查等进一步明确诊断.

近年来肠道微生态在功能性胃肠道疾病中的作用日益受到重视. 有少数研究报道小肠细菌滋生与IBS的症状发作有一定联系，这部分患者在抗生素治疗后症状好转，这些研究提供了采用肠道菌群调节药物治疗IBS的可能性[8]. 本组312例IBS患者中对115例进行了肠道菌群分析，发现其中46例(40%)呈I度菌群失调，42例(36.5%)呈II度菌群失调.

我们分析南方医院近10 a来住院的IBS患者的临床资料后认为，对具有腹痛、腹泻、便秘、大便混有黏液等功能性肠病特征的患者，如体格检查无阳性发现，可初步进行血尿粪常规、粪潜血、粪细菌培养、粪寄生虫以及血生化、血沉、心电图、胸片等相关常规检查，X线钡灌肠、结肠镜、胃镜、腹部或盆腔B超检查可作为IBS筛查常用的影像学方法，肠道菌群分析可列入常规检查，有必要进行心理因素的测评，CT可不作为常规检查.

4 参考文献

1 詹丽杏, 李兆申. 肠易激综合征的诊断与治疗. 世界华人消化杂志 2001;9:1177-1179

2 尉秀清, 陈旻湖, 王锦辉, 胡品津. 广州市居民肠易激综合征及功

能性便秘的流行病学调查. 中华内科杂志 2001;40:517-520
3 Luscombe FA. Health-related quality of life and associated psychosocial factors in irritable bowel syndrome:a review. *Qual Life Res* 2000;9:161-176
4 熊理守, 陈旻湖, 王伟岸, 陈惠新, 许岸高, 胡品津. 肠易激综合征患者生存质量的评价. 中华内科杂志 2004;43:356-359
5 何剑琴, 王伟岸, 胡品津, 陈为. 肠易激综合征患者睡眠质量特征. 世界华人消化杂志 2004;12:744-747
6 靖大道, 徐敏, 陈志青, 张晶璟, 汪佩文, 蒋海飚, 周怡和, 王兴鹏. 难治性肠易激综合征患者的情绪障碍和治疗. 胃肠病学 2004;9:90-93
7 王伟岸, 潘国宗. 肠易激综合征的诊断. 新医学 2002;33:179-181
8 王伟岸, 胡品津. 益生菌和肠易激综合征. 世界华人消化杂志 2004;12:172-176

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

·临床经验·

3种肠道清洁法用于结肠镜检查与治疗的比较

施灵波, 吴清明, 瞿金娥, 毛明芝, 司玉梅, 郭 艳

施灵波, 吴清明, 瞿金娥, 毛明芝, 司玉梅, 郭艳, 郧阳医学院附属医院/十堰市太和医院消化内科 湖北省十堰市 442000
项目负责人: 施灵波, 442000, 湖北省十堰市人民南路29号, 郧阳医学院附属医院/十堰市太和医院消化内科. xulinst@sohu.com
电话: 0719-8801431
收稿日期: 2004-11-09 接受日期: 2004-11-29

摘要

目的: 比较不同肠道清洁方法在结肠镜检查与治疗前的清洁效果和不良反应.

方法: 对2061例接受结肠镜检查与治疗的患者随机分为口服电解质组(801例)、口服甘露醇组(689例)和大肠水疗组(561例)进行肠道准备，按清洁的程度分为甲级、乙级、丙级和丁级，比较肠道清洁效果和恶心、呕吐、腹痛等不良反应的发生率.

结果: 三种肠道清洁方法的清洁程度及不良反应有显著的差异性.大肠水疗组和口服电解质组的肠道清洁甲级率高于口服甘露醇组($P<0.01$)，分别为30.12%、33.95%，口服电解质组肠道清洁丁级率最高，为8.35%($P<0.01$).不良反应发生率大肠水疗组最低($P<0.01$)，仅为5.69%，而口服甘露醇组、口服电解质组分别高达20.90%、22.22%.

结论: 大肠水疗法的肠道清洁效果明显优于口服电解质液和口服甘露醇法，不良反应少.

施灵波, 吴清明, 瞿金娥, 毛明芝, 司玉梅, 郭艳. 3种肠道清洁法用于结肠镜检查与治疗的比较. 世界华人消化杂志 2005;13(3):413-414
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/413.asp

0 引言

结肠镜检查是诊断大肠疾病最有效的方法之一，随着结肠镜检查技术的不断进步，结肠镜不但广泛应用于疾病检查，而且经结肠镜的微创治疗也逐渐普及. 术前肠道准备是否彻底，直接影响检查与治疗是否能够顺利完成. 我们回顾性分析总结了近3 a进行结肠镜检查和治疗患者的病例资料，比较了三种不同术前肠道准备方法，现将结果报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2061例患者，为我科2001/01-2003/12行结肠镜检查与治疗的患者，随机分为三组，其中口服电解质组801例，男478例，女323例，平均年龄41±0.5岁;口服甘露醇组689例，男345例，女344例，平均年龄42±0.3岁;大肠水疗组例，男226例，女235例，平均年龄38±0.3岁.

1.2 方法 口服电解质液法:1 000 mL开水中加入氯化钠6.14 g，碳酸氢钠2.9 g，氯化钾0.75 g，按比例配制成复方水剂3 000 mL.在检查前2-3 h开始由患者自饮，以50-60 ml/min的速度服用.口服甘露醇法:于检查前2 h口服甘露醇250 mL，然后饮5%(W/V)糖盐水500-1 000 mL(5-10 min饮完).大肠水疗法:采用西班牙Tanscom公司生产的HC-2000大肠水疗机，由专业的技师操作，将特制的一次性肛管由肛门(进水管直径约6 mm，出水管直径约20 mm)插入直肠约5-7 cm，将经过3次过滤的自来水缓慢灌入大肠，水温控制在37-38℃，水压在1 PSI/平方吋，采用灌注测量方式进行循环冲洗，时间为40-60 min.

1.2.1 肠道清洁效果判定 由检查师在检查时判定，按其清洁的程度分为4级:(1)甲级:良好，全结肠无粪渣或仅积有少量清澈的液体;(2)乙级:较好，有少量或积有较多清澈液体，不影响进镜与观察;(3)丙级:欠佳，有较多粪便散附在肠壁上或有较多混浊粪便的液体，稍影响

进镜与观察，但有经验的术者可将肠镜送至回盲部;(4)丁级:不良，肠腔积满糊状粪便及粪水，部分患者结场镜虽可勉强通过乙状结肠和降结肠，却往往受阻于横结肠或升结肠[1].

1.2.2 不良反应的评定 由检查技师在检查过程中进行观察，根据患者明显感觉到的不适及需要对症处理的临床症状，分别记录恶心、呕吐、腹痛等发生人数.进行统计学处理，采用χ^2检验.

2 结果

三种肠道清洁方法中大肠水疗组和口服电解质组甲乙级合计率最高(表1)，分别为81.81%、77.65%.从恶心、呕吐、腹痛的不良反应发生率来看，大肠水疗组最低，仅为5.69%，而口服甘露醇组、口服电解质组分别高达20.90%、22.22%.

表1 三种肠道清洁法的效果比较(%)

组别	肠道清洁效果				不良反应		
	甲级	乙级	丙级	丁级	恶心	呕吐	腹痛
大肠水组	30.12[b]	51.69[bd]	13.01[b]	5.18[c]	3.20[bd]	1.06[bd]	1.43[d]
甘露醇组	18.14	57.62	20.03	4.21	12.05	6.82	2.03
电解质组	33.95[b]	43.70[b]	14.00[b]	8.35[a]	9.24	9.36	3.62

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* 甘露醇组; [c]$P<0.05$, [d]$P<0.01$ *vs* 电解质组.

3 讨论

通过以上分析比较得出，3种肠道清洁法在临床应用时，肠道清洁效果及不良反应各有不同.大肠水疗的优良率达81.81%，不良反应也明显低于口服电解质组和口服甘露醇组;口服电解质液组为77.65%，口服甘露醇组为75.76%.可见，大肠水疗和口服电解质液清洁肠道的效果较为理想，但口服电解质组丁级率高于大肠水疗组.

电解质液进入肠腔后通过提高肠液渗透压，使肠内水份增多，肠腔容积扩大，加快肠蠕动而产生导泻效果，多数清洁效果较好，作为传统的肠道清洁方法，已广泛应用于临床，且费用低，比较适用于低消费人群.但需短时间内饮大量水，对老年人及心、肾功能不全者存在一定危险，可能引起水、钠潴留[2]，部分受检者出现恶心、呕吐、腹痛等不适.

甘露醇属高渗溶液，进入肠腔后不被小肠吸收而产生导泻作用，口感好，饮水量少，费用也低，易被绝大多数患者接受.但因甘露醇进入肠道被细菌分解后有可能产生可燃性气体，易引起爆炸.准备行高频电凝、电切时禁忌，仅用于结肠镜检查前准备[3].另外，对长期卧床，大便干结不畅者，大量引用甘露醇可能引起剧烈腹痛[4]，对不全性梗阻的患者，可诱发或加重肠梗阻[5].而且甘露醇在肠腔内被细菌分解后产生可燃性气体，如梗阻得不到及时解除，会加速肠穿孔的发生[6].

大肠水疗是通过一种经过精密设计与精确计算的仪器，对整个结肠进行分段清洗，即从肛门逐段清洗至乙状结肠、横结肠、升结肠，可对直肠至升结肠1.5 m的长度进行彻底清洗[7];配合专业性的结肠按摩，将残留在肠道皱褶的污垢、毒素和寄生虫清洗干净.不仅清洁效果好，而且可以避免口服电解质液和口服甘露醇所引起的不良反应，同时可保持正常饮食，免除节食之苦.对长期便秘者也无需控制饮食，只需在清洗的前一天晚上口服33%(W/V)硫酸镁溶液50 mL溶解回盲部的成形大便[8].尤其适合内镜手术、腹部手术及急诊肠镜检查前的肠道准备.对疑有肠道占位性病变等伴有不全性梗阻，或年龄较大、体质较弱又必须做肠镜检查者，选择大肠水疗既可暂时缓解梗阻症状，又可进行结肠镜检查和诊断，可作为首选.对肠道运动功能障碍，如习惯性便秘者，能通过循环冲洗及物理性水运动，帮助恢复正常肠蠕动，改善肠道运动功能(因使用的水制剂，既不会产生依耐性，也不会改变菌群，而且在清洁的环境里更有利于益菌生长，使大肠内菌群更趋于平衡).有报道大肠水疗治疗老年急性粪便嵌塞也能收到满意的效果[10].

在进行本组比较研究中，分组的主要依据是参考患者的身体状况、饮食要求和费用负担，虽然各组患者的年龄和人数不完全一致，但因各组患者年龄比较接近，不影响回顾性分析的可信性.众所周知，理想的肠道准备应该是安全、迅速、清洁效果好、副作用少，对门诊、住院受检者都十分便利.因此，我们认为大肠水疗是一种肠道清洁效果好、安全、快速、副作用小、不良反应少的新兴肠道清洁法.虽然费用较高，但其不良反应的发生率明显低于前两种方法，患者也无需作特殊准备，已被多数人接受.

4 参考文献

1 徐富星. 下消化道内镜学. 第1版. 上海:上海科学技术出版社, 2003:182-184
2 赵毅, 李世荣. 磷酸钠口服液清洁肠道效果的临床观察. 中华护理杂志 2000;35:455
3 赵光斌, 韩盛喜, 刘雅玲, 万静明. 结肠镜检查前几种肠道准备方法清洁效果对比观察. 中国误诊学杂志 2003;3:1332
4 张永霞. 大量口服甘露醇引起疼痛性休克1例. 实用护理杂志 1998;14:49
5 丁云珍. 王骊. 左半结肠癌口服甘露醇肠道准备致肠梗阻3例. 中国内镜杂志 2002;23:63
6 左铁, 洪文元, 李远华, 赵德重, 华利勇. 甘露醇清洁肠道导致肠梗阻并肠破裂一例. 西藏医药杂志 2002;23:63
7 朱明山, 刘竹君, 吕建华. 肠道水疗在肠道清洁准备中的应用价值. 中华医学实践杂志 2004;3:47-48
8 华静蕙, 赵发, 郭伶俐. 大肠水疗用于结肠镜检查前的肠道准备. 河北医药 2003;25:920
9 杨如美. 结肠水疗临床疗效分析. 齐齐哈尔医学院学报 2003;24:89
10 王晓娟, 阎皓, 洪松超. 大肠水疗治疗老年急性粪便嵌塞的临床观察. 职业与健康 2003;19:118

编辑 张海宁

·临床经验·

肝硬化患者肝储备功能对TIPSS术后近期疗效的影响

张铁英, 赵金满, 施贵静

张铁英, 赵金满, 施贵静, 中国医科大学附属第一临床医院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
项目负责人: 赵金满, 110001, 辽宁省沈阳市和平区北二马路92号, 中国医科大学附属第一临床医院消化内科.
电话: 024-23256666-6199
收稿日期: 2004-11-01 接受日期: 2004-11-22

摘要

目的: 探讨肝硬化门脉高压上消化道出血患者的肝储备功能对于TIPSS术后近期肝细胞损害和预后的影响.

方法: 收集肝硬化门脉高压合并上消化道出血经TIPSS术治疗的患者病历资料，采用回顾性的分析方法，对肝功能进行Child-Pugh分级和MELD评分，用χ^2检验和t检验进行统计学分析.

结果: TIPSS术对肝储备功能不同的肝硬化患者产生不同程度的肝细胞损害.Child-Pugh分级中A，B，C级损害率分别4.76%，30.00%，69.50%，三者之间差异具有显著性(P<0.01).死亡率分别为4.76%，3.30%，13.00%.MELD评分中细胞损害率分别为6.25%，22.20%，90.00%，三者之间差异具有显著性(P<0.01)，死亡率分别为4.20%，3.70%，15.0%.MELD评分中>20肝细胞损害率的95%可信区间为68-99%，而Child-Pugh C级肝细胞损害率的95%可信区间为47-87%.

结论: TIPSS术对肝硬化患者具有明确的降低门脉压力的疗效，但同时对肝细胞也会产生不同程度的损伤加重;术前正确评价肝储备功能，恰当选择适应证将会减少死亡率.对于TIPSS术预后的判断，MELD评分优于Child-Pugh分级.

张铁英, 赵金满, 施贵静. 肝硬化患者肝储备功能对TIPSS术后近期疗效的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3):415-418
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/415.asp

0 引言

经颈静脉肝内支架门一腔静脉分流术(transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt，TIPSS)[1-2]是在X光屏幕监视下，经过股动脉穿刺造影，通过颈静脉穿刺放入导丝，途经肝内在门静脉与肝静脉之间放置金属网状支架形成分流通路.TIPSS是一项新的介入性治疗技术，其创伤性小，且能建立有效的分流，从而降低门静脉压力，对于肝硬化门脉高压合并上消化道出血和腹水有较好的疗效[3].然而，行TIPSS术尽管近期止血效果明显，挽救了经内科治疗无效的上消化道出血的患者，但Narahara，Ryan，Tripathi *et al*[4-10]通过大量对照试验和Meta分析表明，同其他方法相比，TIPSS术后患者生存质量并没有提高.这可能是因为TIPSS术后，门脉灌流量下降，肝细胞损害加重，肝功能进一步减退，及分流道阻塞等.因此，术前正确的评价肝储备功能，采取适宜的分流量，有益于提高患者的预后.对于肝储备功能的评价，目前在国际上常用的是Child-Pugh分级法和近年提出的MELD 评分法[11-14].二者对于短期评价均有较好的效果.Child-Pugh分级法与临床密切相关，五大指标均与病情发展密切相关，但其主观性较强，然而MELD评分法均采用实验室的指标，运用数学公式来计算获得相应的评分，较客观.我们采用Child-Pugh分级法和MELD评分法两方面来评价肝储备功能，考察门脉高压合并上消化道出血的患者行TIPSS术后近期发生肝细胞损害的情况，同时对术后近期死亡病例作进一步分析，旨在探讨肝储备功能对TIPSS术后疗效的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院1998-01/2003-12经过TIPSS治疗的肝硬化门脉高压合并上消化道出血的患者95例，男65例，女30例，年龄32-71岁之间，73例为肝炎后肝硬化，5例酒精性肝硬化，2例Budd-Chiari综合征，15例为原因不明者.其中有9例为急诊手术，36例合并有中重度腹水.TIPSS支架的直径分别为8 mm，10 mm，12 mm，长度为6-8.5 cm，支架的类型为Wallstent，Angiomed和带膜的国产支架.

1.2 方法

1.2.1 Child-Pugh肝功能分级法 根据血清胆红素、白蛋白、凝血酶原时间、腹水的程度以及脑病的分期来综合评分制定的.Child-Pugh原用于估计门静脉系和腔静脉系分流术后肝病患者的预后，现在也用来作为非门静脉系和腔静脉系手术术后预后判断的指标.将血清胆红素、白蛋白、凝血酶原时间、腹水和肝性脑病的严重程度综合计分，≤6分为A级，7-9分为B级，≥10分为C级.

1.2.2 MELD评分 MELD(model for end-stage liver disease)[12]是由Mali临床工作组2000年创建的一种预测TIPSS 术预后的一种数学方法.最初是用来评价肝硬化患者TIPSS 术后短期生存率.Kamath *et al*[13]将其作为预测终末期肝病潜在危险性的指标.MELD评分是根据总胆红素、肌苷、国际凝血酶原时间比率(INR)及肝硬化的病因(酒精性或胆管性为0，其他原因为1)，经下面公式:$9.6\times\log_e$(肌苷 *mg/dl*)$+3.8\times\log_e$(胆红素 *mg/dl*)$+11.2\times\log_e$(INR)$+6.4\times$(0或1)，计算后获得评分进行分级.本组资料中MELD评分<10为48例，10-20为27例，>20为20例.

1.2.3 肝细胞损害加重的判断 根据胆红素增高、凝血酶原时间延长、ALT增高和白蛋白减少的程度进行综合分析[15]

1.2.4 Tipss 术方法[1-2] 按常规TIPSS 术方法

统计学处理 用SPSS11.0软件进行χ^2检验及配对 t 检验

2 结果

2.1 TIPSS 术前后肝功能的变化 为了明确肝储备功能对TIPSS 术后肝细胞的影响，我们对发生肝细胞损害的患者TIPSS 术前后血中总胆红素(TBIL)、白蛋白(G/L)、谷丙转氨酶(ALT)及凝血酶原时间进行了检测和对比.肝功能的变化 用mean±SD 表示.

2.2 TIPSS 术后肝细胞损害程度同肝储备功能有关 Child-Pugh 分级中C 级发生肝细胞损害率最高，为69.50%，而且其死亡率也较高，为13.00%.MELD 评分中MELD 评分>20 的患者TIPSS 术后易发生肝细胞损害，损害率为90.00%，死亡率为15%(表2).

2.3 肝贮备功能对TIPSS 术后发生死亡的影响(表3).

3 讨论

TIPSS 术是一种治疗门静脉高压症的有效方法，临床上对难治性腹水和经内科保守治疗无效的上消化道出血的患者有较好的疗效.一般认为，反复食管胃底静脉曲张破裂出血的肝硬化患者，无论年龄多大，Child 分级结果如何，以前是否接受过硬化和(或)结扎治疗，均可行TIPSS 治疗，但通过对我院肝硬化合并上消化道出血的患者行TIPSS 术的临床观察来看，肝功能障碍的程度对TIPSS 术后的肝细胞损害有一定影响.

3.1 肝硬化的患者TIPSS 手术前后肝功能的变化 从表1我们可以看到，Child-Pugh 分级中，发生肝细胞损害的肝硬化患者TIPSS 术后血中胆红素、谷丙转氨酶的含量较术前升高，凝血酶原时间延长，白蛋白进行性减少.其中胆红素较术前相比高出近1倍，术前与术后差异具有显著性($P<0.05$).同样，谷丙转氨酶水平与凝血酶原

表1 肝硬化的患者TIPSS 手术前后肝功能的变化(1 wk 以内)

Child-Pugh 分级		TBIL(μmol/L)	ALB(G/L)	ALT(IU/L)	凝血酶原时间(s)
A	术前	16.33 ± 2.87	38.57 ± 2.68	30.29 ± 9.10	15.58 ± 2.76
	术后	32.04 ± 6.70[a]	36.71 ± 1.27	89.14 ± 23.43	16.35 ± 1.23
B	术前	25.80 ± 4.22	31.23 ± 1.75	29.42 ± 5.33	16.22 ± 2.03
	术后	50.58 ± 9.19[a]	30.29 ± 1.99	117.67 ± 69.57	17.13 ± 2.37
C	术前	47.00 ± 7.50	34.07 ± 1.94	52.78 ± 12.06	20.28 ± 4.53
	术后	90.33 ± 21.02[a]	30.31 ± 2.60	226.78 ± 82.39[b]	22.64 ± 5.28[b]

[a]$P<0.05$，[b]$p<0.01$ *vs* 术前.

表2 肝储备功能对TIPSS 术后疗效的影响

肝贮备功能评价	肝细胞损害(*n*)	死亡(*n*)	损害率(%)	死亡率(%)	*P*值
child-Pugh 分级(*n*)					
A(42)	2	2	4.76	4.76	
B(30)	9	1	30.00	3.3 0	$P<0.01$[c]
C(23)	16	3	69.50	13.00	
MELD 评分(*n*)					
<10(48)	3	2	6.25	4.20	
10-20(27)	6	1	22.20	3.70	$P<0.01$[d]
>20(20)	18	3	90.00	15.00	

c: A，B，C 三组之间比较; d: MELD 评分三组之间比较.

表3 TIPSS 术后近期死亡病例临床资料

编号	性别	年龄	肝功级别	MELD 评分	分流道(mm)	并发症
1	男	72	C	28.0	10	肝性脑病
2	男	64	C	23.0	10	肝性脑病，右心衰
3	男	70	A	8.5	12	肝性脑病
4	男	65	B	14.0	8	上消化道大出血
5	女	67	C	21.0	10	肝肾功能衰竭
6	男	68	A	7.8	12	肝性脑病，胃黏膜出血

时间术前与术后差异也具有显著性($P<0.01$)，而且Child-Pugh C级患者术后两指标的变化比较明显，谷丙转氨酶术后升高将近4倍，凝血酶原时间延长近2 s ($P<0.01$). 因此，TIPSS可使肝损伤加重，且肝储备功能越差损伤越重. C级患者白蛋白术前术后的变化不如其他级别变化明显，可能是C级患者术前术后反复输白蛋白所致.

3.2 肝贮备功能对TIPSS术后发生肝细胞损害的影响 在本组资料中Child-Pugh A级发生肝细胞损害率4.76%，Child B级30.00%，Child C级69.50%，三者之间差异具有显著性($P<0.01$)，MELD评分中，MELD评分<10损害率为(6.25%)，MELD评分10-20损害率为(22.2%)，MELD评分>20损害率为(90%)，Child C级肝硬化及MELD评分>20的术后易使肝细胞损害加重，甚至造成肝功能衰竭引起死亡. TIPSS是在肝内进行的一种分流术，术中会对肝细胞造成机械性损伤，同时一部分血流直接进入腔静脉，流经肝脏血流减少[16-17, 25]. 这对于肝功储备能力极差的Child-Pugh C级及MELD评分>20的肝硬化无疑是雪上加霜，导致肝细胞进一步的损害. 因此，对于这类肝硬化患者在行TIPSS治疗时，分流道的直径应小于10 mm. 又由于肝硬化患者易发生低氧血症，且随着肝功能分级的增高，低氧血症的发生率呈梯形上升，即使肝功能状况良好的A级患者也可发生低氧血症，但随着肝功能状况的恶化，机体储备调节能力降低，低氧血症更加常见和严重，造成细胞内低能量状态，加重肝功能的损害. 另外随着肝Child-Pugh分级的改变更易发生电解质的紊乱，特别是低钠血症，引起细胞内水肿[18-20]. 当TIPSS作为一种应急的治疗措施时，因无法选择肝脏级别，因此术后应加强保肝治疗，并避免出现其他使肝功能恶化的并发症[26]. 当TIPSS作为预防出血措施时，应尽量选择肝功能A级或MELD<10分的患者，而B级或MELD评分10-20分者应慎重，一般不选择C级或MELD>20者，不管肝功能状态如何，TIPSS术后均应全力保肝治疗.

3.3 肝贮备功能对TIPSS术后发生死亡的影响 本组资料中有6例患者于术后7 d内死亡，其中Child-Pugh分级中A，B，C级死亡率分别为4.76%，3.30%和13%. MELD评分中三组死亡率分别为4.2%，3.7%和15%. 文献[21-23]报道A级死亡率为0-5%，B级为10-15%，C级>25%. MELD<10，7 d致死率<1.0%，MELD评分10-20死亡率为9.6%，MELD评分>20为22.4%，本资料中B，C级死亡率降低，主要是由于对病例的适应证选择上比较谨慎. 3例C级患者术前均合并有大量难治性腹水，其中2例合并有高糖血症，术后出现肝功能衰竭、肝昏迷、右心功能不全而死亡. 另一例患者急诊手术，术后10 h出现肝肾衰竭，肝昏迷死亡. 1例B级患者，既往II型糖尿病3 a，术后30 h再发上消化道大量出血，死于失血性休克. A级死亡率为4.76%，较B级死亡率高，考虑有几点原因:(1)患者年龄偏大，均在68岁以上;(2)术前合并有冠心病及慢性支气管炎，术后由于回心血量增多，加重心脏前负荷[24]，在原有心肺疾患的基础上，进一步导致心功能不全;(3)2例A级死亡者术后均发生肝细胞损害加重，其分流道直径为12 mm，不排除分流过量，造成肝细胞损害加重，肝功能衰竭. 曾有学者提出[18, 26]，对于Child C级患者分流道直径应小于10 mm. 对于年龄偏大，原有心肺疾患的患者尽管肝贮备功能较好，分流道直径也应小于10 mm.

3.4 MELD评分与Child-Pugh分级法评价肝储备功能的比较 我们从MELD评分和Child-Pugh分级法两方面对肝功能进行了评价，结果表明:MELD各级评分中肝细胞的损害率分别为6.25%，22.2%和90%. Child-Pugh分级法中各级肝细胞的损害率分别为4.76%，30%，69.50%. 随着肝储备功能的减退，肝细胞的损害率逐渐增高. 通过对两种方法的比较来看，MELD评分中>20肝细胞损害率的95%可信区间为(68-99%)，而Child-Pugh C级肝细胞损害率的95%可信区间为(47-87%). 因此，MELD对于肝贮备功能的评价更优于MELD法，而且从临床实际来看，肝储备功能差的患者术后发生肝细胞损害的现象较普遍，而且预后也很差. 总之，MELD评价要比Child-Pugh分级法更切合临床实际.

TIPSS是一种治疗门静脉高压症的有效方法，其近期疗效显著，日益受到临床的重视[3]. 他对急性胃底，食管静脉曲张破裂和反复难治性的出血有很好的疗效[27-29]. 肝储备功能对TIPSS术后的近期疗效有一定的影响. 术前正确评价肝储备功能，恰当选择适应证及适当的分流，将会减少死亡率. 对于TIPSS术预后的判断，MELD评分优于Child-Pugh分级. 随着临床及基础研究的不断深入，TIPSS的中远期疗效会不断提高，而且并发症会越来越少，逐渐成为一项完善的降低门脉高压的治疗手段.

4 参考文献

1 Rossle M, Richter GM, Noldge G, Palmaz JC, Wenz W, Gerok W. New non-operative treatment for variceal haemorrhage. *Lancet* 1989;2:153

2 Richter GM, Palmaz JC, Noldge G, Rossle M, Siegerstetter V, Franke M, Wenz W. The transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt. A new nonsurgical percutaneous method. *Radiologe* 1989;29:406-411

3 Hassoun Z, Pomier-Layrargues G. The transjugular intrahepatic portosystemic shunt in the treatment of portal hypertension. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:1-4

4 Narahara Y, Kanazawa H, Kawamata H, Tada N, Saitoh H, Matsuzaka S, Osada Y, Mamiya Y, Nakatsuka K, Yoshimoto H, Koizumi N, Sakamoto C, Kobayashi M. A randomized clinical trial comparing transjugular intrahepatic portosystemic shunt with endoscopic sclerotherapy in the long-term management of patient with cirrhosis after recent variceal hemorrhage. *Hepatol Res* 2001;21:189-198

5 Pomier –Layrargue G, Villeneuve JP, Deschenes M, Bui B, Perreault P, Fenyves D, Willems B. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt(TIPS)versus endoscopi variceal ligation in the prevention of variceal rebleeding in patients with cirrhosis:a randomised trial. *Gut* 2001;48:390-396

6 Tripathi D, Helmy A, Maebeth K, Balata S, Lui HF, Stanley AJ, Redhead DN, Hayes PC. Ten years' follow-up of 472 patients following transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt insertion at a single centre. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:9-18

7 Ryan BM, Stockbrugger RW, Ryan JM. A pathophysiologic, gastroenterologic, and radiologic approach to the management of gastric varices. *Gastroenterology* 2004;126:1175-1189

8 Tripathi D, Liu HF, Helmy A, Dabos K, Forrest F, Stanley AJ, Jalan R, Redhead DN, Hayes PC. Randomised controlled trial of long term portographic follow up versus variceal band ligation following transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt for preventing oesophageal variceal rebleeding. *Gut* 2004;53:431-437
9 Zhuang ZW, Teng GJ, Jeffery RF, Gemery JM, Janned'othee B, Bettmann MA. Long-term results and quality of life in patients treated with transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Am J Roentgenol* 2002;179:1597-603
10 Gulberg V, Schepke M, Geigenberger G, Holl J, Brensing KA, Waggershauser T, Reiser M, Schild HH, Sauerbnuch T, Gerbes AL. Transjugular intrahepatic portosystemic shunting is not superior to endoscopic variceal band ligation for prevention of variceal rebleeding in cirrhotic patients:a randomized, controlled trial. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:338-343
11 Angermayr B, Cejna M, Karnel F, Gschwantler M, Koenig F, Pidlich J, Mendel H, Pichlor L, Wichlas M, Kreil A, Schmid M, Ferlitsch A, Lipinski E, Brunner H, Lammer J, Ferenci P, Gangl A, Peck-Redvsavljevic M. Child-pugh versus MELD score in predicting survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Gut* 2003;52:879-885
12 Malinehoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter-Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoingransjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Hepatology* 2000;31:864-871
13 Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patient with end-stage liver disease. *Hepatology* 2001;33:464-470
14 Schepke M, Roth F, Fimmers R, Brensing KA, Sudhop T, Schid HH, Sauerbruch T. Comparison of MELD, Child-pugh, and Emory Model for the prediction of survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunting. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1167-1174
15 王宝恩, 张定凤. 现代肝脏病学. 北京, 科学出版社, 2003:216-217
16 Rosemurgy AS, Thometz DP, Zervos EE. Portal blood flow, effective hepatic blood flow, and outcome after partial portal decompression. *J Surg Res* 2004;117:64-70
17 Mullen KD. Interplay of portal pressure, portal perfusion and hepatic arterial inflow in modulating expression of hepatic encephalopathy in patients with spontaneous or artificially created portosystemic shunts. *Indian J Gastroenterol* 2003;22 (Suppl 2):S25-27
18 Matsumoto A, Matsushita M, Sugno Y, Takimoto K, Yasuda M, Inokuchi H. Limitations of transjugular intrahepatic portosystemic shunt for management of gastric varices. *Gastroenterology* 2004;126:380-381
19 Matsumoto A, Yamauchi H, Inokuchi H. How should we improve the clinical course of patients with gastric varices? *J Clin Gastroenterol* 2003;36:372
20 Olde Damink SW, Jalan R, Redhead DN, Hayes PC, Deutz NE, Soeter PB. Interorgan ammonia and amino acid metabolism in metabolically stable patients with cirrhosis and a TIPSS. *Hepatology* 2002;36:1163-1171
21 ter-Borg PC, Hollemans M, Van Buuren HR, Vleggaar FP, Groeneueg M, Hop WC, Lameris JS. Transjugular intrahepatic portosystemic shunts:long-term patency and clinical results in a patient cohort observed for 3-9 years. *Radiology* 2004;231:537-545
22 Saxon RR. A new era for transjugular intrahepatic portosystemic shunts? *J Vasc Interv Radiol* 2004;15:217-219
23 Ferral H, Gamboa P, Postoak DW, Albermaz VS, Young CR, Speeg KV, McMahan CA. Survival after elective transjugular intrahepatic portosystemic shunt creation:prediction with model for end-stage liver disease score. *Radiology* 2004;231:231-236
24 Schwartz JM, Beymer C, Althaus SJ, Larson AM, Zaman A, Glickerman DJ, Kowdley KV. Cardiopulmonary consequences of transjugular intrahepatic portosystemic shunts:role of increased pulmonary artery pressure. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:590-594
25 毕向军, 杨冬华, 农玉新, 黄纯炽, 徐明符, 肖玉梅. 经颈静脉肝内门体分流术对肝功能的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:594-595
26 Chalasani N, Clark WS, Martin LG, Kamean J, Khan MA, Patel NH, Boyer TD. Determinant of mortality in patient with advanced cirrhosis after transjugular intrahepatic portosystemic shunting. *Gastroenterology* 2000;118:138-144
27 邓侠兴, 杨卫平, 蔡伟耀, 陈皓, 李宏为. 经颈内静脉肝内门体支架分流门脉血液动力学变化. 世界华人消化杂志 1999;7:799-800
28 蒋明德, 秦建平. TIPS的临床应用再评价. 世界华人消化杂志 2003;11:1989-1992
29 Gow PJ, Chapman RW. Modern management of oesophageal varices. *Postgrad Med J* 2001;29:406-411

编辑 张海宁

·临床经验·

直肠癌保肛手术后肛门功能障碍的生物反馈治疗

苏 琪, 吴硕东, 袁正伟, 王 伟, 殷红专, 韩 霞, 刘恩卿

苏琪, 吴硕东, 袁正伟, 王伟, 殷红专, 韩霞, 刘恩卿, 中国医科大学附属盛京医院普通外科 辽宁省沈阳市 110004.
辽宁省自然科学基金资助项目, No. 972255
辽宁省教育厅资助项目, No. 202010792
项目负责人: 苏琪, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院普通外科. suqi100@hotmail.com
电话: 024-83955072
收稿日期: 2004-12-10 接受日期: 2004-12-21

摘要

目的: 探讨直肠癌保肛手术后肛门功能障碍的治疗方法.

方法: 利用多种先进的客观检测手段，通过不同侧面对31例直肠癌保肛手术后肛门功能进行综合评定，并根据患者不同的排便功能障碍机制，选择性进行加强肛周肌肉力量、改善直肠感觉阈值等5种方法的生物反馈训练.

结果: 接受生物反馈训练的中低位直肠癌患者临床评分由2.3±1.0提高至4.6±0.5，而高位直肠癌由3.7±1.0提高至5.7±0.5.经过训练之后，代表肛周肌肉力量、直肠功能和直肠肛管综合控制能力的指标均有非常明显的改善，统计学处理差异有显著性意义.

结论: 针对性的生物反馈训练方法对于治疗直肠癌保肛手术后肛门功能障碍具有的非常显著效果，对提高患者生活质量具有重要意义.

苏琪, 吴硕东, 袁正伟, 王伟, 殷红专, 韩霞, 刘恩卿. 直肠癌保肛手术后肛门功能障碍的生物反馈治疗. 世界华人消化杂志 2005;13(3):419-423
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/419.asp

0 引言

肛门功能障碍是直肠癌保肛手术后常见的并发症，常常引起患者的心理、生理发育和社会活动能力障碍.然而目前对于直肠癌保肛手术后肛门功能障碍的治疗并无有效的方法，进行括约肌重建手术仅适合于超低位直肠癌手术后括约肌严重损伤的患者.自Park *et al*[1]报道生物反馈治疗便秘及便失禁取得疗效后，引起人们极大兴趣，经过详细的疗效分析和随访观察，证实生物反馈疗效非常明显，同时操作简单、无损伤性，可明显提高患者的生活质量[2-5].目前文献报道生物反馈训练方法有多种，但并没有针对不同的患者，许多人甚至不考虑大便失禁及便秘的原发病[6-9].而不同患者的排便控制异常的机制不尽相同，使用单一的训练方法不一定有显著疗效.本研究首次利用多种先进的客观检测手段通过不同侧面对31例直肠癌患者肛门直肠功能进行综合测定，并根据患者不同的控制机制异常制定相应的生物反馈训练方案，对不同的排便功能障碍进行治疗，提高疗效.

1 材料和方法

1.1 材料 病例组:直肠癌术后0.5-3 a的患者31例，男11例，女20例，年龄36-75岁，平均51岁.其低位直肠癌15例，中位8例，高位8例.临床评分[4]为优者9例，良17例，劣5例.临床表现为便失禁11例(其中完全失禁2例，9例为稀便失禁)，污便11例，便秘9例.正常组:年龄30-54岁(平均40.6岁)的无直肠及神经系统疾患者20例，男8例，女12例.训练所需仪器:高分辨多通道胃肠功能测定仪(POLY-GRAM HR瑞典CTDSYNECTICS公司);肌电和神经诱发电位检测仪(美国Cadwellsierra Console).

1.2 方法

1.2.1 生物反馈训练方案 (1)首先填写1 wk的排便日记，内容包括正常排便、便失禁、污便和便秘等情况，然后进行各项客观检测和临床评分.(2)让患者回家自己进行收缩肛门和排便习惯训练，排便习惯训练是每日3次进餐后30 min内立即到厕所训练排便，1 mo后再次进行各种客观检测和临床评分.(3)根据客观检测结果，选择下列5种训练方法的一种或几种进行综合训练，对各种控制机制异常分别进行矫正，同时继续进行排便习惯训练.

加强肛周肌肉力量生物反馈训练:适合于收缩状态肌电振幅和向量容积低于正常者.将肛探电极插入肛管，肌电波形即可在监视器屏幕显示，也可以标尺形式显示.首先让患者观看正常人肌电波形，然后指导患者边观察监视器，边摸索调整用力方式，尽最大努力提高肌电振幅，并延长括约肌收缩时间.同时也可通过扬声器的声音判断肌肉力量大小，每天训练两次，每次30 min，待患者学会使用肛周肌肉进行收缩训练3-4 d后，可使用便携式生物反馈训练仪在家中训练，根据患者肌肉力量提高的程度决定复查时间，待肌电振幅和最大收缩时间达到正常标准后，停止强化训练，进行下一步训练.

改善直肠感觉阈值的生物反馈训练:适合于直肠感觉阈高于正常者.将带有气囊的测压导管插入直肠，导管固定位置与直肠肛管测压相同，首先膨胀气囊达到患者感觉阈值，然后减少5-10 mL注气量，在患者观察监视器压力波形的情况下，反复注气，让患者仔细体会并牢记气囊膨胀感觉，然后关闭监视器，随机地注气或不注气，如果回答次数至少75%正确，说明感觉阈已达到这一水平.然后再次减少气体量5-10 mL，重复上述过程，直至感觉阈降到正常水平.

缩短括约肌反应时间的生物反馈训练:适合于感觉收缩时间延长者.首先膨胀直肠内气囊达到患者感觉阈，让患者感觉到直肠膨胀后立即收缩肛门外括约肌，患者可

通过监视器观察从气囊膨胀至括约肌收缩所需时间，通过不断训练逐渐缩短感觉收缩时间，直至达到正常.

建立肛门括约肌收缩反射的生物反馈训练：适合于直肠肛管收缩反射阴性者.在患者直肠感觉阈和感觉收缩时间均达到正常后，要继续进行膨胀气囊训练，通过不断巩固，使患者能够建立一种条件反射，只要直肠出现轻微膨胀感觉，肛门括约肌就会立即出现反射性收缩.

改善排便动力生物反馈训练：适合于排便动力异常，特别是术后便秘患者.首先让患者观看正常排便时肛门括约肌肌电波形变化，然后让患者在观察监视器肌电波形情况下，做排便动作，并通过一定方式(如想象、意念等)尽量缩小肌电振幅，并不断训练，进行巩固.然后关闭监视，做排便动作，如果5次排便动作至少有4次肌电振幅降低，则认为排便动力已训练正常，再进行巩固训练3-4 d就可结束训练.

全部训练结束，再次进行各项客观检测和临床评分，并定期随访.

1.2.2 肛门直肠功能客观检测指标 (1)肛门外括约肌神经电生理检测会阴-肛门反射潜伏期、脊髓肛门反应潜伏期和中枢传导时间.(2)X线排便造影：首次漏出量和直肠肛管角.(3)直肠肛管向量测压：静息和收缩状态向量容积.(4)同位素排便造影：半排时间、排空率和残留率.(5)直肠肛管测压：直肠感觉阈、感觉收缩时间和直肠顺应性.(6)肛门括约肌肌电图：静息和收缩状态的肌电振幅和痉挛指数.

2 结果

2.1 临床分析 31例接受生物反馈训练患者经过首次随访时的肛门直肠功能客观评价，根据患者的具体控制机制异常，31例全部接受增强括约肌力量的训练，21例接受改善直肠感觉阈值训练，19例接受缩短括约肌反应时间训练，12例接受建立括约肌收缩反射训练，15例接受改善排便动力训练.结果8例高位直肠癌患者训练后临床评分由3.7±1.0提高至5.7±0.5，全部为优(其中2例5分，6例6分)，23例中低位直肠癌患者临床评分由2.3±1.0升至4.6±0.5，有7例为优(6例5分，1例6分)，14例评分为良(8例3分，6例4分)，其中临床评分为3分的2例患者因训练不合作，中途停止治疗.训练疗程高位患者为10 d左右，中低位患者为20 d左右.

2.2 客观检测结果 经过首次随访的客观检测之后，患者在家中自己进行收缩肛门和排便习惯训练.1 mo之后的检测结果显示，代表肛周肌肉力量的收缩状态向量容积和肌电振幅，代表肛门综合控制能力的首次漏出量和代表直肠功能的直肠感觉阈值、膨胀收缩时间均明显增高，中低位直肠癌患者增高更明显，而代表内括约肌功能的静息状态向量容积改变不明显(表1，2).

进行生物反馈训练之后直肠肛管收缩反射阳性率明显提高，由48.4%(14/31)升至90.3%(28/31).训练后临床评分为优良的15例中低位直肠癌患者与其余5例评分为差的低位直肠癌患者两组之间比较，反映肛周肌肉力量和神经传导功能的指标在首次随访时和生物反馈训练之后差异均有显著性意义(表1，3).

2.3 近期随访 除2例中断治疗的患者以外，对其余29例患者进行48 mo的随访观察，临床评分无下降，而有3例经生物反馈训练后评分为4分的患者经继续巩固，临床评分已升为5分.

表1 直肠癌患者生物反馈训练前、后肛门外括约肌功能的检测结果 (mean ± SD)

分组	*n*	收缩向量容积 (cm×cmHg^2)	最大收缩时间 (ms)	静息肌电振幅 (μv)	收缩肌电振幅 (μv)
高位组	11				
训练前(1)		188.5±126.0^a	58.1±11.9^a	36.3±8.4^a	145.2±35.3^a
训练前(2)		242.0±60.6^{ac}	65.1±0.73	39.1±5.4^a	194.8±25.6^c
训练后		527.0±115.2^{ac}	50.0±18.2^c	45.3±12.4^a	309.1±51.7^c
中低位组					
评分优良	15				
训练前(1)		139.7±71.3^a	48.8±11.2^a	25.6±6.2^a	126.0±41.4^a
训练前(2)		188.3±101.8	52.0±11.4^a	17.3±6.3^a	135.6±33.3^{ac}
训练后		415.1±72.4^{ace}	70.2±24.8^c	23.4±6.58^{ac}	250.67±41.3^{ce}
评分差	5				
训练前(1)		57.2±15.6^{ab}	37.7±12.1^{ac}	16.9±7.1^a	53.2±24.5^{ac}
训练前(2)		69.9±14.1^{ac}	39.1±11.9^a	16.6±7.0^a	60.3±23.0^{ac}
训练后		256.2±61.0^{aceg}	48.5±19.6^{ag}	18.3±5.3^{ac}	95.0±27.9^{aeg}
正常组	20	934.0±425.0	65.15±10.74	87.17±31.36	194.11±56.65

$^aP<0.05$ *vs* 正常组; $^cP<0.05$ *vs* 前一组; $^eP<0.05$ *vs* 训练前(1)组; $^gP<0.05$ 中低位直肠癌训练后评分良组 *vs* 评分优组; 训练前(1): 首次随访时客观检测结果, 训练前(2): 首次随访以后患者在家中自己进行收缩肛门和排便习惯训练 1 mo 后，生物反馈训练之前的检测结果.

表2 直肠癌患者生物反馈训练前、后直肠肛门综合控制能力与直肠功能的检测结果 (mean ± SD)

分组	n	直肠感觉阈 (mL)	感觉收缩阈 (s)	首次排出量 (mL)	静息直肠肛管角 (度)
高位组	11				
训练前(1)		45.5±11.1[a]	2.56±0.34[a]	68.0±30.4	112.5±10.1
训练前(2)		56.0±7.2[a]	2.49±0.34[a]	79.1±19.4	
训练后		37.5±5.4[c]	1.29±0.23[c]	122.0±33.4[c]	102.7±15.4
中低位组					
评分优良	15				
训练前(1)		51.0±6.8[a]	2.69±0.87[a]	44.9±7.5	140.1±7.6[a]
训练前(2)		49.1±3.7[a]	2.46±0.86[a]	46.4±8.2	
训练后		28.5±6.2[c]	1.37±0.51[c]	107.4±23.4[c]	138.00±17.0[a]
评分差	5				
训练前(1)		57.5±15.0[a]	3.68±0.54[aq]	30.0±3.4[q]	150.5±3.6[a]
训练前(2)		55.4±14.6[a]	3.46±0.54[a]	35.6±8.3[q]	
训练后		39.0±10.8[e]	2.31±0.65[eq]	57.2±25.4[eq]	145.24±6.5[a]
正常组	20	35.7±8.8	1.83±0.52	0	105.2±18.1

[a]$P<0.05$ *vs* 正常组; [c]$P<0.05$ *vs* 前一组; [e]$P<0.05$ *vs* 训练前(1)组; [q]$P<0.05$ 中低位直肠癌训练后评分良组 *vs* 评分优组.

表3 直肠癌患者生物反馈训练前、后直肠肛门括约肌神经功能的检测结果 (ms, mean ± SD)

分组	n	会阴-肛门反射潜伏期	脊髓-肛门反射潜伏期	马尾神经诱发电位潜伏期
高位组	11			
训练前		55±16	16.8±3.9[ac]	12.8±2.6
训练后		36.1±11.0[ae]	10.1±2.3[a]	9.6±3.2[ae]
中低位组				
评分优良	15			
训练前		59±11	11.2±2.5	10.7±2.4
训练后		34.4±12.2[ae]	9.3±0.8[ae]	9.2±3.2[ae]
评分差	5			
训练前		70±29	18.5±2.1	14.2±3.3
训练后		50.6±15[aq]	14.7±1.6[a]	10.4±4.1[a]
正常组	20	32±17.5	8.2±6.1	7.2±6.3

[a]$P<0.05$ *vs* 正常组; [c]$P<0.05$ *vs* 前一组; [e]$P<0.05$ *vs* 训练前组; [q]$P<0.05$ 低位直肠癌训练后评分良组 *vs* 评分优组.

3 讨论

3.1 *生物反馈训练方案的制定及其科学依据* 生物反馈治疗是指利用各种技术，以视、听觉的形式显示体内生理活动，通过指导和自我训练有意识地对某些出现异常的生理活动进行矫正，达到治疗疾病的目的[1, 10-11]. 在目前关于排便功能障碍的生物反馈治的文献中，大多数作者都只注重大便失禁或便秘的症状，对不同疾病导致的大便失禁或便秘患者都放在一起使用相同的方法进行治疗，并没有区别导致排便功能障碍的具体病因[12-14]. 由于排便控制是一个复杂的生理反射和调控过程，许多机制均参与维持排便控制. 直肠癌手术后存在着复杂的病理改变，参与排便控制的多种机制都可能出现异常，不同患者存在的异常机制也不相同. 笔者利用各种客观检测手段对直肠癌患者的不同排便控制机制进行了较全面细致的检测，并根据检测结果提出了5种不同的生物反馈训练方法，不同患者根据自身客观检测结果选取其中一种或几种方法并配合排便习惯训练，取得了非常明显的治疗效果. 经过生物反馈训练之后进行临床评分，除4例低位直肠癌患者为良以外均达到了优的效果，同时直肠癌术后患者的便秘症状也获得明显缓解.

由于外科手术损伤，常常使直肠癌术后的患者存在严重的内外括约肌功能障碍，导致便障碍. 文献认为患者术中行超低前切除术新直肠容量和支配括约肌的神经及直肠神经感受器的破坏等均是引起排便障碍的原因. 通过客观检测反映内外括约肌功能的指标在患者组远远低于正常组. 因此进行增强肛周肌肉力量的训练是最基本的最重要的训练方法. 在加强肌肉力量训练的同时，进行延长最大收缩时间的训练也是非常重要的. 训练后最大收缩时间均有明显延长，表明肌肉的抗疲劳性明显增强. 这可能是通过训练肛周肌肉由II型肌纤维向I型转化，I型肌纤维可维持持久的张力性活动，并产生静息电位. 由表1可以看出静息肌电振幅经过训练升高很慢，只有低位直肠癌患者的振幅出现统计学差异，这可能由于低位直肠癌患者训练时间较长，也表明肌纤维类型转化很困难. 直肠癌患者加强肛周肌肉力量训练需要时间较长，约占整个生物反馈训练时间的4/5.

直肠感觉阈值是反映直肠敏感性的重要指标，直肠癌患者感觉阈值与临床评分具有明显的负相关，因此改善直肠感觉也是提高临床评分的关键. 改善直肠感觉可以提高直肠对小块粪便的感觉能力，及时收缩外括约肌，能有效地防止便失禁发生. 由于直肠癌患者的直肠感觉阈值改变十分严重，因此训练比较困难，所需训练时间也

比较长.虽然经过训练直肠感觉阈值降为正常，但如果感觉收缩时间延长，也能引起大便失禁.通过训练使感觉收缩时间短于膨胀松弛时间，使患者在粪便进入直肠尚未引发内括约肌松弛反射之前能够收缩外括约肌，达到治疗便失禁的目的.因为有许多直肠癌患者直肠肛管收缩反射为阴性，膨胀收缩时间正常后还要进行不断强化巩固训练，以便建立一种条件反射，只要直肠出现膨胀，就立即自动引发肛门外括约肌收缩，防止便失禁.直肠肛管测压结果显示经过生物反馈训练之后直肠肛管收缩反射由48.4%(14/31)升至90.3%(28/31)，这表明生物反馈训练可明显改善肛门外括约肌功能.

通过检测排便时肛管压力和肛门括约肌痉挛指数，发现许多直肠癌患者存在明显的排便动力异常.因此对这部分患者我们还要进行矫正排便动力的生物反馈训练，经过训练使患者在排便时能够充分放松肛周肌肉，使粪便顺利通过肛管，减少排便阻力.许多作者利用这种方法对特发性便秘患者进行训练并获得非常满意的疗效[15-19].进行生物反馈训练的同时还要进行排便习惯训练，经过1 wk左右的训练患者都能按照要求定时排出粪便，这样至少每日3次排空直肠，减少粪便储留，可以从另一种机制防止大便失禁，同时也对便秘患者的治疗起很重要作用.进行排便习惯训练主要利用胃结肠反射，是指胃进食几分钟之后，结肠出现短时间的收缩活动增强，并产生便意.由于这种反应可持续30-60 min，因此充分利用胃结肠反射是排便训练能否成功的关键，这对于直肠功能较差的便秘患者尤为重要.笔者对31例患者在生物反馈训练前进行自己收缩肛门和排便习惯训练，临床评分也获得较大提高，再经过生物反馈训练之后，临床评分又获得更明显的提高，这表明虽然每个训练都通过不同的机制产生一定的治疗效果，但只有将这些不同机制的训练综合在一起才会产生更大的效果.因此我们主张进行生物反馈训练要在全面的直肠肛门功能客观评价之后，根据每一患者的不同改变，制定一套综合的训练方案是非常重要的.

3.2 生物反馈训练的客观指标变化和影响治疗效果因素的探讨 经过生物反馈训练，反映肛门外括约肌和臀大肌等肛周肌肉力量的客观指标均有非常明显的改善.收缩向量容积、收缩肌电振幅和最大收缩时间分别提高至原来的3.5，2.1和1.8倍，直肠感觉阈降低，膨胀收缩时间减少.而反映耻骨直肠肌功能的直肠肛管角只在中低位直肠癌患者组出现明显改变，反映内括约肌功能的指标改变不明显.反映肛门括约肌神经传导功能的指标也有明显恢复，尤其低位直肠癌患者非常明显，但仍未完全恢复正常，这表明神经异常的恢复非常缓慢，但经过较长时间训练也可明显恢复.

探讨影响疗效的因素对于提高治疗效果和预测疗效都具有重要意义，但由于生物反馈涉及心理学、生理学和机能康复治疗学等多个学科领域，因此影响疗效的因素很多，也很复杂，目前尚处于探索阶段[20-21].Park *et al*[1,3]强调排便功能障碍患者训练前有足够肛门静息压和良好的外括约肌肌电活动是生物反馈训练成功的基础.我们将生物反馈训练后疗效优良与差的两组低位直肠癌患者的客观指标进行比较，发现反映肛周肌肉力量和神经传导功能的指标在治疗前后均存在明显异常，表明肛门括约肌缺陷和支配括约肌的神经功能异常可能是影响疗效的主要因素.许多人则强调直肠感觉是生物反馈训练成功的关键，我们体会由于直肠癌患者术后直肠感觉异常严重，而且经过训练恢复较慢，因此直肠感觉异常也是影响疗效的主要因素之一.除此之外良好的医患关系，患者及家属对治疗的强烈要求和信心、患者没有心理障碍等也是保证生物反馈训练成功的关键因素.

3.3 生物反馈训练的临床应用价值 虽然生物反馈训练还有许多有待改进和发展的方面，但以其独特的疗法和可靠的疗效，已在临床引起极大重视，并获得广泛应用1[22-23].由于我们的生物反馈训练方案是在全面评价直肠肛门功能基础上，根据具体不同的病理生理改变制定的，因此更加适合于各种类型的排便障碍性疾病，包括直肠癌术后排便功能障碍、肛门括约肌损伤后大便失禁、特发性大便失禁、先天性巨结肠、结肠传输功能障碍、出口梗阻等慢性便秘也具有特异性疗效.同时生物反馈训练不仅仅重视对排便功能的改善，而且还注重患者生活质量的提高.生物反馈为多种疾病提供了一种操作简单、无损伤性并且疗效可靠的辅助性治疗方法.

4 参考文献

1 Park UC, Choi SK, Piccirillo MF, Verzaro R, Wexner SD. Patterns of anismus and the relation to biofeedback therapy. *Dis Colon Rectum* 1996;39:768-773

2 Ho YH, Chiang JM, Tan M, Low JY. Biofeedback therapy for excessive stool frequency and incontinence followinganterior resection or total colectomy. *Dis Colon Rectum* 1996;39:1289-1292

3 Gilliland R, Heymen S, Altomare DF, Park UC, Vickers D, Wexner SD. Outcome and predictors of success of biofeedback for constipation. *Br J Surg* 1997;84:1123-1126

4 Patankar SK, Ferrara A, Levy JR, Larach SW, Williamson PR, Perozo SE. Biofeedback in colorectal practice:a multicenter, statewide, three-year experience. *Dis Colon Rectum* 1997;40:827-831

5 Ho YH, Tan M. Biofeedback therapy for bowel dysfunction following low anterior resection. *Ann Acad Med Singapore* 1997;26:299-302

6 Gilliland R, Heymen JS, Altomare DF, Vickers D, Wexner SD. Biofeedback for intractable rectal pain:outcome and predictors of success. *Dis Colon Rectum* 1997;40:190-196

7 Heah SM, Ho YH, Tan M, Leong AF. Biofeedback is effective treatment for levator ani syndrome. *Dis Colon Rectum* 1997;40:187-189

8 Ho YH, Tan M, Goh HS. Clinical and physiologic effects of biofeedback in outlet obstruction constipation. *Dis Colon Rectum* 1996;39:520-524

9 Solomon MJ, Rex J, Eyers AA, Stewart P, Roberts R. Biofeedback for fecal incontinence using transanal ultrasonography: novel approach. *Dis Colon Rectum* 2000;43:788-792

10 Lau CW, Heymen S, Alabaz O, Iroatulam AJ, Wexner SD. Prognostic significance of rectocele, intussusception, and abnormal perineal descent in biofeedback treatment for constipated patients with paradoxical puborectalis contraction. *Dis Colon Rectum* 2000;43:478-482

11 Heymen S, Wexner SD, Vickers D, Nogueras JJ, Weiss EG, Pikarsky AJ. Prospective, randomized trial comparing four biofeedback techniques for patients with constipation. *Dis Colon Rectum* 1999;42:1388-1393

12 Mollen RM, Salvioli B, Camilleri M, Burton D, Kost LJ, Phillips SF, Pemberton JH. The effects of biofeedback on rectal sensation and distal colonic motility in patients with disorders of rectal evacuation:evidence of an inhibitory rectocolonic reflex in humans? *Am J Gastroenterol* 1999;94:751-756
13 Mavrantonis C, Wexner SD. A clinical approach to fecal incontinence. *J Clin Gastroenterol* 1998;27:108-121
14 苏琪, 吴硕东. 直肠癌术后肛门外括约肌的电生理研究. 中国临床康复 2004;8:3308-3309
15 王军, 齐清会, 董作亮. 生物反馈治疗慢性顽固性特发性便秘的临床研究. 基础医学与临床 2001;21:91
16 Palsson OS, Heymen S, Whitehead WE. Biofeedback treatment for functional anorectal disorders:a comprehensive efficacy review. *Appl Psychophysiol Biofeedback* 2004;29:153-174
17 Bharucha AE. Treatment of severe and intractable constipation. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2004;7:291-298
18 Beddy P, Neary P, Eguare EI, McCollum R, Crosbie J, Conlon KC, Keane FB. Electromyographic biofeedback can improve subjective and objective measures of fecal incontinence in the short term. *J Gastrointest Surg* 2004;8:64-72
19 Battaglia E, Serra AM, Buonafede G, Dughera L, Chistolini F, Morelli A, Emanuelli G, Bassotti G. Long-term study on the effects of visual biofeedback and muscle training as a therapeutic modality in pelvic floor dyssynergia and slow-transit constipation. *Dis Colon Rectum* 2004;47:90-95
20 Martinez-Puente Mdel C, Pascual-Montero JA, Garcia-Olmo D. Customized biofeedback therapy improves results in fecal incontinence. *Int J Colorectal Dis* 2004;19:210-214
21 Fernandez-Fraga X, Azpiroz F, Aparici A, Casaus M, Malagelada JR. Predictors of response to biofeedback treatment in anal incontinence. *Dis Colon Rectum* 2003;46:1218-1225
22 Wang J, Luo MH, Qi QH, Dong ZL. Prospective study of biofeedback retraining in patients with chronic idiopathic functional constipation. *World J Gastroenterol* 2003;9:2109-2113
23 Tariq SH, Morley JE, Prather CM. Fecal incontinence in the elderly patient. *Am J Med* 2003;115:217-227

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

CAB Abstracts 和 Global Health 收录 World Journal of Gastroenterology

本刊讯 CAB International 对 WJG 仔细评阅，发现 WJG 报到的范围与 CAB International 兴趣范围一致，因此 CAB International 将 WJG 收录在 CAB Abstracts 和 Global Health 的索引内. CAB International 是一个非盈利的政府之间的组织，致力于全球范围传播知识. CAB 覆盖全球的优秀杂志，全球数据库的用户能够获得全文.(世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 收录 World Journal of Gastroenterology

本刊讯 在 2004 年 11 月，Nature Publishing Group 将会出版一系列杂志，题为自然临床实践，包括肿瘤、心血管、泌尿、胃肠病学和肝脏病学，这些文章会应用于临床患者和医生. Nature Publishing Group 收录非常有影响的杂志，*World Journal of Gastroenterology* 也被收录. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 为非常繁忙的胃肠病学家和肝脏病学家提供其专业的概况和其领域的所有的关键的进展，更重要的是这些进展会为他们的患者提供进一步的帮助. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology* 提供电子和印刷版，其主编为 Stephen Hanauer. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

World Journal of Gastroenterology 办刊宗旨

《*World Journal of Gastroenterology*，WJG》的任务是及时报道和刊登国内外、特别是我国消化病学者具有创造性的、有较高学术水平的基础和临床研究论文、研究快报等. 对具有中国特色的研究论文，如食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合和基于作者自己研究工作为主的综述性论文，将优先发表，使WJG成为我国消化疾病临床和基础科学研究对外学术交流的窗口和我国优秀医务工作者走向世界的桥梁.

·临床经验·

心肺复苏后中枢神经功能障碍与急性胃黏膜病变的关系

孙亚新,徐 岩,韩秀文,贺 杰,郭英惠,付秀清

孙亚新,徐岩,韩秀文,贺杰,郭英惠,付秀清,四平市中心医院消化内镜中心 吉林省四平市 136000
项目负责人: 孙亚新,136000,吉林省四平市铁西区迎宾街89号,四平市中心医院消化内镜中心. sunyaxin2004@126.com
电话:0434-3622616 传真:0434-3636627
收稿日期:2004-11-23 接受日期:2004-12-16

摘要

目的: 研究心肺复苏后发生急性胃黏膜病变(AGML)与中枢神经功能障碍的关系.

方法: 对急诊来院的36例内源性心脏骤停心肺复苏后发生上消化道出血患者在48-120 h内行上消化道内镜检查,依据检查所见AGML存在与否及发生部位分组,胃窦部发生AGML者为A组(10例),胃内其他部位发生AGML者为B组(16例),AGML以外出血者为C组(10例).脑干功能应用脑干听觉诱发电位(BAEP)评价,大脑功能应用脑电波(EEG)评价.

结果: A组BAEP测定I、III、V波峰间期100%正常,脑干功能正常;B组12.5%正常,25%延长,62.5%III、V波消失;C组30%正常,70%III、V波消失.B组和C组脑干功能障碍明显.EEG显示重度异常者在A组为10%,B组93.8%,C组80%.B组和C组大脑功能严重障碍.A组脑死亡为0%,植物状态为30%,神志转清占70%;B组为68.8%,25%,6.2%;C组为70%,20%,10%.B组和C组脑死亡及植物状态发生率明显高于A组.BAEP,EEG及意识障碍程度在A组和B组间、A组和C组间均有显著性差异($P<0.01$或$P<0.05$),但在B组和C组间无显著性差异.

结论: 心肺复苏后发生AGML在胃内分布状况与中枢神经功能障碍密切相关,AGML发生在胃窦部者脑干及大脑功能障碍相对较轻,预后良好.

孙亚新,徐岩,韩秀文,贺杰,郭英惠,付秀清.心肺复苏后中枢神经功能障碍与急性胃黏膜病变的关系.世界华人消化杂志 2005;13(3):424-425
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/424.asp

0 引言

心肺复苏后患者常发生不同程度的上消化道出血,且多为急性胃黏膜病变(AGML),日本学者洲崎文男 *et al*[1] 研究认为,此种AGML在胃内分布状况与脑功能障碍程度呈正相关性.因此,我们对1999-03以来的内源性心脏骤停复苏后发生上消化道出血患者进行研究,证实AGML特征性分布与中枢神经功能障碍密切相关.现报告如下.

1 材料和方法

1.1 *材料* 选择1999-03以来5 a间急诊来院心脏骤停心肺复苏后48 h以内发生上消化道出血且生命指征平稳者36例作为研究对象.自主呼吸未恢复或光反射消失等重度脑功能障碍、合并严重的脏器功能衰竭、既往有消化性溃疡或肝硬化病史、有出血倾向以及必须使用抗凝治疗的病例不列为研究对象.36例中男25例,女11例,年龄31-69岁,平均57±6.71岁.心脏骤停的基础病因中冠心病19例,脑血管意外9例,急性中毒5例,肺心病3例.

1.2 *方法*

1.2.1 *内镜检查* 所有研究对象复苏后48-120 h内行上消化道内镜检查,术前不特殊用药,采用多功能监护仪监测血压及心肺功能.依据检查所见AGML存在与否及发生部位分组,胃窦部发生AGML者为A组,胃内其他部位发生AGML者为B组,AGML以外出血者为C组.

1.2.2 *中枢神经功能检查* 脑干功能评价应用脑干听觉诱发电位(BAEP),大脑功能评价应用脑电波(EEG),均在复苏后第5 d进行.BAEP选用声强阈上80-90 DB声压水平,重复频率10 Hz,单耳刺激,对侧耳施加白躁声掩蔽.测定I波、III波及V波峰间期正常者为脑干功能正常,峰间期延长者为中度脑干功能障碍,III波及V波消失者为重度脑干功能障碍.EEG按Hockerday分类[2]将大脑功能障碍分为5型,我们把I型列为轻度功能障碍,II、III型列为中度功能障碍,IV、V型列为重度功能障碍.

1.2.3 *血气分析检查* 因研究对象被发现时已经心跳停止,难于准确判定其时间,所以即时进行动脉血气分析(pH及base excess)有助于估测心跳停止至开始复苏的时间.

统计学处理 所有数据均以平均值±标准差(mean±SD)表示,两组间比较采用 t 检验.

2 结果

2.1 *内镜检查结果* 36例中AGML 26例,其中A组10例,病变发生于胃窦部,内1例胃底部亦见AGML. B组16例胃窦部未见AGML,病变主要位于胃底及胃体上部.C组无AGML出血10例,出血原因有:胃管压迫致食管及胃底黏膜损伤6例,心外按压致贲门黏膜撕裂4例.3组均无慢性消化性溃疡及恶性肿瘤.

2.2 *中枢神经功能检查结果*

2.2.1 *BAEP与AGML分布的关系* A组BAEP测定I、III、V波峰间期100%正常,脑干功能正常;B组12.5%正常,25%延长,62.5% III、V波消失;C组30%正常,70% III、V波消失.B组和C组脑干功能障碍明显.

2.2.2 *EEG与AGML分布的关系* EEG显示重度异常者在A组为10%,B组93.8%,C组80%.B组和C组大脑功能严重障碍.

2.2.3 *意识障碍程度与AGML分布的关系* 意识障碍分为

表1 急诊来院时3组动脉血气分析所见

	A组	B组	C组	*P*值
PH	7.1 ± 0.1	7.1 ± 0.2	7.0 ± 0.2	>0.05
base excess	−14.8 ± 5.7	−13.5 ± 5.8	−16.8 ± 6.2	>0.05

脑死亡、植物状态及神志转清，A组脑死亡为0%，植物状态为30%，神志转清占70%;B组为68.8%，25%，6.2%;C组为70%，20%，10%.B组和C组脑死亡及植物状态发生率明显高于A组.

BAEP、EEG及意识障碍程度在A组和B组间、A组和C组间均有显著性差异($P<0.01$和$P<0.05$)，但在B组和C组间无显著性差异.

2.3 血气分析结果 急诊来院时3组病例动脉血pH值平均7.0-7.1，大致相近($P>0.05$)，base excess值虽然C组较低，但经统计学处理3组间无显著性差异($P>0.05$)(表1).

3 讨论

AGML是指急性应激等状态下发生的胃黏膜糜烂和出血，其机制尚未完全阐明，但认为胃黏膜缺血和胃酸反弥散进入黏膜为主要发病因素.由于心脏骤停心肺复苏后患者存在着短暂性全身血流停止及再通过程，故AGML发生可能与中枢神经功能及胃黏膜缺血再灌流密切相关.本组病例急诊来院时血气分析显示A组和B组无显著性差异，说明两组心搏停止时间大致相近，胃内处于同样的低氧状态.但AGML在胃内的分布却有明显的偏向性，其原因就不仅仅是胃黏膜局部因素，与复苏后中枢神经功能障碍有直接关系.Cushing *et al*早期研究指出，AGML中枢性成因在中脑，其后的动物实验研究进一步证实大脑边缘系统，特别是海马结构在AGML发生上起主导作用[3-4]，迷走神经依赖性受体激素如促甲状腺素释放激素及5-羟色胺也影响着AGML的发生与加重[4].

EEG用于意识障碍者大脑功能评价效果肯定，BAEP则是通过检查听觉传导途径来评价脑干功能，两者联合应用，可有效检测大脑皮质及脑干功能障碍程度.我们对36例心肺复苏后患者通过内镜检查探讨中枢神经功能障碍与AGML发生的关系，发现病变位于胃窦部的A组BAEP检测结果全部在正常范围，EEG显示重度脑电波改变者仅1例，与B组和C组相比中枢神经功能障碍较轻，预后良好，无1例发生脑死亡，70%神志转清.而胃窦部以外发生AGML者BAEP和EEG均显示重度脑干及大脑功能障碍，预后不良.研究结果提示，复苏后胃窦部发生AGML者脑干功能较好，大脑功能障碍相对较轻.其发生机制与中枢性及胃黏膜局部因素密切相关，可能是迷走神经依赖性受体激素作用增强及胃窦部特殊性收缩运动所致[5].也有复苏后不合并AGML出血者，主要与应激状态及各种损伤性操作有关.

由于我们的研究对象是心肺复苏患者，虽然生命指征平稳，但仍存在着不同程度的意识障碍，尤其行气管切开术后患者，接受内镜检查较为勉强并有风险.故笔者认为，检查前要征得家属同意并配合，应在严密监视下由有经验的内镜医师操作，仔细查找出血病灶，观察有无AGML及其发生部位，并详实记录.本组病例全部一次性内镜插管成功，未发生窒息及再次心搏停止者.说明即使患者具有重度意识障碍，在严密监护下行内镜检查也是较为安全的.

4 参考文献

1 洲崎文男,铃木亮一,杉山贡.心肺停止生例の中枢神经系障害と急性胃黏膜病变の关系.日本消化器病学会杂志 1997;94:18-23

2 Hockaday JM, Potts F, Epstein E, Bonazzi A, Schwad RS. Electroencephalogrphic changes in acute cerebral anoxia from cardiac or respiratory arrest. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1965;18:575-586

3 Henke PG, Ray A, Sullivan RM. The amygdala, Emotions and gut functions. *Dig Dis Sci* 1991;36:1633-1643

4 Marrow NS, Grijalva CV, Geiselman PJ, Novln D. Effects of amygdaloid lesions on gastric erosion formation during exposure to activity-stress. *Physiol Behav* 1993;53:1043-1048

5 Uchida K, Mitsuma T, Kaneko H, Nagal H, Furusawa A, Nakada K, Maeda Y. The role of thyrotropin-releasing hormone(TRH)in the pathogenesis of water-immersion stress in rats inhibition of TRH release from the stomach by atropine, ranitidine or omeprazole. *Gastroenterol Jpn* 1993;28:1-9

编辑 张海宁

·临床经验·

小肠内固定空肠造口术治疗和预防粘连性肠梗阻

胡俊波, 杨传永, 严 群, 杨福文, 龚建平

胡俊波, 杨传永, 严群, 杨福文, 龚建平, 华中科技大学同济医学院附属同济医院外科 湖北省武汉市 430030
项目负责人: 杨传永, 430030, 湖北省武汉市汉口区解放大道1095号, 同济医院胃肠外科. yanghui@tjh.tjmu.edu
电话: 027-83662189 传真: 027-83646605
收稿日期: 2004-08-16 接受日期: 2004-11-04

摘要

目的: 探讨粘连性肠梗阻的治疗和预防方法.

方法: 回顾性分析本院自2001-01/2004-01 31例术中诊断为粘连性肠梗阻或术后极有可能再次发生粘连性肠梗阻而行小肠内固定空肠造口术患者的临床资料.

结果: 31例患者均无手术死亡和肠瘘发生, 术后有6例发生切口感染.其中28例患者随访了6 mo到3 a, 均无肠梗阻复发.

结论: 小肠内固定空肠造口术是治疗和预防粘连性肠梗阻复发的简便、安全、有效的手段, 具有一定临床实用价值, 值得推广.

胡俊波, 杨传永, 严群, 杨福文, 龚建平. 小肠内固定空肠造口术治疗和预防粘连性肠梗阻. 世界华人消化杂志 2005;13(2):426-427
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/426.asp

0 引言

粘连性肠梗阻是外科常见急腹症, 容易复发, 处理棘手, 特别是反复粘连者, 故预防和治疗肠粘连导致的肠梗阻一直是外科医师关注的问题. 单纯手术只能松解粘连, 且术后常进一步加重粘连, 多次手术不但加重病情, 预后亦差. 为此, 学者们提出了多种治疗和预防措施. 我们回顾性地分析2001-01/2004-01我科对在手术中诊断为粘连性肠梗阻或术后可能再次发生粘连性肠梗阻的31例患者采用小肠内固定空肠造口术治疗, 取得了满意得疗效. 报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 本组患者31例, 男18例, 女13例. 年龄最大78岁, 最小21岁, 平均39岁. 有腹部手术史者26例, 其中上腹部手术史者10例(胃、胰腺、脾脏手术), 下腹部手术史16例(结直肠、妇科手术); 曾一次肠粘连行松解手术者8例, 两次和两次以上手术者13例, 肠梗阻反复发作, 但未做过肠梗阻松解手术者3例, 无手术史者5例, 茧腹症2例, 克罗恩氏病3例. 小肠内固定空肠造口术的手术适应证: (1) 粘连性肠梗阻反复多次手术者; (2) 腹部严重的创伤并发腹腔严重感染或空腔脏器穿孔致弥漫性腹膜炎者; (3) 小肠粘连松解术后具有广泛的浆膜粗糙面者; (4) 茧腹症并发肠梗阻非手术治疗无效者; (5) 克罗恩氏病穿孔并发腹腔慢性炎性包块可切除者; (6) 肿瘤化疗后并发完全性肠梗阻者等. 小肠内固定空肠造口术的手术禁忌证: (1) 单纯性粘连性肠梗阻; (2) 克罗恩氏病并发广泛性肠粘连者; (3) 肿瘤放疗后并发放射性肠炎肠梗阻者. 此术式的并发症较少见, 有可能并发远端出口处肠瘘, 其原因可能系: 出口处荷包缝合不牢靠或患者合并重度营养不良. 另外拔管时速度过快力量过大易导致肠套叠或将管拉断, 本组未发生上述并发症.

1.2 方法 手术一般取原切口, 超出其上或下端3 cm, 在无粘连处切开腹膜, 无手术史者则取左、右旁正中探查切口. 进腹后应首先分离与前腹壁、侧腹壁、大网膜的粘连, 检查全部肠管, 了解梗阻的部位、形式和程度, 以确定手术方式. 需作小肠内固定者, 按以下步骤处理.

1.2.1 分离、松解粘连, 解除梗阻, 肠腔减压 对无肠管绞窄坏死者, 先切除粘连带, 肠管成角或压迫形成梗阻的粘连部分分离松解, 视具体情况选择在梗阻之上方行肠腔减压后并缝合减压孔. 对于已有绞窄坏死的肠管, 肠壁损伤严重者; 一组较短肠袢紧密粘连成团难以分离者, 予以切除, 一期吻合. 然后行肠内置管固定. 术中注意肠切除的范围不要过大, 尽量保留有生机的肠管.

1.2.2 肠内置管固定空肠造口术 取一根乳胶管, 直径大于0.5 cm, 长度视术中肠管的长度而定, 一般3-4 m, 其位于肠腔内的两端各剪5-6个侧孔, 侧孔间距5-10 cm, 横经不超过管径的1/3, 插管则从上向下顺行插入, 首先同空肠造瘘一样, 在距屈氏韧带远端约20 cm处的肠壁上切开一小孔, 将备好的乳胶管套上5-6 cm的玻璃棒(玻璃棒的另端套上一段5 cm长的乳胶管, 便于肠内置管以及避免置管时损伤肠管)便于插入, 沿空肠一直插到回盲部, 切除阑尾, 从阑尾基部穿出, 并于阑尾基部做一双层荷包缝合包埋, 然后将此管与其相对应的腹壁穿出固定. 管近端同空肠造瘘一样处理, 从左上腹壁另戳孔穿出, 妥善固定. 腹腔清理干净, 将小肠从上至下依次呈大弧度顺其自然置于腹腔, 关腹.

1.2.3 术后处理 防止内固定管滑脱, 近、远端穿出腹壁处要固定好. 术后早期行肠管减压(两端接引流袋), 并可从此管注入少量中药或蓖麻油, 促进肠蠕动尽早恢复. 对如克罗恩氏病则可通过此管直接局部给药, 较其他给药途径效果更佳. 可经此管行肠内营养. 术后2 d开始给予平衡液500 mL加10%氯化钾溶液20-40 mL缓慢滴注24 h, 待肠功能恢复(引流管远端有气体或液体排出)后, 可给予肠内营养制剂(如能全力、瑞素等). 一般在

术后2 wk左右可拔出内固定管.剪去消毒后的肠排列管近端体外部分，从远端拔出，拔管时动作应轻柔、缓慢，以免造成肠套叠.患者如有不适，不必一次性拔出，可于1-2 d内分次拔出.造瘘口一般4-5 d左右愈合.如需继续肠内营养，可适当延长拔管时间.

2 结果

26例复杂性粘连性肠梗阻全部治愈，无手术死亡和肠瘘发生，术后随访6 mo至3 a，无肠梗阻复发;2例茧腹症，3例克罗恩氏病及2例严重腹部外伤者也全都获治愈.

3 讨论

腹部手术后，肠粘连致肠梗阻仍然是腹部外科医生的重大难题，有人报道腹部外科手术后约90%的患者存在粘连，40%以上会起粘连性肠梗阻[1].肠管粘连扭曲、成角致肠梗阻特别是复发的或再次手术后的粘连性肠梗阻一直困扰着外科界.为使肠管产生有序粘连而不致于肠梗阻，维持小肠正常生理功能，肠排列固定术在临床上的应用不断改进和发展[2-3].

小肠内固定术[4-6]的原理是:利用导管的弹性作用将形成大弧度的肠粘连固定，避免形成锐角、扭曲，从而达到预防术后肠梗阻复发.相比较，我们认为肠内固定术还具有如下优点:(1)小肠内固定术较小肠外固定操作简单，对小肠浆肌层没有因固定缝合而增加人为损伤，术后减少肠漏以及肠间感染等并发症的发生;(2)采用直径大于0.5 cm乳胶管作小肠内固定空肠造口术，此管比传统的M-A管、胃管、改良的Baker管等相比，其弹性好，口径大，支撑引流效果好，且其长度留有充分余地，可根据患者的肠管实际长度截取;(3)小肠置管内固定空肠造口，术后其两端开放引流减压无需置胃管行胃肠减压，不影响患者术后咳嗽、呼吸，且其术后胃肠减压效果好，可明显减少术后呼吸系统并发症;(4)术后早期经空肠造口给予肠内营养，既有利于患者术后较快地恢复健康，又明显减轻经济负担.本组先前9例术后早期即开始给予肠内营养，我们发现8例有不同程度的腹胀，甚至呕吐，立即停止肠内营养并行减压处理，待肠道功能恢复后再行肠内营养后好转，后19例早期则只给予500 mL生理盐水缓慢滴入，待肠功能恢复后再给予肠内营养，则无不良反应发生.一般3 d后肠功能恢复，给予肠内营养，预后均好.3例克罗恩氏病，我们保留置管3-6 mo亦获痊愈.

总之，我们认为小肠内固定空肠造口术是治疗和预防粘连性肠梗阻复发的较为简便、有效、安全的方法，值得在临床推广应用.

4 参考文献

1 Ellis H. The clinical significance of adhesions:focus on intestinal obstruction. *Eur J Surg* 1997;557:5-9

2 李文东, 刘彦复. 粘连性肠梗阻的预防和治疗. 中国胃肠外科杂志 1999;2:77-78

3 任建安, 黎介寿. 肠排列术在预防粘连性肠梗阻中的应用. 中国实用外科杂志 2000;20:502-504

4 Grosfeld JL, Cooney DR, Csicsko JF. Gastrointinal tube stentplication in infants and Children. *Arch Surg* 1975;110:594-599

5 黎介寿. 认识术后早期肠梗阻的特性. 中国实用外科杂志 1998;18:387-388

6 胡智明, 周寿椿, 赵大建, 陶厚权. 腹部手术后早期炎症性肠梗阻的治疗. 中国胃肠外科杂志 2000;4:236-237

7 Timerbulatov VM, Khunafin SN, Gattarov Ikh, Kunafin MS. The clinical picture and surgical treatment of adhesive intestinal obstruction. *Vestn Khir Im I I Grek* 1999;158:36-39

编辑 张海宁

• 致谢 •

致谢世界华人消化杂志审稿人

本期文章审稿中(包括退稿)，审稿人精心的审稿，为提高世界华人消化杂志的质量而贡献了力量. 编辑和投稿作者，非常感谢顾问、编委和审稿人的帮助.

陈红松 副研究员
北京大学肝病研究所
陈仕珠 主任医师
中国人民解放军第451医院
陈孝平 教授
华中科技大学同济医学院附属同济医院肝胆外科中心
崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科
董蕾 教授
西安交通大学第二医院消化内科
房殿春 教授
中国人民解放军第三军医大学西南医院消化内科
房静远 教授
上海第二医科大学附属仁济医院
谷俊朝 副教授
首都医科大学附属北京友谊医院普外科
韩泽广 主任
上海国家人类基因组南方研究中心
洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科
冀振华 副主任医师
海军总医院肝胆外科
李东辉 副研究员
厦门大学生命科学学院抗癌研究中心
林勇 讲师
中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科
梅林 教授
北京大学医学部生理学与病理生理学系
南极星 副教授
延边大学医学院
彭吉润 副教授
北京大学人民医院肝胆外科中心
钱建民 教授
南京医科大学第一附属医院肝胆外科
石统东 副教授
中国人民解放军第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所
石雪迎 讲师
北京大学医学部病理学系
唐承薇 教授
四川大学华西医院
王小众 副教授
福建医科大学附属协和医院消化内科
王振军 教授
北京大学第一医院普外科
徐克成 教授
深圳市养和医疗中心
徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院
许洪卫 教授
上海同济大学附属铁路医院普通外科
许玲 副教授
中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科
杨东亮 教授
武汉华中科技大学同济医学院附属同济医院
于皆平 教授
湖北医科大学附属第一医院消化内科
喻荣彬 副教授
南京医科大学流行病与卫生统计学系
张吉翔 教授
江西医学院第二附属医院
张学 教授
中国医学科学院基础医学研究所医学遗传学系
钟鸣 副研究员
广西民族医药研究所