

重视瘦素在肝纤维化领域中的研究

李定国, 刘清华

李定国, 刘清华, 上海第二医科大学附属新华医院消化科 上海市 200092
李定国, 男, 1946-9-6 生, 上海市人, 汉族, 博士、教授、博士生导师, 现任上海第二医科大学附属新华医院内科学教研室主任、消化内科主任, 上海第二医科大学消化疾病第三研究室主任、临床流行病学研究中心主任, 主要从事慢性肝病的基础及临床研究工作。

通讯作者: 李定国, 200092, 上海市杨浦区控江路 1665 号, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科, dingguo_li@hotmail.com

电话: 021-65790000 传真: 021-55055127

收稿日期: 2005-03-31 接受日期: 2005-04-09

摘要

瘦素(leptin)是一种由肥胖基因编码的分泌型蛋白质, 具有广泛的生物学效应。近年来的研究显示, 瘦素与肝纤维化形成之间有密切联系。在慢性病毒性肝炎、酒精性肝硬化、原发性胆汁性肝硬化等患者中均可见血清瘦素水平异常。目前国内外研究主要集中于瘦素与活化肝星状细胞(HSC)间的关系、瘦素对细胞因子分泌的调控, 以及瘦素对肝纤维化胶原产生及降解的影响。本文从流行病学入手, 阐述瘦素促进肝纤维化形成的证据, 以探讨瘦素参与肝纤维化的作用机制, 强调瘦素在该领域中的研究已初见端倪, 必须引起我们足够的重视。

关键词: 瘦素; 肝纤维化

李定国, 刘清华. 重视瘦素在肝纤维化领域中的研究. 世界华人消化杂志 2005; 13(15):1801-1803

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1801.asp>

0 引言

瘦素(leptin)的命名源于希腊文“leptos”, 是指肥胖(obese, ob)基因编码的分泌性蛋白质, 由 167 个氨基酸组成^[1]。自 1994 年 Zhang *et al*^[2]首次成功定位克隆小鼠 ob 基因及人类同源序列以来, 对瘦素的研究已由单纯的食欲控制和能量消耗^[3-4], 扩展到包括免疫应答、胰岛素分泌、血管内皮发生和损伤愈合等全身各个病理生理过程^[5-13]。最近, 一系列临床及基础研究还显示瘦素可能参与肝纤维化形成, 相关机制的研究正逐步展开。

1 流行病学资料

有统计资料显示: 肥胖人群肝硬化发病率是普通人群的 6 倍, 而且肥胖是多种慢性肝病(如丙型肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝病等)肝纤维化发展的重要危险因素^[14-23], 提示作为肥胖调控蛋白—瘦素, 可能与肝纤维化形成存在某种必然联系。

目前, 有关临床流行病学资料有以下一些特点: (1) 慢性肝病患者血清瘦素水平明显异常; (2) 血清瘦素水平与慢性肝病的严重程度有关。但是, 可能受到所选人群、肝病病因及严重程度、机体脂肪含量评估方法等因素影响, 上述特点各家报道结论相佐。

2 瘦素促进肝纤维化形成的直接证据

2001 年, Ikejima *et al*^[24]首次证实瘦素在肝纤维化形成中起促进作用。他们发现在四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)或硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)诱导的 C57B1/6 雄性小鼠急、慢性肝损伤模型中, 一定浓度外源性瘦素能明显上调 $\alpha_1(I)$ 前胶原基因表达, 促进促纤维化因子—转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 以及肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化标志— α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)表达。

此后, 多个研究小组先后观察到在瘦素先天缺乏的 ob/ob 小鼠中, 由 CCl₄、TAA 或曼氏血吸虫诱导的肝组织纤维化反应明显低于野生型小鼠, 肝组织中的 $\alpha_1(I)$ 前胶原、TGF- β_1 基因表达明显受到抑制; 给予 ob/ob 小鼠注射外源性瘦素使其回复生理水平, 则肝组织纤维化程度与野生型小鼠相当^[25-27], 有力地印证瘦素是肝纤维化发生发展的促进因子。

3 作用机制探讨

瘦素的生物学效应是由瘦素受体(leptin receptor, ob-R)介导的。ob-R 为单跨膜细胞表面受体, 目前已发现的有全长型(ob-Rb)及不同剪接(ob-Ra、c、d、f、e)等至少 6 种形式, 其中 ob-Rb 是主要的功能性受体。瘦素与靶细胞表面 ob-Rb 结合后, 通过激活 Janus 激酶/信号转导与转录激活因子(janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)途径调控靶基因转录, 也可经分裂素活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和磷酸肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3-K)等通路传递信号^[28-37]。

早期研究显示活化的 HSC 能表达瘦素, 然而在 HSC 仅作为瘦素的来源抑或是瘦素自分泌/旁分泌直接效

应细胞这一问题上仍存在分歧. Ikejima *et al*^[38-39]在进行瘦素促肝纤维化作用机制及相关细胞学基础研究时发现:HSC表达的是ob-Ra, 非功能性ob-Rb;外源性瘦素(100 nmol/L)不能促进HSC的STAT3磷酸化与 α_1 (I)前胶原基因表达;从Zucker大鼠(fa/fa大鼠, 因ob-R基因突变而对瘦素抵抗)和正常大鼠分离的HSC在体外以相同的方式活化, 结合肝窦内皮细胞(sinusoidal endothelial cell, SEC)、库普弗细胞(Kupffer cell, KC)表面均表达ob-Rb, 对外源性瘦素表现为以TGF- β_1 高表达为特点的应答反应, 推测HSC是瘦素的来源而不是直接效应细胞. 然而, Saxena *et al*^[40-41]认为鉴于正常大鼠HSC及其细胞株均能表达ob-Rb;在外源性瘦素刺激下, HSC的 α_2 (I)前胶原基因及STAT3磷酸化增加;在JAK2阻滞剂AG490阻断ob-Rb磷酸化后, 瘦素诱导的HSC增殖受到抑制, 提示瘦素直接作用于HSC促进肝纤维化发生.

HSC活化受细胞信号网络系统的调控, 其中TGF- β_1 起关键性作用. Tang *et al*^[42-43]发现:外源性瘦素(100 nM)能促进人HSC细胞株表达TGF- β_1 II型受体;与TGF- β_1 同时作用于细胞株时, 将使TGF- β_1 促胶原合成的效应放大至单独作用时的3.5倍, 显示瘦素致肝纤维化机制与TGF- β_1 密切相关, 二者具有协同作用.

总之, 瘦素与肝纤维化的研究已初见端倪, 必须引起我们重视. 但是, 由于国内外的研究尚处于起步阶段, 要解答“瘦素在肝纤维化形成中的作用到底有多大”, 有赖于对其作用机制进行深入研究. 我们认为今后的研究方向有两个方面: (1)开展大规模、多病因、多层次的流行病学调查, 在设计时应摒弃性别、体重、肥胖、糖尿病、肾功能不全等混杂因子的干扰; (2)开展瘦素与细胞信号网络系统的基础研究, 在研究中可采用基因敲除、小RNA干扰等技术控制相互间的影响. 因此, 探明瘦素与肝纤维化的确切关系, 有望揭示肝纤维化机制新的切入点, 对肝纤维化防治具有重要的临床和理论价值.

4 参考文献

- Houseknecht KL, Baile CA, Matteri RL, Spurlock ME. The biology of leptin: a review. *J Anim Sci* 1998;76:1405-1420
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994;372:425-432
- Clement K, Boutin P, Froguel P. Genetics of obesity. *Am J Pharmacogenomics* 2002;2:177-187
- Boutin P, Froguel P. Genetics of human obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001;15:391-404
- Considine RV. Human leptin: an adipocyte hormone with weight-regulatory and endocrine functions. *Semin Vasc Med* 2005;5:15-24
- Mattioli B, Straface E, Quaranta MG, Giordani L, Viora M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. *J Immunol* 2005; 174:6820-6828
- Kougias P, Chai H, Lin PH, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. Effects of adipocyte-derived cytokines on endothelial functions: implication of vascular disease. *J Surg Res* 2005;126:121-129
- Tasdelen A, Algin C, Ates E, Kiper H, Inal M, Sahin F. Effect of leptin on healing of colonic anastomoses in rats. *Hepatogastroenterology* 2004;51:994-997
- Peelman F, Iserentant H, Eyckerman S, Zabeau L, Tavernier J. Leptin, immune responses and autoimmune disease. Perspectives on the use of leptin antagonists. *Curr Pharm Des* 2005; 11:539-548
- Matarese G, Sanna V, Fontana S, Zappacosta S. Leptin as a novel therapeutic target for immune intervention. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1:13-22
- Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Najib S, Gonzalez-Yanes C. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol* 2003;133:11-19
- Sharma AM, Chetty VT. Obesity, hypertension and insulin resistance. *Acta Diabetol* 2005;42:S3-S8
- Seufert J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. *Diabetes* 2004;53:S152-S158
- Ben-Ari Z, Schafer Z, Sulkes J, Manheim V, Tur-Kaspa R, Fainaru M. Alterations in serum leptin in chronic liver disease. *Dig Dis Sci* 2002;47:183-189
- Onodera K, Kato A, Suzuki K. Serum leptin concentrations in liver cirrhosis: relationship to the severity of liver dysfunction and their characteristic diurnal profiles. *Hepatol Res* 2001;21: 205-212
- Campillo B, Sherman E, Richardet JP, Bories PN. Serum leptin levels in alcoholic liver cirrhosis: relationship with gender, nutritional status, liver function and energy metabolism. *Eur J Clin Nutr* 2001;55:980-988
- Nakamuta M, Tada S, Uchimura K, Enjoji M, Kinukawa N, Iwamoto H, Sugimoto R, Shimada M, Ohashi M, Sugimachi K, Nawata H. Serum leptin levels in patients with nonalcoholic chronic liver disease. *Hepatogastroenterology* 2001;48: 527-532
- Greco AV, Mingrone G, Favuzzi A, Capristo E, Gniuli D, Addolorato G, Brunani A, Cavagnin F, Gasbarrini G. Serum leptin levels in post-hepatitis liver cirrhosis. *J Hepatol* 2000; 33:38-42
- Testa R, Franceschini R, Giannini E, Cataldi A, Botta F, Fasoli A, Tenerelli P, Rolandi E, Barreca T. Serum leptin levels in patients with viral chronic hepatitis or liver cirrhosis. *J Hepatol* 2000;33:33-37
- Angulo P, Alba LM, Petrovic LM, Adams LA, Lindor KD, Jensen MD. Leptin, insulin resistance, and liver fibrosis in human nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2004;41: 943-949
- Piche T, Vandenbos F, Abakar-Mahamat A, Vanbiervliet G, Barjoan EM, Calle G, Giudicelli J, Ferrua B, Laffont C, Benzaken S, Tran A. The severity of liver fibrosis is associated with high leptin levels in chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* 2004;11:91-96
- Crespo J, Rivero M, Fabrega E, Cayon A, Amado JA, Garcia-Unzeta MT, Pons-Romero F. Plasma leptin and TNF-alpha levels in chronic hepatitis C patients and their relationship to hepatic fibrosis. *Dig Dis Sci* 2002;47:1604-1610
- Chitturi S, Farrell G, Frost L, Kriketos A, Lin R, Fung C, Liddle C, Samarasinghe D, George J. Serum leptin in NASH correlates with hepatic steatosis but not fibrosis: a manifestation of lipotoxicity? *Hepatology* 2002;36:403-409
- Ikejima K, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin augments inflammatory and profibrogenic responses in the murine liver induced by hepatotoxic chemicals. *Hepatology* 2001;34:288-297
- 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
- Honda H, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Lang T,

- Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology* 2002;36:12-21
- 27 Potter JJ, Rennie-Tankesley L, Mezey E. Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by *Schistosoma mansoni* infection and by chronic carbon tetrachloride administration. *J Hepatol* 2003;38:281-288
- 28 Myers MG Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *Recent Prog Horm Res* 2004;59:287-304
- 29 Bates SH, Myers MG Jr. The role of leptin receptor signaling in feeding and neuroendocrine function. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:447-452
- 30 Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiol Behav* 2004;81:223-241
- 31 Bates SH, Dundon TA, Seifert M, Carlson M, Maratos-Flier E, Myers MG Jr. LRB-STAT3 signaling is required for the neuroendocrine regulation of energy expenditure by leptin. *Diabetes* 2004;53:3067-3073
- 32 Craig J, Zhu H, Dyce PW, Petrik J, Li J. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2004;145:5355-5363
- 33 Shigemura N, Miura H, Kusakabe Y, Hino A, Ninomiya Y. Expression of leptin receptor (Ob-R) isoforms and signal transducers and activators of transcription (STATs) mRNAs in the mouse taste buds. *Arch Histol Cytol* 2003;66:253-260
- 34 Jin X, Fukuda N, Su J, Takagi H, Lai Y, Lin Z, Kanmatsuse K, Wang ZW, Unger RH. Effects of leptin on endothelial function with OB-Rb gene transfer in Zucker fatty rats. *Atherosclerosis* 2003;169:225-233
- 35 Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz MW, Myers MG Jr. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature* 2003;421:856-859
- 36 Muraoka O, Xu B, Tsurumaki T, Akira S, Yamaguchi T, Higuchi H. Leptin-induced transactivation of NPY gene promoter mediated by JAK1, JAK2 and STAT3 in the neural cell lines. *Neurochem Int* 2003;42:591-601
- 37 Zhao Y, Sun R, You L, Gao C, Tian Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:247-252
- 38 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
- 39 Ikejima K, Lang T, Zhang YJ, Yamashina S, Honda H, Yoshikawa M, Hirose M, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Expression of leptin receptors in hepatic sinusoidal cells. *Comp Hepatol* 2004;3:S12
- 40 Saxena NK, Titus MA, Ding X, Floyd J, Srinivasan S, Sitaraman SV, Anania FA. Leptin as a novel profibrogenic cytokine in hepatic stellate cells: mitogenesis and inhibition of apoptosis mediated by extracellular regulated kinase (Erk) and Akt phosphorylation. *FASEB J* 2004;18:1612-1614
- 41 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
- 42 Tang M, Potter JJ, Mezey E. Leptin enhances the effect of transforming growth factor beta in increasing type I collagen formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:906-911
- 43 Tang M, Potter JJ, Mezey E. Activation of the human alpha1 (I) collagen promoter by leptin is not mediated by transforming growth factor beta responsive elements. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:629-633

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 •

2006 年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行

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

据中国科技期刊引证报告(潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 1-289)统计, 世界华人消化杂志 2003 年发表文章 594 篇, 地区分布 25 个, 机构分布 191 个, 基金论文比 31%, 总被引频次 5249 次, 影响因子 2.924, 即年指标 0.529, 引用期刊数 260 种, 被引半衰期 3.06。中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》定期公布收录的中国科技论文统计源期刊的 10 个科学计量指标, 并根据此指标评选出中国百种杰出学术期刊。世界华人消化杂志获得 2001 年和 2003 年中国百种杰出学术期刊。

据《中文核心期刊要目总览 2004 年版》(戴龙基, 蔡蓉华主编. 北京: 北京大学出版社, 2004: 1-678), 采用了被引量、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有 51 种, 统计到的文献数量共计 9435301 篇次, 涉及期刊 39893 种次。参加核心期刊评审的学科专家达 1873 位。经过定量筛选和专家定性评审, 从中国正在出版的近 1 万 2 千种中文期刊中评选出 1800 种核心期刊。世界华人消化杂志被评为中文核心期刊要目总览。

世界华人消化杂志发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

世界华人消化杂志 2006 年由北京报刊发行局发行, 国内统一刊号 CN 14 1260/R, 邮发代号 82-262, 出版日期 8, 18, 28 日, 页码 160, 月价 72.00。(世界胃肠病学杂志社 2005-06-29)

胃癌中医证候特点分析 767 例

许玲, 魏品康, 秦志丰, 孙大志, 姜林娣, 施俊, 刘龙, 陆烨

许玲, 魏品康, 秦志丰, 孙大志, 施俊, 刘龙, 陆烨, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院中医科 上海市 200003
姜林娣, 复旦大学附属中山医院内科 上海市 200032
许玲, 女, 1967-03-08 出生, 浙江衢州人, 汉族, 1995 年毕业于上海中医药大学, 获博士学位, 副教授, 主要从事中西医结合防治肿瘤的临床研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30271626
通讯作者: 许玲, 200003, 上海市凤阳路 415 号, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科。czyk@smmu.edu.cn
电话: 021-63610109-73406
收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-05-30

Characteristics of gastric cancer in syndromic classifications on Traditional Chinese Medicine: Analysis of 767 cases

Ling Xu, Pin-Kang Wei, Zhi-Feng Qin, Da-Zhi Sun, Lin-Di Jiang, Jun Shi, Long Liu, Ye Lu

Ling Xu, Pin-Kang Wei, Zhi-Feng Qin, Da-Zhi Sun, Jun Shi, Long Liu, Ye Lu, Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China
Lin-Di Jiang, Department of Internal Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271626

Correspondence to: Dr. Ling Xu, Department of Traditional Chinese Medicine, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, 415 Fengyang Road, Shanghai 200003, China. czyk@smmu.edu.cn
Received: 2005-05-08 Accepted: 2005-05-30

Abstract

AIM: To analyze the characteristics of gastric cancer based on the syndromic classifications, and to provide the basis for standardizing the syndromic classifications of gastric cancer in terms of Traditional Chinese Medicine (TCM).

METHODS: The cases ($n = 767$) of gastric cancer were collected from several hospitals. The symptoms and clinical signs on TCM (118 in total) were obtained by questionnaire, and their rates in different syndromic classifications were analyzed.

RESULTS: Two hundred and fifty-two cases (32.86%) belonged to the type of deficiency-cold of the spleen and stomach, and 233 (30.38%) belonged to the discordance of liver-stomach. The numbers of cases, which belonged to the classification of the stasis and endogenous toxics, the deficiency of both Qi and blood, the stagnation of phlegm-damp, Yin-insufficiency due to stomach-heat, were

90 (11.73%), 74 (9.65%), 65 (8.47%) and 55 (7.17%), respectively. Only 12 out of 118 symptoms and physical signs had no significant difference among the 6 gastric cancer classifications on TCM. The other 106 symptoms and physical signs were markedly different among the 6 syndromic classifications (all $P < 0.05$). The rates of characteristic symptoms or physical signs in each classification on TCM were higher than others.

CONCLUSION: The characteristic symptoms or physical signs are clear-cut in this study, which provides theoretical evidence and basis for standardizing the syndromic classifications of gastric cancer on TCM.

Key Words: Gastric cancer; Traditional Chinese Medicine; Syndromic classification

Xu L, Wei PK, Qin ZF, Sun DZ, Jiang LD, Shi J, Liu L, Lu Y. Characteristics of gastric cancer in syndromic classifications on Traditional Chinese Medicine: Analysis of 767 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(15):1804-1808

摘要

目的: 分析胃癌证型的特点, 为规范胃癌中医证型做基础。

方法: 采取多中心收集病例资料, 统一应用胃癌辨证临床调查表收集临床胃癌症状、体征资料, 总结分析胃癌各种症状、体征在各胃癌证型的构成比, 并比较其证型间的差异性。

结果: 脾胃虚寒 252 例, 占 32.9%; 肝胃不和型 233 例, 占 30.4%; 瘀毒内阻 90 例, 占 11.7%; 气血双亏型 74 例, 占 9.6%; 痰湿凝结型 65 例, 占 8.5%; 胃热伤阴 55 例, 占 7.2%。118 项症状和体征中仅 12 项在证型之间无统计学差异, 其余 106 项症状和体征在六证型之间均有统计性差异 ($P < 0.05$), 且每证型的特征性证候所占比例均较高。

结论: 临床辨证中证型特征性证候较明确, 辨证无偏倚, 或偏倚性很小, 为制定标准化且临床实用的胃癌辨证分型的打下良好基础。

关键词: 胃癌; 中医; 证型

许玲, 魏品康, 秦志丰, 孙大志, 姜林娣, 施俊, 刘龙, 陆烨. 胃癌中医证候特点分析 767 例. *世界华人消化杂志* 2005;13(15):1804-1808
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1804.asp>

0 引言

胃癌是临床难治性疾病,中医辨证论治在改善临床症状候,提高生活质量方面具有一定优势^[1],但由于缺乏统一的辨证分型标准,影响了临床疗效总结和进一步提高^[2].本文较全面采集胃癌患者的中医四诊信息,采用多因素统计分析的原理和统计软件,处理、分析胃癌的临床信息,以获得临床胃癌中医证候特点及分布;为胃癌的临床治疗研究做基础,同时为运用循证医学的方法规范胃癌中医辨证分型标准、使胃癌中医辨证标准化奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 我们经过以往文献总结分析,得出的最佳胃癌辨证依据为辨证标准^[2],即采用1978年全国第一届胃癌学术会议北京市胃癌协作组制定的6型分法^[3].具体辨证标准为:(1)肝胃不和型:主症为胃脘胀满,时时隐痛,窜及两胁,呃逆呕吐,脉沉或弦细,舌质淡红,苔薄白或薄黄;(2)脾胃虚寒型:主症为胃脘隐痛,喜按喜温,或朝食暮吐,暮食朝吐,面色苍白,肢冷神疲,便溏浮肿,舌淡而胖,苔白滑润,脉沉缓;(3)瘀毒内阻型:主症为胃脘刺痛,心下痞硬,吐血便黑,皮肤甲错,舌质暗紫,脉沉细涩;(4)胃热伤阴型:主症为胃内灼热,口干欲饮,胃脘嘈杂,食后脘痛,五心烦热,大便干燥,食欲不振,脉弦细数,舌红少苔,或苔黄少津;(5)痰湿凝结型:主症为胸闷膈满,面黄虚肿,呕吐痰涎,腹胀便溏,痰核累累,舌淡红,苔滑腻;(6)气血双亏型:主症为全身乏力,心悸气短,头晕目眩,面色无华,虚烦不寐,自汗盗汗,甚至阴阳两虚,脉沉细无力,舌淡苔薄.建立完善的胃癌辨证调查表格.患者来自龙华医院、曙光医院、长征医院、上海市第一人民医院和宝山区中心医院.

1.2 方法 对临床胃癌进行辨证分型,并详细记录下患者的一般资料,如性别、年龄等.两位主治以上中医师同时辨证,保证辨证无偏倚.胃癌证候调查表在资深中医师及循证医学专家的指导下建立,反复应用最后得出实用的临床胃癌证候调查表,主要内容包括:症状、体征、舌、脉(共118项).入院后或首次门诊即进行证候问卷调查.当同一患者病情有变化或症状有变化,伴或不伴辨证分型改变时,可以重复纳入.症状表由患者在中医师指导下自己填写;体征由医师作记录;舌、脉象采用传统诊断分析.数据采集运用Excel电子表格,患者的临床症状、体征、舌、脉的变量118项中属于是非或有无者赋以数值1,2,其中是或有者为1、非或无者为2,项目中下属有多个项目时则依次赋以数值1,2,3,4等,逐一整理输入相应的数值.

统计学处理 采用SAS 6.02软件包进行数据统计分析.

2 结果

2002-12/2005-01,山龙华医院肿瘤科、曙光医院肿瘤科、宝山区中心医院肿瘤科和上海市第一人民医院中医科和上海长征医院中医科共收集胃癌患者801例,均明确诊断病理证实.排除症状及体征患者,即属于无证可辩者34例,剩余767例纳入最终分析.年龄20-85岁(平均年龄为52.5岁).证型分布依次是:脾胃虚寒252例,占32.9%;肝胃不和型233例,占30.4%;瘀毒内阻90例,占11.7%;气血双亏型74例,占9.6%;痰湿凝结型65例,占8.5%;胃热伤阴55例,占7.2%,有疼痛者294例,占38.1%,在肝胃不和中99例,占33.7%;胃热伤阴中27例,占9.2%;脾胃虚寒中54例,占18.1%;瘀毒内阻中55例,占18.4%;痰湿凝结中27例,占9.2%;气血双亏中32例,占10.9%;其余117项症状和体征在六证型组间的比率及统计结果见表1.

3 讨论

胃癌辨证论治是中医临床的核心,只有辨证准确,才能施以正确的“法”、“方”、“药”,但中医的辨证论治目前尚无统一的标准,特别是对胃癌的辨证分型,更是种类繁多,在我们初步统计文献记载的胃癌辨证分型种类(包括类似同一种证型而称谓不同者)多达87种^[2],而且对胃癌的分型有分三型^[4]、四型^[5-6]、最多分七型^[7],这给临床治疗和研究带来一定困难和不便,使研究的可重复性差,可信度各抒己见,临床中无统一标准.循证医学为中医注入新的活力,为研究及制定统一标准,为中医治疗的规范化、标准化打开了新思路,提供了新方法.我们采用病症结合方法,遵循中医临床观察特点,设计症状、体征调查表,收集临床手术确诊为胃癌患者的四诊资料,建立信息数据库,运用统计方法以期能发现胃癌患者中医证候特点,为进一步规范中医辨证分型,运用循证医学的方法确立临床实用的胃癌辨证方法提供依据.为胃癌中医证候标准化,病机探讨及论治的研究提供有价值的“证据”.从767例胃癌患者的6种证型分布,按所占比率从多至少依次是:脾胃虚寒、肝胃不和型、瘀毒内阻、气血双亏型、痰湿凝结型、胃热伤阴型.这一结果与我们通过文献总结分析的归纳的证型中出现频数例数大体一致^[2],本结果提示,临证治疗胃癌,在祛邪辨证治疗的基础上须注重顾护正气,必要时标本兼顾、虚实同治.从多角度广泛收集与胃癌相关的118项指标,

表1 胃癌临床主要症状和体征(%)

症状和体征	频数	频率	肝胃不和	胃热伤阴	脾胃虚寒	瘀毒内阻	痰湿凝结	气血双亏	χ^2	<i>P</i>
疼痛	294	38.1	33.7	9.2	18.1	18.4	9.2	10.9	55.63	0.001
胀痛	84	28.6	63.1	3.6	15.5	6.0	6.0	6.0	254.95	0.001
隐痛	141	48.0	24.8	9.2	25.5	14.9	12.1	13.5		
刺痛	28	9.5	0	3.6	7.1	78.6	0	10.7		
钝痛	11	3.7	27.3	9.1	9.1	27.3	9.1	18.2		
绞痛	16	5.4	25.0	6.3	0	25.0	25.0	18.8		
灼痛	14	4.8	28.6	57.1	14.3	0	0	0		
饥饿痛	92	31.3	26.1	9.8	16.3	26.1	12.0	9.8	13.07	0.220
食后痛	52	17.7	46.2	9.6	21.2	13.5	3.9	5.8		
与饮食无关	150	50.7	34.0	8.7	18.7	16.0	9.3	13.3		
痛处固定	244	83.0	25.8	11.1	19.3	22.1	10.7	11.1	44.71	0.001
痛而位置不定	50	17.0	72.0	0	14.0	2.0	2.0	10.0		
痛及两胁	32	10.9	65.6	3.1	15.6	9.4	0	6.3	262.60	0.001
日轻夜重	31	10.5	32.3	6.5	32.3	12.9	3.2	12.9	14.30	0.16
日重夜轻	38	12.9	21.1	15.8	29.0	15.8	10.5	7.9		
与时间无关	225	76.5	36.0	8.4	14.7	20.0	9.8	11.1		
疼痛喜按	207	70.4	29.5	11.1	20.8	12.6	11.1	96.9	45.97	0.001
疼痛不喜按	87	29.6	43.7	4.6	12.6	33.3	4.6	1.2		
与情绪有关	62	21.0	51.6	6.5	21.0	16.1	0	4.8	18.51	0.002
与情绪无关	232	79.0	28.9	9.9	17.7	19.4	11.6	12.5		
饱胀感	346	45.0	37.9	8.1	29.9	11.3	11.6	11.3	53.23	0.001
便秘	136	17.7	32.4	11.0	12.5	20.6	8.8	14.7	39.97	0.001
腹泻	62	8.1	16.1	1.6	56.5	4.8	4.8	16.1	25.59	0.001
便而不爽	43	5.6	23.3	7.0	37.2	11.6	14.0	7.0	2.98	0.703
伴有肛门灼热	4	0.5	25.0	50.0	0	25.0	0	0	12.99	0.023
便色正常	664	86.4	32.2	7.7	36.6	6.8	8.6	8.1	143.67	0.001
白呈陶土状	3	0.4	0	0	33.3	33.3	0	33.3		
黑便、暗红色	102	13.3	18.6	3.92	7.8	43.1	7.8	18.6		
便质正常	524	68.1	32.6	7.4	33.0	9.4	9.0	8.6	59.07	0.001
时干时溏	26	3.4	26.9	0	42.3	15.4	7.7	7.7		
溏薄	96	12.5	16.7	3.1	52.1	11.5	4.2	12.5		
大便干硬	120	15.6	31.7	10.8	13.3	21.7	10.0	12.5		
完谷不化	3	0.4	33.3	0	66.7	0	0	0		
数日一次	180	23.4	27.2	8.3	27.8	13.3	10.0	13.3	16.08	0.377
每日或隔日1-2次	555	72.2	31.7	7.0	34.1	11.4	8.1	7.8		
3-5次/d	31	4.0	22.6	3.2	38.7	9.7	6.5	19.4		
>5次/d	3	0.4	33.3	0	33.3	0	0	33.3		
夜或晨泻	40	5.2	15.0	2.5	67.5	0	2.5	12.5	27.10	0.001
食欲如常	521	67.8	31.1	5.0	36.9	11.9	7.5	7.7	32.52	0.001
食欲减退	238	31.0	28.6	11.8	24.4	10.5	10.5	14.3		
食欲亢进	10	1.3	30.0	10.0	20.0	30.0	10.0	0		
喜温热	424	55.1	32.6	5.7	33.5	10.4	9.0	9.0	45.97	0.001
喜凉	36	4.7	19.4	16.7	13.9	33.3	11.1	5.6		
无特殊	309	40.2	28.5	8.1	34.0	11.0	7.4	11.0		
进食梗阻感	49	6.4	12.2	2.0	67.4	6.1	6.1	6.1	28.99	0.001
恶心	165	21.5	27.9	9.7	17.0	17.0	14.6	13.9	36.54	0.001
呕吐	89	11.6	25.8	13.5	13.5	18.0	12.4	16.9	28.36	0.001

朝食暮吐	5	5.6	40.0	20.0	0	40.0	0	0	16.43	0.354
暮食朝吐	1	1.1	100.0	0	0	0	0	0		
食后即吐	19	21.4	26.3	0	31.6	10.5	15.8	15.8		
与时间无关	64	71.9	23.4	17.2	9.4	18.8	12.5	18.8		
呕吐食物	52	58.4	30.8	13.5	15.4	15.4	7.7	17.3	25.25	0.047
黏液、清水	17	19.1	35.3	17.7	28.6	0	23.5	11.8		
暗红色血液	16	18.0	6.3	0	12.5	43.8	12.5	25.0		
胆汁	4	4.5	0	50.0	0	25.0	25.0	0		
泛酸	267	34.7	43.5	10.5	18.4	7.9	7.5	12.4	64.33	0.001
暖气	393	51.1	40.5	5.9	27.7	8.9	6.4	10.7	45.91	0.001
呃逆	181	23.5	42.5	5.0	29.3	10.5	5.5	7.2	18.30	0.003
情绪如常	574	74.6	25.1	7.7	38.9	9.8	8.5	10.1	68.14	0.001
沉默寡言	102	13.3	34.3	4.9	19.6	22.6	8.8	9.8		
心烦易怒	93	12.1	58.1	6.5	9.7	11.8	7.5	9.8		
上腹部不适	408	53.1	31.9	8.1	26.0	12.3	8.8	13.0	24.57	0.001
自汗	104	13.5	23.1	6.7	34.6	9.6	5.8	20.2	17.64	0.003
盗汗	137	17.8	25.6	14.6	21.2	16.1	7.3	15.3	29.58	0.001
午后潮热	40	5.2	20.0	17.5	27.5	10.0	5.0	20.0	13.56	0.019
畏寒怕冷	194	25.2	20.1	5.2	49.0	5.7	5.7	14.4	47.75	0.001
口干	287	37.3	26.1	15.0	25.8	10.8	11.5	10.8	54.63	0.001
欲饮	213	74.2	27.2	18.3	31.5	7.5	6.1	10.3	42.87	0.001
不欲饮	74	25.8	23.0	5.4	12.2	20.3	27.0	12.2		
口苦	218	28.4	33.5	11.5	21.6	7.3	12.8	13.3	36.74	0.001
头晕	258	33.6	23.6	8.9	37.6	8.1	5.8	15.9	33.35	0.001
乏力	458	76.9	26.2	8.1	34.7	10.0	7.0	14.0	36.72	0.001
消瘦	400	52.0	27.3	8.0	29.5	13.5	9.3	12.5	16.19	0.006
腹部胀大	37	4.8	13.5	13.5	43.2	5.4	10.8	13.5	9.29	0.098
下肢浮肿	25	3.3	12.0	8.0	52.0	16.0	12.0	0	9.07	0.107
四末不温	101	13.1	21.8	6.9	53.5	45.5	2.0	10.9	28.44	0.001
面色如常	429	55.8	39.4	7.5	33.3	7.9	7.7	4.2	147.20	0.001
白	134	17.4	12.7	6.0	48.5	6.0	8.2	18.7		
晦暗	91	11.8	27.5	7.7	19.8	31.9	9.9	3.3		
萎黄	115	15.0	19.1	7.0	22.6	16.5	10.4	24.4		
睡眠较好	377	49.0	32.1	6.6	35.8	10.1	9.8	5.6	23.46	0.009
一般	226	29.4	26.1	6.6	30.1	13.7	8.9	14.6		
较差	166	21.6	31.9	9.0	29.5	12.7	4.8	12.1		
舌神荣	715	93.0	31.5	7.4	32.6	11.3	8.7	8.5	20.04	0.001
舌神枯	54	7.0	14.8	3.7	35.2	16.7	5.6	24.1		
裂纹舌	45	5.9	13.3	22.2	26.7	8.9	8.9	20.0	25.91	0.001
舌边齿痕	61	7.9	24.6	3.3	42.6	11.5	13.1	4.9	7.287	0.200
舌色淡红	403	52.4	38.2	3.5	33.0	5.7	11.2	8.4	426.71	0.001
红	149	19.4	26.9	14.8	40.3	2.7	4.7	10.7		
淡白	82	10.7	15.9	1.2	47.6	3.7	7.3	24.4		
青紫或紫暗	111	14.4	22.5	0.9	15.3	52.3	6.3	2.7		
红绛	24	3.1	4.2	70.8	12.5	8.3	0	4.2		
舌苔白	563	73.2	31.8	3.2	33.4	13.3	10.0	8.4	61.48	0.001
黄	20	2.6	15.0	5.0	70.0	5.0	5.0	0	13.44	0.020
灰黑	2	0.26	100.0	0	0	0	0	0	4.61	0.466
薄	437	56.8	35.2	3.7	32.5	14.0	3.7	11.0	59.19	0.001

厚	106	13.8	21.7	2.8	21.7	14.2	33.0	6.6	100.26	0.001
润	135	17.6	36.3	2.2	38.5	9.6	3.7	9.6	14.11	0.015
燥	29	3.8	24.1	20.7	20.7	17.2	6.9	10.3	10.32	0.067
滑	32	4.2	9.4	9.4	62.5	6.3	9.4	3.1	16.387	0.006
老	7	0.9	57.1	0	28.6	0	0	14.3	3.80	0.578
嫩	20	2.6	15.0	5.0	70.0	5.0	5.0	0	13.44	0.020
腻	215	28.0	25.6	2.3	33.0	9.3	24.7	5.1	112.19	0.001
无苔	37	4.8	2.7	59.5	18.9	2.7	0	16.2	168.26	0.001
地图舌	7	0.9	14.3	28.6	14.3	0	0	42.9	15.38	0.009
舌下脉络正常	624	81.1	31.3	7.9	38.6	4.5	7.9	9.9	186.60	0.001
迂曲	145	18.9	26.2	4.1	7.6	42.8	11.0	8.3		
脉象弦	326	42.4	54.9	5.8	12.9	17.8	4.0	4.6	228.59	0.001
滑	132	17.2	31.1	8.3	13.6	4.6	34.9	7.6	156.97	0.001
细	338	44.0	19.8	11.8	39.1	6.2	5.9	17.2	103.18	0.001
沉	410	53.3	26.6	5.6	33.4	13.4	9.5	11.5	13.47	0.019
数	47	6.1	12.8	42.6	25.5	4.3	2.1	12.8	98.72	0.001
迟	24	3.1	12.5	0	66.7	12.5	0	8.3	15.18	0.010
缓	94	12.2	19.2	3.2	60.6	5.3	3.2	8.5	39.45	0.001
涩	58	7.5	1.7	0	15.5	81.0	1.7	0	293.75	0.001
促	0	0	-	-	-	-	-	-	-	
结	1	0.1	0	0	100	0	0	0	2.052	0.842
代	2	0.3	0	0	0	0	0	100	18.81	0.002

运用率的比较卡方检验筛选出胃癌常见的症状及体征,包括中医四诊资料在内.结果发现,在临床辨证中证型特征性证候较明确,但对胃癌整体辨证中不仅包括典型特征性证候而且包含其他证候,如肝胃不和型便秘44例,占便秘总人数的32.4%,腹泻10例,占腹泻总人数的16.1%,其他证候对某一证型分析所处的地位如何,或者说进一步得出判断某一证型的主症和次症,需要进一步做证候与证型相关性分析,也是我们要进一步研究方向.

4 参考文献

- 1 孙大志,魏品康.胃癌非手术疗法治疗现状.国外医学肿瘤学分册 2003;30:375-378
- 2 许玲,孙大志,施俊,陈亚琳,魏品康.胃癌中医证型分类的文献研究.世界华人消化杂志 2004;12:1457-1458
- 3 张宗岐.临床肿瘤综合治疗大全.北京:奥林匹克出版社,1995:182-184
- 4 吴水生,郑东海,林求诚.胃癌转移状态血液流变学变化与中医证型关系的临床研究.中国中西医结合杂志 2000;20:583-585
- 5 陈郭斌.中医辨证分型治疗胃癌.湖北中医杂志 2000;15:19
- 6 陶炼.辨治胃癌晚期胃癌40例临床观察.湖南中医杂志 2002;18:5-6
- 7 钱心兰,钱力兰,钱伯文.攻补兼施治疗胃癌113例.上海中医药杂志 1996;2:7-9

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 •

广东中西医结合、中医消化病学术会议

本刊讯 广东中西医结合、中医消化病学术会议定于2005-11在广州召开,现将征稿通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文、结构式摘要(800字左右)各一份,电脑打印(附软盘),2005-09-30截稿.

2 联系方式

广东省广州市广州大道北1838号南方医院消化科 智发朝 教授,电话:020-65641531.

人胃癌组织中分子伴侣蛋白的表达及检测

曲晶磊, 徐惠绵, 阎影, 唐冰, 贾兰玲

曲晶磊, 徐惠绵, 中国医科大学附属第一医院肿瘤外科
辽宁省沈阳市 110001
阎影, 贾兰玲, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所
辽宁省沈阳市 110001
唐冰, 中国医科大学附属第一医院麻醉科 辽宁省沈阳市 110001
曲晶磊, 女, 1978-03-03 生, 辽宁省营口市人, 汉族, 2002 年中国医科大学
硕士, 主要从事肿瘤免疫及肿瘤免疫治疗方面的研究。
国家自然科学基金项目资助, No.30370640
通讯作者: 徐惠绵, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医科
大学附属第一医院肿瘤外科, dirui33@hotmail.com
电话: 024-23256666-6227
收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-13

Expression of chaperone proteins in human gastric cancer

Jing-Lei Qu, Hui-Mian Xu, Ying Yan, Bing Tang, Lan-Ling Jia

Jing-Lei Qu, Hui-Mian Xu, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Ying Yan, Lan-Ling Jia, Cancer Institute, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Bing Tang, Department of Anaesthesiology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30370640
Correspondence to: Dr. Hui-Mian Xu, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, 155 Nanjing North Street, Shenyang 110001, Liaoning Province China. dirui33@hotmail.com
Received: 2005-05-23 Accepted: 2005-06-13

Abstract

AIM: To detect the expression of GRP94/gp96 and calreticulin (CRT) in gastric cancer, and to extract and identify the chaperone-rich cell lysates (CRCL).

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect GRP94/gp96 and CRT expression, and the relationship between the levels of expression and the pathological factors were analyzed. Isoelectric focusing technique was used to separate CRCL from the tumor tissue homogenate. The molecular weight and quality of the purified CRCL were identified by SDS-PAGE and Western blot.

RESULTS: The positive rates of GRP94/gp96 and CRT expressive were 86.3% and 84.3% in gastric cancer, respectively, whereas they were 37.3% and 43.1% in cancer-adjacent tissues. The rates were markedly higher in gastric cancer than those in the cancer-adjacent tissues ($\chi^2 = 25.946, 18.704$, both $P < 0.01$). The levels of GRP94/gp96 expression in gastric cancer were correlated with

the differentiation, infiltration and lymph metastasis of the cancer and the levels of CRT expression were correlated with the size of tumor and lymph metastasis. Western blot showed that the isolated CRCL contained four kinds of chaperone proteins: GRP94/gp96, HSP90, HSP70 and CRT. The pH value ranged from 4.8 to 5.6 (lane 5-11). These chaperone proteins clustering along the pH gradient were very typical and reproducible, and the distributions of the proteins and the pH range were accordant among the tissues of different types.

CONCLUSION: GRP94/gp96 and CRT are stably expressed in gastric cancer and the levels of expression are correlated with the occurrence, carcinogenesis, and biological behavior of gastric cancer.

Key Words: Chaperone protein; Chaperone-rich cell lysate; Immunohistochemistry; Gastric cancer

Qu JL, Xu HM, Yan Y, Tang B, Jia LL. Expression of chaperone proteins in human gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(15):1809-1813

摘要

目的: 检测人胃癌组织中 GRP94/gp96, CRT 的表达, 分离并鉴定富含分子伴侣的细胞裂解物(CRCL), 为研制和开发肿瘤来源的分子伴侣疫苗奠定基础。

方法: 采用免疫组织化学方法检测人胃癌组织中 GRP94/gp96 和 CRT 的表达及其表达程度与胃癌病理因素的关系; 等电聚焦技术从人胃癌组织匀浆中分离 CRCL, 经电泳及 Western blot 进行蛋白分子质量及性质鉴定。

结果: 癌组织中 GRP94/gp96 和 CRT 表达的阳性率分别为 86.3% 和 84.3%; 而癌旁非癌组织中的阳性率分别为 37.3% 和 43.1%, 癌组织表达程度显著高于癌旁非癌组织 ($\chi^2 = 25.946, 18.704, P < 0.01$); 癌组织中 GRP94/gp96 的表达程度与肿瘤分化程度、浸润深度及淋巴结转移有关, CRT 的表达程度与肿瘤大小及淋巴结转移有关。分离的 CRCL 经鉴定为 HSP70, HSP90, GRP94/gp96, CRT。并且这些分子伴侣蛋白沿 pH 梯度集中分布于 5-11 号收集管中, 其余管中未见明显表达。pH 跨度为 4.8-5.6。不同组织类型中分子伴侣蛋白的分布及 pH 跨度具有一致性。

结论: 胃癌组织中稳定表达 GRP94/gp96 和 CRT, 其

表达程度与胃癌的发生、发展及其生物学行为有关。

关键词: 分子伴侣蛋白; 富含分子伴侣的细胞裂解物; 免疫组化; 胃癌

曲磊磊, 徐惠绵, 阎影, 唐冰, 贾兰玲. 人胃癌组织中分子伴侣蛋白的表达及检测. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1809-1813
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1809.asp>

0 引言

开发新型有效的抗肿瘤疫苗已成为肿瘤免疫治疗的主要目标. 研究表明, 从肿瘤细胞中提取分子伴侣蛋白如HSP70, HSP90, GRP94/gp96和钙网蛋白(calreticulin, CRT)制成的肿瘤疫苗能有效的激活抗原特异性T细胞免疫反应^[1-3]. 随着纯化的肿瘤来源的分子伴侣蛋白作为抗肿瘤疫苗的研究进展, 人们将注意力集中于富含分子伴侣的细胞裂解物(chaperone-rich cell lysates, CRCL)在肿瘤免疫治疗中的应用. CRCL是通过液相等电聚焦(free solution-isoelectric focusing, FS-IEF)技术从肿瘤组织匀浆中分离获得的富含大量分子伴侣蛋白的高产疫苗. Graner *et al*^[5-7]发现用从小鼠白血病/淋巴瘤中提取的CRCL对荷瘤小鼠进行治疗, 其治疗效果优于单一成分分子伴侣疫苗. 由于肿瘤的自身免疫原性, 所以富含分子伴侣的肿瘤疫苗必须从自身肿瘤组织中提取制备. 为了应用自体肿瘤来源的CRCL进行人体疫苗试验, 我们首先采用免疫组织化学方法检测GRP94/gp96和CRT在人胃癌组织中的表达及其表达程度与胃癌病理因素的关系, 并采用等电聚焦技术探讨建立从人胃癌组织中分离纯化CRCL的方法.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-12/2003-11中国医科大学附属第一医院行胃癌切除手术病例51例. 男27例, 女24例. 每例取癌组织及距癌肿3 cm以上的癌旁非癌组织作对照. 用于HE及免疫组化染色的组织均经16 g/L多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 厚4 μ m连续切片. 用于CRCL提取分析的新鲜组织于术中切除后立即从原发肿瘤组织中取直径约1.5-2.0 cm组织块, -70℃低温冰箱保存备用.

1.2 方法 免疫组织化学染色采用SP试剂盒法(迈新公司), 石蜡切片常规脱蜡至水, 0.01 mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中高温高压抗原修复2 min, 一抗孵育, 4℃过夜; DAB显色, 苏木素复染, 中性树脂封片. 大鼠抗人GRP94/gp96及小鼠抗人CRT(Stressgen公司产品)工作浓度分别为1:30和1:200. 阴性对照以PBS缓冲液代替一抗. 单盲法光学显微镜下进行观察. 判定标准: GRP94/gp96和CRT主要表达在细胞质内, 呈棕

黄色颗粒. 每个视野至少观察100个细胞, 以阳性细胞数 $\geq 10\%$ 作为阳性判断标准, 进而根据阳性细胞百分率分为弱阳性(+): 阳性细胞数为10-30%; 阳性(++): 阳性细胞数为30-70%; 强阳性(+++): 阳性细胞数 $\geq 70\%$. 另将人胃癌组织称质量, 剪碎, 加入3-5倍体积的匀浆缓冲液(50 mmol/L Tris/Cl, 150 mmol/L NaCl, 0.2 g/L叠氮钠, 100 mg/L PMSF, 1 mg/L Aprotinin, 10 g/L TritonX-100), 匀浆器中匀浆. 充分裂解后, 以10 000 g, 4℃离心30 min, 取上清; 以100 000 g, 4℃二次离心60 min, 取上清备用. Bradford法测定样品液中蛋白质的浓度, 以牛血清白蛋白作为标准品. 装配液相等电聚焦仪(Rotofor IEF Cell, Bio-Rad公司产品), 阳极舱填充0.1 mol/L H_3PO_4 , 阴极舱填充0.1 mol/L NaOH. 将样品按20 g/L浓度加入两性电解质(pH范围为3-10和4-6, 二者之比1:2), 用5 mol/L尿素稀释至18 mL, 加入等电聚焦仪的聚焦室内. 聚焦在4℃冷却循环水浴, 12 W的功率下运行5 h, 用真空泵将样品收集到20个收集管中. 弃去1, 20号管(因其靠近两极, pH值偏离较大), 余18管样品用去离子水稀释至18 mL, 加入聚焦室内, 二次聚焦. 收集样品, pH计测定样品pH值, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳SDS-PAGE(Mini-Protein电泳槽, Bio-Rad公司产品), 考马斯亮蓝S-250染色, 检测蛋白分离效果. 标准分子量为Low Protein Standard(Bio-Rad). 将CRCL的蛋白样品进行SDS-PAGE后, 用电转移法转移至硝酸纤维素膜(Bio-Rad)上. 分别以抗小鼠HSP70单抗、抗小鼠HSP90单抗、抗大鼠GRP94/gp96单抗、抗小鼠CRT单抗(Stressgen公司产品)为一抗, 过氧化物酶标记的抗小鼠或大鼠IgG(1:200, 武汉博士德公司产品)为二抗, 进行Western blot检测(Western blot检测试剂盒, 为武汉博士德公司产品), DAB显色, 观察结果.

统计学处理 应用SPSS11.0软件进行统计学处理, 根据实验资料要求, 选用 χ^2 检验进行数据分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性.

2 结果

2.1 免疫组织化学结果 蛋白主要表达于细胞质, 呈棕黄色染色. GRP94/gp96和CRT在胃癌组织中的表达多为阳性甚至强阳性(图1AB), 阳性率分别为86.3%(44/51)和84.3%(43/51); 而在癌旁非癌组织中多为阴性或弱阳性表达(图1CD), 阳性率分别为37.3%(19/51)和43.1%(22/51). 癌组织表达程度显著高于癌旁非癌组织, 差异有统计学意义($\chi^2 = 25.946, 18.704, P < 0.01$). 癌组织中GRP94/gp96的表达程度与肿瘤分化程度、浸润深度及淋巴结转移有关, CRT的表达

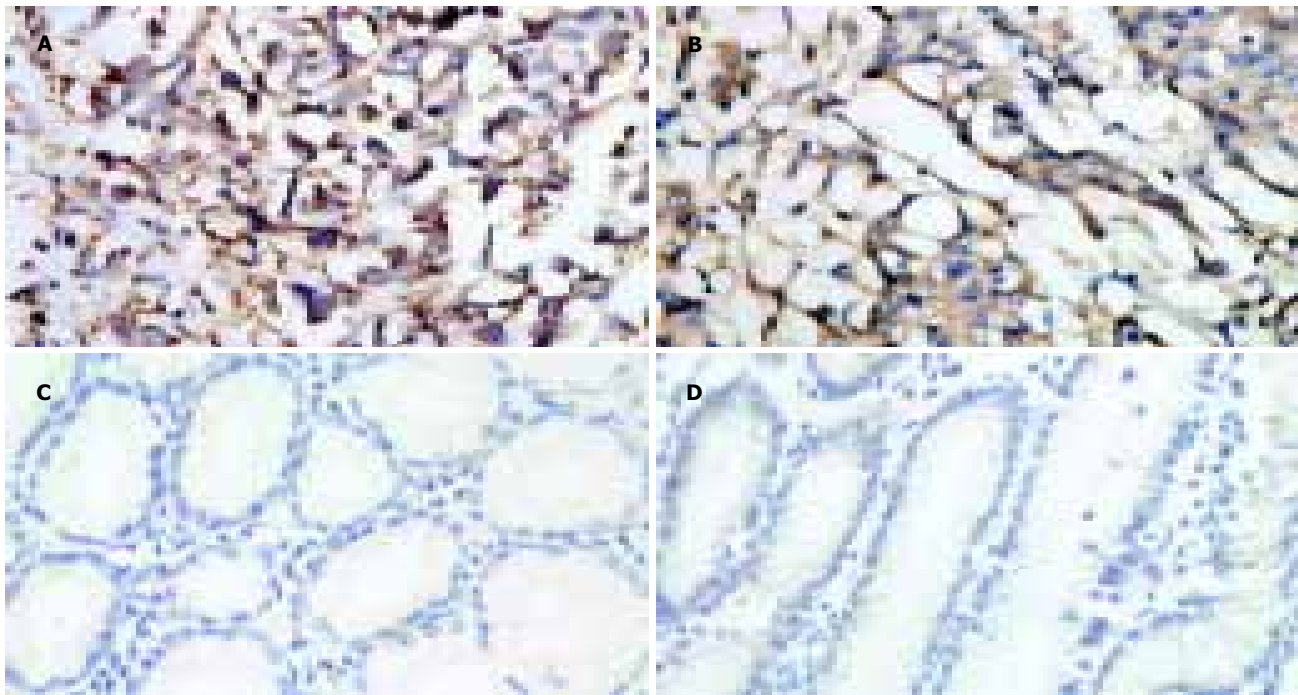


图1 胃组织 GRP94/gp96 和 CRT 的表达(SP × 400). A: GRP94/gp96, 低分化腺癌, 强阳性; B: CRT, 中分化腺癌, 强阳性; C: GRP94/gp96, 癌旁非癌组织, 阴性; D: CRT, 癌旁非癌组织, 弱阳性.

程度与肿瘤大小及淋巴结转移有关(表 1).

2.2 CRCL 检测 经液相等电聚焦系统分离后, 肿瘤组织中的蛋白质按各自的等电点聚焦于不同的位置, 分别收集于 20 个收集管中, 弃去 1, 20 号管. 经 SDS-PAGE 分离后, 考马斯亮蓝 S-250 染色, 可以看到同一分子质量的蛋白质仅在相邻的部位表达, 且表现为量的不同(图 2). 经特异性的 Western blot 鉴定, 证实被聚焦的目的蛋白中富含 GRP94/gp96, HSP90, HSP70, CRT, 并且这些分子伴侣蛋白沿 pH 梯度集中分布于 5-11 号收集管中, 其余管中未见明显表达(图 2, 3). pH 跨度为 4.8-5.6(图 2). 不同组织类型中分子伴侣蛋白的分布及 pH 跨度具有一致性. 1 g 胃癌组织经液相等电聚焦分离后可产生 1-2 mg 的分子

伴侣疫苗. 改变 FS-IEF 两性电解质的比例不能增强分离效果, 只能使总体蛋白沿 pH 梯度左右移动, 提示分子伴侣蛋白以复合物的形式被分离, 因而不表现为个体蛋白的特性.

3 讨论

从肿瘤细胞中分离纯化出来的 CRCL 是一种很有潜力的自体肿瘤疫苗, 能够激活肿瘤细胞中分子伴侣-肿瘤抗原肽复合物免疫应答. 已经证实, 分子伴侣家族的 HSP70, HSP90, GRP94/gp96 和 CRT 具有免疫活性^[1-5]. 用肿瘤来源的 CRCL 免疫小鼠后, 其能被抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)摄取和加工, 并将相关的肿瘤抗原肽提呈给细胞毒 T 淋巴细胞

表1 GRP94/gp96 和 CRT 表达与胃癌病理因素的关系

病理因素	n	GRP94/gp96 染色强度				阳性率(%)	CRT 染色强度				阳性率(%)
		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
肿瘤大小(cm): ≤ 5	27	5	9	8	5	81.5	1	3	10	13	96.3
>5	24	2	4	7	11	91.7	7	11	5	1	70.8 ^a
分化程度:分化型	21	6	10	4	1	71.4	5	6	6	4	76.2
未分化型	30	1	3	11	15	96.7 ^a	3	8	9	10	90.0
浸润:黏膜, 黏膜下层	16	5	7	4	0	68.8	4	6	4	2	75.0
肌层, 浆膜层	35	2	6	11	16	94.3 ^a	4	8	11	12	88.6
淋巴结转移:-	22	6	9	5	2	72.7	7	10	5	0	68.2
+	29	1	4	10	14	96.6 ^a	1	4	10	14	96.6 ^a

^aP<0.05.

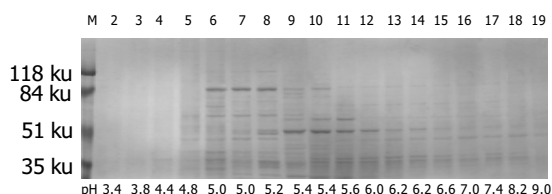


图2 CRCL的SDS-PAGE(考马斯亮蓝染色).

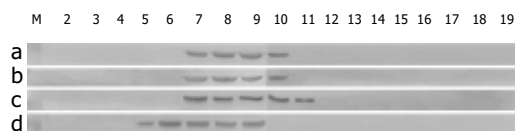


图3 CRCL 组分的免疫印迹杂交. (a-GRP94/gp96; b-HSP90; c-HSP70 d-CRT).

(cytotoxic T lymphocyte, CTL), 从而引发保护性的或治疗性的免疫反应^[8]. 我们采用等电聚焦技术从肿瘤组织匀浆中分离获得了CRCL, 经电泳及Western blot 鉴定为HSP70, HSP90, GRP94/gp96, CRT; 克服了提纯某一单一成分分子伴侣蛋白所需周期长、费用高且产量不足的缺点, 便于临床推广应用. 鉴于自体肿瘤来源的分子伴侣蛋白在肿瘤患者的瘤苗试验, 我们应用免疫组化技术对胃癌和癌旁非癌组织中的分子伴侣蛋白GRP94/gp96和CRT的表达进行了分析. 有充分的证据证明肿瘤来源的分子伴侣制剂的免疫原性是由于与分子伴侣结合的内源性抗原肽的不同序列. 由于肿瘤的自身免疫原性, 所以含有CRCL的肿瘤疫苗必需针对每例患者, 从其自身肿瘤组织中提取制备. 因此, 了解分子伴侣蛋白在人类普遍发生的肿瘤中的表达水平很有意义. 由于近年来国内外对HSP70, HSP90在癌组织中的表达报道较多^[9-13], 因此本文以胃癌为例, 对GRP94/gp96和CRT的稳定同源的表达进行了报道. 本研究发现胃癌时GRP94/gp96和CRT呈递增之势, 癌组织中GRP94/gp96和CRT表达程度显著高于癌旁非癌组织. GRP94/gp96的表达程度随细胞分化程度降低、浸润深度增加及淋巴结转移而增高, 而CRT的表达则与肿瘤大小及淋巴结转移有关. 对这种结果的一种可能性解释就是肿瘤细胞有高表达的选择性趋势. 实验性研究已经表明肿瘤细胞中HSP70和GRP94/gp96的表达有助于他们的肿瘤原性. 临床上, 已经发现卵巢癌的高表达和乳腺癌的HSP70和HSP90的高表达都与肿瘤的进程有关^[14-15]. 分子伴侣蛋白能够促进肿瘤原性的一个明显的原因就是他们对应激因子如葡萄糖缺乏、缺氧、酸中毒等应激因素起到一种保护作用, 这些应激因素普遍存在于肿瘤细胞快速生长的恶劣环境中^[16]. 我们发现肿瘤结节≤5 cm的癌组织中CRT的表达增强, 可以用CRT能产生抑制血管生成的作用来解释. 近来, 有报道CRT和其蛋白片断(1-180 aa)—vasostatin是肿瘤生长的细胞抑制剂^[17-18].

肿瘤的生长依靠充足的血供, CRT抑制血管生成很可能有助于抑制肿瘤结节的生长. 因此, 应用CRT肿瘤疫苗可通过增强抗肿瘤免疫反应和抗血管生成作用而潜在地引发抗肿瘤效应.

总之, 胃癌组织中GRP94/gp96和CRT的表达程度与其生物学行为有关. 癌细胞中GRP94/gp96和CRT的高表达具有不可缺少的作用, 其作用大概是在肿瘤微环境的恶劣条件下起保护作用. 然而, 由于分子伴侣疫苗利用了宿主APC对分子伴侣-肽复合物的加工和分子伴侣-肿瘤相关抗原肽的提呈, 所以分子伴侣对肿瘤细胞起保护作用与其制剂的免疫原性显然不相矛盾. 由于肿瘤来源的分子伴侣本身不具有抗原性, 而是作为肿瘤多肽抗原的载体, 具有免疫递呈功能, 其结合的多肽为肿瘤细胞表达的特异性抗原, 含有多个活化CTL的抗原表位, 可活化多克隆的CTL, 产生对几乎所有肿瘤细胞的杀伤, 因此分子伴侣蛋白为理想的分子水平的肿瘤疫苗. 进一步研究分子伴侣蛋白的特性, 将有助于发展以分子伴侣蛋白为基础的新的肿瘤疫苗.

4 参考文献

- 1 Srivastava PK, Amato RJ. Heat shock proteins: the 'Swiss Army Knife' vaccines against cancers and infectious agents. *Vaccine* 2001;19:2590-2597
- 2 Nair S, Wearsch PA, Mitchell DA, Wassenberg JJ, Gilboa E, Nicchitta CV. Calreticulin displays in vivo peptide-binding activity and can elicit CTL responses against bound peptides. *J Immunol* 1999;162:6426-6432
- 3 Zeng Y, Feng H, Graner MW, Katsanis E. Tumor-derived, chaperone-rich cell lysate activates dendritic cells and elicits potent antitumor immunity. *Blood* 2003;101:4485-4491
- 4 Feng H, Zeng Y, Graner MW, Likhacheva A, Katsanis E. Exogenous stress proteins enhance the immunogenicity of apoptotic tumor cells and stimulate antitumor immunity. *Blood* 2003;101:245-252
- 5 Graner M, Raymond A, Romney D, He L, Whitesell L, Katsanis E. Immunoprotective activities of multiple chaperone proteins isolated from murine B-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 2000;6:909-915
- 6 Graner MW, Zeng Y, Feng H, Katsanis E. Tumor-derived chaperone-rich cell lysates are effective therapeutic vaccine against a variety of cancers. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:226-234
- 7 Graner M, Raymond A, Akporiaye E, Katsanis E. Tumor-derived multiple chaperone enrichment by free-solution isoelectric focusing yields potent antitumor vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 2000;49:476-484
- 8 Li Z, Menoret A, Srivastava P. Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol* 2002;14:45-51
- 9 Lebre T, Watson RW, Molin V, O'Neill A, Gabriel C, Fitzpatrick JM, Botto H. Heat shock proteins HSP27, HSP60, HSP70, and HSP90: expression in bladder carcinoma. *Cancer* 2003;98:970-977
- 10 孙水平, 吴胜利, 耿智敏, 牛新捷, 杨威. 肝细胞肝癌中HSP90α的表达及意义. *中国普外基础与临床杂志* 2003;10:243-245
- 11 Noguchi T, Takeno S, Shibata T, Uchida Y, Yokoyama S, Muller W. Expression of heat shock protein 70 in grossly resected esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2002;74:222-226

- 12 蒋业贵, 王宇明, 李奇芬. 热休克蛋白 70 在肝细胞癌中的表达及其意义. 免疫学杂志 2002;18:64-66
- 13 王树东. 热休克蛋白与人肠癌发生、发展及生物学行为的关系. 中国临床康复 2003;7:1650-1651
- 14 Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implication. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:570-574
- 15 Kimura E, Enns RE, Alcaraz JE, Arboleda J, Slamon DJ, Howell SB. Correlation of the survival of ovarian cancer patients with mRNA expression of the 60-kD heat-shock protein HSP-60. *J Clin Oncol* 1993;11:891-898
- 16 张新晨, 杨维良. 葡萄糖调节蛋白在肿瘤细胞中的表达及意义. 中华普通外科杂志 2003;18:501-502
- 17 Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, Nakhasi H, Teruya-Feldstein J, Wirth P, Gupta G, Tosato G. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* 1998;188:2349-2356
- 18 Cheng WF, Hung CF, Chai CY, Hsu KF, He L, Ling M, Wu TC. Tumor-specific immunity and antiangiogenesis generated by a DNA vaccine encoding calreticulin linked to a tumor antigen. *J Clin Invest* 2001;108:669-678

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 •

中国生物医学基金论文摘要网站开通

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(expressed 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)

人脐血间充质干细胞体外诱导分化为类肝细胞

何念海, 赵文利, 王宇明

何念海, 赵文利, 王宇明, 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
何念海, 男, 1965-03-20 生, 四川省遂宁市人, 汉族, 第三军医大学医学博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事生物人工肝及相关基础研究。
国家高技术研究发展计划(863)资助项目, No. 2001AA216161
通讯作者: 王宇明, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30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。
wym417@mail.tmmu.com.cn
收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-06-01

Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells differentiate into functional hepatocyte-like cells *in vitro*

Nian-Hai He, Wen-Li Zhao, Yu-Ming Wang

Nian-Hai He, Wen-Li Zhao, Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by the Fund from 863 High-Technology Program of China, No.2001AA216161
Correspondence to: Dr. Yu-Ming Wang, Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, 30 Gaotanyan Zhengjie, Chongqing 400038, China. wym417@mail.tmmu.com.cn
Received: 2005-04-26 Accepted: 2005-06-01

Abstract

AIM: To differentiate human umbilical cord blood mesenchymal stem cells (UCBMSCs) into functional hepatocyte-like cells *in vitro*, and to identify the molecular biology and function of hepatocyte-like cells.

METHODS: Human UCBMSCs were isolated and cultured *in vitro*. Matrigel (10 g/L) was used as matrix, and after pretreated with 2.5 mmol/L AZA for 10-12 h, UCBMSCs were induced in HGF (10 µg/L)+FGF4 (10 µg/L)+HGM medium *in vitro*. The proliferation of UCBMSCs was detected by MTT. The phenotypes of UCBMSCs were identified by flow cytometry, immunohistochemistry, and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The level of albumin (ALB) in the supernatant was determined with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: About 150 ± 20 adherent cells were obtained in each cord blood unit, and the growth of the cells entered log phase 6 days after plantation. The number of UCBMSCs reached 10^9 - 10^{10} after 10 generations. The CD44 and CD166 phenotypes were positive in UCBMSCs, whereas CD34 and CD45 were negative. On day 21-28,

UCBMSCs changed from long fusiform to polygonal or round-like shape (40-50%). The rate of double-nucleus cells was 5-7%. A few parts of the undifferentiated UCBMSCs expressed alpha-fetoprotein (AFP) and AFP mRNA, but did not express any of the liver-specific transcription factors or cytoplasmic markers. In the early period of induction, many cells expressed GATA4, AFP and CK19 proteins and their mRNA, and their expression reduced in the late period of induction. However, the expression of ALB, CK18, GST- π and hepatic nuclear factor-1 α (HNF-1 α) increased gradually in the process of induction. The rates of ALB- and CK18-positive cells were 61-65%. The undifferentiated UCBMSCs did not secrete ALB and urea while the differentiated UCBMSCs produced ALB in a time-dependent manner.

CONCLUSION: Human UCBMSCs can be successfully induced to differentiate into hepatocyte-like cells, which are able to secrete ALB.

Key Words: Umbilical cord blood mesenchymal stem cells; Hepatocyte-like cells; Differentiation; Albumin

He NH, Zhao WL, Wang YM. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells differentiate into functional hepatocyte-like cells *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(15):1814-1818

摘要

目的: 建立人脐血间充质干细胞(umbilical cord blood mesenchymal stem cells, UCBMSC)的体外分离、培养方法, 体外诱导 UCBMSC 分化为类肝细胞, 观察 UCBMSC 细胞生物学特性, 并对类肝细胞进行分子生物学及功能鉴定。

方法: 采用体外细胞培养技术, 分离培养人脐血 UCBMSC, 在 10 g/L Matrigel 作基质, 2.5 mmol/L AZA 预处理 10-12 h, HGF 10 µg/L + FGF4 10 µg/L+HGM 培养基中诱导。用显微摄像和 MTT 研究细胞增殖及生长特征, 用流式细胞仪、免疫组织化学、RT-PCR 鉴定细胞表型。采用 ELISA 法检测培养上清中人白蛋白水平。

结果: 每份脐血可获得 150 ± 20 个贴壁细胞; 细胞种植后 6 d 达到对数生长期, 连续传 10 代后, 每份脐带血 UCBMSC 可扩增达 10^9 - 10^{10} 个细胞。UCBMSC 表型为 CD44 及 CD166 阳性, CD34 及 CD45 阴性。在添加 FGF4 和 HGF 的 Matrigel 上诱导培养的 UCBMSC 在 21-28 d

时, 形态由长梭形变为三角形, 多角形或类圆形. 细胞转圆率为 40–50%, 双核细胞比率 5–7%. 免疫组化, RT-PCR 检测显示未诱导培养的 UCBMSC 中, 有较少的细胞表达 AFP 及其 mRNA, 未见其他肝脏特有的转录因子或者胞质蛋白标志. 诱导早期可见较多细胞表达 GATA4, AFP 和 CK19 及其 mRNA, 至诱导后期表达下降, 而 ALB, CK18, GST- π 和肝细胞转录因子 HNF1 α 表达逐渐上升. ALB, CK18 阳性细胞比例达 61–65%. 未诱导分化的 UCBMSC 没有分泌 ALB 和产生尿素, 诱导分化的 UCBMSC 以时间依赖方式产生白蛋白.

结论: 人脐血 UCBMSC 先分化为肝前体细胞, 再分化为成熟肝细胞, 获得了在复制及翻译各环节肝细胞标志阳性的类肝细胞, 已具备肝细胞特有的分泌白蛋白功能.

关键词: 人脐血间充质干细胞; 类肝细胞; 分化; 白蛋白

何念海, 赵文利, 王宇明. 人脐血间充质干细胞体外诱导分化为类肝细胞. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1814–1818
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1814.asp>

0 引言

骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cell, MMSC)具有向多种中胚层和神经外胚层来源组织细胞分化的能力, 在一定条件下, 还可以形成肌小管和肌腱^[1–4]. 大量研究显示MMSC可在人为诱发肝脏病变的实验鼠体内分化为肝细胞, 重建肝脏, 使病鼠肝功能恢复正常^[5]. Ratajczak *et al*^[6]报道CXCR4阳性细胞移出骨髓后表达早期肌肉, 肝脏和神经细胞的 mRNA. 体外利用小鼠骨髓细胞或来自骨髓的成体多潜能干细胞在不同条件下可分化为类肝细胞^[5, 7–14]. MSC具有可反复多次采集和自体移植或应用而不出现免疫排斥反应的优势. 如果能够利用易于获得的MSC在体外诱导分化为成熟肝细胞, 将为肝细胞移植及生物人工肝提供大量的细胞来源. 但MSC体内移植尚不能达到大规模增殖, 体外向肝细胞转化尚未见报道. 我们建立人脐带血间充质干细胞(umbilical cord blood mesenchymal stem cell, UCBMSC)的体外分离, 培养方法, 体外诱导分化UCBMSC为类肝细胞, 观察UCBMSC细胞生物学特性, 并对类肝细胞进行分子生物学和功能鉴定.

1 材料和方法

1.1 材料 健康产妇正常分娩的足月顺产人胎儿脐带血共15份. 用脐血收集袋收集每份脐血50–100 mL(肝素抗凝). 脐血与0.01 mol/L pH7.4的PBS按1:1混匀, 再与5 g/L的甲基纤维素按4:1混匀, 静置30 min沉降红细胞. 吸上清, 500 r/min, 4℃, 离心5 min, 弃上清, 用0.0 mol/L PBS重悬细胞, 轻轻地叠加到盛有到相对密度1.077的淋巴细胞分离液上(Ficoll与脐

带血体积比约1:1), 900 r/min, 20℃, 离心20 min, 可见血清, 单核细胞白膜层, 分离液, 红细胞沉淀四个清晰层面, 用吸管小心地收集白色界面单个核细胞层, 用含100 mL/L FBS的MEM培养基洗2次, 500 r/min, 离心5 min洗涤细胞, 以除去Ficoll. MEM培养基重悬单核细胞, 取细胞悬液90 μ L, 加入台盼蓝10 μ L, 鉴定细胞活率; 计数后, 用含100 mL/L FBS的MEM培养基调整细胞浓度为 2×10^9 /L, 接种入培养瓶中, 置于37℃, 50 mL/L CO₂, 饱和湿度的孵箱内培养. 1 wk后, 更换培养基, 倒置显微镜观察, 弃掉未贴壁细胞. 贴壁细胞即为UCBMSC. 以后每3 d换液1次. 细胞长到80%融合时, 用1:1的2.5 g/L胰蛋白酶和0.2 g/L EDTA混合液消化. 80%融合时给予2.5 g/L胰酶消化(在显微镜下控制消化时间), 按1:3传代扩增. 传代标记为P1, P2, P3……等. 采用MTT法观察细胞生长曲线. 流式细胞仪检测UCBMSC表型标记CD44, CD166, CD34, CD45.

1.2 方法 按文献[15]先予10 g/L Matrigel基质包被细胞爬片, 选择第3–5代增生旺盛, 活力良好的UCBMSC, 2.5 mmol/L AZA和20 mL/L FBS预处理10–12 h后, 用0.01 mol/L PBS洗涤2次, 按 $(10–20) \times 10^3$ cells/cm²接种, 给予HGF 10 μ g/L + FGF4 10 μ g/L + HGM培养基诱导诱导, 每2 d换液1次. 倒置显微镜观察细胞形态变化.

1.2.1 免疫组化法检测肝细胞标志蛋白在诱导分化细胞中的表达及分布 分别于诱导4, 7, 14, 21, 28 d收集细胞, 并以未诱导UCBMSC作为阴性对照, 以免疫组织化学法检测检测肝细胞早期标志AFP, CK19及转录因子GATA4, 成熟肝细胞标志ALB, CK18, GST- π 和肝细胞转录因子HNF1 α 的表达. 操作按SABC免疫组化说明书进行. 计数阳性细胞比例. 比较不同时相细胞中肝细胞标志表达情况. 分别收集未诱导的UCBMSC和诱导10, 28 d的细胞. RNA的提取按Roche公司RT-PCR试剂盒(Tripure 分离试剂)说明书进行, 取上述溶液4 μ L加入996 μ L无Rnase水中, 在紫外分光光度计上测定 A_{260} 和 A_{280} 的值. A_{260}/A_{280} 在1.8以上说明RNA纯度符合要求. 吸10 μ L(0.4 g/L)RNA样品10 g/L脂糖凝胶, 160 V电压电泳15 min, 于凝胶成像仪上, 拍照. 设计如下5对基因引物: FP基因引物, 特异性扩增片段428 bp. 上游引物: 5' -AAATGCGTTTCTCGTTGC-3', 下游引物: 5' -CAGCCTCAAGTTGTTCTCT-3'; LB基因引物, 特异性扩增片段162 bp. 上游引物: 5' -TGCTTG AATGTGCTGATGACAGGG-3', 下游引物: 5' -AAGGCAAGTCAGCAGGCATCTCATC-3'; K19基因引物, 特异性扩增片段328 bp. 上游引物: 5' -ATGCGCCGAGCAGACCGAA-3', 下游引物: 5' -CCATGAGCCGCTGGTACTCC-3';

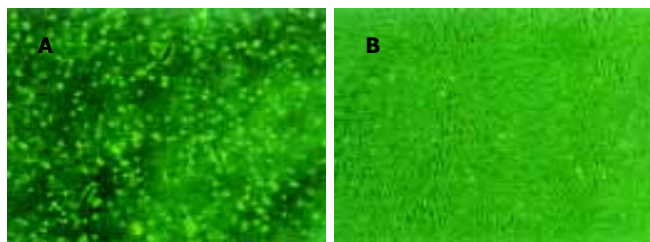


图1 原代培养UCBMSC. A: 3 d × 100; B: 15 d × 40.

K18 基因引物, 特异性扩增片段 361 bp. 上游引物: 5' -GAACCACGAAGAGGAAGTAAA-3'; 下游引物: 5' -CATCTGTAGGGCGTAGCG-3'; APDH 看家基因引物, 特异性扩增片段 520 bp. 上游引物: 5' -GTCAACGGATTGGTCTGTATT-3', 下游引物: 5' -AGTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'. 以提取的 RNA 为模板进行逆转录和 PCR 反应. 取扩增液 5 μ L 加溴酚蓝 1 μ L 于 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 并加小分子质量标记, 电压 50 V, 电泳 40 min, 取下凝胶紫外线下观察结果, 并在凝胶成像仪上电脑拍照. 分别于细胞诱导分化的 0, 3, 6, 13, 20, 27 d 换液, 换液量均为 3 mL, 培养 24 h 后收集上清, 分别以原代培养的单层胎肝细胞上清为阳性对照用放射免疫分析法检测白蛋白浓度. 同时记录培养细胞数. 研究均为复份, 每组研究重复 2 次. 检测灵敏度为 0.5 mg/L. 计算每个细胞每小时白蛋白分泌量 [标本浓度 (mg/L) \times 3 (mL) \times 10⁶ \div 24 (h) \times 细胞总数] $\text{pg} \times 100 / (\text{细胞} \cdot \text{h})$.

统计学处理 计量资料均以 mean \pm SD 表示并进行均数 t 检验或 u 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义.

2 结果

2.1 UCBMSC 分离培养 人脐血单核细胞培养后, 20% (3/15) 的样本出现间充质样细胞, 细胞数量平均为 150 ± 20 个贴壁细胞, 胞体呈梭形 (图 1A), 集落稀少. 原代生长缓慢, 最初散在存在, 2 wk 后形成几十到几百个细胞的克隆 (图 1B), 3 wk 后细胞生长达 80-90% 融合, 每个克隆约几百至几千个细胞, UCBMSC 呈较均一的长梭形. 每瓶单层融合的 UCBMSC 消化后, 平均获得 $(8.25 \pm 0.49) \times 10^5$ 个 UCBMSC. 将原代细胞传

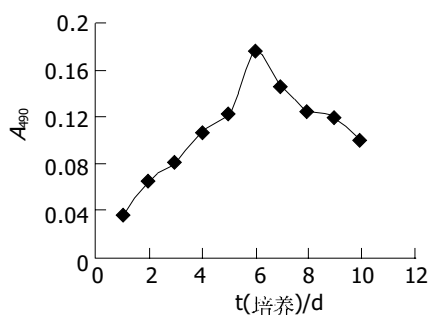
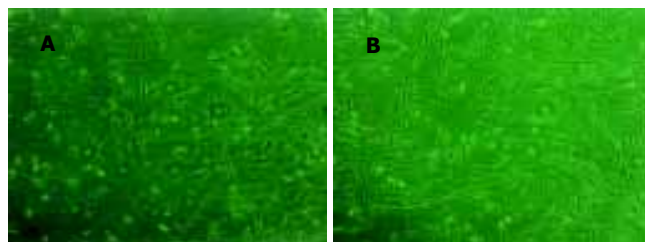


图3 UCBMSC 生长曲线图.

图2 UCBMSC 传代培养 $\times 40$. A: 1 d; B: 6 d.

代培养 (图 2A), 传代后的 UCBMSC 1 wk 左右融合, 可继续传代扩增 (图 2B). 传代培养细胞 7-9 d 可传 1 代, 传 10 代后可达到 10^9 - 10^{10} 个细胞. 传代培养 10 代的细胞未出现衰老征象. 传代培养的潜伏期约为 1-3 d, 传代培养细胞的对数增殖期约为 2-3 d, 对数增殖期后至接种后 8 d 进入平台期 (图 3). 细胞分裂指数曲线的趋势与生长曲线基本类似, 在达到对数生长期后, 分裂相的细胞明显减少 (图 4). 连续传 10 代后, 每份脐带血来源的 UCBMSC 可扩增达到 10^9 - 10^{10} 个细胞. 取培养第 5 代的细胞, 流式细胞术显示, UCBMSC 中 CD44 及 CD166 表达阳性细胞比例分别为 96.7% 和 91.7%; CD34 及 CD45 表达阳性细胞比例为 0% 和 2.05%.

2.2 诱导细胞的形态观察 在添加 FGF4 和 HGF 的 Matrigel 上诱导培养的 UCBMSC 在 21-28 d 时, 形态由长梭形变为三角形, 多角形或类圆形. 细胞转圆率为 40-50%, 双核细胞比率 5-7%. ALB, CK18 阳性细胞比例达 61-65% (表 1, 图 5). RT-PCR 方法检测 A_{260}/A_{280} 比值在 1.75-

表1 UCBMSC 细胞免疫组化结果 ($n = 5$)

标志	未诱导	t(诱导)/d				
		4	7	14	21	28
AFP	+	++	+	-	-	NT
CK19	-	±	+	-	-	NT
GATA4	-	±	+	++	++	+++
ALB	-	稀少 ±	++	++	++	+++
CK18	-	稀少 ±	++	+++	++	+++
HNF1 α	-	稀少 ±	-	±	+	+
+GST- π	-	稀少 ±	±	+	+	++

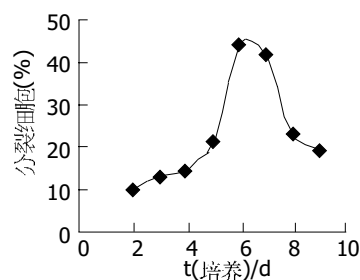


图4 UCBMSC 分裂指数曲线.

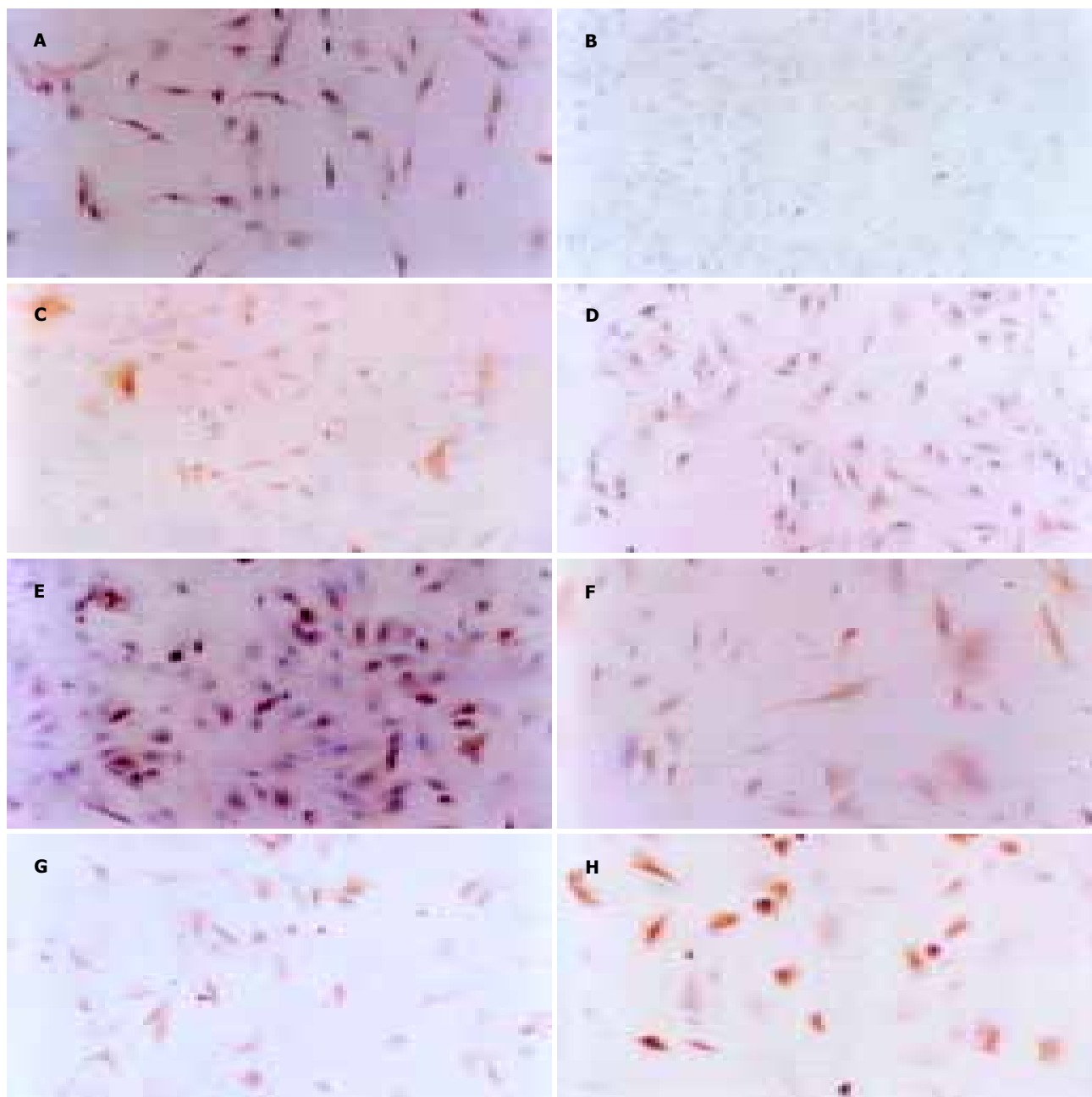


图5 UCBMSC细胞中肝细胞标志表达(SP × 100). A: 未诱导 AFP+; B: 诱导21 d AFP-; C: 诱导7 d CK19+; D: 诱导21 d GATA4+; E: 诱导14 d ALB+; F: 诱导14 d CK18+; G: 诱导14 d HNF1 α +; H: 诱导7 d GST- π +.

1.90之间;说明RNA质量好,纯度高. RT-PCR显示,未诱导的UCBMSC仅可表达微弱的AFP mRNA,诱导早期可见AFP mRNA和CK19 mRNA表达,诱导后期未见扩增,而ALB mRNA,CK18 mRNA早期和后期均可见表达(图6).在分化过程的不同时间点检测ALB生成,同期培养的未诱导分化UCBMSC没有分泌ALB;而给予FGF4和HGF处理后,UCBMSC产生的白蛋白以时间依赖方式增加(图7).

3 讨论

最近发现脐血中存在MSC^[16],UCBMSC形态与MMSC相似,倍增时间为48 h,传代后形态基本无变化;UCBMSC不表达CD34及CD45,强表达CD44及CD166,与MMSC

的表面抗原特性一致,是脐血中区别于造血干细胞的一群处于未分化状态的非定向干祖细胞.在添加FGF4和HGF的Matrigel上诱导培养UCBMSC 4 d后表达肝脏特有的转录因子GATA4和较低水平的胞质蛋白CK19,AFP阳性细胞比例达到最高,同时非常稀少的细胞呈现肝细胞分化中重要的转录因子HNF1 α ,胞质蛋白ALB,或者CK18染色阳性.在7 d时,大的上皮细胞出现HNF1 α 染色阳性,同时ALB和CK18染色强度增加.只有非常少的细胞表达AFP. UCBMSC在诱导培养14,21和28 d后,大的上皮细胞GATA4,HNF1 α ,GST- π ,CK18和ALB染色阳性,而AFP或者CK19染色阴性.用蛋白质印迹分析确认了AFP,CK18和ALB的免疫组化结果. RT-PCR确证了肝细胞分化中重要的胞质

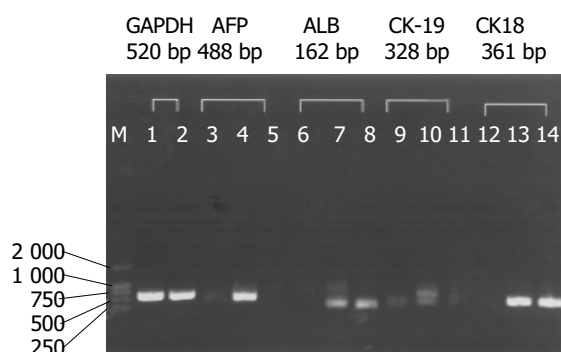


图6 UCBMSC RT-PCR产物20 g/L琼脂糖凝胶电泳。1, 3, 6, 9, 12: 未诱导; 2, 4, 7, 10, 13: 诱导10 d; 5, 8, 11, 14: 诱导28 d。

蛋白如CK19, CK18, AFP, ALB. 大量研究显示骨髓细胞或纯化的造血干细胞(haemopoietic stem cell, HSC)均可在体内转化为肝细胞^[5,7-14]。我们的实验结果显示UCBMSC向类肝细胞的横向分化是先分化为肝前体细胞, 表达肝细胞分化的早期标志GATA4, CK19和AFP, 再分化为成熟肝细胞, 表达肝细胞的晚期标志HNF1 α , HNF-3 β , CK18和ALB. UCBMSC在诱导条件下可获得在复制及翻译各环节肝细胞标志阳性的类肝细胞。

业已证明联用FGF4和HGF可将UCBMSC诱导为具有肝细胞形态和表型的细胞^[12-14], 单有此点不能证明细胞已分化为肝细胞, 除非证明获得了肝细胞的功能性特征。白蛋白产生是肝细胞存在和代谢活性的特异性试验。我们的功能试验结果证明诱导培养后的UCBMSC产生白蛋白, 提示从人脐带血来源的UCBMSC体外用AZA预处理后培养于Matrigel包被并加用FGF4和HGF的HGM培养基时不仅表达肝细胞标志, 更有与肝细胞合成代谢活性一致的功能特征。成体组织特异性干细胞分化为不同组织细胞的发现对于干细胞具有组织特异性的传统生物学观点提出了挑战。在我们的培养系统中, UCBMSC被诱导, 去分化而变为肝前体细胞, 而后再分化肝细胞样细胞, 象在克隆过程所见的培养系统诱导染色质重塑并改变细胞命运。UCBMSC在体外能被分离, 扩增和保持群体倍增数的未分化状态, 并被诱导特异分化为肝细胞样细胞, 使UCBMSC成为体内基因性或获得性肝病治疗及应用于生物人工肝装置的理想细胞。进一步的研究是探索UCBMSC衍生的肝细胞样细胞治疗肝脏疾病的潜力。

4 参考文献

- 1 Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, Radu A, Moseley AM, Deans R, Marshak DR, Flake AW. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med* 2000;6:1282-1286
- 2 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak

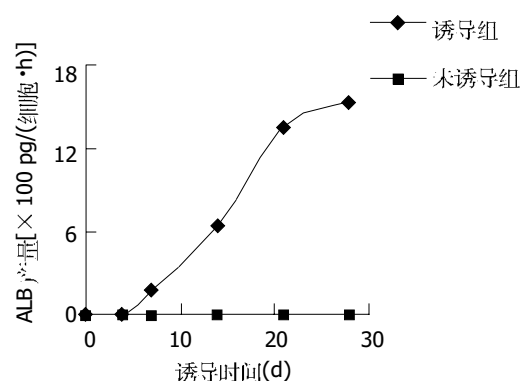


图7 UCBMSC上清液中白蛋白产量。

- DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147
- 3 Mezey E, Chandross KJ. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *Eur J Pharmacol* 2000;405:297-302
- 4 Fukuda K. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *C R Biol* 2002;325:1027-1038
- 5 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16
- 6 Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 2004;18:29-40
- 7 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234
- 8 Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:369-377
- 9 Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170
- 10 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000;31:235-240
- 11 Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillion AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257
- 12 Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:500-504
- 13 Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:24-30
- 14 Yamazaki S, Miki K, Hasegawa K, Sata M, Takayama T, Makuuchi M. Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells. *J Hepatol* 2003;39:17-23
- 15 何念海, 赵文利, 王宇明. 人胎儿骨髓间充质干细胞体外向类肝细胞诱导分化条件的优化. 第四军医大学学报 2004;25:1939-1943
- 16 Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235-242

UGT1A8 基因多态与结直肠癌的相关性

王 敏, 孙德峰, 李延青, 陈 建, 郭辰虹, 刘福国, 袁孟彪

王敏, 山东大学齐鲁医院干部保健科 山东省济南市 250012
孙德峰, 山东省烟台护士学校遗传教研室 山东省烟台市 264000
李延青, 陈建, 刘福国, 袁孟彪, 山东大学齐鲁医院消化内科
山东省济南市 250012
郭辰虹, 山东大学医学遗传学研究所 山东省济南市 250012
王敏, 女, 1968-08-22 生, 山东省烟台市人, 汉族, 山东大学齐鲁医院消化内科博士, 主要从事结肠癌的基础与临床研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30370634
通讯作者: 李延青, 250012, 山东省济南市文化西路 107 号, 山东大学齐鲁医院消化内科. doctormin@163.com
电话: 0531-82169454
收稿日期: 2005-05-31 接受日期: 2005-06-13

Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A8 gene in human colorectal cancer

Min Wang, De-Feng Sun, Yan-Qing Li, Jian Chen, Chen-Hong Guo, Fu-Guo Liu, Meng-Biao Yuan

Min Wang, Department of Health Care, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China
De-Feng Sun, Yantai Nursing School, Yantai 264000, Shandong Province, China
Yan-Qing Li, Jian Chen, Fu-Guo Liu, Meng-Biao Yuan, Department of Gastroenterology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China
Chen-Hong Guo, Institute of Medical Genetics, Shandong University, Jinan 250012, Shandong Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30370634
Correspondence to: Yan-Qing Li, Department of Gastroenterology, Qilu Hospital of Shandong University, 107 Wenhua Road, Jinan 250012, Shandong Province, China. doctormin@163.com
Received: 2005-05-31 Accepted: 2005-06-13

Abstract

AIM: To explore the relationship between the polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A8 gene and human colorectal cancer (CRC).

METHODS: One hundred and nine cases of colorectal cancer and normal controls (NC), respectively, were collected for analysis. Genomic DNA was prepared from full blood samples. The amplification of UGT1A8 exon-1 sequences was performed using exon-1 specific primer. And the products were visualized by gel electrophoresis and the fragments were purified. The extracted DNA was subcloned into TOPO TA plasmid and the insert was sequenced for the allelic specificity. Two-tailed Fisher's exact test was used to determine the differences of allelic genotypes between CRC and NC group. Odds ratios (ORs) and confidence interval (CI) were calculated to evaluate

the relationship between the gene polymorphism and the grades of CRC. The predisposition factors of CRC were analyzed by Logistics.

RESULTS: Three mutations were identified in UGT1A8 exon-1. The allele frequency of wild UGT1A8*1 was higher in controls when compared with that in CRC ($P = 0.047$, $OR = 0.51$, 95% CI: 0.28-0.79), suggesting that this allele was a protective factor. The frequency of mutant UGT1A8*3 was significantly lower in controls than that in CRC ($P = 0.003$, $OR = 9.63$, 95% CI: 2.12-7.79), indicating UGT1A8*3 as a risk factor of CRC. The expression of homozygous UGT1A8*1 was markedly higher in controls than that in CRC ($P = 0.045$). Both heterozygous UGT1A8*1/*3 and UGT1A8*2/*3 were more significantly expressed in CRC as compared with that in controls ($P < 0.05$, $OR = 5.03$, 95% CI: 2.25-5.99; $P = 0.003$, $OR = 12.90$, 95% CI: 2.68-6.15). Logistic regression analysis demonstrated that the occurrence of CRC was mainly related to the presence of polymorphic UGT1A8 alleles ($P = 0.029$), but not the sex of the patients ($P = 0.25$).

CONCLUSION: The high incidence of UGT1A8 polymorphism exists in the patients with colorectal cancer. UGT1A8*1 allele is a protective factor and UGT1A8*3 allele is a risk factor for CRC. Homozygous UGT1A8*1/*3 and UGT1A8*2/*3 are also associated with the high occurrence of CRC.

Key Words: Colorectal cancer; UDP-glucuronosyltransferase UGT1A8; Polymorphism; Predisposition

Wang M, Sun DF, Li YQ, Chen J, Guo CH, Liu FG, Yuan MB. Polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase UGT1A8 gene in human colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(15):1819-1823

摘要

目的: 探讨葡萄糖醛酸转移酶UGT1A8基因多态与结直肠癌的相关性。

方法: 结直肠癌病例组与正常对照组各109例, 取静脉血5 mL, 提取DNA, PCR扩增获得UGT1A8第一外显子, 对扩增产物检测、纯化及测序。每个基因型样本克隆至TOPO TA质粒, 通过DNA序列分析其特性。经双尾Fisher精确检验, 确定各等位基因及基因型在

病例组与对照组中的分布差异.计算OR值及95%CI,评价研究因素与结直肠癌的相关强度.采用Logistic回归分析UGT1A8各基因型及性别因素对结直肠癌的易感性.

结果: UGT1A8基因第一外显子区域存在3个突变位点.野生型UGT1A8*1等位基因频率在对照组高于病例组($P=0.047$),两组差异有统计学意义,OR值为0.51(95%CI 0.28–0.79),此等位基因为保护性因素.突变型等位基因UGT1A8*3频率在正常对照组稀有,明显低于病例组($P=0.003$),OR值为9.63(95%CI 2.12–7.79),此等位基因为结直肠癌的危险因子.纯合基因型UGT1A8*1/*1在正常对照组比例高于病例组($P=0.045$),OR值为0.28(95%CI 0.16–0.88),此基因型的危险度减少.UGT1A8*1/*3杂合基因型($P=0.028$)、UGT1A8*2/*3杂合基因型($P=0.003$)在病例组高于对照组,OR值分别为5.03(95%CI 2.25–5.99)及12.90(95%CI 2.68–6.15),这两种基因型为结直肠癌的易感性因素.Logistic回归分析,UGT1A8等位基因多态性是结直肠癌发生的主要影响因素($P=0.029$),性别因素影响不明显($P=0.25$).

结论: 结直肠癌UGT1A8呈现明显的基因多态性,野生型UGT1A8*1等位基因为保护性因素,突变型UGT1A8*3为结直肠癌的危险因子.UGT1A8*1/*3、UGT1A8*2/*3杂合基因型为结直肠癌的易感性因素.

关键词: 结直肠癌; 葡萄糖醛酸转移酶 1A8; 多态性; 易感性

王敏, 孙德峰, 李延青, 陈建, 郭辰虹, 刘福国, 袁孟彪. UGT1A8基因多态与结直肠癌的相关性. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1819–1823
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1819.asp>

0 引言

葡萄糖醛酸转移酶(UDP-glucuronosyltransferase, UGT)对内源性代谢物如类固醇、胆红素以及外源性药物、毒物及致癌物等的代谢和排出有重要意义^[1].在结直肠癌中遗传病因占15–20%,致突变物介导的基因毒性启动了的肿瘤发生,这种致癌作用的危险度取决于细胞的遗传生化保护机制.UGT1A8由UGT1基因位点编码,主要表达于肠道^[1–2],可催化N-羟基化合物与葡萄糖醛酸结合,阻止和降低杂环胺物质诱发DNA突变的发生^[3].等位基因的变异在UGT1A8的功能特性中具有重要的意义.这些发现提示我们,UGT1A8基因表达及功能的改变可能是结直肠肿瘤发生的危险性因素.我们将UGT1A8作为靶基因,检测了结直肠癌患者及正常对照人群UGT1A8基因位点的基因型,探讨其基因多态性与结直肠癌的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 2002–11/2004–09 山东大学齐鲁医院普外科及消化内科患者109例,男68例,女41例,平均

年龄为(55.4 ± 10.2)岁.为新发6 mo内入院、病理学确诊的结直肠癌患者;按照Amsterdam II标准^[4],排除遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC)及家族性腺瘤息肉病(FAP);均未经过化放疗或其他针对肿瘤的生物治疗.对照组109例选自健康查体志愿者,男66例,女43例,平均年龄为(53.2 ± 9.2)岁.与病例组性别比相近;年龄相差小于5岁;与病例组均来自山东同一地域,均为山东籍汉族人;与病例组无血缘关系.对纳入研究的病例与对照组进行问卷调查,问卷采用面访形式.调查表内容包括年龄、性别、当前和既往职业史,个人生活习惯、吸烟与酒精摄入情况、详细饮食摄入情况、肿瘤遗传史等,建立流行病学档案.红细胞裂解液,白细胞裂解液,蛋白沉淀液, DNA水化液等试剂均由山东大学医学院医学遗传学研究所提供,5 × PCR反应液,5 × dNTP, TaqDNA内切酶等购自美国Promega公司,PCR产物凝胶回收试剂盒购自美国BioTek公司.

1.2 方法 空腹抽取上述病例组及对照组的外周静脉血5 mL, ACD防凝备用.取300 μL防凝血注入到1.5 mL Eppendorf管中,加入红细胞裂解液900 μL,混匀,室温下放置10 min, 12 000 g离心20 s,弃上清液,加入红细胞裂解液50 μL将细胞重悬,其后再加入白细胞裂解液300 μL,充分混匀,室温下放置30 min,加入蛋白沉淀液100 μL,充分混匀,12 000 g离心3 min,将上清液转移至1.5 mL的新Eppendorf管中,缓慢加入两倍体积的预冷无水乙醇,轻摇直至DNA析出;9 000 g离心1 min,弃上清液,在沉淀中加入750 mL/L乙醇500 μL,9 000 g离心1 min,弃上清液,晾干,加入DNA水化液100 μL溶解DNA.用紫外分光光度计进行DNA定量后,将DNA稀释至20 mg/L备用.

1.2.1 UGT1A8 EXON-1的PCR扩增 人类UGT1A基因位点在5'端包含个体差异调节的第一外显子,根据编码UGT1A基因位点(accession number AF297093)的序列而设计引物,forward primer(pr1A8F-bases 34175–34198):5' -tgg ggt cag gtt ttg tgc ctg tag-3', reverse primer(pr1A8R, bases 35175–35208):5' -gaa aat gtc aaa tca caa ttc agt aag gaa tct-3'.反应体系100 μL,其中5 × PCR反应液4 μL、5 × dNTP 4 μL、上下游引物各0.5 μL, TaqDNA内切酶5U,模板DNA 2 μL,余体积用灭菌三蒸水补齐.95℃预变性3 min, 95℃变性30 s、57℃退火30 s、72℃延伸30 s,共35个循环,末次72℃延伸10 min.取PCR扩增产物5 μL,加入1/6体积的电泳上样缓冲液混匀,上样于20 g/L琼脂糖凝胶中,150 V电泳1 h,将凝胶用EB(溴化乙锭)凝胶染色15 min,紫外灯下观察扩增结果.

1.2.2 PCR 产物的纯化和测序 将所扩增的PCR产物全部上样于 20 g/L 琼脂糖凝胶中, 150 V 电泳 1 h. EB 染色 15 min 后, 在波长 320 nm 紫外光下将扩增的 DNA 条带切下, 放入新的 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入 4 倍体积 Binding Buffer, 65℃ 水浴 7 min 后转移至 column 内, 12 000 g 离心 1 min, 弃去溶液, 用 300 μ L Binding Buffer 冲洗 column, 12 000 g 离心 1 min, 加入 750 μ L DNA Wash Buffer, 10 000 g 离心 1 min, 重复 1 次, 然后 12 000 g 离心 1 min, 弃去溶液. 12 000 g 离心 1 min. 更换新的 1.5 mL Eppendorf 管, 在 column 中加入 30 μ L DNA Water Buffer, 12 000 g 离心 1 min, 收集溶液定量待测序. 每个基因型的样本克隆至 TOPO TA 克隆质粒, 每一个 DNA 样本多重克隆, DNA 测序经 377 型全自动 DNA 测序仪 (美国 ABI 公司) 分析完成, 通过 DNA 序列分析其特性.

统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件包, 进行双尾 Fisher 精确检验, 确定各等位基因及基因型在病例组与对照组中分布的差异. 计算比值比 OR 值及 95% CI, 用于评价研究因素与结直肠癌的相关强度. 采用 Logistic 回归分析 UGT1A8 所有基因型、携带 UGT1A8*3 的基因型及性别因素对结直肠癌的易感性. $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

测序结果用 DNA star 分子生物学软件的 SeqMan 进行分析, 先将每条测序引物的全部测序结果进行汇总, 剔除测序峰图的假峰和坏区, 并与人类基因组计划测定的 UGT1A8 标准序列比对, 确定 SNP 位点及相应等位基因的频率. χ^2 检验等位基因的群体分布符合 Hardy-Weinberg 平衡.

2.1 UGT1A8 等位基因的鉴定 样本 DNA 经过 PCR 反应, 扩增片段长度为 1 033 bp (图 1), 扩增的 DNA 纯化后测序. 结果可见在第一外显子区域存在 3 个突变位点 (表 1, 图 2). 碱基对 518C>G, 碱基对 765A>G,

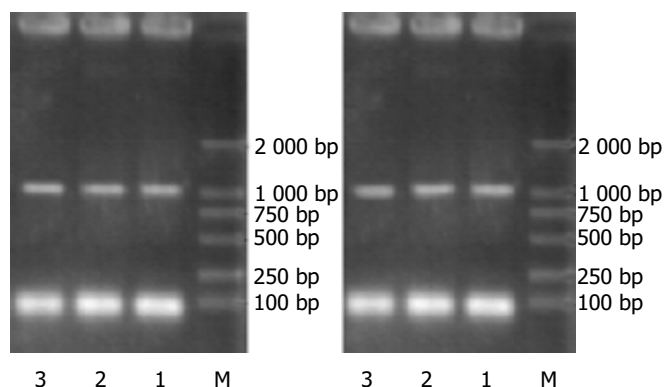


图1 UGT1A8 第一外显子扩增产物(1 033 bp).

碱基对 830G>A. 518 位点突变导致 173 密码子错义突变, 致使丙氨酸被甘氨酸替代. 830G>A 突变导致 277 密码子编码的半胱氨酸转变成酪氨酸. 碱基对 765A>G 突变为沉默突变 (表 2). 样本中大多数均为杂合型突变, 仅有一个单一性突变 (表 1). 这个结果显示三个突变是非连锁的. 为进一步检测这种可能性, 每个基因型的样本克隆至 TOPO TA 克隆质粒, 每一个 DNA 样本多重克隆, 通过 DNA 序列分析其特性. 所有样本突变模式与等位基因同一性的匹配见表 1. 在确定了 UGT1A8*2 和 UGT1A8*3 等位基因的情况下, 用 TOPO 克隆每一个 DNA 样本来核对检验基因型.

表1 UGT1A8 基因第一外显子(exon-1)区域的多态位点

	核苷酸位置		
	518	765	830
UGT1A8*1	C	A	G
变异体	G	G	A
	A ¹⁷³ G	T ²⁹⁵ (silent)	C ²⁷⁷ T

UGT1A8 基因的 3 个多态位点位于碱基 518 765 和 830, 表中所示这些碱基在 UGT1A8*1 的位置, 以及其他等位基因的单核苷酸多态性. 这些突变之间无连锁.

表2 UGT1A8 蛋白等位基因多态性区域(173 和 277 氨基酸)与其他 UGT1A 蛋白的氨基酸同一性

UGT	氨基酸位点					
	172	173	174	276	277	278
1A1	L	P	C	N	C	L
1A3	I	P	C	N	C	A
1A4	I	P	C	N	C	A
1A6	F	P	C	N	C	K
1A7	I	F	C	N	C	H
1A8*1	I	A	C	N	C	H
1A8*2	I	G	C	N	C	H
1A8*3	I	A	C	N	T	H
1A9	I	L	C	N	C	H
1A10	I	F	C	N	C	

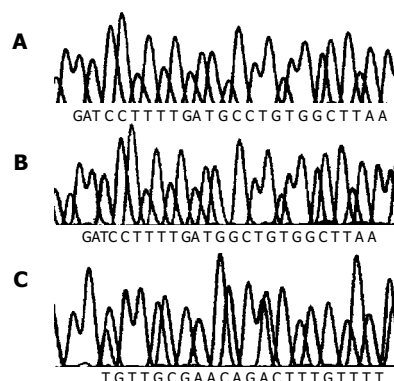


图2 UGT1A8等位基因测序结果. A: UGT1A8*1; B: UGT1A8*2; C: UGT1A8*3.

2.2 结直肠癌 UGT1A8 等位基因频率及基因型 正常对照组中, 等位基因中79%为UGT1A8*1和UGT1A8*1a, 大约 18.8% 等位基因为 UGT1A8*2, 而 UGT1A8*3 比例最低, 总等位基因群体约 2.3% 携带这种基因型 (表3). 因为 UGT1A8*1a 是沉默突变, 他编码 UGT1A8*1, 因此 1A8*1 纯合型基因型 (UGT1A8*1/*1, UGT1A8*1/*1a, UGT1A8*1a/*1a) 表达约占总人群的 65.21% (表4). 杂合基因型 UGT1A8*1/*2 和 UGT1A8*1a/*2 的频率大约 24.64%, 纯合 UGT1A8*2/*2 的表达仅占 5.8%. UGT1A8*1/*3, UGT1A8*2/*3 的杂合基因型频率为约 4.35%, 在我们检测的对照组中未发现 UGT1A8*3 的纯合型表达. 在病例组中, UGT1A8*1 和 UGT1A8*1a 频率为 61.5%, UGT1A8*2 频率为 22.0%, UGT1A8*3 等位基因频率为 16.5%. 分析此组的基因型, 46.38% 的结直肠癌患者呈现 UGT1A8*1 纯合基因型. 杂合基因型 UGT1A8*1/*2 和 UGT1A8*1a/*2 的频率约 18.84%, 纯合型 UGT1A8*2/*2 的表达仅占 4.35%. UGT1A8*1/*3, UGT1A8*2/*3 的杂合基因型频率为约 28.98%, 在我们检测的结直肠癌组中有 1 例 UGT1A8*3 的纯合型表达 (表3). 野生型 UGT1A8*1 在正常对照组为 51.4%, 而病例组比例为 32.1%, 采用双尾 Fisher 精确检验, $P = 0.047$, 差异有统计学意义. 计算 OR 值为 0.51 (95% CI 0.28-0.79). 突变型等位基因 UGT1A8*3 在正常对照组为 2.3%, 而在病例组 16.5%, $P = 0.003$, 两组差异有统计学意义 (图3). 计算 OR 值为 9.63 (95% CI 2.12-7.79). 纯合型 UGT1A8*1/*1 在正常对照组为 34.78%, 而病例组为 13.04%, 采用双尾 Fisher 精确检验, $P = 0.045$, 两组差异有统计学意义. 计算 OR 值为 0.28 (95% CI 0.16-0.88). UGT1A8*1/*3 杂合基因型在对照组与病例组分别为 2.90% 和 13.04%, $P = 0.028$, OR 值为 5.03 (95% CI 2.25-5.99); UGT1A8*2/*3 杂合基因型在病例组及对照组分别为 1.45% 和 15.94%, $P = 0.003$, OR 值为 12.90 (95% CI 2.68-6.15) (图4). Logistic 回归分析结果说明, UGT1A8 等位基因的多态性是肿瘤发生的主要影响因素 ($P = 0.029$), 尤其是 UGT1A8*3 ($P = 0.001$), 但性别因素影响不甚明显 ($P = 0.25$).

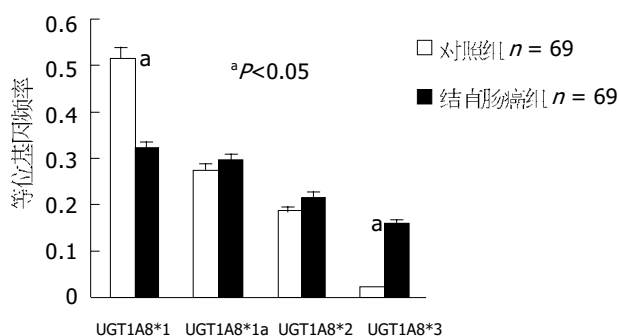


图3 结直肠癌 UGT1A8 等位基因频率的分布.

表3 结直肠癌 UGT1A8 等位基因频率分布(% , $n = 69$)

等位基因	氨基酸位置	对照组	结直肠癌组	P值	OR值(95% CI)
UGT1A8*1	A ¹⁷³ T ²⁵⁵ C ²⁷⁷	0.514	0.321	0.047	0.51(0.28-0.79)
UGT1A8*1a	A ¹⁷³ T ²⁵⁵ A>G ^C 277	0.275	0.294	0.329	
UGT1A8*2	G ¹⁷³ T ²⁵⁵ C ²⁷⁷	0.188	0.220	0.572	
UGT1A8*3	A ¹⁷³ T ²⁵⁵ Y ²⁷⁷	0.023	0.165	0.003	9.63(2.12-7.79)

表4 结直肠癌 UGT1A8 基因多态

UGT1A8 Genotypes	对照组 $n = 109$ (%)	结直肠癌 $n = 109$ (%)	P值	OR值(95% CI)
UGT1A8*1/*1	38(34.78)	14(13.04)	0.045	0.28(0.16-0.88)
UGT1A8*1/*1a	14(13.04)	14(13.04)	0.412	
UGT1A8*1a/*1a	19(17.39)	22(20.30)	0.642	
UGT1A8*2/*1	19(17.39)	14(13.04)	0.477	
UGT1A8*2/*1a	8(7.25)	6(5.80)	0.730	
UGT1A8*2/*2	6(5.80)	5(4.35)	0.698	
UGT1A8*3/*1	3(2.90)	14(13.04)	0.028	5.03(2.25-5.99)
UGT1A8*3/*2	2(1.45)	18(15.94)	0.003	12.90(2.68-6.15)
UGT1A8*3/*3	0(0)	2(1.45)	—	

3 讨论

在癌变的启动阶段, 代谢酶基因的多态性在决定环境致癌物的效应中起着关键作用. 肠道内 UGT 的高度表达, 说明这些酶蛋白在解毒代谢中具有重要的作用^[5-7]. Guillemette *et al*^[8]发现非洲籍美国女性的 UGT1A1 低活性等位基因型在乳腺癌组高于正常对照组. UGT2B15 的多态导致双氢睾酮葡萄糖醛酸化降低, 致双氢睾酮水平增加, 在前列腺癌的发生中有重要意义^[9]. 我国刘茶珍 *et al*^[10]发现 UGT1F 基因第 1 外显子则呈高度多态, 可能与肝癌有关. 另有国外相关的研究揭示 UGT1A7*3 作为肿瘤风险因子在肝癌、喉癌中的意义^[11-12]. UGT1A8 基因产物的差异性说明此基因具有高度多态性^[13]. 我们检测了山东籍汉族人群中结直肠癌病例组及对照组外周血 DNA 中 UGT1A8 第一外显子区域的基因型, 在 218 例 (对照组及病例组各 109 例) 进行分析, 1 033 bp 的第一外显子中包含 3 个单核苷酸多态性. 其中 2 个导致在密码子 173 和 277 的错义突变, 分别导致了丙氨

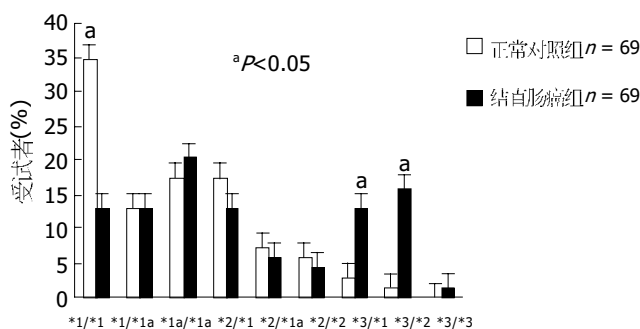


图4 UGT1A8 基因多态与结直肠癌的相关性.

酸替代为甘氨酸, 以及半胱氨酸替代为酪氨酸. 分析两组人群的等位基因, 发现在结直肠癌组 UGT1A8 表现明显的基因多态性, 野生型 UGT1A8*1 在正常对照组高于病例组比例, 差异有统计学意义, OR 值 0.51, 说明此等位基因为保护性因素, 疾病的危险度减少. 突变型等位基因 UGT1A8*3 在正常对照组低于病例组, 差异有统计学意义, OR 值 9.63, 说明此等位基因为易感性因素, 疾病的危险度增加. 进一步分析基因型, UGT1A8*1 纯合基因型 UGT1A8*1/*1 在正常对照组为高于病例组, OR 值 0.28, 此基因型疾病的危险度减低. UGT1A8*1/*3 杂合基因型 (OR 值 5.03)、UGT1A8*2/*3 杂合基因型 (OR 值 12.90), 说明这两种基因型为结直肠癌的易感性因素, 使危险度增加. 基因型分析进一步论证了 UGT1A8*3 等位基因是结直肠癌的危险因子. Logistic 回归分析亦说明, UGT1A8 等位基因的多态性是肿瘤发生的主要影响因素, 尤其是 UGT1A8*3, 但性别因素影响不甚明显.

UGT1A8A¹⁷³G 突变是保守的无极性氨基酸变化, 但是这个位置的 A/G 的存在在其他 UGT 1A 蛋白中未发现, 173 位置 A/G 相比于此位置上的重复的保守 P, L 或 F, 说明其对功能是很关键的. 然而 Huang *et al*^[14] 观察到在 173 位置 A 被 G 取代, 对催化活性影响较少. 而在 UGT 1A8*3, 在编码高度保守的 C²⁷⁷ 的密码子单个碱基对的突变导致被酪氨酸替代, 致使此蛋白失活. 定位于第一外显子的 C²⁷⁷ 在蛋白构象中起着重要的作用, 涉及到与另一个半胱氨酸形成二硫化物, 这种二聚体氨基酸的形成对其二级结构或活性具有关键性的作用. 有学者观察到存在于 UGT1A8 第一外显子区域的错义突变导致了在 K¹³³R, A¹⁷³G, T²⁰²A, M²¹²L, T⁴A, T⁴⁰A, A¹⁵⁴G, F¹²¹S^[13] 部位氨基酸的变化, 从而出现 UGT1A8 酶蛋白催化能力的明显差异. UGT1A8 在结肠中的选择性丰富表达揭示其在组织特异性葡萄糖醛酸结合反应中的重要作用. 其代谢能力的降低可能致结肠的自稳状态失衡. UGT1A8 基因占优势的两种形式 UGT1A8*1 和 UGT1A8*2 之间催化能力相差不大, 而非功能性 UGT1A8*3 等位基因遗传的可能性, 尤其是纯合基因型在正常人群中稀有, 由此其作为肿瘤危险因子在结直肠癌的筛选中有重要意义.

结直肠癌是人类主要的恶性肿瘤之一, 我国结直肠癌近年来发病率显著上升^[15]. 由于结直肠癌早期缺乏典型症状和体征, 在确诊时已属中晚期, 因此做好结直肠癌的一级预防十分重要. 肿瘤分子流行病学研究对肿瘤防治的影响已初露端倪, 对人体易感基因类型和暴露致癌因素之间关系的研究为结直肠癌高危

人群的确定提供了分子生物学手段, 此研究将有助于汇集结直肠癌高危人群, 对其高危因子与代谢基因多态之间以及多态基因之间的交互作用的进一步深入探讨, 为癌症的化学预防及基因治疗开辟新途径.

4 参考文献

- 1 Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:581-616
- 2 Tukey RH, Strassburg CP. Genetic multiplicity of the human UDP-glucuronosyltransferases and regulation in the gastrointestinal tract. *Mol Pharmacol* 2001;59:405-414
- 3 Malfatti MA, Felton JS. N-glucuronidation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b]pyridine (PhIP) and N-hydroxy-PhIP by specific human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis* 2001;22:1087-1093
- 4 Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the international Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453-1456
- 5 Strassburg CP, Kneip S, Topp J, Obermayer-Straub P, Barut A, Tukey RH, Manns MP. Polymorphic gene expression and interindividual variation of UDP-glucuronosyltransferase activity in human small intestine. *J Biol Chem* 2000;275:36164-36171
- 6 Vogel A, Ockenga J, Ehmer U, Barut A, Kramer FJ, Tukey RH, Manns MP, Strassburg CP. Polymorphisms of the carcinogen detoxifying UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 in proximal digestive tract cancer. *Z Gastroenterol* 2002;40:497-502
- 7 Shipkova M, Strassburg CP, Braun F, Streit F, Grone HJ, Armstrong VW, Tukey RH, Oellerich M, Wieland E. Glucuronide and glucoside conjugation of mycophenolic acid by human liver, kidney and intestinal microsomes. *Br J Pharmacol* 2001;132:1027-1034
- 8 Guillemette C, Millikan RC, Newman B, Housman DE. Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 and association with breast cancer among African Americans. *Cancer Res* 2000;60:950-956
- 9 MacLeod SL, Nowell S, Plaxco J, Lang NP. An allele-specific polymerase chain reaction method for the determination of the D85Y polymorphism in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B15 gene in a case-control study of prostate cancer. *Ann Surg Oncol* 2000;7:777-782
- 10 Liu CZ, Bian J, Jiang F, Shen F. Genetic polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 1F and susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Yixue Yi Chuan Xue Zazhi* 2002;19:324-3288
- 11 Vogel A, Kneip S, Barut A, Ehmer U, Tukey RH, Manns MP, Strassburg CP. Genetic link of hepatocellular carcinoma with polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A7 gene. *Gastroenterology* 2001;121:1136-1144
- 12 Zheng Z, Park JY, Guillemette C, Schantz SP, Lazarus P. Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1411-1418
- 13 Cheng Z, Radominska-Pandya A, Tephly TR. Cloning and expression of human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A8. *Arch Biochem Biophys* 1998;356:301-305
- 14 Huang YH, Galijatovic A, Nguyen N, Geske D, Beaton D, Green J, Green M, Peters WH, Tukey RH. Identification and functional characterization of UDP-glucuronosyltransferases UGT1A8*1, UGT1A8*2 and UGT1A8*3. *Pharmacogenetics* 2002;12:287-297
- 15 Zhang YL, Zhang ZS, Wu BP, Zhou DY. Early diagnosis for colorectal cancer in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:21-25

胎儿胰腺来源的单克隆 SP 细胞具有间充质的表型特征

吴永华, 洪天配, 张 玲, 胡 江, 李凌松

吴永华, 洪天配, 张玲, 北京大学第三医院内分泌科 北京市 100083
胡江, 李凌松, 北京大学干细胞研究中心 北京市 100083
吴永华, 男, 1977-01-26 生, 山西省太原市人, 汉族, 2002 年北京大学硕士生, 主要从事胰腺干细胞的应用基础研究。
国家自然科学基金项目, No. 30170443
211 工程建设项目人体干细胞工程学科群资助项目, No.108-2
通讯作者: 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: 010-62017691-8212 传真: 010-62017700
收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-06-13

Monoclonal SP cells derived from human fetal pancreas have phenotypic markers identical to mesenchymal stem cells

Yong-Hua Wu, Tian-Pei Hong, Ling Zhang, Jiang Hu, Ling-Song Li

Yong-Hua Wu, Tian-Pei Hong, Ling Zhang, Department of Endocrinology, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China
Jiang Hu, Ling-Song Li, Research Center of Stem Cells, Peking University, Beijing 100083, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30170443, and the 211 Project Foundation of Peking University, No.108-2
Correspondence to: Tian-Pei Hong, Department of Endocrinology, the Third Hospital of Peking University, Beijing 100083, China. tpho66@bjmu.edu.cn
Received: 2005-05-08 Accepted: 2005-06-13

Abstract

AIM: To find out a new method for isolation and purification of human pancreatic stem cells, and to investigate the characterization of the cells acquired by this method.

METHODS: Islet-like cell clusters (ICCs) were isolated from human fetal pancreas. Monolayer epithelium-like cells were obtained from the ICCs and passaged thereafter. The side population (SP) cells or non-SP cells were sorted from these cells at the sixth generation by fluorescence-activated cell sorting (FACS). The culture of single SP cell or non-SP cell was assayed for clone formation. The markers of SP cells were assayed using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and FACS.

RESULTS: The SP cells accounted for 0.22% of the total cells. The rate of clone formation was about 2.7% for the SP cells, whereas there was no clone formation for the non-SP cells. The SP cell clones were further expanded for more than 15 generations. RT-PCR analysis showed that the mRNAs of ATP-binding cassette transporter G2

(ABCG2) and transcription factor OCT4 were expressed in the cloned SP cells. FACS analysis revealed that CD44 and CD147 were positive, whereas CD34, CD38, CD45, CD71, CD133 and HLA-DR were negative.

CONCLUSION: The SP cells isolated from human fetal pancreas have highly proliferative potential and share many phenotypic markers with mesenchymal stem cells derived from bone marrow.

Key Words: Monoclonal SP cells; Pancreatic stem cells; Clone; Fluorescence-activated cell sorting

Wu YH, Hong TP, Zhang L, Hu J, Li LS. Monoclonal SP cells derived from human fetal pancreas have phenotypic markers identical to mesenchymal stem cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(15):1824-1827

摘要

目的: 探索一种新的人胰腺干细胞分离纯化体系, 并对经这一体系所获细胞的特性进行研究。

方法: 首先从胎儿胰腺中分离得到胰岛样细胞簇(ICCs), 进而从 ICCs 中得到单层上皮样细胞, 并传代培养, 第 6 代细胞通过荧光激活细胞分选(FACS)技术分选出 side population(SP)细胞和非 SP 细胞后进行单克隆细胞培养。应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和 FACS 分析, 研究单克隆 SP 细胞的体外增殖特性和表面标志。

结果: SP 细胞占全部细胞的 0.22%, SP 细胞的克隆形成率为 2.7%, 而非 SP 细胞没有克隆形成。SP 克隆能够在体外传 15 代以上。RT-PCR 显示单克隆 SP 细胞可表达 ATP 结合盒转运子 G2(ABCG2)和转录因子 OCT4。FACS 分析显示 CD44, CD147 均为阳性, 而 CD34, CD38, CD45, CD71, CD133 及 HLA-DR 均为阴性。

结论: 胎儿胰腺来源的单克隆 SP 细胞在体外具有高度的增殖潜能, 并具有与骨髓间充质干细胞相同的表型特征。

关键词: 单克隆 SP 细胞; 胰腺干细胞; 克隆; 荧光激活细胞分选

吴永华, 洪天配, 张玲, 胡江, 李凌松. 胎儿胰腺来源的单克隆 SP 细胞具有间充质的表型特征. *世界华人消化杂志* 2005;13(15):1824-1827
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1824.asp>

0 引言

胰腺干细胞的纯化和鉴定是研究热点和难点。迄今,

尚没有特异性的标记分子可供用于胰腺干细胞的分离、纯化及鉴定. 从成人胰岛培养得到的上皮样细胞中有side population(SP)细胞的存在^[1]. 然而, 有关SP细胞在胎儿胰腺中是否存在及其表面标志和体外扩增能力的研究尚未见公布. 我们通过对胎儿胰腺来源的上皮样细胞进行荧光激活细胞分选(FACS), 以确证胎儿胰腺来源的上皮样细胞中有SP细胞的存在, 并对其增殖能力和表面标志物进行分析, 从而建立一种新的人胰腺干细胞的分离纯化体系.

1 材料和方法

1.1 材料 使用进行药物(米索)引产的胎儿胰腺, 胎龄为20 wk. 孕妇自愿终止妊娠, 胎儿组织的使用得到孕妇本人的知情同意. 无菌条件下取出胎儿胰腺, 去除包膜, 剪碎成约1 mm³的小块, 加入适量的V型胶原酶(200 kU/L)(美国Sigma公司), 37℃水浴3-5 min. 冷D-Hanks液终止消化. 离心漂洗(300 r/min 5 min), 重复2-3次, 弃上清后, 加入含100 mL/L胎牛血清、1 mmol/L丙酮酸钠、71.5 μmol/L β-巯基乙醇的RPMI 1640培养基. 接种在100 mm细菌培养皿中. 培养96 h后, 将悬浮的胰岛样细胞簇(ICCs)吸出, 接种到新的60 mm细胞培养皿中. 加入含有20 μg/L碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、20 μg/L表皮细胞生长因子(EGF)的RPMI 1640培养基(美国Hyclone公司), 继续培养和传代.

1.2 方法 SP细胞分选. 荧光染料Hoechst 33342(终浓度为5 mg/L), 37℃孵育120 min; 加预冷碘化丙啶(PI)染色15-30 min, 终浓度为2 mg/L, 目的是区分死细胞. 用含20 mL/L胎牛血清的PBS悬浮细胞, 400目细胞筛过滤, 制备细胞悬液. FACS分选并分析SP细胞和非SP细胞. 另外, 分选SP细胞和非SP细胞各5 000个, 分别提取RNA. 利用流式细胞仪将单个SP和非SP细胞直接分选至96孔板中, 进行单克隆培养. 在培养7-12 d后, 可见克隆形成. 培养单克隆SP细胞达到80-90%汇合后, 用2.5 g/L胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA消化, 当在镜下观察到细胞之间的间隙明显增

大时, 终止消化. PBS漂洗(1 000 r/min, 5 min), 重复2次. 将细胞重新悬浮, 显微镜下计数. 将细胞(2×10^8 /L, 1 mL/管)放入相同流式管中, 分别加入FITC标记的CD34, CD45, CD147, HLA-DR抗体, PE标记的CD38, CD44, CD71, CD133抗体及其相应的同型对照, 4℃避光孵育30 min. PBS漂洗(1 000 r/min, 5 min), 重复2次. 去除PBS后, 每管细胞中加入1 mL流式固定液, FACS流式细胞仪分析. 用Trizol试剂(美国Life Technologies公司)一步法提取细胞RNA. 用M-MLV逆转录试剂盒(Life Technologies公司), 将RNA转录成cDNA. 上述均按照操作说明书完成. PCR反应以人GAPDH基因为内参照. 引物的核苷酸序列和扩增产物大小为: GAPDH, 5' ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3' 和5' ATG TCG TTG TCC CAC CAC CT 3', 452 bp; ABCG2, 5' GGC CTC AGG AAG ACT TAT GT 3' 和5' AAG GAG GTG GTG TAG CTG AT 3', 342 bp; OCT4, 5' CGA CCA TCT GCC GCT TTG AG 3' 和5' CCC CCT GTC CCC CAT TCC TA 3', 577 bp. PCR反应条件: GAPDH运行30个循环, 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 30 s; ABCG2运行34个循环, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s; OCT4运行35循环, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s. PCR产物用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测, Bio-RAD凝胶成像系统照相.

2 结果

2.1 SP细胞的分选和鉴定 胎儿胰腺组织经胶原酶消化后接种于非贴壁培养皿中, 此时在倒置显微镜下可观察到大量悬浮的胰岛样细胞簇(ICCs). 上述ICCs培养3 d后, 重新接种于25 cm²细胞培养瓶贴壁培养. ICCs贴壁后形成单层细胞, 迁移出的细胞中以上皮样细胞为主(图1A-B). 该上皮样细胞具有很强的增殖能力, 可连续传代培养. 将第6代上皮样细胞用荧光染料Hoechst 33342标记后, 进行FACS分选. 结果显示, 有一群细胞呈现低荧光强度甚至为荧光染色阴性, 约占0.22%左右. SP细胞群属于二维散点图中的小细胞群, 细胞体积小(图2A-C). RT-PCR分析显示,

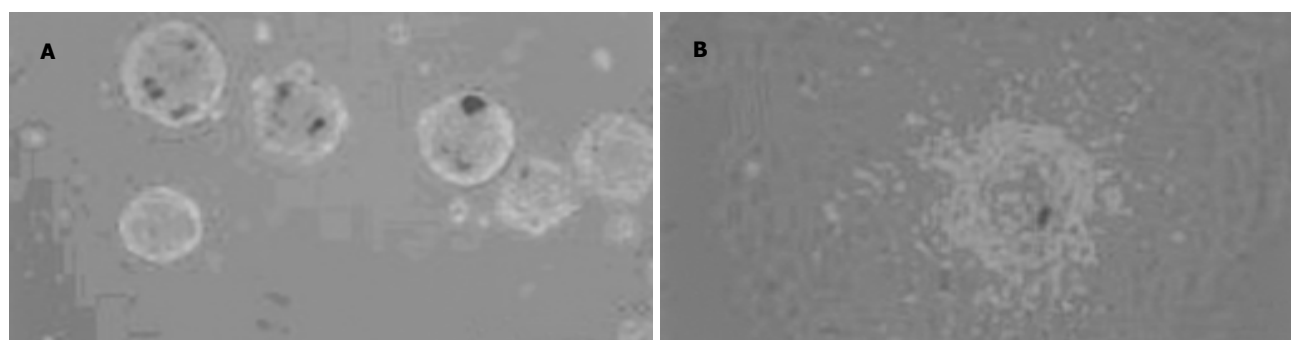


图1 ICCs的分离与培养. A: 非贴壁培养3 d($\times 100$); B: 贴壁培养后形成单层细胞, 迁移出的细胞中可见大量的上皮样细胞($\times 200$).

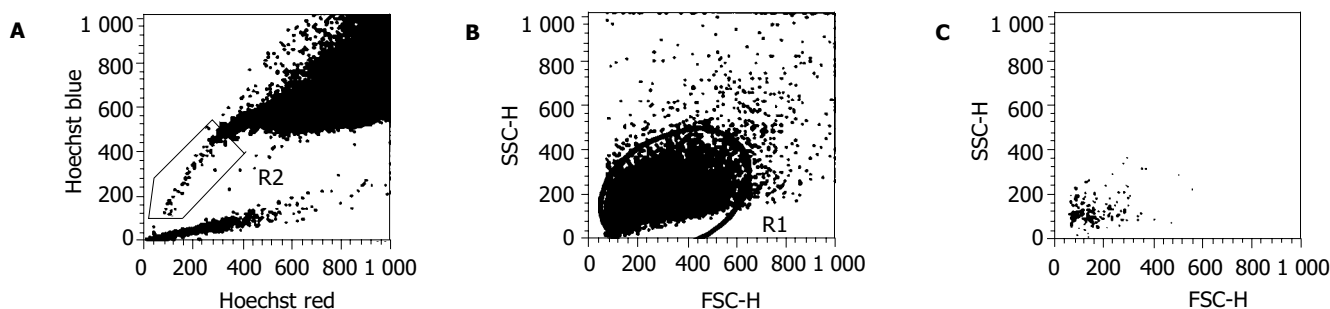


图2 SP细胞的流式分选. A: 第6代上皮样细胞进行Hoechst 33342标记后显示有一群细胞呈现低荧光强度甚至为荧光染色阴性; B: 总细胞的前向角-侧向角散点图; C: SP细胞群属于二维散点图中的小细胞群.

分选出的SP细胞有ABCG2和转录因子OCT4(干细胞的一种通用标志物)的表达,而非SP细胞则没有ABCG2表达(图3).

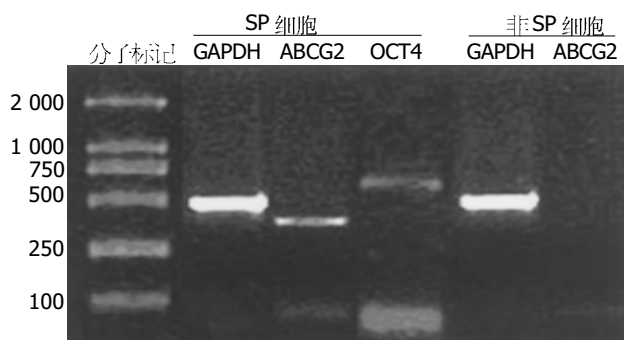


图3 RT-PCR分析. FACS分选出的SP细胞有ABCG2和OCT4表达,而非SP细胞则没有ABCG2表达.

2.2 单克隆SP细胞的体外增殖和表面标志物分析 利用流式细胞仪分选至96孔板中的单个SP细胞,在体外进行单克隆培养.7-12 d后部分培养孔可见克隆形成,克隆形成率为2.7%.细胞具有很强的增殖性,细

胞体积小,形态均一,折光性好,在体外可传代培养15代以上.在相同条件下,非SP细胞没有克隆形成(图4).单克隆SP细胞分别加入荧光标记抗体CD34-FITC, CD45-FITC, CD147-FITC, HLA-DR-FITC, CD38-PE, CD44-PE, CD71-PE, CD133-PE及其相应的同型对照,进行FACS分析.结果显示,CD44, CD147为阳性,而CD34, CD38, CD45, CD71, CD133及HLA-DR则为阴性(图5).

3 讨论

SP细胞最初是在骨髓造血干细胞中发现的,是一群低荧光标记的细胞,具有很强的增殖能力和重建造血的功能^[2].随后的研究发现,在骨骼肌、神经、心肌和肺等组织中均有SP细胞的存在^[3-7],其在体内具有较强的增殖能力和多向分化潜能,从而认为SP表型是各种来源的干细胞的普遍标志^[8].同时发现,骨髓、骨骼肌的SP细胞可特异性表达ABCG2,而非SP细胞没有该基因的表达.ABCG2是一种跨膜蛋白,属于ATP

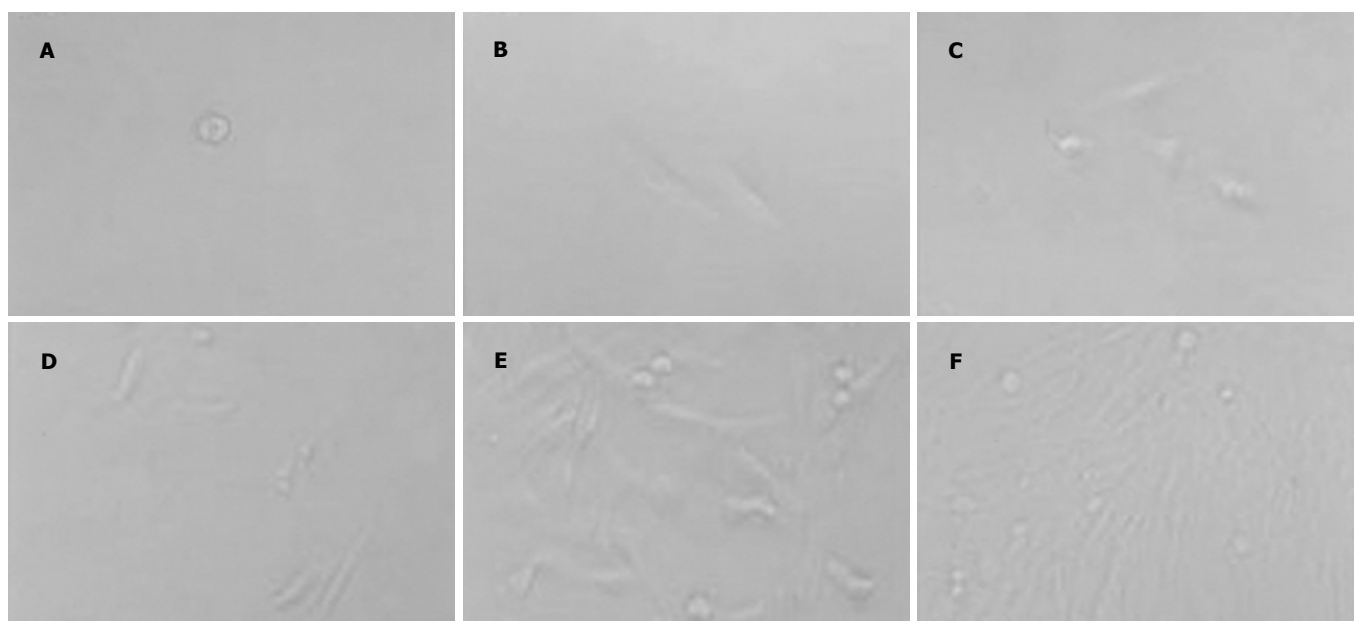


图4 单克隆SP细胞的体外增殖($\times 100$). A: 1个细胞期; B: 2个细胞期; C: 4个细胞期; D: 8个细胞期; E: 50%汇合; F: 100%汇合.

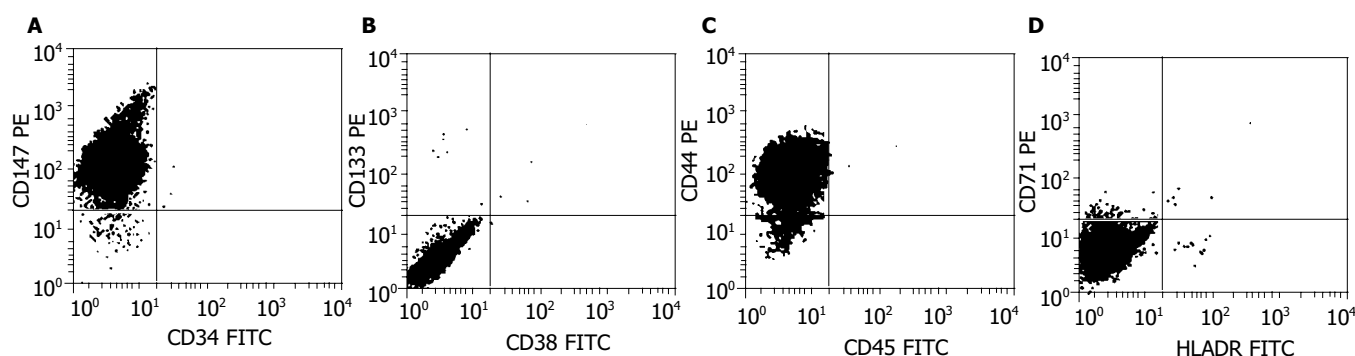


图5 单克隆SP细胞的表型鉴定. FACS分析显示, CD44, CD147均为阳性, 而CD34, CD38, CD45, CD71, CD133及HLA-DR均为阴性.

结合盒转运子超家族的成员. 通过 ABCG2 可以将 Hoechst 33342 泵出细胞外, 从而使细胞呈现阴性或低荧光强度, 该群细胞即为 SP 细胞. ABCG2 在原始的小鼠造血干细胞中呈高水平表达, 而细胞分化后的表达急剧下调. 基因转染使骨髓细胞中 ABCG2 持续表达增强直接导致了 SP 细胞群的出现, 并且在体外培养和体内移植实验中均发现成熟的子代细胞数目明显减少^[8]. 因此认为 ABCG2 是 SP 表型存在的重要决定分子^[8]. 从成人胰岛培养得到的上皮样细胞中有 SP 细胞的存在^[1]. 然而, SP 细胞在胎儿胰腺中是否存在及其体外扩增和表型特征的研究尚未见报道. 我们对胎儿胰腺来源的上皮样细胞进行 Hoechst 33342 标记后, FACS 分析发现有一群细胞呈现低荧光强度甚至为阴性荧光染色, 约占细胞总数的 0.22% 左右, 从而证实胎儿胰腺来源的上皮样细胞中有 SP 细胞的存在. 另外, 该群细胞体积小, 细胞内颗粒少. 基本符合多种来源的干细胞大多为处于静止期的小细胞这一已被普遍证实的特征^[9]. RT-PCR 检测显示, SP 细胞表达 ABCG2, 而非 SP 细胞不表达该基因. 另外, SP 细胞还有干细胞通用标志物 OCT4 的表达, 进一步证明该 SP 细胞为胰腺前体细胞. 体外培养显示, 利用流式细胞仪分选至 96 孔板中的单个 SP 细胞, 在进行单克隆培养 7-12 d 后, 可见克隆形成, 克隆形成率为 2.7%. 单克隆 SP 细胞在体外可传代培养 15 代以上. 流式分析显示, 胰腺来源的单克隆 SP 细胞不表达造血干细胞特有的表面标志物 CD34, CD45 以及 T 或 B 细胞表面标志物 CD38, HLA-DR, 但可表达黏附分子 CD44, CD147, 提示胎儿胰腺来源的单克隆 SP 细胞与骨髓间充质干细胞具有相同的表面标志物. 晚近有报道显示, 在体外合适的微环境中, 通过与胰腺β细胞发育有关的多种转录因子的作用, 人骨髓间充质干细胞可以分化为胰岛素表达细胞^[10]. 另有报道也证实, 成人胰岛组织中具有间充质表型上皮样细胞, 经过无血清诱导培养后, 也可以转化为胰岛素分泌细胞, 并重现胰岛细胞典型的上皮样特征^[11].

总之, 本研究提示胎儿胰腺来源的单克隆 SP 细胞在体外具有高度的增殖潜能, 并具有与骨髓间充质干细胞相同的表型特征. 单克隆 SP 细胞的建立可能为从人胰腺组织中分离和纯化干细胞提供一种新的方案.

4 参考文献

- 1 Lechner A, Leech CA, Abraham EJ, Nolan AL, Habener JF. Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets of Langerhans contain side population (SP) cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1) ATP-binding cassette transporter. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293:670-674
- 2 Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating *in vivo*. *J Exp Med* 1996;183: 1797-1806
- 3 Jackson KA, Mi T, Goodell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:14482-14486
- 4 Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999;401:390-394
- 5 Hulspar R, Quesenberry PJ. Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry. *Cytometry* 2000;40:245-250
- 6 Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, Rudnicki MA, Megeney LA. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett* 2002;530:239-243
- 7 Summer R, Kotton DN, Sun X, Ma B, Fitzsimmons K, Fine A. Side population cells and Bcrp1 expression in lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L97-104
- 8 Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosfeld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; 7:1028-1034
- 9 Petropavlovskaya M, Rosenberg L. Identification and characterization of small cells in the adult pancreas: potential progenitor cells? *Cell Tissue Res* 2002;310:51-58
- 10 Moriscot C, de Fraipont F, Richard MJ, Marchand M, Savatier P, Bosco D, Favrot M, Benhamou PY. Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation *in vitro*. *Stem Cells* 2005;23:594-603
- 11 Gershengorn MC, Hardikar AA, Wei C, Geras-Raaka E, Marcus-Samuels B, Raaka BM. Epithelial-to-mesenchymal transition generates proliferative human islet precursor cells. *Science* 2004;306:2261-2264

牛幽门螺杆菌抗体中和菌体蛋白对Hela细胞的生长抑制作用

张世联, 刘 冉, 王 薇

张世联, 刘冉, 王薇, 河北省疾病预防控制中心医学研究部
河北省石家庄市 050021

张世联, 男, 1956-10-01 生, 河北省沧州市人, 1998 年河北医科大学分子生物学专业硕士, 研究员, 主要从事慢性疾病方面的应用基础研究。
河北省医学科研基金项目, No. 01118

通讯作者: 张世联, 050021, 河北省石家庄市青园街 241 号, 河北省疾病预防控制中心医学研究部, zhangshl75@126.com

电话: 0311-86573208

收稿日期: 2005-06-06 接受日期: 2005-06-13

Bovine anti-*Helicobacter pylori* antibodies neutralize inhibitory effects of SS1 and NCTC11637 antigens on proliferation of Hela cells

Shi-Lian Zhang, Ran Liu, Wei Wang

Shi-Lian Zhang, Ran Liu, Wei Wang, Department of Medical Research, Hebei Center for Disease Prevention and Control, Shijiazhuang 050021, Hebei Province, China

Supported by the Medical Scientific Research Foundation of Hebei Province, No.01118

Correspondence to: Dr. Shi-Lian Zhang, Department of Medical Research, Hebei Center for Disease Prevention and Control, 241 Qingyuan Street, Shijiazhuang 050021, Hebei Province, China. zhangshl75@126.com

Received: 2005-06-06 Accepted: 2005-06-13

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects of SS1 and NCTC11637 antigens on the proliferation of Hela cells, and to observe the neutralization of bovine anti-*Helicobacter pylori* antibodies against SS1 and NCTC11637.

METHODS: The cows were immunized with sonicated *Helicobacter pylori* (*H pylori*) antigen. After the scheduled immunization was completed, the immunization was strengthened with an interval of 1-2 month. The bovine serum was prepared when the ratio in agar-double diffusion was 1 : 32. The bovine milk was collected at the same time. The serum proteins (81.4g/L) were isolated and purified by saturated ammonium sulfate (500, 330, 330 g/L) and DEAE-32. The obtained proteins were identified by SDS-PAGE. Bovine anti-*H pylori* IgGs were incubated with SS1 or NCTC11637, respectively, at 37°C for 2 h, and then added into the solutions including Hela cells. The proliferation of Hela cells was determined by cell growth curve. MTT assay was adopted to evaluate the inhibitory effects of SS1 and NCTC11637 antigens on the proliferation of Hela cells.

RESULTS: The bacterial protein of SS1 and NCTC11637 inhibited the proliferation of Hela cells in a concentration-dependent manner (SS1: $r = 0.9594$; NCTC11637: $r = 0.9371$), and the cells manifested apoptotic or lysed features. For the same effect, a higher concentration of SS1 was needed. After treatment with bovine anti-*H pylori* IgG, the inhibitory effects of SS1 and NCTC11637 on Hela cells were neutralized, and their inhibition rates were negatively related with the concentration of bovine anti-*H pylori* IgG (SS1: $r = -0.9936$; NCTC11637: $r = -0.9627$).

CONCLUSION: SS1 and NCTC11637 can inhibit the proliferation of Hela cells, and bovine anti-*H pylori* antibodies can neutralize the inhibiting action in a concentration-dependent manner.

Key Words: Bovine anti-*H pylori* antibodies; *Helicobacter pylori*; Hela cells; SS1; NCTC11637

Zhang SL, Liu R, Wang W. Bovine anti-*Helicobacter pylori* antibodies neutralize inhibitory effects of SS1 and NCTC11637 antigens on proliferation of Hela cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(15):1828-1833

摘要

目的: 研究 *H pylori* 菌体蛋白对 Hela 细胞增殖的影响及牛抗 *H pylori* 抗体对 *H pylori* 菌体蛋白的中和作用。

方法: *H pylori* 超声全菌抗原接种奶牛, 按多克隆抗体制备常规, 腋下皮下接种, 全程免疫后每 1-2 mo 加强 1 次, 琼脂双向扩散至 1 : 32 时可采集牛血制备抗血清, 同期收集牛常乳。抗血清及牛乳低温保存备用。经 500、330、330 g/L 饱和硫酸铵粗提后, 沉淀用生理盐水溶解, 对生理盐水透析 24 h, 上 DEAE-32 柱, 收集高峰蛋白, 经 SDS-PAGE 鉴定后分装, -20°C 保存。通过 Hela 生长曲线确定 Hela 细胞的接种密度。建立 SS1 及 NCTC11637 对 Hela 细胞生长增殖功能的抑制作用的 MTT 分析方法, 以牛抗 *H pylori* IgG 分别与 SS1 及 NCTC11637 共育 2 h 后各自对 Hela 增殖功能的抑制率变化来评价牛抗 *H pylori* IgG 对 SS1 及 NCTC11637 菌体蛋白的中和作用。

结果: 细胞毒模型发现 SS1 与 NCTC11637 均能浓度依赖性地抑制 Hela 细胞增殖 (SS1: $r = 0.9594$; NCTC11637: $r = 0.9371$), Hela 细胞圆缩、边界突显, 胞质内可见较多颗粒, 折光性差, 至高浓度抗原孔, Hela 多见碎

片, 或明显皱缩. 但对于相同的细胞毒效应 SS1 所需浓度高于 NCTC11637; 中和模型发现牛特异性 IgG 可分别中和 SS1 及 NCTC11637 的细胞毒作用, 且具有剂量-反应关系 (SS1: $r = -0.9936$; NCTC11637: $r = -0.9627$).

结论: 牛抗 *H. pylori* 抗体能够剂量依赖地中和 *H. pylori* 对 Hela 细胞生长增殖的抑制作用.

关键词: 牛抗 *H. pylori* IgG; 幽门螺杆菌; Hela 细胞; SS1; NCTC11637

张世联, 刘冉, 王薇. 牛幽门螺杆菌抗体中和菌体蛋白对 Hela 细胞的生长抑制作用. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1828-1833
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1828.asp>

0 引言

自 1988 年 Leunk *et al*^[1]报道 VacA (vacuolating cytotoxin) 可致 Hela 细胞空泡改变以来, VacA 及其活性密切相关的 CagA (cytotoxin associating gene protein, Cag A) 的基因型常被作为 *H. pylori* 是否毒力株的重要标志, 但有研究发现 VacA+/CagA+ 的 SS1 株由于 VacA 基因型为 s2-m2, 不具有诱导 Hela 空泡形成的能力^[2], 而作为适应小鼠 *H. pylori* 感染模型的菌株 SS1, 有感染率高, 慢性炎症发生率高且持久的特点^[3]. SS1 株能否引起小鼠胃上皮的直接损伤, 而不仅是细胞免疫反应的间接损害^[4-5], 是此次研究要解决的一个问题. 为此我们比较了 VacA 为 s2-m2 的 SS1 株与具有致 Hela 空泡能力的 NCTC11637 株对 Hela 细胞生长与增殖影响. 幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 作为慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌、MDLT 淋巴瘤的重要危险因素, 已受到广泛重视^[6-10], 而抗生素治疗的副作用或耐药性常导致治疗失败^[11, 15, 29], 我们设想通过口服抗体制剂局部中和 *H. pylori* 的毒性蛋白. 我们即检验了抗 *H. pylori* IgG 是否有中和作用, 为进一步体内试验验证 IgG 的预防和治疗效果提供了体外实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 菌株 SS1 及 NCTC11637 均由河北医科大学中医学院惠赠. 空肠弯曲菌选择性琼脂基础购自中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心, Hela 细胞由河北省二院赠送. *H. pylori* 菌株培养采用空肠弯曲菌选择性琼脂基础加 100 g/L 脱纤维羊血, 在混合气体条件下 (N_2 850 mL/L、 CO_2 50 mL/L、 H_2 100 mL/L) 37℃ 培养 48-72 h. *H. pylori* 的血平板培养物用生理盐水洗涤重新混悬, 在冰浴中超声粉碎 6 次每次间隔 1 min, 4℃ 离心 10 000 $g \times 30$ min, 弃沉渣, 测定上清液 Pr 浓度 (紫外吸收法) SS1: 1.29 g/L, NCTC11637: 0.8 g/L.

0.22 μ m 滤器过滤除菌、分装 -20℃ 保存. 免疫牛特异性 IgG 制备参照文献[12]按多克隆抗体制备技术免疫奶牛, 抗血清以饱和硫酸铵粗提取, DEAE-32 柱层析, 洗脱液收集高峰测蛋白后, 冻干保存.

1.2 方法 Hela 细胞培养在 DMEM (100 mL/L 小牛血清、100 kU/L 青霉素、100 kU/L 链霉素) 培养液中置 37℃、50 mL/L CO_2 培养箱内培养, 每 2 d 传代 1 次, 以 2.5 g/L 胰蛋白酶、0.2 g/L EDTA 消化. 细胞生长曲线测定: Hela 消化 10 min 后 GKN 洗 2 次, 计数, 将细胞密度调节为 $2.5 \times 10^9/L$, 取 0.5 mL, 用 DMEM 对倍稀释后, 配成 10 个稀释度, 在 40 孔培养板中每孔加 200 μ L, 每个稀释度重复 4 孔, 培养 48 h 后, 作 MTT 测定. Hela 阳性对照抑制药物的筛选: 取一 40 孔培养板, 加入 14 种常用抗肿瘤药物 20 μ L, 分别加入 Hela 细胞 $2 \times 10^3/$ 孔, 37℃, 50 mL/L CO_2 培养 48 h 后, 加 MTT 20 μ L/孔, 37℃、50 mL/L CO_2 4 h 后 1 500 r/min $\times 10$ min, 弃上清, 加 DMSO 100 μ L, 振荡混匀后 570 nm 处测光密度, 以不加细胞的孔为空白对照, 以不加药物只加细胞的孔存活率为 100%, 计算 Cell 抑制率 = $(1 - \text{实验组平均}A\text{值} \div \text{对照组平均}A\text{值}) \times 100\%$. 为分析 Hela 细胞对 HRP-牛 IgG 的吸附作用, 将 Hela 细胞计数后 (3×10^6) PBS 洗 2 次, 加固定剂 100 μ L 固定, 板条预先加黏附剂烘干, Hela 细胞用固定剂稀释成 10 个倍比梯度后, 每孔加细胞悬液 5 μ L, 重复 4 孔, 4℃ 过夜, 50 g/L 脱脂奶粉封闭过夜后, 加 HRP-牛特异性 IgG (1:200) 37℃ 水浴 30 min, 以只加黏附剂, 不加固定剂为空白对照, 以只加黏附剂和固定剂, 不加细胞为阴性对照. PRS 洗 3 次后加底物显色, 540 nm 处比色. *H. pylori* 菌体蛋白与 Hela 细胞作用的 ELISA 参照文献[13], Hela 细胞数 $2 \times 10^4/$ 孔, 加菌体蛋白的稀释系列 37℃ 1 h 后, HRP-牛特异性 IgG 37℃ 30 min, 底物显色 3 min, 540 nm 处比色. *H. pylori* 菌体蛋白抑制 Hela 增殖的 MTT 分析: 将 Hela 细胞以 $2 \times 10^3/$ 孔密度接种于 40 孔板, 分别加入不同浓度的 SS1/NCTC11637 菌体蛋白, 每一浓度重复 4 孔, 培养 48 h 后, 加 MTT 续培养 4 h, 测定方法参见^[14], 检测中设一阳性对照, 一阴性对照. 牛特异性 IgG 单独加入 Hela 细胞培养 48 h, 分析牛特异性 IgG 对 Hela 细胞的作用. *H. pylori* 菌体蛋白 (SS1: 162.5 mg/L; NCTC11637: 50 mg/L) 分别与牛特异性 IgG (500-4 mg/L) 37℃ 共育 2 h 后加入 Hela 细胞中培养, 培养 48 h 后作 MTT 分析.

统计学处理 采用 SAS6.12 直线回归与相关分析推断各处理剂量与 Hela 细胞反应率之间的关系, 倍比梯度剂量经对数变换转为正态分布后进行分析.

2 结果

2.1 HelA 细胞对化疗药物的敏感性(表 1) 接种细胞密度以 $(1-4) \times 10^3$ /孔为宜, 培养 48 h, A 值在 1-2 范围内. HelA 对三尖杉酯碱(HRT)、甲氨喋呤(MTX)、吡柔比星(THP), 表阿霉素(EADM)均敏感, 本试验采用三尖杉酯碱(HRT)为抑制 HelA 增殖的阳性对照物.

表 1 14 种抗肿瘤化疗药物对 HelA 细胞的作用

药物	A (mean±SD)	抑制率(%)
1(ADM)	0.95 ± 0.04	10.45
2(CDDP)	1.20 ± 0.10	0
3(CTX)	1.34 ± 0.10	24.63
4(5-FU)	1.01 ± 0.12	56.72
5(HRT)	0.58 ± 0.06	8.21
6(MMC)	1.23 ± 0.14	8.21
7(VCR)	1.23 ± 0.14	17.16
8(VP-16)	1.11 ± 0.03	32.09
9(MTX)	0.91 ± 0.02	2.99
10(CBDCA)	1.30 ± 0.04	30.60
11(THP)	0.93 ± 0.01	70.90
12(EADM)	0.39 ± 0.06	19.40
13(Ara-C)	1.08 ± 0.02	2.99
14(CTX)	1.30 ± 0.04	10.45

Control: 1.33, 1.40, 1.27, 1.33, 1.33, 1.33, 1.27, 1.48 (mean±SD: 1.34 ± 0.07).

2.2 *H pylori* 与 HelA 细胞相互作用 研究表明牛特异性 IgG 对 HelA 细胞无特异性结合. 进一步的细胞 ELISA 结果发现菌体蛋白的浓度对数值与光密度值之间呈良好的直线相关关系 ($r = 0.9622$), 回归方程 $A = 0.0418 \pm 0.1157 \ln C$ 说明菌体蛋白能与 HelA 细胞结合, 并呈剂量依赖关系(表 2).

表 2 不同浓度菌体蛋白的光密度

SS1 蛋白(mg/L)	A(mean±SD)
1300	1.26 ± 0.05
130	0.71 ± 0.20
65	0.77 ± 0.06
32.5	0.64 ± 0.07
16.25	0.55 ± 0.17
8.13	0.59 ± 0.11
4.06	0.40 ± 0.04
2.03	0.39 ± 0.06
1.02	0.32 ± 0.06
0.51	0.27 ± 0.01

与牛抗 *H pylori* IgG 共培育的 HelA 细胞光密度为 0.245.

2.3 SS1 及 NCTC11637 对 HelA 细胞的毒性作用 正常生长的 HelA 细胞呈贴壁的多形性, 细胞折光性好, 胞质透亮, 胞膜较清晰. *H pylori* 蛋白作用 48 h 后, 随菌体蛋白浓度增高, 可见孔内 HelA 细胞贴壁减少. 细胞圆缩、边界突显, 胞质内可见较多颗粒, 折光性差. 至高浓度抗原孔, HelA 多见碎片, 或明显皱缩. MTT 分析结果可见细胞抑制率随菌体蛋白剂量增加而增加, SS1 蛋白与 NCTC 11637 对 HelA 细胞的毒性反应相似, 其差异主要表现在诱导相同 HelA 毒性反应的浓度不同(表 3, 4; 图 2AB), 实验同时应用 SS1 菌株与 HelA 细胞共育, 可见细胞周围有大量 *H pylori* 附着(图 1A).

表 3 SS1 蛋白对 HelA 细胞增殖的抑制率

SS1 蛋白(mg/L)	A(mean±SD)	IR(%)
2.54	0.96 ± 0.01	-3.81
5.08	0.85 ± 0.06	8.15
10.16	0.79 ± 0.03	13.86
20.31	0.77 ± 0.05	17.12
40.63	0.63 ± 0.02	20.38
81.25	0.60 ± 0.02	35.05
162.50	0.54 ± 0.03	41.49
325	0.26 ± 0.02	71.42
Control	0.92 ± 0.02	—

$A = -0.1156 \pm 0.1011 \ln C$; $r = 0.9594$.

表 4 NCTC11637 对 HelA 细胞增殖的抑制率

NCTC11637 protein(mg/L)	A(mean±SD)	IR(%)
1.56	0.94 ± 0.02	-1.82
3.13	0.83 ± 0.05	9.40
6.25	0.84 ± 0.02	9.24
12.50	0.76 ± 0.03	17.93
25	0.67 ± 0.01	27.17
50	0.50 ± 0.02	45.92
100	0.31 ± 0.01	66.03
200	0.19 ± 0.04	79.08
control	0.92 ± 0.02	—

$A = -0.1617 \pm 0.1664 \ln C$; $r = 0.9371$.

2.4 牛抗 *H pylori* IgG 对 *H pylori* 菌体蛋白致 HelA 细胞毒作用的中和作用 单独应用牛特异性 IgG 并不影响 HelA 的生长与增殖, 其细胞增殖形态及数量与无牛 IgG 作用的 HelA 细胞对照相似, 统计分析表明二者无明显相关. 牛抗 *H pylori* IgG 与 SS1/NCTC11637 菌体蛋白分别共育 2 h 后, 加入 HelA 细胞培养 48 h, 以三尖杉酯碱为阳性抑制对照, 以单加 SS1/NCTC11637 为

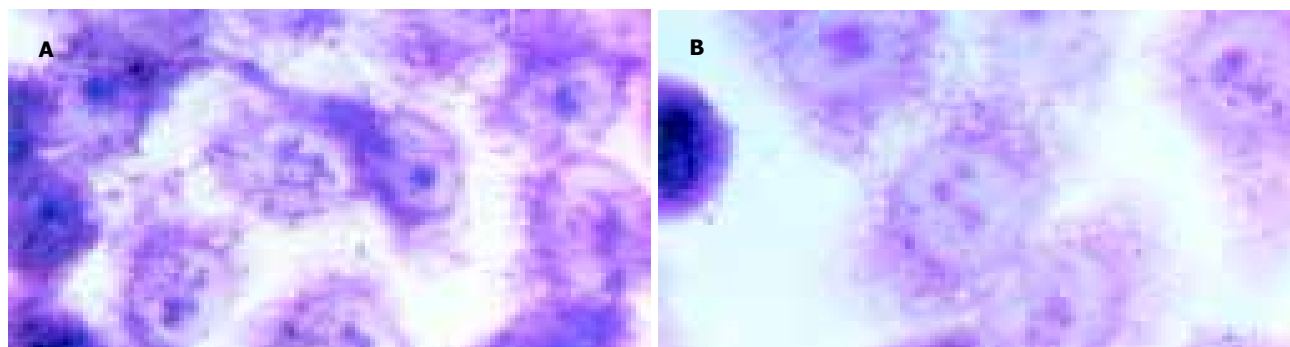


图1 培育24 h后的Hela细胞(姬氏染色, $\times 1\,000$)。A: 与SS1共存; B: 与抗体、SS1共存。

中和作用阴性对照, 可见随IgG浓度升高, HeLa细胞贴壁增多, 圆形及皱缩细胞量减少, 折光性增强, 细胞岛的数量亦增多, MTT分析结果可见细胞抑制率随抗*H pylori* IgG剂量增加而降低, 呈显著负相关(表5, 6;图3AB), 此外将特异牛IgG与SS1菌株同时加入HeLa细胞中, 共育24 h可见贴壁的HeLa细胞周围无*H pylori*黏附(图1B)。

表5 加入牛抗*H pylori* IgG后SS1蛋白对Hela细胞的抑制率

牛抗 <i>H pylori</i> IgG(mg/L)	A(mean \pm SD)	IR (%)
500	0.86 \pm 0.01	4.54
250	0.92 \pm 0.02	-1.57
125	0.80 \pm 0.00	11.75
62.5	0.72 \pm 0.06	20.63
31.25	0.60 \pm 0.05	33.96
15.63	0.45 \pm 0.04	50.05
7.81	0.26 \pm 0.02	71.70
3.91	0.17 \pm 0.01	81.69
0	0.16 \pm 0.04	82.78
Control	0.90 \pm 0.13	—

$A = 1.0\,909 - 0.2\,056\text{LnC}$; $r = -0.9\,936$ 。

表6 加入牛抗*H pylori* IgG后的NCTC11637蛋白对Hela细胞的抑制率

牛抗 <i>H pylori</i> IgG (mg/L)	A(mean \pm SD)	IR (%)
500	0.80 \pm 0.05	11.75
250	0.89 \pm 0.10	1.21
125	0.89 \pm 0.02	1.76
62.5	0.78 \pm 0.028	13.42
31.25	0.76 \pm 0.02	16.19
15.63	0.62 \pm 0.02	31.73
7.81	0.46 \pm 0.04	49.49
3.91	0.29 \pm 0.01	67.81
0	0.27 \pm 0.05	69.72
Control	0.90 \pm 0.13	—

$A = 0.8\,156 - 0.1\,616\text{LnC}$; $r = -0.9\,627$ 。

3 讨论

在慢性胃炎, 消化性溃疡等上消化道慢性炎症性疾病的发病中, *H pylori*毒力株常被认为是重要的致病因素^[15-17]。采用两株毒力株, 但SS1不具有致空泡毒性, NCTC 11637可致HeLa细胞空泡变。两株*H pylori*除空泡毒素分泌活性不同外, 均可产生尿素酶、过氧化氢酶、HSP54等毒性蛋白。两株*H pylori*体外对HeLa细胞的抑增殖毒性作用表明空泡毒素的确是影响HeLa细胞的重要毒力因子, 此外其他毒性蛋白亦占有重要地位, 且有剂量依赖关系。Knipp *et al*^[18]发现*H pylori*的一种保守性抗原-细胞增殖抑制蛋白(proliferation inhibiting protein, PIP)可引起哺乳动物细胞增殖的抑制, 该抑制作用与细胞种属来源或细胞类型无关, 细菌各株的抑制增殖作用相似, 且是非致死的可逆反应, 具有剂量与时间依赖性, 主要存在于胞质中。其免疫损伤作用机制可能与抑制宿主细胞免疫应答、诱导免疫无能及影响上皮细胞修复能力、促进损伤发展有关。因此, 我们认为*H pylori*的细胞毒作用可能是多种毒力因子共同作用的结果, PIP的作用有待进一步证实, 而空泡毒素并不是决定性的致细胞损伤因子。由此我们可以推测无空泡变活性的SS1株依然具有致上皮细胞损伤的毒性作用。这种损伤作用可能不全是免疫后炎症反应所致, 而与SS1的毒力因子的直接毒性作用有关。另外, 我们还发现低浓度的*H pylori*菌体蛋白有促HeLa细胞增殖的作用。国内外的研究均发现活菌对胃上皮细胞具有低浓度促进, 高浓度抑制增殖的作用, 认为*H pylori*可能同时具备与细胞增殖和细胞凋亡相关的两类因子^[19]。当低浓度*H pylori*作用于细胞时, *H pylori*的促细胞增殖因子占主导地位, 而促细胞凋亡相关因子被细胞代偿机制对抗, 表现为细胞的DNA合成增加, 细胞生长加速; 高浓度*H pylori*的促细胞凋亡作用占优势, 表现为细胞增殖受抑制。在*H pylori*超声上清中低浓度与高浓度的矛盾作用结果, 是否亦为促增殖与促凋亡因子的优势地位转换所致, 值得进一步探讨。

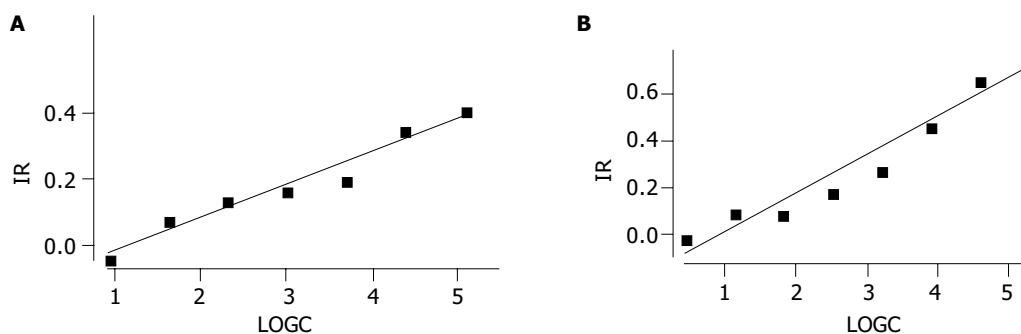


图2 HeLa细胞对不同蛋白的剂量依赖性反应. A: 对SS1蛋白; B: 对NCTC11637蛋白.

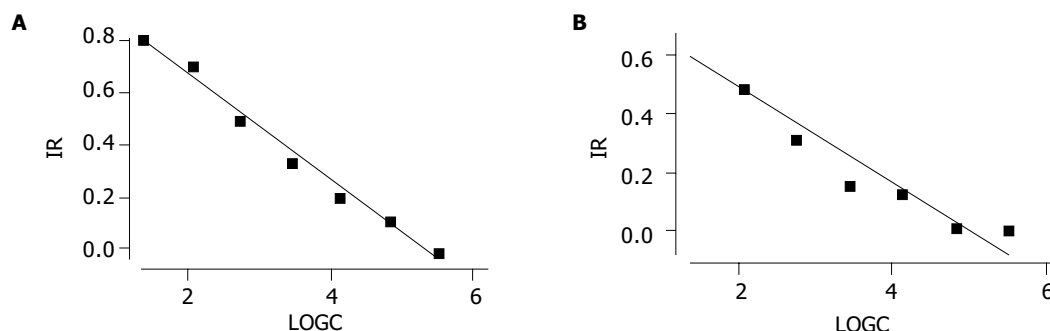


图3 牛抗 *H. pylori* IgG中和菌体蛋白对Hela细胞的毒性作用. A: 中和SS1蛋白; B: 中和NCTC蛋白.

以菌体蛋白免疫制备的牛特异性IgG由于是针对 *H. pylori* 的多克隆抗体, 其抗原包括不同株的共有抗原, 因此对不同菌株均具有中和作用, 在实验研究及应用人群推广方面均有重要意义. 我们前期研究^[20]发现以 *H. pylori* 超声后全菌蛋白免疫奶牛, 主要的免疫抗原为 23-66 KD 的蛋白, 较鸡等小型动物的抗原组分范围更宽 (60-70 KD)^[21-22]. 在被动免疫制剂的制备中, 应用针对不同抗原范围的抗体, 制备全面抑制 *H. pylori* 从黏附定植到产毒损伤胃上皮的一系列蛋白组分的广泛抗体, 在 *H. pylori* 感染的防治中可能会收到更好的效果, 而牛抗 *H. pylori* 抗体明显具有这一优势. 该抗体可明显剂量依赖地阻断 *H. pylori* 菌体超声裂解上清的Hela细胞毒性, 与国内卵黄IgY的中和作用研究结果相似, 表明不同种属来源的IgG均可在局部环境中中和 *H. pylori* 的毒性蛋白, 阻断其致上皮细胞的细胞毒活性. 有研究表明, 虽然IgG在胃蛋白酶的作用下可降解为Fab' 2片段, 但Fab' 2片段仍具有结合抗原的活性, 可发挥中和作用^[23]. 此外, 我们还进行了活菌对Hela的黏附作用及牛特异性IgG抑制此种黏附作用的研究, 发现加活菌于Hela中, 可见贴壁细胞周围有大量 *H. pylori* 附着, 而特异牛IgG与活菌同时加入Hela细胞中, 共育24h可见贴壁的Hela细胞周围无 *H. pylori* 黏附, 说明IgG可阻断活菌与上皮细胞的附着 (图1, 图4). 目前国内外研究多以鸡的IgY免疫作用为研究重点, 发现IgY在体外能中和毒素、杀死 *H. pylori*, 体内能降低 *H. pylori*

感染率, 减轻局部炎症, 提示口服抗体制剂作为 *H. pylori* 感染免疫防治的方法是可行的^[24-28]. 同时牛作为大型动物免疫接种后可产生长期、稳定、高滴度的特异性抗体, 定期加强免疫可以保证抗体质量, 生命期长, 可多次间歇采集特异性抗体, 为工业制备抗 *H. pylori* 特异抗体提供稳定来源, 成本稳定, 收益较高. 因此, 应用口服抗体制剂局部阻断 *H. pylori* 的黏附、中和 *H. pylori* 毒性蛋白可能成为 *H. pylori* 感染免疫防治的有效方法^[30].

牛特异性IgG对 *H. pylori* 菌体蛋白的中和作用表现为中低浓度为剂量依赖地中和细胞毒, 在较高浓度时甚至有轻微促细胞增殖作用, 至高浓度阈后表现为抑制细胞增殖, 考虑是否高浓度的非特异IgG可能含有抗细胞共有抗原的相应抗体, 后者可能在较高浓度时影响细胞代谢, 表现为抑制细胞增殖. 故进行了单加牛特异性IgG对Hela的剂量-反应关系分析, 发现单纯牛特异性IgG与Hela的增殖无直线相关关系. 对此现象尚待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1988;26:93-99
- 2 Atherton JC, Cao P, Peek RM Jr, Tummuru MKR, Blaser MJ, Cover TL. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration. *J Biol Chem* 1995; 270:17771-17777
- 3 Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos

- G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the sydney strain. *Gastroenterology* 1997;112:1386-1397
- 4 van Doorn NE, Namavar F, Sparrius M, Stoof J, van Rees EP, van Doorn LJ, Vandenbroucke-Grauls CM. *Helicobacter pylori*-associated gastritis in mice is host and strain specific. *Infect Immun* 1999;67:3040-3046
- 5 Sawai N, Kita M, Kodama T, Tanahashi T, Yamaoka Y, Tagawa Y, Iwakura Y, Imanishi J. Role of gamma interferon in *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammatory responses in a mouse model. *Infect Immun* 1999;67:279-285
- 6 Shang J, Pena AS. Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11:4131-4139
- 7 Inoue M, Tsugane S. Epidemiology of gastric cancer in Japan. *Postgrad Med J* 2005;81:419-424
- 8 胡伟国, 朱欢, 陈松平, 徐彭, 黄开宇, 徐辉, 黄爱芬, 程片片, 陶洪群, 谢小志. 幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白与胃窦黏膜炎症程度、细菌定植密度的关系. 实用儿科临床杂志 2005;20:446-447
- 9 胡伏生. 消化性溃疡发病机制的现代理念. 中华消化杂志 2005; 25:189-190
- 10 Arnaud L, Chrysostalis A, Terris B, Pavy S, Chaussade S, Kahan A, Allanore Y. Systemic sclerosis and gastric MALT lymphoma. *Joint Bone Spine* 2005;[Epub ahead of print]
- 11 Zhang WD, Xiao SD, Hu FL. Some suggestions about the problem of *Helicobacter pylori*. *Natl Med J China* 2004;6:522-523
- 12 李影林. 中华医学检验全书(下卷). 北京: 人民卫生出版社, 2000: 2390-2392
- 13 朱立平, 陈学清. 免疫学常用试验方法. 北京: 人民军医出版社, 2000:342-365
- 14 杨建斌, 李晓雯, 董伟华, 孔大翰, 宋红霞, 郑相予, 刘桂亭. 东亚钳蝎毒抗痛多肽对H₂₂荷瘤小鼠免疫调节作用. 中国中药杂志 2000;25:736-739
- 15 McLoughlin R, Racz I, Buckley M, O'Connor HJ, O'Morain C. Therapy of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2004;9(Suppl 1): 42-48
- 16 Massari P, Manetti R, Burrioni D, Nuti S, Norais N, Rappuoli R, Telford JL. Binding of the *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin to target cells. *Infect Immun* 1998;66:3981-3984
- 17 Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000;287: 1497-1500
- 18 Knipp U, Birkholz S, Kaup W, Opferkuch W. Partial characterization of a cell proliferation-inhibiting protein produced by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1996;64:3491-3496
- 19 Wagner S, Beil W, Westermann J, Logan RP, Bock CT, Trautwein C, Bleck JS, Manns MP. Regulation of gastric epithelial cell growth by *Helicobacter pylori*: interference for a major role of apoptosis. *Gastroenterology* 1997;113:1836-1847
- 20 刘冉, 王薇, 张世联. 牛抗幽门螺杆菌抗体的免疫印迹分析. 中国生物制品学杂志 2003;16:293-295
- 21 Nilsson I, Ljungh A, Aleljung P, Wadstrom T. Immunoblot assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* infections. *J Clin Microbiol* 1997;35:427-432
- 22 许杨, 熊勇华, 魏华, 钟青萍, 陈红兵, 孙红斌. 幽门螺杆菌全菌抗原对鸡的免疫原性. 中国生物制品学杂志 2000;13:147-150
- 23 张和平, 郭军. 免疫乳—科学与技术. 北京: 中国轻工业出版社, 2002:201-210
- 24 余保平, 王伟岸. 消化系统病免疫学. 北京: 科学出版社, 2000: 124-128
- 25 刘立华, 杨贵贞, 齐名, 杨毓华, 武建国. IgY 抗体对幽门螺杆菌菌体抗原细胞毒活性的中和作用. 中国生物制品学杂志 1999; 12:139-141
- 26 陈翠萍, 杨朝晖, 王永谦. IgY 抗体在体外和体内对幽门螺杆菌作用的研究. 中华微生物学和免疫学杂志 2002;22:37-40
- 27 Nomura S, Suzuki H, Masaoka T, Kurabayashi K, Ishii H, Kitajima M, Nomoto K, Hibi T. Effect of dietary anti-urease immunoglobulin Y on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2005;10:43-52
- 28 刘颢, 张永宏, 周力, 左丽, 陈阿英, 李永念, 郭松. 鸡卵黄抗幽门螺杆菌-IgY的特性研究. 中华消化杂志 2005;25:241-242
- 29 周殿元, 陈烨. 幽门螺杆菌感染的药物治疗新进展. 世界华人消化杂志 2005;13:157-159
- 30 魏华, 许杨, 熊勇华. 抗幽门螺杆菌牛初乳体外调理杀伤研究. 中华微生物和免疫学杂志 2002;22:168-169

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 •

汤钊猷院士当选美国外科学会名誉会员

本刊讯 在125届美国外科学会年会的开幕式上, 复旦大学医学院中山医院肝癌研究所所长、中国工程院院士汤钊猷教授当选为该学会2004年度名誉会员。这是汤钊猷院士继2002年获中国香港外科医院名誉院士和2004年全国“白求恩奖章”后获得的又一殊荣。

据介绍, 美国外科学会建于1880年, 是美国历史最长、最有声望的外科协会。“名誉会员”是该学会给予外国学者的最高荣誉, 迄今共选出23个国家的67位名誉会员, 除英国最多外, 多数国家仅有1-2位, 在我国仅香港大学的John Wong和汤钊猷院士获此荣誉。

美国外科学会主席Polk教授指出: “汤钊猷教授是一位世界广泛公认的肝癌专家, 他在实验室和手术室的贡献, 拓宽了有关肝癌的基础知识, 并提高了治疗水平; 尤其在小肝癌的研究和不能切除肝癌的缩小后切除方面做出了贡献。作为中国工程院院士、中华医学会副会长以及上海医科大学校长, 对国家的公共事业也做出了显著贡献。作为一位对人民无私奉献以及在外科学术上有极高境界的医生, 汤钊猷毫无疑问值得当选为美国外科学会名誉会员。”

汤钊猷院士在致答辞时说, 他的当选不仅仅是个人荣誉, 也是美国外科医生和中国外科医生间友谊的象征, 希望通过他的当选, 有助于加强两国外科界的学术交流与友谊。

裸鼠人涎腺黏液表皮样癌多药耐药模型逆转耐药的体内研究

李 焰, 吴军正, 刘 斌, 李 峰, 惠延平, 黄晓峰, 于 华

李焰, 吴军正, 刘斌, 李峰, 中国人民解放军第四军医大学口腔医院口腔生物学教研室 陕西省西安市 710032
惠延平, 中国人民解放军第四军医大学病理教研室 陕西省西安市 710032
黄晓峰, 于华, 中国人民解放军第四军医大学电镜中心 陕西省西安市 710032
李焰, 女, 1952-12-22 生, 湖北省孝感市人, 汉族, 中国人民解放军第四军医大学口腔医院口腔生物学教研室, 副主任技师, 主要从事口腔生物学研究。国家自然科学基金资助课题, No. 30371551
通讯作者: 吴军正, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学口腔医院口腔生物学教研室, liyanly@fmmu.edu.cn
电话: 029-83376173 传真: 029-83376232
收稿日期: 2005-06-06 接受日期: 2005-06-13

Reversal of multidrug resistance in a nude mice model induced by human salivary gland mucoepidermoid carcinoma cell line MEC-1/5-FU *in vivo*

Yan Li, Jun-Zheng Wu, Bin Liu, Feng Li, Yan-Ping Hui, Xiao-Feng Huang, Hua Yu

Yan Li, Jun-Zheng Wu, Bin Liu, Feng Li, Department of Oral Biology, College of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Yan-Ping Hui, Department of Pathology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China
Xiao-Feng Huang, Hua Yu, Center of Electron Microscopy, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China
Supported by National Science Foundation of China, No. 30371551
Correspondence to: Jun-Zheng Wu, Department of Oral Biology, College of Stomatology, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. liyanly@fmmu.edu.cn
Received: 2005-06-06 Accepted: 2005-06-13

Abstract

AIM: To establish the multidrug resistance (MDR) model in nude mice using human salivary gland mucoepidermoid carcinoma cell line MEC-1/5-FU and to observe the reversal of multidrug resistance.

METHODS: MEC-1/5-FU cells (0.2 mL, 1×10^{10} /L) were injected into the backs of 20 six-week-old nude mice subcutaneously. After the tumor was developed, the mice were randomly divided into 4 groups, each containing 5 mice. The mice in the four groups were respectively injected with 5-FU (20 mg/kg), HMBA (800 mg/kg), 5-FU (10 mg/kg) plus HMBA (400 mg/kg) and normal saline (control) peritoneally. The tumor mass and the body mass of the nude mice were measured every other day. Three weeks after treatment, the mice were sacrificed, and the tumor tissue was examined by HE staining and transmission electron microscopy.

RESULTS: All the 20 nude mice developed tumor tubules 6-8 days after the injection of MEC-1/5-FU cells, and the mean tumor mass was $193 \pm 52 \text{ mm}^3$. The survival times of the mice were 20.8, 13.6, 16.4 and 21.2 days in control, 5-FU, HMBA and HMBA plus 5-FU group, respectively and the doubling times of the tumor mass were 113, 135, 109 and 212 h, respectively. The tumor inhibition rate was 25.6% in 5-FU group, and 44.0% in HMBA group, whereas that in HMBA plus 5-FU group was 71.8%. Significant difference in tumor inhibition was observed between HMBA plus 5-FU group and control group ($P < 0.05$). Compared with control and HMBA group, there were more necrotic cells in HMBA plus 5-FU group (30-40%), which was fewer than that in 5-FU group (40-50%). Under electron microscopy, obvious necrosis was observed in HMBA plus 5-FU group, and some cells manifested apoptotic features.

CONCLUSION: The combination of HMBA and 5-FU can inhibit tumor growth more efficiently and increase the survival rate of the nude mice.

Key Words: Mucoepidermoid carcinoma; Reversal model; Nude mice; Multidrug resistance

Li Y, Wu JZ, Liu B, Li F, Hui YP, Huang XF, Yu H. Reversal of multidrug resistance in a nude mice model induced by human salivary gland mucoepidermoid carcinoma cell line MEC-1/5-FU *in vivo*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(15):1834-1838

摘要

目的: 建立裸鼠人涎腺黏液表皮样癌多药耐药模型, 实施裸鼠体内逆转耐药方案, 为研究逆转耐药机制以及临床逆转涎腺黏液表皮样癌耐药奠定实验基础。

方法: 建立裸鼠人涎腺黏液表皮样癌多药耐药模型采用细胞培养法、裸鼠体内试验以及光镜、透射电镜等方法并观察分化诱导剂 HMBA 联合化疗药物逆转肿瘤耐药作用。

结果: 裸鼠皮下细胞接种成瘤率 20/20。对照组、5-FU、HMBA 和 5-FU 联合 HMBA 药物治疗组裸鼠存活时间分别为 20.8, 13.6, 16.4 和 21.2 d; 肿瘤倍增时间分别为 113, 135, 109 和 212 h。与对照组相比, 5-FU 和 HMBA 治疗组肿瘤抑制率分别为 25.55 和 44.0%, 统计学处理无显著性差异 ($P > 0.05$)。5-FU 联合 HMBA 组肿瘤抑制率为 71.8% ($P < 0.05$)。联合用药组 HE 染色坏死细胞少于 5-FU 组, 但多于 HMBA 组及对照组。透射

电镜观察细胞有明显的脂滴并有明显的凋亡细胞形成. 联合用药组 HE 染色多见变性与坏死的细胞, 个别细胞染色质聚集成片类似凋亡细胞.

结论: 分化诱导剂 HMBA 与 5-FU 联合应用可在一定程度上减少药物副作用, 同时提高裸鼠的存活质量和其对化疗药物的耐受性, 增加肿瘤细胞对药物的敏感程度而达到逆转效果.

关键词: 黏液表皮样癌; 逆转模型; 裸鼠; 多药耐药性

李焰, 吴军正, 刘斌, 李峰, 惠延平, 黄晓峰, 于华. 裸鼠人涎腺黏液表皮样癌多药耐药模型逆转耐药的体内研究. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1834-1838 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1834.asp>

0 引言

肿瘤细胞具有对多种化疗药物产生耐药性的特征, 肿瘤细胞的多药耐药 (MDR) 现象往往导致肿瘤化疗失败, 因此寻求有效可靠多途径的对肿瘤细胞耐药现象的逆转对策是当前研究重要课题^[1-2]. 由于 MDR 的发生机制十分复杂, 近年来, 为研究肿瘤的机制, 国内外诸多实验室在体外诱导耐药细胞系、建立动物耐药模型、选择可靠、有效、精确的逆转 MDR 方案, 提高化疗的效果等方面正在开展大量工作^[3-5]. 黏液表皮样癌是常见的颌面部涎腺恶性肿瘤, 高度恶性的黏液表皮样癌疗效差, 预后不良, 至今尚无有效的治疗方法^[6-7]. 我们采用细胞培养体外试验筛选的逆转剂进行裸鼠体内逆转耐药试验, 尝试筛选有效、可行的 MDR 逆转方案, 为临床涎腺黏液表皮样癌的治疗以及逆转肿瘤耐药奠定实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 采用第四军医大学口腔医学院口腔生物学教研室建立的人涎腺黏液表皮样癌耐药细胞株 MEC-1/5-FU^[8]. 复苏后的 MEC-1/5-FU 细胞继续使用诱导药物持续常规培养于 RPMI 1640 培养液 (含 100 mL/L 胎牛血清, 10 kU/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素), 50 mL/L CO₂, 37℃ 条件, 每 3 d 更换 1 次培养液, 5-7 d 传代 1 次. 细胞生长状态稳定后, 取对数生长期 MEC-1/5-FU 细胞进行实验. 细胞培养所用 RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶为 Gibco 产品, 5FU 购自上海旭东海普制药厂, 六亚甲基双乙酰胺 (HMBA) 为 Sigma 产品. 实验用药分别用无菌生理盐水配制成高浓度贮存液 -20℃ 存放, 使用时用 RPMI 1640 培养液作相应稀释. 裸鼠 Balb/c.nu 系, 6 周龄, 体质量 18-20 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司. 无特定病原体条件 (SPF) 的空气洁净的层流架内饲养、观察, 所使用的饲养笼具、垫料、饲料、以及饮用水按常规经高压蒸汽灭菌.

1.2 方法 常规消化对数生长期的 MEC-1/5-FU 细胞, 制备单细胞悬液, 无血清培养液洗涤 2 次, 重悬于无血清培养液, 计数, 调整细胞密度为 $1 \times 10^{10}/L$, 无菌条件下接种于裸鼠背部, 每点接种 0.2 mL (2×10^6 个细胞). 接种部位肿瘤长出后, 将裸鼠随机分为 4 组, 5 只/组, 采用体外实验结果选择的逆转药物进行治疗. 于治疗开始每日裸鼠 ip 相应药物. 5-FU 治疗组注射 20 mg/kg^[9], HMBA 组注射 800 mg/kg^[10], 联合用药组为 5-FU 10 mg/kg 加 HMBA 400 mg/kg, 对照组注射生理盐水. 隔日称量裸鼠体质量同时分别测量瘤体长径 *a*、短径 *b*, 观察记录裸鼠生长及存活状况以及逆转耐药作用的逆转效果. 治疗 3 wk 后处死裸鼠, 切除肿瘤组织称质量并分别测量瘤体长径 *a*, 短径 *b*, 以瘤体质量为纵坐标, 生长时间为横坐标, 绘制裸鼠肿瘤增殖曲线, 计算肿瘤倍增时间及肿瘤抑制率^[9]. 分别将肿瘤以及心、肺、肾、肝脏等主要脏器分别行病理学检查, 标本 40 g/L 多聚甲醛固定、石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜观察. 透射电镜样品用 30 g/L 戊二醛固定, 常规处理后, 透射电镜观察各组肿瘤超微结构的变化. 肿瘤体积倍增时间: $DT = t[\log 2 / (\log V_t - \log V_0)]$, 公式中 *t* 为肿瘤生长时间, *V*₀ 和 *V*_{*t*} 分别为测量瘤体大小开始和结束时的肿瘤体积^[11]. 肿瘤抑制率 = $(C - T) / C \times 100$. 公式中 *T* 为给药组平均瘤质量, *C* 为对照组平均瘤质量.

统计学处理 实验数据采用 Microsoft Excel, Sigmaplot2000 软件进行数据分析.

2 结果

倒置显微镜下观察 MEC-1/5-FU 细胞均为贴壁生长的上皮样细胞, 细胞增殖活跃, 核分裂多见, 细胞大小不一可见重叠生长. 细胞增殖率测定群体倍增时间为 28.8 h.

2.1 裸鼠成瘤观察以及体内治疗情况 细胞接种后 3-7 d 接种部位出现肿瘤结节, 成瘤率 20/20. 观察可见肿瘤结节质地较硬, 增长速度较快, 肿瘤体积大小不等. 瘤块平均体积为 $193 \pm 52 \text{ mm}^3$. 分组治疗后密切观察裸鼠一般情况可见, 肿瘤瘤块生长较迅速, 裸鼠反应较敏捷, 进食正常, 治疗 6 次时 5-FU 组裸鼠很快消瘦, 反应逐渐迟钝, 进食情况差, 皮肤皱缩并发红, 出现腹泻. 治疗 13 d 后裸鼠极度消瘦, 陆续死亡 2 只, 其余反应迟钝, 腹泻严重, 极度衰竭, 为留取标本于治疗 2 wk 时提前处死 5-FU 组裸鼠. HMBA 组裸鼠治疗前 2 wk 生长一般状况较明显好于 5-FU 组, 裸鼠动作活跃, 进食较好, 治疗进行至 3 wk 时, 可见随瘤体增大裸鼠逐渐消瘦, 进食情况较差. 联合用药组裸鼠动作活跃, 进食正常, 一般情况较其他组好 (表 1, 图 1).

表1 体内逆转耐药实验裸鼠肿瘤倍增时间及肿瘤抑瘤率

分组	注药(存活数)			生存时间(d)	肿瘤体积(mm ³)	抑瘤率(%)	瘤体倍增(h)
	开始	13次	结束				
对照组	5	5	3	20.8	3.651 ± 1.172	0	113
5-FU组	5	3	0	13.6	1.055 ± 0.858	25.6	135
HMBA组	5	4	3	16.4	2.043 ± 0.356	44.0	109
5-FU+HMBA组	5	5	3	21.2	1.028 ± 0.309 ^a	71.8	212

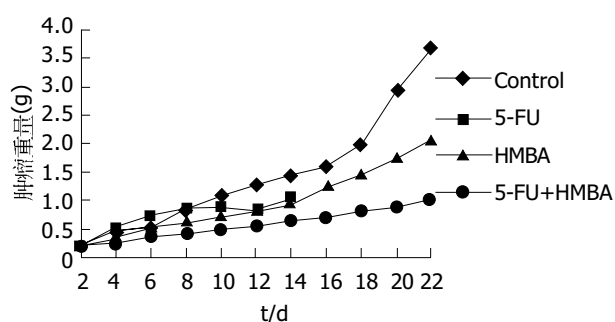
^aP<0.05 vs对照组.

图1 裸鼠肿瘤增殖曲线.

2.2 病理学检查 裸鼠背部皮下可见包块隆起, 切开呈圆形位于皮下. 皮下圆形包块和周围组织界限清楚, 易剥离. 包块切面灰白, 质地细腻, 部分有局灶性坏死和囊性变. 部分包块中心部位可见暗褐色坏死灶. 肝、肺、心脏等脏器未见病变, 未查到肿大的淋巴结. 光镜下观察瘤组织呈腺样或巢状排列, 可见不规则的腺腔形成. 细胞密集, 为多角形或梭形, 细胞大小不一, 异形性明显, 胞界清楚, 胞质丰富、红

染, 核大深染, 可见嗜酸性核仁, 分裂相多见. 瘤细胞间质可见不规则的纤维间质和黏液样物质, 坏死多见(多灶性的、片状坏死和局灶性坏死), 对照组坏死细胞区域较小, HMBA组细胞增生活跃, 坏死细胞少见. 5-FU组细胞可见大片弥漫性坏死, 坏死细胞约占40-50%, 联合用药组坏死细胞约所占区域少于5-FU组但较对照组和HMBA组为多且明显, 约占观察区域的30-40%(图2).

2.3 透射电镜观察 对照组肿瘤细胞不规则、核仁明显, 细胞成片状排列, 形成原始腺样结构. 细胞上皮样特征明显, 细胞之间可见发育不良的细胞连接, 部分细胞散在, 核仁明显, 可见明显的核分裂, 细胞器胞质丰富, 线粒体、核仁较多, 巢之外可见细胞基质成分和较多胶原. 部分细胞内可见脂滴, 有细胞内腺管形成, 少部分细胞有凋亡现象, 可见细胞之间的黏液样基质, 微绒毛发达. 细胞间可见桥粒结构. 5-FU组细胞明显变性, 细胞电子密度降低, 核异染色质增多, 靠近核膜边缘. 核膜腔扩张, 内质网扩张, 线粒体肿

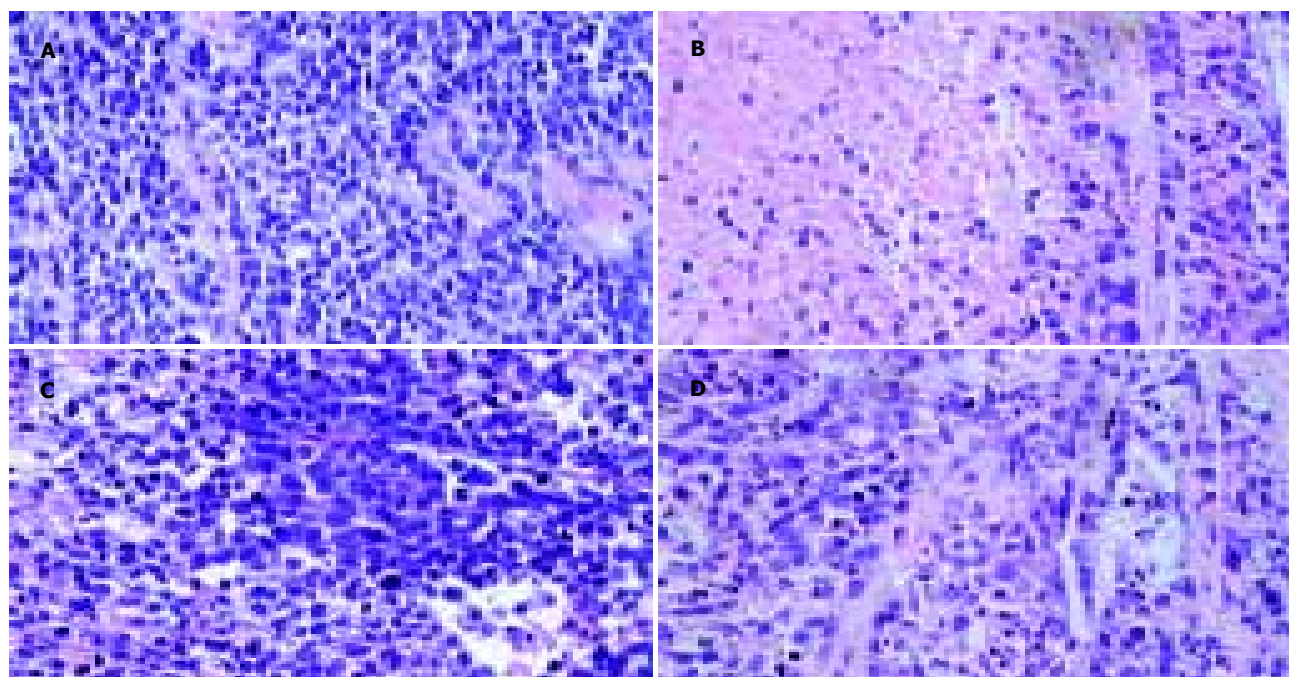


图2 裸鼠皮下成瘤组织学(HE × 20). A: control; B: 5-FU; C: HMBA; D: 5-FU+ HMBA.

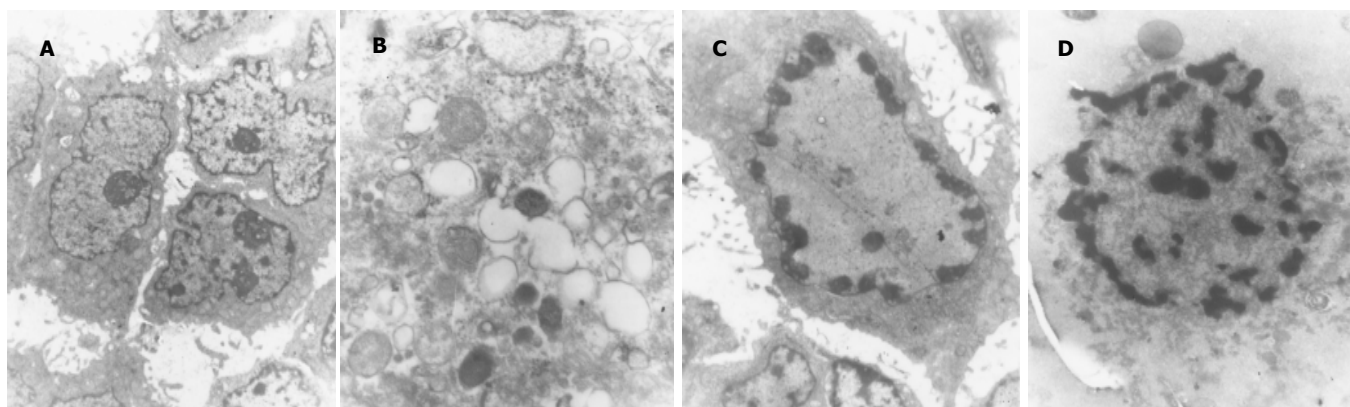


图3 裸鼠皮下成瘤组织超微结构TEM. A: control(TEM × 4000); B: 5-FU(TEM × 25000); C: HMBA(TEM × 5000); D: 5-FU+HMBA(TEM × 12000).

胀、空泡化. HMBA 组细胞近似圆形或卵圆形, 细胞核异染色质增多, 沿核膜边缘成块状排列, 未见核分裂, 核仁不明显, 有明显的脂滴. 有明显的凋亡细胞形成. 联合用药组部分细胞存活, 可见核分裂, 血管结构尚可, 胞质胞膜较完整, 核内异染色质增多. 部分细胞坏死明显, 变性与坏死的细胞均可见到核膜腔扩张, 染色质凝集靠边, 细胞核破裂成碎片状. 无明显组织结构, 细胞界限不清, 细胞器无法分辨. 胞质崩解坏死的肿瘤细胞聚集成片. 个别细胞染色质聚集成片, 类似凋亡细胞. 坏死严重(图3).

3 讨论

MDR 逆转剂是指全部或部分恢复耐药的肿瘤细胞对化疗药物敏感性的一类物质^[12], 具有逆转 MDR 作用的多种药物其作用机理各不相同^[13-14], 目前其主要研究方向在于: 寻找高效低毒的逆转剂; 联合应用机制不同的逆转剂; 通过特殊制剂手段; 进行构效关系研究广泛筛选; 采用反义技术在基因水平调节^[15]. 有研究表明, 分化诱导剂是众多药物中的一种具有其独特的作用机制的逆转药物. 自1960年代发现分化诱导剂以来, 为恶性肿瘤的化疗提供了新的途径. HMBA 为杂极性诱导分化剂的代表, 目前已发现HMBA可对包括人急性早幼粒白血病细胞 HL-60、人肾癌细胞以及人胶质瘤等多种肿瘤具有诱导终末分化的作用^[16-17]. 本教研室既往曾报道研究HMBA对人黏液表皮样癌治疗及增敏协同抗癌作用^[9]. 我们在既往研究的基础上建立裸鼠耐药模型, 进一步观察HMBA对黏液表皮样癌治疗作用及联合化疗药物进行治疗的逆转耐药效应. 实验观察可见: 5-FU 药物治疗组与对照组以及其他各治疗组相比, 裸鼠生活质量差, 治疗过程中短时间内出现衰竭, 治疗13 d时发现陆续死亡2只. HE染色见细胞大面积坏死, 透射电镜观察细胞电子密度降低, 核异染色质增多, 靠近核膜边缘. 核膜腔扩张, 内质网扩张, 线粒体肿胀、空泡化. 肿瘤抑制率低于30%(25.6%), 统

计学处理无显著性差异. 表明该组对治疗药物不敏感, 毒性反应导致裸鼠生存时间缩短. HMBA 给药组裸鼠生存时间较5-FU组略延长, 平均存活天数为16.6 d, HE染色坏死细胞少于5-FU组. 透射电镜观察细胞有明显的脂滴并有明显的凋亡细胞形成. 表明虽然HMBA药物毒性低于5-FU, 裸鼠的生活质量有一定改善, 肿瘤抑制率为44.0%, 对肿瘤的治疗存在一定的疗效, 但统计学处理无显著性差异. 5-FU与HMBA联合用药组可观察到一方面较低剂量的联合用药使裸鼠对药物毒性反应有所减轻, 裸鼠存活时间延长. 另一方面肿瘤对药物的敏感性增强, 抑瘤率为71.8%, 经统计学处理有显著性差异($P<0.05$). HE染色见变性与坏死的细胞均可见到核膜腔扩张, 染色质凝集靠边, 细胞核破裂成碎片状, 个别细胞染色质聚集成片类似凋亡细胞.

有资料表明, 分化诱导治疗可使异常增殖的癌细胞转变为不增殖的较为成熟的细胞. 其诱导分化的机制有可能为HMBA可一定程度改变细胞膜及信号传递系统并且改变细胞周期调控因子及相关原癌基因与抑癌基因、合成调控特殊功能蛋白质等^[18-20]. 肿瘤抑制率为疗效评价指标, 抑制率 $>30\%$, 经统计学处理有显著性差异($P<0.05$)者, 评定该药对肿瘤有一定疗效^[9]. 结合本实验结果试分析: 分化诱导剂HMBA与5-FU联合应用与对照组以及单独用药组相比, 采用较低的给药浓度, 可能在一定程度上减少了药物副作用, 同时部分提高了裸鼠的存活质量和其对化疗药物的耐受性, 从而增加了肿瘤细胞对药物的敏感程度而达到逆转效果, 使肿瘤的抑瘤率得以提高. 作为分化诱导剂的HMBA协同化疗药物治疗及逆转肿瘤细胞耐药的机制尚待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Boumendjel A, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Perrotton T, Di Pietro A. Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: Recent advances in the discovery of reversal agents. *Med Res Rev* 2005;25:453-472
- 2 Ojima I, Borella CP, Wu X, Bounaud PY, Oderda CF, Sturm

- M, Miller ML, Chakravarty S, Chen J, Huang Q, Pera P, Brooks TA, Baer MR, Bernacki RJ. Design, synthesis and structure-activity relationships of novel taxane-based multidrug resistance reversal agents. *J Med Chem* 2005;48: 2218-2228
- 3 Millet J, Alibert S, Torrentino-Madamet M, Rogier C, Santelli-Rouvier C, Bigot P, Mosnier J, Baret E, Barbe J, Parzy D, Pradines B. Polymorphism in plasmodium falciparum drug transporter proteins and reversal of in vitro chloroquine resistance by a 9, 10-dihydroethanoanthracene derivative. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4869-4872
- 4 Limtrakul P, Khantamat O, Pintha K. Inhibition of P-glycoprotein activity and reversal of cancer multidrug resistance by Momordica charantia extract. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54:525-530
- 5 Qi J, Wang S, Liu G, Peng H, Wang J, Zhu Z, Yang C. Pyronaridine, a novel modulator of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:1124-1131
- 6 Sakamoto K, Izumaru S, Kurita T, Miyajima Y, Nakashima T. Clinical review of mucoepidermoid carcinomas. *Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 2005;108:142-149
- 7 Sobral AP, Loducca SV, Nunes FD, de Araujo NS, Kowalski LP, de Araujo VC. Relationship between major and minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma malignancy grading and presence of stromal myofibroblasts: immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 2004;33:335-339
- 8 李焰, 吴军正, 司徒镇强, 刘斌, 王江华, 李峰, 李洁. 涎腺黏液表皮样瘤细胞系的建立及其生物学特性. 第四军医大学学报 2002;23:1637-1640
- 9 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997:297-459
- 10 贾保军, 司徒镇强, 吴军正, 陈建元. Agnors 在六亚甲基二乙酰诱导涎腺黏液表皮样瘤细胞分化研究中的表达和意义. 肿瘤防治研究 1999;26:43-44
- 11 Shimomura K, Manda T, Mukumoto S, Masuda K, Nakamura T, Mizota T, Matsumoto S, Nishigaki F, Oku T, Mori J. Anti-tumor activity and hematotoxicity of a new, substituted dihydrobenzoxazine, FK973, in mice. *Cancer Res* 1988;48: 1166-1172
- 12 Peer D, Dekel Y, Melikhov D, Margalit R. Fluoxetine inhibits multidrug resistance extrusion pumps and enhances responses to chemotherapy in syngeneic and in human xenograft mouse tumor models. *Cancer Res* 2004;64:7562-7569
- 13 Li DQ, Wang ZB, Bai J, Zhao J, Wang Y, Hu K, Du YH. Reversal of multidrug resistance in drug-resistant human gastric cancer cell line SGC7901/VCR by antiprogesterone drug mifepristone. *World J Gastroenterol* 2004;10:1722-1725
- 14 范培红, 姜红祥. 逆转肿瘤多耐药策略进展. 天然产物研究与开发 2002;2:74-79
- 15 Tepsiri N, Chaturat L, Sripa B, Namwat W, Wongkham S, Bhudhisawasdi V, Tassaneeyakul W. Drug sensitivity and drug resistance profiles of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2005;11:2748-2753
- 16 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;13:294-298
- 17 Palumbo C, Albonici L, Bei R, Bocci C, Scarpa S, Di Nardo P, Modesti A. HMBA induces cell death and potentiates doxorubicin toxicity in malignant mesothelioma cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004;54:398-406
- 18 Chou TC, Guan Y, Soenen DR, Danishefsky SJ, Boger DL. Potent reversal of multidrug resistance by ningalins and its use in drug combinations against human colon carcinoma xenograft in nude mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;56:379-390
- 19 Peer D, Dekel Y, Melikhov D, Margalit R. Fluoxetine inhibits multidrug resistance extrusion pumps and enhances responses to chemotherapy in syngeneic and in human xenograft mouse tumor models. *Cancer Res* 2004;64:7562-7569
- 20 Ruefli AA, Smyth MJ, Johnstone RW. HMBA induces activation of a caspase-independent cell death pathway to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Blood* 2000;95:2378-2385

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 •

欢迎订阅 2006 年《实用儿科临床杂志》

《实用儿科临床杂志》为儿科学类核心期刊、中国科技核心期刊、中国科技论文统计源期刊、俄罗斯《文摘杂志》来源期刊。本刊办刊宗旨为贯彻党和国家的卫生工作方针、政策，贯彻理论与实践、普及与提高相结合的方针，反映国内外儿科医疗、科研等方面的新技术、新成果及新进展，促进学术交流。本刊辟有专家论坛、论著、小儿神经基础与临床、实验研究、儿童保健、误诊分析、药物与临床、综述、小儿外科、病例（理）讨论、病例报告、临床应用研究等栏目。2006年起本刊由月刊改为半月刊，A4开本，64页，每月5、20日出版，ISSN 1003-515X，CN 41-1106/R。国内外公开发售，国内邮发代号：36-102，国外邮发代号：M1763。欢迎广大儿科医务工作者和医学科教研人员、各级图书馆（室）订阅邮购。国内定价：6.50元/期，156.00元/年；国外定价：10.00美元/期，240美元/年。联系地址：453003 河南省新乡市新乡医学院《实用儿科临床杂志》编辑部。联系电话：0373-3029144，0373-3831456；传真：0373-3029144；E-mail: syqk@chinajournal.net.cn; syqk@xxmc.edu.cn。

多功能腹膜检查针对良恶性腹水的诊断价值

朱 樑, 张忠兵, 谢渭芬, 胡和平, 张兴荣, 刘 苏, 陈伟忠

朱樑, 张忠兵, 谢渭芬, 胡和平, 张兴荣, 刘苏, 陈伟忠, 中国人民解放军第二军医大学长征医院消化科 上海市 200003

朱樑, 男, 1946-03-18 生, 上海市人, 汉族, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要从事消化道肿瘤早期诊断研究。

军队医药卫生重大科技成果推广应用项目, No. [2000]卫科训字第 50 号

通讯作者: 朱樑, 200003, 上海市黄浦区凤阳路 415 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院。czneike@sohu.com

电话: 021-63610109-73181 传真: 021-63520020

收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-08

Values of multifunctional peritoneal biopsy needle in diagnosis of benign and malignant ascites

Liang Zhu, Zhong-Bing Zhang, Wei-Fen Xie, He-Ping Hu, Xing-Rong Zhang, Su Liu, Wei-Zhong Chen

Liang Zhu, Zhong-Bing Zhang, Wei-Fen Xie, He-Ping Hu, Xing-Rong Zhang, Su Liu, Wei-Zhong Chen, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

Supported by the Medical Healthy Program of Military Important Science and Technology Extend Application, No. [2000]50

Correspondence to: Liang Zhu, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, the Second Military Medical University, 415 Fengyang Road, Huangpu District, Shanghai 200003, China. czneike@sohu.com

Received: 2005-05-23 Accepted: 2005-06-08

Abstract

AIM: To evaluate the values of the multifunctional peritoneal biopsy needle in the differential diagnosis of benign and malignant ascites.

METHODS: Routine cytological examination, biopsy and brush cytology were performed in 327 patients with ascites using multifunctional peritoneal biopsy needle, and then the cytological results were analyzed.

RESULTS: All the benign ascites were diagnosed as benign using the multifunctional peritoneal biopsy needle, and the specificity was 100%. For the malignant ascites, the diagnostic sensitivity of the routine ascitic cytology was 53.4%(101/189), and those of biopsy and brush cytology were 90.5%(171/189) and 83.1%(157/189) respectively. After biopsy and brush cytology, the sensitivity of cytological examination was 90.0%(170/189). However, when the multifunctional peritoneal biopsy needle was used, the sensitivity of co-examination was 93.7%(177/189), and the sensitivities of biopsy, brush cytology

and the cytological examination after biopsy and brush cytology were significantly higher than that of routine ascitic cytology ($\chi^2 = 64.241, 38.288, 62.064$, all $P < 0.001$). The sensitivity of biopsy was markedly higher than that of brush cytology ($\chi^2 = 4.518, P < 0.05$), and the sensitivity of ascitic cytological examination after biopsy and brush cytology was higher than that of single brush cytology ($\chi^2 = 3.831, P < 0.05$). There was no significant difference between the sensitivities of biopsy and cytological examination as well as between the multifunctional peritoneal biopsy needle and cytological examination after single biopsy or single brush cytology. The sensitivity and accuracy of the multifunctional peritoneal biopsy needle were 93.7% and 96.3%, respectively, in diagnosis of benign and malignant ascites.

CONCLUSION: The multifunctional peritoneal biopsy needle is valuable in the differential diagnosis of benign and malignant ascites.

Key Words: Ascites; Benign; Malignant; Diagnosis; Multifunctional peritoneal biopsy needle

Zhu L, Zhang ZB, Xie WF, Hu HP, Zhang XR, Liu S, Chen WZ. Values of multifunctional peritoneal biopsy needle in diagnosis of benign and malignant ascites. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005; 13(15):1839-1841

摘要

目的: 评价多功能腹膜检查针在良恶性腹水鉴别诊断中的价值。

方法: 对明确诊断腹水患者 327 例用多功能腹膜检查针进行活检、刷检, 并对活检刷检前后腹水细胞学检查结果进行分析。

结果: 多功能腹膜检查针各项检查良性腹水结果均为良性, 特异度均为 100%。恶性腹水 189 例活检前细胞学检查明确诊断 101 例, 灵敏度 53.4%; 活检明确诊断的为 171 例, 灵敏度 90.5%; 经刷检明确诊断 157 例, 灵敏度 83.1%; 活检刷检后细胞学明确诊断 170 例, 灵敏度 90.0%; 而多功能腹膜活检针 3 项检查综合确诊 177 例, 灵敏度 93.7%。活检、刷检及活检刷检后的细胞学检查的诊断灵敏度均明显高于活检前腹水细胞学检查 ($\chi^2 = 64.241, 38.288, 62.064, P < 0.01$); 活检和刷检相比, 活检诊断灵敏度明显高于刷检 ($\chi^2 = 4.518$,

$P<0.05$);活检刷检后细胞学检查灵敏度与单一刷检相比明显升高($\chi^2 = 3.831$, $P<0.05$),而活检和活检、刷检后细胞学检查在统计学上没有差异;单一活检、单一活检刷检后细胞学检查和多功能腹膜检查针3项检查综合相比在统计学上没有显著差异.多功能腹膜检查针对良恶性腹水的诊断灵敏度达 93.7%,准确度达 96.3%.

结论:多功能腹膜检查针对良恶性腹水鉴别诊断具有较大的价值.

关键词: 腹水; 良恶性; 诊断; 多功能腹膜检查针

朱樑, 张忠兵, 谢渭芬, 胡和平, 张兴荣, 刘苏, 陈伟忠. 多功能腹膜检查针对良恶性腹水的诊断价值. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1839-1841
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1839.asp>

0 引言

腹水是临床常见的病症,可分为良性和恶性,细胞学检查阳性率低,生化及常规检查变异较大.超声检查鉴别腹水的良恶性作用有限^[1].AFP联合CEA诊断灵敏度可达 92.9%,明显高于腹水细胞学检查,但特异度仅为 63.0%^[2].恶性腹水中CA-125和cytokeratin 19显著降低,而CEA,CA 125,CA 15-3显著升高,而使用CEA,CA 125,CA 15-3的腹水血清比联合诊断敏感性为 82%,特异度为 100%^[3].我们在传统的胸腹膜活检针的基础上,对关键技术进行创新,利用杠杆原理设计出了汇集腹水抽取、活检、腹膜及腹腔内刷检等功能的多功能腹膜检查针对良恶性腹水的鉴别有较大的价值如下.

1 材料和方法

1.1 材料 1996/2004年长征医院、302医院、解放军454医院等 12家军队医院最终明确腹水性质的住院患者327例,男176例,平均年龄65.7岁,女151例,平均年龄56.4岁),恶性腹水189例,病因:胃癌25例,肝癌78例,结肠癌52例,胰腺癌14例,卵巢癌17例,恶性腹膜间皮瘤3例;良性腹水138例,病因:肝硬化90例,肾性17例,心源性3例,结核性28例.多功能腹膜检查针(第二军医大学附属长征医院研制,上海埃斯埃医械塑料制品有限公司制造;专利号97106375.7,沪药管械(准)字2001第2011011号)置腹穿包中,消毒,备用.

1.2 方法 检查前,所有患者均测定出凝血时间、血小板计数、凝血酶原时间,异常者给予纠正.根据患者情况可予术前B超腹水探索以发现腹膜可疑病变部位作为活检和刷检的重点部位,以提高检查阳性率.嘱患者排尽尿,在床边进行检查.中等量腹水者取侧卧位,在脐与左或右髂前上棘连线上选择穿刺点(穿刺

点应选在叩诊呈实音的腹水区内);大量腹水患者的穿刺点可选择在脐上下方腹白线上或左右腹直肌外缘,也可根据病变部位选择穿刺点.常规消毒,铺洞巾,20 g/L利多卡因5 mL局麻,用穿刺针进行腹腔穿刺.进入腹腔后,拔出穿刺针芯,见腹水流出,放腹水送细胞学检查.安装加压器后进行加压活检.除对B超探查确定的可疑病变部位进行活检外,在半径为10 cm的腹膜四个象限上各取活检2块,然后插入刷检器,除对B超定位后的可疑病变部位进行刷检外,在腹腔内四个象限上分别进行刷检,涂片后送细胞学检查.最后放腹水进行常规、生化和细胞学检查,必要时再进行放腹水治疗.操作完毕后拔出穿刺针,局部消毒,必要时用蝶形胶布或火棉胶包扎穿刺针眼.如有腹水外溢,可用消毒的青霉素橡皮盖扣紧针孔区,用橡皮膏或邦迪加压粘贴于腹壁.术后嘱患者对侧卧位6-12 h,防止腹水漏出.活检所取腹膜组织用40 g/L甲醛固定,送病理科作常规石蜡包埋和HE染色后作病理诊断.300-500 mL腹水抽取后标本内加入少量肝素钠抗凝剂,15 min后取底部液体,2 000 r/min离心5 min,取沉淀物涂片2张,作细胞学诊断.

统计学处理 采用 χ^2 检验.

2 结果

本组327例腹水患者最终均已明确诊断,多功能腹膜检查针检查刷检前细胞学、腹膜活检、腹膜刷检,及活检刷检后腹水细胞学检查,良性腹水各项检查结果均为良性,特异度均为100%.恶性腹水189例中,经活检前细胞学检查明确诊断的为101例,灵敏度53.4%;经活检明确诊断的为171例,灵敏度90.5%;经刷检明确诊断的为157例,灵敏度83.1%;经活检刷检后细胞学明确诊断的为170例,灵敏度90.0%;而多功能腹膜活检针3项检查综合确诊的为177例,灵敏度93.7%.有6例为刷检未明确诊断,而在活检及活检刷检后细胞学明确诊断的;7例仅在活检中明确诊断;6例仅在刷检后细胞学明确诊断(表1).采用 χ^2 检验显示,活检、刷检及活检刷检后的细胞学检查的诊断灵敏度均明显高于活检前腹水细胞学检查($\chi^2 = 64.241$, 38.288 , 62.064 , $^aP<0.01$);活检和刷检相比,活检诊断灵敏度明显高于刷检($\chi^2 = 4.518$, $^bP<0.05$);活检刷检后细胞学检查灵敏度与单一刷检相比明显升高($\chi^2 = 3.831$, $^cP<0.05$),而活检和活检、刷检后细胞学检查在统计学上没有差异;单一活检、单一活检刷检后细胞学检查和多功能腹膜检查针3项检查综合相比在统计学上没有显著差异(表2).

表1 腹水的诊断结果

方法		恶性	良性
细胞学	阳性	101	0
	阴性	88	138
活检	阳性	171	0
	阴性	18	138
刷检	阳性	157	0
	阴性	32	138
活检刷检后细胞学	阳性	170	0
	阴性	19	138
多功能腹膜活检针	阳性	177	0
	阴性	12	138

表2 多功能腹膜检查针各检测方法诊断恶性腹水的比较(%)

检测方法	灵敏度	特异度	准确度
活检前细胞学	53.4	100	73.1
活检	90.5	100	94.5
刷检	83.1	100	90.2
活检、刷检后细胞学	90.0	100	94.2
全检	93.7	100	96.3

3 讨论

多年来国内外学者在腹水良恶性诊断上进行了许多研究, 主要在腹水及或血液生化检查方面. 最早采用的倒钩形活检针活检成功率只有 50%, 且患者疼痛较明显, 且每次进针仅能活检 1 块组织. 血管内皮生长因子, 腹水胆固醇、端粒酶活性、腹水中基质金属蛋白酶、LDH 活性等来诊断恶性腹水, 但总的结果均不如多功能腹膜检查针^[4-8]. 我们使用多功能腹膜检查针在活检、刷检后能使细胞学检查阳性率由原来的 53.4% 上升至 93.7%, 大大提高了诊断的灵敏度, 而诊断的特异度并未有下降, 仍为 100%. 多功能腹膜检查针活检、刷检范围广, 活检范围为进针点周围半径为 10 cm 的圆周内, 刷检半径比活检长 2-3 cm, 并可同时进行腹膜活检、刷检、腹水常规、生化和活检、刷检后细胞学检查, 大大提高了良恶性腹水的鉴别诊断率. 比较各项检查的诊断灵敏度, 总体检查优于单一活检、优于活检, 刷检后细胞学检查优于单一刷检并明显优于常规腹水细胞学检查 ($P < 0.01$). 而在灵敏度上具有显著统计学差异 ($P < 0.05$) 的是总体检查和刷检, 活检和刷检, 活检、刷检后细胞学检查与单一刷检; 而单一活检、单一活检刷检后细胞学检查和 3 项综合相比在统计学上没有显著差异. 分析可能为以下方面原因, (1) 单一活检对恶性腹水确诊率为 90.5%, 高于作

者原先报道的 68.8%^[9], 可能是因改进了取活检的方法, 原先是共取 4-8 块, 而本文是在半径为 10 cm 的四个象限上各取活检 2 块, 而且在活检前 B 超探查发现的腹膜可疑病变部位作有针对性重点活检检查, 提高了检查阳性率; (2) 所检查患者均为中量以上腹水, 在刷检时及刷检后退出过程中可能有部分细胞脱落落于腹水中. 这可能是活检刷检后的细胞学检查阳性率大于单一的刷检阳性率的原因. 多功能腹膜检查针的优点: (1) 对腹膜及腹腔脏器损伤小. 我们所采用的腹膜活检针针头为钝头, 中空针, 腹膜刷头毛的软硬度适中, 其顶端圆钝光滑, 刷柄富有弹性, 不易造成腹腔内器官的损伤和腹膜出血; (2) 腹膜活检针进入腹腔内长达 10 cm, 故可在半径为 10 cm 范围的腹膜上取活检, 腹膜细胞刷进入腹腔内较腹膜活检针长约 2-3 cm, 刷检范围更为广泛; (3) 阳性率高, 因有些肿瘤, 如腹膜恶性间皮瘤等主要累及腹膜, 但不易脱落, 很难在腹水中找到脱落细胞, 活检、刷检则可提高阳性率; (4) 活检病理可直接给出诊断金标准—病理诊断, 刷检细胞结构完整, 涂片所见肿瘤细胞形态清晰, 有利于细胞组织化学检查; (5) 操作简单, 容易掌握, 安全可靠, 使用限制小, 适合于大中小型各级医院的门诊或住院患者. 因此, 此项技术确有一定的实用价值.

4 参考文献

- Goldberg BB, Goodman GA, Clearfield HR. Evaluation of ascites by ultrasound. *Radiology* 1970;96:15-22
- 朱煥兴, 杨永青. 血清、腹水中 AFP、CEA 及 CA125 水平对良、恶性腹水的诊断价值. *放射免疫学杂志* 2003;16:329-331
- Trape J, Molina R, Sant F. Clinical evaluation of the simultaneous determination of tumor markers in fluid and serum and their ratio in the differential diagnosis of serous effusions. *Tumour Biol* 2004;25:276-281
- Rana SV, Venketesh SG, Kochhar R. Usefulness of ascitic fluid cholesterol as a marker for malignant ascites. *Med Sci Monit* 2005;11:CR136-142
- Nascimento I, Schaer R, Lemaire D, Freire S, Paule B, Carvalho S, Meyer R, Schaer-Barbosa H. Vascular endothelial growth factor (VEGF) levels as a tool to discriminate between malignant and nonmalignant ascites. *APMIS* 2004;112:585-587
- Li CP, Huang TS, Chao Y, Chang FY, Whang-Peng J, Lee SD. Advantages of assaying telomerase activity in ascites for diagnosis of digestive tract malignancies. *World J Gastroenterol* 2004;10:2468-2471
- Sun XM, Dong WG, Yu BP, Luo HS, Yu JP. Detection of type IV collagenase activity in malignant ascites. *World J Gastroenterol* 2003;9:2592-2595
- Sevinc A, Sari R, Fadillioglu E. The utility of lactate dehydrogenase isoenzyme pattern in the diagnostic evaluation of malignant and nonmalignant ascites. *J Natl Med Assoc* 2005;97:79-84
- 张忠兵, 朱樑, 马述春, 张兴荣, 胡和平, 陈伟忠, 刘苏, 林勇. 多功能腹膜检查针的研制及临床应用研究. *中华消化杂志* 1999;19:114-116

CD1 小鼠胃肠道快速延迟性整流性钾通道基因的分布

余英, 余保平, 汪福群

余英, 余保平, 汪福群, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
余英, 女, 1980-08-27 生, 湖北省武汉市人, 汉族, 2003 年武汉大学硕士生, 主要从事胃肠动力学的基础研究。

通讯作者: 余保平, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科。
yubaoping62@yahoo.com.cn

电话: 027-68759391

收稿日期: 2005-06-06 接受日期: 2005-06-13

Expression of ether-a-go-go-related gene in gastrointestinal tract of normal CD1 mice

Ying Yu, Bao-Ping Yu, Fu-Qun Wang

Ying Yu, Bao-Ping Yu, Fu-Qun Wang, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Bao-Ping Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. yubaoping62@yahoo.com.cn

Received: 2005-06-06 Accepted: 2005-06-13

Abstract

AIM: To investigate the expression of ether-a-go-go-related gene (ERG) mRNA and protein and its different distributions in the gastrointestinal tract of CD1 mice.

METHODS: The expression of ERG K⁺ current related protein was examined by immunohistochemistry and the expression of ERG mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and *in situ* hybridization in the tissues of stomach, jejunum, ileum and colon from adult CD1 mice. Then the distribution of ERG was analyzed.

RESULTS: ERG was positively expressed in all the tissues of stomach, jejunum, ileum and colon. The positive cells mainly distributed in the muscular layer. A small number of positive cells distributed in the mucosa and chorion. The levels of ERG expression in stomach and colon were significantly higher than those in jejunum and ileum (4.30 ± 0.95 , 3.60 ± 0.70 vs 2.70 ± 0.82 , 2.30 ± 1.06 ; $P < 0.05$).

CONCLUSION: ERG is expressed in the gastrointestinal tract of CD1 mice. Furthermore, the expression is differential at different sites.

Key Words: Ether-a-go-go-related gene; *In situ* hybridization;

Immunohistochemistry; Reverse transcription polymerase chain reaction; Gastrointestinal tract; Mice

Yu Y, Yu BP, Wang FQ. Expression of ether-a-go-go-related gene in gastrointestinal tract of normal CD1 mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(15):1842-1845

摘要

目的: 研究快速延迟性整流性钾通道基因 (ether-a-go-go-related gene, ERG)mRNA 及相关蛋白在正常小鼠胃肠道的表达及不同部位分布的差异性。

方法: 用原位杂交、RT-PCR 和免疫组化技术检测 CD1 小鼠胃、空肠、回肠和结肠组织 ERG mRNA 及相关蛋白的分布。

结果: 三种方法显示胃、空肠、回肠和结肠组织均有 ERG 阳性表达, 阳性细胞主要分布在肌层, 少量分布在黏膜、浆膜。胃和结肠 ERG 阳性表达明显高于回肠和空肠, 具有显著性差异 (4.30 ± 0.95 , 3.60 ± 0.70 vs 2.70 ± 0.82 , 2.30 ± 1.06 ; $P < 0.05$)。

结论: ERG 在 CD1 小鼠胃肠道有阳性表达, 并在胃肠道不同部位的表达存在差异性。

关键词: 快速延迟性整流性钾通道基因; 原位杂交; 免疫组化; 逆转录聚合酶链反应; 胃肠道; 小鼠

余英, 余保平, 汪福群. CD1 小鼠胃肠道快速延迟性整流性钾通道基因的分布. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1842-1845

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1842.asp>

0 引言

ERG (Ether-a-go-go-related gene) 编码快速延迟性整流性钾通道的 α 亚基, 该亚基参与构成快速延迟性整流性钾通道的电压感知功能区。该通道在心脏起搏细胞电流频率的调节及维持心肌细胞静息电位的稳定性中起着重要作用^[1-2], HERG (human-ether-a-go-go-related gene) 突变常导致长 QT 间期综合征^[3-6]。ERG 最初被认为只在心脏表达, 随着研究的深入, 人们发现他也存在于其他许多组织中 (如脑神经细胞), 并在不同组织中扮演着重要角色。目前有研究发现食管中也有 ERG 的表达, 但在胃肠道的表达罕有报道。我们首次用原位杂交技术来研究 ERG 在胃肠道中的存

在性, 并结合 RT-PCR 和免疫组化技术首次探讨 ERG 在胃肠道不同部位的分布情况。

1 材料和方法

1.1 材料 成年 CD-1 小鼠 10 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 雌雄不限, 自由饮食饮水, 室温保持在 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$, 12 h 昼夜交替. rabbit anti-mouse human erg polyanitbody (Santa Cruz 公司), ERG 原位杂交试剂盒 (博士德公司), 羊抗兔 IgG (中山公司), Trizol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), dNTP Mix, Rnasin (Takara 公司), M-MLV 逆转录酶及缓冲系统 (Promega 公司), Taq DNA 聚合酶及缓冲系统 (Biostar 公司), ERG 上下游引物、 β -actin 上下游引物由上海生工合成。

1.2 方法 禁食 12 h 后颈椎脱臼法处死, 取出胃, 空肠 (幽门后 2 cm), 回肠 (回盲瓣前 5 cm), 结肠 (盲肠后 2 cm), 在装有 Krebs 营养液的烧杯中去除胃肠内容物. (Krebs 营养液成分如下: NaCl 120.6 mmol/L, KCl 5.9 mmol/L, CaCl₂ 22.5 mmol/L, NaHCO₃ 15.4 mmol/L, NaH₂PO₄ 1.2 mmol/L, C₆H₁₂O₆ 11.5 mmol/L, pH = 7.4)。

1.2.1 ERG mRNA 原位杂交 原位杂交试剂盒采用针对 ERG 的寡核苷酸探针, 经地高辛标记. 针对小鼠 ERG 靶基因的 mRNA 序列为: (1) 5' -GACAC CATCA TCCGC AAGTT TGAGG GCCAG AGCCG-3' (2) 5' -CATGA CACCA ACCAC AGGGG CCCCT CTACC AGCTG-3' (3) 5' -AACAG GCTGG AAACC CGGCT AAGTG CAGAC ATGGC-3'. 原位杂交实验步骤严格按照试剂盒说明书操作进行. 阳性信号以胞质及少量胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒判断。

1.2.2 RT-PCR 分析 按 Trizol RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA, RNA 保存在 -70°C , 用紫外分光光度吸收法在 260 nm 处测定 RNA 的含量. 引物如下: ERG 上游引物: 5' -TCTCCATCTGTGTCATGCTC-3', ERG 下游引物: 5' -ACCAAGCATGCTGGAAGTAC-3'. β -actin 上游引物: 5' -TGTGATGGTGGGAATGGGTCAG-3', β -actin 下游引物: 5' -TTTGATGTCACGCACGATTTCC-3'. 然后进行逆转录和 PCR 扩增反应。

1.2.3 免疫组化评分 免疫组化 SABC 法染色步骤严格按照试剂说明书进行, 阳性对照片为心脏组织, 以 PBS 代替一抗做阴性对照. 阳性信号以胞质及少量胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒判断. 免疫组化评分 (immunohistochemical scores IHS) 方法见参照 [7] 文献, 结合阳性细胞百分比及阳性细胞染色强弱两个方面评分: a 为阳性细胞百分比 (无阳性细胞 = 0, 阳性细胞占 1-10% = 1, 11-50% = 2, 51-80% = 3, 81-100% = 4), b 为阳性细胞染色强弱 (阴性 = 0, 弱阳性 = 1, 中度阳性 = 2, 强阳性 = 3), a, b 两项乘积即为该例组织的 IHS。

统计学处理 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示. 各组 ERG 的 IHS 的变化值运用统计软件 SPSS12.0 作单因素方差分析, 组间比较采用 SNK (q 检验), 以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 ERG mRNA 原位杂交 胃、空肠、回肠、结肠均有阳性表达 (细胞质内出现棕黄色颗粒者为阳性). 着色主要在环肌层和纵肌层, 黏膜腺体、浆膜有少量着色 (图 1)。

2.2 RT-PCR 成年 CD1 小鼠 ($n = 10$) 胃体、空肠、

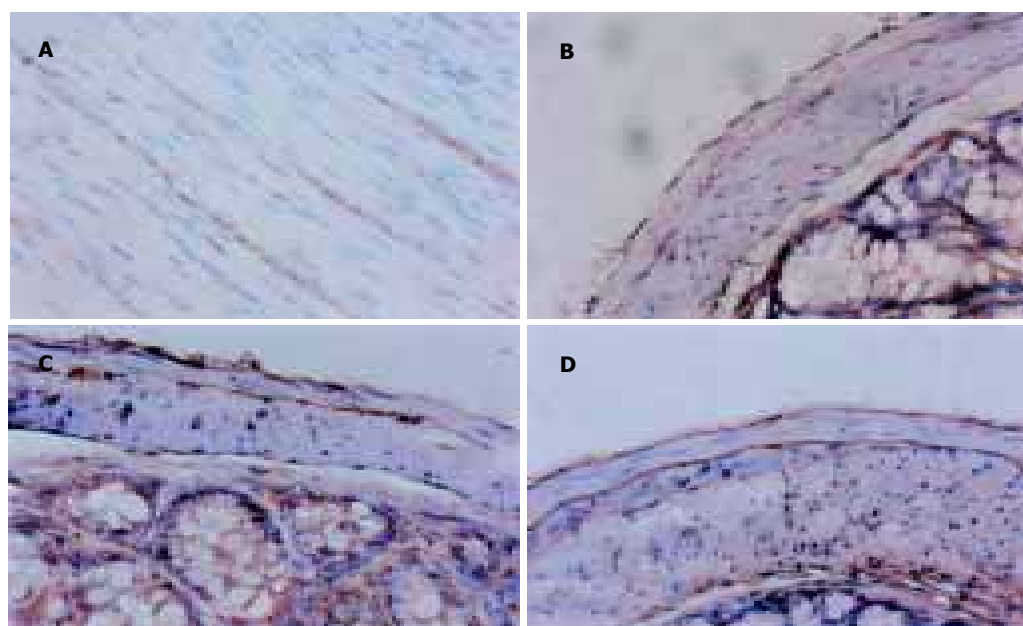


图1 小鼠胃肠道 ERG mRNA 阳性染色 ($\times 400$). A: 胃肌层; B: 空肠肌层; C: 回肠肌层; D: 结肠肌层。

回肠、结肠平滑肌中均表达 ERG mRNA. 所检测到的 ERG cDNA 片段大小为 198bp, 位于全系列(NM_013569) 的 2252-2449 间. 用同一只小鼠心肌组织作为阳性对照(图2).

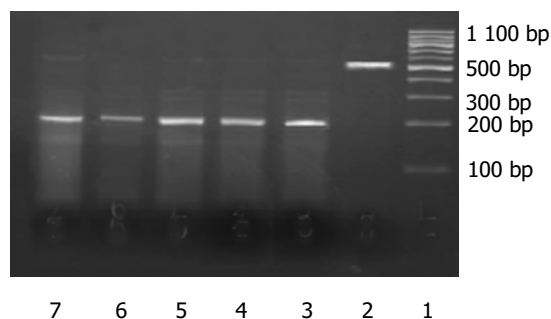


图2 PT-PCR结果. 1: Maker; 2: β -actin; 3: 心脏(阳性对照); 4: 胃体; 5: 空肠; 6: 回肠; 7: 结肠.

2.3 ERG 免疫组化 胃、空肠、回肠、结肠均有阳性表达(细胞质内出现棕黄色颗粒者为阳性), 着色主要在环肌层和纵肌层, 黏膜腺体及浆膜有少量着色. 胃、结肠ERG明显高于空肠和回肠(图3). 染色结果用免疫组化评分(IHS)表示, 结果:胃 4.30 ± 0.95 分, 空肠 2.70 ± 0.82 分, 回肠 2.30 ± 1.06 分, 结肠 3.60 ± 0.70 分. 各组ERG的IHS的变化值作单因素方差分析, 得出 $P < 0.01$ 有统计学意义. 证明至少有两组表达差异有统计学意义. 不同部位的ERG的IHS两两比较采用SNK(q 检验), 得出胃、结肠IHS明显高于空肠、回肠($P < 0.05$)有统计学意义. 胃与结肠比较无显著性差异($P > 0.05$), 空肠与回肠比较无显著性差异($P > 0.05$).

3 讨论

ERG基因是一种延迟整流性钾通道基因, 属电压门控性钾通道家族, 而后研究表明其在心脏表达最为强烈. 深入研究发现在大鼠脑小胶质细胞^[8]、大鼠脑垂体^[9]、大鼠颈动脉窦化学感受器细胞^[10]、大鼠肺小动脉平滑肌细胞^[11]、人胰腺 β 细胞^[12]、小鼠门静脉^[13]也都存在ERG通道基因. 但在消化道罕有类似报道, 1999年Akbarali *et al*^[14]在负鼠食管平滑肌细胞中发现ERG阳性表达. 本实验补充说明ERG在胃、空肠、回肠、结肠也有表达, 证明ERG在整个消化道广泛分布. 其次本实验用原位杂交检测ERG, 不仅从基因水平证明ERG的存在, 而且初步定位ERG存在于胃肠道平滑肌细胞. 另外我们首次证明了ERG在胃、空肠、回肠、结肠的表达存在不均一性, 在胃、结肠的表达量明显高于空肠、回肠; 胃和结肠之间, 空肠和回肠之间表达无明显差异性. 我们推测ERG在胃肠道的不均匀分布与胃肠道不同部位平滑肌收缩力及收缩节律差异性相关. 研究表明快速延迟性整流性钾通道参与调节平滑肌舒张和收缩功能, 主要是通过对平滑肌细胞膜钾通道的开放或抑制进行的. 当钾通道开放, 细胞钾离子外流增加, 细胞膜超极化, 一方面通过关闭电压门控钙通道, 使细胞外钙内流减少; 另一方面通过钠和钙交换及三磷酸肌醇途径使细胞内钙释放减少, 导致细胞内游离钙与钙调素结合下降, 肌球蛋白轻链激酶活性降低, 肌动与肌球蛋白相互作用产生的收缩力也减弱, 从而导致平滑肌舒张. 相反, 钾通道活性受抑制时, 则引起平滑肌细胞膜去极化, 从而导致平滑肌收缩^[15]. 胃肠道平滑肌快速延迟性整流性钾通道

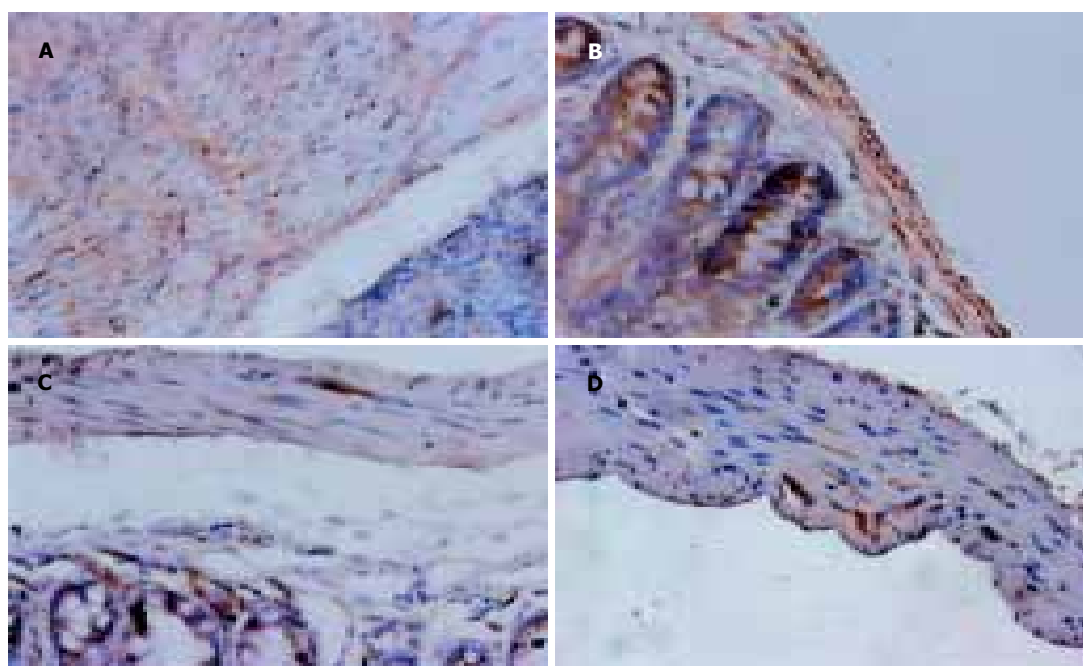


图3 免疫组化染色阳性($\times 400$). A: 胃肌层; B: 空肠肌层; C: 回肠肌层; D: 结肠肌层.

的活性受ERG表达多寡予以调控, 当ERG表达增多时, 该通道数量增多, 其活性增强^[16], 从而导致胃肠道平滑肌的收缩力减弱, 平滑肌舒张. 反之, ERG表达减弱时该通道数量减少, 活性减弱, 从而导致胃肠道平滑肌收缩力增强, 平滑肌收缩. 因此胃肠道不同部位ERG的表达多寡不同可能是导致胃肠道各段平滑肌收缩力和收缩节律不同的原因之一. 既往在研究ERG时, 研究动物多采用兔^[17], 大鼠^[9-11], 犬^[18-19], 豚鼠^[20], 而我们选用小鼠, 证明了ERG也存在于小鼠, 补充说明了ERG存在的物种多样性.

ERG的表达多寡及活性都会影响到胃肠道平滑肌的收缩和舒张功能, 我们推测先天性或后天病理情况导致的ERG在胃肠道表达和分布的异常或者ERGK⁺通道活性的改变, 都可能导致胃肠道运动的异常. 如今胃肠道动力疾病如功能性消化不良、肠易激综合征和慢性便秘等发病率日益增高, 已成为明显影响人们生活质量的常见病和多发病, 而该类疾病的发生与胃肠道平滑肌收缩力改变密切相关. 因此, 胃肠道动力疾病与ERG改变的相关性值得我们进一步研究. 另外在临床用药上, 某些药物引起胃肠道动力异常是否与ERG发生改变有关也值得我们进一步探讨.

4 参考文献

- Vandenberg JJ, Walker BD, Campbell TJ. HERG K⁺ channels: friend and foe. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22:240-246
- Subbiah RN, Clarke CE, Smith DJ, Zhao J, Campbell TJ, Vandenberg JJ. Molecular basis of slow activation of the human ether-a-go-go related gene potassium channel. *J Physiol* 2004;558(Pt 2):417-431
- Shang YP, Xie XD, Wang XX, Chen JZ, Zhu JH, Tao QM, Zheng LR. A novel splice mutation of HERG in a Chinese family with long QT syndrome. *J Zhejiang Univ Sci* 2005;6:626-630
- Wolpert C, Schimpf R, Giustetto C, Antzelevitch C, Cordeiro J, Dumaine R, Brugada R, Hong K, Bauersfeld U, Gaita F, Borggrefe M. Further insights into the effect of quinidine in short QT syndrome caused by a mutation in HERG. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005;16:54-58
- Viswanathan PC, Rudy Y. Cellular arrhythmogenic effects of congenital and acquired long-QT syndrome in the heterogeneous myocardium. *Circulation* 2000;101:1192-1198
- 桂乐, 杨钧国, 丁久平, 袁国会, 杜戎, 李伟, 任法鑫, 张守焰, 康彩练. QT延长综合征HERG基因新突变位点E505D的功能检测. *中华心血管病杂志* 2004;32:733-735
- Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, Woerner BM, Khan KN, Masferrer J, Koki AT. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000;89:2637-2645
- Eder C. Ion channels in microglia (brain macrophages). *Am J Physiol* 1998;275(2 Pt 1):C327-342
- Schafer R, Wulfsen I, Behrens S, Weinsberg F, Bauer CK, Schwarz JR. The erg-like potassium current in rat lactotrophs. *J Physiol* 1999;518(Pt 2):401-416
- Kim I, Boyle KM, Carroll JL. Postnatal development of E4031-sensitive potassium current in rat carotid chemoreceptor cells. *J Appl Physiol* 2005;98:1469-1477
- 陈文彬, 杜国清, 程德云. HERG基因在低氧性肺动脉高压大鼠肺小动脉平滑肌中的表达. *中华内科杂志* 1999;38:193
- Rosati B, Marchetti P, Crociani O, Lecchi M, Lupi R, Arcangeli A, Olivetto M, Wanke E. Glucose- and arginine-induced insulin secretion by human pancreatic beta-cells: the role of HERG K(+) channels in firing and release. *FASEB J* 2000;14:2601-2610
- Ohya S, Horowitz B, Greenwood IA. Functional and molecular identification of ERG channels in murine portal vein myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C866-877
- Akbarali HI, Thatte H, He XD, Giles WR, Goyal RK. Role of HERG-like K(+) currents in opossum esophageal circular smooth muscle. *Am J Physiol* 1999;277(6 Pt 1):C1284-1290
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 1998;280:69-77
- Tseng GN. I (Kr): the hERG channel. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:835-849
- Masumiya H, Saito M, Ito M, Matsuda T, Noguchi K, Iida-Tanaka N, Tanaka H, Shigenobu K. Lack of action potential-prolonging effect of terfenadine on rabbit myocardial tissue preparations. *Biol Pharm Bull* 2004;27:131-135
- Wang J, Della Penna K, Wang H, Karczewski J, Connolly TM, Koblan KS, Bennett PB, Salata JJ. Functional and pharmacological properties of canine ERG potassium channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H256-267
- Sugiyama A, Satoh Y, Takahara A, Ando K, Wang K, Honsho S, Nakamura Y, Hashimoto K. Electropharmacological effects of a spironolactone derivative, potassium canrenoate, assessed in the halothane-anesthetized canine model. *J Pharmacol Sci* 2004;96:436-443
- Choi SY, Koh YS, Jo SH. Inhibition of human ether-a-go-go-related gene K⁺ channel and IKr of guinea pig cardiomyocytes by antipsychotic drug trifluoperazine. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313:888-895

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

白术对肝硬化大鼠胃动力和氮能神经分布的影响及意义

朱金照, 许其增, 张志坚, 乐桥良

朱金照, 许其增, 张志坚, 乐桥良, 中国人民解放军南京军区福州总医院消化内科 福建省福州市 350025

朱金照, 男, 1964-01-28 生, 江西省莲花县人, 汉族, 2000 年第三军医大学医学硕士, 主要从事胃肠动力疾病及中药促胃肠动力作用的研究。

通讯作者: 朱金照, 350025, 福建省福州市西环路 156 号, 中国人民解放军南京军区福州总医院消化内科中心。

电话: 0591-83727698

收稿日期: 2005-03-25 接受日期: 2005-04-20

Effects of *Atractylodes macrocephalae* on gastric emptying and nitrergic nerves in rats with hepatic cirrhosis

Jin-Zhao Zhu, Qi-Zeng Xu, Zhi-Jian Zhang, Qiao-Liang Le

Jin-Zhao Zhu, Zhi-Jian Zhang, Qi-Zeng Xu, Qiao-Liang Le, Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Jin-Zhao Zhu, Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, 156 Xihuan North Road, Fuzhou 350025, Fujian Province, China.

Received: 2005-03-25 Accepted: 2005-04-20

Abstract

AIM: To observe the effects of *atractylodes macrocephalae* (AM) on gastric motility and nitrergic neural system in rats with hepatic cirrhosis.

METHODS: Twenty-four Wister rats were randomly divided into control group, cirrhosis model group and AM treatment group. Dextran blue-2000 was used as an internal marker to assay the gastric emptying of the rats. The nitrergic nerves in the myenteric plexuses of gastric fundus, body and antrum were observed with NADPH-d histochemical staining.

RESULTS: Compared with those in control group, the gastric emptyings of rats were markedly delayed in model group (160.23 ± 45.13 vs 100 ± 17.78 , $P < 0.01$), and the distributions and densities of myenteric nitrergic nerves in the gastric body and antrum were significantly increased (7.35 ± 0.95 vs 5.52 ± 0.92 , $P < 0.01$; 6.26 ± 0.79 vs 5.28 ± 0.78 , $P < 0.05$). No significant changes were found in the fundus. After treatment with AM, the gastric motility of rats was markedly improved and the nitrergic nerves in antrum were significantly recovered. No significant differences were observed between the rats of AM and control group (96.12 ± 16.25 vs 100 ± 17.78 , 5.39 ± 0.84 vs 5.28 ± 0.78 , both $P > 0.05$).

CONCLUSION: *Atractylodes macrocephalae* can improve the gastric motility and the mechanism may be related to its effect on the distributions of nitrergic nerves in the gastric body and antrum of rats with hepatic cirrhosis.

Key Words: *Atractylodes macrocephalae*; Gastric motility; Nitrergic nerves; Hepatic cirrhosis; Rats

Zhu JZ, Xu QZ, Zhang ZJ, Le QL. Effects of *Atractylodes macrocephalae* on gastric emptying and nitrergic nerves in rats with hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(15):1846-1848

摘要

目的: 观察中药白术对肝硬化大鼠胃动力及胃肌间神经丛氮能神经的影响。

方法: Wister 大鼠 24 只随机分为肝硬化模型组, 白术治疗组 and 对照组, 采用葡聚糖蓝-2000 为胃肠内标记物观察大鼠胃动力变化, NADPH-d 组织化学染色及肌间神经丛全层铺片技术, 观察肝硬化大鼠胃底、胃体及胃窦肌间神经丛氮能神经的变化, 并对其分布进行定量分析。

结果: 与对照组比较, 肝硬化组大鼠胃动力明显减弱 (160.23 ± 45.13 vs 100 ± 17.78 , $P < 0.01$), 胃体、胃窦肌间神经丛氮能阳性神经排列紊乱, 染色增强, 密度增加, 明显高于对照组 (7.35 ± 0.95 vs 5.52 ± 0.92 , $P < 0.01$ 或 6.26 ± 0.79 vs 5.28 ± 0.78 , $P < 0.05$), 胃底肌间神经丛氮能阳性神经元数量及分布无明显变化; 中药治疗组肝硬化大鼠胃动力明显改善 (100 ± 17.78 vs 96.12 ± 16.25), 胃窦肌间神经丛氮能阳性神经明显恢复 (5.39 ± 0.84 vs 5.28 ± 0.78), 与对照组比较均无明显变化 ($P > 0.05$)。

结论: 中药白术对肝硬化大鼠胃动力减退有治疗作用, 其机制与改善胃窦肌间神经丛氮能神经分布有关。

关键词: 白术; 胃动力; 氮能神经; 肝硬化; 大鼠

朱金照, 许其增, 张志坚, 乐桥良. 白术对肝硬化大鼠胃动力和氮能神经分布的影响及意义. *世界华人消化杂志* 2005;13(15):1846-1848
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1846.asp>

0 引言

肝硬化患者存在明显的胃肠动力异常^[1-5]. 近年研究发现中药对胃肠动力有重要的调节作用^[6-12]. 但是否对肝

硬化胃肠动力障碍有治疗作用还不明确. 我们通过建立肝硬化大鼠模型, 观察中药白术对肝硬化大鼠胃排空和胃肌间神经丛氮能神经的影响, 为临床治疗肝硬化胃肠动力障碍提供一定的依据.

1 材料和方法

1.1 材料 白术水提取液制备白术由福州总医院中药房提供, 产地浙江, 冬季收集, 先用5-7倍的蒸馏水浸泡60 min, 然后用玻璃杯恒温电炉上煮30 min, 煎液过滤, 制成250 g/L, 4℃备用. 清洁级Wister大鼠24只(上海实验动物中心提供), 雌雄不限, 质量200-250 g, 随机分为3组: 正常对照组, 肝硬化模型组(下称模型组)和中药治疗组各8只. 模型组大鼠给予500 mL/L CCl_4 溶剂大腿根部SC, 5 mL/kg, 2次/wk, 并根据质量变化调整剂量, 共12 wk. 中药治疗组在造模9 wk, 给予灌服250 g/L白术水提取液10 mL/kg, 1次/d, 共4 wk. 模型组及中药治疗组同时给予含300 g/L, 食用猪油、5 g/L肌固醇的饲料, 自由饮水.

1.2 方法 造模成功后, 大鼠处死开腹取胃, 沿大弯侧剪开, 将胃内残留色素充分洗于4 mL去离子水中, 3 500 r/min离心15 min, 取上清滤液, 以721-A型分光光度计 $\lambda 620$ nm测吸光度为其胃内色素残留吸光度值, 求出与对照组均值的百分比, 即为胃内色素相对残留率, 胃内色素相对残留率越低表示胃排空速率越快^[13]. 胃底、胃体、胃窦标本入100 g/L甲醛+10 g/L氯化钙液中, 4℃过夜. 将标本先用蒸馏水漂洗5 min, 然后将标本剪成 0.5×0.5 cm大小若干入0.01 mol/L PBS液中, 用钟表镊轻轻剥离出纵肌层, 用0.02 mol/L多聚甲醛磷酸缓冲液(pH7.2-7.6)洗片2次, 在含NADPH(0.1 g/L, Sigma公司)、NBT(0.2 g/L, Sigma公司)和30 g/L Triton X-100的0.02 mol/L PBS(pH 7.4-7.6)工作液中孵育20 min, 用PBS液漂洗中止反应. 裱片, 脱水, 透明, 封片. 采用MAS-5图像分析系统. 选取同一染色条件下组化片, 每张切片于200倍光镜下选取5个视野, 观察肌间神经丛中阳性神经元的染色及分布情况, 将图像扫描入计算机, 设定基

础统计面积, 调定灰度值. 滤去非阳性部分, 得到阳性表达面积, 通过计算机分析即可得到阳性表达的密度.

统计学处理 数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示. 组间差异采用 t 检验.

2 结果

与对照组比较, 肝硬化模型组, 大鼠胃内色素相对残留率明显增加, 表明肝硬化大鼠胃排空显著减弱(160.23 ± 45.13 vs 100 ± 17.78 , $P < 0.01$). 组化染色显示NOS阳性产物为蓝色沉淀. 肌间神经丛主要由神经节、节间束及一些含膨体的阳性神经纤维纵横交织呈网状分布, 神经节多呈梭形, 大小不等, 节间束与纵肌平行, 其中有含膨体的阳性纤维. 高倍镜下, 阳性神经形态、大小不等, 胞质呈蓝色, 核不着色, 胞体形态多样, 有卵圆形、三角形及不规则形. 与对照组比较, 肝硬化组肌间NOS阳性神经丛排列较粗乱, 神经元数量增加, 染色深, 以胃窦、胃体肌间神经丛明显(图1-2, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 中药白术治疗组肌间NOS阳性神经丛排列较规律, 胃窦神经元数量较肝硬化模型组减少, 染色较浅, 与对照组无明显差异($P > 0.05$, 表1).

表1 胃肌间神经丛NOS密度($\text{mean} \pm \text{SD} \%$, $n = 8$)

组别	胃底	胃体	胃窦
对照组	4.4 ± 0.7	5.5 ± 0.9	5.3 ± 0.8
模型组	4.7 ± 0.8	7.4 ± 0.9^b	6.3 ± 0.8^a
白术治疗组	4.5 ± 0.7	6.9 ± 0.9^b	5.4 ± 0.8

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

3 讨论

肝硬化是临床上常见的慢性肝病, 患者常出现食欲减退、嗝气、腹胀等胃肠功能障碍症状, 严重影响患者的生存质量. 本实验证实肝硬化大鼠胃排空明显延迟, 经中药白术治疗后, 大鼠胃排空显著好转, 但中药白术改善肝硬化大鼠胃动力的机制尚不明确. 研究发现NO作为氮能神经系统的神经递质, 在肝硬化的

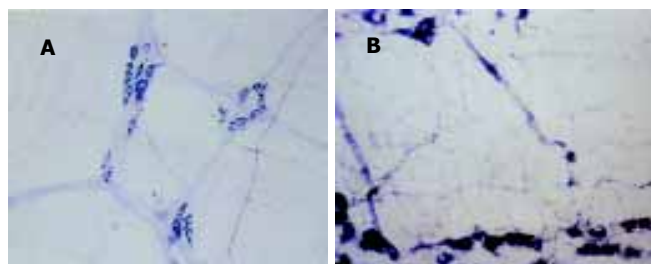


图1 大鼠胃窦肌间神经丛NOS阳性神经铺片染色(组化 $\times 200$). A: 对照组; B: 模型组.

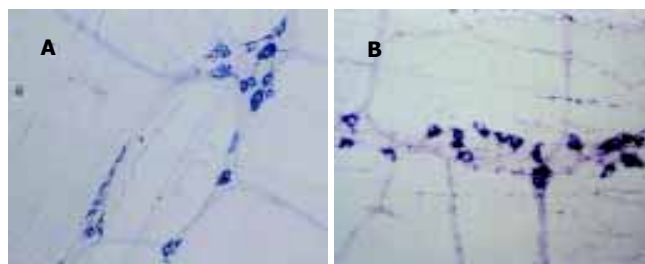


图2 大鼠胃体肌间神经丛NOS阳性神经铺片染色(组化 $\times 200$). A: 对照组; B: 模型组.

病理生理及胃肠功能调节中起非常重要的作用^[14-23]. NOS 是 NO 合成的关键酶, 现已证实 NOS 神经元广泛分布于人和动物的整个胃肠道^[24-27]. 根据 NOS 的生物学特性, 可将 NOS 分为两类三型同工酶, I 型(NOS I)和III型(NOS III)属原生型 NOS (cNOS), II 型(NOS II)属诱生型 NOS (iNOS). 一般在生理状态下 cNOS 即表现出一定的活性, 保持 NO 的基础释放量, 起神经递质和第二信使的作用, iNOS 仅在内毒素及细胞因子等刺激下才显示一定活性, 催化产生的 NO 具有细胞毒作用, 参与免疫反应. NADPH 黄递酶作为 NOS 组织化学标记物已被广泛应用于 NOS 的定位研究, 我们探索应用胃肌间神经丛全层铺片 NADPH 组化染色技术, 结果表明能清晰的显示 NOS 神经元及神经的分布情况. 正常对照组大鼠胃 NOS 阳性神经纤维呈蓝色网状, 神经节内有圆形或卵圆形的 NOS 神经元, 胞质呈蓝色. 肝硬化大鼠胃底、胃体、胃窦肌间神经丛 NOS 阳性神经排列均较紊乱, 胃体、胃窦 NOS 神经变粗, 神经元数量增加, 染色深, 胃底 NOS 神经元数量及染色无明显变化, 计算机定量分析显示胃体、胃窦 NOS 阳性神经含量明显高于对照组. 中药白术治疗后, 全胃肌间神经丛 NOS 阳性神经排列较规律, 与肝硬化模型鼠比较, 胃窦 NOS 神经元染色变浅. 定量分析表明与对照组无明显差异.

总之, 肝硬化大鼠胃动力明显减退, 胃体、胃窦肌间神经丛氮能阳性神经明显增加, 胃底肌间神经丛氮能阳性神经分布无明显变化, 中药白术对肝硬化大鼠胃动力减退有调节作用, 其机制可能减少胃窦肌间神经丛氮能阳性神经的分布有关.

4 参考文献

- 张宗友, 王新, 徐海峰, 穆继珍, 马玉波, 苗继延, 郭学刚, 樊代明. 肝硬化大鼠胃肠动力的变化. 第四军医大学学报 2001;22:898-890
- 唐晓丹, 范红, 万平, 王芸. 肝硬化患者胃动力多因素相关性研究. 中华肝脏病杂志 2004;12:141-143
- 张爱国, 王哲, 尹玉芬. 肝硬化患者空腹胃动力障碍的临床研究. 白求恩医科大学学报 2001;27:262-264
- Song HL, Zhu YH, Liu GM. A Study on the relationship between gastric motility and plasma motilin in the patients with hepatocirrhosis. *J Postgrad Med* 2001;24:14-15
- 张蓉, 闻勤生, 黄裕新, 赵海峰, 田力. 肝硬化患者血浆胃动素、胆囊收缩素、生长抑素及其胃电的改变. 世界华人消化杂志 2003;11:1230-1233
- 朱金照, 郑伟, 冷恩仁, 陈东风. 大鼠皮对大鼠胃肠道 AChE 及 NOS I 阳性神经分布的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:101-103
- 朱金照, 张捷, 许其增, 张志坚, 冷恩仁. 中药大鼠皮抑制大鼠肠道内毒素移位中 iNOS、SP 的作用. 世界华人消化杂志 2002;7:659-662
- 朱金照. 促胃肠动力药物的研究现状. 世界华人消化杂志 2001;9:1439-1444
- 王贺玲, 李岩, 白蕊, 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
- 齐清会, 王简, 田建峰, 江力, 吴咸中. 大承气汤和针刺治疗胃肠运动障碍疾病的研究. 世界华人消化杂志 2004;12:129-132
- Wang XQ, Wang XJ, Li Y. Effect of xiang sha ping wei san on gastric emptying motility in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:571-574
- Li Y, Wang XQ, Zhang WW, Wang JY. Effect of zhu xiang power on gastric and intestinal motility in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:575-577
- Zhu JZ, Leng ER, Chen DF, Shi HT, Gui XY. A screening study of the kinetogenic effects of 15 chinese herbal medicines on the gastrointestinal tract in rats. *Acta Academiae Militaris Tertiae* 2000;22:436-438
- Wang X, Zhong YX, Zhang ZY, Lu J, Lan M, Miao JY, Guo XG, Shi YQ, Zhao YQ, Ding J, Wu KC, Pan BR, Fan DM. Effect of L-NAME on nitric oxide and gastrointestinal motility alterations in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:328-332
- Yao DM, Yao XX, Yang CJ, Feng ZJ, Fang HM, Gao JP. Effect s of ET-1 and NO on hepatic hemodynamics at various stages of isolated perfused cirrhotic liver in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:726-729
- Wang Y, Zhou Z, Wang XQ. Study of NO and CGRP in plasma in cirrhotic patients. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:358-359
- Ramachandran A, Prabhu R, Thomas S, Reddy JB, Pulimood A, Balasubramanian KA. Intestinal mucosal alterations in experimental cirrhosis in the rat: role of oxygen free radicals. *Hepatology* 2002;35:622-629
- Madrid AM, Hurtado C, Venegas M, Cumsille F, Defilippi C. Long-term treatment with cisapride and antibiotics in liver cirrhosis: effect on small intestinal motility, bacterial overgrowth, and liver function. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1251-1255
- Kato S, Suzuki K, Ukawa H, Komoike Y, Takeuchi K. Low gastric toxicity of nitric oxide-releasing aspirin, NCX-4016, in rats with cirrhosis and arthritis. *Dig Dis Sci* 2001;46:1690-1699
- Wang ZQ, Watanabe Y, Toki A, Kohno S, Hasegawa S, Hamazaki M. Involvement of endogenous nitric oxide and c-kit expressing cells in chronic intestinal pseudo-obstruction. *J Pediatr Surg* 2000;35:539-544
- Wang YM, Feng GH. Relation of NO and liver regeneration in rats with experimental liver failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:109-110
- Li WJ, Sun JY, Wang XM, Zhang SS, Yang SC. Changes of NO and ET in patients cirrhosis with hepatorenalsyndrom. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:484-485
- Zhang ZP, Zhang ZJ, Zhang J, Wang W, Lin KR, Zhu JZ. Changes of intestinal cholinergic and nitrergic nerves in rats with cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12:1459-1461
- Peng X, Feng JB, Wang SL. Distribution of nitric oxide synthase in stomach wall in rats. *World J Gastroenterol* 1999;5:92
- Shao RX, Wang JB, Guo JH. The plasma level of and the expression of inducible nitric oxide synthase in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 6):61
- Kohjitani A, Miyawaki T, Funahashi M, Mitoh Y, Matsuo R, Shimada M. Mexiletine inhibits nonadrenergic noncholinergic lower oesophageal sphincter relaxation in rabbits. *Eur J Pharmacol* 2003;28:145
- Porter AJ, Wattchow DA, Brookes SJ, Costa M. Cholinergic and nitrergic interneurons in the myenteric plexus of the human colon. *Gut* 2002;51:70

小鼠胚胎干细胞体外分步诱导为肝细胞的实验研究

江海洪, 向德栋, 刘国栋, 王宇明

江海洪, 向德栋, 刘国栋, 王宇明, 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
江海洪, 男, 1969-03-16 生, 重庆市人, 汉族, 2000 年第三军医大学硕士, 讲师, 在读博士研究生, 主要从事生物人工肝细胞材料的研究。
通讯作者: 江海洪, 400038, 重庆市, 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。 jhh316@hotmail.com
电话: 023-68754475-8017 传真: 023-65461319
收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-13

Differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes *in vitro*

Hai-Hong Jiang, De-Dong Xiang, Guo-Dong Liu, Yu-Ming Wang

Hai-Hong Jiang, De-Dong Xiang, Guo-Dong Liu, Yu-Ming Wang, Chinese PLA Institute of Infectious Disease, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Correspondence to: Hai-Hong Jiang, Chinese PLA Institute of Infectious Disease, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. jhh316@hotmail.com
Received: 2005-05-23 Accepted: 2005-06-13

Abstract

AIM: To explore a method for the differentiation of embryonic stem (ES) cells into hepatocytes *in vitro*.

METHODS: ES cells were cultured on the feeder layer of mouse embryonic fibroblasts (MEF) in the medium containing leukemia inhibitory factor (LIF). The inductive factors, such as acid-fibroblast growth factor (acid-FGF), HGF, oncostatin M (OSM), Dex and ITS mixture (5 g/L insulin, 5 g/L transferrin, 5 mg/L selenic acid), were added at day 9, 12, 12, 15 of induction. The activity of alkaline phosphatase (ALP) was detected by cytochemical method and visualized by NBT/BCIP. Albumin (ALB) and CK18 were examined by immunohistochemistry and DAB staining.

RESULTS: ALP was positive in the undifferentiated ES cells. Four days after induction, embryonic bodies came into formation. After the inductive factors were added, ES cells were differentiated into single morphological cells like epithelium. ALB and CK18 were positive in some differentiated cells.

CONCLUSION: Embryonic stem cells can be selectively differentiated into hepatocytes *in vitro*.

Key Words: Embryonic stem cell; Hepatocyte; Differentiation

Jiang HH, Xiang DD, Liu GD, Wang YM. Differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(15):1849-1851

摘要

目的: 探索小鼠胚胎干细胞(ES)体外分步诱导为肝细胞的培养方法。

方法: 在小鼠胚胎成纤维细胞MEF饲养层上培养ES细胞, 培养液中含白血病抑制因子(LIF), 然后分阶段加入含 acid-FGF、肝细胞生长因子(HGF)、致瘤素(OSM)、胰岛素、微量硒酸等诱导因子。采用免疫组化方法检测白蛋白(Albumin)、细胞角蛋白CK18, 用硝基四氮唑蓝/5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸(NBT/BCIP)显色检测碱性磷酸酶(ALP)。

结果: ES细胞克隆ALP染色阳性, 未分化。培养4 d后, 形成拟胚体。在分步加入诱导因子24 d后, ES细胞分化出的细胞形态比较单一, 类似上皮样细胞。诱导分化的细胞可见白蛋白、CK18阳性细胞。

结论: 分步诱导培养有利于ES细胞向肝细胞分化。

关键词: 胚胎干细胞; 肝细胞; 细胞分化

江海洪, 向德栋, 刘国栋, 王宇明. 小鼠胚胎干细胞体外分步诱导为肝细胞的实验研究. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1849-1851
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1849.asp>

0 引言

胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ES cells)是从小鼠的胚胎内细胞团(inner cell mass, ICM)或桑葚胚中分离并建立起来的具有自我更新、高度增殖和多向分化潜能的细胞。在特定的体外培养条件下, ES细胞能分化成心肌、造血细胞、神经细胞以及肝细胞、胆管细胞等各种类型的细胞^[1-3]。随着人ES细胞系的建立^[4], 在体外大量生产人肝细胞有可能成为肝细胞移植、生物人工肝等肝细胞材料的新来源。目前所报道的诱导胚胎干细胞为肝细胞主要有3条途径: 细胞因子干预、细胞共培养和转基因。我们采用以小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)作为饲养层, 观察ES细胞生长情况, 并用细胞因子分步干预法诱导ES细胞分化为肝细胞, 探讨诱导ES细胞为肝细胞的可行性并探索其诱导条件, 为肝病的临床治疗及其研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 小鼠ES细胞株MESPU13由闵峰博士提供。DMEM, DMEM/F12, 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)均购自Hyclone公司, 重组人白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)为PeproTech产品. 胰岛素, 转铁蛋白, 硒化钠, 胶原蛋白I型, β -巯基乙醇, 胰蛋白酶, 丝裂霉素C均购自Sigma. 白蛋白抗体, CK18抗体购自PharMingen公司, 二抗和三抗、褐色DAB显色试剂盒以及硝基四氮唑蓝(NBT)、5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸(BCIP)购自武汉博士德, 其余试剂均为国产分析纯试剂.

1.2 方法 小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)在含FCS 100 mL/L的DMEM培养液中培养, 细胞铺满培养瓶底壁后用含10 mg/L丝裂霉素C的培养液处理1 h, PBS洗5次后, 用于ES细胞的培养. ES细胞在MEF饲养层上培养, 培养液成分为DMEM, 含150 mL/L FCS的LIF(1×10^6 IU/L), β -巯基乙醇(100 μ mol/L). 培养时每天更换培养液, 2-3 d传代1次. 碱性磷酸酶(ALP)染色是将盖玻片置于培养板的底壁, 待MEF和ES细胞长好后取出. 40 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS漂洗5 min \times 3, TSM1、TSM2中各漂洗5 min \times 2, (TSM1: 0.1 mol/L NaCl, 0.1 mol/L Tris, 10 mmol/L $MgCl_2$, 0.1 mmol/L HCl调pH到8.0; TSM2: 0.1 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L Tris, 50 mmol/L $MgCl_2$, 0.1 mol/L HCl调pH到9.5), 用NBT/BCIP显色(NBT 45 μ L, BCIP 35 μ L, TSM2 1 mL), 室温避光显色10-15 min. 胚胎干细胞向肝细胞诱导的具体方法如下, 不用MEF饲养层和LIF, ES细胞在含100 μ mol/L β -巯基乙醇、150 mL/L FCS的DMEM中利用细菌培养皿悬滴方法悬浮培养2 d. 在每一液滴中细胞形成聚集物, 并形成一个拟胚体EBs (embryonoid bodies, EBs). 用递质5 mL小心冲洗细菌培养盖, 然后转移到60 mm细菌培养皿中, 并加入分化递质5 mL. 持续悬浮培养3 d. 将单个的EBs转移到1 g/L胶原蛋白I型包被的微孔板中进行形态学分析, 或转移5-10个EBs到直径为60 mm细菌培养皿作免疫组化实验. 在诱导递质中按照以下不同时

间加入肝细胞诱导分化的启动因子和成熟因子, 以ES细胞悬浮培养开始时为第1 d: 作为早期诱导因子的Acidic FGF(10 μ g/L)在第9 d加入, 作为中期因子HGF(2×10^{-5} g/L)在第12 d加入, 作为晚期因子OSM(1×10^{-5} g/L)、Dex(10^{-7} mol/L)、ITS混合物(5 g/L胰岛素, 5 g/L转铁蛋白、5 mg/L硒酸)在第15 d加入. 诱导递质用含150 mL/L FCS的DMEM低糖, 每天换液1次. 用40 g/L多聚甲醛固定细胞30 min, 2 mL/L Triton X-100处理10 min, 正常小鼠血清封闭10 min, 用3 mL/L H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶10 min, 加入白蛋白、CK18一抗(1:100), 然后4 $^{\circ}$ C过夜. 用PBS漂洗后, 其余步骤按传统ABC方法操作.

2 结果

小鼠ES细胞在含LIF的DMEM高糖培养基中形成细胞克隆. 细胞表面的ALP是ES细胞未分化特性的标志, ALP染色阳性, 表明ES细胞处于未分化状态(图1A). ES细胞在含 β -巯基乙醇(100 μ mol/L)的DMEM低糖、150 mL/L FCS中悬浮培养4 d后, 形成拟胚体EBs(图1B); ES细胞在分步加入诱导因子24 d后, ES细胞分化出的细胞形态比较单一, 类似上皮样细胞(图2A). 诱导培养递质中按不同的时间分步加入HGF、acid-FGF等细胞因子干预后, 部分分化细胞白蛋白、CK18表达阳性. 本实验中不加一抗的对照完全不着色(图2B、2C).

3 讨论

有关ES细胞的研究是目前生物领域研究的热点, 将ES细胞诱导为神经细胞、心肌细胞和血细胞的研究较多, 但将ES细胞诱导为内胚层细胞如胰岛细胞、肝细胞等文献报道较少. 我们根据肝发育的过程拟定的诱导培养条件. 肝发育的第一个形态学标志是在小鼠性交后8.5 d, 山前肠内胚层的腹侧底部增厚形成, 即所谓的肝憩室; 然后肝憩室迁移到横膈而形成肝脏的雏形. 在早期未分化的前肠内胚层, 转录因子Gata-4和Hnf-3 β 能结合到肝脏特定的白蛋白增强了

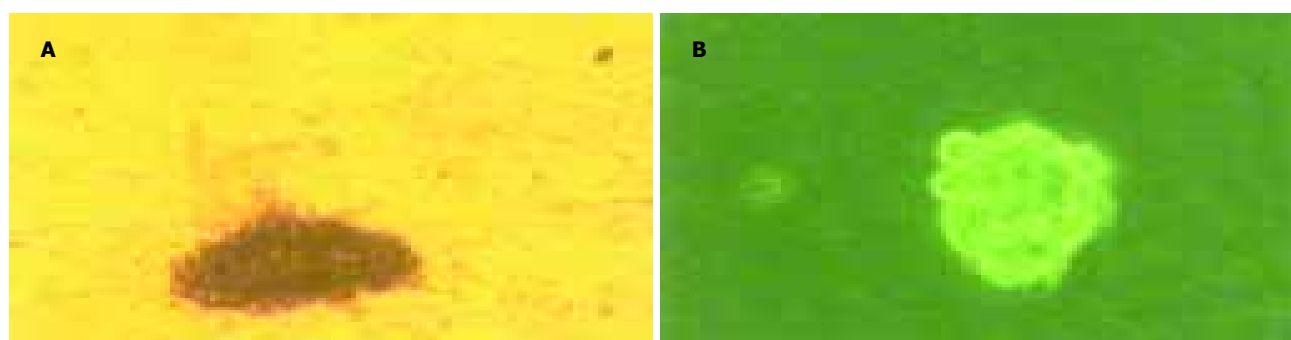


图1 小鼠ES细胞克隆ALP染色、EBs形成. A: ES细胞克隆ALP染色; B: 4 d形成的拟胚体(EBs).



图2 拟胚体EBs贴壁分化24 d的形态及组化染色. A: ES细胞分化出较多的上皮样细胞; B: 白蛋白染色阳性; C: CK18 染色阳性.

部位^[5], 从而开始诱导肝脏特定基因的表达. 随后, 来源于临近中胚层心脏FGFs, 诱导前肠内胚层定向形成原始的肝胚, 组织移植研究也已显示从心脏中胚层来源的细胞信号能诱导内胚层向肝脏分化^[6]. 国内丛笑倩 *et al* 采用ES与鼠胎肝细胞共培养, 将小鼠胚胎干细胞成功诱导为肝细胞, 并且有肝细胞特异性标志物表达, 国外Jung *et al*^[7]应用组织外植体系证实了FGF1和FGF2能替代心脏中胚层的诱导效应. 因此, 在向肝细胞分化中, FGFs可能是向肝细胞诱导的重要启动因子. 在E8.5以后的2 d, 肝脏的胚芽增殖并迁移到周围由含有胶原质的疏松结缔组织构成的横膈膜. 肝脏的前体直接和结缔组织基质接触, 并且其周围环绕的实质细胞能分泌HGF并支持胎肝细胞的生长; 在HGF遗传缺陷小鼠, 会导致胚胎肝脏在容量上缩小, 并显示实质细胞的广泛丢失. 现已研究表明, HGF的不同生物效应是通过激活酪氨酸激酶受体c-Met蛋白来介导的. 当HGF结合到c-Met受体, 在c-Met的C-末端区域的两个酪氨酸残基磷酸化, 然后各种结合蛋白和信号转导分子如Grb2/Sos/Ras、细胞外信号调节激酶(ERK)、p38、MAPK、P70s6k和AKT等被激活, 从而产生生物效应. 近来, 磷酸肌醇-3-羟基激酶(PI3K)/AKT信号转导途径已经应用到各种HGF依赖系统的生物效应, 包括犬肾细胞的迁移、主要肝细胞中的抗凋亡保护和胰腺细胞的增殖等方面^[8]. 在临床上, 从治疗的观点来考虑, 主要应发展一种HGF转移到严重肝损伤患者的再生肝脏中来增强肝细胞活力. 在E12到E16期间, 胎肝是造血的主要场所. 造血细胞能产生OSM, 并与ITS(转铁蛋白、胰岛素与硒酸)一同诱导小鼠胎肝细胞的成熟.

目前, 虽然有关内胚层肝脏发育特别是肝细胞成熟过程中的分子作用机制仍未完全阐明, 但ES细胞向肝细胞诱导应该有FGFs、HGF、OSM和ITS等得到了广泛的学者支持^[9]. 我们根据肝脏的发育生物学特点, 在培养液中分步加入上述物质, 探索了ES诱导分化为肝细胞的体外培养条件. 白蛋白主要由肝细胞合成, 并

且被普遍认为是肝细胞的标志, CK18主要存在于肝细胞、胆管上皮细胞以及卵圆细胞等. 我们检测了白蛋白、CK18, 且均为阳性, 因而认为分化细胞中有肝细胞的存在, 表明我们使用的ES诱导递质和分步诱导方法, 具有诱导ES细胞向肝细胞分化的潜能. 并且诱导分化的肝细胞样细胞, 既具有增殖分化潜能, 又没有ES细胞生成畸胎瘤的危险(移植部分的实验资料待发表), 故是较好的肝细胞移植材料, 其将可为肝细胞移植、生物人工肝等提供新的细胞来源.

4 参考文献

- 1 Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, Tsunoda Y. *In Vitro* differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells* 2002;20:146-154
- 2 Tabei I, Hashimoto H, Ishiwata I, Tachibana T, Akahori M, Ohi S, Kubo H, Satou K, Yamazaki Y, Yanaga K, Ishikawa H. Characteristics of hepatocytes derived from early ES cells and treatment of surgically induced liver failure rats by transplantation. *Transplant Proc* 2005;37:262-264
- 3 Kumashiro Y, Asahina K, Ozeki R, Shimizu-Saito K, Tanaka Y, Kida Y, Inoue K, Kaneko M, Sato T, Teramoto K, Arii S, Teraoka H. Enrichment of hepatocytes differentiated from mouse embryonic stem cells as a transplantable source. *Transplantation* 2005;79:550-557
- 4 Carpenter MK, Rosler E, Rao MS. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 2003;5:79-88
- 5 Kanda S, Shiroy A, Ouji Y, Birumachi J, Ueda S, Fukui H, Tatsumi K, Ishizaka S, Takahashi Y, Yoshikawa M. In vitro differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells promoted by gene transfer of hepatocyte nuclear factor 3 beta. *Hepato Res* 2003;26:225-231
- 6 Fair JH, Cairns BA, Lapaglia M, Wang J, Meyer AA, Kim H, Hatada S, Smithies O, Pevny L. Induction of hepatic differentiation in embryonic stem cells by co-culture with embryonic cardiac mesoderm. *Surgery* 2003;134:189-196
- 7 Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999;18:1998-2003
- 8 Okano J, Shiota G, Matsumoto K, Yasui S, Kurimasa A, Hisatome I, Steinberg P, Murawaki Y. Hepatocyte growth factor exerts a proliferative effect on oval cells through the PI3K/AKT signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;309:298-304
- 9 Jones EA, Tosh D, Wilson DI, Lindsay S, Forrester LM. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 2002;272:15-22

大龄大鼠空肠平滑肌对异丙肾上腺素反应下降的机制

李 敏, 李祖贵, 朱晓博, 冯秀玲, 胡还忠

李敏, 李祖贵, 朱晓博, 胡还忠, 华中科技大学同济医学院生理系
湖北省武汉市 430030
冯秀玲, 华中科技大学同济医学院机能学中心实验室
湖北省武汉市 430030
李敏, 男, 1983-06-07 生, 江苏溧阳人, 华中科技大学同济医学院硕士在读
生, 主要从事消化生理学的研究。
通讯作者: 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: 2005-04-20 接受日期: 2005-05-14

Mechanism of decreased response of jejunal smooth muscle to isoproterenol in aged rats

Min Li, Zu-Gui Li, Xiao-Bo Zhu, Xiu-Ling Feng, Huan-Zhong Hu

Min Li, Zu-Gui Li, Xiao-Bo Zhu, Huan-Zhong Hu, Department of Physiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Xiu-Ling Feng, Central Laboratory of Functional Medicine, 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: 2005-04-20 Accepted: 2005-05-14

Abstract

AIM: To investigate the response of jejunal smooth muscles (JSMs) to nonselective β -adrenoceptor agonist (Isoproterenol, Iso) in rats with different ages and its possible mechanism.

METHODS: The nonselective β -adrenoceptor agonist Iso and nonselective nitric oxide synthase (NOS) inhibitor N^o-nitro-L-arginine (L-NNA) were perfused into the baths of rat JSMs. Muscle force transducer (MFT) was used to measure the tension of JSMs.

RESULTS: The contractive frequency of JSMs was markedly lower in 20-month rats than that in 3-month rats (27.0 ± 2.5 vs 30 ± 3.1 , $P < 0.05$). After perfusion with Iso (Final concentration: 1×10^{-9} - 1×10^{-6} mol/L), the variation rates of contractive amplitude of JSMs in 20-month rats were lower than those in 3-month rats (3×10^{-8} mol/L: -41.4%, $P < 0.05$; 1×10^{-7} mol/L: -34.6%, $P < 0.05$; 3×10^{-7} mol/L: -25.0%, $P < 0.05$; 1×10^{-6} mol/L: -19.5%, $P < 0.05$). After the administration of L-NNA, the relaxation responses of JSMs decreased in 3-month rats, while there was no obvious variation in 20-month rats. Before the adminis-

tration of L-NNA, the pD₂ of β -adrenoceptor decreased in 20-month rats as compared with that in 3-month rats (6.52 ± 0.54 vs 6.98 ± 0.30 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: The response of JSMs to Iso in aged rats decreases, and the mechanism may be related to the decreased effect of NOS or nitric oxide.

Key Words: Jejunal smooth muscle; β -adrenoceptor; Soproterenol; Nitric oxide

Li M, Li ZG, Zhu XB, Feng XL, Hu HZ. Mechanism of decreased response of jejunal smooth muscle to isoproterenol in aged rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(15):1852-1855

摘要

目的: 观察不同月龄大鼠空肠平滑肌对 β 受体激动剂异丙肾上腺素(Iso)反应性的变化, 初步探讨其变化的机制。

方法: 采用灌流法加药, 利用张力换能器记录离体空肠平滑肌张力的变化。

结果: 20月龄组大鼠空肠平滑肌收缩频率都低于3月龄组(27.0 ± 2.5 vs 30 ± 3.1 , $P < 0.05$);灌流 10^{-9} - 10^{-6} mol/L 终浓度的 Iso 后, 20月龄组大鼠空肠平滑肌收缩幅度变化的百分率(即舒张反应)都低于3月龄组(3×10^{-8} , -41.4%, $P < 0.05$; 1×10^{-7} , -34.6%, $P < 0.05$; 3×10^{-7} , -25.0%, $P < 0.05$; 1×10^{-6} , -19.5%, $P < 0.05$);加 N^o-nitro-L-arginine(L-NNA)后, 3月龄组对 Iso 的舒张反应降低, 而 20月龄组对 Iso 的舒张反应未见明显变化;抑制 NOS 前, 20月龄组 Iso 的 pD₂ 值比 3月龄组的 pD₂ 值小(6.52 ± 0.54 vs 6.98 ± 0.3 , $P < 0.05$)。

结论: 大龄大鼠空肠平滑肌对 Iso 的反应性下降;NOS 或一氧化氮(NO)的作用降低可能是引起大龄大鼠空肠平滑肌对 Iso 的反应性下降的重要原因之一。

关键词: 空肠平滑肌; β 受体; 异丙肾上腺素; 一氧化氮

李敏, 李祖贵, 朱晓博, 冯秀玲, 胡还忠. 大龄大鼠空肠平滑肌对异丙肾上腺素反应下降的机制. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1852-1855
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1852.asp>

0 引言

随着人口的老齡化, 老年性疾病越来越受到重视, 老年消化道疾病如吞咽困难, 便秘, 腹泻, 以及肠

易激综合征等也越来越常见. 研究发现, 随着年龄的增长, 肠神经系统(ENS)神经元的数量也明显减少^[1]. β 受体在大鼠肠道有着广泛分布, β 受体兴奋后通过 G_s 蛋白激活腺苷酸环化酶(AC), 催化ATP生成cAMP, 再通过使PKA磷酸化, 产生各种生理效应. 已有资料显示, 老年动物模型心肌、膀胱等组织中的 β 受体对异丙肾上腺素(Iso)反应性下降^[2-4]. 但对老年大鼠小肠组织中 β 受体机能活动的变化的研究尚未见报道. 我们观察了不同年龄的SD大鼠空肠平滑肌对Iso舒张反应性的变化, 以及L-NNA(非选择性NOS抑制剂)对Iso浓度-效应曲线的影响, 并初步探讨了其变化的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 Sprague-Dawley 清洁级大鼠 30 只, 山华中科技大学同济医学院实验动物中心提供. 随机分成 2 组, 20 月龄组 15 只, 最初月龄 3 mo, 用同济医学院实验动物中心提供的条形饲料喂养至月龄为 20 mo, 体重 450~550 g. 对照组 15 只, 月龄 3 mo, 体重 150~250 g, 与 20 月龄组的喂养条件相同, 适应性喂养 2 wk. 实验前禁食 18 h, 自由饮水. 异丙肾上腺素(isoproterenol, Iso) 由上海禾丰有限公司提供, N-硝基-L-精氨酸(N^G -nitro-L-arginine, L-NNA) 由 Sigma 公司提供. KCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $NaHCO_3$, NaCl, KH_2PO_4 均为国产分析纯试剂. MedlabU4CS 生物信号采集处理系统(南京美易科技有限公司), JZ100 型肌肉张力换能器(高碑店市新航机电设备有限公司), 超级恒温器(上海市实验仪器厂).

1.2 方法 大鼠击头致昏, 立即打开腹腔分离空肠, 取一段距胃幽门窦 10 cm 处的空肠, 制备成长 0.6 cm 的标本, 将离体空肠标本一端固定于肌槽底部的不锈钢丝固定钩上, 另一端通过挂钩接肌肉张力换能器, 后者与 MedlabU4CS 生物信号采集处理系统连接, 定量记录平滑肌张力的变化. 肌槽内盛 Krebs 液 (mmol/L: NaCl 118.07, KCl 4.69, $CaCl_2$ 2.52, $MgSO_4$ 1.16, NaH_2PO_4 1.01, $NaHCO_3$ 25, glucose 11.10) 10 mL, 持续通以 950 mL/L O_2 和 50 mL/L CO_2 的混合气. pH 7.4, T $37 \pm 0.5^\circ C$. 观察舒张率 = [(加

药前收缩幅度 - 加药后收缩幅度) / 加药前收缩幅度] $\times 100\%$. 收缩频率变化百分率 = [(加药前收缩频率 - 加药后收缩频率) / 加药前收缩频率] $\times 100\%$.

统计学处理 采用 Microsoft Office Excel 2003 软件进行数据统计. 实验数据以 $mean \pm SD$ 表示, 两组间数据比较采用组间 t 检验, 组内比较采用配对 t 检验, 检验水准: $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异显著.

2 结果

2.1 大鼠空肠平滑肌自主收缩幅度和频率 将平滑肌标本置于 Krebs 液中平衡 50 min, 自主收缩平稳后记录 and 比较 2 组动物空肠平滑肌的自主收缩频率波幅, 结果显示, 基础状态下的空肠平滑肌自主收缩频率 20 月龄组低于 3 月龄组, 而自主收缩波幅与 3 月龄组相比没有显著性差异(表 1, 图 1).

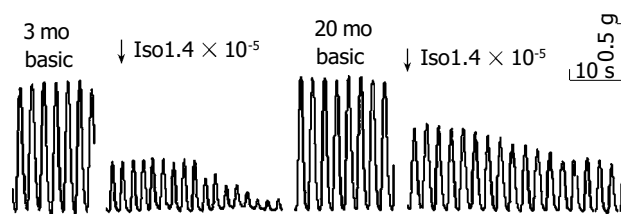


图1 Iso 10^{-7} mol/L 对大鼠空肠平滑肌自主收缩波形曲线的影响.

2.2 大鼠空肠平滑肌对 Iso 的舒张反应 按半对数摩尔浓度法, 加入累积浓度的 Iso, 使灌流槽内 Iso 终浓度依次为 3×10^{-10} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 1×10^{-8} , 3×10^{-8} , 1×10^{-7} , 3×10^{-7} 和 1×10^{-6} mol/L, 记录灌流不同浓度的 Iso 时平滑肌舒张的百分率. 与 3 月龄组相比, 终浓度高于 3×10^{-8} 时 20 月龄组空肠平滑肌对 Iso 的舒张反应在各浓度点明显降低. 浓度为 3×10^{-8} mol/L 时, 20 月龄组舒张率为 15.9%, 较 3 月龄组降低 41.4% ($P < 0.05$); 在 1×10^{-7} mol/L, 20 月龄组舒张率为 32.1%, 较 3 月龄组降低 34.6% ($P < 0.05$); 在 3×10^{-7} mol/L, 20 月龄组舒张率为 56.7%, 较 3 月龄组降低 25.0% ($P < 0.05$); 在 1×10^{-6} mol/L, 20 月龄组舒张率为 72.8%, 较 3 月龄组降低 19.5% ($P < 0.05$, 图 2). 结果表明 20 月龄组大鼠空肠平滑肌对 Iso 的舒张反应在各个浓度点均较 3 月龄组下降.

表1 Iso 对大鼠空肠平滑肌自主收缩幅度的影响($n = 9$)

分组	基础		加 Iso 后(3×10^{-7} mol/L)		变化百分率(%)	
	张力	频率(次/min)	张力	频率(次/min)	张力	频率(次/min)
3月龄组	1.2 ± 0.5	30.3 ± 3.1	0.16 ± 0.13^c	26.2 ± 3.6^c	84.80 ± 15.1	13.6 ± 10.0
20月龄组	1.3 ± 0.5	27.0 ± 2.5^a	$0.40 \pm 0.22^{a, c}$	26.4 ± 2.4	77.94 ± 15.6^a	2.5 ± 2.6^a

^a $P < 0.05$ vs 3月龄组; ^c $P < 0.05$ vs 基础.

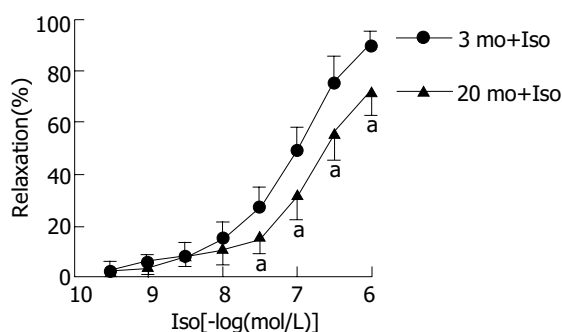


图2 大鼠空肠平滑肌对Iso的舒张反应。° $P < 0.05$ vs 3 mo+Iso.

2.3 Iso 相对 β 受体的 $pD_2(-\log EC_{50})$ 值的比较 3 月龄组 pD_2 值为 6.98 ± 0.3 , 20 月龄组为 6.52 ± 0.54 , 20 月龄组比 3 月龄组 pD_2 值下降 ($P < 0.05$).

2.4 NOS 抑制剂 L-NNA 对 Iso 引起的大鼠空肠平滑肌标本舒张反应的影响 标本平衡至收缩平稳后, 加入 L-NNA, 终浓度为 5×10^{-5} mol/L, 5 min 后, 再按半对数摩尔浓度法, 加入不同浓度的 Iso, 记录不同浓度时平滑肌舒张的百分率, 与未加 L-NNA (Control) 时相同浓度的 Iso 对平滑肌舒张的百分率进行比较. 加 L-NNA 后, 3 月龄组大鼠空肠平滑肌标本对 Iso 的舒张反应在各浓度均明显降低. 加入 L-NNA 后, Iso 的为 3×10^{-8} mol/L 时, 舒张率为 16.0%, 舒张率较加药前降低 41.2% ($P < 0.05$); 在 1×10^{-7} mol/L 时为 27.5%, 较加药前降低 44.3% ($P < 0.05$); 在 3×10^{-7} mol/L 时为 56.4%, 较加药前降低 25.4% ($P < 0.05$); 在 3×10^{-6} mol/L 时为 78.8%, 较加药前降低 12.8% ($P < 0.05$, 图 3). 结果表明, 3 月龄组大鼠空肠平滑肌标本, 在抑制 NOS 后对 Iso 的舒张反应在各个浓度点均下降. 而 20 月龄组大鼠空肠平滑肌对各浓度点对 Iso 的舒张反应, 加 L-NNA 前后无明显差异 ($P > 0.05$). 用 L-NNA 抑制 NOS 后, 20 月龄组同 3 月龄组空肠平滑肌标本对 Iso 的舒张反应也无明显差异 ($P > 0.05$).

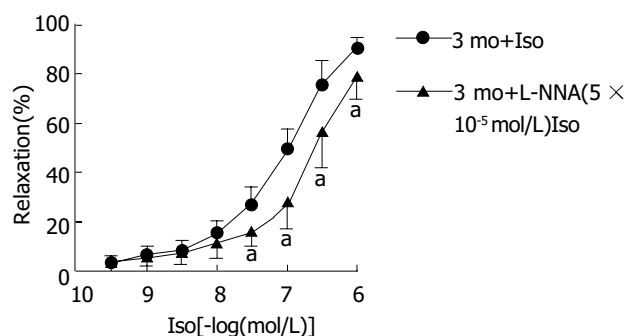


图3 L-NNA 对 Iso 引起的 3 月龄组空肠平滑肌舒张反应的影响。° $P < 0.05$ vs 3 mo+Iso.

3 讨论

Nishimoto *et al*^[3] 的研究表明, 随着年龄的增长, 豚鼠心肌细胞对 Iso 的收缩反应显著下降, 认为与 AC

(腺苷酸环化酶) 通路的损伤有关; Birder *et al*^[5] 发现, 老年家兔膀胱逼尿肌对 Iso 的舒张反应显著下降, 可能由 β 受体表达和 cAMP 生成的减少所致. 我们的实验结果显示, 20 月龄大鼠空肠平滑肌自主收缩幅度和频率同 3 月龄组相比相对下降, 其中频率降低显著; 不同浓度的 Iso 灌流大鼠空肠平滑肌后, 20 月龄组收缩幅度和频率的变化百分率都低于 3 月龄组, 即 20 月龄组大鼠空肠对 β 受体激动剂 (Iso) 的反映性也下降. 同时, 20 月龄组 Iso 对 β 受体的 pD_2 值显著下降, 提示 β 受体对其激动剂的亲和力下降. 说明动物随年龄的增加, 除心脏, 膀胱外, 消化道平滑肌运动功能也有降低趋势, 对 β 受体激动剂的反应性也下降. 组织不同其运动功能减低的机制有可能不一样.

Kanai *et al*^[6] 发现心肌细胞 β 受体兴奋时, 可促进 NO 的生成. Banwait *et al*^[7] 和 Varghese *et al*^[8] 分别观察到兴奋肛门内括约肌及心肌的 β_3 受体, 引起 NO 的生成增加. Birder *et al*^[5] 认为, 兔膀胱内的肾上腺能神经元释放的去甲肾上腺素以及肾上腺髓质释放的儿茶酚胺, 通过兴奋膀胱上皮上的 β 受体后, 促进 NO 的生成而影响膀胱的功能, 其促进 NO 的生成机制可能为 β 受体通过 AC 途径促使细胞内 Ca^{2+} 的释放所致. 消化道平滑肌的运动受到高级中枢神经系统、自主神经系统、内在神经系统、自身及体液等调节. 胃肠道除受交感和迷走神经支配外, 还存在 NANC 能神经的支配, 其神经递质可能为 NO^[1, 9-11]. NO 由 L-精氨酸经 NOS 催化合成. NOS 是 NO 产生的限速酶, 有 3 种类型, 即神经型 NOS (nNOS)、内皮型 NOS (eNOS) 和诱导型 NOS (iNOS). 其中 nNOS 与 eNOS 合称为结构型 NOS (cNOS), 依赖于钙-钙调蛋白而起作用. NO 对胃肠道的运动起着重要的调节作用^[6, 8]. 我们以往的工作表明^[12-14], L-精氨酸对小肠平滑肌有抑制作用, 这种作用与 NOS 的活性有关, 而 NOS 的活性又受 α 、 β 受体机能状态的影响, 而非 NA、Iso 的直接作用.

本实验结果表明, 大龄大鼠空肠平滑肌自主收缩幅度和频率下降和对 β 受体激动剂 (Iso) 的反应减弱与 NO 有关. NOS 抑制剂 L-NNA 使 3 月龄组空肠平滑肌对 Iso 的舒张反应的幅度降低、Iso 浓度-效应曲线向右下移动提示, L-NNA 阻断 NOS 后, NO 合成减少, 使 Iso 对空肠平滑肌的舒张作用明显减弱, 说明 NO 参与了 Iso 对年轻大鼠空肠平滑肌的舒张作用. Iso 对 20 月龄组大鼠空肠平滑肌标本的舒张作用较小; 给与 L-NNA 前后 Iso 对空肠平滑肌标本的舒张作用无明显变化, 对 Iso 的浓度-效应曲线也无明显影响. 因此, 有理由认为, 20 月龄组大鼠空肠平滑肌除 β 受体对其激动剂的亲和力下降外, NOS 活性降低或 NO 的合成减少也可能是引起大龄大鼠空肠平滑肌对 Iso 的反应性

下降的重要原因之一;还可能与 sGC 的活性降低及其与NO的亲和力下降有关. 此机制可能在老年性胃肠道运动功能障碍的发病中起重要作用. 但老龄大鼠空肠平滑肌对Iso的反应性下降的确切机制和临床意义有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Wade PR. Aging and ceural nontrol of the GI tract I. Age-related changes in the enteric nervous system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G489-G495
- 2 Gettys TW, Rohlfis EM, Prpic V, Daniel KW, Taylor IL, Collins S. Age-dependent changes in beta-adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase activation in adipocytes from Fischer 344 rats. *Endocrinology* 1995;136:2022-2032
- 3 Nishimoto T, Latifpour J, Wheeler MA, Yoshida M, Weiss RM. Age-dependent alterations in beta-adrenergic responsiveness of rat detrusor smooth muscle. *J Urol* 1995;153:1701-1705
- 4 Ferrara N, O'Gara P, Wynne DG, Brown LA, del Monte F, Poole-Wilson PA, Harding SE. Decreased contractile responses to isoproterenol in isolated cardiac myocytes from aging guinea-pigs. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1141-1150
- 5 Birder LA, Nealen ML, Kiss S, de Groat WC, Caterina MJ, Wang E, Apodaca G, Kanai AJ. Beta-adrenoceptor agonists stimulate endothelial nitric oxide synthase in rat urinary bladder urothelial cells. *J Neurosci* 2002;22:8063-8070
- 6 Kanai AJ, Mesaros S, Finkel MS, Oddis CV, Birder LA, Malinski T. Beta-adrenergic regulation of constitutive nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1997;273(4 Pt 1):C1371- C1377
- 7 Banwait KS, Rattan S. Role of nitric oxide in beta3-adrenoceptor activation on basal tone of internal anal sphincter. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G547-555
- 8 Varghese P, Harrison RW, Lofthouse RA, Georgakopoulos D, Berkowitz DE, Hare JM. beta(3)-adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J Clin Invest* 2000;106:697-703
- 9 Teng BQ, Murthy KS, Kuemmel JF, Grider JR, Sase K, Michel KT, Makhlonf GM. Expression of endothelial NOS in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998;275:G342-G351
- 10 Morin MJ, Karr SM, Faris RA, Gruppuso PA. Developmental variability in expression and regulation of inducible nitric oxide synthase in rat intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G552- G559
- 11 黄颖秋, 张德中, 曹树东. 一氧化氮与消化道动力. 国外医学·消化系统分册 1997;17:23-27
- 12 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;13:358-362
- 13 汪长东, 胡还忠, 刘子龙, 马立群, 田琴, 余承高, 王晓敏. 一氧化氮抑制大鼠空肠平滑肌收缩. 胃肠病学和肝病学杂志 2004;13:588-591
- 14 马立群, 胡还忠, 汪长东, 王晓敏, 田琴. β -肾上腺能受体在一氧化氮抑制小鼠回肠自主收缩中的作用. 中国应用生理学杂志 (待发表)

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 •

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)

免疫分子与胃癌侵袭转移的关系

刘霞, 王承党

刘霞, 王承党, 福建医科大学附属第一医院消化科, 福建医科大学消化系病研究室 福建省福州市 350005
福建省自然科学基金资助课题, No. C9910008
中国教育部高等学校骨干教师基金课题, No. 00A003
通讯作者: 王承党, 350005, 福建省福州市, 福建医科大学附属第一医院消化科, 福建医科大学消化系病研究室: wangcdh@sina.com
电话: 0591-3357199-2515
收稿日期: 2004-11-18 接受日期: 2005-05-14

摘要

胃癌是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤, 癌细胞向局部淋巴结、腹腔和远处转移是导致死亡的主要原因. 胃癌侵袭转移的机制非常复杂, 涉及到多种免疫分子的作用. 某些免疫分子在正常组织、良性病变中的表达与其在恶性肿瘤组织中的表达有很大差异. 表明这些分子在胃癌的发生、发展过程中发挥了作用. 本文就一些与胃癌侵袭、转移关系密切的免疫分子作一综述.

刘霞, 王承党. 免疫分子与胃癌侵袭转移的关系. 世界华人消化杂志 2005; 13(15):1856-1859
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1856.asp>

0 引言

胃癌侵袭转移的机制非常复杂, 涉及到多种黏附分子、组织金属蛋白酶及其抑制物、细胞因子和相关基因的突变^[1]. 本文就一些与胃癌侵袭、转移关系密切的免疫分子作一综述.

1 细胞黏附分子(cell adhesion molecule, CAM)

CAM是一类介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)间黏附作用的膜表面糖蛋白, 在肿瘤的侵袭和转移等病理过程中具有重要的作用. 据结构和功能将其分为钙黏附素、整合素、免疫球蛋白超家族、选择素和CD44家族等.

1.1 钙黏附素(cadherin, CD) CD家族包括E-CD(见于成人上皮细胞)、N-CD(见于成人神经、肌肉组织)和P-CD(主要见于胎盘和上皮组织), 其中关于E-CD与胃癌关系的研究最多. 正常胃黏膜组织中E-CD的表达阳性率为100.0%, 胃癌组织E-CD阳性率为43.5%^[2], E-CD的表达情况与胃癌组织学类型有关^[3], 其低表达与胃癌的浸润深度、远处转移、预后显著相关, 而且在转移灶(如淋巴结)的表达明显低于原发灶的表达^[4]. 研究表明CD家族主要参与介导同型细胞间的黏附作用, 使肿瘤细胞间保持紧密的接触而难以脱离原发肿瘤进入周围组织和血管淋巴管. E-CD的功能维持与其相关蛋白的连接蛋白- α 、 β 、 γ 密

切相关, E-CD与连接蛋白- α (α -CA)在细胞内形成复合物, 在上皮细胞间聚集和黏附中起关键作用, 即使E-CD表达正常, 如无 α -CA表达, 胃癌细胞间的黏附作用也将丧失, 有利于肿瘤的扩散和转移.

1.2 CD44家族 CD44家族是一类由单一基因编码的、具有高度异质性的单链膜表面糖蛋白. 据其跨膜区是否含有可变区, 将CD44分为标准型CD44(CD44s)和变异型CD44(CD44v). CD44s分布于所有正常组织细胞, 而CD44v有组织特异性, 在肿瘤组织中的表达率比较高, 与胃癌关系比较密切的有CD44v5、CD44v6、CD44v8-10. CD44v6在正常组织中没有表达, 在胃癌组织中的阳性表达率为52.1%, 肠型胃癌的表达率高于弥漫型胃癌, 分化差的胃腺癌CD44v6阳性表达率显著增高^[5], 而且随着胃癌浸润深度的增加, CD44v6阳性率逐渐升高, 已经浸润到肌层和浆膜层的胃癌CD44v6阳性率高于局限于黏膜及黏膜下层的胃癌组织. CD44v6的高表达与淋巴结转移有显著正相关、而与患者的预后呈显著负相关^[3]. 日本学者^[6]研究发现血清CD44v6水平与胃癌组织中CD44v6表达水平相平行, CD44v6高的患者发生淋巴结转移和远处转移的机率较高, 预后差.

研究表明CD44v6与整合素, ECM中的配体结合使酪氨酸酸化而激活信号传导系统, 导致细胞形态、游走性改变、从而影响胃癌细胞的骨架构象和分布, 促进癌细胞与血管内皮、ECM的黏附, 促进肿瘤细胞的迁移和运动, 加速肿瘤细胞向基质侵袭; 表达CD44v6的肿瘤细胞与透明质酸盐的亲合力增加, 从而竞争性减弱与其他基质成分的亲合力, 这使肿瘤细胞沿透明质酸盐表面运动的能力大大增加; 此外, 这种CD44v6阳性的肿瘤细胞容易与转移位点的相关配体结合, 使转移到那里的肿瘤细胞能够继续生长、增殖, 最终成为大的转移灶.

1.3 整合素、免疫球蛋白超家族和选择素 整合素家族是一组细胞表面糖蛋白受体, 目前已知的整合素有22种, 整合素可与ECM中的纤维粘连蛋白、胶原蛋白等配体结合形成细胞骨架跨膜系统. 整合素与肿瘤的关系比较复杂, 特定的整合素可用于某些特定肿瘤侵袭转移的研究. 免疫球蛋白超家族是细胞表面与免疫球蛋白结构相似的跨膜糖蛋白, 包括细胞间黏附分子(ICAM-1, 2, 3)、血管细胞黏附分子(VCAM-1)、神经细胞黏附分子(NCAM)、CEA、DCC分子. 与肿瘤转移关系极为密切的是CEA、DCC. 选择素是一类以糖基为其识别配体的黏附分子, 主要为P-选择素、L-选择素、E-选择素, 在防止肿瘤的转移中起重要作用.

2 组织金属蛋白酶(MMPs)及其抑制物(TIMPs)

癌细胞侵袭和转移的能力与其诱导产生降解ECM和基底膜的能力密切相关,这一过程涉及大量蛋白酶及其抑制物之间的平衡关系,包括MMPs及TIMPs. MMPs几乎能降解所有ECM成分和基底膜胶原, MMPs与TIMPs之间平衡关系的丧失为肿瘤侵袭、转移提供了有利因素. MMPs有可能成为判断胃癌生物学行为的重要指标,而TIMPs有望为肿瘤治疗另辟蹊径.

2.1 MMPs MMPs是一类结构高度同源的内肽酶的总称,因含有金属(锌、钙)离子而得名. 迄今为止发现的MMPs至少有18种,几乎能降解除多糖以外的全部细胞外基质成分,根据降解的底物不同可将MMPs分为4大类:(1)胶原酶:MMP1、MMP8、MMP13主要消化I、II、III、VII、X型胶原和蛋白多糖;(2)明胶酶(IV型胶原酶):MMP2、MMP9,又称明胶酶A、B,主要消化IV、V、VII、X型胶原和弹性纤维;(3)基质溶解素:MMP3、MMP7、MMP16、MMP11,主要作用于纤维粘连蛋白、层粘连蛋白、弹力纤维、III、IV、V、VII、IX胶原及MMP1、MMP8、MMP9;(4)膜型金属蛋白酶:MT₁-MMP、MT₂-MMP、MT₃-MMP,主要作用于明胶、IV型胶原、MMP2. 体内绝大多数细胞并不储备MMPs,当需要MMPs的信号传到细胞后才临时合成,合成的MMPs以无活性的酶原形式分泌到细胞外,随后被多种蛋白酶和非蛋白酶水解以及热处理激活,一种激活的MMPs可激活另一种MMPs,形成瀑布效应. 近年研究发现MMP2、MMP7、MMP9与胃癌的侵袭、转移关系密切.

MMP2在正常胃黏膜组织中无表达, Monig *et al*^[7]研究得出浸润至肌层的胃癌MMP₂阳性率为75.0%,浸润至浆膜层时阳性率为76.2%,有淋巴结转移时阳性率为88.1%,未发生转移者阳性率为41.4%;但与胃癌的病理类型似乎没有关系,肠型胃癌MMP2阳性率为63.3%,弥漫型胃癌阳性率为73.2%. MMP2在胃癌组织中的表达活性明显增高,并且与胃癌的分期、局部浸润、淋巴管穿透、淋巴结和肝转移呈正相关. 通过MMP2基因多态性研究发现:不同基因型与胃癌的侵袭转移无明显相关性^[8]. MMP7的阳性率在II-IV期胃癌患者高于癌肿局限于固有层者,而且MMP7在癌巢的浸润前缘表达率尤其高^[9], MMP7阳性率高的低分化胃癌发生微转移的机率明显增高^[10],胃癌周围淋巴结MMP7阳性者发生2组或多组淋巴结转移的机率明显高于MMP7阴性者^[11]. 表明MMP7不但与胃癌细胞从原发灶向淋巴结转移有关,而且与淋巴结向淋巴结转移有关. MMP7可以作为胃癌侵袭转移(尤其是局部侵袭)的重要指标. 弥漫型胃癌MMP9的阳性表达率明显高于肠型胃癌,提示分化差的胃癌细胞具有更强的诱导MMP9表达的能力. MMP9还参与肿瘤向外浸润、扩展的过程,其表达较强的部位往往是在癌巢的浸润边缘,有淋巴结转移者MMP9阳性率也明显增高,而且有淋巴结或远处转移组的病灶微血管密度明显高于无转移组,微血管密度增高的

部位恰好是MMP9高表达的部位,提示MMP9的表达与肿瘤血管的形成有关^[12]. 因此, MMP9高表达的胃癌具有更强的浸润和转移能力.

2.2 TIMPs TIMPs是MMPs的天然抑制物,在ECM中与MMPs之间存在着微妙的平衡关系,在细胞的增殖、凋亡、Pre-MMP2的激活、血管生成及ECM的重建过程中具有重要的作用^[13]. 目前已经发现的TIMPs有4种,结构大致相同:N-端功能区的半胱氨酸残基与MMPs的锌离子活性中心结合, C-端功能区与MMPs的其他部位结合,以1:1的比例形成MMP-TIMP复合体,从而阻断MMPs与底物结合,抑制MMPs的活性. 多数研究显示TIMPs与胃癌的发生、浸润深度、TNM分期、淋巴结转移呈负相关, TIMPs高表达而MMPs低表达胃癌患者的生存率较高,反之亦然.

研究表明应用转染人TIMP2基因的胃癌细胞株建成的小鼠模型的胃癌的成瘤率明显降低,肝、腹膜、胰的转移率明显下降^[14],也进一步提示TIMP对胃癌生长和转移具有明显的抑制作用. 因此,许多学者^[15-16]尝试运用TIMPs干预胃癌的生长和转移:如加贝酯可以降低MMP9的表达,从而降低胃癌的淋巴结转移率;奥曲肽可以降低胃癌细胞合成MMP2、抑制VEGF表达,达到抑制肿瘤突破基底膜的过程和肿瘤血管的形成,从而抑制胃癌的转移;Marimastat是MMPs的广谱抑制物,通过抑制血管形成、下调明胶酶表达,从而抑制肿瘤的转移. 但是,研究表明TIMP-1可以促进包括肿瘤细胞在内的多种细胞的生长,可能促进微血管形成. 因此, TIMPs的蛋白酶抑制功能与其生长刺激活性的关系还有待进一步研究, TIMPs与MMPs之间的平衡关系在肿瘤浸润和转移中的地位尚需深入探讨.

3 细胞因子(cytokine, CK)

3.1 多向生长因子(pleiotrophin, PTN) PTN是一个有136氨基酸残基的肝素结合神经营养因子(heparin-binding neurotrophic factor, HBNF),成骨细胞、神经元、Schwann细胞、垂体后叶细胞、睾丸间质细胞、胚胎的中胚层和神经上皮细胞以及一些肿瘤细胞都可以表达PTN,其在胚胎发育(特别是神经系统的发育)中起重要作用.

近年来研究发现PTN与细胞转化、抗凋亡、血管生成和纤维蛋白溶解等肿瘤侵袭性生长有关^[17]. 100%的胃癌组织、86%的癌旁组织有PTN mRNA表达. PTN蛋白在癌组织中的表达明显高于癌旁组织、有远处转移的明显高于没有转移的病例^[18]. 因此, PTN蛋白表达与胃癌侵袭性生长有一定关系,但是其作用机制尚待进一步研究证实.

3.2 低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) HIF-1首先在1992年作为被低氧诱导的、连接在红细胞生成素基因低氧反应元件上的一个核因子被发现,是细胞在低氧条件下产生的蛋白性调节因子,是由HIF-1 α 和HIF-1 β 亚单位构成的异二聚体. 其与靶基因结合,促进靶基因转录,使机体产生一系列低氧适应反应. 近年来

HIF-1与恶性肿瘤的关系引起许多学者的注意。

恶性肿瘤的生长增殖可造成局部低氧,肿瘤细胞能够在低氧环境下迅速增长是其特性之一。组织细胞的氧供可调节HIF-1的表达,HIF-1在含氧量正常的细胞中很快被降解,而组织缺氧可使HIF-1 α 蛋白稳定,并激活低氧反应基因。在肿瘤细胞中,内源性活性氧(reactive oxygen species, ROS)可以诱导HIF-1 α 的表达,激活HIF-1介导的DNA复制,增强目的基因(如血管内皮生长因子, VEGF)表达^[19]。胃癌细胞ROS也与幽门螺杆菌感染有关,内在激活或幽门螺杆菌感染引起的ROS可能是HIF-1 α 在胃癌细胞中稳定表达的机制。

HIF-1是在基因水平直接调控VEGF表达的一个最为关键的转录因子。具有高转移倾向的胃癌细胞株在低氧状况下合成HIF-1 mRNA的能力明显增加,后者通过上调VEGF表达以适应低氧环境^[20]。通过对直肠癌的研究也发现HIF-1表达与肝转移灶、癌组织中VEGF和微血管指数水平显著正相关^[21]。因此,HIF-1是恶性肿瘤诱导新生血管形成的一个主要调控因子。

HIF-1是肿瘤增殖和侵袭转移的重要指标之一,HIF-1通过影响组织细胞的新陈代谢、增殖和凋亡,进而影响恶性肿瘤的发生和发展^[20-22],其高表达与肿瘤的TNM分期、浸润深度、淋巴结和远处转移有明显相关性^[21]。动物试验^[23]表明:作用于HIF-1基因的抗癌药可以使胃癌和其他类型恶性肿瘤的成瘤体积、HIF-1基因表达、癌组织中HIF-1蛋白含量都大幅度降低。

4 相关基因

胃癌相关基因主要以扩增、重排、缺失等方式导致其mRNA及蛋白高表达、低表达或不表达,来作用于不同阶段的不同环节,引起转导信号紊乱,最终导致胃癌发生、发展,目前研究较多的有以下几种。

4.1 nm23 nm23基因位于17号染色体着丝点附近17q22,其编码的蛋白与核苷酸二磷酸激酶(NDPK)有高度同源性,而细胞微管的聚合和解聚需要NDPK参与,因此推测nm23的改变一方面可使聚合异常而引起减数分裂和纺锤体异常,从而导致肿瘤发展;另一方面又可通过影响细胞骨架而促进细胞运动,从而参与浸润转移过程。有发现在有肝脏转移组、淋巴结转移组、无转移组的胃癌,nm23阳性率分别为27.50%、39.68%和54.93%,有显著性差异($P<0.01$)。由此可见nm23基因的低表达可能在胃癌浸润和转移中起作用^[24]。

4.2 p53 抑癌基因p53是胃癌组织中最常发生突变的肿瘤基因,也是研究得最为深入的基因之一,其基因位于人类17p13.1,编码53 kD的蛋白质。p53基因的主要生物学功能是参与细胞周期G₀-G₁期的转变,从G₁期生长限制性位点调控细胞进入细胞增殖周期,引起细胞周期阻滞,诱导凋亡和促进分化。p53基因缺失和突变时使其失

去抑制增殖的能力,导致凋亡受阻和肿瘤的发生。免疫组化法检测发现,突变型P53蛋白表达与胃癌的生物学行为关系密切,尤其与浸润和转移有关^[25]。

4.3 DCC 基因 DCC基因定位于18q21.3,约370 kb,至少含8个外显子,转录成10-12 kb mRNA,编码750个氨基酸组成的,分子量为190 kD的磷酸化蛋白,其序列与神经细胞黏附分子及其他Ig超家族的细胞表面糖蛋白有明显同源性,具有4个Ig样区域及3个中间长丝结构域。DCC基因产物具有黏附因子样功能,其表达异常可能会引起细胞异常,导致细胞的恶性转化、肿瘤的浸润与转移。研究发现^[26]:该基因表达缺失或减低与胃癌的胃肠浸润深度、肝转移、临床分期相关。DCC基因mRNA表达缺失多出现在临床III-IV期及伴有淋巴结转移组,提示其表达改变在胃癌转移中可能起重要作用。

总之,随着对胃癌侵袭转移机制的深入研究,对免疫黏附分子、细胞外基质及其蛋白水解酶、细胞因子与胃癌增殖、转移的关系有了更多的认识,相信不久的将来,这些分子有可能成为治疗胃癌的新靶点,为抗胃癌侵袭转移治疗提供新的线索。

5 参考文献

- 1 Hippo Y, Yashiro M, Ishii M, Taniguchi H, Tsutsumi S, Hirakawa K, Kodama T, Aburatani H. Differential gene expression profiles of scirrhous gastric cancer cells with high metastatic potential to peritoneum or lymph nodes. *Cancer Res* 2001;61:889-895
- 2 Joo YE, Rew JS, Choi SK, Bom HS, Park CS, Kim SJ. Expression of e-cadherin and catenins in early gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2002;35:35-42
- 3 Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of E-cadherin, beta-catenin, CD44s and CD44v6 in gastric adenocarcinoma: relationship with lymph node metastasis. *Anticancer Res* 2003;23:1581-1588
- 4 Takahashi Y, Kitadai Y, Ellis LM, Bucana CD, Fidler IJ, Mai M. Multiparametric in situ mRNA hybridization analysis of gastric biopsies predicts lymph node metastasis in patients with gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:1258-1265
- 5 Yamaguchi A, Goi T, Yu J, Hirono Y, Ishida M, Iida A, Kimura T, Takeuchi K, Katayama K, Hirose K. Expression of CD44v6 in advanced gastric cancer and its relationship to hematogenous metastasis and long-term prognosis. *J Surg Oncol* 2002;79:230-235
- 6 Saito H, Tsujitani S, Katano K, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Serum concentration of CD44 variant 6 and its relation to prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1998;83:1094-1101
- 7 Monig SP, Baldus SE, Hennecken JK, Spiecker DB, Grass G, Schneider PM, Thiele J, Dienes HP, Holscher AH. Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology* 2001;39:597-602
- 8 Miao X, Yu C, Tan W, Xiong P, Lu W, Lin D. A functional polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 gene promoter (-1306C/T) is associated with risk of development but not metastasis of gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res* 2003;63:3987-3990
- 9 Liu XP, Kawauchi S, Oga A, Tsushimi K, Tsushimi M, Furuya T, Sasaki K. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression at the invasive front in gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:291-295
- 10 Ikeda S, Kimura H, Shibata T. Correlation between expression

- of MMP-7 in gastric submucosal invasive carcinoma and lymph node micrometastasis. *Rinsho Byori* 2002;50:196-201
- 11 Ajsaka H, Fushida S, Yonemura Y, Miwa K. Expression of insulin-like growth factor-2, c-MET, matrix metalloproteinase-7 and MUC-1 in primary lesions and lymph node metastatic lesions of gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1788-1792
 - 12 王爱东, 吕光成. 胃癌组织中 MMP-9 表达、微血管生成与胃癌侵袭与转移. *肿瘤* 2002;22:57-58
 - 13 Baker EA, Leaper DJ. The plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in colorectal cancer: relationship to tumour pathology. *Eur J Cancer* 2003;39:981-988
 - 14 刘炳亚, 朱丽华, 郭继和. 转导人 TIMP-2 基因抑制胃癌浸润转移的实验研究. *中华消化杂志* 2000;32:61-63
 - 15 Rha SY, Jeung HC, Roh JK, Kim JJ, Noh SH, Min JS, Kim BS, Chung HC. Biological phenotype determination with ex vivo model in gastric cancer for matrix-metalloproteinase inhibitor treatment. *Int J Mol Med* 2002;10:251-256
 - 16 Wada N, Otani Y, Kubota T, Kimata M, Minagawa A, Yoshimizu N, Kameyama K, Saikawa Y, Yoshida M, Furukawa T, Fujii M, Kumai K, Okada Y, Kitajima M. Reduced angiogenesis in peritoneal dissemination of gastric cancer through gelatinase inhibition. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:431-435
 - 17 Kadomatsu K. Recent progress of midkine research on cancer. *Nippon Rinsho* 2000;58:1337-1347
 - 18 高原, 丁吉人, 郑树森. 多向生长因子在胃癌生长转移中的作用. *中华医学杂志* 2001;81:496-497
 - 19 Park JH, Kim TY, Jong HS, Kim TY, Chun YS, Park JW, Lee CT, Jung HC, Kim NK, Bang YJ. Gastric epithelial reactive oxygen species prevent normoxic degradation of hypoxia-inducible factor-1alpha in gastric cancer cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:433-440
 - 20 Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Onogawa S, Matsutani N, Kaio E, Ito M, Chayama K. Constitutive upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA occurring in highly metastatic lung carcinoma cells leads to vascular endothelial growth factor overexpression upon hypoxic exposure. *Oncogene* 2003;22:6717-6724
 - 21 Kuwai T, Kitadai Y, Tanaka S, Onogawa S, Matsutani N, Kaio E, Ito M, Chayama K. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2003;105:176-181
 - 22 Fan LF, Diao LM, Chen DJ, Liu MQ, Zhu LQ, Li HG, Tang ZJ, Xia D, Liu X, Chen HL. Expression of HIF-1 alpha and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Ai Zheng* 2002;21:254-258
 - 23 Yeo EJ, Chun YS, Cho YS, Kim J, Lee JC, Kim MS, Park JW. YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:516-525
 - 24 陈雪华, 刘炳亚, 朱正纲. nm23-H1 表达与胃癌浸润、转移的关系. *上海医学* 2000;23:213-215
 - 25 Lee KE, Lee HJ, Kim YH, Yu HJ, Yang HK, Kim WH, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. Prognostic significance of p53, nm23, PCNA and c-erbB-2 in gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2003;33:173-179
 - 26 Iino H, Fukayama M, Maeda Y, Koike M, Mori T, Takahashi T, Kikuchi-Yanoshita R, Miyaki M, Mizuno S, Watanabe S. Molecular genetics for clinical management of colorectal carcinoma. 17p, 18q, and 22q loss of heterozygosity and decreased DCC expression are correlated with the metastatic potential. *Cancer* 1994;73:1324-1331

编辑 王谨晖 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年第四次全国幽门螺杆菌学术会议征文通知

本刊讯 由中华医学会消化病学分会主办, 湖南省医学会、湖南省医学会消化病学专业委员会承办的第四次全国幽门螺杆菌学术会议定于2005-10月中旬在湖南省长沙市召开, 现将征文通知公布如下:

1 内容

文章内容包括: 幽门螺杆菌流行病学及其他传播途径、幽门螺杆菌的致病机理及其分子机制、幽门螺杆菌相关性疾病的研究、幽门螺杆菌与胃肠道外疾病、幽门螺杆菌与胃癌的研究进展、幽门螺杆菌诊治进展、幽门螺杆菌耐药研究进展。

2 论文寄送地址

湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院消化科 袁伟健教授 收; 邮编: 410008. 电话: 0731-4327106, 4327282. 请在信封上注明“全国幽门螺杆菌会议征文”。

胃肠道中心房利尿钠肽的研究现状

李春辉, 郭慧淑, 朴莲花, 许文燮

李春辉, 郭慧淑, 朴莲花, 延边大学医学院生理学教研室 吉林省延吉市 133000
许文燮, 上海交通大学医学院, 文选医学楼 424 室 上海市 200240
国家自然科学基金资助, No. 30160028
通讯作者: 许文燮, 200240, 上海市, 上海交通大学医学院, 文选医学楼 424 室.
电话: 021-54747639 传真: 021-62832528
收稿日期: 2005-03-31 接受日期: 2005-04-09

摘要

心房利尿钠肽是由心房肌细胞分泌的一种多肽类激素, 是最早发现的利尿钠肽家族成员之一. 近年来的研究表明, 胃肠道黏膜的内分泌细胞也分泌心房利尿钠肽, 并且胃肠道中心房利尿钠肽通过旁分泌和自分泌的方式作用于心房利尿钠肽受体, 调节胃肠道的水和电解质吸收、胃肠运动及胃肠的分泌. 本文对胃肠道中心房利尿钠肽的研究现状进行了简要的综述.

李春辉, 郭慧淑, 朴莲花, 许文燮. 胃肠道中心房利尿钠肽的研究现状. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1860-1863
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1860.asp>

0 引言

自从1981年de Bold *et al*^[1]发现心房利尿钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)以来, 利尿钠肽家族(natriuretic peptides, NPs)已有六大成员, 即ANP、脑性利尿钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、C-型利尿钠肽(C-type natriuretic peptide, CNP)、树眼镜蛇性利尿钠肽(dendroaspis natriuretic peptide, DNP)、室性利尿钠肽(ventricular natriuretic peptide, VNP)和珊瑚毒蛇性利尿钠肽(micrurus natriuretic peptide, MNP), 所有的钠尿肽家族成员的共同结构特征是由17个氨基酸组成环行结构, 其中11个氨基酸以二硫键相连, N端和C端氨基酸序列则因NP家族成员及动物种类的不同而异^[2]. 以往的研究表明, ANP共有的生理作用是利尿、利钠、舒张血管、降低血压和调节电解质平衡. Vuolteenaho *et al*^[3]首次在大鼠的胃和小肠内发现了ANP的免疫反应物质, 为研究ANP在胃肠道的功能及作用拉开了序幕. 随着研究的深入, Crane *et al*^[4]发现大鼠的肠道内还存在ANP的受体, 这进一步证明了ANP参与胃肠生理功能的调节, 以后相继在大鼠的大肠, 豚鼠的胃、小肠和结肠以及人的胃、空肠、回肠、结肠和直肠等组织提取物中也发现有ANP的免疫反应物质, 并在大鼠的小肠微绒毛、空肠、回肠上皮细胞中发现存在ANP的特殊作用位点(受体)^[5-8]. 目

前, 国内外学者对ANP的生物学特性, 胃肠道中的ANP的形态学分布及其对胃肠道功能调节的研究日益深入, 现就ANP的生物学特性、胃肠道中ANP的形态学分布及对胃肠道功能调节作用的研究现状综述如下.

1 ANP的生物学特性

ANP是一种多肽类物质, 其结构由17个氨基酸围成一个环行结构, 他有自由氨基的一端即氨基末端(amino terminal)或N端有6个氨基酸序列, 有自由羧基的一端即羧基末端(carboxyl terminal)或C端有5个氨基酸序列, 并且在不同种属的动物与人之间的ANP也有其相同或不同的基本结构(表1). 现将几种动物与人的ANP的基因结构进行一下对比.

表1 心房利尿钠肽

动物名称	基因结构
鳗	SKSSSPCFGGKLDRIQSYSGGLGCNSRK-NH ₂
彩虹鲟鱼	SKAVSGCFGARMDRIGTSSGLGCSPKRRS
牛蛙	SSDCFGSRIDRIGAQSGMGC-GRRF
青蛙	APRSMRRSSDCFGSRIDRIGAQSGMGC-GR-F
人	SLRRSSCFGGRMDRIGAQSGLCNSFRY
大鼠	SLRRSSCFGGRIDRIGAQSGLCNSFRY

ANP的mRNA约1 kb, 编码一个126个氨基酸的蛋白前体(Pro-ANP), 人类Pro-ANP分裂释放一个98个氨基酸N末端片段和一个28个氨基酸C末端片段即成熟的ANP, N末端片段具有ANP同样的生物学活性. ANP主要在心房肌中产生, 在胃肠道黏膜中也被检测到有ProANP-(1-30)、ProANP-(1-126)即ANP前激素原的表达, 并且这种表达在胃肠道黏膜的下1/3为多.

2 ANP在胃肠道组织中的存在形式和分布特点

ANP在胃肠道中合成, 并且胃肠道组织中ANP的存在形式与心脏不同, 在胃肠道大多以Pro-ANP-(1-126)的形式存在, 而在心脏中的主要的储存形式是ANP-(4-28)和ANP-(5-28)的形式^[9]. ANP基因在胃肠道^[10]、脑^[11]、肾^[12]、性腺^[13]、淋巴组织^[14]等组织均有表达. 大量的研究证实了在正常大鼠的胃肠道组织内存在着心房利尿钠因子(atrial natriuretic factor, ANF)^[6], 这就也为胃肠道中存在着ANP提供了证据. Nguyen *et al*^[15]研究表明, ANP基因在大鼠的胃中表达, 并证实ANP前体(Pro-

ANP)mRNA在大鼠胃不同水平选择性表达,这种选择性表达在胃窦和贲门水平超过胃底,提示胃内ANP的这种选择性表达可能有其特殊的生理机能.研究还发现,在人的空肠、回肠、结肠黏膜的EC(enterochromaffin, EC)细胞也含有Pro-ANP(1-126)^[16],这说明在人的空肠、回肠、结肠也可能存在着ANP,并且这个结论用免疫组织化学和组织原位杂交(tissue *in situ* hybridization)方法得到了进一步的证实:胃肠道中的ANP是由胃肠道的内分泌细胞合成分泌的.总之,胃肠道中的内分泌细胞(特别是EC细胞)在胃中的主要分布在胃底和幽门部黏膜的下1/3,而在肠道中也主要分布在空肠、回肠、结肠黏膜的下1/3,由此推断胃肠道中的ANP的合成细胞应在胃肠道黏膜的下1/3,也就是说ANP在胃肠道组织中主要分布在胃肠道黏膜的下1/3部位.

3 ANP受体在胃肠道内的分布及其作用方式

受体(receptor)是细胞膜上或细胞内能特异识别生物活性分子并与之结合,进而引起生物学效应的特殊蛋白质,在细胞信息传递过程中起着极为重要的作用.目前研究证实,心房利尿钠肽受体(natriuretic peptide receptor, NPR)有三种,即NPR-A, NPR-B和NPR-C. Lai *et al*^[17]在大鼠的胃窦黏膜和平滑肌组织中发现有心房利尿钠肽的受体NPR-A的存在. Crane *et al*^[4]研究发现在大鼠的肠道内也存在着NPR-A,并且后来在家兔的胃肠道内也发现了NPR-A的存在,主要分布在胃肠道黏膜细胞. NPR-A有与鸟苷酸环化酶结合的位点. ANP通过与NPR-A结合而发挥作用,并且ANP通过与NPR-C结合而被清除. ANP与靶细胞膜上的NPR-A结合后,能激活鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GC),后者再催化GTP转变成环一磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP). cGMP能激活cGMP依赖蛋白激酶(cGMP-蛋白激酶,蛋白激酶G),从而催化有关蛋白或有关酶类的丝/苏氨酸残基磷酸化产生生物学效应. ANP与NPR-A结合使细胞内的cGMP生成增加而发挥作用. 在大鼠离体实验中发现,ANP有刺激胃窦黏膜产生cGMP的能力^[16], Rambotti *et al*^[18]却发现在胃肠道ANP能刺激胃窦黏膜产生cGMP而BNP几乎不能使之产生cGMP,并发现鸟苷酸环化酶活性在胃和小肠分布要比大肠多,其中鸟苷酸环化酶A(NPR-A)主要分布在胃. 在胃的GC-A反应产物存在于不同类型的细胞或同一细胞的不同部位,整个胃肠道NPR-A主要在以下几种细胞被发现:内分泌和外分泌细胞、成熟和未分化的内皮细胞、平滑肌细胞,这些部位NPR-A的存在表明ANP在胃肠道内腺体的分泌、细胞的增殖和肌肉的活动过程中起着重要的作用. 在家兔的胃肠道发现, NPR-A主要分布在内皮细胞^[19]. 总之, NPR-A广泛存在于胃肠道中,他通过与ANP结合激活鸟苷酸环化酶,并催化GTP转变成cGMP来发挥其生物学效应.

4 ANP对胃肠功能的调节作用

4.1 ANP对胃肠运动的调节作用 ANP在中枢水平对胃肠道运动的调节,主要是通过参与副交感神经对胃肠功能的调节来完成的^[20]. Chijiwa *et al*^[21]通过研究也发现, ANP能抑制胃平滑肌收缩反应. ANP对胃肠动力的调节除了受中枢神经系统的支配外,还发现豚鼠的胃和小肠能合成ANP并通过旁分泌和自分泌形式作用于胃肠道抑制胃肠运动^[22]. 禁食大鼠胃局部ANP浓度和他们的基因表达是随时被调整的,如禁食的大鼠胃ANP基因表达和ANP的基因产物减少,相反在进食时大鼠胃ANP的基因表达和ANP的基因产物增加. 因此,有人推测,在胃肠道中存在着重要的ANP调节因子,他们受胃肠道伸展和膨胀的刺激影响. 当进食时,食物的向下推移运动导致小肠和结肠的伸展和膨胀,可能刺激ANP激素原基因的表达并增加ANP基因产物的释放从而调节胃肠运动. ANP和利尿钠肽家族对胃肠平滑肌运动主要起抑制作用,而抑制作用机制与激活鸟苷酸环化酶使胞内cGMP增加有关. 最近Itaba *et al*^[23]观察到, ANP通过神经和自分泌途径调节结肠平滑肌运动,而ANP对结肠平滑肌的舒张作用与膜结合型或颗粒性鸟苷酸环化酶(membrane-bound guanylate cyclase, mGC, 或particulate guanylate cyclase, pGC)使cGMP生成增多有关. 我们实验室近来的研究也已证实, ANP通过NP-pGC-cGMP途径使胞内cGMP增加,而cGMP激活了钙敏感的外向钾电流使细胞膜超极化,最终抑制大鼠、豚鼠和人胃平滑肌自发性收缩^[24-26]. 因此, ANP对胃肠道的运动起着重要的调节作用.

4.2 ANP对胃肠吸收和分泌的调节作用 ANP通过利尿、利钠来调节胃肠道中水盐平衡,在胃肠道水盐平衡中起着重要的作用,同时胃肠道也是ANP的重要作用部位. 研究表明^[27-29], ANP对小肠和结肠吸收水、钠、氯等电解质以及小肠黏膜钠-葡萄糖协同转运起抑制作用,而对小肠上皮细胞分泌氯离子起促进作用. 早在80年代末, Martinez Seeber *et al*^[30]发现大鼠心房提取物抑制小肠对水、钠离子和葡萄糖的吸收,认为抑制肠道吸收水和溶质的因素可能是ANF,后来在1991年Matsushita *et al*^[31]在大鼠小肠观察到, ANP抑制水、钠和氯离子的重吸收分别达到61%、43%和42%,其主要作用部位在空肠而不是回肠,并且关于ANP抑制胃肠道对钠和氯离子的吸收以及抑制钠-葡萄糖的协同转运的机制,基本上共认为通过cGMP介导的信号途径实现,如在猪的结肠ANP抑制结肠黏膜吸收钠离子和氯离子,同时诱发结肠上皮细胞分泌氯离子, ANP的这种作用可以用cGMP来模拟^[32]. Kagawa *et al*^[33]在狗的小肠上,也观察到ANP抑制小肠黏膜吸收钠和氯离子的作用与cGMP介导的信号途径有关. 小肠黏膜对葡萄糖的吸收方式是钠-葡萄糖的协同转运, ANP通过cGMP信号途径抑制钠-葡萄糖的协同转运^[34]. ANP促进小肠和结肠分泌氯离子的作用在不同的动物有差异. Hardin

et al^[35]在 Hooded-Lister 大鼠和 New Zealand 白兔中比较观察了 ANP 对回肠氯离子转运功能, 实验发现 1 $\mu\text{mol/L}$ 的 ANP 使大鼠和白兔均产生最大幅度的短环路电流 (in short circuit current, I_{sc}), 是一种与氯离子转运有关的电流. 但是, 在大鼠回肠产生的 I_{sc} 的幅度比大白兔回肠高两倍, 而且在大白兔回肠产生的 I_{sc} 快速而短暂. 在两种动物中, ANP 发挥作用都依赖细胞外的钙离子, 而神经节阻断剂明显抑制 ANP 对白兔回肠氯离子转运, 却不影响大鼠回肠氯离子转运, 无论是大鼠还是白兔, ANP 使组织中 cGMP 水平明显增高而对环一磷酸腺苷酸 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 水平却无影响. 以上研究说明, ANP 不仅通过肾脏起着利尿、利钠作用, 而且在通过胃肠道抑制钠和氯离子的吸收以及促进氯离子分泌中也起到重要作用. 目前有关 ANP 对消化液分泌方面的研究报道较少, 有研究发现 ANP 作用于胃黏膜受体, 通过负反馈系统减少胃酸的分泌, 增加黏液的产生, 从而保护胃黏膜免受胃酸的损伤^[35-36]. 由以上研究报道可以得出, ANP 对胃肠吸收和分泌有着重要的调节作用.

总之, ANP 不仅调节胃肠道对水、电解质的吸收和分泌功能, 也对消化道平滑肌运动及对胃酸的分泌起重要的调节作用. 因此, ANP 对消化道功能的调节作用将为临床防治消化道动力障碍性疾病以及胃、十二指肠溃疡性疾病提供理论依据和新的作用靶点.

5 参考文献

- de Bold AJ. Atrial natriuretic factor of the heart. Studies on isolation and properties. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982;170:133-138
- Hansson M. Natriuretic peptides in relation to the cardiac innervation and conduction system. *Microsc Res Tech* 2002;58:378-386
- Vuolteenaho O, Arjama O, Vakkuri O, Maksniemi T, Nikkila L, Kangas J, Puurunen J, Ruskoaho H, Leppaluoto J. Atrial natriuretic peptide (ANP) in rat gastrointestinal tract. *FEBS Lett* 1988;233:79-82
- Crane MR, O'Hanley P, Waldman SA. Rat intestinal cell atrial natriuretic peptide receptor coupled to guanylate cyclase. *Gastroenterology* 1990;99:125-131
- Gower WR Jr, Salhab KF, Foulis WL, Pillai N, Bundy JR, Vesely DL, Fabri PJ, Dietz JR. Regulation of atrial natriuretic peptide gene expression in gastric antrum by fasting. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000;278:770-780
- Sharkey KA, Gall DG, MacNaughton WK. Distribution and function of brain natriuretic peptide in the stomach and small intestine of the rat. *Regul Pept* 1991;34:61-70
- Bianchi C, Thibault G, De Lean A, Genest J, Cantin M. Atrial natriuretic factor binding sites in the jejunum. *Am J Physiol* 1989;256(2 Pt 1):G436-441
- Rambotti MG, Giambanco I, Spreca A. Detection of guanylate cyclases A and B stimulated by natriuretic peptides in gastrointestinal tract of rat. *Histochem J* 1997;29:117-126
- Bialik GM, Abassi ZA, Hammel I, Winaver J, Lewinson D. Evaluation of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in atrial granules of rats with experimental congestive heart failure. *J Histochem Cytochem* 2001;49:1293-1300
- Godellas CV, Gower WR Jr, Fabri PJ, Knierim TH, Giordano AT, Vesely DL. Atrial natriuretic factor: a possible new gastrointestinal regulatory peptide. *Surgery* 1991;110:1022-1027
- Walther T, Stepan H, Pankow K, Becker M, Schultheiss HP, Siems WE. Biochemical analysis of neutral endopeptidase activity reveals independent catabolism of atrial and brain natriuretic peptide. *Biol Chem* 2004;385:179-184
- Santos-Neto MS, Carvalho AF, Forte LR, Fonteles MC. Relationship between the actions of atrial natriuretic peptide (ANP), guanylin and uroguanylin on the isolated kidney. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:1015-1019
- Gutkowska J, Nemer M. Structure, expression, and function of atrial natriuretic factor in extraatrial tissues. *Endocr Rev* 1989;10:519-536
- Vollmar AM. Atrial natriuretic peptide in peripheral organs other than the heart. *Klin Wochenschr* 1990;68:699-708
- Nguyen TT, Babinski K, Ong H, De Lean A. Differential regulation of natriuretic peptide biosynthesis in bovine adrenal chromaffin cells. *Peptides* 1990;11:973-978
- Gerbes AL, Nathrath W, Cantin M, Denecke H. Presence of atrial natriuretic factor prohormone in enterochromaffin cells of the human large intestine. *Gastroenterology* 1991;101:424-429
- Lai FJ, Hsieh MC, Hsin SC, Lin SR, Guh JY, Chen HC, Shin SJ. The cellular localization of increased atrial natriuretic peptide mRNA and immunoreactivity in diabetic rat kidneys. *J Histochem Cytochem* 2002;50:1501-1508
- Rambotti MG, Giambanco I, Spreca A. Detection of guanylate cyclases A and B stimulated by natriuretic peptides in gastrointestinal tract of rat. *Histochem J* 1997;29:117-126
- Murthy KS, Makhoul GM. cGMP-mediated Ca^{2+} release from IP_3 -insensitive Ca^{2+} stores in smooth muscle. *Am J Physiol* 1998;274(5 Pt 1):C1199-1205
- McCann MJ, Nice-Lepard K, Rogers RC. Dorsal medullary injection of atrial natriuretic factor (ANF) excites vagal efferents and inhibits gastric motility. *Brain Res* 1991;549:247-252
- Chijiwa Y, Kabemura T, Misawa T, Kawakami O, Nawata H. Direct inhibitory effect of calcitonin gene-related peptide and atrial natriuretic peptide on gastric smooth muscle cells via different mechanisms. *Life Sci* 1992;50:1615-1623
- Vollmar AM, Friedrich A, Sinowatz F, Schulz R. Presence of atrial natriuretic peptide-like material in guinea pig intestine. *Peptides* 1988;9:967-971
- Itaba S, Chijiwa Y, Matsuzaka H, Motomura Y, Nawata H. Presence of C-type natriuretic peptide (CNP) in guinea pig caecum: role and mechanisms of CNP in circular smooth muscle relaxation. *Neurogastroenterol Motil* 2004;16:375-382
- Guo HS, Cui X, Cui YG, Kim SZ, Cho KW, Li ZL, Xu WX. Inhibitory effect of C-type natriuretic peptide on spontaneous contraction in gastric antral circular smooth muscle of rat. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:1021-1026
- Guo HS, Jin Z, Jin ZY, Li ZH, Cui YF, Wang ZY, Xu WX. Comparative study in the effect of C-type natriuretic peptide on gastric motility in various animals. *World J Gastroenterol* 2003;9:547-552
- Guo HS, Cai ZX, Zheng HF, Li XL, Cui YF, Wang ZY, Xu WX, Lee SJ, Kim YC. Role of calcium-activated potassium currents in CNP-induced relaxation of gastric antral circular smooth muscle in guinea pigs. *World J Gastroenterol* 2003;9:2054-2059
- Gonzalez Bosc LV, Vidal NA, Prieto R, Tur JA. Effect of atrial natriuretic peptide on alpha-methyl-D-glucoside intestinal active uptake in rats. *Peptides* 1998;19:1249-1253
- Tsukada T, Rankin JC, Takei Y. Involvement of drinking and intestinal sodium absorption in hyponatremic effect of atrial natriuretic peptide in seawater eels. *Zoolog Sci* 2005;22:77-85
- Loretz CA. Inhibition of goby posterior intestinal NaCl absorption by natriuretic peptides and by cardiac extracts. *J Comp Physiol (B)* 1996;166:484-491
- Martinez Seeber A, Vidal NA, Carchio SM, Karara AL. Inhibition of water-sodium intestinal absorption by an atrial extract. *Can J Physiol Pharmacol* 1986;64:244-247
- Matsushita K, Nishida Y, Hosomi H, Tanaka S. Effects of atrial natriuretic peptide on water and NaCl absorption across

- the intestine. *Am J Physiol* 1991;260(1 Pt 2):R6-12
- 32 Argenzio RA, Armstrong M. ANP inhibits NaCl absorption and elicits Cl⁻ secretion in porcine colon: evidence for cGMP and Ca mediation. *Am J Physiol* 1993;265(1 Pt 2):R57-65
- 33 Kagawa K, Suzuki S, Matsushita K, Uemura N, Morita H, Hosomi H. Relationship between the suppressive actions on intestinal absorption and on cGMP production for the natriuretic peptide family in dogs. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994;21:83-92
- 34 Gonzalez Bosc LV, Elustondo PA, Ortiz MC, Vidal NA. Effect of atrial natriuretic peptide on sodium-glucose cotransport in the rat small intestine. *Peptides* 1997;18:1491-1495
- 35 Hardin JA, Brockway PD, Gall DG. Atrial natriuretic peptide-induced secretory responses in rabbit vs rat ileum. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 1998;119:833-838
- 36 Puurunen J, Ruskoaho H. Vagal-dependent stimulation of gastric acid secretion by intracerebroventricularly administered atrial natriuretic peptide in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 1987;141:493-495

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 •

WJG 和世界华人消化杂志全文网站免费开通

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 和世界华人消化杂志出版的电子版全文已上传, 于 2003-04-15 开通。WJG 包括: 1995-2005 年 1-24 期及特刊。世界华人消化杂志包括: 1993-2005 年第 1-48 期及特刊。

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)。高影响力论文排序: 点击次数, 下载次数, 引用次数。高影响力论文即特别受同行关注, 影响范围广, 被点击次数、下载次数、引用次数多的论文。一篇论文如果能进入高影响力论文行列, 其研究成果一般多有创新性, 学术水平较高, 学术价值较大, 因而影响力大。投稿须知包括: 投稿细则, 述评, 研究原著, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告等要求及书写格式。

2 网址

WJG (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.asp>)

世界华人消化杂志 (<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.asp>)

3 论文摘要格式

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004 年 5 月; 12(5):1009-1014

中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护

岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠.

100101, 北京市, 中国人民解放军第 306 医院载人航天主着陆场区医疗救护队. yuemx@ns.cetin.net.cn

目的: 探讨中国首次载人航天主着陆场区航天员医疗保障及救护的经验体会。方法: 结合我们参加中国首次载人航天航天员医疗保障及救护的体会, 8 次在直升机上的医疗救护演练经验, 2 次突发意外事故乘直升机远距离实施医疗救护的体会, 多次在载人航天医疗救护车上医疗救护演练体会。并参考国内外相关资料, 对载人航天航天员意外伤害提出有效的防治预案。结果: 主要针对首飞载人航天航天员可能发生意外伤害的原因, 创新地把一个高质量的 ICU 全天候前移至草原上、沙漠里, 载体是载人航天医疗救护直升机及医疗救护车, 可以确保意外情况下航天员的安全。创造了反应速度第一; 技术装备第一。使救治规则、卫勤保障原则更趋于合理, 抢救成功率更高。载人航天医疗保障系统在装备、方案、试验等方面能满足安全性的要求。航天员主着陆场的医疗卫勤保障工作能够体现急救医学“快速反应, 立体救护”的理念。载人航天医疗救护直升机在航天员的医疗保障及救护中起着十分重要的作用, 他有机动性强、速度快、飞行高度较低的优点, 在草原及沙漠地区都可着落实施救护。结论: 返回着陆场区的航天员实施快速医疗救护, 能保障航天员安全, 圆满完成载人航天任务。

论文日次

日次网页包括: 岳茂兴, 邹德威, 闵庆旺, 牛恩喜, 杨善芝, 张坚, 刘志国, 崔少杰, 方伟武, 周雪峰, 高铁山, 化楠. 中国首次载人航天航天员主着陆场区医疗保障及救护. 世界华人消化杂志 2004 年 5 月; 12(5):1009-1014。功能日次包括: 点击率: 71, 下载率: 9, 引用率: 0, 摘要, 相关文章, 被引用次数, HTML, PDF。

4 全文

全文网页包括: 投稿, 摘要, PDF, 被引用, 点击率: 72, 下载率: 9, 相关文章, 相关评论, 图片及参考文献外链。

5 投稿查询

投稿查询网页包括: 编号, 刊名, 题目, 作者, E-mail, 收稿, 送审, 审回, 退稿, 接受, 审稿费, 出版费, 彩色图制作费, 黑白图制作费, 英文摘要加工费, 英文全文加工费, 加急费, 其他, 发票编号, 送修, 修回, 重修, 编辑, 入库, 卷号, 期号, 起止页。(世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

NF- κ B与幽门螺杆菌相关性胃炎和消化性溃疡

凌江红, 李家邦

凌江红, 李家邦, 中南大学湘雅医院中西医结合研究所
湖南省长沙市 410078
湖南省卫生厅中医药科研基金资助项目, No. 202053
通讯作者: 李家邦, 410078, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院中西医结合研究所. lijiaobang001@yahoo.com.cn
电话: 0731-4327227
收稿日期: 2005-05-28 接受日期: 2005-06-15

摘要

细胞核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)是一重要的多功能核转录因子, 激活后参与许多基因的转录调控, 在机体的炎症、免疫反应, 氧化应激, 细胞凋亡等过程中发挥作用. 近年研究发现幽门螺杆菌(*H pylori*)感染后NF- κ B呈激活状态, NF- κ B的激活导致其炎症相关因子如白介素-8(interleukin-8, IL-8)、白介素-1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)等的过度表达, TNF- α 和IL-1 β 又能激活NF- κ B, 导致持续放大的炎症反应而与*H pylori*相关性胃炎和消化性溃疡密切相关. 此外, NF- κ B还可通过调控应激、凋亡等相关靶基因转录参与消化性溃疡发生. 抑制NF- κ B的活性可能为这些疾病的治疗开辟新的途径.

凌江红, 李家邦. NF- κ B与幽门螺杆菌相关性胃炎和消化性溃疡. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1864-1866
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1864.asp>

0 引言

核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)最先发现于B淋巴细胞中, 能与免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强子 κ B序列(GGGACTTCC)特异性结合, 故称为核因子- κ B. 其由Rel蛋白家族中的成员以同源或异源二聚体的形式存在于多种类型的细胞, 其中p65/p50异源性二聚体是生理情况下最常见的功能形式, 活性最强. 激活后参与多种免疫相关受体、细胞因子、炎症因子、黏附分子、凋亡、应激等基因的表达和调控, 而与多种疾病的发生有关. 本文就其与幽门螺杆菌(*H pylori*)相关性胃炎和消化性溃疡的关系综述如下.

1 NF- κ B与*H pylori*相关性胃炎

体内外实验研究证实, NF- κ B的激活将导致其炎症相关因子的过度表达, 使炎症分子释放增多, 这些炎症分子具有重要作用, 如白介素-8(interleukin-8, IL-8)是目前已知最强的多形核白细胞趋化和激活因子, 能趋化中性粒细胞向炎症部位聚集, 从而引起明显的炎症反应. 多种基因涉及机体的炎症反应, 这些基因活化的前提首

先是NF- κ B的激活. 细胞处于静息状态时, NF- κ B通过与抑制蛋白I κ B结合存在于多种细胞的细胞质中, 如巨噬细胞、淋巴细胞、单核细胞、内皮细胞和平滑肌细胞, 多种细胞因子如植物凝集素、磷脂、脂糖、病毒、白介素-1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)致一个特异的I κ B激酶(IKK)复合物的激活, 可使I κ B发生磷酸化, 因而使其遍在化和被蛋白酶体降解. I κ B的降解使NF- κ B暴露出NF- κ B蛋白序列上核定位信号, 而使NF- κ B定位于细胞核, 结合到反应基因启动子特异性元件, 多种免疫和炎症反应有关的基因包括IL-1, 6, 8、干扰素(interferon, INF)、TNF- α 、内皮细胞黏附分子-1(endothelial cell adhesion molecule-1, ECAM-1), 细胞间黏附分子-1(intracellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)^[1]的调控区都含有 κ B位点, 因而NF- κ B可激活他们的转录. 反过来, 由NF- κ B调节的产物, 如TNF- α 和IL-1 β 又能激活NF- κ B. 这意味着存在一个能放大且延续炎症反应的复杂的调节环路. NF- κ B是其中一个中心环节.

*H pylori*定植在胃黏膜上皮与黏液之间的中性微氧环境中, 通过上皮细胞刺激细胞因子的产生, 并促使黏膜固有层的免疫炎症细胞的聚集与活化, 造成慢性活动性胃炎. 已证实*H pylori*感染与胃黏膜的IL-1、IL-6、IL-8及TNF- α 等细胞因子和化学趋化因子升高相关^[2-5], 这些细胞因子和化学趋化因子可引起中性粒细胞的聚集和激活, 中性粒细胞在上皮间迁移并释放递质, 引起活动性炎症反应. 而前已述及在炎症反应的复杂细胞因子网络中, NF- κ B的激活可能是一个中心环节. 体外实验显示将*H pylori*和胃癌细胞一起培养可引起NF- κ B的激活^[6]. *cag*致病岛阳性的*H pylori*菌株较*cag*致病岛阴性的菌株更具激活NF- κ B的能力^[7]. 新近一项研究^[8]发现*H pylori*对蒙古沙鼠胃癌细胞NF- κ B的激活依赖于*cagE*致病岛. 近来大量证据表明, 胃上皮细胞在*H pylori*攻击诱导下产生IL-8, 其过程伴随着NF- κ B的活化^[7, 9], IL-8表达水平与NF- κ B活性相关; p50反义寡核苷酸(抑制NF- κ B p50亚基的翻译)转染ADS细胞可阻滞*H pylori*诱导的IL-8的表达^[10]. Chu *et al*^[11]研究发现*H pylori*显著上调胃上皮AGS细胞IL-8 mRNA和蛋白水平, 并激活NF- κ B、活化蛋白-1(activator protein-1, AP-1), 抗氧化剂NAC通过阻滞氧化敏感转录因子的激活降低IL-8

的水平,提示 *H pylori* 诱导胃上皮细胞 IL-8 mRNA 及蛋白依赖于氧自由基介导的 NF- κ B、AP-1 的激活. Isomoto *et al*^[12] 研究表明, *H pylori* 感染患者的胃黏膜上皮细胞核中较非感染的上皮细胞 NF- κ B 激活增加, NF- κ B 表达程度与黏膜 IL-8 水平相关. 另一项研究^[13] 表明 *H pylori* 相关性胃炎的胃黏膜上皮细胞 NF- κ B 阳性细胞数与胃炎程度有明显相关性. 抗 *H pylori* 药物克拉霉素通过 AP-1 和 NF- κ B 转录因子抑制脂多糖诱导的人单核细胞 IL-8 的产生而抗炎^[14].

此外, NF- κ B 激活后还通过调控其他因子转录而影响 *H pylori* 相关胃黏膜炎症的发生. 有报道^[15] *H pylori* 水溶性蛋白可通过 NF- κ B、丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号途径激活人中性粒细胞环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 的表达, 后者在炎症反应中具有重要作用. 活化 T 细胞调节的正常 T 细胞表达和分泌的因子 (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted, RANTES) 是单核细胞和 T 淋巴细胞浸润的重要趋化因子, *H pylori* 通过细胞内信号途径包括 IKK 和 NIK 激活 NF- κ B 导致胃上皮细胞 RANTES 基因转录^[16]. β -防御素-2 (human β -defensin-2, hBD-2) 是宿主上皮组织防御感染的抗微生物肽, 其水平在细菌感染后显著性增加. 携带 *cag* 致病岛 (PAI) 菌株诱导 hBD-2 增强子的 NF- κ B 位点的激活, 特异 NF- κ B 蛋白是 *H pylori* 诱导 hBD-2 基因转录的重要顺式元件^[17].

H pylori 激活 NF- κ B 的机制主要有以下几个方面^[18]: *H pylori* 通过诱导 I κ B- α 的第32位和第36位氨基酸的磷酸化使 I κ B- α 降解引起 NF- κ B 活化; *H pylori* 可以导致胃癌 MKN45 细胞中 IKKs (IKK- α 、IKK- β) 活性增高; NIK 属于 MAPK kinase kinase (MAPKKK) 家族, 是 IKK- α 和 IKK- β 的直接上游激酶, 能使 IKK- α 的 Ser176 磷酸化, TRAF2 和 TRAF6 (TNF 受体相关因子) 也和 *H pylori* 介导的 NF- κ B 激活有关. Ras 和 MAPK 级联可作 NF- κ B 激活的上游信号^[19]. 总之, *H pylori* 通过细胞内传导通路激活 NF- κ B, 这种通路涉及 IKK- α 、IKK- β 、NIK、TRAF2、TRAF6、Ras 和 MAPK.

2 NF- κ B 与 *H pylori* 相关性消化性溃疡

NF- κ B 是炎症呈持续放大反应的中心环节, 而过强的炎症反应可导致组织损伤. IL-1 β 和 TNF- α 可阻止溃疡的修复, 甚至引起溃疡的复发. Watanabe *et al*^[20-21] 在大鼠腹腔内或皮下注射 IL-1 β 或 TNF- α , 48 h 后可在原乙酸性胃溃疡的同一部位引起溃疡复发. 而能减少中性粒细胞浸润和抑制炎症细胞 TNF- α 产生的 Pentoxifylline 能加速乙酸诱导的大鼠胃溃疡的愈合^[22]. *H pylori* 感染通过 NIK-IKK 信号合成诱导 NF- κ B 的激活, 导致胃上皮细胞单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 基因的转录^[23]. 而腹腔注射 TNF- α 可增加大鼠愈合溃疡瘢痕黏膜 MCP-1 mRNA 的表达, 后者

诱导 C-X-C 趋化因子巨噬细胞炎性蛋白-2 (MIP-2) 和细胞因子诱导的中性粒细胞趋化物-2 α (cytokine induced neutrophil chemoattractants-2 α , CINC-2 α) 增加, 趋化中性粒细胞, 而诱导溃疡复发^[24]. 有研究^[25] 证实浆膜下注射佛波酯 (phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA) 导致大鼠胃黏膜溃疡的形成, 研究发现在 PMA 注射的相应部位存在 NF- κ B 的激活, 而 NF- κ B 抑制剂或抗 TNF- α 抗体可显著抑制溃疡的形成, 提示 NF- κ B 的激活和随之诱导的 TNF- α 的释放, 均参与 PMA 介导的胃溃疡的形成. 依卡倍特钠是一抗溃疡药物, 其并无抗革兰氏阳性或阴性菌的抗微生物活性, 但却能抑制 *H pylori* 感染的胃上皮细胞 NF- κ B 的激活和 I κ B- α 的降解及 IL-8 基因的转录和 IL-8 的分泌, 这种对炎症的抑制作用可能是其发挥抗溃疡活性的机制之一^[26].

胃黏膜属于更新较快的组织, 正常情况下, 存在一定的细胞凋亡与增殖, 借以维护黏膜的生理平衡. *H pylori* 通过诱导细胞凋亡形成溃疡^[27-29]. 而 NF- κ B 能促凋亡, 抑制 NF- κ B 的活性可能使细胞免于凋亡^[30]. Chu *et al*^[31] 研究发现 *H pylori* 能诱导细胞凋亡, 减低凋亡相关基因 *bcl-2* 水平, 期间伴随 NF- κ B 的激活. 但 Uehara *et al*^[32] 研究显示神经酰胺可能通过 NF- κ B 的激活和胃黏膜凋亡的增加参与 PMA 介导的胃溃疡的形成, NF- κ B 抑制剂阻碍胃溃疡形成, 但不影响神经酰胺含量或凋亡数目, 提示神经酰胺水平增加后, NF- κ B 和凋亡途径可能分别参与胃溃疡的形成. *H pylori* 本身直接或通过趋化中性粒细胞诱导氧自由基在胃上皮细胞表达, 促进黏膜损伤^[33]. NF- κ B 是最早被发现的氧化应激敏感的转录因子之一, Kim *et al* 研究显示瑞巴派特 (rebamipide) 可通过抑制脂质过氧化物 (lipid peroxidation, LPO)、氧化激活的 NF- κ B 和 IL-8 产生而减轻 *H pylori* 介导的胃炎反应, 从而抗溃疡形成.

但也有研究认为 NF- κ B 对溃疡起保护作用. 该研究发现 NF- κ B 在大鼠胃溃疡愈合过程中的溃疡组织中被激活, 激活水平随溃疡愈合而下降. 用 IL-1 β 处理从溃疡基底分离的成纤维细胞, 可激活 NF- κ B 继而诱导 COX-2 和 CINC-1 mRNA 表达, 抑制 NF- κ B 激活导致这两种基因表达的抑制和增加 IL-1 β 诱导的 PGE2 和 CINC-1 水平, 持续预防 NF- κ B 激活削弱大鼠胃溃疡的愈合, 提示 NF- κ B 在溃疡组织激活可能上调促溃疡愈合因子的表达而促溃疡愈合.

总之, *H pylori* 感染后可以激活 NF- κ B, 后者从炎症、凋亡、氧化应激等多方面影响 *H pylori* 相关性胃炎和消化溃疡的发生. 姜黄抑制 NF- κ B 的活性可能为这些疾病的治疗开辟新的途径. 但同时也应认识到 NF- κ B 的活化对于促发机体炎症反应、清除病原体具有积极作用, 所以盲目抑制 NF- κ B 活性或完全阻断其与特定 DNA- κ B 序列的结合可能对机体有不可预料的损伤. 因此, 更重要的应该是调节 NF- κ B 静息与激活的动态平衡. 中药复方的整体调节可能在这方面具有一定的优势.

3 参考文献

- 1 Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N Engl J Med* 1997;336:1066-1071
- 2 Huang J, O'Toole PW, Doig P, Trust TJ. Stimulation of interleukin-8 production in epithelial cell lines by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1995;63:1732-1738
- 3 Harris PR, Mobley HL, Perez-Perez GI, Blaser MJ, Smith PD. *Helicobacter pylori* urease is a potent stimulus of mononuclear phagocyte activation and inflammatory cytokine production. *Gastroenterology* 1996;111:419-425
- 4 Peek RM Jr, Miller GG, Tham KT, Perez-Perez GI, Zhao X, Atherton JC, Blaser MJ. Heightened inflammatory response and cytokine expression *in vivo* to *cagA*⁺ *Helicobacter pylori* strains. *Lab Invest* 1995;73:760-770
- 5 Yamaoka Y, Kita M, Kodama T, Sawai N, Imanishi J. *Helicobacter pylori cagA* gene and expression of cytokine messenger RNA in gastric mucosa. *Gastroenterology* 1996;110:1744-1752
- 6 Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, Hirata Y, Ogura K, Shiratori Y, Omata M. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signaling pathways induced by *Helicobacter pylori*. *Mol Pathol* 2002;55:286-293
- 7 Keates S, Hitti YS, Upton M, Kelly CP. *Helicobacter pylori* infection activates NF-kappa B in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 1997;113:1099-1109
- 8 Nozaki K, Tanaka H, Ikehara Y, Cao X, Nakanishi H, Azuma T, Yamazaki S, Yamaoka Y, Shimizu N, Mafune K, Kaminishi M, Tatematsu M. *Helicobacter pylori*-dependent NF-kappa B activation in newly established Mongolian gerbil gastric cancer cell lines. *Cancer Sci* 2005;96:170-175
- 9 Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y, Imagawa K, Kikuchi M, Mukaida N, Matsushima K. Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun* 1997;65:3218-3224
- 10 Kim H, Lim JW, Kim KH. *Helicobacter pylori*-induced expression of interleukin-8 and cyclooxygenase-2 in AGS gastric epithelial cells: mediation by nuclear factor-kappaB. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:706-716
- 11 Chu SH, Kim H, Seo JY, Lim JW, Mukaida N, Kim KH. Role of NF-kappaB and AP-1 on *Helicobacter pylori*-induced IL-8 expression in AGS cells. *Dig Dis Sci* 2003;48:257-265
- 12 Isomoto H, Mizuta Y, Miyazaki M, Takeshima F, Omagari K, Murase K, Nishiyama T, Inoue K, Murata I, Kohno S. Implication of NF-kappaB in *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2768-2776
- 13 van Den Brink GR, ten Kate FJ, Ponsioen CY, Rive MM, Tytgat GN, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP. Expression and activation of NF-kappa B in the antrum of the human stomach. *J Immunol* 2000;164:3353-3359
- 14 Kikuchi T, Hagiwara K, Honda Y, Gomi K, Kobayashi T, Takahashi H, Tokue Y, Watanabe A, Nukiwa T. Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF-kappaB transcription factors. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:745-755
- 15 Kim JS, Kim JM, Jung HC, Song IS. Expression of cyclooxygenase-2 in human neutrophils activated by *Helicobacter pylori* water-soluble proteins: possible involvement of NF-kappaB and MAP kinase signaling pathway. *Dig Dis Sci* 2001;46:2277-2284
- 16 Mori N, Krensky AM, Gelezianas R, Wada A, Hirayama T, Sasakawa C, Yamamoto N. *Helicobacter pylori* induces RANTES through activation of NF-kappaB. *Infect Immun* 2003;71:3748-3756
- 17 Wada A, Ogushi K, Kimura T, Hojo H, Mori N, Suzuki S, Kumatori A, Se M, Nakahara Y, Nakamura M, Moss J, Hirayama T. *Helicobacter pylori*-mediated transcriptional regulation of the human beta-defensin 2 gene requires NF-kappaB. *Cell Microbiol* 2001;3:115-123
- 18 Maeda S, Yoshida H, Ogura K, Mitsuno Y, Hirata Y, Yamaji Y, Akanuma M, Shiratori Y, Omata M. *H pylori* activates NF-kappaB through a signaling pathway involving IkappaB kinase, NF-kappaB-inducing kinase, TRAF2, and TRAF6 in gastric cancer cells. *Gastroenterology* 2000;119:97-108
- 19 Seo JH, Lim JW, Kim H, Kim KH. *Helicobacter pylori* in a Korean isolate activates mitogen-activated protein kinases, AP-1, and NF-kappaB and induces chemokine expression in gastric epithelial AGS cells. *Lab Invest* 2004;84:49-62
- 20 Watanabe T, Higuchi K, Tominaga K, Fujiwara Y, Arakawa T. Acid regulates inflammatory response in a rat model of induction of gastric ulcer recurrence by interleukin 1 beta. *Gut* 2001;48:774-781
- 21 Watanabe T, Arakawa T, Fukuda T, Higuchi K, Kobayashi K. Role of neutrophils in a rat model of gastric ulcer recurrence caused by interleukin-1 beta. *Am J Pathol* 1997;150:971-979
- 22 Shimizu N, Watanabe T, Arakawa T, Fujiwara Y, Higuchi K, Kuroki T. Pentoxifylline accelerates gastric ulcer healing in rats: roles of tumor necrosis factor alpha and neutrophils during the early phase of ulcer healing. *Digestion* 2000;61:157-164
- 23 Mori N, Ueda A, Gelezianas R, Wada A, Hirayama T, Yoshimura T, Yamamoto N. Induction of monocyte chemoattractant protein 1 by *Helicobacter pylori* involves NF-kappaB. *Infect Immun* 2001;69:1280-1286
- 24 Watanabe T, Higuchi K, Hamaguchi M, Shiba M, Tominaga K, Fujiwara Y, Matsumoto T, Arakawa T. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates leukocyte recruitment during gastric ulcer recurrence induced by tumor necrosis factor-alpha. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:919-928
- 25 Takeuchi T, Miura S, Wang L, Uehara K, Mizumori M, Kishikawa H, Hokari R, Higuchi H, Adachi M, Nakamizo H, Ishii H. Nuclear factor-kappaB and TNF-alpha mediate gastric ulceration induced by phorbol myristate acetate. *Dig Dis Sci* 2002;47:2070-2078
- 26 Kim JM, Kim JS, Jung HC, Oh YK, Kim N, Song IS. Inhibition of *Helicobacter pylori*-induced nuclear factor-kappa B activation and interleukin-8 gene expression by ecabet sodium in gastric epithelial cells. *Helicobacter* 2003;8:542-553
- 27 Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by *Helicobacter pylori*. *Gut* 1996;38:498-501
- 28 Piotrowski J, Skrodzka D, Slomiany A, Slomiany BL. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide induces gastric epithelial cells apoptosis. *Biochem Mol Biol Int* 1996;40:597-602
- 29 Kohda K, Tanaka K, Aiba Y, Yasuda M, Miwa T, Koga Y. Role of apoptosis induced by *Helicobacter pylori* infection in the development of duodenal ulcer. *Gut* 1999;44:456-462
- 30 Dumont A, Hehner SP, Hofmann TG, Ueffing M, Droge W, Schmitz ML. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene* 1999;18:747-757
- 31 Chu SH, Lim JW, Kim KH, Kim H. NF-kappaB and Bcl-2 in *Helicobacter pylori*-induced apoptosis in gastric epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:568-572
- 32 Uehara K, Miura S, Takeuchi T, Taki T, Nakashita M, Adachi M, Inamura T, Ogawa T, Akiba Y, Suzuki H, Nagata H, Ishii H. Significant role of ceramide pathway in experimental gastric ulcer formation in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305:232-239
- 33 Davies GR, Simmonds NJ, Stevens TR, Sheaff MT, Banatvala N, Laurenson IF, Blake DR, Rampton DS. *Helicobacter pylori* stimulates antral mucosal reactive oxygen metabolite production *in vivo*. *Gut* 1994;35:179-185

改善微循环障碍药物在治疗急性胰腺炎中的应用

张喜平, 李志军

张喜平, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006
李志军, 浙江中医学院 浙江省杭州市 310053
浙江省中医药卫生科计划项目, No. 2003C130、2004C142
杭州市重大科技发展计划项目, No. 2003123B19
杭州市医药卫生重点项目, No. 2004Z006.
通讯作者: 张喜平, 310006, 浙江省杭州市第一人民医院普外科.
zxp99688@yahoo.com
电话: 0571-87065701 传真: 0571-86069376
收稿日期: 2005-05-13 接受日期: 2005-06-08

摘要

胰腺微循环障碍既是急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的启动因子, 又是引起胰腺出血、坏死等严重病变的促变因子, 是水肿型胰腺炎向出血坏死型胰腺炎转化的重要因素。因此, 改善微循环障碍在 AP 的发生、发展过程中有重要意义, 本文将主要阐述中西医药物治疗 AP 微循环障碍的实验与临床研究进展。

张喜平, 李志军. 改善微循环障碍药物在治疗急性胰腺炎中的应用. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1867-1871
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1867.asp>

0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的急腹症, 多属自限性, 约 15-30% 发展成为重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP), SAP 并发症多, 有较高的死亡率^[1]。近年来研究表明^[2], AP 的发生与发展不一定或不完全取决于胰酶的自家消化, 而与胰腺血流微循环障碍及炎性递质造成的多脏器损害有关, 微循环障碍既是 AP 发病的始动因素之一, 又是引起胰腺出血、坏死等严重病变的促变因子, 在 AP 的发病过程中, 胰腺微循环障碍作为一种持续的损伤机制贯穿于 AP 的整个发展过程^[3], 并促使 AP 由水肿型向出血、坏死型发展^[4], 改善微循环障碍在 AP 治疗中具有重要的临床意义, 本文就中西医药物治疗 AP 微循环障碍的研究进展作一综述。

1 中药

1.1 单味中药 现代中医药在治疗 AP 微循环障碍方面已取得很大进展。AP 时出现血液黏滞度增高和胰腺微循环障碍, 中药可以抑制血小板聚集, 降低毛细血管渗透率, 降低血液黏滞度, 改善胰腺微循环。丹参具有活血化瘀、抗凝、抑制血小板黏附、聚集^[5]和钙拮抗剂作用^[6], 能有效降低细胞聚集指数, 调节血液黏稠度, 改善血液流变性^[7-8], 增加毛细血管张力, 减轻毛细血管损伤, 促进纤溶, 从而改善微循环^[9]。阮利群 *et al*^[10] 用丹参注射液

治疗 72 例 SAP 患者, 结果各项研究指标较对照组有明显的改善($P < 0.05$)。汤一新 *et al*^[11] 用复方丹参注射液治疗 21 例手术后 SAP 患者, 发现红细胞压积、全血黏度高切和低切黏度与血浆黏度较对照组在治疗后比治疗前明显降低($P < 0.05$), 提示复方丹参注射液可改善 SAP 的血液流变性, 有利于胰腺组织病变的康复。大黄具有活血化瘀作用, 有研究^[12-13] 表明大黄能提高血浆渗透压, 降低血液的浓聚黏稠状态和毛细血管通透性, 降低血 PAF、TXA₂、PGI₂ 和 ET 的浓度, 抑制氧自由基生成, 对体内超氧离子自由基有较强的清除能力, 从而改善微循环障碍。杨正安 *et al*^[14] 将 42 例患者随机分成 2 组, 治疗组胃管注入大黄粉 200 mg/kg, 结果入院 48 h 肠麻痹恢复者显著高于对照组($P < 0.01$), 血浆内毒素含量显著低于对照组($P < 0.01$)。现代医学实验和临床研究^[15] 证明刺五加具有抗氧化、清除氧自由基, 改善微循环作用, 减轻胰腺病变。汪宝林 *et al*^[16] 给 SAP 大鼠腹腔注射刺五加 90 mg/kg, 发现治疗组血清 NO 含量和 SOD 活性明显高于 SAP 组($P < 0.05$), 血清淀粉酶明显下降($P < 0.05$), 各时相点胰腺病理检查结果均较 SAP 组轻。

1.2 中药复方 侯以岸 *et al*^[17] 应用血液流变学的检测方法, 观察兔急性出血坏死型胰腺炎(AHNP)时通过活血化瘀中药(丹参、红花、木香、元胡、大青、栀子、鱼腥草、三七、厚朴、枳壳及大黄)腹腔灌注治疗后血液流变学变化。结果显示全血还原黏度、血小板聚集性明显降低($P < 0.05$), 提示早期应用活血化瘀中药可以纠正血液流变异常改变, 改善胰腺微循环。周总光 *et al*^[18] 观察了中药复方清下一号(主要成分柴胡、黄芩、胡黄连和大黄等)对 AP 胰腺局部微循环的影响, 发现同急性水肿型胰腺炎(AEP)自然病程组比较, 治疗组胰腺组织毛细血管密度增加, 微血管管径增粗, 胰腺微循环流速加快, 流量增加, 组织灌注量明显改变($P < 0.01$), 提示清下一号具有显著改善 AP 胰腺微循环的作用。袁玉峰 *et al*^[19] 观察到中药胰必清能有效降低全血黏度, 血浆黏度, 红细胞聚集指数, 红细胞压积等血液流变指标, 从而改善微循环。

1.3 中药单体 三七皂甙(panax notoginseng saponins, PNGS)能扩张血管, 改善微循环^[20]。葛忠 *et al*^[21] 给 SAP 大鼠股静脉注入 PNGS 20 mg/100 g, 观察到胰腺组织的病理损伤明显减轻, 血清淀粉酶、TXB₂ 和 TNF- α 水平显著降低($P < 0.05$)。大黄素能有效抑制血管活性物质如二十碳烯酸类的异常代谢、抗凝、抗血栓等, 从而改善微循环^[12]。吴建新 *et al*^[22] 通过实验研究证实大黄素治疗

SAP的机制与调整TXB₂等二十碳烯酸类的异常代谢,改善胰循环有关.川芎嗪能抑制血小板活化因子^[23],降低IL-6的表达,减少氧自由基的产生,从而改善微循环障碍^[24].常冬梅 *et al*^[25]将95例SAP患者随机分为两组,治疗组50例用川芎嗪注射液100 mL静滴,总有效率90.0%,与对照组相比有显著性差异($P<0.05$).灯盏花素使血管平滑肌松弛,扩张微动脉,改善微循环^[26].于德顺 *et al*^[27]将60例急性胰腺炎患者随机分为两组,治疗组用灯盏花素注射液,总有效率100%,各项指标均优于对照组($P<0.05$).银杏叶提取物还具有改善血液流变学,调节神经递质释放,以及增加缺血组织对氧及葡萄糖的供应量,降低血液黏稠度等多种生物学特性^[28],从而能改善胰腺及肠道的微循环.Yamaguchi *et al*^[29]用雨蛙肽诱导大鼠产生SAP后给予银杏叶提取物进行治疗,结果发现胰腺水肿、白细胞、淀粉酶、胰腺重量和PAF浓度均有显著改变.山莨菪碱可改善微循环,阻断M和 α 受体,改善花生四烯酸代谢,解除血管平滑肌痉挛,降低血管阻力.马兴刚 *et al*^[30]将60例SAP患者随机分为两组,治疗组每日持续静滴山莨菪碱40~100 mg.结果两组在平均腹痛缓解天数、住院天数及住院费用比较均有显著统计学差异($P<0.05$).

2 西药

2.1 血小板活化因子受体阻滞剂 血小板活化因子(platelet-activating factor, PAF)是迄今发现的最强的血小板聚集剂及最强的血管活性脂类递质.PAF主要由病灶局部或全身内皮细胞、巨噬细胞等分泌,肿瘤坏死因子、血栓素、白三烯、氧自由基和缓激肽等可刺激PAF产生.PAF具有重要的生物学效应,在AP的外分泌和局部的全身炎症反应中被作为关键性炎症递质^[31-32],参与体内“瀑布系统”即补体系统、激肽系统和凝血纤溶系统的激活.PAF通过活化血小板,促进血小板聚集,使血液黏稠度增加,血流速度减慢,血栓形成,引起毛细血管通透性增加,使血浆大量渗出,参与缺血-再灌注损伤,导致胰腺微循环障碍,并可刺激其他血管活性物质、细胞因子及炎症递质的产生,损伤腺泡细胞,促进胰酶的分泌和活化,进一步损伤胰腺^[33-35].PAF受体阻滞剂与PAF共同竞争受体,通过降低血中PAF浓度和PAF活性来抑制血小板聚集和降低毛细血管通透性,减少细胞因子和炎症递质产生,减轻胰腺组织因自我消化而产生的损伤^[36-40].Poitzik *et al*^[41]研究证明,PAF受体拮抗剂能够降低白细胞黏附,稳定毛细血管通透性,减少血浆渗出,增加血流速度.Wang *et al*^[42]发现Lexipafant(一种PAF受体拮抗剂)能减轻胰腺组织水肿,抑制胰腺白细胞浸润和血清白介素(IL)-1水平.

2.2 IL-10 IL-10主要来源于单核细胞^[43],此外T淋巴细胞也能产生少量IL-10,IL-10在AP发病过程有重要的保护作用,预防性注射IL-10能减轻AP损伤程度^[44],

降低SAP的严重性及死亡率^[45].IL-10能增加胰腺毛细血管血流量,改善胰腺微循环损伤^[46-47],抑制内毒素介导的促凝效果,阻断活化的巨噬细胞释放氧自由基(OFR)及一氧化氮(NO)^[48],通过诱导*bcl-2*基因表达而抑制胰腺腺泡细胞凋亡.Minter *et al*^[49]用酵母多糖诱发大鼠AP模型前,以载有人IL-10基因的腺病毒对大鼠进行微处理,发现IL-10可明显减轻促炎细胞因子反应,减轻胰腺及肝脏损伤程度,降低死亡率.Simovic *et al*^[50]在治疗18例水肿型AP患者和14例SAP患者过程中发现,IL-10/IL-6同IL-10/IL-8比例升高同病情改善成正比.

2.3 内皮素受体阻滞剂 内源性内皮素(ET)是由血管内皮细胞分泌释放的一种血管生物活性肽,体外实验证明ET几乎能够引起所有动脉和静脉收缩^[2],是迄今为止缩血管递质活性最强的一种.ET能使胰腺微血管持续痉挛,通过胰腺腺泡内皮素受体,促进钙离子内流,损伤胰腺组织细胞,并且收缩冠脉血管,影响心肌血供,减少心输出量,加重胰腺缺血,导致胰腺微循环障碍^[51-52].Plusczyk *et al*^[53]将ET-1滴注到大鼠胰腺表面,诱发胰腺微循环损害,包括红细胞速度降低,毛细血管直径缩小,功能毛细血管密度减少,胰腺严重水肿伴腺泡细胞坏死,提示ET-1可致胰腺微循环障碍.而内皮素受体阻滞剂能稳定毛细血管通透性,减少血浆渗出,改善微循环^[54-55].Eibl *et al*^[56-57]实验显示内皮素受体阻滞剂降低AP毛细血管的渗透率,改善微循环,且效果优于细胞间粘连分子抗体和PAF阻滞剂.

2.4 左旋精氨酸 一氧化氮(NO)具有多种生物学功能,能扩张血管,调节局部血流,抑制血小板聚集及白细胞黏附,降低血液黏稠度,改善微循环障碍,保护胰腺组织细胞^[58-62].Sandstrom *et al*^[63]在AP发生2 h后给予AR-C或L-NIL(一氧化氮合成剂)进行治疗,能明显降低血浆淀粉酶,减少腹水的产生,改善胰腺病变,因此对AP具有很好的保护作用.左旋精氨酸^[64-65]是生成NO前体,在体内经一氧化氮合成酶(NOS)作用后生成生物活性产物NO,可使组织血管扩张,使损伤后缺血缺氧情况得到改善.阻止NO生成会加重AP的病理过程^[66].Inagaki *et al*^[67]注意到使用NO合成酶抑制剂预处理,可使胰腺中积聚的中性粒细胞及失活细胞显著增加,提示NO对胰腺有保护作用.也有人认为NO引起难治性血管扩张,不宜使用^[68].Chen *et al*^[69]发现在用caerulein诱发胰腺之前使用NO合成酶抑制剂可显著减轻微循环障碍,且黏附白细胞数同胰腺NO水平明显正相关,提示抑制NO可产生保护胰腺微循环.Um *et al*^[70]也认为阻止NO的产生对减轻胰腺损伤有益.关于NO在AP微循环障碍中的应用仍有待于研究.

2.5 前列腺素I₂(PGI₂)/血栓素A₂(TXA₂)受体阻滞剂 PGI₂/TXA₂是一对血管张力调节递质,其平衡失调导致胰腺血管功能紊乱,微血栓形成致血管闭塞等病理变化^[71].TXA₂是强烈的微血管收缩剂和血小板聚集促进剂,可诱导血小

板变形、黏附, 导致凝血功能障碍, 使胰腺组织缺血的恶性循环更重, 细胞保护机制摧毁^[72-73], 还可促进中性粒细胞活化, 释放氧自由基, 导致血管内皮细胞损伤^[74]. PGI₂是血小板聚集抑制剂及血管松弛剂, 通过抑制血小板变形、黏附作用, 抑制白细胞激活, 保护溶酶体, 防止溶酶体向组织内释放来对抗TXA₂引起的胰腺微循环障碍和胰腺损伤^[75]. Hirano *et al*^[76]用TXA₂受体阻滞剂预处理, 可稳定胰腺毛细血管通透性, 改善AP微循环, 对实验性AP有治疗价值.

2.6 生长抑素 生长抑素是一种分布于脑、胃肠道、内外分泌腺等组织的环状多肽, 具有多种生物学效应, 能减少胰腺分泌的胰酶含量, 抑制胰酶活性, 保护胰腺腺泡细胞, 减轻内毒素血症, 抑制PAF及促炎细胞产生, 从而改善AP微循环障碍^[77], 减轻胰腺的病理损伤和促进胰腺的修复, 阻止疾病的进一步发展, 是目前公认有效治疗AP的药物. Plusczyk *et al*^[78]观察生长抑素能增加功能毛细血管密度及血细胞的血流速度, 保证毛细血管灌注量. 吴建新 *et al*^[79]实验表明外源性生长抑素可以明显阻遏急性坏死性胰腺炎 (ANP) 引起的胰腺组织微循环障碍、胰腺缺血, 从而减轻病理损害, 提高急性坏死性胰腺炎大鼠的生存率.

2.7 蛋白酶抑制剂 蛋白酶抑制剂具有抑制多种胰酶活性和炎症递质释放的药理作用, 减轻胰腺损伤和改善炎症因子引起的微循环障碍. 甲磺酸加贝酯能通过降低血清淀粉酶, 减少白细胞的黏附提高胰腺的血流灌注量, 来改善ET诱导的AP模型的微循环障碍^[80-81]. 乌司他丁 (一种蛋白酶抑制剂) 可以减少炎症递质的产生, 减轻各种胰酶对微循环血管内皮的损害, 从而改善AP时胰及胰外器官微循环障碍. 瞿建国 *et al*^[82]研究证实乌司他丁 (UTI) 组ANP大鼠制模后2 h及6 h后肺、肾及末端回肠血流量同未经治疗的ANP组比较均有明显增高 ($P<0.05$).

2.8 其他 Klar *et al*^[83]研究证明中低分子右旋糖酐能改善胰腺毛细血管的灌注量, 并阻止胰腺坏死的进展, 其机制可能是降低血液黏稠度, 扩充血容量来改善微循环. Keck *et al*^[84]观察到氧自由基清除剂可以减少白细胞黏附和细胞间粘连分子-1 (ICAM-1) 表达, 改善AP微循环障碍. Foitzik *et al*^[85]证实 ICAM-1 抗体可显著增加胰腺和结肠毛细血管血流量, 减少白细胞黏附, 稳定毛细血管通透性, 提高毛细血管血流速度, 改善微循环障碍, 减少器官损害. Dobosz *et al*^[86-87]实验证明肝素能改善AP时胰腺微循环障碍.

总之, 胰腺微循环障碍是AP病变过程中的一个关键环节, 通过改善微循环障碍可以减轻胰腺腺泡细胞的损伤和坏死, 以及AP造成的多脏器功能损害, 提高患者的生存率. 其治疗是否有效将直接影响AP的预后转归. 值得注意的是, 临床上使用禁食、胃肠减压、抑制胰液分泌、抗炎和对症支持治疗等常规治疗方法并不能使多

数AP患者病情得到满意控制, 改善微循环障碍必然成为治疗AP的一个重要措施, 但目前仍有许多问题有待于解决: (1) 虽然临床报道一些药物可用于改善微循环障碍, 但目前大多数药物尚处于实验研究阶段, 尚未得到临床充分论证, 是否能够广泛应用临床以及疗效如何尚须进一步研究. (2) 中药在改善AP微循环障碍中的应用已取得重大进展, 能有效降低AP并发症发生率及死亡率, 但中药改善微循环障碍的作用机制尚不清楚, 而且缺乏大规模、多中心、随机双盲对照试验. (3) 上述所列举的药物均是从化学方法治疗AP, 能否用物理方法来改善微循环障碍, 尚未见到研究报道. (4) AP时不仅胰腺本身发生微循环障碍, 同时并发其他脏器微循环障碍, 我们该怎样抓住临床最佳的治疗时机, 使AP造成的脏器损害降到最低. 尽管存在这些问题, 但随着对AP微循环障碍的重视以及研究水平的提高, 改善微循环将作为治疗AP的一个重要手段, 而且这方面的药物也必然会广泛应用于临床.

3 参考文献

- 1 Tiscornia OM, Hamamura S, Lehmann ES, Otero G, Waisman H, Tiscornia-Wasserman P, Bank S. Biliary acute pancreatitis: a review. *World J Gastroenterol* 2000;6:157-168
- 2 王兴鹏, 王国良, 巫协宁, 袁耀宗, 徐家裕. 急性胰腺炎血循环障碍的意义. *新消化病学杂志* 1997;5:55-56
- 3 Liu QF, Li SH. Influence of somatostatin analogue on pancreatic microflow in acute hemorrhagic pancreatitis in rats and its preventive necrotizing and therapeutic effect. *Wei Xunhuanxue Zazhi* 1996;6:3-5
- 4 田伏洲, 黎冬晖. 急性胰腺炎重型化的预防. *中国实用外科杂志* 1999;19:527-527
- 5 李鲁杨, 唐占府, 孔令钧. 复方丹参注射液对冠心病患者血小板活化率的影响. *山东中医杂志* 2001;20:204-205
- 6 秦仁义, 邹声泉, 吴在德, 裘法祖. 丹参对胆源性胰腺炎的防治作用. *中华实验外科杂志* 2000;17:330-330
- 7 赵晓晏, 夏时海, 郭萍, 周渝. 丹参治疗重症急性胰腺炎的血流变学及其相关指标的实验研究. *微循环学杂志* 2001;11:31-34
- 8 赵淑云, 尹旭斌. 复方丹参滴丸对冠心病患者血液流变学的影响. *现代中西医结合杂志* 2001;10:799-800
- 9 范林军, 顾红光, 王放川. 微循环障碍在急性出血坏死性胰腺炎病程中的作用及丹参的治疗效果. *普外基础与临床杂志* 1997;4:7-9
- 10 阮利群, 蔡爱群. 丹参注射液治疗重症胰腺炎 72 例疗效观察. *浙江预防医学* 2003;15:78
- 11 汤一新, 张晓东, 钱玲. 手术后静滴复方丹参注射液治疗重病胰腺炎的临床观察. *中西医结合实用临床急救* 1997;4:159-160
- 12 吴建新, 徐家裕, 袁耀宗. 大黄素与善得定对重症胰腺炎胰腺缺血的影响及机制. *中国中西医结合杂志* 1997;17:356-359
- 13 Zhao YQ, Liu XH, Ito T, Qian JM. Protective effects of rhubarb on experimental severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004;10:1005-1009
- 14 杨正安, 陆宏伟. 大黄对重症急性胰腺炎的治疗价值研究. *中国急救医学* 2001;21:717
- 15 韩丽雅, 蔡定芳. 刺五加注射液治疗急性脑梗塞的临床与实验研究. *中国中西医结合杂志* 1998;18:472-474
- 16 汪宝林, 潘林祥, 王志琪. 刺五加对小鼠急性胰腺炎的保护作用实验研究. *南京医科大学学报* 2001;21:344-345
- 17 侯以岸, 王宇, 薛建国. 中药腹腔灌注对家兔急性出血坏死性胰腺炎血流变学影响的实验研究. *新消化病学杂志* 1997;5:297-298
- 18 周总光, 程中, 孙伟, 舒华, 陈友岱, 王容, 彭雪梅, 张肇达. 中药复方“清下二号”对急性水肿性胰腺炎局部微循环损伤的作用. *中华实验外科杂志* 2001;18:298-300
- 19 袁国峰, 刘志苏, 艾立中, 钱群, 孙权. 中药胰必清对急性坏死性胰

- 腺炎免疫微循环障碍的治疗作用. 武汉大学学报(医学版) 2003;24:350-352
- 20 朱绍兴, 曹宁生, 王家翠, 石勇刚, 马鸿钧. 三七皂甙对肾缺血再灌注损伤保护作用的研究. 中华泌尿外科杂志 1995;16:273-276
 - 21 葛忠, 张东生, 胡义利, 王. 三七皂甙和普宁对大鼠急性重症胰腺炎治疗作用的比较研究. 中国现代医学杂志 2002;12:17-19
 - 22 吴建新, 徐家裕, 袁耀宗. 人黄素与善得定对重症胰腺炎二十碳烯酸类代谢的影响. 中华实验外科杂志 1997;14:215-216
 - 23 李红红, 周晓, 杨荣源. 川芎嗪对急性胰腺炎患者血小板活化因子的影响. 湖南中医药导报 2002;8:656-657
 - 24 李勇, 毛连波, 张学明, 肖刚, 赵群, 范立桥, 赵雪峰, 焦志凯, 张志栋, 丁跃明, 马志学, 刘品. 急性胰腺炎合并肝损伤时 IL-6、氧自由基变化及 IL-2、川芎嗪干预的实验研究. 中国中西医结合外科杂志 2002;8:111-114
 - 25 常冬梅, 谷元江, 张信成. 川芎嗪注射液治疗急性胰腺炎 50 例疗效观察. 长春中医学院学报 2003;19:40-41
 - 26 徐龙尧. 云南红盏花素注射液治疗脑梗塞 67 例. 中国中西医结合杂志 2001;21:227-228
 - 27 丁德顺, 彭引平, 李海峰. 灯盏花素治疗急性胰腺炎 30 例. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊8):112
 - 28 谢培山. 银杏叶标准提取物 EGb761 及银杏叶制剂的质量评价. 中国中药杂志 1999;24:3-5
 - 29 Yamaguchi Y, Matsumura F, Liang J, Okabe K, Matsuda T, Ohshiro H, Ishihara K, Akizuki E, Yamada S, Ogawa M. Platelet-activating factor antagonist (TCV-309) attenuates the priming effects of bronchoalveolar macrophages in cerulein-induced pancreatitis rats. *Pancreas* 1999;18:355-363
 - 30 马兴刚, 王昌成, 朱九成. 持续静滴山莨菪碱治疗重症急性胰腺炎 60 例病例对照研究. 胰腺病学 2003;3:167-169
 - 31 Howard KM, Olson MS. The expression and localization of plasma platelet-activating factor acetylhydrolase in endotoxemic rats. *J Biol Chem* 2000;275:19891-19896
 - 32 Asai Y, Nomura T, Murahashi N, Iwamoto K. Characterization of the physicochemical properties of the micelles of platelet-activating factor (C18:0). *Drug Dev Ind Pharm* 2000;26:671-674
 - 33 Kingsnorth AN. Platelet-activating factor. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996;219:28-31
 - 34 Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000;190:117-125
 - 35 Wang H, Tan X, Chang H, Gonzalez-Crussi F, Remick DG, Hsueh W. Regulation of platelet-activating factor receptor gene expression in vivo by endotoxin, platelet-activating factor and endogenous tumour necrosis factor. *Biochem J* 1997;322:603-608
 - 36 Lane JS, Todd KE, Gloor B, Chandler CF, Kau AW, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW. Platelet activating factor antagonism reduces the systemic inflammatory response in a murine model of acute pancreatitis. *J Surg Res* 2001;99:365-370
 - 37 Kusuhaara H, Yamaguchi S, Matsuyuki H, Sugahara K, Komatsu H, Terasawa M. Y-24180, an antagonist of platelet-activating factor, suppresses interleukin 5 production in cultured murine th (2) cells and human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 2000;12:1120-1123
 - 38 Loucks EB, Qayumi AK, Godin DV, English JC, Lim SP, Al Mahmeed T, Gul S. Therapeutic potential of platelet-activating factor antagonism in the management of myocardial infarction. *Can J Cardiol* 2000;16:497-504
 - 39 Sun Z, Wang X, Deng X, Lasson A, Soltesz V, Borjesson A, Andersson R. Beneficial effects of lexipafant, a PAF antagonist on gut barrier dysfunction caused by intestinal ischemia and reperfusion in rats. *Dig Surg* 2000;17:57-65
 - 40 Bastos da Silva M, Delaunois A, Gustin P, Godeau JM, Lekeux P. In vitro inhibitory effect of SR 27417, a potent platelet-activating factor (PAF) receptor antagonist, on the PAF-induced bovine platelet aggregation. *Vet Res* 2000;31:267-272
 - 41 Foitzik T, Hotz HG, Eibl G, Hotz B, Kirchengast M, Buhr HJ. Therapy for microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: effectiveness of platelet-activating factor receptor blockade vs. endothelin receptor blockade. *J Gastrointest Surg* 1999;3:244-251
 - 42 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 with acute hemorrhagic pancreatitis. *Int J Pancreatol* 1999;25:45-52
 - 43 Demols A, Van Laethem JL, Quertinmont E, Degraef C, Delhay M, Geerts A, Deviere J. Endogenous interleukin-10 modulates fibrosis and regeneration in experimental chronic pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:1105-1112
 - 44 Deviere J, Le Moine O, Van Laethem JL, Eisendrath P, Ghilain A, Severs N, Cohard M. Interleukin 10 reduces the incidence of pancreatitis after therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Gastroenterology* 2001;120:498-505
 - 45 Zou WG, Wang DS, Lang MF, Jin DY, Xu DH, Zheng ZC, Wu ZH, Liu X. Human interleukin 10 gene therapy decreases the severity and mortality of lethal pancreatitis in rats. *J Surg Res* 2002;103:121-126
 - 46 Menger MD, Plusczyk T, Vollmar B. Microcirculatory derangements in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001;8:187-194
 - 47 Warzecha Z, Dembinski A, Konturek PC, Ceranowicz P, Konturek SJ, Tomaszewska R, Schuppan D, Stachura J, Nakamura T. Hepatocyte growth factor attenuates pancreatic damage in cerulein-induced pancreatitis in rats. *Eur J Pharmacol* 2001;430:113-121
 - 48 Pradier O, Gerard C, Delvaux A, Lybin M, Abramowicz D, Capel P, Velu T, Goldman M. Interleukin-10 inhibits the induction of monocyte procoagulant activity by bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Immunol* 1993;23:2700-2703
 - 49 Minter RM, Ferry MA, Murday ME, Tannahill CL, Bahjat FR, Oberholzer C, Oberholzer A, LaFace D, Hutchins B, Wen S, Shinoda J, Copeland EM 3rd, Moldawer LL. Adenoviral delivery of human and viral IL-10 in murine sepsis. *J Immunol* 2001;167:1053-1059
 - 50 Simovic MO, Bonham MJ, Abu-Zidan FM, Windsor JA. Anti-inflammatory cytokine response and clinical outcome in acute pancreatitis. *Crit Care Med* 1999;27:2662-2665
 - 51 Zhao HP, Wang WX, Yang CW, Shou NY. Therapeutic effects of naltrexone in plasma endotoxin in experimental acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:400-402
 - 52 Ren XB, He ZP, Feng HF, Duan HC. Changes of plasma ET/NO ratio and their relationship with pancreatic blood flow during acute pancreatitis in rats. *Disan Junyi Daxue Xuebao* 1999;21:344-346
 - 53 Plusczyk T, Bersal B, Westermann S, Menger M, Feifel G. ET-1 induces pancreatitis-like microvascular deterioration and acinar cell injury. *J Surg Res* 1999;85:301-310
 - 54 Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates. *Surgery* 2000;128:399-407
 - 55 Foitzik T, Hotz HG, Eibl G, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin receptor block in acute pancreatitis--improvement of microcirculation and decrease of capillary permeability also distant from the pancreas. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998;115:427-429
 - 56 Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ, Foitzik T. Effect of endothelin and endothelin receptor blockade on capillary permeability in experimental pancreatitis. *Gut* 2000;46:390-394
 - 57 Eibl G, Buhr HJ, Foitzik T. Therapy of microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: what mediators should we block? *Intensive Care Med* 2002;28:139-146
 - 58 Stoclet JC, Muller B, Andriantsitohaina R, Kleschyov A. Overproduction of nitric oxide in pathophysiology of blood vessels. *Biochemistry (Mosc)* 1998;63:826-832
 - 59 Endlich K, Muller C, Barthelmebs M, Helwig JJ. Role of shear

- stress in nitric oxide-dependent modulation of renal angiotensin II vasoconstriction. *Br J Pharmacol* 1999;127:1929-1935
- 60 Olszanecki R, Chlopicki S. Endotoxaemia in rats: role of NO, PAF and TXA2 in pulmonary neutrophil sequestration and hyperlactataemia. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:443-454
 - 61 Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Heliadis N, Herodotou A, Hatjopoulou E, Petridou E, Sarris K. The implication of nitric oxide in the process of bacterial translocation. *Int Surg* 2000; 85:23-26
 - 62 Werner J, Fernandez-del Castillo C, Rivera JA, Kollias N, Lewandowski KB, Rattner DW, Warshaw AL. On the protective mechanisms of nitric oxide in acute pancreatitis. *Gut* 1998;43:401-407
 - 63 Sandstrom P, Brooke-smith ME, Thomas AC, Grivell MB, Saccone GT, Toouli J, Svancvik J. Highly selective inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2005;30:e10-e15
 - 64 王万铁, 王卫, 徐正衿, 林丽娜, 李东. 肝缺血-再灌注损伤中脂质过氧化反应及左旋精氨酸的干预作用. *中国危重病急救医学* 2003;15:91-93
 - 65 朱永安, 张西洲, 哈振德, 张芳, 韩敏, 朱金山. 左旋精氨酸治疗高原肺水肿患者血流动力学观察. *中国急救医学* 2002;22:217-218
 - 66 Dobosz M, Hac S, Mionskowska L, Dymecki D, Dobrowolski S, Wajda Z. Organ microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. A role of nitric oxide. *Physiol Res* 2004;9
 - 67 Inagaki H, Nakao A, Kurokawa T, Nonami T, Harada A, Takagi H. Neutrophil behavior in pancreas and liver and the role of nitric oxide in rat acute pancreatitis. *Pancreas* 1997;15: 304-309
 - 68 Dobosz M, Wajda Z, Hac S, Mysliwska J, Bryl E, Mionskowska L, Roszkiewica A, Mysliwski A. Nitric oxide, heparin and procaine treatment in experimental ceruleine-induced acute pancreatitis in rats. *Arch Immunol Ther (Warsz) Exp* 1999;47: 155-160
 - 69 Chen HM, Shyr MH, Lau YT, Hwang TL, Chen MF. Leukocyte-endothelial adherence correlates with pancreatic nitric oxide production in early cerulein-induced pancreatitis in rats. *Shock* 1998;10:218-222
 - 70 Um SH, Kwon YD, Kim CD, Lee HS, Jeon YT, Chun HJ, Lee SW, Choi JH, Ryu HS, Hyun JH. The role of nitric oxide in experimental cerulein induced pancreatitis. *J Korean Med Sci* 2003;18:520-526
 - 71 Iida T, Yokoi H, Kawarada Y. The effects of a thromboxane A2 synthesis inhibitor and a prostaglandin I2 analogue on experimental acute necrotizing pancreatitis in rats. *Pancreas* 1998;17:140-147
 - 72 Mao EQ, Zhang SD, Han TQ, Wang JC, Zhang CL. Pancreatic ischemia a continuous injury factor in acute necrotic pancreatitis. *Zhonghua Waik Zazhi* 1997;35:150-152
 - 73 Wang KH, Liao JX, Li DH, Liao XW, Qi MH. The changes of plasmic TXA2 and PGI2 of rats with severe acute pancreatitis by different vascular perfusion of drug of improving-microcirculation. *Zhonghua Shiyao Waik Zazhi* 1998;15:396-398
 - 74 Zhou XZ, Mao QS, Chen YQ, Shen HX. Relation between pathology and oxygen free radicals in acute pnacreatitis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:108-109
 - 75 Sun CL, Li JS, Zhu WM, Wang JJ. The influence of prostoglandin E1 on the pancreatic blood flow during acute necrotizing pancreatitis in rats. *Zhongguo Weizhongbing Jijiu Yixue* 1998;10: 154-157
 - 76 Hirano T, Hirano K. Thromboxane A2 receptor antagonist prevents pancreatic microvascular leakage in rats with caerulein-induced acute pancreatitis. *Int J Surg Investig* 1999; 1:203-210
 - 77 Wu JX, Yuan YZ, Xu JY, Xia ZQ, Qin LF, Zheng ZL, Li DG, Lu HM. Changes in somatostatin receptor expression of the pancreas and effectiveness of octreotide in rats with acute necrotizing pancreatitis. *Chin J Dig Dis* 2004;5:35-39
 - 78 Plusczyk T, Rathgeb D, Westermann S, Feifel G. Somatostatin attenuates microcirculatory impairment in acute sodium taurocholate-induced pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1998;43:575-585
 - 79 吴建新, 王兴鹏, 徐家裕, 袁耀宗, 秦兰芬. 外源性生长抑素对正常和急性坏死型胰腺炎胰血流量的影响. *中国病理生理杂志* 2001; 17:830-833
 - 80 Chen HM, Hwang TL, Chen MF. The effect of gabexate mesilate on pancreatic and hepatic microcirculation in acute experimental pancreatitis in rats. *J Surg Res* 1996;66:147-153
 - 81 Chen HM, Shyr MH, Chen MF. Gabexate mesilate improves pancreatic microcirculation and reduces lung edema in a rat model of acute pancreatitis. *J Formos Med Assoc* 1997;96: 704-709
 - 82 瞿建国, 张建新, 程国祚. 急性坏死性胰腺炎胰外器官微循环改变及乌司他丁的影响. *中国普外基础与临床杂志* 2003;10:234-235
 - 83 Klar E, Mall G, Messmer K, Herfarth C, Rattner DW, Warshaw AL. Improvement of impaired pancreatic microcirculation by isovolemic hemodilution protects pancreatic morphology in acute biliary pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1993;176:144-150
 - 84 Keck T, Werner J, Banafsche R, Stalman A, Schneider L, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Oxygen radicals promote ICAM-1 expression and microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis. *Pancreatolgy* 2003;3:156-163
 - 85 Foitzik T, Eibl G, Buhr HJ. Therapy for microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: comparison of delayed therapy with ICAM-1 antibodies and a specific endothelin A receptor antagonist. *J Gastrointest Surg* 2000;4:240-246
 - 86 Dobosz M, Wajda Z, Hac S, Mysliwska J, Mionskowska L, Bryl E, Roszkiewicz A, Mysliwski A. Heparin and nitric oxide treatment in experimental acute pancreatitis in rats. *Forum (Genova)* 1998;8:303-310
 - 87 Dobosz M, Mionskowska L, Hac S, Dobrowolski S, Dymecki D, Wajda Z. Heparin improves organ microcirculatory disturbances in caerulein-induced acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2004;10:2553-2556

编辑 王谨晖 审读 张海宁

原发性肝癌合并肝硬化脾功能亢进的外科治疗

范应方, 聂晶, 黄宗海, 方驰华

范应方, 黄宗海, 方驰华, 南方医科大学附属珠江医院普通外科
广东省广州市 510282
聂晶, 广州市海珠区红十字会医院妇产科 广东省广州市 510250
通讯作者: 范应方, 510282, 广东省广州市, 南方医科大学附属珠江医院普
外科. fan_xifan@yahoo.com.cn
电话: 020-61643211
收稿日期: 2005-04-20 接受日期: 2005-05-14

摘要

原发性肝癌有 75-90% 合并有肝硬化, 11-33% 继发性脾脏肿大和脾功能亢进. 脾亢的存在, 增加了手术的风险, 影响患者的预后, 因此, 肝癌合并肝硬化脾功能亢进是肝癌外科治疗的难题. 近年来, 随着对脾脏生理功能、肿瘤免疫功能方面的基础及临床研究的全面深入, 人们认识到脾脏在抗肿瘤免疫中发挥重要作用, 但其抗肿瘤作用具有双相性. 在肿瘤早期, 脾脏具有抗肿瘤作用, 宜予保留; 晚期, 脾脏不仅无功能且表现为负性免疫作用. 对肝癌合并肝硬化脾功能亢进患者行同期联合切除, 不仅可改善术后肝功能, 还可减少肝癌复发转移, 提高远期疗效. 而且切脾后可纠正脾亢所致的外周血白细胞、血小板的减少, 提高术后预防性和治疗性栓塞化疗的安全性.

范应方, 聂晶, 黄宗海, 方驰华. 原发性肝癌合并肝硬化脾功能亢进的外科治疗. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1872-1874
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1872.asp>

0 引言

外科手术技巧的不断提高以及围手术期处理的日趋完备, 使肝癌切除手术安全性大大提高, 死亡率已明显下降. 但原发性肝癌有 75-90% 合并有肝硬化, 11-33% 继发性脾脏肿大和脾功能亢进^[1]. 由于脾亢所致的血小板减少和凝血功能障碍, 术中及术后可能出现难以控制的出血, 增加了手术的风险. 另外, 肝硬化的存在、肝功能的损害、手术创伤、术中的大量出血及输血, 均能影响患者的预后. 因此, 肝癌合并肝硬化脾功能亢进一直是肝癌外科治疗的难题. 在肝癌切除的同时究竟脾脏切除与否, 目前存在两种观点: 一方面学者认为, 切除脾脏增加了手术风险, 如术中出血、胰腺、肾上腺损伤等; 破坏了机体的防御功能, 易发生术后凶险感染及肿瘤复发等; 同时快速回升的血小板使术后门静脉血栓发生率增高, 从而对切脾持否定态度^[2]. 另一方面则认为, 切脾能使血小板、白细胞计数值迅速回升、改善肝功能、增强机体免疫功能, 同期行肝脾切除对肝癌合并肝硬化脾功能亢进是有益的^[3].

近年来, 随着脾脏生理功能、肿瘤免疫功能方面基

础及临床研究的全面深入, 使人们认识到对肝癌合并肝硬化脾功能亢进患者同期联合切除, 不仅可改善术后肝功能, 还可减少肝癌复发转移, 提高远期疗效. 本文就近年肝癌合并肝硬化脾功能亢进外科治疗方面的进展做一综述.

1 脾脏的免疫功能

脾脏是机体最大的免疫器官, 占全身淋巴组织总量的 25%, 含有大量的淋巴细胞和巨嗜细胞, 是机体细胞免疫和体液免疫的中心, 通过多种机制发挥抗肿瘤作用. 脾脏切除导致细胞免疫和体液免疫功能的紊乱, 影响肿瘤的发生和发展.

1.1 促吞噬素(Tufts) Tufts 是美国 Tufts 大学教授 Najjara 于 1970 年首次发现的一种四肽物质, 目前已知脾脏是体内 Tufts 的唯一来源. Tufts 作为一个参与免疫调节的体液因子, 具有显著的抗肿瘤作用, 通过激活多核白细胞、单核细胞、巨嗜细胞, 提高他们的吞噬、游离及产生细胞毒的功能, 增强机体细胞免疫功能^[4]. 除此之外, 脾脏还产生其他多种免疫因子, 促进吞噬作用, 清除体内外抗原, 这是切脾后凶险感染综合征(OPSI) 的原因所在, 也是保脾手术的理论依据^[5].

1.2 B 淋巴细胞 B 淋巴细胞约占脾内淋巴细胞总数的 55%, 在肿瘤抗原刺激下转化为浆细胞, 继而分泌特异性抗肿瘤的免疫球蛋白 IgG, 且具有抗原提呈能力. 研究发现, 脾脏切除后, 机体免疫球蛋白含量异常且血清 IgM 水平明显下降, 从而影响肿瘤的发生、发展^[6].

1.3 T 淋巴细胞 脾脏拥有全身循环 T 淋巴细胞的 25%, 直接参与细胞免疫, 并对外周血中 T 细胞亚群的分布有重要调节作用. 脾脏对 T 淋巴细胞免疫的调节作用是肿瘤免疫的一个重要环节. 脾脏切除后, 外周血 T 淋巴细胞亚群发生改变, 辅助性 T 淋巴细胞的 (Th) 数量减少, 抑制性 T 淋巴细胞 (Ts) 数量相对增高, 导致肿瘤免疫抑制^[7].

1.4 巨噬细胞 脾脏中大量的巨噬细胞具有强大的吞噬抗原颗粒的作用, 还可作为抗原提呈细胞 (APC), 调节和增强免疫应答. 除自身能释放肿瘤坏死因子 (TNF)、IFN、IL-1 等活性物质直接参与抗肿瘤作用外, 还能调节细胞毒素 T 淋巴细胞 (CTL)、淋巴因子激活的杀伤细胞 (LAK) 细胞的抗肿瘤作用, 具有广泛的免疫感应及效应功能^[7].

1.5 树突状细胞 (DC)、自然杀伤 (NK) 细胞和 LAK DC 具有比巨噬细胞更强的抗原提呈能力, 作为 APC 参与细胞免疫和体液免疫. LAK 细胞对自体或异体的肿瘤细胞

均有很强的杀伤作用,能非特异性地杀伤多种对NK细胞、CTL不敏感的肿瘤细胞,在抗肿瘤中也发挥着重要作用^[7].

2 脾脏抗肿瘤免疫的双相性

脾脏的解剖结构是发挥其功能的形态学基础.目前,国内外多数学者认为,脾脏中大量的免疫活性细胞及其产生的免疫因子,在抗肿瘤免疫中发挥重要作用,但脾脏的抗肿瘤作用具有双相性.

脾脏中不仅有大量的CD4⁺等免疫活性细胞,同时又是CD8⁺和抑制性巨噬细胞分化、增殖的场所,不仅能产生大量的免疫因子,也能产生免疫抑制因子、前列腺素等抑制免疫功能的物质.正常情况下,脾脏的正性免疫作用和负性免疫作用处于相对平衡稳定状态.当脾脏淋巴细胞最初接触肿瘤抗原后,释放大量的淋巴因子、抗体,并激活免疫细胞,使脾脏正性免疫作用增强,从而抑制肿瘤的发生和发展.随着肿瘤的进展,肿瘤产生的免疫抑制因子增多及体内激素(如糖皮质激素、前列腺素等)的增多,使脾脏乃至整个机体内抑制性T细胞、抑制性巨噬细胞的活性增强,CD4⁺/CD8⁺下降,B淋巴细胞增殖及产生抗体的能力减弱,脾脏释放免疫抑制因子增多.此时脾脏呈负性免疫状态,导致肿瘤免疫抑制^[8-9].

对于肝硬化门静脉高压合并脾功能亢进患者,纤维化脾脏免疫功能低下,脾切除可改善患者的免疫状况.而对于肝癌合并脾功能亢进患者,行肝癌切除过程中是否应同时切除脾脏?脾切除后对细胞免疫功能将产生那些影响?吴仕和^{et al}^[10]研究表明肝癌合并肝硬化脾亢时,脾严重纤维化,I型胶原较正常脾组织显著增生,Tufts水平明显下降甚至消失,脾脏免疫功能严重下降;另一方面,肝癌在其生长过程中可能释放免疫抑制因子,使CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺显著降低,CD8⁺增加,脾脏呈负性免疫状态.切脾后CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺显著增加,不但没有破坏机体T细胞亚群和Th细胞平衡,反而改善了机体抗肿瘤的免疫能力^[11-12].以上研究表明在肿瘤早期,脾脏具有抗肿瘤作用,应予保留;肿瘤发展至进展期,脾脏不仅无功能,且表现为负性免疫作用,应予切除.

3 肝癌免疫功能变化

肝癌患者在免疫网络的各个环节上均存在不同程度的免疫紊乱或缺陷,主要以细胞免疫改变为主.特异性抗肿瘤免疫的启动需要APC,尤其是DC细胞,递呈内源性和外源性抗原.肝癌患者肿瘤细胞可通过分泌某些肿瘤细胞抑制因子抑制宿主DC表面HLA-DR及B7表达,使肿瘤逃避免疫监视^[13-15].

CD4⁺T细胞合成释放IL-2杀伤肿瘤细胞,CD8⁺则直接抑制B细胞合成抗体,也可抑制Tc的辅助功能而导致免疫抑制.研究表明,肝硬化脾功能亢进时,机体细

胞免疫功能下降,表现为淋巴细胞减少和T细胞亚群及NK细胞的数量与功能的异常,血清IL-2水平,CD4⁺/CD8⁺比值明显低于正常人群,而SIL-2R、IL-6、TNF α 水平则较正常人明显为高^[16-17].

CD4⁺T细胞数量减少或功能缺陷,导致IL-2水平降低,而正常血清IL-2水平是维持CD4⁺T细胞、B细胞、NK细胞等正常功能的重要条件,二者相互影响,形成恶性循环,导致病情发展.曹志新^{et al}^[9]研究发现肝癌患者外周血CD4⁺T细胞数量减少,CD4⁺/CD8⁺比值下降,而脾静脉血中,CD4⁺/CD8⁺比值下降更加明显,伴有NK和LAK功能异常,尤其是中晚期肝癌患者差异显著.他进一步研究表明,在肝癌早期,脾脏分泌CD4⁺T细胞来源的Th1细胞因子IL-2、IFN- γ 发挥抗肿瘤免疫功能,但随肿瘤进展,机体Th1/Th2平衡紊乱,机体免疫功能受抑.脾脏出现了Th1细胞向Th2细胞方向偏移,加重了机体Th1/Th2紊乱,加重了机体抗肿瘤免疫抑制,脾脏呈负性抗肿瘤免疫作用.不仅如此,Th2产生的IL-10抑制肝细胞的再生,提示脾脏中存在抑制因素,导致免疫功能受抑制^[18].

4 切脾对肝癌合并肝硬化脾功能亢进患者手术、免疫功能及预后的影响

4.1 对手术安全性影响 研究表明,对肝癌合并肝硬化脾亢患者联合行病理性脾脏切除,可使血小板在脾脏中破坏减少,增加血清中血小板生成素,减少血小板相关抗体,提高血小板数量,增加其聚集性.同时提高纤维蛋白原含量,改善凝血功能,减少术中、术后出血,可提高手术安全性.切脾还能降低血清胆红素水平,改善肝功能^[11].汪谦^{et al}^[19]对20例原发性肝癌并脾亢患者联合肝脾切除,全组无死亡,黄疸及腹水出院时消失,术后1wk血小板,白细胞显著升高,认为肝脾联合切除安全可行.Tomikawa^{et al}^[20]则研究表明,肝癌切除后,门静脉压力往往升高,极易发生术后食管静脉曲张破裂出血,而切脾后,减少了入肝血量,降低了门脉压力,避免了术后的上消化道出血.

4.2 对预后的影响 Chen^{et al}^[21]将204例肝癌合并肝硬化脾功能亢进患者分成肝癌切除+脾切除组(94例)和单纯肝癌切除,即不切脾组(110例),比较两组患者手术后WBC、PLT、血清总胆红素、免疫功能的变化、并发症和术后5a生存情况.结果表明行肝脾联合切除可促进机体T细胞亚群和Th细胞恢复平衡,WBC和PLT计数恢复正常,可减轻术后肝脏胆红素代谢负担,有利于肝功能恢复,术后并发症发生率并不增加,而术后5a无瘤生存率却明显提高.蔡建强^{et al}^[22]比较57例肝脾联合切除组(A组)和45例单纯切脾组(B组)的疗效,结果表明术后血小板、白细胞及谷氨酰转肽酶(GGT)A组明显好于B组,A组1、3、5a生存率为92.6%、59.1%、41.8%,B组相应为80.3%、43.9%、29.1%,A组复发患者平均带瘤生存期12.9mo

明显长于B组的6.3 mo ($P<0.01$). Wu *et al*^[23]研究也表明,肝脾联合切除组虽然术后肝功能差,但无瘤生存率却好于单纯切肝组. Lin *et al*^[24]报道肝癌合并肝硬化患者行同期肝脾联合切除,其5 a生存率达66.7%,明显高于单纯肝切除组. 肝癌术后易复发,由于种种原因不能再次手术,而切脾后纠正了脾亢所致的外周血白细胞、血小板的减少,可提高术后预防性和治疗性栓塞化疗的安全性.

4.3 对免疫功能的影响 研究表明,原发性肝癌合并肝硬化脾亢的患者,肝脾联合切除后,白细胞、血小板计数明显升高,转氨酶(ALT、AST)逐渐升高,肝功能明显改善^[19]. T细胞亚群CD4、CD4/CD8高于术前($P<0.01$ 、 $P<0.05$). Th细胞因子IL-2、INF升高而IL-10下降($P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.05$),机体免疫状态明显改善,而围手术期死亡率无明显差异^[25]. 因此中晚期肝癌患者在根治性切除肿瘤的同时合理脾切除,不仅不会降低机体细胞免疫功能,反而在某种程度上改善其对机体的免疫抑制,提高机体抗肿瘤免疫功能,有利于手术后肝细胞再生和肝功能恢复,并对预防肝癌术后复发和转移可能起一定作用^[25].

5 存在问题

肝癌合并肝硬化脾功能亢进的外科治疗目前趋于积极的手术治疗,但还有许多问题有待解决,如应从解剖学和肿瘤免疫学角度,对脾亢在肝癌发生、发展过程中造血功能和免疫功能的变化进一步研究;在治疗方法上,同期或分步治疗、手术切除、脾动脉结扎或脾动脉栓塞哪一种效果较好;对联合切脾与单独切肝患者预后的比较上,目前均为小样本的回顾性研究,国内外尚缺乏大样本随机性和前瞻性的研究,难以得出令人信服的结论等. 对上述问题的深入研究,不仅可极大地丰富现代肝脾外科内容,也将为肝脾外科的临床治疗提供更加科学的理论依据.

6 参考文献

- 1 Yu MW, Hsu FC, Sheen IS, Chu CM, Lin DY, Chen CJ, Liaw YF. Prospective study of hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis in asymptomatic chronic hepatitis B virus carriers. *Am J Epidemiol* 1997;145:1039-1047
- 2 Waghorn DJ. Overwhelming infection in asplenic patients: current best practice preventive measures are not being followed. *J Clin Pathol* 2001;54:214-218
- 3 Sugawara Y, Yamamoto J, Shimada K, Yamasaki S, Kosuge T, Takayama T, Makuuchi M. Splenectomy in patients with hepatocellular carcinoma and hypersplenism. *J Am Coll Surg* 2000;90:446-450
- 4 Trevisani F, Castelli E, Foschi FG, Parazza M, Loggi E, Bertelli M, Melotti C, Domenicali M, Zoli G, Bernardi M. Impaired tuftsin activity in cirrhosis: relationship with splenic function and clinical outcome. *Gut* 2002;50:707-712
- 5 Davidson RN, Wall RA. Prevention and management of infections in patients without a spleen. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:657-660
- 6 Skelsey ME, Mayhew E, Niederkorn JY. Splenic B cells act as antigen presenting cells for the induction of anterior chamber-associated immune deviation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:5242-5251
- 7 易坚, 邹志森. 脾脏与肿瘤免疫. *实用癌症杂志* 1999;14:239-240
- 8 姚英民, 刘青光, 杨威, 张梅, 马清浦, 潘承恩. 肝癌合并肝硬化时脾脏对机体免疫状态影响的实验研究. *中华肝胆外科杂志* 2002;8:428-430
- 9 曹志新, 陈孝平, 吴在德. 肝癌合并肝硬化患者脾脏T细胞亚群免疫状态的研究. *中国普通外科杂志* 2002;11:361-363
- 10 吴仕和, 仇登波, 黄韬. 门脉高压症患者脾脏免疫学研究. *湖南医学* 2001;18:1-4
- 11 Cao ZX, Chen XP, Wu ZD. Effects of splenectomy in patients with cirrhosis undergoing hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2460-2463
- 12 Cao ZX, Chen XP, Wu ZD. Changes of immune function in patients with liver cirrhosis after splenectomy combined with resection of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003;2:562-565
- 13 Lau AH, Thomson AW. Dendritic cells and immune regulation in the liver. *Gut* 2003;52:307-314
- 14 廖晓峰, 易继林. 树突状细胞与肝癌免疫治疗进展. *肝胆外科杂志* 2003;11:395-397
- 15 曹雪涛. 树突状细胞与肝癌的免疫治疗. *中华肝胆病杂志* 2003;11:133-134
- 16 孔丽, 姚树坤, 刘金星, 王娜. 原发性肝癌患者细胞免疫功能变化及其与转归的关系. *中华肝胆病杂志* 2005;13:194-195
- 17 曹驰, 李彩霞. 原发性肝癌的免疫状态与预后的相关性分析. *肿瘤防治杂志* 2004;11:127-130
- 18 曹志新, 陈孝平, 吴在德. 肝癌合并肝硬化患者脾脏Th1/Th2细胞因子免疫状态的研究. *中华实验外科杂志* 2001;18:518-519
- 19 汪谦, 李湘斌, 陈俊任, 梁力建. 肝癌合并有脾亢的外科治疗. *消化外科* 2004;3:319-321
- 20 Tomikawa M, Hashizume M, Akahoshi T, Shimabukuro R, Gotoh N, Ohta M, Sugimachi K. Effects of splenectomy on liver volume and prognosis of cirrhosis in patients with esophageal varices. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:77-80
- 21 Chen XP, Wu ZD, Huang ZY, Qiu FZ. Use of hepatectomy and splenectomy to treat hepatocellular carcinoma with cirrhotic hypersplenism. *Br J Surg* 2005;92:334-339
- 22 蔡建强, 胡敬群, 毕新宇, 赵建军, 车旭, 解世亮, 邵永孚, 赵平. 肝脾联合切除治疗肝癌合并肝硬化脾功能亢进的远期疗效. *中华医学杂志* 2004;84:6-8
- 23 Wu CC, Cheng SB, Ho WM, Chen JT, Yeh DC, Liu TJ, P'eng FK. Appraisal of concomitant splenectomy in liver resection for hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients with hypersplenic thrombocytopenia. *Surgery* 2004;136:660-668
- 24 Lin MC, Wu CC, Ho WL, Yeh DC, Liu TJ, P'eng FK. Concomitant splenectomy for hypersplenic thrombocytopenia in hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999;46:630-634
- 25 曹志新, 陈孝平, 吴在德. 肝癌合并肝硬化患者脾脏切除后机体免疫状态的变化. *中华普通外科杂志* 2002;17:413-414

自身免疫重叠综合征

陈 嵩, 王宇明

陈嵩, 王宇明, 第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038
通讯作者: 王宇明, 400038, 重庆市, 第三军医大学西南医院全军感染病研究所.
wym417@mail.tmmu.com.cn
电话: 023-68754475
收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-13

摘要

自身免疫性肝病(autoimmune liver diseases)是指由于机体的自身免疫反应攻击肝组织而非病毒感染所致肝病, 主要包括自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)、原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)及原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC), 前者主要表现为肝细胞炎症坏死、后者主要表现为肝内胆汁淤积。自身免疫性肝病的表现有时不典型或相互重叠, 给临床诊断和治疗带来困难, 称为自身免疫重叠综合征(autoimmune overlap syndromes), 是指AIH、PBC、PSC相互重叠。自身免疫重叠综合征诊断应包括对临床、血清学、影像学及组织学等的综合分析。目前对自身免疫重叠综合征的解释: (1)当综合标准提示三种自身免疫性肝病, 单项指标缺乏特异性时, 提示重叠综合征; (2)自身免疫性胆管炎(autoimmune cholangitis, AIC)为AIH加胆汁淤积, 他不是一个独立疾病, 应考虑为抗线粒体抗体(AMA)阴性的PBC, 宜按PBC治疗; (3)部分重叠综合征仅系疾病早期表现, 以后可呈现某一种自身免疫性肝病; (4)伴有界面性肝炎的PBC或PSC可用免疫抑制剂加熊去氧胆酸治疗, 前者无效则应撤除, 以免产生骨骼脱钙。

陈嵩, 王宇明. 自身免疫重叠综合征. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1875-1878
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1875.asp>

0 引言

临床上有些患者表现自身免疫性肝病的特点, 但尚未达到自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)、原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis, PBC)或原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)的诊断标准。这类疾病被命名为自身免疫重叠综合征(autoimmune overlap syndromes)。另外, 有些患者虽不能诊断AIH, 但有提示性发现, 包括自身免疫性胆管炎和原因不明的慢性肝炎。这些情况普遍缺乏确定的定义和治疗方案, 但必须被充分认识, 不致与传统疾病混淆。现就自身免疫重叠综合征的研究进展综述如下。

1 自身免疫性肝病的分类

自身免疫性肝病是指那些以血生化、影像学和组织学证实的以肝炎(AIH)或胆管炎(PBC和PSC)为主要特征的疾

病。胆汁性肝病包括PBC和PSC。AIH依靠血清自身抗体不同分为三种类型。I型表现为抗核抗体(ANA)和抗平滑肌抗体(ASMA)阳性; II型为抗肝肾微粒体抗体1(抗-LKM1)阳性, 而ANA和ASMA阴性^[1], 约20%病例上述抗体均阴性^[2]; III型表现为抗可溶性肝抗原抗体(抗-SLA)阳性^[3]。抗唾液酸糖蛋白受体抗体(抗-ASGPR)对三种类型AIH无特异性^[4]。由于自身免疫性肝病的临床症状与病毒原因所致肝病相比并无突出特征, 其诊断主要依据特异性血生化、自身抗体及肝组织学特征。然而, 这些检查方法的敏感性或特异性不尽相同, 一些患者不可避免表现某种条件不完全或两种条件重叠的诊断依据。因此, 在讨论自身免疫重叠综合征前, 有必要对各种自身免疫性肝病的特征作一阐述。

1.1 自身免疫性肝炎 AIH多发于女性, 男女之比为1:4, 有10-30岁及40岁以上2个发病年龄高峰, 又被称为“狼疮性肝炎”。国际AIH小组新修定了AIH诊断标准和计分系统^[5-6]。2002年, 美国肝病学会(AASLD)发表的诊疗指南中提出了较为详细的诊断依据, 其要点如下^[7]: (1)首先除外遗传代谢性疾病(α 1抗胰蛋白酶表型正常、血清铜蓝蛋白水平正常、铁及铁蛋白水平正常)、活动性肝炎病毒感染(无现症甲、乙、丙型肝炎病毒感染的血清标志物)、酒精性或中毒性肝病(每日饮酒量<25 g, 近期末应用肝毒性药物); (2)血清转氨酶(ALT、AST)明显升高、球蛋白、 γ 球蛋白或IgG ≥ 1.5 倍正常上限; (3)自身抗体阳性, 如ANA、ASMA、抗-LKM1 $\geq 1:180$ (成人)或 $\geq 1:40$ (儿童), 但抗线粒体抗体(AMA)阴性。也有部分患者抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)、抗可溶性肝/胰抗原抗体(抗-SLA/LP)、抗肝胞质抗原-1抗体(抗-LC-1)或抗-ASGPR阳性; (4)肝脏病理学改变: 界面性肝炎(汇管区和肝实质界面的炎症), 汇管区周围淋巴细胞或浆细胞炎症, 肝细胞形成玫瑰花结(多个肝细胞围绕胆小管)和/或碎屑样坏死, 且无胆管损坏、肉芽肿或提示其他疾病的病变。部分患者有全小叶(acinar)肝炎, 尤其多见于急性起病或皮质类固醇停药后复发的AIH。

1.2 原发性胆汁性肝硬化 PBC是一种慢性破坏性肉芽肿性胆管炎, 主要累及肝内中小胆管。90% PBC患者伴有其他自身免疫性疾病, 如干燥综合征和甲状腺疾病。中老年女性多见, 男女之比为1:9。血清碱性磷酸酶(ALP)、 γ 谷氨酰转肽酶(GGT)升高、AMA阳性是本病的重要特征^[8]。2000年, AASLD发表的PBC诊断程序为: (1)对于血清ALP升高且无其他原因解释(B超检查胆道系统正常)者,

应测定AMA; (2) 如有胆汁淤积的生化改变(ALP、GGT升高)且无其他原因解释,同时 $\text{AMA} \geq 1:40$,则可确诊PBC; (3) 如果血清 $\text{AMA} \geq 1:40$,但血清ALP正常,则应每年复查; (4) 对于血清ALP升高无其他原因解释(B超检查胆道系统正常)者,如果血清AMA阴性,则应做ANA、ASMA及免疫球蛋白检查,同时应做肝活检。PBC组织病理学特点为进行性、非化脓性、破坏性胆管炎,其最具诊断意义的改变为小叶间胆管炎、汇管区淋巴细胞聚集甚至形成淋巴滤泡,可有非干酪样肉芽肿形成,最终小叶间胆管消失。

1.3 原发性硬化性胆管炎 PSC是一种病因不明的慢性胆汁淤积综合征,多发于中青年男性,70%左右的病例合并炎性肠病(主要是溃疡性结肠炎)^[9-10]。其特征性病理改变为胆管纤维化性炎症,肝内、外胆管可分别或同时受累,部分病例可并发胆管细胞癌^[11]。通常缺乏具有诊断价值的自身抗体,ANCA阳性支持本病诊断,肝组织病理学检查有助于除外其他病因和进行分期,但诊断本病主要依靠逆行胰胆管造影(ERCP)下的典型改变^[12-13]。诊断PSC的主要依据: (1) 临床症状、体征和病史(乏力、瘙痒、黄疸、肝脾肿大及炎性肠病的表现); (2) 血清生化改变(ALP升高); (3) 胆管造影有硬化性胆管炎的典型改变(肝内、外胆管狭窄与扩张相间而呈串珠状改变); (4) 除外引起硬化性胆管炎的其他病因(其他胆系肿瘤、结石、创伤、手术史、先天性胆管发育异常)。

2 自身免疫重叠综合征的概念和分类

目前,有关自身免疫重叠综合征的诊断标准尚未达成共识。临床医师需要认识两种形式的重叠综合征:一种是交叉(crossover);另一种是真正意义的重叠(true overlap)^[14]。交叉指患者可能表现最符合某种疾病的诊断标准,同时还伴有另一种疾病的某些特征。例如,PBC表现瘙痒症、胆汁淤积的生化表现及特异组织病理学改变,同时伴ANA和ASMA阳性,而AMA阴性。重叠指患者在同一时段或病程中具备两种疾病的临床表现、血清学及组织学特征;例如,AST、ALT及ALP升高,ANA、AMA和/或ASMA阳性,以及胆管和肝组织学改变。国际AIH小组新修定的AIH诊断计分系统推进了对自身免疫重叠综合征的认识。

2.1 AIH-PBC重叠综合征 AIH和PBC的重叠综合征既有AIH的临床特点,包括ALT显著升高,高丙种球蛋白血症和血清SMA和/或ANA阳性;还有类似PBC的一些临床特征,如血清AMA阳性和胆汁淤积的生化表现^[15-17]。组织学特征包括: (1) 各种炎症细胞直接浸润胆管和肝细胞; (2) 与多形性或肉芽肿性胆管炎相关的汇管炎相关的汇管区和汇管区周围淋巴浆细胞浸润和/或胆管消失; (3) 界面炎或与肝细胞肿胀或嗜酸性坏死有关的弥散炎性细胞浸润^[18]。以肝细胞病变为主的患者比以胆汁淤积为主者更易对皮质类固醇治疗发生应答。

如汇管区炎症和界面炎不伴有明显的弥散性肝炎

(AIH)或胆管减少(PBC),仅依靠组织学检查区分AIH和2期PBC是不可能的。二者有相似的炎症细胞浸润,包括浆细胞成分。需要从实验室和血清学分析找到差异。胆汁淤积(主要是血清ALP水平显著升高)和血清AMA阳性者归为PBC;肝细胞损伤(主要是血清转氨酶水平显著升高),血清AMA、ASMA和抗-LKM1阳性,血清AMA阴性者可归为AIH。有胆汁淤积、肝细胞损伤和自身抗体混合表现的支持重叠综合征的分类。有AIH和PBC重叠综合征的患者按国际AIH小组修订的积分系统计分分值较高。

PBC和AIH重叠综合征的发生原因,可能由于患者具有发生自身免疫性疾病的遗传易感性,正如I型糖尿病和自身免疫性甲状腺疾病通常伴随出现一样。我们研究^[19]发现,AIH-PBC重叠综合征比单纯PBC患者更易伴随干燥综合征等其他自身免疫性疾病。部分患者的AIH和PBC特征不是同时出现。有些重叠综合征患者先出现PBC特征,数年后再次出现AIH特征;确诊AIH的部分患者可出现PBC特异性AMA;反之,亦可于AMA消失后出现ANA阳性。这提示AIH-PBC重叠综合征有可能是一种病情进展而非重叠性疾病。另有文献报道^[20-21],几乎所有AIH和PBC重叠综合征患者均表现AIH相关的HLA-DR单倍型。由于AIH-PBC重叠综合征肝内胆小管损害明显,严格地说其应归于PBC诊断,而广泛的肝炎特征可能与宿主遗传易感性有关。

2.2 AIH-PSC重叠综合征 AIH-PSC重叠综合征的表现包括血清SMA和/或ANA阳性、界面性肝炎和伴随胆汁淤积生化变化(主要是血清ALP和GGT升高)的高丙种球蛋白血症,常同时伴有结肠炎,组织学特点为纤维替代性胆管炎、胆管消失及汇管区水肿和/或胆汁淤积^[22-25]。肝内胆管造影的变化和肝外的PSC支持诊断。这些变化并不是诊断的先决条件。因为可能只有小叶内的胆管受累(小胆管PSC)。国际AIH小组制订的积分系统有助于诊断,因为PSC的胆管造影变化和分值可提示可能的或明确的AIH的这种变异。AIH和PSC重叠往往表现有对皮质类固醇治疗和试验性治疗包括短期熊去氧胆酸(UDCA)的抵抗,使二者合用有局限性。

AIH-PSC重叠综合征成年患者与PSC患儿肝组织学改变十分相似^[26-28]。随访研究^[27]发现,所有AIH-PSC重叠综合征患者SMA和/或AMA阳性,而仅个别单纯PSC患儿呈阳性。具有PBC影像学和组织学特征患儿中约半数以上IgG增高和SMA或ANA阳性。曾有文献^[28]报道,自身免疫抗体阳性儿童中半数具有PSC的胆管影像改变。至于PSC患儿易转变为AIH的原因,可能是其免疫系统发育过程中平衡失控所致。

有学者^[29]认为不管是否呈现界面性肝炎或小叶性肝炎,只要存在确切的胆管影像学改变和胆汁淤积特征,都应将AIH-PSC重叠综合征归于PSC的特殊形式而不是一种新的疾病类型。然而,如果有突出的肝炎表现,应该考虑使用免疫抑制剂治疗。

2.3 自身免疫性胆管炎 自身免疫性胆管炎是一个边缘综合

征,以血清ANA和/或SMA阳性、组织学有胆管损伤的证据和缺乏AMA为特征^[30-31]。胆汁淤积的特点排除了AIH的诊断,缺乏AMA则限制了PBC的诊断。以组织学表现可能无法与PBC鉴别,诊断依靠AMA的缺乏和常规胆管造影。

用国际AIH学组的评分系统打分,自身免疫性胆管炎患者得分低,且用皮质类固醇或UDCA进行试验性治疗的反应与AIH不同。实际上,治疗期间的临床和实验室改善并不与组织学诊断相伴随。这些特点说明自身免疫性胆管炎比AIH更近似于PBC或PSC。

自身免疫性胆管炎是多病因的病变,他不应将其等同与AMA阴性的PBC。组织学发现可以类似PSC或有界面性肝炎和破坏性胆管炎的混合特征。这些表现可以反映同时发生的综合征、各种典型的病变或过渡系统^[32-33]。AMA阴性与AMA阳性的PBC患者胆管上皮表达丙酮酸盐脱氢酶复合物(M2抗原)的相似性也支持其与PBC的关系。

2.4 原因不明慢性肝炎 少数(<15%)成人患者有AIH的临床、实验室和组织学特征,但常见的自身抗体(ANA、ASMA和抗-LKM1)为阴性。现将这些“自身抗体阴性的AIH”定义为原因不明性慢性肝炎^[6]。明显的血清转氨酶异常、高丙种球蛋白血症、血清IgG水平升高、汇管区、界面和小叶炎症、有或无汇管区浆细胞浸润是这种综合征的典型表现。AIH的人类白细胞抗原(HLA)易感性因素(HLA-DR3、DR4)在AIH和原因不明慢性肝炎同样常见,并对皮质类固醇治疗都有反应。这些患者也许是传统血清学检测不出的AIH患者。随后的SMA和/或ANA的表达或某些新的自身抗体如抗SLA/LP的阳性表达最终决定了其自身免疫的性质。重要的是,必须把原因不明性慢性肝炎与原因不明性肝硬化区别开来,后者是典型的进展性、不活跃的、性质不明的疾病。

3 自身免疫重叠综合征的治疗

对于肝组织有中度以上炎症坏死、血清AST高于10倍正常上限或5倍正常上限和 γ 球蛋白2倍正常上限者,应该使用肾上腺皮质激素治疗^[7]。2002年,AASLD推荐治疗方案为:(1)单用泼尼松疗法:第1 wk泼尼松60 mg/d,第2 wk 40 mg/d,第3 wk、第4 wk 30 mg/d,第5 wk以后,20 mg/d维持治疗;(2)泼尼松和硫唑嘌呤联合疗法:将上述泼尼松剂量减半,同时每日服硫唑嘌呤50 mg。一般开始治疗后数日至数周后,血液生化指标即开始有明显改善,但肝脏组织学改善要晚3-6 mo。即使经过2 a激素治疗达到缓解(包括组织学恢复正常),在停药后仍有较多患者复发,因此不宜过早停药。应采取相应措施防治消化性溃疡、高血压、糖尿病及骨质疏松等副作用。

UDCA是惟一经随机双盲临床试验证实对PBC有效的药物^[34-35],能有效改善肝功能,延缓门脉高压发生,延长生存期或肝移植前期。还有研究发现^[36-37],UDCA在改善肝功能的同时,可引起AMA滴度降低、血浆免疫球蛋白下降及一些免疫标志物的减少。UDCA的具体作用机制不

明,可能与细胞保护、调节免疫抑制和抑制胆盐引起的细胞毒性三方面因素有关。AASLD推荐的UDCA剂量为每日13-15 mg/kg,分2-3次口服。治疗有效的标志为血浆ALP在6 mo内明显下降。因为UDCA并不能去除PBC的病因,因此需要终生治疗或直到肝移植。本药几无副作用,仅部分患者在开始服用时有轻度腹泻。UDCA无论对AMA阴性还是阳性PBC的疗效均无明显差别。对于AIH-PBC重叠综合征,可使用UDCA加肾上腺皮质激素治疗^[15-16]。环孢霉素A、6-巯基嘌呤、环磷酰胺等也被用于肾上腺皮质激素无应答者,但他们的确切疗效有待评估。

PSC的药物治疗和PBC基本相同。已有多项较大样本的随机对照临床研究^[22-24]表明,UDCA每日13-15 mg/kg能够明显降低血清ALP、GGT、转氨酶及胆红素水平。对于AIH-PSC重叠综合征患者,可考虑加用肾上腺皮质激素或其他免疫抑制剂,但是这种联合疗法的确切疗效尚未最后确定。对于合并胆管严重狭窄者,应做活检或细胞学刷检,并测定CA 19-9等肿瘤标志物,以除外胆管癌;同时应清除胆道泥沙并做气囊扩张。对于反复出现严重狭窄的患者,于气囊扩张后短期放置胆道内支架(2-3 wk)可能会提高疗效。

对于AIH、PBC及PSC晚期患者,原位肝移植是惟一有效的治疗方法,术后1 a生存率可达90%,5 a生存率可达83-92%,10 a生存率可达75%^[36-39]。但有炎性肠病的PSC患者在肝移植术后,发生结、直肠癌的危险性并未降低。

总之,大部分AIH的肝功能指标与免疫学标志之间关系密切。但这种关系在重叠综合征患者中并不十分显著。根据目前有关自身免疫重叠综合征的研究资料,至少可以得出以下结论:(1)结合血生化、组织学、免疫学及胆管影像学诊断标准,可以明确三种主要自身免疫性肝病。虽然每项标准对自身免疫性肝病的诊断缺乏特异性,但可为重叠综合征的诊断提供有价值的证据;(2)自身免疫性胆管炎不能称为一种独立的疾病,而应被考虑为AMA阴性的PBC,并按PBC进行治疗;(3)界面性肝炎是AIH的诊断标准之一,但部分PBC和PSC也存在这种特征。当此种表现非常突出,应考虑有AIH重叠。由于PBC或PSC伴有明显界面性肝炎患者对皮质激素治疗有一定疗效,目前主张这类患者应该接受UDCA加皮质激素联合治疗;然而,如果使用激素无明显疗效,不应延长激素的使用时间,以免产生骨质疏松等副作用。

4 参考文献

- 1 McFarlane IG. Definition and classification of autoimmune hepatitis. *Semin Liver Dis* 2002;22:317-324
- 2 McFarlane IG. Autoimmune hepatitis: diagnostic criteria, subclassifications, and clinical features. *Clin Liver Dis* 2002;6: 605-621
- 3 Diamantis I, Boumpas DT. Autoimmune hepatitis: evolving concepts. *Autoimmunity Rev* 2004;3:207-214
- 4 Vento S, Cainelli F. Is there a role for viruses in triggering autoimmune hepatitis? *Autoimmun Rev* 2004;3:61-69

- 5 Baragiotta A, James OFW, Craig W, Mitchison H, Burke D, Bateson M, Trewby P, Macklon A, Bassendine MF. Autoimmune hepatitis (AIH): clinical spectrum of disease defined by revised international autoimmune hepatitis group (IAHG) scoring system. *J Hepatol* 2002;36:261
- 6 Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Buschenfelde KH, Zeniya M. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-938
- 7 Czaja AJ, Freese DK; American Association for the Study of Liver Disease. Diagnosis and treatment of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2002;36:479-497
- 8 Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Yamashiro T, Maeshiro T, Kobashigawa K, Kinjo F, Saito A, Zukeran H, Nakanuma Y, Ohba K. Epidemiology of primary biliary cirrhosis among women with elevated γ -glutamyl transpeptidase levels in Okinawa, Japan. *Hepatol Res* 2003;26:330-336
- 9 Chapman RW. Primary sclerosing cholangitis as an autoimmune disease: pros and cons. In: Manns MP, Paumgartner G, Leuschner U, eds. Immunology and liver. *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers* 2000:279-287
- 10 Wiencke K, Louka AS, Spurkland A, Vatn M, Schrumpf E, Boberg K; IBSEN study group. Association of matrix metalloproteinase-1 and-3 promoter polymorphisms with clinical subsets of Norwegian primary sclerosing cholangitis patients. *J Hepatol* 2004;41:209-214
- 11 Portmann BC. Primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis. *Curr Diag Pathol* 2002;8:133-143
- 12 Bergquist A, Lindberg G, Saarinen S, Broomé U. Increased prevalence of primary sclerosing cholangitis among first-degree relatives. *J Hepatol* 2005;42:252-256
- 13 Macchi V, Floreani A, Marchesi P, Pasini R, Zuliani M, Feltrin GP, De Caro R, Miotto D. Imaging of primary sclerosing cholangitis: preliminary results by two new non-invasive techniques. *Dig Liver Dis* 2004;36:614-621
- 14 Hubscher SG. Pathology of vanishing bile duct syndromes. In: Neuberger J, ed. Primary Biliary Cirrhosis. *Eastbourne: West End Studios* 2000:41-52
- 15 Talwalkar JA, Keach JC, Angulo P, Lindor KD. Overlap of autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis: an evaluation of a modified scoring system. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1191-1197
- 16 Villamil AG, Welz G, Bandi JC, Mullen E, Galdame OA, Bustos GD, Gadano AC. Overlap syndrome AIH-PBC: Prevalence, long term evolution and prognostic factors. *J Hepatol* 2004;40:S163
- 17 Weyman RL, Voigt M. Consecutive occurrence of primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis: a case report and review of the literature. *Am J Gastroenterol* 2001;96:585-587
- 18 Findor JA, Sorda JA, Gonzalez E, Daruich JR. Overlap syndrome between autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003;38:S206
- 19 朱刚剑, 陈嵩, 毛青, 王宇明. 原发性胆汁性肝硬化和自身免疫性肝炎重叠综合征的临床与病理分析. *中华肝胆病杂志* 2005;13:6-8
- 20 Djilali-Saiah I, Renous R, Caillat-Zucman S, Debray D, Alvarez F. Linkage disequilibrium between HLA class II region and autoimmune hepatitis in pediatric patients. *J Hepatol* 2004;40:904-909
- 21 Czaja AJ, Santrach PJ, Paula J, Breannan-Moore S. Shared genetic risk factors in autoimmune liver disease. *Dig Dis Sci* 2001;46:140-147
- 22 Liana G, Speranta I, Cristian G, Razvan I, Iulia S, Roxana V, Gabriel B, Iuliana P, Cristina T. Frequency and predictive factors for overlap syndrome between autoimmune hepatitis and primary cholestatic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:585-592
- 23 Burak KW, Angulo P, Lindor KD. Is there a role for liver biopsy in primary sclerosing cholangitis? *Am J Gastroenterol* 2003;98:1155-1158
- 24 Abdo AA, Bain VG, Kichian K, Lee SS. Evolution of autoimmune hepatitis to primary sclerosing cholangitis: A sequential syndrome. *Hepatology* 2002;36:1393-1399
- 25 Arndt V, Heiner W, Michaelp M, Christianp S. Autoimmune hepatitis and overlap syndromes. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl 3):S389-S398
- 26 Feldstein AE, Angulo P, El-Youssef M, Freese D, Lindor K, Perrault J. Overlap with autoimmune hepatitis in pediatric patients with primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2002;36:S262
- 27 Gregorio GV, Portmann B, Karani J, Harrison P, Donaldson PT, Vergani D, Mieli-Vergani G. Autoimmune hepatitis/sclerosing cholangitis overlap syndrome in childhood: A 16-year prospective study. *Hepatology* 2001;33:544-553
- 28 Floreani A, Rizzotto ER, Ferrara F, Carderi I, Caroli D, Blasone L, Baldo V. Clinical course and outcome of autoimmune hepatitis/primary sclerosing cholangitis overlap syndrome. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1516-1522
- 29 Feldstein AE, Angulo P, El-Youssef M, Freese D, Lindor K, Perrault J. Overlap with autoimmune hepatitis in pediatric patients with primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2002;36:S262
- 30 Woodward J, Neuberger J. Autoimmune overlap syndromes. *Hepatology* 2001;33:994-1002
- 31 马安林, 王泰岭. 自身免疫性胆管炎. *中华肝胆病杂志* 2004;12:703-704
- 32 Agarwal K, Jones DE, Watt FE, Burt AD, Floreani A, Bassendine MF. Familial primary biliary cirrhosis and autoimmune cholangitis. *Dig Liver Dis* 2002;34:50-52
- 33 Kacar S, Kosar Y, Parlak E, Erden E, Sasmaz N, Oguz P, Disibeyaz S, Alkim H. The features of autoimmune cholangitis. *J Hepatol* 2000;32:S219
- 34 Eriksson LS, Olsson R, Glauman H, Prytz H, Befrits R, Ryden BO, Einarsson K, Lindgren S, Wallerstedt S, Weden M. Ursodeoxycholic acid treatment in patients with primary biliary cirrhosis. A Swedish multicentre, double-blind, randomized controlled study. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:179-186
- 35 Chan CW, Papatheodoridis GV, Goulis J, Burroughs AK. Ursodeoxycholic acid and histological progression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003;39:1094-1095
- 36 Itakura J, Izumi N, Nishimura Y, Inoue K, Ueda K, Nakanishi H, Tsuchiya K, Hamano K, Asahina Y, Kurosaki M, Uchihara M, Miyake S. Prospective randomized crossover trial of combination therapy with bezafibrate and UDCA for primary biliary cirrhosis. *Hepatol Res* 2004;29:216-222
- 37 Poupon RE, Lindor KD, Parés A, Chazouillères O, Poupon R, Heathcote EJ. Combined analysis of the effect of treatment with ursodeoxycholic acid on histologic progression in primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003;39:12-16
- 38 Koulentaki M, Moschandrea J, Dimoulis PH, Hatzikostas K, Skordilis P, Kouroumalis E. Ursodeoxycholic acid (UDCA) increases survival of primary biliary cirrhosis (PBC) and autoimmune cholangitis (AIC) patients. *J Hepatol* 2002;36:S57
- 39 Seaberg EC, Belle SH, Beringer KC. Liver transplantation in the United States from 1987-1998: updated results from the Pitt-UNOS liver transplant registry. In: Cecka JM, Terasaki PI, eds. Clinical transplants 1998. *Los Angeles: UCLA Tissue Typing Laboratories* 1999:17-37

肿瘤光动力学疗法的机制

汲振余, 禹丽娜, 杨观瑞, 索振河, Nesland JM, 彭 迁

汲振余, 禹丽娜, 杨观瑞, 郑州大学医学院, 河南省医学科学研究所肿瘤病理室 河南省郑州市 450052
汲振余, 索振河, Nesland JM, 彭迁, 挪威奥斯陆大学国立肿瘤医院肿瘤研究所 奥斯陆 0310
通讯作者: 杨观瑞, 450052, 河南省郑州市大学路 40 号, 郑州大学医学院, 河南省医学科学研究所肿瘤病理室, yangquanrui@yahoo.com.cn
电话: 0371-66912679 传真: 0371-66912679
收稿日期: 2005-05-28 接受日期: 2005-06-13

摘要

光动力学疗法(PDT)是指利用光敏剂和光治疗浅表肿瘤的一种非手术疗法, 近 20 多年已应用于许多肿瘤的临床治疗. 关于 PDT 的作用机制、影响疗效的因素和如何提高肿瘤细胞的应答是当今研究的主要内容. 本文综合了国外近年在此方面的研究动态, 着重讨论了光敏剂和其亚细胞分布、光和氧等影响 PDT 效应的主要因素及线粒体、细胞表面受体、凋亡相关蛋白和细胞间质在 PDT 中的作用和机制, 并对未来的研究方向做一概述.

汲振余, 禹丽娜, 杨观瑞, 索振河, Nesland JM, 彭迁. 肿瘤光动力学疗法的机制. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1879-1884
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/20.asp>

0 引言

光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)是近 20 多年来应用于浅表肿瘤临床治疗的一种非手术替代疗法. 选择性存积于肿瘤细胞内的光敏剂经特定波长的光照射激发后, 发生光物理化学反应, 产生活性氧分子和自由基等其他活性物质^[1], 导致肿瘤细胞凋亡或坏死;或通过破坏肿瘤组织内的微血管循环系统, 使肿瘤细胞缺氧或营养匮乏而衰竭.

目前肿瘤的传统疗法有手术、放疗和化疗. 外科手术切除限于分界明显的肿瘤组织或早期癌灶组织, 但不可避免地会切除掉部分正常组织而损害其在机体内的正常功能^[2]. 放疗和化疗的临床疗效虽然已得到肯定, 但其副作用较大, 由于光敏物质在肿瘤组织和细胞内的蓄积作用, 使病变组织内的药物浓度远大于邻近的正常组织, 因而经光照射后能选择性杀伤肿瘤细胞, 对正常细胞无或有极小的毒性作用, 相对无弥漫性损伤. 另外 PDT 还能与肿瘤的传统疗法相结合, 如手术切除后结合使用 PDT 杀死残留的癌细胞, 可防止复发和扩散, 所以 PDT 可为临床医生提供另一种治疗选择. 随着各国卫生组织的先后批准, PDT 已逐渐成为临床常用的备选治疗方式^[3], 包括晚期癌的姑息性治疗和早期癌及癌前病变的根治性治疗^[4].

1 影响 PDT 效应的主要因素

1.1 光敏剂 光敏剂的物理化学特性直接决定了其光毒性作用. 理想的光敏剂应具备以下特点: (1) 能较强地特异选择性积蓄于肿瘤细胞和组织内, 且在较短时间内达到高峰. (2) 能从正常组织内迅速得到清除, 毒副作用小或无. (3) 所需的光波长范围能最大限度穿透组织到深层. (4) 纯度高. (5) 反应性氧类产量高. 肿瘤细胞这种选择性存蓄作用的机制目前还不太清楚, 但主要认为与肿瘤组织的生物学特性相关. 如: 肿瘤组织有较大的间质体积; 淋巴通道排流能力差, 血管渗透能力强; 肿瘤组织比正常组织含有更多的巨噬细胞; 含更多的胶原蛋白和脂蛋白受体等^[5]. 这些物理化学特性可能决定了肿瘤细胞吸收积蓄光敏剂的能力, 特别是肿瘤细胞膜表面丰富的脂蛋白受体似乎起了很大的作用^[6], 而且具有长烷基链的 ALA 脂类穿越生物膜屏障的速度更快^[7].

人们称以 HPD 为基础的光敏物质为第一代. 第一代光敏剂有其自身的缺陷, 如皮肤光毒性作用较强, 在体内代谢缓慢, 正常组织内滞留时间较长, 患者需 1 mo 以上的避光时间; 使用的光穿透力有限, 无法达到较深层的癌组织. 于是人们开始研究使用第二代光敏剂, 如二氢卟吩(chlorin)类, 薹醌(purpurin)类, 苯基卟啉(benzoporphyrin)及 5-ALA 等. ALA-PDT 的优点是皮肤光毒性时间短, 仅为 1-2 d^[8]; 可局部应用也可口服, 使用方便; 短时间内可重复治疗. 以后以 ALA 为基础又合成出 ALA 酯类衍生物, 如 ALA-hexylester, 显著增强了细胞内 PpIX 的累积效率.

1.2 光 PDT 对光源的要求一是光波穿透力要强, 能达到深层肿瘤组织, 二是能有效激发光敏剂. 最初使用的光源是普通光附加合适的滤光片, 常用于皮肤肿瘤或其他体表病变的治疗. 其特点是简单、实用、价廉, 但能产生热量, 难以确定准确的光剂量. 对于脏器内腔表面肿瘤, 则需光纤内镜系统传送激光束. 现在随着激光技术和光纤技术的应用, 使 PDT 技术几乎可以在内镜下把光输送到体内任何部位. 最常使用的激光就是靛染料激光和磷酸钛钾(KTP)染料激光. 广泛使用的靛染料激光器能调整输出波长, 适用于各种光敏剂. 半导体激光简单, 体积小, 不需冷却装置, 因此易于携带, 缺点是输出功率有限. 二极管激光器仅能发射单一波长的激光, 只能适用于特定光敏剂的 PDT. 光照剂量的选择主要根据光敏剂的不同而不同, 通常在 10-500 J/cm² 之间.

1.3 氧 由于光敏剂受光激发后产生的细胞毒性作用机制

之一就是依赖单态氧的产生. 因而组织中氧分子浓度直接决定了PDT的效应. 然而实质瘤中往往存在缺氧状态, 肿瘤组织的氧水平是临床上必须关注的指标. 缺氧由供氧和耗氧的失衡而引起. 肿瘤组织微血管结构与功能的异常, 因肿瘤细胞的快速增生导致的氧扩散距离不断加大, 治疗过程中对氧的剥夺(如PDT)等, 均可造成缺氧状态^[9]. 缺氧使细胞内的许多基因活性改变, 导致蛋白质表达水平变化, 一方面使细胞周期停止, 造成分化、凋亡或坏死; 另一方面又能使细胞生物学性状改变, 适应了缺氧和营养匮乏的状况, 使肿瘤细胞更能抵抗恶劣的外部环境, 增强了细胞的恶性增殖和远处转移能力^[10], 这有可能是抵御PDT作用的原因之一. PDT过程中光的流速(light fluence rate)大小能影响到肿瘤组织内的氧浓度水平^[11]. 高流速的光产生了高浓度的单态氧, 却导致了氧的快速耗尽, 使氧无法扩散到较深部的癌组织, 使肿瘤组织内缺氧范围增大, 造成PDT效应减弱^[11].

缺氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1)是细胞缺氧信号转导途径中的主要转录因子, 能结合到所调控基因的启动子或增强子的缺氧反应元件, 导致基因的转录活化^[12]. HIF能激活许多基因的表达, 如促红细胞生成素、血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶2(MMP2), 还有一些与糖运输和糖酵解有关的酶类, 均与细胞的存活、增殖、血管生成及迁移相关. 这可以解释为何许多缺氧的实体瘤HIF-1 α 的过表达与放化疗预后差相关. Koukourakis *et al*^[13]报道食管癌患者51%高表达HIF-1 α , HIF-1 α 高表达与PDT低完全应答率(CR)相关, 其原因一是肿瘤组织内低氧状态可能使PDT不能产生大量的单态氧, 使PDT毒性效应下降; 二是高表达的HIF-1 α 可能使细胞抗凋亡能力增强.

HIF-1 α 对细胞凋亡的作用存在两种相反的观点. 一种观点认为HIF-1 α 能抑制细胞凋亡. Akakura *et al*^[14]在缺氧条件下培养前列腺癌细胞, 发现高表达HIF-1 α 的前列腺癌细胞的增殖活性要大于低表达HIF-1 α 的前列腺癌细胞. 培养基中剥夺葡萄糖可造成低表达HIF-1 α 细胞的凋亡, 而对高表达HIF-1 α 的细胞影响不大. 利用表达载体把HIF-1 α cDNA转染到不表达HIF-1 α 的细胞中, 结果显著抑制了氧和葡萄糖缺乏诱导的细胞凋亡. Dong *et al*^[15]也发现缺氧能抑制星型孢菌素(staurosporine, STA)引起的肾近端小管细胞凋亡, 并证实与凋亡抑制蛋白IAP-2的高表达有关. 另外也有报道^[16]认为缺氧能诱导表达MC1-1(Bcl-2同源物), 降低Bax/Bcl-2比率, 均与抑制凋亡作用有关. 另一种实验结果则完全相反. Krick *et al*^[17]使大鼠肺泡上皮AT II细胞在缺氧条件下生长, 诱导HIF-1 α 的表达, 发现能使促凋亡蛋白Bnip3L表达上调, 细胞周期停滞, 细胞存活下降. 用小片段干扰RNA(siRNA)抑制HIF-1 α 的表达, 则抑制了对凋亡的诱导. 转染HIF-1 α cDNA使HIF-1 α 蛋白短暂高表达, 又增强

了细胞凋亡. HIF-1 α 对凋亡的诱导/抑制作用机制是下一步需要阐明的问题.

2 光敏剂在肿瘤细胞中的吸收和亚细胞定位

光敏剂的物理化学性质(如亲脂性能, 所带电荷等)决定了在细胞中的定位和分布浓度. 一般来说, 脂溶性光敏剂易结合到质膜和线粒体膜, 而水溶性光敏剂则主要位于溶酶体和肿瘤间质. 由于光动力学过程中产生的单态氧寿命非常短暂, 仅有0.05 μ s, 其扩散的距离也相应较短, 仅为0.02 μ s, 因而PDT的细胞毒性作用仅限于光敏剂所处的很小范围, 具有较高浓度光敏剂和较高浓度分子氧的细胞对PDT敏感性就强. 光敏物质在细胞内的定位可能决定是以凋亡为主还是以坏死为主. 因为研究^[18]发现, 结合到线粒体上的光敏剂主要诱导凋亡, 而结合到溶酶体上的光敏剂, 则在受光激发后破坏溶酶体膜结构, 释放出组织蛋白酶, 一方面能裂解caspase-3, 阻断了凋亡信号传导途径, 另一方面又裂解Bid产生较短的具有促凋亡活性的tBid, 参与了线粒体凋亡途径. 但总的来说还是以细胞坏死方式为主.

光敏剂的胞内定位还与细胞类型和/或孵育时间有关. Fabris *et al*^[19]用酞菁类光敏剂ZnPc(zinc phthalocyanine)与胚胎成纤维细胞4R孵育, 2 h后ZnPc出现在高尔基体和胞膜, 24 h后ZnPc出现在高尔基体和线粒体. 孵育2 h后进行PDT, 细胞死亡方式主要为坏死, 这是由于膜的完整性遭到破坏而引起. 孵育24 h后的PDT主要诱导细胞的凋亡. mTHPC在胞质中散在分布, 内质网、线粒体、高尔基体及核膜mTHPC均可定位, 因而mTHPC的主要作用靶点还不太确定, 但至少在鼻咽癌细胞系HK1和CNE2中线粒体是PDT的作用位点^[20].

5-ALA本身不具有光敏作用, 是内源性光敏物质PpIX的前体. ALA在胞质中经过胆色素原-尿卟啉-粪卟啉-原卟啉原III途径, 在线粒体内形成PpIX, 最后成为血红素(heme). 在血红素合成过程中有两个限速步骤^[21], 第一个是ALA的生成过程, 此过程受血红素的反馈抑制. 但在有外源性ALA存在的条件下, 则解除了这种合成抑制, 造成中间产物PpIX合成量增加. 第二个限速步骤是由原卟啉IX生成血红素的过程, 此过程由限速酶亚铁原卟啉合成酶调控. 由于肿瘤细胞和正常细胞血红素合成过程中的代谢酶活性有差异, 如具有低活性的亚铁原卟啉合成酶和高浓度的胆色素原脱氨酶^[8], 结果就促成了肿瘤细胞线粒体中高浓度的PpIX积累. 这些位于线粒体内膜的PpIX也可由于渗透等作用分布到胞膜或其他细胞器膜^[22]. PpIX的亚细胞定位还取决于细胞种类. Krieg *et al*^[23]发现, PpIX在分化好的结肠腺癌HT29细胞中主要结合于胞膜上, 在PDT(LD₅₀剂量)后膜的完整性受破坏最大. 在分化差的SW480细胞中, PpIX主要分布于线粒体, PDT后主要表现为线粒体活性的丢失.

3 光敏剂的光动力效应机制

3.1 I型与II型反应机制 光敏剂在相应波长的光激发下, 吸收光子的能量由基态升迁至极不稳定的激发态, 激发态的寿命非常短暂(10^{-6} – 10^{-8} s), 在返回基态的过程中产生荧光, 这是肿瘤诊断的基础. 同时激发态的光敏剂也可形成三价态, 并与周围的化学物质产生反应, 形成所谓的I型与II型光动力反应机制. I型反应机制主要是指激发态的光敏剂与相邻物质发生电子或氢原子转移形成的氧化还原反应, 导致自由基或自由基离子的产生. 在此过程中也有氧的参与, 产生过氧化物, 超氧离子和羟自由基等. II型光动力反应机制则主要是三价态光敏剂把能量传递给分子态的氧, 产生单态氧^[24].

在I型与II型机制中所产生的这些活性氧类(reactive oxygen species, ROS)能氧化细胞中的生物大分子, 如蛋白、脂肪酸及蛋白间的桥连结构, 破坏生物分子的结构和功能, 改变生物膜渗透性和流动性, 激活或抑制了膜上的酶蛋白和受体, 最终引起细胞的凋亡与坏死. PDT引起的细胞坏死主要是由于光敏剂剂量过大, 光照剂量过强所引起的细胞快速死亡, PDT引起的细胞凋亡被认为是临床上PDT发挥效应的重要方式. 细胞是凋亡还是坏死取决于光敏剂的种类、光剂量大小和细胞种类.

3.2 线粒体在凋亡中的作用 线粒体在PDT诱导的细胞凋亡中起很重要的作用, 这主要与许多光敏剂在线粒体的定位有关. 在线粒体中产生的内源性光敏剂如血红素合成过程中的中间产物PpIX, 或结合于线粒体膜上的光敏剂在光的作用下, 能使线粒体膜的通透性增加, 膜电位($\Delta\psi_m$)消失, 使膜腔中的许多与诱导细胞凋亡相关的蛋白因子释放于胞质中. 这些因子包括细胞色素C、凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)和SMAC(second mitochondria-derived activator of caspases)等. 研究发现在线粒体膜上的渗透性转运孔道复合体(permeability transition pore complex, PTPC)在凋亡因子释放过程中起重要作用. PTPC的具体结构尚不完全清楚, 但至少知道由三个穿膜蛋白组成, 分别是腺苷酸转运子(ANT)、膜电压依赖性离子通道(VDAC)及PBR(peripheral benzodiazepine receptor). PTPC负责质子的正常穿膜运输, 受pH、ATP/ADP局部浓度和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度调节. 当PTPC开放时, 使 H^+ 在膜两侧浓度梯度消失, 即造成了膜电位的消失和 Ca^{2+} 释放, 导致细胞色素C进入胞质, 与胞质中的dATP、凋亡活化因子-1(APAF-1)及原caspase-9结合成复合物, 启动了caspase的级联活化, 最终使许多蛋白因子活化^[25], 如DNA裂解因子(DNA fragmentation factor, DFF)、PARP[poly(ADP-ribose)polymerase]、DNA依赖蛋白激酶(DNA-PKcs)和ICAD(inhibitor of caspase activated DNase)等, 引起细胞凋亡特征的产生, 如细胞收缩、染色质凝聚并边缘化、DNA断裂和凋亡小体形成等.

PBR分子量为 M_r 18000, 主要位于线粒体外膜. PBR能把PpIX的前体粪卟啉原III穿膜运输至线粒体内的PpIX合成位点, 并能结合包括PpIX在内的其他光敏剂^[26], 因而细胞中PBR蛋白表达水平的高低有可能决定了PpIX的合成效率或线粒体吸收结合光敏剂的能力, 最终有可能影响线粒体介导的PDT应答敏感性. 研究发现, 光敏剂与PBR的亲合活性与光动力杀伤作用相关^[27], 与PBR有更强亲和力的PK11195可以降低PDT的光毒作用, 提示PBR是PDT的重要靶部位.

关于PTPC造成线粒体膜电位消失的具体机制尚有争论. 一些实验发现, 阻止PTPC孔开放的特异性抑制剂并未抑制膜电位的消失^[28], Verteporfin-PDT处理的Hela细胞在膜电位并未发生任何变化的情况下, 也有细胞色素C从线粒体转移至胞质中. 因此关于线粒体途径诱导凋亡的机制仍需更多的研究. 另外Reiners *et al*^[29]利用能结合于溶酶体上的光敏剂Npe6处理肝癌细胞Hepa1c1c7, 在线粒体膜电位消失前也发现有细胞色素C的释放和caspase-9, -3的活化, 推测其原因可能是光敏作用破坏溶酶体, 释放出的蛋白酶降解Bid, 活性tBid引起了细胞色素C的释放, 提示很多因素可能与线粒体凋亡途径相关.

3.3 细胞表面受体和凋亡相关蛋白 当细胞外的信号配体与胞膜上的肿瘤坏死因子(TNF)受体结合时, 形成死亡信号复合体(death-inducing signaling complexes, DISCs), 能诱导细胞迅速凋亡. 人们研究较多的是FAS/CD95/AP01和TNFR1/P55/CD120a. Ahmad *et al*^[30]实验证实, Pc4-PDT能引起人表皮样瘤A431细胞表面受体Fas和其配体FasL的短暂高表达, 并导致Fas多聚化及与胞内受体分子FADD(fas-associated protein with a death domain)的结合, Fas-FADD复合物能结合原caspase-8, 使其自我激活, 启动了死亡信号传导途径. Ali *et al*^[31]观察到人鼻咽癌(NPC)细胞用Hypocrellin A(HA)和HB处理, 光激活HA, HB后增强了Fas/FasL表达, 诱导了Fas信号依赖的细胞凋亡. 但Zhuang *et al*^[32]利用结合于质膜上的光敏剂Rose Bengal, 对HL-60细胞进行PDT处理, 发现即便在无FasL的情况下也能直接引起Fas受体的多聚化, 并活化caspase-8. caspase-8裂解Bid, 形成较短的具有活性的C末端片段tBid, 作用于线粒体, 导致细胞色素C和AIF释放、caspase-3活化及相应的凋亡. Takahashi *et al*^[24]利用人角质形成细胞(NHK), 以ATX-SiO(Na)作为光敏剂进行PDT试验, 也发现在无FasL结合的情况下引起了Fas抗原的多聚化, 胞质中有细胞色素C的累积. 有人作出假设, 是单态氧引起了Fas/TNF受体的多聚和活化^[32]. 但这种假设还需更多实验数据去证实.

有关Bcl-2在PDT诱导的凋亡中的作用有截然不同的报道. 一方面, Bcl-2的高表达能抑制BPD-MA-PDT引起的白血病HL-60细胞的凋亡^[33], 其机制可能是通过抑

制 caspase-3 和 caspase-6 的激活, 或 PDT 依靠细胞周期依赖蛋白激酶(CDK1)途径对 Bcl-2 磷酸化, 使细胞阻滞于 G2/M 期^[34], 抑制了凋亡的发生. 结合于线粒体外膜上的 Bcl-2 也可能抑制了细胞色素 C 的释放, 其抑凋亡作用还可能与 Bcl-2 的抗氧化作用或能维持 Ca^{2+} 的稳定有关^[35]. 利用逆转录病毒载体把 Bcl-2 反义序列转染至胃腺癌 MGC803 细胞, 使 Bcl-2 蛋白表达降低, 能显著增强 PDT 的光毒作用^[36]. 另一方面, Kim *et al*^[37]报道, 高表达 Bcl-2 的人乳腺上皮 MCF10A 细胞能增强 PDT 诱导的凋亡. Crescenzi *et al*^[38]报道 PDT 能引起人 MCF-7 乳腺癌细胞 Bcl-2 短暂的选择性降解, 并上调 Bax, 因此使 Bax/Bcl-2 比率增加, 促进凋亡. 因此 Bcl-2 的作用相当程度上还要取决于其他促凋亡蛋白质的水平, 如 Bax. Chiu *et al*^[39]在人乳腺癌 MCF-7C3 细胞中观察到, 光敏剂 Pc4 受光的激发能使 Bax 从胞质溶胶移位到线粒体, 并引起细胞色素 C 释放. MCF-7C3 细胞用 Bax 反义寡核苷酸处理后能抑制 50% 的 PDT 引起的凋亡, Bax 阴性的人前列腺癌细胞 DU-145 经 PDT 后, 上述凋亡的主要标志均不存在, 提示促凋亡蛋白 Bax 低表达(低 Bax/Bcl-2 比率)能抵御 PDT 诱导的凋亡.

热休克蛋白 HSP-70 能与蛋白酶活化因子 Apaf-1 结合, 抑制了 Apaf-1/细胞色素 C/procaspase-9 蛋白复合体的形成, 也因此抑制了由细胞色素 C 释放引起的 caspase 的活化^[40, 41]. Kuzelova *et al*^[22]利用 ALA-PDT 处理白血病 K562 细胞, 能诱导细胞早期凋亡特征, 如 Bcl-x1 表达降低、线粒体膜电位下降和细胞色素 C 从线粒体释放入胞质等, 但却没有发现细胞晚期凋亡迹象, 如 caspase-3 未活化, DNA 也未降解. 细胞主要是由于质膜的破坏而坏死. 作者发现 K562 细胞有 HSP-70 和 HSP-27 的高表达, 推测是热休克蛋白阻断了 caspase 的活化. 可见 PDT 诱导的凋亡受许多因素的影响, 机制相当复杂.

3.4 肿瘤间质 细胞中的光敏剂受光的激发可直接对细胞产生毒性作用, 但这种直接效应是有限的. 有研究^[42]表明肿瘤间质在 PDT 中起重要作用, 是不可忽视的 PDT 效应因素. 肿瘤间质包括微血管系统、细胞成分和细胞基质, 对肿瘤细胞的生长至关重要. 当光敏物质进入血液后, 便根据各自不同的物理化学特性结合不同的血清蛋白, 便于被输送. 亲水性光敏物质主要由白蛋白和球蛋白运输至肿瘤组织的血管基质, 疏水性药物则易与低密度脂蛋白(LDL)结合, 最终定位于肿瘤细胞内部. 肿瘤间质组织结构特征, 如血管渗透性好, 淋巴引流差, 较大的空间, 大量巨噬细胞, LDL 受体丰富等, 利于肿瘤组织选择性积累光敏物质; 另外, 卟啉与网状蛋白, 胶原和弹性蛋白等有很高的亲和能力, 纤维蛋白和胶原是间质的重要成分, 而胶原和弹性蛋白则是血管壁的成分; 另外存在于基质中的高活性脂酶可能有利于 ALA-脂类的代谢. 所以间质在肿瘤组织积累光敏剂的过程中占有一定的比重.

肿瘤间质中的微血管是光敏物质选择性积蓄的一个场所, 所以是 PDT 效应部位之一. 对血管损伤的作用方式依赖于光敏剂的不同. Photofrin 或单天冬酰氨-二氢卟吩(mono-L-aspartyl chlorin)PDT 可引起血管收缩及血细胞凝集成血栓, 血液循环终止, 使肿瘤细胞因缺氧和营养剥夺而死亡; 酞菁类光敏剂(phthalocyanines, Pc)则引起血管崩漏^[43]. 光敏剂 AIPcSn 还能结合于内皮下层, 破坏了肿瘤细胞赖以生存的基础. 所以最有效的 PDT 应该是既能杀伤肿瘤细胞, 也能破坏肿瘤细胞的生存环境-间质. Peng *et al*^[44]把作用于肿瘤细胞的光敏剂 ALA 和能作用于肿瘤间质的光敏剂 Photofrin 同时应用于 PDT, 取得了较好的效果. Dolmans *et al*^[45]发现, 在同位移植的乳腺癌中使用光敏剂 MV6401, 15 min 后光敏物质分布于血管, 4 h 后则主要位于肿瘤细胞内. 分别在应用 MV6401 后 15 min 和 4 h 给予二次 PDT, 效果明显好于 15 min 或 4 h 的单次光照射, 提示破坏微血管是 PDT 的重要方式之一, 且 PDT 方案还可进行优化以达到最佳效果.

4 PDT的发展趋势—如何增强 PDT 效应

4.1 开发更有效的光敏剂 理想的光敏剂是决定 PDT 疗效的前提. 寻找安全、有效的光敏剂是重点研究内容之一. 新光敏剂的开发应注意以下几点: (1) 在肿瘤细胞中的亚细胞定位情况. 因为确切了解 PDT 的作用方式有助于调整 PDT 方案至最佳. (2) 对分子氧的依赖程度, 能否产生足量的单态氧. (3) 对人体的皮肤光毒作用和生理毒性情况. 最好在分布到肿瘤细胞前无光毒作用, 如以 ALA 为基础的一些衍生物. 金丝桃素(hypericin)对许多肿瘤细胞具有更强的光毒作用^[46], 但在临床上的应用还有待研究.

4.2 恢复细胞凋亡能力 凋亡能力的丧失是肿瘤细胞的一大特点^[47]. PDT 效应的重要机制之一就是诱导凋亡的产生, 因而恢复恶性肿瘤细胞的凋亡能力, 提高细胞对 PDT 等外界刺激的凋亡诱导敏感性, 是改善 PDT 临床疗效的重要手段. Barberi-Heyob *et al*^[48]将野生型 p53(wt p53)基因转移至 p53 突变的人结肠癌细胞系(HT29A4)中, PDT 后细胞凋亡明显增加, caspase 3 的活性增强了 2.6 倍. Usuda *et al*^[49]把白介素(IL)-6 基因转染至 Lewis 肺癌细胞(LLC), 发现对 PDT 毒性作用敏感性增强. IL-6 已知能通过降低 Bcl-2 的表达而诱导凋亡, 因而该结果提示通过调控某些基因的表达能降低肿瘤细胞对 PDT 应答的阈值.

4.3 与其他疗法相结合 Hirschberg *et al*^[26]在胶质瘤的 ALA-PDT 中, 把高热疗法(hyperthermia, HT)与 PDT 相结合, 显著增强了细胞毒性作用: HT 能抑制亚致死损伤细胞(如缺氧引起)的修复功能, 使细胞变得更加脆弱, 对 PDT 或放疗等更加敏感; 而 PDT 则引起某些蛋白, 特别是线粒体膜上一些酶的氧化损伤, 也使细胞对 HT 更敏感. 二者叠加可出现协同效应.

细胞分化疗法(differentiation therapy, DT)

能提高PDT效应的报道对临床有指导意义. 如前所述, 细胞线粒体膜上的PBR能运送血红素前体, 增加PpIX的合成, 而且与PpIX也有很高的亲和力. 在皮肤肿瘤中, 高分化的癌细胞PBR表达最高, 分化差的癌细胞和浸润型肿瘤细胞中PBR表达很低^[50], 这可能是造成高分化细胞积累较高浓度的PpIX原因之一. 利用诱导剂诱导肿瘤细胞的分化有可能提高细胞内PpIX水平, 进而改善PDT的细胞毒性作用. Ortel *et al*^[51]用人工合成的雄激素R1881与LNCaP前列腺癌细胞孵育进行分化诱导, 发现细胞内PpIX的产量是未分化处理细胞的28倍, 用514 nm的光照射后发现, 分化处理的细胞达到50%的细胞杀死效果所需的光剂量是未经分化处理细胞的1/50. 然而白血病细胞系HL-60用DMSO诱导分化后并未造成细胞内PpIX浓度的上升, 提示并不是所有类型的细胞都能用分化疗法提高PDT效果.

肿瘤选择性积累光敏剂依靠肿瘤组织的异常生物学特性, 这是非特异性积蓄效应, 在正常细胞中或多或少也存在光敏剂的分布, 所以仍难以避免其毒副作用. 利用单克隆抗体把光敏剂特异性输送至靶部位, 减少正常组织的光敏剂浓度并提高PDT的特异性是另外一个思路. 有人把这种方法叫做光免疫治疗(photoimmunotherapy, PIT)^[43]. Jiang *et al*^[52]把光敏剂BPD同表达于人肺鳞状细胞癌细胞表面糖蛋白的抗体(Mab5E8)相偶合, 发现BPD和BPD-Mab5E8的LD₅₀分别为150 g/L和10 g/L, 提示偶连有抗体的BPD有更强的细胞毒性作用. Hemming *et al*^[53]把BPD与抗表皮生长因子受体(EGFR)单克隆抗体偶合, 注射于荷瘤仓鼠模型, 肿瘤中BPD的浓度是单纯BPD对照组的26倍, PDT后1 mo生存率BPD-抗-EGFR组为80%, BPD组为67%. 虽然一些体外实验显示良好的前景, 但仍存在许多问题^[43, 54]: 抗体和光敏剂偶合后由于分子内部和分子间的交联作用易使二者改变各自的特性, 并易引起水溶性下降; 抗体是 M_r 150 000的大免疫球蛋白分子(光敏剂分子量一般小于 M_r 1 000), 如此大的分子难以渗透至肿瘤组织内部及穿越生物膜进入细胞内部; 临床上肿瘤具有高度异质性, 不会持续高表达某一种特异靶抗原. 因此该方法还有待进一步评价. 另外光敏剂还可与一些血清蛋白如LDL、白蛋白和转铁蛋白等结合以提高运输能力; 还可与一些受体的配体如表皮生长因子(EGF)偶合以提高特异结合能力^[54].

总之, PDT由于其自身的特点和优势目前已得到越来越广泛的应用. 在某些领域如皮肤肿瘤和癌前病变的临床已成为常规性治疗措施. 但在另一些领域仍是空白^[7]. PDT能否成为肿瘤临床治疗的主流, 需依赖于更加理想的光敏剂的出现. 另外一些新技术的应用(如超声内镜)也可能促进PDT的发展. 相信随着新光敏剂的不断开发, 对PDT机制及影响因素的深入了解和治疗方案的不断完善, PDT会为肿瘤的临床治疗发挥更好的作用.

5 参考文献

- Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res* 1978;36(7 Pt 1):2326-2329
- Friesen SA, Hjortland GO, Madsen SJ, Hirschberg H, Engebraten O, Nesland JM, Peng Q. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumors. *Int J Oncol* 2002;21:577-582
- Dougherty TJ. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg* 2002;20:3-7
- Prosst RL, Wolfen HC, Gahlen J. Photodynamic therapy for esophageal diseases: a clinical update. *Endoscopy* 2003;35:1059-1068
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:889-905
- Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opin Pharmacother* 2001;2:917-927
- Xiang W, Weingandt H, Liessmann F, Klein S, Stepp H, Baumgartner R, Hillemanns P. Photodynamic effects induced by aminolevulinic acid esters on human cervical carcinoma cells in culture. *Photochem Photobiol* 2001;74:617-623
- Peng Q, Moan J, Warloe T, Iani V, Steen HB, Bjorseth A, Nesland JM. Build-up of esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin. *J Photochem Photobiol B* 1996;34:95-96
- Vaupel P, Harrison L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. *Oncologist* 2004;9(Suppl 5):4-9
- Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2003;23:359-369
- Henderson BW, Gollnick SO, Snyder JW, Busch TM, Kousis PC, Cheney RT, Morgan J. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res* 2004;64:2120-2126
- Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 2004;36:1-12
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Skarlatos J, Corti L, Blandamura S, Piazza M, Gatter KC, Harris AL. Hypoxia inducible factor (HIF-1a and HIF-2a) expression in early esophageal cancer and response to photodynamic therapy and radiotherapy. *Cancer Res* 2001;61:1830-1832
- Akakura N, Kobayashi M, Horiuchi I, Suzuki A, Wang J, Chen J, Niizeki H, Kawamura Ki, Hosokawa M, Asaka M. Constitutive expression of hypoxia-inducible factor-1alpha renders pancreatic cancer cells resistant to apoptosis induced by hypoxia and nutrient deprivation. *Cancer Res* 2001;61:6548-6554
- Dong Z, Venkatachalam MA, Wang J, Patel Y, Saikumar P, Semenza GL, Force T, Nishiyama J. Up-regulation of apoptosis inhibitory protein IAP-2 by hypoxia. Hif-1-independent mechanisms. *J Biol Chem* 2001;276:18702-18709
- Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C. Is HIF-1alpha a pro-or an anti-apoptotic protein? *Biochem Pharmacol* 2002;64:889-892
- Krick S, Eul BG, Hanze J, Savai R, Grimminger F, Seeger W, Rose F. Role of hypoxia-inducible factor-1 alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:395-403
- Kessel D, Luguya R, Vicente MG. Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distributions. *Photochem Photobiol* 2003;78:431-435
- Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S, Reddi E. Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res* 2001;61:7495-7500
- Yow CM, Chen JY, Mak NK, Cheung NH, Leung AW. Cellular

- uptake, subcellular localization and photodamaging effect of temoporfin (mTHPC) in nasopharyngeal carcinoma cells: comparison with hematoporphyrin derivative. *Cancer Lett* 2000; 157:123-131
- 21 Tsai T, Hong RL, Tsai JC, Lou PJ, Ling IF, Chen CT. Effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 and MCF-7/ADR cells. *Lasers Surg Med* 2004;34:62-72
 - 22 Kuzelova K, Grebenova D, Pluskalova M, Marinov I, Hrkal Z. Early apoptotic features of K562 cell death induced by 5-aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2004;73:67-78
 - 23 Krieg RC, Messmann H, Schlottmann K, Endlicher E, Seeger S, Scholmerich J, Knuechel R. Intracellular localization is a co-factor for the phototoxicity of protoporphyrin IX in the gastrointestinal tract: in vitro study. *Photochem Photobiol* 2003; 78:393-399
 - 24 Takahashi H, Itoh Y, Miyauchi Y, Nakajima S, Sakata I, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Activation of two caspase cascades, caspase 8/3/6 and caspase 9/3/6, during photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-S10 (Na), in normal human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 2003;295:242-248
 - 25 Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2004;1704:59-86
 - 26 Hirschberg H, Sun CH, Tromberg BJ, Yeh AT, Madsen SJ. Enhanced cytotoxic effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy by concurrent hyperthermia in glioma spheroids. *J Neurooncol* 2004;70:289-299
 - 27 Kessel D, Antolovich M, Smith KM. The role of the peripheral benzodiazepine receptor in the apoptotic response to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001;74:346-349
 - 28 Chaloupka R, Petit PX, Israel N, Sureau F. Over-expression of Bcl-2 does not protect cells from hypericin photo-induced mitochondrial membrane depolarization, but delays subsequent events in the apoptotic pathway. *FEBS Lett* 1999;462:295-301
 - 29 Reiners JJ Jr, Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin XM, Kessel D. Release of cytochrome c and activation of procaspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ* 2002;9:934-944
 - 30 Ahmad N, Gupta S, Feyes DK, Mukhtar H. Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Invest Dermatol* 2000;115:1041-1046
 - 31 Ali SM, Chee SK, Yuen GY, Olivo M. Photodynamic therapy induced Fas-mediated apoptosis in human carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2002;9:257-270
 - 32 Zhuang S, Demirs JT, Kochevar IE. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 2000;275:25939-25948
 - 33 Granville DJ, Jiang H, An MT, Levy JG, McManus BM, Hunt DW. Bcl-2 overexpression blocks caspase activation and downstream apoptotic events instigated by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 1999;79:95-100
 - 34 Vantieghe A, Xu Y, Assefa Z, Piette J, Vandenheede JR, Merlevede W, De Witte PA, Agostinis P. Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277: 37718-37731
 - 35 Moor AC. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2000;57:1-13
 - 36 Zhang WG, Ma LP, Wang SW, Zhang ZY, Cao GD. Antisense bcl-2 retrovirus vector increases the sensitivity of a human gastric adenocarcinoma cell line to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 1999;69:582-586
 - 37 Kim HR, Luo Y, Li G, Kessel D. Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection. *Cancer Res* 1999;59:3429-3432
 - 38 Crescenzi E, Varriale L, Iovino M, Chiaviello A, Veneziani BM, Palumbo G. Photodynamic therapy with indocyanine green complements and enhances low-dose cisplatin cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2004;3:537-544
 - 39 Chiu SM, Xue LY, Usuda J, Azizuddin K, Oleinick NL. Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 2003; 89:1590-1597
 - 40 Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000; 2:469-475
 - 41 Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, Maise C, Daugas E, Zamzami N, Mak T, Jaattela M, Penninger JM, Garrido C, Kroemer G. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001;3:839-843
 - 42 Peng Q, Nesland JM. Effects of photodynamic therapy on tumor stroma. *Ultrastruct Pathol* 2004;28:333-340
 - 43 van Dongen GA, Visser GW, Vroenenraets MB. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:31-52
 - 44 Peng Q, Warloe T, Moan J, Godal A, Apricena F, Giercksky KE, Nesland JM. Antitumor effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can be enhanced by the use of a low dose of photofrin in human tumor xenografts. *Cancer Res* 2001;61:5824-5832
 - 45 Dolmans DE, Kadambi A, Hill JS, Flores KR, Gerber JN, Walker JP, Rinkes IH, Jain RK, Fukumura D. Targeting tumor vasculature and cancer cells in orthotopic breast tumor by fractionated photosensitizer dosing photodynamic therapy. *Cancer Res* 2002;62:4289-4294
 - 46 Kamuhabwa AR, Agostinis P, D'Hallewin MA, Kasran A, de Witte PA. Photodynamic activity of hypericin in human urinary bladder carcinoma cells. *Anticancer Res* 2000;20:2579-2584
 - 47 Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57-70
 - 48 Barberi-Heyob M, Vedrine PO, Merlin JL, Millon R, Abecassis J, Poupon MF, Guillemin F. Wild-type p53 gene transfer into mutated p53 HT29 cells improves sensitivity to photodynamic therapy via induction of apoptosis. *Int J Oncol* 2004; 24:951-958
 - 49 Usuda J, Okunaka T, Furukawa K, Tsuchida T, Kuroiwa Y, Ohe Y, Saijo N, Nishio K, Konaka C, Kato H. Increased cytotoxic effects of photodynamic therapy in IL-6 gene transfected cells via enhanced apoptosis. *Int J Cancer* 2001;93:475-480
 - 50 Morgan J, Oseroff AR, Cheney RT. Expression of the peripheral benzodiazepine receptor is decreased in skin cancers in comparison with normal skin. *Br J Dermatol* 2004;151:846-856
 - 51 Ortel B, Sharlin D, O'Donnell D, Sinha AK, Maytin EV, Hasan T. Differentiation enhances aminolevulinic acid-dependent photodynamic treatment of LNCaP prostate cancer cells. *Br J Cancer* 2002;87:1321-1327
 - 52 Jiang FN, Liu DJ, Neyndorff H, Chester M, Jiang SY, Levy JG. Photodynamic killing of human squamous cell carcinoma cells using a monoclonal antibody-photosensitizer conjugate. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:1218-1225
 - 53 Hemming AW, Davis NL, Dubois B, Quenville NF, Finley RJ. Photodynamic therapy of squamous cell carcinoma. An evaluation of a new photosensitizing agent, benzoporphyrin derivative and new photoimmunoconjugate. *Surg Oncol* 1993;2:187-196
 - 54 Sharman WM, van Lier JE, Allen CM. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:53-76

异种胰岛移植的化学免疫抑制治疗

张建国, 沈 滨, 刘晓君

张建国, 沈滨, 刘晓君, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科
黑龙江省哈尔滨市 150086
通讯作者: 张建国, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二
医院普外二科, zhang jiang43@hotmail.com
收稿日期: 2005-05-13 接受日期: 2005-06-08

摘要

移植分泌胰岛素的细胞、组织或器官为 I 型糖尿病(IDDM)患者提供了可靠的治疗手段. 相对于胰腺移植来说, 胰岛移植方法简单、安全、并发症少以及死亡率低, 易于为患者所接受. 但供体短缺及排斥反应目前仍然是制约胰岛移植被广泛应用于临床的主要障碍. 在预防及控制排斥反应中, 免疫抑制药物发挥了巨大的作用. 然而目前的抗排斥反应药物如 CsA、FK506 等在同种胰岛移植中作用显著, 在异种胰岛移植中却作用甚微. 探索新的免疫抑制药物及药物组合将对解决供体短缺以及排斥反应问题产生深远影响.

张建国, 沈滨, 刘晓君. 异种胰岛移植的化学免疫抑制治疗. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1885-1888
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1885.asp>

0 引言

目前胰岛移植面临的一个严峻问题是同种胰岛供体短缺, 而异种移植的开展为解决这一难题带来了希望. 提高异种胰岛存活的关键是预防和控制排斥反应, 而化学免疫抑制剂对于控制异种胰岛移植排斥反应起十分重要的作用. 用于异种胰岛移植的化学免疫抑制剂主要有早期的环孢霉素 A(CsA)和他克罗姆(FK506), 以及近年来出现的 15-脱氧精脒素(15-DSG)、雷帕霉素(RPM)、霉酚酯酸(MMF)和新型免疫抑制剂 LEF、FTY720 等.

1 传统化学免疫抑制剂

1.1 CsA CsA作为目前临床应用最广泛的免疫抑制剂已有 20 多年的历史. 通过阻断编码细胞因子白介素(IL)-2 的基因转录, CsA 可选择性抑制 T 细胞活化. CsA 是一种钙神经毒碱, 可阻断胞质内 IL-2 转录因子的磷酸化, 从而阻止 T 细胞内的细胞因子基因的活化. CsA 的主要副作用为肾毒性. 有报道^[1]对胰岛素释放有不同程度的抑制作用.

在大-小鼠异种胰岛移植中, 移植前若将胰岛进行低温培养, 则可使植入肾被膜下的移植物存活时间明显延长, 同时应用 CsA 并不能明显延长移植物的生存时间. 另有报道^[2]将仓鼠胰岛植入大鼠睾丸组织内, 在应用 CsA 的情况下使受体血糖正常达 230 d 以上, 当然这种情况不能排除睾丸作为免疫特惠区对排斥反应的良性影响. 以

上结果提示单独应用 CsA 时大-小鼠异种胰岛移植排斥反应的影响不大, 其中移植物生存时间延长的表现很可能是与移植前的预处理和移植部位有关.

1991 年 Morel *et al*^[3]行狗-猪异种胰岛移植, 使用 CsA、硫唑嘌呤(AZA)和强的松(PRED)使胰岛移植物有功能存活达数天, 之后移植物很快失去了功能, 可以看出在异种胰岛移植中, 即使应用了 CsA, 早期排斥反应仍然可以发生. 为了减少 CsA 的毒性作用, 增加其在异种胰岛移植中的抗排斥反应作用, Wennberg *et al*^[4]应用 CsA 联合单克隆抗 CD40 配基抗体(aCD40L), 使猪-大鼠异种胰岛移植物存活超过 12 d, 未见排斥反应, 但远期效果尚不明确.

1.2 FK506 80 年代晚期, FK506 开始被应用于临床肝移植的研究中, 发现其有比 CsA 更强的免疫抑制作用, 更能控制排斥反应发生, 延长移植物存活时间. FK506 的作用机制与 CsA 相似, 其与所谓的 FK506 结合蛋白(FKBP-12)结合, 通过阻断 IL-2 转录因子的磷酸化过程阻止 T 细胞内细胞因子的活化. 与此同时其他 T 细胞活化基因, 如 C-MYC、IL-3、GM-CSF、TNF- α 、INF- γ 等重要淋巴因子的基因编码同时受到影响^[5], 并抑制混合淋巴细胞反应、细胞毒性 T 细胞活性以及 IL-2R 的表达.

临床上应用 FK506 可发生急性和慢性肾毒性. 静脉注射 FK506 还可出现一定程度的神经症状, 大多在减量或停用后消失. FK506 对胰岛细胞具有毒性作用, 可导致高血糖, 在术后 3、6 mo 内胰岛素依赖性高血糖发生率分别是 15% 和 20%, 但术后 1 a 则减少至 5.5%^[6]. 与 CsA 相比, FK506 对肾脏、胰岛毒性较低.

FK506 在大鼠、小鼠和猪的同种胰岛移植中对移植物的生存和排斥反应的控制均有改善^[7]. FK506 单独用于异种胰岛移植的报道相对较少, 一例报道^[8]将仓鼠胰岛植入大鼠肝内, 联合应用小剂量 FK506 与 15-DSG, 使移植物存活时间明显延长(达 30.7 d). Song *et al*^[9]联合应用 FK506 和 CsA 于猪-大鼠异种胰岛移植中, 显著延长了移植物的存活时间, 但在第 24 d 时有些观察组出现了排斥反应的迹象.

1.3 CsA 与 FK506 对胰岛素分泌的影响 研究表明^[3]CsA 与 FK506 在胰腺的聚积浓度要远远大于其他器官, 因而直至这一浓度降低之前, CsA 与 FK506 可能对胰岛功能有长期影响. 有研究显示短期应用 CsA 可见到鼠类 B 细胞超微结构的改变, 而停止给药后, CsA 对胰岛的抑制作用仍可持续达 2-3 wk.

不同剂量的CsA和FK506对正常狗静脉注射葡萄糖和给予胰高血糖素引起的胰岛素分泌也会产生明显的抑制作用.这种对分泌的影响一直持续到停药后至少1 mo;而对于CsA甚至会持续到停药后4 mo.另外,CsA还明显抑制狗的自体胰岛移植和同种胰岛移植的胰岛素分泌,并可能造成B细胞功能的不可逆损害.研究^[10]还显示,口服FK506可引起了狗葡萄糖-胰岛素的代谢紊乱,停药后恢复正常,但应用FK506 4 wk停药,正常的胰岛素分泌则无法重建.

需要指出的是,在犬类CsA与FK506的有效使用剂量要比人类高得多.Ricordi *et al*^[11]将10倍于人体治疗剂量的FK506用于裸小鼠肾被膜下人类胰岛移植,发现对人胰岛有毒性,而小剂量时则未表现出毒性.另有实验表明CsA对仓鼠B细胞系和人胰岛的抑制作用分别持续到停药后16 h和48 h.Kaufman *et al*^[12]发现用于人类胰岛移植时,治疗范围的CsA对胰岛自体移植无毒性作用.尽管这些结果可能提示正常起免疫抑制作用的剂量在人类可能对胰岛功能无影响,但仍需要谨慎的引用这些数据.因为毕竟不少报道^[13]发现,胰肾联合移植后用CsA治疗的患者出现了B细胞功能缺失.

总之,CsA和FK506对胰岛的长期抑制作用,可能仅仅反映了大剂量用药时对胰岛B细胞直接的细胞毒性作用,B细胞功能发生了不可逆的丧失.这提示我们在控制异种胰岛移植排斥时,应尽量减少这两种药物的剂量.

2 新型免疫抑制剂

2.1 15-脱氧精脒素 15-脱氧精脒素(15-deoxyspergulin, 15-DSG)是一种抗肿瘤抗生素,能够抑制巨噬细胞功能,减低原发及继发抗体反应,并可能对控制体液免疫反应特别有效.与FK506和CsA不同,15-DSG被证实对培养胰岛的胰岛素分泌无抑制作用.

研究^[8]表明15-DSG在仓鼠对大鼠肝内胰岛移植时可明显延长移植物的生存(18.7 d vs 2.9 d);DSG联合抗胸腺细胞球蛋白(ATG)可有效减低胰岛移植原发无功能的发生.而另有研究^[14]显示,RATG(抗兔胸腺细胞球蛋白)结合全淋巴照射,对NOD小鼠异种胰岛移植物的长期生存并无明显作用,但是与15-DSG合用则表现出协同作用.在猪对大鼠胰岛移植,Krook *et al*^[15]联合应用一定剂量的CsA与15-DSG(10 mg/kg),与移植后12 d观察排斥反应发现,浸润细胞明显减少(偶见),可见到充足的内分泌细胞,移植物生存获得显著改善.可见,对于大动物,单独应用15-DSG控制异种胰岛排斥反应很难达到理想效果,但与其他药物联合使用往往容易获得良好效果.

2.2 LEF LEF,化学名为*N*-(三氟甲基苯)-5-甲基恶唑-4-羧酰胺($C_{12}H_9F_3N_2O_2$),在体内被转化为活性代谢产物A77 1726.有证据表明后者干预嘧啶代谢,抑制T细胞和B细胞增殖和抗体产生^[16-17].值得一提的是目前尚未发现LEF的任何副作用.

LEF可以延长同种和协同性异种移植物的生存,逆转正在进行的急性排斥反应,减少同种特异性抗体的生成.LEF对心肾、小肠、角膜及皮肤等器官移植具有良好的免疫抑制作用,同时对同种、异种、急性和慢性排斥反应等均有不同程度的改善^[18-20],在这些研究中均发现LEF与CsA有协同作用.

在链脲霉素(STZ)诱发的糖尿病模型鼠类异种胰岛移植中,LEF可预防急性排斥反应的发生,并可将平均存活时间(MST)由 7 ± 2.6 d延长至 55.7 ± 12.3 d;但对自发性糖尿病(NOD)小鼠却无此作用^[21].

1995年,Wennberg *et al*^[22]将LEF与其他免疫抑制药物联合应用于胎猪胰岛样细胞团(ICC)大鼠肾被膜下移植,发现单独应用LEF对排斥反应无明显抑制作用;而与CsA合用时,移植后12 d几乎完全控制了异种排斥反应的发生,仅见少量细胞浸润于ICC周围,移植物中见到足量(定义为与植入裸鼠体内的情况相同)的内分泌细胞;LEF与FK506或RPM联用对异种胰岛也有保护,但作用相对较弱.

Wennberg *et al*^[23]又在先前的基础之上进行了包括LEF、CsA、FK506、15-DSG、MMF以及RPM在内的三种以上的免疫抑制药物联合应用的实验.在植入12 d,除了LEF与MMF或15-DSG三联组合时可见到大量的胰岛细胞外,其他的三联组合方案以及各种药物单用时均未见完整的内分泌细胞.较理想的结果是,在LEF与CsA和MMF三联应用时病理上可见到足量的内分泌细胞,仅偶尔可见浸润细胞,同时浸润细胞的种类也最少,异种移植物保持良好的功能达100 d以上.

1998年,Mital *et al*^[24]将LEF与CsA及抗淋巴细胞血清组合使用,应用于猪胰岛小鼠肾被膜下移植,单用LEF、CsA及抗淋巴细胞血清均较对照组生存时间延长;使用LEF与CsA时,生存期延长一倍以上(MST>19 d).在另一例胎猪ICC对大鼠的异种胰岛移植中,单用LEF对异种胰岛生存无影响;与CsA合用12 d则几乎完全预防了排斥反应的发生,仅偶尔见到浸润细胞,同时亦可见到足量的胰岛.与FK506或RPM联用也可以保护移植物,但不如与CsA联用效果好.

LEF目前还未用于人类胰岛移植,但其应用于鼠类和猪的良好效果,尤其是在异种移植方面,可能预示着在大动物和人异种胰岛移植应用的广阔前景.

2.3 FTY720 FTY720最初发现于一种名为Isaria Sinclairii的子囊菌的培养滤过液中.化学名为2-氨基-2[2-(4-辛基)乙基]丙烷-1,3-二碘盐酸盐.在主要组织相容性复合物(MHC)不相容的大鼠种系中表现出比CsA和FK506都要强的免疫抑制作用^[24].

FTY720的作用机制与FK506和CsA不同,FTY720不会影响到IL-2的表达.FTY720的主要特点是引起外周循环淋巴细胞数量明显下降.以0.1 mg/kg的剂量给大鼠口服,可见外周血、胸导管淋巴、淋巴结细胞数量明显

减少, 脾中的淋巴细胞也部分减少. 而同时, 外周淋巴结(PLN)、肠系膜淋巴结(MLN)以及Peyer' Patches(集合淋巴结, PP)的淋巴细胞数量明显增加^[24-26].

FTY720的免疫抑制作用与减少循环中的淋巴细胞有关. 在正常大鼠活体应用FTY720 3 d可使外周血淋巴细胞数量迅速下降至对照组的3%以下, 而同时不改变胸腺、脾或淋巴结的多个淋巴细胞亚群的总数量或百分比, 口服FTY720 3-6 mo后外周血淋巴细胞数量明显下降, 多形核白细胞数量增加, 中性粒细胞和单核细胞数量不变^[27-28].

FTY720口服吸收好, 在血细胞中分布浓度比血浆中好. FTY720的副作用较轻微, 主要有呕吐、腹泻和厌食. 无肾、肝、胰腺及骨髓毒性. 总的来看, FTY720是人工合成的一种真菌代谢产物. 该药毒性小, 免疫抑制作用强, 与CsA、FK506和RPM等均有协同作用, 因而可以用于提高针对细胞因子合成及信号传导过程的药物疗效^[29].

单独应用FTY720能阻断同种移植排斥反应, 可延长移植器官存活时间, 可明显延长MHC相容或不相容的大鼠同种心、肝、肾、皮肤移植物和狗、猴肾移植的存活时间^[27, 29-31]. 另外, 还有研究^[28]显示一定剂量的FTY720于大鼠同种移植后3-4 d应用, 仍可延长移植物的存活时间, 提示此药尚可逆转正在发生的排斥反应.

对于异种移植, Miyata *et al*^[32]将FTY720与FK506应用于仓鼠对大鼠的心、肝和皮肤移植中, 发现单独应用FTY720不会延长移植物的生存时间, 但与FK506联合应用则可使后者的免疫抑制作用显著增强.

在同种胰岛移植, FTY720以5 mg/kg口服可使大鼠肝内移植物生存时间较对照组显著延长(12.2 ± 5.6 d vs 2.8 ± 2.6 d)^[29]. 目前FTY720用于异种胰岛移植的研究不多. 研究^[33]发现, FTY720单用时对成猪胰岛(adult porcine islets, API)大鼠肾被膜下移植物的生存无明显影响;但FTY720与CsA联合使用时, 不仅浸润细胞数量和种类都明显减少, 而且补体和抗体在移植物的沉积也减少, 移植12 d后于移植物中仍可见大量的API. Maeda *et al*^[34]观察到, 联合应用FTY720和CsA使接受API的糖尿病大鼠保持血糖正常达 53.0 ± 15.8 d.

FTY720能加强亚治疗剂量的CsA等药物的免疫抑制作用, 减少其用量, 减轻其毒性. 例如, FTY720与亚治疗剂量的CsA对大鼠心脏同种移植物和犬肾脏同种移植物以及大鼠皮肤同种移植物均产生协同作用^[26]. 另有报道FTY720与FK506在大鼠的同种移植模型中有协同作用^[29].

此外, FTY720能够有效缓解T细胞介导的某些自身免疫反应^[35];在FK506无明显作用的情况下, FTY720还可使大鼠同种胰腺移植生存时间明显延长, 且呈剂量依赖性^[36]. Suzuki *et al*^[37]研究FTY720与诱发实验性糖尿病模型的关系, 发现尽管FTY720不能减少放射引起的糖尿病发生率, 尽管FTY720本身也可以诱导淋巴细胞特异性凋亡, 但在切除胸腺的大鼠其并不诱发自身免疫性糖尿病.

由于FTY720独特的免疫抑制机制, 对胰岛素分泌的

毒副作用小, 加上其对于自身免疫性疾病的控制能力以及对其他免疫抑制药物的协同作用, 提示在未来的异种胰岛移植中, FTY720可能将越来越显示出巨大的应用价值.

3 参考文献

- Polastri L, Galbiati F, Bertuzzi F, Fiorina P, Nano R, Gregori S, Aldighetti L, Pozza G, Secchi A, Adorini L, Davalli AM. Secretory defects induced by immunosuppressive agents on human pancreatic beta-cells. *Acta Diabetol* 2002;39:229-233
- Bellgrau D, Selawry H. Cyclosporine-induced tolerance to intratesticular islet xenografts. *Transplantation* 1990;50:654-657
- Morel P, Kaufman DB, Platt J, Braymann K, Field MJ, Lloveras JK, Almond PS, Fasola C, Kyriakides P, Tzardis P, Schlumpf R, Matas AJ, Sutherland DER. Islet xenotransplantation in a pre-clinical large animal model. *Transplant Proc* 1991;23:875-876
- Wennberg L, Goto M, Maeda A, Song Z, Benjamin C, Groth CG, Korsgren O. The efficacy of CD40 ligand blockade in discordant pig-to-rat islet xenotransplantation is correlated with an immunosuppressive effect of immunoglobulin. *Transplantation* 2005;79:157-164
- Thomson AW. The immunosuppressive macrolides FK506 and rapamycin. *Immunol Lett* 1991;29:105-111
- 毛海萍, 余学清. 新型免疫抑制剂与器官移植. 国外医学内科学分册 1999;26:68-70
- Molano RD, Pileggi A, Berney T, Poggioli R, Zahr E, Oliver R, Malek TR, Ricordi C, Inverardi L. Long-term islet allograft survival in nonobese diabetic mice treated with tacrolimus, rapamycin, and anti-interleukin-2 antibody. *Transplantation* 2003;75:1812-1819
- Ueno M, Nakajima Y, Kanehiro H, Yoshimura A, Nakano H. Immunosuppressive effect in combination therapy of cyclosporine A, FK506 and 15-deoxyspergualin on a pancreatic islet xenotransplantation. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 1993;94:376-382
- Song Z, Zhang J, Bennet W, Wennberg L. Tacrolimus inhibits discordant islet xenograft rejection: a study in the pig-to-rat model. *Xenotransplantation* 2003;10:628-634
- Shapiro AM, Geng Hao E, Lakey JR, Finegood DT, Rajotte RV, Kneteman NM. Defining optimal immunosuppression for islet transplantation based on reduced diabetogenicity in canine islet autografts. *Transplantation* 2002;74:1522-1528
- Ricordi C, Zeng YJ, Alejandro R, Tzakis A, Venkataramanan R, Fung J, Bereiter D, Mintz DH, Starzl TE. In vivo effect of FK506 on human pancreatic islets. *Transplantation* 1991;52:519-522
- Kaufman DB, Morel P, Condie R, Field MJ, Rooney M, Tzardis P, Stock P, Sutherland DE. Beneficial and detrimental effects of RBC-adsorbed antilymphocyte globulin and prednisone on purified canine islet autograft and allograft function. *Transplantation* 1991;51:37-42
- Drachenberg CB, Klassen DK, Weir MR, Wiland A, Fink JC, Bartlett ST, Cangro CB, Blahut S, Papadimitriou JC. Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine: morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation. *Transplantation* 1999;68:396-402
- Thomas F, Pittman K, Ljung T, Cekada E. Deoxyspergualin is a unique immunosuppressive agent with selective utility in inducing tolerance to pancreatic islet xenografts. *Transplant Proc* 1995;27:417-419
- Krook H, Wennberg L, Hagberg A, Song Z, Groth CG, Korsgren O. Immunosuppressive drugs in islet xenotransplantation: a tool for gaining further insights in the mechanisms of the rejection process. *Transplantation* 2002;74:1084-1089
- Xu X, Williams JW, Gong H, Finnegan A, Chong AS. Two activities of the immunosuppressive metabolite of leflunomide, A77 1726. Inhibition of pyrimidine nucleotide synthesis and protein tyrosine phosphorylation. *Biochem Pharmacol* 1996;52:527-534

- 17 Chong AS, Rezai K, Gebel HM, Finnegan A, Foster P, Xu X, Williams JW. Effects of leflunomide and other immunosuppressive agents on T cell proliferation in vitro. *Transplantation* 1996;61:140-145
- 18 D'Silva M, Candinas D, Achilleos O, Lee S, Antoniou E, DeRoover A, Germentis A, Stavropoulos C, Buckels J, Mayer D. The immunomodulatory effect of leflunomide in rat cardiac allotransplantation. *Transplantation* 1995;60:430-437
- 19 Shen J, Chong AS, Xiao F, Liu W, Huang W, Blinder L, Foster P, Sankary H, Jensik S, McChesney L, Mital D, Williams JW. Histological characterization and pharmacological control of chronic rejection in xenogeneic and allogeneic heart transplantation. *Transplantation* 1998;66:692-698
- 20 Yeh LS, Gregory CR, Griffey SM, Lecouteur RA, Morris RE. Effects of leflunomide and cyclosporine on myocutaneous allograft survival in the rat. *Transplantation* 1996;62:861-863
- 21 Guo Z, Mital D, Shen J, Chong ASF, Tian Y, Foster P, Sankary H, McChesney L, Jensik SC, Williams JW. Differential effect of leflunomide on concordant xenogeneic islet graft rejection and recurrence of autoimmune diabetes. *Transplant Proc* 1998;30:463-464
- 22 Wennberg L, Wallgren AC, Sundberg B, Rafael E, Zhu S, Liu J, Tibell A, Karlsson-Parra A, Groth CG, Korsgren O. Immunosuppression with leflunomide and cyclosporine prevents pig-to-rat islet xenograft rejection. *Transplant Proc* 1995;27:3314-3315
- 23 Wennberg L, Song Z, Bennet W, Zhang J, Nava S, Sundberg B, Bari S, Groth CG, Korsgren O. Diabetic rats transplanted with adult porcine islets and immunosuppressed with cyclosporine A, mycophenolate mofetil, and leflunomide remain normoglycemic for up to 100 days. *Transplantation* 2001;71:1024-1033
- 24 Mital D, Guo Z, Tian Y, Shen J, Podlasek W, Foster P, Sankary H, Jensik S, McChesney L, Chong A, Olack B, Williams J. Leflunomide-based immunosuppression for porcine islet xenotransplantation. *Transplant Proc* 1998;30:515
- 25 Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, Kataoka H, Kawaguchi T, Ohtsuki M, Hoshino Y. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. *J Immunol* 1998;160:5037-5044
- 26 Yanagawa Y, Masubuchi Y, Chiba K. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats, III. Increase in frequency of CD62L-positive T cells in Peyer's patches by FTY720-induced lymphocyte homing. *Immunology* 1998;95:591-594
- 27 Suzuki S, Enosawa S, Kakefuda T, Shinomiya T, Amari M, Naoe S, Hoshino Y, Chiba K. A novel immunosuppressant, FTY720, with a unique mechanism of action, induces long-term graft acceptance in rat and dog allotransplantation. *Transplantation* 1996;61:200-205
- 28 Yamasaki T, Inoue K, Hayashi H, Gu Y, Setoyama H, Ida J, Cui W, Kawakami Y, Kogire M, Imamura M. Effect of a new immunosuppressive agent, FTY720, on survival of islet allografts. *Cell Transplantation* 1998;7:403-406
- 29 Nikolova Z, Hof A, Baumlin Y, Hof RP. Combined FTY720/cyclosporine A treatment promotes graft survival and lowers the peripheral lymphocyte count in DA to lewis heart and skin transplantation models. *Transpl Immunol* 2001;8:267-277
- 30 Yanagawa Y, Hoshino Y, Chiba K. The significance of timing of FTY720 administration on the immunosuppressive effect to prolong rat skin allograft survival. *Int J Immunopharmacol* 2000;22:597-602
- 31 Nakajima H, Sun E, Mizuta N, Fujiwara I, Oka T. FTY720 inhibits the mRNA expression of intragraft cytotoxic molecules, leading to cardiac allograft survival. *Transplant Proc* 1998;30:2217-2220
- 32 Miyata Y, Ohdan H, Noriyuki T, Shintaku S, Shibata S, Yamamoto H, Fan XH, Fudaba Y, Yoshioka S, Asahara T, Fukuda Y, Dohi K. Prolongation of concordant xenograft survival by treatment with FTY720. *Transplant Proc* 1998;30:4163-4165
- 33 Zhang J, Song Z, Wijkstrom M, Bari S, Sundberg B, Nava S, Groth CG, Korsgren O, Wennberg L. FTY720 in combination with CsA inhibits islet xenograft rejection: a study in the pig-to-rat model. *Transplant Proc* 2000;32:1017
- 34 Maeda A, Goto M, Zhang J, Bennet W, Groth CG, Korsgren O, Wennberg L. Immunosuppression with FTY720 and cyclosporine A inhibits rejection of adult porcine islet xenografts in rats. *Transplantation* 2003;75:1409-1414
- 35 Yanagawa Y, Sugahara K, Kataoka H, Kawaguchi T, Masubuchi Y, Chiba K. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. II. FTY720 prolongs skin allograft survival by decreasing T cell infiltration into grafts but not cytokine production in vivo. *J Immunol* 1998;160:5493-5499
- 36 Suzuki K, Kazui T, Kawabe A, Li XK, Funeshima N, Amemiya H, Suzuki S. Immunosuppressive effect of FTY720 on rat pancreas allograft. *Transplant Proc* 1998;30:3417-3418
- 37 Suzuki K, Yan H, Li XK, Amemiya H, Suzuki S, Hiromitsu K. Prevention of experimentally induced autoimmune type I diabetes in rats by the new immunosuppressive reagent FTY720. *Transplant Proc* 1998;30:1044-1045

编辑 王谨晖 审读 张海宁

5-FU相关的药物疗效及毒性预测分子研究进展

魏 嘉, 王立峰, 刘宝瑞

魏嘉, 王立峰, 刘宝瑞, 南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心
江苏省南京市 210008

通讯作者: 刘宝瑞, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院
肿瘤中心. baorui@medmail.com.cn

电话: 025-83304616-21002 传真: 025-83107095

收稿日期: 2005-06-09 接受日期: 2005-06-13

摘要

5-氟尿嘧啶(5-FU)作为一种抗代谢药物, 已广泛应用于各种实体肿瘤的治疗。但是, 由于肿瘤及个体异质性的影响, 仍有部分患者对该药不敏感或出现严重致死性毒性反应。药物基因组学和药物遗传学分别以 mRNA 的表达和 DNA 基因型的分析为参数, 从 DNA/RNA 水平上对药物的有效性、毒副作用以及患者的预后进行预测, 针对不同个体选择药物, 使真正意义上的化疗成为可能。本文着重论述了几个 5-FU 的疗效及毒性预测分子的药物基因组学和药物遗传学研究进展, 初步探讨了他们在指导化疗药物选择方面的重要作用。

魏嘉, 王立峰, 刘宝瑞. 5-FU 相关的药物疗效及毒性预测分子研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1889-1893
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1889.asp>

0 引言

自Heidelberger首次合成氟尿嘧啶类抗癌药物5-氟尿嘧啶(5-FU)以来, 5-FU已广泛应用于各种实体肿瘤的治疗, 如大肠癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈部肿瘤、胃癌和卵巢癌等, 目前已成为消化道恶性肿瘤普遍使用的化疗药物。

尽管5-FU的应用开辟了化学药物治疗的新纪元, 但是对于肿瘤转移患者, 以氟尿嘧啶为基础的化疗敏感性只有22%, 中位生存期仅11 mo. 临床最常见的现象就是不同患者对同一药物有不同反应, 这是一直困扰临床治疗的一个重大问题。长期以来, 人们追求根据肿瘤自身药物敏感性为指导开展个体化的药物治疗。最近3 a, 随着人类基因组计划的完成, 恶性肿瘤的分子学亚分类成为可能, 以药物敏感性相关基因为检测目标的所谓药物基因组学(pharmacogenomics)、药物遗传学(pharmacogenetics)获得快速发展, 个体化的化疗成为可能。5-FU作为消化道肿瘤最常用的化疗药物之一, 其疗效与毒性相关基因的研究备受瞩目。与5-FU相关基因的基础研究早已广泛开展, 其具体机制也有较明确的认识。近年来, 越来越多的临床研究逐渐开展, 已显示出了无穷的潜力。本文就5-FU的代谢特点以及其相关药物效应及毒性预测分子作一综述。

1 5-FU代谢特点

5-FU结构与嘧啶碱基尿嘧啶和胸腺嘧啶相似, 为周期特异性药物。5-FU本身没有抗肿瘤活性, 在体内有两种代谢形式: 在肝脏中的分解代谢和组织中的合成代谢。

大约有80%以上的药物在肝脏中经二氢嘧啶脱氢酶(dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD)作用分解代谢为没有活性的产物二氢氟尿嘧啶(DHFU); 另外约20%可被细胞迅速摄取且沿几种途径迅速代谢转化为活性代谢产物: 一磷酸氟尿嘧啶脱氧核苷(FdUMP)、三磷酸氟尿嘧啶脱氧核苷(FdUTP)和三磷酸氟尿嘧啶(FUTP)。(1) FdUMP通过其共价底物还原型叶酸(CH₂FH₄)与胸腺嘧啶核苷酸合成酶(thymidylate synthase, TS)形成三元复合物(ternary complex), 抑制TS的催化活性, 阻断尿嘧啶脱氧核苷(dUMP)合成酶转变为胸腺嘧啶脱氧核苷(dTMP), 影响DNA的生物合成。FdUMP还可以排空三磷酸脱氧胸苷(dTTP), 使DNA合成的必需前体减少。dTTP的缺乏继而还可以影响DNA修复功能而引起DNA链的断裂; (2) FdUMP可进一步磷酸化为FdUTP, 直接掺入DNA, 抑制DNA链的延长, 同时改变DNA的稳定性, 继而引起DNA单链断裂; (3) FUTP则直接掺入RNA中产生异常的RNA, 干扰蛋白质合成^[1]。

从以上描述可以看出, TS和DPD分别作为5-FU合成代谢和分解代谢的关键酶, 在5-FU的作用途径中起了重要的作用。

2 TS

2.1 TS在5-FU合成途径中的作用 细胞内靶酶的含量及其活性的变化是影响多种化疗药物抗肿瘤活性的重要因素, TS催化dTMP起始合成唯一通路dUMP的甲基化反应。因此, TS对细胞内DNA合成和细胞生长所需要的TMP的生成至关重要, TS已成为细胞内5-FU发挥抗癌作用的主要靶酶, 5-FU的活性代谢产物FdUMP可与dUMP竞争性结合TS, 使TS失活, 抑制DNA的合成, 从而抑制肿瘤细胞的生长和增殖。

已有研究^[2-3]表明, 肿瘤细胞可通过多种机制介导对5-FU的抵抗性, 其中包括活化5-FU的关键酶缺失; 5-FU代谢酶活性增加; TS还原型叶酸底物的缺乏和TS基因扩增; 基因过度表达或TS基因突变引起的TS活性或水平的变化; DNA损伤反应通路的变化等等。此外, 还有核苷酸补救合成途径参与的证据。其中, TS基因突变、TS基因表达增强以及TS基因扩增等原因引起的TS活性和水平

的改变是肿瘤细胞对5-FU耐药的重要机制。

2.2 TS mRNA与5-FU抵抗以及预后 很多体外实验表明, 5-FU耐药与TS基因扩增有关. Murakami *et al*^[4]用5-氟-2'-脱氧尿苷(FdUrd)处理结肠癌细胞系DLD-1 72 h后, 在获得的抗FdUrd细胞DLD-1/FdUrd中测得TS mRNA增长7倍. Fukushima *et al*^[5]用5-FU处理人结肠癌KM12C细胞后得到对5-FU不敏感细胞(5-FU的抑制率为7.9%), 与非处理细胞(5-FU抑制率为81.8%)比较, 其TS活性高2-3倍, TS mRNA水平的增加与TS活性的增加是一致的。

随着实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR)的应用, 采用石蜡包埋标本检测mRNA的表达, 大大地扩大了药物基因组学的应用范围并提高了其准确性. Lenz *et al*^[6]在1995年报道了65例接受5-FU和铂类药物方案化疗的胃癌患者, 其胃镜活检肿瘤组织中TS mRNA水平与化疗有效率和中位生存期有关: TS mRNA水平高者中位生存期为6 mo, 而TS mRNA水平低者, 生存期为43 mo。

自这一有开创性意义的报道以后, 很多相关研究相继开展. 免疫组化也用于检测TS蛋白水平, 在欧洲Nordic trail的一项研究^[7]中, 862例大肠癌患者接受单独手术治疗/手术+5-FU辅助化疗. 结果表明, 在单独手术组, 与高TS水平组相比, 低TS水平者有更好的生存($P = 0.04$). 在接受术后辅助治疗组, 作者却认为高TS水平者临床获益较明显. 这一结果与用荧光定量PCR测得的低TS mRNA水平有效率高、生存期长的结论相矛盾。

综合分析若干篇肠癌患者5-FU化疗有效率与TS水平相关性文献发现, 转移性大肠癌患者肿瘤组织内低表达TS者可从姑息性5-FU化疗中获益^[8-9]; 相反, 局部进展大肠癌患者肿瘤组织内低表达TS者未见明显获益于辅助化疗^[7]. 这些实验结果大多来源于对5-FU为基础的化疗进行的回归分析, 因此有必要在前瞻性研究中使用新的联合化疗方案重新进行评估。

在其他肿瘤如早期直肠癌、非小细胞肺癌、乳腺癌和头颈部肿瘤等也有研究表明TS的表达水平与5-FU的治疗反应密切相关。

在直肠癌患者中, TS表达水平可以作为复发和远处转移的独立预测指标. 有研究者^[10]检测了接受草酸铂和氟尿嘧啶作为二线化疗药物的转移性大肠癌患者的TS mRNA, 发现TS mRNA水平与生存期相关: 其表达越高预示着生存期越短(高TS: 1.5 mo vs 低TS: 10.2 mo). 但另外一篇文献上提到^[11], 在胰腺癌患者中, TS高表达却预示着生存期越长, 其具体机制尚不清楚。

总之, TS是5-FU发挥作用的关键酶, 有研究者^[12]强烈建议要进行辅助性化疗的肠癌患者检测TS mRNA水平作为化疗的预测因子。

2.3 TS基因多态性与5-FU敏感性 虽然, 目前与化疗相关的TS活性的研究大部分是基于检测肿瘤组织内TS mRNA的表达水平. 但是已有多篇文献报道^[13-14], TS基因的表达在一定程度上受到TS基因多态性的影响. 其中TS启动子增强区域(thymidylate synthase promoter enhancer region, TSER)是由不同拷贝数的28 bp的重复序列组成, 该序列有2-9个拷贝数(TSER*2-TSER*9)的多态性存在. 体外实验证明提高28 bp重复序列的数目将导致TS基因表达增加, 还可提高TS酶活性. Pullarkat *et al*^[13]研究表明TSER*3纯合子的TS mRNA水平比TSER*2纯合子高3.6倍($P = 0.004$); TSER*3纯合子的TS mRNA水平则比TSER*2/TSER*3杂合子高1.7倍. 另外, Kawakami *et al*^[14]还报道了在一组92例接受优氟定(uridine and tegafur, UFT)治疗的胃肠肿瘤患者的基因型分析中, TSER*3纯合子(60.8%)的TS蛋白的表达比TSER*2纯合子(4.6%)高3倍($P < 0.05$). 另外, 还有研究者提出TS翻译水平可能与其基因型相关的假说. 所以, TSER的基因型可以单独或者是联合TS蛋白水平以及TS mRNA表达水平作为5-FU敏感性的预测指标。

在一组221例肠癌患者接受辅助5-FU+亚叶酸钙(CF)方案化疗的研究中更加确定了TS多态性的临床价值. TSER*2纯合子和TSER*2/TSER*3杂合子(74%)患者临床生存期显著提高, 而TSER*3纯合子(26%)患者无生存获益^[15]. 这一研究肯定了检测TSER基因型在预测使用5-FU化疗的缓解率中的重要作用。

TS基因其他位点的多态性研究也有报道, 在2004年ASCO会议上报道在213例接受5-FU+levamisole/leucovorins为标准化疗方案的II-IV期的大肠癌患者中, TS基因的另一多态性3'非编码区6 bp的缺失(TS1494del6)与5 a生存期密切相关($P = 0.006$)^[16]. 但其具体机制尚不清楚。

3 DPD

3.1 DPD在5-FU代谢途径中的地位 DPD是胸腺嘧啶和尿嘧啶(包括5-FU)分解代谢的限速酶, 在5-FU的降解和灭活过程中起着重要作用. 5-FU同DPD的两种生理性底物尿嘧啶、胸腺嘧啶一样, 经DPD作用, 能迅速而有效地转化为相应地5, 6-二氢嘧啶(FUH2), 继而进一步代谢和生成无抗癌活性的代谢产物 α -fluoro- β -alanine(F-BAL). DPD在肝脏及单核细胞中活性最高, 同时在全身其他器官比如小肠黏膜中也有较高的活性. 肝脏是5-FU代谢的主要场所, 循环至肝脏的5-FU大约96%均被降解。

5-FU主要在肝脏中代谢, 所以不容易检测标本中DPD活性. 有研究者^[17]报道, 在肝功能正常的患者中, 外周血单核细胞(peripheral mononuclear cells, PMNCs)中DPD的活性与其在肝脏组织中的活性有明显的相关性. 但是也有报道^[15]显示, PMNCs中DPD的活性与

5-FU 的代谢呈负相关. 原因可能为 PMNCs 中 DPD 的活性在个体中的波动和个体间的变异较大, 而且还与 PMNCs 的组成(淋巴细胞和单核细胞所占的比例)和蛋白水平相关.

3.2 DPYD 基因的多态性与 5-FU 的毒副作用 自从 Tuchman *et al* 于 1985 年首次报道了 5-FU 相关的严重副作用与 DPD 的低活性相关以来, DPYD 基因的研究也迅速开展. DPYD 基因位于人类染色体 1p21-1q22, 呈晶状结构, 长约 150 kb, 包含 23 个外显子, 编码 M_r 111 000 蛋白.

对于 DPYD 基因的变异和碱基序列的缺失也研究得较多. 到现在为止, 至少有 20 余种突变与 DPD 活性下降有关. 其中与 5-FU 密切相关的是 DPYD 第 1 986 位剪切位点发生 G 到 A 的转化 (DPYD*2A) 导致外显子 14 的缺失 (IVS14+1G>A), 形成无活性 DPD, 使 5-FU 的合成途径活跃, 其活性代谢产物的累积可以导致血液、神经以及消化系统的毒性, 甚至有时这些毒副作用是致命的^[18]. 理论上讲, 5-FU 相关的严重毒副作用不仅与 DPD 活性降低有关, 还依赖于 5-FU 合成途径中酶表达的增加.

发生 IVS14+1G>A 变异的患者有明显的 DPD 功能不全, 对 5-FU 的清除率比携带野生基因型患者低 2.5 倍, 其药时曲线下面积 (area under the curve, AUC) 高 2.5 倍. 有研究者对接受 5-FU 化疗并且出现 WHO 3-4 级毒副作用的患者进行 DPD 基因型分析发现, 其中有 24-28% 患者的 DPYD 基因存在 IVS14+1G>A 变异 (包括纯合子和杂合子)^[19]. 但是, DPD 基因的缺陷和 DPD 活性之间的关系并未得到完整的诠释. Collie-Duguid *et al*^[20] 对 23 例 DPD 活性降低的患者进行 DPYD 基因型分析, 并未发现他们有 IVS14+1G>A 的变异.

其他可能与 DPD 活性相关的突变还有 DPYD 第 1 796 位密码子由 T 到 G 的变异 (T1796G). 其具体作用机制还有待研究.

3.3 DPD 与 5-FU 的敏感性及其预后评估 TS 作为 5-FU 作用的靶酶, 其表达和 5-FU 的敏感性密切相关. 而 5-FU 分解代谢途径酶表达水平与其作用敏感性方面的研究却较少.

有研究者分析了 60 余种肿瘤细胞系, 结果显示 DPD mRNA 的水平与 DPD 活性以及对 5-FU 的反应性密切相关^[21]. 还有研究者^[22] 认为, DPD 作为 5-FU 代谢的限速酶, 其 mRNA 的水平也决定着 5-FU 的疗效: DPD mRNA 表达水平较低的肿瘤对 5-FU 敏感. DPD 高表达的肿瘤细胞却呈现出对 5-FU 的抵抗.

Horiguchi *et al*^[23] 研究了 119 例乳腺癌术后患者 (其中 87 例术后接受了 5-FU 为主的化疗) 的 DPD 表达与预后的关系. 研究结果显示, DPD 阳性患者的无病生存期与 DPD 阴性患者相比有显著性差异 ($P < 0.05$). 还证明了淋巴结的转移与 DPD 的表达都可以作为无病生存期的独立预后指标. 相似的结果在肠癌患者的研究中也报道.

也有学者^[24] 指出 DPD 的表达本身就可能已经反应了肿瘤的进展, 但是仍然不能限制其作为 5-FU 的毒性、疗效和预后的指标.

4 胸腺嘧啶磷酸化酶 (thymidine phosphorylase, TP)

由于肝脏和胃肠道中 DPD 的活性很高, 所以口服 5-FU 的生物利用度很低. 卡培他滨 (Capecitabine) 作为 5-FU 的前体药物, 在胃肠道的吸收过程中并不会被 DPD 灭活. 通过肝中的羧酸酯酶和胞嘧啶脱氨酶转变为 5-二氢氟尿嘧啶 (5-DHFU), 最后进一步通过肿瘤中的 TP 转化为 5-FU, 发挥其细胞毒性作用.

TP 也称为血小板衍生内皮因子 (platelet-derived endothelial cell growth factor, PDEC GF), 主要与肿瘤细胞的高增殖率、转移侵袭力及肿瘤性血管生成有关. TP 在肿瘤组织中的活性比正常组织高的多, 这也是 Capecitabine 的肿瘤选择性强于 5-FU 的原因. TP 不仅将 5-DFUR 转化为 5-FU, 还参与 5-FU 代谢为活性产物 FdUMP 的过程. 体外细胞培养和异种移植模型实验表明, TP 的高表达与 5-FU 敏感相关, 这可能与 FdUMP 的聚集有关.

Salonga *et al*^[25] 将 TS、DPD 和 TP 三个指标联合用于评估药物的敏感性发现, 所有化疗有效的患者三个指标的表达呈现一致性, 而化疗无效的患者三个指标表达的高低却不相同. 其具体机制仍不清楚, 但研究者提出这样一个假设: 在化疗无效的实验组中, 一些可变因素使药物由敏感变成了抵抗, 而癌细胞在这种情况下却不能相应地调整其基因的表达.

5 亚甲基四氢叶酸还原酶 (methylene tetrahydrofolate reductase, MTHFR)

MTHFR 是叶酸代谢过程中的关键酶, 可将还原型叶酸转变为 5-甲基四氢叶酸 (5-MTHF), 从而使 FdUMP、TS 与还原型叶酸组成的三元复合物减少, 削弱 5-FU 的抗肿瘤作用.

MTHFR 基因具有多态性, 其中最常见的是其第 677 位密码子发生的由 T 到 C 的变异 (C677T). Sohn *et al*^[26] 报道了针对结肠癌细胞和乳腺癌细胞株的 MTHFR 基因型与酶活性的研究表明, 具有变异型的癌细胞的 MTHFR 活性降低, 细胞增殖速度加快, 而对 5-FU 的敏感性增高. MTHFR 基因型的改变还可以影响叶酸的浓度及其在细胞内的分布而改变肿瘤细胞的生长以及对化疗的敏感性.

Cohen *et al*^[27] 分析了 43 例晚期大肠癌患者 MTHFR 基因多态性与以 5-FU 为基础化疗方案疗效的关系, 发现 T/T 基因型 (17/43) 患者的有效率达 100%, 而 C/C (5/43) 和 C/T (21/43) 基因型患者的有效率分别为 47% 和 67%. 由于该病例数较少而没有统计学意义, 所以期待大样本多中心的临床试验来证明此结论.

6 dUTP 核苷酸水解酶 (dUTP nucleotidohydrolase, dUTPase)

TS 活性的抑制可以导致大量 dUTP 的积聚, dUTP 通过直接掺入 DNA, 抑制 DNA 链的延长, 同时还可以改变 DNA 的稳定性, 继而引起 DNA 链断裂, 最终导致细胞的死亡. 在正常情况下, dUTP 核苷酸水解酶和 UDG 可以抑制 dUTP

引起的DNA损伤,所以,dUTP核苷酸水解酶被作为许多细胞毒性药物作用的靶点.dUTPase的过表达可以限制dUTP的聚集,引起TS相关的细胞毒性药物的耐受,最终阻止尿嘧啶错误地掺入到DNA链中;相应的,dUTPase的低表达可以使dUTP聚集,从而提高药物的敏感性.

有研究者^[28]用免疫印记的方法检测了20个大肠癌患者的dUTP核苷酸水解酶的表达,发现其中核dUTP核苷酸水解酶阳性的8个患者(核内阳性表达>10%),没有一个人对5-FU敏感;而另外12个dUTP核苷酸水解酶阴性的患者却对5-FU敏感($P = 0.005$).另外对疾病进展时间和生存期的比较发现,dUTP核苷酸水解酶阳性和dUTP核苷酸水解酶阴性的患者有显著性的差异.所以该作者认为,核中dUTP核苷酸水解酶的过度表达的患者对5-FU为基础的化疗不敏感,疾病进展时间和生存期也较短.但是目前仍缺乏大样本的研究来证实此结论.

以上着重论述了5-FU相关的几个药物有效性及毒性的预测分子的表达和临床指标的相关性,目前对TS、DPD、TP的研究较多,而dUTP核苷酸水解酶及MTHFR的研究还缺乏大样本多中心的研究.但是无论如何,越来越多的体外及临床实验都逐渐地揭示了药物基因组学和药物遗传学在肿瘤化疗中的重要作用.药物基因组学和药物遗传学探讨药物作用的遗传分布以满足临床要求,遗传的多样性对个体差异、临床症状长短、费用及临床疗效等有决定性作用.随着检测技术和检测结果评价的标准化,可以通过对患者基因表达水平以及遗传状态进行分析,设计最佳治疗方案,不仅可以提高药物治疗有效率,还可以避免药物相关的严重毒副作用的发生,这将为肿瘤的个体化疗翻开新的一页.

7 参考文献

- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3:330-338
- Kinsella AR, Smith D, Pickard M. Resistance to chemotherapeutic antimetabolites: a function of salvage pathway involvement and cellular response to DNA damage. *Br J Cancer* 1997;75:935-945
- Chu E, Drake JC, Koeller DM, Zinn S, Jamis-Dow CA, Yeh GC, Allegra CJ. Induction of thymidylate synthase associated with multidrug resistance in human breast and colon cancer cell lines. *Mol Pharmacol* 1991;39:136-143
- Murakami Y, Kazuno H, Emura T, Tsujimoto H, Suzuki N, Fukushima M. Different mechanisms of acquired resistance to fluorinated pyrimidines in human colorectal cancer cells. *Int J Oncol* 2000;17:277-283
- Fukushima M, Fujioka A, Uchida J, Nakagawa F, Takechi T. Thymidylate synthase (TS) and ribonucleotide reductase (RNR) may be involved in acquired resistance to 5-fluorouracil (5-FU) in human cancer xenografts *in vivo*. *Eur J Cancer* 2001;37:1681-1687
- Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Danenberg PV, Groshen S, Cohen H, Laine L, Crookes P, Silberman H, Baranda J, Garcia Y, Li J, Leichman L. Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: a predictor for primary tumor response and overall survival. *J Clin Oncol* 1996;14:176-182
- Edler D, Glimelius B, Hallstrom M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I, Ragnhammar P, Blomgren H. Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2002;20:1721-1728
- Etienne MC, Chazal M, Laurent-Puig P, Magne N, Rosty C, Formento JL, Francoual M, Formento P, Renee N, Chamorey E, Bourgeon A, Seitz JF, Delpero JR, Letoublon C, Pezet D, Milano G. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *J Clin Oncol* 2002;20:2832-2843
- Lenz HJ. Pharmacogenomics in colorectal cancer. *Semin Oncol* 2003;30:47-53
- Shirota Y, Stoecklacher J, Brabender J, Xiong YP, Uetake H, Danenberg KD, Groshen S, Tsao-Wei DD, Danenberg PV, Lenz HJ. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol* 2001;19:4298-4304
- Takamura M, Nio Y, Yamasawa K, Dong M, Yamaguchi K, Itakura M. Implication of thymidylate synthase in the outcome of the patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas and efficacy of adjuvant chemotherapy using 5-fluorouracil or its derivatives. *Anti Cancer Drugs* 2002;13:75-85
- Adlard JW, Richman SD, Seymour MT, Quirke P. Prediction of response of colorectal cancer to systemic therapy. *Lancet Oncol* 2002;3:75-82
- Pullarkat ST, Stoecklacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S, Lenz HJ. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001;1:65-70
- Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, Omura K, Watanabe G, Danenberg PV. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. *Clin Cancer Res* 2001;7:4096-4101
- Iacopetta B, Grieco F, Joseph D, Elsaleh H. A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *Br J Cancer* 2001;85:827-830
- Villanueva A, Dotor E, Cuatrecasas M, Pareja L, Martinez M, Navarro M, Moreno V, Peinado A, Capella G, Germa JR. Comprehensive thymidylate synthase genotyping in adjuvant therapy of CRC. *Journal of Clinical Oncology* 2004 ASCO. *Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)* 2004;22(Suppl):3588
- Chazal M, Etienne MC, Renee N, Bourgeon A, Richelma H, Milano G. Link between dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells and liver. *Clin Cancer Res* 1996;2:507-510
- Van Kuilenburg AB, Van Lenthe H, Tromp A, Veltman PC, Van Gennip AH. Pitfalls in the diagnosis of patients with a partial dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Clin Chem* 2000;46:9-17
- Raida M, Schwabe W, Hausler P, Van Kuilenburg AB, Van Gennip AH, Behnke D, Hoffken K. Prevalence of a common point mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) gene within the 5'-splice donor site of intron 14 in patients with severe 5-fluorouracil (5-FU)-related toxicity compared with controls. *Clin Cancer Res* 2001;7:2832-2839
- Collie-Duguid ES, Etienne MC, Milano G, McLeod HL. Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics* 2000;10:217-223
- Scherf U, Ross DT, Waltham M, Smith LH, Lee JK, Tanabe L, Kohn KW, Reinhold WC, Myers TG, Andrews DT, Scudiero DA, Eisen MB, Sausville EA, Pommier Y, Botstein D, Brown PO, Weinstein JN. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer. *Nat Genet* 2000;24:236-244

- 22 Takebe N, Zhao SC, Ural AU, Johnson MR, Banerjee D, Diasio RB, Bertino JR. Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34+-enriched peripheral blood progenitor cells. *Cancer Gene Ther* 2001;8:966-973
- 23 Horiguchi J, Takei H, Koibuchi Y, Iijima K, Ninomiya J, Uchida K, Ochiai R, Yoshida M, Yokoe T, Iino Y, Morishita Y. Prognostic significance of dihydropyrimidine dehydrogenase expression in breast cancer. *Br J Cancer* 2002;86:222-225
- 24 Shiota Y, Ichikawa W, Uetake H, Yamada H, Nihei Z, Sugihara K. Intratumoral dihydropyrimidine dehydrogenase messenger RNA level reflects tumor progression in human colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2002;9:599-603
- 25 Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, Lenz HJ, Leichman CG, Leichman L, Diasio RB, Danenberg PV. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 2000;6:1322-1327
- 26 Sohn KJ, Croxford R, Yates Z, Luccock M, Kim YI. Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism on chemosensitivity of colon and breast cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:134-144
- 27 Cohen V, Panet-Raymond V, Sabbaghian N, Morin I, Batist G, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism in advanced colorectal cancer: a novel genomic predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2003;9:1611-1615
- 28 Ladner RD, Lynch FJ, Groshen S, Xiong YP, Sherrod A, Caradonna SJ, Stoehlmacher J, Lenz HJ. dUTP nucleotidohydrolase isoform expression in normal and neoplastic tissues: association with survival and response to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Cancer Res* 2000;60:3493-3503

编辑 王谨晖 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 •

第一届北京国际消化疾病高峰论坛

本刊讯 第一届北京国际消化病高峰论坛定于 2005-11-04/06 在北京世纪金源大酒店举行, 本届论坛由中国医学论坛报社主办, 内容包括胃食管反流病、Barrett 食管和食管癌、胃癌和幽门螺杆菌、结直肠癌筛查、炎症肠病、慢性胰腺炎和胰腺癌、NASH/ 脂肪肝和病毒性肝炎等重要专题。

本届论坛很荣幸地邀请到 M. Brian Fennerty, J. Thomas LaMont, Meinhard Classen, David A. Johnson, David Lieberman, David J. Bjorkman, Manfred Stolte, Stuart Sherman 和 Atif Zaman 等欧美消化领域的知名专家, 以及萧树东、钱家鸣、斯崇文、欧阳钦、郑树、柯美云、王贵奇、周丽雅、罗金燕、贾继东等国内知名专家。他们将从临床研究和实践的角度总结 2005 年胃肠病学和肝病学的最新进展和发展动态, 并将根据自己掌握的关键性的第一手资料, 对上述疾病发病机制、诊断和治疗中的热点问题精彩演讲。希望通过参会的国内外高层专家们之间的深入探讨, 提高我国消化系统疾病的诊治水平。

为了加强国内外学术交流的深度和效果, 本届论坛语言采用中文和英文, 并配有同声传译系统。论坛热忱邀请全国医院消化中心的负责人和学术带头人、中青年专家参加本届论坛, 共同为东西方在消化疾病领域的高层学术交流与合作写下新的篇章。

1 主要议题

本届论坛的主要议题包括: (1) 胃食管反流病 (GERD): 中国和美国的不同经验; (2) Barrett 食管和食管癌: 东西方的异同; (3) 胃癌和幽门螺杆菌: 东西方的看法是否相同? (4) 慢性胰腺炎和胰腺癌; (5) 病毒性肝炎治疗新进展; (6) 炎症肠病 (IBD): 中国的现状; (7) IBD 的病理生理及临床治疗 2005 年新进展; (8) 结直肠癌筛查: 全球范围是否面临同样的问题? (9) 非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) / 脂肪肝肝硬化威胁。

2 壁报征文

论坛将为参会者提供以壁报方式展示最新研究成果的机会。壁报摘要要求在 800 字以内, 需描述研究目的、方法、结果和结论。评审费为 500 元, 届时将评选优秀壁报 5 名, 获奖者将免注册费。申请截止日期为 9 月 15 日。10 月 1 日前通知作者壁报摘要录用情况。

3 大会秘书处

大会设有秘书处, 联系人为黄向东, 张莉, 詹宁育, 北京市鼓楼西大街 41 号, 中国医学论坛报社, 邮编 100009, 电话: 010-64002844, 传真: 010-64064469, Email: communications@gisummit.com。

本论坛欢迎全国医院消化中心的负责人和学术带头人、中青年专家参加, 详细注册及相关费用信息请咨询大会秘书处。

乙型肝炎病毒前-S蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化

王春花, 成军, 郎振为, 李蕴茹, 闫杰, 张黎颖

王春花, 成军, 李蕴茹, 闫杰, 张黎颖, 北京地坛医院传染病研究所
北京市 100011

郎振为, 北京地坛医院病理科 北京市 100011

国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689

军队“九、五”科技攻关项目, No. 981D063

军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038

军队“十、五”科技攻关青年基金项目, No. 01Q138

军队“十、五”科技攻关面上项目, No. 01MB135

通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安定门外大街地坛公园13号, 北京地坛医院传染病研究所. cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-64481639 传真: 010-64281540

收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-05-25

摘要

目的: 在大肠杆菌中表达乙型肝炎病毒(HBV)前-S蛋白, 并进行纯化和鉴定。

方法: 通过聚合酶链式反应(PCR)获得HBV前-S基因, 将前-S克隆至PET32a+, 构建原核表达重组质粒, 在大肠杆菌中诱导表达, 表达产物进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 考马斯亮蓝染色。采用凝胶电泳回收纯化。经Western blot。

结果: 成功扩增获得HBV的前-S编码基因片断, 并构建大肠杆菌表达载体。表达载体转化的大肠杆菌经过IPTG的诱导, 裂解, SDS-PAGE, 结果显示得到了目的蛋白Mr28 000。以抗-His的单克隆抗体进行的western blot杂交实验, 结果表明表达、纯化的目的蛋白具有特异性免疫反应识别。

结论: 成功表达HBV的前-S蛋白, 对于研究HBV的前-S蛋白的免疫原性和生物学特性奠定了坚实的基础。

王春花, 成军, 郎振为, 李蕴茹, 闫杰, 张黎颖. 乙型肝炎病毒前-S蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1894-1896
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1894.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)是一种嗜肝部分双链DNA病毒, 不仅引起急、慢性病毒性肝炎, 而且与肝纤维化(LF)、肝细胞癌(HCC)的发生、发展密切相关^[1]。1979年Gelibert *et al*首次报告了HBV DNA的全基因序列, 并确定了4个主要的开放读码框架(ORF)^[2-3]。HBV基因组只有3.2 kb, 其结构特点是结构基因与调节基因序列之间重叠, 甚至结构基因序列之间重叠, HBV DNA序列的利用率之高实属罕见^[4-12]。最近我们课题组对中国HBV流行株的全基因序列进行克隆和序列分析, 提出了HBV DNA编码基因序列中存在一个新的ORF前-S基因序列的理论^[13-14], 并重新确定了S区启动子的位置, 提出全S基因在HBV基

因组中的新位置, 在国内外引起广泛关注, 但是该理论的研究工作目前只是初步在基因水平证实前-S基因序列的真实存在, 特别是关于前-S基因具有完整的ORF的编码蛋白序列的理论主要是建立在生物信息学的应用分析之上, 如果能从蛋白水平在临床实验资料中进一步验证前-S是一种编码蛋白, 那么对前-S编码基因的真实性将更有说服力。

由于前-S编码蛋白是一种新型的功能未知的蛋白, 不存在商品化的检测试剂盒, 为了制备抗体用于临床标本的检测, 我们自己尝试在原核系统中进行表达, 获得了大量高效表达的重组抗原, 通过Western-blot杂交实验证实, 具有良好的免疫原性, 为下一步免疫动物制备多克隆抗体应用于免疫组织化学和酶联免疫吸附的检测奠定了实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料 质粒和菌株: pMD-18T载体购自Takara, 表达载体pET32a+和大肠杆菌*E. coli*BL21、*E. coli*XL1均为本室保存; pcDNA3.1(-)-前S由本室构建。主要试剂: IPTG购自Promega公司, 高保真PCR系统(Elongasemix enzyme)购自Invitrogen公司, 小量质粒抽提及胶纯化回收试剂盒购自QIAGEN公司, T₄DNA连接酶及限制性内切酶均购自Takara公司, 其余化学试剂均为国产分析纯和生化试剂。DNA序列测定由上海博亚公司完成。

1.2 方法

1.2.1 前-S的PCR扩增 根据报道的前S蛋白基因序列^[13], 设计序列特异性引物P1、P2, P1: GGATC CATGCAGTTAATCATTAC, P2: AAGCTTGCTGTAGCTCTTGTTCC, 在P1-5'端含有BamHI酶切位点, P2-5'端含有Hind III酶切位点。利用pcDNA3.1(-)-前S为模板, PCR技术扩增获得该新基因的全长序列。

1.2.2 重组表达质粒的构建 将纯化的目的基因连接至pMD-18T载体, 经测序确定序列后, 用BamHI和Hind III从克隆载体酶切目的基因片段, 琼脂糖凝胶电泳纯化, 与经BamHI和Hind III酶切pET32a+表达质粒连接, 转化大肠杆菌*E. coli*XL1, 小量提取质粒酶切鉴定。

1.2.3 重组蛋白的表达和包涵体纯化 将鉴定为阳性的质粒转化大肠杆菌*E. coli*BL21, 挑取单菌落, 37℃振荡培养12 h, 以1:5稀释, 37℃振荡培养2 h, 加入IPTG至终浓度1 mmol/L。同时设阴性对照, 继续37℃振荡培养4 h。对经120 g/L SDS-PAGE电泳证实的表达菌株, 进行大量诱导, 超声裂解破碎, 分别收集裂解上清和沉

淀,将沉淀用包涵体洗液清洗一次,溶于8 mol/L 尿素(PH8.0)中,采用凝胶电泳回收的方法进行纯化。

1.2.4 重组蛋白的抗原性检测 Western blot 检测:以His 抗体 1:3 000 稀释作为第一结合抗体,第二结合抗体为兔抗鼠 IgG,由中山公司生产,以 1:5 000 稀释。

2 结果

2.1 新基因前-前-S的序列分析结果 应用PCR技术扩增得到了前-前-S的序列,乙型肝炎病毒前-前-S基因含 135 nt,编码产物为 45 aa(图1)。

```

ATG CAG TTA ATC ATT ACT TCC AAA CTA GGC ATT ATT TAC ATA CTC TGT GGA
M   Q   L   I   I   T   S   K   L   G   I   I   Y   I   L   C   G
AGG CTG GCA TTC TAT ATA AGA GAG AAA CTA CAC GCA GCG CCT CAT TTT GTG
R   L   A   F   Y   I   R   E   K   L   H   A   A   P   H   F   G
GGT CAC CAT ATT CTT GGG AAC AAG AGC TAC AGC
V   H   H   I   L   G   N   K   S   Y   S

```

图1 乙型肝炎病毒前-前-S基因及其编码产物序列。

2.2 重组前-前-S蛋白的表达、纯化及免疫学检测分析 将重组阳性质粒转入大肠杆菌 *E. coli* BL21,经 IPTG 诱导得到表达。表达产物进行 SDS-PAGE (120 g/L),考马斯亮蓝染色。结果表明其表达产物主要以包涵体形式存在, M_r 28 000,纯化后的包涵体未显示其他杂带(图2)。蛋白印迹试验表明,表达的重组蛋白与His抗体可产生特异性结合,在 M_r 28 000 左右有明显杂交信号(图3)。

3 讨论

1979年, Gelibert *et al* 首次报告了 HBV 基因组的全序列,并定位了4个ORF。我国学者于1984年报道了大陆 HBV 株(*adr*)的序列^[15]。目前在美国国立卫生研究院(NIH)的核苷酸序列数据库(GenBank)中,存储了200多个HBV全基因组序列,但之后学者对4个ORF分区的界定并无异议,沿用至今。前-前-S区ORF在1983年Fujiyama *et al*^[16]克隆的 *adr* 亚型的S基因产物中最早被提及,作者认为存在一身份不明的ORF(unidentified reading

frame);而Mimms *et al*^[17]将Fujiyama *et al* 报告的克隆(S43492)进行再分析后,认为该段多肽位于前-S1多肽内部,他们认为的前-S1长度为164 aa,而不是通常认为的119 aa或108 aa。我们课题组利用LA-PCR技术扩增了中国HBV流行株DNA全基因序列,在分析所获得的5个克隆的过程中,发现在前-S1区之前还存在一个ORF,长度135 bp,编码45 aa,命名为前-前-S区。与初期选择的GenBank中6个其他血清型的HBV克隆株进行比较,其中3个克隆具有前-前-S区ORF。应用DNASIS软件的蛋白分析功能分析了前-前-S、前-S1、前-S2和S基因的完全表达产物,前-前-S区较以往认为的大蛋白多出一个小的疏水区。其中的19(21)个疏水氨基酸在前-前-S区形成了一个小的疏水功能域,可能与蛋白的空间折叠或表面蛋白合成后分泌有关。前-前-S多肽推断氨基酸序列中含有6个亮氨酸(L),分别位于第3、9、15、19、27、39位,前3个L是否可形成亮氨酸拉链结构,尚需要进一步证实^[13-14]。

目前多种资料的研究结果证明前-前-S区至少在基因水平是存在的,以往研究认为该区的编码并不是一种普遍现象,因而未加以重视^[18-25]。我们课题组的实验结果提示具有前-前-S区的HBV克隆株多来自日本和中国,欧美学者在最初的研究中获得的样本存在一定的偏差,这可能是忽视该区域的原因之一。另外,由于目前仍缺乏对HBV的大规模分子流行病学资料,因而早期发现前-前-S区的学者可能认为一些位点发生变异,而不认为这是一种主流现象,但通过对其他学者获得的克隆进行分析也发现了前-前-S区,应当认为前-前-S区的存在不是一种个别现象,至少在中国和日本是非常常见的^[26-30]。

从蛋白水平和临床资料中证实前-前-S是一种编码蛋白,是支持该理论的关键点所在,由于前-前-S编码蛋白是一种新型的功能未知的蛋白,不存在商品化的检测试剂盒,因而表达纯化前-前-S编码蛋白制备多克隆抗体应用于临床检测是必经之路。大肠杆菌作为目前应用最广泛的原核表达系统,表达目的蛋白具有快速、高效、经济等很多优点^[31]。pET32a+含有一段辅助蛋白基因,该辅助蛋白包括Trx, His, S等标签序列,有助于提高目的

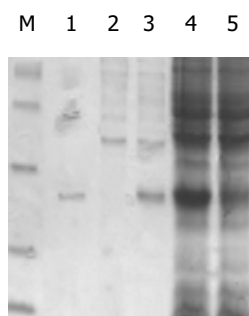


图2 前前S融合蛋白的SDS-PAGE凝胶电泳分析。M: Marker; 1: 纯化后的包涵体; 2: 包涵体洗液; 3: 包涵体; 4: 诱导的前前S融合蛋白裂解液; 5: 未诱导的前前S融合蛋白裂解液。

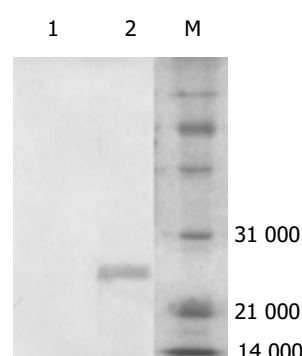


图3 前前S融合蛋白的蛋白印迹实验。M: Marker; 1: 未诱导的前前S融合蛋白裂解液; 2: 诱导的前前S融合蛋白裂解液。

蛋白的表达效率,即对表达产物进行纯化和检测,其 $M_{18\ 000-20\ 000}$,在大多数情况下不会影响被修饰蛋白的免疫原性、结构和功能。由此,我们选用pET32a+作为表达载体,并且上游引物中碱基的设计与载体相匹配,表达蛋白时使辅助蛋白融合到目的蛋白的N端。应用此设计,在大肠杆菌中获得了高效表达的融合蛋白,表达蛋白以包涵体形式存在。SDS-PAGE电泳显示融合辅助蛋白的表达产物 $M_{28\ 000}$,这与预测的前前S蛋白大小相吻合,并且通过WB检测证实此融合蛋白包含His组氨酸标签,从而间接证实了前-前-S的表达。外源蛋白高水平表达过程中容易形成无活性的包涵体^[32],这是原核表达系统的一个缺陷,但以包涵体形式表达的蛋白容易纯化,且保留免疫原性,可不经复性作为检测抗体诊断试剂盒的包被抗原。因不考虑复性,所以将包涵体经高浓度尿素溶解后,采用从已染色的凝胶中电洗脱法纯化回收目的蛋白。这种方法既可确保蛋白纯度,又相对简便、经济。

本研究从基因水平已证实前-前-S区存在前提下,成功构建了前-前-S的原核表达载体,在大肠杆菌中表达纯化了具有免疫原性的前-前-S蛋白,为下一步制备多抗奠定了实验基础,为下游的临床检测提供了将基础实验研究与临床验证相结合的桥梁,并且前-前-S蛋白的功能如果得到进一步证实,也将对HBV感染的检测、疫苗设计、HBV进入肝细胞机制(受体学说)、表面抗原的表达过程及功能、宿主抗感染机制、HCC产生机制研究均产生重大影响。

4 参考文献

- 1 成军,杨守纯.现代肝炎病毒分子生物学.第1版.北京:人民军医出版社,1997:179-182
- 2 Gelibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in E. coli. *Nature* 1979;281:646-650
- 3 Charnay P, Mandart E, Hampe A, Fitoussi F, Tiollais P, Galibert F. Localization on the viral genome and nucleotide sequence of the gene coding for the two major polypeptides of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Nucleic Acids Res* 1979;7:335-346
- 4 董菁,成军,王勤环,皇甫尧坤,施双双,张国庆,洪源,李莉,斯崇文.乙型肝炎病毒DNA序列异质性及准种特点的研究.中华医学杂志 2002;82:81-85
- 5 董菁,成军,王勤环,施双双,皇甫尧坤,王刚,洪源,李莉,斯崇文.乙型肝炎病毒前C/C基因准种与变异特点的研究.解放军医学杂志 2002;27:122-123
- 6 董菁,成军,王勤环,王刚,施双双,刘昕,夏小兵,李莉,张国庆,斯崇文.乙型肝炎病毒C基因启动子区准种与变异特点的研究.中华实验和临床病毒学杂志 2002;16:264-266
- 7 董菁,施双双,皇甫尧坤,成军,王勤环,李莉,斯崇文.乙型肝炎病毒X基因准种特点的研究.中国病毒学 2002;17:22-26
- 8 成军.乙型肝炎病毒基因异质性及准种特点研究的临床意义.解放军医学杂志 2002;27:112-115
- 9 董菁,李进,施双双,皇甫尧坤,成军,王勤环,洪源,王业东,李莉,斯崇文.乙型肝炎病毒基因组准种与变异特点的研究.解放军医学杂志 2002;27:116-118
- 10 董菁,成军,皇甫尧坤,洪源,王刚,陈国凤,李莉,张玲霞,陈菊梅.乙型肝炎病毒序列个体化变异的初步观察.解放军医学杂志 2002;27:119-121
- 11 刘昕,董菁,皇甫尧坤,成军,王刚,王琳,李莉.乙型肝炎病毒X基因异质性及对其反式激活功能的影响.解放军医学杂志 2002;27:125-127
- 12 刘昕,董菁,皇甫尧坤,成军,韩萍,牟劲松,李克,钟彦伟.乙型肝炎病毒核心启动子区基因异质性及对其转录活性的影响.解放军医学杂志 2002;27:128-130
- 13 董菁,成军.乙型肝炎病毒基因组中前-X编码基因的界定.世界华人消化杂志 2003;11:1097-1101
- 14 杨倩,董菁,成军,刘昕,洪源,王建军,张树林.乙型肝炎病毒基因组中前-S-编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定.解放军医学杂志 2003;28:762-764
- 15 甘人宝,储美莲,沈绿萍,钱苏雯,李戟平.克隆的adr型乙型肝炎病毒(pADP-1)的核苷酸顺序.中国科学B辑 1986;5:55-65
- 16 Fujiyama A, Miyahara A, Nozaki C, Yoneyama T, Ohtomo N, Matsubara K. Cloning and structural analyses of hepatitis B virus DNAs, subtype adr. *Nucleic Acids Res* 1983;11:4601-4610
- 17 Mimms LT, Solomon LR, Ebert JW, Fields H. Unique preS sequence in a gibbon-derived hepatitis B virus variant. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;195:186-191
- 18 董菁,成军,王勤环,刘昕,王刚,施双双,夏小兵,李克,邵得志,斯崇文.乙型肝炎病毒囊膜蛋白与白介素-18联合基因免疫的初步研究.中华传染病杂志 2002;20:148-151
- 19 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Zhang LX. Cloning and expression of pre-S1 gene of hepatitis B virus in yeast. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int* 2002;1:238-242
- 20 刘昕,成军,张跃新,段惠娟,牟劲松,韩萍,李莉,张玲霞,陈菊梅.截短型HBsAg中蛋白反式激活基因的克隆.中华传染病杂志 2002;20:218-221
- 21 董菁,施双双,张国庆,皇甫尧坤,成军,王勤环,李莉.乙型肝炎病毒表面抗原/抗体同时阳性患者体内S基因序列的分析研究.中国公共卫生 2002;18:535-537
- 22 董菁,刘昕,皇甫尧坤,施双双,王刚,洪源,陈国凤,李莉,陈菊梅,成军.乙型肝炎病毒表面抗原基因多态性的初步研究.胃肠病学和肝病学杂志 2002;11:130-135
- 23 董菁,成军,王勤环,施双双,洪源,郎振为,皇甫尧坤,李莉,斯崇文. HBsAg中蛋白与IL-18联合核酸免疫HBsAg转基因小鼠的实验研究.中华微生物与免疫学杂志 2002;22:518-519
- 24 刘昕,成军,王刚,李克,段惠娟,王琳,李莉,张玲霞,陈菊梅. HCV核心蛋白与截短型HBV表面抗原中蛋白协同反式激活功能的研究.中华肝病杂志 2002;10:354-357
- 25 Deng H, Dong J, Cheng J, Huangfu JK, Shi SS, Hong Y, Ren XM, Li L. Quasispecies groups in the core promoter region of hepatitis B virus. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int* 2002;1:392-396
- 26 陆荫英,李克,王琳,刘昕,王业东,成军,张玲霞.乙型肝炎病毒前-S2蛋白结合蛋白的筛选.中华肝病杂志 2003;11:8-10
- 27 陆荫英,王琳,刘昕,李克,成军,张玲霞,李莉.乙型肝炎病毒核心抗原与金属硫蛋白相互作用的研究.解放军医学杂志 2003;28:161-163
- 28 刘昕,成军,陆荫英,王刚,牟劲松,李莉,张玲霞,陈菊梅.乙型肝炎病毒X蛋白反式调节基因的克隆化研究.中华肝病杂志 2003;11:5-7
- 29 刘昕,成军,邵得志,王琳,钟彦伟,董菁,李克,李莉. HCV核心蛋白与HBV X蛋白协同反式激活作用的研究.中华实验和临床病毒学杂志 2003;17:39-41
- 30 陆荫英,王琳,刘昕,李克,成军,张玲霞,李莉.乙型肝炎病毒e抗原与金属硫蛋白相互作用的研究.解放军医学杂志 2003;28:451-453
- 31 Swartz JR. Advances in escherichia coli production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:195-201
- 32 Krefhaber T, Rudolph R, Kohler HH. Protein aggregation in vitro and vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Bio Technol* 1991;9:825-829

应用抑制性消减杂交技术克隆 HBV 全 S 蛋白反式激活蛋白 1 的反式激活基因

白桂芹, 成军, 张树林, 刘妍, 刘蔚, 张黎颖

白桂芹, 成军, 张树林, 刘妍, 刘蔚, 张黎颖, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
国家自然科学基金资助, No. C03011402, No. C30070689
军队九、五科技攻关项目, No. 98J063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队十、五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队十、五科技攻关面上项目, No. 01MB135
通讯作者: 成军, 北京市 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院传染病研究所. ci@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-05-25

摘要

目的: 应用抑制性消减杂交(SSH)技术构建乙型肝炎病毒(HBV)全 S 蛋白反式激活蛋白 1(CSTP1)的反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库, 克隆 HBV CSTP1 反式激活相关基因。

方法: 以 HBV CSTP1 表达质粒 pcDNA3.1(-)-CSTP1 转染 HepG2 细胞, 以空载体 pcDNA3.1(-)为对照;制备转染后的细胞裂解液, 从中提取 mRNA 并逆转录为 cDNA, 经 *RsaI* 酶切后将实验组 cDNA 分成两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与对照组 cDNA 进行两次消减杂交及两次抑制性 PCR, 将产物与 T/A 载体连接, 构建 cDNA 消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增, 随机挑选克隆 PCR 扩增后进行测序及同源性分析。

结果: 成功构建人 HBV CSTP1 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库。文库扩增后得到 86 个白色克隆, 进行菌落 PCR 分析, 均得到 100-1 000 bp 插入片段。挑取 25 个含有插入片段的阳性克隆测序分析, 获得 23 个已知基因序列和 2 个未知基因。未知基因的功能还正在研究中。

结论: 应用 SSH 技术成功构建了 HBV CSTP1 反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库。该文库的建立为进一步阐明 HBV CSTP1 反式调节的靶基因及致肝病发生的分子生物学机制提供理论依据。

白桂芹, 成军, 张树林, 刘妍, 刘蔚, 张黎颖. 应用抑制性消减杂交技术克隆 HBV 全 S 蛋白反式激活蛋白 1 的反式激活基因. 世界华人消化杂志 2005; 13(15):1897-1900
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1897.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)为带包膜的肝 DNA 病毒属, 1979 年 Gelibert *et al* 发表了 HBV 基因组的第一个全长核苷酸序列, 长度为 3 182 nt, 血清型为 ayw 亚型, 并在 HBV 基因组中界定了 4 个开放读码框(ORF), 分别命

名为 S、C、P、X 区。其中 S 区又因不同的起始密码子(ATG)而又人为的分为前-S1、前-S2 和 S 三个区。董蓓 *et al*^[1]应用长距离精确 PCR 技术(long and accurate PCR, LA-PCR)研究了乙型肝炎患者血清中存在的 HBV 病毒子基因组发现在前-S1 的 ORF 之前存在一融合编码的 ORF, 该区 135 bp, 暂时命名为前-前-S 区, 并且证实了在前-前-S 基因上游 277 bp 核苷酸序列有启动子活性^[2], 其功能可能为调控前-前-S 区与 HBV 大蛋白的融合表达。

抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术是近年发展起来的一项新的基因克隆技术, 与传统方法比较, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点, 能有效分离扩增低丰度特异表达的基因, 可以在较短的时间内获得较理想的实验结果^[3-4]。我们利用 SSH 技术成功构建人 HBV 全 S 蛋白反式激活基因差异表达的 cDNA 消减文库。获得 2 个未知基因, 通过生物信息学分析获得其全长序列, 其中之一命名为全 S 蛋白反式激活蛋白 1(CSTP1), 已在 GenBank 中注册, 注册号: AY553877。本研究对 HBV CSTP1 反式激活作用进行研究, 为讨论 HBV CSTP1 在致病(癌)过程中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 HepG2 细胞及感受态大肠杆菌 DH5 α 为本室保存, pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen), Lipofectamine PLUS 转染试剂(Gibco), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 \times PCR Enzyme Mix, Advantage PCR Cloning 试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification 试剂盒(Boehringer Mannheim), T7、SP6 通用引物及 pGEM-Teasy 载体(Promega)。

1.2 方法 HBV CSTP1 的克隆分析和真核表达载体及细胞转染: 根据电子拼接的新基因序列(945 bp), 利用生物信息分析软件 Vector NTI 设计新基因序列的引物含有特异性核酸内切酶(*EcoRI*/*BamHI*), 利用 HepG2 细胞来源的 mRNA, 经过 RT-PCR 扩增, 并与 pGEM-T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细菌, 铺于含有氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 18 h。挑取阳性菌落, 增菌, 使用碱裂解法提取质粒后进行双酶切(*EcoRI*/*BamHI*)和

菌落PCR鉴定,证明目的基因约945 bp后测序,进一步鉴定正确后获得阳性克隆。

1.2.1 HBV CSTP1 真核表达质粒 pcDNA3.1(-)-CSTP1 由本室构建。用 Lipofectamine PLUS 转染试剂将 2 μ g pcDNA3.1(-)-CSTP1 及 pcDNA3.1(-)空载体分别转染 35 mm 平皿 HepG2 细胞,48 h 后收获细胞。

1.2.2 细胞 mRNA 提取 使用 mRNA Purification 试剂盒,直接提取转染了 CSTP1 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA,经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计进行定性、定量分析。

1.2.3 双链 cDNA(dscDNA)合成 用 Clontech 公司的 PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit 中的试剂,以获得的 mRNA 为模板逆转录合成 cDNA。

1.2.4 消减杂交文库的建立 采用 Clontech 公司的 PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit,常规 SSH 方法按说明书进行:转染了 CSTP1 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 cDNA 分别标记为 Tester 和 Driver,经 *Rsa* I (一种识别 4 碱基序列的内切酶)消化,产生相对较短的平端片段,纯化酶切产物。将 Tester 的 cDNA 分为两份,分别连接试剂盒提供的特殊设计的寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2,然后与过量的 Driver cDNA 进行杂交;合并两种杂交产物后再与 Driver cDNA 作第 2 次杂交;然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增,使 Tester cDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。

1.2.5 克隆鉴定分析 扩增产物与 pGEM-Teasy 载体连接,转化 JM109 感受态细菌,在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上,37℃ 培养 18 h。挑取白色菌落,增菌,以 pGEM-Teasy 载体多克隆位点两端 T7/SP6 引物进行菌落 PCR 扩增,证明含有插入片段后(200-1 000 bp)测序(上海博亚生物技术有限公司)。应用生物信息学将测得序列与 GenBank 数据库进行同源性分析。

2 结果

2.1 mRNA 的定性定量分析 使用高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提。紫外分光检测显示,转染了 HBV CSTP1 表达质粒及空载体的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.06 μ g 和 3.96 μ g, $A_{260}/A_{280} = 2.01$ 。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带。

2.2 dscDNA 两端连接效率检测 dscDNA 与接头连接效率的高低是决定 SSH 成败的最关键步骤。将连接有 Adaptor 1 和 Adaptor 2 的两组 dscDNA 分别用两个基因特异性引物[甘油三磷酸脱氢酶(G3PDH)3'和5']与一个基因特异性引物(G3PDH 3')和一个 PCR 引物 1 进行 28 个循环扩增,产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。结果显示两组 dscDNA 扩增产物浓度相当,说明 dscDNA 已与接头高效率连接。

2.3 cDNA 消减文库消减效率的鉴定 分别取 1 μ L 抑制性及非抑制性 PCR 产物为模板,用看家基因 G3PDH 引物进

行 PCR 扩增,分别在 18、23、28、33 次循环结束时从体系中吸取 5 μ L 进行电泳鉴定。结果显示:与非抑制性 PCR 产物相比,抑制性 PCR 产物中 G3PDH 基因产物大大减少,说明所构建的消减文库具有很高的消减效率(图 1)。

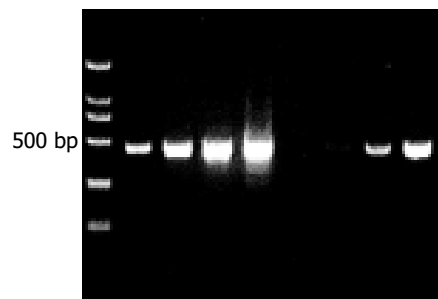


图1 消减效率分析结果。1-4: 未消减组,引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5-8: 消减组,引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33。

2.4 差异表达 cDNA 片段的扩增及克隆 杂交产物经两轮 PCR 扩增后,菌落 PCR 扩增结果显示为 200-1 000 bp 大小不等的插入片段,所获得的 86 个克隆中几乎均含有插入片段,这些条带可能代表差异表达的基因片段(图 2)。

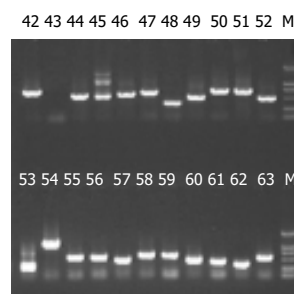


图2 部分克隆(E142-63)菌落 PCR 鉴定电泳图。

2.5 cDNA 测序与同源性分析结果 挑选 25 个克隆测序,与 GenBank 数据库进行初步比较。2 个克隆未检索到任何对应的相似序列,可能代表了某些新基因。应用生物信息学技术对他们进行克隆分析,获得相应的全长编码基因,新基因结构及功能分析正在进行中。其余 23 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源(96-100%, 表 1)。

3 讨论

HBV 感染,不仅引起急、慢性病毒性肝炎,而且与肝纤维化、肝细胞癌(HCC)的发生、发展密切相关^[5-6]。HBV 为包膜 DNA 病毒,其包膜由四个相关的表面蛋白组成,他们是主蛋白(S),中蛋白(M, PreS2+S),大蛋白(L, PreS1+PreS2+S),还包括前-前-S 区的全 S 蛋白。由病毒基因组同一开放读码框编码,但起始位点不同。我们应用 SSH 技术研究包括前-前-S 在内的全 S 蛋白的反式激活靶基因。结果共获得 2 个差异表达的未知序列,我们初步采用生物信息学方法获得了其全长基因序

表1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较

已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	同源性(%)
人类真核翻译延长因子 1	2	100
人类热休克蛋白	3	99
人类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	1	99
人类仅在胎盘绒毛表达的 mRNA	1	97
人类核糖体蛋白	5	98
人类 NADH 脱氢酶	1	99
人类磷蛋白	1	99
人类肌动蛋白相关蛋白	1	100
人类主要组织相容性复合物 I (MHC-I)	2	100
人类细胞色素氧化酶亚单位 1	1	100
人类线粒体核糖体蛋白	1	100
人类磷脂酰肌醇聚糖 3	1	100
人类肌动蛋白	1	100
人类微管蛋白 2	1	100
人类 Axin 2	1	100

列,其中之一命名为全 S 蛋白反式激活基因 1 (CSTP1),已在 GenBank 中注册,注册号:AY553877.本研究对 HBV CSTP1 反式激活作用进行研究,为讨论 HBV CSTP1 在致病(癌)过程中的作用奠定基础,进一步明确了 HBV 全 S 蛋白在致病中的机制.

以下的基因序列值得我们注意:第一是人类肌动蛋白(actin),是一种具有收缩能力的微丝蛋白,其抗原性较稳定,HBV 核心蛋白与 cDNA 编码的人肌动蛋白结合蛋白 C 末端区存在相互作用,这种相互作用在体外和体内均被确定.他们相互作用的部位是 C 末端的 199 氨基酸残基.在慢性 HBV 感染患者 HBV 的复制及其引起的病理变化与这二者之间的相互作用有潜在的联系^[7].常吉庆 *et al*^[8] 观察癌周正常乳腺小叶及不典型小叶增生,其导管肌上皮完整,肌动蛋白呈阳性表达,而小叶原位癌及早期浸润性小叶癌肌动蛋白呈阴性反应,阴性率 100% (20/20).当乳腺小叶末梢导管上皮细胞发生癌变成为癌细胞时,便具有浸润力,破坏周围肌上皮细胞,随着病变程度的不断进展,肌上皮逐渐消失.因而肌动蛋白由正常阳性表达变弱,直至转阴.因此,采用肌动蛋白标记乳腺肌上皮,对区别良恶性肿瘤及判断早期癌变和早期浸润具有重要诊断价值.可将其作为鉴别诊断指标之一. HBV CSTP1 能上调肌动蛋白的表达,在 HBV 的致病中到底起什么作用还需要进一步研究.第二是人类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶对大量的细胞内、外刺激的转导起着中枢性调节作用,从而控制细胞的生长、增生、凋亡,如进入细胞周期、控制核苷酸的生物合成、G2/M 期的转变、M 期高尔基体的裂解和纺锤体的形成等^[9].此系统由多组具有丝/苏氨酸特异性的,脯氨酸指导的蛋白激酶组成,可以被细胞外多种刺激所激活,其主要功能为信息传递的中转站,与细胞表面受体、特异性转录因

子以及其他调控蛋白相互作用,从而使细胞外信号来调节特异性基因的表达^[10].丝氨酸/苏氨酸激酶的 N 末端的接触区域和 C 末端区域直接调节激酶活性,这个作用区域是与死亡相关的蛋白激酶的区域, Sanjo *et al*^[11] 研究发现激酶的过度表达诱导 NIH 3T3 细胞凋亡的形态学改变,也就是说此激酶涉及到细胞凋亡,表明他在凋亡信号中有重要的作用.大多数生长因子受体内部都具有酪氨酸激酶结构域,因而细胞因子受体能够与细胞内酪氨酸激酶偶联,通过一些递质和衔接于酪氨酸激酶能进一步激活一系列下游丝氨酸/苏氨酸激酶,后者又能进一步刺激细胞核和细胞质中转录因子^[12-14],从而导致相应的病理变化.此信号级联在 HBV 致癌机制中也有着重要的作用^[15].因此,我们了解肝炎病毒蛋白 CSTP1 对丝氨酸/苏氨酸激酶及其对信号通路的影响,对于肝炎病毒慢性感染的形成,甚至是肝炎病毒相关性 HCC 的发生机制的研究具有重要意义.第三是人类主要组织相容性复合物 I (MHC-I),程宝泉 *et al*^[16] 应用流式细胞仪对慢性乙肝、原发性肝癌组织中的 MHC-I 类抗原进行检测,发现肝癌组织较慢性乙肝组织 MHC-I 抗原表达明显下降,转移组较非转移组下降明显,而且与血清 AFP 呈负相关,提示肝癌的发生和转移可能与 MHC-I 类抗原表达下降有关.以往研究表明,细胞毒 T 淋巴细胞只识别和 MHC-I 结合的外来抗原,肿瘤细胞异于正常细胞,其抗原性物质只有经过 MHC 结合、处理后方能被 T 淋巴细胞所识别,并杀灭之. MHC-I 抗原下降,使肿瘤细胞与之结合减少,从而逃逸抗体免疫细胞的消灭,这可能是肝癌发生和转移的重要机制^[17]. Zhou *et al*^[18] 研究发现正常肝细胞表达非常少量的 MHC-I 分子,但是在 HBV 感染时 MHC-I 的表达明显升高.瞬时转染分析表明 HBV X 蛋白通过 MHC-I 启动子反式激活转录并且证明顺式元件对反式激活的重要性.第四是人类 Axin2. Wnt 蛋白是被糖蛋白分泌的,并且在胚胎发育时期形成高度保守的信号分子家族.其信号分子的成分发生突变就引起各种类型的癌. Axin 是 Wnt 信号转导通路的一种成分,而 Axin2 和 Axin1 有同样的功能.启动子分析提示 Axin2 是 Wnt 通路的直接靶位,而且认为 Axin2 参与能限制 Wnt 初始信号维持时间和强度的负反馈环^[19]. Miao *et al*^[20] 研究认为 Wnt 信号通路在胚胎发育和肿瘤形成过程中起非常重要的作用.作为 Wnt 信号转导的一部分, Axin 复合物的功能被抑制,导致 catenin 的积累.而 catenin 在肝脏肿瘤中显示免疫组织化学阳性更为常见,提示 Axin 基因的突变可能在儿童 HCC 的致癌机制起一定的作用. Taniguchi *et al*^[21] 研究认为通过 catenin 突变的 Wnt 信号的激活导致 HCC 和肝细胞肿瘤的形成. Axin1 和 Axin2 突变似乎在 10% HCC 的发生中很重要.但是最近研究发现在 HCC 中仅检测出 Axin2 和 Axin1 突变而没有 catenin 基因的突变^[22-23],进一步提示 Axin2 在致癌中的重要作用.身体的 Axin1 和 Axin2 突变已经正

式与许多癌组织种类的形成有关,如结肠癌和HCC^[24].我们利用SSH技术对HBV CSTP1 蛋白反式激活作用进行研究,为讨论HBV全S蛋白和HBV CSTP1在致病(癌)过程中的作用提供有力的理论依据.将对HBV感染的检测、疫苗设计、HBV进入肝细胞机制(受体学说)、表面抗原的表达过程及功能、宿主抗感染机制、HCC产生机制研究产生重大影响.

4 参考文献

- 1 董青,成军.乙型肝炎病毒基因组中前-S区编码基因的界定.世界华人消化杂志 2003;11:1091-1096
- 2 杨倩,董青,成军.乙型肝炎病毒基因组中前-S区编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定.解放军医学杂志 2003;9:761-762
- 3 Kuang WW, Thompson DA, Hoch RV. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acid Res* 1998;26:1116-1123
- 4 刘娟,成军,王刚.应用抑制性杂交技术克隆内型肝炎病毒核心蛋白反式激活基因.解放军医学杂志 2001;26:880-883
- 5 夏小兵,成军,王刚,杨继珍,刘娟,董青,王琳,李克.人肝再生增强因子在毕赤酵母中的表达.世界华人消化杂志 2001;9:743-746
- 6 李克,王琳,成军,张玲霞,段忠娟,陆荫英,杨继珍,刘娟,洪源,夏小兵,王刚,董青,李莉,钟彦伟,陈菊梅.酵母双杂交技术筛选克隆HCV核心蛋白结合蛋白基因1.世界华人消化杂志 2001;9:1379-1383
- 7 Huang CJ, Chen YH, Ting LP. Hepatitis B virus core protein interacts with the C-terminal region of actin-binding protein. *J Biomed Sci* 2000;7:160-168
- 8 常吉庆,阎跃红,胡沛至. HSP70与肌动蛋白在乳腺小叶癌中的表达及意义.中华医学实践杂志 2003;6:165-169
- 9 Nishihama R, Ishikawa M, Araki S, Soyano T, Asada T, Machida Y. The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes Dev* 2001;15:352-363
- 10 Su B, Karin M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol* 1996;8:402-411
- 11 Sanjo H, Kawai T, Akira S. DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:29066-29071
- 12 张忠东,成军,钟彦伟,张树林.乙型和内型肝炎病毒蛋白对蛋白酪氨酸激酶信号转导的影响.世界华人消化杂志 2003;11:1027-1030
- 13 Karin M, Hunter T. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* 1995;5:747-757
- 14 Schindler C, Shuai K, Prezioso VR, Darnell JE Jr. Interferon-dependent tyrosine phosphorylation of a latent cytoplasmic transcription factor. *Science* 1992;257:809-813
- 15 纪冬,成军,王建军,刘娟,杨倩,党晓燕,王春花.乙型肝炎病毒和内型肝炎病毒对MAPKKK蛋白信号转导的影响.世界华人消化杂志 2003;11:1959-1962
- 16 程宝泉,乔立洪,上官红,张尚忠.慢性乙型肝炎、肝癌组织MHC-I类抗原表达及意义.中华肝胆病杂志 2002;12:456-459
- 17 Cruz E, Vieira J, Gonçalves R, Alves H, Almeida S, Rodrigues P, Lacerda R, Porto G. Involvement of the Major Histocompatibility Complex region in the genetic regulation of circulating CD8+ T-cell numbers in humans. *Tissue Antigens* 2004;64:25-39
- 18 Zhou DX, Taraboulos A, Ou JH, Yen TS. Activation of class I major histocompatibility complex gene expression by hepatitis B virus. *J Virol* 1990;64:4025-4028
- 19 Eek-hoon J. Regulation of Wnt signaling and its role in neuronal differentiation. *J Biol Chem* 2003;278:13487-13495
- 20 Miao J, Kusafuka T, Udatu Y, Okada A. Sequence variants of the Axin gene in hepatoblastoma. *Hepatol Res* 2003;25:174-179
- 21 Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, Nagorney DM, Burgart LJ, Roche PC, Smith DI, Ross JA, Liu W. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Oncogene* 2002;21:4863-4871
- 22 de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, Fabre M, Chelly J, Beldjord C, Kahn A, Perret C. Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:8847-8851
- 23 Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, Kato T, Miwa N, Nishiwaki T, Kawasoe T, Ishiguro H, Fujita M, Tokino T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Yamaoka Y, Nakamura Y. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nat Genet* 2000;24:245-250
- 24 Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes* 2000;14:1837-1851

编辑 王谨晖 审读 张海宇

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

• 消息 •

第十届全国肝癌学术会议征文通知

本刊讯 为交流各地肝癌临床和基础研究进展,进一步提高肝癌的诊疗水平,中国抗癌协会专业委员会将于2005-09-21/2005-09-23在江西省南昌市举办第十届全国肝癌学术会议,现将征文范围及要求公布如下:

1 征文范围及要求

肝癌相关的病因、流行病学、基础及临床研究论文,不接纳已发表的论文和综述.征文应包括全文及500字以内的论文摘要(包括目的、方法、结果、结论),并加盖负责单位认可的公章.

2 论文寄送地址

上海市医学院路136号,复旦大学肝癌研究所 任正刚 收,邮编:200032.欢迎通过E-mail投稿,E-mail: renzg@zshospital.com 或 zgren@zshospital.net.

应用基因表达谱芯片技术筛选 NS4ATP2 蛋白反式调节基因

杨 媛, 成 军, 赵英仁, 黄燕萍, 刘 妍

杨媛, 成军, 黄燕萍, 刘妍, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
赵英仁, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
国家自然科学基金攻关项目, No. C03011402, No. C30070689
军队九、五科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队十、五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队十、五科技攻关项目, No. 01MB135
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院传染病研究所. ci@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-05-25

摘要

目的: 对丙型肝炎病毒非结构蛋白 4A(HCV NS4A)反式激活新基因 NS4ATP2 转染肝癌细胞的基因表达谱进行分析, 探索该基因表达对肝细胞基因表达的调节机制及其生物学功能。

方法: 应用基因表达谱芯片技术对重组表达质粒 pcDNA3.1(-)-NS4ATP2 和 pcDNA3.1(-)空载体分别转染的 HepG2 细胞的 mRNA 的差异性表达进行检测。

结果: 基因表达谱芯片所检测的 1152 条目的基因均为 GenBank 中登录的基因, NS4ATP2 表达质粒转染的细胞有 29 条差异表达基因, 其中 12 条基因表达增强, 17 条基因表达降低。这些差异表达的基因与细胞信号转导、凋亡、肿瘤的发生密切相关。

结论: 基因表达谱芯片技术对于初步探索新基因的功能提供重要的资料。本实验结果为进一步阐明 NS4ATP2 生物学功能及 HCV-NS4A 的致病机制提供了理论依据。

杨媛, 成军, 赵英仁, 黄燕萍, 刘妍. 应用基因表达谱芯片技术筛选 NS4ATP2 蛋白反式调节基因. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1901-1904
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1901.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)是一种单股正链RNA病毒, 基因组的长度约 10 kb, 编码一种多蛋白形式, 然后在 HCV 丝氨酸蛋白酶和宿主细胞信号肽酶的联合作用下, 裂解成为 10 余种结构和非结构蛋白, 其中非结构蛋白区包括 NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B。近年来, HCV NS4A 的结构与功能倍受关注, NS4A 蛋白分子由 54 个氨基酸残基组成。在丝氨酸蛋白酶裂解活性、NS5A 蛋白磷酸化修饰和免疫应答的调节中具有十分重要的功能, 近来研究显示其还具有多种调控细胞、病毒基因表达、细胞生长、凋亡以及免疫调节等功能^[1-5]。我们利用抑制性消减杂交(SSH)技术, 对于 NS4A 表达载体转染的肝母细胞瘤细胞系 HepG2 的基因表达谱变化进行比较研究, 发现了 NS4A 蛋白上调一些基因的表达。其中包括一未知功能基因, 命名

为 NS4ATP2。我们应用基因表达谱芯片技术(cDNA microarray)对于 NS4ATP2 反式调节的靶基因进行了筛选, 为今后更加广泛深入地研究新基因 NS4ATP2 功能及 NS4A 的反式调节作用打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝母细胞瘤细胞系 HepG2 细胞由本室保存, 细胞培养相关试剂及总 RNA 提取试剂 Trizol 均购自 Gibco 公司, pcDNA3.1(-)真核表达载体购自 Invitrogen 公司, pcDNA3.1(-)-NS4ATP2 由本室构建。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及取材 在 35 mm 培养皿中常规培养 HepG2 细胞, 细胞生长至对数期时, 分别以脂质体转染试剂 FuGENE6 将 2 μ g pcDNA3.1(-)-NS4ATP2 和空载体 pcDNA3.1(-)转染 HepG2 细胞, 48 h 后收获细胞, 每 5×10^6 个细胞加入 1 mL Trizol 试剂, 立即于液氮中保存。

1.2.2 总 RNA 提取 使用 Trizol 试剂一步法提取 pcDNA3.1(-)-NS4ATP2 和空载体 pcDNA3.1(-)转染的 HepG2 细胞总 RNA (分别标记为实验组和对照组), 样品经分光光度计检测吸光度 A 值, 并行热稳定实验, 于 -20℃ 和 70℃ 保温 1 h 后, 经琼脂糖凝胶电泳检测 28 s、18 s 条带变化。

1.2.3 探针标记 常规方法逆转录标记 cDNA 探针并纯化。Cy3-dUTP 标记对照组细胞 mRNA (5 μ g), Cy5-dUTP 标记实验组细胞 mRNA (5 μ g), 乙醇沉淀后溶解在 20 μ L $5 \times$ SSC+2 g/L SDS 杂交液中。

1.2.4 芯片制备 芯片包含的 1 152 个 cDNA 由上海联合基因有限公司提供, 包括原癌基因、抑癌基因、免疫调节相关基因、细胞凋亡和应激反应蛋白相关基因、信号转导相关基因等。以通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1 000-3 000 bp。靶基因以 0.5 g/L 溶解于 $3 \times$ SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian 7 500 点样仪及 TeleChem 公司的硅烷化玻片进行点样。玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min), 紫外线交联, 再分别用 2 g/L SDS、水及 2 g/L 的硼氢化钠溶液处理 10 min, 晾干备用。

1.2.5 预杂交 将预杂交液放入 95℃ 水浴锅内变性 2 min, 将待预杂交的芯片放入 95℃ 水浴锅内变性 30 s, 芯片取出后即放入无水乙醇中 30 s, 晾干。将已变性的预杂交液加到芯片的点样区域内, 盖上盖玻片, 放入杂交箱内 42℃ 预杂交 5-6 h。

1.2.6 杂交及洗涤 将探针置于 95℃ 水浴中变性 2 min; 芯片置于 95℃ 水浴中变性 30 s, 芯片取出浸无水乙醇 30 s, 探针取出后迅速置于冰上。将探针置于芯片上, 用盖玻片

覆盖, 置于杂交舱中, 用Parafilm密封, 放入42℃杂交箱内杂交过夜(16-18 h). 依次以2 × SSC+2 g/L SDS、1 g/L × SSC +2 g/L SDS、1 g/L × SSC洗涤10 min, 室温晾干.

1.2.7 扫描与分析 用General Scanning公司的ScanArray 3000扫描芯片. 用预先选定的内参照基因(24条管家基因, 每个基因2个点, 共48个点)对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正. 用ImaGene3.0软件分析Cy3、Cy5两种荧光信号的强度, 计算Cy5/Cy3比值. 阳性结果判断: Cy5/Cy3 > 2.0, 红色荧光, 显示表达增强; Cy5/Cy3 < 0.5, 为绿色荧光, 显示表达减弱.

2 结果

2.1 总RNA的定性、定量分析 实验组和对照组总RNA的吸光度 A_{260}/A_{280} 值分别为2.02和2.01, 热稳定实验70℃保温1 h与-20℃ 1 h的电泳条带比较, 显示28 s条带无明显降解, 电泳结果证实已抽提高纯度的总RNA.

2.2 芯片杂交体系验证及结果分析 在芯片上共有1152个cDNA. 为了监控芯片杂交体系, 在芯片上设置了阴性对照(8条水稻基因, 共8个点), 这些点的杂交信号均很低, 证实了数据的可靠性. 由于实验组探针标记Cy5荧光素(呈红色), 对照组探针标记Cy3荧光素(呈绿色), 红绿颜色的差异就显示该基因在实验组和对照组中基因表达水平上的差异, 黄色代表表达水平无差异. 在基因芯片的扫描分析中, 发现有12种基因的表达水平上调(表1), 有17种基因的表达水平下调(表2).

表1 表达显著增强的基因

编号	Cy5/Cy3	编码蛋白
1	2.728	癌基因下调/相关的细胞黏附分子(CDON)
2	2.412	胶原质, VI型 α 3(COL6A3)转录变体1
3	2.338	骨形态生成蛋白受体, II型(丝氨酸/苏氨酸激酶)(BMP2)转录变体1
4	2.204	2RAD54同源蛋白B(RAD54B), 转录变体1
5	2.179	SYNJ1, 转录变体2
6	2.140	锌指蛋白和BTB8(ZBTB8)
7	2.124	TTK蛋白激酶
8	2.093	细胞周期蛋白激酶(CDC2-类似)11(CDK11)
9	2.073	周期同族体1(PER1)
10	2.036	Cullin3(CUL3)
11	2.010	假想丝氨酸富集蛋白
12	2.008	TBP类似物1

3 讨论

HCV NS4A蛋白核心部位的多肽结构是NS3丝氨酸蛋白酶生物学活性重要的辅助因子^[6]. NS3的丝氨酸蛋白酶活性参与NS3-NS4A、NS4A-NS4B、NS4B-NS5A、NS5A-NS5B之间的裂解过程. HCV的这种丝氨酸蛋白酶的生物学

活性是HCV复制过程中重要的调节机制之一, 因此NS4A在HCV的复制过程中发挥着重要的作用. 另外, HCV NS4A蛋白对于NS5A蛋白的磷酸化修饰具有重要的调节作用^[7], NS4A蛋白与NS4B、NS5A之间的结合, 是NS4B-NS5A之间连接部位发生裂解的重要条件. 近来研究发现, NS4A能够抑制双链RNA激活蛋白酶(PKR)的功能, 从而下调IFN刺激的抗病毒效应^[1]; NS4A抑制细胞周期调节基因p21/Waf1的表达, 从而产生翻译抑制效应, 增加某种细胞内蛋白的降解^[8-9], 与HCV的感染及增加病毒在体内的存活有关. 可见, HCV非结构蛋白NS4A的反式激活功能在HCV致病中发挥了重要作用.

我们课题组利用SSH技术筛选出HCV NS4A反式激活基因差异表达的cDNA消减文库, 对挑选的克隆进行分析发现其中一个新基因与GenBank中注册的已知功能基因序列没有同源性, 将该未知功能基因命名为NS4ATP2. 我们用基因芯片技术筛选NS4ATP2的反式调节基因, 结果表明, 12种基因的表达水平上调, 17种基因的表达水平下调, 这些基因包括细胞生长、细胞凋亡、信号传导、肿瘤发生等基因, 如癌基因下调/相关的细胞黏附分子、CUL3、TTK蛋白激酶、周期同族体1、生长抑制家族成员1转录变体1、BSG转录变体1、热休克蛋白8转录变体1、基质金属蛋白酶28、TAF7聚合酶II, TATA盒结合蛋白相关因子等.

在表达显著增加的基因中, 癌基因下调/相关的细胞黏附分子(CDON)是细胞表面球蛋白超家族成员, 研究

表2 表达显著下降的基因

编号	Cy5/Cy3	编码蛋白
1	0.315	BSG转录变体1
2	0.331	蛋白酶体26S亚单位, ATP酶, 3(PSMC3)
3	0.335	锌指蛋白547(ZNF547)
4	0.415	钙通道, 电压依赖, L型, α 1C亚单位(CACNA1C)
5	0.416	纤维蛋白溶酶原激活剂, 尿激酶受体(PLAUR)
6	0.420	基质金属蛋白酶28(MMP28), 转录变体2
7	0.425	膀胱癌相关蛋白
8	0.443	生长抑制家族成员1(ING1)转录变体1
9	0.446	阴离子交换剂SLC4A3
10	0.478	蛋白激酶, DNA-激活, 接触反应多肽(PRKDC)
11	0.480	TAF(TBP相关因子)7RNA聚合酶II, TATA盒结合蛋白(TBP)-相关因子(TAF7)
12	0.483	ATP结合盒, 亚家族B(MDR/TAP)6
13	0.486	眼癌结合蛋白4
14	0.489	热休克蛋白8(HSPA8)转录变体1
15	0.491	异质核糖核体蛋白K(HNRPK)转录变体1
16	0.495	TRAF和TNF受体相关蛋白
17	0.498	混合激酶相关激酶MRK- β

发现在肺癌、乳癌及卵巢癌中存在该基因的杂合丢失^[10], 故其功能的丢失可能在癌症的发生中起到一定的作用. CUL3是一种细胞的负性调节因子, 应用免疫共沉淀法及对CUL3基因敲除鼠的研究发现CUL3可与细胞周期素E特异性结合, 并刺激细胞周期素E的聚集, 对于细胞周期素E普遍泛素化起重要作用, 对细胞循环的S期进行异常调节, 导致了处于S期的细胞频率的增加^[11]. CUL3在组织中广泛表达, 近来发现在COL0205结肠癌细胞中表达增加, 因此CUL3可能参与细胞异常增生的调节^[12]. TTK蛋白激酶(TTK)的激酶区可明显增加磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸及磷酸酪氨酸的水平, 在许多良性组织中, 不能检测到TTK的mRNA, 而在恶性肿瘤分离的细胞中均检测到了TTK的mRNA, 故提出TTK可能通过使丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸磷酸化参与细胞的增殖^[13]. 周期同族体1(PER1)是生理循环的转录因子, 作为一种负性调节元件, 其启动子可作为多个信号分子的传感器, 但不能与DNA直接结合, 提示其可能通过间接方式发挥转录抑制效应^[14]. RAD54B参与同源重组(HR)、有丝分裂和减数分裂重组及双链缺损的修复. 在人的淋巴和结肠癌中, RAD54B的高度保守区发生同源突变, 这些结果显示一些癌症的发生可能是通过RAD54B功能的改变来实现的^[15].

在表达显著降低的基因中, 生长抑制家族成员1(ING1)转录变异体1是肿瘤抑制基因ING多种变异体之一, 已证实ING1在细胞凋亡和衰老等过程中发挥重要作用. 同时ING蛋白的生化功能参与转录调节、细胞循环、DNA修复和凋亡^[16], 在信号转导过程中与p53/TP53协同作用, 通过调节p53依赖的p21/Waf1转录活性来负性调节细胞生长的通路^[17]. Garkavtsev *et al*^[18]研究发现ING1具有肿瘤抑制的特征, 该基因在一些乳癌细胞系发生杂合丢失, 在成纤维细胞瘤细胞中发生基因突变, 从而表达降低, 故其失活可促进癌症的发生. 目前研究发现ING1具有不同转录变异体, 但是是否不同的转录变异体编码不同蛋白, 并发挥不同作用的报道十分有限. BSG转录变异体1所编码的蛋白是免疫球蛋白家族成员之一, 与整合素之间相互作用在BSG信号通路中发挥重要的作用, BSG主要存在于肿瘤细胞的表面, 可触发间充质细胞和肿瘤细胞中基质金属蛋白酶的产生和释放, 由此引起肿瘤的侵袭^[19]. 热休克蛋白8(HSPA8)转录变异体1可调节压力激活蛋白酶对JNK的抑制, 通过抑制细胞的凋亡程序来促进细胞的存活. 基质金属蛋白酶28(MMP28)在组织动态平衡和修复过程中发挥着重要的作用, 在上皮细胞修复过程中与细胞的增殖相关, 在肿瘤中广泛表达, 可调整基膜或降低角质细胞间的黏附蛋白, 从而促进细胞的迁移^[20]. TAF7聚合酶II, TATA盒结合蛋白相关因子(TAF7), 对于激活因子依赖的转录是必要的^[21], 通过蛋白与蛋白之间的相互作用而发挥其功能. 目前研究发现TAF7在HEK293和COS细胞中可提高c-Jun激活功能,

可作为c-Jun协同调节因子, 与c-Jun的N-端和C-端部分相互作用, 调节AP-1靶基因的活性, 作用于细胞外信号^[22], 从而参与细胞的生长、增殖、凋亡及炎症与肿瘤的发生.

通过对NS4ATP2基因芯片结果的分析, 我们发现其与体内细胞的生长、信号转导和凋亡关系密切, 因此在病毒感染后肝细胞恶性变方面可能发挥一定的作用. NS4ATP2是正常人体存在的基因, 在病毒蛋白NS4A的存在下其功能被进一步激活. NS4ATP2蛋白能够上调或下调HepG2细胞中许多不同基因的表达, 这些基因变化是复杂的, 而本研究对于初步了解新基因在肝细胞中的生物学效应提供了一些线索, 值得注意的是NS4A可通过抑制p21/Waf1从翻译水平降低某些蛋白的表达, 目前在对HCV的抗病毒治疗中又提出了联合应用NS3-NS4A蛋白水解酶抑制剂来抑制病毒复制并促进病毒的清除^[23]; 本研究发现NS4ATP2可下调ING1转录变异体1, 而ING1也可调节p53依赖的p21/Waf1通路, 那么二者之间又存在着如何的关系, 他们在复杂的细胞分子网络中是如何发挥作用的, 都值得我们继续深入的研究, 以期能对HCV慢性化感染及不良结局的发病机制与临床治疗有所帮助.

4 参考文献

- 1 Sato C. Effects of hepatitis C virus proteins on the interferon-stimulated signal transduction. *Nippon Rinsho* 2001; 59:1271
- 2 Kato N, Yoshida H, Kioko Ono-Nita S. Activation of intracellular signaling by hepatitis B and C viruses: C-viral core is the most potent signal inducer. *Hepatology* 2000;32:405-412
- 3 Chung KM, Song OK, Jang SK. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A contains potential transcriptional activator domains. *Mol Cells* 1997;7:661
- 4 Gong G, Waris G, Tanveer R. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9599
- 5 Ghosh AK, Steele R, Meyer K. Hepatitis C virus NS4A protein modulates cell cycle regulatory genes and promotes cell growth. *J Gen Virol* 1999;80(Pt 5):1179-1183
- 6 Howe AY, Chase R, Taremi SS. A novel recombinant single-chain hepatitis C virus NS3-NS4A protein with improved helicase activity. *Protein Sci* 1999;8:1332-1341
- 7 Asabe SI, Tanji Y, Satoh S. The N-terminal region of hepatitis C virus-encoded NS5A is important for NS4A-dependent phosphorylation. *J Virol* 1997;71:790-796
- 8 Florese RH, Nagano-Fujii M, Iwanaga Y, Hidajat R, Hotta H. Inhibition of protein synthesis by the nonstructural proteins NS4A and NS4B of hepatitis C virus. *Virus Res* 2002; 90:119-131
- 9 Kato J, Kato N, Yoshida H, Ono-Nita SK, Shiratori Y, Omata M. Hepatitis C virus NS4A and NS4B proteins suppress translation in vivo. *J Med Virol* 2002;66:187-199
- 10 Kang JS, Gao M, Feinleib JL, Cotter PD, Guadagno SN, Krauss RS. CDO: an oncogene-, serum-, and anchorage-regulated member of the Ig/fibronectin type III repeat family. *J Cell Biol* 1997;138:203-213
- 11 Singer JD, Gurian-West M, Clurman B, Roberts JM. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev* 1999;13:2375-2387
- 12 Du M, Sansores-Garcia L, Zu Z, Wu KK. Cloning and expression analysis of a novel salicylate suppressible gene, Hs-CUL-

- 3, a member of cullin/Cdc53 family. *J Biol Chem* 1998;273: 24289-24292
- 13 Mills GB, Schmandt R, McGill M, Amendola A, Hill M, Jacobs K, May C, Rodricks AM, Campbell S, Hogg D. Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation. *J Biol Chem* 1992;267:16000-16006
- 14 Motzkus D, Maronde E, Grunenber U, Lee CC, Forssmann W, Albrecht U. The human PER1 gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathways. *FEBS Lett* 2000; 486:315-319
- 15 Hiramoto T, Nakanishi T, Sumiyoshi T, Fukuda T, Matsuura S, Tauchi H, Komatsu K, Shibasaki Y, Inui H, Watatani M, Yasutomi M, Sumii K, Kajiyama G, Kamada N, Miyagawa K, Kamiya K. Mutations of a novel human RAD54 homologue, RAD54B, in primary cancer. *Oncogene* 1999;18:3422-3426
- 16 Campos EI, Chin MY, Kuo WH, Li G. Biological functions of the ING family tumor suppressors. *Cell Mol Life Sci* 2004;61: 2597-2613
- 17 Garkavtsev I, Grigorian IA, Ossovskaya VS, Chernov MV, Chumakov PM, Gudkov AV. The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature (Lond)* 1998;391:295-298
- 18 Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 1996;14:415-420
- 19 Muramatsu T, Miyauchi T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol* 2003;18:981-987
- 20 Marchenko GN, Strongin AY. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene* 2001;265:87-93
- 21 Chiang CM, Roeder RG. Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 1995;267:531-536
- 22 Munz C, Psichari E, Mandilis D, Lavigne AC, Spiliotaki M, Oehler T, Davidson I, Tora L, Angel P, Pintzas A. TAF7 (TAFII55) plays a role in the transcription activation by c-Jun. *J Biol Chem* 2003;278:21510-21516
- 23 Lin K, Kwong AD, Lin C. Combination of a hepatitis C virus NS3-NS4A protease inhibitor and alpha interferon synergistically inhibits viral RNA replication and facilitates viral RNA clearance in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4784-4792

编辑 王谨晖 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

• 研究快报 •

乙型肝炎病毒 X 蛋白上调前 -X 基因启动子表达活性

白桂芹, 成 军, 刘 妍, 刘 蔚, 张树林

白桂芹, 成军, 刘妍, 刘蔚, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
国家自然科学基金资助, No. C03011402, No. C30070689
军队九、五科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队十、五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队十、五科技攻关面上项目, No. 01MB135
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院传染病研究所. ci@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-05-25

摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒(HBV)X 蛋白(HBxAg)对前 -X 基因启动子的调节作用, 研究 HBxAg 在 HBV 致病的分子生物学机制中的作用。

方法: 应用聚合酶链反应(PCR)扩增 HBV 前 X 基因启动子, 以 T-A 克隆法, 将前 -X 基因启动子(promoter)的基因片段连入载体 pGEM-T。将获得的质粒 pGEMT- 前 -X-promoter 与报告质粒 pCAT3-basic 分别用 *KpnI* 和 *BglII* 双酶切后构建前 -X 启动子报告基因表达载体 pCAT3- 前 -

X-promoter, 以重组表达质粒 pCAT3- 前 -X-promoter 分别与 pCDNA3.1 空载体和 HBxAg 表达载体 pCDNA-HBxAg 瞬时转染 HepG2 细胞, 以转染 pCAT3 basic 的 HepG2 细胞为阴性对照, 48 h 后收获细胞。用酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞中氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性, 以了解 HBxAg 对前 X 基因启动子的调节作用。

结果: 构建的报告载体 pCAT3- 前 -X-promoter 经过序列分析和酶切鉴定正确。真核表达载体 pCDNA3.1(-)-X 和 pCAT3- 前 -X-promoter 共转染的 HepG2 细胞的 CAT 表达活性是 CAT3 启动子的 3.12 倍, 是 pCAT3- 前 -X-promoter 的 2.65 倍, 是 pCAT3-3.1 空载体和 pCAT3- 前 -X-promoter 共转染的 2.28 倍。

结论: HBxAg 可以上调乙型肝炎病毒基因组中前 -X 基因启动子的活性。

白桂芹, 成军, 刘妍, 刘蔚, 张树林. 乙型肝炎病毒 X 蛋白上调前 -X 基因启动子表达活性. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1904-1906
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1904.asp>

- 3, a member of cullin/Cdc53 family. *J Biol Chem* 1998;273:24289-24292
- 13 Mills GB, Schmandt R, McGill M, Amendola A, Hill M, Jacobs K, May C, Rodricks AM, Campbell S, Hogg D. Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation. *J Biol Chem* 1992;267:16000-16006
- 14 Motzkus D, Maronde E, Grunenber U, Lee CC, Forssmann W, Albrecht U. The human PER1 gene is transcriptionally regulated by multiple signaling pathways. *FEBS Lett* 2000;486:315-319
- 15 Hiramoto T, Nakanishi T, Sumiyoshi T, Fukuda T, Matsuura S, Tauchi H, Komatsu K, Shibasaki Y, Inui H, Watatani M, Yasutomi M, Sumii K, Kajiyama G, Kamada N, Miyagawa K, Kamiya K. Mutations of a novel human RAD54 homologue, RAD54B, in primary cancer. *Oncogene* 1999;18:3422-3426
- 16 Campos EI, Chin MY, Kuo WH, Li G. Biological functions of the ING family tumor suppressors. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2597-2613
- 17 Garkavtsev I, Grigorian IA, Ossovskaya VS, Chernov MV, Chumakov PM, Gudkov AV. The candidate tumour suppressor p33ING1 cooperates with p53 in cell growth control. *Nature (Lond)* 1998;391:295-298
- 18 Garkavtsev I, Kazarov A, Gudkov A, Riabowol K. Suppression of the novel growth inhibitor p33ING1 promotes neoplastic transformation. *Nat Genet* 1996;14:415-420
- 19 Muramatsu T, Miyauchi T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol* 2003;18:981-987
- 20 Marchenko GN, Strongin AY. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene* 2001;265:87-93
- 21 Chiang CM, Roeder RG. Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 1995;267:531-536
- 22 Munz C, Psichari E, Mandilis D, Lavigne AC, Spiliotaki M, Oehler T, Davidson I, Tora L, Angel P, Pintzas A. TAF7 (TAFII55) plays a role in the transcription activation by c-Jun. *J Biol Chem* 2003;278:21510-21516
- 23 Lin K, Kwong AD, Lin C. Combination of a hepatitis C virus NS3-NS4A protease inhibitor and alpha interferon synergistically inhibits viral RNA replication and facilitates viral RNA clearance in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4784-4792

编辑 王谨晖 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

• 研究快报 •

乙型肝炎病毒 X 蛋白上调前 -X 基因启动子表达活性

白桂芹, 成 军, 刘 妍, 刘 蔚, 张树林

白桂芹, 成军, 刘妍, 刘蔚, 北京地坛医院传染病研究所 北京市 100011
张树林, 西安交通大学第一医院传染科 陕西省西安市 710061
国家自然科学基金资助, No. C03011402, No. C30070689
军队九、五科技攻关项目, No. 98D063
军队回国留学人员启动基金项目, No. 98H038
军队十、五科技攻关青年基金项目, No. 01Q138
军队十、五科技攻关面上项目, No. 01MB135
通讯作者: 成军, 100011, 北京市东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京地坛医院传染病研究所. ci@genetherapy.com.cn
电话: 010-64481639 传真: 010-64281540
收稿日期: 2005-01-10 接受日期: 2005-05-25

摘要

目的: 研究乙型肝炎病毒(HBV)X 蛋白(HBxAg)对前 -X 基因启动子的调节作用, 研究 HBxAg 在 HBV 致病的分子生物学机制中的作用。

方法: 应用聚合酶链反应(PCR)扩增 HBV 前 X 基因启动子, 以 T-A 克隆法, 将前 -X 基因启动子(promoter)的基因片段连入载体 pGEM-T。将获得的质粒 pGEMT- 前 -X-promoter 与报告质粒 pCAT3-basic 分别用 *KpnI* 和 *BglII* 双酶切后构建前 -X 启动子报告基因表达载体 pCAT3- 前 -

X-promoter, 以重组表达质粒 pCAT3- 前 -X-promoter 分别与 pCDNA3.1 空载体和 HBxAg 表达载体 pCDNA-HBxAg 瞬时转染 HepG2 细胞, 以转染 pCAT3 basic 的 HepG2 细胞为阴性对照, 48 h 后收获细胞。用酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞中氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性, 以了解 HBxAg 对前 X 基因启动子的调节作用。

结果: 构建的报告载体 pCAT3- 前 -X-promoter 经过序列分析和酶切鉴定正确。真核表达载体 pCDNA3.1(-)-X 和 pCAT3- 前 -X-promoter 共转染的 HepG2 细胞的 CAT 表达活性是 CAT3 启动子的 3.12 倍, 是 pCAT3- 前 -X-promoter 的 2.65 倍, 是 pCAT3-3.1 空载体和 pCAT3- 前 -X-promoter 共转染的 2.28 倍。

结论: HBxAg 可以上调乙型肝炎病毒基因组中前 -X 基因启动子的活性。

白桂芹, 成军, 刘妍, 刘蔚, 张树林. 乙型肝炎病毒 X 蛋白上调前 -X 基因启动子表达活性. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1904-1906
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1904.asp>

0 引言

HBV 基因组全长3 200个核苷酸(nt)左右,为部分双链结构.1979年最初的研究将HBV基因组划分为4个开放读码框架(ORF)^[1],分别命名为S、C、P、X区.其中最小的ORF编码的X蛋白(HBxAg)是一种具有反式激活作用的病毒蛋白,在HBV感染肝细胞的恶性转化中具有十分重要的作用^[2-5].1990年克隆了一株adr亚型的HBV基因组,发现了前-X区基因,并初步认为是adr亚型特异性的一段序列.Gelibert *et al*^[6]于1995年的初步研究认为前-X区变异与肝细胞癌(HCC)的形成有关,之后在1998年发表的研究报告中发现来源于HCC患者的40个全HBV病毒基因序列中,有18株具有前-X基因,且均为adr亚型.

董蕾 *et al*^[7]利用长距离精确聚合酶链反应(LR-PCR)扩增慢性乙型肝炎患者血清来源的5个全长HBV基因组DNA,在分析不同克隆之间的序列变异程度时,发现所获得的5个克隆在X区之前可能还存在一个ORF,长度为168 bp,编码56个氨基酸残基(aa),并将其暂时命名为前-X(pre-X).为了解前X编码区上游DNA序列是否具有启动子,杨倩 *et al*^[8]选取其翻译起始密码子ATG上游225 bp的基因片段并设计引物,将其克隆至报告基因表达载体pCAT3中,构建pCAT3-前-X-promoter表达载体,以该质粒转染HepG2细胞,用ELISA法检测报告基因编码产物氯霉素乙酰转移酶(CAT)的表达活性.结果提示pCAT3-前-X-promoter中插入的DNA序列具有启动子活性,为界定前-X的ORF的存在提供了直接的依据.

我们为了研究HBxAg蛋白对前-X基因启动子的调节作用,用基因重组技术构建pCAT3-前-X-promoter报告基因载体及HBxAg的真核表达载体pcDNA3.1(-)-X,并共转染于人肿瘤细胞系HepG2细胞,应用报告基因CAT共转染瞬时表达系统,证明HBxAg可上调前-X基因启动子的转录活性.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系HepG2细胞及大肠杆菌JM109菌株为本室保存,pcDNA3.1(-)-X为本室构建^[5].Tag DNA聚合酶、T4 DNA连接酶及限制性内切酶均购自Takara公司.质粒DNA提取试剂盒,中间载体pGEM-T及报告质粒pCAT3-basic均购自Promega公司;CAT-ELISA检测试剂盒及质粒DNA转染试剂盒购自Roche公司.其他生化试剂购自Sigma公司.

1.2 方法 目的基因的扩增与纯化:杨倩 *et al*^[8]选取了前-X-基因翻译起始密码子ATG上游225 bp,设计并合成引物.在上下游引物的5'-端分别引入KpnI和XhoI酶切位点.上游引物P1:5'-GGTACCGATTGGAAAGTATGTCAGAG-3'.下游引物P2:5'-CTCGAGTTGCGTCAGCAAACACTTGG-3'.以HepG2细胞基因组DNA为模板,PCR扩增包含前-X基因启动子全序列的DNA片段,PCR产物经10 g/L琼

脂糖凝胶电泳,切胶,回收纯化.

1.2.1 pCAT3报告载体的构建、纯化和DNA测序 以T-A克隆法,用T4 DNA连接酶将前-X-promoter基因片段连入载体pGEM-T.将获得的质粒pGEMT-前-X-promoter和报告质粒pCAT3-basic分别用KpnI和Bgl II双酶切后用T4 DNA连接酶进行定向连接,产物转化JM109宿主菌,筛选抗氨苄青霉素阳性菌落;提取质粒,再次双酶切及PCR鉴定正向插入克隆,命名为pCAT3-前-X-promoter.DNA测序由上海博亚公司完成.

1.2.2 细胞转染及前-X-promoter活性检测 磁珠法提取质粒pCAT3-前-X-promoter以备转染,以标准方案培养HepG2细胞.具体转染方法参照转染说明书进行.转染48 h后收集细胞,收集细胞裂解液,用于CAT活性检测.

1.2.3 共转染试验 pcDNA3.1(-)-X和pcDNA3.1(-)-空载体分别与pCAT3-前-X-promoter行共转染实验.在35 mm培养皿中常规培养HepG2细胞,细胞生长至对数期时分别将pcDNA3.1(-)-X+pCAT3-前-X-promoter、pcDNA3.1(-)-空载体+pCAT3-前-X-promoter及pCAT3-pCAT3-前-X-promoter加入细胞培养液中,同时以转染pCAT3-Basic的HepG2细胞作阴性对照.转染24 h后,收集细胞裂解液,用于CAT活性检测.所有实验严格平行操作.

1.2.4 CAT含量检测 参照试剂盒说明书进行.取1.0 ng/mL的CAT标准品(试剂盒提供)及细胞裂解液200 μ L加入已包被抗体的96孔板中,37 $^{\circ}$ C温育2 h,再依次加入第一抗体(地高辛标记的抗-CAT)、第二抗体(偶联有过氧化物酶的地高辛抗体anti-DIG-POD)200 μ L 37 $^{\circ}$ C温育1 h后,加入过氧化物酶的底物室温显色10-30 min.用酶标仪检测标本在415 nm波长的吸光度,其数值反映细胞提取物中CAT的表达水平.以未作转染的细胞裂解液平行实验作空白对照.

2 结果

2.1 构建的中间载体pGEMT-前-X-promoter以KpnI和XhoI双酶切,电泳图谱为两条带:225 bp(IL-18基因片段)和3 015 bp(pGEM-T空载体);DNA测序证实重组质粒含有225 bp的目的基因,读码框架正确.

2.2 重组质粒的酶切鉴定 pCAT3-前-X-promoter分别以KpnI和Bgl II双酶切及PCR鉴定均显示225 bp正向插入条带.说明重组质粒pCAT3-前-X-promoter构建正确.

2.3 共转染试验结果 重组质粒pCAT3-前-X-promoter分别与pcDNA3.1(-)-X和pcDNA3.1(-)-空载体共转染实验结果:空载体对照组pCAT3 basic的CAT的吸光度值为0.062,pCAT3-promoter的吸光值为0.998,pCAT3-前-X-promoter的CAT的吸光度值为1.175,共转染pCAT3-前-X-promoter/pcDNA3.1(-)-空载体和pCAT3-前-X-promoter/pcDNA3.1(-)-X的HepG2细胞CAT的吸光度值分别为1.365和3.115,共转染pCAT3-

前-X-promoter/pcDNA3.1(-)-X的CAT的表达明显增强,是pCAT3空载体的3.12倍,是pCAT3-前-X-promoter的2.65倍,是共转染pCAT3-前-X-promoter/pcDNA3.1(-)-空载体的2.28倍(图1)。

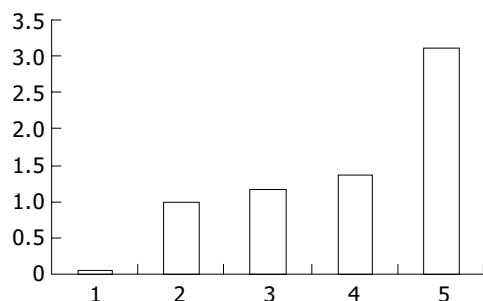


图1 CAT酶表达结果. 1: pCAT3 basic; 2: pCAT3-promoter; 3: CAT3-前-X-promoter; 4: pcDNA3.1(-)-空载体 + pCAT3-前-X-promoter; 5: 乙型肝炎病毒X蛋白 + pCAT3-前-X-promoter.

3 讨论

HBV编码的HBx是一种重要的转录激活因子,与乙型肝炎的慢性化和促进肝细胞的恶性转化有密切关系. HBx的功能状态与其细胞定位有关,核内HBx可通过与DNA结合蛋白作用,激活转录因子或基本转录过程,通过反式激活转录元件而促进病毒的复制. HBx还能在DNA水平激活转录. 而胞质中的HBx则主要通过刺激信号转导途径而引起一系列的反应,激活AP-1、NF- κ B等一批转录因子,干扰细胞内信号转导通路反式激活转录,导致细胞的转录、增生^[9-11]. HBx功能域的分析、研究认为, N-末端和C-末端对其反式激活都不重要,转录活性区位于32-148 aa内^[9, 12]. 以HBx基因序列为靶区域,研究HBV在慢性感染患者体内的存在状态时发现,HBx基因具有准种特点,在其羧基末端存在相对的高变区. 进一步研究发现HBx基因的异质性和准种特点对于其反式激活作用具有显著的影响^[13]. 这些研究结果的差异,可能是HBx在不同细胞通过不同因子或途径起作用而导致所需的功能域不同所致.

研究发现HBx的反式激活作用呈现明显的广谱性,能够反式激活多种同源或异源病毒或细胞转录调节基因区,包括HBV增强子/核心启动子、S基因启动子,SV40的增强子及早期启动子,单纯疱疹病毒胸腺嘧啶核苷激酶启动子(HSV-TK),人T淋巴细胞I型病毒(HTLV-1)的长末端重复序列(LTR)、人免疫缺陷病毒I型(HIV-1)、

罗氏肉瘤病毒(RSV)及 β -干扰素等的启动子.

但是,HBxAg是否对HBV前X基因启动子的转录活性具有显著的反式调节作用,一直没有相关的研究. 本文采用基因重组技术,前-X基因上游自碱基ATG上推225个碱基,以HBV DNA为模板,设计引物,PCR扩增包含前X基因启动子全序列的DNA片段,构建pCAT3-前-X-promoter报告基因载体,应用报告基因CAT共转染瞬时表达系统,与pcDNA3.1(-)-X共转染HepG2细胞,共转染pCAT3-前-X-promoter/pcDNA3.1(-)-X的CAT的表达明显增强,是CAT3空载体的3.12倍,是pCAT3-前-X-promoter的2.65倍,是共转染pCAT3-前-X-promoter/pcDNA3.1(-)-空载体的2.28倍. 说明乙型肝炎病毒X蛋白对前-X基因启动子有反式激活作用,转录激活其下游基因的活性. 证明HBxAg蛋白可上调前-X启动子活性,首次证实HBxAg反式激活HBV前-X基因启动子的转录活性,从而为研究HBV致病的分子生物学机制提供依据.

4 参考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 北京: 人民军医出版社, 1997:79
- 2 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1997:42
- 3 赵鸿, 成军, 斯崇文. 乙型肝炎病毒S基因单独和联合白介素-12免疫小鼠产生的特异性免疫应答. 中华传染病杂志 2000;18:190
- 4 成军, 钟彦伟, 施双双. 乙型肝炎病毒表面抗原素原人源单链可变区抗体基因的克隆与鉴定. 肝脏 2000;5:130
- 5 成军, 斯崇文. HBV DNA转染细胞系的建立及其应用研究进展. 国外医学·流行病学传染病学分册 1994;21:60
- 6 Gelibert F, Mandart E, Fitoussi F. Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E.coli*. *Nature* 1979;281:646
- 7 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X区编码基因的界定. 世界华人消化杂志 2003;8:1091-1096
- 8 杨倩, 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组中前-X区编码基因启动子序列的确定及转录活性的鉴定. 解放军医学杂志 2003;9:761-762
- 9 Murakami S. Hepatitis B virus X protein: structure, function and biology. *Intervirology* 1999;42:81-99
- 10 Yu DY, Moon HB, Son JK, Jeong S, Yu SL, Yoon H, Han YM, Lee CS, Park JS, Lee CH, Hyun BH, Murakami S, Lee KK. Incidence of hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis B virus X-protein. *J Hepatol* 1999; 31:123
- 11 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 12 Arii M, Katada S, Koike K. Identification of three essential regions of hepatitis B virus X protein for trans-activation function. *Oncogene* 1992;7:397
- 13 刘斯, 董菁, 皇甫竞坤. 乙型肝炎病毒X基因异质性及对其反式激活功能的影响. 解放军医学杂志 2002;27:127

编辑 王谨晖 审读 张海宁

丹参素、熊去氧胆酸对大鼠脂肪肝肝细胞糖代谢的影响

丁 钢, 王宝仁, 陈乐明

丁钢, 王宝仁, 陈乐明, 天津港口医院 天津市 300456

通讯作者: 丁钢, 300456, 天津市塘沽区二马路, 天津港口医院.

dq57@medmail.com.cn

电话: 022-81910143 传真: 022-25706348

收稿日期: 2005-05-13 接受日期: 2005-06-15

摘要

目的: 用丹参素和熊去氧胆酸培养脂肪肝模型鼠肝细胞, 观察药物对细胞糖代谢能力的影响.

方法: 将丹参素和熊去氧胆酸加入模型鼠肝细胞的培养液, 经1 wk培养后, 再调整培养液中糖至13.9 mmol/L和胰岛素至250 mU/L. 2 h和24 h测定糖含量, 24 h测定胰岛素含量.

结果: 丹参素组2 h糖含量 11.581 ± 0.501 mmol/L和24 h糖含量 8.188 ± 0.770 mmol/L, 均低于熊去氧胆酸组2 h 11.881 ± 0.608 mmol/L、24 h 10.019 ± 0.900 mmol/L和对照组2 h 12.306 ± 0.360 mmol/L、24 h 11.669 ± 0.832 mmol/L, 并有明显差异(2 h $F = 4.25$, $P = 0.028$; 24 h $F = 34.74$, $P = 0.001$). 24 h胰岛素丹参素组含量 29.513 ± 2.638 mU/L, 亦明显低于熊去氧胆酸组 40.888 ± 6.869 mU/L和对照组 57.125 ± 8.104 mU/L ($F = 38.57$, $P = 0.001$).

结论: 脂肪肝模型鼠肝细胞经丹参素培养后, 对胰岛素的摄取、结合能力提高, 糖代谢能力增强.

丁钢, 王宝仁, 陈乐明. 丹参素、熊去氧胆酸对大鼠脂肪肝肝细胞糖代谢的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1907-1909
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1907.asp>

0 引言

近年来, 脂肪肝形成的“二次打击”学说已经得到了普遍认同. 此学说认为肝细胞本身的糖耐量异常和对胰岛素的耐受在脂肪肝形成中起重要作用. 为了解丹参素和熊去氧胆酸对脂肪肝的影响, 本研究通过对大鼠脂肪肝细胞的体外培养, 以观察上述两种药物对脂肪肝细胞糖代谢的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 纯系♂ Wistar大鼠共20只(军事医学科学院卫生环境所提供), 每只体质量约180±20 g. 饲料采用高脂肪混合饲料: 颗粒饲料(购于天津市卫生局动物中心), 猪油(自制)、胆固醇(购于天津化学试剂公司), 以79:20:1比例混合.

1.2 方法

1.2.1 脂肪肝动物实验模型的建立 大鼠自由进食、饮水, 室内自然采光10:14, 温度23-28℃, 湿度40-60%,

于第16 wk每只大鼠体质量达450±40 g, 随机取其中一只, 450 g, 肝指数>5, 肝脏25.6 g, 黄褐色, 病理检查: 弥漫性肝细胞脂肪变, 95%的肝细胞内有大泡性脂肪滴贮积-重度脂肪肝. 表明脂肪肝造模成功.

1.2.2 肝细胞分离 取脂肪肝模型大鼠一只, 作为肝细胞供体大鼠, 戊巴比妥麻醉, 仰卧位, 胸腹部备皮、消毒、铺无菌巾, 经腹正中切口进入腹腔, 暴露分离腹主动脉、下腔静脉、门静脉, 预置结扎线, 腹主动脉插管固定, 以一定压力向腹主动脉内推注含肝素(100 U/kg)的4℃生理盐水(NS), 同时迅速切开胸腔, 夹闭胸主动脉, 剪开心脏, 即快速推注灌洗液, 共100 mL, 可见血液及灌洗液顺利流出心脏; 推注同时切开门静脉, 插管固定, 快速推注4℃灌洗液100 mL. 在肾静脉水平剪开下腔静脉, 插管固定, 夹闭上下腔静脉, 可见灌洗液从下腔静脉插管流出, 逐渐肝脏呈淡黄色. 将门静脉插管连接驱动泵输出端, 输入端放入胶原酶溶液内(37℃), 下腔静脉插管亦放入此容器, 形成门静脉-腔静脉循环, 循环胶原酶溶液30 min, 流速20 mL/min, 取下肝脏, 轻轻剥离肝包膜, 以肝上下腔静脉为中心用小木梳轻轻快速梳下肝细胞, 弃去残留支架组织, 经200目滤网滤过去除未消化组织, 即得较稠厚肝细胞悬液. 将肝细胞悬液在4℃、1 200 r/min条件离心2.5 min, 弃去上清液, 然后用4℃ PBS液洗1次, MEM洗2次, 分别以1 200 r/min条件离心2 min、1.5 min、1 min. 细胞悬浮于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基, 接种于24孔培养皿中, 在37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养.

1.2.3 肝细胞存活率测定 台盼蓝拒染试验: 取少量肝细胞悬液, 与等量4 g/L台盼蓝溶液混合, 静置1 min, 立即在显微镜下计数200个细胞, 细胞核着色者为死细胞, 不着色者为活细胞.

1.2.4 肝细胞培养 以100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基调整细胞浓度至 1×10^6 /L, 接种于24孔培养皿中, 在37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养24 h后, 分别加入一定浓度丹参素及熊去氧胆酸, 设空白对照, 每孔设3个复孔, 定时取样测定. 经10次细胞分离试验后, 肝细胞平均产量为 $(9.10 \pm 0.40) \times 10^7$, 台盼蓝拒染实验细胞活性率 $(94.30 \pm 1.89)\%$, 倒置显微镜下观察单个游离细胞, 细胞呈圆形.

1.2.5 丹参素、熊去氧胆酸对脂肪肝大鼠肝细胞糖代谢的影响 取分别经丹参素(10 mg/L)、熊去氧胆酸(0.1 mg/L)培养7 d的脂肪肝大鼠肝细胞, 和空白培养的对照组, 分为三组, 每孔设复孔3个, 各孔约含有2 m肝细胞

(10^9 /L) 混悬液, 于实验开始前更换同一培养液, 并加入一定含量的普通胰岛素和葡萄糖. 加入后调整浓度: 葡萄糖 13.9 mmol/L , 普通胰岛素 250 mU/L , 培养 2, 24 h 后, 测量比较培养液中糖和普通胰岛素的含量. 观察脂肪肝细胞在普通胰岛素存在的情况下对糖的利用情况. 以上过程重复 8 次. 糖含量由本院生化室使用 Olympus AU640 型全自动生化分析仪和日本第一化学公司试剂进行测定, 胰岛素含量由天津医科大学内分泌研究所中心实验室测定. 用每次各组平均数进行统计.

统计学处理 采用 F 检验进行统计学处理, 各组间用 SNK 法进行比较. 用 SAS6.12 软件进行分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

对照组和 II 实验组之间在培养 2 h 后糖含量即出现差异, 实验组明显低于对照组 ($P = 0.028$). 培养 24 h 后各组之间均有明显差异 ($P < 0.001$) (表 1).

培养 24 h 后各组胰岛素含量之间均有明显差异, 实验组明显低于对照组 ($P < 0.001$, 表 2).

表 1 丹参素、熊去氧胆酸对脂肪肝大鼠脂肪肝细胞糖代谢的影响 ($n = 8$, mean \pm SD, mmol/L)

时间	丹参素	熊去氧胆酸	对照组	F	P
2h	11.581 ± 0.501	11.881 ± 0.608	12.306 ± 0.360	4.250	0.028
24h	8.188 ± 0.770	10.019 ± 0.900	11.669 ± 0.832	34.740	<0.001

表 2 丹参素、熊去氧胆酸对脂肪肝大鼠脂肪肝细胞胰岛素的影响 ($n = 8$, mean \pm SD, mU/L)

时间	丹参素	熊去氧胆酸	对照组	F	P
24h	29.513 ± 2.638	40.888 ± 6.869	57.125 ± 8.104	38.570	<0.001

3 讨论

胰岛素抵抗是引起非酒精性脂肪肝的一个重要因素, 导致肝细胞的糖利用障碍. 脂肪性肝病是遗传-环境-代谢应激相关因素所致的, 以肝细胞脂肪变性为主的临床病理综合征^[1]. Day *et al*^[2-3] 在 1998 年提出了“二次打击”学说, 经过近年来不断发展, 目前较为公认的“多重打击学说”为统一发病机制学说, 其初次打击主要是胰岛素抵抗^[4-5], 通过促使外周脂肪分解增加和胰岛素血症引起肝细胞脂肪堆积, 并诱导其对损害因子的敏感性增高. 在此阶段, 由于机体组织适应性反应机制的抗氧化、抗细胞凋亡、瘦素的抗脂肪毒性等防御功能可与上述因素相抗衡, 故大多数单纯脂肪肝的结构和功能改变是可逆的^[6]. 二次打击主要是氧应激, 最后导致炎症和纤维化. 在脂肪的演变中, 发生肿瘤坏死因子 (TNF) α -瘦素-胰岛素反馈轴改变, 胰岛素抵抗进一步削弱了抗葡萄糖变性和抗脂肪变性的能力, 适应性反应出现缺陷, 细胞防御机制减弱. 另外, 缺氧、内毒素、药物等作为附加因素实行多重打击.

因此, 在脂肪肝的发展中, 胰岛素抵抗造成的肝细胞糖代谢异常, 作为第一次打击的基础, 起到了重要的作用. 对脂肪肝治疗的方法包括如何减少胰岛素抵抗, 减少反应性氧化体系的生成增多, 减少肝脂质过氧化等因素, 就有可能阻碍脂肪肝的形成.

本研究中, 脂肪肝模型大鼠肝细胞经加入丹参素培养基培养 1 wk, 再加入葡萄糖和胰岛素. 经过 24 h 的培养, 分别对 2 h 和 24 h 的培养液中各组糖含量、胰岛素含量进行比较, 发现丹参素组培养液中葡萄糖的浓度较熊去氧胆酸组和对照组明显下降, 24 h 普通胰岛素的含量各组之间有明显差异. 这一结果表明, 大鼠脂肪肝细胞在丹参素的作用下, 其细胞对糖的利用有一定的改善, 机制不明. 丹参是中医药中的一味良药, 除具有活血化瘀、改善微循环的作用外, 还具有降低血脂、抑制细胞内源性胆固醇的合成, 抗脂蛋白氧化, 降低血液中的甘油三酯和胆固醇的含量, 抑制低密度脂蛋白形成的作用. 同时, 丹参对肝细胞的急慢性损害还具有保护作用, 保护肝细胞膜, 减少细胞坏死, 降低肝纤维化水平. 根据研究还发现, 丹参可降低肝脏的丙二醇含量, 同时对肝脏的超氧化物歧化酶活性有明显的升高作用, 说明在一定程度上具有抗氧自由基及抗脂质过氧化的作用^[7-8].

丹参素影响模型大鼠脂肪肝肝细胞糖代谢的作用, 可能通过以下途径: (1) 丹参素具有多种细胞因子活性, 促进细胞代谢, 改善细胞功能. 能促进脂肪肝细胞本身的物质合成、分解代谢能力和能量产生、利用能力. 增加白蛋白的合成和降低游离脂肪酸 (FFA) 水平, 增加对胰岛素的摄取和结合, 提高对胰岛素的敏感性, 使得细胞对糖的吸收、利用增加, 减轻胰岛素的抵抗. (2) 目前研究发现瘦素、FFA^[9]、TNF^[10-12] 和自由基^[13] 在脂肪肝的形成过程中起重要作用, 这些因子相互作用和影响, 干扰细胞的糖代谢、脂肪代谢和能量合成, 导致脂肪肝. 丹参素能减少细胞产生的氧自由基, 并能减轻自由基的损伤, 减少 FFA 的产生, 调控 TNF 的产生^[14-15]. 他们在胰岛素受体、细胞酶的活性和基因的表达等不同的水平影响细胞内的糖代谢和能量的供应. (3) 丹参素通过抗氧自由基、FFA 等损伤因子的作用, 减少脂肪肝细胞的损伤, 减少细胞的凋亡, 保护肝细胞, 使总的糖代谢改善.

至今为止, 在脂肪肝的形成过程中, 糖代谢的异常改变一直扮演着一个重要角色, 糖耐量下降, 胰岛素抵抗被认为是脂肪肝形成的重要一环. 通过本研究的观察, 在脂肪肝大鼠肝细胞的培养中, 对照比较了丹参素溶液和熊去氧胆酸溶液对其糖代谢的影响. 发现以丹参素溶液培养过的脂肪肝细胞在有一定浓度的胰岛素存在的情况下, 经一定时间培养后, 其细胞培养液中的葡萄糖的含量, 较熊去氧胆酸组和对照组有明显的差异. 证明在普通胰岛素存在的情况下, 丹参素可以明显改善脂肪肝细胞对葡萄糖的利用, 提高对胰岛素的反应性, 降低胰岛素抵抗的现象.

致谢: 感谢天津第三中心医院肝胆研究所张金卷博士在实验中给予的指导和帮助。

4 参考文献

- 1 赵彩彦, 李丽. 瘦素与脂肪性肝病. 中华肝胆病杂志 2004;12: 510-512
- 2 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-845
- 3 曾民德. 重视非酒精性脂肪性肝病的研究. 中华肝胆病杂志 2003; 11:69
- 4 Yu AS, Keffe EB. Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2002;2:11-19
- 5 van Hoek B. Non-alcoholic fatty liver disease: a brief review. *Scand J Gastroenterol* 2004;39(Suppl 241):56-59
- 6 曾民德. 脂肪肝发病机制“二次打击”的假设. 肝脏 2001;6:145
- 7 李跃华, 吴翠贞, 阙玲莉. 丹参素增强肝细胞生长及其在药物性肝细胞损伤中的保护作用. 南京医科大学学报(中文版) 1996;16: 346-348
- 8 王南, 蔡海江, 朱宇, 陈秀英. 丹参素对牛主动脉平滑肌细胞氧化修饰LDL的抑制作用. 南京医科大学学报 1994;14:529-531
- 9 Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192
- 10 Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998;12:57-65
- 11 Memon RA, Hotamisligil GS, Wiesrock SM, Uysal-Teoman K, Faggioni R, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Upregulation of uncoupling protein 2 mRNA in genetic obesity: lack of an essential role for leptin, hyperphagia, increased tissue lipid content, and TNF- α . *Biochem Biophys Acta* 2000;1484:41-50
- 12 Straczkowski M, Kowalska I, Dzienis-Straczkowska S, Stepień A, Skibinska E, Szelachowska M, Kinalska I. Changes in tumor necrosis factor- α system and insulin sensitivity during an exercise training program in obese women with normal and impaired glucose tolerance. *Eur J Endocrinol* 2001;145:273-280
- 13 Xie HS, Lutt WW. Insulin resistance caused by hepatic cholinergic interruption and reversed by acetylcholine administration. *Am J Physiol* 1996;270:E858-E863
- 14 黄双盛, 吴勇杰. 丹参的抗氧化与抗炎作用研究进展. 中国中医药信息杂志 2002;9:88-89
- 15 王文俊, 吴咸中, 姚智, 李会强. 人黄芩素、丹参素对单核细胞分泌炎症细胞因子的调节. 中国免疫学杂志 1995;11:370-372

编辑 王谨晖 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

• 研究快报 •

人食管鳞癌中细胞周期调节基因蛋白的表达

金春亭, 张林西, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 左东升, 王淑强

金春亭, 张林西, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 左东升, 王淑强, 河北省北方学院病理学教研室 河北省张家口市 075029
河北省自然科学基金课题, No. C2005000664
河北省普通高等学校博士科研资助基金课题, No. B2004101
通讯作者: 张林西, 075029, 河北省张家口市长青路 14 号, 河北北方学院病理学教研室. linxizhang@sohu.com
电话: 0313-8041652 传真: 0313-8045177
收稿日期: 2005-06-10 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探讨细胞周期调节基因 cyclin D1、CDK4、cyclin E 和 p27Kip1 在我国食管鳞癌(SCC)中的表达特点及其在食管上皮癌变中的可能作用。

方法: 应用流式细胞术对 81 例食管鳞癌中 cyclin D1、CDK4、cyclin E、p27Kip1 的表达进行检测, 并对结果进行定量分析。

结果: cyclin D1、CDK4、cyclin E 蛋白在正常食管上皮的表达都较低, 在异型增生上皮中有所增高, 而在 SCC 中表达都较高, 且随分化程度的降低而逐渐增高, 组间差异显著(分别为 $F = 28.369$, $P < 0.01$; $F = 9.016$, $P < 0.01$; $F = 22.667$,

$P < 0.01$)。p27Kip1 在正常食管上皮中表达最高, 随分化程度的降低而显著减少, 组间差异显著($F = 5.783$, $P < 0.01$)。p27Kip1 表达分别与 cyclin D1、CDK4 和 cyclin E 基因表达呈显著负相关($r = -0.380$, -0.242 , -0.333 ; $P < 0.05$), 而后三种基因表达之间呈显著正相关(cyclin D1 与 CDK4 $r = 0.711$, $P < 0.01$; cyclin D1 与 cyclin E $r = 0.638$, $P < 0.01$; CDK4 与 cyclin E $r = 0.430$, $P < 0.01$)。

结论: 在食管鳞癌中细胞周期调节基因 cyclin D1、CDK4、cyclin E 和 p27Kip1 表达异常与食管上皮细胞癌变密切相关。

金春亭, 张林西, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 左东升, 王淑强. 人食管鳞癌中细胞周期调节基因蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1909-1912
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1909.asp>

0 引言

细胞周期调节基因与细胞癌变的关系, 是近年来生命科学领域的研究热点之一。目前, 已发现在癌变过程中有多

致谢: 感谢天津第三中心医院肝胆研究所张金卷博士在实验中给予的指导和帮助。

4 参考文献

- 1 赵彩彦, 李丽. 瘦素与脂肪性肝病. 中华肝胆病杂志 2004;12:510-512
- 2 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-845
- 3 曾民德. 重视非酒精性脂肪性肝病的研究. 中华肝胆病杂志 2003;11:69
- 4 Yu AS, Keffe EB. Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2002;2:11-19
- 5 van Hoek B. Non-alcoholic fatty liver disease: a brief review. *Scand J Gastroenterol* 2004;39(Suppl 241):56-59
- 6 曾民德. 脂肪肝发病机制“二次打击”的假设. 肝脏 2001;6:145
- 7 李跃华, 吴翠贞, 阙玲莉. 丹参素增强肝细胞生长及其在药物性肝细胞损伤中的保护作用. 南京医科大学学报(中文版) 1996;16:346-348
- 8 王南, 蔡海江, 朱宇, 陈秀英. 丹参素对牛主动脉平滑肌细胞氧化修饰LDL的抑制作用. 南京医科大学学报 1994;14:529-531
- 9 Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192
- 10 Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998;12:57-65
- 11 Memon RA, Hotamisligil GS, Wiesrock SM, Uysal-Teoman K, Faggioni R, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Upregulation of uncoupling protein 2 mRNA in genetic obesity: lack of an essential role for leptin, hyperphagia, increased tissue lipid content, and TNF- α . *Biochem Biophys Acta* 2000;1484:41-50
- 12 Straczkowski M, Kowalska I, Dzienis-Straczkowska S, Stepień A, Skibinska E, Szelachowska M, Kinalska I. Changes in tumor necrosis factor- α system and insulin sensitivity during an exercise training program in obese women with normal and impaired glucose tolerance. *Eur J Endocrinol* 2001;145:273-280
- 13 Xie HS, Lutt WW. Insulin resistance caused by hepatic cholinergic interruption and reversed by acetylcholine administration. *Am J Physiol* 1996;270:E858-E863
- 14 黄双盛, 吴勇杰. 丹参的抗氧化与抗炎作用研究进展. 中国中医药信息杂志 2002;9:88-89
- 15 王文俊, 吴咸中, 姚智, 李会强. 人黄芩素、丹参素对单核细胞分泌炎症细胞因子的调节. 中国免疫学杂志 1995;11:370-372

编辑 王谨晖 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

• 研究快报 •

人食管鳞癌中细胞周期调节基因蛋白的表达

金春亭, 张林西, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 左东升, 王淑强

金春亭, 张林西, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 左东升, 王淑强, 河北省北方学院病理学教研室 河北省张家口市 075029
河北省自然科学基金课题, No. C2005000664
河北省普通高等学校博士科研资助基金课题, No. B2004101
通讯作者: 张林西, 075029, 河北省张家口市市长青路 14 号, 河北北方学院病理学教研室. linxizhang@sohu.com
电话: 0313-8041652 传真: 0313-8045177
收稿日期: 2005-06-10 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探讨细胞周期调节基因 cyclin D1、CDK4、cyclin E 和 p27Kip1 在我国食管鳞癌(SCC)中的表达特点及其在食管上皮癌变中的可能作用。

方法: 应用流式细胞术对 81 例食管鳞癌中 cyclin D1、CDK4、cyclin E、p27Kip1 的表达进行检测, 并对结果进行定量分析。

结果: cyclin D1、CDK4、cyclin E 蛋白在正常食管上皮的表达都较低, 在异型增生上皮中有所增高, 而在 SCC 中表达都较高, 且随分化程度的降低而逐渐增高, 组间差异显著(分别为 $F = 28.369$, $P < 0.01$; $F = 9.016$, $P < 0.01$; $F = 22.667$,

$P < 0.01$)。p27Kip1 在正常食管上皮中表达最高, 随分化程度的降低而显著减少, 组间差异显著($F = 5.783$, $P < 0.01$)。p27Kip1 表达分别与 cyclin D1、CDK4 和 cyclin E 基因表达呈显著负相关($r = -0.380$, -0.242 , -0.333 ; $P < 0.05$), 而后三种基因表达之间呈显著正相关(cyclin D1 与 CDK4 $r = 0.711$, $P < 0.01$; cyclin D1 与 cyclin E $r = 0.638$, $P < 0.01$; CDK4 与 cyclin E $r = 0.430$, $P < 0.01$)。

结论: 在食管鳞癌中细胞周期调节基因 cyclin D1、CDK4、cyclin E 和 p27Kip1 表达异常与食管上皮细胞癌变密切相关。

金春亭, 张林西, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 左东升, 王淑强. 人食管鳞癌中细胞周期调节基因蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1909-1912
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1909.asp>

0 引言

细胞周期调节基因与细胞癌变的关系, 是近年来生命科学领域的研究热点之一。目前, 已发现在癌变过程中有多

种细胞周期调控因子表达异常.但是,对于多种细胞周期调节基因在食管上皮癌前病变及食管鳞癌(squamous cell carcinoma, SCC)中的表达特点及可能的作用、多种细胞周期调节基因表达的相互关系,目前少见报道.为此,本研究运用新鲜食管癌手术切除标本,研究了细胞周期调节基因蛋白cyclin D1、CDK4、cyclin E、p27Kip1在食管SCC及癌前病变中的表达情况,为食管癌的早期癌变研究提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院附属医院2001-08/12食管癌患者手术切除标本81例.男50例,女31例,年龄30-71岁,平均年龄 55 ± 0.6 岁.其中高分化SCC 39例,中分化SCC 18例,低分化SCC 24例.同时取切端正常食管黏膜5例,癌旁组织10例.术后立即取材,以100 mL/L中性甲醛固定,常规脱水、浸蜡、包埋,并进行连续切片,HE染色,由2位富有经验的病理医师分别进行病理组织学分级诊断.同时在相同部位取材,以700 mL/L冷乙醇固定,进行流式细胞仪检测.癌旁上皮经组织学证实都有明显的不典型增生.患者术前未经放疗或化疗.cyclin D1、CDK4、cyclin E、p27Kip1都是小鼠IgG单抗, Santa Cruz公司产品;羊抗鼠IgG-FITC, Jackson ImmunoResearch公司产品.以上抗体工作液浓度均为1:100.

1.2 方法 基因蛋白表达的流式细胞仪检测:具体方法按文献[1]进行.基因蛋白表达的定量分析:cyclin D1、CDK4、cyclin E、p27Kip1基因蛋白表达的定量分析:以荧光指数(Fluorescence Index, FI)表示他们的相对含量,公式为:FI = (样品基因蛋白表达的平均荧光强度-对照样品平均荧光强度)/正常样品平均荧光强度.

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件进行统计分析.组间显著性检验采用单因素方差分析(ANOVA),组间多重比较采用Scheffe法.基因表达之间的相关分析采用Pearson法. $P < 0.05$ 时表示差异有显著性.

2 结果

2.1 cyclin D1基因表达 cyclin D1在正常及异型增生上皮中的表达都很低,而在不同分化SCC中表达较高,且随分化程度降低显著增高,在低分化SCC中表达最高(表1),组间差

异非常显著($F = 28.369$, $P < 0.01$).尤其是正常及异型增生组分别与不同分化SCC各组间差异显著($P < 0.05$).

2.2 CDK4基因表达 CDK4的表达随分化程度降低而逐渐增高,在正常上皮组中最低,在低分化SCC中最高(表1),组间差异非常显著($F = 9.016$, $P < 0.01$).特别是正常上皮组和异型增生组分别与中、低分化SCC组间,高分化与低分化SCC组间差异显著($P < 0.05$).

2.3 cyclin E基因表达 cyclin E表达在正常上皮中很低,异型增生上皮中有明显增高,而在不同分化SCC中的表达都较高(表1),组间差异非常显著($F = 22.667$, $P < 0.01$).尤其是正常和异型增生组分别与不同分化的SCC各组间差异显著($P < 0.05$).

2.4 p27Kip1基因表达 p27Kip1表达在不同分化组间的差异具有显著性($F = 5.783$, $P < 0.01$).其表达在正常上皮中最高,异型增生上皮中减少,而在不同分化SCC中的表达则随着分化程度的降低明显减少,在低分化SCC中表达最低(表1).cyclin D1、CDK4、cyclin E和p27Kip1表达趋势见图1.

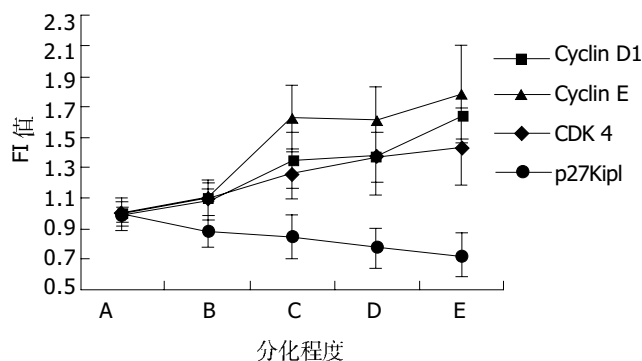


图1 细胞周期调节基因在食管鳞癌中的表达.

2.5 基因表达的相关性分析 对流式细胞仪检测结果进行的相关性分析显示, p27Kip1表达分别与cyclin D1、CDK4、cyclin E基因表达呈显著负相关(相关系数分别为 $r = -0.380$; $r = -0.242$; $r = -0.333$; $P < 0.05$).后3种基因表达之间呈显著正相关(cyclin D1与CDK4相关系数 $r = 0.711$, $P < 0.01$; cyclin D1与cyclin E相关系数 $r = 0.638$, $P < 0.01$; CDK4与cyclin E相关系数 $r = 0.430$, $P < 0.01$).

表1 食管鳞癌中细胞周期调节基因的表达(mean \pm SD)

分组	n	cyclin D1 FI	CDK4 FI	cyclin E FI	p27Kip1 FI
A 正常上皮	5	1.00 \pm 0.02 ^a	1.00 \pm 0.05 ^c	1.00 \pm 0.08 ^e	1.00 \pm 0.10
B 异型增生	10	1.08 \pm 0.12 ^a	1.10 \pm 0.12 ^c	1.11 \pm 0.05 ^e	0.89 \pm 0.10
C 高分化SCC	39	1.35 \pm 0.18	1.26 \pm 0.16	1.63 \pm 0.22	0.85 \pm 0.15
D 中分化SCC	18	1.37 \pm 0.16	1.37 \pm 0.24	1.61 \pm 0.22	0.78 \pm 0.13
E 低分化SCC	24	1.64 \pm 0.15	1.44 \pm 0.25	1.79 \pm 0.32	0.73 \pm 0.14 ^a

^a $P < 0.05$ vs C、D和E组; ^c $P < 0.05$ vs D组和E组; ^e $P < 0.05$ vs C、D和E组; ^a $P < 0.05$ vs A组.

3 讨论

在食管癌的形成及逐步演进过程中,可有多分子事件发生.其中可能有细胞周期调节基因的表达异常.细胞周期调节失控是肿瘤发生的重要机制之一.参与细胞周期调控的因子主要有:细胞周期蛋白(cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent-kinase, CDK)和CDK抑制因子(cyclin dependent-kinase inhibitor, CKI),其中CDK是调节细胞周期的核心成分.CKI通过与cyclin、CDK或cyclin-CDK复合物的结合,抑制CDK的活性,调节细胞周期进程.

cyclins是具有细胞周期特异性的一组蛋白.各型cyclin分别与不同的CDKs有特殊亲和力.cyclin D1所表达的蛋白在细胞周期中是G₁期细胞增殖信号的关键蛋白,可与CDK4构成cyclin D1/CDK4复合体,使Rb抑癌基因产物磷酸化而失活,从而使细胞进入周期.若cyclin D1或/和CDK4表达明显增加,cyclin D1/CDK4促细胞增殖活性大大增强,过多的细胞进入细胞周期,造成食管上皮的过度增殖以至癌变.有报道认为cyclin D1参与人体多种肿瘤的形成^[2].本研究通过对食管癌及癌前病变细胞中cyclin D1及CDK4蛋白表达的检测发现,随着食管上皮向癌的发展,蛋白表达明显增高,提示cyclin D1或/和CDK4基因蛋白过度表达参与食管上皮早期癌变的形成,可能是一个较好的早期诊断分子标志物.Kitahara *et al*^[3]认为cyclin D1, CDK4过度表达及p16基因缺失可能参与食管癌细胞的自主生长;另有报道^[4-5]认为, cyclin D1基因蛋白过度表达和/或p16蛋白表达缺失是食管SCC的预后指标.不同学者对cyclin D1基因蛋白在食管癌中的作用还不够一致^[6-9].进一步说明对食管癌前病变及食管癌进行cyclin D1研究的必要性.亚硝酸盐是中国食管癌高发区重要的致癌因素之一^[10]. Youssef *et al*^[11-12]对甲基苄基亚硝胺诱发的大鼠食管癌进行cyclin D1检测发现, cyclin D1过度表达,并证实食管癌变中cyclin D1过度表达发生在早期.

cyclin E是G₁期的另一个细胞周期蛋白,表达时间稍晚于cyclin D1,可与CDK2特异结合形成CDK2/cyclin E复合体,从而激活CDK2,促进细胞周期向前进展.但目前关于cyclin E在食管癌中的研究较少.本研究发现,cyclin E随食管上皮异型性增高其表达含量逐渐增高,在低分化SCC中表达最高,其表达与病理学分级密切相关.提示cyclin E基因蛋白在食管癌变中可能有重要作用. Anayama *et al*^[13]对食管癌中cyclin E等基因表达研究发现,其与临床病理参数无关. Matsumoto *et al*^[14]认为cyclin E和CDK2与肿瘤预后无明显关系. cyclin E在食管癌中有高表达,但是目前尚未确定cyclin E与食管癌临床病理参数之间的关系,有待进一步研究.

p27Kip1是一个重要的细胞周期抑制蛋白,属于CDK抑制因子(CKI),已在一些恶性肿瘤中作过研究,特别是乳癌、肺癌、膀胱癌和前列腺癌^[15]. p27Kip1基因

蛋白能广泛抑制各种cyclin和CDK的活性,但主要是抑制cyclin E-CDK2等G₁期激酶复合物,使细胞不能通过G₁期.我们发现, p27Kip1的表达在正常上皮中最高,在SCC中则随分化程度的降低其表达显著减少.提示p27Kip1表达降低参与食管SCC形成及进展.有研究认为p27Kip1缺失发生在早期癌变过程,在异型增生上皮表达减少,侵袭转移性强的癌更倾向于p27Kip1表达缺失^[15-16]. p27Kip1表达缺失可能与食管癌组织分化及患者预后较差有关^[16-18],可能是此病的一个独立预后指标^[18].但也有研究^[19]发现61%食管癌中有p27Kip1蛋白高表达,且与肿瘤浸润、淋巴结转移及患者预后较差有关.

因此,在食管SCC及癌前上皮中有cyclin D1、CDK4、cyclin E蛋白及p27Kip1蛋白等细胞周期调控蛋白表达的紊乱,促进细胞增殖的cyclin D1、cyclin E及CDK4表达异常增高,而负性调节基因p27Kip1表达显著减少.导致过多细胞进入细胞周期,细胞增殖活性增强以致癌变.而正常细胞周期的控制需要cyclins、CDK4和抑制蛋白之间的平衡^[20]. p27Kip1表达分别与cyclin D1、cyclin E及CDK4表达呈负相关,而后三者之间表达呈正相关,也说明细胞周期调节蛋白表达紊乱.对食管上皮癌前病变及食管癌中多种细胞周期相关基因分子标志的研究,将有助于揭示食管癌的早期癌变机制,提高食管癌的早期诊断水平.

4 参考文献

- 1 张林西,左连富,齐凤英,林培中,刘江惠,刘淑霞. 环氧化酶-2与p53在食管上皮癌变及鳞癌细胞中的表达. *肿瘤* 2003;23:111-114
- 2 Motokura T, Arnold A. Cyclin D and oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:5-10
- 3 Kitahara K, Yasui W, Yokozaki H, Semba S, Hamamoto T, Hisatsugu T, Tahara E. Expression of cyclin D1, CDK4 and p27KIP1 is associated with the p16MTS1 gene status in human esophageal carcinoma cell lines. *J Exp Ther Oncol* 1996;1:7-12
- 4 Itami A, Shimada Y, Watanabe G, Imamura M. Prognostic value of p27 (Kip1) and CyclinD1 expression in esophageal cancer. *Oncology* 1999;57:311-317
- 5 Takeuchi H, Ozawa S, Ando N, Shih CH, Koyanagi K, Ueda M, Kitajima M. Altered p16/MTS1/CDKN2 and cyclin D1/PRAD-1 gene expression is associated with the prognosis of squamous cell carcinoma of the esophagus. *Clin Cancer Res* 1997;3:2229-2236
- 6 Kunisaki C, Shimada H, Akiyama H, Nomura M, Matsuda G, Ono H. Prognostic factors in esophageal cancer. *Hepatogastroenterology* 2004;51:736-740
- 7 Wu MY, Zhuang CX, Yang HX, Liang YR. Expression of Egr-1, c-fos and cyclin D1 in esophageal cancer and its precursors: An immunohistochemical and in situ hybridization study. *World J Gastroenterol* 2004;10:476-480
- 8 Zuo LF, Lin PZ, Qi FY, Guo JW, Liu JH. Flow cytometric analysis of DNA, telomerase content and multi-gene expression in esophageal epithelial dysplasia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2409-2412
- 9 Guner D, Sturm I, Hemmati P, Hermann S, Hauptmann S, Wurm R, Budach V, Dorken B, Lorenz M, Daniel PT. Multigene analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis. *Int J Cancer* 2003;103:445-454

- 10 王东旭, 李伟. 食管癌病因学进展. 世界华人消化杂志 2000;8:1029-1030
- 11 Youssef EM, Hasuma T, Morishima Y, Takada N, Osugi H, Higashino M, Otani S, Fukushima S. Overexpression of cyclin D1 in rat esophageal carcinogenesis model. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:18-25
- 12 Wang QS, Sabourin CL, Wang H, Stoner GD. Overexpression of cyclin D1 and cyclin E in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1996;17:1583-1588
- 13 Anayama T, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Positive correlation between p27Kip1 expression and progression of human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998;79:439-443
- 14 Matsumoto M, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Comparison of deregulated expression of cyclin D1 and cyclin E with that of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK2 in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999;80:256-261
- 15 Chetty R. p27 Protein and cancers of the gastrointestinal tract and liver: an overview. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:23-27
- 16 Shibata H, Matsubara O, Wakiyama H, Tanaka S. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Pathol Res Pract* 2001;197:157-164
- 17 Yasunaga M, Tabira Y, Nakano K, Iida S, Ichimaru N, Nagamoto N, Sakaguchi T. Accelerated growth signals and low tumor-infiltrating lymphocyte levels predict poor outcome in T4 esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1634-1640
- 18 Shamma A, Doki Y, Tsujinaka T, Shiozaki H, Inoue M, Yano M, Kawanishi K, Monden M. Loss of p27 (KIP1) expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2000;58:152-158
- 19 Kagawa Y, Yoshida K, Hirai T, Toge T. Significance of the expression of p27Kip1 in esophageal squamous cell carcinomas. *Dis Esophagus* 2000;13:179-184
- 20 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-707

编辑 王谨晖 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

• 研究快报 •

成年猪胰岛分离纯化方法的改良

黄跃南, 郭欣, 田素礼, 吴德全, 单世光

黄跃南, 田素礼, 吴德全, 单世光, 哈尔滨医科大学附属二院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086
郭欣, 哈尔滨市中医医院外科 黑龙江省哈尔滨市 150076
通讯作者: 黄跃南, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 246 号, 哈尔滨医科大学附属二院普外科, dr-huangyuanan@163.com
电话: 0451-86605575
收稿日期: 2005-06-06 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 改良成年猪胰岛分离纯化技术, 以优化胰岛制备方法。

方法: 采用体、尾部区段猪胰腺胰管内灌注复合胶原酶震荡消化(胶原酶 V+DNA 酶)和改进的 Dextran 不连续密度梯度离心法分离纯化猪胰岛, 并进行生物学活性测定和形态学观察。

结果: 胰腺被消化组织平均 15 ± 3.4 g, 消化后胰岛获得量 4130 ± 976 IE/g 胰腺组织, 纯化后胰岛获得量为 2320 ± 669 IE/g 胰腺组织, 胰岛纯度 80% 左右。胰岛素释放试验结果显示分离纯化后胰岛功能良好。病理切片, HE 染色显示细胞团结构完整, 细胞核清晰可见, 胞质丰富。

结论: 经本方法分离纯化获得的猪胰岛具有较高的产量和纯度、结构完整、功能良好, 可满足大动物移植实验和临床移植的需要。

黄跃南, 郭欣, 田素礼, 吴德全, 单世光. 成年猪胰岛分离纯化方法的改良. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1912-1914
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1912.asp>

0 引言

异种胰岛移植是近年来应用胰岛移植治疗胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)的一个研究热点, 同种移植^[1]和干细胞移植^[2]有其较多的局限性, 而猪就成为最有希望的临床异种胰岛移植的动物供体。成年猪的胰岛缺少完整的包膜环绕, 分离和纯化过程较为复杂, 胰岛结构和功能完整性极易在此过程中被破坏, 因此需进一步研究和改进成年猪胰岛分离纯化技术, 以获得足量结构完整、功能良好的胰岛细胞, 从而满足大动物移植实验和临床移植的需要。本研究旨在探讨和改良成年猪胰岛分离纯化技术^[3-4], 以优化胰岛制备方法。

1 材料和方法

1.1 材料 成年杂种猪, 猪龄 12 mo, 体质量 150 kg 左右, 由哈尔滨市肉联厂提供。猪被屠宰放血后, 在相对无菌条件下迅速取出胰腺, 保存于 4℃ Hanks 液中送至实验

- 10 王东旭, 李伟. 食管癌病因学进展. 世界华人消化杂志 2000;8:1029-1030
- 11 Youssef EM, Hasuma T, Morishima Y, Takada N, Osugi H, Higashino M, Otani S, Fukushima S. Overexpression of cyclin D1 in rat esophageal carcinogenesis model. *Jpn J Cancer Res* 1997;88:18-25
- 12 Wang QS, Sabourin CL, Wang H, Stoner GD. Overexpression of cyclin D1 and cyclin E in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1996;17:1583-1588
- 13 Anayama T, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Positive correlation between p27Kip1 expression and progression of human esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 1998;79:439-443
- 14 Matsumoto M, Furihata M, Ishikawa T, Ohtsuki Y, Ogoshi S. Comparison of deregulated expression of cyclin D1 and cyclin E with that of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and CDK2 in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1999;80:256-261
- 15 Chetty R. p27 Protein and cancers of the gastrointestinal tract and liver: an overview. *J Clin Gastroenterol* 2003;37:23-27
- 16 Shibata H, Matsubara O, Wakiyama H, Tanaka S. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Pathol Res Pract* 2001;197:157-164
- 17 Yasunaga M, Tabira Y, Nakano K, Iida S, Ichimaru N, Nagamoto N, Sakaguchi T. Accelerated growth signals and low tumor-infiltrating lymphocyte levels predict poor outcome in T4 esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1634-1640
- 18 Shamma A, Doki Y, Tsujinaka T, Shiozaki H, Inoue M, Yano M, Kawanishi K, Monden M. Loss of p27 (KIP1) expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2000;58:152-158
- 19 Kagawa Y, Yoshida K, Hirai T, Toge T. Significance of the expression of p27Kip1 in esophageal squamous cell carcinomas. *Dis Esophagus* 2000;13:179-184
- 20 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-707

编辑 王谨晖 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

• 研究快报 •

成年猪胰岛分离纯化方法的改良

黄跃南, 郭欣, 田素礼, 吴德全, 单世光

黄跃南, 田素礼, 吴德全, 单世光, 哈尔滨医科大学附属二院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086
郭欣, 哈尔滨市中医医院外科 黑龙江省哈尔滨市 150076
通讯作者: 黄跃南, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 246 号, 哈尔滨医科大学附属二院普外三科, dr-huangyuanan@163.com
电话: 0451-86605575
收稿日期: 2005-06-06 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 改良成年猪胰岛分离纯化技术, 以优化胰岛制备方法。

方法: 采用体、尾部区段猪胰腺胰管内灌注复合胶原酶震荡消化(胶原酶 V+DNA 酶)和改进的 Dextran 不连续密度梯度离心法分离纯化猪胰岛, 并进行生物学活性测定和形态学观察。

结果: 胰腺被消化组织平均 15 ± 3.4 g, 消化后胰岛获得量 4130 ± 976 IE/g 胰腺组织, 纯化后胰岛获得量为 2320 ± 669 IE/g 胰腺组织, 胰岛纯度 80% 左右。胰岛素释放试验结果显示分离纯化后胰岛功能良好。病理切片, HE 染色显示细胞团结构完整, 细胞核清晰可见, 胞质丰富。

结论: 经本方法分离纯化获得的猪胰岛具有较高的产量和纯度、结构完整、功能良好, 可满足大动物移植实验和临床移植的需要。

黄跃南, 郭欣, 田素礼, 吴德全, 单世光. 成年猪胰岛分离纯化方法的改良. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1912-1914
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1912.asp>

0 引言

异种胰岛移植是近年来应用胰岛移植治疗胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)的一个研究热点, 同种移植^[1]和干细胞移植^[2]有其较多的局限性, 而猪就成为最有希望的临床异种胰岛移植的动物供体。成年猪的胰岛缺少完整的包膜环绕, 分离和纯化过程较为复杂, 胰岛结构和功能完整性极易在此过程中被破坏, 因此需进一步研究和改进成年猪胰岛分离纯化技术, 以获得足量结构完整、功能良好的胰岛细胞, 从而满足大动物移植实验和临床移植的需要。本研究旨在探讨和改良成年猪胰岛分离纯化技术^[3-4], 以优化胰岛制备方法。

1 材料和方法

1.1 材料 成年杂种猪, 猪龄 12 mo, 体质量 150 kg 左右, 由哈尔滨市肉联厂提供。猪被屠宰放血后, 在相对无菌条件下迅速取出胰腺, 保存于 4℃ Hanks 液中送至实验

室,热缺血时间少于10 min,冷缺血时间少于90 min. 胶原酶V, 512 kut/mg (Sigma 公司), DNA 酶(包头生物制剂公司), 胎牛血清(Gibco 公司), RPMI1640 培养液(Gibco 公司), Dextran (Pharmacia 公司), Hanks 平衡盐溶液(Gibco 公司).

1.2 方法

1.2.1 胰岛分离^[5] 胰腺取回后,置于超净工作台上,快速去除胰周组织、脂肪、血管及外科被膜,保留固有被膜.从胰头、胰体交界部横断胰腺,找到主胰管^[6],用20 G 套管针插入,缝合线结扎,尾部远端亦结扎切断^[7],每次均取约15-20 g 组织,注入4℃含Ca²⁺ Hanks 液配制的复合胶原酶溶液(1.5 g/L,内含DNA 酶0.3 g/L),注入量 = 胰质量×2,注射速度7 mL/min,3-4 min 内完成,置入玻璃容器内,在38.5±0.1℃水浴中震荡消化,震速100 r/min,在消化过程中间断加入0.1 mmol/L 的NaOH,使消化液pH 值尽可能维持在7.8左右,从消化20 min 开始每间隔4 min 取样一次,双硫腺染色镜检,当胰腺组织被消化裂解成细沙状,镜检见大部分结构完整的胰岛从外分泌组织中脱落出来,立即用4℃冷Hanks 液(含100 mL/L 胎牛血清)终止消化,充分混匀后,用40 目钢网过滤,收集消化后组织,4℃离心洗涤2次,去除脂肪等杂质细胞,取样镜检计数和观察消化后胰岛分离情况.

1.2.2 胰岛纯化 用Dextran 配制成密度为1.037, 1.054, 1.070, 1.096, 1.11 kg/L 的不连续密度梯度液,依次将不连续密度梯度液各10 mL 加入50 mL 离心管中,最后将洗涤后的消化组织每0.5 mL 与1.037 kg/L 密度梯度液10 mL 混匀,小心移至离心管中液体上层,形成不连续密度梯度.将2-4 个离心管置入低温离心机中,先800 r/min 离心5 min,然后2 500 r/min 离心15 min,离心后在1.096-1.054 kg/L 之间收集纯化的胰岛,4℃离心洗涤2次.分别取样镜检计数,估计纯度和行生物学活性及组织学鉴定.

1.2.3 胰岛计数和纯度测定^[8] 分离纯化后的组织悬液用双硫腺(双硫腺10 mg,无水乙醇3 mL,250 g/L 氨水50 μL)进行染色,光镜下胰岛细胞团染成腥红色或红色,外分泌组织不着色,呈圆形、椭圆形或不规则形.在显微镜下计数直径≥50 μm 的胰岛算出每克胰腺组织分离的胰岛当量数,纯度用内、外分泌组织量的比值来估计.

1.2.4 胰岛生物学活性鉴定 将纯化后胰岛细胞悬液放置在显微镜下,用巴氏吸管吸取胰岛放入培养板中,每10个胰岛当量(每1个胰岛当量相当于直径150 μm 的胰岛细胞团,IE)的成年猪胰岛(APIs)置入一个培养孔,6孔为1组,共4组.每组分别置入无糖培养基、含5.6 mmol/L 葡萄糖(低糖)、16.7 mmol/L 葡萄糖(高糖)、16.7 mmol/L 葡萄糖+10 mmol/L 茶碱(高糖+茶碱)的RPMI1640 培养液中,置于37℃、含50 mL/L CO₂ 的培养箱中孵育4 h,收集培养液,用胰岛素放免试剂盒(中科院原子能研究所)测定胰岛素含量.

1.2.5 胰岛组织学检查 离心纯化后胰岛细胞悬液,收集胰岛组织,用无水酒精固定,石蜡包埋切片,HE 染色检查胰岛组织结构完整性.

统计学处理 所得数据以mean ± SD 表示,组间均数差异用 *t* 检验比较, *P* < 0.05 为有差异.

2 结果

2.1 分离纯化后的胰岛产量和纯度 18只成年杂种猪胰腺被消化组织平均15 ± 3.4 g,消化后胰岛获得量4 130 ± 976 IE/g 胰腺组织.纯化后胰岛获得量为2 320 ± 669 IE/g 胰腺组织,胰岛纯化后纯度80%左右,进一步于检检出外分泌组织后可达95%以上.

2.2 胰岛形态学观察 消化后猪胰岛经双硫腺染色后,在倒置显微镜下可见大量圆形、椭圆形或不规则形红色或腥红色细胞团,透明度较好,触之易碎,包膜不明显,也有散在单个染色细胞.外分泌组织不着色,透明度差,二者容易区分.纯化后胰岛直径比消化后减小,多呈圆形或椭圆形,直径多在50-200 μm 之间,散在的单个细胞数量亦增多.

2.3 胰岛素释放试验 胰岛素释放试验结果显示,猪胰岛在高糖加茶碱刺激条件下胰岛素释放量为805.7 ± 55.7 mIU/(L·20IE),在高糖刺激条件下为472.7 ± 102.3 mIU/(L·20IE),在低糖刺激条件下为314.2 ± 34.45 mIU/(L·20IE),而无糖对照组胰岛素释放量为143.2 ± 87.5 mIU/(L·20IE);在高糖加茶碱刺激条件下胰岛素释放量为低糖组的1.51倍和2.56倍,为对照组的3.31倍和5.63倍.统计学均有显著性差异(*P* < 0.01),提示分离纯化后胰岛功能良好.

2.4 胰岛组织学检查 纯化后胰岛组织石蜡切片HE染色显示细胞团结构完整,细胞核清晰可见,胞质丰富.

3 讨论

由于供体来源困难,猪胰岛作为异种组织供体来源受到重视,因为猪胰岛素多年来用于治疗人类糖尿病患者,与人胰岛素结构相似,仅有一个氨基酸不同,特别从1990 年以来,使用猪胰岛进行异种移植的研究已成为热门课题之一.猪胰岛的分离和纯化比较困难,主要有以下几个方面^[9]: (1)成年猪胰腺结构复杂,结缔组织较多,内分泌腺与外分泌腺关联紧密,胰岛周围缺乏基质,因此很难分离. (2)猪胰岛周围缺乏被膜保护,这样就使猪胰岛在分离过程中非常脆弱,极易溶解破碎. (3)猪的胰腺结构较复杂,猪胰管寻找比较困难,成功插管是进行胰岛分离纯化的前提条件. (4)猪的品系、年龄及冷热缺血时间均是影响胰岛产量的主要因素.猪胰岛细胞外基质主要成分为胶原I、III、IV 和Laminin、Fibronectin,因此选用胶原酶V 和DNA 酶混和^[10]进行消化,可以建立起可靠、可重复的胰岛分离方法.我们采用了胶原酶V (1.5 g/L,含一

定量的酪蛋白酶、纤维蛋白酶)和DNA酶(0.3 g/L)混合震荡消化法,每次实验均取胰体尾部15 g左右组织进行区段性灌注消化分离胰岛,此种改进使实验有所简便,又节约大量资金,取得了较好的实验效果。

在本实验中发现热缺血时间和猪的年龄对胰岛分离纯化结果产生明显影响。热缺血时间越长,分离获得结构完整的胰岛越少,胰岛多裂解成单个细胞。若时间超过15 min以上则很难获得足量结构完整、功能良好的胰岛细胞团。大于10月龄的成年猪分离获得胰岛结构更完整,以圆形胰岛为多,胰岛素释放试验显示功能良好,这可能与成年猪随年龄增长胰腺中圆形胰岛增加有关,同其他形态胰岛相比,圆形胰岛在物理机械作用下更不易破碎。

实验中恒温水浴箱温度^[11]设为38.5℃并取部分而不是全部胰腺组织进行消化,可以使被消化组织温度从4℃迅速升至胶原酶进行有效消化的最适温度,并使胰腺组织被均匀消化。在消化过程中使用含7.5 mmol/L Ca^{2+} 的胶原酶溶液和不断加入碱性溶液(0.1 mmol/L 氢氧化钠溶液)以对抗不断酸化的消化液,使其PH值尽可能维持在一定范围(7.8±0.1),可以明显减少胶原产生和使胶原酶达到最佳活性,提高消化效果。在消化结束后迅速用冷Hanks终止消化,防止胶原酶过度消化,保证消化下来的大量胰岛细胞团结构和功能免受破坏。猪胰岛的分离和纯化比较困难,成年猪胰腺结构复杂,结缔组织较多,胰岛周围缺乏被膜保护,猪的品系、年龄及冷热缺血时间消化过程中胶原的产生均是影响产量的主要因素^[12]。通过对温度的迅速调控、使用含钙胶原酶和碱性溶液维持消化液pH值在一定范围之内以及对消化时间的适时控制,消化后所得的胰岛产量有明显提高,胶原的产生明显减少。与国内外同类研究相比较^[13-14],处于较高水平。

纯化过程中,本实验改进了将消化后胰岛组织悬液和最高密度梯度液混合离心纯化的传统方法^[15],采用最低密度梯度液和消化后胰岛组织悬液均匀混合离心纯化。此种改进有以下优点:(1)低密度Dextran液黏稠度低,易于和胰岛细胞悬液均匀混合。(2)在混合过程中胰岛细胞分散好,不易破碎,有利于保持其完整性。(3)在离心过程中,密度高的外分泌组织首先离心沉淀下去,不会出现传统方法因细胞堆积使密度低的胰岛细胞被密度较高的外分泌组织挤压住,无法离心上去的现象,使纯化更充分、更有效。

改良后的方法所得胰岛具有较高的产量和纯度、结构完整、功能良好,可满足大动物移植实验和临床移植的需要。本实验室将此种方法作为标准的猪胰岛分离纯化

的实验方法进行推广,已获得更多的实验数据验证此方法的有效性和可靠性,为进一步实现临床异种胰岛移植奠定了坚实的基础。

4 参考文献

- 1 Matsumoto S, Tanaka K, Strong DM, Reems JA. Efficacy of human islet isolation from the tail section of the pancreas for the possibility of living donor islet transplantation. *Transplantation* 2004;78:839-843
- 2 Trivedi N, Hollister-Lock J, Lopez-Avalos MD, O'Neil JJ, Keegan M, Bonner-Weir S, Weir GC. Increase in beta-cell mass in transplanted porcine neonatal pancreatic cell clusters is due to proliferation of beta-cells and differentiation of duct cells. *Endocrinology* 2001;142:2115-2122
- 3 O'Neil JJ, Stegmann JP, Nicholson DT, Gagnon KA, Solomon BA, Mullen CJ. The isolation and function of porcine islets from market weight pigs. *Cell Transplantation* 2001;10:235-246
- 4 Swanson CJ, Olack BJ, Goodnight D, Zhang L, Mohanakumar T. Improved methods for the isolation and purification of porcine islets. *Hum Immunol* 2001;62:739-749
- 5 黄跃南,田素礼,郭欣,吴德全,单世光,齐忠全. 异种胰岛移植联合应用免疫抑制剂FK506和LEF的实验研究. *世界华人消化杂志* 2004;12:1868-1871
- 6 van der Vliet JA, Meloche RM, Field MJ, Chen DJ, Kaufman DB, Sutherland DE. Pancreatic islet isolation in rats with ductal collagenase distention, stationary digestion, and dextran separation. *Transplantation* 1988;45:493-495
- 7 Sutton R, Peter M, McShane P, Gray DW, Morris PJ. Isolation of rat pancreatic islets by ductal injection of collagenase. *Transplantation* 1986;42:689-691
- 8 Krickhahn M, Meyer T, Buhler C, Thiehe A, Ulrichs K. Highly efficient isolation of porcine islets of langerhans for xenotransplantation: numbers, purity, yield and in vitro function. *Ann Transplant* 2001;6:48-54
- 9 Bugliani M, Lupi R, Del Guerra S, Boggi U, Marselli L, Sbrana S, Vistoli F, Torri S, Del Chiaro M, Signori S, Filipponi F, Del Prato S, Campa M, Corsini V, Campatelli A, Di Candio F, Mosca F, Marchetti P. An alternative and simple method to consistently prepare viable isolated human islets for clinical transplantation. *Transplant Proc* 2004;36:605-606
- 10 贺德,詹文华,蔡世荣,陈创奇,汪建平,兰平. 三种消化酶在犬鼠胰岛分离纯化中的效果比较. *中华实验外科杂志* 2003;20:434-435
- 11 张雷,吴德全,孙岩,单世光. 大鼠胰岛分离的影响因素. *中华内分泌代谢杂志* 2002;18:491-492
- 12 Nielsen TB, Yderstraede KB, Beck-Nielsen H. Isolation, transplantation, and functional studies of adult porcine islets of Langerhans. *Comp Med* 2002;52:127-135
- 13 Kerr-Conte J, Pattou F, Hober C, Ple A, Riquier M, Proye C, Lefebvre J. Induction of cerebral death in slaughterhouse pigs facilitates pancreas harvesting for islet isolation. *Transplant Proc* 1994;26:614-615
- 14 Nano R, Clissi B, Melzi R, Calori G, Maffi P, Antonioli B, Marzorati S, Aldrighetti L, Freschi M, Grochowicki T, Socci C, Secchi A, Di Carlo V, Bonifacio E, Bertuzzi F. Islet isolation for allotransplantation: variables associated with successful islet yield and graft function. *Diabetologia* 2005;48:906-912
- 15 陈创奇,詹文华,汪建平,蔡世荣,兰平,吴小剑,贺德. 多种分离纯化大鼠胰岛细胞的实验方法比较. *中山医科大学学报* 2002;23:118-120

编辑 王谨晖 审读 张海宁

和胃冲剂2号对运动障碍型功能性消化不良患者胃肠动力的作用

张宁, 孙军, 王秀杰, 李岩

张宁, 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
孙军, 锦州市中心医院消化内科 辽宁省锦州市 121004
王秀杰, 沈阳市第五人民医院消化内科 辽宁省沈阳市 110023
通讯作者: 李岩, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学
附属第二医院消化内科, liyan99@medmail.com
电话: 024-83956986
收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 观察和胃冲剂2号(暂命名, 由砂仁、鸡内金、神曲、麦芽组成)对运动障碍型功能性消化不良(FD)患者胃肠动力作用, 以期开发出一种新型的促胃动力中药。

方法: 对运动障碍型功能性消化不良患者询问消化不良症状, 采用一次口服不透X线标记物于5 h、72 h拍摄腹平片的方法, 比较用药前后胃肠残留标记物的数目, 同时做胃电节律检查, 通过用药前后上述指标的变化评价药物的疗效。

结果: 运动障碍型功能型消化不良患者餐后正常胃电百分比减少($33.03 \pm 14.35\%$), 5 h胃钡条排空率($6.58 \pm 2.69\%$)明显低于对照组($94 \pm 8.06\%$, $P < 0.01$), 服用和胃冲剂2号后患者腹胀、早饱、暖气等症状有明显改善, 胃排空率明显增加($32.26 \pm 12.57\%$, $P < 0.05$), 餐后胃电正常百分比增加($53.37 \pm 10.98\%$, $P < 0.05$), 与西沙比利组无明显差异($P > 0.05$);对患者肠运动功能治疗前($70.36 \pm 15.28\%$)与治疗前后($68.24 \pm 25.20\%$)无明显差异($P > 0.05$)。

结论: 和胃冲剂2号可以改善运动障碍型功能型FD患者症状, 调节胃电节律, 增加胃正常慢波百分比, 有效地促进FD患者的胃排空功能, 对肠排空功能无明显影响, 是一种有效的促胃动力中药。

张宁, 孙军, 王秀杰, 李岩. 和胃冲剂2号对运动障碍型功能性消化不良患者胃肠动力的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1915-1918
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1915.asp>

0 引言

运动障碍样功能型消化不良是功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)中最为常见的一种类型, 通常存在胃排空延迟和胃运动节律紊乱^[1-2]. 中国医药总结出一些针对该症的治疗经验方剂, 但其疗效的评价多为基于主观症状的改善与否, 缺乏同等条件下具有客观指标的科学评价. 在以往的研究中, 我们观察了各种健脾消食行气中药对小鼠胃肠动力的影响, 发现砂仁、鸡内金、神曲、麦芽合剂有明显增强小鼠和FD患者胃肠动力的作用^[3-5], 用含不同品种砂仁挥发油的此合剂进行动物实验, 发现含阳春砂挥发油和胃冲剂效果最佳^[6]. 本研究在

此基础上对和胃冲剂的剂型进行了改进, 将组方中原有的砂仁以阳春砂挥发油替代, 即和胃冲剂2号, 采用现代科学方法, 观察和胃冲剂2号对运动障碍型FD患者胃肠排空功能、胃电节律及症状的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 中药及制剂 阳春砂、鸡内金、神曲、麦芽购于沈阳市药材采购供应站. 鸡内金、神曲、麦芽采用水提法进行制备, 与中国医药传统水煎法相一致, 浸煎后真空干燥, 制成浸膏由干燥袋封存. 阳春砂以CO₂超临界流体萃取法(supercritical fluid extraction, SFE)^[7]提取挥发油(压力25 000 kpa, 温度55℃, 流速50 kg/h), 所得挥发油与干燥后的三味药混匀, 低温干燥装袋。

1.1.2 病例 均来自中国医科大学附属二院消化门诊, 选择FD患者35例, 其中男6例, 女29例, 平均年龄39 ± 12.5岁. 以罗马II标准诊断FD^[8], 以胃排空时间超过正常对照组+2标准差者为运动障碍型FD, 并将其作为入选病例, 其中20例为和胃冲剂2号治疗组, 15例为西沙比利阳性对照组. 同时选择无消化不良症状健康志愿者15名作为阴性对照, 三组年龄在18-65岁, 年龄、性别构成均等. 实验前1 wk停用影响本实验的抗胆碱能药物、解痉剂、催吐剂、H₂受体拮抗剂、质子泵抑制剂、局部麻醉药等影响消化道功能的药物。

1.1.3 标记物 每粒胶囊含不透X线标记物(radiopaque markers, ROM)0.1 mm × 0.3 mm 小钡条20枚(北京航空航天研究所提供)。

1.1.4 主要仪器 DY168-50-05超临界萃取装置(东宇天然药物研究院提供), 便携式双电极EGG记录仪(瑞典CTD-Synectics公司生产)及胃电图软件分析系统Version6.40版, 中药浸煎及干燥设备, DAR-3000 数字胃肠机(日本SHIMADU生产)。

1.2 方法

1.2.1 主要症状的记录与评价 对入选病例询问上述消化不良症状, 并以下列标准计分^[9]: 0级: 无症状, 积0分; I级: 轻度, 症状轻微, 不影响日常生活, 积1分; II级: 中度, 经常存在症状, 部分影响日常生活, 积2分; III级: 重度, 持续存在症状, 严重影响日常生活, 难以坚持工作, 积3分。

1.2.2 胃排空功能和肠排空功能的测定^[10] 所有受试者采用一次口服不透X线标记物拍摄腹平片的方法, 方法为受试者将标准试餐(方便面110 g, 火腿肠60 g, 水400 mL)在10 min内服完, 并于餐中分4-5次服下20枚不透X

表1 运动障碍型FD患者药物治疗前后症状积分

		疼痛	腹胀	早饱	反酸	暖气	恶心	呕吐	总分
治疗组 (n = 20)	治疗前	2.23	2.35	1.65	1.16	1.42	0.22	0.20	9.72
	治疗后	1.26 ^a	1.13 ^a	0.55 ^a	0.97	0.45 ^a	0.16	0.16	4.48 ^a
	缓解率 %	43.50	51.91	66.67	16.38	68.31	27.27	20.00	53.91
阳性 对照组 (n = 15)	治疗前	2.12	2.05	1.56	0.98	1.38	0.32	0.26	8.97
	治疗后	1.23 ^a	1.06 ^a	0.62 ^a	0.45 ^a	0.38 ^a	0.25	0.19	4.18 ^a
	缓解率	41.98	48.29	60.27	54.08	72.46	21.88	26.92	53.40

^aP<0.05 vs 治疗前.

线标记物,不可嚼碎.于餐后5 h、72 h各透视并拍摄腹平片一张,5 h透视时同时口服200 g/L稀钡溶液20 mL以确定胃内钡条排空情况,统计胃肠内不透X线标记物残留数,计算排空率,排空率 = (20 - 胃或肠内残留钡条数)/20 × 100%,检测用药前后胃排空率及肠排空率的大小,并进行比较.

1.2.3 胃电图检查^[11-13] 受试者空腹接受EGG记录,将一对双电极置于腹部胃体、胃窦的体表投影标准位置(双电极置于脐与剑突连线中点旁开45°、左、右侧离正中线分别为2 cm和3 cm),并置参考电极,和以上双电极成等腰三角形.进行餐前30 min和餐后30 min的EGG检查.

1.2.4 给药方法 上述检查完成后,其中20例给予和胃冲剂2号1袋/次,3次/d餐前30 min口服.另15例给予西沙比利5 mg/次,3次/d口服作为阳性对照.两组均于2 wk后重复以上各项检查过程,分别将二组间及各组自身服药前后胃肠排空、胃电节律紊乱和症状的改善率进行对比.

统计学处理 数据以mean ± SD表示,采用SPSS统计软件进行检验,P<0.05为差异有显著性.

2 结果

2.1 两组治疗前和治疗后各临床症状积分改善程度的比较 治疗组和阳性对照组用药后各种症状均有减轻或缓解,治疗组除反酸、恶心和呕吐,对照组除恶心、呕吐外,均有统计学意义(表1).

表2 运动障碍型FD患者药物治疗前后胃肠排空率比较(mean ± SD)

		胃排空率(5 h)	肠排空率(72 h)
阴性对照组(n = 15)		94.00 ± 8.06	92.00 ± 9.78
FD组(n = 45)		6.67 ± 11.18 ^b	69.38 ± 21.26 ^a
治疗组 (n = 30)	治疗前	6.58 ± 2.69	70.36 ± 15.28
	治疗后	32.26 ± 12.57 ^c	68.24 ± 25.20
阳性对照组 (n = 15)	治疗前	6.76 ± 7.56	68.33 ± 12.57
	治疗后	36.23 ± 15.98 ^c	82.58 ± 10.26 ^c

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 阴性对照组; ^cP<0.05 vs 治疗前.

2.2 胃排空功能和肠排空功能的测定 运动障碍型FD组餐后钡条胃肠排空率明显低于阴性对照组;经和胃冲剂2号治疗后,患者胃排空率明显提高(P<0.05),其效果与西沙比利相似,但肠排空率无明显变化(表2).

2.3 用和胃冲剂2号治疗前后胃电图检查结果比较 运动障碍型FD患者治疗前餐前及餐后正常胃电慢波百分比均较低,尤以餐后降低明显.治疗后餐后正常胃电慢波百分比升高,餐后主频不稳定系数明显低于治疗前(表3).

表3 运动障碍型FD患者服用和胃冲剂2号治疗前后胃电图比较(mean ± SD)

		治疗前	治疗后
餐前	正常节律百分比(%)	50.43 ± 12.56	40.75 ± 12.47
	胃动过缓率(%)	40.07 ± 13.98	52.67 ± 16.82
	胃动过速率(%)	0.99 ± 2.61	3.95 ± 7.90 ^a
	主频率(cpm)	1.67 ± 1.39	1.58 ± 1.26
	主频不稳定系数(%)	70.43 ± 17.77	74.5 ± 13.81
餐后	正常节律百分比(%)	33.03 ± 14.35 ^c	53.37 ± 10.98 ^a
	胃动过缓率(%)	64.67 ± 14.21 ^c	42.15 ± 19.82 ^a
	胃动过速率(%)	2.31 ± 0.23	4.45 ± 1.56 ^a
	主频率(cpm)	0.37 ± 0.21	1.05 ± 0.34
	主频不稳定系数(%)	86.20 ± 21.71	62.53 ± 17.39 ^a

^aP<0.05 vs 治疗前; ^cP<0.05 vs 餐前.

3 讨论

功能性消化不良(FD)为一种常见的消化系统疾病,其发病率为20-40%^[1],其中48.3%有胃排空障碍^[2],该类疾病称为运动障碍型FD,其发病机制虽尚未十分明了,但主要与血中可促进胃动力的胃动素水平低下及依赖于其所产生的与胃收缩紧密相关的移行性运动综合肌电(MMC) III相缺如有关^[14].

目前测定胃排空的方法很多,核素扫描被公认为是“金标准”,但因费用昂贵限制其使用.有报道^[15]认为用ROM法测定固体胃排空结果与核素扫描非常接近,是一种简单可靠的胃排空检测方法.小钡条由无毒的胶剂和硫酸钡制成,柔软有弹性,和腹腔脏器对比性好,X光

很容易找到,且直径1 mm长3 mm钡条基本符合胃肠的生理排空条件,将胃肠动力测定量化,易于评估对比^[16]。另有报道^[17],餐后5 h胃排空异常者,6 h时再透视观察胃内钡条潴留数,结果与5 h时相符,提示5 h时胃排空率完全可反应患者的胃排空情况;结肠传输试验是国内、外常用的检查结肠动力的客观手段^[18-19],于72 h拍腹部平片的方法能初步判断结肠动力障碍类型。因此,本实验简单、易行,与传统X线法相比,操作时间少,又不必多次X线检查,更方便、经济,适合基层医院推广应用。

胃电图描记法是一种通过腹部放置体表电极来检测胃肌电活动的非侵入性检查,不仅可以反映胃肌电活动,也可预测胃排空,是一个较好的检测工具。其主要参数是波幅和主频,波幅与胃的收缩有关,餐后波幅的增高是胃收缩和胃扩张共同作用的结果,因波幅绝对值受很多因素的影响,故意义不大^[11];而主频是指功率谱最大的频率,反映胃的慢节律。正常人胃电频率约为3次/min,变动范围为2.4-3.73次/min,正常胃电慢波百分比是指胃电频率在此范围内的百分比,是胃电图中较重要的参数,正常值应该在65%以上。胃电节律紊乱包括胃动过速、胃动过缓和节律紊乱。胃动过速与胃的低动力有关,胃动过缓可能源自正常或异常的起搏点,其与胃动力的关系目前还不十分清楚^[12-14]。Chen *et al*^[20]对胃轻瘫患者同时进行EGG和胃排空检查,结果显示胃排空延缓的患者正常慢波节律百分比降低,餐后EGG功率的增加明显减少,认为异常的EGG能预示延迟的胃排空,而正常的EGG不一定有正常的胃排空,因为电机械偶联异常,胃排空有可能异常。

在FD的治疗方面,目前促胃肠动力药有多种,红霉素能直接作用于消化道平滑肌膜上的胃动素受体,并可诱发MMC,从而增强胃动力^[21],但该药有致恶心、呕吐和痉挛性腹痛等副作用,易产生耐药性,且其本身是抗生素,故目前尚未作为该病的临床治疗药物;另有人认为该病的发病与迷走神经张力减低有关,西药常用西沙比利通过激动肠壁5-羟色胺(5-HT₄)受体刺激肠肌间神经丛中乙酰胆碱的生理性释放而增进胃动力,但有报道^[22]西沙比利对心脏有较明显的副作用,可致Q-T间期延长、尖端扭转室速等致死性心律失常,美国等已全面停止使用该药;另外,尚有通过拮抗多巴胺受体而增加胃动力的多潘利酮,但临床观察该药亦有对部分该类患者作用不明显或用药一段时间后疗效减低等问题,故开发出一种新的既可增强胃动力同时又可改善临床症状的药物是十分必要的。

本研究中,和胃冲剂2号为阳春砂、鸡内金、神曲、麦芽所组成,阳春砂具有行气调中,和胃醒脾功效,阳春砂中挥发油主要成分为乙酸龙脑酯,可缓解腹胀、胃痛和呕吐。李岩 *et al*^[23]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。进而又证实了阳春砂、鸡内金、神曲、麦芽合煎剂有明显增强小鼠胃肠动力的作用^[3]。鸡内金含胃激素,具有消积滞,健脾胃的功效,还含有胃蛋白酶和淀粉酶,可增强消化作用。药理研究^[24]

证明,人口服鸡内金后胃液分泌量、酸度及消化力均增高,而且促使胃运动期延长、蠕动波增强及胃排空加快。神曲为酵母制剂,含有维生素B复合体、酶类等,可通过氧化供能,促进人体对蛋白的消化^[25]。麦芽主要含淀粉酶,多用于食欲不振、消化不良等症,是传统健胃消食药。以上四味中药,以阳春砂行气调中、和胃醒脾为主,鸡内金健脾胃、消积滞为辅,神曲、麦芽消食和胃为佐使,四味药伍用有健脾和胃、消食下气之功。张庆芳 *et al*^[6]用营养性半固体糊灌胃法观察含阳春砂、绿壳砂、缩砂挥发油的和胃冲剂对健康小鼠胃肠运动的影响,发现三种冲剂均能促进胃肠排空功能,含阳春砂挥发油的和胃冲剂作用优于另两种,并能改善L-精氨酸引起的胃肠运动障碍,升高血浆胃动素水平,毒理实验无急性毒副作用;孙思予 *et al*^[4]用胃窦面积B超测试法就和胃冲剂对31例动力障碍性功能性消化不良患者胃排空的影响进行了观察,结果表明,该冲剂有明显增进该类患者胃排空功能及改善临床症状的作用,并与其促进血中内源性胃动素释放有关。

近来,我们在以往研究的基础上对和胃冲剂的剂型进行了改进,将阳春砂用CO₂超临界萃取法提取挥发油,因为CO₂具有临界温度低,临界压力低,化学惰性,无毒性,价廉易得等特点,是萃取天然物质最理想的溶剂^[7]。应用此技术,无有机溶剂残留,而且提取率也比传统的蒸馏提取法高许多。此剂型具有发挥药效迅速、无毒、安全的特点,使疗效得到进一步的提高,可以明显改善FD患者腹胀、早饱、嗝气等症状,调节患者的胃电节律,增加餐后正常胃电百分比,促进FD患者的胃排空,与西沙比利无显著性差异。

“和胃冲剂2号”其组成药味药源广泛,价格低廉,加之有适应证明确、使用安全、疗效稳定的优点,因此,一旦开发成功将获得很大的社会、经济效益,具有广泛的推广应用前景。

4 参考文献

- 1 柯美云. 功能性消化不良的研究方向. 新消化病学杂志 1996;4: 601-602
- 2 陈波, 张建忠, 方小平, 钱冬梅, 王凝, 李民, 袁申元, 王雁. 功能性消化不良患者胃十二指肠运动功能的研究. 胃肠病学和肝病杂志 2000;9:267-269
- 3 李岩, 孙思予, 周卓, 陈苏宁, 王兴尧. 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
- 4 孙思予, 李岩, 周卓, 金冶. 和胃冲剂促进运动障碍样功能性消化不良患者胃排空. 世界华人消化杂志 2000;8:810-812
- 5 王贺玲, 李岩, 白蕊, 张健. 理气中药对小鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:1136-1138
- 6 张庆芳, 李岩, 王启仪. 和胃冲剂促胃肠动力机制的实验研究. 世界华人消化杂志 2005;13:401-403
- 7 陈浩, 田景振, 牛波. 超临界流体萃取技术. 山东中医杂志 1999; 18:509-511
- 8 赵荣荣. 胃肠道功能性疾病的 Rome II 标准. 中国中西医结合消化杂志 2002;9:43-44
- 9 Stanglioni V, Tosetti V, Paternic inverted question mark A, Barbara G, Morselli-Labate AM, Monetti N, Marengo M, Corinaldesi R. Risk indications of delayed gastric emptying of

- solids inpatients with functional dyspepsia. *Gastroenterology* 1996;110:1036-1042
- 10 Kikuchi K, kusano M, Kawamura O, Mori M, Sekiguchi T. Measurement and evaluation of gastric emptying using radiopaque barium markers. *Dig Dis Sci* 2000;45:242-247
- 11 陈艳敏, 柯美云, 王智凤, 张秀兰, 潘国宗. 50 名健康人胃电参数及其影响因素的研究. *中华消化杂志* 2000;20:227-229
- 12 田丰, 沈静雪, 李岩, 王伟. 运动障碍样功能性消化不良患者症状、胃排空、胃电间相关性的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:739-741
- 13 柯美云, 周吕(整理). 胃电图检查及其评判标准. *基础医学与临床* 2001;12(增刊):112
- 14 谷成明, 柯美云, 王智凤, 孙颖. 功能性消化不良消化期和消化期体表胃电研究. *中国医学科学院学报* 2000;22:245-249
- 15 Stotzer PO, Fjalling M, Gretarsdottir J, Abrahamsson H. Assessment of gastric emptying: comparison of solid scintigraphic emptying and emptying of radiopaque markers in patients and healthy subjects. *Dig Dis Sci* 1999;44:729-733
- 16 金建军, 宋分科, 范银忠, 郑建臣, 魏晓红, 穆立祥, 孙晓敏. 钡条-试餐法测定全消化道动力的实验与临床研究. *洛阳医学学报* 1999;17:93-95
- 17 兰梅, 王新, 郭学刚, 樊代明. 功能性消化不良患者胃固体排空功能与临床症状关系的研究. *中国实用内科杂志* 2001;21:598-600
- 18 Chaussade S, Khyari A, Roche H, Garret M, Gaudric M, Couturier D, Guerre J. Determination of total and segmental colonic transit time in constipated patients: results in 91 patients with a new simplified method. *Dig Dis Sci* 1989;34:1168-1172
- 19 陈延, 王学勤, 戴菲, 朱有玲, 罗金燕. 不透X线标记物检测胃肠道运动的临床应用. *实用放射学杂志* 2001;17:647-650
- 20 Chen JD, Lin Z, Pan J, McCallum RW. Abnormal gastric myoelectrical activity and delayed gastric emptying in patients with symptoms suggestive of gastroparesis. *Dig Dis Sci* 1996;41:1538-1545
- 21 朱金照. 促胃肠动力药物的研究现状. *世界华人消化杂志* 2001;9:1136-1138
- 22 Corvaglia L, Faldella G, Rotatori R, Lanari M, Capretti MG, Salvioli GP. Intrauterine growth retardation is a risk factor for cisapride-induced QT prolongation in preterm infants. *Cardiovasc Drugs Ther* 2004;9:1439-1444
- 23 李岩, 孙思予, 周卓. 消食行(中药)对小鼠胃肠动力的影响. *新消化病学杂志* 1997;5:153
- 24 王本祥. *现代中药药理学*. 第1版. 天津: 天津科学技术出版社, 1999:679
- 25 高慧, 贾天柱. 神曲的研究进展. *时珍国医国药* 2002;13:491-492

编辑 王谨晖 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2004-07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评价, 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, 采用了被引量、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。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会员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学学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)

• 临床经验 •

RFA联合肝动脉-门静脉化疗及瘤内无水酒精注射治疗原发性肝癌21例

李新丰, 吕国荣, 王高雄, 刘德鑫, 李拾林, 史海鸿

李新丰, 王高雄, 史海鸿, 福建医科大学附属第二医院肝胆外科 福建省泉州市 362000
吕国荣, 李拾林, 福建医科大学附属第二医院超声科 福建省泉州市 362000
刘德鑫, 福建医科大学附属第二医院放射科 福建省泉州市 362000
福建省教育厅科技基金资助项目, NO. JA03085
通讯作者: 李新丰, 362000, 福建省泉州市中山北路, 福建医科大学附属第二医院肝胆外科, surgone-0107@163.com
电话: 0595-22865916 传真: 0595-22770853
收稿日期: 2005-05-13 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 研究集束电极射频毁损(RFA)联合肝动脉-门静脉化疗及瘤内无水酒精注射治疗原发性肝癌(HCC)的效果。

方法: HCC患者经RFA联合肝动脉化疗栓塞(TACE)、经皮门静脉化疗(PVC)和瘤内无水酒精注射(PEI)治疗21例(四联组)与同期行RFA+TACE治疗22例(二联组)比较, 四联组中16例在PVC+PEI前及治疗后7 d测定血清中可溶性白介素-2受体(sIL-2R)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。

结果: 在RFA+TACE治疗后的PVC+PEI能改善患者血清中sIL-2R和TNF- α 的活性水平($P<0.01$), 并能弥补RFA+TACE治疗中的不足, 6 mo后两组CT检查比较, 四联组瘤体血供明显减少($\chi^2=7.04$, $P<0.01$)、肿瘤明显缩小($t=6.91$, $P<0.01$), 1 a内复发少。

结论: RFA联合肝动脉-门静脉化疗及瘤内无水酒精注射治疗HCC是一种安全可靠、副作用少的双重介入治疗方法。

李新丰, 吕国荣, 王高雄, 刘德鑫, 李拾林, 史海鸿. RFA联合肝动脉-门静脉化疗及瘤内无水酒精注射治疗原发性肝癌21例. 世界华人消化杂志 2005; 13(15):1919-1920
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1919.asp>

0 引言

原发性肝癌(HCC)的病因至今仍不清楚, 但在我国80%以上合并肝硬化, 其与HBV关系密切, 临床就诊患者中, 能手术切除者不足20%;近年来对肿瘤的间质疗法已成为研究热点, 其中以集束电极射频毁损(RFA)报道为多, 由于受多种条件限制, 治疗中仍存在许多不足, 2001-10/2003-05我们选择RFA+肝动脉化疗栓塞(TACE)+门静脉化疗(PVC)+瘤内无水酒精注射(PEI)(四联组)治疗HCC 21例, 并与同期行RFA+TACE(二联组)治疗的22例比较。

1 材料和方法

1.1 材料 2001-10/2003-05 HCC患者43例, 四联组(RFA+TACE+PVC+PEI)21例, 术中穿刺病理确诊, 其中

男18例, 女3例, 平均46.2岁;AFP>1 000 $\mu\text{g/L}$ 13例, 200-1 000 $\mu\text{g/L}$ 5例, ≤ 50 $\mu\text{g/L}$ 3例;肝功能ChildA级19例, B级2例;B超下肿瘤最大径10 cm \times 9.5 cm \times 9.6 cm, 最小5.2 cm \times 5.0 cm \times 5.0 cm;2-3个结节4例, 单发17例;4例伴有分支门静脉癌栓。二联组(RFA+TACE)22例, 超声下穿刺病理证实, 其中男18例, 女4例, 平均39.8岁;AFP>1 000 $\mu\text{g/L}$ 12例, 200-1 000 $\mu\text{g/L}$ 7例, ≤ 50 $\mu\text{g/L}$ 3例;肝功能ChildA级19例, B级3例;B超下肿瘤最大径10 cm \times 10 cm \times 9.8 cm, 最小5.2 cm \times 5.0 cm \times 4.8 cm;2-3个结节3例, 单发19例;3例伴有分支门静脉癌栓。检测HCC外周血清可溶性白介素-2受体(sIL-2R)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)活性, 应用仪器为德国Bayer公司ACS:180SE全自动高效微粒子化学发光免疫分析仪, 试剂盒由天津德普生物技术和医学产品有限公司提供。

1.2 方法 43例在TACE 3 wk后行RFA, 在RFA治疗后1 mo, 21例以FMC方案(氟尿嘧啶1 000 mg, 丝裂霉素8 mg和卡铂300 mg)行经皮PVC;并在RFA治疗不足之处行PEI, 分1-3点, 每点2-3 mL, 总量<10 mL;以后每月1次, 连续3次;二联组每2 mo复诊1次;43例患者在RFA+TACE后6 mo行CT、彩超检查瘤体情况。四联组21例中的16例, 在第一次PVC+PEI治疗前、后7 d抽取外周静脉血2 mL, 采用化学免疫发光分析技术, 检测HCC外周血清sIL-2R及TNF- α 活性变化。

统计学处理 数据采用mean \pm SD表示, 组内比较采用 t 检验, 计数资料用 χ^2 检验 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 四联组中16例行PVC+PEI治疗前、后7 d, 血清sIL-2R和TNF- α 的水平见表1。

表1 四联组中16例经PVC+PEI治疗前、后7 d, 血清sIL-2R和TNF- α 水平(mean \pm SD)

项目	治疗前	治疗后	t 值
sIL-2R(U/mL)	1 216.99 \pm 410.09	717.85 \pm 252.56 ^b	6.062
TNF- α (pg/mL)	879.12 \pm 800.78	410.68 \pm 548.93 ^b	3.593

^b $P<0.01$ vs 治疗前。

2.2 43例HCC在RFA+TACE后均随访1 a, 四联组远处转移1例, 无死亡例;二联组6例远处转移, 死亡2例。两组患者在RFA+TACE治疗6 mo瘤内彩超血流变化情况:

血流减少图像:四联组4例(19.4%),三联组14例(63.7%);无血流图像:四联组17例(81%),三联组8例(36.4%), ($\chi^2 = 7.04$, $P < 0.01$). 43例HCC治疗6 mo后,CT检查肿瘤缩小10-50%:四联组16例(76.2%),三联组8例(36.4%), ($\chi^2 = 6.91$, $P < 0.01$).

2.3 并发症 除发热、一过性腹痛及三联组1例胆道出血外,余病例均未发生其他并发症.

3 讨论

RFA+TACE治疗HCC已成为一种较有效的联合方法^[1-2],其原理:肿瘤细胞对热耐受力低于正常细胞,温度升至40℃可致癌细胞停止分裂,上升到41-42℃可杀死癌细胞或引起DNA损伤,RFA技术是通过集束电极发出的中高频射频波(460 kHz),激发组织细胞进行等离子震荡,离子相互撞击产生热量达80-100℃,使肿瘤组织凝固性坏死,瘤周血管组织凝固形成反应带,产生防止转移及阻止血供作用,射频的热效应还可增强机体的免疫力^[2];而TACE后1 mo常有血管再通或异生血管建立^[1],故RFA需在1 mo内治疗,两种方法联合可互补不足^[1];由于RFA受超声盲区、门静脉分支癌栓、肿瘤位置等影响(如肿瘤靠近大血管,胆囊、胃、结肠等),常出现治疗不彻底;文献[3]报道:HCC标本经血管灌注癌结节表明,癌栓由肝动脉供血占1/3,1/2由门静脉供血,其余为双重供血,因此门静脉供血对HCC的生长及治疗后的复发具有不可忽视的作用;由于门静脉血流速度慢,故化疗仅需相当于TACE给药量的一半即可达到局部高浓度,使局部获得较好疗效,而对全肝损害小;四联组经3次PVC+PEI后,彩超检查瘤内血流明显减少,二组比较差异非常显著($P < 0.01$);治疗6 mo后CT检查肿瘤体积缩小,二组比较差异非常显著($P < 0.01$);说明TACE+RFA治疗后仍存在肿瘤原位灭活不全现象,而此后的PVC+PEI治疗可进

一步弥补其中的不足.

肿瘤的发生、发展及预后与某些细胞因子有密切关系.sIL-2R来自mIL-2R和p55蛋白,是mIL-2R重要廓清方式,还能同mIL-2R竞争地与IL-2结合,中和活化T淋巴细胞周围的IL-2,阻碍IL-2与mIL-2R的结合,从而发挥免疫抑制作用;sIL-2R的升高,会导致自然杀伤细胞(NK)的活性减低,使机体免疫监视功能减退.TNF是由单核细胞(TNF- α)、淋巴细胞(TNF- β)和NK细胞(TNF- γ)产生的多功能细胞因子,对肿瘤细胞具有直接杀伤作用,并能抑制肿瘤血管的生成^[4].四联组中16例行PVC+PEI治疗前、后7 d,血清sIL-2R和TNF- α 水平比较差异非常显著(分别 $t = 6.062$, $P < 0.01$ 和 $t = 3.593$, $P < 0.01$),即治疗后sIL-2R及TNF- α 下降明显,可能机体的免疫抑制状态有所改善.因此在TACE+RFA后1 mo应行PVC加PEI的方法,能进一步弥补RFA+TACE治疗中的不足.43例中除发热、一过性腹痛及三联组1例胆道出血外,余病例均未发生其他并发症.

总之,我们认为:RFA联合肝动脉-门静脉化疗及瘤内无水酒精注射治疗HCC是一种安全、副作用少、有效的双重介入治疗方法.

4 参考文献

- 1 Li XF, Lu GR, Wang GX, Lu DX, Li SL. TACE in combination with RF in treatment of advanced HCC. *Chin J Hepatobiliary Surg* 2003;9:23-25
- 2 DU XL, Wu JS, Ma QS, Li ZP, Zhao BS. Transcatheter hepatic artery embolization helps radiofrequency ablation of hepatic neoplasms. *J Fourth Mil Med Univ* 2000;21:1406-1408
- 3 Taniguchi H, Daidoh T, Shioaki Y, Takahashi T. Blood supply and drug delivery to primary and secondary human liver cancers studied with in vivo bromodeoxyuridine labeling. *Cancer* 1993;71:50-55
- 4 Horie T, Dobashi H, Lizuka K, Yoshii A, Shimizu Y, Nakazawa T, Mori M. Interferon-gamma rescues TNF-alpha-induced apoptosis mediated by up-regulation of TNF-R2 on Eo1-1. *Exp Hematol* 1999;27:512-515

编辑 王谨晖 审读 张海宁

青少年慢性胃炎危险因素分析 382 例

刘艳萍, 王明月, 牟春笋, 项拓, 孔春妍, 王进, 刘艳红, 杨福玲

刘艳萍, 王明月, 牟春笋, 孔春妍, 王进, 山东中医药大学第二附属医院
小儿科 山东省济南市 250001
项拓, 山东中医药大学第二附属医院胃镜室 山东省济南市 250001
刘艳红, 杨福玲, 山东省胸科医院手术室 山东省济南市 250013
济南铁路局科委资助项目, No. 2000-1-44-3
通讯作者: 刘艳萍, 250001, 山东省济南市经八路1号, 山东中医药大学第
二附属医院小儿科, yanshan@jn.gov.cn
收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探讨青少年慢性胃炎的危险因素。

方法: 采取定群随机抽样的研究方法, 首先对济南市 5 131 例 7-18 岁在校中小學生进行问卷调查, 经分检筛选出 1 500 例反复出现上消化道症状的患者及 3 631 名无症状健康者。从患者中随机抽取 480 例行胃镜检查及幽门螺杆菌(*H pylori*)检测, 确诊为慢性胃炎 382 例。健康者作为对照。随机抽取性别、年龄与患者相同的 423 名健康者, 进行 *H pylori* 抗体检测作为 *H pylori* 检测的对照。运用 SPSS11.5 统计软件, 建立数据库, 将每一被调查者的调查结果分别逐项输入数据库, 最后运用相关及 Logistic 回归模型进行分析。

结果: 61 项单因素相关分析中仅 14 项有显著性意义($P < 0.05$)。进一步引入 Logistic 回归模型, 9 项有显著性意义, 按相对危险度(OR)值高低排序, 青少年慢性胃炎的危险因素及相应 OR 值为: 家庭不和睦(6.621); 不吃水果(4.000); 胃黏膜快速尿素酶试验阳性(3.397); 父母文化层次低(2.641); CagA-IgG 阳性(2.641); 学习困难(2.536); 非三口之家(2.222); 有上消化道疾病家族史(1.917); 不吃肉食(1.873)。

结论: 青少年慢性胃炎的危险因素是以社会、心理因素为主的综合性因素, 研究过热的 *H pylori* 感染因素应客观认识。

刘艳萍, 王明月, 牟春笋, 项拓, 孔春妍, 王进, 刘艳红, 杨福玲. 青少年慢性胃炎危险因素分析 382 例. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1921-1923
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1921.asp>

0 引言

近年青少年慢性胃炎患病率呈逐年上升趋势, 直接影响着青少年的身心健康。究其原因, 除医师重视程度提高及诊断手段进步之外, 日益增加的不良社会、心理因素, 如学习负担过重、家庭不和睦、父母离异及饮食结构不合理等的影响更不容忽视。为探讨青少年慢性胃炎的危险因素, 于 2000/2004 年间, 我们采取定群随机抽样的研究方法, 运用相关分析及 Logistic 回归模型, 对济南市 382 例 7-18 岁青少年慢性胃炎的诸多可疑危险因素进行筛选, 并进行定性、定量分析, 旨在找出致病的危险因素。

1 材料和方法

1.1 材料 2000/2004 年间, 济南市 5 131 例青少年慢性上消化道疾病致病因素的流行病学调查中的患者 382 例, 男 192 例, 女 190 例, 年龄 7-18 岁。7-9 岁 40 例, 10-12 岁 126 例, 13-15 岁 130 例, 16-18 岁 86 例。调查结果为健康者的作为对照共 3 631 名。

1.2 方法

1.2.1 调查内容 (1) 一般项目: 除姓名、性别、年龄外, 还有学校、班级、家庭住址、父母单位、联系电话, 以便联系、随访、帮助判断是否择校及核对其他调查指标。(2) 上消化道症状: 除有关症状外, 还包括症状最早出现的时间, 症状是否经常出现, 症状出现与进餐及季节的关系。(3) 饮食习惯: 包括主食、辅食、蔬菜、水果及近几年儿童喜好的常见饮料、冷食及小食品。(4) 家族史。(5) 环境因素: 居住环境, 家庭人员构成, 有无单亲、寄养、家庭不和睦及父母离异, 父母职业及文化程度, 家庭经济状况, 是否择校、学习困难等。(6) *H pylori* 检测: 包括快速尿素酶实验、胃黏膜活组织直接涂片光镜下检菌、*H pylori* 抗体检测 3 项, 共 61 项。

1.2.2 调查表设计 因为是问卷调查, 由学生自己在表格上回答, 为保证回答准确、真实, 首先在卷首写明答题要求及注意事项, 让学生了解调查目的及准确、如实回答的好处, 并保证为其保密。具体调查内容的设计遵循 3 项原则: (1) 将前述调查内容尽量用简明、通俗、易懂的语言表达, 避免专业术语。(2) 回答方便, 让学生只在表格的“是”或“否”上打“钩”或者画“圈”即可。(3) 敏感内容不直接提问, 如想了解其父母是否离异, 则问“你通常和谁住在一起: 父亲、母亲、父母亲”等。

1.2.3 调查方法 (1) 问卷调查: 调查员由山东中医药大学第二附属医院儿科住院医师和山东省胸科医院护士担任, 实地调查前首先统一对调查员进行严格培训, 认真核对每一项调查指标, 并向被调查学校的校医和被调查班的班主任讲明调查目的、方法和注意事项, 争得其大力支持和配合。实地调查时, 由调查员和班主任向学生讲明注意事项, 然后发给每人一份调查表, 答卷过程中, 调查员在场释疑, 答完后统一收回封存, 由调查员送回课题组。共收回问卷 5 131 份, 经分检, 筛选出反复出现上消化道症状的患者 1 500 例, 健康者 3 631 名。从患者中随机抽取 480 例行胃镜检查及 *H pylori* 检测。(2) 胃镜检查: 全部患者均采用日本产 Olympus GIF-XQ240 型电子胃镜。诊断标准全部符合 1996 年上海儿科消化内镜研讨会通过的诊断标准^[1]。(3) *H pylori* 检测: 凡胃镜检查者均同时采

用3种方法进行 *H pylori* 检测. 快速尿素酶试验: 采用海口南科科技发展有限公司提供的 1 min 快速 *H pylori* 诊断试纸, 术者自患儿胃窦部取黏膜活检组织 1 块, 由助手协助测试. 胃黏膜活检组织直接涂片检测 *H pylori*: 术者另取 1 块胃窦部黏膜活检组织, 由专门指定的细菌室专业人员处理, 革兰氏染色, 光镜下检查. 结果判断: 高倍视野下细菌少而分散为 +, 细菌成簇分布为 ++, 细菌成片分布为 +++. *H pylori* 抗体检测: 采用免疫层析法, 可一次同时测出样本中的 HSP60-IgG 和 CagA-IgG 两种抗体. 试剂盒由上海波亚生物科技有限公司提供. 除经胃镜检查的患者接受 *H pylori* 检测外, 另随机抽取性别、年龄与患者相同的 423 例前述健康者, 同时进行 *H pylori* 抗体检测作为 *H pylori* 检测的对照.

统计学处理 应用 SPSS11.5 统计软件, 建立 SPSS 数据库, 将每一被调查者所有调查结果分别逐项输入数据库. 对全部被调查者的 61 个项目先进行单因素相关分析, 选择其中有意义的因素, 再运用强迫引入法引入 Logistic 回归模型, 进行多因素回归分析. 计算公式: $P = \exp(\beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p) / [1 + \exp(\beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p)]$, β_0 是常数项; $\beta_j (j = 1, 2, 3, \dots, p)$ 是与研究因素 X_j 有关的参数; 危险度 $OR = \exp(\beta_p)$, 按其计算每一被引入因素的相对危险度.

2 结果

2.1 单因素相关分析结果 首先对所有调查指标进行数量化后方可进行分析. 定量指标用原始值, 即实际值; 对定性指标则需要进行一定数量化的方法来分级. 例如: 家庭不和睦, 是家庭不和睦者数量化 = 1, 不是家庭不和睦者数量化 = 0; 上消化道疾病家族史, 有上消化道疾病家族史者数量化 = 1, 无上消化道疾病家族史者数量化 = 0 等. 对 61 项指标逐一进行相关分析, 仅 14 项有显著性意义 ($P < 0.05$, 表 1).

表1 青少年慢性胃炎单因素相关分析有显著意义的相关因素及数量化分级

因素	数量化分级	
家庭不和睦	是 = 1	否 = 0
三代同住	是 = 1	否 = 0
寄养	是 = 1	否 = 0
学习困难	是 = 1	否 = 0
家庭月收入低于 1 500 元	是 = 1	否 = 0
父母文化低	是 = 1	否 = 0
有家族史	有 = 1	无 = 0
CagA-IgG 阳性	阳性 = 1	阴性 = 0
快速尿素酶试验阳性	阳性 = 1	阴性 = 0
爱吃蔬菜 ¹	是 = 1	否 = 0
爱吃水果 ¹	是 = 1	否 = 0
爱吃肉食 ¹	是 = 1	否 = 0
父母文化中等 ¹	是 = 1	否 = 0
三口之家 ¹	是 = 1	否 = 0

¹ 为负相关因素, 其余为正相关因素.

2.2 多因素分析结果 将表 1 中的相关因素引入 Logistic 回归模型, 进行多因素回归分析, 9 项有显著性意义. 按其 *OR* 值高低排序, 青少年慢性胃炎的危险因素及相应 *OR* 值为: 家庭不和睦 (6.621); 不吃水果 (4.000); 快速尿素酶试验阳性 (3.397); 父母文化层次低 (2.641); CagA-IgG 阳性 (2.641); 学习困难 (2.536); 非三口之家 (2.222); 有上消化道疾病家族史 (1.917); 不吃肉食 (1.873) (表 2).

3 讨论

尽管传统观点即认为慢性上消化道疾病与心理、饮食因素有关, 但国内、外均缺乏大样本的报道, 尤其在儿科领域. *H pylori* 感染虽可对 *H pylori* 相关性慢性胃

表2 青少年慢性胃炎各危险因素及各参数估计值、显著性水平和 *OR* 值

经 Logistic 回归分析 有显著性意义的因素	参数估计值(β)	标准误(SE)	wald	df	P	<i>OR</i>	95%CI	
							下限	上限
家庭不和睦	1.890	0.674	7.872	1	0.005	6.621	1.768	24.793
爱吃水果	-1.387	0.391	12.583	1	0.000	0.250 ¹	0.116	0.538
快速尿素酶试验阳性	1.223	0.390	9.842	1	0.002	3.397	1.582	7.295
父母文化低	0.971	0.404	5.774	1	0.016	2.641	1.196	5.832
CagA-IgG 阳性	0.971	0.346	7.875	1	0.005	2.641	1.340	5.205
学习困难	0.931	0.410	5.148	1	0.023	2.536	1.135	5.666
三口之家	-0.798	0.378	4.452	1	0.035	0.450 ¹	0.214	0.945
有家族史	0.651	0.292	4.954	1	0.026	1.917	1.081	3.401
爱吃肉食	-0.628	0.285	4.875	1	0.027	0.534 ¹	0.305	0.932

¹ 为保护性因素, 数值越小保护性越强, 其倒数为相反因素的 *OR* 值. 即不吃水果、非三口之家、不吃肉食的 *OR* 值应依次为 4.000, 2.222 和 1.873.

炎作出某些病因性解释,但有相当一部分慢性胃炎根本找不到 *H pylori* 感染的证据.因此,病因和发病机制的研究显得格外重要.积极寻找其致病的危险因素,可为今后进一步探讨病因、发病机制及预防提供科学的理论根据.本次调查采用定群随机抽样的研究方法,并在分析中应用了 Logistic 回归模型,比较有效地控制了混杂因素的干扰,对诸多因素进行了定量分析,从而比较客观地对济南市区青少年慢性胃炎致病的危险因素作出评价.

社会、心理因素对青少年慢性上消化道疾病的影响已引起广泛关注.我们的研究结果显示:青少年慢性胃炎各致病危险因素中,家庭不和居首位, *OR* 值为 6.621. 父母文化层次低、学习困难也在其中, *OR* 值分别为 2.641 和 2.536. 也就是说,青少年慢性胃炎各致病危险因素中,负性社会心理因素排位第一,相对危险度最高.有研究^[2]表明,慢性浅表性胃炎患儿血液及胃液中生长抑素(SOM)、胃动素(MTL)含量均明显高于正常儿童,差异极为显著.说明胃肠激素直接参与了胃肠消化功能的调节,提示青少年慢性浅表性胃炎与胃肠激素的分泌调节失常密切相关.胃肠激素是机体调节系统中一个重要组成部分,调控消化道的分泌、吸收、运动、血流和细胞营养等功能,机体内外部环境的变化作用于胃肠内分泌细胞,引起他们释放胃肠激素,并作为循环激素而起作用.体内存在一种胃肠激素释放的自动调节机制,一旦分泌异常,必然会影响到消化道的功能而引起各种消化道疾病^[3-4]. 7-18岁青少年学习及各种考试压力日益加重,竞争激烈,一些学校为追求升学率,对学生采取魔鬼式训练及题海战术,而父母则望子成龙,期望值过高,加上家庭不和睦,父母文化层次低,不善于引导等.正值生长发育中的青少年,神经系统发育还不尽完善,对家庭及社会的某些负性因素理解和承受能力有限,上述各负性因素长期持续存在,持久、强烈的精神紧张、情绪激动或抑郁可通过大脑皮层作用于下丘脑,改变自主神经系统功能,从而影响胃肠道消化液的分泌.长久持续心理应激,还会引起机体内环境的变化,导致胃肠激素分泌释放功能异常,从而发生上消化道疾病.

近年来有关 *H pylori* 的研究报道较多,对于成人, *H pylori* 感染为消化性溃疡的病原似乎已被确定.我们对382例青少年慢性胃炎患者采用胃黏膜活组织直接涂片检菌、快速尿素酶实验、*H pylori* 抗体检测3种方法检测 *H pylori*. 相关回归分析显示,对于青少年慢性胃炎,快速尿素酶实验阳性、CagA-IgG 阳性有显著性意义, *OR* 值分别为 3.397 和 2.641. 以上结果提示,带有 CagA 的 *H pylori* 菌株感染对于青少年慢性胃炎有一定的致病危险度,不带有 CagA 的 *H pylori* 菌株感染与青少年慢性胃炎无相关关系,并非 *H pylori* 感染皆可致病,与国内报道符合,与国外报道不尽相同^[5-7]. 由于快速尿素酶实验需要取胃黏膜活组织,缺少健康志愿者对照,所

以,这一因素的结论还有待进一步研究.

分析结果还显示,青少年慢性胃炎各危险因素中,除负性社会、心理因素外,排第二位的是饮食因素.对于青少年慢性胃炎,爱吃水果、爱吃肉食 *OR* 值依次为 0.250 和 0.534,为保护性因素.而不吃水果、不吃肉食的 *OR* 值则为其倒数,依次为 4.000 和 1.873. 众所周知,慢性胃炎与饮食有关.有研究^[5]表明食物中的维生素 A (包括胡萝卜素) 和维生素 C 与慢性胃炎危险性的减少有联系,水果和蔬菜对肠化生有保护作用.我们分析结果与这一结论符合.长期偏食,不吃蔬菜、水果和肉食,对消化道保护性降低,易患慢性胃炎.

胃体胃炎的研究^[8-9]发现,恶性贫血患者的一级亲属胃体胃炎的发病率明显高于一般人群,严重萎缩性胃炎发生的危险性是随机人群的20倍,他们认为其中起作用的是一常染色体显性遗传基因.对胃炎的研究发现亦有家庭聚集现象.我们的研究结果显示,有上消化道疾病家族史对于青少年慢性胃炎有显著性意义,但其 *OR* 值较低,为 1.917. 这一结果表明,青少年慢性胃炎存在一定的遗传易感性,国内尚缺少遗传易感性机制的研究报道.

研究结果还提示,家庭经济状况、父母职业、爱吃面食或米饭等,与青少年慢性胃炎的发生并无正相关关系.

总之,我们认为,青少年慢性胃炎的发生是非单一因素的综合性致病因素共同起作用的结果.长期、持续、强烈的社会、心理应激改变了自主神经系统功能,同时也引起了机体内环境的变化,从而抑制了胃黏膜保护层,导致了胃肠道消化液及胃肠激素分泌释放功能异常,是青少年慢性胃炎发生和发展的基础,是首要和主要因素.而长期偏食在疾病的发生和发展中起到推波助澜的作用.家族遗传易感性和 *H pylori* 感染,也有利于疾病的发生和发展.其发病机制有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 中华儿科杂志编辑委员会. 小儿慢性胃炎、消化性溃疡内镜诊断标准(试行). 中华儿科杂志 1996;34:296-297
- 2 韩秀珍,徐华,王茂青. 慢性浅表性胃炎患儿血及胃液中生长抑素、胃泌素、胃动素含量测定. 第四军医大学学报 1995;16:123-124
- 3 周吕. 胃运动生理与病理生理. 中华消化杂志 1994;14:287-289
- 4 洪炜. 医学心理学. 第二版. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1996:37-83
- 5 Fontham ETH, Ruiz B, Perez A, Hunter F, Correa P. Determinants of *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis. Am J Gastroenterol 1995;90:1094-1101
- 6 阎晓莉,王宝珠,玮康利. 幽门螺杆菌相关性胃黏膜病变患儿血清 CagA 抗体、VacA 抗体检测及其临床意义. 临床儿科杂志 2002;20:729-731
- 7 许春娣,陈舜年,徐家裕. 儿童幽门螺杆菌感染的流行病学研究. 中华儿科杂志 1999;37:308-309
- 8 姚希贤. 临床消化病学. 第一版. 天津:天津科学技术出版社, 1999:493-501
- 9 Varis O, Valle J, Siurala M. Is *Helicobacter pylori* involved in the pathogenesis of the gastritis characteristic of pernicious anaemia? Comparison between pernicious anaemia relatives and duodenal ulcer relatives. Scand J Gastroenterol 1993;28:705-708

氩等离子电凝联合复方五倍子喷洒治疗消化道出血 32 例

王孟春, 张丽瑶, 王彩霞, 孙思予

王孟春, 王彩霞, 孙思予, 中国医科大学附属二院内镜中心
辽宁省沈阳市 110004
张丽瑶, 沈阳市传染病院 辽宁省沈阳市 110006
通讯作者: 王孟春, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属二院内镜中心. wangmc@cmu2h.com
电话: 024-83956947 传真: 024-23892617
收稿日期: 2005-05-28 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探讨氩等离子电凝联合复方五倍子喷洒治疗消化道出血的疗效。

方法: 将患者随机分为两组, 分别采用内镜下单纯氩等离子电凝和复方五倍子喷洒联合氩等离子电凝治疗消化道出血。

结果: 单纯氩等离子电凝和复方五倍子喷洒联合氩等离子电凝即时止血率分别为 92.9% 和 93.6%, 单纯氩等离子电凝再出血率为 10.7%, 复方五倍子喷洒联合氩等离子电凝再出血率为 6.25%。

结论: 氩等离子电凝是治疗消化道出血的有效方法, 联合复方五倍子喷洒能减少再出血发生。

王孟春, 张丽瑶, 王彩霞, 孙思予. 氩等离子电凝联合复方五倍子喷洒治疗消化道出血 32 例. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1924-1925
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1924.asp>

0 引言

经内镜治疗消化道出血方法众多, 疗效确切, 大大降低了患者的手术率和死亡率, 提高了患者的生活质量. 我们应用内镜下氩等离子电凝(argon plasma coagulation, APC)联合复方五倍子喷洒治疗消化道出血, 取得取得满意疗效, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 消化道出血患者 60 例, 随机分为两组, 内镜下单纯 APC 组 28 例, APC 联合复方五倍子喷洒组 32 例, 病例资料见表 1. 所有病例均见到活动性出血病灶. 器械: 日本 PEATAX EG2940 电子胃镜、EG3840 电子结肠镜, EPM3500 电子影像处理机, 德国 ERBE ICC 200 型氩气刀装置. 药物为我院自产复方五倍子液。

1.2 方法

1.2.1 术前准备和设备调试 上消化道内镜: 空腹 8 h 以上, 术前咽喉局麻, 肌注阿托品. 结肠镜: 口服白配洗肠液清洗肠道, 术前肌注阿托品. 连接好氩气刀装置, 氩气流量为 2 L/min, 功率设定为 60 W, 电凝指数为 A60, 体外调试氩气刀效果。

1.2.2 止血过程 常规插入内镜, 尽快找到出血灶, 尽可能将病灶置于视野中央, 用生理盐水冲洗病灶, 视野清晰后, 经内镜钳道插入氩离子凝固导管, 伸出内镜头端至距病灶 0.3-0.5 cm, 对准出血病灶以每次 1-3 s 的时间行 APC 治疗, 使局部组织呈白灼状, 至出血停止. 加用复方五倍子组, 采用内镜注药管在病灶处喷洒 10-20 mL 复方五倍子, 观察出血病灶周围形成褐色凝血块, 无新鲜血渗出为止。

1.2.3 术后处理 均留院观察. 上消化道出血者同时给予抑酸药及常规补液. 下消化道出血者给予常规补液. 观察生命体征变化, 血尿素氮及大便情况等。

2 结果

APC 和 APC 联合复方五倍子喷洒的即时止血率分别为 92.9% 和 93.6%, 两组分别有 2 例未达到即时止血, 分别加用金属夹止血. 单纯 APC 术后 1 wk 内 3 例患者再出血 (1 例胃溃疡, 1 例 Dieulafoy 病, 1 例放射性直肠炎), 再出血率为 10.7%, 其中前 2 例采取手术治疗, 1 例再次 APC 并联合复方五倍子喷洒. 联合组治疗 1 wk 内 2 例发生再出血 (2 例 Dieulafoy 病), 再出血率为 6.25%, 后采用手术治疗. 两组治疗均取得满意疗效, 且无穿孔等严重并发症, 联合治疗组在降低再出血率上有一定优势。

3 讨论

消化道出血常常危及生命, 需要采取快速、有效的止血治疗. 目前国内外普遍采用内镜下止血治疗, 取得良好效果, 方法包括内镜下注射、局部药物喷洒、热探头、微波、高频电、金属夹和 APC 等^[1-5]. 方法各有利弊, 如单纯喷洒药物疗效不持久, 易再出血; 内镜下注射可能引起组织坏死; 微波、热探头治疗难以控制深度; 有的金属夹不脱落成为异物刺激黏膜; 高频电凝直接接触黏膜导致电凝

表 1 60 例消化道出血患者临床资料

组别	n	男	女	平均年龄(岁)	食管息肉	胃息肉	胃溃疡	Dieulafoy 病	大肠息肉	放射性直肠炎	喷血	渗血
APC 组	28	18	10	46	3	6	7	2	8	2	4	24
联合组	32	19	13	50	5	6	6	4	9	2	6	26

头与黏膜黏着等. 本文探讨了应用APC并联合复方五倍子喷洒治疗各种非静脉曲张消化道出血的效果, 结果表明APC是治疗消化道出血的安全、有效的方法, 辅以复方五倍子喷洒有利于减少再出血的发生.

APC最早用于开放性外科手术止血, 1990年代开始应用于内镜治疗, 目前应用于消化道息肉、消化道出血、Barrett食管、消化道肿瘤等的治疗. 其利用高频电流以单极技术通过电离的有导电性的氩气无接触地引导到需要治疗的组织, 产生凝固效应, 病灶表面呈焦灼状, 周边黏膜肿胀, 从而达到止血效果. 其最大优点是凝固导管不直接与病灶接触, 凝固深度小于3 mm, 不易穿孔, 而且氩离子束可以自动导向需治疗的组织表面, 可对病灶进行全方位的治疗. 但连续喷凝易发生黏膜下气肿, 因此, 我们在治疗中, 根据病灶大小、出血性质选择喷凝时间和间隔, 治疗后充分吸气, 避免了并发症的出现. 复方五倍子为我院自制药剂, 已使用多年, 有明确止血效果. 主要成分是五倍子、柯子和明矾. 五倍子和柯子含大量鞣酸, 有较强收敛、固涩和止血作用. 鞣酸和明矾有凝固蛋白的协同作用, 使黏膜和溃疡局部组织蛋白凝固, 形成保护膜, 黏膜小血管被压迫, 收缩止血. 另外, 复方五倍子液可一过性抑制胃

酸和胃液分泌, 有抑制蛋白酶消化蛋白的活性, 并可使胃肠道平滑肌的蠕动减弱, 从而有利于破溃血管形成血栓和止血^[6]. 本文结果提示APC联合复方五倍子喷洒可减少再出血的发生, 巩固APC的治疗效果.

APC技术操作简单, 易于掌握, 是治疗消化道出血安全、有效的方法.

4 参考文献

- 1 Chung SS, Lau JY, Sung JJ, Chan AC, Lai CW, Ng EK, Chan FK, Yung MY, Li AK. Randomized comparison between adrenaline injection alone and adrenaline injection plus heat probe treatment for actively bleeding ulcers. *Br Med J* 1997; 314:1307-1311
- 2 Hachisu T, Miyazaki S, Hamaguchi K. Endoscopic clip-marking of lesions using the newly developed HX-3L clip. *Surg Endosc* 1989;3:142-147
- 3 Asaki S. Efficacy of endoscopic pure ethanol injection method for gastroduodenal ulcer bleeding. *World J Surg* 2000;24: 294-298
- 4 王孟春, 李立, 常桂艳, 孙思予, 孙素云. 金属夹联合内镜注射治疗胃肠道出血. *世界华人消化杂志* 2003;11:673-675
- 5 Havanond C, Havanond P. Argon plasma coagulation therapy for non-variceal upper gastrointestinal bleeding. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;18:CD003791
- 6 郑长青, 孙鑫香, 王纯正. 复方五倍子液治疗消化道出血73例. *中国中西医结合杂志* 1997;17:124

编辑 王谨晖 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

• 临床经验 •

肠易激综合征临床亚型分析 250 例

顾玉兰, 卜平, 朱海杭

顾玉兰, 卜平, 扬州大学医学院中西医结合研究所 江苏省扬州市 225001
朱海杭, 江苏省苏北人民医院消化内科 江苏省扬州市 225009
通讯作者: 卜平, 225001, 江苏省扬州市淮海路 11 号, 扬州大学医学院
中西医结合研究所.
电话: 0514-7978801 传真: 0514-7341733
收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 探讨肠易激综合征(IBS)患者不同亚型的临床特点.

方法: 采用问卷调查和随访的方法, 对2002/2004年在苏北医院消化专科就诊的250例IBS患者的资料进行分型分析.

结果: 250例IBS患者中腹泻为主型(IBM-D)160例, 便秘为主型(IBM-C)43例, 腹泻便秘交替型(A-IBM)47例. 不同亚型在性别、烟酒嗜好、腹部手术史、胃肠感染史、发

病因素、合并其他功能性疾病、治疗反应中分布有差异, 在腹痛、腹胀等结肠症状未见明显差异.

结论: IBS各亚型病理生理不同, 临床表现及治疗反应也各有特点.

顾玉兰, 卜平, 朱海杭. 肠易激综合征临床亚型分析 250 例. *世界华人消化杂志* 2005;13(15):1925-1927
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1925.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)主要是由腹痛或腹部不适伴排便异常构成的一组肠功能紊乱综合征, 是一种常见的功能性胃肠病. 无确切的形态学和

头与黏膜黏着等. 本文探讨了应用APC并联合复方五倍子喷洒治疗各种非静脉曲张消化道出血的效果, 结果表明APC是治疗消化道出血的安全、有效的方法, 辅以复方五倍子喷洒有利于减少再出血的发生.

APC最早用于开放性外科手术止血, 1990年代开始应用于内镜治疗, 目前应用于消化道息肉、消化道出血、Barrett食管、消化道肿瘤等的治疗. 其利用高频电流以单极技术通过电离的有导电性的氩气无接触地引导到需要治疗的组织, 产生凝固效应, 病灶表面呈焦灼状, 周边黏膜肿胀, 从而达到止血效果. 其最大优点是凝固导管不直接与病灶接触, 凝固深度小于3 mm, 不易穿孔, 而且氩离子束可以自动导向需治疗的组织表面, 可对病灶进行全方位的治疗. 但连续喷凝易发生黏膜下气肿, 因此, 我们在治疗中, 根据病灶大小、出血性质选择喷凝时间和间隔, 治疗后充分吸气, 避免了并发症的出现. 复方五倍子为我院自制药剂, 已使用多年, 有明确止血效果. 主要成分是五倍子、柯子和明矾. 五倍子和柯子含大量鞣酸, 有较强收敛、固涩和止血作用. 鞣酸和明矾有凝固蛋白的协同作用, 使黏膜和溃疡局部组织蛋白凝固, 形成保护膜, 黏膜小血管被压迫, 收缩止血. 另外, 复方五倍子液可一过性抑制胃

酸和胃液分泌, 有抑制蛋白酶消化蛋白的活性, 并可使胃肠道平滑肌的蠕动减弱, 从而有利于破溃血管形成血栓和止血^[6]. 本文结果提示APC联合复方五倍子喷洒可减少再出血的发生, 巩固APC的治疗效果.

APC技术操作简单, 易于掌握, 是治疗消化道出血安全、有效的方法.

4 参考文献

- 1 Chung SS, Lau JY, Sung JJ, Chan AC, Lai CW, Ng EK, Chan FK, Yung MY, Li AK. Randomized comparison between adrenaline injection alone and adrenaline injection plus heat probe treatment for actively bleeding ulcers. *Br Med J* 1997; 314:1307-1311
- 2 Hachisu T, Miyazaki S, Hamaguchi K. Endoscopic clip-marking of lesions using the newly developed HX-3L clip. *Surg Endosc* 1989;3:142-147
- 3 Asaki S. Efficacy of endoscopic pure ethanol injection method for gastroduodenal ulcer bleeding. *World J Surg* 2000;24: 294-298
- 4 王孟春, 李立, 常桂艳, 孙思予, 孙素云. 金属夹联合内镜注射治疗胃肠道出血. *世界华人消化杂志* 2003;11:673-675
- 5 Havanond C, Havanond P. Argon plasma coagulation therapy for non-variceal upper gastrointestinal bleeding. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;18:CD003791
- 6 郑长青, 孙鑫香, 王纯正. 复方五倍子液治疗消化道出血73例. *中国中西医结合杂志* 1997;17:124

编辑 王谨晖 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

• 临床经验 •

肠易激综合征临床亚型分析 250 例

顾玉兰, 卜平, 朱海杭

顾玉兰, 卜平, 扬州大学医学院中西医结合研究所 江苏省扬州市 225001
朱海杭, 江苏省苏北人民医院消化内科 江苏省扬州市 225009
通讯作者: 卜平, 225001, 江苏省扬州市淮海路 11 号, 扬州大学医学院
中西医结合研究所.
电话: 0514-7978801 传真: 0514-7341733
收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-06-08

摘要

目的: 探讨肠易激综合征(IRS)患者不同亚型的临床特点.

方法: 采用问卷调查和随访的方法, 对2002/2004年在苏北医院消化专科就诊的250例IRS患者的资料进行分型分析.

结果: 250例IRS患者中腹泻为主型(IRS-D)160例, 便秘为主型(IRS-C)43例, 腹泻便秘交替型(A-IRS)47例. 不同亚型在性别、烟酒嗜好、腹部手术史、胃肠感染史、发

病因素、合并其他功能性疾病、治疗反应中分布有差异, 在腹痛、腹胀等结肠症状未见明显差异.

结论: IRS各亚型病理生理不同, 临床表现及治疗反应也各有特点.

顾玉兰, 卜平, 朱海杭. 肠易激综合征临床亚型分析 250 例. *世界华人消化杂志* 2005;13(15):1925-1927
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1925.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IRS)主要是由腹痛或腹部不适伴排便异常构成的一组肠功能紊乱综合征, 是一种常见的功能性胃肠病. 无确切的形态学和

生化异常改变,病理生理机制尚不明确^[1].我们对2002/2004来我院消化专科就诊的IBS患者的资料进行分析,对IBS的临床亚型特点进行初步探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-2004我院消化专科就诊的IBS患者250例,诊断及分型全部符合罗马II标准^[2].根据症状分为腹泻为主型(D-IBS)、便秘为主型(C-IBS)、腹泻便秘交替型(A-IBS).其中D-IBS160例,C-IBS43例,A-IBS47例.

1.2 方法 采用问卷调查和随访的方法,分析250例IBS患者临床亚型发病、临床症状及治疗反应等方面的特点.D-IBS患者给予解痉剂和止泻剂,C-IBS用解痉剂、导泻剂和促胃肠动力药,A-IBS则对症治疗.治疗前及治疗第2 wk、第4 wk及第8 wk末了解病情并进行症状评分各主要症状的记录与评价:按症状轻重分为4级(0,+,++,+++).0=无;+=轻度,有感觉但不明显;+=中度,稍重,但不影响工作;+++ = 重度,难以坚持工作.治疗后以症状为单位,评估疗效.临控:原有症状消失;显效:原有症状改善II级者;好转:原有症状改善I级者;无效:原有症状无改善或加重.按新药临床试验规定,临控及显效合计为总有效率.

2 结果

2.1 一般资料 包括年龄、性别、职业、体型、病程、有无烟酒嗜好、家族史、腹部手术史、胃肠感染史,发病是否与精神、饮食、天气有关等.D-IBS型中男性明显多于女性(分别为105和55例),C-IBS型中女性较为多见(分别为29和14例),A-IBS型则无差别.有腹部手术史者在D-IBS中占7.8%,C-IBS中占1.6%,A-IBS中占2.9%;有胃肠感染史者在D-IBS中占15.6%,C-IBS中占3.5%,A-IBS中占5.2%;D-IBS中发病有精神因素者占4.3%,与饮食有关者占8.7%,与天气有关者占9.3%,而这个比率在C-IBS中分别为8.8%,3.1%,3.6%,A-IBS中则为5.2%,4.8%,6.2%.

2.2 临床主要症状特点 IBS患者往往有多种症状并存,并且经常变换、反复发作(表1).

表1 临床主要症状特点⁽ⁿ⁾

临床主要症状	D-IBS	C-IBS	A-IBS
腹痛	141	29	34
脐周痛	17	13	12
腹胀	77	39	35
腹胀,排便缓解	20	13	16
黏液便	42	5	9
便急	121	7	18
便后不爽	86	11	15
肠鸣	75	8	13

2.3 其他常见IBS相关症状及肠外症状见表2.

表2 其他常见IBS相关症状及肠外症状⁽ⁿ⁾

其他症状	D-IBS	C-IBS	A-IBS
食欲不振	30	16	13
暖气	25	27	11
恶心	31	5	7
呕吐	25	6	17
反酸	22	7	12
头昏	15	7	8
头痛	23	11	8
腰背痛	32	8	13
月经痛	26	21	17
失眠	33	11	9
尿频	41	5	9

2.4 疗效观察 实验用药第2 wk D-IBS的总有效率为68.7%,C-IBS的总有效率为36.3%,A-IBS的总有效率为32.1%.第4 wk分别为33.2%,18.5%,14.5%.第8 wk则分别为16.7%,7.6%,5.1%.

3 讨论

IBS是胃肠道常见的功能性疾病,近年来有明显增多的趋势,在消化内科门诊处理的患者中占到了三分之一^[3],我院消化门诊的确诊率约为13%.三种亚型中以腹泻为主型最多,占到64%,这与一般统计相符合,而腹泻便秘交替型所占比例与便秘为主型相当,发病率比以往报道要高^[4].本组资料显示,腹泻为主型患者以男性居多,便秘为主型以女性居多,而交替型男女发病无差异.D-IBS患者发病与腹部手术史、胃肠感染史及饮食、天气因素相关,C-IBS患者则与精神因素更密切,有更多上消化道症状及肠外症状.各型在腹痛、腹胀等结肠症状未见明显差异,仅症状频率略有差异,支持IBS症状学不特异^[5].其余观察指标未见有明显差异.目前IBS无特异性治疗,一般予以对症及经验治疗.D-IBS短期疗效最佳,总体来说有效缓解率不高,且容易复发.

IBS具体的病理生理机制尚不明确,肯定的是不同亚型IBS患者自主神经功能各异,C-IBS与胆碱能神经异常有关,而D-IBS则与肾上腺能神经异常有关.目前认为内脏敏感性增加在IBS的发病中有重要作用,包括便秘型和腹泻型患者都有腹痛或腹部不适,肛门直肠测压显示两型IBS患者都存在内脏高敏感性.张志雄 *et al*^[6]发现在自然状态下,C-IBS患者直肠敏感性降低,D-IBS患者直肠敏感性升高.冷应激后C-IBS和D-IBS患者直肠对压力的敏感性明显降低.Drossman *et al*^[7]发现D-IBS患者回肠末端、横结肠黏膜中P物质(SP)、肠血管活性肽(VIP)含量升高,相反C-IBS患者这两种物质含量降低.詹丽杏 *et al*^[8]发现胃窦十二指肠移行性复合运动(MMC)

异常,但与IBS临床分型关系不大.最近肠神经内分泌细胞(又称EC细胞)分泌的5-羟色胺(5-HT)受到了重视.生理状态下自EC细胞释放的5-HT通过多种5-HT受体发挥致动力紊乱作用.肠道各种5-HT受体对平滑肌的作用是相反的.Kuemmerle *et al*^[9]研究表明,人类小肠平滑肌细胞中5-HT_{2A}受体介导收缩和5-HT₄受体介导舒张作用共存,以调节肠道运动的平衡.肠道5-HT_{1B/D}受体也是影响运动可能的作用位点^[10].有研究^[11]表明,5-HT介导的人类回肠的环肌收缩正是通过5-HT_{1D}受体起作用的;而纵肌层中5-HT介导的舒张是通过5-HT_{1B}受体起作用的.实验表明^[12]IBS患者5-HT的EC细胞数量明显增加,分泌功能状态活跃.腹泻型和便秘型IBS患者的肠道运动形式不同,可能与机体内上述各种5-HT受体的功能相互不协调有关.两种亚型患者的完全相反的大便性状和排便习惯是否和此两组患者体内5-HT受体的分布和比例不同相关,有待进一步研究.

目前对IBS着重于其流行病学的调查、发病机制的研究、某种新药的疗效观察等,一般从总体而不是分型进行研究.基于各型病理生理的不同应做分型研究,以更深入的认识这一疾病,指导临床用药.目前尚未有一种药物或一种疗法对IBS患者肯定有效,因此治疗上应遵循个体化原则,采取综合性治疗措施,包括饮食、心理治疗及药物治疗(可酌情选用调节肠道运动功能的药物、调节内脏感觉的药物、改善中枢情感的药物、胃肠微生态制剂及中药等).

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 Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 1999;45:II43-II47
- 3 尉秀清,陈晏湖,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
- 4 Hahn BA, Yan S, Strassels S. Impact of irritable bowel syndrome on quality of life and resource use in the United States and United Kingdom. *Digestion* 1999;60:77-81
- 5 Svedlund J, Sjödin I, Dotevall G. GSRS a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. *Dig Dis Sc* 1988;33:129-134
- 6 张志雄,梁列新,侯晓华.冷应激对便秘型和腹泻型IBS患者内脏感觉影响的差异.基础医学与临床 2003;23(增刊):81-82
- 7 Drossman DA, Patrick DL, Whitehead WE, Toner BB, Diamant NE, Hu Y, Jia H, Bangdiwala SI. Further validation of life questionnaire. *Am J Gastroenterol* 2000;95:999-1000
- 8 詹丽杏,许国铭,李兆申,邹多武,尹宁.便秘型和腹泻型肠易激综合征患者胃窦十二指肠运动性改变.胃肠病学 2003;8(Suppl):A10
- 9 Kuemmerle JF, Murthy KS, Grider JR, Martin DC, Makhoul GM. Coexpression of 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors coupled to distinct signaling pathways in human intestinal muscle cells. *Gastroenterology* 1995;109:1791-1800
- 10 Tack J, Coulie B, Wilmer A, Andrioli A, Janssens J. Influence of sumatriptan on gastric fundus tone and on the perception of gastric distension in man. *Gut* 2000;46:468-473
- 11 Borman RA, Burleigh DE. 5-HT_{1D} and 5-HT_{2B} receptors mediate contraction of smooth muscle in human small intestine. *Ann NY Acad Sci* 1997;812:222-223
- 12 李兆申,詹丽杏,邹多武,许国铭,侯晓华,叶熙宇.肠易激综合征患者分泌5-羟色胺的肠神经细胞形态及功能的改变.中华消化杂志 2004;24:94-97

编辑 王谨晖 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

• 临床经验 •

精神、心理行为障碍对女性肠易激综合征与重叠功能性消化不良的影响

廖常奎,王佩秋

廖常奎,王佩秋,四川省妇幼保健院,妇女儿童医院内科
四川省成都市 610031
通讯作者:廖常奎,610031,四川省成都市金牛区抚琴西路338号,四川省妇幼保健院,妇女儿童医院内科. ckliao2004@126.com
电话:028-87738249 传真:02887735539
收稿日期:2005-06-10 接受日期:2005-06-13

摘要

目的:分析、比较女性不同年龄、职业、文化程度等因素对肠易激综合征(IBS)及重叠功能性消化不良(FD)发病率的影响。

方法:(1)根据罗马Ⅱ标准将103例符合诊断条件的女性IBS患者分为便秘型IBS(C-IBS)、腹泻型IBS(D-IBS)和交替型IBS(A-IBS),对其中43例伴有上消化道功能障碍的患者诊断为重叠FD,17例伴有尿频、尿急、排尿不尽感者诊断为IBS结肠外动力紊乱。(2)对所有患者按不同年龄、职业、学历分组,分析比较不同因素对各型IBS及重叠FD发病的影响。

结果:18-30岁年龄段较其他年龄段的发病率高,有显著性差异($\chi^2 = 22.68, P < 0.01$),C-IBS发生率较D-IBS和A-IBS高,有显著性差异($\chi^2 = 8.15, P < 0.05$);非体力职业

异常,但与IBS临床分型关系不大.最近肠神经内分泌细胞(又称EC细胞)分泌的5-羟色胺(5-HT)受到了重视.生理状态下自EC细胞释放的5-HT通过多种5-HT受体发挥致动力紊乱作用.肠道各种5-HT受体对平滑肌的作用是相反的.Kuemmerle *et al*^[9]研究表明,人类小肠平滑肌细胞中5-HT_{2A}受体介导收缩和5-HT₄受体介导舒张作用共存,以调节肠道运动的平衡.肠道5-HT_{1B/D}受体也是影响运动可能的作用位点^[10].有研究^[11]表明,5-HT介导的人类回肠的环肌收缩正是通过5-HT_{1D}受体起作用的;而纵肌层中5-HT介导的舒张是通过5-HT_{1B}受体起作用的.实验表明^[12]IBS患者5-HT的EC细胞数量明显增加,分泌功能状态活跃.腹泻型和便秘型IBS患者的肠道运动形式不同,可能与机体内上述各种5-HT受体的功能相互不协调有关.两种亚型患者的完全相反的大便性状和排便习惯是否和此两组患者体内5-HT受体的分布和比例不同相关,有待进一步研究.

目前对IBS着重于其流行病学的调查、发病机制的研究、某种新药的疗效观察等,一般从总体而不是分型进行研究.基于各型病理生理的不同应做分型研究,以更深入的认识这一疾病,指导临床用药.目前尚未有一种药物或一种疗法对IBS患者肯定有效,因此治疗上应遵循个体化原则,采取综合性治疗措施,包括饮食、心理治疗及药物治疗(可酌情选用调节肠道运动功能的药物、调节内脏感觉的药物、改善中枢情感的药物、胃肠微生态制剂及中药等).

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 Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 1999;45:II43-II47
- 3 尉秀清,陈晏湖,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
- 4 Hahn BA, Yan S, Strassels S. Impact of irritable bowel syndrome on quality of life and resource use in the United States and United Kingdom. *Digestion* 1999;60:77-81
- 5 Svedlund J, Sjödin I, Dotevall G. GSRS a clinical rating scale for gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome and peptic ulcer disease. *Dig Dis Sc* 1988;33:129-134
- 6 张志雄,梁列新,侯晓华.冷应激对便秘型和腹泻型IBS患者内脏感觉影响的差异.基础医学与临床 2003;23(增刊):81-82
- 7 Drossman DA, Patrick DL, Whitehead WE, Toner BB, Diamant NE, Hu Y, Jia H, Bangdiwala SI. Further validation of life questionnaire. *Am J Gastroenterol* 2000;95:999-1000
- 8 詹丽杏,许国铭,李兆申,邹多武,尹宁.便秘型和腹泻型肠易激综合征患者胃窦十二指肠运动性改变.胃肠病学 2003;8(Suppl):A10
- 9 Kuemmerle JF, Murthy KS, Grider JR, Martin DC, Makhoul GM. Coexpression of 5-HT_{2A} and 5-HT₄ receptors coupled to distinct signaling pathways in human intestinal muscle cells. *Gastroenterology* 1995;109:1791-1800
- 10 Tack J, Coulie B, Wilmer A, Andrioli A, Janssens J. Influence of sumatriptan on gastric fundus tone and on the perception of gastric distension in man. *Gut* 2000;46:468-473
- 11 Borman RA, Burleigh DE. 5-HT_{1D} and 5-HT_{2B} receptors mediate contraction of smooth muscle in human small intestine. *Ann NY Acad Sci* 1997;812:222-223
- 12 李兆申,詹丽杏,邹多武,许国铭,侯晓华,叶熙宇.肠易激综合征患者分泌5-羟色胺的肠神经细胞形态及功能的改变.中华消化杂志 2004;24:94-97

编辑 王谨晖 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

• 临床经验 •

精神、心理行为障碍对女性肠易激综合征与重叠功能性消化不良的影响

廖常奎,王佩秋

廖常奎,王佩秋,四川省妇幼保健院,妇女儿童医院内科
四川省成都市 610031
通讯作者:廖常奎,610031,四川省成都市金牛区抚琴西路338号,四川省妇幼保健院,妇女儿童医院内科. ckliao2004@126.com
电话:028-87738249 传真:02887735539
收稿日期:2005-06-10 接受日期:2005-06-13

摘要

目的:分析、比较女性不同年龄、职业、文化程度等因素对肠易激综合征(IBS)及重叠功能性消化不良(FD)发病率的影响。

方法:(1)根据罗马Ⅱ标准将103例符合诊断条件的女性IBS患者分为便秘型IBS(C-IBS)、腹泻型IBS(D-IBS)和交替型IBS(A-IBS),对其中43例伴有上消化道功能障碍的患者诊断为重叠FD,17例伴有尿频、尿急、排尿不尽感者诊断为IBS结肠外动力紊乱。(2)对所有患者按不同年龄、职业、学历分组,分析比较不同因素对各型IBS及重叠FD发病的影响。

结果:18-30岁年龄段较其他年龄段的发病率高,有显著性差异($\chi^2 = 22.68, P < 0.01$),C-IBS发生率较D-IBS和A-IBS高,有显著性差异($\chi^2 = 8.15, P < 0.05$);非体力职业

和高中及大中专学历发病率比相应同组其他患者比较高,有显著性差异($\chi^2 = 11.68$, $\chi^2 = 12.88$, $P < 0.05$).影响发病的因素还有婚姻、就业等状况所引起的精神、心理行为障碍.

结论: IBS重叠FD在18-30年龄段、非体力职业和中等文化程度的女性有比较高的发病率,各型IBS中C-IBS的发病率最高,与重叠FD关系较密切,其病理生理机制主要是胃肠道动力障碍.

廖常奎, 王佩秋. 精神、心理行为障碍对女性肠易激综合征与重叠功能性消化不良的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1927-1930
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1927.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是目前最常见的功能性胃肠道疾病之一,发病以女性为主,高发年龄在20-50岁,可对患者的工作、学习、交往及生活质量产生重大影响.本病的临床特征是腹痛或腹部不适伴有排便习惯改变,缺乏形态学和生化指标的异常,可与其他功能性胃肠疾病(functional gastrointestinal disorders, FGIDs)重叠,出现胃肠道动力障碍和功能性消化不良(functional dyspepsia, FD),症状与消化系统器质性疾病相比无特异性区别.在我院内科门诊IBS患者的就诊率约占8-10%,其中部分患者表现有重叠FD症状.由于精神或情感(心理)障碍对IBS发病起着重要作用,因而女性在本病中占有特殊地位.根据我们收集的资料,以下对影响发病的有关因素作一分析讨论.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2003-06/2004-10在我院内科门诊就诊的283例有腹痛、腹胀,排便习惯、次数和性状异常症状的女性患者,参照IBS诊断的“罗马II标准”^[1],即腹痛/不适伴排便异常同时存在,症状累计(不一定连续) ≥ 12 wk/a,便后缓解等条件,从中筛选出103例符合IBS诊断条件者.患者年龄18-82岁,平均35.3岁,病程1-23 a,平均28.25 mo,按罗马II标准分为便秘型IBS(C-IBS)58例,腹泻型IBS(D-IBS)19例,便秘、腹泻交替型IBS(A-IBS)26例.所有病例均经临床和实验室检查除外肝、胆、胰及胃肠道器质性疾病,无糖尿病、甲状腺功能亢进等内分泌疾病,无腹部手术史. FD病例选择:按“罗马II标准”对FD的诊断标准^[2],在上述疾病基础上将以下症状累计(不一定连续) ≥ 12 wk/a者纳入重叠FD诊断病例:(1)持续性或再发性集中于上腹部的疼痛或不适样的消化不良;(2)缺乏可以解释症状的器质性疾病存在的依据;(3)消化不良症状不能通过排便缓解或与排便频率和形状改变无关.具备以上诊断条件者43例,患者多伴有不同程度焦虑、忧郁、失眠、压力过重及不良生活事件史者.

1.2 方法

1.2.1 将103例IBS患者按年龄分为18-30、31-40、41-50、51-60和61-82岁等5个年龄段(组),在各组与各型IBS及重叠FD者间列表,对各年龄段、各型IBS及重叠FD的发生率差异进行分析比较,同时对有尿频、尿急、排尿不尽感等膀胱刺激征症状者进行统计.18-30岁年龄段重叠FD者20例,占19.41%,以大龄未婚青年居多;28岁以上未婚者32例,占59.26%,其中重叠FD 22例,占68.75%.因61-82岁年龄段仅为3例,故合为一组.

1.2.2 根据职业将所有病例分为非体力、体力和其他组,病例各为60例,27例和16例,分别占50.49%,33.98%和15.53%;重叠FD者各为25例,11例和7例,分别占24.27%,10.68%和6.80%.其他人员组的职业主要为家庭妇女、经商或待业人员.根据学历文化程度将所有病例分为初中及以下,高中、大中专和大学组,病例各为18例,69例和16例,分别占16.50%,66.99%和15.53%;其中重叠FD者各为4例,32例和7例.高中、大中专组中下岗人员38例,占54.29%,重叠FD16例,占50%.由此分析、讨论各职业、学历对各型IBS和重叠FD发生率的影响和关系.

统计学处理 组间差异采用 t 和 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 年龄对发病的影响 18-30岁年龄段各型IBS及重叠FD病例各为35,12,7和20例,发病率分别为33.98%,11.65%,6.80%和19.41%,明显高于其他各年龄段,有高度显著性差异($\chi^2 = 22.68$, $P < 0.01$).大龄未婚者在该组比例较大,重叠FD比例高.不同年龄段各型IBS中C-IBS为58例,占56.31%,较其他各型有显著性差异($\chi^2 = 8.15$, $P < 0.05$) (表1).

2.2 职业、学历文化程度对发病的影响 非体力职业各型IBS及重叠FD的病例数各为35,10,15和25例,分别占33.98%,9.71%,14.56%和24.27%.该组IBS患者合计60例,占58.25%,与体力和其他组比较有显著性差异($\chi^2 = 11.68$, $P < 0.05$) (表2,图1).高中及大中专学历中各型IBS及重叠FD病例各为39,13,17和32例,分别占37.86%,12.62%,16.50%和31.07%,该组IBS患者合计69例,占66.99%,比其他学历组有明显统计学意义($\chi^2 = 12.88$, $P < 0.05$) (表2,图2).

3 讨论

IBS具有较高的人群患病率,国内北京市按Manning标准和罗马标准分别为7.26%和0.82%,其中仅20%患者频繁就诊^[3],广东地区IBS患病率为5.67%(罗马II标准),普通内科门诊及消化专科门诊中IBS患者分别占10.1%和34.3%^[4];国外北美地区人群IBS患病率约为10-15%,女性和男性比率为2:1^[5].因其高发病率和占用巨大的医疗

表1 年龄段与各型IBS及重叠FD发生率(%)的关系

年龄	n	C-IBS	D-IBS	A-IBS	重叠FD	膀胱刺激征
18-30	54(52.42)	35(33.98) ^{ab}	12(11.65) ^b	7(6.80) ^b	20(19.41) ^b	7(6.80)
31-40	22(21.36)	11(10.68) ^a	2(1.94)	9(8.74)	8(7.76)	3(2.91)
41-50	11(10.68)	4(3.88) ^a	2(1.94)	5(4.85)	7(6.80)	2(1.91)
51-60	13(12.62)	6(5.83) ^a	3(2.91)	4(3.88)	6(5.83)	5(4.85)
61-82	3(2.91)	2(1.91) ^a	0(0.0)	1(0.97)	2(1.94)	0(0.0)
合计	103(100.00)	58(56.31)	19(18.45)	26(25.24)	43(41.75)	17(16.50)

^a $P < 0.05$ vs D-IBS和A-IBS组; ^b $P < 0.01$ vs其他组.

表2 职业、学历与各型IBS及重叠FD发生率(%)比较

分型	非体力	体力	其他职业	初中及以下	高中及大中专	大学
C-IBS	35(33.98) ^a	15(14.56)	10(9.71)	11(10.68)	39(37.86) ^c	8(7.77)
D-IBS	10(9.71) ^a	7(6.80)	4(3.88)	2(1.94)	13(12.62) ^c	5(4.85)
A-IBS	15(14.56) ^a	5(4.85)	2(1.94)	5(4.85)	17(16.50) ^c	3(2.91)
合计	60(58.25) ^a	27(26.21)	16(15.53)	18(17.48)	69(66.99) ^c	16(15.53)
重叠FD	25(24.27) ^a	11(10.68)	7(6.80)	4(3.88)	32(31.07) ^c	7(6.80)

^a $P < 0.05$ vs体力与其他职业组; ^c $P < 0.05$ vs初中及以下和大学组.

资源,在美国已成为医疗保健系统的重大负担^[6].本病包括三类症状^[7]:一类是与结肠相关的症状,如腹痛伴排便困难、排便急迫、排便不尽感,腹痛伴腹泻、黏液便等;第二类是消化道症状,包括上、下消化道;第三类是结肠邻近器官症状,包括尿频、尿急、排尿不尽感、痛经等.这些临床症状的病理生理实质是一种由神经支配调节障碍导致的动力障碍或感觉疾病. Camilleri *et al*^[8]认为这种动力障碍不仅限于结肠,还常涉及全胃肠道甚至胆道、呼吸道、膀胱等器官.近年来还有学者观察到IBS和FD的症状有许多重叠,有时不截然分开,而主张把IBS的症状扩大到上消化道,甚至称为“易激胃肠道”(irritable gut)^[9-10]. Agreus^[11]报道有23-27%的FD患者伴发IBS,反之29-90%的IBS患者同时存在FD.本研究显示了103例IBS患者伴随动力障碍症状的频率:43例患者有上腹胀满、早饱、胃气胀、嗝气、恶心等症状,饭后明显,说明IBS确可伴随或重叠FD症状,二者可能同属胃肠功能紊乱性疾病,

但其症状各有侧重,依表现在结肠或伴随于上消化道,而应该考虑为IBS或重叠FD;17例患者有尿频、尿急和排尿不尽感症状,这与国外学者的观察报道^[8]一致,推测可能与平滑肌痉挛有关,也说明IBS的动力紊乱可超出结肠范围.

目前比较公认的观点认为IBS及FD的发病与抑郁、焦虑、紧张等精神心理因素相关^[12].胃肠动力障碍性疾病(disorders of gastrointestinal motility, DGIM)新分类(曼谷分类)体系中还提出了“心因性动力病”概念,从神经胃肠病学角度将与心身疾病相关的情感综合征,如抑郁、焦虑、疑病和应激诱发的疾病等^[13]归入此范畴.根据我们的观察,影响IBS及伴随重叠FD的心理行为因素有以下方面:(1)18-30岁年龄段发病率最高,此年龄段患者面临的就业和竞争压力大,恋爱、婚姻等情感障碍问题及生活不良事件较多,因此常有精神、心理情绪波动,焦虑、忧郁、失眠症状出现频率高.(2)从事非体力劳动职业及高中、大中专学历者发病率高,

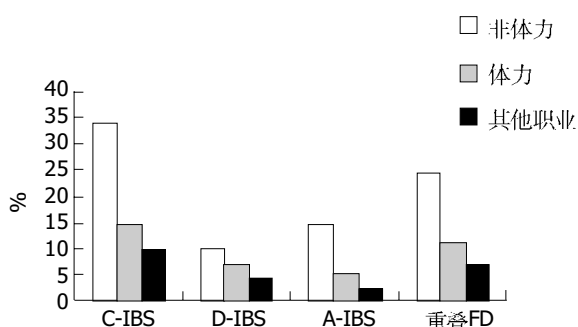


图1 女性不同职业组发生IBS及重叠FD关系图.

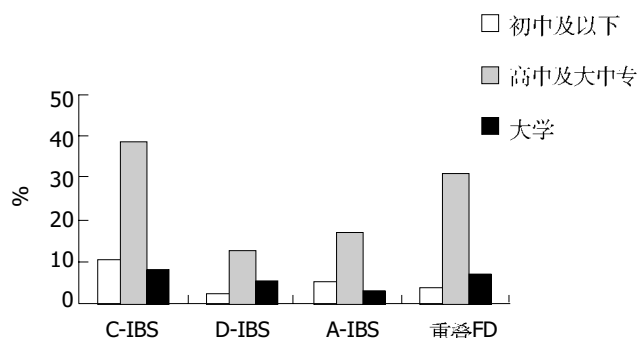


图2 女性不同学历组发生IBS及重叠FD关系图.

这与她们的焦虑、抑郁、慢性社会应急事件等发生频度高或社会文化因素、精神心理行为不健康有较密切关系,后者在我们的统计中下岗和待业人员比例也较多。同时,18-30岁年龄段的患者从事非体力劳动职业和具有高中、大中专学历者较多,说明这些因素对精神、心理行为障碍和IBS平滑肌动力紊乱影响的一致性。

此外,我们的资料还表明各型IBS患者中以便秘和腹痛为主要症状的C-IBS发病率高,并与重叠FD发生率关系密切。事实上当C-IBS重叠FD时,具有共同的神经胃肠病学基础,胃肠道神经系统、自主神经系统和中枢神经系统等对胃肠分泌、运动功能以及内脏感觉的调节作用发生紊乱而导致胃肠道动力障碍,表现为2-4次/分的慢波出现频率明显增加,胃肠道蠕动减慢,节段性收缩运动加强,水分吸收过度,结果使肠内容物推进减慢,患者出现腹痛、腹胀或腹部不适并产生便秘。因此,C-IBS与FD是一种神经系统功能异常所致的胃肠道动力障碍性疾病,精神应激和情绪心理因素、食物变态反应是重要的诱发因素,并且可以加重这种病理生理改变。

女性在本病的发病中具有重要地位,其病因是多因素的,既有生物性的,也有生理和社会性的,本文的研究着点在于后者对发病的影响。患者的年龄、职业、文化程度、婚姻、工作以及生活情况等因素对发病的影响都具有统计学意义,在临床实践中将此作为参数并认真仔细分析病史往往可以做出正确的诊断,以减少不必要的检查,这符合本病的临床特征和节省卫生资源经济学原则,同样可以提高诊断的灵敏性。

4 参考文献

- 1 Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 1999;45(Suppl 2):II43-47
- 2 Talley NJ, Stanghellini V, Heading RC, Koch KL, Malagelada JR, Tytgat GN. Functional gastroduodenal disorders. *Gut* 1999;45(Suppl 2):II37-42
- 3 潘国宗,鲁素彩,柯美云,韩少梅,郭忠平,方秀才. 北京地区肠易激综合症的流行病学研究:一个整群、分层、随机的调查. *中华流行病学杂志* 2000;21:26-29
- 4 熊理守,陈旻湖,陈惠新,许岸高,王伟岸,胡品津. 广东省社区人群肠易激综合症的流行病学研究. *中华医学杂志* 2004;84:278-281
- 5 Saito YA, Schoenfeld P, Locke GR. The epidemiology of irritable bowel syndrome in North America: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1910-1915
- 6 Leong SA, Barghout V, Birnbaum HG, Thibeault CE, Ben-Hamadi R, Frech F, Ofman JJ. The economic consequences of irritable bowel syndrome: a US employer perspective. *Arch Intern Med* 2003;163:929-935
- 7 潘国宗,鲁素彩,韩少梅. 肠易激综合征症状学诊断标准的研究. *中华内科杂志* 1999;38:81-84
- 8 Camilleri M, Heading RC, Thompson WG. Clinical perspectives, mechanisms, diagnosis and management of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1407-1430
- 9 Agreus L, Svardsudd K, Nyren O, Tibblin G. Irritable bowel syndrome and dyspepsia in the general population: overlap and lack of stability over time. *Gastroenterology* 1995;109:671-680
- 10 Longstreth GF. Irritable bowel syndrome. Diagnosis in the managed care era. *Dig Dis Sci* 1997;42:1105-1111
- 11 Agreus L. Natural history of dyspepsia. *Gut* 2002;50(Suppl 4):iv2-9
- 12 李定国,刘栋. 加强肠易激综合症的流行病学研究. *中华消化杂志* 2004;24:257-258
- 13 Wingate D, Hongo M, Kellow J, Lindberg G, Smout A. Disorders of gastrointestinal motility: towards a new classification. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl):S1-14

编辑 王谨晖 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

• 临床经验 •

热休克蛋白-抗原肽复合物疫苗对肝癌术后患者细胞免疫功能的影响

赵子渊,崔建东,龙桂宁,高毅

赵子渊,崔建东,龙桂宁,中国人民解放军第三〇三医院肿瘤科 广西省南宁市 530021
高毅,南方医科大学附属珠江医院普通外科 广东省广州市 510282
通讯作者:赵子渊,530021,广西省南宁市植物路52号,中国人民解放军第三〇三医院肿瘤科. no0@163.com
电话:0771-2870133 传真:0771-2837672
收稿日期:2005-05-19 接受日期:2005-06-08

摘要

目的:探讨热休克蛋白(HSP)-抗原肽复合物疫苗对肝癌术

后患者细胞免疫功能的影响。

方法:回顾性分析57例应用HSP疫苗的原发性肝癌患者,并检测治疗前后T细胞亚群、NK细胞活性和血清白介素(IL)-2受体水平的变化,并与对照组比较。

结果:治疗组术后3 mo CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 水平分别为 62.8 ± 12.4 , 46.5 ± 11.2 , 0.61 ± 0.17 与术前和对照组比较有显著性差异($P < 0.05$),NK细胞活性治疗后升

这与她们的焦虑、抑郁、慢性社会应急事件等发生频度高或社会文化因素、精神心理行为不健康有较密切关系,后者在我们的统计中下岗和待业人员比例也较多。同时,18-30岁年龄段的患者从事非体力劳动职业和具有高中、大中专学历者较多,说明这些因素对精神、心理行为障碍和IBS平滑肌动力紊乱影响的一致性。

此外,我们的资料还表明各型IBS患者中以便秘和腹痛为主要症状的C-IBS发病率高,并与重叠FD发生率关系密切。事实上当C-IBS重叠FD时,具有共同的神经胃肠病学基础,胃肠道神经系统、自主神经系统和中枢神经系统等对胃肠分泌、运动功能以及内脏感觉的调节作用发生紊乱而导致胃肠道动力障碍,表现为2-4次/分的慢波出现频率明显增加,胃肠道蠕动减慢,节段性收缩运动加强,水分吸收过度,结果使肠内容物推进减慢,患者出现腹痛、腹胀或腹部不适并产生便秘。因此,C-IBS与FD是一种神经系统功能异常所致的胃肠道动力障碍性疾病,精神应激和情绪心理因素、食物变态反应是重要的诱发因素,并且可以加重这种病理生理改变。

女性在本病的发病中具有重要地位,其病因是多因素的,既有生物性的,也有生理和社会性的,本文的研究着点在于后者对发病的影响。患者的年龄、职业、文化程度、婚姻、工作以及生活情况等因素对发病的影响都具有统计学意义,在临床实践中将此作为参数并认真仔细分析病史往往可以做出正确的诊断,以减少不必要的检查,这符合本病的临床特征和节省卫生资源经济学原则,同样可以提高诊断的灵敏性。

4 参考文献

- 1 Thompson WG, Longstreth GF, Drossman DA, Heaton KW, Irvine EJ, Muller-Lissner SA. Functional bowel disorders and functional abdominal pain. *Gut* 1999;45(Suppl 2):II43-47
- 2 Talley NJ, Stanghellini V, Heading RC, Koch KL, Malagelada JR, Tytgat GN. Functional gastroduodenal disorders. *Gut* 1999;45(Suppl 2):II37-42
- 3 潘国宗,鲁素彩,柯美云,韩少梅,郭忠平,方秀才. 北京地区肠易激综合症的流行病学研究:一个整群、分层、随机的调查. *中华流行病学杂志* 2000;21:26-29
- 4 熊理守,陈旻湖,陈惠新,许岸高,王伟岸,胡品津. 广东省社区人群肠易激综合症的流行病学研究. *中华医学杂志* 2004;84:278-281
- 5 Saito YA, Schoenfeld P, Locke GR. The epidemiology of irritable bowel syndrome in North America: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1910-1915
- 6 Leong SA, Barghout V, Birnbaum HG, Thibeault CE, Ben-Hamadi R, Frech F, Ofman JJ. The economic consequences of irritable bowel syndrome: a US employer perspective. *Arch Intern Med* 2003;163:929-935
- 7 潘国宗,鲁素彩,韩少梅. 肠易激综合征症状学诊断标准的研究. *中华内科杂志* 1999;38:81-84
- 8 Camilleri M, Heading RC, Thompson WG. Clinical perspectives, mechanisms, diagnosis and management of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1407-1430
- 9 Agreus L, Svardsudd K, Nyren O, Tibblin G. Irritable bowel syndrome and dyspepsia in the general population: overlap and lack of stability over time. *Gastroenterology* 1995;109:671-680
- 10 Longstreth GF. Irritable bowel syndrome. Diagnosis in the managed care era. *Dig Dis Sci* 1997;42:1105-1111
- 11 Agreus L. Natural history of dyspepsia. *Gut* 2002;50(Suppl 4):iv2-9
- 12 李定国,刘栋. 加强肠易激综合症的流行病学研究. *中华消化杂志* 2004;24:257-258
- 13 Wingate D, Hongo M, Kellow J, Lindberg G, Smout A. Disorders of gastrointestinal motility: towards a new classification. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl):S1-14

编辑 王谨晖 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

• 临床经验 •

热休克蛋白-抗原肽复合物疫苗对肝癌术后患者细胞免疫功能的影响

赵子渊,崔建东,龙桂宁,高毅

赵子渊,崔建东,龙桂宁,中国人民解放军第三〇三医院肿瘤科
广西省南宁市 530021
高毅,南方医科大学附属珠江医院普通外科 广东省广州市 510282
通讯作者:赵子渊,530021,广西省南宁市植物路52号,中国人民解放军第三〇三医院肿瘤科. no0@163.com
电话:0771-2870133 传真:0771-2837672
收稿日期:2005-05-19 接受日期:2005-06-08

摘要

目的:探讨热休克蛋白(HSP)-抗原肽复合物疫苗对肝癌术

后患者细胞免疫功能的影响。

方法:回顾性分析57例应用HSP疫苗的原发性肝癌患者,并检测治疗前后T细胞亚群、NK细胞活性和血清白介素(IL)-2受体水平的变化,并与对照组比较。

结果:治疗组术后3 mo CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_4^+/CD_8^+ 水平分别为 62.8 ± 12.4 , 46.5 ± 11.2 , 0.61 ± 0.17 与术前和对照组比较有显著性差异($P < 0.05$),NK细胞活性治疗后升

高 41.3 ± 7.1 , 较治疗前明显升高 ($P < 0.01$). 血清 IL-2 受体水平治疗后略升高 $7.8 \pm 1.0 \mu\text{g/L}$, 与治疗前对比无显著性差异.

结论: 肝癌术后应用热休克蛋白-抗原肽复合物疫苗能明显提高患者免疫功能.

赵子胤, 崔建东, 龙桂宁, 高毅. 热休克蛋白-抗原肽复合物疫苗对肝癌术后患者细胞免疫功能的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1930-1932
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1930.asp

0 引言

恶性肿瘤的免疫疗法已经成为继手术、放化疗之后的又一重要综合治疗手段, 随着特异性肿瘤抗原的发现和研究的进展, 应用肿瘤特异性抗原进行人类恶性肿瘤的治疗已成为一个重要方向. 大量研究证明, 肿瘤来源的热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 有明显的抗肿瘤作用. 我们对 2000-10/2001-03 我院外科住院肝癌患者 57 例进行了追踪研究.

1 材料和方法

1.1 材料 2000-10/2001-03 我院外科住院肝癌患者 57 例, 治疗组共 32 例, 男 22 例, 女 10 例, 年龄 54.5 ± 13.2 岁, I 期 10 例, II 期 17 例, III 期 5 例; 对照组共 25 例, 男 18 例, 女 7 例, 年龄 51.8 ± 14.7 岁, I 期 7 例, II 期 12 例, III 期 6 例. 全组肝功能 Child A 级 21 例、B 级 36 例, HBsAg 阳性 31 例, AFP $\geq 400 \text{ ng/mL}$ 16 例, 伴轻度腹水 7 例. 诊断及分期标准参照“第四届全国肝癌学术会议”. 所有患者随机分为治疗和对照组, 两组均衡性比较在年龄、肿瘤大小、肿瘤分期和肝功能上无差别.

1.2 方法 两组患者均择期手术, 术式均为不规则肝叶切除术, 手术完整切除肿瘤, 肿瘤大小 4-13 cm, 术中未发现肿瘤转移, 病理证实均为肝细胞癌. HSP-肽复合物疫苗由第四军医大学肿瘤研究所惠赠. 术后第 1 mo 每周 1 次, 每次 $10 \mu\text{g}$, 连续 4 次; 第 2 mo 每 10 d 1 次, 连续 3 次; 以后每半个月 1 次, 持续 1 a. 对照组注射生理盐水, 方法同治疗组. 观察指标: (1) 全身及注射局部反应; (2) 患者 3 a 生存率、复发率; (3) T 淋巴细胞亚群检测 (CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$): 术前、术后 3 mo 分别抽取外周静脉血采用碱性磷酸酶桥联免疫酶标法 (APAAP) 测定 (军事医学科学院生物制剂发展中心提供试剂); (4) 血清 IL-2 受体测定采用双抗体夹心法, 试剂盒由广西医科大学免疫室供给, 操作按说明书; (5) Cr^{51} 释放试验测定自然杀伤细胞 (NK) 活性 (中国原子能研究所产品).

统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件包, 计量资料比较应用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 术后 3 mo HSP-抗原肽复合物对患者 T 淋巴细胞免疫功能的影响 可见治疗组 CD_3^+ 、 CD_8^+ 均明显升高

($P < 0.05$), $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 比值下降 ($P < 0.05$); 对照组治疗前后无明显变化 (表 1). 治疗组术后 6 mo、1 a、3 a CD_8^+ 分别为 48.3 ± 12.6 , 45.1 ± 11.5 , 45.8 ± 12.1 , 与 3 mo 比较均无明显差异; 对照组分别为 27.5 ± 9.2 , 26.0 ± 8.8 , 24.3 ± 8.1 , 与治疗组比较有显著性差异 ($P < 0.05$). CD_3^+ , CD_4^+ , $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 治疗组与对照组术后 6 mo、1 a、3 a 比较均无显著性差异.

表 1 两组治疗前, 治疗后 3 mo T 淋巴细胞免疫功能变化 (%)

免疫指标	治疗组 ($n = 32$)		对照组 ($n = 25$)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
CD_3^+	50.4 ± 13.1^a	62.8 ± 12.4^a	52.0 ± 11.7	53.1 ± 14.4
CD_4^+	24.5 ± 9.6	25.7 ± 8.8	21.2 ± 6.9	22.8 ± 6.5
CD_8^+	26.4 ± 9.5^b	46.5 ± 11.2^b	24.2 ± 7.7	23.6 ± 7.4
$\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$	0.92 ± 0.23^a	0.61 ± 0.17^a	0.96 ± 0.21	0.97 ± 0.30

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 治疗前.

2.2 HSP-肽复合物对肝癌切除术后患者生存率及肿瘤复发率的影响 术后 3 a 治疗组总生存率升高, 总复发率明显降低, 与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$) (表 2). 术后 1, 2 a 治疗组总生存率分别为 94%, 81%, 总复发率分别为 9%, 22%, 对照组总生存率分别为 92%, 76%, 总复发率分别为 8%, 28%, 两组比较均无显著性差异.

表 2 两组肝癌切除术后 3 a 生存率、肿瘤复发率比较 (%)

分期	治疗组			对照组		
	n	生存率	复发率	n	生存率	复发率
I	10	90.0	20.0	7	71.4	42.9
II	17	64.7	35.3	12	50.0	58.3
III	5	40.0	80.0	6	33.3	83.3
总计	32	68.8 ^a	37.5 ^b	25	52.0 ^a	60.0 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

2.3 NK 细胞活性 治疗后升高 41.3 ± 7.1 , 与治疗前比较有显著性差异 ($P < 0.05$). 血清 IL-2 受体水平治疗后略升高 $7.8 \pm 1.0 \mu\text{g/L}$, 治疗组与对照组, 治疗前后对比均无显著性差异.

2.4 不良反应 全组患者无明显头痛, 胸闷, 恶心, 血液学毒性, 肝功能受损等不良反应发生, 仅治疗组 1 例于注射后 1 d 出现轻度发热, 未予治疗自行缓解.

3 讨论

原发性肝癌的治疗一直是肝脏外科的难题. 虽然近年来已经取得了许多进展, 但患者预后仍不理想, 国内报道直径小于 4 cm 的肝癌术后 5 a 复发率仍高达 60% 左右^[1-2],

其中一个重要原因是:肝脏血流丰富,40~60%的病例手术时肝内已经存在未被发现的微小转移灶,因此,如何控制肝癌术后的复发和转移是提高生存率的关键^[3].近来肝癌肿瘤疫苗的研制对于提高患者特异性免疫功能来预防和治疗术后复发起到了积极的作用.HSP-肽复合物疫苗是HSP结合了多态性肿瘤多肽片段的复合物,其诱导免疫特异性由其结合的多肽特异性决定,可诱导机体产生对其来源细胞具有杀伤活性的CD₈⁺细胞毒T淋巴细胞(CTL)反应,且可激活多个CTL克隆株,因此可以实现对同一肿瘤内的所有细胞产生杀伤效果^[4].

原发性肝癌患者的免疫功能低下已为多数研究和临床观察所证实,而原发性肝癌术后患者的免疫功能由于手术和麻醉的影响更低^[5].多数实验研究表明,CD₈⁺细胞不仅参与了对肿瘤的直接杀伤作用,而且也参与了肿瘤杀伤的免疫调节、传递抗肿瘤信息、稳定免疫细胞表面受体,起到调动机体多种免疫功能、促进免疫细胞的协同抗肿瘤作用.NK细胞是一种自然细胞毒杀伤细胞,对体内多种细胞,特别是T、B淋巴细胞有调节作用,在肿瘤免疫调节中起重要作用,可作为监测肿瘤细胞免疫功能的指标.其水平低下,易导致肿瘤的发生和发展.本研究表明,HSP疫苗在注射3 mo后即可明显诱导CD₈⁺T淋巴细胞产生CTL反应,而对照组则未见CD₈⁺升高($P<0.05$).术后6 mo,1 a,3 a复测发现CD₈⁺及NK活性无明显变化,证明HSP疫苗可产生持久的特异性免疫反应^[6-7].本研究还发现,患者注射HSP疫苗后血清IL-2R受体水平并不升高,说明HSP疫苗的机制是激活抗肿瘤的CTL反应.另外,本组

部分病例术后的肝脏穿刺病理结果也证实,治疗组复发肿瘤灶周围存在大量淋巴细胞浸润,说明HSP疫苗有针对肿瘤细胞产生特异性杀伤免疫细胞的作用.

总之,在临床应用中,经肝癌HSP疫苗激活的CD₈⁺T淋巴细胞能提高原发性肝癌患者NK细胞活性,并能在一定程度上发挥对肿瘤细胞的杀伤效应,预示HSP疫苗在原发性肝癌患者的治疗方面具有一定的价值和应用前景,尤其在免疫功能低下的原发性肝癌术后患者,能明显提高其杀伤性T淋巴细胞活性,对预防复发和提高远期疗效可能起到一定作用.

4 参考文献

- 1 南克俊,景钊,张璐战,阮之平,郭序,徐瑞.中晚期肝癌不同治疗方案疗效观察.第四军医大学学报 2004;25:62-63
- 2 李锦清.降低肝癌以除术后复发率的措施.中华肝胆病杂志 2000;8:177
- 3 Zhou XP, Wang HY, Yang GS, Chen ZJ, Li BA, Wu MC. Cloning and expression of MXR7 gene in human HCC tissue. *World J Gastroenterol* 2000;6:57-60
- 4 陈罡,罗殿中,冯震博,郭芳.肝癌患者肝局部细胞免疫状态与预后的关系.世界华人消化杂志 2005;13:489-494
- 5 邱健,李国威,隋延仿,宋宏萍,司少艳,葛伟.热休克肿瘤细胞抗原负载的树突状细胞疫苗对原位接种结肠肿瘤的免疫预防作用.世界华人消化杂志 2005;13:635-639
- 6 陈继营,袁玫,卢世璧.预防肿瘤术后复发和转移的最新方法:热休克蛋白肽复合物疫苗的研究与应用(英文).中国临床康复 2002;6:913-914
- 7 Faure O, Graff-Dubois S, Bretaudeau L, Derre L, Gross DA, Alves PM, Cornet S, Duffour MT, Chouaib S, Miconnet I, Gregoire M, Jotereau F, Lemonnier FA, Abastado JP, Kosmatopoulos K. Inducible Hsp70 as target of anticancer immunotherapy: Identification of HLA-A*0201-restricted epitopes. *Int J Cancer* 2004;108:863-870

编辑 王谨晖 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

• 临床经验 •

援生力维和小剂量抗抑郁药治疗难治性肠易激综合征 32 例

寇学斌

寇学斌,商丘市第一人民医院消化科 河南省商丘市 476100
通讯作者:寇学斌,476100,河南省商丘市,商丘市第一人民医院消化科.
电话:0370-3255548
收稿日期:2005-06-23 接受日期:2005-06-28

摘要

目的:观察援生力维和小剂量抗抑郁药治疗难治性肠易激综合征(IBS)的临床疗效.

方法:参照罗马 II 标准,选择 64 例 IBS 患者,随机分成

治疗组和对照组,每组 32 例.两组均给予谷维素(20 mg, po, tid)、匹维溴胺(50 mg, po, tid).治疗组加用援生力维(200 mg, po, tid)、氟西汀或帕罗西汀(20 mg, po, qd),疗程 8 wk.观察治疗前后 IBS 腹痛、腹泻、便秘、腹胀的情况.

结果:治疗组 4 wk 末总有效率 71.9%,8 wk 末总有效率 84.4%;8 wk 末腹痛缓解率 86.7%,腹泻缓解率 81.0%,便秘缓解率 78.6%,腹胀缓解率 81.3%.无明显不良反应.

其中一个重要原因是:肝脏血流丰富,40~60%的病例手术时肝内已经存在未被发现的微小转移灶,因此,如何控制肝癌术后的复发和转移是提高生存率的关键^[3].近来肝癌肿瘤疫苗的研制对于提高患者特异性免疫功能来预防和治疗术后复发起到了积极的作用.HSP-肽复合物疫苗是HSP结合了多态性肿瘤多肽片段的复合物,其诱导免疫特异性由其结合的多肽特异性决定,可诱导机体产生对其来源细胞具有杀伤活性的CD₈⁺细胞毒T淋巴细胞(CTL)反应,且可激活多个CTL克隆株,因此可以实现对同一肿瘤内的所有细胞产生杀伤效果^[4].

原发性肝癌患者的免疫功能低下已为多数研究和临床观察所证实,而原发性肝癌术后患者的免疫功能由于手术和麻醉的影响更低^[5].多数实验研究表明,CD₈⁺细胞不仅参与了对肿瘤的直接杀伤作用,而且也参与了肿瘤杀伤的免疫调节、传递抗肿瘤信息、稳定免疫细胞表面受体,起到调动机体多种免疫功能、促进免疫细胞的协同抗肿瘤作用.NK细胞是一种自然细胞毒杀伤细胞,对体内多种细胞,特别是T、B淋巴细胞有调节作用,在肿瘤免疫调节中起重要作用,可作为监测肿瘤细胞免疫功能的指标.其水平低下,易导致肿瘤的发生和发展.本研究表明,HSP疫苗在注射3 mo后即可明显诱导CD₈⁺T淋巴细胞产生CTL反应,而对照组则未见CD₈⁺升高($P<0.05$).术后6 mo,1 a,3 a复测发现CD₈⁺及NK活性无明显变化,证明HSP疫苗可产生持久的特异性免疫反应^[6-7].本研究还发现,患者注射HSP疫苗后血清IL-2R受体水平并不升高,说明HSP疫苗的机制是激活抗肿瘤的CTL反应.另外,本组

部分病例术后的肝脏穿刺病理结果也证实,治疗组复发肿瘤灶周围存在大量淋巴细胞浸润,说明HSP疫苗有针对肿瘤细胞产生特异性杀伤免疫细胞的作用.

总之,在临床应用中,经肝癌HSP疫苗激活的CD₈⁺T淋巴细胞能提高原发性肝癌患者NK细胞活性,并能在一定程度上发挥对肿瘤细胞的杀伤效应,预示HSP疫苗在原发性肝癌患者的治疗方面具有一定的价值和应用前景,尤其在免疫功能低下的原发性肝癌术后患者,能明显提高其杀伤性T淋巴细胞活性,对预防复发和提高远期疗效可能起到一定作用.

4 参考文献

- 1 南克俊,景钊,张璐战,阮之平,郭序,徐瑞.中晚期肝癌不同治疗方案疗效观察.第四军医大学学报 2004;25:62-63
- 2 李锦清.降低肝癌以除术后复发率的措施.中华肝胆病杂志 2000;8:177
- 3 Zhou XP, Wang HY, Yang GS, Chen ZJ, Li BA, Wu MC. Cloning and expression of MXR7 gene in human HCC tissue. *World J Gastroenterol* 2000;6:57-60
- 4 陈罡,罗殿中,冯震博,郭芳.肝癌患者肝局部细胞免疫状态与预后的关系.世界华人消化杂志 2005;13:489-494
- 5 邱健,李国威,隋延仿,宋宏萍,司少艳,葛伟.热休克细胞瘤抗原负载的树突状细胞疫苗对原位接种结肠肿瘤的免疫预防作用.世界华人消化杂志 2005;13:635-639
- 6 陈继营,袁玫,卢世璧.预防肿瘤术后复发和转移的最新方法:热休克蛋白肽复合物疫苗的研究与应用(英文).中国临床康复 2002;6:913-914
- 7 Faure O, Graff-Dubois S, Bretaudeau L, Derre L, Gross DA, Alves PM, Cornet S, Duffour MT, Chouaib S, Miconnet I, Gregoire M, Jotereau F, Lemonnier FA, Abastado JP, Kosmatopoulos K. Inducible Hsp70 as target of anticancer immunotherapy: Identification of HLA-A*0201-restricted epitopes. *Int J Cancer* 2004;108:863-870

编辑 王谨晖 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

• 临床经验 •

援生力维和小剂量抗抑郁药治疗难治性肠易激综合征 32 例

寇学斌

寇学斌,商丘市第一人民医院消化科 河南省商丘市 476100
通讯作者:寇学斌,476100,河南省商丘市,商丘市第一人民医院消化科.
电话:0370-3255548
收稿日期:2005-06-23 接受日期:2005-06-28

摘要

目的:观察援生力维和小剂量抗抑郁药治疗难治性肠易激综合征(IBS)的临床疗效.

方法:参照罗马 II 标准,选择 64 例 IBS 患者,随机分成

治疗组和对照组,每组 32 例.两组均给予谷维素(20 mg, po, tid)、匹维溴胺(50 mg, po, tid).治疗组加用援生力维(200 mg, po, tid)、氟西汀或帕罗西汀(20 mg, po, qd),疗程 8 wk.观察治疗前后 IBS 腹痛、腹泻、便秘、腹胀的情况.

结果:治疗组 4 wk 末总有效率 71.9%,8 wk 末总有效率 84.4%;8 wk 末腹痛缓解率 86.7%,腹泻缓解率 81.0%,便秘缓解率 78.6%,腹胀缓解率 81.3%.无明显不良反应.

结论: 援生力维和小剂量抗抑郁药治疗难治性肠易激综合征安全有效, 值得临床应用。

寇学斌. 援生力维和小剂量抗抑郁药治疗难治性肠易激综合征32例. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1932-1935
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1392.asp

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种常见的以腹痛、腹部不适伴排便习惯改变为特征的功能性肠病, 其病因和发病机制复杂. 流行病学调查表明, 西方国家人群患病率15-22%^[1-2], 我国北京地区符合Manning标准的IBS人群患病率7.26%^[3]. 一些患者症状持续或反复发作, 频繁就诊, 即所谓的难治性患者^[4], 此类患者常常伴有明显的心理障碍, 症状尤其与抑郁、焦虑关系密切. 目前对IBS的治疗主要有钙通道阻滞药、促胃肠动力药、肠容积性泻药、调节精神药物及对症治疗. 这些药物起一定作用, 但疗效尚不满意, 均有局限性. 本研究旨在通过对常规药物治疗3 mo以上疗效欠佳的患者, 给予援生力维和小剂量抗抑郁药治疗后疗效随访, 探讨应用援生力维和小剂量抗抑郁药治疗难治性IBS的可行性.

1 材料和方法

1.1 材料 根据知情同意的原则, 参照罗马 II 标准, 选择2 a以来频繁就诊、常规药物治疗3 mo以上无效的难治性IBS门诊患者^[4]64例, 男25例, 女39例, 平均年龄39(21-58)岁. 均经胃、结肠内镜或X线钡剂造影检查, 排除胃、十二指肠、结肠器质性病变. 肝、胆、胰B超、生化和甲状腺功能检查均正常, 粪便培养阴性. 排除有严重心、肝、肾、呼吸及内分泌代谢等疾病; 排除腹部手术史者; 排除妊娠及哺乳期妇女. 采用随机数字表将64例患者分成治疗组和对照组, 每组32例. 对照组男12例, 女20例, 年龄34±16岁. 治疗组男性13例, 女性19例, 年龄33±13岁. 两组在性别、年龄方面具有可比性. 利用电话询问和患者复诊监督患者服药, 了解治疗过程中服药的不良反应和依从性. 治疗过程中无一例中断治疗和失访.

1.2 方法 两组均给谷维素每次20 mg, 匹维溴胺每次50 mg, 均为每日3次口服; 治疗组加用援生力维(即马来酸曲美布汀片, 规格: 每片100 mg)每次200 mg, 每日3次口服, 氟西汀或帕罗西汀每日20 mg, 疗程8 wk, 便秘型患者选择氟西汀, 而腹泻型患者选择帕罗西汀. 观察指标: 分别观察治疗前、后IBS常见4个症状腹痛、腹泻、便秘、腹胀的情况, 腹泻便秘交替者, 分别观察腹泻、便秘的情况. 按症状无、轻、中、重分别记录为0, 1, 2, 3分. 0分 = 无症状; 1分 = 轻度, 对日常活动及睡眠无影响; 2分 = 中度, 日常活动有一定程度受限; 3分 = 严重, 不能从事日常活动. 每周观察1次, 同时

记录与服药有关的不良反应. 综合疗效判断: 显效: 治疗后症状明显好转, 积分下降≥50%; 有效: 治疗后症状好转, 积分下降在50-33.3%之间; 无效: 治疗后积分下降<33.3%. 单项症状疗效判断: 显效: 治疗后该症状积分减少≥2分; 有效: 治疗后该症状积分减少1分; 无效: 治疗后该症状积分减少<1分.

统计学处理 所有数据采用SPSS10.0统计软件进行 χ^2 检验, $P<0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 治疗后两组临床综合疗效比较 治疗4 wk后治疗组总有效率71.9%, 明显高于对照组34.4%, 有显著性差异($P<0.01$, $\chi^2 = 13.55$, 表1). 治疗8 wk后治疗组总有效率84.4%, 明显高于对照组46.8%, 有显著性差异($P<0.01$, $\chi^2 = 9.97$, 表2).

表1 治疗4 wk后临床综合疗效比较

组别	n	显效 n(%)	有效 n(%)	无效 n(%)	总有效率(%)
对照组	32	3(9.4)	8(25)	21(65.6)	34.4
治疗组	32	7(21.9)	16(50)	9(28.1)	71.9

$P<0.01$ vs 对照组.

表2 治疗8 wk后临床综合疗效比较

组别	n	显效 n(%)	有效 n(%)	无效 n(%)	总有效率(%)
对照	32	5(15.6)	10(31.2)	17(53.1)	46.8
治疗	32	19(59.4)	8(25)	5(15.6)	84.4

$P<0.01$ vs 对照组.

2.2 两组单项症状疗效比较 治疗4 wk后, 治疗组对腹痛症状的有效率为73.3%, 显著高于对照组41.4%, 有显著性差异($P<0.01$), 其他症状两组无明显差异($P>0.05$) (表3); 治疗8 wk后, 治疗组对腹痛症状的有效率为86.7%, 显著高于对照组48.3%, 差异有显著性差异($P<0.01$), 腹泻、便秘、腹胀两组比较均有显著差异($P<0.05$) (表4).

表3 治疗4 wk后单项症状疗效比较

症状	对照组		治疗组	
	n	有效率(%)	n	有效率(%)
腹痛	29	41.4	30	73.3 ^a
腹泻	20	40	21	57.1
便秘	16	31.3	14	57.1
腹胀	19	42.1	16	50.0

^a $P<0.05$ vs 对照组.

表4 治疗8 wk后单项症状疗效比较

症状	对照组		治疗组	
	n	有效率(%)	n	有效率(%)
腹痛	29	48.3	30	86.7 ^b
腹泻	20	50.0	21	81.0 ^a
便秘	16	37.5	14	78.6 ^a
腹胀	19	47.4	16	81.3 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

2.3 不良反应 治疗组中有1例(3.1%)出现嗜睡, 1例(3.1%)出现头晕, 均不影响治疗, 未见其他特殊不良反应.

3 讨论

用抗抑郁类药物治疗 IBS 至少有 40 a 的历史^[5], 但直到近来前瞻性对照研究和荟萃分析方法的应用, 才进一步明确抗抑郁药物对 IBS 的疗效^[6-7]. 动物实验证明^[8], 曲美布汀可抑制细胞膜钾离子通道, 产生去极化, 提高胃肠平滑肌细胞的兴奋性; 另一方面可阻断钙离子通道, 抑制钙离子内流, 抑制胃肠平滑肌细胞兴奋. 同时作用于平滑肌神经受体, 在低运动状态下时, 作用于肾上腺素能受体, 抑制肾上腺素释放, 增加运动调节; 在运动亢进时, 作用于 U 受体及 K 阿片受体, 抑制乙酰胆碱释放, 抑制平滑肌运动. 曲美布汀能直接作用于胃肠平滑肌, 加强或抑制胃肠道的运动, 从而实现对胃肠道的双向调节.

本研究表明, IBS 患者接受援生力维联合新型抗抑郁药治疗 4 wk 和 8 wk 的总有效率分别为 71.9%, 84.4%, 均明显高于对照组, 差异有统计学意义. 治疗组治疗 8 wk 末的总有效率高于 4 wk 末, 尤其是 8 wk 末的显效率 (59.4%) 明显高于 4 wk 末的显效率 (21.9%). 这说明服用援生力维联合新型抗抑郁药治疗 IBS 效果明显, 4 wk 末开始起作用, 8 wk 末达到明显的治疗作用.

抗抑郁药治疗 IBS 的理论基础是, 临床上就诊的患者常常伴有明显的以抑郁、焦虑为主的心理障碍^[7]. 但新近慢性躯体痛的研究结果显示, 小剂量抗抑郁药用于慢性痛治疗的疗效独立于心理障碍的改善, 这说明抗抑郁药很可能通过治疗抑郁以外的途径发挥作用. 研究表明抗抑郁药可以提高下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴的稳定性, 减缓对应激的反应性, 并可能参与中枢认知功能的调节^[9]. 胃肠道 5 羟色胺 (5-HT) 含量极为丰富, 并且肠黏膜和肠神经系统有 5-HT 转运体^[10], 因此也不能否认与 5-HT 有关的抗抑郁药对胃肠道潜在的直接影响在这类药物治疗 IBS 中的作用. Gorard *et al*^[11]发现抗抑郁药对正常人和 IBS 患者胃肠运动的影响不同. 新近研究^[12-13]表明 5-HT 再摄取抑制剂 (SSRI) 和三环类抗抑郁药对胃肠道感觉神经元有直接作用. 氟西汀或帕罗西汀属于 SSRI 类, 可选择性地抑制 5-HT 的再摄取, 延长和增加 5-HT 的作用. 因

此, 笔者认为小剂量氟西汀或帕罗西汀可能是通过对脑-肠互动联系中不同水平的交互作用发挥特殊的治疗作用.

单项症状疗效比较表明, 治疗组 4 wk 末的有效率均高于对照组, 但仅对腹痛的疗效差异有显著意义. 8 wk 末两组 4 个症状 (腹痛、腹泻、腹胀、便秘) 比较差异均有统计学意义, 其中对腹痛的有效率高达 86.7%. 这进一步支持上述 4 wk 末起效, 8 wk 末显效的观点. 也说明服用援生力维联合新型抗抑郁药缓解腹痛症状出现最早、效果最好. 缓解腹痛症状出现最早可能与曲美布汀能直接作用于胃肠平滑肌, 加强或抑制胃肠道的运动, 从而实现对胃肠道的双向调节作用有关.

我们还发现, 用援生力维联合新型抗抑郁药 5-HT 再摄取抑制剂 (SSRI) 治疗难治性 IBS 患者, 用药后一般 15 d 开始感觉到症状减轻, 治疗后 8 wk 患者的临床症状明显缓解. 这不同于常规治疗过程中, 应用初期疗效显著, 随着疗程的延长, 疗效减弱, 以致一些难治性患者不愿继续服用此类药物. 这说明援生力维联合小剂量抗抑郁药治疗难治性 IBS 患者远期疗效较好.

援生力维联合新型抗抑郁药对腹泻、腹胀、便秘或腹泻、便秘交替者均有良好疗效, 说明援生力维和新型抗抑郁药克服了其他药物的局限性. 不良反应轻微, 值得临床应用.

4 参考文献

- Heaton KW, O'Donnell LJ, Braddon FE, Mountford RA, Hughes AO, Cripps PJ. Symptoms of irritable bowel syndrome in a British urban community: consultants and nonconsulters. *Gastroenterology* 1992;102:1962-1967
- Jones R, Lydeard S. Irritable bowel syndrome in the general population. *BMJ* 1992;304:87-90
- 潘国宗, 鲁素彩, 柯美云, 韩少梅, 郭慧平, 方秀才. 北京地区肠易激综合征的流行病学研究: 一个整群、分层、随机的调查. *中华流行病学杂志* 2000;21:26-29
- 王伟岸, 钱家鸣, 潘国宗. 肠易激综合征的诊断标准和鉴别诊断. *胃肠病学和肝病杂志* 2001;10:106-109
- Clouse RE, Lustman PJ, Geisman RA, Alpers DH. Antidepressant therapy in 138 patients with irritable bowel syndrome: a five-year clinical experience. *Aliment Pharmacol Ther* 1994;8:409-416
- Fishbain DA, Cutler R, Rosomoff HL, Rosomoff RS. Evidence-based data from animal and human experimental studies on pain relief with antidepressants: a structured review. *Pain Med* 2000;1:310-316
- Drossman DA. Diagnosing and treating patients with refractory functional gastrointestinal disorders. *Ann Intern Med* 1995;123:688-697
- Nosaka K, Takenaga H, Magaribuchi T, Tamaki H. [Effects of trimebutine maleate (TM-906) on the gastrointestinal motility in anesthetized dogs. *Nippon Heikatsukin Gakkai Zasshi* 1984;20:407-412
- Cassano GB, Puca F, Scapicchio PL, Trabucchi M; Italian study group on depression in elderly patients. Paroxetine and fluoxetine effects on mood and cognitive functions in depressed nondemented elderly patients. *J Clin Psychiatry* 2002;63:396-402
- Wade PR, Chen J, Jaffe B, Kassem IS, Blakely RD, Gershon MD. Localization and function of a 5-HT transporter in crypt epithelia of the gastrointestinal tract. *J Neurosci* 1996;16:2352-2364

- 11 Gorard DA, Libby GW, Farthing MJ. Influence of antidepressants on whole gut and orocaecal transit times in health and irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1994;8:159-166
- 12 Bielefeldt K, Ozaki N, Whiteis C, Gebhart GF. Amitriptyline inhibits voltage-sensitive sodium currents in rat gastric sen-

- sory neurons. *Dig Dis Sci* 2002;47:959-966
- 13 Tuladhar BR, Costall B, Naylor RJ. Modulation of 5-HT₄-receptor function in the rat isolated ileum by fluoxetine: the involvement of endogenous 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* 2002;136:150-156

编辑 王谨晖 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

• 临床经验 •

阳春砂挥发油对小鼠胃动力的双向作用

张宁, 孙军, 王秀杰, 李岩

张宁, 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
孙军, 锦州市中心医院消化内科 辽宁省锦州市 121004
王秀杰, 沈阳市第五人民医院消化内科 辽宁省沈阳市 110023
通讯作者: 李岩, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院消化内科. liyan99@medmail.com
电话: 024-83956986
收稿日期: 2005-05-28 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 比较不同浓度阳春砂挥发油对健康小鼠胃肠运动功能的影响, 探讨其量效关系。

方法: 以葡聚糖蓝-2000 为标记物, 以紫外分光光度计定量法, 观察不同浓度阳春砂挥发油对小白鼠胃排空及小肠推进功能的影响。

结果: 50 ml/L 的阳春砂挥发油组和西沙比利组其胃内相对色素残留率与对照组相比有显著性差异($50.36 \pm 17.24\%$, $44.88 \pm 19.98\%$ vs $100.00 \pm 28.78\%$, $P = 0.003$, $0.002 < 0.01$), 两组间无明显差异($P > 0.05$)。随着挥发油浓度升高, 其胃内相对色素残留率逐渐升高, 以100%挥发油浓缩液组最高与对照组($210.36 \pm 15.51\%$ vs $100.00 \pm 28.78\%$, $P = 0.002 < 0.01$)及西沙比利组($210.36 \pm 15.51\%$ vs $44.88 \pm 19.98\%$, $P = 0.0001 < 0.01$)均有显著性差异, 且各组间有明显量效关系; 对于小肠推进功能, 除5%挥发油组外, 余各组均有促进作用, 但各组间无量效关系。

结论: 阳春砂挥发油对健康小鼠胃排空具有双向调节作用, 低浓度促进胃排空, 高浓度抑制胃排空; 对正常小鼠的小肠运动, 低浓度阳春砂挥发油无明显影响, 高浓度有促进作用。

张宁, 孙军, 王秀杰, 李岩. 阳春砂挥发油对小鼠胃动力的双向作用. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1935-1937
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1935.asp>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是一种

常见临床综合征, 胃动力障碍等因素在FD中起重要作用。在我国传统医学中, 许多中药通过调理脾胃等作用具有消除胃肠运动障碍的功能, 在治疗FD方面取得了很好的疗效。砂仁系芳香化湿中药, 具化湿行气、醒脾和胃、温中止泻之功效, 临床常用于治疗脾虚寒湿、痞满滞胀、水谷不化等症。砂仁水提液对正常小鼠的胃肠运动有促进作用^[1], 但是, 芳香化湿类中药其药效成分主要在挥发油中, 不同浓度的砂仁挥发油对小鼠胃肠运动的比较, 国内尚未见报道。本文分别取不同浓度的阳春砂挥发油, 进行了比较研究。

1 材料和方法

1.1 材料 中药阳春砂(*Amomum villosum* Lour, 广东阳春)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), 经辽宁中医学院中药鉴定教研室康延国教授鉴定为正品。葡聚糖蓝(DB)-2000(瑞典Pnarmacia公司), 加蒸馏水制成20 mg/L的BD-2000溶液^[2]。西沙必利(西安杨森制药有限公司, 批号:000425057)以蒸馏水配制为0.15 g/L的溶液。751G型紫外分光光度计(上海分析仪器)。健康6周龄、体质量18-22 g昆明小白鼠(♀♂各半)200只, 中国医科大学附属第二医院实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 挥发油的提取及制备 选取阳春砂仁500 g, 按《中华人民共和国药典》2000版附录D挥发油测定法充分提取挥发油4 h, 过滤药液并将其浓缩成500 mL。挥发油用1-2 mL吐温-80℃增溶, 然后分别用蒸馏水及浓缩液配成浓度为50、100、300、1 000 mL/L的挥发油溶液和挥发油加浓缩液溶液备用。

1.2.2 不同浓度的阳春砂挥发油对小鼠胃肠运动的比较 200只昆明小白鼠(♀♂各半)随机分为10组, 每组20只; 分

- 11 Gorard DA, Libby GW, Farthing MJ. Influence of antidepressants on whole gut and orocaecal transit times in health and irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 1994;8:159-166
- 12 Bielefeldt K, Ozaki N, Whiteis C, Gebhart GF. Amitriptyline inhibits voltage-sensitive sodium currents in rat gastric sen-

- sory neurons. *Dig Dis Sci* 2002;47:959-966
- 13 Tuladhar BR, Costall B, Naylor RJ. Modulation of 5-HT₄-receptor function in the rat isolated ileum by fluoxetine: the involvement of endogenous 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* 2002;136:150-156

编辑 王谨晖 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

• 临床经验 •

阳春砂挥发油对小鼠胃动力的双向作用

张宁, 孙军, 王秀杰, 李岩

张宁, 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
孙军, 锦州市中心医院消化内科 辽宁省锦州市 121004
王秀杰, 沈阳市第五人民医院消化内科 辽宁省沈阳市 110023
通讯作者: 李岩, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属第二医院消化内科. liyan99@medmail.com
电话: 024-83956986
收稿日期: 2005-05-28 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 比较不同浓度阳春砂挥发油对健康小鼠胃肠运动功能的影响, 探讨其量效关系。

方法: 以葡聚糖蓝-2000 为标记物, 以紫外分光光度计定量法, 观察不同浓度阳春砂挥发油对小白鼠胃排空及小肠推进功能的影响。

结果: 50 ml/L 的阳春砂挥发油组和西沙比利组其胃内相对色素残留率与对照组相比有显著性差异($50.36 \pm 17.24\%$, $44.88 \pm 19.98\%$ vs $100.00 \pm 28.78\%$, $P = 0.003$, $0.002 < 0.01$), 两组间无明显差异($P > 0.05$)。随着挥发油浓度升高, 其胃内相对色素残留率逐渐升高, 以100%挥发油浓缩液组最高与对照组($210.36 \pm 15.51\%$ vs $100.00 \pm 28.78\%$, $P = 0.002 < 0.01$)及西沙比利组($210.36 \pm 15.51\%$ vs $44.88 \pm 19.98\%$, $P = 0.0001 < 0.01$)均有显著性差异, 且各组间有明显量效关系; 对于小肠推进功能, 除5%挥发油组外, 余各组均有促进作用, 但各组间无量效关系。

结论: 阳春砂挥发油对健康小鼠胃排空具有双向调节作用, 低浓度促进胃排空, 高浓度抑制胃排空; 对正常小鼠的小肠运动, 低浓度阳春砂挥发油无明显影响, 高浓度有促进作用。

张宁, 孙军, 王秀杰, 李岩. 阳春砂挥发油对小鼠胃动力的双向作用. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1935-1937
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1935.asp>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是一种

常见临床综合征, 胃动力障碍等因素在FD中起重要作用。在我国传统医学中, 许多中药通过调理脾胃等作用具有消除胃肠运动障碍的功能, 在治疗FD方面取得了很好的疗效。砂仁系芳香化湿中药, 具化湿行气、醒脾和胃、温中止泻之功效, 临床常用于治疗脾虚寒湿、痞满滞胀、水谷不化等症。砂仁水提液对正常小鼠的胃肠运动有促进作用^[1], 但是, 芳香化湿类中药其药效成分主要在挥发油中, 不同浓度的砂仁挥发油对小鼠胃肠运动的比较, 国内尚未见报道。本文分别取不同浓度的阳春砂挥发油, 进行了比较研究。

1 材料和方法

1.1 材料 中药阳春砂(*Amomum villosum* Lour, 广东阳春)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), 经辽宁中医学院中药鉴定教研室康延国教授鉴定为正品。葡聚糖蓝(DB)-2000(瑞典Pnarmacia公司), 加蒸馏水制成20 mg/L的BD-2000溶液^[2]。西沙必利(西安杨森制药有限公司, 批号:000425057)以蒸馏水配制为0.15 g/L的溶液。751G型紫外分光光度计(上海分析仪器)。健康6周龄、体质量18-22 g昆明小白鼠(♀♂各半)200只, 中国医科大学附属第二医院实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 挥发油的提取及制备 选取阳春砂仁500 g, 按《中华人民共和国药典》2000版附录D挥发油测定法充分提取挥发油4 h, 过滤药液并将其浓缩成500 mL。挥发油用1-2 mL吐温-80℃增溶, 然后分别用蒸馏水及浓缩液配成浓度为50、100、300、1 000 mL/L的挥发油溶液和挥发油加浓缩液溶液备用。

1.2.2 不同浓度的阳春砂挥发油对小鼠胃肠运动的比较 200只昆明小白鼠(♀♂各半)随机分为10组, 每组20只; 分

别取上述制剂的不同剂量灌服 5 d, 阳性对照组选择西沙比利, 空白对照组为同容积水, 禁食不禁水 12 h, 第 6 d 灌药 20 min 后, 灌服胃肠内标记物 20 mg/L BD-2000 水溶液, 每只 0.4 mL, 15 min 后颈椎脱臼处死动物, 自幽门处取胃, 沿大弯侧剪开, 将胃内色素残留物充分洗于 2 mL 去离子水中, 3 500 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用分光光度计测定波长 620 nm 胃内该色素残留量, 以正常对照组的胃内色素残留量为基准值 (100%), 计算胃残留率: 胃残留率 = 残留值 / 基准值 × 100%, 求出各组的相对胃内残留率. 同时量取幽门括约肌至色素最前端及至盲肠的距离, 以二者之比为小肠推进比, 对比不同剂型效应, 并探讨其量效关系.

统计学处理 数据以 mean ± SD 表示, 采用 Excel 统计软件进行两样本均数差异 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义.

2 结果

50 mL/L 的阳春砂挥发油组其胃内相对色素残留率与对照组相比有显著性差异 (*P* < 0.01), 与西沙比利组具有可比性. 随着浓度升高, 其胃内相对色素残留率逐渐升高, 以 1 000 mL/L 挥发油浓缩液组最高, 与对照组及西沙比利组均有显著性差异 (*P* < 0.01), 各组间有明显量效关系; 对于小肠推进功能, 除 50 mL/L 挥发油组外, 余各组均有促进作用, 各组间无量效关系 (表 1).

表 1 阳春砂挥发油对小鼠胃排空和小肠推进功能的影响 (mean ± SD, %)

组别	胃内相对色素残留率	小肠推进比
对照组 (<i>n</i> = 21)	100.00 ± 28.78 ^d	59.39 ± 10.69 ^d
西沙比利 (<i>n</i> = 27)	44.88 ± 19.98 ^b	71.99 ± 6.56 ^d
50 mL/L 挥发油 (<i>n</i> = 20)	50.36 ± 17.24 ^b	62.84 ± 6.36 ^d
50 mL/L 挥发油 + 浓缩液 (<i>n</i> = 19)	66.28 ± 21.24 ^{bd}	67.56 ± 9.64 ^a
100 mL/L 挥发油 (<i>n</i> = 18)	67.67 ± 10.97 ^{bd}	68.87 ± 12.87 ^a
100 mL/L 挥发油 + 浓缩液 (<i>n</i> = 20)	86.58 ± 17.36 ^d	68.10 ± 14.65 ^a
300 mL/L 挥发油 (<i>n</i> = 18)	103.52 ± 25.38 ^d	68.06 ± 11.25 ^a
300 mL/L 挥发油 + 浓缩液 (<i>n</i> = 17)	103.91 ± 25.65 ^d	67.02 ± 12.05 ^a
1 000 mL/L 挥发油 (<i>n</i> = 19)	161.33 ± 14.27 ^{bd}	68.85 ± 10.32 ^b
1 000 mL/L 挥发油 + 浓缩液 (<i>n</i> = 20)	210.36 ± 15.51 ^{bd}	68.69 ± 10.18 ^b

^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.01 vs 对照组; ^d*P* < 0.01 vs 西沙比利.

3 讨论

功能性消化不良是常见的症候群, 发病机制复杂, 尚未完全阐明, 但胃动力障碍等因素在 FD 中起重要作用, FD 患者有 40–50% 存在液体和固体或混合餐的排空延缓^[3], 而促动力剂能促进胃排空, 改善患者症状, 进一步证明了动力减慢是其主要病理生理机制.

目前, 临床上常采用胃复安、多潘立酮、西沙比利等促动力剂进行治疗, 取得一定疗效. 祖国传统医学认

为“痞满”“胃脘痛”等症与现代医学上胃肠动力功能异常改变有关, 多与脾胃功能失调, 脾胃虚弱有关. 通过调理脾胃, 对功能性消化不良有一定的治疗作用^[4]. 砂仁为姜科草本植物, 味辛香, 温燥, 长于化湿而醒脾和胃, 其主要成分为挥发油, 可缓解腹胀、胃痛和呕吐. 以往对砂仁水提液的研究报道较多, 多以促进胃肠运动为主^[5–11]. 我们曾用不同浓度的阳春砂水提液进行研究^[12], 发现 100 mL/L 的砂仁水提液组促胃排空作用较强, 随着浓度升高, 其胃内相对色素残留率逐渐升高, 1 000 mL/L 的砂仁水提液组无促胃动力作用. 李晓光 *et al*^[13] 用砂仁挥发油中的主成分乙酸龙脑酯进行研究, 发现低浓度组和高浓度组对小鼠胃排空无明显影响, 而 4 个浓度组有降低离体家兔肠内压、抑制小肠运动的作用, 且呈明显的量效关系.

本研究结果显示, 阳春砂挥发油对正常小鼠的胃排空具有双向调节作用, 其作用与挥发油浓度有量效关系, 低浓度可促进胃排空, 以 50 mL/L 浓度组效果最强, 与西沙比利具有可比性; 随着浓度的增加, 其促胃排空作用逐渐减小, 至 300 mL/L 挥发油和挥发油浓缩液组, 无促胃排空作用, 而后转为抑制, 1 000 mL/L 的挥发油浓缩液组抑制作用最强. 在传统中医中药中, 许多中药都具有双向调节作用, 据报道^[14], 白术中药健脾止泻, 大量益气治疗老年便秘. 山楂含脂肪酶, 既能使收缩状态的肠肌松弛, 又能使松弛状态的肠肌收缩^[15]. 枳壳能兴奋胃肠平滑肌, 使蠕动增强, 又能降低胃肠平滑肌张力有解痉作用. 本研究中, 砂仁挥发油对正常小鼠胃排空的双向调节与其浓度有明显的量效关系, 这在国内外尚未见报道, 其具体调节机制也需进一步研究.

目前对中药双向作用的机制尚未完全明了, 但多与下列因素相关^[16]: (1) 机体因素: 中医认为阴阳之间的动态平衡是维持一切正常生理活动的必要条件, 应用中药治疗的根本目的在于使疾病过程中失衡的阴阳重新恢复相对动态平衡. 而阴阳又可以互相转化, 互为消长, 这就使得同方药可以治疗多种不同表现的症候, 为双向作用的形成提供机会. (2) 药物因素: 中药含有多种成分, 有的含有两种作用相反的拮抗成分, 使这些药物具有双向调节作用. (3) 使用因素: 剂量改变可使量变导致质变, 可能通过反馈抑制使原作用消失或起相反作用. 另外, 炮制、配伍不同也可使中药表现出原来所不具有的甚至相反作用.

芳香化湿类中药药效成分主要在挥发油中, 本研究对于临床用药具有深远意义, 可以很好地指导临床用药, 既避免用高纯度挥发油影响药效, 亦可避免用传统水煎法造成中药砂仁的浪费.

4 参考文献

- 李岩, 孙思予, 周卓. 消食行 (中药对小鼠胃肠动力的影响). 新消化病学杂志 1997;5:153
- 李岩, 陈苏宁, 田代真一. 葡聚糖 2000 标记五积散对小鼠胃排空及小肠推进功能的影响. 中国医科大学学报 1996;25:160

- 3 Haug TT, Wilhelmsen I, Ursin H, Berstad A. What are the real problems for patients with functional dyspepsia? *Scand J Gastroenterol* 1995;30:97-100
- 4 庞龙, 周德端. 中药对胃肠运动的调节作用. 华人消化杂志 1998; 6:535-536
- 5 李岩, 孙思予, 周卓, 陈苏宁, 王兴尧. 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
- 6 朱金照, 冷恩仁, 陈东风, 张捷. 砂仁对大鼠胃肠运动及神经递质的影响. 中国中西医结合消化杂志 2001;9:205-207
- 7 李岩, 王学清, 张卫卫, 王江玥. 木香冲剂对小鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:575-577
- 8 王贺玲, 李岩, 白茵, 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
- 9 李伟, 郑大珍, 瞿颂义, 瞿颂义, 张英福, 邱小青, 丁永辉, 卫玉玲. 芳香化湿类中药对大鼠离体平滑肌运动的影响. 兰州医学院学报 1998;24:6-8
- 10 邱赛红, 陈立峰, 柳克铃, 应玲珍, 侯雅明. 芳香化湿药开胃作用机理的实验研究. 中药药理与临床 1995;11:24-26
- 11 Qiu S, Shou D, Chen L, Dai H, Liu K. Pharmacological comparison between volatile oil and water extract. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 1999;24:297-299
- 12 张宁, 李岩, 孙利平. 不同浓度砂仁水提液对小鼠胃肠运动比较的研究. 辽宁医学杂志 2003;17:141-142
- 13 李晓光, 叶富强, 徐鸿华. 乙酸龙脑酯药理作用的实验研究. 浙江中医学院学报 2001;25:49-50
- 14 牟冉冉, 牟大可. 中药双向作用与临床应用. 山东医药工业 1999; 18:22-23
- 15 应岳文, 胡旭玲. 部分中药双向作用浅析. 中国药业 2002;11:60
- 16 潘会朝. 中药治疗的双向作用. 世界最新医学信息文摘 2003;8: 760-761

编辑 王谨晖 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

• 临床经验 •

细胞凋亡在燃煤型砷中毒肝损伤中的作用

杨大平, 李 军, 黄晓欣, 张爱华, 何 云, 谢政军

杨大平, 黄晓欣, 何云, 谢政军, 中国人民解放军第44医院
贵州省贵阳市 550009
李军, 张爱华, 贵阳医学院公共卫生学院 贵州省贵阳市 550002
全军医药卫生科研基金资助课题, NO. 01MA048
通讯作者: 杨大平, 550009, 贵州省贵阳市小河经济技术开发区, 中国人民解放军第44医院消化科.
电话: 0851-3802983 传真: 0851-3802983
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

家族中促凋亡蛋白 Bax 的表达而启动肝细胞的胞内凋亡信号传导途径, 导致肝细胞凋亡增加.

杨大平, 李军, 黄晓欣, 张爱华, 何云, 谢政军. 细胞凋亡在燃煤型砷中毒肝损伤中的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1937-1939
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1937.asp>

摘要

目的: 通过观察肝细胞表面分子界导细胞凋亡的 Fas、FasL 及相关基因蛋白 Bax、Bcl-2、Bcl-XL 的变化来探索燃煤型砷中毒肝损伤的分子机制.

方法: 对 25 例砷中毒肝损伤患者按职业性中毒性肝病诊断标准分为 A 组(无明显肝病患者)、B 组(轻度砷中毒肝损伤患者)、C 组(中、重度砷中毒肝损伤患者). 采用免疫组化 ABC 法进行 Fas、FasL、Bax、Bcl-2、Bcl-XL 检测. 结果采用 PEMS 统计软件进行 Radio 分析.

结果: Fas、FasL 表达在肝损伤较重的 C 组比肝损伤较轻的 B 组及无明显肝病的 A 组显著增强, 三组间分级构成上有显著性差异($P < 0.05$); Bax 表达在 A、B、C 组间分级构成上也有显著性差异($P < 0.05$), 而 Bcl-2 和 Bcl-XL 表达在 B、C 两组间分级构成上无显著性差异($P > 0.05$), 但在 A 组与 B、C 组间比较则有显著性差异($P < 0.05$).

结论: 推测砷可能通过上调凋亡基因蛋白 Fas/FasL 和 Bcl-2

0 引言

燃煤型砷中毒是严重危害人体健康的地方病. 前期研究^[1-2]表明砷中毒可引起皮肤、神经、消化等多系统损伤, 肝硬化、皮肤癌为主要致死原因. 因此, 我们通过观察肝细胞表面分子界导细胞凋亡的相关基因的变化来探索肝损伤的分子机制.

1 材料和方法

1.1 材料 按以往砷中毒标准选取砷中毒病例(当地患者)25 例, 按职业性中毒性肝病诊断标准^[3]分为 A 组 4 例(无明显肝病患者)、B 组 11 例(轻度砷中毒肝损伤患者)、C 组 10 例(中、重度砷中毒肝损伤患者). 在严格消毒条件下, 采用一次性快速穿刺活检枪行肝脏活组织取材检查, 性别不限. Fas、FasL、Bax、Bcl-2、Bcl-XL 多克隆抗体试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供.

1.2 方法 Fas、FasL、Bax、Bcl-2、Bcl-XL 的免疫

- 3 Haug TT, Wilhelmsen I, Ursin H, Berstad A. What are the real problems for patients with functional dyspepsia? *Scand J Gastroenterol* 1995;30:97-100
- 4 庞龙, 周德端. 中药对胃肠运动的调节作用. 华人消化杂志 1998; 6:535-536
- 5 李岩, 孙思予, 周卓, 陈苏宁, 王兴尧. 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
- 6 朱金照, 冷恩仁, 陈东风, 张捷. 砂仁对大鼠胃肠运动及神经递质的影响. 中国中西医结合消化杂志 2001;9:205-207
- 7 李岩, 王学清, 张卫卫, 王江玥. 木香冲剂对小鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:575-577
- 8 王贺玲, 李岩, 白茵, 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
- 9 李伟, 郑大珍, 瞿颂义, 瞿颂义, 张英福, 邱小青, 丁永辉, 卫玉玲. 芳香化湿类中药对大鼠离体平滑肌运动的影响. 兰州医学院学报 1998;24:6-8
- 10 邱赛红, 陈立峰, 柳克铃, 应玲珍, 侯雅明. 芳香化湿药开胃作用机理的实验研究. 中药药理与临床 1995;11:24-26
- 11 Qiu S, Shou D, Chen L, Dai H, Liu K. Pharmacological comparison between volatile oil and water extract. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 1999;24:297-299
- 12 张宁, 李岩, 孙利平. 不同浓度砂仁水提液对小鼠胃肠运动比较的研究. 辽宁医学杂志 2003;17:141-142
- 13 李晓光, 叶富强, 徐鸿华. 乙酸龙脑酯药理作用的实验研究. 浙江中医学院学报 2001;25:49-50
- 14 牟冉冉, 牟大可. 中药双向作用与临床应用. 山东医药工业 1999; 18:22-23
- 15 应岳文, 胡旭玲. 部分中药双向作用浅析. 中国药业 2002;11:60
- 16 潘会朝. 中药治疗的双向作用. 世界最新医学信息文摘 2003;8: 760-761

编辑 王谨晖 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

• 临床经验 •

细胞凋亡在燃煤型砷中毒肝损伤中的作用

杨大平, 李 军, 黄晓欣, 张爱华, 何 云, 谢政军

杨大平, 黄晓欣, 何云, 谢政军, 中国人民解放军第44医院
贵州省贵阳市 550009
李军, 张爱华, 贵阳医学院公共卫生学院 贵州省贵阳市 550002
全军医药卫生科研基金资助课题, NO. 01MA048
通讯作者: 杨大平, 550009, 贵州省贵阳市小河经济技术开发区, 中国人民解放军第44医院消化科.
电话: 0851-3802983 传真: 0851-3802983
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

家族中促凋亡蛋白 Bax 的表达而启动肝细胞的胞内凋亡信号传导途径, 导致肝细胞凋亡增加.

杨大平, 李军, 黄晓欣, 张爱华, 何云, 谢政军. 细胞凋亡在燃煤型砷中毒肝损伤中的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1937-1939
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1937.asp>

摘要

目的: 通过观察肝细胞表面分子界导细胞凋亡的 Fas、FasL 及相关基因蛋白 Bax、Bcl-2、Bcl-XL 的变化来探索燃煤型砷中毒肝损伤的分子机制.

方法: 对 25 例砷中毒肝损伤患者按职业性中毒性肝病诊断标准分为 A 组(无明显肝病患者)、B 组(轻度砷中毒肝损伤患者)、C 组(中、重度砷中毒肝损伤患者). 采用免疫组化 ABC 法进行 Fas、FasL、Bax、Bcl-2、Bcl-XL 检测. 结果采用 PEMS 统计软件进行 Radio 分析.

结果: Fas、FasL 表达在肝损伤较重的 C 组比肝损伤较轻的 B 组及无明显肝病的 A 组显著增强, 三组间分级构成上有显著性差异($P < 0.05$); Bax 表达在 A、B、C 组间分级构成上也有显著性差异($P < 0.05$), 而 Bcl-2 和 Bcl-XL 表达在 B、C 两组间分级构成上无显著性差异($P > 0.05$), 但在 A 组与 B、C 组间比较则有显著性差异($P < 0.05$).

结论: 推测砷可能通过上调凋亡基因蛋白 Fas/FasL 和 Bcl-2

0 引言

燃煤型砷中毒是严重危害人体健康的地方病. 前期研究^[1-2]表明砷中毒可引起皮肤、神经、消化等多系统损伤, 肝硬化、皮肤癌为主要致死原因. 因此, 我们通过观察肝细胞表面分子界导细胞凋亡的相关基因的变化来探索肝损伤的分子机制.

1 材料和方法

1.1 材料 按以往砷中毒标准选取砷中毒病例(当地患者)25 例, 按职业性中毒性肝病诊断标准^[3]分为 A 组 4 例(无明显肝病患者)、B 组 11 例(轻度砷中毒肝损伤患者)、C 组 10 例(中、重度砷中毒肝损伤患者). 在严格消毒条件下, 采用一次性快速穿刺活检枪行肝脏活组织取材检查, 性别不限. Fas、FasL、Bax、Bcl-2、Bcl-XL 多克隆抗体试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供.

1.2 方法 Fas、FasL、Bax、Bcl-2、Bcl-XL 的免疫

组化用ABC法,主要步骤:切片常规二甲苯脱蜡→梯度酒精水化→PBS洗涤5 min→30 mL/L H₂O₂室温10 min→PBS洗涤5 min→抗原修复10 min→PBS洗涤5 min→100 mL/L山羊血清封闭20 min→抗37℃ 60 min→PBS洗涤5 min→生物标记二抗37℃ 20 min→PBS洗涤5 min→SABC 37℃ 20 min→PBS洗涤5 min→DAB显色5-30 min→苏木素复染,脱水,透明,封片.用PBS代替一抗作为阴性对照.免疫组化结果判断:Fas、FasL、Bax、Bcl-2、Bcl-XL以胞质或胞膜出现棕黄色着色为阳性,根据各指标的显色强度和范围,分为4级:以低倍镜下阳性细胞少于1/3为I级;1/3-2/3为II级;大于2/3为III级;未见阳性细胞为0级.

统计学处理 采用PEMS统计软件进行Radio分析.

2 结果

2.1 砷中毒患者肝细胞中凋亡基因蛋白Fas、FasL的表达分级比较 Fas、FasL表达在A、B、C三组间分级构成上有显著性差异($P<0.05$,表1).

表1 砷中毒患者肝细胞中凋亡基因蛋白Fas、FasL的表达分级比较

组别	n	Fas			FasL		
		I	II	III	0	I	II
A组	4	0	0	0	0	0	0
B组	11	4	7	0	3	4	4
C组	10	1	5	4	0	5	5

2.2 砷中毒患者肝细胞中凋亡基因蛋白Bax、Bcl-2、Bcl-XL的表达分级比较 Bax表达在A、B、C三组间分级构成上差异有显著性($P<0.05$);Bcl-2和Bcl-XL表达在B、C两组间分级构成上无显著性差异($P>0.05$)(表2),但在A组与B、C两组间比较则差异有显著性($P<0.05$).

表2 砷中毒患者肝细胞中凋亡基因蛋白Bax、Bcl-2、Bcl-XL的表达分级比较

组别	n	Bax			Bcl-2			Bcl-XL		
		I	II	III	0	I	II	0	I	II
A组	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B组	11	7	4	0	7	3	1	5	6	0
C组	10	2	6	2	4	5	1	6	4	0

3 讨论

燃煤型砷中毒是严重危害人体健康的地方病.前期^[4]研究表明砷中毒肝脏损伤病理形态主要表现为:光镜下示肝细胞肿胀、胞质疏松及肝索排列紊乱,肝窦扩张、充血,重者出现弥漫性脂肪变及小灶性溶解、坏死,纤维增生和炎细胞浸润;电镜下示肝细胞核固缩,线粒体基

质增多,电子致密颗粒增多、脂肪小滴形成及髓鞘样变化.以上变化符合肝细胞凋亡的镜下形态改变,提示在砷中毒肝损伤机制中有细胞凋亡的参与.因此,我们通过观察肝细胞表面分子界导细胞凋亡的Fas、FasL及相关基因Bax、Bcl-2、Bcl-XL的变化来探索肝损伤的分子机制.

细胞凋亡是不同于坏死的细胞死亡方式,是细胞基因控制的、维持内环境稳定的一种自主性细胞死亡,是维持人体正常生理功能的必需过程.生理情况下,可以清除机体不正常的、多余的、有害的细胞,是维持机体稳态的重要机制.但在病理状态下,其可能导致疾病、肿瘤的发生^[5].Fas/FasL系统是介导肝细胞凋亡的主要形式之一.Fas介导的肝细胞凋亡是通过肝细胞表面Fas与其配体FasL结合而启动的.Fas、FasL在正常肝组织基本无表达或只有微弱表达,在活化成熟的淋巴细胞、慢性病毒性肝病及肝硬化患者等的肝细胞表面,Fas、FasL均有很高的表达水平,Fas/FasL的异常与肝脏疾病的关系已成为当今肝病研究的重点之一^[5-6].本研究结果显示,Fas、FasL的表达程度在肝损伤较重的C组比肝损伤较轻的B组显著增强,其阳性表达多分配在II、III级.提示砷可能通过上调肝细胞Fas、FasL的表达水平,致使Fas与FasL结合增加.Fas与FasL结合后形成三聚体,使Fas在细胞膜内的信号序列“死亡结构区”聚积并形成“死亡诱导信号复合体”,激活半胱氨酰天门冬氨酸特异酶家族的级联反应,启动细胞凋亡的胞内死亡信号传递过程,引导表达Fas的肝细胞DNA碎裂和细胞凋亡.Bcl-2是一种原癌基因,编码一种抑制凋亡的蛋白,在自身更新组织的祖代细胞和肿瘤细胞表达,Bcl-2和Bcl-XL是最重要的抗凋亡蛋白,Bax则是最重要的促凋亡蛋白.抑制和促进凋亡的两类蛋白的比例决定了肝细胞在受到凋亡信号刺激后是否发生凋亡^[5,7-10].本研究结果显示,Bax在肝损伤程度不同的B、C组间的表达强度及分布随肝损伤加重而增强.而抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-XL在两组间的表达强度及分布则基本一致.提示砷可能通过上调肝细胞Bcl-2家族中促凋亡蛋白Bax的表达水平,致家族中促进和抑制凋亡的两类蛋白比例升高,Bax同源二聚体形成增多,与线粒体膜结合形成渗透性膜转移孔复合物,通过增大线粒体膜的通透性,介导线粒体释放细胞色素C、促凋亡蛋白等反应,最终启动caspase家族的级联反应,引起肝细胞凋亡.

总之,推测砷可能通过上调凋亡基因蛋白Fas/FasL和Bcl-2家族中促凋亡蛋白Bax的表达而启动肝细胞的胞内凋亡信号传递过程,导致肝细胞凋亡增加.肝细胞在砷的作用下大量死亡(坏死或凋亡)将破坏肝脏的正常网状纤维结构,并启动储脂细胞向肌成纤维细胞转化,肌成纤维细胞分泌的胶原、非胶原等多种细胞外基质(ECM)会在肝内过量沉积,导致大量纤维增生.

4 参考文献

- 1 黄晓欣, 张爱华, 杨大平, 洪峰, 张碧霞, 罗鹏, 董学新, 郭渝成. 燃煤型砷中毒患者临床特征、多系统损害及其意义. 中国地方病学杂志 2002;21:490-493
- 2 Guha Mazumder DN. Arsenic and liver disease. *J Indian Med Assoc* 2001;99:311-314
- 3 吴执中. 职业病. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 1984:214-225
- 4 杨大平, 张爱华, 黄晓欣, 郭渝成, 王松, 郭乔楠. 燃煤型砷中毒人体肝损伤临床研究. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊8):89
- 5 周殿元, 姜泊. 细胞凋亡基础与临床. 第一版. 北京: 人民军医出版社, 1999:184-189
- 6 邢文斌, 安杰, 郑梅. Fas、FasL 在慢性乙型肝炎肝组织中的表达. 临床肝胆病杂志 2002;18:275-277
- 7 Chen J, Graham SH, Chan PH, Lan J, Zhou RL, Simon RP. Bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat. *Neuroreport* 1995;6:394-398
- 8 张延龄. 肝脏再生. 国外医学外科学分册 2004;31:264
- 9 陆东东. 肝癌中 Inos 与 p16、Bax 的表达及其与细胞凋亡关系. 临床肝胆病杂志 2003;19:58-59
- 10 王红阳, 吴孟超. 加强原发性肝癌基础研究. 中华肝胆病杂志 2004;12:641

编辑 王谨晖 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 由周刊出版发行

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* 由世界胃肠病学杂志社和 Elsevier 共同出版. 2005-01-01 起改为周刊发行, 每月 7、14、21、28 日出版. 语言编辑由 Elsevier 出版公司香港医学部负责培训和管理. 语言编辑由印度国际出版工业编辑服务有限公司的 6 位语言编辑组成, 并由他们来完成文章语言方面的处理工作. 印刷版国际发行 2005 年开始由 Elsevier 全球独家发行.

WJG 编委会由 517 位国际一流胃肠病学和肝病学专家组成, 分布在 51 个国家和地区, 其中中国有 50 位 (9.67%). 我们对所有来稿均进行同行评议. 采用匿名方式, 通常每篇文章邀请 3 位专家进行审稿. 至少二位审稿人通过为录用, 否则为退稿. 每期的最后一页致谢本期所有的审稿人 (包括退稿). 每篇文章从审稿开始至出版由 2 位科学编辑和 2 位语言编辑负责处理. 印刷版和电子版最后一页致谢本期同行评审专家的姓名和机构.

WJG 采用开放存取出版模式 (OAP), 从 2003-04-15/2005-06-29 电子版的点击次数为 4963364, 平均每天点击次数为 6050 次.

WJG 2004-08-09/2005-05-31, 共收到国内外来稿 1861 篇, 其中中国 733 篇 (39.38%), 国外来稿 1128 篇 (60.61%), 退稿 690 篇 (37.07%), 审稿中 350 篇. 已发表 2760 篇文章被美国国立医学图书馆医学索引收录, 其中 1524 篇被 SCI 收录的期刊引用 (1999-2005-03-30), 占 55.21%. SCI 收录期刊引用 *WJG* 发表的文章, 包括 *Nature Medicine*, *Cell*, *Nature Reviews Neuroscience*, *Nature Cell Biology*, *Genes & Development*, *Lancet*, *Nature Neuroscience*, *Neuron*, *Nature Reviews Cancer*, *Gastroenterology*, *Hepatology*, 等国际顶级期刊. 各项基金论文数占有发表论文的百分比为 1998 年 59.6%, 1999 年 58.9%, 2000 年 55.7%, 2001 年 63.6%, 2002 年 60.6%, 2003 年 54.9%, 2004 年 56.0%.

WJG 1998-2005 年摘要被 *Index Medicus*, MEDLINE, PubMed, Chemical Abstracts, EMBASE, Abstracts Journals, *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*, CAB Abstracts and Global Health 收录.

WJG 2000-2003 年影响因子 ISI JCR 分别为 0.993, 1.445, 2.532 和 3.318.

WJG 2001 年入选中国期刊方阵“双百”期刊. 2002 年 10 月 11 日第一次获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助 (项目批准号: 30224801), 资助期限 2 年, 资助强度为每年 8 万元. 2003 年荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊. 2003 年度获第二届中国百种杰出学术期刊. 2004 年度第二次获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助 (项目批准号: 30424812), 资助期限 2 年, 资助强度为每年 12 万元. 2005 年荣获第三届国家期刊奖百种重点期刊.

WJG 2006 年由北京报刊发行局发行, 国内统一刊号 CN 14-1219/R, 邮发代号 82-261, 页码 160, 月价 200.00 元. (世界胃肠病学杂志社 2005-06-29)

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

蔡淦 教授

上海中医药大学附属曙光医院

陈立波 副教授

武汉华中科技大学同济医学院附属协和医院外科

陈蔚文 教授

广州中医药大学脾胃研究所

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

冯志华 副教授

中国人民解放军第四军医大学唐都医院传染科

纪小龙 教授

中国人民解放军解放军总医院病理科

吕宾 主任医师

浙江中医院附属医院

吕宁 副主任医师

中国医学科学院协和医科大学中国医学科学院肿瘤研究所

罗和生 教授

武汉大学人民医院消化内科

梅林 教授

北京大学医学部生理学与病理生理学系

牛建昭 教授

北京中医药大学

彭吉润 副教授

北京大学人民医院肝胆外科中心

邵成浩 讲师

中国人民解放军第二军医大学长海医院普外科

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

宋振顺 教授

中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

苏鲁 主任医师

海南省人民医院消化内科

王福生 教授

中国人民解放军第三〇二医院传染病研究所

王鲁 副主任医师

上海复旦大学附属中山医院肝外科肝癌研究所

王小众 教授

福建医科大学附属协和医院消化内科

魏来 教授

北京大学人民医院肝病研究所细胞生物与分子生物学实验室

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

于颖彦 教授

上海第二医科大学附属瑞金医院消化外科研究所

张青云 研究员

北京大学临床肿瘤学院、北京肿瘤医院

张万岱 教授

中国人民解放军第一军医大学南方医院消化科

张宗明 教授

上海同济大学附属同济医院普外科

钟鸣 副研究员

广西民族医药研究所