

# 胆汁反流与急性胃黏膜病变

罗和生, 陈 敏

罗和生, 陈敏, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
罗和生, 男, 1951 年 4 月生, 教授, 博士生导师, 主要从事于胃肠动力学及消化系统疾病基础与临床研究.

通讯作者: 罗和生, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院消化内科.  
luotang@public.wh.hb.cn

电话: 027-88041919-2135

收稿日期: 2005-03-31 接受日期: 2005-04-09

## 摘要

胆汁反流的问题是在开展胃手术之后逐渐引起人们的关注的, 尤其是近来各种检测及诊断水平的提高, 得到了更多且更为深入的研究. 胆汁反流不仅引起胃炎, 尚可引起胃溃疡、胃癌和反流性食管炎等多种疾病. 研究其发病机制具有重要的临床意义. 本文对急性胃黏膜病变与胆汁反流的关系及其相应的机制作一综述.

**关键词:** 胆汁反流; 急性胃黏膜病变

罗和生, 陈敏. 胆汁反流与急性胃黏膜病变. 世界华人消化杂志 2005;13(13): 1489-1492

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1489.asp>

## 0 引言

早在1883年Beamont就提出了胆汁可由十二指肠反向流入胃腔, 随后大量的研究证实胆汁反流的发生与许多因子密切相关, 例如胃大部切除术后、幽门螺杆菌感染、遗传因素以及环境因素等<sup>[1]</sup>. 胆汁反流也与很多慢性胃病的发生密切相关, 如胃溃疡、胃炎、残胃炎、残胃癌、胃癌及消化不良等<sup>[2]</sup>. 胆汁反流在急性胃黏膜病变的发展过程中的作用以及急性胃黏膜病变对胆汁反流的影响却很少有人研究. 随着当今社会生活节奏的加快, 应激因素的增多, 研究急性胃黏膜病变发病机制和防治及胆汁反流在应激中的作用具有重要科研及临床意义.

## 1 胆汁反流是急性胃黏膜病变的发病机制之一

1.1 应激状态与胆汁反流 胃黏膜无分泌胆汁功能, 故胃内胆汁皆由肝细胞分泌并逆向流动到胃腔内所致. 胆汁反流首先应有足够的胆汁分泌和胆汁从胆道排出, 同时基于上消化道动力紊乱才能导致胆汁反流出现. 急性胃黏膜病变是胃黏膜发生不同程度糜烂、溃疡和出血为特征的病变. 1989 年, 德国学者 Schindlbeck *et al*<sup>[3]</sup> 测定了 26 例重症患者行人工辅助呼吸者胃内胆汁酸, 并与 8 名健康对照组比较, 发现无论是空腹或餐

后均大于 4 倍以上, 说明应激状态下的患者胃内胆汁酸浓度明显增高, 故认为胆汁反流可能与急性胃黏膜病变发病机制密切相关. 据相关动物实验研究报告显示 SD 大鼠冷束缚应激实验结束后 2 h 胃内胆汁酸浓度达到最大值, 约为应激前对照组的 13 倍左右. 创伤应激后兔胆汁流量较应激前明显增多, 应激后是应激前的 1.42 倍. 以上动物实验皆证明应激过程中胆汁反流明显存在.

1.2 胆汁反流是急性胃黏膜病变的发病机制之一 胆汁反流出现需要两个前提: 逆行的十二指肠收缩运动推进十二指肠内容物逆向移动及同时幽门开放. 当十二指肠出现逆蠕动, 若此时幽门开放, 则出现十二指肠胃反流<sup>[4]</sup>. 幽门括约肌是防止十二指肠胃反流的重要因素, 在消化间期和消化期, 幽门括约肌多数时间都处于收缩关闭状态. 当其开放时, 胃和十二指肠形成共腔. 应激状态下幽门括约肌的松弛或关闭不全也为胆汁反流创造了极为有利的条件. 幽门括约肌受神经-体液调节, 应激时造成神经-体液调节紊乱从而影响幽门括约肌的功能. 戴益琛 *et al*<sup>[5]</sup> 研究证实幽门松弛组患者局部黏膜一氧化氮的含量明显高于对照组患者, 说明局部一氧化氮增高是幽门松弛的重要原因. 据陈敏 *et al*<sup>[6]</sup> 研究证实冷束缚应激后 1 h SD 大鼠幽门区一氧化氮含量达到峰值, 应激后 2 h 胃内胆汁酸和 pH 值均达到峰值, 应激后 4 h 胃内溃疡指数达到峰值. 说明应激过程中胃内胆汁酸水平明显升高, 约是对照组的 13 倍 (对照组为  $66.2 \pm 58.9 \mu\text{mol/L}$ , 应激后 2 h 达到峰值  $844.8 \pm 280.7 \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.01$ ) 且先于溃疡指数达到峰值均说明胆汁反流在急性胃黏膜病变中起重要作用, 是其重要原因而非结果. 幽门局部神经递质在应激过程中有明显变化, 引起幽门舒张的一氧化氮有明显升高的趋势, 于应激结束后有回落的趋势. 而在幽门区注射一氧化氮合酶的抑制剂 (L-NAME) 后幽门区一氧化氮含量减少且胃内胆汁酸也明显减少. 从幽门括约肌的角度解释了应激状态下胆汁反流出现的原因. 据大量免疫组化研究幽门区含有丰富的血管活性肠肽、乙酰胆碱、一氧化氮合酶等递质, 这些递质在应激状态下有无变化以及对胆汁反流有无影响还有待于进一步研究和探讨.

在胃肠激素方面据李贤珍 *et al*<sup>[7]</sup> 报道行兔

胆总管插管引流胆汁计量胆汁流量, 将兔双下肢钳断制备应激模型, 记录创伤应激前后胆汁流量的变化, 同时检测血浆胃泌素、胰高血糖素含量的改变. 创伤应激后兔胆汁流量较应激前明显增多, 约为应激前的1.42倍(应激前后分别为 $2.12 \pm 0.24$  mL/20 min,  $3.01 \pm 0.36$  mL/20 min,  $P < 0.01$ ), 血浆胃泌素(GAS)、胰高血糖素(GL)含量升高(应激前后 GAS 分别为 $823.6 \pm 58.1$  ng/L,  $938.8 \pm 50.6$  ng/L,  $P < 0.01$ ; 应激前后 GL 分别为 $106.3 \pm 5.4$  ng/L,  $202.0 \pm 6.7$  ng/L,  $P < 0.01$ ), 胆汁流量的变化与激素的改变一致. 创伤应激可使兔胆汁流量明显增多, 胃泌素及胰高血糖素的变化可能是影响胆汁分泌和排出的重要因素. 另据研究证实SD大鼠冷束缚应激各时段血浆胆囊收缩素(CCK-8)水平显著升高(对照组为 $2.23 \pm 0.88$  pmol/L, 应激后2 h达到峰值 $10.80 \pm 3.82$  pmol/L,  $P < 0.01$ ), 而生长抑素(SS)水平则有所下降(对照组 $41.83 \pm 22.11$  ng/L, 应激后4 h降到最小值 $26.20 \pm 19.38$  ng/L,  $P < 0.05$ ). 应激过程中确有胆汁反流的存在, 胆汁酸是应激性胃黏膜损伤的重要因素; 应激期间CCK和SS释放量的改变以及胃液pH值的大小与胆汁酸引起的胃黏膜损伤严重程度密切相关. 在这些动物实验中可观察到应激状态下部分胃肠激素的相关变化. 表明他们或充当神经递质, 或作为激素参与胃酸分泌的调节, 从不同角度参与了应激性溃疡的消长过程, 他们之间的相互作用为进一步临床研究应激性溃疡提供了重要的参考资料. 基于他们的保护作用或促营养作用, 可望用于应激性溃疡的临床防治研究.

## 2 应激状态下引起胆汁反流的机制

**2.1 神经机制** 延髓是调节胆汁分泌的重要中枢, 其中迷走神经背核及其周围神经结构, 如孤束核、疑核和背部网状结构等均可通过迷走神经和内脏神经两个途径来参与胆汁分泌和胃肠运动的调节过程. 大鼠束缚应激时迷走神经兴奋频率与幅度均异常增高<sup>[8]</sup>, 与胃黏膜病变程度呈明显正相关. 切除迷走神经及交感神经的大鼠水浸应激6 h后胃黏膜前列腺素(PGE<sub>2</sub>)含量升高, 黏膜血流不降低, 下丘脑外侧区(LHA), 室旁核(PVN)等核团所致的SU效应均消除. 迷走神经在胆汁反流与应激之间也起到了一定了联系作用. 迷走神经对于调节胆汁分泌、胆囊收缩、括约肌功能等作用及机制还有待于进一步研究. 还有中枢系统脑肠肽的变化对于胆汁反流的影响, 即胆汁反流的中枢机制与应激的关系也值得进一步的研究.

**2.2 胃肠激素机制** 当机体处于应激时, 由于神经-体液调节的影响, 胃肠激素分泌处于严重紊乱的状态.

其中某些激素可调节胆汁分泌、胆囊收缩、幽门括约肌及Oddi氏括约肌功能以及调节胃肠运动. 这些激素有胆囊收缩素(CCK)、胰高血糖素、生长抑素、胃泌素、胃动素及血管活性肠肽等.

**2.2.1 胆囊收缩素** 应激状态下CCK对胆汁反流的发生起十分关键的作用, CCK在胃肠道及脑组织中分布广泛, 其不仅作为一种胃肠道激素, 还可以作为一种神经递质来调节胆囊的收缩功能. 他可刺激胆囊收缩及Oddi氏括约肌舒张从而促进胆汁的分泌及排出; 还可刺激胰腺消化酶、碳酸氢盐的分泌, 延缓胃排空, 抑制胃酸分泌, 减少食管下段括约肌压力, 刺激肠道运动及胰岛素、胰高血糖素、生长抑素及胰多肽分泌, 对胰腺还有营养功能. 支配胆囊的神经纤维来自迷走神经前干的肝支, 腹腔神经丛的交感纤维, 右膈神经的肝丛以及位于平滑肌层和黏膜下层的自主神经丛. 在胆囊壁内神经丛中可见胆碱能、肾上腺素能、肽类及5-羟色胺等神经元. CCK就是从内发现的肽类的一种. 因此整个胆囊的静息张力和收缩性实际上就是由具有兴奋性的CCK、乙酰胆碱和局抑制性的血管活性肠肽等共同调节的结果<sup>[9]</sup>. 另据报道CCK-8与促胰液素(SEC)能显著增加大鼠肝细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性, 从而促进肝细胞对水和电解质的转运, 使胆酸非依赖性胆汁增加, 从而导致胆汁流量的增加<sup>[10]</sup>. CCK能显著抑制固体及液体胃排空, 是通过舒张近端胃和提高幽门括约肌张力及改变胃排空模式达到抑制胃排空作用<sup>[11]</sup>. 小肠营养成分引起释放的CCK虽然兴奋胃窦收缩, 但在其他激素及神经作用背景下, CCK对胃排空的作用仍然是抑制性的. 总之, CCK在刺激胆汁分泌、收缩胆囊、舒张Oddi括约肌、抑制胃排空, 从而为胆汁反流创造了极为有利的条件, 作用极为关键.

**2.2.2 胃泌素、胰高血糖素、生长抑素** 据梁丕霞 *et al*<sup>[12]</sup> 研究报道, 在引起应激性溃疡时应激组观察到高胃泌素, 高胃酸, 高胰高血糖素, 低生长抑素水平. 许多文献报道神经肽存在于脑及周围神经, 是脑-肠轴功能联系的传递物质. 胃泌素是最强的促胃酸分泌激素, 可使胃壁细胞最大限度的分泌盐酸. 在低血糖时, 由于胃泌素的分泌增加使泌酸作用更加增强. 同时, 胃泌素对肝胆汁的分泌及胆囊平滑肌的收缩均有刺激作用, 他通过血液循环作用于肝细胞和胆囊; 也可先引起胃酸分泌, 后者作用于十二指肠黏膜, 引起促胰液素释放而促进肝胆汁分泌<sup>[13]</sup>. 胃泌素增高的原因可能是通过应激状态下迷走神经兴奋而调节的. 胰高血糖素使血糖增高, 并受低血糖的负反馈调节, 抑制胃泌素和组胺刺激胃酸分泌的作用. 高血糖状态可使胃排空延迟, 据Ishiguchi *et al*<sup>[14]</sup> 研究, 灌注D-葡萄糖溶液可以明显降低摄食引起的胃窦与幽

门之间协调运动, 负反馈引起的胃收缩也因为高血糖而显著减少. 在迷走神经切除后大鼠却不能观察到胃窦幽门的协调运动, 提示迷走神经参与了其中的调节作用. 高血糖症削弱了胃窦收缩以及胃窦幽门十二指肠协调作用. 而且高血糖对胃排空的抑制作用至少部分是因为损害迷走神经活动所致. 这也为胆汁反流出现起到一定的促进作用. 生长抑素存在于下丘脑, 脑和周围神经组织, 以及胃肠道黏膜和胰腺中的内分泌-旁分泌D细胞. 许多含有生长抑素的细胞有突触终止于胃窦的G细胞和泌酸黏膜中的壁细胞上. 这从解剖角度解释了生长抑素对胃泌素分泌细胞和壁细胞的局部(旁分泌)释放作用. 生长抑素可以减少30%左右内脏血流量, 降低35%左右的门静脉压, 可抑制胃酸分泌, 抑制胃肠运动. 对胃肠运动的抑制也可破坏了抗胆汁反流的第二道屏障, 为胆汁反流创造条件. 同时可抑制肝细胞分泌胆汁, 抑制胆囊收缩, 降低胆汁流率<sup>[15]</sup>, 主要是通过小管的重吸收增加或小管分泌减少所致. 而该激素水平的下降可进一步促进胆汁的分泌, 对胆汁反流起到一定的促进作用.

**2.2.3 胃动素** 胃动素(MTL)主要存在于十二指肠和空肠黏膜的内分泌细胞, 当十二指肠内pH值增加时, MTL释放增加, 以增强胃底和胃窦动力, 促进胃排空. MTL主要促进MMC III期(周期性的移行性复合运动波)的活动增加, 故其在空腹情况下对周期性排空起促进作用. 有研究<sup>[16-17]</sup>证实胃动素对胆囊和肝胰壶腹括约肌的兴奋作用主要是通过内源性胆碱能神经实现的, 因此其作用在行迷走神经切除术后仍可保留, 但可被阿托品和六烃季胺所阻断. 据孙丹莉 *et al*<sup>[4]</sup>研究显示, 十二指肠胃反流患者MTL值较慢性浅表性胃炎患者下降且无显著差异性, 说明在本组病例空腹时, 当CCK分泌增加, Oddi氏括约肌松弛, 胆汁排入十二指肠增多情况下MTL无相应分泌增加, 以促进空腹时MMC III期的活动增加, 提示本组存在相应的胃排空障碍. 而MMC III期活动主要是清扫在消化期未能被消化的食物以及消化间期的反流物, 与胆汁反流密切相关, 因此检测应激时该激素的变化可以说明其部分原因.

**2.3 Oddi氏括约肌功能失调** Oddi氏括约肌的收缩舒张对于调节胆囊排泌胆汁起十分重要的作用, 其运动形式有时相性收缩和张力性收缩两种. 而时相性收缩中的前向性收缩作用十分重要, 对于调节胆汁流动以及胆汁向十二指肠远处移动起到关键作用. 同时也受神经-体液支配, 有关应激状态下其功能的变化与胆汁反流关系也值得深入研究.

**2.4 胃幽门十二指肠协调运动的破坏** 消化间期胃幽门十二指肠的运动有一定的规律, 呈周期性的移行性复合运动(MMC)的表现. MMC III期的收缩活动呈移行

性, 从胃窦越过幽门至十二指肠及小肠远端. 在II相时常有反流发生, 由于II相胃的运动与餐后的运动形式相似, 推测II相具有类似于餐后胃的排空运动, 及时地排除了反流的胆汁、胃窦II相运动低下的患者, 反流的发生率明显提高, III相由于运动连续不断地向前移行, 具有清洁夫作用, 清扫在消化期未能被消化的食物以及消化间期的反流物<sup>[1-2]</sup>. 此相发生率减少或起源异常也可导致反流增加. 应激状态下MMC活动受到严重影响, 尤其是III期的清扫夫作用消失后, 使得反流物在胃内滞留时间增加, 对胃黏膜损害作用增强, 促进了病变的发生发展. Testoni *et al*发现, 胆汁反流也与MMC II胃窦的收缩压低, 动力指数明显下降有关<sup>[18]</sup>. 据Phillips *et al*<sup>[19]</sup>研究证实, 近端十二指肠的收缩先于十二指肠关闭即可导致十二指肠胃反流, 如果灌注液体到十二指肠不仅仅刺激肠受体, 也可以刺激胃受体. 而且, 即使相对少的灌输量以及小肠的膨胀可以很有效的破坏其协调性和运动性. 对十二指肠灌注液体可以降低周期性胃收缩. Holzer和Raybould证实十二指肠灌注液体(0.1-0.5 mL)后扩张可以降低近端胃运动功能, 并且呈容量依赖性. 十二指肠的扩张还可破坏正常幽门功能, 最后, 高容量的灌注液到达空肠可以导致肠收缩活动的完全停止. 应激时胃电活动也发生明显改变. 应激状态下, 胃十二指肠动力障碍表现为胃肠平滑肌收缩的频率增加, 幅度加强以及时间延长, 加重了胃黏膜缺血. 如用平滑肌松弛剂如阿托品等则可减轻应激性溃疡的发生. 同时胃肠平滑肌基本电节律活动明显紊乱, 表现为自发慢波幅度和峰电位发放率显著增加<sup>[20]</sup>. 因为基本电节律和峰电位发放是平滑肌运动的生物电基础, 能量代谢障碍和屏障功能下降, 促使溃疡发生. 对于应激状态下胃窦平滑肌电活动节律异常的检测也能成为胃排空减慢的原因之一.

### 3 胆汁反流引起胃黏膜损害的机制

胆汁是混合性液体, 主要由胆盐、电解质、蛋白质、酶类、脂质等组成, 是具有很强洗涤剂特性的亲脂类固醇, 尤其是其中的胆盐、胰酶、磷脂酶A对黏膜屏障具有明显的溶解和破坏作用<sup>[21]</sup>. 据相关研究显示应激时胃内pH值先升高后下降<sup>[6]</sup>, 部分因为应激时由于交感-肾上腺系统的影响, 胃酸分泌相对减少, 同时胆汁反流的出现, 也进一步升高了胃内pH值. 而pH值的提高可以进一步增加非结合胆汁酸对胃黏膜的损害, 因为这时非结合胆汁酸以亲脂性的非离子形式存在, 能透过黏膜屏障而损伤细胞<sup>[22]</sup>. 据研究证实非结合胆汁酸对胃黏膜和磷状上皮的毒性要比结合胆汁酸强, 因为二者具有不同的生理生化属性.

同时反流物中溶血卵磷脂、胰酶可以起到增效剂的作用。而pH值越低,其增效作用就越明显<sup>[2]</sup>。有报道证实,在应激发生时,胃黏液的保护作用也受到破坏。现已观察发现大多数危重患者在禁食和饥饿状态下,胃黏液的主要成分氨基己糖明显减少;同时也注意到危重患者胃肠道紊乱;十二指肠中胆汁反流胃内,胆盐对胃黏液的破坏。这些因素破坏了胃黏液对黏膜的保护作用,也破坏了抗胆汁反流的第三道屏障同时也加重应激时胃黏膜损害<sup>[23]</sup>。另外,危重疾病需要辅助呼吸的患者,胆酸和溶血性卵磷脂的反流增加<sup>[3]</sup>。

总之,有关急性胃黏膜病变时胆汁反流出现原因的研究目前还比较有限,很多都是处于假设和展望之中,还有待于进一步的研究证实。

#### 4 参考文献

- 1 Kawiorski W, Herman RM, Legutko J. Current diagnosis of gastroduodenal reflux and biliary gastritis. *Przegl Lek* 2001; 58:90-94
- 2 Fuchs KH, Maroske F, Fein M, Tiggers H, Ritter MP, Heimbucher F, Thiede A. Variability in the composition of physiologic duodenogastric reflux. *J Gastrointest Surg* 1999; 3:389-396
- 3 Schindlbeck NE, Lippert M, Heinrich C, Muller-Lissner SA. Intra-gastric bile acid concentrations in critically ill, artificially ventilated patients. *Am J Gastroenterol* 1989;84:624-628
- 4 孙丹莉, 张予蜀, 孙士其. 十二指肠胃反流与胆囊切除术关系的临床研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2002;11:356-357.
- 5 戴益琛, 陈文柳, 张忠兵, 沈建伟, 左秀丽. 一氧化氮和肠血管活性肽对幽门功能的调节及其在胆汁反流中的作用. *临床消化病杂志* 2000;12:13-15
- 6 陈敏, 罗和生, 全巧云, 陈继红, 李贤珍. 大鼠应激性溃疡幽门区降钙素基因相关肽及一氧化氮变化对胃内胆汁反流的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:2131-2134
- 7 李贤珍, 罗和生, 于皆平, 陈敏, 胡利明. 创伤应激对兔胆汁流量

- 及胃肠激素的影响. *胃肠病学和肝病学杂志* 2004;13:375-376
- 8 Cho CH, Qui BS, Bruce IC. Vagal hyperactive in stress induced gastric ulceration in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:125
  - 9 刘嘉林, 李宁, 肖路加. CCK及CCK受体与胆囊结石的关系. *国外医学外科学分册* 1997;24:211-213
  - 10 陈萍, 郑捷, 陈原稼, 陈元方. 胆囊收缩素, 促胰液素和胆机制的初步研究. *中国药理学通报* 1996;12:382
  - 11 陈代陆, 王振华. 胆囊收缩素对消化道运动调节作用的研究进展. *临床消化病杂志* 2002;14:185-186
  - 12 梁丕霞, 杨昭徐, 张绍东, 吴建中. 大鼠应激性溃疡与胃泌素、胰高血糖素和生长抑素的相关性研究. *首都医学院学报* 1995;16:287-289
  - 13 Glasser SS, Rodgers RE, Phinizz J. Gastrin inhibits secretion-induced ductal secretion by interaction with specific receptors on rat cholangiocytes. *Am J Physiol* 1998;275(4Pt1):G835-846
  - 14 Ishiguchi T, Tada H, Nakagawa K, Yamamura T, Takahashi T. Hyperglycemia impairs antro-pyloric coordination and delays gastric emptying in conscious rats. *Auton Neurosci* 2002;95:112-120
  - 15 Kher K, Guelrud M. Normal sphincter of oddi motor function. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:163-168
  - 16 Chathadi KV, Elta GH. Motility and dysmotility of the biliary tract. *Semin Gastrointest Dis* 2003;14:199-207
  - 17 Shaffer EA. Review article: control of gall-bladder motor function. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14(Suppl 2):2-8
  - 18 曾锦章, 张万岱, 彭武和, 张振书, 张洪海, 周殿元. 胆汁反流性胃炎胃排空和胃窦平滑肌电改变的研究. *中华消化杂志* 1997;17:152-154
  - 19 Phillips RJ, Walls EK, Powley TL. Duodenogastric reflux of intestinal infusions in rats is volume dependent. *Appetite* 1996; 27:79-90
  - 20 张根葆, 钱大青, 孙俊, 秦兵, 徐玉兰. 银杏叶提取物对大鼠应激性溃疡的保护作用. *世界华人消化杂志* 1999;7:869-871
  - 21 张万岱, 曾锦章. 胆汁反流性胃炎研究现状及展望. *华人消化杂志* 1998;6(特刊7):17-19
  - 22 Theisen J, Nehra D, Citron D, Johansson J, Hagen JA, Crookes PF, DeMeester SR, Bremner CG, DeMeester TR, Peters JH. Suppression of gastric acid secretion in patients with gastroesophageal reflux disease results in gastric bacterial overgrowth and deconjugation of bile acids. *J Gastrointest Surg* 2000;4:50-54
  - 23 邓跃林. 应激性溃疡的研究进展. 《国外医学》麻醉学与复苏分册 1994;15:195-196

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)



# 人胃癌细胞肿瘤相关基因的表达与甲基化调控

杨 丽, 朱红音, 程中华, 陆 嵘, 陈紫暄, 房静远

杨丽, 同济大学附属同济医院消化科 上海市 200065  
朱红音, 程中华, 陆嵘, 陈紫暄, 房静远, 上海第二医科大学附属仁济医院消化疾病研究所 上海市 200001  
杨丽, 女, 1973-11-16 生, 山东省肥城市人, 汉族. 2003 年上海第二医科大学硕士.  
国家自然科学基金资助项目, No. 30170413  
通讯作者: 房静远, 200001, 上海市山东中路 145 号, 上海第二医科大学附属仁济医院消化疾病研究所. jingyuanfang@yahoo.com  
电话: 021-63200874 传真: 021-63266027  
收稿日期: 2005-01-24 接受日期: 2005-02-26

## Expression and methylation of tumor-associated genes in human gastric cancer cell lines

Li Yang, Hong-Yin Zhu, Zhong-Hua Cheng, Rong Lu, Ying-Xuan Chen, Jing-Yuan Fang

Li Yang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji University, Shanghai 200065, China  
Hong-Yin Zhu, Zhong-Hua Cheng, Rong Lu, Ying-Xuan Chen, Jing-Yuan Fang, Institute of Digestive Disease, the Affiliated Renji Hospital of Shanghai Second Medical University, Shanghai 200001, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30170413  
Correspondence to: Dr. Jing-Yuan Fang, Institute of Digestive Disease, the Affiliated Renji Hospital of Shanghai Second Medical University, 145 Shandong Zhong Road, Shanghai 200001, China.  
jingyuanfang@yahoo.com  
Received: 2005-01-24 Accepted: 2005-02-26

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression and methylation of tumor suppressor genes and oncogenes in the carcinogenesis of gastric cancer, and to further explore new methods for the treatment of gastric cancer.

**METHODS:** The gastric cancer MKN-45 and HGC-27 cell lines were cultured and then exposed to different concentrations (2  $\mu\text{mol/L}$ , 5  $\mu\text{mol/L}$  and 10  $\mu\text{mol/L}$ ) of 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC) for 24 and 72 hours. MTT assay was used to examine the viability of the cells. Then the DNA and RNA of the cells were extracted and the expression of p16<sup>INK4A</sup>, p21<sup>WAF1</sup>, p53, c-myc, and c-Ha-ras were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). At the same time, the cell cycles of MKN-45 and HGC-27 were observed by flow cytometry. Bisulfite modification and sequencing and methylation-specific PCR were used to detect the methylation of p16<sup>INK4A</sup> and c-myc promoter region.

**RESULTS:** The concentrations and exposed time of 5-aza-dC had no significant effect on the viability of gastric cancer cells. p16<sup>INK4A</sup> was expressed in both MKN-45 and HGC-27 cells before treatment. After treated with 5-aza-dC, p16<sup>INK4A</sup> expression was increased in both kinds of the cells, and the 5-aza-dC concentration and exposed time were different between the two kinds of cells when the most markedly increased expression of p16<sup>INK4A</sup> appeared. p53, p21<sup>WAF1</sup>, c-myc and c-Ha-ras were all expressed before and after treatment. HGC-27 cells were blocked at G1 period, but no changes of MKN-45 cell cycle were observed. Methylation in p16<sup>INK4A</sup> promoter region occurred so that the expression of this gene was reduced. After treated with demethylation agent 5-aza-dC, the expression of p16<sup>INK4A</sup> was increased.

**CONCLUSION:** Methylation regulates the expression of p16<sup>INK4A</sup>, but not p21<sup>WAF1</sup>, p53, c-myc, and c-Ha-ras. 5-aza-dC can up-regulate the transcription of tumor suppressor gene through demethylation, in which its concentration and exposed time play an important role.

**Key Words:** Methylation; Tumor suppressor genes; Oncogene; Gastric cancer

Yang L, Zhu HY, Cheng ZH, Lu R, Chen YX, Fang JY. Expression and methylation of tumor-associated genes in human gastric cancer cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1493-1498

## 摘要

**目的:** 旨在阐明胃癌的发生中多种抑癌基因和癌基因的甲基化情况, 以期为进一步深入探索通过改变抑癌基因的甲基化而为胃癌治疗提供新方法.

**方法:** 培养人胃癌细胞株 MKN-45 和 HGC-27 两种细胞, 在 MTT 确定去甲基化制剂 5-氮脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, 5-aza-dC) 浓度和时间对细胞生长活力没有影响后, 分别以 2, 5, 和 10  $\mu\text{mol/L}$  浓度分别干预 24 和 72 h, 然后提取其 DNA 和 RNA, 用 RT-PCR 的方法检测 p16<sup>INK4A</sup>, p21<sup>WAF1</sup>, p53, c-Ha-ras 和 c-myc 等多种基因的表达情况; 同时以流式细胞仪分析药物干预后的 MKN-45 和 HGC-27 的细胞周期变化; DNA 分析则通过亚硫酸氢盐修饰和测序和甲基化特异性 PCR(MSP) 的方法检测 p16<sup>INK4A</sup> 基因及 c-myc 启动子区甲基化的情况.

**结果:**我们所采用的 5-aza-dC 的浓度和时间对细胞的生长无显著性影响.5-aza-dC 干预前, MKN-45 和 HGC-27 两种胃癌细胞系中均有 p16<sup>INK4A</sup> 表达, 5-aza-dC 干预后在 MKN-45 和 HGC-27 两种胃癌细胞系中 p16<sup>INK4A</sup> 的表达增强,且不同的胃癌细胞株表达增强最明显时的时间与浓度不同.p53, p21<sup>WAF1</sup>, c-myc, c-Ha-ras 等多种基因在干预前后均有表达,且在干预前后无明显变化.在 5-aza-dC 干预后, HGC-27 细胞周期阻滞在 G1 期, 而 MKN-45 细胞的周期无明显改变.p16<sup>INK4A</sup> 启动子区存在甲基化使得该基因的表达减少, 在去甲基化试剂处理后使其表达增强.

**结论:**人胃癌细胞系 MKN-45 和 HGC-27 中, p16<sup>INK4A</sup> 启动子甲基化是其在表达减弱的主要原因, 其去甲基化程度取决于 5-aza-dC 干预的时间和浓度.

**关键词:** 甲基化; 抑癌基因; 癌基因; 胃癌

杨丽, 朱红音, 程中华, 陆嵘, 陈蒙恒, 房静远. 人胃癌细胞肿瘤相关基因的表达与甲基化调控. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1493-1498  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1493.asp>

## 0 引言

DNA 甲基化在肿瘤的发生和发展中扮演着极其重要的角色, DNA 甲基化异常是通过影响癌基因和抑癌基因的表达以及基因组的稳定性而参与肿瘤的发生和发展的. 胃癌是危害我国人们生命和健康的主要癌症之一, 我们采用去甲基化作用的 5-aza-dC 处理 MKN-45 和 HGC-27 胃癌细胞株, 研究胃癌的与细胞增殖相关的基因甲基化紊乱情况, 澄清是否同一个体肿瘤发生过程中存在不同基因的低甲基化或高甲基化紊乱问题, 探索通过纠正 DNA 甲基化的化学干预, 而影响胃癌细胞的增殖, 进而控制肿瘤进程的可能性如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 MKN-45 和 HGC-27 人胃癌细胞株细胞来自上

海市消化疾病研究所, 5- 氮脱氧胞苷 (5-aza-dC) (Sigma), RPMI1640 培养基 (Gibco), 小牛血清, 胰蛋白酶、HEPES、L- 谷氨酰胺、焦碳酸二乙酯 (DEPC) (Amresco), 四甲基偶氮唑盐 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) (Sigma), 细胞培养瓶、96 孔细胞培养板 (Nunc), Trizol 试剂、RNA 酶抑制剂 (Gibco), 三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇 (分析醇) 购于上海化学试剂总公司, dNTP mixture (10 mmol/L)、TaqDNA 寡合酶 (5 MU/L) (Takara), oligo(dT)、RT-PCR 引物合成 (上海生工生物公司), M-MLV 逆转录酶: Peomega 公司产品, PCR Mark:100 bp DNA Ladder (上海生工生物公司), 琼脂糖 (华美公司), QIAamp DNA Mini kit (Germany, Cat.No. 51304)

1.2 方法 人胃癌细胞系 MKN-45 和 HGC-27 培养, MTT 比色实验筛选对细胞的生长无显著性影响的 5-aza-dC 浓度和时间. 细胞培养和相应药物浓度时间的干预, Trizol 等相关试剂抽提细胞 RNA, RT-PCR 扩增 p16<sup>INK4A</sup>, p21<sup>WAF1</sup>, p53, c-Ha-ras 和 c-myc 基因, 引物序列见表 1, 反应体系如下 (25  $\mu$ L): 10 $\times$  buffer 2.5  $\mu$ L, Mg<sup>2+</sup> 1.5  $\mu$ L, dNTP 0.5  $\mu$ L, 引物 1 1  $\mu$ L (10 pmol), 引物 2 1  $\mu$ L (10 pmol), cDNA 2.0  $\mu$ L, Taq 酶 1.5 U, 琼脂糖电泳分析. 流式细胞仪检测相关细胞周期. QIAamp DNA Mini kit 抽提 5-aza-dC 干预后的和对照组的 MKN-45 和 HGC-27 细胞 DNA. DNA 亚硫酸氢盐处理: 取 5  $\mu$ g DNA 加 NaOH 至终浓度为 0.2 mol/L, 37 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 向变性 DNA 中加入新鲜配置的 10 mmol/L 的氰脲 30  $\mu$ L 及 3 mol/L 的亚硫酸氢钠 (pH = 5) 520  $\mu$ L, 加入矿物油 200  $\mu$ L, 样品于 50 $^{\circ}$ C 孵育 16 h, 修饰后的 DNA 根据说明书用 Wizerd DNA 纯化树脂 (Promega) 纯化, 用水 50  $\mu$ L 洗脱. 加 5.5  $\mu$ L 3 mol/L NaOH 至洗脱液, 室温放置 5 min, 加 17  $\mu$ L 10 mol/L 的醋酸胺, 糖原 1  $\mu$ L 及 950 mL/L 冰冷乙

表 1 RT-PCR 各引物序列、反应条件和基因登录号

引物	正义(5' $\rightarrow$ 3')	反义(5' $\rightarrow$ 3')	反应条件及产物大小	GeneBank Number
$\beta$ -Actin	GGC ATC GTG ATG GAC TCC G	GCT GGA AGG TGG ACA GCG A	94 $^{\circ}$ C 5 min, 92 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 50 s, 30 cycle, 72 $^{\circ}$ C 5 min; 612 bp	BC023204
p16 <sup>INK4A</sup>	CCC GCT TTC GTA GTT TTC AT	TTA TTT GAG CTT TGG TTC TG	94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 cycle, 72 $^{\circ}$ C 5 min; 355 bp	L27211
p21 <sup>WAF1</sup>	CCC AGT GGA CAG CGA GCA GC	ACT GCA GGC TTC CTG TGG GC	94 $^{\circ}$ C 5 min, 92 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 cycle, 73 $^{\circ}$ C 5 min; 450 bp	S 67388
p53	CAG CCA AGT CTG TGA CTT GCA CGT AC	CTA TGT CGA AAA GTG TTT CTG TCA TC	94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 cycle, 72 $^{\circ}$ C 5 min; 292 bp	XM 008679
c-myc	CCA ACA GGA GCT ATG ACC TC	CTC GGT CAC CAT CTC CAG CT	94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 cycle, 72 $^{\circ}$ C 5 min; 290 bp	V00568
c-Ha-ras	CAA GAG TGC GCT GAC CAT CC	CCG GAT CTC ACG CAC CAA C	95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 1 min, 63 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 cycle, 72 $^{\circ}$ C 5 min; 420 bp	BC006499

表2 甲基化测序引物序列及PCR扩增条件

引物	正义(5' → 3')	反义(5' → 3')	反应条件及产物大小	GeneBank Number
p16 <sup>INK4A</sup> SecA1	GTA GGT GGG GAG GAG TTT AGT T	TCT AAT AAC CAA CCA ACC CCT CC	95°C 5 min, 95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min, 40 cycle, 72°C 5 min; 280 bp	AF022809
p16 <sup>INK4A</sup> SecA2	GGG GGA GAT TTA ATT TGG	CCC TCC TCT TTC TTC CTC	95°C 5 min, 95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min, 40 cycle, 72°C 5 min; 190 bp	AF022809
c-myc meth-MSP (exon1-2)	TAG AAT TGG ATC GGG GTA AA	CGA CCG AAA ATC AAC GCG AAT	95°C 5 min, 95°C 1 min, 56°C 2 min, 72°C 3 min, 5 cycle, 95°C 30 s; 131 bp 56°C 30 s, 72°C 1 min, 35 cycle, 72°C 5 min,	AF002859
c-myc unmeth-MSP (exon1-2)	TAG AAT TGG ATT GGG GTA AA	CCA ACC AAA AAT CAA CAT GAA T	95°C 5 min, 95°C 1 min, 56°C 2 min; 132 bp 72°C 3 min, 5 cycle; 95°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 1 min, 35 cycle; 72°C 5 min	AF002859

醇 500  $\mu\text{L}$  过夜, 14 000  $g$  4°C 离心 30 min, 以 700 mL/L 乙醇洗沉淀物, 真空干燥, 加水 20  $\mu\text{L}$ , 冻存 -70°C 或 MSP 和测序. 设计巢式 PCR 引物及 MSP 引物见表 2, 巢式 PCR 扩增体系 1 (25  $\mu\text{L}$ ): 10  $\times$  buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  3  $\mu\text{L}$ , dNTP 2  $\mu\text{L}$ , 引物 1 2  $\mu\text{L}$  (10 pmol/L), 引物 2 2  $\mu\text{L}$  (10 pmol/L), 亚硫酸氢钠处理后的 DNA 6  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 1.5 U, 水补足体系至 25  $\mu\text{L}$ , PCR 体系 2 (25  $\mu\text{L}$ ): 10  $\times$  buffer 2.5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  3  $\mu\text{L}$ , dNTP 2  $\mu\text{L}$ , 引物 1 2  $\mu\text{L}$  (10 pmol), 引物 2 2  $\mu\text{L}$  (10 pmol), DNA 6  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 1.5 U, 水补足体系至 25  $\mu\text{L}$ , 加入物为 PCR 体系 1 产物, 对产物 p16<sup>INK4A</sup> 启动子测序, MSP 检测 c-myc 甲基化.

## 2 结果

未分化胃癌细胞 HGC-27 细胞在 2  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  5-aza-dC 干预 72 h 后细胞死亡, 故未对其进行 MTT 实验. 试验表明与对照组相比, 浓度为 2  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  5-aza-dC 24 h 干预 HGC-27 胃癌细胞时, 对细胞活力没有明显变化 ( $P>0.05$ ). p16<sup>INK4A</sup> 在 MKN-45 细胞系的 10  $\mu\text{mol/L}$  24 h、2  $\mu\text{mol/L}$  72 h、5  $\mu\text{mol/L}$  72 h 组处理后

增强, 且表达的增强与处理时间和剂量不呈依赖关系, 而 p53, p21<sup>WAF1</sup>, c-myc, c-Ha-ras 的处理前后表达无明显变化 (图 1). p16<sup>INK4A</sup> 在 HGC-27 细胞系的 5  $\mu\text{mol/L}$  24 h 组和 10  $\mu\text{mol/L}$  24 h 组处理后表达增强, 且表达的增强与处理时间和剂量不呈依赖关系, 而 p53, p21<sup>WAF1</sup>, c-myc, c-Ha-ras 的处理前后表达无明显变化 (图 2). 肿瘤相关基因 p53, p21<sup>WAF1</sup>, c-myc, c-Ha-ras 在 5-aza-dC 处理前后没有明显关系, 说明甲基化对上述基因 mRNA 表达的影响不明显. 抑癌基因 p16<sup>INK4A</sup> 在不同浓度 5-aza-dC 干预下有不同程度的表达增强, 以 ACTIN 为对照进行光密度扫描. 干预前 MKN-45 和 HGC-27 细胞 02 和 88.2, 5, 10  $\mu\text{mol/L}$  5-aza-dC 干预 24 h 为 106, 131, 141 和 118, 141, 135; 72 h 为 151, 165, 138. 采用流式细胞仪检测细胞周期, 与未处理对照组比较  $P<0.05$  (表 3). 对 PCR 体系 2 产物进行测序, 结果显示 p16<sup>INK4A</sup> 因 5' 端, 对照组甲基化片段 (图 3A) 中所有的 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶保持不变, 而 5  $\mu\text{mol/L}$  5-aza-dC 干预组中非甲基化片断 (图 3B) 中所有的胞嘧啶都变成了胸腺嘧啶. HGC-27 细胞 c-myc MSP 结果表明 HGC-27 细胞的 c-myc 中有异常甲基化现象, 甲基化和非甲基化碱基共存,

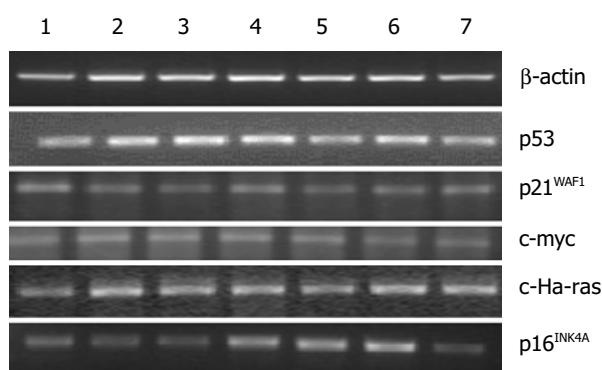


图1 5-aza-dC 对 MKN-45 细胞肿瘤相关基因表达的影响. 1: control; 2: 2  $\mu\text{mol/L}$  24 h; 3: 5  $\mu\text{mol/L}$  24 h; 4: 10  $\mu\text{mol/L}$  24 h; 5: 2  $\mu\text{mol/L}$  72 h; 6: 5  $\mu\text{mol/L}$  72 h; 7: 10  $\mu\text{mol/L}$  72 h.

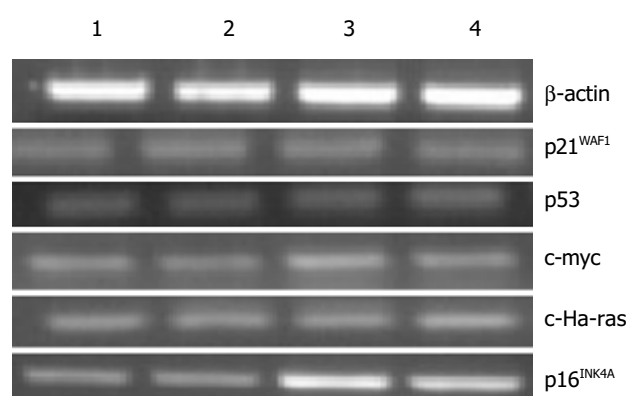


图2 5-aza-dC 对 HGC-27 细胞肿瘤相关基因表达的影响. 1: control; 2: 2  $\mu\text{mol/L}$  24 h; 3: 5  $\mu\text{mol/L}$  24 h; 4: 10  $\mu\text{mol/L}$  24 h.

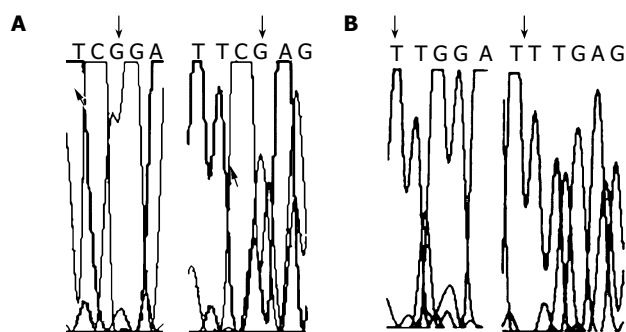


图3 p16<sup>INK4A</sup> 启动子序列. A: Control; B: 5 μmol/L 5-aza-dC 干预 24 h.

且在去甲基化试剂处理前后没有明显变化(图4). MKN-45细胞的c-myc中也有异常甲基化现象, 甲基化和非甲基化碱基共存, 且在去甲基化试剂处理前后没有明显变化(图5).

表3 5-aza-dC 24h 对 HGC-27 和 MKN-45 细胞周期的影响 (mean±SD, %)

分组	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
HGC-27 对照组	43.7 ± 2.78	46.8 ± 5.95	11.5 ± 4.98
2 μmol/L 5-aza-dC	47.5 ± 1.36	39.4 ± 0.51	13.1 ± 1.25
5 μmol/L 5-aza-dC	51.8 ± 1.61 <sup>a</sup>	31.3 ± 1.60 <sup>a</sup>	17.0 ± 0.38 <sup>a</sup>
10 μmol/L 5-aza-dC	51.4 ± 2.34 <sup>a</sup>	32.5 ± 1.91 <sup>a</sup>	17.1 ± 3.13 <sup>a</sup>
MKN-45 对照组	70.4 ± 0.75	19.3 ± 0.15	10.3 ± 0.67
2 μmol/L 5-aza-dC	63.6 ± 7.21	23.9 ± 5.43	12.5 ± 1.79
5 μmol/L 5-aza-dC	63.0 ± 6.29	24.4 ± 5.16	12.6 ± 1.36
10 μmol/L 5-aza-dC	69.9 ± 3.14	19.3 ± 2.90	10.9 ± 1.17

<sup>a</sup>P<0.05 vs 对照组.

### 3 讨论

在人类肿瘤中基因已知的三个失活途径包括: 缺失, 点突变和启动子甲基化, 后者属于表观遗传变化 (epigenetic changes). DNA甲基化是指由DNA甲基化转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 催化的DNA的一种天然修饰方式, 他广泛存在于细菌、植物和哺乳动物, 在真核生物中DNA甲基转移酶以S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-methionine, SAM) 为甲基供体将甲基转移到胞嘧啶第五位碳原子上. 甲基化的胞嘧啶多位于CpG岛上, 在DNA双链中呈对称性分布.

现已证实, DNA甲基化在肿瘤的发生和发展中扮演着极其重要的角色, DNA甲基化异常是通过影响癌基因和抑癌基因的表达以及基因组的稳定性而参与肿瘤的发生和发展的. 近来人们发现肿瘤细胞的总基因组甲基化水平比正常细胞低, 但是伴有某些特定CpG岛甲基化程度的增高. 抑癌基因的高度广泛甲基化使DNA发生转录抑制, 抑癌基因的不表达参与了肿瘤

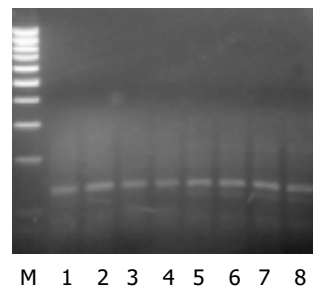


图4 HGC-27细胞c-myc MSP. M: Mark; 1: control; 2: 2 μmol/L; 3: 5 μmol/L; 4: 10 μmol/L; 5: control; 6: 2 μmol/L; 7: 5 μmol/L; 8: 10 μmol/L.

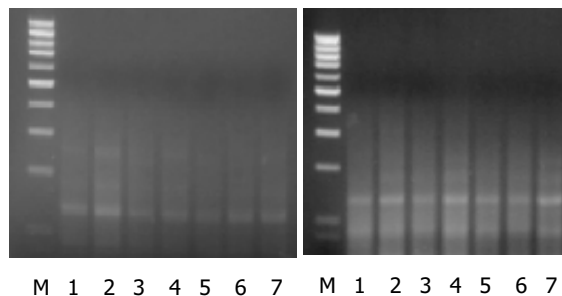


图5 MKN-45细胞c-myc, MSPM. Mark; 1: control; 2: 2 μmol/L; M: Mark; 1: control; 2: 2 μmol/L 3: 5 μmol/L 24 h; 4: 10 μmol/L 24 h; 3: 5 μmol/L 24 h; 4: 10 μmol/L 24 h; 5: 2 μmol/L 2 h; 6: 5 μmol/L 72 h; 5: 2 μmol/L 72 h; 6: 5 μmol/L 72 h 7: 10 μmol/L 72 h; 7: 10 μmol/L 72 h.

的发生. 转录抑制机制可能是: 1. CpG岛甲基化直接干扰转录因子 (transcription factor, TF) 与调控区DNA的结合, 如CAMP反应元件结合蛋白、AP-2、E2F等之后, TF不能于其相应的甲基化DNA结合位点相结合; 2. 甲基化DNA结合蛋白 (MBD2) 以及甲基胞嘧啶结合蛋白1和2 (methylation binding proteins 1 and 2, MeCP1 and MeCP2) 与甲基化DNA特异结合, 抑制基因转录; 3. DNA甲基化也可以改变染色质结构, 间接抑制基因转录. 癌基因和抑癌基因的甲基化与肿瘤的发生和发展之间的关系已成为肿瘤研究的另一热点.

我们采用体外培养胃癌细胞株研究甲基化与胃癌的关系. 首先MTT比色法测定发现, 给予的5-aza-dC药物浓度和时间对细胞的生长没有明显影响后, RT-PCR检测到两种细胞株的癌基因c-myc、c-Ha-ras和抑癌基因p21<sup>WAF1</sup>、p53在处理前后表达没有明显变化, 说明甲基化对这两种细胞系的这几种基因mRNA表达影响不大, 而p16<sup>INK4A</sup>在HGC-27细胞系的5 μmol/L 24 h组和10 μmol/L 24 h组处理后表达增强, MKN-45细胞系的10 μmol/L 24 h、2 μmol/L 72 h、5 μmol/L 72 h组处理后增强, 且表达的增强与处理时间和剂量不呈依赖关系, 提示各种细胞对5-aza-dC的敏感剂量各不相同, 这可能会对今后选择药物的时间和剂量具有借鉴作用.

p16<sup>INK4A</sup>基因是一抑癌基因, 除了等位基因缺失罕

见的失活性突变外,多数的研究表明 p16<sup>INK4A</sup> 基因启动子部位的甲基化的紊乱是基因静默的主要机制<sup>[1-6]</sup>. p16<sup>INK4A</sup> 基因 5-CpG 岛甲基化已经被证实并且与脑瘤、颈部肿瘤、肺癌、胃癌、食管癌和膀胱癌的转录抑制有密切的关系,而且用 5-aza-dC 干预甲基化的细胞群导致启动子区域甲基化水平的严重下降而使 p16<sup>INK4A</sup> 基因重新表达.

Lee *et al*<sup>[7]</sup>发现原发性胃癌中 p16<sup>INK4A</sup> 基因的 mRNA 转录缺陷往往因为 DNA 甲基化的紊乱.他们认为 DNA 甲基化可能是 p16<sup>INK4A</sup> 基因失活的一条途径,由此可进而发展为胃癌.5' 端和第 1 外显子的异常甲基化,使 p16<sup>INK4A</sup> 基因在有些人胃癌细胞系中不能被检出,且此转录抑制可因为应用 5-aza (5-aza-dC 类似物)而逆转.Shim *et al*<sup>[8]</sup>也用 MSP 检测到胃癌中的 p16<sup>INK4A</sup> 甲基水平:42% 胃癌有高甲基化,高甲基化病例中 (19/22) 有完全 p16<sup>INK4A</sup> 的活性丢失,而未甲基化病例 19 人中只有 2 人. p16<sup>INK4A</sup> 高甲基化同免疫活性的相关性分析表明甲基化是胃癌中 p16<sup>INK4A</sup> 失活的重要机制.有学者<sup>[9]</sup>采用亚硫酸氢盐修饰和测序分析了 9 个胃癌细胞系,发现 p16<sup>INK4A</sup> 表达失活伴同其启动子区的高甲基化.28 例患者中的 6 例有 p16<sup>INK4A</sup> 表达缺失,5 例有启动子区甲基化.这表明启动子区特殊 CpG 岛的从头甲基化与 p16<sup>INK4A</sup> 的转录静默有明显关系,RT-PCR 实验结果也初步的证实了 p16<sup>INK4A</sup> 基因的 mRNA 表达受甲基化调控.我们采用了同一方法检测发现,在启动子区存在甲基化,使该细胞基因的表达减少,去甲基化试剂处理后,使其甲基化程度减少.序列分析中对照组在亚硫酸氢盐处理后 CG 没有变化,说明其中的 C 是甲基化的,而去甲基化处理后 CG 在亚硫酸氢盐处理后变为 TG,说明其中的 C 是非甲基化的,这可以解释处理组中的 p16<sup>INK4A</sup> 表达增强.我们还对癌基因 c-myc DNA 进行甲基化特异性 PCR (MSP) 分析<sup>[10]</sup>.证明 c-myc DNA 中有异常甲基化现象,甲基化和非甲基化碱基共存,且在去甲基化试剂处理前后没有明显变化,这也解释了在这两种细胞中去甲基化试剂对癌基因的表达没有造成明显影响的原因.

p53 和 p21<sup>WAF1</sup> 是重要的抑癌基因,参与细胞增殖、监视 DNA 损伤和诱导细胞凋亡、影响其他基因表达.但是在此肿瘤细胞系中未发现甲基化对其 mRNA 表达的影响不大.Shin<sup>[11]</sup>博士的结果也显示胃癌细胞中 p21<sup>WAF1</sup> 基因启动子并未甲基化,说明甲基化并不是胃癌细胞中 p21<sup>WAF1</sup> 失活的机制. c-myc 和 c-Ha-ras 是胃癌中的癌基因,参与多种细胞功能,通常在正常组织的 c-myc 基因 3' 端 C. 既往的研究结果表明 c-myc 基因在胃癌和肝癌发生中低甲基化<sup>[12-13]</sup>. c-Ha-ras 的 CGCG 序列在胃癌、肺癌以及肝癌中甲基化程度降

低,但是我的研究未能得到此结论.这可能与细胞系种类有关,可能在这两种细胞系中癌基因的甲基化紊乱不起主要作用.

我们对细胞周期的研究也有部分发现.细胞周期中各期均有其相应的周期素 (cycline)、周期素依赖激酶 (CDK) 和周期素依赖激酶抑制剂 (CDKI) 控制. CDKI 可抑制细胞周期进程,例如 p16<sup>INK4A</sup>、p21<sup>WAF1</sup>、p27<sup>KIP1</sup>、p57<sup>KIP2</sup> 等都是对细胞周期起负调控作用的 CDKI.一旦 p16<sup>INK4A</sup> 基因失活,可导致 CDK 激活,细胞过度增殖,细胞周期加速,特别是在 DNA 没有被修复前就过早地进入 S 期,会导致肿瘤的发生.我们研究了两种细胞周期后发现 HGC-27 细胞在 5-aza-dC 5  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  24 h 组细胞阻滞于 G<sub>1</sub> 期 ( $P < 0.05$ ),而 MKN-45 细胞没有这种现象,说明这种阻滞可能与 p16<sup>INK4A</sup> 恢复表达量有关,可能 p16<sup>INK4A</sup> 达到一定水平时,才能发挥其对细胞周期的调控作用.上述结果可能得出:5-aza-dC 通过恢复 p16<sup>INK4A</sup> 阻止细胞过度增殖作用,有组织特异性.即组织来源不同,5-aza-dC 的 G<sub>1</sub> 期阻滞作用表现很大差异,可能与作用与 p16<sup>INK4A</sup> 功能尚未完全恢复有关.这与国外学者和国内学者的研究结果一致<sup>[14-16]</sup>.本研究还表明 HGC-27 细胞的 G<sub>2</sub>/M 期阻滞也有意义,现有研究阶段表明 G<sub>2</sub>/M 的调控机制受 p53、p21<sup>WAF1</sup> 和不依赖 p53 所影响,但是细胞周期受多种基因和细胞因子的调控,其机制复杂而又不完善,有许多环节尚未被认识,有待今后进一步研究.

总之,本实验首次在同一胃癌细胞系中同时观察多个基因是否为甲基化调控,显示了在人胃癌细胞系 MKN-45 和 HGC-27 中,去甲基化能明显提高 p16<sup>INK4A</sup> mRNA 的表达,表明 p16<sup>INK4A</sup> 启动子甲基化是其在表达减弱的主要原因,且去甲基化程度取决于 5-aza-dC 干预的时间和浓度.

**致谢:**感谢罗鸿好和沈冠凤协助流式细胞仪分析,童菊芳和李恩灵在细胞培养工作的帮助!

#### 4 参考文献

- 1 Rocco JW, Didransky D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001;264:42-55
- 2 Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nat Med* 1995;1:686-692
- 3 Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, Nguyen T, Beart RW, Van Tornout JM, Jones PA. Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Res* 1995;55:4531-4535
- 4 Sakuma K, Chong JM, Sudo M, Ushiku T, Inoue Y, Shibahara J, Uozaki H, Nagai H, Fukayama M. High-density methylation of p14ARF and p16INK4A in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004;112:273-278
- 5 Koike H, Ichikawa D, Ikoma H, Otsuji E, Kitamura K,

- Yamagishi H. Comparison of methylation-specific polymerase chain reaction (MSP) with reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) in peripheral blood of gastric cancer patients. *J Surg Oncol* 2004;87:182-186
- 6 Ichikawa D, Koike H, Ikoma H, Ikoma D, Tani N, Otsuji E, Kitamura K, Yamagishi H. Detection of aberrant methylation as a tumor marker in serum of patients with gastric cancer. *Anticancer Res* 2004;24:2477-2481
- 7 Lee YY, Kang SH, Seo JY, Jung CW, Lee KU, Choe KJ, Kim BK, Kim NK, Koeffler HP, Bang YJ. Alteration of p16INK4a and p15 INK4B genes in gastric carcinomas. *Cancer* 1997;80:1889-1896
- 8 Shim YH, Kang HG, Ro JY. Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Lab Invest* 2000;80:689-695
- 9 Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang SH, Ryu MH, Kim NK, Kim WH, Bang YJ. Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16 (INK4a) expression in gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2000;87:236-240
- 10 Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Neldin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG island. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-9826
- 11 Shin JY, Kim HS, Park J, Park JB, Lee JY. Mechanism for inactivation of the KIP family cyclin-dependent kinase inhibitor genes in gastric cancer cells. *Cancer Res* 2000;60:262-265
- 12 Shen L, Fang J, Qiu D, Zhang T, Yang J, Chen S, Xiao S. Correlation between DNA methylation and pathological changes in human hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1998;45:1753-1759
- 13 Fang JY, Zhu SS, Xiao SD, Jiang SJ, Shi Y, Chen XY, Zhou XM, Qian LF. Studies on the hypomethylation of c-myc, c-Ha-ras oncogenes and histopathological changes in human gastric carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1996;11:1079-1082
- 14 杜红玲, 任立敏, 陈华, 朱燕, 戚豫. 丁酸钠与5-氮杂-2'-脱氧胞苷协同诱导U266细胞p16基因重新表达. 第一军医大学学报 2002;22:981-984
- 15 晁红霞, 孙建衡, 陆士新. 5-氮-2'-脱氧胞苷对子宫内腺癌裸鼠移植瘤细胞凋亡及细胞周期的影响. 癌症 2001;20:489-492
- 16 Bender CM, Pao MM, Jones PA. Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res* 1998;58:95-101

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 消息 •

## 世界华人消化杂志入编《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, 采用了被索量、被引量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等7个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达51种, 统计文献量达到943万余篇次(1999-2001年), 涉及期刊1万2千种. 本版还加大了专家评审力度, 1873位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1800种核心期刊, 分属七大编75个学科类目. 该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书.

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

# 胃癌组织 PLK1 的表达及其意义

张庆, 刘南植, 洪玮, 倪志, 李秀梅

张庆, 刘南植, 洪玮, 倪志, 李秀梅, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科 湖北省武汉市 430030

通讯作者: 刘南植, 430030, 湖北省武汉市汉口解放大道 1095 号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院消化内科. www95@126.com

电话: 027-83663595

收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-05-14

## Expression of Polo-like kinase 1 and its significance in gastric carcinoma

Qing Zhang, Nan-Zhi Liu, Wei Hong, Zhi Ni, Xiu-Mei Li

Qing Zhang, Nan-Zhi Liu, Wei Hong, Zhi Ni, Xiu-Mei Li, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China  
Correspondence to: Nan-Zhi Liu, Department of Gastroenterology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. www95@126.com

Received: 2005-04-26 Accepted: 2005-05-14

### Abstract

**AIM:** To investigate the expression of Polo-like kinase 1 (PLK1) and its relationship with clinicopathological characteristics, anti-oncogene and tumor proliferation in human gastric carcinoma, and to explore the role of PLK1 in the carcinogenesis and progression of tumor and its clinical significance.

**METHODS:** The expression of PLK1, P53 and Ki67 was detected in tissues of gastric carcinoma ( $n = 54$ ), atypical hyperplasia ( $n = 10$ ) and normal gastric mucosa ( $n = 15$ ) by immunohistochemical method.

**RESULTS:** PLK1 was negatively expressed in normal mucosa. Weakly positive staining for PLK1 was observed in 4 out of 11 Atypical hyperplasia tissues. The expression of PLK1 was elevated in 88.9%(48/54) of the gastric carcinoma. There were no significant associations between PLK1 and clinicopathological characteristics such as histological differentiation, distant metastasis and lymph node metastasis ( $P > 0.05$ ). PLK1 expression was significantly related to the depth of invasion ( $\chi^2 = 6.775$ ,  $P < 0.01$ ) and TMN staging ( $\chi^2 = 9.009$ ,  $P < 0.01$ ). In gastric cancer, positive staining for P53 was detected in 38 of 54 cases (70.4%). P53 expression was significantly associated with PLK1 ( $\chi^2 = 6.664$ ,  $P < 0.05$ ). The mean value of Ki67 labelling index (Ki67 LI) was  $34.7 \pm 13.4\%$ , with a range

of 10.3-60.1%. PLK1 expression was positively associated with Ki67 level ( $r = 0.720$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** PLK1 is over-expressed in gastric cancer, and associated with tumor proliferation and anti-oncogene. PLK1 plays an important role in the carcinogenesis and development of gastric carcinoma.

**Key Words:** Polo-like kinase 1; Gastric carcinoma; P53; Ki67

Zhang Q, Liu NZ, Hong W, Ni Z, Li XM. Expression of Polo-like kinase 1 and its significance in gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(13):1499-1502

### 摘要

**目的:** 研究 Polo 样激酶 1(Polo-like kinase 1, PLK1)在胃癌中的表达与各临床病理特征、抑癌基因和肿瘤增殖活性的关系, 探讨 PLK1 在胃癌发生发展中的作用以及其临床意义。

**方法:** 运用免疫组织化学的方法检测正常胃组织 15 例, 非典型增生组织 11 例, 胃癌 54 例中 PLK1, Ki67, P53 的表达。

**结果:** PLK1 在正常胃组织中表达均为阴性; 11 例非典型增生组织有 4 例弱阳性; 胃癌中有 48 例阳性(88.9%), 其表达与组织分化程度、远处转移和淋巴结转移无关 ( $P > 0.05$ ), 与浸润深度( $\chi^2 = 6.775$ ,  $P < 0.01$ )和临床分期( $\chi^2 = 9.009$ ,  $P < 0.01$ )相关。在胃癌中, P53 阳性 38 例(70.4%), PLK1 的表达与 P53 蛋白积聚相关( $\chi^2 = 6.664$ ,  $P < 0.05$ )。胃癌中 Ki67 标记指数均值为  $34.7 \pm 13.4\%$ , 范围为 10.3-60.1%, PLK1 的表达与 Ki67 呈正相关 ( $r = 0.720$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** PLK1 在胃癌中高表达, 与肿瘤的增殖活性和抑癌基因相关, 在胃癌发生发展中起重要作用。

**关键词:** Polo 样激酶 1; 胃癌; P53; Ki67

张庆, 刘南植, 洪玮, 倪志, 李秀梅. 胃癌组织 PLK1 的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1499-1502  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1499.asp>

### 0 引言

Polo 样激酶 1(Polo-like kinase 1, PLK1)是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸激酶<sup>[1]</sup>, 他参与了细胞周

期中中心体的成熟、纺锤体的形成以及染色体的分离等过程,对细胞的有丝分裂起重要的调控作用.在正常情况下,DNA受损时会通过抑制PLK1的活性而阻止细胞进入分裂期(M期)<sup>[2-3]</sup>.目前已发现PLK1在多种肿瘤中呈异常高表达<sup>[4]</sup>.为此我们采用免疫组织化学的方法检测PLK1,P53和Ki67在胃癌中的表达,并分析PLK1与各临床病理特征、抑癌基因(P53)和肿瘤增殖活性的相关性,探讨PLK1在人类胃癌发生发展中的作用以及对临床的指导意义.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2003/2004年华中科技大学同济医学院附属同济医院手术切除的胃癌标本54例,均经病理检查确诊,男33例,女21例,平均年龄52.9岁.按UICC新TMN分期标准分为I期10例,II期17例,III期11例,IV期16例.另非典型增生组织11例和正常胃组织15例(来源于胃镜活检).标本均经40 g/L甲醛固定,常规石蜡包埋,切成3-5  $\mu\text{m}$ 切片.鼠抗人PLK1 mAb购自美国Santa Cruz公司;鼠抗人Ki67 mAb、鼠抗人P53 mAb、AEC显色试剂盒均购自福州迈新公司;SP免疫组化试剂盒和DAB显色试剂盒购自北京中山生物工程有限公司.

**1.2 方法** 采用免疫组织化学SP法,染色步骤按试剂盒说明进行.用PBS代替一抗作阴性对照,已知阳性切片作阳性对照.PLK1和Ki67采用DAB显色,P53采用AEC显色.阳性结果判断标准:(1)PLK1染色结果判定:胞质或胞核呈棕黄色或棕褐色为阳性,在不同位置取5个高倍视野( $\times 400$ ),记数200个肿瘤细胞/视野,共计1000个,阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为(-);阳性细胞数6-30%为(+);阳性细胞数31-60%之间为(++);阳性细胞数 $>60\%$ 为(+++).(2)Ki67标记指数(Ki67 Labeling Index, Ki67 LI)的测定:胞核呈棕黄色或棕褐色为阳性,每个标本随机选5个高倍镜视野( $\times 400$ ),计数1 000个肿瘤细胞,其中阳性细胞所占百分比即为Ki67 LI.(3)P53阳性判定标准:胞核呈红色为阳性,其中肿瘤细胞着色率 $<10\%$ 为(-),肿瘤细胞着色率 $\geq 10\%$ 为(+).

**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 $\chi^2$ 检验、Fisher精确检验、直线相关分析进行数据分析,以 $P<0.05$ 为差异具有显著性.

## 2 结果

**2.1 PLK1的表达** PLK1表达主要定位于细胞胞质中,为棕黄色或棕褐色,少数胞核中也可有表达.在15例正常胃组织中PLK1均未见明显表达(图1A);11例非典型增生组织中,4例+(36.4%),均为低表达(图1B),7例-.在胃癌组织中PLK1可见明显表达(图1C):54例胃癌中有6例+,30例++,12例+++,6例-,阳性率88.9%,阳性细胞率均值 $40.9 \pm 18.6\%$ (mean $\pm$ SD).则PLK1在胃癌中的表达明显高于正常和非典型增生组织( $P<0.05$ ,表1).

表1 PLK1分别在正常、非典型增生组织和胃癌组织中的表达

诊断	n	-	+	++	+++	阳性数
正常胃组织	15	15	0	0	0	0(0%)
非典型增生	11	7	4	0	0	4(36.4%)
胃癌	54	6	6	30	12	48(88.9%)

**2.2 PLK1表达与胃癌临床病理特征的关系** PLK1在胃癌中的表达与组织分化程度、远处转移和淋巴结转移均无关( $P>0.05$ ),而随着临床分期的进展,PLK1的表达增高,各期间的表达率有显著性差异( $\chi^2 = 9.009$ ,  $P<0.01$ ,表2),还与肿瘤的浸润深度相关( $\chi^2 = 6.775$ ,  $P<0.01$ ,表2).

**2.3 PLK1表达与P53, Ki67 LI的关系** 在胃癌中P53和Ki67均为核表达(图2).P53阳性38例(70.4%),其中PLK1(+)/P53(+)37例,PLK1(+)/P53(-)11例,PLK1(-)/P53(+)1例,PLK1(-)/P53(-)5例,在胃癌中PLK1的表达与P53蛋白积聚显著相关( $\chi^2 = 6.664$ ,  $P<0.05$ ,表2).胃癌中Ki67 LI均值为 $34.7 \pm 13.4\%$ (mean $\pm$ SD),范围为10.3-60.1%,通过相关分析PLK1的表达与Ki67 LI呈正相关( $r = 0.720$ ,  $P<0.01$ ).

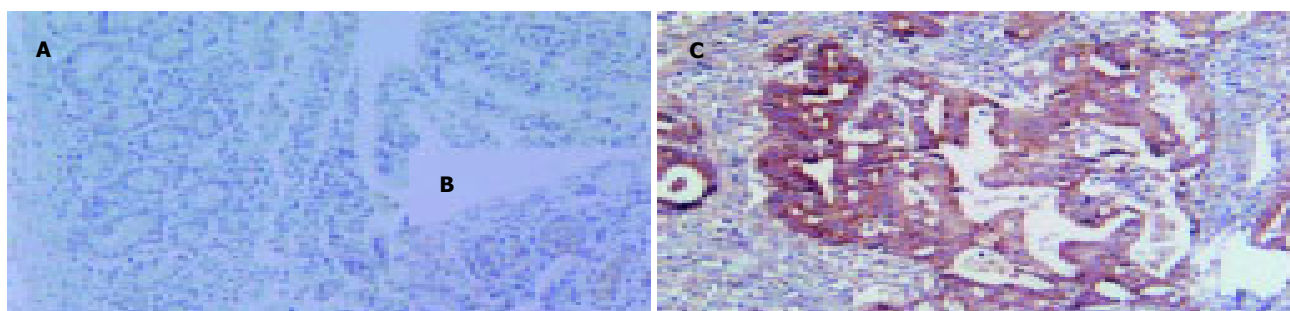


图1 正常、非典型增生组织和胃癌组织PLK1的表达. A: 正常组织未见明显表达( $\times 100$ , DAB显色); B: 非典型增生组织中可见少数弱阳性( $\times 100$ , DAB显色); C: 胃癌组织PLK1可见明显表达( $\times 200$ , DAB显色).



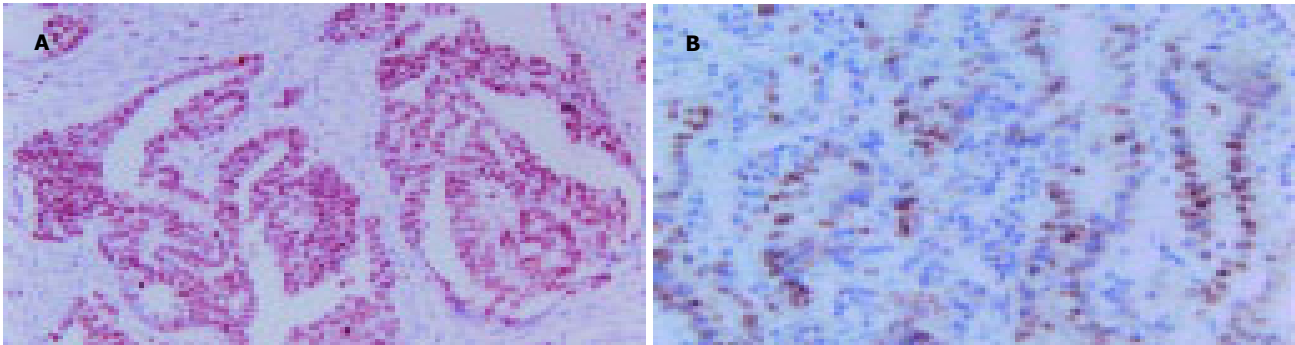


图2 胃癌组织中P53和Ki67的表达. A: P53 阳性表达( $\times 100$ , AEC 显色); B: Ki67 阳性表达( $\times 200$ , DAB 显色).

表2 PLK1 在胃癌中的表达与各临床病理特征和 P53 的关系

临床特征		n	PLK1	
			阴性	阳性
分化程度	高	5	0	5
	中	10	0	10
	低	39	6	33
临床分期	I	10	4	6 <sup>b</sup>
	II	17	2	15
	III	11	0	11
	IV	16	0	16
浸润深度	T1	11	4	7 <sup>b</sup>
	T2	6	0	6
	T3	24	2	22
	T4	13	0	13
淋巴结转移	有	34	2	30
	无	20	4	18
远处转移	有	15	1	14
	无	39	5	34
P53	阳性	38	1	37 <sup>b</sup>
	阴性	16	5	11
总计		54	6	48

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs 阴性.

3 讨论

肿瘤的发生和发展是在多种因素的作用下, 包括癌基因激活以及抑癌基因失活的结果, 而癌基因和抑癌基因作用的归结均在于对细胞周期的调控, 细胞周期的调控失常是肿瘤发生的主要原因<sup>[5]</sup>. PLK1 在G2晚期M初期参与CDC25C的激活、继而促成Cyclin B/Cdc2的激活, 协助中心体的功能成熟以及纺锤体的形成, 从而促进M期的起始和染色体正常分离分配<sup>[6-8]</sup>; 通过调节APC(anaphase-promoting complex)来决定细胞能否按期离开M期; 他在细胞自我保护中也起到着重要作用, 当DNA受损时可引起PLK1 苏氨酸残基磷酸化而使其活性受抑, 从而使细胞阻滞于G2/M期<sup>[9-11]</sup>; 在分裂活跃的组织器官或肿瘤细胞中 PLK1 活性较高.

PLK1 在许多人类肿瘤和细胞系中提示高表达, 如非小细胞肺癌<sup>[12]</sup>、头颈部鳞癌<sup>[13]</sup>、食管癌、胃癌<sup>[14]</sup>、结肠癌<sup>[15]</sup>、乳腺癌<sup>[16]</sup>、卵巢癌<sup>[17]</sup>、子宫内膜癌<sup>[18]</sup>、黑色素瘤<sup>[19]</sup>、前列腺癌<sup>[20]</sup>、非霍奇金淋巴瘤<sup>[21]</sup>等. 此外Smith *et al*<sup>[22]</sup>报道 PLK1 的过多表达能使NIH3T3 细胞癌基因聚集, 这些细胞能在裸鼠上形成肿瘤. 这些研究表明PLK1可能参与人类肿瘤发生发展. Tokumitsu *et al*<sup>[14]</sup>曾从mRNA 水平上对75 例胃癌 PLK1 的表达进行分析, 高表达为55 例(73%). 我们从蛋白水平对 PLK1 在正常、非典型增生和胃癌组织进行分析, 正常组织均未见明显表达; 非典型增生组织中有4 例弱阳性(36. 4%), 均为低表达; 54 例胃癌中48 例阳性(88. 9%). 在胃癌中 PLK1 高表达, 明显高于正常和非典型增生性组织; 并且PLK1的表达在各临床分期中有着显著性差异, 随临床分期的进展, 表达增高, 还与肿瘤浸润深度相关, 而与组织分化程度、远处转移和淋巴结转移无关. 由此从mRNA 水平和蛋白水平都反映了 PLK1 在胃癌中高表达, 说明 PLK1 在胃癌发生发展上可能起着重要的作用, 在诊断上可作为一个新的肿瘤标志物.

P53 是一种抑癌基因, 对细胞周期的调控和肿瘤的转归起着重要作用<sup>[23]</sup>. 据研究表明, PLK1 能抑制P53的转录, 从而影响诱导细胞凋亡的活性, P53可能是 PLK1 的一个作用靶点<sup>[24]</sup>. Liu *et al*<sup>[25]</sup>在 PLK1 基因敲除细胞中发现 P53 大量聚集, 提示 PLK1 对 P53 的活性有调节作用. 我们在通过突变型P53抗体对胃癌的检测发现, PLK1 (+)/P53 (+) 37 例, PLK1 (+)/P53 (-) 11 例, PLK1 (-)/P53 (+) 1 例, PLK1 (-)/P53 (-) 5 例, 在胃癌中 PLK1 的表达与 P53 蛋白积聚明显相关( $P<0.05$ ). 从而表明, PLK1 除了对肿瘤细胞的细胞周期调控外, 可能还通过对抑癌基因调节参与胃癌的发生发展.

在肿瘤诊断中, 肿瘤增殖活性是一个评价肿瘤进展的重要参数. Ki67 是一种细胞增殖核抗原, 存在于G0 期以外的所有细胞周期中, 在有丝分裂后迅速降解或失去抗原决定簇, 因此, 被认为是反映细胞增殖状态的理想标记物, 并且还与肿瘤预后密切相关<sup>[26-27]</sup>. 在

我们的实验中,胃癌PLK1的表达与Ki67LI呈正相关( $r = 0.720$ ,  $P < 0.01$ ),表明PLK1可反映胃癌的增殖活性,可能对预后判定也有作用.临床分期和组织分级系统最重要的功能是评价预后和指导治疗,而在我们的实验中PLK1的表达与胃癌临床分期相关.此外许多关于肿瘤PLK1的表达与预后的研究发现<sup>[12-14, 20-21]</sup>: PLK1的表达与预后相关,PLK1表达越高预后越差.因此PLK1不仅可反映胃癌的增殖活性,而且可能象非小细胞肺癌、头颈鳞状细胞癌、食管癌、前列腺癌和非霍奇金淋巴瘤等一样对预后判定有着重要意义.

根据PLK1在许多肿瘤中高表达,与肿瘤细胞增殖和致癌性转化密切相关,目前已经建立了针对PLK1 mRNA的反义寡核苷酸和小干扰RNA(small interference RNA, siRNA),他们能特异性的对PLK1 mRNA及其蛋白产物表现为剂量依赖性的抑制作用,由此也抑制了PLK1的丝氨酸/苏氨酸激酶的活性,能有效抑制培养细胞系或裸鼠肿瘤模型中肿瘤细胞的增殖<sup>[28]</sup>.说明了PLK1可以作为肿瘤治疗的一个靶点,在临床治疗中有着重要的指导作用.综合以上,我们的研究表明PLK1在胃癌中表达明显高于正常和非典型增生组织,其表达与临床分期、浸润深度和肿瘤增殖活性密切相关,与抑癌基因(P53)相互作用,在胃癌的发生发展中可能起着重要作用,在胃癌诊断中可作为一种新的肿瘤标志物,在临床治疗和预后判定中有一定的指导意义.

#### 4 参考文献

- Donohue PJ, Alberts GF, Guo Y, Winkles JA. Identification by targeted differential display of an immediate early gene encoding a putative serine/threonine kinase. *J Biol Chem* 1995; 270:10351-10357
- Smits VA, Klompmaker R, Arnaud L, Rijksen G, Nigg EA, Medema RH. Polo-like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat Cell Biol* 2000;2:672-676
- Jackman M, Lindon C, Nigg EA, Pines J. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat Cell Biol* 2003;5:143-148
- Eckerdt F, Yuan J, Strebhardt K. Polo-like kinases and oncogenesis. *Oncogene* 2005;24:267-276
- Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 2000;35:111-115
- Roshak AK, Capper EA, Imburgia C, Fornwald J, Scott G, Marshall LA. The human polo-like kinase, PLK, regulates cdc2/cyclin B through phosphorylation and activation of the cdc25C phosphatase. *Cell Signal* 2000;12:405-411
- Toyoshima-Morimoto F, Taniguchi E, Nishida E. Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep* 2002;3:341-348
- Yuan J, Eckerdt F, Bereiter-Hahn J, Kurunci-Csacsko E, Kaufmann M, Strebhardt K. Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1. *Oncogene* 2002;21:8282-8292
- Kotani S, Tugendreich S, Fujii M, Jorgensen PM, Watanabe N, Hoog C, Hieter P, Todokoro K. PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell* 1998;1:371-380
- Sumara I, Vorlaufer E, Stukenberg PT, Kelm O, Redemann N, Nigg EA, Peters JM. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Mol Cell* 2002;9:515-525
- Golan A, Yudkovsky Y, Hershko A. The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J Biol Chem* 2002;277:15552-15557
- Wolf G, Elez R, Doermer A, Holtrich U, Ackermann H, Stutte HJ, Altmannsberger HM, Rubsamen-Waigmann H, Strebhardt K. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1997;14:543-549
- Knecht R, Elez R, Oechler M, Solbach C, von Ilberg C, Strebhardt K. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999;59:2794-2797
- Tokumitsu Y, Mori M, Tanaka S, Akazawa K, Nakano S, Niho Y. Prognostic significance of polo-like kinase expression in esophageal carcinoma. *Int J Oncol* 1999;15:687-692
- Takahashi T, Sano B, Nagata T, Kato H, Sugiyama Y, Kunieda K, Kimura M, Okano Y, Saji S. Polo-like kinase 1 (PLK1) is overexpressed in primary colorectal cancers. *Cancer Sci* 2003; 94:148-152
- Wolf G, Hildenbrand R, Schwar C, Grobholz R, Kaufmann M, Stutte HJ, Strebhardt K, Bleyl U. Polo-like kinase: a novel marker of proliferation: correlation with estrogen-receptor expression in human breast cancer. *Pathol Res Pract* 2000;196:753-759
- Weichert W, Denkert C, Schmidt M, Gekeler V, Wolf G, Kobel M, Dietel M, Hauptmann S. Polo-like kinase isoform expression is a prognostic factor in ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2004;90:815-821
- Takai N, Miyazaki T, Fujisawa K, Nasu K, Hamanaka R, Miyakawa I. Polo-like kinase (PLK) expression in endometrial carcinoma. *Cancer Lett* 2001;169:41-49
- Kneisel L, Strebhardt K, Bernd A, Wolter M, Binder A, Kaufmann R. Expression of polo-like kinase (PLK1) in thin melanomas: a novel marker of metastatic disease. *J Cutan Pathol* 2002;29:354-358
- Weichert W, Schmidt M, Gekeler V, Denkert C, Stephan C, Jung K, Loening S, Dietel M, Kristiansen G. Polo-like kinase 1 is overexpressed in prostate cancer and linked to higher tumor grades. *Prostate* 2004;60:240-245
- Mito K, Kashima K, Kikuchi H, Daa T, Nakayama I, Yokoyama S. Expression of Polo-Like Kinase (PLK1) in non-Hodgkin's lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2005;46:225-231
- Smith MR, Wilson ML, Hamanaka R, Chase D, Kung H, Longo DL, Ferris DK. Malignant transformation of mammalian cells initiated by constitutive expression of the polo-like kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:397-405
- Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-331
- Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A. Polo-like kinase 1 (Plk1) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation. *J Biol Chem* 2004;279:25549-25561
- Liu X, Erikson RL. Polo-like kinase (Plk) 1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:578
- van Oijen MG, Medema RH, Slootweg PJ, Rijksen G. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol* 1998;110:24-31
- Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 2002;40:2-11
- Reagan-Shaw S, Ahmad N. Silencing of polo-like kinase (Plk) 1 via siRNA causes induction of apoptosis and impairment of mitosis machinery in human prostate cancer cells: implications for the treatment of prostate cancer. *FASEB J* 2005;19:611-613

# 原发性肝癌肿瘤微血管形态特征与其生物学特性的关系

李功杰, 杨立, 史晓林, 盛复庚, 乔鹏岗

李功杰, 盛复庚, 乔鹏岗, 中国人民解放军 307 医院放射科  
北京市 100039

杨立, 中国人民解放军 301 医院放射科 北京市 100853

史晓林, 中国人民解放军 301 医院消化科 北京市 100853

李功杰, 男, 1965-11-21 生, 北京市人, 汉族, 1990 年第四军医大学本科学历, 2003 年解放军军医进修学院获医学影像学硕士学位, 副主任医师, 主要从事肿瘤的影像学诊断及介入治疗。

通讯作者: 杨立, 100853, 北京市复兴路 28 号, 中国人民解放军 301 医院放射科, yangli301@yahoo.com

电话: 010-66939564

收稿日期: 2005-03-07 接受日期: 2005-05-06

## Relationship between morphological characteristics of tumor microvessel and biological features of primary hepatocellular carcinoma

Gong-Jie Li, Li Yang, Xiao-Lin Shi, Fu-Geng Sheng, Peng-Gang Qiao

Gong-Jie Li, Fu-Geng Sheng, Peng-Gang Qiao, Department of Radiology, the 307 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China  
Li Yang, Department of Radiology, the 301 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Xiao-Lin Shi, Department of Gastroenterology, the 301 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Correspondence to: Li Yang, Department of Radiology, the 301 Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Haidian District, Beijing 100853, China. yangli301@yahoo.com

Received: 2005-03-07 Accepted: 2005-05-06

## Abstract

**AIM:** To investigate the relationship between the tumor microvascular characteristics and biological features of primary hepatocellular carcinoma (HCC).

**METHODS:** Thirty-two tumor specimens were resected from patients with HCC. The tumor microvessel density (MVD), microvessel diameter (MD), trabecular diameter (TD) and diameter ratio of tumor microvessel to trabecular (D-TM/T) of HCC with different differentiated degree, sizes, and blood supply in DSA were analyzed statistically.

**RESULTS:** The grades of tumor microvessel type tended to go up with the growth of HCC ( $r_s = 0.55$ ,  $P = 0.001$ ). With the increase of tumor microvessel grades, DSA blood supply tended to be higher types ( $r_s = 0.56$ ,  $P = 0.001$ ). MVD was different between different sizes of HCC, and the highest value, which was significantly higher than that of HCC with the diameters of  $\leq 3$  cm ( $P = 0.005$ ) and  $> 5$  cm ( $P = 0.016$ ), appeared in tumors with the diameters of 3-

5 cm. MD was increased with the increase of HCC diameter. MVDs in low, moderate and high blood supply HCC were  $45.34 \pm 21.18$ ,  $69.50 \pm 54.18$  and  $61.56 \pm 38.94$  respectively, and MVD in low blood supply HCC was much markedly lower than that in moderate and high one ( $P = 0.014$ ,  $P = 0.031$ ). Tumor MD and D-TM/T was increased from low to high blood supply HCC accordingly. Tumor MD of low blood supply HCC was significantly smaller than that in high one ( $P = 0.044$ ), and D-TM/T obviously lower than moderate and high one ( $P = 0.017$ ,  $P = 0.008$ ). MVD showed no significant difference between high and moderate blood supply HCC. MVD was not significantly related to the differentiated degree of HCC ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The characteristics of tumor microvessels are regularly different during the progress of HCC. HCC with different blood supply shows significant differences in features of tumor microvessels.

**Key Words:** Hepatocellular carcinoma; Tumor microvascular characteristics; Biological feature; Microvessel density

Li GJ, Yang L, Shi XL, Sheng FG, Qiao PG. Relationship between morphological characteristics of tumor microvessel and biological features of primary hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1503-1506

## 摘要

**目的:** 探讨 HCC 肿瘤微血管特征与其大小、细胞分化程度、DSA 血供分型等生物学特性的关系。

**方法:** 选取手术切除前做过血管造影且未做栓塞治疗的 HCC 标本 32 例。对不同分化程度、大小、DSA 血供分型肝癌的 MVD、肿瘤微血管直径、肿瘤梁索直径、肿瘤微血管梁索直径比进行相关统计学分析。

**结果:** 随 HCC 生长, 肿瘤微血管分型有增高的趋势( $r_s = 0.55$ ,  $P = 0.001$ ); 肝癌 DSA 血供分型随肿瘤微血管分型增加呈增加的趋势( $r_s = 0.56$ ,  $P = 0.001$ ); 不同大小肝癌 MVD 不同, 3-5 cm 组肝癌的 MVD 最大, 与  $\leq 3$  cm 及  $> 5$  cm 组比  $P = 0.005$  及  $P = 0.016$ ; 随 HCC 生长, 微血管直径有增高的趋势; 肿瘤 MVD 在乏血供、中等血供、富血供 HCC 中分别为  $45.34 \pm 21.18$ 、 $69.50 \pm 54.18$  和  $61.56 \pm 38.94$ , 乏血供组 MVD 明显小于中等血供和富血供组( $P = 0.014$ ,  $P = 0.031$ )。肿瘤微血管直径、微血管梁索直径比有随 HCC 血供分级

由乏血供至富血供有明显的增加趋势,乏血供HCC肿瘤微血管直径明显低于富血供HCC( $P=0.044$ ),其血管梁索直径比明显低于中等血供和富血供组( $P=0.017$ ,  $P=0.008$ );富血供HCC与中等血供相比,MVD基本相似,而富血供HCC的微血管直径有大于中等血供HCC的趋势;MVD与肝癌分化程度无关( $P>0.05$ ).

**结论:** HCC在生长的不同阶段,其肿瘤微血管特征是不同的,并有一定的发展规律;HCC的DSA不同血供类型之间有明显的肿瘤微血管特征差异.

**关键词:** 肝细胞癌;肿瘤微血管特征;生物学特性;微血管密度

李功杰, 杨立, 史晓林, 盛复庚, 乔鹏岗. 原发性肝癌肿瘤微血管形态特征与其生物学特性的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1503-1506

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1503.asp>

## 0 引言

肿瘤微血管(angiogenesis)是实体肿瘤生长和转移的病理基础和必要条件,肿瘤微血管密度(microvessel density, MVD)可作为判断肿瘤患者预后的独立指标<sup>[1-2]</sup>. 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国发病率第3的恶性肿瘤,关于HCC肿瘤微血管形态特征与肿瘤生物学特性关系的研究仅见对肝癌MVD与肿瘤大小、肿瘤分化程度及预后关系的研究,对肿瘤微血管其他特征与肿瘤临床特性的关系尚未见报道. 我们探讨HCC肿瘤微血管特征与其大小、细胞分化程度、DSA血供分型等生物学特性的关系.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 1988-01/2002-02手术切除前曾行血管造影且未做栓塞治疗的HCC标本32例,男26例,女6例. 年龄28-76(平均 $50.6 \pm 10.5$ )岁. 血管造影至手术切除时间为13-70(平均 $31.9 \pm 19.1$ )d. 肿瘤直径为2-23(平均 $8.1 \pm 6.2$ )cm. 血清HBsAg阳性29例. 肝功Child I级15例, II级14例, III级3例. 细胞高分化(I、II级)4例,中分化(III级)15例,低分化(IV级)13例.

### 1.2 方法

**1.2.1 肝细胞癌DSA检查** 应用数字减影血管造影机. 采用Seldinger法穿刺股动脉,将导管送至腹腔动脉、肝总动脉或肠系膜上动脉变异的肿瘤供血动脉近端,用电动高压注射器,分别以5 mL/s、4 mL/s和4 mL/s速率注入600 g/L优维显25 mL、20 mL、20 mL,进行正位DSA,持续曝光20 s. 造影完毕即反复动态观察各期影像表现,按杨立 *et al*<sup>[3]</sup>的肝癌DSA分型方法进行血供分型.

**1.2.2 免疫组化染色** 取肝癌附有癌周肝组织的蜡块,连续切片,切片厚度为5  $\mu$ m,除1张做常规HE染色

外,余片均用于MVD染色. 采用免疫组化S-P法染色,抗体为北京中山生物技术有限公司提供的鼠抗CD<sub>34</sub>(BI-3C5)工作液. 采用内皮细胞表面标记物CD<sub>34</sub>显示的肝癌肿瘤微血管(angiogenesis)呈棕色. MVD、肿瘤微血管直径、肿瘤梁索直径、肿瘤微血管梁索直径比的测量及肿瘤微血管分型按李功杰 *et al*<sup>[4]</sup>的方法进行.

**统计学处理** 对不同分化程度、大小、DSA血供分型肝癌的MVD、肿瘤微血管直径、肿瘤梁索直径、肿瘤微血管梁索直径比进行非参数Wilcoxon秩和检验,同时将肿瘤大小、分化程度、DSA血供分型等级资料进行双向有序不同属性的 $R \times C$ 表资料假设检验, Spearman秩相关分析.

## 2 结果

HCC肿瘤微血管特征,与肝癌的大小、分化程度、DSA血供分型的关系见表1. 结果显示:随HCC生长,肿瘤微血管分型有增高的趋势( $r_s = 0.55$ ,  $P = 0.001 < 0.01$ );肝癌DSA血供分型随肿瘤微血管分型增加呈增加的趋势( $r_s = 0.56$ ,  $P = 0.001 < 0.01$ ). 肿瘤微血管分型与生物学特性的关系见表2. 结果显示:不同大小肝癌MVD不同,3-5 cm组肝癌的MVD最大,与 $\leq 3$  cm及 $> 5$  cm组比 $P_{1-2} = 0.005 < 0.01$ 及 $P_{2-3} = 0.016 < 0.05$ ;随HCC生长,微血管直径有增高的趋势;肿瘤MVD在乏血供、中等血供、富血供HCC中分别为 $45.34 \pm 21.18$ 、 $69.50 \pm 54.18$ 和 $61.56 \pm 38.94$ ,乏血供组MVD明显小于中等血供和富血供组( $P_{1-2} = 0.014 < 0.05$ ,  $P_{1-3} = 0.031 < 0.05$ ),但富血供组MVD并未大于中等血供( $P_{2-3} = 0.372 > 0.05$ );肿瘤微血管直径、微血管梁索直径比有随HCC血供分级由乏血供至富血供有明显的增加趋势,乏血供HCC肿瘤微血管直径明

表1 HCC肿瘤微血管分型与其HCC的关系(n)

	n	肿瘤微血管分型		
		点状型	线状型	环条状型
生物学特性		4	11	17
直径				
$\leq 3$ cm	4	2	2	0
3-5 cm	9	1	5	3 <sup>b</sup>
$\geq 5$ cm	19	1	4	14
分化				
高	4	2	2	0
中	15	1	7	7 <sup>b</sup>
低	13	1	2	10
血供				
乏	6	2	4	0
中等	8	2	2	4 <sup>b</sup>
富	18	0	5	13

<sup>b</sup> $P < 0.01$ .

表2 HCC 微血管特征与生物学特征的关系

HCC		MVD(个)		肿瘤微血管直径(μm)		肿瘤梁索直径(μm)		肿瘤微血管梁索直径比	
		大小\	P值	大小\	P值	大小\	P值	大小\	P值
直径	≤ 3 cm	35.0 ± 3.5	P <sub>1-2</sub> = 0.0 050	9.5 ± 1.5	P <sub>1-2</sub> = 0.8 753	32.2 ± 22.0	P <sub>1-2</sub> = 0.7 573	0.4 ± 0.2	P <sub>1-2</sub> =1
	3-5 cm	92.0 ± 32.6	P <sub>1-3</sub> = 0.8 708	10.7 ± 5.2	P <sub>1-3</sub> = 0.0 118	50.2 ± 43.0	P <sub>1-3</sub> = 0.0 036	0.4 ± 0.3	P <sub>1-3</sub> = 0.5 680
	>5cm	51.0 ± 41.0	P <sub>2-3</sub> = 0.0 157	17.9 ± 6.9	P <sub>2-3</sub> = 0.0 465	85.7 ± 75.6	P <sub>2-3</sub> = 0.1 759	0.4 ± 0.2	P <sub>2-3</sub> = 0.9 215
血供	乏	45.3 ± 21.2	P <sub>1-2</sub> = 0.0 138	10.1 ± 4.5	P <sub>1-2</sub> = 0.4 309	129.2 ± 71.0	P <sub>1-2</sub> = 0.0 093	0.1 ± 0.1	P <sub>1-2</sub> = 0.0 171
	中等	69.5 ± 54.2	P <sub>1-3</sub> = 0.0 309	13.5 ± 5.7	P <sub>1-3</sub> = 0.0 438	47.5 ± 28.5	P <sub>1-3</sub> = 0.0 231	0.4 ± 0.3	P <sub>1-3</sub> = 0.0 080
	富	61.6 ± 38.9	P <sub>2-3</sub> = 0.37 230	17.4 ± 7.5	P <sub>2-3</sub> = 0.2 193	60.1 ± 67.7	P <sub>2-3</sub> = 0.6 560	0.5 ± 0.3	P <sub>2-3</sub> = 0.2 648
分化	高	55.1 ± 41.4	P <sub>1-2</sub> = 0.1 764	11.0 ± 6.8	P <sub>1-2</sub> = 0.0 463	70.8 ± 50.8	P <sub>1-2</sub> = 0.5 216	0.2 ± 0.6	P <sub>1-2</sub> = 0.1 425
	中	68.7 ± 53.1	P <sub>1-3</sub> = 0.2 471	16.2 ± 5.9	P <sub>1-3</sub> = 0.0 427	61.5 ± 22.5	P <sub>1-3</sub> = 0.9 319	0.4 ± 0.2	P <sub>1-3</sub> = 0.0 832
	低	62.7 ± 30.4	P <sub>2-3</sub> = 0.2 381	18.8 ± 8.3	P <sub>2-3</sub> = 0.5 854	71.3 ± 78.0	P <sub>2-3</sub> = 0.6 386	0.5 ± 0.2	P <sub>2-3</sub> = 0.1 892

$P_{1-2}$ :本组数据第一行与第二行相比之  $P$ 值,  $P_{1-3}$ :本组数据第一行与第三行相比之  $P$ 值,  $P_{2-3}$ :本组数据第二行与第三行相比之  $P$ 值。

显低于富血供HCC(图1-2) ( $P_{1-3} = 0.044 < 0.05$ ), 其血管梁索直径比明显低于中等血供和富血供组 ( $P_{1-2} = 0.017 < 0.05$ ,  $P_{1-3} = 0.008 < 0.05$ ); 富血供HCC与中等血供相比, MVD基本相似, 而富血供HCC的微血管直径有大于中等血供HCC的趋势; MVD与肝癌分化程度无关( $P$ 值均 $>0.05$ )。

### 3 讨论

在HCC生长过程中, 由于恶性肿瘤的生长迅速, 造成相对缺氧, 刺激产生肿瘤微血管, 导致MVD增加, 但肿瘤生长到一定大小后, 由于内皮细胞与肿瘤细胞倍增时间的不同, 内皮细胞倍增时间为50-60 h, 而肿瘤细胞倍增时间仅22 h<sup>[4]</sup>, 肿瘤生长速度大于肿瘤微血管形成速度, 导致肿瘤毛细血管间的距离增加, 在肿瘤微血管粗细不变的情况下, MVD将随肝癌增大而减少。我们与El-Assal *et al*<sup>[5]</sup>的研究结果显示: 在中等大小(2-5 cm)组HCC的MVD最大。同时, 在HCC生长的过程中, 肿瘤生长速度大于微血管形成速度, 导致的肿瘤相对缺血, 肿瘤通过增大微血管直径来实现代偿。HCC体积增加到一定程度后, 由于肿

瘤梁索直径和微血管直径均有增加, 其MVD与小HCC比势必会有所降低。

肝癌DSA血供分型在一定程度上反映肝癌的分化程度<sup>[6]</sup>, 在临床中, 介入医师常根据肝癌DSA血供分型选择治疗方案并粗略评估预后, DSA血供分型已经成为肝癌的重要生物学特性。我们的研究结果显示: 肝癌DSA表现不仅与MVD有关, 还与肿瘤微血管直径、肿瘤微血管梁索直径比和肿瘤微血管分型有关, 是多种因素共同作用的结果。虽然大HCC的MVD低于中等大小的HCC的MVD, 但其微血管直径随HCC的增大而增加, 在一定程度上使肿瘤单位体积内可容纳造影剂的血管空间并未减少, 故可以认为肝癌DSA造影血供分型受MVD、肿瘤微血管直径及肿瘤微血管类型等综合因素作用影响, 在不同大小的HCC中, MVD对其DSA血供分级的影响力不同, 在 $\leq 5\text{ cm}$ 的HCC中, MVD对DSA血供级别的影响力较大, 呈现MVD越高, 血供就越丰富的趋势。随着HCC体积的增大, 微血管数目增加相对变缓, MVD由相对恒定, 转为变小, 为了生长的需要, 肝癌通过增加微血管直径来代偿, 此时肝癌DSA血供分型随MVD、微血管直径及肿瘤微血管类

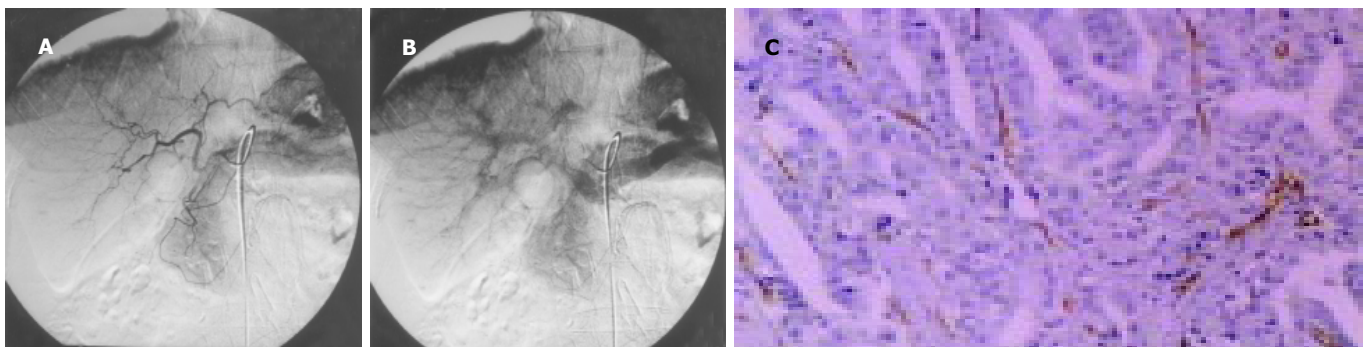


图1 肝右前叶上段乏血供结节型索状腺样肝癌的肿瘤微血管特点。A: DSA动脉期病灶处未见肿瘤血管, 周围血管似有受压移位; B: 实质期末见肿瘤染色; C: 血管内皮CD<sub>34</sub>阳性, 其形态以线状型肿瘤微血管为主(S-P  $\times 100$ )。

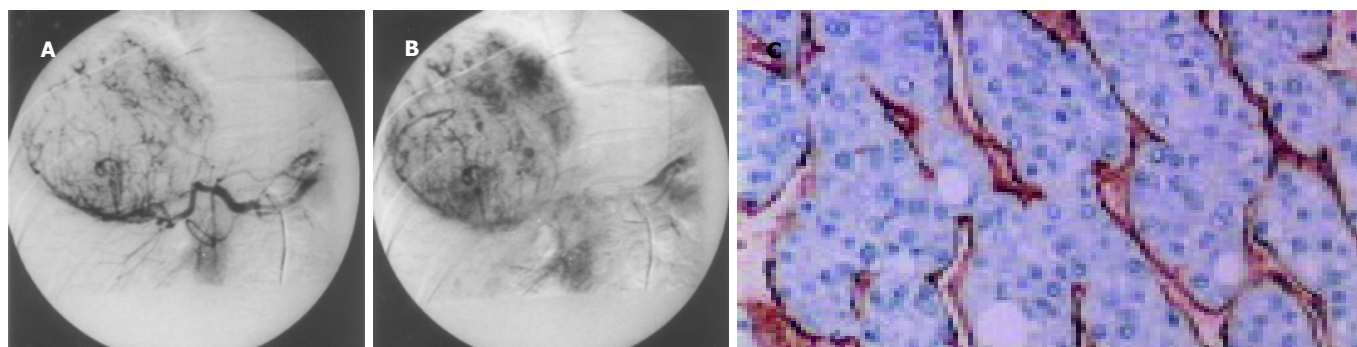


图2 富血供块状型肝癌支肿瘤微血管特点. A: DSA 动脉期肝右叶巨大癌灶内见大量迂曲紊乱、不规则的肿瘤血管; B: 实质期肿瘤染色明显; C: 血管内皮 CD<sub>34</sub> 阳性, 其形态以条状型及环状型肿瘤微血管为主(S-P 法 × 200).

型综合因素作用的影响而变化, 其中, 可能肿瘤微血管类型的影响力较大.

本文肝癌 DSA 血供分级中, 将有无肿瘤血管作为划分中等血供和富血供的标准. 结果提示微血管的增粗及肿瘤微血管分型的升高可能与肝癌 DSA 血供分型中富血供与中等血供的变化相关. 肿瘤血管是一种发育不成熟的小动脉, 其中层平滑肌不发达, 中膜缺损, 管径粗细不均. 有研究证实 HCC 内微血管与肝动脉及门静脉同时相通, 我们推测: 当微血管增粗, 并有环状型及条状型粗大肿瘤微血管时, 容易产生微小的动-门瘘, 导致血流量增加, 同时, 动-门瘘的出现会加重局限性缺血, 从而诱导产生小肿瘤动脉, 当此类小动脉直径及数目增加到一定程度时, 可被 DSA 下造影发现.

从病理学角度讲, 分化越低的肿瘤, 生长越迅速, 缺氧相对严重, 产生新生血管多, MVD 相对高, 但本文结果与 El-Assal 的结果一样<sup>[5]</sup>, 并未出现 MVD 与肝癌分化程度的相应关系, 考虑可能的原因, (1) 本组 32 例肝癌中, 直径大于或等于 5 cm 的占 59.4% (19/32), 由于病灶平均直径较大, 其内的微血管供血特点已由 MVD 增加型转为微血管增粗型, 致使肿瘤 MVD

与其细胞分化程度分离, 表现为 MVD 与肝癌分化程度无关. (2) 因受经费等多方面的影响, 患者很难在手术前只行 DSA 造影检查而不行治疗. 本组病例较少, 统计结果仅为参考, 有待于例数进一步积累.

#### 4 参考文献

- 1 Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31
- 2 Maeda K, Kang SM, Onoda N, Ogawa M, Sawada T, Nakata B, Kato Y, Chung YS, Sowa M. Expression of p53 and vascular endothelial growth factor associated with tumor angiogenesis and prognosis in gastric cancer. *Oncology* 1998;55:594-599
- 3 杨立, 汪鸿志. 现代诊疗技术在消化系统疾病的应用. 姚希贤. 临床消化病学. 天津: 天津科学技术出版社, 1999:323-330
- 4 李功杰, 杨立, 史晓林, 李晓兵, 郑晓玲, 王悦华. 原发性肝癌肿瘤微血管形态特征研究. 解放军医学杂志 2004;29:605-606
- 5 El-Assal ON, Yamanoi A, Soda Y, Yamaguchi M, Igarashi M, Yamamoto A, Nabika T, Nagasue N. Clinical significance of microvessel density and vascular endothelial growth factor expression in hepatocellular carcinoma and surrounding liver: possible involvement of vascular endothelial growth factor in the angiogenesis of cirrhotic liver. *Hepatology* 1998;27:1554-1562
- 6 李功杰, 杨立, 史晓林, 王殿军, 王悦华, 李晓兵. 原发性肝癌血供分型与其病理分化程度关系的研究. 军事医学科学院院刊 2004;28:398-399
- 7 李朝龙, 王成恩, 曹绣虎, 邓秉枢, 叶维基, 郑树森. 原发性肝癌的血管铸型及其扫描电镜观察. 中华外科杂志 1986;24:620-621

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 肝癌切除术后转移过程中炎性递质的作用

白莉, 毛高平, 曹传平, 张映辉

白莉, 毛高平, 曹传平, 张映辉, 中国人民解放军空军总医院 北京市 100036  
白莉, 女, 河北人, 汉族, 1996年北京协和医科大学肿瘤医院博士毕业, 主任医师, 主要从事肝癌的基础与临床研究.

通讯作者: 白莉, 100036, 北京市海淀区阜成路 30 号, 中国人民解放军空军总医院消化内科. bai\_li@hotmail.com

电话: 010-66986729-6231

收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-14

## Effects of inflammatory cytokines on metastasis of liver cancer after apparently curative operation

Li Bai, Gao-Ping Mao, Chuan-Ping Cao, Ying-Hui Zhang

Li Bai, Gao-Ping Mao, Chuan-Ping Cao, Ying-Hui Zhang, Department of Digestive Diseases, General Air Force Hospital, Beijing 100036, China  
Correspondence to: Dr. Li Bai, Department of Digestive Diseases, General Air Force Hospital, 30 Fucheng Road, Beijing 100036, China. bai\_li@hotmail.com

Received: 2005-04-15 Accepted: 2005-05-14

### Abstract

**AIM:** To explore the effects of relevant inflammatory cytokines on the metastasis of liver cancer after apparently curative operation.

**METHODS:** A mouse model for metastasis of experimental liver cancer was established by inoculation of hepatoma 22 (H<sub>22</sub>) cells into subserous layer of spleen. Partial hepatectomy (PH) or sham operation (SH) was performed at various periods of spleen inoculation, and metastasis was observed at the 11<sup>th</sup> day. The expression levels of inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), were measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

**RESULTS:** The metastatic tumors were significantly increased in PH mice as compared with those in SH mice (stage IV: 16/40 vs 4/38,  $P = 0.00\ 087$ ) and the mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and VCAM-1 were markedly higher. The peak of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and VCAM-1 expression were observed 96, 72, 48 and 72 hours after inoculation, respectively. Among them, TNF- $\alpha$  expression was found rapidly increased 4 hours after PH, and then linearly increased till 96 hours. The concentrations of IL-1 $\beta$  and IL-6 fell quickly to normal level after peaks. The peak expression of VCAM-1 appeared twice (at 4 and 72 h)

after PH, which was 3-6 times higher than normal level.

**CONCLUSION:** The levels of inflammatory cytokines, especially TNF- $\alpha$ , are positively related to the metastasis, and they may promote the metastasis of liver cancer.

**Key Words:** Liver cancer; Metastasis; Inflammatory cytokines; Partial hepatectomy

Bai L, Mao GP, Cao CP, Zhang YH. Effects of inflammatory cytokines on metastasis of liver cancer after apparently curative operation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1507-1509

### 摘要

**目的:** 探讨炎性细胞因子在肝癌术后复发过程中的影响.

**方法:** 615 小鼠脾包膜下接种肝癌 H<sub>22</sub> 腹水瘤细胞, 同时进行 2/3 肝切除 (PH) 或假手术 (Sham), 术后不同时间采集肝脏标本提取 mRNA, 测定肝组织中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 和 VCAM-1 的表达水平. 为观测肝内肿瘤转移程度, 动物被饲养 11 d, 断颈处死, 计数肝脏表面瘤结节数量.

**结果:** PH 组与假手术组比较, 接受肝切除的动物肝内转移瘤明显增多, 两组间比较具有显著性差异 ( $P = 0.00\ 087$ ). 肝组织内 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 VCAM-1 mRNA 的表达明显增高, 其峰值分别在 96、72、48 和 72 h. 其中 TNF- $\alpha$  mRNA 在 PH 后 4 h 迅速升高, 在术后 4 d 内升高呈线性关系. IL-1 $\beta$  在术后 72 h 达到峰值后迅速降至正常水平. IL-6 mRNA 表达的峰值时间为 PH 后 48 h, 下降至正常水平的时间也较迅速. VCAM-1 mRNA 的表达在正常组织含量甚微, 几乎观测不到, 但在术后升高有两个峰值, 分别为 4 和 72 h, 可达到正常水平 3-6 倍.

**结论:** 炎性细胞因子, 尤其是 TNF- $\alpha$  的表达与转移瘤有明显的正相关, 可能对肿瘤转移有一定的增强效果.

**关键词:** 肝癌; 转移; 炎性细胞因子; 肝部分切除

白莉, 毛高平, 曹传平, 张映辉. 肝癌切除术后转移过程中炎性递质的作用. *世界华人消化杂志* 2005;13(13):1507-1509  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1507.asp>

### 0 引言

原发性肝癌 (PHC) 手术切除术后高的复发率直接影响其治疗效果. 如肿瘤 < 3 cm 的肿瘤, 手术后 5 a 生存率仅为 66.3%, 即使是 < 5 cm 的肝癌患者接受肝移植



后, 5 a 生存率也仅为 63%<sup>[1-2]</sup>. 积极预防和减少肝癌手术切除后和肝移植后的复发, 才能从根本上提高肝癌的治愈水平. 下面从炎性细胞因子对肝部分切除术后肿瘤复发转移的影响角度进行研究.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 615 小鼠, 18-22 g, 雌雄各半(预防医学科学院实验动物中心).  $H_{22}$  肝癌腹水瘤细胞(中国医学科学院病理系). 鼠白血病病毒逆转录酶(MMLV), 脱氧核糖核苷三磷酸(4dNTP)及TaqDNA聚合酶(GIBCO, 北方同正公司); RNA酶抑制物(RNasin 华美公司); 六核苷酸随机引物(Oligo(dT) 华美公司); 印度墨汁(北京化学试剂公司). 引物序列 TNF- $\alpha$  (349 bp) Sense 5'-TTCTGTCCCTTTCACTCACTGG-3', Antisense 5'-TTGGTGGT TTGCTACGACGTGG-3', IL-1 $\beta$  (441 bp) Sense 5'-ATTA GACAGCTGCACTACAGGCTC-3', Antisense 5'-AGATTCCA TGGTGAAGTACCTTAT-3', IL-6 (156 bp) Sense 5'-TGGA GTCACAGAAGGAGTGGCTAAG-3', Antisense -TCTGACCA CAGTGAGGAATGTCCAC-3', 和 VCAM-1 (139bp) Sense 5'-CCTCACTTGACGCACTACGGGCT-3', Antisense 5'-TTTTCC AATATCCTCAATGACGGG-3',  $\beta$ -actin (478bp) Sense 5'-AGGGAAATCGTGCGTGACATCAAA-3', Antisense 5'-ACTCATCGTACTCTGCTTGCTGA-3',  $\beta$ 2-MG (300bp) Sense 5'-GGCTCGCTCGGTGACCCTAGCTTT-3', Antisense 5'-TCTGCAGGCGTATGTATCAGTCTCA-3'. MPIAS-500多媒体彩色病理图文分析系统(同济医科大学清平影像公司); 紫外分光光度仪(日本岛津); 9600基因扩增仪(美国); DYY-III电泳仪(北京六一仪器厂); Molecular Analyst (Bio-Rad, 美国).

**1.2 方法** 雌性 615 小鼠, 注射  $H_{22}$  肝癌腹水瘤细胞  $1 \times 10^6$  入动物脾被膜下制备肝转移动物模型<sup>[3]</sup>. 动物在乙醚麻醉下腹部正中行纵形切口, 切除肝右叶占全肝重量的 2/3 肝组织, 假手术组过程同样, 但无半肝切除. 在手术后 4, 16, 24, 48, 72 和 96 h 采集肝脏标本. 采用 Trizol 试剂盒提取肝组织内 mRNA, 经鼠白血病病毒逆转录酶合成 cDNA, 分别在 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 和 VCAM-1 的引物引导下合成相应的 PCR 产物, 经 2% 琼脂糖电泳分离, Molecular Analyst 定量分析.

**统计学处理** 各组计量数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 采用 SPSS 统计软件进行组间显著性分析和非参数对比分析.

## 2 结果

**2.1 半肝切除动物的实验性肝转移比较** 转移瘤定级标准<sup>[3]</sup>. 0 级: 无转移. I 级: 在肝的一个叶内有 1-2 个小转移灶, 直径 0.2-0.5 mm. II 级: 肝内有 3-5 个小转

移灶或 1-2 个较大转移灶, 直径 0.5-1 mm. III 级: 肝内转移灶  $>1$  mm, 但  $<1$  cm, 或小转移灶数目较多, 未波及全肝者. IV 级: 肝内肿块  $>1$  cm, 或弥散性病灶波及全肝者. 本研究中所计数的肝转移灶均为肝表面肉眼所见的病灶(表 1).

表1 小鼠部分肝切除后肝内肿瘤转移病灶分析

分组	n	肿瘤分期				
		0	I	II	III	IV
PH 组	40	0	0	3	21	16
Sham 组	38	0	3	4	27	4

<sup>b</sup>  $P < 0.001$  vs Sham 组.

**2.2 半肝切除动物的肝脏炎性细胞因子表达水平**(图 1) 在手术前后不同时间获取的组织标本所测得的 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 和 VCAM-1 mRNA 表达水平显示, TNF- $\alpha$  mRNA 在 PH 后迅速开始升高, 在术后 4 d 不同时间点检测其水平升高呈一条直线关系. IL-1 $\beta$  在术后 72 h 的表达最为明显, 之后迅速降至正常水平. IL-6 mRNA 表达的峰值时间为 PH 后 48 h, 下降至正常水平的时间也较迅速. VCAM-1 mRNA 的表达在正常组织含量甚微, 几乎观测不到, 但在术后升高有两个峰值, 分别为 4 和 72 h, 可达到正常水平 3-6 倍. 结果提示, IL-1 $\beta$ , IL-6 和 VCAM-1 的表达是在 TNF- $\alpha$  高表达之后出现, TNF- $\alpha$  可能触发了 IL-1 $\beta$ , IL-6 和 VCAM-1 的表达.

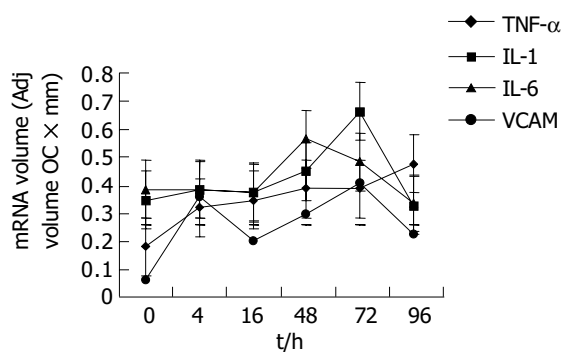


图 小鼠 PH 前后不同时间肝组织内 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 和 VCAM-1 mRNA 表达.

## 3 讨论

肝炎活性、病毒负荷以及肝功能储备是 HCC 术后复发的独立危险因素. 伴随肝炎和肝硬化的 HCC 术后复发率明显升高. 肝脏部分切除或肝移植对机体是一种创伤过程. 作为一种防御反应, 可引起肝脏本身的炎症反应以及全身性炎症反应综合征(SIRS). 无论是病毒感染引起还是手术创伤所致的肝脏炎症反应, 与肝脏肿瘤的发生及手术后的复发有着密切的关系. TNF- $\alpha$ ,



IL-1 $\beta$ , IL-6 和 VCAM-1 等在这其中起到一定的作用. 研究认为, 炎性细胞能产生众多有助于肿瘤生长和存活物质, 其中就包括诱导 NF- $\kappa$ B 产生的活性物质. 这一观点目前正成为一个快速发展的热点研究领域. TNF- $\alpha$  可以诱导内皮细胞黏附分子包括血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1)、E-选择素 (E-selectin)、胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 的表达. 这些黏附分子在肿瘤转移的早期起到促进肿瘤细胞黏附于血管壁及向组织浸润的作用. 另外, TNF- $\alpha$  激活肝细胞内细胞核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). 这种蛋白质不仅能加速细胞变异, 导致癌细胞的“疯狂”生长, 而且还能协助这种变异细胞“逃离”最初的肿瘤, 转移到身体的其他部位<sup>[7]</sup>. IL-1 的致瘤作用可能与刺激 COX-2 的表达有关. COX-2 的主要功能是将花生四烯酸转化为 PGE<sub>2</sub>. 他的表达受有丝分裂原、细胞因子、生长因子和肿瘤促进因子的诱导, 其中包括 IL-1、TNF- $\alpha$ . 研究发现, 在多种实体瘤的原发病灶、复发、转移病灶均可检测到 COX-2 的过表达. COX-2 刺激上皮细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 刺激血管生长, 增强细胞浸润, 介导免疫抑制和增加突变剂的产生等, 在乳腺、前列腺、膀胱、肺、食管、胰腺癌等癌发生方面发挥了重要作用<sup>[4-6]</sup>. 最近 Kondo *et al*<sup>[8]</sup> 的研究表明, 在手术后的 HCC 患者中, 癌旁组织中的 COX-2 的过表达与活动性炎症反应有关, 并且与较短的无瘤生存期相关, 提示 COX-2 的表达对术后 HCC 的复发具有促进作用. IL-6 是肝脏急性应答反应的重要递质, 是一种多功能性细胞因子, 参与肝脏产生急性期反应蛋白, 一般由 TNF- $\alpha$  或 IL-1 刺激组织分泌. 因此, IL-6 的肝脏肿瘤发生及发展方面是通过诱导 TNF- $\alpha$  和 IL-1 的释放起作用的. 在 TNF- $\alpha$ , IL-1 和 IL-6 术后的分泌水平分析, 在经历了手术创伤引发的炎症反应后, 是否炎性递质也可能为促发肿瘤转移或复发因素, 有关的研究报道甚少. 在我们前期的动物实验中, 部分肝切除前后不同时间接种肿瘤细胞后观察, 发现未手术或假手术动物的肿瘤转移程度明显轻于肝部分切除动物. 这提示我们, 创伤后的炎症反应, 尤其是炎性因子在肿瘤复发转移

过程中有一定的作用. 炎性因子的作用不仅影响肝脏的功能, 同时对残留在肝组织内的微卫星病灶的迅速生长、血流中癌细胞的着床均起一定的作用. 我们还发现, 血流中的癌细胞在术后 72 h 左右已被发现黏附于血管壁, 并穿透管壁向组织内浸润, 成为复发病灶<sup>[3]</sup>. “炎症-癌症”有着密切的联系<sup>[9]</sup>. 大约 20% 的人类癌症的发生和发展是由炎症诱发或促进的<sup>[7]</sup>. 如慢性活动性肝炎、胆汁郁积性肝炎将发展为肝癌就是其中的例证. 非类固醇类抗炎药 COX-2 抑制剂可降低某些人类癌症的发病率也是例证. 近年提出肝癌治疗的微创观念, 用射频、介入、微波、冷冻等方法取代肝切除治疗肝癌, 通过大大减轻了对肝脏, 尤其是肝炎或肝硬化后肝脏的损伤, 降低手术因素引起的术后近期内肿瘤的复发.

#### 4 参考文献

- 1 Figueras J, Ibanez L, Ramos E, Jaurrieta E, Ortiz-de-Urbina J, Pardo F, Mir J, Loinaz C, Herrera L, Lopez-Cillero P, Santoyo J. Selection criteria for liver transplantation in early-stage hepatocellular carcinoma with cirrhosis: results of a multicenter study. *Liver Transpl* 2001;7:877-883
- 2 吴孟超. 原发性肝癌的诊断和治疗进展. *中华外科杂志* 1998;36:515-518
- 3 白莉, 黄洁, 黄志强. 肝癌术后复发的影响因素研究. *中华实验外科* 1998;15:345-346
- 4 Hull MA, Fenwick SW, Chapple KS, Scott N, Toogood GJ, Lodge JP. Cyclooxygenase-2 expression in colorectal cancer liver metastasis. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:21-27
- 5 Singh B, Lucci A. Role of Cyclooxygenase-2 in breast cancer. *J Surg Res* 2002;108:173-179
- 6 Yao M, Kargman S, Lam EC, Kelly CR, Zheng Y, Luk P, Kwong E, Evans JF, Wolfe MM. Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Res* 2003;63:586-592
- 7 Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF- $\kappa$ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004;431:461-466
- 8 Kondo M, Yamamoto H, Nagano H, Okami J, Ito Y, Shimizu J, Eguchi H, Miyamoto A, Dono K, Umeshita K, Matsuura N, Wakasa K, Nakamori S, Sakon M, Monden M. Increased expression of COX-2 in nontumor liver tissue is associated with shorter disease free survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:4005-4012
- 9 Marx J. Cancer research. Inflammation and cancer: the link grows stronger. *Science* 2004;306:966-968

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 人直肠腺癌细胞系 HRC-99 的建立及其生物学特性

郑雪莲, 周总光, 辜俊, 李红光, 林立, 邓伊伶

郑雪莲, 周总光, 辜俊, 李红光, 四川大学华西医院消化外科研究室  
四川省成都市 610041  
林立, 四川大学华西医院遗传研究室 四川省成都市 610041  
邓伊伶, 四川大学华西医院病理室 四川省成都市 610041  
郑雪莲, 女, 1965 - 11 - 26 生, 重庆市大足县人, 汉族, 1992 年四川大学  
华西医学院临床检验专业毕业, 主要从事直肠癌相关方面的研究。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30271283  
通讯作者: 周总光, 610041, 四川省成都市国学巷 37 号, 四川大学华西医院  
消化外科研究室. zhou767@21cn.com  
电话: 028-85422484 传真: 028-85422484  
收稿日期: 2005-04-11 接受日期: 2005-05-06

## Establishment and characterization of a cell line HRC-99 from human rectal adenocarcinoma

Xue-Lian Zheng, Zong-Guang Zhou, Jun Gu, Hong-Guang Li, Li Lin, Yi-Ling Deng

Xue-Lian Zheng, Zong-Guang Zhou, Jun Gu, Hong-Guang Li, Department of Digestive Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China  
Li Lin, Department of Heredity, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China  
Yi-Ling Deng, Department of Pathology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39770722  
Correspondence to: Dr. Zong-Guang Zhou, Department of Digestive Surgery, West China Hospital, Sichuan University, 37 Guo Xue Xiang, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. zhou767@21cn.com  
Received: 2005-04-11 Accepted: 2005-05-06

## Abstract

**AIM:** To establish a cell line from human moderately differentiated rectal adenocarcinoma, and to investigate its biological characteristics.

**METHODS:** Cancer tissues taken from freshly resected specimens of patients with primary rectal adenocarcinoma were incubated *in vitro*. The cell line, we named HRC-99, was established. The biological characteristics of these cells were studied by light microscopy, electron microscopy, immunohistochemistry, chromosome analysis and heterogenic transplantation experiment.

**RESULTS:** Cells from specimens of the primary tumor, the HRC-99 cell line and transplanted tumor were confirmed possessing the characteristics of malignant glandular epithelium under light and electron microscope. The cell growth curve, duplicating time and cleavage index *in*

*vitro* were also observed. CEA and CK-20 were positively expressed in the cells. Nuclear chromosome analysis revealed that the tumor was a subtriploid with a mode of 60 per cell, and marker chromosome and chromosome translocation were found in G band as well. Tumor nodes were induced under the skin of nude mice by heterogenic transplantation.

**CONCLUSION:** The HRC-99 cell line is a new cell line out of rectal moderately differentiated adenocarcinoma.

**Key Words:** Cell line; Moderately differentiated adenocarcinoma; Rectum

Zheng XL, Zhou ZG, Gu J, Li HG, Lin L, Deng YL. Establishment and characterization of a cell line HRC-99 from human rectal adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1510-1513

## 摘要

**目的:** 建立一人直肠癌细胞系并探讨其生物学特性。

**方法:** 取人直肠癌新鲜手术标本, 经组织块体外培养并克隆建系, 命名为 HRC-99。采用光镜、电镜、免疫组化、染色体核型分析及异种移植瘤实验对细胞系生物学特性进行观察。

**结果:** 原位肿瘤、细胞系及移植瘤标本经光镜、电镜证实该细胞系具有腺上皮性恶性细胞特征, 并观察了其体外生长曲线、倍增时间和分裂指数; 免疫组化 CEA 和 CK-20 呈阳性表达; 染色体核型分析众数为 60, 为亚三倍体, G 显带出现标记染色体和染色体易位; 裸鼠皮下异种移植形成移植瘤。

**结论:** HRC-99 为一株新的来源于直肠中分化腺癌的细胞系。

**关键词:** 细胞系; 中分化腺癌; 直肠

郑雪莲, 周总光, 辜俊, 李红光, 林立, 邓伊伶. 人直肠腺癌细胞系 HRC-99 的建立及其生物学特性. *世界华人消化杂志* 2005;13(13):1510-1513  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1510.asp>

## 0 引言

直肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一, 发病率逐年上升<sup>[1-3]</sup>, 其病因及生长因素与其他肿瘤一样尚不

清楚. 对直肠癌的深入研究需要建立一系列具有不同生物学特性的细胞系<sup>[4-5]</sup>. 目前, 国内外报道的直肠癌细胞株较少<sup>[9-13]</sup>, 不能满足实验研究需要, 为了进一步探索直肠癌的特性并满足实验研究需要, 我们建立了来源于人直肠中分化腺癌的细胞系, 并进行了克隆, 建立了 HRC-99 细胞株, 探讨了其部分生物学特性.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 肿瘤组织来源于一女性直肠癌患者, 46 岁, 术前纤维结肠镜检确诊为直肠腺癌. 于 2004-09-06 由四川大学华西医院普外三科行直肠癌根治术, 我们将一部分标本送本院病理会诊中心作病理诊断, 一部分标本送消化外科研究室作原代培养. 术后病理诊断: 直肠中分化腺癌. 本研究采用的主要试剂有: FBS、DMEM/F<sub>12</sub> (1:1 混合) 培养液、RPMI1640 培养液、丙酮酸钠、多聚赖氨酸 (GIBCO 公司); 胰岛素和 EGF (Sigma 公司); 角蛋白 CK-20 和癌胚抗原 CEA (DAKO 公司). 液体配制: (1) 洗液: PBS 液 + 青霉素 5 000 U/L + 链霉素 5 mg/L + 两性霉素 30 mg/L; (2) 原代培养液: DMEM/F<sub>12</sub> 培养液 + FBS 200 mL/L + L-谷氨酰胺 2 mmol/L + 胰岛素 10 μg/L + EGF 200 ng/L + 丙酮酸钠 1.1 mg/L + 青霉素 4 000 U/L + 链霉素 4 mg/L; (3) 传代培养液: RPMI1640 培养液 + FCS 100 mL/L + L-谷氨酰胺 2 mmol/L + 青霉素 1 000 U/L + 链霉素 1 mg/L.

**1.2 方法** 在无菌条件下迅速切取术后直肠癌标本中的癌组织, 用无菌生理盐水冲洗 3 次, 立即浸泡在 4℃ 加 5 倍抗菌素的无菌 PBS 液中, 迅速送至实验室, 用 PBS 洗液冲洗三次, 参见薛庆善<sup>[4]</sup>肿瘤组织细胞的原代培养方法, 将组织块接种于 25 cm<sup>2</sup> 的一次性塑料培养瓶中, 放入培养箱贴壁培养 4 h 后, 加入原代培养液, 培养液的量以不使植块浮起为准, 置 37℃ 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱内静置培养, 根据培养液 pH 变化, 每 2-3 d 进行半量换液. 组织块培养 38 d, 光镜观察到在部分癌组织边缘有细胞伸出, 待细胞分裂繁殖汇合成片后, 于培养 49 d 第 1 次传代. 每次传代用胰酶 2.5 g/L + 乙二胺四乙酸二钠 100 mg/L 混合

液原瓶消化, 利用差速黏附法去除成纤维细胞. 经第 3 次传代后, 细胞较纯上皮样, 生长速度稳定, 基本每隔 3 d 传代 1 次, 传至 20 代时用无限稀释法进行克隆, 然后每隔 5 代冻存 1 批, 每隔 1 mo 复苏 1 支, 至目前已传至 50 代, 经多次冻存、复苏培养, 细胞均能生长增殖. 在倒置显微镜下观察培养中的活细胞形态, 取对数生长期的传代培养细胞, 离心固定后送四川大学电镜室包埋和超薄切片, 在 H-600IV 型透射电镜下观察并摄影. 第 10 代细胞制成悬液后计数, 然后平均分配于 8 个 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 每天取一瓶观察并计数, 绘制生长曲线, 求得细胞的群体倍增时间. 将 25 代细胞培养 1-7 d 的细胞盖片, 逐日将盖片取出, 固定, Giemsa 染色, 在光镜下计算有核分裂的细胞数. 将生长于用 100 g/L 多聚赖氨酸处理的盖玻片上的细胞用预冷丙酮固定 15 min, 室温晾干后, 采用 SABC 法对细胞进行 CK-20 和 CEA 免疫组化抗体染色. 将 14 代的 2 × 10<sup>6</sup> 个细胞分别接种于裸鼠前、后肢腋窝皮下, 1 wk 后观察, 有皮下结节形成者为阳性, 将移植瘤做常规病理组织学检查. 取传代后生长 48 h 的第 3, 50 代细胞, 按鄂征<sup>[5]</sup>培养细胞的染色体显示法, 对染色体进行 G 带核型分析.

## 2 结果

**2.1 形态观察** 在倒置显微镜下可直接观察. 活细胞经传代, 一般在 12-24 h 大都贴壁, 细胞呈不规则多角形, 少数为梭形及圆形, 生长密集时呈镶嵌排列 (图 1). 生长在盖玻片上的细胞经 Giemsa 染色后, 多数细胞呈多边形, 梭形, 少数呈圆形; 胞质丰富, 淡粉色, 可见分泌颗粒及空泡; 核椭圆形, 圆形, 核浆比例增大 (接近 1:1), 核仁清晰可见 1-4 个不等. 透射电镜观察, 结果显示细胞核较大, 呈椭圆形, 圆形, 有多个核仁, 染色质分布均匀, 常染色质较丰富, 胞质内有丰富的核糖体、线粒体、粗面内质网、溶酶体等细胞器, 清晰可见, 细胞表面有许多微绒毛, 可见细胞间紧密联接 (图 2). 免疫组化染色见癌细胞的胞质均被染成棕黄色, CEA 表达强阳性, CK-20 阳性, 证实

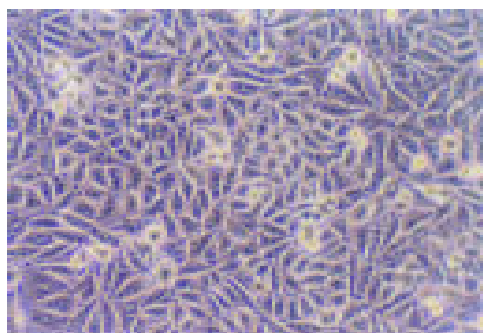


图 1 培养的 10 代细胞呈多角形, 梭形, 少数为圆形 × 100.

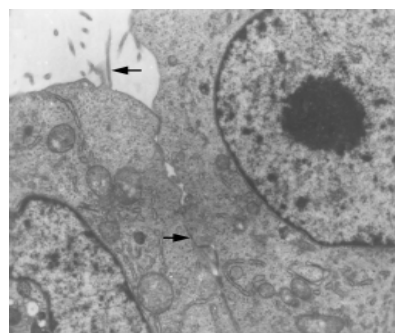


图 2 微绒毛和紧密连接 TEM × 11200.

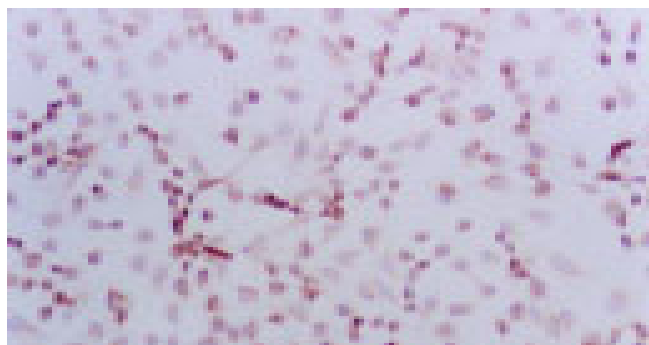


图3 CEA免疫组化染色胞质染成棕黄色(SABC × 100).

为腺上皮来源的癌细胞(图3). 传代接种细胞后, 1-2 d 增殖较慢, 3-5 d 细胞增殖逐日上升, 7 d 达高峰, 8 d 开始下降, 按Patterson 公式计算, 细胞的群体倍增时间为24.8 h. 细胞分裂指数在培养3 d 的细胞达最高峰, 为49.2%, 细胞培养4 d 后分裂指数逐日下降.

**2.2 异种移植** 接种于裸鼠前、后肢的癌细胞, 8 d 后在接种处见长出黄豆大小的肿块, 质软, 呈圆形结节状, 裸鼠4 wk 时的成瘤性(图4). 处死裸鼠称质量, 均值为1.6 786 g, 瘤均体积为2.16 cm<sup>3</sup>, 病理组织学检查, 可见癌细胞生长旺盛呈片状, 核分裂相多, 细胞核不均匀增大(图5), 与该患者原肿瘤标本病理结果基本一致.

**2.3 染色体分析** 将第3, 50代细胞各分析20个中期细胞核型, 观察到染色体数目主要分布于57-62之间, 染色体众数为60, 多为亚三倍体. 染色体G带核型分析几乎在每个核型里发现了结构异常的标记染色体, 有6个标记染色体在所分析的核型里, 出现频率高达100% (图6). 另外, 在多数核型里发现t(10, 14)和t(1, 17)易位, 在个别核型里还观察到双着丝点染色体.

### 3 讨论

直肠癌是消化道最常见恶性肿瘤之一, 在我国近几年来其发病率、死亡率都有上升趋势<sup>[1-3]</sup>, 发病年龄也有明显提前<sup>[2, 6]</sup>, 其病因及生长因素与其他肿瘤一样尚不清楚. 对直肠癌的深入研究需要建立一系列具



图4 第14代细胞接种于裸鼠前后肢4 wk 的成瘤性.

有不同生物学特性的细胞系, 按常规方法建立体外培养的人类癌细胞系, 一般成功率较低, 而肠道肿瘤建系更为困难, 因肠道属于开放性器官, 造成污染机会比较大, 不易成功. 国内外迄今为止, 仅见少数几例报道<sup>[9-13]</sup>, 而国内报道的3例细胞系中, 有2例细胞系来源于结肠腺癌, 其中SIC-8101<sup>[8]</sup>为低分化腺癌; THC-8908<sup>[12]</sup>为高分化腺癌; 另1例来源于直肠的HR-8348<sup>[13]</sup>, 为低分化腺癌, 而我们建立的HRC-99细胞系来源于直肠中分化腺癌, 这一新细胞系的建立有利于直肠癌的深入研究. 我们自2004-05起, 先后用45例人直肠癌标本做原代培养, 每例均采用了组织块培养法和酶消化法, 最后建系成功的2例标本, 均为组织块培养法培养. 酶消化法分离的癌细胞, 数量少, 而成纤维细胞多, 细胞排列稀疏, 培养到6-8 d, 细胞体积增大, 胞质出现空泡状变性, 细胞难以汇合成单层, 同时可见体积较大的巨型细胞, 最后形成“拉网”而自然脱落死亡. 而采用组织块培养法, 不但减少了操作步骤, 节约了成本, 而且还降低了污染机率, 只是癌细胞在体外的适应期较长. 本实验在38 d时才见细胞从组织块边缘长出, 一旦长出癌细胞便迅速生长分裂增殖, 并能传代建系. 我们建立的HRC-99细胞系具有以下特点: (1) 培养细胞形态, 超微结构及生长特性均显示恶性上皮细胞特征; (2) 角蛋白和癌胚抗原免疫组化染色均呈阳性反应; (3) 染色体分析, 众数为60, 为亚三倍体; G带核型

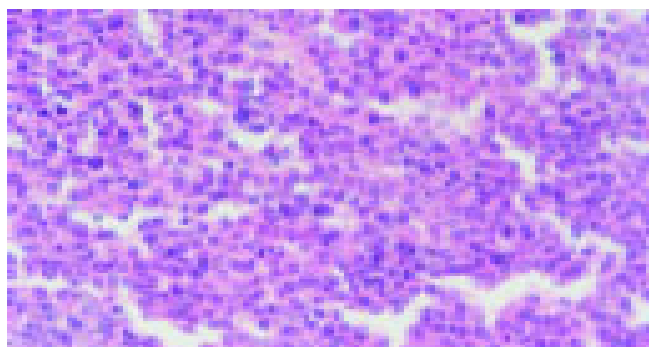


图5 移植瘤癌细胞生长旺盛呈片状(HE × 200).

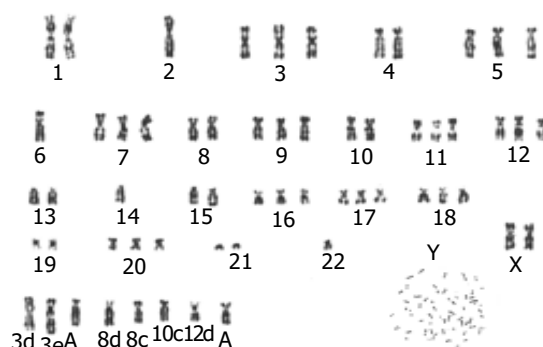


图6 染色体亚三倍体G带核型显示标记染色体(× 1000).

分析染色体结构异常, C 组和 E 组染色体明显增多, 并发现 6 个标记染色体; (4) 裸鼠经接种细胞后产生移植瘤, 其病理组织学特征与患者行根治术时原发肿瘤的特征一致. 根据以上特点, 可以初步确认 HRC-99 为一新的来源于直肠中分化腺癌的细胞系.

癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 正常情况下仅存在于胚胎组织中, 但在一些肿瘤组织—如胃肠道肿瘤中常见其表达, 因而可作为肿瘤的特异标记物, 在诊断和鉴别诊断上具有重要价值. 研究表明, 70% 以上的直肠癌组织 CEA 呈阳性表达<sup>[12-17]</sup>, 本细胞系免疫组化染色发现 CEA 呈强阳性表达, CK-20 阳性, 证实为腺上皮来源的癌细胞; 经异种移植瘤实验更证明了本细胞系的恶性特征; 染色体 G 带核型分析几乎在每个核型里发现了结构异常的标记染色体, 有 6 个标记染色体在所分析的核型里, 出现频率高达 100%, 另外, 在多数核型里发现 t(10, 14) 和 t(1, 17) 易位, 在个别核型里还观察到双着丝点染色体. 这是否与直肠癌的发生发展有关, 有待对该细胞系从分子遗传水平上做更深入的研究. 细胞和分子遗传学方法的结合将为最终阐明染色体畸变在直肠癌发生发展中的意义提供有力的帮助.

#### 4 参考文献

- 1 Zhang YL, Zhang ZS, Wu BP, Zhou DY. Early diagnosis for colorectal cancer in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:21-25
- 2 Zheng S, Liu XY, Ding KF, Wang LB, Qiu PL, Ding XF, Shen YZ, Shen GF, Sun QR, Li WD, Dong Q, Zhang SZ. Reduction of the incidence and mortality of rectal cancer by polypectomy: a prospective cohort study in Haining County. *World J Gastroenterol* 2002;8:488-492
- 3 Zhou ZG, Wang Z, Yu YY, Shu Y, Cheng Z, Li L, Lei WZ, wangTC. Laparoscopic total mesorectal excision of low rectal cancer with preservation of anal sphincter: A report of 82 cases. *World J Gastroenterol* 2003;9:1477-1481
- 4 Okabe S, Arai T, Yamashita H, Sugihara K. Adenovirus-mediated prodrug-enzyme therapy for CEA-producing colorectal cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:367-373
- 5 Li S, Yu B, An P, Chen G, Lu W, Cai H, Guo W, Zuo F. Combined liposome-mediated cytosine deaminase gene therapy with radiation in killing rectal cancer cells and xenografts in athymic mice. *Clin Cancer Res* 2005;11:3574-3578
- 6 薛庆善. 体外培养的原理和技术. 北京: 科学出版社, 2001:710-711
- 7 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术. 北京出版社, 1995:164-165
- 8 富志民. 人肠癌细胞系 SIC-8101 的建立及生物学特征的初步观察. *中国肿瘤临床* 1986;13:47
- 9 Kokuba Y, Otani Y, Kakita A, Yamashita K. Establishment of alpha-fetoprotein producing human rectal cancer cell line (RKK-YK) and its features. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1999;96:809-816
- 10 Shibusawa M, Tsunoda Y, Tsunoda A, Yoshizawa H, Nakao K, Yasuda N, Choh H, Numabe K, Koike T. Establishment and characterization of a human rectal cancer cell line, SRM from primary diffuse infiltrating type cancer. *Hum Cell* 1993;6:57-61
- 11 Morita A, Tsao D, Kim YS. Effect of sodium butyrate on alkaline phosphatase in HRT-18, a human rectal cancer cell line. *Cancer Res* 1982;42:4540-4545
- 12 刘洪, 李川, 王立梅, 杨毅, 战忠利, 张天泽. 人结肠高分化腺癌细胞系 THC-8908 的建立及其生物学特性. *中国肿瘤临床* 1993;20:330-333
- 13 张宗显. 人直肠腺癌细胞系 HR-8348 的建立和生物学特性. *中国科学 B 辑* 1986;11:1197
- 14 喻德洪, 刘连杰. 进一步提高我国大肠癌疗效的几点意见. *腹部外科* 2000;13:121-123
- 15 Wu WX, Sun YW, Hua YB, Shen LZ. Laparoscopic versus conventional open resection of rectal carcinoma: A clinical comparative study. *World J Gastroenterol* 2004;10:1167-1170
- 16 曾屈波. 癌胚抗原与大肠癌关系. *大肠肛门病外科杂志* 2001;7:58-61
- 17 黄雅萍, 仇玲岭. 大肠癌 p53 蛋白和 CEA 表型与其预后的关系. *中国肿瘤临床与康复* 2002;9:26-27

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 消息 •

## 《世界胃肠病学杂志(英文版)》第二次荣获 我国期刊界的最高政府奖项—国家期刊奖百种重点期刊

**本刊讯** 由中华人民共和国新闻出版总署举办的第三届国家期刊奖评选结果已经揭晓, 由世界胃肠病学杂志社出版的《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊之后, 第二次获得此项殊荣.

第三届国家期刊奖颁奖大会于 2005-02-28 在北京举行. 中共中央宣传部、国家新闻出版总署和国家科技部有关负责同志出席了颁奖大会. 新闻出版总署署长暨第三届国家期刊奖评委会主任石宗源同志在颁奖大会上做了“坚持正确导向, 促进期刊繁荣”的重要讲话. 国家期刊奖是经中共中央宣传部批准, 由国家新闻出版总署于 1999 年开始主办的我国期刊界的最高政府奖项, 每两年评选一次, 至今已举办了三届.

第三届国家期刊奖评选活动于 2004-08 开始. 所有参评期刊经过评选工作办公室的参评资格、学术质量、出版规范、编校质量和广告内容审查后, 由专家组和评选工作委员会进行了认真、严格的评选, 于 2004-12-21 产生初评入围期刊名单, 并在《中国新闻出版报》等新闻媒体上进行了为期一个月的公示, 接受全社会的监督, 最终从推荐参评的 976 种期刊中评出获本届国家期刊奖百种重点期刊科技类期刊 100 种.

获第三届国家期刊奖百种重点期刊的期刊是我国 9000 余种期刊的优秀代表, 反映了我国期刊业近年来坚持正确舆论导向、促进期刊事业繁荣发展所取得的最新成果. (世界胃肠病学杂志社 2005-03-10)

# 基质金属蛋白酶-2,9 及其抑制剂与大肠腺瘤癌变的关系

汪丽燕, 乔 镇, 关景明, 吕丽燕, 张春燕

汪丽燕, 乔镇, 关景明, 吕丽燕, 张春燕, 哈尔滨医科大学附属第二医院  
消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

汪丽燕, 女, 1976-12-27 生, 黑龙江省哈尔滨市, 汉族, 2002 年哈尔滨医科大学硕士。

黑龙江省科技厅攻关课题, No. GB01C12403

通讯作者: 关景明, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二  
医院消化内科, 168wangliyan@163.com

电话: 0451-86605143

收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

## Roles of MMP-2, MMP-9 and their inhibitors in progression of colorectal neoplasm into colorectal carcinoma

Li-Yan Wang, Zhen Qiao, Jing-Ming Guan, Li-Yan Lv, Chun-Yan Zhang

Li-Yan Wang, Zhen Qiao, Jing-Ming Guan, Li-Yan Lv, Chun-Yan Zhang,  
the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin  
150086, Heilongjiang Province, China

Supported by the Fund from Science and Technology Department of  
Heilongjiang Province, No.GB01C12403

Correspondence to: Jing-Ming Guan, Department of Gastroenterology,  
the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin  
150086, Heilongjiang Province, China. 168wangliyan@163.com

Received: 2005-04-04 Accepted: 2005-04-09

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) and TIMP-1 colorectal mucous tissues with different types, and to explore the clinical significance of MMP-2/TIMP-2, MMP-9/TIMP-1 in the progression of colorectal neoplasm into colorectal carcinoma.

**METHODS:** The expression of MMP-2, MMP-9 and their inhibitors TIMP-2, TIMP-1 were detected in the mild, moderate and severe dysplasia of colorectal neoplasm and colorectal carcinoma by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

**RESULTS:** The expression of MMP-2 in the severe dysplasia of colorectal neoplasm significantly higher than that in the mild and moderate ones and normal mucosa ( $91.391 \pm 23.551$  vs  $19.461 \pm 8.836$ ,  $42.313 \pm 14.094$ ,  $27.330 \pm 8.405$ ,  $P < 0.05$ ). MMP-9 was not expressed in normal colorectal mucosa, but its expression was successively in mild ( $11.260 \pm 4.104$ ), moderate ( $31.520 \pm 7.433$ ) and severe ( $57.803 \pm 19.060$ ) dysplasia as well as in colorectal carcinoma ( $202.17 \pm 33.344$ ). Marked difference

was detected between any two of them ( $P < 0.05$ ). TIMP-2 was differently expressed between severe dysplasia and normal colorectal mucosa ( $136.279 \pm 19.539$  vs  $81.363 \pm 26.252$ ,  $P < 0.05$ ). The ratio of MMP-2 to TIMP-2 was significantly different between mild, moderate and severe dysplasia and colorectal carcinoma ( $0.206 \pm 0.128$  vs  $0.360 \pm 0.129$  vs  $0.665 \pm 0.100$  vs  $1.136 \pm 0.300$ ,  $P < 0.05$ ). TIMP-1 expression was obviously decreased in mild and medium dysplasia as compared with that in colorectal carcinoma ( $227.413 \pm 208.497$ ,  $654.854 \pm 339.005$  vs  $1136.271 \pm 607.029$ ,  $P < 0.05$ ). The ratio of MMP-9 to TIMP-1 showed no marked difference between mild, moderate and severe dysplasia and colorectal carcinoma ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** MMP-2 may be an important marker in the progression of colorectal neoplasm into colorectal carcinoma. MMP-9 can be applied to differentiate benign tumors from malignant ones. The ratio of MMP-2 to TIMP-2 is associated with colorectal neoplasm's progression into carcinoma, but the ratio of MMP-9 to TIMP-1 isn't. MMP-2 and MMP-9 may be used as valuable biological markers for predicting progression of colorectal neoplasm into carcinoma.

**Key Words:** Colorectal neoplasm; Colorectal carcinoma; MMP-2; TIMP-2; MMP-9; TIMP-1

Wang LY, Qiao Z, Guan JM, Lv LY, Zhang CY. Roles of MMP-2, MMP-9 and their inhibitors in progression of colorectal neoplasm into colorectal carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(13):1514-1518

## 摘要

**目的:** 探讨基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶抑制剂-2(TIM-2)、基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIM-1)在不同性质的大肠黏膜中的表达情况及 MMP-2/TIMP-2、MMP-9/TIMP-1 与大肠腺瘤向大肠癌转变的相关性及临床意义。

**方法:** 用酶联免疫吸附试验(ELISA)的方法对 MMP-2、MMP-9 及其抑制剂 TIMP-2、TIMP-1 在大肠腺瘤轻、中、重度不典型增生以及大肠腺癌中进行定量检测。

**结果:** MMP-2 在大肠腺瘤重度不典型增生与中含量明显高于轻、中度不典型增生及正常大肠黏膜( $91.391 \pm 23.551$  vs  $19.461 \pm 8.836$ ,  $42.313 \pm 14.094$ ,  $27.330 \pm 8.405$ ,  $P < 0.05$ ); MMP-9 在正常肠黏膜中未见表达,

在大肠腺瘤轻中重度不典型增生及大肠癌中表达依次增强, 两两间有显著性差异( $11.260 \pm 4.104$  vs  $31.520 \pm 7.433$  vs  $57.803 \pm 19.060$  vs  $202.17 \pm 33.344$ ,  $P < 0.05$ ); TIMP-2 重度不典型增生组与正常大肠黏膜有显著性差异( $136.279 \pm 19.539$  vs  $81.363 \pm 26.252$ ,  $P < 0.05$ ); MMP-2/TIMP-2 比率在腺瘤轻、中度不典型增生, 重度不典型增生及大肠腺瘤中两两之间均有显著性差异( $0.206 \pm 0.128$  vs  $0.360 \pm 0.129$  vs  $0.665 \pm 0.100$  vs  $1.136 \pm 0.300$ ,  $P < 0.05$ ); TIMP-1 在腺瘤轻中度不典型增生中表达与大肠腺瘤中表达有显著性差异( $227.413 \pm 208.497$ ,  $654.854 \pm 339.005$  vs  $1136.271 \pm 607.029$ ,  $P < 0.05$ ); MMP-9/TIMP-1 比率在腺瘤轻中度不典型增生, 重度不典型增生及大肠腺瘤中两两之间均无显著性差异( $P > 0.05$ ).

**结论:** MMP-2 可能是大肠腺瘤向大肠腺癌转变过程中的早期事件. MMP-9 可作为区别大肠肿瘤良恶性的一项重要指标. MMP-2/TIMP-2 比率与大肠腺瘤恶变有相关性, 而 MMP-9/TIMP-1 的比率与大肠腺瘤向大肠腺癌的转变无相关性. MMP-2、MMP-9 的定量监测可以作为大肠腺瘤向大肠腺癌转变过程中重要的生物学指标.

**关键词:** 大肠腺瘤; 大肠腺癌; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶-9; 基质金属蛋白酶抑制剂-2; 基质金属蛋白酶抑制剂-1

汪丽燕, 乔镇, 关景明, 吕丽燕, 张春燕. 基质金属蛋白酶-2,9及其抑制剂与大肠腺瘤癌变的关系. 世界华人消化杂志. 2005;13(13):1514-1518  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1514.asp

## 0 引言

大肠癌的发生、发展是一个分子、细胞、组织形态学伴随生化改变的渐变、递增过程. 腺瘤性息肉组织学由轻到重的不典型增生癌变过程已为许多学者认同, 故腺瘤性息肉已成为研究癌变的专用对象. 文献报道<sup>[1-9]</sup>, 基质金属蛋白酶-2, 基质金属蛋白酶-9 的高表达与许多恶性肿瘤的浸润、转移及血管生成密切相关. 目前对 MMP 的研究主要集中在肿瘤侵袭转移中的作用的认知, 本实验集中研究了 MMP 在大肠癌前病变即大肠腺瘤轻、中、重度增生中的表达情况. 为预防大肠癌, 有效治疗大肠癌前病变提供理论依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 研究材料取自 2003-2004 年本院外科住院患者手术切除的大肠标本, 经过病理组织学诊断为大肠腺瘤伴轻、中、重度不典型增生 8 例、大肠腺癌(腺瘤与腺癌同时存在)8 例及手术切除标本中正常组织 8 例. 年龄 38-76 岁, 新鲜组织置液氮 3 h 后防于  $-70^{\circ}\text{C}$  保存, 待制备组织匀浆. 主要试剂 MMP-2、9, TIMP-1、2 试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司.

**1.2 方法** 用 ELISA 法在大肠的正常组织、大肠腺瘤、大肠癌组织中定量检测 MMP-2、MMP-9、TIMP-1, 2 的蛋白含量, 全部操作严格按照说明书进行.

**统计学处理** 采用 SPSS10.0 软件包进行统计学分析. ELISA 实验结果以  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示, 运用 Dunnett' c 检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 MMP-2 在不同性质的大肠黏膜中的检测结果** MMP-2 大肠腺瘤轻、中、重度不典型增生、大肠癌中的含量依次增高; 大肠腺瘤组中的轻、中度不典型增生组与正常组无显著性差异( $P > 0.05$ ), 与重度不典型增生组有显著性差异( $P < 0.05$ ), 与大肠癌组比有显著性差异( $P < 0.05$ ); 重度不典型增生腺瘤与正常组有显著性差异( $P < 0.05$ ), 与大肠癌组无显著性差异( $P > 0.05$ ) (表 1, 图 1).

表1 MMP-2, TIMP-2, MMP-2/TIMP-2 在不同性质的大肠黏膜腺中的表达(mean  $\pm$  SD)

	<i>n</i>	MMP-2	TIMP-2
腺瘤轻度不典型增生	8	$19.461 \pm 8.836^{\circ}$	$110.961 \pm 54.841$
腺瘤中度不典型增生	8	$42.313 \pm 14.094^{\circ}$	$122.791 \pm 28.434$
腺瘤重度不典型增生	8	$91.391 \pm 23.551^{ab}$	$136.279 \pm 19.539^{\circ}$
大肠腺癌	8	$211.987 \pm 125.821$	$177.755 \pm 65.881$
正常大肠黏膜黏膜	8	$27.330 \pm 8.405$	$81.363 \pm 26.252$

<sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 腺瘤轻、中度不典型增生; <sup>b</sup> $P < 0.05$  vs 大肠腺癌; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 正常大肠黏膜.

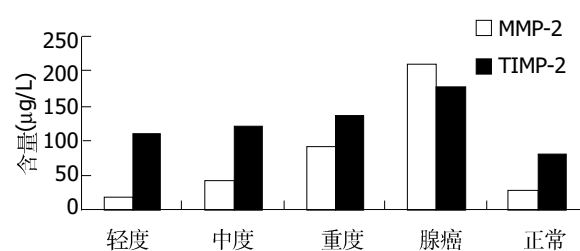


图1 MMP-2、TIMP-2 在不同性质的大肠黏膜中的含量.

**2.2 TIMP-2 在不同性质的大肠黏膜腺中的检测结果** TIMP-2 在正常大肠黏膜、大肠腺瘤轻、中、重度不典型增生、大肠癌中的含量依次增高; 大肠腺瘤组中的轻、中度不典型增生组与重度不典型增生组、大肠癌组及正常组均无显著性差异( $P > 0.05$ ); 重度不典型增生组与正常组有显著性差异( $P < 0.05$ ), 与大肠癌组无显著性差异( $P > 0.05$ ) (表 1, 图 1).

**2.3 MMP-9 在不同性质的大肠黏膜腺中的检测结果** MMP-9 在正常大肠黏膜、大肠腺瘤轻、中、重度不典型增生、大肠癌中的含量依次增高; MMP-9 在正常

大肠黏膜中几乎没有检测到;大肠腺瘤组中的轻、中、重度不典型增生组、大肠癌组两两间均显著性差异( $P<0.05$ ) (表2, 图2).

表2 MMP-9, TIMP-1, 在不同性质的大肠黏膜腺中的表达(mean  $\pm$  SD)

	<i>n</i>	MMP-9	TIMP-1
腺瘤轻度不典型增生	8	11.260 $\pm$ 4.104 <sup>a</sup>	227.41 $\pm$ 208.497 <sup>c</sup>
腺瘤中度不典型增生	8	31.520 $\pm$ 7.433 <sup>a</sup>	403.959 $\pm$ 193.868
腺瘤重度不典型增生	8	57.80 $\pm$ 19.060 <sup>a</sup>	654.854 $\pm$ 339.005
大肠腺癌	8	202.17 $\pm$ 33.344	1136.271 $\pm$ 607.029
正常大肠黏膜	8	0.000 $\pm$ 0.000	212.220 $\pm$ 162.236

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 腺瘤轻、中度不典型增生; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 大肠腺癌; <sup>e</sup> $P<0.05$  vs 正常大肠黏膜.

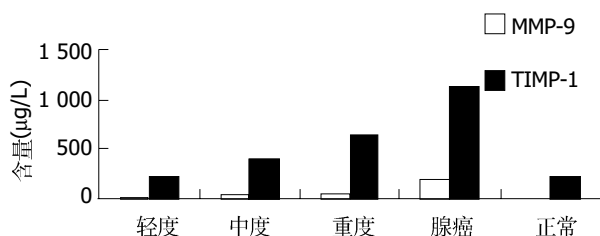


图2 MMP-9、TIMP-1 在不同性质的大肠黏膜中的含量.

2.4 TIMP-1 在不同性质的大肠黏膜腺中的检测结果 TIMP-1 在正常大肠黏膜、大肠腺瘤轻、中、重度不典型增生、大肠癌中的含量依次增高;腺瘤组中的轻度不典型增生组与比大肠癌组有显著性差异( $P<0.05$ );其他各组间均无显著性差异( $P>0.05$ ) (表2, 图2).

2.5 MMP-2/TIMP-2 在不同性质的大肠黏膜腺中的检测结果 MMP-2/TIMP-2 的比值在正常大肠黏膜、大肠腺瘤轻、中、重度不典型增生、大肠癌中依次增高;大肠腺瘤组中的轻、中度不典型增生组与重度不典型增生及大肠癌组有显著性差异( $P<0.05$ ), 与正常组无显著性差异( $P>0.05$ );腺瘤组中的重度不典型增生与正常组及大肠癌组均有显著性差异( $P<0.05$ ) (表3, 图3).

表3 MMP-9/TIMP-1、MMP-2/TIMP-2 与大肠腺瘤恶变的相关性 (mean  $\pm$  SD)

	<i>n</i>	MMP-9/TIMP-1	MMP-2/TIMP-2
腺瘤轻度不典型增生	8	0.071 $\pm$ 0.030 <sup>a</sup>	0.206 $\pm$ 0.128 <sup>c</sup>
腺瘤中度不典型增生	8	0.071 $\pm$ 0.064 <sup>a</sup>	0.360 $\pm$ 0.129 <sup>c</sup>
腺瘤重度不典型增生	8	0.175 $\pm$ 0.102 <sup>a</sup>	0.665 $\pm$ 0.100 <sup>a</sup>
大肠腺癌	8	0.231 $\pm$ 0.129	1.136 $\pm$ 0.300
正常大肠黏膜黏膜	8	0.000 $\pm$ 0.000	0.350 $\pm$ 0.100

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 腺瘤轻、中度不典型增生; <sup>c</sup> $P<0.05$  vs 大肠腺癌; <sup>e</sup> $P<0.05$  vs 正常大肠黏膜.

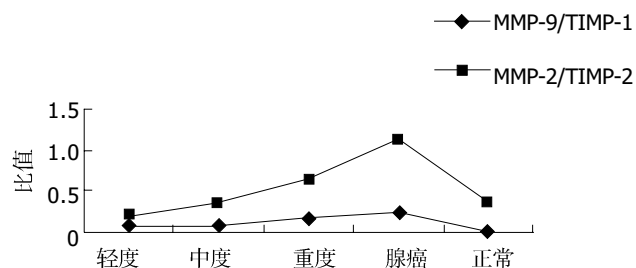


图3 MMP-2、TIMP-2、MMP-9、TIMP-1 与大肠腺瘤恶变的关系.

2.6 MMP-9/TIMP-1 的比值在不同性质的大肠黏膜腺中的检测结果 MMP-9/TIMP-1 的比值在正常大肠黏膜、大肠腺瘤轻、中、重度不典型增生、大肠癌中依次增高;大肠腺瘤组中的轻、中、重度不典型增生组与正常组有显著性差异( $P<0.05$ ), 其他各组间均无显著性差异( $P>0.05$ ) (表3, 图3).

### 3 讨论

MMPs 是在 1962 年被发现的一组锌离子依赖性内肽酶, 是由 24 种 MMP 构成的超家族<sup>[10]</sup>. 各种 MMP 间具有一定的特性. 目前对 MMP 的研究主要集中在肿瘤侵袭转移中作用的认识, 本实验集中研究了 MMP 在大肠癌前期病变即大肠腺瘤轻、中、重度不典型增生中的表达情况.

肿瘤的发生、发展是一个多基因多步骤的复杂过程<sup>[11-12]</sup>, 这个过程中有细胞外基质及基膜的降解. MMP-2、MMP-9 是一种明胶酶(gelatinase), 主要水解底物是变性胶原及细胞外基质 BM 的主要成分 IV 型胶原和 V 型胶原等. 而 IV 型胶原和 V 型胶原是细胞外基质及基膜的主要成分, 与肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[13-18]</sup>. MMP-2, MMP-9 的除了降解细胞外基质外, 还有促进新生血管形成, 调节细胞黏附的作用. MMP-2、MMP-9 分子质量分别为 72 ku, 以酶原形式分泌到细胞外, 经活化才具有活性. 本实验结果显示 MMP-2 在大肠腺瘤重度不典型增生中含量明显高于轻、中度不典型增生及正常大肠黏膜( $P<0.05$ ), 但与大肠癌组无显著性差异( $P>0.05$ ). 说明 MMP-2 可能是大肠腺瘤向大肠腺癌转变过程中的早期事件. MMP-9 在正常肠黏膜中未见表达, 在大肠腺瘤轻、中、重度不典型增生及大肠癌中表达依次增强, 两两比较有显著性差异( $P>0.05$ ). 提示 MMP-9 可作为区别大肠肿瘤良恶性的一项指标. 腺瘤重度不典型增生被认为是癌前病变. Liotta *et al*<sup>[19]</sup>认为:当肿瘤处于癌前病变时期, 其基底膜的连续性就已经出现了局部破损, 这可能与一些非正常的分泌型酶被合成有关. 本研究推测这些分泌型的酶中可能会 MMP-2、MMP-9 的存在. 细胞外基质(ECM)在细胞与细胞之间起机械支持和连接作用, 同时也是细胞和细胞之间信号传递的桥梁. MMPs 可以



通过分解ECM成分来调节其降解和重组之间的动态平衡,使基质中已存在的生物活性物质释放或激活而参与组织和细胞的生长、增殖、分化,进而影响细胞和组织器官的各种形态和功能<sup>[20]</sup>.MMP的表达异常可能导致某些特殊信号被消除、某些隐含信号被显现,破坏了细胞外基质的平衡性,导致大肠腺瘤向大肠腺癌转变.文献[21-24]报道MMP-2可以激活MMP-9,本实验结果显示正常大肠黏膜中有少量的MMP-2的表达,而没有MMP-9的表达,是否可以推测随着大肠腺瘤不典型增生程度的增加直到发展成大肠腺癌的过程中MMP-2诱导了MMP-9的表达.无论是良性肿瘤还是恶性肿瘤其生长都依赖于血管供应营养.血管的发生是肿瘤生长的前提条件.新生血管的形成在肿瘤发生、发展过程中有重要作用.文献[21]报道MMP-2、MMP-9在血管形成中均起了重要作用,新生血管的形成极大的依赖于基质金属蛋白酶的活性.MMP-9能上调肿瘤血管化的程度是血管发生启动系统中重要的一员<sup>[22-27]</sup>.从本实验可以推断腺瘤可能通过增加MMP的表达诱导血管生成促进腺瘤生长,加重不典型增生的程度,在大肠腺瘤向大肠腺癌的转变过程中起促进作用.

TIMPs是MMPs的天然抑制剂,是由体内细胞分泌、能抑制MMPs活性的一类蛋白酶抑制剂,可与MMPs的酶原与活化形式相结合.TIMP能抑制已激活的MMP的活性,能阻止或延缓酶原型MMP转变为激活型MMP的过程,能抑制肿瘤新生血管的生长<sup>[28]</sup>.TIMP-1是一个由184个氨基酸组成的糖蛋白,分子质量为28.5 ku,可与活化的MMP形成复合体,降低细胞外基质的降解,抑制肿瘤转移.TIMP-2是一个非糖化的由194个氨基酸组成的蛋白质,分子质量为21 ku.TIMP-2,TIMP-2可抑制MMP-2的活性,对除MMP-3、MMP-9以外的MMP家族其他成员的活性也有抑制作用,能阻断所有被激活的MMP的水解酶活性.本实验研究结果显示TIMP-2大肠腺瘤轻、中、重度不典型增生、大肠癌中的含量依次增高;大肠腺瘤组中的轻、中度不典型增生组与重度不典型增生组、大肠癌组及正常组均无显著性差异( $P>0.05$ );重度不典型增生组与正常组比有显著性差异( $P<0.05$ ),与大肠癌组无显著性差异( $P>0.05$ );MMP-2/TIMP-2比率在大肠腺瘤组中的轻、中度不典型增生组与重度不典型增生及大肠癌组有显著性差异( $P<0.05$ ),与正常组比无显著性差异( $P>0.05$ );腺瘤组中的重度不典型增生与正常组及大肠癌组均有显著性差异( $P<0.05$ ).这说明在不同性质的大肠黏膜中随着MMP-2的增加TIMP-2也在增加,这可能是MMP-2表达增强的一种内在需求导致其抑制剂表达也随之增强,但TIMP-2的表达强度弱于MMP-2,最终导致二者失衡,而在大肠癌的发生发展中发生作用.说明

MMP-2/TIMP-2比率与大肠腺瘤向大肠腺癌的转变有相关性.TIMP-1在正常大肠黏膜、大肠腺瘤轻、中、重度不典型增生、大肠癌中的含量依次增高;腺瘤组中的轻度不典型增生组与比大肠癌组比有显著性差异( $P<0.05$ );其他各组间均无显著性差异( $P>0.05$ ),这说明腺瘤重度不典型增生中某些异型细胞的生物学行为已经接近于恶性肿瘤细胞的生物学行为,进一步提示临床对大肠腺瘤进行全瘤活检的重要性及意义.MMP-9/TIMP-1比率在正常大肠黏膜、大肠腺瘤轻、中、重度、大肠癌中依次增高;大肠腺瘤组中的轻、中、重度不典型增生组与正常组比有显著性差异( $P<0.05$ ),其他各组间均无显著性差异( $P>0.05$ ).这说明而MMP-9/TIMP-1的比率与大肠腺瘤向大肠腺癌转变过程有相关性.

本实验通过对MMP-2、MMP-9及MMP-2/TIMP-2、MMP-9/TIMP-1的研究进一步揭示了基质金属蛋白酶及其抑制剂在大肠腺瘤向大肠腺癌转变过程中的作用,有助于我们对癌前病变进展为癌的分子机制有更深入的了解,为临床制定合理的综合治疗方案提供可靠的理论依据.但在大肠腺瘤向大肠腺癌转变过程除了有MMP-2、MMP-9表达含量的变化,MMP-2/TIMP-2、MMP-9/TIMP-1比率的失衡,可能还有MMP-2、MMP-9的活性改变,是他们中的某一种改变起决定性的作用,还是他们间的相互协调起决定性的作用,值得我们去进一步探讨研究.

#### 4 参考文献

- 1 Takahashi M, Oka N, Naroda T, Nishitani MA, Kanda K, Kanayama HO, Kagawa S. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-2 activation ratio in renal cell carcinoma. *Int J Urol* 2002;9:531-538
- 2 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
- 3 张成武, 邹寿椿, 徐文娟, 赵仲生. 胃癌基质金属蛋白酶-9表达的临床意义. *中国胃肠外科杂志* 2000;3:25
- 4 Riedel F, Gotte K, Bergler W, Hormann K. Inverse correlation of apoptotic and angiogenic markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncol Rep* 2001;8:471-476
- 5 Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, Baba H, Koga T, Sugimachi K. Clinicopathological features and overexpression of matrix metalloproteinases in intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 2000;6:3581-3584
- 6 Chamber AF, Matrisian LM. Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1260-1270
- 7 Hirvonen R, Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in T (1-2) N0 breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2003;77:85-91
- 8 Matsuyama Y, Takao S, Aikou T. Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *J Surg Oncol* 2002;80:105-110
- 9 Kabashima A, Yao T, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. Relationship between biologic behavior and phenotypic expression in

- intramucosal gastric carcinomas. *Hum Pathol* 2002;33:80-86
- 10 Roeb E, Matern S. Matrix metalloproteinases and colorectal cancer. *Med Klin (Munich)* 2003;98:763-770
- 11 Meyer T, Hart IR. Mechanisms of tumor metastasis. *Eur J Cancer* 1998;34:214-221
- 12 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;43(Suppl): s42-s51
- 13 Stock UA, Wiederschain D, Kilroy SM, Shum-Tim D, Khalil PN, Vacanti JP, Mayer JE Jr, Moses MA. Dynamics of extracellular matrix production and turnover in tissue engineered cardiovascular structures. *J Cell Biochem* 2001;81:220-228
- 14 Uria JA, Lopez-Otin C. Matrilysin, a new matrix metalloproteinase expressed in human tumors and showing the minimal domain organization required for secretion, latency, and activity. *Cancer Res* 2000;60:4745-4751
- 15 Deng SJ, Bickett DM, Mitchell JL, Lambert MH, Blackburn RK, Carter HL 3rd, Neugebauer J, Pahel G, Weiner MP, Moss ML. Substrate specificity of human collagenase 3 assessed using a phage-displayed peptide library. *J Biol Chem* 2000; 275:31422-31427
- 16 Stracke JO, Hutton M, Stewart M, Pendas AM, Smith B, Lopez-Otin C, Murphy G, Knauper V. Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. *J Biol Chem* 2000;275:14809-14816
- 17 Marchenko GN, Ratnikov BI, Rozanov DV, Godzik A, Deryugina EI, Strongin AY. Characterization of matrix metalloproteinase-26, a novel metalloproteinase widely expressed in cancer cell of epithelial origin. *Biochem J* 2000;356:705-718
- 18 Nar H, Werle K, Bauer MM, Dollinger H, Jung B. Crystal structure of human macrophage elastase (MMP-12) in complex with a hydroxamic acid inhibitor. *J Mol Biol* 2001;312: 743-751
- 19 Liotta LA, Stetler-Stevenson W. Metalloproteinases and malignant conversion: does correlation imply causality? *J Natl Cancer Inst* 1989;81:556-557
- 20 赵云隔, 欧尔比特·安尼瓦尔, 祝诚. 细胞外基质与基质金属蛋白酶. *生物化学与生物物理进展* 1999;26 :223-226
- 21 高国林, 杨原, 杨思凤, 任彩文. 血管内皮细胞增生是胃癌相关性病变. *世界华人消化杂志* 2000;8:282-284
- 22 Gasparini G. Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 2000;5(Suppl 1):37-44
- 23 吴静, 樊代明. 肿瘤血管生成与肿瘤血管抑制治疗. *世界华人消化杂志* 2001;9:316-321
- 24 陶厚权, 邹寿椿, 王瑞年, 林言箴. 血管生成与胃癌发生之间的实验研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:43-46
- 25 Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999;13:781-792
- 26 Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* 2000;4:737-744
- 27 Riedel F, Gotte K, Schwalb J, Bergler W, Hormann K. Expression of 92-k Da type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2000;17:1099-1105
- 28 Seandel M, Noack-Kunmann K, Zhu D, Aimes RT, Quigley JP. Growth factor induced angiogenesis in vivo requires specific cleavage of fibrillar type I collagen. *Blood* 2001;97:2323-2332

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北京协和国际消化疾病论坛征文通知

本刊讯 “北京协和国际消化疾病论坛”由北京协和医院主办,中华医学会北京分会、中华医学会继续教育部、中国医学论坛报、《中国卫生人才》、中国全科医学杂志社协办,现定于2005-10-20/2005-10-23在北京召开.会议将邀请国内外众多此领域具有较深造诣的知名专家参会作专题报告吉内镜操作表演.国家继续教育委员会将授予与会人员 I 类继续教育学分 8 分.论坛期间还将举办药品及器械展览活动.

### 1 会议具体安排

地点:中国·北京京都信苑饭店(五星级)(暂定).会务费:2005-08-15 前付费¥800 元;2005-08-15 后(含)付费¥900 元.付款方式:Bank Remittance(汇款),开户行:中国建设银行北京广安门直航,户名:北京世纪安德广告有限公司,账号:11001042200053000033.地址:北京市丰台区方城园一区17号楼A座1603室(组委会),邮编:100078.电话:010-58075131、58075132、58075088、58075099,传真:010-58075138,电子信箱:puiddf@163.com.请在汇款时务必表明款项的用途为:2005北京协和国际消化疾病论坛会务费,2005北京协和国际消化疾病论坛秘书处 2005-1.

### 2 会议议题

会议的议题包括:(1)消化系统疾病的发病机制、诊断和治疗的研究进展;(2)消化系统肿瘤的发病机制、治疗及预防的进展;(3)消化系统内镜的应用现状及操作表演;(4)肝病及肝癌的研究进展;(5)消化系统疾病的外科治疗及研究现状.

### 3 其他事项

大会秘书处联系人:李景南,北京协和医院消化内科 100730.电话:010-65295017,电子信箱:l.jndr@yahoo.com.大会组委会联系人:王双、白雪.

# FLIP 干扰性小 RNA 促进大肠癌细胞的凋亡

孙保存, 臧凤琳, 牛瑞芳, 魏熙胤, 赵秀兰, 张诗武

孙保存, 臧凤琳, 牛瑞芳, 魏熙胤, 张诗武, 天津医科大学肿瘤研究所  
天津市 300060  
赵秀兰, 天津医科大学病理教研室 天津市 300070  
天津市自然科学基金资助项目, No. 013611511  
通讯作者: 孙保存, 300060, 天津市河西区体院北环湖西路, 天津医科大学  
肿瘤研究所. baocunsun@eyou.com  
电话: 022-23340123-5224  
收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-05-14

## Effect of FLIP small interfering RNA on apoptosis of colorectal cancer cells

Bao-Cun Sun, Feng-Lin Zang, Rui-Fang Niu, Xi-Yin Wei,  
Xiu-Lan Zhao, Shi-Wu Zhang

Bao-Cun Sun, Feng-Lin Zang, Rui-Fang Niu, Xi-Yin Wei, Shi-Wu Zhang,  
Institute of Oncology, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China  
Xiu-Lan Zhao, Department of Pathology, Tianjin Medical University,  
Tianjin 300060, China  
Supported by the Natural Science Foundation of Tianjin, No. 013611511  
Correspondence to: Bao-Cun Sun, Institute of Oncology, Tianjin Medical  
University, Huanhuxi Road, Ti Yuan North, Hexi District, Tianjin 300060,  
China. baocunsun@eyou.com  
Received: 2005-04-26 Accepted: 2005-05-14

## Abstract

**AIM:** To investigate the promotion effect of small interfering RNA of FADD-like IL-1 $\beta$  converting enzyme inhibitory protein (FLIP) on the cell apoptosis in colorectal cancer.

**METHODS:** Human colorectal cancer cell line HT-29 was cultured *in vitro* and transfected with two siRNAs (different loci) of FLIP by electroporation technique. The level of FLIP mRNA expression before and after interfering was detected by semi-quantitative polymerase chain reaction (PCR). The specificity and time effect for interference and the interfering effect between the two siRNAs were compared. Then the cells were treated with agonistic anti-Fas antibody to induce apoptosis. The apoptosis before and after interfering was determined by Annexin V and DNA degradation.

**RESULTS:** The level of FLIP mRNA in HT-29 cells was inhibited by the specific siRNAs. The decrease of FLIP mRNA expression began to appear 24 hours after transfection. And the most apparent interfering efficiency was 65.02% 48 hours after transfection, which was markedly higher than that in the cells transfected with the control siRNAs. Both siRNAs (siRNA-F1 and siRNA-F2) from different loci had interfering effect on FLIP mRNA expression, but there

was no significant difference between them. Compared with those in non-transfected cells (1.76%), the apoptotic rates were significantly higher in siRNA transfected cells (29.50%) after treated with agonistic anti-Fas antibody.

**CONCLUSION:** Small interfering RNA of FLIP can markedly decrease the expression of FLIP mRNA and sensitize the Fas-mediated apoptosis of colorectal cancer cell line HT-29. The RNA interfering technique targeted on FLIP may provide a new method in the gene therapy of colorectal cancer.

**Key Words:** Colorectal cancer; FADD-like IL-1 $\beta$  converting enzyme inhibitory protein; Small interfering RNA; Apoptosis

Sun BC, Zang FL, Niu RF, Wei XY, Zhao XL, Zhang SW. Effect of FLIP small interfering RNA on apoptosis of colorectal cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1519-1523

## 摘要

**目的:** 研究对应 FLIP 基因的 siRNA 片段对大肠癌细胞株 HT-29 凋亡的影响, 明确 FLIP 在 Fas 介导的凋亡途径中的作用。

**方法:** 体外培养大肠癌细胞 HT-29, 通过电穿孔技术将特异性 siRNA 片段转染入细胞, 半定量 RT-PCR 法判断干扰前后 FLIP mRNA 水平的变化, 分析 RNA 干扰的特异性、时效性, 并比较对应不同位点的两个 siRNA 片段对 FLIP 的干扰效果。经凋亡诱导型抗体激活后, 以 Annexin V 染色法及 DNA 降解片段检测分析干扰前后 HT-29 细胞对 Fas 介导的凋亡敏感性的改变。

**结果:** 特异性 siRNA 片段能有效降低 FLIP mRNA 水平, 最大干扰效率达 65.02%, 明显高于作为对照的非相关片段; 干扰作用于转染后 24 h 即可出现, 48 h 达高峰, 72 h 稍有降低; 对应不同位点的两个 siRNA 片段对 FLIP 均可产生干扰作用, 彼此间差别不大。在诱导型抗体的刺激下, 与未转染细胞相比, 转染 siRNA 的 HT-29 细胞中凋亡细胞所占比例明显增加。

**结论:** 特异性 siRNA 片段可显著降低 FLIP 基因 mRNA 的表达水平, 并提高 HT-29 细胞对 Fas 介导的凋亡敏感性。以 FLIP 为靶点的 RNA 干扰技术可望成为大肠癌基因治疗的新方法。

**关键词:** 大肠癌; FLIP; siRNA; 凋亡

孙保存, 臧凤琳, 牛瑞芳, 魏熙瀚, 赵秀兰, 张诗武. FLIP干扰性小RNA促进大肠癌细胞的凋亡. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1519-1523  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1519.asp>

## 0 引言

FLIP (FADD-like IL-1 $\beta$  converting enzyme inhibitory protein) 是近年来发现的一类凋亡抑制蛋白. 现已证实, FLIP的高表达与恶性黑色素瘤<sup>[1]</sup>、Burkitt淋巴瘤<sup>[2]</sup>、卡波氏肉瘤<sup>[3]</sup>等的发生、发展具有密切相关性. FLIP在蛋白水平上包括短型FLIP (FLIP<sub>S</sub>) 和长型FLIP (FLIP<sub>L</sub>) 2种形式, 前者只含有2个与caspase-8相似的死亡效应域 (DED), 后者除此之外还含有一个caspase同源结构域, 但其中具有催化功能的半胱氨酸残基被酪氨酸残基所取代<sup>[4]</sup>. 因此, 虽然2种形式的蛋白均缺乏蛋白水解酶活性, 但FLIP<sub>L</sub>与caspase-8在结构上似乎更为相近. 本研究以大肠癌细胞为研究对象, 采用新近发现的RNA干扰技术, 将对应FLIP<sub>L</sub>的干扰性小RNA (small interfering RNA, siRNA) 片段转染入细胞, 观察肿瘤细胞对Fas介导的凋亡敏感性的变化, 以期对肿瘤的基因治疗提供新的靶点和思路.

## 1 材料和方法

1.1 材料 siRNA片段: 对应FLIP<sub>L</sub>选用2对大小为20 nt的siRNA片段, 化学合成法制备, 由德国Stuttgart大学Harald Wajant教授惠赠, 对应序列: siRNA-F1 (FLIP<sub>L</sub> 472-492): 正义5' -ACAUAAGGUGGAACCACAUCU-3', 反义5' -AGAUGUGGUCCACCUGAAUGU-3'; siRNA-F2 (FLIP<sub>L</sub> 908-928): 正义5' -GUAACUUGUCCUGCUCCUUG-3', 反义5' -CAAGGAGCAGGGACAAGUUAC-3'<sup>[5]</sup>. 对应I型人类T细胞白血病病毒转录激活区 (HTLV-1 Tax), 选用一条siRNA片段 (siRNA-H), 由国家新药筛选中心李佳副研究员惠赠, 对应序列: 正义5' -GAUGGACGCGUUAUCGGCU-3', 反义5' -AGCCGAUAACGCGUCCAUC-3'. 经BLAST检索, 该片段与FLIP<sub>L</sub>之间不存在同源性, 故可作为非相关对照. 主要试剂及仪器: Hypo-osmolar电穿孔缓冲液购自Eppendorf公司; ImProm- II<sup>TM</sup> 反转录酶购自Promega公司, 其余RT-PCR试剂购自TaKaRa公司; 凋亡诱导型小鼠抗人Fas单抗 (CH-11)、Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自Beckman Coulter公司. 电穿孔仪 (Eppendorf Multiporator型), PCR仪 (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9700型), 凝胶成像分析仪 (Kodak 440CF型), 流式细胞仪 (Beckman Coulter公司 EPICS-XL型).

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 大肠癌细胞株 HT-29 由天津肿瘤医院中心实验室保存, 常规培养在含100 mL/L胎牛血清、

青霉素100 U/mL、链霉素100 mg/L的RPMI1640培养基中, 培养条件为37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>饱和湿度.

1.2.2 转染细胞 取对数生长期的HT-29细胞, 胰酶消化, 重悬于含5 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液中, 计数10<sup>6</sup>个细胞, 800 r/min离心, 以800  $\mu$ L的Hypo-osmolar电穿孔缓冲液轻柔重悬, 室温静置25 min, 加入100 nmol/L的siRNA片段, 于500 V、70  $\mu$ s条件下电穿孔 (4 mm gap width电转杯). 电转后室温静置5-10 min, 接种于6孔板 (每个转染条件接种3个复孔), 每孔加入2.5 mL含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液, 37℃培养, 4 h后更换常规培养液, 继续培养. 实验中, 以未经任何处理的细胞为对照, 并设仅施以电穿孔组和转染非相关片段 (HTLV-1 Tax) 组.

1.2.3 RT-PCR 于转染后24、48、72 h, 收集细胞, PBS洗涤, 以TRIZOL试剂 (Gibco公司) 提取总RNA, 逆转录, 并进行PCR扩增 (按试剂说明操作). FLIP<sub>L</sub>上游引物: 5' -ACCGAGACTACGACAGCTTTGTG-3', 下游引物: 5' -CAATGTGAAGATCCAGGAGTGGG-3', 扩增产物大小为429 bp<sup>[6]</sup>; 内参照 $\beta$ -actin上游引物: 5' -ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3', 下游引物: 5' -CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3', 扩增产物大小为318 bp. PCR反应条件为: 94℃预变性3 min; 94℃变性45 s, 65℃退火45 s, 72℃延伸2 min, 共35个循环, 最后72℃延伸7 min. 扩增产物经13 g/L琼脂糖凝胶电泳, 并用Kodak 440凝胶成像系统进行灰度扫描密度分析, 计算目的基因的相对含量及干扰效率. 目的基因相对含量 (%) = 目的基因Net. Int. /  $\beta$ -actin Net. Int.  $\times$  100%; 干扰效率 = [未处理组FLIP相对含量 (%) - 处理组FLIP相对含量 (%) ] / 未处理组FLIP相对含量 (%)  $\times$  100%.

1.2.4 凋亡检测 以凋亡诱导型小鼠抗人Fas单抗 (CH-11) 刺激细胞, 37℃孵育16 h<sup>[6-7]</sup>, 收集细胞, PBS洗涤2次. 一方面, 取5  $\times$  10<sup>5</sup>个细胞加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC溶液 (5 mg/L) 和2.5  $\mu$ L的PI溶液 (250 mg/L), 轻轻混匀, 冰上避光孵育10 min. 另一方面, 取10<sup>6</sup>个细胞, 加入950 mL/L冷乙醇4℃过夜, 离心后加入含Rnase的PI染料 (20 mg/L), 避光孵育30 min. 2种不同方式处理后的细胞均经流式细胞仪检测, 计数凋亡细胞百分比.

1.2.5 重复性评价 以上各种实验方法均独立进行3次以上.

## 2 结果

2.1 RNA干扰的特异性和时效性 以siRNA-F2为外源片段, 转染细胞, 半定量RT-PCR检测发现, 与未

处理的细胞相比, 仅进行电穿孔和转染 siRNA-H 的细胞中, FLIP<sub>L</sub> mRNA 含量无明显变化, 而转染 siRNA-F2 后, FLIP<sub>L</sub> mRNA 含量明显下降(图 1), 最大干扰效率达 65.02%; 于转染后 24 h, FLIP<sub>L</sub> mRNA 的含量已出现下降, 最显著的干扰作用出现在转染后 48 h, 72 h 后 FLIP<sub>L</sub> mRNA 的表达水平略有回升(表 1)。

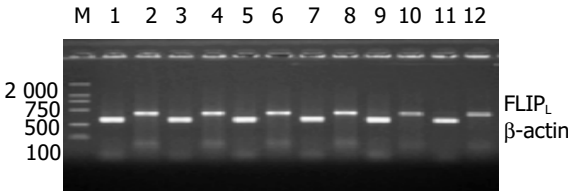


图1 特异性 siRNA 片段使 FLIP<sub>L</sub> mRNA 含量降低. 1、2: 未处理细胞 β-actin、FLIP<sub>L</sub>; 3、4: 仅电穿孔细胞 β-actin、FLIP<sub>L</sub>; 5、6: 转染 siRNA-H 细胞 β-actin、FLIP<sub>L</sub>; 7、8: 转染 siRNA-F2 24 h 后 β-actin、FLIP<sub>L</sub>; 9、10: 转染 siRNA-F2 48 h 后 β-actin、FLIP<sub>L</sub>; 11、12: 转染 siRNA-F2 72 h 后 β-actin、FLIP<sub>L</sub>.

2.2 RNA 干扰的靶向位点性 分别转染 siRNA-F1、siRNA-F2 以及二者的等量混合物, 收集转染 48 h 后的细胞, 进行半定量分析. 结果发现, 转染 3 种不同类型的 siRNA 均可对 FLIP 产生干扰效果(图 2); 相对而

言, siRNA-F2 的干扰作用(64.73%)略强于 siRNA-F1(50.39%) 以及二者的等量混合物(54.68%), 但彼此间差别不大(表 2)。

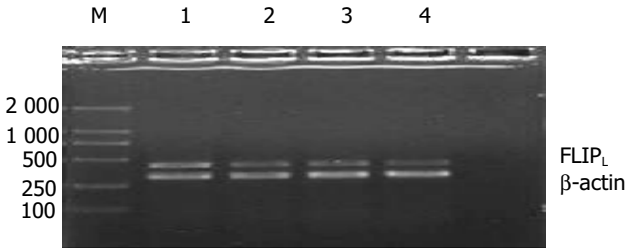


图2 对应不同位点的 siRNA 片段干扰效果比较. 1: 未处理细胞; 2: 转染 siRNA-F1(100 nmol/L)细胞; 3: 转染 siRNA-F2(100 nmol/L)细胞; 4: 转染 F1(50 nmol/L)+F2(50 nmol/L)细胞.

2.3 HT-29 细胞凋亡敏感性

2.3.1 AnnexinV 染色法判断胞膜的改变 与未处理的 HT-29 细胞相比, 转染 siRNA-F2 后细胞在各成分的组成上发生了明显的变化(图 3). 其中, 活细胞所占比例下降, 凋亡细胞和死细胞所占比例上升, 且凋亡细胞在细胞总体中所占的比例上升得尤为显著, 由 1.76% 升至 29.5%(表 3)。

表1 半定量 RT-PCR 分析 siRNA-F2 对 FLIP<sub>L</sub> mRNA 的基因沉默

条带	扩增基因	分子量(bp)	净密度	相对含量(%)	干扰效率(%)
未处理组	1 β-actin	319.4	7 381.73	78.55	
	2 FLIP <sub>L</sub>	444.4	12 957.70		
仅电穿孔组	3 β-actin	319.4	18 209.25	71.79	8.61
	4 FLIP <sub>L</sub>	430.6	13 073.23		
siRNA-H	5 β-actin	319.4	17 978.57	72.96	7.12
	6 FLIP <sub>L</sub>	430.6	13 117.16		
24 h 组	7 β-actin	319.4	18 726.56	50.69	35.47
	8 FLIP <sub>L</sub>	430.6	9 492.42		
48 h 组	9 β-actin	305.6	20 367.85	27.48	65.02
	10 FLIP <sub>L</sub>	430.6	5 597.09		
72 h 组	11 β-actin	305.6	19 230.38	31.96	59.31
	12 FLIP <sub>L</sub>	416.7	6 146.03		

表2 RNA 干扰的靶向位点性比较

条带	siRNAs	扩增基因	分子量(bp)	净密度	相对含量(%)	干扰效率(%)
1	未处理组	β-actin	343.7	30 484.50	77.97	
		FLIP <sub>L</sub>	437.5	23 768.76		
2	siRNA-F1 (100 nmol/L)	β-actin	328.1	26 850.23	38.68	50.39
		FLIP <sub>L</sub>	437.5	10 385.67		
3	siRNA-F2 (100 nmol/L)	β-actin	328.1	28 411.53	27.50	64.73
		FLIP <sub>L</sub>	453.1	7 813.17		
4	F1(50 nmol/L) +F2(50 nmol/L)	β-actin	343.7	29 146.41	35.34	54.68
		FLIP <sub>L</sub>	453.1	10 300.34		

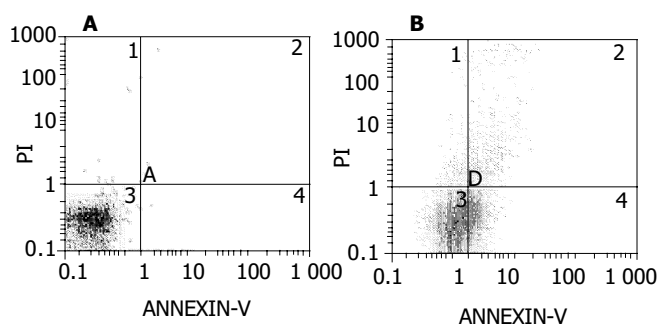


图3 RNA干扰对大肠癌细胞 HT-29 凋亡的作用(Annexin V 分析). A: 未处理细胞; B: 转染 siRNA-F2 细胞. 左下象限代表活细胞, 右上象限代表坏死细胞及细胞碎屑, 右下象限代表凋亡细胞.

表3 转染 siRNA-F2 对 HT-29 细胞凋亡的影响

细胞类型	活细胞(%)	凋亡细胞(%)	坏死细胞及碎屑(%)
未处理	96.7	1.76	0.35
转染 siRNA-F2	63.5	29.50	5.04

2.3.2 DNA 降解片段 转染 siRNA 后的细胞在 G0/G1 期前, 出现了明显的亚二倍体峰, 经软件分析确认其为凋亡峰; 未处理组中虽也存在一凋亡峰, 但峰值显然很低 (图 4).

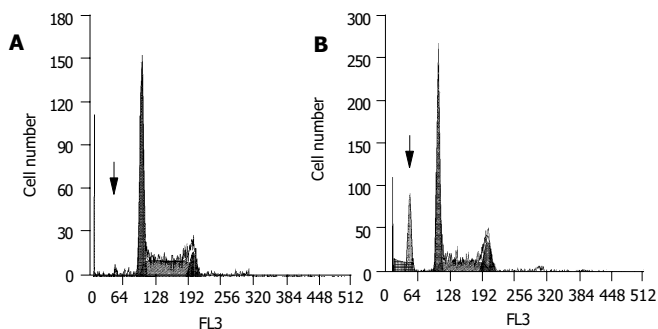


图4 RNA干扰前后, 细胞DNA降解片段分析. A: 未处理细胞; B: 转染 siRNA-F2 细胞.

### 3 讨论

FLIP 作为新近发现的凋亡相关因子, 由于其与 caspase-8 在结构上具有相似性, 故可竞争性与 Fas 相关死亡结构域 (FADD) 结合, 阻断 caspase 蛋白酶级联反应, 从而抑制 Fas、TNFR-1、DR5、TRAILR 等死亡受体介导的凋亡. 到目前为止, FLIP 对大肠癌的凋亡抑制作用尚未见报道. 在本研究中, 我们采用 RNA 干扰技术, 将对应 FLIP<sub>L</sub> 的 siRNA 片段转染入大肠癌细胞株 HT-29, 在 mRNA 水平上封闭其表达, 从而推测大肠癌中 FLIP<sub>L</sub> 在 Fas 介导的凋亡途径上起重要作用. RNA 干扰是由双链 RNA 始动的、序列特异性转录后基因沉默现象, 主要通过双链 RNA 被核酸酶切割成约 21-25 nt 大小的 RNA 双链复合物, 即 siRNA 介导识别并靶向切割同源性靶 mRNA 分子而实现<sup>[8]</sup>. 研究发现, 转染对应 FLIP<sub>L</sub> 的 siRNA 片段可特异性降低目的基因的

mRNA 水平, 而转染非同源的、对应 HTLV-1 Tax 的 siRNA-H 却几乎不产生任何干扰作用, 充分证实了 RNA 干扰的高度特异性. 此外, 对应某一基因可能设计出许多对 siRNA, 但并非所有的片段都能产生高效的沉默作用. 因此, 设计、选择最佳的 siRNA 片段已成为 RNA 干扰研究的关键点之一. 在目前的 RNA 干扰实验中, 常需设计 3-5 对不同的 siRNA 片段, 逐一实验以确定最有效的封闭位点. 在本实验中, 转染 100 nmol/L 的 siRNA-F1、siRNA-F2 48 h 后, 干扰效率分别为 50.39% 和 64.73%, 这提示对应这 2 个不同位点的 siRNA 片段均具有一定强度的基因沉默功能. Abedini *et al*<sup>[9]</sup> 将对应另外 4 个不同位点的 siRNA 片段转染入人类卵巢癌细胞株, 也达到了较好的封阻效果. 但这种封阻能力的相接近性是否与细胞类型、FLIP<sub>L</sub> 表达水平等因素有关, 还有待于进一步探讨.

siRNA 封阻 FLIP<sub>L</sub> mRNA 表达后, 以凋亡诱导型抗体激活细胞, 通过检测凋亡早期细胞膜表面磷脂酰丝氨酸的变化, 并结合 DNA 降解片段分析, 发现 RNA 干扰组的细胞对 Fas 介导的凋亡敏感性明显上升, 从反向基因功能研究的角度证实在大肠癌细胞中 FLIP 对 Fas 介导的凋亡受体通路起到了阻断作用. 目前, 对于这种阻抑作用的机制仍未得到清晰的阐释. 比较公认的观点是: FLIP 主要通过阻断凋亡途径中的关键因子—caspase-8 的剪切和活化, 起到抑制凋亡的作用. 进一步研究发现, caspase-8 的活化由连续的两步酶切水解作用完成: 第一步反应依靠分子内部的蛋白酶即可完成, 但需要来自另一分子的 caspase 样区域作为其补足集团, 该集团可以来自具有催化活性的 caspase-8, 也可以来自无催化活性的 FLIP<sub>L</sub>; 第二步反应则通过分子间的相互作用才能完成, 此时作为补足集团的 caspase 区域必须具有活性. 因而当 FLIP<sub>L</sub> 过表达时, 胞质中可检测到第一步酶切产物 caspase-8 的 p10 亚基和 FLIP<sub>L</sub> 的 p12 亚基, 而检测不到 caspase-8 的第二步酶切产物 p18 亚基, 无法形成完整的 caspase-8 活性形式, 从而阻断了后续的蛋白酶级联反应<sup>[10]</sup>.

本研究将特异性 siRNA 片段转染入肿瘤细胞, 为大肠癌细胞中存在 RNA 干扰现象提供了实验依据; 更重要的是, 封闭 FLIP 的表达后, 可显著提高大肠癌细胞对 Fas 介导的凋亡敏感性, 提示以 FLIP 为靶点的 RNA 干扰技术可望成为肿瘤基因治疗的新途径.

**致谢:**感谢 Harald Wajant 教授 (University of Stuttgart, Stuttgart, Germany) 和李佳副研究员 (国家新药筛选中心, 上海, 中国) 为本研究提供所需的特异性 siRNAs 片段.

### 4 参考文献

- 1 Bullani RR, Huard B, Viard-Leveugle I, Byers HR, Irmeler M,

- Saurat JH, Tschopp J, French LE. Selective expression of FLIP in malignant melanocytic skin lesions. *J Invest Dermatol* 2001; 117:360-364
- 2 Tepper CG, Seldin MF. Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma. *Blood* 1999;94:1727-1737
- 3 Sturzl M, Hohenadl C, Zietz C, Castanos-Velez E, Wunderlich A, Ascherl G, Biberfeld P, Monini P, Browning PJ, Ensoli B. Expression of K13/v-FLIP gene of human herpesvirus 8 and apoptosis in Kaposi's sarcoma spindle cells. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1725-1733
- 4 Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190-195
- 5 Siegmund D, Hadwiger P, Pfizenmaier K, Vornlocher HP, Wajant H. Selective inhibition of FLICE-like inhibitory protein expression with small interfering RNA oligonucleotides is sufficient to sensitize tumor cells for TRAIL-induced apoptosis. *Mol Med* 2002;8:725-732
- 6 Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Rosen A, Thompson C, Loeffler L, Parker T, Danning C, Rochon PJ, Gillespie J, Plotz P. The inhibition of apoptosis in myositis and in normal muscle cells. *J Immunol* 2000;164:5459-5465
- 7 Johnson DE, Gastman BR, Wieckowski E, Wang GQ, Amoscato A, Delach SM, Rabinowich H. Inhibitor of apoptosis protein hILP undergoes caspase-mediated cleavage during T lymphocyte apoptosis. *Cancer Res* 2000;60:1818-1823
- 8 Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-498
- 9 Abedini MR, Qiu Q, Yan X, Tsang BK. Possible role of FLICE-like inhibitory protein (FLIP) in chemoresistant ovarian cancer cells in vitro. *Oncogene* 2004;23:6997-7004
- 10 Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 2001;21:8247-8254

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、炎性肠病、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) 炎性肠病(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 — 新的流行病。

### 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。

# 高脂饮食性脂肪性肝炎大鼠肝脏线粒体损伤和ATP储备改变

丁晓东, 范建高, 徐正婕, 郑晓英, 田丽艳, 王国良

丁晓东, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科 上海市 200092  
范建高, 徐正婕, 郑晓英, 田丽艳, 王国良, 上海市第一人民医院消化内科  
上海市 200085

丁晓东, 男, 1977年生, 山东烟台人, 汉族. 2000年白求恩医科大学毕业,  
2003年复旦大学上海医学院内科学硕士毕业, 主要从事慢性肝病的研究.

通讯作者: 范建高, 200085, 上海市第一人民医院消化内科. fanjg@citiz.net  
电话: 021-63240090 传真: 021-63240825

收稿日期: 2004-11-18 接受日期: 2004-12-09

## Hepatocyte Mitochondrial Injury and the Change of Adenosine Triphosphate Storage in Rat Nonalcoholic Steatohepatitis

Xiao-Dong Ding, Jian-Gao Fan, Zeng-Jie Xu, Xiao-Ying Zeng,  
Li-Yan Tian, Guo-Lin Wang

Xiao-Dong Ding, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital,  
Shanghai 200092, China

Jian-Gao Fan, Zeng-Jie Xu, Xiao-Ying Zeng, Li-Yan Tian, Guo-Lin Wang,  
Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080, China

Correspondence to: Jian-Gao Fan, Department of Gastroenterology,  
Shanghai, First People's Hospital, Shanghai 200080,  
China. fanjg@citiz.net

Received: 2004-11-18 Accepted: 2004-12-09

### Abstract

**AIM:** To investigate the mitochondrial injury and change in adenosine triphosphate (ATP) storage in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) induced by fat-rich diet.

**METHODS:** Seventy-two male SD rats were randomly divided into two groups. The control group ( $n = 24$ ) was fed with normal diet; the model group ( $n = 48$ ) was fed with fat-rich diet, which is consisted of 10% lard oil + 2% cholesterol. 6 or 12 rats were sacrificed at the 8th, 12th, 16th and 24th wk of the experiment. Serum biochemical parameters were measured by a commercial laboratory. The hepatic histologic change was evaluated by light microscopy and transmission electron microscopy. The ATP content was measured by luciferin-luciferase method.

**RESULTS:** Simple fatty liver was observed in the model group at the 8th wk. From the 12th wk to 24th wk, the liver gradually progressed to steatohepatitis. The ATP content of the liver was reduced in the model group compared with normal group at the 16th wk  $[(2.97 \pm 0.48) \times 10^{-8} \mu\text{mol/g}$  vs  $(2.25 \pm 0.55) \times 10^{-8} \mu\text{mol/g}$ ,  $P = 0.0361$ ,  $t = 2.354$ ] and the 24th wk  $[(2.97 \pm 0.48) \times 10^{-8} \mu\text{mol/g}$  vs  $(1.99 \pm 0.66) \times 10^{-8} \mu\text{mol/g}$ ,

$P = 0.0053$ ,  $t = 3.439$ ]. Markedly abnormal morphology was observed in the hepatocyte mitochondria in model group, including swelling, rounding, loss of cristae, and stacks of intramitochondrial paracrystalline inclusion bodies.

**CONCLUSION:** The hepatocytic mitochondria in NASH were injured and the storage of ATP was reduced, which may contribute to the pathogenesis of NASH.

**Key Words:** Nonalcoholic steatohepatitis; Mitochondria; Adenosine triphosphate

Ding XD, Fan JG, Xu ZJ, Zeng XY, Tian LY, Wang GL. Hepatocyte Mitochondrial Injury and the Change of Adenosine Triphosphate Storage in Rat Nonalcoholic Steatohepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1524-1528

### 摘要

**目的:** 探讨高脂饮食大鼠脂肪性肝炎模型肝脏线粒体损伤和三磷酸腺苷(ATP)储备的改变.

**方法:** SD大鼠随机分为模型组( $n = 48$ )和对照组( $n = 24$ ), 分别给予高脂饲料和标准饲料喂养, 分批于实验8、12、16和24 wk处死. 常规检测血清生化和肝匀浆ATP含量, 光镜和电镜观察肝脏组织学改变.

**结果:** 与对照组相比, 模型组肝脏8 wk时肝脂肪变明显, 表现为单纯性脂肪肝, 12-24 wk进展为脂肪性肝炎; 模型组肝脏ATP含量呈减低趋势, 16-24 wk时较对照组减低约1/3( $P < 0.05$ ); 电镜下8 wk模型组大鼠肝细胞线粒体肿胀、增大, 部分内膜嵴粒脱落, 16 wk和24 wk大鼠线粒体内有类圆形结晶样物质沉积.

**结论:** 高脂饮食大鼠脂肪性肝炎模型的肝细胞存在线粒体损伤和ATP储备的减低.

**关键词:** 非酒精性脂肪性肝炎; 线粒体; 三磷酸腺苷

丁晓东, 范建高, 徐正婕, 郑晓英, 田丽艳, 王国良. 高脂饮食性脂肪性肝炎大鼠肝脏线粒体损伤和ATP储备改变. *世界华人消化杂志* 2005;13(13):1524-1528  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1524.asp>

### 0 引言

随着非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)发病率的增高<sup>[1-4]</sup>, 针对NASH的研究越来越多. 能量供应超过机体需要时, 大量转化



为脂肪蓄积在机体内, 当超过外周脂肪组织的蓄积能力后, 易脂解为游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)进入血液, 运输到肝脏, 经过 $\beta$ 氧化转化为三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)储备在肝细胞内. 线粒体在 $\beta$ 氧化中发挥核心作用, 如果线粒体损伤导致脂肪酸代谢障碍, FFA便酯化为三酰甘油(triglyceride, TG)蓄积在肝脏, 导致肝细胞内脂滴增多, 发生肝细胞脂肪变. 为此, 我们动态观察NASH形成过程中肝脏线粒体超微形态改变和ATP储备情况, 以明确他们在NASH发病中的作用.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 雄性SD大鼠72只, 购自中科院上海实验动物中心斯莱克公司, 体质量150(140–160)g. 胆固醇, 上海生化试剂商店. 猪油, 自备. 血清生化指标通过Bayer 1650全自动生化分析仪检测. 荧光素酶-荧光素、标准ATP粉剂和荧光素酶系缓冲液: 中科院上海植物生理研究所. 低温离心机: Sigma公司, TR-16R. 透射电子显微镜: 飞利浦透射电镜CM120. FG-100型发光光度计: 中科院上海植物生理研究所. SD大鼠正常喂养1 wk后, 随机分为2组. 对照组24只用普通饲料喂养, 模型组48只以20 g/kg胆固醇+100 g/kg猪油+880 g/kg标准大鼠用饲料构成的高脂饲料喂养. 实验开始后8、12、16和24 wk分别处死6只对照组和12只模型组大鼠. 所有大鼠处死前夜禁食, 以氯胺酮麻醉, 腹主动脉采血后取肝, 称量肝脏湿质量, 之后迅速从肝脏切取1块肝组织, 中性甲醛固定后制备石蜡切片, 同时一小块肝脏标本标记后液氮罐中冷冻保存, 并取2 mm<sup>3</sup>的肝脏组织一块戊二醛固定后行电镜检查.

**1.2 方法** 血清ALT、AST、TG和总胆固醇(TC), 采用全自动生化分析仪检测. 肝组织石蜡切片HE染色观察肝病理学变化, 根据肝小叶内含脂滴细胞数/总细胞数之比值, 对肝细胞脂肪变进行分级<sup>[5-6]</sup>. 肝脏炎症活动

度计分(hepatic histologic activity scores of inflammation, HAI)标准分为汇管区炎症(P)、小叶内炎症(L)、碎屑样坏死(PN)、桥接坏死(BN)4项, 计分公式为 $P+L+2(PN+BN)$ <sup>[7]</sup>. 肝脏经戊二醛固定后, 由LKB V型超薄切片机切片, 枸橼酸铅色片染色, 透射电镜观察肝细胞超微结构的改变, 尤其是线粒体的变化. ATP测定所有试剂均用重蒸蒸馏水配制, 溶液为: (1)腺苷酸提取液(Tris·HCl 20 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 2 mmol/L); (2)荧光素酶系缓冲液: 每只粉剂用50 mL重蒸水溶解, 内含50 mmol/L甘氨酸甘氨酸(pH=7.6)、10 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、1 mmol/L EDTA缓冲液. ATP的标准曲线: 将ATP配成 $1 \times 10^{-10}$ – $5 \times 10^{-5}$  mol/L的6管应用液进行测定, 以相对发光强度的log值与ATP浓度绘制标准曲线. 荧光素酶-荧光素法测定ATP: 取肝组织0.1–0.15 g, 加入1 mL腺苷酸提取液中, 匀浆后沸水中加热3 min, 然后以4 000 rcf/min离心3 min, 取上清液0.4 mL. 检测时将肝匀浆液0.1 mL加入重蒸蒸馏水0.1 mL稀释, 置入2 mL的比色杯中, 放入FG-200型发光光度计的暗室中, 从暗室盖的小孔中快速注入荧光素酶系缓冲液0.8 mL, 所记录之发光曲线的初始峰值即为检测样品光强, 测定温度为25℃, 测定电压为0.5 mV. 根据所得光强(测定曲线上所占的小格数)后, 在标准曲线上查出ATP值.

**统计学处理** 计量资料用mean±SD表示, 组间比较采用Student *t*检验,  $P<0.05$ 为差别有统计学意义,  $P<0.01$ , 为差别有显著性统计学意义, 所有统计采用SPSS11.01(Chicago, USA)软件完成.

## 2 结果

实验过程中2组大鼠体质量、肝质量和腹腔内脂肪含量均呈进行性增加. 从8 wk开始模型组大鼠体质量、肝指数(肝脏湿重/体质量)和腹腔内脂肪指数(腹腔内脂肪含量/体质量)均显著高于对照组( $P<0.05$ ), 24 wk升高最明显( $P<0.01$ , 表1). 与对照组相比,

表1 各组大鼠体质量、肝重、腹腔内脂肪含量改变

分组	<i>n</i>	体质量(g)	肝重(g)	脂肪质量(g)	肝指数	脂肪指数
正常组 8 wk	6	367 ± 34	11.0 ± 1.3	10.3 ± 1.2	0.030 ± 0.003	0.028 ± 0.002
高脂组 8 wk	12	403 ± 27 <sup>a</sup>	13.3 ± 1.5 <sup>b</sup>	12.0 ± 1.2 <sup>b</sup>	0.033 ± 0.003 <sup>a</sup>	0.030 ± 0.003
正常组 12 wk	6	403 ± 28	12.2 ± 1.0	12.1 ± 2.3	0.029 ± 0.001	0.030 ± 0.004
高脂组 12 wk	12	445 ± 43 <sup>a</sup>	16.6 ± 1.9 <sup>b</sup>	14.5 ± 2.0 <sup>a</sup>	0.037 ± 0.002 <sup>a</sup>	0.033 ± 0.002
正常组 16 wk	6	469 ± 40	14.8 ± 1.0	14.0 ± 1.8	0.031 ± 0.001	0.030 ± 0.002
高脂组 16 wk	12	531 ± 46 <sup>a</sup>	20.1 ± 1.5 <sup>a</sup>	17.4 ± 0.7 <sup>b</sup>	0.038 ± 0.006	0.033 ± 0.002 <sup>a</sup>
正常组 24 wk	6	508 ± 33	15.1 ± 1.3	14.8 ± 2.3	0.030 ± 0.002	0.029 ± 0.003
高脂组 24 wk	12	573 ± 45 <sup>a</sup>	23.8 ± 1.5 <sup>b</sup>	19.9 ± 2.1 <sup>b</sup>	0.042 ± 0.004 <sup>b</sup>	0.035 ± 0.005 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P<0.05$ , <sup>b</sup> $P<0.001$  vs 对照组.

表2 各组大鼠生化指标改变

分组	<i>n</i>	ALT(nkat/L)	AST(nkat/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)
正常组 8 wk	6	487 ± 25	2 000 ± 283	1.18 ± 0.18	0.60 ± 0.14
高脂组 8 wk	12	492 ± 32	2 050 ± 167	1.51 ± 0.10	0.66 ± 0.18
正常组 12 wk	6	728 ± 90	1 750 ± 200	1.02 ± 0.10	0.75 ± 0.17
高脂组 12 wk	12	864 ± 87	2 534 ± 267 <sup>b</sup>	1.83 ± 0.39 <sup>a</sup>	0.81 ± 0.12
正常组 16 wk	6	628 ± 43	2 134 ± 217	1.20 ± 0.38	0.74 ± 0.10
高脂组 16 wk	12	1 614 ± 150 <sup>a</sup>	2 951 ± 350 <sup>b</sup>	2.10 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.83 ± 0.13
正常组 24 wk	6	768 ± 157	2 000 ± 183	1.27 ± 0.61	0.71 ± 0.12
高脂组 24 wk	12	2 070 ± 193 <sup>b</sup>	2 700 ± 183 <sup>b</sup>	2.33 ± 0.21 <sup>b</sup>	1.10 ± 0.24 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组.

表3 各组大鼠肝脂肪变程度和 HAI 计分

分组	<i>n</i>	脂肪变程度				HAI	ATP(10 <sup>-8</sup> μmol/g)
		-	+	++	+++		
对照组	24	21	3	0	0	0	2.97 ± 0.48
高脂组 8 wk	12	0	2	5	5	0.67 ± 0.19 <sup>a</sup>	2.45 ± 1.05
高脂组 12 wk	12	0	0	4	8	3.82 ± 1.00 <sup>b</sup>	2.27 ± 0.73
高脂组 16 wk	12	0	0	0	12	7.36 ± 1.76 <sup>a</sup>	2.25 ± 0.55 <sup>a</sup>
高脂组 24 wk	12	0	0	0	12	4.83 ± 1.05 <sup>b</sup>	1.99 ± 0.66 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 对照组.

在第8-12 wk 部分模型组大鼠血清 ALT 水平明显升高, 16 wk 时模型组大鼠血清 ALT 均值显著增高(*P*<0.05), 24 wk 时增高更为明显(*P*<0.01); 血清 AST 水平在造模 12 wk 开始显著升高(*vs* 对照组 *P*<0.01), 至造模 16 wk 达高峰. 两组大鼠血清 TG 水平在造模 8-16 wk 时差异不明显, 但在 24 wk 时, 模型组与对照组相比明显升高(*P*<0.05). 血清 TC 水平自造模 8 wk 始呈增高趋势, 12 wk 时差别有统计学意义(*P*<0.05), 16-24 wk 时升高更为明显(*P*<0.01, 表 2).

**2.1 肝脏病理学改变** 光镜下, 肝组织 HE 染色显示造模 8 wk 大鼠肝脏即有弥漫性肝细胞脂肪变性, 以肝腺泡 III 区最为明显, 87.5%(10/12) 达脂肪肝诊断标准, 41.7%(5/12) 肝脏小叶内出现轻度炎症细胞浸润和散在的点状坏死. 造模 12 wk 大鼠呈中-重度脂肪肝, 且 HAI 积分显著高于造模 8 wk 大鼠(*P*<0.01, *t* = 3.2); 所有大鼠均可见到小叶内炎症, 炎症细胞以单个核细胞为主, 伴点状和/或小灶性坏死, 部分标本见数个炎症坏死灶融合成片, 汇管区亦可见到以单个核细胞为主的炎症细胞浸润. 16 wk 时, 大鼠肝脏内往往数个坏死灶融合成片, 1 例出现碎屑样坏死, 1 例出现桥接坏死, 汇管区炎症也较重. 造模 24 wk 大鼠仍呈中-重度脂肪肝, 肝脏炎症仍然较重(*vs* 12 wk 模

型组 *P*<0.01, *t* = 8.864, 表 3), 与 16 wk 高脂组相比, 其小叶内炎症略有减轻, 其中 1 例(1/12) 汇管区炎症加剧. 透射电镜下, 与正常肝细胞相比(图 1A) 模型组大鼠肝细胞内充满大量脂滴, 肝细胞核被胞质内积聚的大脂滴推挤, 从肝细胞中央区被推到细胞的周边(图 1D). 肝细胞线粒体结构异常, 表现为线粒体增大、肿胀、线粒体内嵴粒脱落、减少, 且随着造模时间延长, 线粒体损害加重, 部分线粒体内可以看到类圆形高密度结晶样物质沉积(图 1B). 模型组 24 wk 标本电镜下肝脏内发现胶原纤维沉积(图 1C).

**2.2 大鼠肝脏 ATP 含量改变** 对照组大鼠肝脏 ATP 含量为 (2.97 ± 0.48) × 10<sup>-8</sup> μmol/g, 模型组肝脏 ATP 含量随着造模时间延长呈逐渐下降趋势, 16 wk 模型组与对照组相比具有统计学意义(*P* = 0.036, *t* = 2.354), 24 wk 模型组 ATP 含量进一步下降, 与对照组比较 ATP 含量降低约 33%, 且差异具有明显的统计学意义(*P* = 0.005, *t* = 3.439). 相关分析显示, 对照组肝脏 ATP 含量与体质量之间呈负相关(*r* = -0.81, *P*<0.05), 模型组肝脏 ATP 含量与体质量的相关性不明显(*r* = 0.35, 0.1<*P*<0.2); 无论模型组还是对照组大鼠肝指数与肝脏 ATP 含量之间均没有明显的相关性.

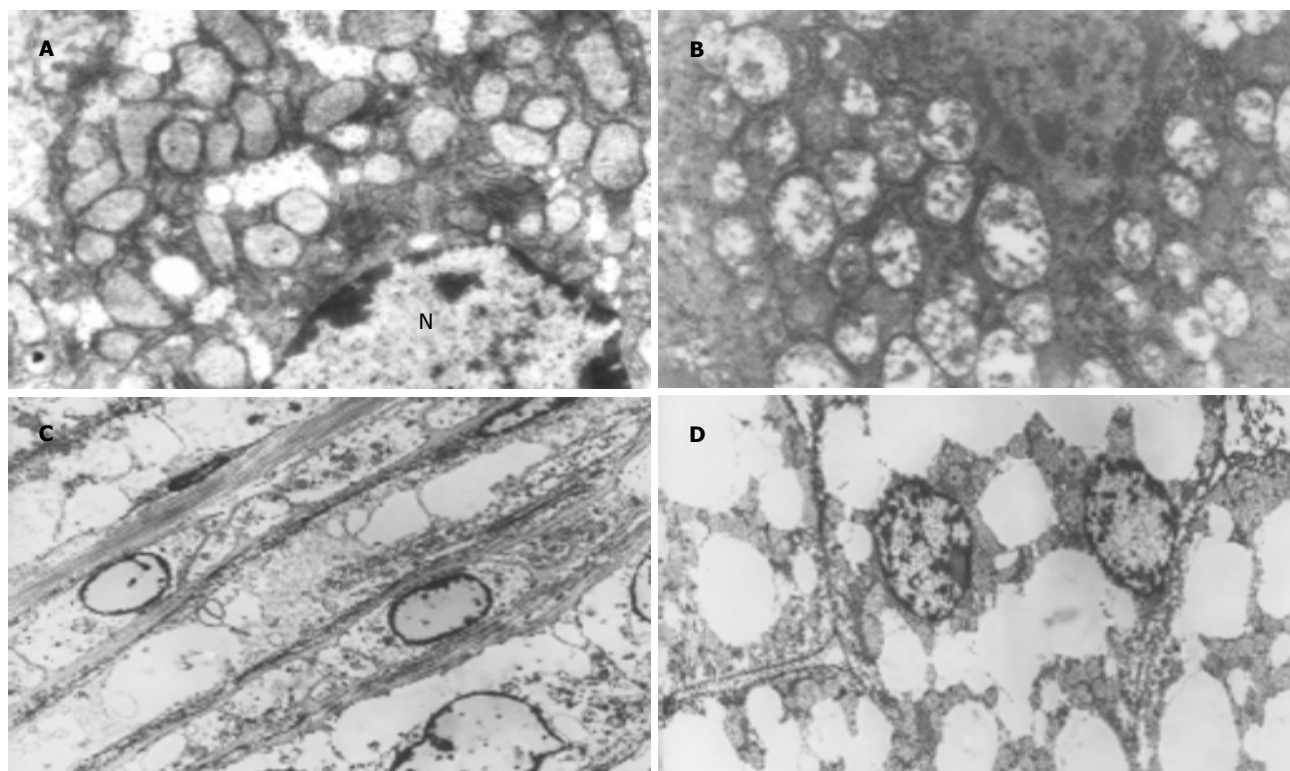


图1 肝细胞透射电镜扫描结果. A: 正常肝细胞, 细胞核位于细胞中央, 线粒体形态正常, 嵴粒位于内嵴上 ( $\times 16800$ ); B: 高脂组 16 wk 肝细胞, 线粒体结构异常, 可见线粒体增大、肿胀、线粒体内嵴粒脱落、减少, 部分线粒体内可以看到类圆形高密度结晶样物质沉积 ( $\times 9600$ ); C: 高脂组 24 wk 肝脏内发现胶原纤维沉积 ( $\times 5700$ ); D: 高脂组大鼠肝细胞内充满大量脂滴, 细胞核被胞质内积聚的大脂滴推挤到细胞的周边 ( $\times 5700$ ).

### 3 讨论

通过高脂饲料喂养雄性 SD 大鼠, 对肝脏病理变化进行了动态观察, 结果与我们以前造模情况基本吻合, 实验动物出现超质量、高胆固醇血症、中-重度脂肪肝伴以小叶内为主的炎症坏死, 从而通过高脂饲料成功建立了普通 SD 大鼠的 NASH 模型<sup>[8-10]</sup>. 肝脏是机体能量代谢和转换的中枢器官. 线粒体是体内中、长链脂肪酸  $\beta$  氧化的核心细胞器, 其在代谢脂肪酸的过程中产生大量 ATP, 为 ATP 合成的主要细胞器. ATP 含量决定了细胞对应激的反应能力, 如果其含量降低, 会导致细胞对应激的反应不足, 引起肝脏的严重损伤, 因此组织中 ATP 水平是反映组织细胞功能状态及其生命力的重要参数之一<sup>[11-12]</sup>. 为此我们动态观察了 NASH 大鼠模型肝细胞超微结构的改变, 尤其是线粒体形态的改变, 并测定了肝脏 ATP 的含量, 探讨二者在 NASH 发病中的可能作用. 电镜检查显示, NASH 模型组肝细胞中充满大量脂滴, 导致胞核移向细胞边缘, 伴肝细胞线粒体肿胀、变圆、体积增大, 细胞内膜嵴粒部分脱落. 随着造模时间的延长, 肝细胞线粒体损伤逐渐加重, 造模 16 wk 起部分线粒体内见类圆形高密度沉积物. 这与国外报道的 NASH 肝脏线粒体损伤的程度相近, 此时往往同时伴有线粒体 ATP 合成酶亚单位减少、线粒体产生 ROS 增多等<sup>[13-21]</sup>.

对肝脏 ATP 含量的测定结果表明, NASH 模型组

肝脏 ATP 储备降低 1/3 左右. 进一步的相关分析显示, 实验大鼠体质量与肝脏 ATP 含量具有一定的相关性, 这主要见于正常对照组肝脏, 而模型组则没有发现二者之间具有相关性. 这一结果与 Cortez-Pinto *et al*<sup>[22]</sup> 在 NASH 患者所得出的结果相似, 作者发现正常人群肝脏 ATP 储备与体质量指数 (body mass index, BMI) 关系密切, BMI 越大, 其肝脏 ATP 含量越低. 而发生 NASH 后的患者, 尽管肥胖, 但其肝脏中 ATP 储备与 BMI 的负相关性不明显, 这可能与 NASH 肝脏 ATP 储备本身就减少有关. 肝脏能量储备不足容易导致肝脏对再次打击的耐受力降低. Cortez-Pinto *et al*<sup>[22]</sup> 对肝活检证实的 8 例 NASH 患者用果糖静脉注射诱发短暂的中度肝脏 ATP 耗竭, 注射后 15 min 二者 ATP 含量均降到最低值, 60 min 时对照组 ATP 含量恢复到注射前水平; 而此时 NASH 组 ATP 含量没有恢复到注射前水平, 直到实验结束其与对照组恢复后的 ATP 含量相比仍有显著的统计学差异, 说明 NASH 患者肝脏遭受中等度果糖注射应激后, 其 ATP 储备恢复能力降低. 作者同时发现对照组 ATP 储备恢复程度与 BMI 呈负相关, 提示肥胖者肝细胞对应激反应能力不足. Vendemiale *et al*<sup>[23]</sup> 进行的实验发现脂肪肝大鼠肝细胞线粒体上  $F_0F_1$  ATP 合成酶的  $\beta$ - $F_1$  催化亚单位较对照组减少 30%, 其线粒体内 ATP 含量亦明显降低; 对两组禁食 18 h 后, 实验组的  $\beta$ - $F_1$  亚单位较禁食前

明显减少,而对照组无明显变化,说明ATP合成的 $\beta$ -F<sub>1</sub>亚单位减少与肝脏ATP储备降低具有一定的相关性. Caracini *et al*<sup>[24]</sup>用ob/ob大鼠诱导的脂肪肝模型进行缺血再灌注试验发现门静脉结扎15 min后,对照组肝细胞ATP含量降低30%,而ob/ob大鼠则高达60%,恢复灌注60 min后对照组ATP含量恢复到缺血前水平,而ob/ob大鼠则有2只死亡,存活的4只其ATP含量明显低于基线时的水平. 这些实验和我们的实验说明,脂肪变的肝脏的确存在ATP储备降低,使肝脏耐受二次打击(如手术、缺血灌注损伤、禁食和果糖应激等)的能力降低. 总之,我们的研究结果提示,高脂饮食NASH大鼠存在肝脏肝细胞线粒体结构的损伤和ATP储备的减低,并可能参与NASH的发生和发展.

#### 4 参考文献

- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002; 346:1221-1231
- James O, Day C. Non-alcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999;353:1634-1636
- Chitturi S, Farrell GC, George J. Non-alcoholic steatohepatitis in the Asia-Pacific region: future shock? *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:368-374
- Sanyal AJ; American Gastroenterological Association. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123:1705-1725
- 范建高, 曾民德. 非酒精性脂肪性肝病的分类及其诊断策略. *中华肝病杂志* 2003;11:127-128
- 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊断标准. *中华肝病杂志* 2003;11:71-72
- 中华肝病学学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识. *中华肝病杂志* 2002;10:327-328
- Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarendo A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004;79:502-509
- Fan JG, Zhong L, Xu ZJ, Tia LY, Ding XD, Li MS, Wang GL. Effects of low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. *World J Gastroenterol* 2003;9:2045-2049
- 徐正婕, 范建高, 王国良, 丁晓东, 田丽艳, 郑晓英. 高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型. *世界华人消化杂志* 2002; 10:392-394
- Johns DR. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Mitochondrial DNA and disease. *N Engl J Med* 1995; 333:638-644
- Fromenty B, Robin MA, Igoudjil A, Mansouri A, Pessayre D. The ins and outs of mitochondrial dysfunction in NASH. *Diabetes Metab* 2004;30:121-138
- Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Parks JK, Parder WD Jr. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999;31:430-434
- 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
- Pessayre D, Fromenty B, Mansouri A. Mitochondrial injury in steatohepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:1095-1105
- Le TH, Caldwell SH, Redick JA, Sheppard BL, Davis CA, Arseneau KO, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Al-Osaimi A, Peterson TC. The zonal distribution of megamitochondria with crystalline inclusions in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;39:1423-1429
- Perez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solis-Herruzo JA. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;38:999-1007
- Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004;114:147-152
- Baffy G, Zhang CY, Glickman JN, Lowell BB. Obesity-related fatty liver is unchanged in mice deficient for mitochondrial uncoupling protein 2. *Hepatology* 2002;35:753-761
- Sreekumar R, Rosado B, Rasmussen D, Charlton M. Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;38:244-251
- Pessayre D, Berson A, Fromenty B. Mitochondria in Steatohepatitis. *Semin Liver Dis* 2001;21:57-69
- Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko VP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA* 1999;282: 1659-1664
- Vendemiale G, Grattagliano I, Caolo C. Mitochondrial oxidative injury and energy metabolism alteration in rat fatty liver: effect of the nutritional status. *Hepatology* 2001;33:808-815
- Caracini P, Nardo B, Domenicali M, Turi P, Vici M, Simoncini M, De Maria N, Trevisani F, Van Thiel DH, Derenzini M, Cavallari A, Bernardi M. Ischemia-reperfusion injury in rat fatty liver: role of nutritional status. *Hepatology* 1999;29:1139-1146

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# HBV 慢性感染患者免疫耐受期肝组织内 T、B 淋巴细胞的变化

邢汉前, 辛绍杰, 赵景民, 陈黎明, 李保森, 游绍莉, 赵 军, 周光德, 潘 登

邢汉前, 辛绍杰, 赵景民, 陈黎明, 李保森, 游绍莉, 赵军, 周光德, 潘登, 中国人民解放军第 302 医院感染三科 北京市 100039

邢汉前, 男, 1970-12-24 生, 湖北省武穴人, 汉族, 1995 年中国人民解放军第四军医大学本科毕业, 2005 年军医进修学院医学硕士研究生毕业, 主治医师, 主要从事病毒性肝炎的临床研究。

通讯作者: 辛绍杰, 100039, 北京市丰台路 26 号, 中国人民解放军第 302 医院感染三科。xsj302@263.net

电话: 010-66933423

收稿日期: 2005-06-15 接受日期: 2005-06-20

## Change of intrahepatic T and B lymphocyte contents in immune tolerant phase of patients with chronic hepatitis B virus infection

Han-Qian Xing, Shao-Jie Xin, Jing-Min Zhao, Li-Ming Chen, Bao-Sen Li, Shao-Li You, Jun Zhao, Guang-De Zhou, Deng Pan

Han-Qian Xing, Shao-Jie Xin, Jing-Min Zhao, Li-Ming Chen, Bao-Sen Li, Shao-Li You, Jun Zhao, Guang-De Zhou, Deng Pan, the Third Department of Infectious Diseases, the 302 Hospital of Chinese PLA, 26 Fengtai Road, Beijing 100039, China

Correspondence to: Shao-Jie Xin, the Third Department of Infectious Diseases, the 302 Hospital of Chinese PLA, 26 Fengtai Road, Beijing 100039, China. xsj302@263.net

Received: 2005-06-15 Accepted: 2005-06-20

## Abstract

**AIM:** To investigate the characteristics of intrahepatic CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and B cells in immune tolerant phase of patients with chronic hepatitis B virus infection, and to explore the relationship between intrahepatic immune competent cells and the status of immune tolerance in chronic HBV infection.

**METHODS:** Sixteen liver biopsies were selected from patients with HBV infection in immune tolerant phase for the immunohistochemical detection of T lymphocyte subsets, B lymphocytes and expression of HBsAg and HbcAg. Six normal liver biopsies and 17 liver biopsies of patients in immuneactive phase were employed to serve as control respectively.

**RESULTS:** CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subsets in the liver biopsies of patients in immune tolerant phase were all significantly increased as compared with those in the normal control ( $t = 4.504, 8.272, 4.742$ , all  $P < 0.01$ ), but significantly decreased as compared with those in biopsies of patients in immuneactive phase ( $t = 7.079$ ,

$6.866, 6.316$ , all  $P < 0.01$ ). The ratio of CD4/CD8 in portal tract was lower in immune tolerant phase than in immuneactive phase ( $t = 3.46$ ,  $P < 0.01$ ), but it was not markedly different from that in the normal control. The number of intrahepatic B cells in immune phase was decreased statistically as compared with that in immuneactive phase ( $t = 4.76$ ,  $P < 0.01$ ), but were almost the same as that in normal control ( $P > 0.05$ ). The rate of HBcAg expression in hepatocytes of patients at immune tolerant phase was significantly higher than that of patients at immuneactive phase ( $t = 8.76$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** T and B lymphocytes may play important roles in the clearance of HBV as well as in liver inflammation and injury during chronic HBV infection. The fewer T and B lymphocyte infiltrations are associated with the status of immune tolerance.

**Key Words:** HBV infection; Immune tolerance; Immune competent cells; Immunohistochemistry

Xing HQ, Xin SJ, Zhao JM, Chen LM, Li BS, You SL, Zhao J, Zhou GD, Pan D. Change of intrahepatic T and B lymphocyte contents in immune tolerant phase of patients with chronic hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1529-1534

## 摘要

**目的:** 了解 HBV 慢性感染免疫耐受期患者肝内 T、B 淋巴细胞的变化特点, 探讨肝内免疫活性细胞与 HBV 慢性感染免疫耐受的关系。

**方法:** 采用免疫组织化学方法检测 16 例 HBV 感染免疫耐受期患者肝组织内 T、B 淋巴细胞在肝内分布情况, 及 HBsAg、HBcAg 在肝细胞内表达状况, 并与 6 例正常肝组织、17 例免疫活动期患者进行比较。

**结果:** 免疫耐受期患者肝内浸润的 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞数明显多于正常肝组织( $t = 4.504, 8.272, 4.742$ ,  $P$  均  $< 0.01$ ), 但明显少于免疫活动期患者( $t = 7.079, 6.866, 6.316$ ,  $P$  均  $< 0.01$ ); 免疫耐受期患者肝脏汇管区 CD4/CD8 比值小于免疫活动期患者( $t = 3.46$ ,  $P < 0.05$ ), 与正常肝组织比较无差异( $P > 0.05$ ); 免疫耐受期患者肝内 B 细胞数明显少于免疫活动期患者( $t = 4.76$ ,  $P < 0.01$ ), 但与正常组比较均无差异( $P > 0.05$ ); 免疫耐受期患者肝细胞内 HBcAg 阳性表达明显高于免疫活动期患者( $t = 8.76$ ,  $P < 0.01$ )。

**结论:** 肝组织内 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞在慢性乙型肝炎的肝组织炎症损伤及肝内 HBV 清除中起重要作用;免疫耐受期患者肝组织内 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞浸润量低,与免疫耐受有一定的关系。

**关键词:** HBV 感染;免疫耐受;免疫活性细胞;免疫组化

邢汉前, 辛绍杰, 赵景民, 陈黎明, 李保森, 游绍莉, 赵军, 周光德, 潘登. HBV 慢性感染患者免疫耐受期肝组织内 T、B 淋巴细胞的变化. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1529-1534

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1529.asp>

## 0 引言

我国 HBV 慢性感染者约有 30-50% 通过围产期感染,且大多数是通过母婴垂直传播感染的. 导致 HBV 慢性感染者体内 HBV 持续存在的原因可能有两方面:一是患者机体存在不同程度的免疫耐受,机体不能建立完整的免疫清除功能;二是肝细胞内的 HBV 共价闭合环状 DNA (cccDNA) 难以清除,现今的抗病毒药物尚不能有效地作用于 cccDNA<sup>[1-2]</sup>. 目前 HBV 慢性感染免疫耐受期患者肝组织内免疫细胞应答的研究甚少,而外周血淋巴细胞的免疫学特点不能完全反映肝组织内的免疫学特点. 一般认为 HBV 慢性感染者机体存在不同程度的 T、B 细胞免疫耐受. 我们采用免疫组织化学方法检测 16 例免疫耐受期患者肝组织内 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞分布状况,并与 6 例正常肝组织、17 例免疫活动期患者进行了比较.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 标本 HBV 慢性感染患者肝穿刺标本 49 例,其中免疫耐受期 16 例(I 组)、免疫活动期 17 例(II 组),6 例正常肝组织做对照(0 组),标本来源于北京大学第一人民医院肝移植中心肝移植时的供肝.

1.1.2 免疫组化用主要试剂 肝组织免疫组化采用即用型二步法,二步法试剂 PV-9000 购自北京中山金桥生物公司分装的美国 Zymed 公司产品,鼠抗人-CD3、鼠抗人-CD20、鼠抗人-CD8 单克隆抗体、EDTA 抗原修复液及 DAB 显色剂为购自北京中山金桥生物公司分装的美国 Zymed 公司产品,鼠抗人-CD4 单克隆抗体为购自福建福州迈新生物技术开发公司分装的美国 Zymed 公司产品,用 PBS 代替一抗作阴性对照.

### 1.2 方法

1.2.1 HBV 慢性感染不同时期的诊断标准<sup>[2-3]</sup> 免疫耐受期(I 组):所有患者病史中均无肝功能异常病史,且无保肝、降酶、免疫调节剂及抗病毒药物应用史,外周血 HBsAg、HBeAg 和 HBcAb 均阳性,HBV DNA>1.0 × 10<sup>8</sup>copies/L,肝组织无或仅轻微损伤.

免疫活动期(II 组):全部病例均有肝功能持续异常半年以上,外周血 HBsAg、HBeAg/HBeAb、HBcAb 阳性,HBV DNA>1.0 × 10<sup>8</sup>copies/L,肝组织炎症明显.

1.2.2 实验室检查 采用全自动生化分析仪器常规检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),应用酶联免疫(ELISA)法及 PCR 法检测乙肝病毒抗原抗体五项及 HBV-DNA 定量.

1.2.3 肝组织病理学检查 肝穿刺活检组织用 40 g/L 甲醛固定,石蜡包埋,连续 4 μm 切片,用苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察,按 2000 年西安修订的《病毒性肝炎防治方案》标准进行炎症分级(G0-4)<sup>[4]</sup>.

1.2.4 免疫组化方法 操作流程均参照文献[5]:采用 PV-9000 即用型二步法,严格按照 PV-9000 说明书进行,用脾组织切片做阳性对照,用 PBS 替代第一抗体做阴性对照. 免疫组化步骤如下:(1)常规脱蜡;(2)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的甲醇混合液去除内源酶;(3)热修复:鼠抗人 CD3、CD20、CD8 实验用切片均采用柠檬酸钠抗原修复液(0.01 mol/L, pH6.0)进行热修复,鼠抗人 CD4 实验用切片采用 EDTA 抗原修复液(0.01 mol/L, pH8.0)进行热修复;(4)滴加鼠抗人 CD3(工作液)、CD4(1:250)、CD8(1:40)抗体、CD20(1:100)抗体,4℃过夜;(5)滴加二抗:兔抗鼠 PV-9000 法,加试剂 1,37℃ 20 min, PBS 洗 5 次,每次 3 min,再加试剂 2,37℃ 20 min, PBS 洗 5 次,每次 3 min;(6)DAB 显色,显微镜下控制显色,阳性信号为棕黄色;(7)流水充分冲洗,苏木素衬染约 2 min,盐酸酒精分化 15 s,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片.

1.2.5 肝内 HBsAg、HBcAg 免疫组织化学检测采用改良 S-P 免疫组化法,鼠抗人-HBs 单抗(1:100)、兔抗人-HBc 多克隆抗体(1:50)及免疫组化 PV-9000 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司进口分装,按说明书严格操作,取已知血清 HBsAg、HBeAg、HBcAb 均阳性,且肝细胞 HBsAg、HBcAg 表达阳性患者肝组织做阳性对照,用 PBS 代替第一抗体做阴性对照. DAB 显色,中性树胶封片,阳性染色为棕黄色.

1.2.6 免疫组化结果半定量计数 视肝组织标本大小分别在肝小叶和汇管区随机选取 5-8 个视野,CD3、CD4、CD8、CD20 均在 10 × 20 倍显微镜下计数阳性细胞数,取其平均数表示每个患者肝组织内阳性细胞数.

**统计学处理** 数据资料以 mean ± SD 表示,应用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析及 t 检验.

## 2 结果

2.1 HBV 感染免疫耐受期患者肝内 CD3<sup>+</sup>细胞浸润状况 正常肝组织肝小叶及汇管区见散在分布个别 CD3<sup>+</sup>细胞(图 1A);免疫耐受期患者汇管区及肝小叶内 CD3<sup>+</sup>细胞轻度增多(图 1B);免疫活动期患者肝组织可见 CD3<sup>+</sup>阳

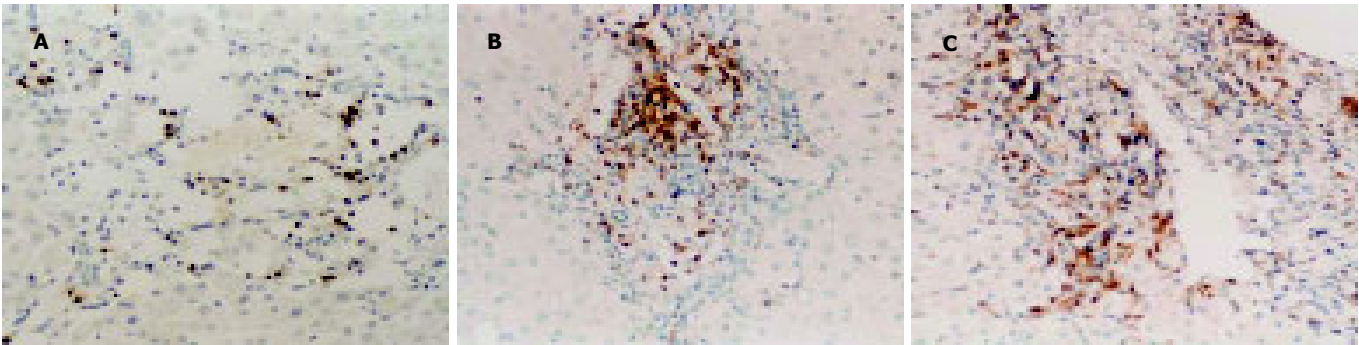


图1 肝组织内 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞(免疫组化染色 × 200). A: 正常; B: 免疫耐受期; C: 免疫活动期.

表1 各组患者肝小叶及汇管区内 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞计数

分组	<i>n</i>	小叶 CD3	汇管区 CD3	小叶 CD4	汇管区 CD4
正常组(0)	6	34.7 ± 4.6	24.1 ± 5.9	2.86 ± 0.92	2.78 ± 1.02
免疫耐受组(Ⅱ)	16	53.7 ± 16.6 <sup>b</sup>	23.7 ± 6.1 <sup>d</sup>	8.56 ± 1.43 <sup>f</sup>	7.83 ± 2.14 <sup>h</sup>
免疫活动组(Ⅲ)	17	151.3 ± 62.1	85.8 ± 45.2	17.42 ± 4.3	31.9 ± 19.7

$F=28.83$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 0 组, Ⅱ组;  $F=26.73$ , <sup>d</sup> $P<0.01$  vs Ⅱ组;  $F=72.15$ , <sup>f</sup> $P<0.01$  vs 0 组, Ⅱ组;  $F=21.98$ , <sup>h</sup> $P<0.01$  vs 0 组, Ⅱ组.

性细胞明显聚集, 肝小叶及汇管区内 CD3<sup>+</sup> 阳性细胞明显增多, 尤以界面炎、炎性坏死灶及窦周炎等部位增多明显, 偶见淋巴滤泡样结构形成(图 1C).

免疫耐受期患者肝小叶及汇管区内 CD3<sup>+</sup> 细胞明显少于免疫活动期患者 ( $P<0.01$ ), 肝小叶内 CD3<sup>+</sup> 细胞均明显多于正常肝组织 ( $P<0.01$ ) (表 1).

2.2 HBV 感染免疫耐受期患者肝内 CD4<sup>+</sup> 细胞浸润状况  
正常肝组织肝小叶及汇管区内见零星分布 CD4<sup>+</sup> 细胞(图 2A); 免疫耐受组期患者肝小叶内及汇管区少数散在分布 CD4<sup>+</sup> 细胞, 在汇管区内 CD4<sup>+</sup> 细胞略多(图 2B); 免疫活动期患者肝汇管区 CD4<sup>+</sup> 细胞明显增多, 肝小叶内增多不明显, 但在界面炎、炎性坏死灶及窦周炎等部位增多明显(图 2C).

免疫耐受期患者肝内 CD4<sup>+</sup> 主要分布在汇管区, 肝小叶内仅零星分布几个, 均稍多于正常肝组织 ( $P<0.05$ ), 但明显少于免疫活动期患者 ( $P<0.01$ ) (表 1).

2.3 HBV 感染免疫耐受期患者肝内 CD8<sup>+</sup> 细胞浸润状况  
正常肝组织汇管区及小叶内见少量散在分布 CD8<sup>+</sup> 细胞

(图 3A). 免疫耐受期患者肝内 CD8<sup>+</sup> 细胞主要分布在肝小叶, 汇管区稍多(图 3B). 免疫活动期患者肝小叶内及汇管区内 CD8 阳性细胞明显增多, 尤以界面炎、炎性坏死灶及窦周炎等肝小叶内增多明显(图 3C).

免疫耐受期患者肝小叶内及汇管区 CD8<sup>+</sup> 细胞明显少于免疫活动期患者 ( $P<0.01$ ), 但明显多于正常肝组织 ( $P<0.01$ ) (表 2).

表2 各组患者肝小叶及汇管区内 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞

分组	<i>n</i>	小叶 CD8	汇管区 CD8	肝组织内 CD20
正常组(0)	6	18.63 ± 1.93	11.16 ± 1.78	7.46 ± 1.53
免疫耐受组(Ⅱ)	16	26.57 ± 2.89 <sup>b</sup>	13.24 ± 4.25 <sup>d</sup>	10.34 ± 5.13 <sup>f</sup>
免疫活动组(Ⅲ)	17	94.47 ± 44.23	46.96 ± 29.42	22.78 ± 9.53

$F=24.76$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 0 组, Ⅱ组;  $F=15.24$ , <sup>d</sup> $P<0.01$  vs Ⅱ组;  $F=24.13$ , <sup>f</sup> $P<0.01$  vs Ⅱ组.

2.4 HBV 感免疫耐受期患者肝小叶内 CD4/CD8 比值

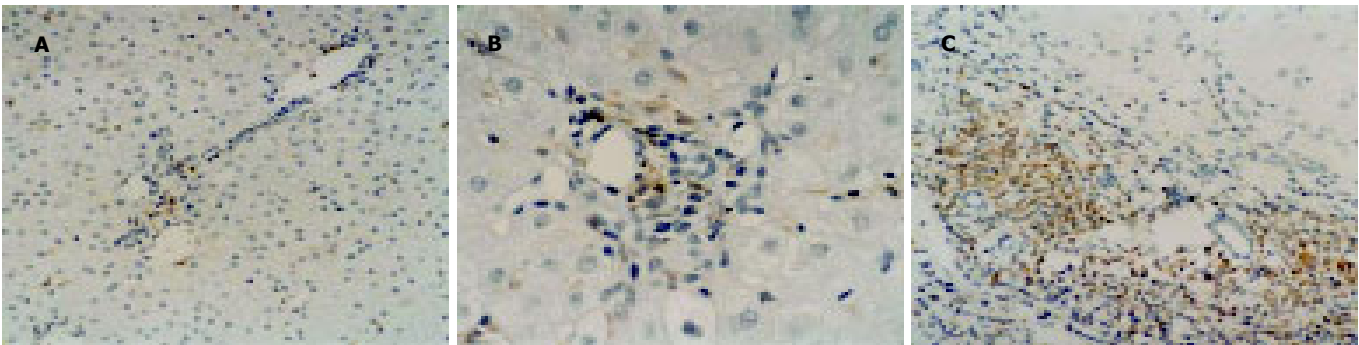


图2 肝组织内 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞(免疫组化染色). A: 正常(× 200); B: 免疫耐受期(× 400); C: 免疫活动期(× 200).

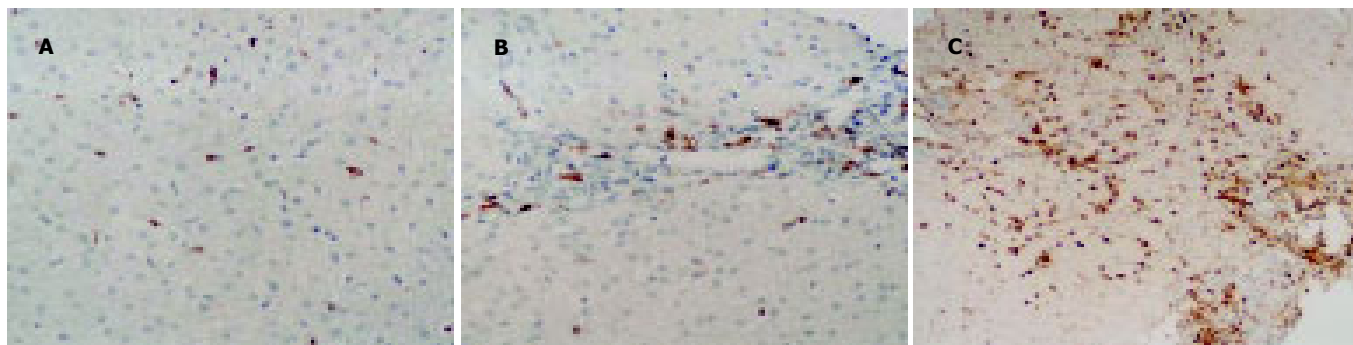


图3 肝组织内CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞(免疫组化染色. A: 正常( $\times 200$ ); B: 免疫耐受期( $\times 200$ ); C: 免疫活动期( $\times 100$ ).

免疫耐受组患者肝小叶内CD4/CD8比值与免疫活动期及正常肝组织比较均无显著性差异( $P>0.05$ ) (表3). 2.5 HBV感染免疫耐受期患者肝汇管区内CD4/CD8比值免疫耐受期患者肝汇管区内CD4/CD8比值明显低于免疫活动期患者, 有显著性差异( $P<0.01$ ), 与正常肝组织比较无显著性差异( $P>0.05$ ) (表3).

表3 各组患者肝小叶及汇管区内CD4/CD8比值

分组	<i>n</i>	肝小叶CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T	汇管区CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> T
正常组(0)	6	0.153 $\pm$ 0.038	0.231 $\pm$ 0.089
免疫耐受组(II)	16	0.247 $\pm$ 0.061 <sup>a</sup>	0.383 $\pm$ 0.167 <sup>b</sup>
免疫活动组(III)	17	0.208 $\pm$ 0.064	0.886 $\pm$ 0.573

$F = 2.858$ , <sup>a</sup> $P>0.05$  vs 0组, II组;  $F = 6.53$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs 0组, II组.

2.6 HBV感染免疫耐受期患者肝内CD20<sup>+</sup>细胞浸润状况 正常肝组织汇管区及肝小叶内零星分布CD20<sup>+</sup>细胞(图4A). 免疫耐受期患者肝小叶及汇管区内少数分布CD20<sup>+</sup>细胞(图4B); 免疫活动期患者肝小叶及汇管区内CD20<sup>+</sup>细胞明显增多, 可见CD20<sup>+</sup>细胞聚集, 尤以界面炎、炎性坏死灶及窦周炎等部位增多明显(图4C).

免疫耐受组患者肝组织内CD20<sup>+</sup>细胞明显少于免疫活动期( $P<0.01$ ), 与正常肝组织比较无显著性差异( $P>0.05$ ) (表2).

2.7 肝组织内HBsAg、HBcAg免疫组化半定量表达状况(表4) 免疫耐受期、免疫活动期者肝细胞内HBsAg

阳性表达均无显著性差异( $P>0.05$ ); 免疫耐受组患者肝细胞内HBcAg阳性表达明显高于免疫活动期者, 有非常显著性差异( $P<0.01$ ).

表4 各组患者肝细胞内HBsAg、HBcAg表达状况比较

分组	<i>n</i>	HBsAg	HBcAg
免疫耐受组(II)	16	13.17 $\pm$ 11.02 <sup>a</sup>	59.96 $\pm$ 39.52 <sup>b</sup>
免疫活动组(III)	17	8.05 $\pm$ 7.67	12.97 $\pm$ 17.15

$F = 2.36$ , <sup>a</sup> $P>0.05$  vs II组;  $F = 14.49$ , <sup>b</sup> $P<0.01$  vs II组.

### 3 讨论

3.1 HBV慢性感染免疫耐受期患者肝组织内T淋巴细胞的免疫特点 目前国内有关HBV慢性感染患者外周血淋巴细胞亚群及树突状细胞方面研究较多, 也是研究热点. 但HBV慢性感染免疫耐受期患者外周血及肝组织CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD4/CD8比值、B淋巴细胞、NK细胞、Kupffer细胞方面研究甚少, 免疫耐受期患者肝内免疫细胞与免疫活动期患者及正常肝组织间比较研究尚未见报道.

我们研究发现HBV慢性感染者肝内CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞主要浸润于肝小叶, 在小叶内炎性坏死灶及窦周炎部位增多明显, 而CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞主要浸润在汇管区, 与国内外报道的慢性乙肝的CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞肝内浸润状况基本一致<sup>[6-7]</sup>. 免疫耐受期患者肝小叶内CD3<sup>+</sup>T淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>T淋巴细胞、



图4 肝组织内CD20<sup>+</sup>细胞(免疫组化染色 $\times 200$ ). A: 正常; B: 免疫耐受期; C: 免疫活动期.



CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞及汇管区 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞数均明显高于正常肝组织 ( $P < 0.01$ ), 而外周血及肝细胞内 HBV 高复制, 肝组织无炎症或轻微炎症损伤, 提示免疫耐受期患者肝内浸润的 T 淋巴细胞数量虽增多, 但不足以产生有效的免疫应答以清除 HBV 病毒, 可能与 T 淋巴细胞浸润的数量还不够多有关, 或与免疫耐受期患者肝组织内 Th1/Th2 细胞比例失调有关. 由 HBcAg 诱导的免疫应答侧重于 Th1 细胞, 而 HBeAg 是非颗粒性分泌抗原, 分泌性 HBeAg 诱导的免疫应答侧重于 Th2<sup>[8]</sup> 细胞, 免疫耐受期患者外周血中有大量 HBeAg 抗原, 而 HBeAg 抗原作为耐受原, 优先清除外周血对 HBcAg 特异的 Th1 细胞, 从而阻碍了 Th1 细胞对细胞免疫应答的辅佐作用, 而使免疫应答转为 Th2 亚类<sup>[9]</sup>, Th2 细胞占优势时倾向于发生持续性的 HBV 感染<sup>[10]</sup>, 因此免疫耐受期患者肝组织内 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞增多可能是以 Th2 类为主.

免疫耐受期患者肝内 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞数虽明显多于正常对照组, 但肝组织无明显损伤, HBV 未被清除, 提示 CD8<sup>+</sup> CTL 细胞杀伤感染肝细胞的细胞毒作用未发挥, 其原因可能是: (1) 免疫耐受期患者体内 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞抑制 CD8<sup>+</sup>CTL 细胞的功能. Franzese *et al*<sup>[11]</sup> 研究发现 HBV 慢性感染者外周血 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞在体外抑制 HBV- 特异的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞增殖反应及其功能, 因此 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 调节性 T 淋巴细胞在 HBV 慢性感染耐受期患者肝内的分布及功能特点有待进一步研究; (2) 免疫耐受期患者肝组织内浸润的 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞数量还是不足够多, 其分泌极低水平的抗病毒细胞因子  $\gamma$  干扰素、TNF- $\alpha$  不足以清除 HBV 病毒; (3) 免疫耐受期患者肝内 HBcAg 高表达, 血清 HBeAg 含量高, HBcAg、HBeAg 可能诱导 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞免疫耐受, 不攻击 HBV 感染的肝细胞. 免疫耐受期患者肝内 CD3<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞与非活动 HBV 携带状态者比较无显著性差异 ( $P > 0.05$ ).

由于 T 淋巴细胞中 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞在抗原刺激下可分化为特异性 T 辅助细胞 (Th), 促进特异性 CTL 和抗体产生, 并对维持 CTL 活性、产生持续性特异性细胞免疫起重要作用. HBV 特异性 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞在 HBV 特异性 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞的产生、维持, 启动树突状细胞 (dendritic cell) 激活 CD8<sup>+</sup> 效应 T 淋巴细胞起重要作用<sup>[12-13]</sup>. 王敏 *et al* 报道外周血 CD4/CD8 比值在慢性乙型肝炎轻中度、重度及肝硬化患者间比较均无显著性差异<sup>[14]</sup>. 徐志强 *et al*<sup>[15]</sup> 报道 HBV 慢性感染者肝脏炎症明显组与不明显组比较外周血 CD4/CD8 比值显著升高. 本研究显示: HBV 慢性感染免疫耐受期患者肝组织汇管区 CD4/CD8 比值明显低于免疫活动期患者, 有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 这与免疫活动增强时肝内 CD4<sup>+</sup>T

淋巴细胞、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞均明显增多, 且汇管区 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞增多比 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞更明显, 推测二者可能在 HBV 清除及肝细胞病理损伤中存在协同作用.

3.2 HBV 慢性感染免疫耐受期患者肝组织内 B 淋巴细胞的免疫特点 CD20 是 B 细胞的表面标记物, 在肝组织 CD20 主要表达于肝内成熟 B 细胞及活化 B 细胞, 具有提呈抗原及体液免疫调节功能. 王敏 *et al*<sup>[14]</sup> 报道慢性乙型肝炎轻中度和重度患者外周血 B 淋巴细胞百分比明显低于肝硬化患者. 刘源 *et al*<sup>[16]</sup> 报道 CHB 患者外周血 B 淋巴细胞百分比与正常对照组比较无显著性差异, 目前肝组织内 B 淋巴细胞浸润状况国内尚无报道. 我们实验结果显示: 免疫耐受期患者肝内 B 淋巴细胞明显少于免疫活动期患者 ( $P < 0.01$ ), 免疫耐受期患者肝内 B 淋巴细胞与正常对照者比较无显著性差异, 说明免疫耐受期患者肝内 B 淋巴细胞浸润太少, 未产生免疫应答, 相反免疫活动明显时, 肝内 B 淋巴细胞浸润明显增多, 在 HBV 清除过程中起一定作用.

3.3 HBV 慢性感染免疫耐受期患者肝内 HBsAg、HBcAg 表达特点 HBV 慢性感染患者, 肝组织内 HBcAg 是靶抗原, 而 HBsAg 不一定是靶抗原, 因此 HBcAg 是评价 HBV 复制程度较可靠指标. 本研究结果显示: 免疫耐受期、免疫活动期及非活动 HBV 携带状态患者肝细胞内 HBsAg 表达量均无显著性差异 ( $P > 0.05$ ), 而免疫耐受期患者肝细胞内 HBcAg 表达量明显高于免疫活动期患者, 有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 免疫耐受期患者血清及肝细胞内均有高水平 HBV 复制, 肝组织无炎症损伤或仅有轻微炎症损伤, 原因可能是机体对 HBV 病毒抗原呈免疫耐受状态, 不杀伤 HBV 感染的肝细胞所致.

HBV 慢性感染患者免疫耐受期肝组织内 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞明显少于免疫活动期患者, 说明上述免疫活性细胞参与了慢性乙型肝炎的炎症损伤; 与免疫活动期相比, 免疫耐受期患者肝细胞内 HBcAg 表达率高, 然而肝组织内 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞及 B 淋巴细胞浸润量低, 提示肝组织内 T、B 淋巴细胞在肝内 HBV 清除中起重要作用; 免疫耐受期患者肝组织内免疫活性细胞浸润量低, 与免疫耐受有一定的关系.

**致谢:** 解放军 302 医院病理科孙艳玲、周光德、潘登、赵雨来老师在实验指导及论文撰写方面提供了大量的帮助, 在此表示衷心的感谢.

#### 4 参考文献

- 1 Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Seminars Liver Dis* 2003;23:47-58
- 2 McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Seminars Liver Dis* 2004;24:17-21

- 3 Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001; 120:1828-1853
- 4 中华医学会传染病与寄生虫病学会. 肝病学会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝病杂志 2000;8:324-329
- 5 纪小龙, 施作森. 诊断免疫组织化学. 北京: 军事医学科学出版社. 1997:14-20
- 6 曲春枫, 吕世军, 玄恩余, 苗乃法, 梁秀珍, 李左连. HDV 感染后在肝细胞损伤中的作用探讨. 临床肝胆病杂志 1999;15:113-115
- 7 Mosnier JF, Pham BN, Walker F, Dubois S, Degos F, Erlinger S, Degott C. Relationship between composition of lymphoid cell infiltrates in the liver and replication status in chronic hepatitis B: an immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol* 1996;106:625-633
- 8 Burk RD, Hwang LY, Ho GY, Shafritz DA, Beasley RP. Outcome of perinatal hepatitis B virus exposure is dependent on maternal virus load. *J Infect Dis* 1994;170:1418-1423
- 9 Level D, Block S. Mechanisms of immune escape in viral hepatitis. *Review Gut* 1999;44:759-764
- 10 Lok ASF, Lai CL, Wu PC. Spontaneous hepatitis B virus e antigen to antibody seroconversion and reversion in Chinese patients with chronic hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 1987;92:1839-1843
- 11 Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ. Modulation of the CD8+ T cell response by CD4+CD25+regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005;79:3322-3328
- 12 Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 1998;393:474-478
- 13 Sigal LJ, Crotty S, Andino R, Rock KL. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature* 1999;398:77
- 14 王敏, 王福生, 刘敬超. 慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群与病程相关性的研究. 中华肝病杂志 2003;8:18-20
- 15 徐志强, 张鸿飞, 杨晓晋, 杨斌, 王福生. 小儿慢性乙型肝炎外周血 T 淋巴细胞亚群和临床病理关系的研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2004;18:142-144
- 16 刘源, 韩亚萍, 李军, 黄祖瑚. 慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群的测定分析. 南通医学院学报 2004;24:140-141

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 •

## 汤钊猷院士当选美国外科学会名誉会员

本刊6月27日讯 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年获中国香港外科学院名誉院士和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.

# 应用抑制性消减杂交技术筛选三氧化二砷对肝细胞调节的差异表达基因

吴顺华, 成军, 郑玉建, 张跃新, 刘妍, 郭江, 张黎颖, 王国荃

吴顺华, 成军, 刘妍, 郭江, 张黎颖, 北京地坛医院传染病研究所  
北京市 100011  
吴顺华, 郑玉建, 张跃新, 王国荃, 新疆医科大学公共卫生学院环境与  
基因研究室 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054  
吴顺华, 男, 1974-09-12 生, 宁夏固原市人, 汉族, 2004 年新疆维吾尔自治  
区医科大学博士, 副教授, 主要从事环境与基因、病毒性肝炎的发病机理研究。  
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”科技攻关面上项目, No. 01MB135  
通讯作者: 成军, 100011, 北京东城区安外大街地坛公园 13 号, 北京市地  
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: 2004-09-07 接受日期: 2005-05-25

## Screening and identification of target genes differentially expressed in HepG2 cells treated with arsenic trioxide by suppression subtractive hybridization technique

Shun-Hua Wu, Jun Cheng, Yu-Jian Zheng, Yue-Xin Zhang,  
Yan Liu, Jiang Guo, Li-Ying Zhang, Guo-Quan Wang

Shun-Hua Wu, Jun Cheng, Yan Liu, Jiang Guo, Li-Ying Zhang, Institute  
of Infectious Diseases, Beijing DiTan Hospital, Beijing 100011, China  
Shun-Hua Wu, Yu-Jian Zheng, Yue-Xin Zhang, Guo-Quan Wang, Insti-  
tute of Enviromental and Gene, Public Health College, Xinjiang Medical  
University, Xinjiang Urumqi 830054, China  
Supported by National Science Foundation of China, No.C03011402,  
No.C30070689; Returned Scholar Fundation of General Logistics De-  
partment of Chinese PLA, No. 98H038; the Science and Technique  
Foundation of Chinese PLA during the 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> Five-Year Period, No.  
98D063, No.01MB135; and the Science and Technique Foundation of  
Chinese PLA for Young Scholars during the 10<sup>th</sup> Five-Year Plan Period,  
No. 01Q138  
Correspondence to: Dr. Jun Cheng, Institute of Infectious Diseases,  
Beijing Ditan Hospital, Dongcheng District, 13 Anwai Avenue, Beijing  
100011, China. cj@genetherapy.com.cn  
Received: 2004-09-07 Accepted: 2005-05-25

## Abstract

**AIM:** To clone and identify human genes differentially ex-  
pressed in human hepatocarcinoma HepG2 cells treated  
with arsenic trioxide by constructing a subtractive cDNA  
library with suppression subtractive hybridization (SSH)  
technique, and to elucidate the molecular mechanism of  
arsenic trioxide in the regulation of liver cells.

**METHODS:** The mRNA was isolated from HepG2 cells  
treated with arsenic trioxide and PBS, respectively, and

then cDNA was synthesized. After digestion of restriction  
enzyme *Rsa*I, small sizes cDNA were obtained. Then the  
tester cDNA was subdivided into two portions and each  
was ligated with a different cDNA adaptor. After the tester  
cDNA was hybridized with driver cDNA (twice) and under-  
went nested polymerase chain reaction (PCR) (twice), the  
DNA fragment was subcloned into T/A plasmid vectors to  
establish the subtractive cDNA library. Amplification of the  
library was performed in *E. coli* strain JM109. The ampli-  
fied cDNA was sequenced and analyzed in GenBank with  
BLAST search after colony PCR.

**RESULTS:** The subtractive cDNA library of genes differ-  
entially expressed in HepG2 cells treated with arsenic  
trioxide was constructed successfully. The amplified li-  
brary contained 109 positive clones. Colony PCR showed  
that these clones all contained 200-1 000 bp inserts. Thirty-  
six clones were analyzed by sequencing and bioinformatics.  
The results showed there were 15 coding sequences with  
known function and 6 novel ones with unknown function.

**CONCLUSION:** A subtractive cDNA library of genes differ-  
entially expressed in HepG2 cells treated with arsenic tri-  
oxide was constructed successfully using SSH technique.

**Key Words:** Human hepatocarcinoma; Arsenic trioxide;  
Suppression subtractive hybridization; Polymerase chain  
reaction; Clone

Wu SH, Cheng J, Zheng YJ, Zhang YX, Liu Y, Guo J, Zhang LY,  
Wang GQ. Screening and identification of target genes differentially  
expressed in HepG2 cells treated with arsenic trioxide by suppres-  
sion subtractive hybridization technique. *Shijie Huaren Xiaohua*  
*Zazhi* 2005;13(13):1535-1539

## 摘要

**目的:** 应用抑制性消减杂交(suppression subtractive  
hybridization, SSH)技术构建 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理的人肝癌细胞  
系 HepG2 差异表达基因的 cDNA 消减文库, 筛选并克  
隆 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 调节相关基因, 阐明 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对肝细胞调节作  
用的分子生物学机制。

**方法:** 以 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理 HepG2 细胞, 同时以 PBS 处理的  
相同细胞系作为对照;24 h 后制备细胞裂解液, 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多聚酶链反应(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 JM109 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:** 成功构建三 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理 HepG2 细胞差异表达基因的 cDNA 消减文库。文库扩增后得到 109 个白色克隆, 进行菌落 PCR 分析, 均得到 200–1 000 bp 插入片段。挑取含有插入片段的 36 个克隆进行测序, 并通过生物信息学分析获得 15 种已知基因序列和 6 个未知功能的新基因。

**结论:** 应用 SSH 技术成功构建了 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理 HepG2 细胞差异表达基因的 cDNA 消减文库。

**关键词:** 肝癌; As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 抑制性消减杂交; 多聚酶链反应; 克隆

吴顺华, 成军, 郑玉建, 张跃新, 刘妍, 郭江, 张黎颖, 王国荃. 应用抑制性消减杂交技术筛选三氧化二砷对肝细胞调节的差异表达基因. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1535–1539  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1535.asp>

## 0 引言

三氧化二砷(arsenic trioxide, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)用于维甲酸治疗失败的急性早幼粒细胞性白血病, 取得了满意的临床效果, 完全缓解率达到90%以上。近年来的研究发现 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在体外对人的肝癌细胞株有抑制增殖、诱导凋亡的作用<sup>[1]</sup>。但 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 同时作为国际癌症研究机构(IARC) 1980年确定一种致癌物, 其确切的致癌机制尚未阐明。因此正确认识 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的这种治/致癌的双向调节作用就显得尤为重要。抑制性消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)可以快速有效地检测到差异表达的基因<sup>[2]</sup>。我们应用 SSH 技术, 构建 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用于人肝癌细胞 HepG2 后差异表达基因的 cDNA 消减文库, 筛选并克隆 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对肝细胞调节作用的差异表达基因, 并应用生物信息学(bioinformatics)技术初步获得其基因序列。为深入了解 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在肝癌治疗中的作用机制提供新的理论依据。

## 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 (本室保存), mRNA Purification 试剂盒(Amersham Pharmacia Biotech), PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒(Clontech), 50 × 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-T 载体(Promega)。DNA 序列测定由上海博亚公司完成。配制 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶液以 PBS 溶液作参比。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 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 及 PBS 加入细胞培养液中, 使 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 终浓度达到 5 μmol/L, 24 h 后收获细胞。使用 mRNA Purification 试剂盒, 直接提取 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 及 PBS 处理的 HepG2 细胞 mRNA, 经琼脂糖凝胶电泳及分光光度计分别进行定性、定量分析。

**1.2 方法** 消减杂交文库的建立采用 PCR-Select cDNA Subtraction Kit, 常规 SSH 方法按说明书进行: 以 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 及 PBS 处理的 HepG2 细胞 mRNA 为模板逆转录合成双链 cDNA(dscDNA), 并分别标记为 Tester 和 Driver, dscDNA 经 *RsaI* (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 dscDNA 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 dscDNA 进行杂交; 合并两种杂交产物后再与 Driver dscDNA 作第 2 次杂交; 然后将杂交产物做选择性 PCR 扩增, 使 Tester dscDNA 中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。将扩增产物与 pGEM-T 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-T 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。应用生物信息学将测得序列与 GenBank 数据库进行 Blast 同源性分析。

## 2 结果

紫外分光检测显示, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 及 PBS 处理的 HepG2 细胞 mRNA 分别为 4.6 μg 和 5.5 μg,  $A_{260}/A_{280} = 2.199$ 。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。将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的 2 组 dscDNA 分别用不同的特异性引物(看家基因甘油三磷酸脱氢酶 G3PDH 引物)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 2 组 dscDNA 扩增产物浓度相当, 说明 dscDNA 已与接头高效率连接。分别以消减及未消减 PCR 产物为模板, 用 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 μL 进行电泳鉴定。结果显示, 与未消减组 PCR 产物相比, 消减组 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)。杂交产物经 2 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 36 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)。随机挑选 36 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较。应用生物信息学技术分析发现, 36 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源(98–100%), 编码 15 种已知蛋白, 6 种新的未知蛋白(表 1)。

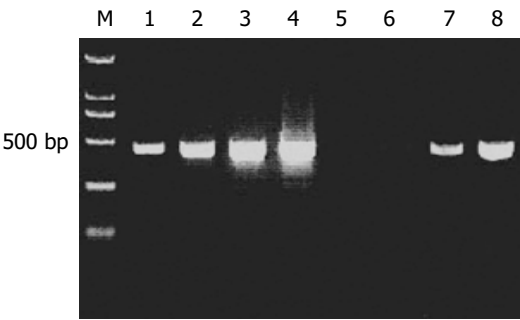


图1 消减效率分析结果. 引物为G3PDH3'和G3PDH5', 1-4为未消减组; 5-8为消减组. 均为18, 23, 28, 33个PCR循环次数.

表1 阳性克隆与 GenBank 同源序列比较结果

同源蛋白基因名称	相同克隆数	同源性
腺苷环化酶相关蛋白(CAP)	2	97%
小核糖体核蛋白(SNRPB)	2	100%
蛋白酶体亚单位 a2(PSMA2)	3	100%
蛋白酶体亚单位 a5(PSMA5)	1	100%
胶原结合蛋白	1	99%
转移粘连蛋白(AEG1)	1	99%
碳酸氢钠协同转运子(SLC4A7)	1	99%
CCAAT- 结合蛋白类似物(CCAAT-B)	1	97%
包被蛋白(COPA)	1	99%
半乳糖苷转移酶相关蛋白激酶(p58/GTA)	1	97%
铁蛋白重链多肽(FHP)	4	98%
铁蛋白轻链多肽(FLP)	4	100%
热休克蛋白 47(HSP47)	1	100%
热休克蛋白 89 a(HSP89 a)	1	99%
热休克蛋白 90a(HSP90a)	2	99%
推定蛋白 KIAA0172	1	99%
推定蛋白 MGC9084	1	98%
FLJ14185	1	100%
FLJ90301	1	97%
FLJ23322	1	100%
有丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)	1	100%
睾丸增强基因转录子(BAX inhibitor 1),	1	100%
人类染色体克隆	3	100%

3 讨论

三氧化二砷(arsenic trioxide, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)俗称砒霜, 是细胞凋亡诱导物, 其注射液已获得我国 SDA 和美国 FDA 批准上市. 肝细胞肝癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)是最常见的原发性肝癌, 同时也是一个常见的世界范围内的肿瘤 [3-6], 其恶性程度高预后差 [7-10]. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在与肝癌细胞的研究表明, 他是较好的抗肿瘤药物之一. 但 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 同时作为一种致癌物, 可以引起包括皮肤异常改变和肺癌、膀胱癌、肝癌等其他内脏肿瘤的发生. 因此研究 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对肝细胞作用的机制在有效防治肝细胞癌方面有很重要的意义. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在体外引

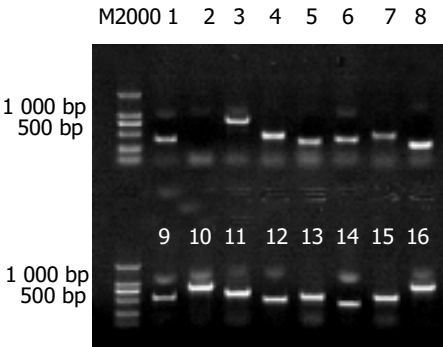


图2 部分阳性克隆(1-16)菌落 PCR 电泳鉴定.

起细胞代谢异常, 发生细胞凋亡, 下调抑凋亡基因 Bcl-2, 增加促凋亡基因 Bax 的表达以及改变二者之间的比例, 促使 Fas 基因的表达增强, 促进其凋亡 [11-13]. 随着 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 广泛应用于抑制包括肝癌的其他实体肿瘤, 其抑癌作用机制的研究也更加深入. 抑制性消减杂交方法是近年发展起来的一项新的基因克隆技术, 与传统的方法比较, 具有实验周期短、易操作、可靠性高、假阳性率低等特点, 能有效地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 [14]. 我们将 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 刺激肝母细胞瘤细胞系 HepG2, 并以 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶剂 PBS 刺激的相同细胞系作为对照, 以 2 种细胞系中提取的 mRNA 为起始材料, 应用 SSH 方法成功地构建了 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 激活相关基因差异表达的 cDNA 消减文库, 随机挑选 36 个克隆测序分析, 有 27 个克隆与已知功能的基因高度同源 (98-100%), 共编码 15 种基因. 6 个克隆为新的基因序列, 3 个染色体基因序列.

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可上调肝细胞许多功能蛋白的表达. 吴顺华 *et al* [15] 应用低剂量 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对肝 HepG2 细胞基因表达谱调节的基因芯片研究发现, 5 μmol/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 诱导肝 HepG2 细胞差异表达基因 137 条, 其中 53 条基因表达上调. 包括人胰岛素生长因子 2 受体 (IGF2R), 人有丝分裂原激活蛋白 2 激酶 6 (MAP2K6) 等. Tchounwou *et al* [16] 发现 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 上调谷胱甘肽转移酶, 金属硫蛋白 II, 热休克蛋白 HSP70, C-Fos, DNA 损伤组织蛋白 153, 45 (GADD153, 45), 葡萄糖调节蛋白 78 启动子 (GRP78), 以及异源物质反应元件 (XRE)、肿瘤抑制蛋白反应元件 (p53RE), 环磷酸昔反应元件 (CRE), 维甲酸反应元件 (RARE) 的表达. 我们发现 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 上调的 15 种已知功能蛋白可分为 7 类: (1) 细胞凋亡相关蛋白: (BAX inhibitor 1), Bax inhibitor-1 (BI-1) 是一种新的抗凋亡蛋白, 位于 12q12-q13, CDS 全长 711bp, 编码 237 aa, 信号肽区域 1-46, 6 个跨膜区 30-47, 51-73, 85-107, 112-134, 141-163, 早期研究命名为睾丸增强基因转录子 (TEGT), 受 Bcl-2 和 Bax 的调控. 现在证实 BI-1 可与 Bcl-2 和 Bcl-XL 相互作用, 而不是与 Bax 和 Bad, 当 BI-1 在恶性细胞中过度表达时, 可

以抑制由Bax和化疗药物诱导的细胞凋亡,而不是通过Fas(CD95)作用的<sup>[17]</sup>。(2)离子通道和运输蛋白:包被蛋白(COPA),碳酸氢钠协同转运子(SLC4A7),这是两种在物质转运和能量传递中起重要作用的蛋白.转移粘连蛋白(AEG1)是肿瘤转移的标志物之一。(3)细胞外基质:胶原结合蛋白,核糖体蛋白为细胞内结构的蛋白.腺苷酸环化酶相关蛋白(CAP)为广泛存在,高度保守,具有双重功能的蛋白质,其氨基末端是细胞响应上游的Ras调节信号系统,结合腺苷酸环化酶;而羧基末端结合球形肌动蛋白,改变微丝系统动态的重组,是保持正常细胞形态和生长所需要的<sup>[18]</sup>。Yu *et al*<sup>[19]</sup>证实As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>显著地抑制肝母细胞瘤HepG2细胞,改变了核基质蛋白的组成减少了HSC70的表达启动了级联反应以及多核功能最终导致细胞存活。(4)维持细胞稳定,促进损伤细胞再生、修复的基因:铁蛋白重(轻)链多肽:铁蛋白是体内主要储存铁的蛋白质,与体内铁的代谢密切相关.有研究发现肝脏中其水平的升高为抵抗氧化应激损伤的机制之一<sup>[20]</sup>, Gebel *et al*<sup>[21]</sup>发现低水平的砷介导的细胞毒性可以通过细胞耐受提高砷诱导的DNA损伤.近来还有研究认为铁蛋白重链基因有抗凋亡作用,可以使肝脏免受缺血性损伤<sup>[22]</sup>,因此间接的反映As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>可以改变细胞内铁负荷的平衡影响铁代谢。(5)分子伴侣蛋白:HSP47, HSP89, HSP90. HSP47作为细胞内质网的一种分子伴侣,参与内质网前胶原分子的折叠,组装和转运,促进胶原的合成并维持内质网非折叠分子稳定性,有助于从内质网到高尔基体的分子正确组装和转运<sup>[23]</sup>. HSP47在富含胶原的实体瘤中特异的表达增高,可作为肿瘤早期转移的标志物之一. HSP89是HSP90家族的新成员, HSP90是细胞内最活跃分子伴侣蛋白之一,许多信号转导蛋白的正常功能发挥都依赖于他. Lee *et al*<sup>[24]</sup>应用Strategic shotgun proteomics技术筛选肝HepG2蛋白表达谱与Hep3B相比发现16种蛋白包括热休克蛋白HSP90和异种核糖核蛋白(hnRNP A2/B1)存在显著的统计学意义,实验证明这些蛋白的差异表达与端粒酶的长度有关系。(6)信号转导通路蛋白:有丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是一类广泛存在于真核细胞中的Ser/Thr蛋白激酶,是Ras途径中的下游信号分子,具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性,可激活C-Fos、C-Jun等转录调节因子,形成AP-1作用于核内,激活特定的基因从而传递信号. MAPK的激活需要其分子中特定的Tyr残基和Ser残基同时被磷酸化. MAPK信号通路具有调节细胞分裂和凋亡的作用. 当细胞经As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理,则MAPK信号传导,同时应激胱冬肽酶-3(caspase-3)和信号调节激酶(ERK)和相关的C-Jun氨基末端激酶(JNK)、应激激

化蛋白激酶(SAPK),但p38MAP未被激活,抑制HepG2细胞iNOS的表达,结果表明被As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>诱导的信号转到通路激酶活性的改变可能不是细胞凋亡的主要因素<sup>[25]</sup>. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>诱导凋亡可能与MAPK信号通路有关. 最近的发现表明,慢性砷暴露导致的免疫毒性与砷直接作用于JAK酪氨酸激酶,从而强烈的抑制了STAT3酪氨酸磷酸化作用有关,而不影响其丝氨酸的磷酸化. 砷完全阻断了STAT活性依赖的细胞因子信号抑制子(SOCS)的表达,激活了MAPK的活性<sup>[26]</sup>。(7)蛋白酶体:PSMA2, PSMA5,一般真核细胞主要有两种蛋白降解途径:一种是溶酶体途径,主要降解经胞吞进入细胞中的胞外蛋白质;另一种是非溶酶体途径,他主要经细胞颗粒中的蛋白酶体(proteasome)降解泛素化的胞内蛋白质. 泛素-蛋白酶体(ubiquitin-proteasome)途径不仅是一种破坏陈旧或损伤蛋白质的重要机制之一,而且还是调节多种细胞生物学过程如细胞周期、基因转录调节、抗原递呈、免疫逃逸和耐药的关键机制<sup>[27]</sup>。20 S蛋白酶体主要用于底物识别,参与底物降解. 其活性调节因子主要有两种:19 S调节复合体和11 S(20S-PA28)调节复合体. 20 S蛋白酶体结合19 S调节复合体后参与泛素化蛋白的降解,20 S-PA28主要参与抗原递呈. 26 S蛋白酶体复合物由20 S核心颗粒和19 S帽结构组成,主要使蛋白在胞质中裂解为短肽片段. 20 S蛋白酶体有28个亚单位构成,PSMA2和PSMA5均是20 S蛋白酶体亚单位,负责蛋白酶体的激活,抑制,调节,可能在肿瘤的转移和侵袭过程中发挥作用<sup>[28]</sup>. 我们的结果暗示As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>可激活泛素-蛋白酶体调节通路。

总之,我们应用SSH技术成功构建了As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理HepG2细胞差异表达基因的cDNA消减文库. 发现应用As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>刺激细胞后,有7类15种蛋白参与了细胞生长、代谢、维持细胞稳定及促进损伤细胞再生、修复以及抑制肿瘤的生长和转移的基因表达增高,这些基因影响了细胞凋亡、信号转导和蛋白降解等系统. 提示As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>在抑制肝癌细胞中作用机制是多基因多通路共同作用的结果。

#### 4 参考文献

- 1 Siu KP, Chan JY, Fung KP. Effect of arsenic trioxide on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells: inhibition of proliferation and induction of apoptosis. *Life Sci* 2002;71:275-285
- 2 Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 1999;303:349-380
- 3 Anzola M. Hepatocellular carcinoma: role of hepatitis B and hepatitis C viruses proteins in hepatocarcinogenesis. *J Viral Hepat* 2004;11:383-393
- 4 Szabo E, Paska C, Kaposi Novak P, Schaff Z, Kiss A. Similarities and differences in hepatitis B and C virus induced hepatocarcinogenesis. *Pathol Oncol Res* 2004;10:5-11

- 5 Lee JH, Ku JL, Park YJ, Lee KU, Kim WH, Park JG. Establishment and characterization of four human hepatocellular carcinoma cell lines containing hepatitis B virus DNA. *World J Gastroenterol* 1999;5:289-295
- 6 Worman HJ, Lin F, Mamiya N, Mustacchia PJ. Molecular biology and the diagnosis and treatment of liver diseases. *World J Gastroenterol* 1998;4:185-191
- 7 He XX, Wang JL. The current status and prospect in the gene therapy of liver cancer. *Huaren Xiaohua Zazhi* 1998;6:158-159
- 8 Yang LJ, Wang WL. Preparation of monoclonal antibody against apoptosis-associated antigens of hepatoma cells by subtractive immunization. *World J Gastroenterol* 2002;8:808-814
- 9 Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2002;8:464-468
- 10 Zhang G, Long M, Wu ZZ, Yu WQ. Mechanical properties of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:243-246
- 11 Siu KP, Chan JY, Fung KP. Effect of arsenic trioxide on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells: inhibition of proliferation and induction of apoptosis. *Life Sci* 2002;71:275-285
- 12 Kito M, Akao Y, Ohishi N. Arsenic trioxide-induced apoptosis and its enhancement by buthionine sulfoximine in hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:861-867
- 13 Liu JW, Tang Y, Shen Y, Zhong XY. Synergistic effect of cell differential agent-II and arsenic trioxide on induction of cell cycle arrest and apoptosis in hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:65-68
- 14 成军. 功能基因组学与肝脏疾病研究. *世界华人消化杂志* 2004;12:1-5
- 15 吴顺华, 郑玉建, 成军, 刘妍, 张跃新, 刘开泰, 钟彦伟, 吴煜. 低剂量三氧化二砷对 HepG2 细胞基因表达谱调节的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13:100-104
- 16 Tchounwou PB, Wilson BA, Ishaque AB. Atrazine potentiation of arsenic trioxide-induced cytotoxicity and gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). *Mol Cell Biochem* 2001;222:49-59
- 17 Xu Q, Reed JC. Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol Cell* 1998;1:337-346
- 18 Ksiazek D, Brandstetter H, Israel L, Bourenkov GP, Katchalova G, Janssen KP, Bartunik HD, Noegel AA, Schleicher M, Holak TA. Structure of the n-terminal domain of the adenylyl cyclase-associated protein (cap) from dictyostelium discoideum. *Structure (Camb)* 2003;11:1171-1178
- 19 Yu D, Wang ZH, Cheng SB. The effect of arsenic trioxide on the expression of Hsc and HNF4 in nuclear matrix proteins in HepG2 cells. *Anticancer Res* 2001;21:2553-2559
- 20 Erario MA, Gonzales S, Noriega GO, Tomaro ML. Bilirubin and ferritin as protectors against hemin-induced oxidative stress in rat liver. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2002;48:877-884
- 21 Gebel TW. Unanswered questions in arsenic toxicology. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2001;20:299-309
- 22 Berberat PO, Katori M, Kaczmarek E, Anselmo D, Lassman C, Ke B, Shen X, Busuttill RW, Yamashita K, Csizmadia E, Tyagi S, Otterbein LE, Brouard S, Tobiasch E, Bach FH, Kupiec-Weglinski JW, Soares MP. Heavy chain ferritin acts as an antiapoptotic gene that protects livers from ischemia reperfusion injury. *FASEB J* 2003;17:1724-1726
- 23 Tasab M, Batten MR, Bileid NJ. Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen. *EMBO J* 2000;19:2204-2211
- 24 Lee CL, Hsiao HH, Lin CW, Wu SP, Huang SY, Wu CY, Wang AH, Khoo KH. Shotgun proteomics approach for efficient construction of an expression map of targeted protein families in hepatoma cell lines. *Proteomics* 2003;3:2472-2486
- 25 Kang SH, Song JH, Kang HK, Kang JH, Kim SJ, Kang HW, Lee YK, Park DB. Arsenic trioxide-induced apoptosis is independent of stress-responsive signaling pathways but sensitive to inhibition of inducible nitric oxide synthase in HepG2 cells. *Exp Mol Med* 2003;35:83-90
- 26 Cheng HY, Li P, David M, Smithgall TE, Feng L, Lieberman MW. Arsenic inhibition of the JAK-STAT pathway. *Oncogene* 2004;23:3603-3612
- 27 Zavrski I, Jakob C, Schmid P, Krebbel H, Kaiser M, Fleissner C, Rosche M, Possinger K, Sezer O. Proteasome: an emerging target for cancer therapy. *Anticancer Drugs* 2005;16:475-481
- 28 Han YG, Liu HL, Zheng HJ, Li SG, Bi RC. Purification and refolding of human alpha5-subunit (PSMA5) of the 20S proteasome, expressed as inclusion bodies in Escherichia coli. *Protein Expr Purif* 2004;35:360-365

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 消息 •

## 第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.

# 炭疽芽孢在巨噬细胞 RAW264.7 内的萌发过程

李 霆, 王恒樑, 史兆兴, 冯尔玲, 刘润艳, 黄留玉

李霆, 王恒樑, 史兆兴, 冯尔玲, 刘润艳, 黄留玉, 军事医学科学院生物工程研究所 北京市 100071

李霆, 1977-04-18 生, 江苏省南京市人, 汉族. 军事医学科学院生物工程研究所 2002 级博士研究生, 从事病原微生物功能基因组研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30470100

通讯作者: 王恒樑, 100071, 北京市丰台大路 20 号, 军事医学科学院生物工程研究所. wanghl@nic.bmi.ac.cn

电话: 010-66948836 传真: 010-63833521

收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-05-25

## Germination process of *Bacillus anthracis* endospores within macrophage RAW264.7

Ting Li, Heng-Liang Wang, Zhao-Xing Shi, Er-Ling Feng, Run-Yan Liu, Liu-Yu Huang

Ting Li, Heng-Liang Wang, Zhao-Xing Shi, Er-Ling Feng, Run-Yan Liu, Liu-Yu Huang, State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Bioengineering, Beijing 100071, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30470100

Correspondence to: Dr. Heng-Liang Wang, Beijing Institute of Bioengineering, State key laboratory of pathogen and biosecurity, 20 Dongda Street, Beijing 100071, China. wanghl@nic.bmi.ac.cn

Received: 2005-05-08 Accepted: 2005-05-25

## Abstract

**AIM:** To confirm the germination process of *Bacillus anthracis* A16R endospores within murine macrophage RAW264.7

**METHODS:** Macrophage RAW264.7 cells were infected by *Bacillus anthracis* A16R (pXO2) spores at a multiplicity of infection (MOI) of 20:1. Then the cells were harvested at different time points (1, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 and 8 h after infection). The growth of infected cells was observed under light microscope by fuchsin basic methylene blue staining.

**RESULTS:** The endospores began to germinate and develop into vegetative bodies 2 to 2.5 hours after infection. The vegetative bodies entered the phase of binary fission 3.5 to 4 hours after infection. At 5 to 5.5 hours, the bacillus proliferated into exponential phase and the macrophages began to lyse 7 to 8 hours after infected.

**CONCLUSION:** For the first time, fuchsin basic methylene blue staining is used to study the germination process of *Bacillus anthracis* endospores within macrophage RAW264.7.

**Key Words:** *Bacillus anthracis*; Germination; Fuchsin basic methylene blue staining; Macrophage

Li T, Wang HL, Shi ZX, Feng EL, Liu RY, Huang LY. Germination process of *Bacillus anthracis* endospores within macrophage RAW264.7. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1540-1543

## 摘要

**目的:** 确定炭疽杆菌 A16R 芽孢在巨噬细胞系 RAW264.7 内萌发的过程.

**方法:** 用炭疽杆菌 A16R 芽孢以 MOI 20:1 感染 RAW264.7, 分别于吞噬后 1、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8 h 取细胞爬片进行复红美蓝染色, 显微镜观察.

**结果:** 吞噬后 2-2.5 h, 细胞内的芽孢开始萌发并形成繁殖体;吞噬后 3.5-4 h, 繁殖体开始二分裂;吞噬后 5-5.5 h, 繁殖体进入指数增长阶段;吞噬后 7-8 h, 大量的繁殖体充斥于细胞内、外, 细胞开始崩解.

**结论:** 首次采用复红美蓝染色确定了 A16R 炭疽芽孢在巨噬细胞 RAW264.7 内的萌发过程.

**关键词:** 炭疽芽孢杆菌; 巨噬细胞; 萌发; 复红美蓝染色

李霆, 王恒樑, 史兆兴, 冯尔玲, 刘润艳, 黄留玉. 炭疽芽孢在巨噬细胞 RAW264.7 内的萌发过程. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1540-1543  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1540.asp>

## 0 引言

炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 系统性感染是致命性的. 炭疽芽孢首先被感染部位的巨噬细胞吞噬并由其携带至附近的淋巴结, 随后芽孢在巨噬细胞内存活、萌发进而形成繁殖体, 后者很快从巨噬细胞内释放并扩散进入淋巴系统、血液循环系统, 在那里迅速地繁殖并释放大量毒素 (致死毒素 (LT) 和水肿毒素 (ET)) 从而引发菌血症、脓毒血症和休克, 最终导致宿主死亡<sup>[1]</sup>. 巨噬细胞不仅是机体内最早和炭疽芽孢作用 (噬菌作用) 的细胞, 还能够诱导宿主产生针对病原菌侵袭的防御反应, 并在炭疽感染过程中介导细胞毒作用<sup>[2-5]</sup>. 为了研究宿主细胞在芽孢萌发过程中不同时段的全局性反应, 准确界定炭疽芽孢在萌发过程中结构、功能改变的时间点 (段) 就成为了全面研究宿



主反应机制的必要前提. 我们采用复红美蓝染色简便而有效地确定了 A16R 芽孢在巨噬细胞内急性感染时萌发形成繁殖体的过程, 为今后从基因表达谱和比较蛋白质组等多种角度开展炭疽芽孢感染的宿主反应机制研究奠定了基础.

## 1 材料和方法

1.1 材料 亚甲基蓝、碱性品红、石碳酸等试剂均购自北京化学试剂公司; 小牛血清购自 Hyclone 公司; DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 细胞培养板购自 Costar 公司; HF safe 900/C + 型生物安全柜为上海力新实业有限公司产品; 3K12 离心机为 Sigma 公司产品; E600 生物显微镜为 Nikon 公司产品; 成像系统为 Spot 公司产品. 小鼠腹腔巨噬细胞系 RAW264.7 购自协和医科大学基础医学细胞中心, 炭疽芽孢杆菌 A16R (pX02<sup>-</sup>) 为本室保存. 芽孢的制备、纯化和计数参照文献<sup>[6]</sup>挑取芽孢杆菌 A16R 单菌落接种于 LB 液体培养基, 37℃, 200 r/min 培养 4 d 后, 经复红美蓝染色、镜检, 当芽孢数达 80% 以上开始收集. 4℃ 10 000 g 离心 10 min, 弃上清, 用灭菌纯水重悬沉淀后 65℃ 水浴 30 min 杀灭残余的繁殖体, 灭菌纯水重复离心洗涤 10 次, 去除繁殖体碎片. 取少量芽孢溶液进行平板稀释计数以确定活芽孢浓度, 并将芽孢浓度固定在 10<sup>11</sup>/L 左右, 4℃ 保存. 以上操作均在生物安全柜内进行.

1.2 方法 细胞培养和芽孢吞噬试验参照文献<sup>[7]</sup>稍作修改, 小鼠腹腔巨噬细胞系 RAW264.7 用含有 100 mL/L 小牛血清和 100 mg/L 的氨苄青霉素和链霉素的 DMEM 培养基于 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 饱和湿度培养至 80% 融合. 胰酶 (2.5 g/L 胰蛋白酶, 0.2 g/L EDTA, pH7.2) 消化, 血球计数板计数. 在 6 孔细胞培养板中放置 20 mm × 20 mm 灭菌盖玻片, 共 3 块培养板. 按 5 × 10<sup>5</sup> 细胞 / 孔的数量将细胞接种于已放置了盖玻片的培养孔中, 用无双抗的含 100 mL/L 小牛血清的 DMEM 培养基于 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 饱和湿度培养 24 h. 次日, 吸出培养孔中的培养基, pH7.2 PBS 漂洗 3 次. 按照感染比 (MOI) 20 : 1 加入 A16R 芽孢的 DMEM 悬液, 100 μL/cm<sup>2</sup>, 即 800 μL / 孔, 置 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 饱和湿度培养 30 min, 并开始计时. 弃去芽孢悬液, PBS 洗 3 遍, 加入含 2.5 g/L 庆大霉素的 DMEM 溶液, 作用 30 min. 弃去培养基, PBS 洗 3 遍后, 添加新鲜无血清 DMEM 继续培养. 分别于添加芽孢后 1、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8 h 取出一张细胞爬片, 进行复红美蓝染色. 将上述爬片用 PBS 漂洗 3 次, 纯水漂洗 1 次, 20 s. 吹干, 甲醇固定 10 min, 石碳酸复红 (100 mL 30 g/L 碱性品红的 950 mL/L 酒精溶液和 90 mL 50 g/L 石碳酸水溶液混匀, 滤纸过滤)

染色 40 min, 水洗, 950 mL/L 酒精脱色 30 s, 水洗, 碱性美蓝 (30 mL 10 g/L 亚甲基蓝的 950 mL/L 酒精溶液和 100 mL 0.1 g/L 的氢氧化钾水溶液混匀, 滤纸过滤) 染色 1-2 min, 水洗去除多余染料, 干燥. 封片方法如下: 950 mL/L 酒精 1 min, 2 次; 无水乙醇脱水 1 min, 2 次; 二甲苯透明 1 min, 2 次. 采用 Nikon E600 生物显微镜进行油镜观察, 图像采集应用 Spot CCD 系统完成. 以上试验重复 2 次.

## 2 结果

通过复红美蓝染色法, 有效地确定了炭疽杆菌 A16R 芽孢按照 MOI 20 : 1 的比例感染鼠腹腔巨噬细胞系 RAW264.7 后, 其在巨噬细胞内的萌发过程. 染色结果显示, RAW264.7 细胞吞噬 A16R 芽孢 1 h 后, 细胞内存在大量的红色芽孢 (红色箭头所示), 说明 A16R 芽孢被成功吞噬但尚未形成繁殖体. 吞噬后 2-2.5 h, 细胞内少量芽孢开始萌发, 并开始呈现出繁殖体才能染上的蓝色 (黑色箭头所示). 吞噬后 3 h, 细胞内萌发的芽孢数量逐渐增多, 萌发的芽孢开始膨胀. 吞噬后 3.5-4 h, 细胞内出现典型的繁殖体并开始二分裂. 吞噬后 4.5-5 h, 细胞内进入二分裂的繁殖体逐步增多, 并开始生长至胞外. 吞噬后 5.5 h, 繁殖体进入指数生长阶段. 吞噬后 6-6.5 h, 繁殖体在巨噬细胞内 / 外快速增殖, 呈典型的竹节状. 吞噬后 7-8 h, 大量的繁殖体充斥于细胞内 / 外, 胞内空泡增多, 逐渐崩解, 细胞脱落, 出现细胞毒效应 (图 1). 最后, 需要指出一个客观事实即所有被吞噬的芽孢其在细胞内萌发和生长的进程并不可能完全一致, 而我们所观察到的结果是该时段的最早发生的或者代表性的事件.

## 3 讨论

感染性疾病是病原微生物和宿主紧密相互作用的结果, 只有深入了解病原微生物与宿主相互作用的分子细节才可能鉴定出病原微生物的所有毒力基因、全面理解病原微生物的致病机制和宿主的防御机制. 巨噬细胞是炭疽芽孢萌发和毒力体现的关键宿主细胞, 因此开展巨噬细胞反应机制的研究对于理解炭疽感染机制和宿主免疫机制意义重大. 国外已有文献报道了多种菌株炭疽芽孢在巨噬细胞内存活、萌发的研究, 而国内在这方面却鲜有报道. 另外, 本试验所采用的 A16R (pX02<sup>-</sup>) 是我国特有的无荚膜水肿型活芽孢疫苗株, 其皮肤炭疽的保护率为 80-100%, 但对死亡率高的肺炭疽保护效果不佳, 其机制如何尚无报道, 因此开展对炭疽杆菌 A16R 和巨噬细胞相互作用的研究不仅有利于深入了解炭疽感染的分子机制, 还将为 A16R 疫苗的改良提供帮助.

炭疽芽孢感染巨噬细胞是一个动态的过程, 准确

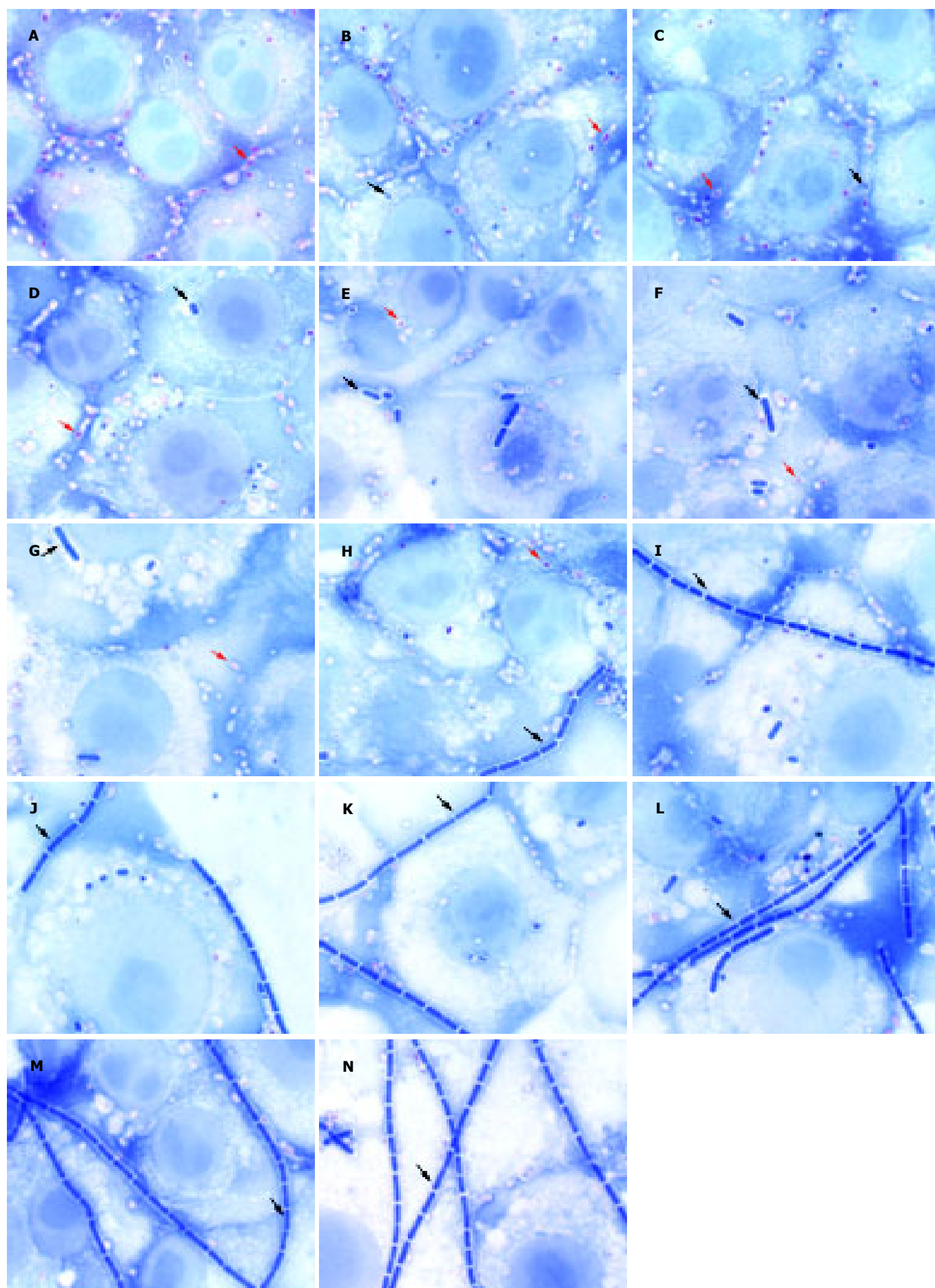


图1 RAW264.7 细胞感染炭疽芽孢 A16R 芽孢后不同时间的复红美蓝染色结果. A: 1 h; B: 2 h; C: 2.5 h; D: 3 h; E: 3.5 h; F: 4 h; G: 4.5 h; H: 5 h; I: 5.5 h; J: 6 h; K: 6.5 h; L: 7 h; M: 7.5 h; N: 8 h.

界定炭疽芽孢在感染模型中结构、功能改变的时间点(段)是全面研究宿主反应机制的前提. 已有文献采用了免疫荧光-激光共聚焦显微镜<sup>[5-6]</sup>、透射电镜<sup>[7]</sup>以及常规革兰染色<sup>[7-8]</sup>等方法检测了几株炭疽芽孢在巨噬细胞内的萌发情况, 但都存在着过程繁琐或者不能同时显示芽孢和繁殖体等缺陷. 因此, 我们考虑能否应用芽孢染色法来检测芽孢在巨噬细胞内萌发的过程. 常用的芽孢染色法包括孔雀石绿染色、Moller染色以及复红美蓝染色等, 但前两种染色过程都需要加热, 不适用于细胞爬片的染色. 我们采用染色过程温和的复红美蓝染色法, 对吞噬后的芽孢和萌发的繁殖体进行了清楚地着色(芽孢呈红色和繁殖体呈蓝色), 从而简便、有效地确定了 A16R 芽孢在巨噬细胞 RAW264.7 内的萌发过程, 并为今后通过基因表达谱分析和比较蛋白质组等方法对宿主细胞在芽孢萌发不同时段的全局性反应进行研究奠定了基础.

#### 4 参考文献

- 1 Fukao T. Immune system paralysis by anthrax lethal toxin: the roles of innate and adaptive immunity. *Lancet Infect Dis* 2004;4:166-170
- 2 Moayeri M, Leppla SH. The roles of anthrax toxin in pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 2004;7:19-24
- 3 Guidi-Rontani C. The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*. *Trends Microbiol* 2002;10:405-409
- 4 Hanna PC, Acosta D, Collier RJ. On the role of macrophages in anthrax. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10198-10201
- 5 Guidi-Rontani C, Weber-Levy M, Labruyere E, Mock M. Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophages. *Molecular Microbiol* 1999;31:9-17
- 6 Guidi-Rontani C, Levy M, Ohayon H, Mock M. Fate of germinated *Bacillus anthracis* spores in primary murine macrophages. *Molecular Microbiol* 2001;42:931-938
- 7 Dixon TC, Fadl AA, Koehler TM, Swanson JA, Hanna PC. Early *Bacillus anthracis*-macrophage intracellular survival and escape. *Cellular Microbiol* 2000;2:453-463
- 8 Bergman NH, Passalacqua KD, Gaspard R, Shetron-Rama LM, Quackenbush J, Hanna PC. Murine macrophage transcriptional responses to *bacillus anthracis* infection and intoxication. *Infection Immunity* 2005;73:1069-1080

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

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

• 消息 •

## 第六届全国胃肠动力学术研讨会征文通知

**本刊讯** 为提高国内胃肠动力障碍性疾病临床和基础研究水平, 吸取国外最新研究成果, 加强对外交流与合作, 中华医学会消化病学分会胃肠动力学组定于 2005-11 上旬在武汉召开全国第六届胃肠动力学术会议, 届时将邀请国内外胃肠动力学专家就本学科的基础和临床研究进展作专题演讲, 并进行广泛的学术交流. 现将征文有关事项通知如下:

### 1 征文内容

(1) 胃肠动力障碍性疾病的基础和临床研究; (2) 胃肠功能性疾病的基础和临床研究; (3) 胃肠神经系统功能与胃肠动力学基础研究; (4) 胃肠动力学检测方法的临床应用.

### 2 征文要求

(1) 论文摘要不得超过 800 字, 电脑打印(附软盘), 格式为: 题目, 作者, 单位, 邮编, 目的, 方法, 结果和结论, 附联系电话及 E-mail 地址; (2) 已在全国公开发表的论文不予受理.

### 3 投稿地址

武汉市解放大道 1277 号协和医院消化科 刘劲松 收(邮编: 430022), 电话: 027-85726381; 2 武汉市丁字桥路 100 号湖北省医学会 林勇 胡丽萍收(邮编: 430064), 电话: 027-87893467.

### 4 截稿日期

2005-07-30

### 5 会议具体地点

另行通知. 会议信息, 论文投稿, 表格下载请登陆网站: <http://hubeiyiyuan.go.nease.net>.

中华医学会消化病学分会

消化病学分会胃肠动力学组

# 大鼠 CCl<sub>4</sub> 所致肝纤维化自发逆转的基因表达谱研究

潘 勤, 谢渭芬, 张忠兵, 张 新, 韩泽广

潘勤, 谢渭芬, 张忠兵, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科 上海市 200003  
张新, 韩泽广, 国家人类基因组南方研究中心 上海市 201203  
潘勤, 男, 1971-03-12 生, 上海市人, 汉族. 2003 年上海第二医科大学博士, 2005 年中国人民解放军第二军医大学附属长征医院博士后, 主要研究肝纤维化的发生机制及药物防治.  
中国博士后科学基金资助项目, No. 2004036325  
通讯作者: 潘勤, 200003, 上海市凤阳路 415 号, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院消化内科. fangchunhua@online.sh.cn  
电话: 021-68452002 传真: 021-63520020  
收稿日期: 2005-04-20 接受日期: 2005-05-06

## Gene expression profile analysis of spontaneous reversion of CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis in rats

Qin Pan, Wei-Fen Xie, Zhong-Bing Zhang, Xin Zhang, Ze-Guang Han

Qin Pan, Wei-Fen Xie, Zhong-Bing Zhang, Department of Gastroenterology of Chang Zheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China  
Xin Zhang, Ze-Guang Han, Chinese National Human Genome Southern Center, Shanghai 201203, China  
Supported by Postdoctoral Science Foundation of China, No. 2004036325  
Correspondence to: Qin Pan, Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, 415 FengYang Road, Shanghai 200003, China. fangchunhua@online.sh.cn  
Received: 2005-04-20 Accepted: 2005-05-06

## Abstract

**AIM:** To screen the differentially expressed gene in the spontaneous reversion of hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>), and to reveal the gene expression profile in this process.

**METHODS:** Animal model of hepatic fibrosis with spontaneous reversion was created in SD rats by injection of carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) for 8 weeks and then withdrawing for 6 weeks. The mRNA of liver tissues was extracted at different time spots in the process of reversion. Then cDNA microarray was used to screen the differentially expressed genes. Finally the products were subjected to hierarchical clustering and confirmed by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of  $\alpha$ -synuclein, A-raf, presenilin-2 and  $\beta$ -actin.

**RESULTS:** Hepatic fibrosis was progressively reversed after stopping injection of CCl<sub>4</sub>. All together, there were 254 (21.59%) genes that changed at the transcription level.

Meanwhile, 54, 85, 97 and 132 genes were identified differentially expressed in the 8<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> week, respectively. After confirmed by RT-PCR, the differentially expressed were associated with metabolic enzymes, ion channels, transcription factors, gastrointestinal hormones and their receptors, mitogen-activated protein kinase (MAPK) and PI3k/Akt signaling pathway.

**CONCLUSION:** The gene expression profile is significantly changed in the spontaneous recovery of CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis. Genes closely related to the spontaneous recovery are associated with metabolic enzymes, transporter/symporter proteins, gastrointestinal hormones/receptors, lipoprotein/fatty acid binding proteins, transcription factor/nuclear factors, and MAPK signal pathway.

**Key Words:** Gene Microarray; Hepatic fibrosis; Spontaneous reversion

Pan Q, Xie WF, Zhang ZB, Zhang X, Han ZG. Gene expression profile analysis of spontaneous reversion of CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1544-1549

## 摘要

**目的:** 利用cDNA微阵列杂交筛选肝纤维化自发逆转过程中的差异表达基因, 从而揭示纤维化逆转的基因表达谱。

**方法:** 通过四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)注射SD大鼠8 wk, 随后停药6 wk 建立肝纤维化自发逆转的动物模型. 提取纤维化逆转过程中不同时间段的肝组织mRNA, 与cDNA微阵列杂交, 筛选表达水平明显上调或下调的差异基因, 并结合Cluster分析等进行分类. 此外选择 $\alpha$ 共核蛋白、A-raf、早老素2及 $\beta$ 肌动蛋白作RT-PCR以验证检测结果。

**结果:** CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化在停止毒剂注射后出现进行性消退. cDNA微阵列杂交证实, 肝纤维化消退过程中共有254条基因出现转录水平改变, 占基因总数的21.59%。其中8, 10, 12, 14 wk的差异表达基因分别为54, 85, 97, 132条. 筛选所得的肝纤维化逆转相关基因主要涉及代谢相关酶、脂肪代谢相关蛋白、离子通道、转录因子、胃肠激素及受体、MAPK及PI3k/Akt信号转导通路等. RT-PCR检测与cDNA微阵列杂交一致, 证实了结果的可靠性。

**结论:** 肝纤维化逆转过程中基因表达谱发生显著改变,

主要涉及代谢相关酶、转运蛋白/协同转运蛋白、胃肠激素及受体、脂蛋白/脂肪酸结合蛋白、转录因子/核因子、MAPK 信号转导通路等6类基因。

**关键词:** 基因芯片; 肝纤维化; 逆转

潘勤, 谢清芬, 张忠兵, 张新, 韩泽广. 大鼠CCl<sub>4</sub>所致肝纤维化自发逆转的基因表达谱研究. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1544-1549  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1544.asp>

## 0 引言

近年研究显示, 消除致病因素<sup>[1-3]</sup>或应用有效的抗纤维化药物<sup>[4-8]</sup>都能诱导肝纤维化发生逆转. 然而纤维化的逆转过程十分复杂, 涉及众多基因<sup>[9-11]</sup>, 目前的研究仅局限于单一因素分析, 难以全面揭示肝纤维化逆转中的基因表达状况. 为此, 我们在建立大鼠纤维化自发逆转模型的基础上, 采用cDNA微阵列杂交快速、高通量地筛选纤维化逆转过程中的差异表达基因, 以期阐明纤维化自发逆转的相关基因表达谱, 总结纤维化逆转的确切机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 雄性Sprague-Dawley大鼠, 质量180-240 g (中国科学院上海实验动物中心); Oligotex mRNA Midi 试剂盒(Qiagen公司), <sup>33</sup>P dATP(Life Sciences公司), Atlas Rat 1.2 cDNA芯片(BD公司); 杂交炉(Hybaid公司); phosphorimager扫描仪(Molecular Dynamics公司); Gene AMP PCR system 9700型PCR扩增仪.

**1.2 方法** 将Sprague-Dawley大鼠随机分为正常对照组( $n = 5$ )及肝纤维化逆转模型组( $n = 22$ ). 模型组大鼠SC 400 mL/L四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>) (6 mL/kg, 首剂加倍), 正常对照组则以同样方法注射等量橄榄油, 每3 d一次, 共8 wk, 此后停药6 wk. 8, 10, 12, 14 wk末分别处死5只大鼠, 肝组织经HE及VG染色后进行纤维化程度的半定量评级<sup>[12]</sup>: S1, 汇管区、汇管区周围纤维化, 局限性窦周纤维化或小叶内纤维瘢痕, 均不影响小叶的完整性; S2, 虽有纤维间隔即桥接纤维化形成, 但大部分小叶结构仍保留; S3, 大量纤维间隔形成, 分隔并破坏肝小叶, 导致小叶结构紊乱, 但尚无肝硬化; S4, 早期肝硬化, 可见肝实质广泛破坏, 弥漫性纤维增生, 被分隔的肝细胞团出现不同程度的再生及假小叶形成, 但纤维间隔宽大疏松, 改建尚不充分. 取正常对照组及8, 10, 12, 14 wk肝纤维化逆转模型组大鼠的肝组织(0.8 g/只), 以酚/氯仿抽提5组总RNA, 分别混合后分离mRNA. 采用变性mRNA (1  $\mu$ g)与DTT, dNTP, M-MLV, <sup>33</sup>P dATP于37℃共孵育1.5 h. 所得探针

经纯化后与鲑精DNA封闭的Atlas Rat 1.2大鼠cDNA微阵列在68℃条件下杂交12-18 h. 随即顺序进行低严谨度及高严谨度洗膜、磷屏曝光、扫描. 图像经均一化后, 以Array Vision 5.1软件分析, 筛选出表达水平上调或下调3倍的差异表达基因, 并应用Cluster 3.0及Treeview软件作Cluster分析. 在cDNA微阵列检测结果中选择表达上调( $\alpha$ -共核蛋白、A-raf)、下调(早老素2)及保持稳定( $\beta$ -肌动蛋白)的基因. 按同样分组方法, 取肝组织总RNA (2  $\mu$ g/组)、随机引物0.5  $\mu$ g、MMLV 200 U于37℃逆转录1 h以生成cDNA. 引物设计: (1) $\alpha$ -共核蛋白: 5' GGGTACCCA CAAGAGGGAAT3' (上游), 5' CGATCACTGCTGATGGAAGA3' (下游), 扩增片断长248 bp; (2)A-raf: 5' ACTCCAG CCTCATGCAGTTT 3' (上游), 5' TGTCGTGTCTTCCTG AGCAC3' (下游), 扩增片断长401 bp; (3)早老素2: 5' CTACCTCGGGGAAGTGTTCA3' (上游), 5' AGTGC GC TGATCACAATGAG3' (下游), 扩增片断长156 bp; (4) $\beta$ -肌动蛋白(内参照): 5' ACCCACACTGTGCCCATCTATG 3' (上游), 5' AGAGTACTGCGCTCAGGAGGA 3' (下游), 扩增片断长521 bp. 反应体系: cDNA 3  $\mu$ L, 上、下游引物各1  $\mu$ L, Taq酶1 U, dNTP (2 mM) 1  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 1.5  $\mu$ L, 10×反应缓冲液2.5  $\mu$ L, 加纯水至25  $\mu$ L. 优化反应条件: (1) $\alpha$ -共核蛋白: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 40 s, 共36个循环; (2)A-raf: 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 45 s, 共36个循环; (3)早老素2: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共35个循环; (4) $\beta$ -肌动蛋白: 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 45 s, 共26个循环. 另设不加逆转录酶, 或以蒸馏水为模板的阴性对照管, 与各样本管同期扩增. 产物加入20 g/L琼脂糖凝胶, 以100 V恒压电泳60 min左右, 紫外透射仪下观察结果.

**统计学处理** 结果以mean±SD表示, 采用方差分析检验及t检验, 以SPSS软件处理.

## 2 结果

**2.1 建立肝纤维化自发逆转模型** CCl<sub>4</sub> sc 8 wk后, 肝纤维化逆转模型组大鼠可见大量胶原沉积于小叶中央静脉、汇管区、肝窦间隙等部位, 并形成纤维间隔及假小叶. 同时出现中央静脉扩大、肝细胞脂肪变性、炎性细胞浸润、肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化及增殖等肝纤维化的特征性改变. 组织纤维化程度达S3-S4. 正常对照组大鼠的肝组织则均属正常. 停止毒剂注射后, 各类病理改变均逐渐减轻, 胶原纤维显著减少, 纤维间隔变少、变细. 10-12 wk时纤维化逆转模型组的肝纤维化程度为S2-S3, 而第14 wk时仅为S1. 通过检测cDNA微阵列上各点的

表1 基因簇1中的代谢相关酶

基因	GenBank 号	与正常对照组的比率			
		8 wk	10 wk	12 wk	14 wk
细胞色素 P450, IIC 亚族	J02657	0.19	1.52	3.73	5.20
细胞色素 P450, 2E1 亚族	J02627	0.91	1.55	3.22	2.53
细胞色素 P450, 2c39	M18335	0.33	0.33	0.64	2.37
细胞色素 P450, 4F4	U39206	0.32	0.58	1.59	2.12
细胞色素 P450, 3A1	M10161	0.24	1.64	2.08	2.23
细胞色素 P450, 4A3	M33936	0.28	0.72	0.90	1.50
细胞色素 P450, 4a10	M37828	1.52	3.44	3.64	3.10
细胞色素氧化酶, I 亚单位	S79304	1.43	2.61	2.67	3.28
细胞色素 C 氧化酶, IVa 亚单位	X14209	1.55	1.54	3.28	2.88
细胞色素 C 氧化酶, VIIa 3 亚单位	X54080	0.32	0.37	2.31	3.03
细胞色素 C 氧化酶, Vb 亚单位	D10952	0.94	1.40	2.61	3.21
$\mu$ 型谷胱甘肽 S 转移酶	J02592	0.68	2.70	5.07	4.85
$\alpha$ 型谷胱甘肽 S 转移酶	K01931	0.26	0.66	4.54	9.51
微粒体谷胱甘肽 S 转移酶 1	J03752	0.29	0.57	0.74	3.36

nARVOL, 并采用 9 个阳性对照点及 3 个阴性对照点对数据进行均一化后, 共筛选出 254 条在肝纤维化逆转过程中表达显著上调或下调的差异基因, 约占基因总数的 21.59%。其中 8, 10, 12, 14 wk 末的差异表达基因数分别达 54 条 (22 条上调, 32 条下调), 85 条 (52 条上调, 33 条下调), 97 条 (77 条上调, 20 条下调), 132 条 (44 条上调, 88 条下调)。

分层 Cluster 分析则显示, 差异表达基因属两大基因簇。基因簇 1 包含 65 条基因, 主要有多种代谢相关酶, 尤其是细胞色素 P450、细胞色素 C 氧化酶、谷胱甘肽 S 转移酶等 (表 1)。此外, 还包括 I 型及 IV 型载脂蛋白 A、1 型及 7 型脂肪酸结合蛋白等脂肪代谢相关基因。此类基因在肝纤维化逆转过程中表达上调, 且峰值均出现于 14 wk。

基因簇 2 含有 189 条差异表达基因, 其中除已知的基质金属蛋白酶及基质金属蛋白酶抑制物<sup>[1-3, 9, 11]</sup>外, 既有钙、钾、钠、氢、氯等离子通道的编码基因, 也有水通道蛋白及氨基酸转运蛋白基因 (表 2)。胃肠激素及其受体在基因簇 2 中也较丰富 (表 3)。

此外, 基因簇 2 又可依据表达时序等特征分为 2 个亚簇。第 2 亚簇中转录因子及核因子较多, 如真核细胞启动因子 5, Jun D 原癌基因、c-fos 原癌基因等。10 wk 时 c-fos 原癌基因、Jun D 原癌基因的转录水平分别达正常对照组的 14.71 及 3.63 倍。有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 及磷脂酰肌醇-3-激酶 (phosphoinositide-3-OH kinase, PI3K) /Akt 信号转导通路中的多个重要激酶, 如 A-raf、有丝分裂原活化的蛋白激酶激酶 2

(mitogen-activated protein kinase kinase 2, MAPKK2)、有丝分裂原活化的蛋白激酶激酶 5 (mitogen-activated protein kinase kinase 5, MAPKK5)、有丝分裂原活化的蛋白激酶 3 (mitogen-activated protein kinase 3, MAPK3)、PI3K 等也包含于第 2 亚簇中, 且在肝纤维化逆转的第 8-14 wk 表达高度上调。

A-raf 及  $\alpha$  共核蛋白的表达水平在肝纤维化自发消退的过程中显著升高, 并在 10 wk 时达到峰值。而早老素 2 则随肝纤维化的逆转出现表达水平显著降低, 尤其 10 wk 时最为明显。管家基因  $\beta$  肌动蛋白的转录水平在整个过程中基本保持稳定。半定量 RT-PCR 与 cDNA 微阵列检测相吻合, 由此证实所得结果具有较高的准确性和可信度。

### 3 讨论

肝纤维化是慢性肝病向肝硬化进展的主要中间环节。近年 Iredal *et al*<sup>[13]</sup>报道, 经腹腔注射 CCl<sub>4</sub> 2 次/wk, 共 4 wk 可诱发大鼠肝纤维化, 停止毒剂注射后 28 d 纤维化几乎完全消退。而由胆道梗阻及胆汁郁积导致的患者或大鼠肝纤维化经胆道再通后均出现逆转<sup>[14]</sup>。多项研究也显示, 消除致病因素或者应用抗纤维化药物, 都可部分或完全逆转患者及模型动物中存在的肝纤维化。为此, 我们依据既往动物模型及相关报道<sup>[1-2, 13]</sup>, 首先采用 CCl<sub>4</sub>/橄榄油皮下注射诱导成年雄性 SD 大鼠发生肝纤维化, 随之停止毒剂接触促使纤维化自发恢复。结果显示, 经 CCl<sub>4</sub> 注射 8 wk 后可见多项典型的肝纤维化病理改变, 如纤维间隔形成、中央静脉及肝窦

表2 基因簇2中的膜通道蛋白

基因	GenBank 号	与正常对照组的比率			
		8 wk	10 wk	12 wk	14 wk
内流型整流钾离子通道(J 亚族)	L29403	1.06	1.34	3.21	0.87
内流型整流钾离子通道(J 亚族, 5 型)	L35771	1.15	2.92	3.15	0.87
蛋白激酶 C 调节氯离子通道	D17521	2.67	2.84	3.22	2.26
I 型氯离子通道	X62894	1.06	1.46	3.05	0.74
感觉神经特异性阳离子通道	AF013598	0.40	0.42	0.34	0.27
钙离子通道( $\beta$ 3 亚单位)	M88751	0.93	1.33	3.26	0.92
水通道蛋白 1	X71069	1.14	2.46	4.14	1.06
水通道蛋白 2	D13906	1.417	2.51	5.89	1.28
水通道蛋白 3	D17695	1.62	2.46	3.26	2.81
水通道蛋白 4	U14007	0.36	0.39	1.49	0.22
水通道蛋白 5	U16245	0.58	0.69	2.05	0.26
溶质转运蛋白(6 亚族, 3 型)	M80570	1.30	1.47	3.04	1.34
溶质转运蛋白(9 亚族)	M85299	1.12	5.60	0.87	0.64
溶质转运蛋白(12 亚族, 1 型)	U10096	0.36	0.44	0.95	0.29
溶质转运蛋白(12 亚族, 3 型)	U10097	0.40	0.68	0.95	0.27
溶质转运蛋白(17 亚族, 1 型)	U28504	1.14	1.58	3.67	1.56
溶质转运蛋白(17 亚族, 2 型)	L13257	1.29	1.54	3.32	1.49

周围纤维化、小叶结构紊乱、HSC 增生、汇管区扩大等. 而停药后 10, 12, 14 wk 末, 上述病理改变以及肝纤维化分期均出现进行性改善, 直至第 14 wk 时纤维化分期仅为 S1. 以此为基础, 通过收集肝纤维化逆转过程中不同时间段的肝组织 mRNA, 并与 cDNA 微阵列杂交, 共筛选得到 254 条差异表达基因, 约占微阵列中基因总数的 21.59%. 其中, 8, 10, 12, 14 wk 时的差异基因数分别为 54、85、97 及 132 条. 提示纤维化逆转时肝脏基因表达谱存在广泛改变, 并且随着纤维化的消退, 参与的基因也不断增多. 通过分层 Cluster 可将差异表达基因分为 2 个基因簇及若干基因亚簇. 综合分层 Cluster、基因功能及表达时序分析, 在差异表达基因中共发现 6 类基因: (1) 代

谢相关酶, 包括基因簇 1 中的 7 型细胞色素 P450 同工酶、5 型细胞色素氧化酶的同工酶、以及 3 型谷胱甘肽 S 转移酶的同工酶. 其中绝大多数在肝纤维化逆转的早、中期 (10–12 wk) 表达水平明显上升. 由于细胞色素 P450 的同工酶在胆汁淤积及 CCl<sub>4</sub> 诱导的大鼠肝纤维化中表达水平显著降低<sup>[15]</sup>, 在重度肝纤维化的患者中也大幅低于正常<sup>[16]</sup>, 而谷胱甘肽 S 转移酶的同工酶在原发性胆汁性肝硬化患者中较少表达<sup>[17]</sup>, 因此诸多代谢相关酶的表达上调可能是肝细胞代谢功能增强、肝功能逐渐恢复的表现<sup>[18–20]</sup>. (2) 载脂蛋白、脂肪酸结合蛋白等脂肪代谢相关蛋白的编码基因也出现于基因簇 1 中. 由于相关的 mRNA 水平在肝纤维化逆转过程中均表现为上调, 且峰值均出现于 14 wk, 而

表3 基因簇2中的胃肠激素及受体

基因	GenBank 号	与正常对照组的比率			
		8 wk	10 wk	12 wk	14 wk
生长抑素	M25890	3.12	3.90	1.50	0.66
速激肽 2	M16410	5.96	6.81	4.31	2.16
成纤维细胞生长因子 10	D79215	13.61	18.10	11.38	9.60
神经生长因子受体	X05137	0.59	0.62	0.43	0.31
I 型胰岛素样生长因子受体	L29232	0.59	0.60	0.58	0.33
IV 型成纤维细胞生长因子受体	M91599	0.37	0.43	0.42	0.23
酪氨酸激酶受体 2 型配体	U97143	0.34	0.87	0.31	0.28
6 型 5 羟色氨受体	L03202	3.75	5.54	2.78	1.45
2 型雌激素受体 (ER $\beta$ )	U57439	0.89	1.12	3.30	0.34

此时肝细胞内脂滴的数量较纤维化时明显减少,因此脂肪代谢相关基因的高表达可能与加强脂肪代谢、减轻肝脏脂肪变性有关。(3)纤维化逆转时,包括多种离子通道(钙、钾、钠、氢、氯离子通道)、谷氨酸盐通道、水通道及溶质转运蛋白在内的膜通道基因出现转录改变。此类基因的特点是均编码转运蛋白或协助转运蛋白,并多在纤维化消退的中、后期(12, 14 wk)表达水平显著上调或下调。钙离子浓度及pH值的改变可影响细胞增殖能力,因而对膜通道水平的调节可能在稳定细胞内环境、促进损伤修复及肝细胞增殖方面发挥重要作用。(4)真核细胞启动因子5、Jun D原癌基因、c-fos原癌基因等典型的转录因子及核因子同样被发现出现差异表达。其中c-fos原癌基因、Jun D原癌基因的转录水平在第10 wk时分别较正常对照组高13.7及2.6倍,从而进一步证实肝纤维化逆转过程涉及大量基因的转录激活。(5)基因簇2中的生长抑素、成纤维细胞生长因子10、速激肽2等胃肠激素在肝纤维化消退的全过程中表达水平均显著增高。与之相反,同期神经生长因子受体、胰岛素样生长因子受体、成纤维细胞生长因子受体、5羟色胺受体等多数胃肠激素受体的转录却出现下调。业已证实,生长抑素、成纤维细胞生长因子、5羟色胺、IV型成纤维细胞生长因子受体、雌激素受体 $\beta$ 、神经生长因子受体等均与肝纤维化的发生密切相关<sup>[5, 21-24]</sup>。胃肠激素及其受体的表达改变提示该类基因也可能参与肝纤维化的逆转过程。(6)MAPK及PI3K/Akt信号转导通路的关键激酶A-raf, MAPKK2, MAPKK5, MAPK3, PI3K在肝纤维化逆转的8-14 wk时表达高度上调。MAPK信号通路是主要的细胞生存通路,对损伤修复、细胞增殖都具有重要意义<sup>[25-26]</sup>,该通路的持续激活可有效地保护肝细胞<sup>[27-30]</sup>,促进肝纤维化逆转。

通过对各类基因功能及表达特点的总结,初步提示多种胃肠激素可能通过G蛋白耦联受体活化细胞内的MAPK信号通路,并经由MAPK转位入核,磷酸化c-fos、c-Jun等转录因子,促使代谢相关酶、细胞膜通道等效应分子的表达提高,改善细胞代谢功能,恢复正常的内环境,由此加速损伤修复及肝细胞增殖,最终导致肝纤维化的逆转。这可能加深我们对肝纤维化逆转机制的认识,并为确定合理的纤维化防治策略提供科学依据。

#### 4 参考文献

- 1 Lee HS, Huang GT, Miao LH, Chiou LL, Chen CH, Sheu JC. Expression of matrix metalloproteinases in spontaneous regression of liver fibrosis. *Hepatogastroenterology* 2001;48: 1114-1117
- 2 Watanabe T, Niioka M, Ishikawa A, Hozawa S, Arai M, Maruyama K, Okada A, Okazaki I. Dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. *J Hepatol* 2001;35:465-473
- 3 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 2002;36(4 Pt 1):850-860
- 4 Salgado S, Garcia J, Vera J, Siller F, Bueno M, Miranda A, Segura A, Grijalva G, Segura J, Orozco H, Hernandez-Pando R, Fafutis M, Aguilar LK, Aguilar-Cordova E, Armendariz-Borunda J. Liver cirrhosis is reverted by urokinase-type plasminogen activator gene therapy. *Mol Ther* 2000;2:545-551
- 5 Yu C, Wang F, Jin C, Wu X, Chan WK, McKeehan WL. Increased carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in FGFR4-deficient mice. *Am J Pathol* 2002;161:2003-2010
- 6 Zhang LH, Pan JP, Yao HP, Sun WJ, Xia DJ, Wang QQ, He L, Wang J, Cao X. Intrasplenic transplantation of IL-18 gene-modified hepatocytes: an effective approach to reverse hepatic fibrosis in schistosomiasis through induction of dominant Th1 response. *Gene Ther* 2001;8:1333-1342
- 7 Dienstag JL, Goldin RD, Heathcote EJ, Hann HW, Woessner M, Stephenson SL, Gardner S, Gray DF, Schiff ER. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology* 2003;124:105-117
- 8 Garcia L, Hernandez I, Sandoval A, Salazar A, Garcia J, Vera J, Grijalva G, Muriel P, Margolin S, Armendariz-Borunda J. Pirfenidone effectively reverses experimental liver fibrosis. *J Hepatol* 2002;37:797-805
- 9 Sakaide I, Hironaka K, Terai S, Okita K. Gadolinium chloride reverses dimethylnitrosamine (DMN)-induced rat liver fibrosis with increased matrix metalloproteinases (MMPs) of Kupffer cells. *Life Sci* 2003;72:943-959
- 10 Ueberham E, Low R, Ueberham U, Schonig K, Bujard H, Gebhardt R. Conditional tetracycline-regulated expression of TGF-beta1 in liver of transgenic mice leads to reversible intermediary fibrosis. *Hepatology* 2003;37:1067-1078
- 11 Okazaki I, Watanabe T, Hozawa S, Niioka M, Arai M, Maruyama K. Reversibility of hepatic fibrosis: from the first report of collagenase in the liver to the possibility of gene therapy for recovery. *Keio J Med* 2001;50:58-65
- 12 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. *中华肝脏病杂志* 2000;8:324-329
- 13 Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis: hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538-549
- 14 Hammel P, Couvelard A, O'Toole D, Ratouis A, Sauvanet A, Flejou JF, Degott C, Belghiti J, Bernades P, Valla D, Ruszniewski P, Levy P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *N Engl J Med* 2001;344:418-423
- 15 Bastien MC, Leblond F, Pichette V, Villeneuve JP. Differential alteration of cytochrome P450 isoenzymes in two experimental models of cirrhosis. *Can J Physiol Pharmacol* 2000;78:912-919
- 16 George J, Murray M, Byth K, Farrell GC. Differential alterations of cytochrome P450 proteins in livers from patients with severe chronic liver disease. *Hepatology* 1995;21:120-128
- 17 Tsuneyama K, Harada K, Kono N, Sasaki M, Saito T, Gershwin ME, Ikemoto M, Arai H, Nakanuma Y. Damaged interlobular bile ducts in primary biliary cirrhosis show reduced expression of glutathione-S-transferase-pi and aberrant expression of 4-hydroxynonenal. *J Hepatol* 2002;37:176-183
- 18 Chalasani N, Gorski JC, Patel NH, Hall SD, Galinsky RE. Hepatic and intestinal cytochrome P450 3A activity in cirrhosis: effects of transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 2001;34:1103-1108
- 19 Niemela O, Parkkila S, Juvonen RO, Viitala K, Gelboin HV, Pasanen M. Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Hepatol* 2000;



- 33:893-901
- 20 Kessova I, Cederbaum AI. CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr Mol Med* 2003;3:509-518
- 21 Cabre M, Camps J, Ferre N, Paternain JL, Joven J. The antioxidant and hepatoprotective effects of zinc are related to hepatic cytochrome P450 depression and metallothionein induction in rats with experimental cirrhosis. *Int J Vitam Nutr Res* 2001;71:229-236
- 22 Inoue H, Shimizu I, Lu G, Itonaga M, Cui X, Okamura Y, Shono M, Honda H, Inoue S, Muramatsu M, Ito S. Idoxifene and estradiol enhance antiapoptotic activity through estrogen receptor-beta in cultured rat hepatocytes. *Dig Dis Sci* 2003;48:570-580
- 23 潘勤, 李定国, 汪余勤, 徐芹芳. 生长抑素对肝星状细胞的影响机制. *世界华人消化杂志* 2002;10:1250-1252
- 24 Shimizu I. Impact of oestrogens on the progression of liver disease. *Liver Int* 2003;23:63-69
- 25 Vaidya VS, Shankar K, Lock EA, Dixon D, Mehendale HM. Molecular mechanisms of renal tissue repair in survival from acute renal tubule necrosis: role of ERK1/2 pathway. *Toxicol Pathol* 2003;31:604-618
- 26 Sharma GD, He J, Bazan HE. p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J Biol Chem* 2003;278:21989-21997
- 27 Svegliati-Baroni G, Ridolfi F, Caradonna Z, Alvaro D, Marzioni M, Saccomanno S, Candelaresi C, Trozzi L, Macarri G, Benedetti A, Folli F. Regulation of ERK/JNK/p70S6K in two rat models of liver injury and fibrosis. *J Hepatol* 2003;39:528-537
- 28 孙意, 程瑞雪, 冯德云, 欧阳小明, 郑晖. HCVNS3 蛋白对正常人源肝细胞生长及 MAPK 磷酸化的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:173-177
- 29 Kakazu A, Chandrasekher G, Bazan HE. HGF protects corneal epithelial cells from apoptosis by the PI-3K/Akt-1/Bad-but not the ERK1/2-mediated signaling pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3485-3492
- 30 Schoemaker MH, Conde de la Rosa L, Buist-Homan M, Vrenken TE, Havinga R, Poelstra K, Haisma HJ, Jansen PL, Moshage H. Tauroursodeoxycholic acid protects rat hepatocytes from bile acid-induced apoptosis via activation of survival pathways. *Hepatology* 2004;39:1563-1573

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 种发表的各类基金资助论文摘要 155115 条, 其中国家基金资助的论文为 70167 条(45.23%), 其他基金资助的论文为 84948 条(54.76%).

### 1 本系统的功能

电子杂志: 关键词搜索, 高级搜索(期刊全名、ISSN、年度、单位、题名、摘要、作者、资助), 期刊搜索(A-Z 排序). 论文排序: 期刊论文数, 点击论文数.

### 2 网址

中国生物医学基金论文摘要(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)

### 3 论文摘要格式

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉. 鼻咽癌中染色体

3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定. *癌症* 2003 年;22(1): 1-5

鼻咽癌中染色体 3p21 区域一个表达下调的 EST 的鉴定

贺修胜, 陈主初, 田芳, 肖志强, 贺智敏, 关勇军, 李峰, 何春梅, 袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目 (39970287, 30000188)

背景与目的: 研究显示鼻咽癌细胞 3p14-25 存在高频率杂合性丢失位点. 本研究拟寻找与筛选染色体 3p21 区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(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)

# IL-12 和 IL-6 与实验性急性坏死性胰腺炎严重程度的关系

赖铭裕, 梁志海, 唐国都, 孙学成, 邓德海

赖铭裕, 广西医科大学第一附属医院老年消化内科  
广西壮族自治区南宁市 530021  
梁志海, 孙学成, 广西医科大学 广西壮族自治区南宁市 530021  
唐国都, 邓德海, 广西医科大学第一附属医院消化内科  
广西壮族自治区南宁市 530021  
赖铭裕, 男, 1969-07 生, 广西合浦人, 广西医科大学消化内科硕士, 从事消化内科临床工作。  
广西自然科学基金资助项目(桂科自), No. 0447054  
通讯作者: 唐国都, 530021, 广西壮族自治区南宁市双拥路 6 号, 广西医科大学第一附属医院消化内科。 tguodu02@yahoo.com.cn  
电话: 0771-5356501  
收稿日期: 2005-03-14 接受日期: 2005-04-01

## Correlation of interleukin-12 and interleukin-6 with severity of experimental acute necrotizing pancreatitis

Ming-Yu Lai, Zhi-Hai Liang, Guo-Du Tang, Xue-Cheng Sun, De-Hai Deng

Ming-Yu Lai, Department of Gerontism Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Province, China.  
Zhi-Hai Liang, Xue-Cheng Sun, Graduates of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Province, China  
Guo-Du Tang, De-Hai Deng, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Province, China  
Correspondence to: Guo-Du Tang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi Province, China. tguodu02@yahoo.com.cn  
Received: 2005-03-14 Accepted: 2005-04-01

## Abstract

**AIM:** To investigate the change of serum interleukin-12 (IL-12) and interleukin-6 (IL-6) concentrations and the correlation with the severity of pancreas damages in experimental acute necrotizing pancreatitis (ANP).

**METHODS:** Ninety-two Sprague-Dawley rats were randomly divided into ANP (group A,  $n = 36$ ), IL-10-interfering (group I,  $n = 32$ ) and control group (group C,  $n = 24$ ). Rats in group A and I were injected intraperitoneally with 6% L-Arginine ( $3 \times 1.0$  mg/g) three times at an interval of 1 hour to induce ANP and those in group C received saline intraperitoneal injection only. Rats in Group I were treated with recombinant human IL-10 at 2<sup>nd</sup>, 5<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> hour (10 000 U for each time) after the L-arginine injection. Rats were killed at 4<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup>, 24<sup>th</sup> and 36<sup>th</sup> hour after the last L-arginine injection. The pathological characteristics of the pancreas observed under light microscope. Serum

amylase, IL-12 and IL-6 concentrations were detected by substrate-enzyme technique and ELISA respectively.

**RESULTS:** The pathological scores of pancreas, the concentrations of serum amylase, IL-12 and IL-6 in rats of group A were markedly higher than group C (24 h, serum amylase:  $3\ 264.89 \pm 1\ 627.18$  vs  $364.61 \pm 64.24$ ,  $P < 0.01$ ; IL-12:  $104.68 \pm 23.93$  vs  $56.72 \pm 22.67$  pg/L,  $P < 0.01$ ; IL-6:  $132.95 \pm 26.64$  vs  $81.90 \pm 9.93$  pg/L,  $P < 0.01$ ). After administration of IL-10, the pathological scores of pancreas, the concentrations of serum amylase, IL-12 and IL-6 in were significantly decreased in group I as compared with those in group A (24 h, pathological scores:  $4.75 \pm 1.75$  vs  $7.89 \pm 1.17$ ,  $P < 0.01$ ; serum amylase:  $1\ 481.13 \pm 336.48$  vs  $3\ 264.89 \pm 1\ 627.18$ ,  $P < 0.01$ ; IL-12:  $81.31 \pm 17.23$  vs  $104.68 \pm 23.93$  pg/L,  $P < 0.05$ ; IL-6:  $96.80 \pm 18.28$  vs  $132.95 \pm 26.64$  pg/L,  $P < 0.01$ ). The concentration of IL-12 was positively correlated with pathological scores of pancreas ( $r = 0.603$ ,  $P < 0.001$ ) and serum amylase concentration ( $r = 0.323$ ,  $P < 0.05$ ), but had no marked relations with IL-6 concentration ( $P > 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The serum concentrations of IL-12 and IL-6 are markedly elevated in experimental ANP. The pancreatic damages are improved after IL-10 administration. Serum IL-12 is positively related to the severity of pancreatic damages.

**Key Words:** Interleukin-12; Interleukin-6; Acute necrotizing pancreatitis

Lai MY, Liang ZH, Tang GD, Sun XC, Deng DH. Correlation of interleukin-12 and interleukin-6 with severity of experimental acute necrotizing pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1550-1553

## 摘要

**目的:** 探讨血清白介素12(IL-12)浓度在急性坏死性胰腺炎(ANP)中的变化以及他与胰腺病变严重程度的关系。

**方法:** SD 大鼠 92 只随机分为 3 组, 胰腺炎组(A 组,  $n = 36$ )和干预组(I 组,  $n = 32$ )大鼠都分 3 次 60 g/L 左旋精氨酸(L-arginine)ip 建立 ANP 大鼠模型; I 组在诱导胰腺炎后 2, 5, 8 h 分 3 次 ip IL-10 各 10 000 U。正常对照组(C 组,  $n = 24$ )接受同剂量的生理盐水。于 4, 12, 24, 36 h 分批处死大鼠, 光镜下观察胰腺组织并进行病理评分, 用酶底物法检测血清淀粉酶, 用 ELISA 法检测 IL-12 和 IL-6 浓度。

**结果:** A组胰腺病理评分、血清淀粉酶、IL-12及IL-6的水平显著高于对照组(24 h, 血清淀粉酶:  $3\,264.89 \pm 1\,627.18$  vs  $364.61 \pm 64.24$ ,  $P < 0.01$ ; IL-12:  $104.68 \pm 23.93$  vs  $56.72 \pm 22.67$  pg/L,  $P < 0.01$ ; IL-6:  $132.95 \pm 26.64$  vs  $81.90 \pm 9.93$  pg/L,  $P < 0.01$ ), I组可使各观察指标较A组明显下降(24 h, 病理评分:  $4.75 \pm 1.75$  vs  $7.89 \pm 1.17$ ,  $P < 0.01$ ; 血清淀粉酶:  $1481.13 \pm 336.48$  vs  $3\,264.89 \pm 1\,627.18$ ,  $P < 0.01$ ; IL-12:  $81.31 \pm 17.23$  vs  $104.68 \pm 23.93$  pg/L,  $P < 0.05$ ; IL-6:  $96.80 \pm 18.28$  vs  $132.95 \pm 26.64$  pg/L,  $P < 0.01$ ); IL-12与病理评分( $r = 0.603$ ,  $P < 0.001$ )及血清淀粉酶水平( $r = 0.323$ ,  $P < 0.05$ )存在正相关, 但是与IL-6无显著相关性( $P > 0.05$ ).

**结论:** 大剂量L-arginine ip诱导的ANP大鼠中, 血清IL-12及IL-6显著上升, 应用IL-10可减轻胰腺病变程度, IL-12浓度与胰腺病变正相关.

**关键词:** 白介素 12; 白介素 6; 急性坏死性胰腺炎

赖铭裕, 梁志海, 唐国都, 孙学成, 邓德海. IL-12和IL-6与实验性急性坏死性胰腺炎严重程度的关系. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1550-1553 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1550.asp>

## 0 引言

急性胰腺炎(AP)常见轻症、重症患者的临床经过与预后均相差很远. 如发生急性坏死性胰腺炎(ANP)则进展快、死亡率高, 常因并发多器官功能衰竭(MOF)而致死. 研究表明, ANP的发病机制不单只与消化酶的活化有关, 还与由于前炎症因子大量释放形成的系统性炎症反应综合征(SIRS)有关, 也正是SIRS引起的多器官功能衰竭导致了ANP的高死亡率<sup>[1]</sup>. 所以, 如何在疾病早期准确地预测AP的预后就成了一个热点话题. 由于ANP与SIRS的密切关系, 从细胞因子中寻找与病情严重程度相关的新指标成为可能的思路. IL-12是由P35和P40组成的异源二聚体细胞因子, 主要由树突状细胞, 巨噬细胞, B淋巴细胞以及其他一些抗原提呈细胞产生, 他是一个具有多种生物功能的细胞因子, 在细胞免疫应答过程中具有重要作用<sup>[2]</sup>. IL-12在ANP中的变化目前报道甚少. IL-6可由单核/巨噬细胞、T细胞、B细胞等多种细胞产生, 参与到烧伤、脓毒症、重大手术等机体的许多急性反应中, 已经有许多研究证实血清IL-6水平与AP的严重程度正相关<sup>[3]</sup>. 我们通过实验性大鼠胰腺炎模型的研究探讨IL-12在ANP中的变化以及其与AP严重程度的相关性.

## 1 材料和方法

1.1 材料 健康雄性SD大鼠92只, 清洁级, 2-3月龄, 质量250-350 g, 购自广西医科大学实验动物中心提供, 随机分成正常对照组(C组24只)、急性胰腺炎

组(A组36只)、和IL-10干预组(I组32只). 左旋精氨酸(L-arginine, 美国Sigma公司产品, 分析纯); 重组人IL-10蛋白和大鼠血清IL-6 ELISA检测试剂盒, 购自美国R & D公司; 大鼠血清IL-12检测试剂盒(比利时Biosource). 通过深圳晶美生物工程技术有限公司购进.

1.2 方法 参照尚宏清 *et al*<sup>[4]</sup>建模方法并经本实验室改良的ip L-arginine法制备大鼠AP模型<sup>[5]</sup>. 所有大鼠实验前禁食12 h, 自由饮水; A组大鼠分3次给予ip 60 g/L L-arginine( $3 \times 1.0$  mg/g), 间隔1 h, 诱导ANP模型; I组于L-arginine注射诱导胰腺炎后2, 5, 8 h分3次进行ip IL-10各10 000 U, 共30 000 U; C组大鼠ip生理盐水对照, 用量同L-arginine. 在注射L-arginine造模后4, 12, 24, 36 h共4个时分批处死大鼠, 从腹主动脉取血, 留血清-80℃下保存待测, 并取胰腺组织用40 g/L甲醛溶液固定, 石蜡包埋、切片及HE染色. 由病理科医生对大鼠胰腺组织在光镜下观察并进行盲法病理评分, 大鼠胰腺组织病理学评分参考Kusske组织学评估标准<sup>[6]</sup>进行, 按水肿、炎细胞浸润、坏死3方面的轻重程度评分. 血清淀粉酶浓度用底物酶学法在大型生化仪(Hitachi 7170)上检测, 血清IL-12、IL-6浓度用ELISA方法按说明书操作检测.

**统计学处理** 应用SPSS 10.0 for Windows软件包分析, 对病理评分采用 $t$ 检验, 对血清淀粉酶、IL-12, IL-6数据进行One-Way ANOVA单因素方差分析. 实验数据均以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示. 用Spearman法计算IL-12与病理评分的相关性, 用Pearson法计算IL-12与血清淀粉酶水平、IL-6浓度的相关性.  $P < 0.05$ 为差异具有显著性意义.

## 2 结果

2.1 病理改变和血清淀粉酶 A组和I组大鼠解剖后在腹腔内可见数量不等的淡黄色或红色血性腹水, 而且同时可观察到鼓肠、腹腔脏器粘连、脂肪皂化现象, 胰腺外观变成灰白色, 部分有暗红色出血样改变. 大鼠生存时间越长, 以上大体病理变化越重. I组大鼠大体病理改变比A组要轻. C组大鼠大体观无变化. A组胰腺标本在镜下可见胰腺腺泡水肿、组织坏死, 在胰腺实质、间质内有中性粒细胞、淋巴细胞浸润以及出血灶形成. 第36时点改变最重, 甚至出现大片胰腺组织凝固性坏死、腺小叶结构消失. I组改变相对较轻. C组标本只见轻度水肿及少量炎症细胞浸润. 根据Kusske方法对每一大鼠的胰腺组织在光镜下的表现评分. C组在光镜下的改变轻, 腺泡结构完整、腺小叶清晰、偶见有水肿或轻度炎症浸润者, 未见细胞坏死, 评分在0-2分间, 不进行统计计算(表1).

表1 胰腺组织病理评分和血清淀粉酶(mean±SD)

	分组	n	4 h	12 h	24 h	36 h
病理评分	A	9	4.44 ± 1.33	5.33 ± 1.66	7.89 ± 1.17	8.33 ± 1.12
	I	8	4.13 ± 1.13	3.75 ± 1.28 <sup>a</sup>	4.75 ± 1.75 <sup>b</sup>	7.00 ± 1.60 <sup>a</sup>
血清淀粉酶	C	6	378.83 ± 49.00	352.00 ± 37.93	364.61 ± 64.24	377.17 ± 64.45
	A	9	497.67 ± 61.68 <sup>e</sup>	675.22 ± 153.88 <sup>f</sup>	3 264.89 ± 1 627.18 <sup>f</sup>	1 709.33 ± 736.57 <sup>f</sup>
	I	8	412.75 ± 92.47 <sup>c</sup>	413.38 ± 85.53 <sup>d</sup>	1 481.13 ± 336.48 <sup>fd</sup>	1 122.80 ± 525.57 <sup>fd</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01, <sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>d</sup>*P*<0.01 vs A组; <sup>e</sup>*P*<0.05, <sup>f</sup>*P*<0.01 vs C组.

表2 AP大鼠血清IL-12和IL-6含量(pg/L)(mean±SD)

	分组	n	4 h	12 h	24 h	36 h
IL-12	C	6	52.15 ± 16.95	48.99 ± 14.61	56.72 ± 22.67	55.48 ± 19.53
	A	9	80.99 ± 28.41	130.41 ± 30.61 <sup>b</sup>	104.68 ± 23.93 <sup>b</sup>	106.68 ± 23.69 <sup>b</sup>
	I	8	81.31 ± 17.23	80.60 ± 31.38 <sup>c</sup>	81.31 ± 17.23 <sup>c</sup>	93.75 ± 18.49
IL-6	C	6	88.10 ± 34.08	83.97 ± 14.32	81.90 ± 9.93	74.01 ± 248.67
	A	9	199.81 ± 94.23 <sup>a</sup>	159.17 ± 46.02 <sup>b</sup>	132.95 ± 26.64 <sup>b</sup>	123.92 ± 34.74 <sup>a</sup>
	I	8	120.34 ± 75.95 <sup>c</sup>	101.35 ± 22.98 <sup>d</sup>	96.80 ± 18.28 <sup>d</sup>	82.48 ± 38.81 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05, <sup>b</sup>*P*<0.01 vs C组; <sup>c</sup>*P*<0.05, <sup>d</sup>*P*<0.01 vs A组.

A组各时点淀粉酶水平较C组升高, 在第24时点达到高峰, I组比A组降低(表1).

2.2 血清IL-12和血清IL-6水平 除第4时点差异无显著意义外, IL-12在A组水平均较C组高, 第12 h达到高峰, 此后有所降低. I组除第4、36时点与A组差异无统计学意义外, 其余时点均较A组低(表2). A组大鼠IL-6水平较对照组为高, 其中第4时点即达到高峰, 此后IL-6水平有所下降. 与A组相比, I组各时点均有所下降. IL-12水平与病理评分以及血清淀粉酶水平相关, 但与IL-6水平不相关(表3).

表3 IL-12与其他观察指标的相关性

	IL-12	
	r值	P值
病理评分	0.603	<0.001
血清淀粉酶	0.323	<0.05
IL-6	0.192	>0.05

### 3 讨论

大剂量腹腔注射L-arginine能建立可靠的ANP模型. ANP发病后机体产生大量的免疫细胞因子, 如IL-1, TNF-α, IL-6等. IL-6作为ANP早期开始升高的细胞因子, 他在血清里的浓度与ANP的严重程度有关, 可以用于预测ANP的严重程度<sup>[7-9]</sup>. 本结果提示, 成功建立ANP模型后, A组IL-6水平均较C组明显升高, 而且高峰出现在建模后4 h, 24 h点以后浓度有所下降.

而且, 在应用IL-10进行干预后, C组大鼠的IL-6浓度显著降低. IL-10作为具有免疫抑制作用的细胞因子, 对ANP进行干预可以起到减轻病变程度、改善预后的作用<sup>[10]</sup>. Warzecha *et al*<sup>[11]</sup>在动物实验中使用IGF-1可减轻胰腺损害, 同时观察到血清IL-10水平的升高, 认为IGF-1的作用是通过增加IL-10水平改善胰腺血流达到的. 另外, Chen *et al*<sup>[12]</sup>利用腺病毒质粒介导的人IL-10基因对大鼠AP进行治疗, 也证实了IL-10的治疗作用. 我们的实验在使用IL-10ip后使C组的病理评分以及血清IL-6水平都明显下降, 可以认为IL-10能有效地改善胰腺病变. Sweeney *et al*<sup>[13]</sup>认为, 无论AP后是否发生SIRS, AP早期都会发生T细胞的激活, 另有学者发现在AP早期, Th1型CD4+细胞能诱发巨噬细胞的活化以及前炎症因子释放<sup>[14]</sup>. 张群华 *et al*<sup>[15]</sup>利用经胰胆管逆行注射牛磺胆酸建立大鼠ANP模型后观察到模型组血清IL-12水平的上升. 在临床研究中, Pezzilli *et al*<sup>[16]</sup>进行认为AP患者血清IL-12在病变早期就明显升高; 重症急性胰腺炎(SAP)组血清IL-12水平较明显高于轻症急性胰腺炎(MAP)组<sup>[14, 17]</sup>. 这些都说明, IL-12作为细胞免疫过程中的一个重要调节因子, 在AP发生后体内单核细胞、B淋巴细胞等被激活, IL-12的分泌增加, 血清浓度将会升高, 并参与了AP的发生发展过程. 我们观察到建模12 h后A组血清IL-12水平的比C组显著增高, 与上述结果类似. 而应用IL-10干预的I组比A组有所下降, 说明了IL-10对AP发生后的免疫抑制可能通

过影响 T 细胞功能的途径进行, 其机制与 IL-10 通过对单核细胞分泌 IL-12、IL-18 及 HLA-DR 和 CD80 表达的调节, 影响 T 细胞的活化、分化及其介导的免疫应答有关<sup>[18]</sup>.

另外, 相关性分析的结果表明 IL-12 的水平是与病理评分以及血清淀粉酶都存在正相关的关系. 血清淀粉酶作为诊断 AP 的重要指标, 虽然水平高低与胰腺病变的轻重程度不成比例, 但针对淀粉酶水平的动态观察对判断疾病轻重程度尚有一定价值. IL-12 与血清淀粉酶存在正相关 ( $P < 0.05$ ),  $r = 0.323$ . 通过动态观察血清 IL-12 的水平可能可以了解胰腺病变的动态变化. 另外, IL-12 与胰腺病理评分的相关系数为  $r = 0.603$  ( $P < 0.001$ ), 说明 IL-12 的血清浓度高低是与胰腺的病变程度密切相关, 早期测定血清 IL-12 水平可以作为预测 AP 病变严重程度的指标. 另外, 我们也注意到了 IL-12 浓度与 IL-6 浓度无相关, 这可能与 ANP 发生发展中, 炎性递质和细胞因子呈网络反应而导致细胞因子浓度升高早晚不一有关.

#### 4 参考文献

- 1 Raraty MG, Connor S, Criddle DN, Sutton R, Neoptolemos JP. Acute pancreatitis and organ failure: pathophysiology, natural history, and management strategies. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:99-103
- 2 杨家和, 钱其军, 吴孟超, 郭亚军. 白介素 12: 重要的免疫调节因子. *世界华人消化杂志* 1999;7:71-72
- 3 Bhatia M. Novel therapeutic targets for acute pancreatitis and associated multiple organ dysfunction syndrome. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002;1:343-351
- 4 尚宏清, 李非, 张再兴, 孙家邦. 分次大剂量 L-精氨酸腹腔内注射致大鼠急性坏死性胰腺炎模型的研究. *首都医科大学学报* 2000;21:322-324
- 5 谭至柔, 唐国都, 姜海行, 邓德海, 袁海峰. 抗氧化剂对急性胰腺炎大鼠核因子- $\kappa$ B 和一氧化氮合酶的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12:711-713
- 6 Kusske AM, Rongione AJ, Ashley SW, McFadden DW, Reber HA. Interleukin-10 prevents death in lethal necrotizing pancreatitis in mice. *Surgery* 1996;120:284-288
- 7 Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lausen M, Ruckauer K, Andreesen R, Farthmann EH, Scholmerich J. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1991;101:782-785
- 8 Jiang CF, Shiao YC, Ng KW, Tan SW. Serum interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and C-reactive protein in early prediction of severity of acute pancreatitis. *J Chin Med Assoc* 2004;67:442-446
- 9 王昌成, 马兴刚, 徐淮, 朱九成, 王建营, 陈刚英. 血清 IL-6、IL-8 和 TNF- $\alpha$  在早期诊断重症急性胰腺炎中的价值. *中华急诊医学杂志* 2001;10:252-253
- 10 王健, 易继林. 白介素-10 治疗急性胰腺炎的实验研究. *中国危重病急救医学* 2002;14:371-374
- 11 Warzecha Z, Dembinski A, Ceranowicz P, Konturek SJ, Tomaszewska R, Stachura J, Konturek PC. IGF-1 stimulates production of interleukin-10 and inhibits development of caerulein-induced pancreatitis. *Physiol Pharmacol* 2003;54:575-590
- 12 Chen ZQ, Tang YQ, Zhang Y, Jiang ZH, Mao EQ, Zou WG, Lei RQ, Han TQ, Zhang SD. Adenoviral transfer of human interleukin-10 gene in lethal pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004;10:3021-3025
- 13 Sweeney KJ, Kell MR, Coates C, Murphy T, Reynolds JV. Serum antigen (s) drive the proinflammatory T cell response in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2003;90:313-319
- 14 Uehara S, Gothoh K, Handa H, Tomita H, Tomita Y. Immune function in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:363-370
- 15 张群华, 蔡端, 吴树强, 姜永峰, 侯兰娣, 张延龄. 急性坏死性胰腺炎大鼠的炎性递质变化和生长抑素的作用. *中华医学杂志* 1997;77:355-358
- 16 Pezzilli R, Miniero R, Cappelletti O, Barakat B. Behavior of serum interleukin 12 in human acute pancreatitis. *Pancreas* 1999;18:247-251
- 17 艾迎春, 韩桂华, 郭公新, 陈福军. IL-8 和 IL-12 与急性胰腺炎分类的探讨. *黑龙江医药科学* 2004;27:34-35
- 18 姚婷, 王书奎, 陈军, 姚堃, 秦浚川, 季晓辉. M-CSF、IL-10 对单核细胞 IL-12、IL-18 产生及 HLA-DR 和 CD80 表达的影响. *细胞与分子免疫学杂志* 2004;20:67-69

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 人内皮抑素 endostatin 基因的融合表达纯化及活性测定

杨芳, 何援利, 刘芸

杨芳, 何援利, 南方医科大学珠江医院妇产科 广东省广州市 510282  
刘芸, 中山大学生命科学院医药分子生物学实验室 广东省广州市 510275  
杨芳, 女, 1975-09-18 生, 山西省高平市人, 汉族. 主治医师, 2002 年南方医科大学硕士生, 主要从事肿瘤治疗的研究.  
广东省科技厅科技计划项目资助课题, No. 2003B30502  
通讯作者: 何援利, 510282, 广东省广州市工业大道中 253 号, 南方医科大学珠江医院妇产科. fangfangy2003@yahoo.com.cn  
电话: 020-61643361  
收稿日期: 2005-03-22 接受日期: 2005-04-08

## Fusion expression and purification of human endostatin gene and its activity analysis

Fang Yang, Yuan-Li He, Yun Liu

Fang Yang, Yuan-Li He, Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China  
Liu Yun, Laboratory of Medicine and Molecular Biology, Life Science School of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, Guangdong Province, China  
Supported by the Science and Technology Project of Guangdong Province, No.2003B30502  
Correspondence to: Yuan-Li He, Department of Obstetrics and Gynecology, Zhujiang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. fangfangy2003@yahoo.com.cn  
Received: 2005-03-22 Accepted: 2005-04-08

## Abstract

**AIM:** To procure human endostatin fusion protein with biological activity.

**METHODS:** The total RNA was extracted from fetal liver and amplified to acquire human endostatin gene by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Then the obtained gene was cloned into expression vector pTRX and transformed into *E.coli* BL21 (DE3). Endostatin was expressed in the *E.coli* by IPTG inducement, and then purified. MTT assay was used to detect the inhibitory activity of endostatin on human umbilical vein endothelial cells (ECV304).

**RESULTS:** One band with a length of 573 bp was showed after electrophoresis of RT-PCR product. After the obtained gene was transformed into *E.coli* DH5 $\alpha$ , the positive clone was identified by *KpnI* and *NotI* digestion and its sequence was identified by sequencing. The pTRX-endo expression vector was successfully constructed and expressed in *E.coli* BL21 (DE3). SDS-PAGE analysis showed that the expressed endostatin was the right one. It had good

biological activity after purification. The growth of ECV304 cells was markedly inhibited by endostatin in a dose-dependent manner, and ED<sub>50</sub> was 550  $\mu$ g/L.

**CONCLUSION:** Human endostatin gene is successfully expressed in the prokaryotic expressing vector pTRX, and human endostatin protein can inhibit the proliferation of ECV 304 cells.

**Key Words:** Human endostatin gene; Fusion expression; Activity; Reverse transcription polymerase chain reaction; MTT assay

Yang F, He YL, Liu Y. Fusion expression and purification of human endostatin gene and its activity analysis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(13):1554-1557

## 摘要

**目的:** 获得有活性的人内皮抑素(endostatin)融合蛋白。

**方法:** 从人胎肝组织中提取总 RNA, 经逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)扩增出 endostatin 基因, 定向克隆重组入 pTRX 表达载体, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), IPTG 诱导表达, 纯化, MTT 法测定 endostatin 蛋白对人脐带静脉血管内皮细胞的抑制活性。

**结果:** RT-PCR 获得 endostatin 基因, 扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上显示为 1 条扩增条带, 约 573 bp, 与预计大小一致。将 PCR 产物连入 PGEM-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 阳性克隆经 *KpnI*, *NotI* 酶切鉴定、测序验证。构建 pTRX-endo 表达载体, 在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达, 经 SDS-PAGE 分析, 出现特异性蛋白质条带, 大小与预期相符合。重组蛋白经纯化, MTT 法测定重组人内皮抑素蛋白具有生物学活性。人脐带静脉血管内皮细胞(ECV304)受到明显抑制, 具有剂量依赖抑制关系, ED<sub>50</sub> = 550  $\mu$ g/L。

**结论:** 人内皮抑素基因在原核细胞表达载体 pTRX 中获得成功表达, 表达蛋白能够抑制人脐带静脉血管内皮细胞(ECV304)的增殖。

**关键词:** 人内皮抑素基因; 融合表达; 活性; 逆转录-聚合酶链反应; MTT 法

杨芳, 何援利, 刘芸. 人内皮抑素 endostatin 基因的融合表达纯化及活性测定. *世界华人消化杂志* 2005;13(13):1554-1557  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1554.asp>

## 0 引言

恶性肿瘤治疗一直是困扰医学界的一大难题. 现有的放化疗及手术治疗虽有一定的临床效果, 但副作用大、复发率高. 目前抑制肿瘤血管生成已成为肿瘤治疗学研究的新热点<sup>[1-6]</sup>. 血管生成抑制因子—内皮抑素(endostatin)能有效地抑制血管内皮细胞的增殖, 抑制血管生成和肿瘤的生长与转移, 而且具有低毒性、可长期应用等特点<sup>[7-12]</sup>. 为了研究人内皮抑素用于肿瘤治疗的可行性, 我们进行了人内皮抑素的表达及活性研究.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、DNA 分子大小标准、反转录试剂盒购自大连宝生物公司; 中分子质量蛋白标准购自华美生物技术公司; IPTG 购自上海 Sangon 公司; Trizol 试剂购自 Gibco 公司; PGEM-T 载体系统购自 Promega 公司; 质粒提取及凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司. 融合表达质粒 pTRX 由中山大学医药分子实验室构建, 宿主菌大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , BL21 (DE3)、人脐带静脉血管内皮细胞 (ECV304) 由中山大学医药分子实验室保存, 肠激酶由中山大学医药分子实验室自制, 肝细胞来源于本院引产胎儿肝脏. 引物根据 GenBank 中报告的 endostatin 序列设计而成. 上下游引物 5' 端分别携带 *Kpn*I、*Not*I 酶切位点, 由上海博亚生物工程公司合成. 上游引物: 5' -GGGGTACCGACGACGACGACAAACACAGCCACCGCGACTTCC-3' 下游引物 5' GTCATGCGGCGCTTACTACTTGGAGGCAGTCATGAAGC-3'. 测序由上海博亚生物工程公司完成.

**1.2 方法** 将液氮冻存的新鲜胎肝组织约 100 mg 加入研钵中, 倒入少许液氮, 尽力研磨使其成为粉末状. Trizol 一步法提取总 RNA, 反转录按 Takara 试剂盒说明书操作. 反转录引物为试剂盒提供的 Oligo dT. 反转录合成第一链后, 加入 PCR 扩增引物. 引物 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 将上述 PCR 产物取 2  $\mu$ L 在 10 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳鉴定, 其余部分胶

回收. 将上述回收的 PCR 产物以 4:1 的分子比率连入 PGEM-T 载体, 在 16 $^{\circ}$ C 下进行 16 h 连接反应, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 对所获克隆扩大培养, 提取质粒并经 *Kpn*I、*Not*I 酶切鉴定. 将带有插入片段的重组质粒命名为 PGEM-Tendo. 将含有重组质粒的 PGEM-Tendo 阳性克隆扩大培养, 大量提取质粒, 分别以 T7、SP6 为测序引物进行全自动正、反向测序, 测序由上海博亚生物工程公司完成. 将所得序列与 GenBank 中有关基因序列相比较. 将 PGEM-Tendo 经 *Kpn*I、*Not*I 双酶切, 回收纯化的 endostatin 片段, 与经 *Kpn*I、*Not*I 切开的线性载体 pTRX 连接, 构建融合表达载体 pTRX-endo. 转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 经 PCR 筛选转化后的克隆, 阳性克隆命名为 pTRX-endo. 提取质粒并经 *Kpn*I、*Not*I 进一步酶切鉴定. 将 pTRX-endo 质粒转化工程菌 BL21 (DE3), 挑取含重组表达质粒的单菌落, 扩大培养, 37 $^{\circ}$ C, IPTG 诱导表达 4 h, 对所收菌和诱导前细菌进行 SDS-PAGE 电泳. 将诱导表达菌体重悬浮, 超声, 取超声上清, 通过 Ni-Chelating Sepharose 亲和层析纯化融合蛋白 Trx-endo, 经 0.1-1.0 mol/L 咪唑梯度洗脱, 收集融合蛋白洗脱峰. 纯化的融合蛋白经肠激酶 (EK) 酶切, 酶切产物上 Ni-Chelating Sepharose 亲和层析柱, 收集穿流峰, 穿流峰通过 SP Sepharos Fast Flow 进一步纯化, 经 0.1-1.0 mol/L NaCl 梯度洗脱, 收集含目的蛋白的洗脱峰. 将体外培养的人脐带静脉血管内皮细胞, 传至第 5 代后, 按 MTT 法进行重组人内皮抑素蛋白活性测定.

## 2 结果

endostatin 基因预计大小为 573 bp (含酶切位点), 扩增产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上显示为 1 条扩增条带, 约 573 bp, 与预计大小基本一致 (图 1). 从阳性克隆提取的质粒用 *Kpn*I、*Not*I 双酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳上可见约为 560 bp 的 endostatin 片段和约为 3 000 bp 的 PGEM-T 载体片段, 此结果说明 endostatin 已成功构建在 PGEM-T 载体上 (图 2). 阳性

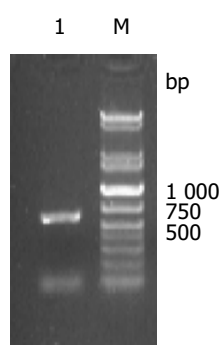


图 1 人 endostatin RT-PCR 扩增产物. M: DNA 标准; 1: RT-PCR 扩增产物.

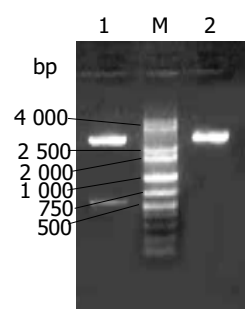


图 2 PGEM-Tendo 的酶切鉴定. M: DNA 标准; 1: PGEM-Tendo 经 *Kpn*I 和 *Not*I 酶切; 2: PGEM-Tendo.

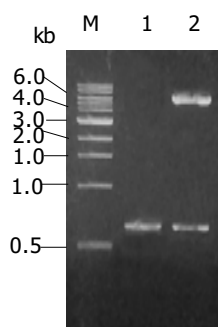


图3 pTRX-endo 的酶切鉴定. M: DNA 标准; 1: PCR 筛选阳性克隆; 2: pTRX-endo 经 *Kpn* I 和 *Not* I 酶切.

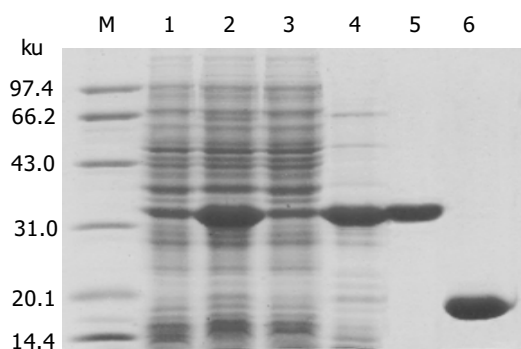


图4 人内皮抑素基因的重组表达与纯化 SDS-PAGE 分析. M: 中分子质量蛋白标准; 1: 诱导前总蛋白; 2: 诱导后总蛋白; 3: 诱导后沉淀; 4: 诱导后上清; 5: Trx-endo 融合蛋白经  $\text{Ni}^{2+}$  chelating sepharose 亲和层析; 6: endostatin 重组蛋白经  $\text{Ni}^{2+}$  chelating sepharose column 和 SP 阳离子交换层析纯化.

克隆经全自动正、反向测序, 所获得目的基因序列与已发表的人 endostatin 基因序列相比基本一致, 该基因的第 471 位氨基酸编码碱基由 G 突变为 A, 但编码的氨基酸都是精氨酸, 与 GenBank 中人内皮抑素蛋白质序列完全一致, 属于沉默突变型. 从阳性克隆提取的质粒用 *Kpn*I, *Not*I 双酶切, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳上可见约为 560 bp 的 endostatin 片段和约为 5 800 bp 的 pTRX 载体片段, 此结果说明 endostatin 已成功构建在 pTRX 载体上(图3). SDS-PAGE 电泳结果表明, 与没有经过 IPTG 诱导的阴性对照相比, 经诱导的基因工程菌在 34 ku 处出现了明显加强的蛋白带, 与预期大小一致(内皮抑素  $M_r$  20 000, pTRX  $M_r$  14 000)(图4). 由于融合蛋白含有 6 × His 亲和纯化标签, 因此首先选择亲和层析进行纯化, SDS-PAGE 结果表明, 纯化的融合蛋白纯度达 85%(图4), 可用于 EK 酶切. 融合蛋白 Trx-endo 经 EK 酶切割后, 需要将 EK 酶、融合伴侣 Trx 和未切割的融合蛋白与 endo 重组蛋白, 根据这些蛋白亲合性、离子性质的差异, 我们选择  $\text{Ni}^{2+}$ -Chelating Sepharose 亲和层析和 SP Sepharose Fast Flow 阳离子交换层析进行纯化, 经上述步骤纯化, 最终可获得纯度在 95% 以上的重组人内皮抑素蛋白(图4). 加入人内皮抑素后, 可见人脐静脉血管内皮

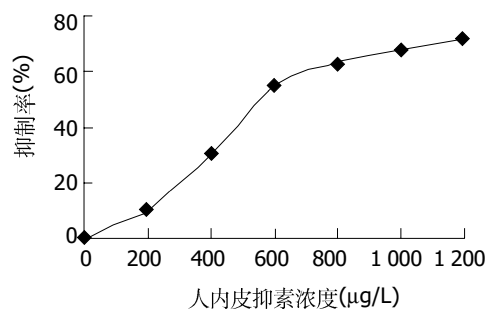


图5 人内皮抑素蛋白抑制 ECV304 细胞生长曲线.

细胞(ECV304)受到明显抑制, 具有剂量依赖抑制关系,  $\text{ED}_{50} = 550 \mu\text{g/L}$ (图5).

### 3 讨论

大量体内外实验证实, 原发性恶性肿瘤细胞中存在多种促进和抑制血管形成的因子, 抑制血管生成治疗可能是限制肿瘤生长和防止转移的有效策略<sup>[13-18]</sup>. 内皮抑素作为存在于体内的天然抗血管生成蛋白, 对正常静止的血管内皮细胞和其他细胞无抑制作用, 能够特异性地作用于新生血管内皮细胞而不是肿瘤细胞本身, 抗癌谱广泛, 是目前最有前景的肿瘤治疗候选药物之一<sup>[19-22]</sup>. 因内皮细胞遗传性状稳定, 不易发生突变, 以内皮细胞作为治疗靶点既可提高治疗的专一性和安全性, 又大大减少了耐药性的出现<sup>[23-25]</sup>. 内皮抑素的蛋白治疗在国外已进入II期临床试验阶段.

内皮抑素为胶原 XVIII C 末段的一个片段, 由 184 个氨基酸组成,  $M_r$  约 20 000, 在内皮抑素的序列中存在着锌离子结合位点, 由其 N 末端 1、3、11 三个组氨酸残基和 76 位的天门冬氨酸残基构成. N 末端与锌离子结合成 1:1 的复合物, 是内皮抑素活性所必须<sup>[26-30]</sup>. 我们所用的原核细胞融合表达载体 pTRX 由中山大学医药分子实验室构建, 以 T7 为启动子, 细菌硫氧还蛋白 TRX 为担体蛋白, 具有 6 × His 纯化标签, 硫氧还蛋白和目的蛋白之间有柔韧性区和肠激酶酶切位点,  $M_r$  14 000. 我们根据 GenBank 中人胶原 XVIII 的基因序列及融合表达载体 pTRX 的特点, 设计了人 endostatin 的序列引物. 上游带有 *Kpn* I 酶切位点、肠激酶酶切位点, 下游引物带有 *Not* I 酶切位点和 TTACTA 强终止密码子. 测序结果表明序列虽第 471 位氨基酸编码碱基由 G 突变为 A, 但与 GenBank 中人内皮抑素蛋白质序列完全一致, 属于沉默突变型, 不影响后续表达. 利用 pTRX 载体, 我们成功地构建了融合蛋白表达质粒 pTRX-endo, 通过 IPTG 诱导了重组融合蛋白 pTRX-endo 的表达, 并利用 pTRX 含有 6 × His 亲和纯化标签和 endostatin 离子特性, 进行重组融合蛋白和重组人内皮抑素的纯化. 经体外实验证实, 纯化的



人内皮抑素蛋白可明显抑制 ECV304 细胞的增殖, 并存在剂量效应关系。

#### 4 参考文献

- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285:1182-1186
- Dudek AZ, Pawlak WZ, Kirshtein MN. Molecular targets in the inhibition of angiogenesis. *Expert Opin Ther Targets* 2003;7: 527-541
- Fishman M, Antonia S. Novel therapies for renal cell carcinoma-an update. *Expert Opin Investing Drugs* 2003;12:593-609
- Wang ZQ, Li JS, Lu GM, Zhang XH. The correlation study of CT enhancement, intratumoral microvessel density and pathological grades in pancreatic carcinoma. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2003;83:1882-1886
- Morioka H, Weissbach L, Vogel T, Nielsen GP, Faircloth GT, Shao L, Hornicek FJ. Antiangiogenesis treatment combined with chemotherapy produces chondrosarcoma necrosis. *Clin Cancer Res* 2003;9:1211-1217
- Qin RY, Fang RL, Gupta MK, Liu ZR, Wang DY, Chang Q, Chen YB. Alteration of somatostatin receptor subtype 2 gene expression in pancreatic tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2004;10:132-135
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: An endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997;88:277-285
- Hu TH, Huang CC, Wu CL, Lin PR, Liu SY, Lin JW, Chuang JH, Tai MH. Increased endostatin/collagen XVIII expression correlates with elevated VEGF level and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 2005;18:663-672
- Folkman J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS* 2004; 112:496-507
- Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, Mandeli J, Woo SL. Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4802-4807
- Dixelius J, Larsson H, Sasaki T, Holmqvist K, Lu L, Engstrom A, Timpl R, Welsh M, Claesson-Welsh L. Endostatin-induced tyrosine kinase signaling through the Shb adaptor protein regulates endothelial cell apoptosis. *Blood* 2000;95:3403-3411
- Eriksson K, Magnusson P, Dixelius J, Claesson-Welsh L, Cross MJ. Angiostatin and endostatin inhibit endothelial cell migration in response to FGF and VEGF without interfering with specific intracellular signal transduction pathways. *FEBS Lett* 2003;536:19-24
- Ren B, Hoti N, Rabasseda X, Wang YZ, Wu M. The antiangiogenic and therapeutic implications of endostatin. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2003;25:215-224
- Nakashima Y, Yano M, Kobayashi Y, Moriyama S, Sasaki H, Toyama T, Yamashita H, Fukai I, Iwase H, Yamakawa Y, Fujii Y. Endostatin gene therapy on murine lung metastases model utilizing cationic vector-mediated intravenous gene delivery. *Gene Ther* 2003;10:123-130
- Liang ZH, Wu PH, Li L, Xue G, Zeng YX, Huang WL. Inhibition of tumor growth in xenografted nude mice with adenovirus-mediated endostatin gene comparison with recombinant endostatin protein. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:1809-1814
- Yu J, Tian S, Metheny-Barlow L, Chew LJ, Hayes AJ, Pan H, Yu GL, Li LY. Modulation of endothelial cell growth arrest and apoptosis by vascular endothelial growth inhibitor. *Circ Res* 2001;89:1161-1167
- Yamanaka R, Tanaka R. Gene therapy of brain tumor with endostatin. *Drugs Today (Barc)* 2004;40:931-934
- Su SJ, Yeh TM, Chuang WJ, Ho CL, Chang KL, Cheng HL, Liu HS, Cheng HL, Hsu PY, Chow NH. The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2005;69:307-318
- Lee CH, Wu CL, Shiau AL. Endostatin gene therapy delivered by Salmonella Choleraesuis in murine tumor models. *J Gene Med* 2004;6:1382-1393
- Dkhissi F, Lu H, Soria C, Opolon P, Griscelli F, Liu H, Khattar P, Mishal Z, Perricaudet M, Li H. Endostatin exhibits a Direct antitumor effect in addition to its antiangiogenic activity in colon cancer cells. *Hum Gene Ther* 2003;14:997-1008
- Zhang M, Wang L, Wang HW, Pan X, Pan W, Qi ZT. Effect of N-terminal deletion on biological activity of vascular endothelial cell growth inhibitor. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2003;35:133-137
- Yao HC, Jin DJ, Sun YN, Ren MH, Li XD. Endostatin in the treatment of the transplantable model of human laryngeal squamous carcinoma in nude mice. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Zazhi* 2004;39:394-398
- Indraccolo S. Undermining tumor angiogenesis by gene therapy: an emerging field. *Curr Gene Ther* 2004;4:297-308
- Konouchi H, Asaumi J, Yanagi Y, Shigehara H, Hisatomi M, Matsuzaki H, Kishi K. Evaluation of tumor proliferation using dynamic contrast enhanced-MRI of oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003; 39:290-295
- Noguchi N, Kawashiri S, Tanaka A, Kato K, Nakaya H. Effects of fibroblast growth inhibitor on proliferation and metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2003; 39:240-247
- Ding YH, Javaherian K, Lo KM, Chopra R, Boehm T, Lanciotti J, Harris BA, Li Y, Shapiro R, Hohenester E, Timpl R, Folkman J, Wiley DC. Zinc-dependant dimers observed in crystals of human endostatin. *Proc Natl Sci USA* 1998;95:10443-10448
- Folkman J. Endogenous angiogenesis inhibitors. *APMIS* 2004; 112:496-507
- John H, Radtke K, Standker L, Forssmann WG. Identification and characterization of novel endogenous proteolytic forms of the human angiogenesis inhibitors restin and endostatin. *Biochim Biophys Acta* 2005;47:161-170
- Su SJ, Yeh TM, Chuang WJ, Ho CL, Chang KL, Cheng HL, Liu HS, Cheng HL, Hsu PY, Chow NH. The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2005;69:307-318
- Pufe T, Petersen WJ, Miosge N, Goldring MB, Mentlein R, Varoga DJ, Tillmann BN. Endostatin/collagen XVIII--an inhibitor of angiogenesis--is expressed in cartilage and fibrocartilage. *Matrix Biol* 2004;23:267-276

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 人谷氧还蛋白基因的分子克隆及表达

张春晶, 周宏博, 邹朝霞, 董 钦, 于海涛

张春晶, 于海涛, 齐齐哈尔医学院生化教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161042  
周宏博, 邹朝霞, 董钦, 哈尔滨医科大学大学生化教研室  
黑龙江省哈尔滨市 150086

张春晶, 女, 1973 年生, 黑龙江省齐齐哈尔人, 硕士, 主要从事生物化学与分子生物学方面的研究。

黑龙江省自然科学基金项目, No. D2004-05

通讯作者: 周宏博, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路 157 号, 哈尔滨医科大学大学生化教研室. zhouhongbo6704@yahoo.com.cn

电话: 0451-86671684

收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-06

## Molecular cloning and expression of human glutaredoxin gene

Chun-Jing Zhang, Hong-Bo Zhou, Chao-Xia Zou, Qin Dong, Hai-Tao Yu

Chun-Jing Zhang, Hai-Tao Yu, Department of Biochemistry, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161042, Heilongjiang Province, China  
Hong-Bo Zhou, Chao-Xia Zou, Qin Dong, Department of Biochemistry, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D2004-05

Correspondence to: Hong-Bo Zhou, Department of Biochemistry, Harbin Medical University, 157 Baojian Road, Nangang District, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. zhouhongbo6704@yahoo.com.cn

Received: 2005-04-15 Accepted: 2005-05-06

## Abstract

**AIM:** To clone and sequence glutaredoxin (Grx) cDNA from human umbilical endothelium cells, and to express it in *E.coli* BL21 (DE3).

**METHODS:** The total RNA was extracted from human umbilical endothelium cells. Grx cDNA was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and then cloned into pRSETA vector to construct recombinant pRSET-Grx. The products were transformed into *E.coli* (JM109). The positive transformant was identified by bacterium-specific PCR and digestion of restriction endonucleases. The positive clones were purified and sequenced, then transfected into *E.coli* BL21 (DE3). The expression of Grx was induced by IPTG.

**RESULTS:** Compared the cDNA sequence we obtained with that in GenBank (NM002064), there was one difference in the base pairs, but the amino acid sequence was identical. The recombinant Grx was expressed after induced by IPTG for 4-5 hours, and the apparent  $M_r$ 16000 were confirmed by 150 g/L SDS-PAGE.

**CONCLUSION:** Recombinant human Grx gene was successfully cloned and expressed in *E.coli*.

**Key Words:** Molecular cloning; Glutaredoxin; Human umbilical endothelium cells

Zhang CJ, Zhou HB, Zou CX, Dong Q, Yu HT. Molecular cloning and expression of human glutaredoxin gene. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(13):1558-1561

## 摘要

**目的:** 克隆人脐静脉内皮细胞谷氧还蛋白(glutaredoxin, Grx)编码区的 cDNA 序列并进行序列测定, 构建原核表达载体并在大肠杆菌 BL21(DE3)中表达。

**方法:** 从人脐静脉内皮细胞中提取总 RNA, 采用 RT-PCR 技术, 获得该基因编码区的 cDNA, 并重组入原核克隆表达载体 pRSETA, 构建重组质粒 pRSET-Grx, 通过菌落 PCR 筛选及限制性内切酶鉴定, 选择阳性克隆并测序。将测序正确的重组质粒 pRSET-Grx 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 用 IPTG 诱导表达。

**结果:** 将所得序列与 GenBank 提供的序列(NM002064)比较, 测出的序列在核苷酸序列上有一处碱基不同, 但在氨基酸序列上与已知序列一致。经 IPTG 诱导 4-5 h 后, 150 g/L SDS-PAGE 分析, 表达出  $M_r$ 16000 的蛋白。

**结论:** 从人脐静脉内皮细胞中成功地获得 Grx 编码区的 cDNA, 成功构建了原核融合表达载体 pRSET-Grx 并获得表达。

**关键词:** 分子克隆; 谷氧还蛋白; 人脐静脉内皮细胞

张春晶, 周宏博, 邹朝霞, 董钦, 于海涛. 人谷氧还蛋白基因的分子克隆及表达. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1558-1561  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1558.asp>

## 0 引言

谷氧还蛋白(glutaredoxin, Grx), 又称巯基转移酶(thioltransferase), 是广泛存在于原核、真核生物中的一种小分子蛋白质,  $M_r$ 11800<sup>[1]</sup>. Grx 是一种多效性细胞因子, 具有多种生物学功能, 如核糖核苷酸还原酶的辅酶、脱氢抗坏血酸还原酶活性、参与氧化应激作用、抗凋亡作用等<sup>[2-4]</sup>. 日前, Grx 在体内具有广泛的抗氧化作用已很肯定. Grx 系统参与维持细胞

的氧化还原状态, 提供细胞质内的还原环境; Grx 系统对活性氧导致的细胞氧化应激损伤有阻抗和治疗的作用, 即 Grx 可通过恢复细胞中一些含有半胱氨酸残基的抗氧化蛋白和转录因子的活性来阻抗氧化应激损伤<sup>[5]</sup>. 另外 Grx 的抗氧化作用还表现在他的基因表达在细胞受到氧化应激之后增加, 目前已经有 Grx 在心血管疾病、脑血管疾病、白内障等病理状态下高表达的报道<sup>[6-9]</sup>. 由此可见, Grx 的清除自由基和抗氧化作用, 使其在治疗心脑血管等器官缺血再灌注损伤性疾病上有重要价值. Grx 因其能作为一种自由基清除剂减少自由基对组织细胞的损伤, 近年来已成为国际上研究的热点. 由于脐静脉内皮细胞是心血管系统中受氧化应激作用的第一层屏障, 易受到氧化应激损伤, 而脐静脉内皮细胞中 Grx 的克隆表达及是否参与氧化应激调控作用的研究尚属空白. 因此我们根据 GenBank 提供的人 Grx 编码区的 cDNA 序列, 应用 RT-PCR 方法成功克隆获得人脐静脉内皮细胞 Grx 编码区 cDNA 基因, 并进行了序列测定分析和初步表达, 为进一步研究 Grx 的功能及其与氧化应激的关系奠定了基础.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人脐静脉内皮细胞 (ECV304), 购自中国典型培养物保藏中心; Trizol, RNA 提取 Kit, 限制性内切酶 RT-PCR 试剂盒 (逆转录酶 Kit), T4 连接酶, 快速连接<sup>TM</sup> 试剂盒, Tag 酶, pRSETA 载体购于 Invitrogen 公司; DNA Marker  $\phi$  X174, DL15 000, 质粒提取 Kit 购自 Promega 公司; 小量胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; 大肠杆菌 JM109 和 BL21 (DE3) 由本室储存; 引物由上海博亚生物技术公司合成.

**1.2 方法** 按 GenBank 发表的人 Grx 基因开放阅读框 (ORF) 全长序列, 用 Primer 5.0 软件设计上游引物 5'-CTGGATCCGGCATGGCTCAAGAGTT-3', 5' 端设有 *Bam*H I 酶切位点; 下游引物 5'-CGGAATTCGGGCTGTTCTGTGGTTACTG-3', 5' 端设有 *Eco*R I 酶切位点. 将人脐静脉内皮细胞按常规培养在含 100 mL/L 新生牛血

清的 RPMI1640 培养基中, 于 37℃, 含 50 mL/L 二氧化碳条件下培养, 当细胞生长旺盛并贴壁后, 0.2 g/L EDTA 消化, 重新悬浮细胞接种于 25 mL 培养瓶中, 待细胞融合, 用于实验. 按 RNA 提取 Kit 说明书操作, 得到总 RNA, 并经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定. RT-PCR 扩增按逆转录酶 Kit 说明书操作, 用锚定引物 Oligo (dT) 20 反转录合成第一条链. 将所获得的 cDNA 片段, 置 -20℃ 或 -70℃ 冻存备用. 取逆转录产物进行常规 PCR 扩增, 扩增参数为 94℃, 2 min; 94℃, 30 s; 57℃, 30 s; 72℃, 45 s; 30 个循环后, 72℃ 延伸 10 min. 琼脂糖凝胶电泳分析 RT-PCR 结果.

将扩增的 PCR 产物用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后, 用小量胶回收试剂盒回收. 将质粒 pRSETA 双酶切后的回收产物做 CIP 处理并回收. 然后按载体: 目的基因 = 1:3 连接线性质粒载体 pRSETA 和人 Grx 基因片段. 连接产物转化用  $\text{CaCl}_2$  法制备的感受态 *E. coli* JM109 细胞, 并将转化菌涂在含有 Amp<sup>+</sup> 的琼脂糖平板上, 37℃ 倒置培养. 挑取单克隆菌落培养, 先经 PCR 鉴定再提取质粒 DNA 用限制性内切酶 *Bam*H I, *Eco*R I 双酶切鉴定. 将含有重组质粒的菌液送到上海生工生物工程技术有限公司进行目的基因单项序列测定. 把构建得到的重组 pRSET-Grx 质粒转化到宿主菌 BL21 (DE3) 上, 在 100 mg/L 的 LB 培养基中, 37℃ 倒置培养, 在 OD<sub>600</sub> 达到 0.7 时, 加入 IPTG 至 0.5 mmol/L, 并在 37℃ 诱导 4-5 h, 以 150 g/L SDS-PAGE 鉴定表达产物.

## 2 结果

根据核糖体 RNA 的电泳条带判断 RNA 的提取质量. 图 1 中可见 28S 和 18S RNA 条带亮度显示抽提的总 RNA 纯度很高. 28S:18S = 2:1, 表明 RNA 无降解, 并利用核酸计算器测得  $A_{260}/A_{280} = 1.85$ , 浓度为 162 g/L. PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并以 PCR Marker ( $\phi$ X174) 为分子标准参照物, 可见 PCR 产物约在 392bp 和 341 bp 之间 (图 2), 与预期 370 bp 的目的片段位

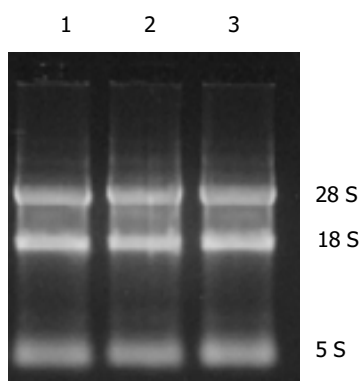


图1 总 RNA 提取.

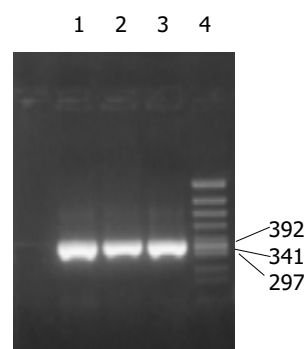


图2 Grx 基因的 PCR 扩增. 1-3: PCR product; 4: PCR Marker (1057, 770, 612, 495, 392, 341, 297, 210 bp fragment, from top to bottom).

置基本一致. 克隆构建的重组质粒命名为 pRSET-Grx. 理论上重组质粒应为 3 230 bp, 双酶切可得到 2 860 bp, 370 bp 两个片段. 采用 PCR 方法扩增阳性克隆后双酶切鉴定, 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳(图 3)显示, *Bam*H I, *Eco*R I 双酶切后重组质粒切出两条带, 切出片段大小均与理论值相符, 系阳性克隆.

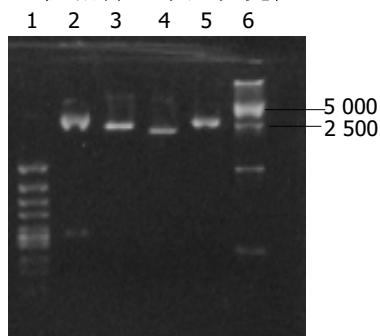


图3 重组质粒 pRSET-Grx 酶切鉴定. 1: PCR Marker; 2: pRSET-Grx digested with *Bam*H I + *Eco*R I; 3: undigested pRSET-Grx; 4: undigested pRSETA; 5: pRSETA digested with *Bam*H I + *Eco*R I; 6: plus-mid Marker.

**2.1 人脐静脉内皮细胞 Grx 基因序列测定** 测定的基因序列长 370 bp, ORF 为 320 bp, 部分序列测序图谱结果见图4. 用 Dnasis 和 Pmsis 软件程序与 GenBank Data Base 中发表的人 Grx 基因序列进行同源性分析比较, 同源性为 99.7%, 碱基序列只有 1 处不同, 即 <sup>240</sup>T-C(前者为人皮肤细胞 Grx 基因), 但相应氨基酸序列(Ile)没有发生改变.

**2.2 重组 pRSET-GRX 质粒在大肠杆菌中的表达** 将筛选的重组克隆子转化大肠杆菌 BL21(DE3), 获得重组表达菌株, 经 0.5 mmol/L IPTG, 37°C 诱导培养 4-5 h, 其 150 g/L SDS-PAGE 结果(图 5)可见, 表达产物的  $M_r$  16000. 由于人的谷氧还蛋白含 107 个氨基

酸,  $M_r$  11800, 由于 pRSET-Grx 表达载体 5' 端带有用于表达蛋白纯化的多聚 His 标签, 维持目的基因稳定转录的 T7 噬菌体基因 10 起动子、用于表达抗体检测的抗原决定基因及肠激酶裂解识别位点等标记, 因此谷氧还蛋白的融合蛋白的  $M_r$  15840, SDS-PAGE 结果与理论值相符.

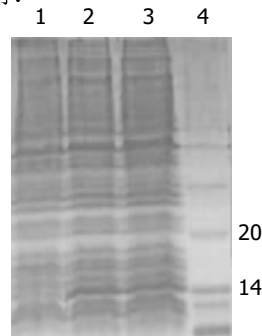
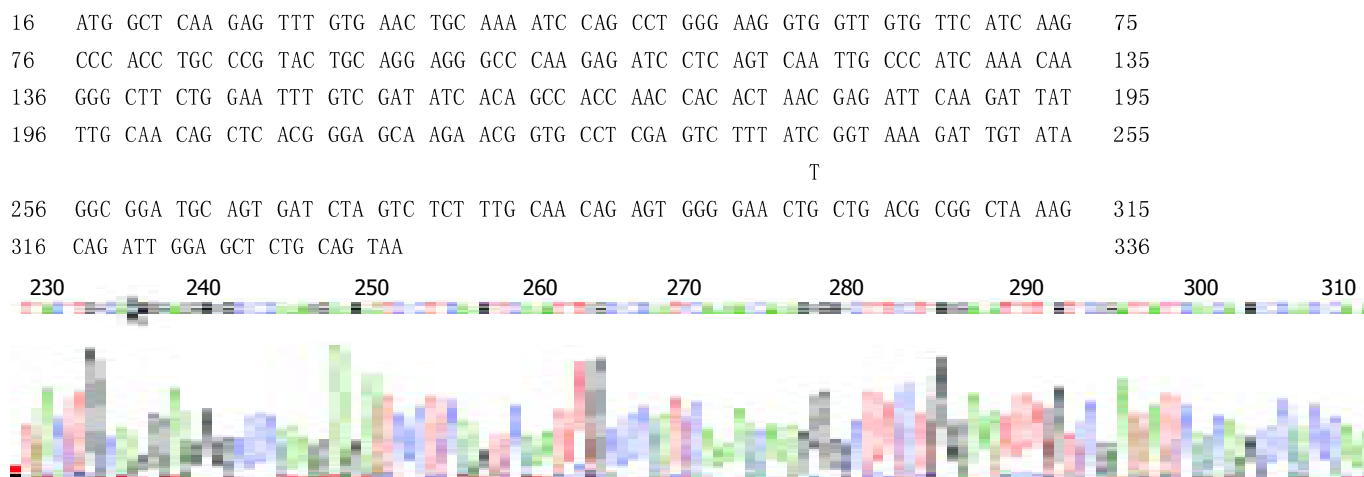


图5 150 g/L SDS-PAGE 分析表达产物. 1: Bacterial sample before induced; 2: Bacterial sample after induced 4 h; 3: Bacterial sample after induced 5 h; 4: Low-range protein molecular weight markers.

### 3 讨论

由于血管内皮细胞具有复杂的生物学功能, 在国内外科医学界逐渐引起重视, 目前研究最多的是脐静脉内皮细胞. 血管内皮细胞具有活跃的分泌与代谢功能, 他在调节血管功能、维持心血管生理稳态中起着重要作用. 血管内皮也是多种心血管疾病或危险因素作用的重要靶器官, 组成人体的脐静脉内皮细胞除受到内源性氧化应激损伤外, 还受到血液系统中的氧化性物质的作用. 血管内皮细胞功能障碍时, 导致 NO 分泌异常, 与高血压、高血脂症、缺血再灌注的损害和动脉粥样硬化等许多心血管疾病的发生发展有密切关系<sup>[10]</sup>.

有文献报道, 在活性氧引起的损伤中, 蛋白质氧化损伤先于核酸<sup>[11]</sup>, 蛋白发生羰基化和糖基化,



The No.240 nucleotide T was identified to be substituted with C, either ATC or ATT encodes the same amino acid Ile.

图4 人脐静脉内皮细胞 Grx 编码区的 cDNA 序列.

从而失去生物活性. 已有研究证明, 关于蛋白活性的修复, 除机体内小分子物质发挥作用外, 主要依赖于巯基-二硫键氧化还原酶家族, 而Grx是这个家族的重要组分<sup>[12]</sup>, 他是利用GSH作为辅酶来催化体内氧化状态的蛋白质上的二硫键还原为巯基, 恢复蛋白质结构和功能, 修复蛋白质活性的抗氧化酶, 对维持体内稳定的氧化还原状态及对活性氧所导致的氧化应激损伤有阻抗和治疗作用<sup>[13]</sup>. 最近研究发现, Grx是机体内能特异、高效的还原谷胱甘肽化蛋白的一种酶蛋白<sup>[14-15]</sup>, Grx特异的恢复氧化应激损伤产生的谷胱甘肽化蛋白活性的能力可能会使其成为热点药物. 目前, 细胞内Grx抵御过氧化氢作用的研究国外已有很多报道<sup>[6-9]</sup>, 但是关于Grx本身抵御过氧化氢作用的研究, 至今未见报道. 因此, 该蛋白的原核克隆、高效表达及观察Grx保护细胞免受氧化应激损伤作用的研究, 将对于人类氧化应激相关疾病的预防和治疗有重要的意义. 目前, 根据本研究的实验结果, 我们正在进行Grx的优化表达、纯化及体外抗氧化活性的研究, 以便为Grx生物学功能研究及今后的临床应用提供重要的理论依据. 另外, 本实验经30个PCR循环, 370 bp的基因序列中有一处碱基与已知序列的不同, 是PCR过程中的错误参入还是人脐静脉内皮细胞中Grx编码区的cDNA序列就是如此, 还有待进一步论证. 但本实验中出现的不同碱基没有影响氨基酸的排序, 因此, 即使是错配也不必去做更正.

#### 4 参考文献

- 1 Holmgren A. Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:2275-2279
- 2 Daily D, Vlamis-Gardikas A, Offen D, Mittelman L, Melamed E, Holmgren A, Barzilai A. Glutaredoxin protects cerebellar granule neurons from dopamine-induced apoptosis by activating NF-kappa B via Ref-1. *J Biol Chem* 2001;276:1335-1344
- 3 Song JJ, Rhee JG, Suntharalingam M, Walsh SA, Spitz DR, Lee YJ. Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 2002;277:46566-46575
- 4 Landino LM, Moynihan KL, Todd JV, Kennett KL. Modulation of the redox state of tubulin by the glutathione/glutaredoxin reductase system. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:555-560
- 5 Bandyopadhyay S, Starke DW, Mieyal JJ, Gronostajski RM. Thioltransferase (glutaredoxin) reactivates the DNA-binding activity of oxidation-inactivated nuclear factor I. *J Biol Chem* 1998;273:392-397
- 6 Prieto-Alamo MJ, Jurado J, Gallardo-Madueno R, Monje-Casas F, Holmgren A, Pueyo C. Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 2000;275:13398-13405
- 7 Ragbavachari N, Krysan K, Xing K, Loum F. Regulation of thioltransferase expression in human lens epithelial cells. *Investg Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1002-1008
- 8 Okuda M, Inoue N, Azumi H, Seno T, Sumi Y, Hirata Ki, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yodoi J, Yokoyama M. Expression of glutaredoxin in human coronary arteries: its potential role in antioxidant protection against atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1483-1487
- 9 Sahlin L, Wang H, Stjernholm Y, Lundberg M, Ekman G, Holmgren A, Eriksson H. The expression of glutaredoxin is increased in the human cervix in term pregnancy and immediately post-partum, particularly after prostaglandin-induced delivery. *Mol Hum Reprod* 2000;6:1147-1153
- 10 Schwartz EA, Bizios R, Medow MS, Gerritsen ME. Exposure of human vascular endothelial cells to sustained hydrostatic pressure stimulates proliferation. Involvement of the alphaV integrins. *Circ Res* 1999;84:315-322
- 11 陈媛, 周玫. 自由基医学基础与病理生理. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:14-35
- 12 Jung CH, Thomas JA. S-glutathiolated hepatocyte proteins and insulin disulfides as substrates for reduction by glutaredoxin, thioredoxin, protein disulfide isomerase, and glutathione. *Arch Biochem Biophys* 1996;335:61-72
- 13 Holmgren A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid Redox Signal* 2000;2:811-820
- 14 Rebrin I, Kamzalov S, Sohal RS. Effects of age and caloric restriction on glutathione redox state in mice. *Free Radic Biol Med* 2003;35:626-635
- 15 Yoshitake S, Nanri H, Fernando MR, Minakami S. Possible differences in the regenerative roles played by thioltransferase and thioredoxin for oxidatively damaged proteins. *J Biochem (Tokyo)* 1994;116:42-46

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

# 单克隆抗体酶联免疫方法检测人血清胰岛素原及其应用

贾恩志, 李爱香, 徐振霞

贾恩志, 南京医科大学第一附属医院心内科 江苏省南京市 210029  
李爱香, 徐振霞, 山东省济宁市第二人民医院急诊科 山东省济宁市 272049  
贾恩志, 男, 1971-01-13 生, 山东省济宁市人, 汉族. 2003 年南京医科大学  
心血管专业博士研究生毕业, 讲师, 主治医师, 主要从事冠心病与胰岛素抵抗  
的研究.

国家自然科学基金资助课题, No. 30400173

通讯作者: 贾恩志, 210029, 江苏省南京市广州路 300 号, 南京医科大学第  
一附属医院心内科. enzhijia@yahoo.com.cn

电话: 025-83718836-6640

收稿日期: 2005-03-31 接受日期: 2005-04-09

## Application of monoclonal antibody-based sandwich enzymeimmunoassay in detection of human serum proinsulin

En-Zhi Jia, Ai-Xiang Li, Zhen-Xia Xu

En-Zhi Jia, Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of  
Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China  
Ai-Xiang Li, Zhen-Xia Xu, Department of Mmergency Medicine, the  
Second People's Hospital of Jining City, Jining 27249, Shandong  
Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.  
30400173

Correspondence to: Dr. En-Zhi Jia, Department of Cardiology, the  
First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029,  
Jiangsu Province, China. enzhijia@yahoo.com.cn

Received: 2005-03-31 Accepted: 2005-04-09

## Abstract

**AIM:** To develop a highly sensitive and specific ELISA to  
detect the human serum proinsulin, and to explore the  
relationship between proinsulin and cardiovascular risk fac-  
tors in a population-based epidemiological study.

**METHODS:** The assay was based on two monoclonal  
antibodies, an anti-C-peptide antibody bound to a microtest  
plate and a biotin-labeled anti-insulin antibody. The biotin-  
avidin ELISA was used to measure the serum proinsulin of  
1196 subjects who aged 35-59 in Pizhou, Jiangsu Province.

**RESULTS:** With a detection limit of 0.83 pmol/L, the ELISA  
covered a standard linear range of 0.83-142 pmol/L, and  
the human insulin and human C-peptide did not cross-  
react at 1 200 and 3 960 pmol/L respectively. The inter-  
and inner-assay coefficient of variation of the ELISA were  
less than 11.4% and 11.2% respectively. The results of  
the population-based epidemiological study indicated that  
the concentration of proinsulin had significantly positive

correlations with body mass index (BMI), waist, systolic  
blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), total  
cholesterol (TCH), triglycerides (TG), low density lipopro-  
tein cholesterol (LDL-C), and cardiovascular risk factors  
clustering and negative association with high density lipo-  
protein cholesterol (HDL-C).

**CONCLUSION:** The monoclonal-based BA-ELISA can be  
used to detect serum proinsulin in the clinical and epide-  
miological study. The mechanism underlying the relation-  
ship between proinsulin and cardiovascular risk factors  
may be related to the fibrinolysis and damages of  $\beta$ -cells.

**Key Words:** Monoclonal antibody; Proinsulin; Risk fac-  
tors clustering

Jia EZ, Li AX, Xu ZX. Application of monoclonal antibody-based  
sandwich enzymeimmunoassay in detection of human serum  
proinsulin. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(13):1562-1566

## 摘要

**目的:** 建立灵敏、特异的检测人血清中胰岛素原的酶  
联免疫吸附试验并应用于临床与流行病学研究.

**方法:** 选择 2 种 mAb 并引入生物素与亲和素放大系统来  
建立酶联免疫分析方法, 一种抗 C 肽 mAb 结合到酶反  
应板上作为固相抗体, 另一种生物素标记的抗胰岛素  
抗体作为液相抗体, 将该检测方法应用于流行病学研  
究 ( $n = 1\ 196$ ).

**结果:** 本法灵敏度 0.83 pmol/L, 与 1 200 pmol/L 胰岛  
素、3 960 pmol/L C 肽无交叉反应, 线性标准范围  
0.83-142 pmol/L. 批内变异系数小于 11.4%, 批间变异  
系数小于 11.2%. 流行病学研究结果显示胰岛素原的含  
量与体重指数、腰围、收缩压、舒张压、胆固醇、三酰  
甘油、低密度脂蛋白胆固醇、危险因素数目呈正相关,  
与高密度脂蛋白胆固醇呈负相关.

**结论:** 本法适用于在临床研究及流行病学研究中检测人  
血清中胰岛素原的含量.  $\beta$  细胞功能受损与纤溶功能的  
紊乱可能是高胰岛素原与心血管危险因素关联的原因.

**关键词:** 单克隆抗体; 胰岛素原; 危险因素聚集

贾恩志, 李爱香, 徐振霞. 单克隆抗体酶联免疫方法检测人血清胰岛素原及其  
应用. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1562-1566  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1562.asp>

## 0 引言

胰岛素原(proinsulin, PI)是胰岛素的前体物质,由胰岛 $\beta$ 细胞分泌,在正常情况下外周循环中的PI占总胰岛素样物质的比例较小,但是在糖尿病<sup>[1]</sup>、冠心病<sup>[2]</sup>等情况下PI呈现与胰岛素不呈比例的高分泌状态.流行病学及临床研究证实外周循环中的PI的浓度与中风<sup>[3]</sup>、高血压<sup>[4]</sup>及其他心血管危险因素<sup>[5]</sup>有较为密切的关系,因此快速、灵敏、特异地检测外周循环中的PI已经成为心脑血管疾病及内分泌疾病研究的必需.我们应用2种mAb建立了经生物素-亲和素放大系统的酶联免疫吸附实验方法来检测PI并应用于临床检测及流行病学研究.

## 1 材料和方法

1.1 材料 PEP-001与HUI-001 mAb由丹麦Novo Nordisk公司馈赠,分别由人C肽(PEP-001)、人胰岛素(HUI-001)免疫BALB/c小鼠并且应用杂交瘤技术获得.抗体获得后应用蛋白A-亲和层析柱纯化后备用. PEP-001抗体与人C肽的亲和力为 $10^{10}$  L/mol,结合位点在其C末端的中部, HUI-001与人胰岛素的亲和力为 $10^9$  L/mol,结合位点为胰岛素B链的C端<sup>[6]</sup>.称取3.4 mg长臂生物素N-hydroxysuccinimidobiotin(BNHS, Sigma H-1759)溶于1 mL二甲基甲酰胺并取60  $\mu$ L加入1 mL HUI-001(1 g/L),在室温中轻微振荡混匀4 h.生物素化的mAb注入透析卡(Pierce 66415)在PBS缓冲液中透析过夜.去离子水由Minipore系统生产来配置缓冲液与试剂.缓冲液A(包被缓冲液)为0.1 mol/L的碳酸盐缓冲液, pH值为9.8.缓冲液B(冲洗液)为0.15 mol/L的氯化钠缓冲液包含1 mL/L的Tween 20.缓冲液C(封闭液)为0.5 g/L的牛血清白蛋白.缓冲液D被用来温育标记抗体和稀释亲和素,为0.04 mol/L的磷酸盐缓冲液加入0.1 mol/L的氯化钠、5 g/L的人血清白蛋白(由上海生物制品研究所提供)、1 mL/L Tween 20, pH值为7.4.缓冲液E(抗原温育液)为0.04 mol/L的磷酸盐缓冲液加入1.0 mol/L的氯化钠、30 g/L人血清白蛋白(由上海生物制品研究所提供)、1 g/L的牛 $\gamma$ 球蛋白(Sigma G7516)、1 mL/L的Tween 20, pH值为7.4.辣根过氧化物酶标记的链球菌亲和素(streptavidin-peroxidase conjugate)为美国Kirkegaard and Perry Labs(KPL)实验室提供,产品编号为14-30-00,加入500 mL/L甘油1 mL溶解亲和素0.5 mg并在-20℃保存,在使用前应用缓冲液D进一步稀释成25  $\mu$ g/L.底物液为四甲基联苯胺/双氧水溶液系统(3', 3', 5', 5'-tetramethylbenzidine/ $H_2O_2$  solution),为美国KPL实验室提供,产品编号为50-76-00,使用前两种溶液等量混匀.

酶标板为丹麦NUNC公司产品,酶标仪为美国Bio-Tek产品,型号为EL900. PI标准品为瑞典Mercodia产品,该标准品由国际人PI参考试剂IRR 84/611校正.

按照随机分层抽样的原则,在江苏省邳州市随机抽取4个乡镇,每个乡镇随机抽取1个村庄,每个村庄随机抽取350名35-59岁的常住居民,抽样1400人,调查人数1265人,有效样本量为1196人,男533人,女663人,平均年龄46.7岁.测量身高(HT, cm)、体重(WH, kg)、腰围(WC, cm)、收缩压(SBP)与舒张压(DBP).按照体重(kg)/身高( $m^2$ )计算体重指数(BMI).全部研究对象空腹检测血糖(FBG, mmol/L)、总胆固醇(TCH, mmol/L)、甘油三酯(TG, mmol/L)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL, mmol/L),所用仪器为Olympus Au2700全自动生化分析仪,试剂为日本第一化学株式会社供应,检测符合实验室质控标准.低密度脂蛋白胆固醇(LDL, mmol/L)按Freidwalds公式计算求得.全部血清标本-20℃保存,分批检测PI.

1.2 方法 包被抗体(PEP-001)在缓冲液A中被稀释成5 mg/L并在酶标板每孔中加入125  $\mu$ L,密封后4℃温育3 d,然后弃去抗体,冲洗液洗涤4次,加入200  $\mu$ L封闭液密封过夜.在使用前洗涤液洗板4次,每孔加入缓冲液E50  $\mu$ L,然后各加入标准品、质控液、标本50  $\mu$ L(皆双孔重复),反应板被密封后4℃过夜.生物素标记的HUI-001在缓冲液D中被稀释成25  $\mu$ g/L,过夜后的反应板被冲洗4次并每孔加入稀释后的HUI-001 100  $\mu$ L,反应板被密封后4℃过夜.反应板被冲洗4次后加入新鲜配置的辣根过氧化物酶标记的链球菌亲和素100  $\mu$ L并室温避光反应1 h,冲洗4次后每孔加入底物液125  $\mu$ L,避光室温反应30 min后每孔加入125  $\mu$ L的4 mol/L的磷酸终止反应.在酶标仪上使用450/620 nm双波长读取吸光度值.定义高血压为:收缩压 $\geq 140$  mmHg和/或舒张压 $\geq 90$  mmHg;正在服用抗高血压药<sup>[7]</sup>.定义高血糖:空腹血糖 $\geq 6.1$  mmol/L;被确诊的糖尿病患者<sup>[8]</sup>.将高胆固醇定义为 $\geq 5.20$  mmol/L;高低密度脂蛋白胆固醇定义为 $\geq 3.38$  mmol/L;高甘油三酯定义为 $\geq 1.70$  mmol/L;低高密度脂蛋白胆固醇定义为 $\leq 1.04$  mmol/L<sup>[9]</sup>.将BMI $\geq 25$  kg/ $m^2$ 定义为超重<sup>[10]</sup>.将向心性肥胖定义为男性腰围 $\geq 85$  cm;女性腰围 $\geq 80$  cm<sup>[11]</sup>.将上述危险因素进行记分,分别研究PI在人群中的分布及与各变量、危险因素聚集的关系.全部使用美国SPSS10.0软件完成.

## 2 结果

2.1 方法学评价 浓度为0, 3.2, 12, 46, 142 pmol/L的标准品的吸光度值分别为0.137, 0.295, 0.597, 1.568与2.679,进行3次方的曲线拟合其决定系数

表1 回收试验结果

标本	浓度(pmol/L)	加入浓度(pmol/L)	期望浓度(pmol/L)	检测浓度(pmol/L)	回收率(%)
I	0.00	3.20	3.20	3.12	97.50
		12.00	12.00	11.35	94.58
		42.00	42.00	44.96	107.05
		120.10	120.10	116.39	96.91
II	1.46	3.20	4.66	4.70	100.86
		12.00	13.46	11.59	86.11
		42.00	43.46	37.62	86.56
		120.10	121.56	114.45	94.15
III	4.09	3.20	7.29	6.75	92.59
		12.00	16.09	14.36	89.25
		42.00	46.09	48.29	104.77
		120.10	124.19	133.20	107.26

( $R^2$ )为1,说明拟合较好.建立的方程为 浓度 =  $-4.3270 + 30.0815 \times \text{吸光度} - 9.7786 \times \text{吸光度}^2 + 7.0687 \times \text{吸光度}^3$  每次检测均利用标准品建立个回归方程.以10次检测的0标准的均值加2个标准差为0.8294 pmol/L.与1200 pmol/L的真胰岛素、3960 pmol/L的C肽无交叉反应.胰岛素原浓度为3.2, 12, 46, 142 pmol/L的标准品批间重复10次的变异系数分别为11.2%, 7.4%, 8.15%, 10.24%;浓度为1.47, 4.42, 4.27 pmol/L的标本批内重复8次的变异系数分别为11.4%, 6.55%与5.17%.分别在胰岛素原含量为0, 1.46与4.09 pmol/L的标本中加入浓度为3.2, 12.0, 42.0与120.10 pmol/L的标准品,其回收率(%)见表1.分别取6份胰岛素含量相对高的标本倍比稀释,结果显示测得值与期望值非常接近(表2).

表2 稀释试验结果

标本	稀释倍数	理论值(pmol/L)	检测值(pmol/L)	回收率(%)
I	1:1	19.20	19.20	100
	1:2	10.60	12.23	115.38
	1:3	6.4	6.83	106.72
	1:4	4.8	5.30	110.42
	1:5	3.84	4.21	109.64
II	1:1	16.92	16.92	100
	1:2	8.46	8.92	105.44
	1:3	5.64	5.23	92.73
	1:4	4.23	4.24	100.24
	1:5	3.38	3.67	108.58
III	1:1	33.53	33.53	100
	1:2	16.77	17.08	101.85
	1:3	11.18	11.84	105.90
	1:4	8.38	9.67	115.39
	1:5	6.71	7.30	108.79

2.2 PI在人群中的分布 对上述研究标本分批检测,研究PI在人群中的分布(表3).因PI不呈正态分布,故以中位数(四分位间距)进行表示,对资料进行对数转换后应用成组资料的 $t$ 检验与单因素方差分析研究不同性别、不同年龄组的分布有无差别.男性PI在各年龄组间的分布无显著性差别,而女性有显著性差别,在55-年龄组最高.在40-年龄组,男性PI的浓度大于女性,而在50-与55-年龄组,女性PI含量大于男性.

2.3 PI与各危险因素及危险因素聚集的研究 分性别对PI与各参数及危险因素的数目进行Spearman相关分析(表4).在女性,PI的浓度与年龄呈微弱正相关,而在男性未有相关关系.无论是男性还是女性,PI的含量与体重指数、腰围、收缩压、舒张压、胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇、危险因素数目呈正相关,与高密度脂蛋白胆固醇呈负相关.

### 3 讨论

PI是由86个氨基酸组成的单链多肽,在胰岛 $\beta$ 细胞合成后大部分裂解为胰岛素与C肽<sup>[12]</sup>,PI是胰岛素与C肽共同的前体物质,分子结构中包含有完整的胰岛素与C肽分子,具有胰岛素与C肽的免疫反应性.传统的检测PI的方法为将血清或血浆中的胰岛素与C肽分开后再检测PI的含量,灵敏度与特异性均较差.我们以抗C肽单克隆抗体Pep-001为固相抗体以抗胰岛素单克隆抗体Hui-001为液相抗体建立了双抗体夹心法酶联免疫吸附实验来检测外周循环中的PI的含量,在方法学中引入了生物素-亲和素放大系统,使该方法具有较高的灵敏度与较好的特异性.该方法的灵敏度为0.83 pmol/L,与1200 pmol/L的真胰岛素、3960 pmol/L的C肽无交叉反应,与国际上相关报道结果基本一致<sup>[6]</sup>.该方法的检测范围为0.83-142 pmol/L,基本覆盖了正常生理及病理情况下的血



表3 PI在人群中的分布

年龄(岁)	男性(pmol/L)		女性(pmol/L)		t值	P值
	中位数	例数	中位数	例数		
35-	3.46(2.06-5.78)	145	3.69(2.44-5.83)	179	0.524	0.601
40-	3.76(2.05-6.18)	84	2.89(1.64-4.73)	114	2.073	0.039
45-	3.46(2.08-5.93)	103	3.36(1.94-4.89)	128	0.269	0.788
50-	3.33(1.91-5.20)	89	5.99(3.58-9.91)	114	-2.163	0.032
55-	3.19(1.96-5.37)	112	4.41(2.67-6.26)	128	-2.261	0.025
F值		1.111		4.011	-	-
P值		0.350		0.003	-	-

表4 PI与各参数Spearman相关分析表

参数	男性		女性	
	相关系数	P值	相关系数	P值
AGE	-0.049	0.256	0.085	0.029
BMI	0.409	0.000	0.205	0.000
WC	0.378	0.000	0.233	0.000
SBP	0.155	0.000	0.136	0.000
DBP	0.187	0.000	0.107	0.006
FBG	0.267	0.000	0.238	0.000
CH	0.182	0.000	0.171	0.000
TG	0.321	0.000	0.309	0.000
HDL	-0.163	0.000	-0.099	0.011
LDL	0.128	0.003	0.139	0.000
NRF	0.367	0.000	0.259	0.000

清中的PI的范围,批间、批内变异系数小,稀释试验与回收试验均较满意,且该方法采用酶标技术,方法简单,因此,该方法适用于在临床检测及流行病学研究中大批量自动化检测PI。

应用上述建立的酶联免疫法本研究检测了1 196名35-59岁的成年男女,结果显示其中位数为3.50 pmol/L,四分位间距为2.14-5.68 pmol/L,与国际研究报道结果一致<sup>[6]</sup>,但后者的样本量较少。分层分析结果显示在35-49岁年龄组,男女性PI的含量无统计学差异,在50-59岁年龄组,女性PI的浓度明显升高,可能与女性生理变化有关。Haffner *et al*<sup>[5]</sup>对260名非糖尿病对象进行了研究,结果显示被研究者的空腹血清PI的含量与体重指数、腰臀围比值、甘油三酯、收缩压、舒张压呈显著相关关系,多因素分析显示,在调整了年龄、性别与胰岛素等变量后,PI的含量仍然与甘油三酯、收缩压呈正相关。Lindahl *et al*<sup>[3, 13]</sup>研究认为高PI血症是心肌梗死、脑卒中的独立的危险因素。Ferreira *et al*<sup>[4]</sup>认为高PI与高血压有关。Hanley *et al*<sup>[14]</sup>也证实人群中PI的含量与心血管危险因素有关。本研究结果显示PI的含量与体重指数、腰围、

收缩压、舒张压、胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇、危险因素数目呈正相关,与高密度脂蛋白胆固醇呈负相关,与上述报道一致。纤维蛋白溶解功能的紊乱可能是高PI与心血管危险因素相关的原因之一。高PI能够促进肝细胞与内皮细胞合成与分泌纤维化蛋白<sup>[15-16]</sup>。Festa *et al*<sup>[17]</sup>也证实PI与纤溶酶原激活物抑制剂-1(Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)、纤维蛋白原有关。高PI引起高纤溶酶原激活物抑制剂1、纤维蛋白原的高活性,从而抑制体内纤溶系统、激活体内高凝系统,导致体内平衡系统紊乱。高PI是胰岛β细胞功能受损的指标之一,β细胞功能损伤可能是PI与危险因素相关的间接原因之一<sup>[14]</sup>。

#### 4 参考文献

- 1 Roder ME, Dinesen B, Hartling SG, Houssa P, Vestergaard H, Sodoyez-Goffaux F, Binder C. Intact proinsulin and β-cell function in lean and obese subjects with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999;22:609-614
- 2 Snehaltha C, Ramachandran A, Saltyamurthy I, Satyavani K, Sivasankari S, Misra J, Viswanathan V. Association of proinsulin and insulin resistance with coronary artery disease in non-diabetic south Indian men. *Diabet Med* 2001;18:706-708
- 3 Lindahl B, Dinesen B, Eliasson M, Roder M, Hallmans G, Stegmayr B. High proinsulin levels precede first-ever stroke in a nondiabetic population. *Stroke* 2000;31:2936-2941
- 4 Ferreira SR, Franco LJ, Gimeno SG, Iochida LC, Iunes M. Is insulin or its precursor independently associated with hypertension? An epidemiological study in Japanese-Brazilians. *Hypertension* 1997;30(Pt 2):641-645
- 5 Haffner SM, Mykkanen L, Stern MP, Valdez RA, Heisserman JA, Bowsher RR. Relationship of proinsulin and insulin to cardiovascular risk factors in nondiabetic subjects. *Diabetes* 1993;42:1297-1302
- 6 Kjems LL, Roder ME, Dinesen B, Hartling SG, Jorgensen PN, Binder C. Highly sensitive enzyme immunoassay of proinsulin immunoreactivity with use of two monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1993;39:2146-2150
- 7 Subcommittee of 1999 World health organization-international society. 1999 World health organization-international society of hypertension guidelines for the management of hypertension. *J Hypertension* 1999;17:151-183
- 8 Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26(Suppl 1):S5-20
- 9 Expert Panel on Detection, Evaluation, and treatment of high

- blood cholesterol in adults. Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-2497
- 10 Barreto SM, Passos VMA, Firmo JOA, Guerra HL, Vidigal PG, Lima-Costa MFF. Hypertension and clustering of cardiovascular risk factors in a community in southeast Brazil-the bambui health and ageing study. *Arq Bras Cardiol* 2001;77:576-581
- 11 周北凡, 武阳丰, 赵连成, 李莹, 杨军, 李贤. 我国中年人群向心性肥胖和心血管病危险因素及其聚集性. *中华心血管病杂志* 2001;29:70-73
- 12 Davidson HW, Rhodes CJ, Hutton JC. Interaorganelle calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic  $\beta$ -cell via two distinct site-specific endopeptidases. *Nature* 1988;333:93-96
- 13 Lindahl B, Dinesen B, Eliasson M, Roder M, Jansson JH, Huhtasaari F, Hallmans G. High proinsulin concentration precedes acute myocardial infarction in a nondiabetic population. *Metabolism* 1999;48:1197-1202
- 14 Hanley AJ, McKeown-Eyssen G, Harris SB, Hegele RA, Wolever TMS, Kwan J, Connelly PW, Zinman B. Cross-sectional and prospective associations between proinsulin and cardiovascular disease risk factors in a population experiencing rapid cultural transition. *Diabetes Care* 2001;24:1240-1247
- 15 Nordt TK, Schneider DJ, Sobel BE. Augmentation of the synthesis of plasminogen activator inhibitor type-1 by precursors of insulin: a potential risk factor for vascular disease. *Circulation* 1994;89:321-330
- 16 Schneider DJ, Nordt TK, Sobel BE. Stimulation by proinsulin of expression of plasminogen activator inhibitor type-1 in endothelial cells. *Diabetes* 1992;41:890-895
- 17 Festa A, D'Agostino R Jr, Mykkanen L, Tracy RP, Zaccaro DJ, Hales CN, Haffner SM. Relative contribution of insulin and its precursors to fibrinogen and PAI-1 in a large population with different states of glucose tolerance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:562-568

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 •

## 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 1-48 期及特刊. 世界华人消化杂志包括: 1993-2005 年第 1-24 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医疗救护队. [yuemx@ns.cetin.net.cn](mailto: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的医疗救护演练体会. 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.

### 论文目次

目次网页包括: 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. 功能目次包括: 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接.

### 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)

## 中医经验方治疗急性胰腺炎的用药特点

张喜平, 石焱

张喜平, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006  
石焱, 浙江中医学院 浙江省杭州市 310053  
浙江省中医药卫生科技计划项目, 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: 2005-05-08 接受日期: 2005-05-25

### 摘要

中医经验方治疗急性胰腺炎能缩短病程, 减少并发症, 降低死亡率, 疗效确切, 具有重要的临床应用价值, 但仍待完善与发展. 本文从用药特点方面入手对中医经验方治疗急性胰腺炎的现状进行了综述, 期望读者能从中借鉴一些宝贵经验, 以提高急性胰腺炎的治疗水平.

张喜平, 石焱. 中医经验方治疗急性胰腺炎的用药特点. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1567-1569  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1567.asp>

### 0 引言

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是一种常见急腹症. 虽然近年来关于AP的基础与临床研究均有较大进展, 但是本病仍因起病急、病情重、并发症多、死亡率高而成为临床的一大难题.

AP属中医学“胰瘕”范畴, 其病机为湿热内阻, 气滞血瘀. 临床上多因嗜酒伤胃、恣食油腻, 或情志不遂、暴怒伤肝, 或蛔虫上扰等诱发. 传统中医经过几千年的临床诊治, 创造出系列颇为有效的方剂, 如大承气汤、大柴胡汤、大陷胸汤等. 近现代中医以临床实践为基础, 结合现代人的生理特点, “师古而不泥古”, 推陈出新, 总结出大量疗效可靠的经方验方. 现分述其用药特点.

### 1 通里攻下

急性胰腺炎可归属于中医学“结胸”、“阳明腑实证”等范畴, 属里实热证. “其实者, 散而泻之”, 故临床上应用最为广泛的的就是攻下药, 以宗“六腑以通为用”之旨. 常用苦寒攻下药急泻肠胃邪热积滞, 阻止阳明腑实证发展至火毒炽盛、气血逆乱、脏腑衰败等诸多危症, 即“釜底抽薪, 急下存阴”.

现代研究也证实, 攻下药能改善和消除肠麻痹, 短期内促进肠排空, 减少肠膜反射所致的胰液分泌, 从而减轻胰液逆流引起的胰腺自身消化<sup>[1]</sup>;减轻胃肠压力及腹压, 降低胰管、胆总管的压力, 有利于胰液、胆汁的

排泄;保护肠黏膜的完整性, 增强肠黏膜抗病能力, 保护肠黏膜屏障, 排除肠道内细菌和内毒素, 防止肠道菌群移位, 并能及时清除灭活毒性物质而防止多脏器损伤, 从而截断病情进一步恶化.

大黄峻下热结、荡涤胃肠之力较强, 为所有医家治疗急性胰腺炎之必用药物. 有医者更是重用大黄以通腑除积, 如李健<sup>[2]</sup>自拟胰腺清中大黄炭、生大黄并用治疗56例AP患者, 总有效率97%. 许多医家将大黄、芒硝合用, 以泻下攻积, 软坚散结. 如Liu *et al*<sup>[3]</sup>的柴芩承气汤, Liu *et al*<sup>[4]</sup>的柴芩承气汤, 蒋益泽 *et al*<sup>[5]</sup>的桃红承气汤, 邓轶 *et al*<sup>[6]</sup>的通腑汤, 马志杭<sup>[7]</sup>的大黄柴枳汤, 古达乾<sup>[8]</sup>的自拟清胰泻热汤, 杨菊 *et al*<sup>[9]</sup>的通腑解毒汤, 葛惠男 *et al*<sup>[10]</sup>的清热通腑剂等, 以上方剂总有效率均在80%以上, 各项指标复常时间均优于对照组( $P<0.05$ ).

### 2 疏肝退黄

AP诱因多为患者纵腹不节, 恣食肥甘厚腻, 致湿、热、痰、食蕴滞肝胆;或由于肝气郁结、情志不畅致肝郁气滞, 横逆犯胃而致通降失调. 故治疗立法以“郁者达之”为原则, 应用疏肝解郁药. 胆源性胰腺炎属中医黄疸范畴. 因湿热内蕴, 煎熬日久, 结成砂石, 阻滞胆道. 利湿退黄药苦泄寒清而利湿、利胆退黄, 正适用于湿热黄疸证. 肝胆相照, 互为表里, 故临床上常将疏肝药与利胆药并用, 使肝胆同得疏泄.

国内报道, 胆道疾病是胰腺炎的主要病因, 占50%以上<sup>[11]</sup>. 利胆退黄药可疏通胆道, 松弛奥狄氏括约肌, 解除痉挛, 降低胰、胆管的压力<sup>[12]</sup>, 使蛔虫离胆顺畅而下, 增加胆汁分泌, 减轻胆汁酸的毒性和促进胃肠消化功能的恢复, 防止AP的重症化过程. 毛晓刚<sup>[13]</sup>治疗急性水肿型胰腺炎的清中活血汤含柴胡、郁金、香附等, 治疗29例, 痊愈率为65.52%;黄培乐 *et al*<sup>[14]</sup>以柴胡、茵陈蒿、郁金、虎杖、金钱草等组成清肝利胆汤, 治疗36例重症AP, 全部治愈;彭培初 *et al*<sup>[15]</sup>用含茵陈蒿、柴胡的胰胆汤治疗急性胆源性胰腺炎, 结果治疗组各项指标均显著优于对照组( $P<0.01$ );乔九胜 *et al*<sup>[16]</sup>自拟消胰汤, 应用龙胆草、茵陈蒿、柴胡, 治疗AP30例, 总有效率达97%.

### 3 清热解毒

肝胆疏泄不利, 邪热鸱张, 可进一步发展热毒内盛.

瘀热相搏,或上迫于肺,或热伤血络,肉腐为脓等,可致类似“热厥”等危证.应用清热解毒药则能避免种种变证的发生.近年研究证明,一系列炎性递质在AP胰腺组织损伤过程中起重要介导作用,形成“第2次打击”,从而促使病情恶化<sup>[17]</sup>.清热解毒药有较好的抗菌或抑菌作用,对促炎症细胞因子如TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-12的表达、产生和释放均有抑制作用,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和变形杆菌有杀灭作用,降解细菌和内毒素,清除内毒素介导的淋巴因子及其他炎性递质,减轻和避免了肠源性感染和内毒素血症,加快炎性渗出物的吸收及消散,有效预防和治疗AP继发的胰腺、脓肿、腹腔内或全身其他各部位的感染,减轻“第2次打击”,从而降低重要器官功能障碍的发生率.刘会峰 *et al*<sup>[18]</sup>以栀子、金银花、连翘等治疗50例重症AP,邵华 *et al*<sup>[19]</sup>予21例重症AP由栀子、赤芍、蒲公英等组成的化瘀通腑剂,顾天鸽 *et al*<sup>[20]</sup>予46例AP清下化痰汤(含栀子、蒲公英、金银花、连翘、赤芍等),任明 *et al*<sup>[21]</sup>的通瘀清胰饮和张国梁<sup>[22]</sup>的清胰汤均应用金银花、连翘和赤芍,以上方剂临床疗效均良好.

#### 4 理气活血

热毒如若不解,必致气滞血瘀,而成为气血逆乱之危症,此所谓“毒热炽盛,蔽其气,凝其血也”.“气为血之帅,血为气之母”,气血乃互根互用,故临床上多将理气药与活血药共用.理气药其性芳香走窜,疏理气机,使腑气得通;活血药其性辛润通畅,消散瘀血,使壅聚得解.二者并用,可使气顺血行,瘀热自除.

近年研究也证实,理气药有调节胃肠运动、促进消化液分泌,迅速消积导滞作用.在AP的发病过程中,胰腺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,是水肿型胰腺炎向出血坏死转化的重要因素<sup>[23]</sup>.活血化痰药能扩张胰腺组织中的血管,降低血小板聚集,抑制血栓形成,改善高凝状态,降低毛细血管通透性,改善坏死区局部微循环和血液流变性,增加组织器官的相对血流量和灌流量,对重要脏器的缺血一再灌注损伤有较好的保护作用;降低组织氧耗,清除自由基,抗脂质过氧化,保护细胞膜,调节组织修复与再生,减轻腺泡的坏死,预防胰腺损伤、水肿和渗出<sup>[24]</sup>;改善肠麻痹,促进肠道屏障功能快速恢复,阻止肠道细菌移位,防止疾病向纵深发展.此外,活血化痰药物尚有镇痛、镇静的作用,且能缩短病程,减少胰腺囊肿形成,加速炎症吸收,减轻临床症状.

理气活血药也是医家治疗AP之必用药,如李真<sup>[25]</sup>的“通腑逐瘀汤”含木香、三棱,周新蓉 *et al*<sup>[26]</sup>的攻瘀合剂含枳实、荔枝、大腹皮、丹皮、大血藤、桔核、桃仁、红花,吴益高<sup>[27]</sup>的大黄佛手汤含金佛手、紫丹参、延胡索、枳实、红花,钱靖 *et al*<sup>[28]</sup>的大黄紫花汤含枳

实、红花、紫丹参、延胡索、木香,高立超<sup>[29]</sup>的黄朴汤含丹皮、元胡、水蛭,谢志豪<sup>[30]</sup>的通腑清胰汤含玄明粉、炒枳壳、广木香、广郁金、延胡索,王勇<sup>[31]</sup>自拟通胰汤含川芎、丹参、郁金、枳实、元胡等.

#### 5 祛湿化痰

AP的常见致病因素:(1)情志改变;(2)暴饮暴食;(3)虫积.而三者均可生湿化痰,情绪激动,暴怒伤肝,而致气机不畅,水液输布不利,痰湿遏积;饮食过量或嗜食厚味,损伤脾胃积滞于中,水道受阻,水湿不得运化,酿湿成痰;虫体寄生,窜入胆道,使脾脏津液不得外泄,横溢为患.痰湿不仅是胰腺炎发病过程中的病理产物,且为进一步造成各种复杂病理变化的致病因素,若不及时治疗,诸证丛生.

湿痰同源而异流,分之为二,合则为一.湿聚为水,积水成饮,饮凝成痰.故临床上多将祛湿药与化痰药并用,使水湿痰浊不与热邪相搏,其势必孤.逐水药与攻下药联合运用,可荡涤中焦水湿,有利于重症AP的迅速转机.如陈岭易<sup>[32]</sup>的旋覆化痰汤采用旋覆花、姜半夏、皂角刺、白茯苓、金钱草,刘立昌<sup>[33]</sup>予黄芩、冬瓜子,张静华<sup>[34]</sup>自拟安胰汤用黄芩、厚朴,李运伦 *et al*<sup>[35]</sup>的胰炎灵冲剂用黄芩、川厚朴,魏瑞民<sup>[36]</sup>的胰解汤用石菖蒲、黄芩炭.

#### 6 益气养阴

AP属热邪,耗气伤阴,同时要控制饮食,故患者往往体液不足,阴津亏虚;另疾病早期,医者治疗时多以通腑泄热为法,给予大量苦寒泻下之剂,且服用时间较长.虽然对证,但久服也必损脾胃之阳气.故患者辨证多有气阴匮乏.“补可扶弱”,临床上应益气养阴以扶正.阳气在生理情况下是生命的动力,在病理情况下又是抗病的主力.补益阳气可振奋衰减的机能,对防止疾病后期出现脾胃虚弱之候大有裨益.同时养阴增液,阳得阴助,方能生化无穷.益气养阴药共用,能增强体质,调动体内防御机能,提高抗病能力,补充耗损的体液,保持内环境稳定,调整细胞内部代谢,帮助肠功能的恢复及改善胰腺的微循环而有利于“毒素”的排泄与灭活.如崔玉华 *et al*<sup>[37]</sup>自拟胰宁汤用黄芪、白芍,黄培乐 *et al*<sup>[14]</sup>清肝利胆汤用党参、黄芪、焦白术、黄精、当归,周端求<sup>[38]</sup>自制胰康合剂用参须、麦冬等.

总之,由于AP患者病情重,一般状况差,多有恶心、呕吐等症状,胃肠功能减退,入院后多禁食禁水,胃肠减压,通常的给药渠道被截断,而中医方剂可以通过胃管注入、鼻饲,灌肠、肛滴、静脉滴注、外敷、腹腔灌洗等方法改善症状,并能提高临床疗效,缩短住院时间,减少并发症,降低死亡率,故目前在临床上应用较为广泛.

近年来中医医家秉承古法,开拓创新,研发出大量

经方验方来治疗 AP. 用药时多视腑实热结、瘀热、肝胆湿热及热毒的侧重而灵活应用以上方法. 在急性阶段, 针对肝郁气滞, 郁久化热, 中焦实热, 采用通腑导滞、疏肝退黄等攻邪措施, 有助于疾病趋缓; 炎症消退阶段采用活血化瘀和益气养阴药物, 祛邪兼可匡扶正气, 转归预后良好. 但由于本病的病机复杂, 病势凶险, 变证迭出, 一般用药时应几方面兼顾.

尽管中医经验方治疗 AP 仍存在一定的问题, 如尚无一个标准来调节服药的剂量和频率, 缺乏规定的疗效判定标准和观察指标等, 但笔者坚信, 随着医者临床经验的总结与中医现代化步伐的加快, 现代中医必将承前启后, 继往开来, 使中医方剂治疗 AP 日趋完善, 从而发挥更大的作用.

## 7 参考文献

- 徐波, 张环宇. 中药肠清辅佐治疗急性胰腺炎 27 例. 中国民间疗法 2001;9:49-50
- 李健. 自拟胰腺清治疗急性胰腺炎 36 例. 陕西中医 2002;23:37-38
- Liu BY, Lei YF. Analysis of the therapeutic effect of integrated Chinese and Western medicine in treating acute biliogenic pancreatitis after papillary myotomy. Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi 2004;24:150-152
- Liu XB, Jiang JM, Huang ZW, Tian BL, Hu WM, Xia Q, Chen GY, Li QS, Yuan CX, Luo CX, Yan LN, Zhang ZD. Clinical study on the treatment of severe acute pancreatitis by integrated traditional Chinese medicine and Western medicine. Sichuan Daxue Xuebao Yixueban 2004;35:204-208
- 蒋益泽, 王绍明, 李力, 林伟, 蒋建春, 魏东. 桃红承气汤配合西药治疗急性胰腺炎 31 例. 四川中医 2003;21:27-28
- 邓轶, 陈航, 崔朝阳, 林欣潮. 通腑汤保留灌肠治疗急性胰腺炎 45 例. 北京中医药大学学报 2000;23:59-61
- 马志杭. 大黄枳实汤配合西药治疗急性水肿型胰腺炎 56 例—附单用西药治疗 56 例对照. 浙江中医杂志 2002;37:294-295
- 古达乾. 清胰泻热汤治疗急性胰腺炎 25 例. 中国中医急症 2003;12:80
- 杨菊, 丁尧光. 中西医结合治疗急性重症胰腺炎 28 例观察. 实用中医药杂志 2003;19:194
- 葛惠男, 朱雄雄. 中西医结合治疗急性胰腺炎 42 例. 实用中医药杂志 2004;20:79
- 陈灏珠. 实用内科学. 第 10 版. 北京:人民卫生出版社, 1997:1649
- 赵连根, 伍孝先, 朱作铭. 治疗急性胰腺炎中药筛选及药理作用研究. 中国中西医结合外科杂志 1996;2:329
- 毛晓刚. 清中活血汤治疗急性水肿型胰腺炎疗效观察. 河北中医 2001;23:904-905
- 黄培乐, 李昕钰, 梁军, 魏小义, 高鹏程. 中药清肝利胆汤在重症急性胰腺炎治疗中的作用. 中国中西医结合杂志 2001;21:461-462
- 彭培初, 要全保, 王亚平, 陈川, 花蕊, 庄敏之, 张迪. 胰胆汤治疗急性胆源性胰腺炎 31 例. 上海中医药杂志 2003;37:12-13
- 乔九胜, 于素明. 中西医结合治疗急性胰腺炎 30 例. 河北中医 2002;24:40
- 姜琳, 朱金水. 急性胰腺炎预后与细胞免疫因子相关研究新进展. 世界华人消化杂志 2002;10:1045-1047
- 刘会峰, 郑培明, 高蕾, 于来永, 陈乾德. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎—附 50 例临床报告. 中国中西医结合外科杂志 2001;7:373
- 邵华, 范均, 徐晋. 重症急性胰腺炎术后配合中药辅助治疗的临床体会. 吉林中医药 2004;24:24-25
- 顾天鸽, 刘志新, 王洪京. 清下化瘀汤胃管注入配合西药治疗急性胰腺炎 46 例. 山东中医杂志 2004;23:289
- 任明, 阎峰. 中西医结合治疗急性胰腺炎 42 例分析. 中医药学刊 2003;21:970
- 张国梁. 中西医结合治疗急性重症胰腺炎 15 例. 中国中医急症 2003;12:446
- 田伏洲, 黎冬暄. 急性胰腺炎重型化的预防. 中国实用外科杂志 1999;19:525-527
- 周总光. 胰腺微循环障碍与急性坏死性胰腺炎. 国外医学外科学分册 1997;24:201
- 李真. “通腑逐瘀汤”治疗急性水肿型胰腺炎疗效观察. 中国中西医结合急救杂志 2001;8:139
- 周新蓉, 吴忠和. 攻瘀剂配合西药治疗重症急性胰腺炎 53 例. 四川中医 2003;21:54
- 吴益高. 大黄佛手汤治疗急性重症胰腺炎 20 例. 中国中医急症 2004;13:391
- 钱靖, 王敏, 宋云娟. 大黄紫花汤治疗重症急性胰腺炎临床观察. 中国中医药信息杂志 2001;8:66-67
- 高立超. 中西医结合治疗急性胰腺炎 40 例. 山西中医 2003;19:25
- 谢志豪. 中西医结合治疗急性胰腺炎 38 例. 中国中医急症 2003;12:29
- 王勇. 应用中药通胰汤治疗急性胰腺炎的临床观察. 中国基层医药 2003;10:1287
- 陈岭易. 中西医结合治疗急性胰腺炎 13 例—附西药常规治疗 18 例对照. 浙江中医杂志 2001;36:514
- 刘立昌, 李莉芳, 张磊. 重用附子治疗急性重症胰腺炎 21 例. 中国中医急症 2003;12:78
- 张静华. 安胰汤治疗急性胰腺炎 53 例. 中国中医急症 2003;12:468-469
- 李运伦, 符为民, 王永生. 胰炎灵冲剂治疗急性胰腺炎 184 例临床观察. 中医杂志 2003;44:512-513
- 魏瑞民. 中西医结合治疗出血坏死性胰腺炎. 湖北中医杂志 2004;26:35-36
- 崔玉华, 金汤, 王晓丽, 任红, 李京华. 自拟胰宁汤治疗急性胰腺炎 40 例. 中医药学报 2001;29:18-19
- 周端求. 中西医结合治疗急性水肿型胰腺炎 60 例. 新中医 2002;34:35-36

编辑 王谨晖 审读 张海宁

# 溃疡性结肠炎的易感基因

李晶珏, 胡刚正, 林连捷, 郑长青

李晶珏, 胡刚正, 林连捷, 郑长青, 中国医科大学附属第二医院  
辽宁省沈阳市 110004  
通讯作者: 郑长青, 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. zhengchangqing88@163.com  
电话: 024-83596682 传真: 024-83956682  
收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-06

## 摘要

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)是炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的一种, 指原因不明的直肠和结肠慢性非特异性炎症性疾病. 其发病涉及环境、感染、免疫及遗传等因素之间的相互作用, 是一种多基因参与的作用于免疫系统和靶器官的疾病. 随着分子生物学的不断发展, 近年已有大量关于 UC 相关基因的报道, 找到了一些可能相关的连锁位点和等位基因, 但尚未发现特异性易感基因. 本文将近年来 UC 易感基因的研究进展作一综述.

李晶珏, 胡刚正, 林连捷, 郑长青. 溃疡性结肠炎的易感基因. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1570-1573  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1570.asp>

## 0 引言

在西方国家溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的发病率很高, 有关 UC 的研究一直十分活跃. 我国 UC 的发病率较西方国家低, 且病情较轻, 但近年报道的 UC 病例逐渐增多<sup>[1]</sup>, 预计其发病率还将逐年上升. UC 已被临床、流行病学、动物模型及分子生物学研究证明是一种多基因遗传病. UC 易感基因的确定已成为当今 UC 研究的热点.

## 1 UC 是一种多因素疾病

UC 的发病机制尚不十分清楚, 目前认为是多因素相互作用所致, 包括环境、感染、免疫和遗传等因素. 环境: 亚洲、南美等发展中国家 UC 的发病率较西方发达国家低, 而这些地区的居民移民到西方国家后, 其后裔 UC 发病率显著上升<sup>[2]</sup>, 移民现象表明环境因素起了微妙而重要的作用. 感染: 微生物在 UC 发病中的作用一直受到重视, 多数学者认为细菌感染可能为其促发因素<sup>[3]</sup>. 免疫: 认为 UC 发病与 T 细胞亚群平衡失调和受累肠段分泌过量抗体有关<sup>[4]</sup>. 遗传: UC 的种族聚集、家族聚集现象<sup>[5]</sup>及双胞胎研究结果<sup>[6]</sup>均表明 UC 的发病与遗传有关.

## 2 UC 是一种多基因遗传病

近年来人们在大样本 UC 家族研究中发现, 很多基因均可能参与 UC 的发病, 但尚未发现与 UC 发病特异相关的易

感基因. 大量关于 UC 易感基因的报道中, 随样本不同结果不一, 可能与不同种族和不同的人群遗传背景有关. 目前认为 UC 不仅存在多基因缺陷, 而且须在一定环境下才能发病, 有关研究尚在深入进行. 目前研究提示, UC 易感基因主要位于第 3、6、7、12、16、19 等号染色体上.

## 3 连锁位点及相关基因

3.1 16 号染色体 16 号染色体较短, 共有 98 000 kb, 其上有两个连锁位点, 16q12 (IBD1) 以及位于 16p 着丝粒周围的 IBD8. 主要候选基因有 NOD2、CD19、IL-4 受体 (IL-4R) 基因等. NOD2 已被证实是 IBD 的易感基因<sup>[7]</sup>, CARD 是位于 NOD2 N 端的 Caspase 募集区, NOD2/CARD15 基因呈高度多态性. R702W、G908R 和 1 007fs 被认为是最重要的独立易感因素<sup>[8]</sup>. 大多数研究表明, NOD2/CARD15 与克隆氏病 (crohn's disease, CD) 关系密切, 而与 UC 无关<sup>[9]</sup>. Forabosco *et al*<sup>[10]</sup> 研究发现, IBD1 中 D16S408 附近区域的基因与 UC 发病有关, 并且指出单个等位基因突变使 UC 患病率增加, 而双等位基因突变可导致重度 CD. Gazouli *et al*<sup>[11]</sup> 研究 NOD2/CARD15、TLR4、CD14 基因与 UC 关系时发现 TL4 或 CD14 基因与 NOD2/CARD15 基因突变同时存在可以使 UC 易感性增加. 由此可见 NOD2 基因与 UC 相关, 但不如与 CD 的相关性显著.

3.2 12 号染色体 12 号染色体的连锁位点在 12q13 (IBD2), 其主要候选基因有 VDR (vitamin D receptor) 和 NRAMP2 ( $\gamma$  naturas resistance associated macrophage protein) 基因等. 大样本研究<sup>[12]</sup>发现, IBD2 主要与 UC 连锁 (LOD = 3.91). Paavola-Sakki *et al*<sup>[13]</sup> 用全基因组连锁分析芬兰 UC 家系发现, 12p13 区域与 UC 的两点 NPL 值达到 2.00, 为 UC 易感基因的研究提供了新的位点.

3.3 6 号染色体 人类主要组织相容性复合体 (MHC), 又称 HLA, 即人类白细胞抗原, 位于 6p13 (IBD3), 约 4 000 kb, 具有高度多态性, 与 UC 易感性密切相关, 是人类最早开始研究的 UC 易感基因. HLA 基因包括三类: HLA-I、HLA-II 和 HLA-III.

3.3.1 HLA-I HLA-I 属于免疫球蛋白超家族, 分布于有核细胞表面, 起识别和递呈内源性抗原肽的作用. 主要候选基因包括 HLA-A、HLA-B、HLA-C 等. 有研究<sup>[14]</sup>发现, 与健康人群以及广泛结肠炎 UC 患者相比, HLA-B7 在局限性 UC 患者中频率较高 ( $P = 0.03$ ,  $P = 0.007$ ). 而 HLA-B\*52 与 HLA-I 着丝粒区和 HLA-III 端粒区之间的区域连锁不平衡, 可能与 UC 易感性有关<sup>[15]</sup>.

**3.3.2 HLA-II** HLA-II也属于免疫球蛋白超基因家族,对于T细胞免疫应答及B细胞产生抗体均有重要作用,与UC的易感性密切相关.此区主要基因包括HLA-DR、HLA-DP和HLA-DQ等.从1995年开始,人们用分子生物学技术研究HLA-II区域UC易感基因<sup>[16]</sup>,并在研究中发现HLA-II与UC易感性的关系主要与DR区多态性有关<sup>[17-18]</sup>.继续对DR区进行深入研究发现HLA-DR2,尤其是HLA DRB1\*1 502与UC重症表型有关<sup>[19]</sup>,HLA-DR15有可能导致UC广泛性结肠炎型<sup>[20]</sup>,HLA DRB1\*0103提示需要早期手术治疗<sup>[21-22]</sup>.而HLA DRB1\*0301则与UC的轻型发病有关;HLA-DR4为UC的保护因子<sup>[19]</sup>.

**3.3.3 HLA-III** HLA-III位于HLA-I和HLA-II之间,约1 000 kb,含有多个免疫相关基因.其重要候选基因有肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ (LT- $\alpha$ )、MHC-I链相关基因(MIC)-A、MIC-B、C2和C4等.Ahmad *et al*<sup>[22]</sup>通过对321例UC患者进行15 a随访发现,TNF- $\alpha$ 多态性(-1 031T, -863C, -857C, -380G, -308G和-238G)与UC易感性有关,并可能使局限性UC不易进展为广泛性结肠炎(局部/广泛, 40.9%/25.7%;OR = 2.0).在日本对UC患者的研究中发现,TNF- $\alpha$ (-308A, -238G)在UC患者中频率高于正常人群( $P < 0.01$ )<sup>[23]</sup>;在墨西哥混血儿的研究中,UC易感性与TNF- $\alpha$ (-308)多态性关系密切( $P = 0.00 002$ ),而与TNF- $\alpha$ (-238)无显著相关性<sup>[21]</sup>.充分说明了UC在不同种族间存在遗传异质性.MIC-A基因多态性也与UC易感性有关.MIC-A分子表达于小肠上皮,可以特异性识别小肠上皮TCR $\delta\gamma$ -T细胞,在跨膜区具有多态性.MICA-A5可能导致UC的重症表型<sup>[14]</sup>,而MICA-A6纯合性等位基因与UC的早期发病有关<sup>[24]</sup>.

**3.4 5号染色体** 5q31(IBD5)区域聚集了一些细胞因子基因,其候选基因包括IL-3、IL-4、IL-5和IL-13基因等.有研究者<sup>[25]</sup>认为,IBD5主要与CD有关,而与UC无关.Giallourakis *et al*<sup>[26]</sup>用传递不平衡实验(TDT)研究德国UC患者时发现,IBD5区域与UC易感性有关( $P = 0.002$ ).

**3.5 19号染色体** 19q13作为第6个IBD连锁位点(IBD6),其主要候选基因包括细胞间黏附因子(ICAM-1)、C3和LTB4H等.ICAM-1基因在UC患者肠黏膜中过度表达,其多态性与UC易感性有关.Low *et al*<sup>[27]</sup>在大样本研究中发现,ICAM-1 G/G241纯合子等位基因与UC病变局限有关.

**3.6 7号染色体** 多药耐药基因(multidrug resistance, mdr-1)位于7q,编码P170糖蛋白,在肠上皮中高度表达.mdr-1有C3 435T和G2 677T等多态性.其中3 435 T-T和T-等位基因型在UC患者中的频率均高于正常人群( $P = 0.04$ ,  $P = 0.02$ ),在广泛型UC患者中尤为明显( $P = 0.009$ ),而在CD和正常人群之间没有区别<sup>[28]</sup>.

**3.7 3号染色体** 3号染色体上的连锁位点位于3p,候选基因包括hMLH1、CCR2、CCR5和IL-4RA等.研究表明该位点与UC易感性关联较弱,LOD值均小于2.0<sup>[29-31]</sup>.Bagnoli *et al*<sup>[32]</sup>在研究中发现hMLH1 655A/G在UC

患者与正常人之间几乎没有区别,而hMLH1 655G基因型在复发性UC患者中出现的频率却明显高于正常人群( $P < 0.0 001$ ).这为估计UC患者的预后提供了理论依据.

### 3.8 细胞因子

**3.8.1 IL-1** IL-1 $\beta$ 可以上调HLA-II和黏附分子的表达,还可以通过旁分泌增强Th淋巴细胞活性,在激发免疫应答中起重要作用.因此,IL-1 $\beta$ 、IL-1受体(IL-1R)、IL-1受体拮抗(IL-1RA)基因及IL-1RA/IL-1之间的平衡可能与UC有关.但一些研究表明IL-1 $\beta$ 和IL-1RA基因与UC易感性无关<sup>[33-34]</sup>.而IL-1RA基因等位基因2(IL-1RN\*2)可以下调IL-1RA蛋白水平和IL-1RA/IL-1的比例,从而与UC发病相关<sup>[35]</sup>.

**3.8.2 IL-4** IL-4主要在淋巴细胞中表达,在调节Th淋巴细胞亚群平衡中起重要作用,因此,可能与UC易感性相关.IL-4和IL-4受体(IL-4R)基因分别位于IBD5和IBD1.Peng *et al*<sup>[33]</sup>研究中国人群中IL-4多态性与UC关系时发现,IL-4-PR2等位基因在UC中分布明显高于正常人群,而IL-4-PR1等位基因在正常人群中的分布高于UC患者( $P < 0.05$ ).

**3.8.3 IL-18** IL-18主要由小肠上皮细胞产生,可增强细胞活性,有明显的肿瘤抑制作用.Aizawa *et al*<sup>[36]</sup>研究IL-18与UC关系时发现,IL-18基因5'末端具有-656G/T, -607C/A, -137G/C, +113T/G, +127C/T等单核苷酸多态.其中+113G与+127T在UC中分布的频率明显高于正常人群.从而提示IL-18基因5'端的单核苷酸多态可能与UC的发病密切相关.

与UC相关基因归纳于表1、表2、表3.

表1 与UC密切相关的基因

文献序号	基因	与UC关系
12	12q13(1BD2)	有关联
14	HLA-B7	局限性结肠炎
19	HLA-DR2, HLA-DRB1*1 502, HLA-DR15	广泛性结肠炎
19	HLA-DR4	保护因子
21, 22	HLA-DRB1*0103	广泛性结肠炎, 重型
21, 23	TNF- $\alpha$ (-308)	升高 <sup>1</sup> , 升高 <sup>2</sup>
21, 23	TNF- $\alpha$ (-238)	升高 <sup>1</sup>
24	MICA-A6	早期发病
28	mdr-1C3 435T	升高, 广泛性尤为明显

<sup>1</sup>日本人;<sup>2</sup>墨西哥人.

总之,近年来人们对UC易感基因的研究开展得越来越深入,并取得了不少成果.但是人们对UC发病相关基因不断认识的同时,也存在一些问题:(1)人们通过研究证实许多基因与UC易感性有关,但尚未发现特异性UC易感基因;(2)一些基因可能在一定环境作用下影响UC发病,但

表2 与UC关系较弱或尚未证实的基因

文献序号	基因	与UC关系
13	12P13	可能有关联
14	MICA-A5	重症表型
15	HLA-B*52	可能有关联
19	HLA-DRB1*0301	轻型
27	ICAM-1	升高
29-31	染色体3	关系较弱
32	hMLH1 655G	与复发有关
33	IL-4-PR1	降低 <sup>1</sup>
33	IL-4-PR2	升高 <sup>1</sup>
35	IL-1RN*2	可能有关
36	IL-18 +113G, +127T	升高

<sup>1</sup>中国人。

表3 仅与CD有关基因

文献序号	基因	与UC关系	与CD关系
8, 9	NOD2/CARD15		
	R702W, G908R, 1 007fs	无关联	关系密切
25, 26	5q31(1BD5)	多数无关联, 偶有关联 <sup>1</sup>	有关联

<sup>1</sup>德国人。

尚不清楚这些基因在调控免疫反应、细胞分化中的具体作用以及在UC发病中的具体机制; (3) UC发病涉及诸多基因, 众多基因不是单独发挥作用, 而是作为一个整体对机体进行调节. 因此从单个基因的角度研究在UC发病中的作用会受到局限. 提示人们今后研究应多考虑多基因联合作用的效应.

随着分子生物学技术的不断进展, 研究手段不断完善, 人们对于UC易感基因的认识也将不断深入. UC易感基因的确定会使人类更清楚地认识UC的发病机制; 从基因角度对UC进行更准确的分型; 对UC发病风险、病情进展、预后情况等预测更加精确, 同时针对这些基因功能开发新的治疗手段. 对UC易感基因的研究将为人类认识和战胜UC发挥更大的作用.

#### 4 参考文献

- Ouyang Q, Tandon R, Goh KL, Ooi CJ, Ogata H, Fiocchi C. The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:408-413
- Carr I, Mayberry JF. The effects of migration on ulcerative colitis: a three-year prospective study among Europeans and first- and second- generation South Asians in Leicester (1991-1994). *Am J Gastroenterol* 1999;94:2918-2922
- Inoue S, Nakase H, Chiba T. Etiopathogenesis and aggravating factors of ulcerative colitis. *Nippon Rinsho* 2005;63:757-762
- Wen Z, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: autoimmune or immune-mediated pathogenesis? *Clin Dev Immunol* 2004; 11:195-204

- Laharie D, Debeugny S, Peeters M, Van Gossum A, Gower-Rousseau C, Belaiche J, Fiasse R, Dupas JL, Lerebours E, Piotte S, Cortot A, Vermeire S, Grandbastien B, Colombel JF. Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring. *Gastroenterology* 2001;120:816-819
- Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1075-1081
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603
- Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain C, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Modigliani R, Gower-Rousseau C, Macry J, Merlin F, Chamaillard M, Jannot AS, Thomas G, Hugot JP; EPWG-IBD Group; EPIMAD Group; GETAID Group. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002;70:845-857
- Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeier A, MacPherson AJ, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925-1928
- Forabosco P, Collins A, Latiano A, Annese V, Clementi M, Andriulli A, Fortina P, Devoto M, Morton NE. Combined segregation and linkage analysis of inflammatory bowel disease in the IBD1 region using severity to characterise Crohn's disease and ulcerative colitis. On behalf of the GISC. *Eur J Hum Genet* 2000;8:846-852
- Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonomopoulos J, Gorgoulis VG. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol* 2005;11:681-685
- Parkes M, Barmada MM, Satsangi J, Weeks DE, Jewell DP, Duerr RH. The IBD2 locus shows linkage heterogeneity between ulcerative colitis and Crohn disease. *Am J Hum Genet* 2000;67:1605-1610
- Paavola-Sakki P, Ollikainen V, Helio T, Halme L, Turunen U, Lahermo P, Lappalainen M, Farkkila M, Kontula K. Genome-wide search in Finnish families with inflammatory bowel disease provides evidence for novel susceptibility loci. *Eur J Hum Genet* 2003;11:112-120
- Fdez-Morera JL, Rodrigo L, Lopez-Vazquez A, Rodero SR, Martinez-Borra J, Nino P, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. MHC class I chain-related gene A transmembrane polymorphism modulates the extension of ulcerative colitis. *Hum Immunol* 2003;64:816-822
- Nomura E, Kinouchi Y, Negoro K, Kojima Y, Oomori S, Sugimura M, Hiroki M, Takagi S, Aihara H, Takahashi S, Hiwatashi N, Shimosegawa T. Mapping of a disease susceptibility locus in chromosome 6p in Japanese patients with ulcerative colitis. *Genes Immun* 2004;5:477-483
- Duerr RH, Neigut DA. Molecularly defined HLA-DR2 alleles in ulcerative colitis and an antineutrophil cytoplasmic antibody-positive subgroup. *Gastroenterology* 1995;108:423-427
- Reinshagen M, Loeliger C, Kuehn P, Weiss U, Manfras BJ, Adler G, Boehm BO. HLA class II gene frequencies in Crohn's disease: a population based analysis in Germany. *Gut* 1996; 38:538-542
- Heresbach D, Alizadeh M, Reumaux D, Colombel JF, Delamaire M, Danze PM, Gosselin M, Genetet B, Bretagne JF,



- Semana G. Are HLA-DR or TAP genes genetic markers of severity in ulcerative colitis? *J Autoimmun* 1996;9:777-784
- 19 Matri S, Boubaker J, Hamzaoui S, Bardi R, Ayed K, Filali A. The role of major histocompatibility complex genes in the pathogenesis of chronic inflammatory bowel diseases. *Tunis Med* 2003;81:289-294
  - 20 Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcon G, Ruiz-Morales JA, Higuera L, Cutino T, Rodriguez-Perez JM, Villarreal-Garza C, Granados J. Clinical and genetic heterogeneity in Mexican patients with ulcerative colitis. *Hum Immunol* 2003;64:119-123
  - 21 Yamamoto-Furusho JK, Uscanga LF, Vargas-Alarcon G, Rodriguez-Perez JM, Zuniga J, Granados J. Polymorphisms in the promoter region of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and the HLA-DRB1 locus in Mexican mestizo patients with ulcerative colitis. *Immunol Lett* 2004;95:31-35
  - 22 Ahmad T, Armuzzi A, Neville M, Bunce M, Ling KL, Welsh KI, Marshall SE, Jewell DP. The contribution of human leucocyte antigen complex genes to disease phenotype in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2003;62:527-535
  - 23 Sashio H, Tamura K, Ito R, Yamamoto Y, Bamba H, Kosaka T, Fukui S, Sawada K, Fukuda Y, Tamura K, Satomi M, Shimoyama T, Furuyama J. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics* 2002;53:1020-1027
  - 24 Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Mizuki N, Seki SS, Honma T, Inoko H, Asakura H. A close relationship of triplet repeat polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 2001;57:9-14
  - 25 Urcelay E, Mendoza JL, Martinez A, Fernandez L, Taxonera C, Diaz-Rubio M, de la Concha EG. IBD5 polymorphisms in inflammatory bowel disease: Association with response to infliximab. *World J Gastroenterol* 2005;11:1187-1192
  - 26 Giallourakis C, Stoll M, Miller K, Hampe J, Lander ES, Daly MJ, Schreiber S, Rioux JD. IBD5 is a general risk factor for inflammatory bowel disease: replication of association with Crohn disease and identification of a novel association with ulcerative colitis. *Am J Hum Genet* 2003;73:205-211
  - 27 Low JH, Williams FA, Yang X, Cullen S, Colley J, Ling KL, Armuzzi A, Ahmad T, Neville MJ, Dechairo BM, Walton R, Lench NJ, Jewell DP. Inflammatory bowel disease is linked to 19p13 and associated with ICAM-1. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:173-181
  - 28 Ho GT, Nimmo ER, Tenesa A, Fennell J, Drummond H, Mowat C, Arnott ID, Satsangi J. Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2005;128:288-296
  - 29 Hampe J, Schreiber S, Shaw SH, Lau KF, Bridger S, Macpherson AJ, Cardon LR, Sakul H, Harris TJ, Buckler A, Hall J, Stokkers P, van Deventer SJ, Nurnberg P, Mirza MM, Lee JC, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME. A genomewide analysis provides evidence for novel linkages in inflammatory bowel disease in a large European cohort. *Am J Hum Genet* 1999;64:808-816
  - 30 Dechairo B, Dimon C, van Heel D, Mackay I, Edwards M, Scambler P, Jewell D, Cardon L, Lench N, Carey A. Replication and extension studies of inflammatory bowel disease susceptibility regions confirm linkage to chromosome 6p (IBD). *Eur J Hum Genet* 2001;9:627-633
  - 31 Hampe J, Lynch NJ, Daniels S, Bridger S, Macpherson AJ, Stokkers P, Forbes A, Lennard-Jones JE, Mathew CG, Curran ME, Schreiber S. Fine mapping of the chromosome 3p susceptibility locus in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;48:191-197
  - 32 Bagnoli S, Putignano AL, Melean G, Baglioni S, Sestini R, Milla M, d'Albasio G, Genuardi M, Pacini F, Trallori G, Papi L. Susceptibility to refractory ulcerative colitis is associated with polymorphism in the hMLH1 mismatch repair gene. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:705-708
  - 33 Peng Z, Hu P, Cui Y, Li C. Interleukin (IL)-1beta, IL-1 receptor antagonist and IL-4 gene polymorphisms in ulcerative colitis in the Chinese. *Zhonghua Neike Zazhi* 2002;41:248-251
  - 34 Craggs A, West S, Curtis A, Welfare M, Hudson M, Donaldson P, Mansfield J. Absence of a genetic association between IL-1RN and IL-1B gene polymorphisms in ulcerative colitis and Crohn disease in multiple populations from northeast England. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1173-1178
  - 35 Carter MJ, Jones S, Camp NJ, Cox A, Mee J, Warren B, Duff GW, Lobo AJ, di Giovine FS. Functional correlates of the interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in the colonic mucosa in ulcerative colitis. *Genes Immun* 2004;5:8-15
  - 36 Aizawa Y, Sutoh S, Matsuoka M, Negishi M, Torii A, Miyakawa Y, Sugisaka H, Nakamura M, Toda G. Association of interleukin-18 gene single-nucleotide polymorphisms with susceptibility to inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 2005;65:88-92

编辑 王谨晖 审读 张海宁

## 重症急性胰腺炎继发感染及抗生素的合理应用

李德辉, 孙 备

李德辉, 孙备, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰脾外科 黑龙江省哈尔滨市 150001

通讯作者: 孙备, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街 23 号, 哈尔滨医科大学附属第一医院肝胆胰脾外科. sunbei70@tom.com

电话: 0451-53600281 传真: 0451-53670428

收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-05-30

### 摘要

重症急性胰腺炎(SAP)病情凶险, 并发症多, 并发胰腺感染高达 40-70%. SAP 近期死亡的主要原因是继发感染, 占 SAP 死亡总数的 80% 以上. 随着对 SAP 病理生理的深入研究, 抗生素的合理应用在 SAP 治疗中所起的重要作用日益受到关注, 抗生素可有效减少 SAP 的死亡率和并发症. 本文就 SAP 继发感染的病因、病原微生物、机制和抗生素应用的种类、给药方式、策略做一综述.

李德辉, 孙备. 重症急性胰腺炎继发感染及抗生素的合理应用. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1574-1576

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1574.asp>

### 0 引言

重症急性胰腺炎(SAP)的治疗方法一直被国内外众多学者所重视. 该发病急, 临床表现复杂, 合并症多, 治疗虽基本有章可循, 但结果远不令人满意. 随着对 SAP 病理生理研究的深入及治疗措施的进步, 大多数 SAP 患者能度过急性反应期而进入全身感染期, 而全身感染合并多器官功能不全综合征(MODS)却成为其最主要的死亡原因. SAP 并发胰腺感染高达 40-70%<sup>[1]</sup>. Buchler *et al*<sup>[2]</sup>报道 86 例急性坏死性胰腺炎(ANP)中, 无菌性坏死的死亡率为 1.8%, 而感染性坏死的死亡率为 24%.

人们已经认识到, SAP 的近期死亡主要由胰腺的坏死范围和其他脏器受累程度所决定, 远期死亡的主要原因是继发性感染, 占 SAP 死亡总数 80% 以上. 因此, 抗生素在早期非手术治疗中的地位是肯定的, 并已成为 SAP 预防和治疗继发感染的规范化措施. Bassi *et al*<sup>[3]</sup>通过 2001/2003 年的随机对照试验(RCTs)来评价抗生素治疗 SAP 的疗效, 其 RCTs 结果显示, 应用抗生素组的并发症和死亡率明显降低. 可见抗生素在 SAP 中的合理应用可以促进 SAP 治愈率稳步上升, 有效降低死亡率.

### 1 SAP 继发感染

1.1 病因学方面的研究 目前 SAP 继发感染的病因尚不明确, 其发生可能与以下因素有关: (1) 病理种类: 据统计, 胆源性 SAP、术后及创伤性 SAP 继发感染的发生率高于

酒精性 SAP. (2) 局部和全身情况的变化: 正常胰腺组织本身具有抵御细菌生长的能力, 但一旦出现水肿、坏死, 即成为细菌生长的良好培养基, 极大地增加了继发感染的机会. (3) 病期及坏死范围: 随着病期的进展和坏死范围的扩大, SAP 继发感染的发生率可呈正比例改变. (4) 其他因素: 如治疗 SAP 时作为器官保护所实施的连续性静脉-静脉血液滤过(CVVH)<sup>[4]</sup>和治疗时所采取引流、灌洗等措施所导致的一些不可低估的感染的发生.

1.2 引起继发感染的微生物种类 SAP 继发感染多由革兰氏阴性菌引起, 最常见者为大肠杆菌(35%)、克雷伯杆菌(25%)和肠球菌(24%), 其他感染菌为葡萄球菌(14%)、假单胞菌(11%)、变形杆菌(8%)、链球菌(7%)、肠杆菌(7%)、类杆菌(6%)和厌氧菌(6%)<sup>[5]</sup>. 大量资料证实, 从 SAP 感染的胰腺及胰周培养出的细菌多数为大肠和末端回肠常驻菌, 依次为大肠埃希杆菌属、变形杆菌属和粪肠球菌属<sup>[6]</sup>. 真菌感染主要见于长期使用多种抗生素的患者. Isenmann *et al*<sup>[7]</sup>对 77 例感染性坏死的病原学检查结果, 单菌感染占 69%, 以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌居多; 多菌感染占 31%, 以大肠杆菌、肠球菌联合感染居多.

1.3 SAP 继发感染的机制 SAP 继发感染是病原微生物、宿主和环境三大因素相互作用的结果, 而免疫功能低下和腹腔内存在坏死病灶常为其重要原因, 且致病菌一般为侵袭力不强的肠源性条件致病菌, 这与 SAP 存在的机体免疫力下降及肠屏障功能受损而导致肠道菌群移位有关<sup>[8]</sup>. SAP 继发感染的来源分为胆源性和肠源性. 但现已证实引起 SAP 继发感染的细菌主要来源于肠道菌群移位, 即肠源性<sup>[9]</sup>. 肠道黏膜屏障功能受到严重削弱后细菌得以突破肠黏膜而侵入机体, 实验证明影响细菌移位的因素有三个: (1) 肠道微生态失调而导致细菌生长. SAP 时肠道功能的改变, 如肠动力减弱, 肠腔积液、积气, 肠管扩张等, 为肠道内细菌的过度繁殖创造了条件, 引起以革兰氏阴性菌为主的肠道需氧菌过度增殖, 而双歧杆菌和乳酸杆菌明显减少, 破坏了肠道微生态的平衡. (2) 宿主免疫防御功能削弱. Saidakhmedova<sup>[10]</sup>对比观察了急性胰腺炎患者和健康人的免疫功能状况, 发现胰腺炎患者的全身免疫系统尤其是 T 淋巴细胞功能下降, T 淋巴细胞减少可增加机体的易感性. Kylanpaa-Back *et al*<sup>[11]</sup>用流式细胞仪分析了急性胰腺炎患者血液中巨噬细胞的免疫功能状态, 发现在疾病早期很快就出现机体免疫功能减退的现象, 尤其是重度患者的人类白细胞抗原 DR 位点(HLA-DR)阳性单核细胞的构成比表现为低表达或下降很快, 巨噬

细胞吞噬功能低下, 清除细菌的能力下降. (3) 肠黏膜屏障的破坏. SAP时存在着肠道血流减少和缺血再灌注损伤的现象, 可直接损伤肠道组织, 是改变肠道通透性的重要因素. 肠道是人体最大的细菌及内毒素储存库, 但因存在完整的肠黏膜屏障功能, 正常情况下并不损害机体健康. Ammori *et al*<sup>[12]</sup>发现, SAP患者肠道通透性明显增加. SAP时, 肠黏膜屏障受到损害, 主要通过肠系膜淋巴结-胸导管-体循环途径发生细菌及内毒素移位, 移位至胰腺的细菌可致胰腺坏死继发感染. 同时, 机体产生和释放大细胞因子及炎症递质, 激活炎症细胞并释放氧自由基、蛋白酶和细胞因子, 作用于肠道加重肠黏膜损伤, 削弱屏障功能<sup>[13]</sup>. 以上任何一个因素均可增加细菌移位的可能性. 细菌移位后可在多个脏器中形成继发性感染, 甚至全身性败血症. 细菌和内毒素的协同作用, 还将激活吞噬细胞, 并释放出一系列具有损伤作用的炎症递质, 诱发全身炎症反应综合征(SIRS), 危害极大<sup>[14]</sup>.

## 2 抗生素的应用

**2.1 SAP抗生素应用的种类** 由于抗生素并不是通过血液途径到达坏死的胰腺组织, 而是通过胰管和胰液的弥散, 为此选择应用有效抗生素须遵循以下原则: (1) 能够通过血-胰屏障. (2) 能在胰腺组织中达到有效浓度. (3) 能有效抑制胰腺感染常见的致病菌. 在众多抗生素中: (1) 碳青酰胺类能覆盖多数革兰氏阴性菌、厌氧菌等, 广谱、强效, 耐药菌极少, 但对铜绿假单胞菌、嗜麦芽窄食单胞菌等敏感率极低. (2) 第三代头孢为广谱抗生素, 但长期应用易诱导产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(*ESBL*)大肠杆菌的繁殖. (3) 喹诺酮类抗生素在胰腺坏死组织中能达到稳定的药物浓度, 对革兰氏阳性菌抗菌活性较好, 但对革兰氏阴性菌较差. (4) 甲硝唑或替硝唑能较好地透过血-胰屏障, 而且甲硝唑及替硝唑对厌氧菌有效且脂溶性大, 可与(2)(3)联合应用, 是目前公认的辅助性抗炎药<sup>[15]</sup>. (5) 氟康唑对绝大多数念珠菌有效, 可口服、静脉给药, 且能通过血-脑屏障和血-胰屏障<sup>[16]</sup>. 氟康唑为目前抗真菌药的首选用药, 必要时可选用两性霉素B, 但两性霉素B虽可快速清除真菌, 但并不能改善预后.

耐药菌出现时可选用万古霉素等治疗. 其主要针对肠源性革兰氏阴性杆菌, 配伍选用能通过血-胰屏障的抗生素如喹诺酮类、头孢他啶、亚胺培南、甲硝唑等<sup>[17]</sup>, 能大大降低感染的并发症的发生<sup>[18]</sup>.

**2.2 抗生素给药方式的革新** 胰腺组织内抗生素的浓度高低直接关系到抗生素治疗SAP的疗效, 主要由两大因素所决定: 其一为药物自身穿透胰腺组织的能力, 即抗生素对于胰腺组织的渗透率的高低; 其二为抗生素的给药方式. 当胰腺本身存在病变时, 胰腺自身将出现不同程度的微循环紊乱、血液回流障碍等. 尿中肠道脂肪酸结合蛋白(IFABP)浓度是

判断肠道缺血的敏感指标, Rahman *et al*<sup>[19]</sup>通过测定尿中IFABP证实, SAP患者肠道血流灌注明显减少. SAP时, 由血管内皮细胞产生的内皮素(ET)增多, 而ET是迄今为止活性最强的一种缩血管递质. ET对急性胰腺炎微循环的损害作用, 文献报道几乎完全一致. ET使胰腺微血管持续痉挛, 并与胰腺腺泡ET受体结合, 促进钙离子大量内流(钙超载), 损伤胰腺细胞; ET还收缩冠脉血管影响心肌的血供, 减少心输出量, 致胰腺缺血; 同时ET减少胰腺血流, 使红细胞血流速度下降65-75%, 机能毛细血管密度下降45%, 引起胰腺腺泡坏死, 是介导胰腺炎由水肿性向坏死性转变的恶化因子<sup>[20]</sup>. 这些因素极大地影响了抗生素对于胰腺组织的渗透率. Hayashi *et al*<sup>[21]</sup>的对比实验证实, 静脉输入抗生素时胰腺局部的药物浓度仅为外周血的40%左右, 而且下降很快, 细菌培养和胰腺组织坏死的阳性率均在50%左右. 所以研究新的给药方式, 提高胰腺组织内药物浓度成为目前SAP非手术治疗中的热点. 1996年Takeda *et al*<sup>[22]</sup>提出通过区域性动脉灌注(regional arterial irrigation, RAI)蛋白酶抑制剂及抗生素来治疗SAP. 研究表明RAI治疗可以提高胰腺局部的药物浓度, 胰动脉区域灌注局部药物浓度可达静脉途径给药的6倍以上, 并且保证抗生素等药物100%作用于靶器官, 提高局部疗效, 减少药物造成的全身副反应. 但RAI在病程后期由于SAP并发胰周包裹性积液、脓肿或假性囊肿而几乎无效. 成明富 *et al*<sup>[23]</sup>在CT介导下对上述并发症进行穿刺术, 通过抽吸、注入一定量抗生素治疗获得了成功. 显然, 此项技术较手术切除来说, 优点在于成功率高、并发症少、疗效肯定、死亡率低, 可反复进行, 因此具有极大的推广价值.

通过腹腔镜下行腹腔灌洗引流术也是一种新的抗生素给药方式, 在灌洗液中加入敏感抗生素等, 可以增加灌洗疗效. 腹膜及胰腺被膜为生物半透膜, 有良好的渗透扩散作用和分泌吸收功能. 由于腹腔灌洗引流具有一定的透析作用, 可以滤过血液中形成并加重SIRS的细胞因子和炎症递质, 抑制肠道细菌移位, 降低全身炎症反应和腹腔脓肿的形成; 腹腔灌洗引流可以促使局部坏死组织排出体外; 稀释腹腔渗液中的胰酶, 减轻胰酶对周围组织的自身消化, 阻止病情进展; 缓解腹内高压, 减轻腹膜和胰腺外侵犯的发展, 有利于病情控制. 腹腔灌洗术的主要适应证为: 经系统的重症监护治疗后, 病情仍发展迅速、非手术治疗无效、或者腹腔内压进行性升高、腹膜刺激征持续不缓解或逐渐加重、范围逐渐扩大者<sup>[24]</sup>. 腹腔灌洗停止标准: 体温、WBC计数恢复正常, 腹腔引流液变清, 腹膜刺激征及自觉症状消失, 灌出液中淀粉酶正常. 本法具有以下优点: (1) 创伤少、术时短、操作简便, 能及早遏制病情恶化, 缩短病期, 减少住院时间和费用; (2) 以微创的手段能基本实现早期开腹手术所进行的操作, 安全可靠, 适应证变宽; (3) 置管准确, 灌洗充分, 引流彻底; (4) 能最大

限度减少胰腺术后继发感染的机会; (5)对出现腹腔室隔综合征或腹压明显增高的患者, 避免开腹手术关腹困难或二次关腹的发生<sup>[25]</sup>; (6)能使患者较平稳度过急性反应期, 为后续治疗创造条件。

2.3 抗生素治疗的新策略 SAP继发感染应用抗生素的降阶梯治疗是2001-03在比利时举行的第21届急诊医学及加强监护国际会议上提出的一种抗生素治疗新策略。所谓“降阶梯”含义为, 初始治疗选用的抗生素要有足够的抗菌覆盖面, 并根据细菌培养及药敏结果, 尽快降低抗菌谱的覆盖面, 转入目标性治疗。通常抗生素的经验性治疗一般疗程为1 wk, 进一步抗感染应根据病菌培养结果采用针对性治疗, 过长时间的广谱抗菌会促使真菌感染<sup>[26]</sup>。而一部分学者<sup>[27]</sup>不同意用严格的时限来决定停药, 他们认为只要患者全身中毒症状减轻, 体温正常, 即可果断停药。如果进入SAP后期, 即胰腺囊肿和胰周囊肿及包裹性积液形成, 在无继发性感染迹象的前提下, 即可停用抗生素。

总之, 目前我们在临床上强调遵循个体化治疗方案, 胰腺感染的菌群在改变, 菌种在增加, 菌株的耐药性在增强, 在很大程度上给SAP临床“细菌战争”增加了难度, 当然也对抗生素的合理应用提出了更高的要求。因此, 为了确保SAP治愈率稳步上升, 对抗生素的合理应用的研究仍须不断深入的进行。

### 3 参考文献

- Uhl W, Warshaw A, Imrie C, Bassi C, McKay CJ, Lankisch PG, Carter R, Di Magno E, Banks PA, Whitcomb DC, Dervenis C, Ulrich CD, Satake K, Ghaneh P, Hartwig W, Werner J, McEntee G, Neoptolemos JP, Buchler MW. International Association of Pancreatology. AIP Guidelines for the surgical management of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2002; 2:565-573
- Buchler MW, Gloor B, Muller CA, Friess H, Seiler CA, Uhl W. Acute necrotizing pancreatitis: treatment strategy according to the status of infection. *Ann Surg* 2000;232:619-626
- Bassi C, Larvin M, Villatoro E. Antibiotic therapy for prophylaxis against infection of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;4:CD002941
- Pupelis G, Austrums E, Snippe K. Importance of a clinical protocol in the treatment of severe acute pancreatitis. *Zentralbl Chir* 2002;127:975-981
- Buchler P, Reber HA. Surgical approach in patient with acute pancreatitis: is infected or sterile necrosis an indication in whom should this be done, when, and why? *Gastroenterol Clin North Am* 1999;28:661-671
- Radman I, Kovacevic-Metelko J, Aurer I, Nemet D, Zupancic-Salek S, Bogdanic V, Sertic D, Masic M, Pulanic R, Gasparovic V, Labar B. Surgical resection in the treatment of primary gastrointestinal non-Hodgkin's lymphoma: retrospective study. *Croat Med J* 2002;43:555-560
- Isenmann R, Rau B, Beger HG. Early severe acute pancreatitis: characteristics of a new subgroup. *Pancreas* 2001;22:274-278
- Isenmann R, Beger HG. Bacterial infection of pancreatitis necrosis: role of bacterial translocation, impact of antibiotic treatment. *Pancreatol* 2001;1:79-89
- Runzi M, Layer P. Nonsurgical management of acute pancreatitis. Use of antibiotics. *Surg Clin North Am* 1999;79:759-765
- Saidakhmedova ZT. Immunomodulating activity of thymogen in acute pancreatitis. *Vopr Pitan* 2000;69:35-36
- Kylanpaa-Back ML, Takala A, Kemppainen E, Puolakkainen P, Kautiainen H, Jansson SE, Haapiainen R, Repo H. Cellular markers of systemic inflammation and immune suppression in patients with organ failure due to severe acute pancreatitis. *Scand Gastroenterol* 2001;36:1100-1107
- Ammori BJ, Fitzgerald P, Hawkey P, McMahon MJ. The early increase in intestinal permeability and systemic endotoxin exposure in patients is not associated with systemic bacterial translocation: molecular investigation of microbial DNA in the blood. *Pancreas* 2003;26:18-22
- Chavez AM, Menconi MJ, Hodin RA, Fink MP. Cytokine-induced intestinal epithelial hyperpermeability: Role of nitric oxide. *Crit Care Med* 1999;27:2246-2251
- Ronco C, Tetra C, Mariano F, Wratten ML, Bonello M, Bordoni V, Cardona X, Inguaggiato P, Pilotto L, d'Intini V, Bellomo R. Interpreting the mechanism of continuous renal replacement therapy in sepsis: the peak concentration hypothesis. *Artif Organs* 2003;27:792-801
- Gebhardt C. Pancreaticojunal anastomosis. Indication, technique and results. *Zentralbl Chir* 2001;126(Suppl 1):29-31
- Shrikhande S, Friess H, Issengger C, Martignoni ME, Yong H, Gloor B, Yeates R, Kleeff J, Buchler MW. Fluconazole penetration into the pancreas. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2569-2571
- 孙备, 许军, 姜洪池, 李哈莉. 重症急性胰腺炎感染的相关因素分析及其预防. *中华肝胆外科杂志* 2003;9:186-188
- Kramer KM, Levy H. Prophylactic antibiotics for severe acute pancreatitis: the beginning of an era. *Pharmacotherapy* 1999; 19:592-602
- Rahman SH, Ammori BJ, Holmfield J, Larvin M, McMahon MJ. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2003;7:26-35
- Foitzik T, Faulhaber J, Hotz HG, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin mediates local and systemic disease sequelae in severe experimental pancreatitis. *Pancreas* 2001;22:248-254
- Hayashi J, Kawarada Y, Isaji S, Yokoi H, Higashiguchi T. Therapeutic effects of continuous intrasplenic antibiotic infusion in experimental acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 1996;13:184-192
- Takeda K, Matsuno S, Sunamura M, Kakugawa Y. Continuous regional arterial infusion of protease inhibitor and antibiotic in acute necrotizing pancreatitis. *Am J Surg* 1996;171:394-398
- 成明富, 李淑芳, 丁涤飞, 陈玉明. CT介导下介入治疗胰腺炎. 放射学实践 2000;15:183-184
- Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavi J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000;190:117-125
- McNelis J, Soffer S, Marini CP, Jurkiewicz A, Ritter G, Simms HH, Nathan I. Abdominal compartment syndrome in the surgical intensive care unit. *Am Surg* 2002;68:18-23
- Hartwig W, Werner J, Muller CA, Uhl W, Buchler MW. Surgical management of severe pancreatitis including sterile necrosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:429-435
- Hartwig W, Maksin SM, Foitzik T, Schmidt J, Herfarth C, Klar E. Reduction in mortality with delayed surgical therapy of severe pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2002;6:481-487

# 炎症性肠病特殊营养素的补充

陈 焰, 姒健敏

陈焰, 浙江大学医学院附属二院消化科 浙江省杭州市 310009  
姒健敏, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院胃肠疾病研究所  
浙江省杭州市 310016  
通讯作者: 姒健敏, 310016, 浙江省杭州市, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院胃肠疾病研究所. sijm@163.com  
电话: 0571-86090073-2005  
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

## 摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)与营养关系密切, 一些特殊的营养素如短链脂肪酸、鱼油、谷氨酰胺、益生菌、益生素可以维持肠道适当的免疫应答, 减轻炎症反应, 对炎症性肠病的治疗有一定作用。

陈焰, 姒健敏. 炎症性肠病特殊营养素的补充. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1577-1580  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1577.asp>

## 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎和克罗恩病, 营养与炎症性肠病的发病机制和治疗有极其重要的关系. 1990 年代以来, 人们发现某些特殊的营养素以特定的方式刺激免疫细胞, 可维持正常的、适度的免疫应答, 调控细胞因子的产生, 从而起到减轻肠道过度的炎症反应, 维持肠黏膜屏障等功能. 随着对这些特殊营养素认识的加深, 其与炎症性肠病的关系也日益受到重视. 这些特殊营养素包括短链脂肪酸、鱼油、谷氨酰胺、益生菌、益生素等. 本文就目前此方面的研究进展作如下综述.

## 1 短链脂肪酸

短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFA)是肠内主要的营养物质, 指未被吸收的膳食纤维在结肠被细菌发酵的产物, 包括乙酸、丙酸、丁酸等, 其中最主要的是丁酸, 可以供给结肠细胞70%以上代谢能量, 是结肠细胞的主要能量来源. 补充SCFA可促进肠黏膜增生, 维护肠黏膜形态. 由于口服 SCFA 被胃和小肠吸收而无法到达结肠, 故一般采用局部灌肠的方法治疗溃疡性结肠炎.

临床上已将SCFA或丁酸局部应用于远端结肠炎的治疗, 结果显示使用后疾病活动指数和炎症的组织学积分明显下降. Breuer *et al*<sup>[1]</sup>应用 SCFA 作灌肠治疗, 在 12 例溃疡性结肠炎患者中, 10 例完成全程治疗, 结果 9 例症状明显改善, 其疾病活动性指数平均自  $7.9 \pm 0.3$  分降至  $1.8 \pm 0.6$  分 ( $P < 0.002$ ), 黏膜组织学病理评分也自  $7.7 \pm 0.7$  分降至  $2.6 \pm 0.7$  分 ( $P < 0.002$ ), 可见增加

患者结肠黏膜与能源底物的接触有助于病变的恢复. 另一项临床研究<sup>[2]</sup>发现SCFA灌肠治疗远端结肠炎的疗效和糖皮质激素疗效相当. 最近 Vernia *et al*<sup>[3]</sup>报道局部使用丁酸和 5-氨基水杨酸(5-ASA)的疗效优于单独使用 5-ASA, 对复发型结肠炎患者的疗效较好. 动物实验<sup>[4]</sup>也表明饮食中增加丁酸可降低结肠炎症, 促进黏膜恢复, 认为可能与抑制HSP70和NF- $\kappa$ B有关. 膳食纤维在肠道细菌作用下生成 SCFA, 故最近研究<sup>[5]</sup>让 22 例静止期溃疡性结肠炎患者每日摄入 20 g 膳食纤维(即 60 g 燕麦糠), 结果显示 4 wk 后大便中丁酸浓度增加 36%, 且原有的腹痛和反流症状明显改善.

## 2 鱼油

鱼油中富含二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA), 同属 n-3 系列不饱和脂肪酸, 有抗炎作用, 其机制可能是降低血栓素 A<sub>2</sub>、花生四烯酸和白三烯 B<sub>4</sub>(LTB<sub>4</sub>)的性能, 这些物质在炎症性肠病中是增加的, 同时鱼油具有抑制白介素-1、血小板激活因子, 清除自由基、改善细胞膜流动性和抑制血小板聚集的作用. 由于鱼油的上述特点, 已有许多学者将鱼油应用于炎症性肠病的治疗.

有多项研究<sup>[6]</sup>表明口服补充鱼油可缓解溃疡性结肠炎症状、改善组织病变并减少激素使用量, 提示鱼油对溃疡性结肠炎的治疗有一定的有益作用. 对鱼油最早的研究是 1989 年 McCall *et al*<sup>[7]</sup>让 6 例溃疡性结肠炎患者每日服用 3-4 g EPA(16-24 粒鱼油)持续 12 wk, 结果显示患者临床和组织学均明显改善. Hawthorne *et al*<sup>[8]</sup>报道使用 4 g EPA 治疗溃疡性结肠炎的大规模实验, 并用橄榄油作对照, 发现使用鱼油可明显减少激素的使用量, 但不能减少复发率. Stenson *et al*<sup>[9]</sup>则发现服用鱼油可使体重明显增加, 改善组织学评分, 减少直肠透析液中 LTB<sub>4</sub> 合成, 但未发现有减少激素使用的效应. Loeschke *et al*<sup>[10]</sup>研究了 64 例溃疡性结肠炎, 实验组每日服用 5.1 g n-3 脂肪酸维持 2 a, 结果显示实验组 3 mo 后的疾病复发率低于对照组, 但这种状况未延续到 2 a. Almallah *et al*<sup>[11-12]</sup>让 9 例远端溃疡性结肠炎患者摄入鱼油(EPA 3.2 g, DHA 2.4 g)6 mo, 发现疾病活动指数和组织学评分改善, 还发现患者的自然杀伤细胞(NK)细胞活性较对照下降, 血清 LTB<sub>4</sub>、IL-2 和可溶性白介素 2 受体(sIL-2R)下降, 提示鱼油可抑制患者过度的免疫反应.

虽然多数学者认为鱼油可缓解溃疡性结肠炎患者的症

状,甚至减少复发或减少激素的用量,但鱼油对克罗恩病疗效的报道不一.已有数项研究,肠溶性鱼油可以减少克罗恩的复发.Belluzzi<sup>[13]</sup>将78例有高危复发因素的克罗恩病患者随机给予鱼油和安慰剂,1 a后鱼油组和对照组的缓解率分别为59%和26%,二者有显著性差异.但另一项研究<sup>[14]</sup>却发现鱼油并不能减少临床复发率.Belluzzi<sup>[13]</sup>认为上述实验的差异可能在于设计(如患者的入选、对照的选择、鱼油中脂肪酸的配方)的不同,认为虽然鱼油是否适用所有的炎症性肠病尚无定论,但在许多时候鱼油仍有显著疗效.

### 3 谷氨酰胺

谷氨酰胺(Glutamine)是血浆和细胞中含量最丰富的氨基酸,是肠细胞的主要能量来源,可以促进肠黏膜细胞增殖,维护肠黏膜屏障,是肠道修复最重要的营养物质,谷氨酰胺同时可以调节免疫功能,参与机体免疫保护,无论口服或静脉补充谷氨酰胺都有利于肠道炎症和黏膜损伤结构和功能的改善,改善肠道免疫功能,减少细菌易位.

有多项研究<sup>[15-18]</sup>显示局部使用谷氨酰胺对结肠炎有益,Ameho *et al*<sup>[15]</sup>发现服用谷氨酰胺的结肠炎小鼠的结肠IL-8,肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )浓度下降,其细菌易位也减少,且4%浓度的谷氨酰胺优于2%.Gismondo *et al*<sup>[16]</sup>发现口服补充谷氨酰胺可升高结肠炎大鼠IL-2和肠道T细胞计数,认为有局部和全身免疫调节作用.Kaya *et al*<sup>[17]</sup>给结肠炎大鼠谷氨酰胺灌肠后认为其局部治疗的作用明显优于其他药物.Kanauchi *et al*<sup>[18]</sup>给溃疡性结肠炎患者服用一种富含谷氨酰胺和纤维素的大麦食品后发现患者的临床症状和内镜表现均有明显改善,而停用后症状再次加重.

溃疡性结肠炎患者行全直肠结肠切除回肠贮袋-肛门吻合术后,约1/3发生回肠贮袋炎,如局部使用谷氨酰胺治疗可降低回肠贮袋炎的发展<sup>[19]</sup>.

但谷氨酰胺对克罗恩病的治疗作用似乎不如溃疡性结肠炎.Akobeng *et al*<sup>[20]</sup>在一项双盲随机对照的临床研究中发现活动期患者服用含高谷氨酰胺的多聚膳肠内营养组较低谷氨酰胺组并无明显优势,前者症状活动指数改善情况甚至不如后者.另有学者<sup>[21]</sup>发现口服补充谷氨酰胺的克罗恩病其肠道通透性并无好转.

### 4 益生菌

益生菌(Probiotics)是存在于消化道的无致病性菌,如乳酸杆菌、双歧杆菌、链球菌等,他们在人体中有酸对抗性,能降低结肠PH值,延长代谢活性,同时产生某些抗菌物质.研究<sup>[22-25]</sup>发现益生菌不仅可以抑制炎症,同时可抑制过强的免疫反应,其对炎症性肠病的作用已逐渐受到重视,所研究的益生菌包括VSL#3、非致病性大肠杆菌Nissle1917、双歧杆菌、乳酸杆菌、非致病性酵母菌boulardii I等,最新又研发出经基因工程技

术改造的可产生IL-10或三叶因子的乳酸菌.

宿主肠道细菌环境和局部免疫、肠屏障与溃疡性结肠炎非常相关.已有数项研究<sup>[22-25]</sup>显示益生菌对溃疡性结肠炎有一定作用,尤其在维持治疗方面.Gionchetti *et al*<sup>[22]</sup>让40例因为溃疡性结肠炎接受回肠贮袋-肛门吻合术的患者服用VSL#3或安慰剂1 a,观察回肠贮袋炎的发病情况后实验组只有2例复发,而对照有8例复发( $P<0.05$ ),且实验组症状积分和生活质量改善优于对照,认为VSL#3对预防回肠贮袋炎有效.Kruis *et al*<sup>[23]</sup>研究了120例急性溃疡性结肠炎患者在缓解期服用12 wk氨基水杨酸或Nissle益生菌的情况后发现二者的复发率无明显差别,认为益生菌是另一种较好的维持治疗药物.Rembacken *et al*<sup>[24]</sup>也有类似结论.最近的研究<sup>[25]</sup>显示乳酸菌及从中提取的免疫活性DNA片段有重要抗炎作用.基因工程合成的细菌可能会使得益生菌的作用更明显,Steidler *et al*<sup>[26]</sup>在2000年一项研究中使用可以产生抗炎因子IL-10的乳酸菌治疗小鼠肠炎,结果显示有良好治疗作用,其作用甚至可以和糖皮质激素等传统治疗药物媲美.Vandenbroucke *et al*<sup>[27]</sup>用基因工程修饰乳酸球菌,使之能分泌三叶因子,发现这种球菌可预防和治疗小鼠急性和慢性结肠炎,这些都提示随着基因工程的迅速发展,各种基因修饰的菌对炎症性肠病的治疗很可能有重要意义.

在克罗恩病患者的回肠中发现致病性大肠杆菌,所以有人<sup>[28]</sup>研究了非致病性大肠杆菌Nissle 1917[Mutaflo]和肠上皮细胞的黏附情况后发现Nissle 1917和上皮的黏附呈剂量和时间依赖性,可以抑制致病性大肠杆菌对上皮的黏附和侵袭,认为Nissle 1917在克罗恩病的预防和治疗中起到了积极有益的作用.Borrueel *et al*<sup>[29]</sup>把手术切除后的克罗恩病患者的肠黏膜分别和无致病性大肠埃希氏菌等各种细菌培养24 h后发现和几种菌培养的黏膜TNF- $\alpha$ 显下降,同时CD4细胞减少,认为益生菌可以调节局部炎症细胞因子.

Malin *et al*<sup>[30]</sup>研究了服用乳酸菌GG的14例克罗恩病患儿的IgA分泌细胞,发现其IgA分泌细胞增加,认为乳酸菌GG可以改善肠黏膜屏障.Gupta *et al*<sup>[31]</sup>让4例活动克罗恩患儿接受6 mo乳酸菌GG肠衣片,其临床症状在1 wk后便明显改善且延续整个实验周期,4 wk后疾病活动指数下降73%.Guslandi *et al*<sup>[32]</sup>将32例缓解期克罗恩病患者随机分组,一组5-氨基水杨酸1 g tid,另一组加酵母菌boulardii 1 g/d,观察到后者的临床缓解率更高,认为酵母菌boulardii可能对克罗恩病的维持治疗有一定疗效.但也有不同意见者,如Prantera *et al*<sup>[33]</sup>让45例切除病变肠段的克罗恩病患者术后服用12 mo的乳酸菌GG后发现实验组和阴性对照组的临床和内镜缓解率无差异.

总之,多数研究表明补充益生菌既有一定的营养价值,又可以抑制病变,很可能成为传统治疗外的一种新

的治疗方法,但同时也有相反结论的报道,而且存在益生菌的活力、生存时间不能确定以及治疗中何种细菌好、多长疗程合适等问题,故仍需进行设计严密、科学性强的临床实验以进行正确的评估。

## 5 益生菌

益生菌(prebiotics)由Gibson *et al*于1995年提出的,指具有选择性刺激结肠中一种或几种特定细菌生长或增强其活性,从而调节肠道微生物菌群,对机体产生有益作用又不被消化的食物成分,包括非淀粉多糖、膳食纤维、菊粉、低聚果糖等。其可以通过增加肠道特殊菌群,改变肠道微生态,发挥一定的治疗作用。和炎症性肠病相关的益生菌包括乳果糖(lactosucrose)、低聚果糖(oligofructose)、菊粉、麦麸、车前子和出芽大麦食物(germinated barley food-stuff, GBF)。其中GBF和炎症性肠病的报道最多,GBF是一种从谷类中加工提取的富含谷氨酰胺和半纤维素的食物,可被双歧杆菌等细菌转化为乳酸、醋酸和丁酸。从而改善肠道的炎症,供给肠道特殊营养,也属于益生菌的一种,同时还有减少腹泻的作用。其机制是<sup>[34]</sup>通过增加丁酸和胆盐吸收,抑制NF- $\kappa$ B活性,减少促炎因子生成,促进结肠上皮增殖。有研究<sup>[34-36]</sup>发现GBF可增加盲肠中丁酸和大便中双歧杆菌浓度,改善结肠炎症,减少症状积分,患者每日摄入20-30 g GBF,4 wk后实验组症状积分明显减少,故认为GBF是一种新的治疗溃疡性结肠炎的辅助疗法。

总之,越来越多的证据表明特殊营养素的应用具有较高的临床和科研价值,此类营养素的补充对炎症性肠病的治疗有深远的意义。虽然尚存在一些不一致的结论,但大多数结果显示营养素对炎症性肠病有积极的治疗作用,此方面的基础和临床研究方兴未艾,前景广阔。

## 6 参考文献

- Breuer RI, Soergel KH, Lashner BA, Christ ML, Hanauer SB, Vanagunas A, Harig JM, Keshavarzian A, Robinson M, Sellin JH, Weinberg D, Vidican DE, Flemal KL, Rademaker AW. Short-chain fatty acid rectal irrigation for left sided ulcerative colitis: A randomized, placebo-controlled trial. *Gut* 1997;40:485-491
- Vernia P, Cittadini M, Caprilli R, Torsoli A. Topical treatment of refractory distal ulcerative colitis with 5-ASA and sodium butyrate. *Dig Dis Sci* 1995;40:305-307
- Vernia P, Annese V, Bresci G, d'Albasio G, D'Inca R, Giaccari S, Ingrosso M, Mansi C, Riegler G, Valpiani D, Caprilli R; Gruppo Italiano per lo Studio del Colon and del Retto. Topical butyrate improves efficacy of 5 ASA in refractory distal ulcerative colitis: result of a multicentre trial. *Eur J Clin Invest* 2003;33:244-248
- Venkatraman A, Ramakrishna BS, Shaji RV, Kumar NS, Pulimood A, Patra S. Amelioration of dextran sulfate colitis by butyrate: role of heat shock protein 70 and NF-kappaB. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G177-G184
- Hallert C, Björck I, Nyman M, Pousette A, Granno C, Svensson H. Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: controlled pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:116-121
- Aslan A, Triadafilopoulos G. Fish oil fatty acid supplementation in active ulcerative colitis: a double-blind, placebo controlled, crossover study. *Am J Gastroenterol* 1992;87:432-437
- McCall TB, O'Leary D, Bloomfield J, O'Morain CA. Therapeutic potential of fish oil in the treatment of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1989;3:415-424
- Hawthorne AB, Daneshmend TK, Hawkey CJ, Belluzzi A, Everitt SJ, Holmes GK, Malkinson C, Shaheen MZ, Willars JE. Treatment of ulcerative colitis with fish oil supplementation: a prospective 12 month randomized controlled trial. *Gut* 1992;33:922-928
- Stenson WF, Cort D, Rodgers J, Burakoff R, DeSchryver-Kecskemeti K, Gramlich TL, Beeken W. Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. *Ann Intern Med* 1992;116:609-614
- Loeschke K, Ueberschaer B, Pietsch A, Gruber E, Ewe K, Wiebecke B, Heldwein W, Lorenz R. n-3 fatty acid only delay early relapse in ulcerative colitis in remission. *Dig Dis Sci* 1996;41:2087-2094
- Almallah YZ, Ewen SW, El-Tahir A, Mowat NA, Brunt PW, Sinclair TS, Heys SD, Eremin O. Distal proctocolitis and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs): the mucosal effect in situ. *J Clin Immunol* 2000;20:68-76
- Almallah YZ, El-Tahir A, Heys SD, Richardson S, Eremin O. Distal procto-colitis and n-3 polyunsaturated fatty acids: the mechanism (s) of natural cytotoxicity inhibition. *Eur J Clin Invest* 2000;30:58-65
- Belluzzi A. N-3 fatty acids for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Proc Nutr Soc* 2002;61:391-395
- Lorenz-Meyer H, Bauer P, Nicolay C, Schulz B, Purrmann J, Fleig WE, Scheurlen C, Koop I, Pudel V, Carr L. Omega-3 fatty acids and low carbohydrate diet for maintenance of remission in Crohn's disease. *Scand J Gastroenterology* 1996;31:778-785
- Ameho CK, Adjei AA, Harrison EK, Takeshita K, Morioka T, Arakaki Y, Ito E, Suzuki I, Kulkarni AD, Kawajiri A, Yamamoto S. Prophylactic effect of dietary glutamine supplementation on interleukin 8 and tumor necrosis factor alpha production in trinitrobenzene sulphonate induced colitis. *Gut* 1997;41:487-493
- Gismondo MR, Drago L, Fassina MC, Vaghi I, Abbiati R, Grossi E. Immunostimulating effect of oral glutamine. *Dig Dis Sci* 1998;43:1752-1754
- Kaya E, Gur ES, Ozguc H, Bayer A, Tokyay R. L-glutamine enemas attenuate mucosal injury in experimental colitis. *Dis Colon Rectum* 1999;42:1209-1215
- Kanauchi O, Iwanaga T, Mitsuyama K. Germinated barley foodstuff feeding. A novel nutraceutical therapeutic strategy for ulcerative colitis. *Digestion* 2001;63(Suppl 1):60-67
- Wischmeyer P, Pemberton JH, Phillips SF. Chronic pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis: responses to butyrate and glutamine suppositories in a pilot study. *Mayo Clin Proc* 1993;68:978-981
- Akobeng AK, Miller V, Stanton J, Elbadri AM, Thomas AG. Double-blind randomized controlled trial of glutamine-enriched polymeric diet in the treatment of active Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:78-84
- Den Hond E, Hiele M, Peeters M, Ghos Y, Rutgeerts P. Effect of long-term oral glutamine supplement on small intestinal permeability in patients with Crohn's disease. *J Parenter Enteral Nutr* 1999;23:7-11
- Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003;124:1202-1209
- Kruis W, Schutz E, Frick P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:853-858
- Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for

- the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999;354:635-639
- 25 Famularo G, Mosca L, Minisola G, Trinchieri V, De Simone C. Probiotic lactobacilli: a new perspective for the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 2003;9:1973-1980
- 26 Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000;289:1352-1355
- 27 Vandenbroucke K, Hans W, Van Huysse J, Neiryck S, Demetter P, Remaut E, Rottiers P, Steidler L. Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice. *Gastroenterology* 2004;127:502-513
- 28 Boudeau J, Glasser AL, Julien S, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18:45-56
- 29 Borruel N, Carol M, Casellas F, Antolin M, de Lara F, Espin E, Naval J, Guarner F, Malagelada JR. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 2002;51:659-664
- 30 Malin M, Suomalainen H, Saxelin M, Isolauri E. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. *Ann Nutr Metab* 1996;40:137-145
- 31 Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S. Is *Lactobacillus GG* helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31:453-457
- 32 Guslandi M, Giollo P, Testoni PA. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:697-698
- 33 Prantera C, Scribano ML, Falasco G, Andreoli A, Luzi C. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus GG*. *Gut* 2002;51:405-409
- 34 Fukuda M, Kanauchi O, Araki Y, Andoh A, Mitsuyama K, Takagi K, Toyonaga A, Sata M, Fujiyama Y, Fukuoka M, Matsumoto Y, Bamba T. Prebiotic treatment of experimental colitis with germinated barley foodstuff: a comparison with probiotic or antibiotic treatment. *Int J Mol Med* 2002;9:65-70
- 35 Bamba T, Kanauchi O, Andoh A, Fujiyama Y. A new prebiotic from germinated barley for nutraceutical treatment of ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:818-824
- 36 Kanauchi O, Suga T, Tochihiro M, Hibi T, Naganuma M, Homma T, Asakura H, Nakano H, Takahama K, Fujiyama Y, Andoh A, Shimoyama T, Hida N, Haruma K, Koga H, Mitsuyama K, Sata M, Fukuda M, Kojima A, Bamba T. Treatment of ulcerative colitis by feeding with germinated barley foodstuff: first report of a multicenter open control trial. *J Gastroenterol* 2002;37(Suppl 14):67-72

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 •

## 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)



# 凋亡蛋白抑制剂家族研究进展

都昌胡, 徐 军

都昌胡, 徐军, 广州医学院第一附属医院广州呼吸疾病研究所  
广东省广州市 510120

通讯作者: 徐军, 510120, 广东省广州市, 广州医学院第一附属医院广州呼吸疾病研究所.

电话: 020-33836480 传真: 020-87331451

收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-05-15

## 摘要

凋亡蛋白抑制剂(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)编码一组结构相关的蛋白, 该家族成员不仅可以抑制细胞凋亡, 而且参与多种似无关联的生物学功能, 如调节细胞周期和细胞分裂等. 迄今为止, 在人体新发现的 IAPs 家族有 8 个成员, 分别是 HIAP-1、HIAP-2、XIAP、ML-IAP、Survivin 和 ILP-2/Ts-IAP、NAIP、BRUCE/apollon 等. 本文对现有的 IAPs 家族成员的结构特征和功能作一总结, 尤其对 Survivin 的分子构成、功能、作用机制、组织分布、表达特点、生物学特性以及与肿瘤治疗相关的研究进展方面进行重点综述.

都昌胡, 徐军. 凋亡蛋白抑制剂家族研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1581-1589

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1581.asp>

## 0 引言

在肿瘤的分子生物学研究中, 细胞凋亡始终是学术界的研究热点. 细胞凋亡, 又称程序性细胞死亡, 是细胞自杀的遗传主动过程, 具有特定的形态学特征和生化标记. 在生理状态下, 机体通过凋亡途径清除体内衰老和异常细胞, 维持机体组织的动态平衡. 而对于肿瘤, 如凋亡过程受抑制, 将促使细胞恶性增生, 导致肿瘤的发生, 而且造成肿瘤细胞对放化疗不敏感. 其中的机制除了经典的 Bcl-2 蛋白过表达直接或间接抑制了凋亡以外<sup>[1]</sup>, 另外一组调节凋亡分子在 1993 年 Crook *et al*<sup>[2]</sup>为了鉴定病毒感染的调节子过程中被从杆状病毒中发现, 即凋亡蛋白抑制剂(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)家族.

## 1 IAP 家族的概述

IAPs 是一组高度保守的含有 2-3 个长约 70 个氨基酸串联的半胱氨酸/组氨酸的杆状病毒 IAP 重复序列(baculoviral IAP repeats, BIRs)的家族, IAPs 在许多物种中广泛表达, 结构上具有同源性, 如哺乳动物、昆虫、细菌、酵母中均发现有 IAP, 充分证明 IAP 在生物体内普遍存在且高度保守, BIR 结构是 IAP 能够发挥拮抗细胞凋亡作用的必要元件. 许多 IAP 除了 BIR 结构外, 还有与此重复序

列相邻的羧基末端: 含有一个环指结构和 Caspase 募集结构域(caspase recruitment domain, CARD)以及泛素结合位点. 随着研究的深入, 凋亡蛋白抑制剂的种类和数量逐渐增多. 较目前已知 bcl-2 家族的所有凋亡抑制基因成员可能更多. 迄今为止, 在人体新发现的 IAPs 有 8 个成员, 分别是 HIAP-1、HIAP-2、XIAP(X chromosome-associated IAP)、ML-IAP(melanocytes IAP)、Survivin 和 NAIP、BRUCE (Apollon)、ILP-2/Ts-IAP 等<sup>[3]</sup>(图 1).

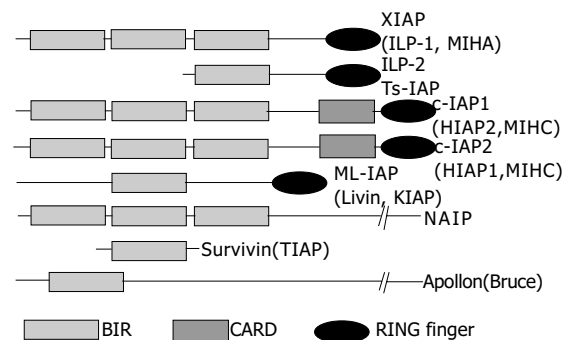


图 1 哺乳动物 IAPs 家族成员. BIR: baculovirus IAP repeat; CARD: caspase-recruitment domain; ILP: IAP-like protein; MIHA: mammalian IAP homologue A; NAIP: neuronal apoptosis inhibitory protein.

## 2 HIAP<sup>[4]</sup>

HIAP 位于染色体 11q22-23. HIAP-1 和 HIAP-2 的结构和功能相似, 二者都是肿瘤坏死因子受体 2 (TNFR2) 复合体的成员. 干扰肿瘤坏死因子 (TNF) 激活的死亡信号, 从而抑制凋亡. 在脾和胸腺中有大量 HIAP-2 的表达, 可见 HIAP-2 在调节人体免疫方面有一定意义.

## 3 XIAP<sup>[5]</sup>

XIAP 基因位于 X 染色体 q24-25, 含 497 个氨基酸的蛋白. 结构生物学分析表明 XIAP 的 BIR2 区有 3 个反平行  $\beta$  片层、4 条  $\alpha$  螺旋、3 个高度保守的半胱氨酸和 1 个组氨酸, 并螯合 1 个锌原子, 能直接抑制编码 Caspase-3, 7, 但是不能直接抑制 Caspase-1, 6, 8 10, 同时 BIR3 区还可直接抑制 Caspase-9 前体 -C- 末端的亚单位, XIAP-Caspase-9 的结合区域是一个潜在的药物设计靶点. Smac(second mitochondria-derived activation of caspase)也称为 DIABLO(direct IAP-binding protein with low PI)全长 cDNA 编码一段 239 个氨基酸读码框, 与 IAP 结合加速凋亡. 在细胞凋亡过程中, 线粒体释放

Smac/DIABLO 中和 IAPs, 提高依赖细胞色素 c/Apaf-1/Caspase-9 的凋亡途径. Smac 与 XIAP 结合可能是 SMAC 的 N 末端取代了 Caspase-9 小亚基的 N 端, 而使活性酶释放. 激活的 Caspase-9 裂解 Caspase-3 前体, 使其成为有活性的 Caspase-3, Caspase-3 又正反馈于 Caspase-9. SMAC 末端残基 Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) 与 XIAP BIR3 结合, 抑制其与 Caspase-9 的作用. 如果在体外含 AVPI 的小分子多肽能与 XIAP 结合, 可用来合成一种选择性抑制肿瘤细胞上调的 XIAP 药物, 选择性激活 Caspase, 从而达到治疗肿瘤的目的.

受体介导的外源性细胞凋亡途径是在 Caspase-8 的激活下启动的, 进而再激活 Caspase-3. 内源性细胞凋亡途径首先由 Bcl-2 家族致凋亡成员 (像 Bax 基因) 提高线粒体膜的通透性, 使之释放出细胞色素 C 进入胞质, 后者与前体 Caspase-9、Apaf-1 (apoptosis protease activating factors) 组成凋亡体, 结果激活前体 Caspase-9, 进而激活 Caspase-3. 分解死亡底物, 完成细胞凋亡过程. 有些情况下, 受体介导的信号也可以通过线粒体通路传递, 如 Bid, FADD 的激活 (图 2).

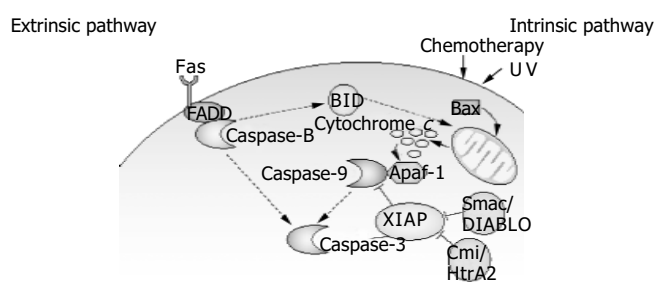


图 2 细胞凋亡的外源性途径和内源性途径. FADD: Fas-associated death domain protein; UV: ultraviolet light; XIAP: X-linked IAP.

#### 4 ML-IAP<sup>[7]</sup>

ML-IAP 的基因定位于染色体 20q13, 编码约 280 个氨基酸残基的蛋白. ML-IAP 含有 1 个 BIR 和 1 个 RING 结构, 分析发现 124 位半胱氨酸, 120 和 138 位天冬氨酸的突变会使 ML-IAP 丧失抑制凋亡的功能; 120 和 138 位天冬氨酸也能使其失去抑制死亡受体诱导的凋亡; ML-IAP 可以和 Smac 结合, 较弱的抑制 caspase-3 和 caspase-9 的活性. 其不参与 TNF- $\alpha$  通路. ML-IAP 在胚胎组织和肿瘤细胞中大量表达, 尤其在黑色素瘤细胞中高表达. 故 ML-IAP 可能在黑色素细胞瘤病理过程中起重要作用.

#### 5 NAIP<sup>[8]</sup> (neuronal apoptosis inhibitory protein)

NAIP 可能与神经退行性疾病-脊髓肌肉萎缩症有关, 该疾病是由于 SMN 基因突变引起的, 而 NAIP 可能是此基因的调节者.

#### 6 Survivin

Survivin 是一种新近发现的结构独特的 IAPs 成员. 具有

抑制细胞凋亡和调节细胞周期和细胞分裂的双重功能. 主要功能是通过抑制 Caspase-3, Caspase-7 而阻断细胞凋亡; 还与微管蛋白相互作用调控细胞有丝分裂以及参与血管形成. 主要表达于胚胎和发育的胎儿组织, 同时高表达于绝大多数肿瘤组织和转化细胞, 而在终末分化成熟的正常成人组织中无表达. Survivin 可能是一种癌基因, 参与肿瘤的发生发展过程. 提示他是一个有潜在价值的肿瘤标志物, 与肿瘤诊断、预后均密切相关<sup>[9-10]</sup>. 针对 Survivin 设计了一系列的拮抗剂, 抑制肿瘤生长, 增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性, 因此该基因有可能成为肿瘤治疗的新靶点. 下文着重讨论 survivin 的分子结构、生物学功能及与其他 IAPs 的不同之处和在肿瘤治疗中的可能地位<sup>[9]</sup>.

6.1 Survivin 的发现与蛋白结构及表达 Survivin 基因早在 1997 年由耶鲁大学的 Altieri 研究组发现<sup>[11]</sup>, 他们用效应细胞蛋白酶受体-1 (effector cell protease receptor-1, EPR-1) cDNA 作探针从人类基因组 P1 文库中通过杂交筛选获得, Survivin 与 EPR-1 位于同一染色体, 二者转录方向相反, 互为天然反义核酸. 但由于表达时间上的差异, 导致他们在自然状态下相互作用的可能性非常有限. Survivin 是迄今发现的最强的凋亡抑制因子, 其抑制细胞凋亡的作用远大于 Bcl-2 家族成员.

鼠 Survivin 基因定位于染色体 11E2 的端粒区. 鼠 Survivin 基因与人类 Survivin 基因均含有 4 个外显子, 但其 cDNA 可编码在距 ATG 起始区 -32、-36 及 -40 位分别有 3 个转录起始位点, 编码 3 种不同的 Survivin 蛋白. 最长的开放阅读框来自于全部 4 个外显子, 第二个 cDNA 含有内含子 2, 编码 121 个氨基酸的蛋白, 缺乏羧基端螺旋功能区. 以前体 mRNA 剪接去除外显子 2, 可获得第 3 个含有 40 个氨基酸的蛋白, 缺乏 BIR 功能区 and 羧基端螺旋功能区, 因此也缺乏对 Caspase-3 的抑制作用. 人类 Survivin 研究也发现了 2 种具有不同抗凋亡特性的新的 Survivin 的剪接变构体, 一种是缺乏外显子 3 (Survivin- $\Delta$ Ex3), 另一种保留了部分内含子 2 作为隐性外显子 (Survivin-2B) (图 3). 2 种序列的变化使其编码蛋白的结构也有显著差异, 包括对 BIR 区的结构修饰. 通过转染实验研究 2 种剪接变构体对凋亡的调控, 显示 Survivin- $\Delta$ Ex3 保留了抗凋亡特性, 而 Survivin-2B 的抗凋亡能力明显降低, 其原因可能是 Survivin-2B 获得的外显子改变了 BIR 功能域. 人类 Survivin 基因定位于染色体 17q25, 靠近端粒, 包含 4 个外显子和 3 个内含子, 全长 14.7 kb, 转录产物为 1.9 kb. Survivin 蛋白是 IAP 家族中最小的成员, 仅由 142 个氨基酸残基构成, 分子量只有 16.5 ku. 结构上与其他 IAP 蛋白略有不同, Survivin 蛋白只包含 2 个特定的结构: N-端含有一个单拷贝的 BIR 结构域, 并且存在一个由 Cys-Pro-Thr 三氨基酸组成的插入片段, 将 BIR 结构域分成 2 个二等分的模块, 这一插入片段是 Survivin 所特有的, 其他潜在重要

性目前尚不清楚, 具体功能还有待进一步研究. 该BIR区域可以通过抑制 Caspase-3 和 Caspase-7 的前体或直接抑制 Caspase-3 和 Caspase-7 本身的活性来发挥抗凋亡作用. BIR 结构中心是一个由 3 条反平行的肽链组成的  $\beta$  片层(与 XIAP 的 BIR2 相似, 中心都是大  $\beta$  片层), 周围是 4 个短  $\alpha$  螺旋. BIR 结构中心的  $\beta$  片层面积大, 富含酸性氨基酸, 是 Survivin 蛋白配体结合区域, 当该区域被磷酸化后, 表面电荷更多, 与配体结合能力更强. 在  $\beta$  片层中残基 Thr34-Pro-Glu-Arg 被认为是 CDK 结合位点. 突变体 T34A 失去抗凋亡功能. BIR 另一个特点是  $Zn^{2+}$  处于 Survivin 蛋白 BIR 单拷贝上的 Cys57、Cys60、His77 和 Cys84 构成的四面体内, 以配位键将此 4 个氨基酸残基连结. 这个结构对 Survivin 蛋白抗凋亡功能很重要, 因为研究发现, Survivin 蛋白突变体 C84A (Cys84 突变为 Ala84) 不具备抗凋亡功能, 而 Pro26 突变为 Ala 或 Leu64 突变为 Ala 则功能正常. Survivin 蛋白另一个显著特点是 C-端是由 42 个氨基酸的高电荷区所形成的疏水  $\alpha$ -螺旋卷曲结构(coiled coil)- $\alpha 6$ .  $\alpha 6$  长约 65 Å (1 Å =  $10^{-10}$  m), 由 C 端 40 个残基组成, 有 11 圈螺旋, 靠近 BIR 的 4 圈螺旋与 BIR 通过氢键和疏水键连结, 形成空间相对固定的稳定结构, 剩下的 7 圈螺旋远离 BIR. C 端  $\alpha$  螺旋上的残基 126-142 构成 C 端疏水域, 调节 Survivin 与纺锤体上的  $\gamma$  微管蛋白结合. C 端不包含 IAP 家族其他成员所具有的环指结构, 该结构具有蛋白泛肽化降解信号的作用. 研究发现 Survivin 蛋白单体结合成蝴蝶结样的对称二聚体, 这种二聚体化是 Survivin 抗凋亡功能所必需的. 两个 Survivin 蛋白通过 BIR 相互聚集, 两边的  $\alpha 6$  形成  $110^\circ$  夹角, 这就使二聚体有一个弧形的、广阔的结合空间. 二聚体内部单体之间的结合也很有趣, 在结合部位两侧残基 94-99 形成分子间  $\beta$  片层结构. 由于 Survivin 蛋白单体和二聚体的稳定性以及抗凋亡功能的不同, 二聚体连结处也是干扰 Survivin 蛋白功能的靶点之一. Survivin 蛋白与中心粒微管蛋白的结合对于 Survivin 蛋白发挥抗凋亡促增殖作用也是必须的, 切断 C 端  $\alpha$  螺旋上的残基 126-142, 虽然二聚体仍然可以形成, BIR 也正常折叠, 但是 Survivin 蛋白无法定位于中心粒, 无法使 CDK4(周期蛋白依赖性蛋白激酶)、P21 和 Caspase-3 在微管组装中心聚集, 从而失去调控凋亡和细胞周期的功能. 在 Survivin 的启动子区 5' 端缺少典型的 TATA 序列, 而是含有一个典型的 CpG 岛结构. 在外显子 1 的上游大约 200 nt 处有 GC 富集区. 启动子区含有 2 个 AP2 位点、3 个 NF- $\kappa$ B 位点和 1 个 Sp1 位点, 大约 60-80% 人和鼠 Survivin 基因的转录依赖于 Sp1 位点的完整性. 该区还有 3 个细胞周期依赖元件(cell cycle-dependent elements, CDEs) 和一个细胞周期基因同源区(cell cycle gene homology region, CHR). 其中 -51 区的 CHR 和 -57 区的 CDE 对 Survivin 调控细胞周期很重

要. CDE 盒的缺失使 Survivin 基因的细胞周期依赖性表达消失, 影响细胞的生存和导致肿瘤的发生. 另外, 经序列分析发现, Survivin 在 Thr21, Ser88 和 Thr127 含有 3 个蛋白激酶 C(PKC) 磷酸化作用点, 在 Thr48 和 Thr97 有两个酪氨酸蛋白酶作用点, 在 Ser81 有一个蛋白激酶 A(PKA) 作用点, 这些特殊位点在调节细胞凋亡中的作用还有待进一步研究. 与其他 IAPs 不同, Survivin 基因表达不受 TNF $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号转导系统的影响<sup>[12-14]</sup>.

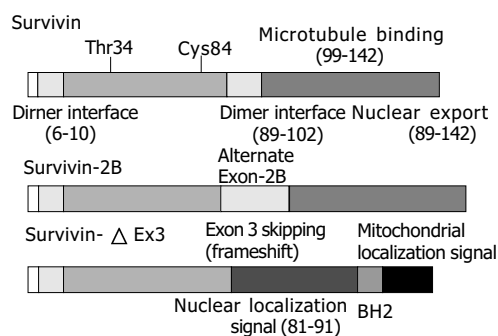


图3 Survivin 的 3 种选择性剪接方式.

Survivin 严格以细胞周期 (G2/M 期) 依赖性方式高表达, 并通过与有丝分裂纺锤体结合而发挥抗凋亡作用. 进一步研究发现这种表达调控主要发生在转录水平, 由位于 Survivin 基因 -6, -12, -171 的序列 GGCGG 以及 -42 的 ATTTGAA 进行调控. 这些区域是调节 G2/M 期细胞周期依赖性基因表达的媒介. 在 HeLa 细胞的实验研究发现 Survivin 在 G1 期的表达基本检测不到, 在 S 期细胞的表达增加 6 倍, 而在 G2/M 期的表达则超过了 40 倍. 一旦失去以上顺式作用元件的 Survivin 基因在 G2/M 期的表达同 G1 期无显著差异. 随着细胞周期的运动, Survivin 蛋白的表达调控与亚细胞定位也发生相应改变. 在分裂间期, Survivin 蛋白定位于中心粒, 分裂前期、中期定位于着丝粒; 后期定位于赤道板(midbodies), 末期又定位于中心粒. 进一步研究发现: 在分裂间期, Survivin 蛋白主要与中心粒表面的  $\gamma$  微管蛋白结合,  $\gamma$  微管蛋白的主要功能是与  $\alpha$ 、 $\beta$ -微管蛋白异二聚体中的  $\beta$  亚单位结合, 使微管在临近细胞核的特定区域即微管组装中心 (MTOC) 形成. 以上 Survivin 蛋白的表达调控与亚细胞定位研究提示 Survivin 蛋白的功能可能是使细胞周期能够顺利得以进行的必要条件, 而且他在细胞内可能参与中心体的装配, 在细胞周期纺锤体组装检查点(spindle assembly checkpoint) 机制中发挥重要功能. 与其他的 IAPs 在各种正常成人组织中的广泛表达不同, 不同组织仅仅表现为表达水平的差别, 生理状态下, 在成人除子宫内膜组织、胎盘和胸腺组织中发现存在不同程度的 Survivin 基因表达外, 大多数组织, 如正常分化成熟组织具有高增殖指数的细胞区域, 如皮肤基底层角质形成细胞、肠腺窝上皮细胞和正常骨髓细胞, 均检测不到 Survivin

基因表达,相反通过原位杂交和蛋白印迹实验提示,14-21 wk的胎儿中Survivin在不同部位(肾小管、肺腺泡、胰腺、子宫内膜腺、表皮、胸腺髓质、脊索神经元)的组织中均可以明显检测到,这表明Survivin基因在人类发育过程中起着某些重要作用.研究显示绝大多数人类恶性肿瘤细胞和组织中均存在Survivin表达,这一普遍分布现象表明Survivin在癌症中可能处于失控的表达状态<sup>[15-18]</sup>.

**6.1.1 Survivin蛋白在神经胶质瘤的表达** Adida *et al*<sup>[19]</sup>用免疫组化分析了成神经细胞瘤survivin的表达情况以及阳性表达与临床预后、临床分级、组织学分类的关系.选取了72例成神经细胞瘤病例,Survivin阳性表达率为47%(34/72).组织学形态较差组的Survivin阳性表达率较高,为73.9%(17/23),而组织学形态较佳组Survivin阴性率较高,为60%(15/25).2例自发消退的成神经纤维瘤Survivin表达均为阴性.认为survivin的表达和成神经细胞瘤的恶性程度正相关,也和肿瘤的组织形态有关.

**6.1.2 Survivin蛋白在非小细胞性肺癌(NSCLC)的表达** Monzo *et al*<sup>[20]</sup>用RT-PCR方法分析83个NSCLC标本,发现71例(85.5%)肿瘤标本阳性.12例表达阴性的病例比71例表达阳性的病例在生存时间上有明显差异,即Survivin表达阴性患者预后明显好于表达阳性者.但Survivin表达和年龄、性别、吸烟、肿瘤大小、淋巴转移和病理组织学之间无明显关系.

**6.1.3 Survivin蛋白在乳腺癌的表达** Tanaka *et al*<sup>[21]</sup>用免疫组化法显示,167例III期乳腺癌中Survivin阳性表达118例(70.7%),而癌旁组织表达均为阴性.Survivin表达阳性的乳腺癌与Survivin表达阴性的乳腺癌相比,前者凋亡率是 $0.62 \pm 0.52\%$ ,显著低于后者 $1.27 \pm 1.37\%$  ( $P < 0.0001$ ),提示survivin的表达可以作为预后较差的标志.在乳腺癌组织中,Survivin基因的表达与Bcl-2基因的表达及凋亡指数的下降具有高度相关性,由于Survivin与Bcl-2分别作用于凋亡通路的不同点,对凋亡抑制可以产生协同作用,因此二者的同时表达提示肿瘤预后不良.而Survivin表达与年龄、绝经状况、肿瘤大小、临床分期、淋巴结转移、ER状况、静脉侵犯、肿瘤组织学类型和复发均无显著关系.

**6.1.4 Survivin蛋白在消化系统肿瘤的表达** Lu *et al*<sup>[22]</sup>用免疫组化分析了174例I-III期胃癌,其中60例(34.5%)阳性,癌旁正常组织均无表达.Survivin表达阳性的胃癌与Survivin表达阴性的胃癌相比,凋亡率明显降低.在胃癌中,癌细胞胞核Survivin阳性与良好预后、发病年龄小、血管侵犯发生率低有关,但胞质阳性与肿瘤进展或预后无相关性,提示Survivin在胃癌细胞核中的表达在阻止肿瘤进展上可能有一定的作用,但Survivin表达阳性与肿瘤大小、浸润深度、淋巴结转移均无显著关系.Kawasaki *et al*<sup>[23]</sup>报道了Survivin在结直肠癌的表

达情况,其中91例(53.2%)阳性,癌旁正常组织均无表达.Survivin表达阳性与肿瘤大小、深度、淋巴管或静脉侵犯、淋巴结转移、组织学分级、Duke's分期、癌肿复发均无显著关系,Survivin的表达上调与直肠癌凋亡指数下降、总体存活率缩短、预后不良和复发率增加有关,在II期结、直肠癌患者中,Survivin表达阳性患者根治术后5 a生存率明显低于表达阴性者,可以作为预后不良的重要指标,Kawasakiza *et al*<sup>[24]</sup>在另一项研究中指出结直肠癌中Survivin表达与P53无明显相关性.并且在大肠腺瘤轻度不典型增生至高度不典型增生直至癌的演变过程中,Survivin表达逐渐增加,其中高度增生不良腺瘤Survivin的阳性率与腺癌无明显差异.其表达不仅与凋亡指数负相关,而且与增殖指数和微血管密度成正相关.Ikeguchi *et al*<sup>[25]</sup>研究指出Survivin阳性的肝癌患者5 a无病生存率(19%)明显低于其阴性患者(39%),而且57%的肝癌复发患者有Survivin表达,提示Survivin的表达可作为肝细胞癌患者独立的预后因子.

**6.1.5 Survivin蛋白在泌尿系统肿瘤中的表达** 我们知道目前临床用于检查膀胱癌的方法是膀胱镜检和尿细胞学检测.前者具有侵入性、不适感,且价格贵的缺点,而后者检测特异性虽高,但敏感性却只有40-60%、尤其在低分化病变中更低.Smith *et al*<sup>[26]</sup>对158例尿液研究发现仅在膀胱癌患者尿液中可检测出Survivin.膀胱癌患者尿中检测出Survivin,可能与膀胱移行细胞癌细胞易脱落至尿中有关.在大规模病例中检测尿液Survivin蛋白的表达证实该方法诊断膀胱癌的敏感性为100%,特异性为95%,为膀胱癌诊断提供了一个简单、非侵入性的检测手段.Swana *et al*<sup>[27]</sup>利用免疫组化法研究36例膀胱癌Survivin表达,Survivin总阳性表达率为78%(28/36),其中I级膀胱癌阳性表达率65%(13/20),II级90%(9/10),III级100%(6/6),而正常膀胱黏膜无表达.同时膀胱癌由于其80%的复发率而很难治愈,一项相关研究发现膀胱癌Survivin表达与肿瘤复发有关.在I级膀胱癌患者中,不表达Survivin的患者复发间隔为 $35.5 \pm 16.2$  mo,而表达Survivin的患者复发间隔为 $10.5 \pm 6.2$  mo,二者有显著性差异( $P < 0.001$ ),说明Survivin的表达与膀胱癌的复发密切相关,而在该实验中,包括Bcl-2及p53的表达在内,没有任何其他的分子指标能表现出类似的预后作用.Takamizawa *et al*<sup>[28]</sup>在对小儿肾癌的研究中发现Survivin表达均较正常肾组织高,其中初发性肾癌Survivin阳性表达率为18%,复发性肾癌为50%.

**6.1.6 Survivin蛋白在生殖系统肿瘤的表达** Hattori *et al*<sup>[29]</sup>检测Survivin在卵巢癌表达,其阳性率约为86%,研究发现Survivin在卵巢透明细胞腺癌的表达水平比卵巢浆液性腺癌高,并且前者原发灶的Survivin水平高于转移灶,但后者无此现象,提示Survivin的表达影响卵巢

透明细胞腺癌和浆液性腺癌的进展. 此外Saitoh *et al*<sup>[30]</sup>检测了34株宫颈癌细胞株和25例宫颈癌标本以及2株子宫内膜癌细胞株和17例子宫内膜癌标本, 结果发现, 所有细胞株和标本均有survivin表达, 并与凋亡指数的下降密切相关, 表明Survivin的抗凋亡作用参与了宫颈癌的发生及发展过程.

**6.1.7 Survivin在淋巴造血组织系统肿瘤的表达** 在100%的急性骨髓白血病(AML)的细胞株可检测到Survivin表达, 相反经过全反视维甲酸处理明显降低HL-60, OCI-AML3, MB-4细胞的Survivin水平, 表明Survivin在骨髓白血病高表达并受全反视维甲酸的抑制. Survivin在50-60%高度恶性非霍奇金淋巴瘤有表达, 而在低度恶性非霍奇金淋巴瘤无表达. Adida *et al*<sup>[31-32]</sup>用免疫组织化学方法研究弥散性大细胞淋巴瘤, 发现60%的患者有survivin蛋白表达, 在阳性组, 5 a生存率低于阴性组, Survivin可作为弥漫性大细胞性B细胞淋巴瘤(DLBCL)预后的参考指标.

**6.1.8 Survivin在其他系统与组织肿瘤及癌前病变的表达** Grossman *et al*<sup>[33]</sup>研究指出在皮肤肿瘤中有81%基底细胞癌、92%鳞状细胞癌、所有鲍温氏病和HAK(hypertrophic actinic keratosis)有Survivin表达, 提示Survivin可能参与了基底细胞癌和鳞状细胞癌的发病和进展. 该作者用免疫组化检测30例恶性黑色素瘤时发现, 转移者的15例均为阳性, 浸润者的15例中有13例阳性. 癌灶附近的正常黑色素细胞或其他正常细胞均为阴性. Koch *et al*<sup>[34]</sup>发现所有嗜铬细胞瘤和副神经节瘤均有Survivin的表达, 但尚不足以作为鉴别良性和恶性嗜铬细胞瘤和副神经节瘤的可靠指标. 此外Survivin蛋白还被发现存在于结肠息肉、乳腺炎、角化皮炎等一些癌前损伤组织中, 这提示Survivin的表达出现在恶性转化前期, 可能具有促进这些损伤恶性转化的作用. 以上研究均表明Survivin高表达于恶性肿瘤, 可作为肿瘤诊断和预后的一个有价值的指标. 肿瘤细胞表达Survivin除了可以使肿瘤血管内皮细胞对化疗药物产生抵抗不至于受化疗药物诱导的凋亡的影响, 同时研究发现Survivin的表达可被血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)上调, 有研究<sup>[35]</sup>用血管内皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)以及血管形成素1(angiopoietin-1)等有丝分裂原刺激静息的内皮细胞, 可以诱导Survivin的表达上调10-19倍之多. 有丝分裂原还可刺激培养的内皮细胞Survivin表达快速增加, 在6-10 h即达高峰. 提示Survivin蛋白在肿瘤血管形成过程中的表达可能对肿瘤细胞的浸润、迁移起重要作用. 因此, 可以认为Survivin是一种癌基因在肿瘤组织中高表达而参与肿瘤的发生和发展.

**6.2 Survivin的生物学功能及其在肿瘤细胞中的作用机制**

Survivin蛋白同时具有共同调控细胞周期和细胞凋亡的双重功能<sup>[36-43]</sup>. 首先Survivin对于细胞周期的调控方面: 细胞周期的运动受细胞周期调节因子的控制, 在肿瘤细胞中一方面是由于细胞周期正调控因子过表达, 如周期蛋白(Cyclin, 主要是Cyclin D1, Cyclin E1)和周期蛋白依赖性蛋白激酶(cyclin dependent kinases, 主要是CDK4, CDK6). CyclinD的主要功能是激活CDK4、CDK6, 使细胞渡过G1期进入S期. 另一方面是细胞周期负调控因子低表达, 如细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI, 主要INK4, KIP1). CKI通过与CDK结合, 抑制CDK的活性, 阻止细胞增殖分化. 如P21蛋白可以抑制增殖细胞核抗原(proliferating-cell nuclear antigen, PCNA)而抑制CDK的促进作用. 细胞周期运动的过程实际上是细胞增殖的过程. 在这一过程中, 细胞核型和体积也随之发生变化. 对于那些具有快速增殖特点的细胞, 对细胞周期负调控因子(P21蛋白)进行抑制是必须的. 有丝分裂开始时, Survivin与有丝分裂纺锤体的微管蛋白特异性结合, 维持有丝分裂的进行, 此反应过程受微管动力学的调节. 研究表明, 无Survivin表达的细胞可形成卵裂沟和收缩环, 但不能完成正常的细胞质流动过程, 因此导致多核细胞的形成. Survivin和INCEN(inner centromere protein)在微管组装、卵裂沟形成、细胞质流动等协同事件中发挥重要作用. Survivin并可通过与CDK4/p16(INK4a)和CDK2/cyclinE复合体活化的竞争性作用来启动细胞周期. 我们知道所有生物的生长和发育都离不开细胞忠实地繁殖, 要实现这一点要求细胞基因组必须能够精确地复制, 并且在两个子代细胞中均匀分配. Survivin主要在G2/M期表达, 具有严格的细胞周期依赖性. G2/M期控制点负责保持遗传的准确性, 如果增殖细胞的DNA复制不能与中心体的加倍相一致就会不可避免地出现细胞倍型的改变, 产生多核现象, 从而造成染色体核型的改变, 而后者在癌细胞中是很常见的. 这种染色体的改变导致其不稳定, 使已经突变的肿瘤抑制基因的表型表达或使癌基因过表达, 即Survivin有助于肿瘤细胞逃离G2-M期检控点而达到无限增生, 从而促使肿瘤的发生.

Survivin可能除了参与细胞有丝分裂在微管系统中起重要作用, 而且他还参与胞质分裂. 近年来Survivin与细胞分裂的关系以及Survivin亚细胞定位问题日益受到人们重视. 我们知道Aurora B是最先被发现的参与调节纺锤体微管两极与着丝粒的连接蛋白, 功能是调节染色体的分离和胞质分裂. Wheatley *et al*<sup>[39, 43]</sup>人采用酵母双杂交实验检测获得了Survivin与Aurora B和内部着丝粒蛋白INCENP直接结合的证据, 并且发现这种结合异常稳定, 同时发现Aurora B的激酶活性受Survivin的结合和细胞周期依赖的磷酸化调节. 又有研究

提示Survivin在细胞周期中能刺激Aurora B的激酶活性,帮助Aurora B正确的与其底物结合,这可能是Survivin发挥其功能的机制.Survivin基因缺失小鼠的表型:在胚胎开始发育的前3.5 d可造成微管集群的严重缺损、有丝分裂纺锤体的缺陷、多核细胞的大量产生及在4.5 d发生胚胎致死性变化.Terada *et al*<sup>[38]</sup>认为Survivin可能是染色体过客蛋白(passenger protein),染色体过客蛋白是指那些在细胞分裂过程中从着丝粒转移到纺锤体赤道面的蛋白,他们在细胞分裂中参与染色体的浓缩和分离,在有丝分裂结束时,参与胞质分裂的完成.认为Survivin在分裂中期定位于染色体的着丝粒,而后期处于中心纺锤体的中间带上,在细胞分裂时又在中间体上,即是一种过客蛋白.近来研究对于有丝分裂点处抗凋亡路径的潜在进化来源提出了一些令人感兴趣的线索.在线虫封闭与Survivin同源的IAP分子BIR-1导致了胚胎致死性表型.这可能并不是由于凋亡调节的紊乱,而是由于胞质分裂缺陷所致,胚胎不能完成细胞分化造成了多核细胞的堆积.上述表型通过人Survivin过表达部分得到逆转,提示了这个机制具有很强的进化保守性.占优势的Survivin在细胞内与中心体结合,提示Survivin可能参与胞质分裂.近来几个实验室正在做一系列实验,若封闭了其他IAPs包括Survivin,除了引起自发凋亡外是否也可见到胞质分裂缺陷<sup>[41]</sup>.

Survivin蛋白对于细胞凋亡的调节,大致来说有两种途径—外源性途径和内源性途径.外源性凋亡途径又称死亡受体途径,是通过细胞膜上的死亡受体(如TNF受体、Fas)激活,使细胞发生凋亡,该途径的启动酶是Caspase-8;内源性凋亡途径又称线粒体途径,该途径的启动酶是Caspase-9,执行酶是Caspase-3.具体是DNA损伤信号通过Bcl-2家族提高线粒体膜的通透性,使线粒体释放出促凋亡的细胞色素C,后者与前体Caspase-9、Apaf-1组成凋亡体,导致前体Caspase-9激活,分解死亡底物,完成细胞凋亡过程.处于凋亡途径的下游阶段.Survivin蛋白主要通过抑制前面提到的Caspases-3, 7. Survivin还作用于细胞周期调节因子CDK4,使CDK2/cyclin E活化并使Rb磷酸化.Survivin/CDK4复合物的形成,使p21从p21/CDK4复合物中释放出来,一方面使细胞周期免受P21蛋白的抑制.另一方面作用于procaspase-3,形成procaspase-3/p21复合物,抑制procaspase-3激活,我们知道caspase-3是死亡受体途径及线粒体途径介导的凋亡过程中必需的死亡因子,处于凋亡途径的下游阶段,因此Survivin得以发挥其抗凋亡作用,同时Survivin过度表达使得P21解离而使活化Cdk4,细胞进入增殖周期.细胞失去了正常增殖周期中凋亡“开关”(checkpoint)的限制,大量细胞无限增殖,增殖与凋亡平衡打破,造成凋亡减少,最后导致肿瘤的发生.就Survivin蛋白是否与Caspase-3直接发生相互作用

用仍还存在着争议.反对者认为,与XIAP的BIR2相比,Survivin蛋白没有N端环状结构,而此结构正是XIAP抑制Caspase-3的关键部位,且实验中发现Survivin蛋白与Caspase-3无直接关系.另有实验表明Survivin抗凋亡作用也可抑制Caspase-9而实现的.在果蝇的研究中证实Survivin可以通过与SMAC相结合,抑制SMAC拮抗IAP而发挥抗凋亡的作用.

Survivin在有丝分裂中的作用:有丝分裂前期Survivin与纺锤体微管相结合,在分裂的中后期,与纺锤丝全长捆绑,直到分裂末期依附于中心体上.通过体外共沉淀试验,这一独特的现象被定量观察.研究发现,在连续的微管的聚合和解聚过程中,重组Survivin与聚合微管以一种特殊的、浓度依赖的、可饱和的方式相结合,这一反应通过微管力学来调节.在分裂间期细胞,Survivin积聚在中心体上,因此Survivin可能是微管组织中心的元件.Survivin与微管相结合对于其抗凋亡功能的实现是必需的.在诱变实验中,缺少C末端带电荷的卷曲螺旋状结构和截短的Survivin在体外均不能与泰素和聚合微管竞争性结合,在体内亦不能与转染细胞的有丝分裂纺锤体结合.上述Survivin突变体的过表达不能保护泰素介导的NIH3T3成纤维细胞的凋亡,这些研究提示Survivin装配在有丝分裂装置上,Survivin末端带电荷的螺旋区是其抗凋亡功能所必需的.可见Survivin不仅通过与下游凋亡效应因子Caspase-3和Caspase-7结合对其活性产生直接抑制效应,还通过与纺锤体纤维的结合,间接抑制Caspase对纺锤体的水解作用,有利于保护有丝分裂细胞器的完整性,抑制细胞凋亡.

总之, Survivin具有控制纺锤体检查点和凋亡检查点双重作用.肿瘤组织过表达Survivin可以避开凋亡检查点,使细胞进行异常的有丝分裂.同时Survivin的过表达对抗多种广泛的凋亡诱导因素,如化疗药物足叶已甙和泰素和放疗所引起的凋亡.由此可以理解Survivin高表达的肿瘤对于临床放化疗均不敏感分子机制.

6.3 Survivin是肿瘤治疗的新靶点<sup>[44]</sup> 细胞凋亡是化疗和放疗介导杀伤肿瘤细胞的主要机制,抑制细胞凋亡从而促使肿瘤细胞的存活力增强是肿瘤细胞的共同特征.肿瘤细胞对凋亡的抑制有利于逃避机体的免疫监视及细胞毒性药物治疗进而产生对化疗药物耐药,是肿瘤形成、发展和对化疗药物耐药的重要机制.其耐药机制除了肿瘤细胞能过度表达mdr1编码的P糖蛋白增加化疗药物排除,还在于能抵抗药物诱导的凋亡,即哺乳动物细胞内存在IAPs,在肿瘤细胞中这些凋亡抑制蛋白水平升高显然是肿瘤形成、发展和对化疗药物耐药的重要机制之一.由于Survivin在肿瘤组织中选择性高表达,抑制Survivin足以诱导肿瘤细胞自发性凋亡,这是其他抑制凋亡的基因所不具备的特点,我们知道Bcl-2基因是通过阻止细胞色素c从线粒体向胞质释放而抑制凋亡作用,这一环节处在Caspase级

联反应上游. 而Survivin基因是通过直接作用于细胞凋亡途径中的终末效应酶-Caspase-3, 7来发挥作用的. 而且抑制bcl-2只能提高细胞对凋亡的敏感性, 但不足以诱导凋亡, 因此Survivin已经成为倍受关注的抗肿瘤治疗的新靶点. 以Survivin蛋白为靶点的拮抗分子纷纷研究出来, 如应用反义Survivin降低细胞凋亡的阈值, 促使肿瘤细胞凋亡增加、RNA干涉Survivin基因的表达、设计Survivin突变体以及特异性抗体免疫治疗, 这些策略具有良好的靶向性、特异性及安全性.

6.3.1 反义Survivin的寡核苷酸 Ambrosini *et al*<sup>[45]</sup>首先将具有反义Survivin功能的EPR-1 cDNA置于金属硫因(metallthionein)诱导的启动子下游, 转染Hela细胞, 结果与对照载体相比, 在稳定的转化细胞中, Survivin反义核酸的表达能够快速诱导细胞凋亡, 同时伴有靶细胞增殖的下降. Olie *et al*<sup>[46]</sup>设计反义Survivin寡核苷酸对肺腺癌细胞株的作用, 发现Caspase-3活性提高, 凋亡细胞增加以及腺癌细胞对化疗药物敏感性增加. Mesri *et al*<sup>[47]</sup>利用Survivin反义寡核苷酸作用于人脐静脉内皮细胞, 发现Survivin反义寡核苷酸能诱导毛细血管网迅速退化. VEGF在肿瘤血管中的抗EC凋亡作用主要是通过诱导EC的Survivin表达来完成的. 反义Survivin治疗可特异性抑制VEGF抗EC的凋亡作用, 而EC移行作用不受影响, 从而促进肿瘤EC凋亡和肿瘤血管退化.

6.3.2 Survivin显性负突变(dominant-negative mutant)体诱导细胞凋亡 Survivin的多肽序列中, 34位氨基酸为苏氨酸, 是细胞周期素依赖蛋白激酶P34-cdc2的磷酸化位点, 该位点的磷酸化对维持Survivin的凋亡抑制功能非常重要, 以丙氨酸取代后的人工突变体(T34A)可以使凋亡抑制功能丧失, Mesri *et al*<sup>[48]</sup>发现, PAd-T34A(复制缺陷的腺病毒携带编码Survivin突变体)感染乳腺癌、宫颈癌、前列腺癌、肺癌、大肠癌等细胞株, 导致细胞色素C从线粒体释放, 促进caspase-3活化引起肿瘤细胞凋亡, 而PAd-T34A不影响纤维母细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等处于增殖状态的正常人类细胞的生存能力; PAd2T34A诱导肿瘤细胞的凋亡与紫杉酚一样有效, 而比阿霉素引起的肿瘤细胞凋亡的效能更强, 而且可以促进紫杉酚诱导的细胞凋亡作用, 裸鼠动物实验也进一步证实PAd-T34A可导致肿瘤体积的缩小. 该研究同时显示PAd-T34A可以促进肿瘤血管内皮细胞的凋亡. Grossman *et al*<sup>[49]</sup>应用Survivin突变(T34A)的腺病毒转染多种黑色素瘤细胞株, 引起细胞自发性凋亡, 促进化疗药物顺铂诱导的细胞凋亡, 并且裸鼠动物实验也表明该突变体可以抑制接种黑色素瘤细胞株的免疫缺陷鼠肿瘤体积的增大. 除了T34A Survivin突变体可以诱导细胞凋亡外, 另外还有C84A(Cys84/Ala)突变体, 他与野生型Survivin蛋白竞争中心粒, 抑制野生型Survivin蛋白与中心粒的结合, 从而剥夺野生型Survivin蛋白的

抗凋亡促增殖的双重功能. 最终导致细胞凋亡和细胞分裂缺陷, 出现多核细胞和多极点细胞. 除了对Survivin-34位苏氨酸进行干预外, Li *et al*<sup>[50-51]</sup>将鼠的Survivin基因62位点的SP1结合区破坏后, G2/M期50%的转录活性被特异性抑制. 而破坏169位点的SP1结合区, G2/M期转录活性几乎全被抑制. 研究表明Survivin及bcl-2在肿瘤细胞内的大量表达都与SP1依赖转录调控有关. 如能通过反义核酸手段来破坏肿瘤细胞内的SP1结合区, 可引起肿瘤细胞内包括Survivin和Bcl-2在内多种基因的表达异常, 必将导致肿瘤细胞走向凋亡.

6.3.3 免疫治疗 Survivin被认为是肿瘤相关抗原, 广泛存在于肿瘤中. 当Survivin可溶性重组蛋白被树突状细胞(DC)呈递时, Survivin多肽和主要组织相容性复合体I(major histocompatibility complex I, MHC I)形成的复合物能在体外诱导特异性CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞, 从而杀伤肿瘤细胞, Pisarev *et al*<sup>[52-53]</sup>报道了相关的研究, 但临床价值还有待进一步证实.

6.3.4 RNA干扰Survivin的表达技术<sup>[54-56]</sup> RNA干扰(RNA interference, RNAi)是指在生物体细胞内, 外源性或内源性的双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)引起与其同源的mRNA特异性的降解, 因而抑制Survivin基因的转录和表达, 具有高度特异性、高效性的特点. Li *et al*<sup>[54-56]</sup>利用RNA干扰技术设计针对Survivin的dsRNA来抑制Survivin基因的转录和表达, 实验取得一定的成功. 总之, 以Survivin为靶点很可能是一种理想的肿瘤治疗策略. 不但可以提高抗肿瘤疗效, 而且能弥补其他治疗措施的不足, 在临床肿瘤治疗中可能有广阔的应用前景.

总之, IAPs作为一种重要的细胞凋亡调节因子, 一方面发挥抑制细胞凋亡的功能, 另一方面该家族部分成员发挥其他与细胞凋亡不太直接相关的多种生物学功能, 如调节细胞周期和有丝分裂等. Survivin基因自从被发现后, 作为一种新的凋亡抑制因子引起国内外学者的广泛关注, 围绕Survivin的分子生物学特点、生物学功能, 特别是在细胞凋亡和细胞周期中的作用进行了一系列研究, 根据现有的资料, 其抗凋亡的作用及在肿瘤发生、发展中的作用已经逐步得到肯定. 对于肿瘤的诊断、治疗、预后方面都有重要意义, 尤其在肿瘤基因治疗中可能有广泛的应用价值和前景. 然而仍有许多关于Survivin的细节问题不清楚, Survivin如何实现对细胞凋亡和细胞周期的双重检测点的调控, Survivin细胞内定位的复杂性的具体环节, Survivin的选择剪接和剪接异构体又是如何调节细胞凋亡的? 这些问题均需要进一步研究和探讨, 为肿瘤的诊断和治疗奠定坚实的理论基础.

## 7 参考文献

- 1 Debatin KM. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:153-159
- 2 Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993;67:



- 2168-2174
- 3 Nachmias B, Ashhab Y, Ben-Yehuda D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. *Semin Cancer Biol* 2004;14:231-243
- 4 Liston P, Young SS, Mackenzie AE, Korneluk RG. Life and death decisions: the role of the IAPs in modulating programmed cell death. *Apoptosis* 1997;2:423-441
- 5 Holcik M, Gibson H, Korneluk RG. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* 2001;6:253-261
- 6 Yamaguchi K, Nagai S, Ninomiya-Tsuji J, Nishita M, Tamai K, Irie K, Ueno N, Nishida E, Shibuya H, Matsumoto K. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J* 1999;18:179-187
- 7 Andersen MH, Reker S, Becker JC, Thor Straten P. The melanoma inhibitor of apoptosis protein: a target for spontaneous cytotoxic T cell responses. *J Invest Dermatol* 2004;122:392-399
- 8 Yamashita M, Nishio H, Harada Y, Matsuo M, Yamamoto T. Significant increase in the number of the SMN2 gene copies in an adult-onset Type III spinal muscular atrophy patient with homozygous deletion of the NAIP gene. *Eur Neurol* 2004;52:101-106
- 9 Escuin D, Rosell R. The anti-apoptosis survivin gene and its role in human cancer: an overview. *Clin Lung Cancer* 1999;1:138-143
- 10 Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;22:8581-8589
- 11 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;3:917-921
- 12 Li F. Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol* 2003;197:8-29
- 13 Kiechle FL, Zhang X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta* 2002;326:27-45
- 14 Chiou SK, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin - an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. *Med Sci Monit* 2003;9:PI25-PI29
- 15 Mollinedo F, Gajate C. Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 2003;8:413-450
- 16 Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003;3:46-54
- 17 Reed JC. The Survivin saga goes in vivo. *J Clin Invest* 2001;108:965-969
- 18 Li F, Altieri DC. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res* 1999;59:3143-3151
- 19 Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC. Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 1998;351:882-883
- 20 Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, Martin C, Font A, Barnadas A, Abad A. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999;17:2100-2104
- 21 Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:127-134
- 22 Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1998;58:1808-1812
- 23 Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5071-5074
- 24 Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, Tenjo T, Tanigawa N. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 2001;91:2026-2032
- 25 Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, Hirooka Y, Kaibara N. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2002;11:33-40
- 26 Smith SD, Wheeler MA, Plescia J, Colberg JW, Weiss RM, Altieri DC. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. *JAMA* 2001;285:324-328
- 27 Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. *N Engl J Med* 1999;341:452-453
- 28 Takamizawa S, Scott D, Wen J, Grundy P, Bishop W, Kimura K, Sandler A. The survivin:fas ratio in pediatric renal tumors. *J Pediatr Surg* 2001;36:37-42
- 29 Hattori M, Sakamoto H, Satoh K, Yamamoto T. DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. *Cancer Lett* 2001;169:155-164
- 30 Saitoh Y, Yaginuma Y, Ishikawa M. Analysis of Bcl-2, Bax and Survivin genes in uterine cancer. *Int J Oncol* 1999;15:137-141
- 31 Adida C, Recher C, Raffoux E, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P, Sigaux F, Degos L, Altieri DC, Dombret H. Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000;111:196-203
- 32 Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, Dombret H, Reyes F, Diebold J, Gisselbrecht C, Salles G, Altieri DC, Molina TJ. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000;96:1921-1925
- 33 Grossman D, McNiff JM, Li F, Altieri DC. Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line. *Lab Invest* 1999;79:1121-1126
- 34 Koch CA, Vortmeyer AO, Diallo R, Poremba C, Giordano TJ, Sanders D, Bornstein SR, Chrousos GP, Pacak K. Survivin: a novel neuroendocrine marker for pheochromocytoma. *Eur J Endocrinol* 2002;146:381-388
- 35 Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, Kerbel RS. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;264:781-788
- 36 Altieri DC. Survivin and apoptosis control. *Adv Cancer Res* 2003;88:31-52
- 37 Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;396:580-584
- 38 Terada Y. Role of chromosomal passenger complex in chromosome segregation and cytokinesis. *Cell Struct Funct* 2001;26:653-657
- 39 Wheatley SP, Carvalho A, Vagnarelli P, Earnshaw WC. INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol* 2001;11:886-890
- 40 Suzuki A, Shiraki K. Tumor cell "dead or alive": caspase and survivin regulate cell death, cell cycle and cell survival. *Histol Histopathol* 2001;16:583-593
- 41 Adams RR, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* 2001;11:49-54
- 42 Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 2004;23:2825-2837
- 43 Wheatley SP, Henzing AJ, Dodson H, Khaled W, Earnshaw WC. Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo. *J Biol Chem* 2004;279:5655-5660
- 44 Nam NH, Parang K. Current targets for anticancer drug discovery. *Curr Drug Targets* 2003;4:159-179
- 45 Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of



- apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998;273:11177-11182
- 46 Olie RA, Simoes-Wust AP, Baumann B, Leech SH, Fabbro D, Stahel RA, Zangemeister-Wittke U. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Res* 2000;60:2805-2809
- 47 Mesri M, Morales-Ruiz M, Ackermann EJ, Bennett CF, Pober JS, Sessa WC, Altieri DC. Suppression of vascular endothelial growth factor-mediated endothelial cell protection by survivin targeting. *Am J Pathol* 2001;158:1757-1765
- 48 Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* 2001;108:981-990
- 49 Grossman D, Kim PJ, Schechner JS, Altieri DC. Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:635-640
- 50 Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio PC, Altieri DC. Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* 1999;1:461-466
- 51 Fornaro M, Plescia J, Chheang S, Tallini G, Zhu YM, King M, Altieri DC, Languino LR. Fibronectin protects prostate cancer cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis via the AKT/survivin pathway. *J Biol Chem* 2003;278:50402-50411
- 52 Pisarev V, Yu B, Salup R, Sherman S, Altieri DC, Gabrilovich DI. Full-length dominant-negative survivin for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2003;9:6523-6533
- 53 Andersen MH, Thor SP. Survivin—a universal tumor antigen. *Histol Histopathol* 2002;17:669-675
- 54 Li LP, Liang NC, Luo CQ. Construction of survivin siRNA expression vector and its regulation on cell cycle and proliferation in MCF-7 cells. *Ai Zheng* 2004;23:742-748
- 55 Ling X, Li F. Silencing of antiapoptotic survivin gene by multiple approaches of RNA interference technology. *Biotechniques* 2004;36:450-454
- 56 Coumoul X, Li W, Wang RH, Deng C. Inducible suppression of Fgfr2 and Survivin in ES cells using a combination of the RNA interference (RNAi) and the Cre-LoxP system. *Nucleic Acids Res* 2004;32:e85

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”。

# Fas 死亡受体及 FLIP 对大肠癌细胞凋亡的影响

臧凤琳, 魏熙胤, 史玉荣, 张霖, 赵秀兰, 张诗武, 孙保存

臧凤琳, 魏熙胤, 史玉荣, 张霖, 张诗武, 孙保存, 天津医科大学肿瘤研究所 天津市 300060  
赵秀兰, 天津医科大学病理教研室 天津市 300070  
天津市自然科学基金资助项目, No. 013611511  
通讯作者: 孙保存, 300060, 天津市河西区体院北环湖西路, 天津医科大学肿瘤研究所.  
电话: 022-23340123-5221  
收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-05-14

## 摘要

**目的:** 比较不同大肠癌细胞 Fas 受体及其下游通路抑制因子 FLIP 的表达差异, 探讨 Fas、FLIP 对大肠癌细胞凋亡的影响。

**方法:** 体外培养大肠癌细胞, 应用直接免疫荧光流式细胞术检测细胞表面 Fas 表达率, 半定量 RT-PCR 法测定 FLIP mRNA 的水平, 并采用 Annexin V 法评价细胞对 Fas 介导的凋亡的敏感性。

**结果:** 大肠癌细胞表面 Fas 表达率不同, 其中 HT-29 细胞的表达率为  $42.46 \pm 4.32\%$ , 明显高于其他 3 株细胞。SW620 和 HT-29 细胞 FLIP mRNA 含量较高, Colo205 居中, Lovo 则呈阴性; 且相对于任何一株 FLIP 表达阳性的细胞, FLIP<sub>L</sub> 的表达水平均高于 FLIP<sub>S</sub>。给予凋亡诱导型抗 Fas 抗体(CH-11)刺激后, 4 株大肠癌细胞凋亡敏感性均较低。

**结论:** 不同的大肠癌细胞株可能通过不同途径逃避 Fas 介导的凋亡, 其中包括下调 Fas 的表达和上调 FLIP 的含量。

臧凤琳, 魏熙胤, 史玉荣, 张霖, 赵秀兰, 张诗武, 孙保存. Fas 死亡受体及 FLIP 对大肠癌细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1590-1592  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1590.asp>

## 0 引言

大肠癌是胃肠道最常见的恶性肿瘤之一, 其作为黏膜相关淋巴组织, 细胞表面重要的凋亡受体 Fas 表达率与凋亡敏感性不一致的现象一直吸引人们的关注<sup>[1]</sup>. 近年来, 在某些人类恶性肿瘤如恶性黑色素瘤、部分恶性淋巴瘤和白血病、卡波氏肉瘤等的胞质中相继分离出一种重要的凋亡相关蛋白, 即 FLIP (FADD-like IL-1 $\beta$  converting enzyme inhibitory protein)<sup>[2]</sup>. 由于该蛋白与凋亡关键因子 Caspase-8 在结构上有相似性, 推测其可能在 Fas 等受体介导的凋亡途径中起到十分重要的作用. FLIP 在蛋白水平上有长型 FLIP (FLIP<sub>L</sub>) 和短型 FLIP (FLIP<sub>S</sub>) 2 种形式, 均能抑制 Caspase-8 与 FADD (Fas-associated death domain) 的结合, 进而阻断 Fas 介导的细胞凋亡<sup>[3]</sup>. 本研究以体外培养的大肠癌细胞株为实验对象, 通过检测细胞表面 Fas 的表达率和胞内 FLIP mRNA 的水平, 进一步

分析大肠癌细胞凋亡敏感性差异的具体机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** FITC 标记鼠抗人 Fas 单抗 (UB2)、凋亡诱导型鼠抗人 Fas 单抗 (CH-11)、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自 Beckman Coulter 公司, ImProm- II<sup>TM</sup> 反转录酶购自 Promega 公司, 其余 RT-PCR 试剂购自 TaKaRa 公司; 流式细胞仪 (Beckman Coulter 公司 EP-ICS-XL 型), PCR 仪 (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9700 型), 凝胶成像分析仪 (Kodak 440CF 型)。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 大肠癌细胞株 Lovo、HT-29、Colo205 由天津肿瘤医院中心实验室保存, SW620 由 Joe O' Connell 教授惠赠. 细胞置于含 100 nmol/L 胎牛血清 (Hyclone 公司) 和青霉素 100 kU/L、链霉素 100 mg/L 的 RPMI 1640 培养液 (Gibco 公司) 中, 培养箱内含 50 mL/L CO<sub>2</sub>, 温度 37℃。

**1.2.2 直接免疫荧光流式细胞术** 细胞经消化液 (2.5 g/L 胰蛋白酶 + 0.2 g/L EDTA) 作用后, PBS 洗涤 2 次, 取  $5 \times 10^5$  细胞重悬于 100  $\mu$ L PBS, 实验管加入 20  $\mu$ L FITC 标记的抗 Fas 抗体 (UB2, 10 mg/L), 对照管加入等体积 FITC 标记的同型相配抗体, 室温避光孵育 20 min. 细胞悬液经流式细胞仪检测, 并以 Coulter XL System II<sup>TM</sup> 软件分析荧光阳性细胞百分比。

**1.2.3 半定量 RT-PCR** 收集对数生长期的细胞, PBS 洗涤, TRIZOL (Gibco 公司) 提取总 RNA, 以 Random 6mers 为引物进行逆转录, 随后进入 PCR 扩增. FLIP<sub>L</sub> 上游引物: 5' -ACCGAGACTACGACAGCTTTGTG-3', 下游引物: 5' -CAATGTGAAGATCCAGGAGTGGG-3', 扩增片段长 429 bp; FLIP<sub>S</sub> 上游引物: 5' -ACCTTGTGGTTGAGTTGGAGAAAC-3', 下游引物: 5' -ACAATTTCCAAGAATTTTCAGATCAG-3', 扩增片段长 259 bp<sup>[3]</sup>; 内参照  $\beta$ -actin 上游引物: 5' -ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3', 下游引物: 5' -CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3', 扩增片段长 318 bp. PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, 65℃ 退火 45 s (其中 FLIP<sub>S</sub> 的最佳退火温度为 60℃), 72℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min. 产物在 13 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 经凝胶成像系统进行半定量比较, 计算扩增片段的相对含量. 扩增片段相对含量 (%) = 扩增片段 Net. Int. /  $\beta$ -actin Net. Int.  $\times 100\%$ .

**1.2.4 Annexin V-FITC 染色法** 以凋亡诱导型鼠抗人 Fas 单抗 (CH-11, 0.1 mg/L) 刺激细胞, 孵箱培养 16 h,

收集细胞,调整密度至  $5 \times 10^5$ /管, PBS 洗涤 2 次, 重悬于 100  $\mu$ L 反应缓冲液, 加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC (5 mg/L) 和 2.5  $\mu$ L PI (250 mg/L), 冰上避光孵育 10 min, 流式细胞仪检测. 凋亡敏感性 (%) = 刺激后细胞凋亡率 (%) - 刺激前细胞凋亡率 (%).

**统计学处理** 采用 SPSS 10.0 软件系统处理, 各组间差异比较为单因素方差分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义.

## 2 结果

**2.1 细胞表面 Fas 表达率** 经流式细胞仪多次测定比较发现, 4 种大肠癌细胞株之间 Fas 的表达水平差异显著 ( $F = 297.808$ ,  $P < 0.01$ ), HT-29、Colo205 高于 SW620、Lovo, 其中 HT-29 的 Fas 表达水平远远高于其他 3 种大肠癌细胞株, 而 SW620、Lovo 则呈低水平表达 (表 1).

表 1 不同大肠癌细胞株 FasR 表达率 (mean  $\pm$  SD, %)

细胞类型	n	Fas
HT-29	3	42.4 600 $\pm$ 4.3 189
Colo205	3	7.2 333 $\pm$ 1.2 529 <sup>a</sup>
SW620	4	2.6 300 $\pm$ 0.2 627 <sup>b</sup>
Lovo	4	1.4 700 $\pm$ 0.2 223 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs HT-29.

**2.2 FLIP mRNA 含量** 半定量 RT-PCR 检测结果显示, 2 种形式的 FLIP (FLIP<sub>L</sub> 和 FLIP<sub>S</sub>) 在不同大肠癌细胞株中表达水平明显不同 ( $F = 849.513$   $P < 0.01$ ;  $F = 143.571$   $P < 0.01$ ). SW620 和 HT-29 的表达水平较高, Colo205 的表达水平居中, 而 Lovo 则几乎不表达任何形式的 FLIP. 且相对于任何一个 FLIP 表达阳性的细胞, 均存在着 FLIP<sub>L</sub> 的表达水平明显高于 FLIP<sub>S</sub> 的现象 (图 1, 表 2).

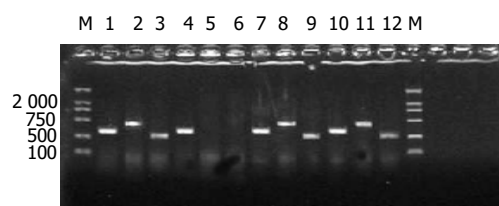


图 1 4 种大肠癌细胞株 FLIP RT-PCR 扩增结果. 1-3: SW620  $\beta$ -actin, FLIP<sub>L</sub>, FLIP<sub>S</sub>; 4-6: Lovo  $\beta$ -actin, FLIP<sub>L</sub>, FLIP<sub>S</sub>; 7-9: HT-29  $\beta$ -actin, FLIP<sub>L</sub>, FLIP<sub>S</sub>; 10-12: colo205  $\beta$ -actin, FLIP<sub>L</sub>, FLIP<sub>S</sub>.

表 2 大肠癌细胞株 FLIP mRNA 的相对含量 (mean  $\pm$  SD, %)

细胞类型	n	FLIP <sub>L</sub>	FLIP <sub>S</sub>
SW620	4	85.64 $\pm$ 3.94	30.43 $\pm$ 4.79
HT-29	4	83.36 $\pm$ 3.44	36.30 $\pm$ 3.44
Colo205	4	61.64 $\pm$ 1.63	17.15 $\pm$ 1.61
Lovo	4	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00

**2.3 凋亡敏感性分析** 凋亡诱导型抗体刺激细胞后, 以 Annexin V-FITC 标记膜表面磷脂酰丝氨酸变化的凋亡早期细胞, 流式细胞仪检测凋亡率, 4 种大肠癌细胞株的凋亡敏感性存在显著差异 ( $F = 44.962$ ,  $P < 0.01$ ), 但凋亡敏感性均较低 (表 3).

表 3 不同细胞的凋亡敏感性 (mean  $\pm$  SD, %)

细胞类型	n	凋亡敏感性
SW620	3	2.7 800 $\pm$ 0.4 636
HT-29	3	9.2 100 $\pm$ 1.3 473
Colo205	3	9.9 000 $\pm$ 1.6 350
Lovo	3	1.8 700 $\pm$ 0.0 700

## 3 讨论

大肠癌作为严重威胁人类健康的恶性肿瘤, 早期便易出现侵袭和转移, 且不同患者对诱导凋亡化疗药的敏感性也不尽相同. 其中, 肿瘤细胞对 Fas 介导的凋亡敏感性的变化一直吸引着人们的关注. 夏成青 *et al* [4] 研究发现, 结肠腺癌组织和正常结肠黏膜组织均有不同程度的 Fas 表达, 但癌组织中的表达水平有所降低. 且与未发生转移的癌组织相比, 发生淋巴结转移的癌组织 Fas 的平均阳性率更低. Fas 表达水平的下调可能是肿瘤细胞对体内免疫系统及外源性刺激产生凋亡抵抗的原因之一. 值得注意的是, 一方面临床上在使用了能够促进 Fas 表达的化疗药后, 仍有一部分大肠癌患者病情未得到明显控制; 另一方面, 在 Fas 高表达的组织细胞中, Fas 的表达水平与其对 Fas 配体 (FasL) 诱导凋亡的敏感性也存在着不一致的现象 [5-6]. 这提示在 Fas 介导的受体凋亡途径中必然存在着其他的抑制调节因子, 肿瘤细胞凋亡敏感性的下降也是不同水平综合作用的结果.

FLIP 是近年来发现的一类含有 DED (death effect domain) 的凋亡抑制蛋白, 在病毒、真核生物、哺乳动物等许多物种中广泛存在. 其在蛋白水平有 2 种存在形式, 即小分子的 FLIP<sub>S</sub> 和大分子的 FLIP<sub>L</sub>, 前者在结构上只含有 2 个 DED, 后者除此之外还含有一个 Caspase 同源结构域, 即 Caspase 蛋白水解酶区, 但该区域中具有催化活性的半胱氨酸残基被酪氨酸残基所取代 [2]. 目前, 对于 FLIP 在抑制凋亡中的具体机制仍未得到阐明. 比较公认的观点为: 由于 FLIP 在结构上与 Caspase-8 极为相似, 其 DED 也可以与 FADD 相结合, 竞争性抑制 Caspase-8 前体结合于 DISC (death inducing signaling complex) 上, 从而抑制凋亡 [7].

在本研究中, 我们以凋亡诱导型抗 Fas 抗体体外刺激大肠癌细胞株, 经检测发现 4 株细胞对 Fas 介导的凋亡均不敏感. 进一步研究发现, 4 种细胞株之间 Fas 表达率及 FLIP mRNA 水平也不尽相同. 其中, 除 HT-29 具有一定程度的 Fas 表达外, 其余 3 株细胞的 Fas 表达率均较低,

与先前的报道基本一致<sup>[8]</sup>;而SW620、HT-29的FLIP mRNA含量较高, Colo205居中, Lovo则几乎呈阴性. 这说明, 不同的大肠癌细胞可能存在不同的凋亡抵抗机制: SW620和Colo205很可能通过下调Fas和上调FLIP 2种方式来降低凋亡敏感性;而对于HT-29来说, FLIP的高水平表达可能起到更为重要的作用;至于Lovo, 由于二者的低表达, 以及Fas/FasL表达率与凋亡率之间无明显关联, 提示其很可能不是通过Fas通路发生凋亡的<sup>[9]</sup>. Nita *et al*<sup>[10]</sup>发现与其他大肠癌细胞相比, Lovo高表达Bcl-2和Bcl-XL, 且伴随着Bax的表达下降, 这提示对于Lovo来说, 线粒体凋亡途径似乎起到更为重要的作用.

此外, Krueger *et al*<sup>[11]</sup>发现2种形式的FLIP均可阻断Caspase-8激活的蛋白水解反应. 在BJAB细胞中, 当FLIP<sub>L</sub>过表达时, Caspase-8的第一步水解作用仍可实现, 第二步酶切水解受到抑制; FLIP<sub>S</sub>过表达时, 胞质中检测不到Caspase-8任何的酶切水解成分. 而在我们的实验中, 对于任何一个FLIP mRNA表达阳性的细胞, 均存在着FLIP<sub>L</sub>表达明显高于FLIP<sub>S</sub>的现象. 这种mRNA水平的差异是否与蛋白水平相一致以及究竟哪一种蛋白类型起到更为重要的凋亡抑制作用仍需进一步的探讨.

#### 4 参考文献

- 1 von Reyher U, Strater J, Kittstein W, Gschwendt M, Krammer PH, Moller P. Colon carcinoma cells use different mechanism to escape CD95-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1998;58:526-534
- 2 Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschoep J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190-195
- 3 Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Rosen A, Thompson C, Loeffler L, Parker T, Danning C, Rochon PJ, Gillespie J, Plotz P. The inhibition of apoptosis in myositis and in normal muscle cells. *J Immunol* 2000;164:5459-5465
- 4 夏成青, 刑长虹, 唐小奈. 结肠癌组织中Fas表达的定量分析. 临床与实验病理学杂志 2002;18:307-309
- 5 Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365
- 6 Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 1993;5:625-630
- 7 Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:1541-1548
- 8 Moller P, Koretz K, Leithauser F, Bruderlein S, Henne C, Quentmeier A, Krammer PH. Expression of APO-1(CD 95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer* 1994;57:371-377
- 9 彭志海, 邢同海, 裘国强, 唐华美. 结肠腺癌细胞株Fas/FasL的表达与凋亡的关系. 中国癌症杂志 2001;11:25-28
- 10 Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, Fu CG, Takenoue T, Tsuruo T, Muto T. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer* 1998;78:986-992
- 11 Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2001;276:20633-20640

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 •

## 多种细胞因子联合诱导大肠癌患者外周血单个核细胞为CIK细胞的免疫表型

撒亚莲, 华映坤, 宋建新, 严新民, 贾玲, 董虹, 沈涛

撒亚莲, 华映坤, 严新民, 董虹, 沈涛, 云南省第一人民医院临床基础医学研究所 云南省昆明市 650032  
宋建新, 云南省第一人民医院临床检验中心 云南省昆明市 650032  
贾玲, 云南省第一人民医院肿瘤科 云南省昆明市 650032  
通讯作者: 撒亚莲, 650032, 云南省昆明市金碧路 157#, 云南省第一人民医院. sa\_yi@yahoo.com.cn  
电话: 0871-3638454 传真: 0871-3619076  
收稿日期: 2005-04-07 接受日期: 2005-04-09

#### 摘要

目的: 用多种细胞因子联合诱导大肠癌患者外周血单个核细胞为细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细

胞, 并了解其在体外的增殖能力及免疫表型的变化.

方法: 用 Ficoll Hypaque 淋巴细胞分离液分离获取 10 例大肠癌患者外周血单个核细胞, rhIFN- $\gamma$ , rhIL-2, Anti-CD3mAb 共孵育. 分别在第 0, 4, 7, 10, 13 d 计细胞数, 并通过流式细胞术检测细胞免疫表型.

结果: 大肠癌患者外周血单个核细胞与 IFN- $\gamma$ , IL-2, Anti-CD3mAb 共孵育 4, 7, 10, 13 d, 细胞数分别增加  $2.69 \pm 0.9$ ,  $14.1 \pm 3.7$ ,  $23.0 \pm 5.0$  和  $31.2 \pm 3.0$  倍. CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>

与先前的报道基本一致<sup>[8]</sup>;而SW620、HT-29的FLIP mRNA含量较高, Colo205居中, Lovo则几乎呈阴性. 这说明, 不同的大肠癌细胞可能存在不同的凋亡抵抗机制: SW620和Colo205很可能通过下调Fas和上调FLIP 2种方式来降低凋亡敏感性;而对于HT-29来说, FLIP的高水平表达可能起到更为重要的作用;至于Lovo, 由于二者的低表达, 以及Fas/FasL表达率与凋亡率之间无明显关联, 提示其很可能不是通过Fas通路发生凋亡的<sup>[9]</sup>. Nita *et al*<sup>[10]</sup>发现与其他大肠癌细胞相比, Lovo高表达Bcl-2和Bcl-XL, 且伴随着Bax的表达下降, 这提示对于Lovo来说, 线粒体凋亡途径似乎起到更为重要的作用.

此外, Krueger *et al*<sup>[11]</sup>发现2种形式的FLIP均可阻断Caspase-8激活的蛋白水解反应. 在BJAB细胞中, 当FLIP<sub>L</sub>过表达时, Caspase-8的第一步水解作用仍可实现, 第二步酶切水解受到抑制; FLIP<sub>S</sub>过表达时, 胞质中检测不到Caspase-8任何的酶切水解成分. 而在我们的实验中, 对于任何一个FLIP mRNA表达阳性的细胞, 均存在着FLIP<sub>L</sub>表达明显高于FLIP<sub>S</sub>的现象. 这种mRNA水平的差异是否与蛋白水平相一致以及究竟哪一种蛋白类型起到更为重要的凋亡抑制作用仍需进一步的探讨.

#### 4 参考文献

- 1 von Reyher U, Strater J, Kittstein W, Gschwendt M, Krammer PH, Moller P. Colon carcinoma cells use different mechanism to escape CD95-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1998;58:526-534
- 2 Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschoep J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997;388:190-195
- 3 Nagaraju K, Casciola-Rosen L, Rosen A, Thompson C, Loeffler L, Parker T, Danning C, Rochon PJ, Gillespie J, Plotz P. The inhibition of apoptosis in myositis and in normal muscle cells. *J Immunol* 2000;164:5459-5465
- 4 夏成青, 刑长虹, 唐小奈. 结肠癌组织中Fas表达的定量分析. 临床与实验病理学杂志 2002;18:307-309
- 5 Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365
- 6 Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 1993;5:625-630
- 7 Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999;274:1541-1548
- 8 Moller P, Koretz K, Leithauser F, Bruderlein S, Henne C, Quentmeier A, Krammer PH. Expression of APO-1(CD 95), a member of the NGF/TNF receptor superfamily, in normal and neoplastic colon epithelium. *Int J Cancer* 1994;57:371-377
- 9 彭志海, 邢同海, 裘国强, 唐华美. 结肠腺癌细胞株Fas/FasL的表达与凋亡的关系. 中国癌症杂志 2001;11:25-28
- 10 Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Fujii S, Sasaki S, Fu CG, Takenoue T, Tsuruo T, Muto T. 5-Fluorouracil induces apoptosis in human colon cancer cell lines with modulation of Bcl-2 family proteins. *Br J Cancer* 1998;78:986-992
- 11 Krueger A, Schmitz I, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 2001;276:20633-20640

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 •

## 多种细胞因子联合诱导大肠癌患者外周血单个核细胞为CIK细胞的免疫表型

撒亚莲, 华映坤, 宋建新, 严新民, 贾玲, 董虹, 沈涛

撒亚莲, 华映坤, 严新民, 董虹, 沈涛, 云南省第一人民医院临床基础医学研究所 云南省昆明市 650032  
宋建新, 云南省第一人民医院临床检验中心 云南省昆明市 650032  
贾玲, 云南省第一人民医院肿瘤科 云南省昆明市 650032  
通讯作者: 撒亚莲, 650032, 云南省昆明市金碧路 157#, 云南省第一人民医院. sa\_yi@yahoo.com.cn  
电话: 0871-3638454 传真: 0871-3619076  
收稿日期: 2005-04-07 接受日期: 2005-04-09

#### 摘要

目的: 用多种细胞因子联合诱导大肠癌患者外周血单个核细胞为细胞因子诱导的杀伤(cytokine-induced killer, CIK)细

胞, 并了解其在体外的增殖能力及免疫表型的变化.

方法: 用 Ficoll Hypaque 淋巴细胞分离液分离获取 10 例大肠癌患者外周血单个核细胞, rhIFN- $\gamma$ , rhIL-2, Anti-CD3mAb 共孵育. 分别在第 0, 4, 7, 10, 13 d 计细胞数, 并通过流式细胞术检测细胞免疫表型.

结果: 大肠癌患者外周血单个核细胞与 IFN- $\gamma$ , IL-2, Anti-CD3mAb 共孵育 4, 7, 10, 13 d, 细胞数分别增加  $2.69 \pm 0.9$ ,  $14.1 \pm 3.7$ ,  $23.0 \pm 5.0$  和  $31.2 \pm 3.0$  倍. CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>

和 CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞在培养第 13 d 分别从 (62.8 ± 7.6)%, (31.5 ± 5.8)%, (44.9 ± 8.2)% 和 (1.9 ± 0.9)% 增加到 (90.6 ± 9.0)%, (48.0 ± 6.3)%, (57.3 ± 9.0)% 和 (41.0 ± 12.7)%。

**结论:** rhIFN- $\gamma$ , rhIL-2 和 Anti-CD3mAb 能诱导大肠癌患者外周血单个核细胞为 CIK 细胞, 体外增殖力强, 是以 CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 为主的异质细胞群。

撒亚莲, 华映坤, 宋建新, 严新民, 贾玲, 董虹, 沈海. 多种细胞因子联合诱导大肠癌患者外周血单个核细胞为 CIK 细胞的免疫表型. 世界华人消化杂志 2005; 13(13): 1592-1594

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1592.asp>

## 0 引言

Schmidt Wolf 于 1991 年首次报道外周血单个核细胞在多种细胞因子刺激下活化为细胞因子诱导杀伤细胞 (cytokine-induced killer cells, CIK 细胞)<sup>[1]</sup>. 近年的研究表明 CIK 细胞是介导细胞毒活性最强的免疫效应细胞, 兼有 T 淋巴细胞强大的杀瘤活性和 NK 细胞的主要组织相容性复合物 (MHC) 限制的杀瘤效应, 故又称为 NKT 细胞<sup>[2]</sup>. 大肠癌是最常见的肿瘤之一, 也是最常见的肿瘤死亡原因之一. 直到现在, 手术仍然是其主要的治疗方式, 大约 50% 的术后患者在 5 a 内出现转移<sup>[3]</sup>. 免疫效应细胞能够识别并清除肿瘤细胞, 据报道在肿瘤术后常规治疗赋予细胞过继免疫治疗能降低复发率<sup>[4]</sup>. 在 CIK 免疫效应细胞用于临床治疗之前, 我们需要证实来源于大肠癌患者外周血单个核细胞的 CIK 细胞在体外的增殖能力和免疫表型的变化, 为 CIK 细胞过继免疫治疗提供可靠的理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 10 例大肠癌患者均为云南省第一人民医院 2003-09/2004-10 住院经手术后病检确诊病例, 其中男性 9 例, 女性 1 例, 年龄为 49-73 岁, 平均年龄为 65.8 岁. RPMI-1640 从 Invitrogen (GIBCO, 美国) 公司购买. 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 从 Hyclone (美国) 公司购买. 重组人干扰素  $\gamma$  (recombinant human interferon  $\gamma$ , rhIFN- $\gamma$ ) 购自上海生物制品研究所 (中国). 重组人白介素 2 (recombinant human interleukin-2, rhIL-2) 购自深圳科兴生物制品有限公司 (中国). 鼠抗人 CD3 单克隆抗体 (monoclonal antibody CD3, Anti-CD3mAb) 购自 Beckman 公司 (法国)。

### 1.2 方法

**1.2.1 CIK 细胞的分离和培养** 取大肠癌患者外周静脉血 12-15 mL, 用 Ficoll Hypaque 淋巴细胞分离液分离, 收集界面层的单个核细胞, 洗涤 2 次后, 将细胞按  $1 \times 10^6$ /L 数量悬浮于含 100 mL/L FBS 的 RPMI-1640 完全培养基中, 添加终浓度为  $3 \times 10^6$  U/L rhIFN- $\gamma$ , 置 37°C, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱 (Forma Therapeutics Inc.,

USA) 中培养. 24 h 后添加终浓度为 20  $\mu$ g/L Anti-CD3mAb 和  $1.5 \times 10^6$  U/L rhIL-2. 每 3 d 更换培养液一次, 并补充上述细胞因子. 在培养 0, 4, 7, 10, 13 d 时, 对细胞进行计数。

**1.2.2 CIK 细胞的免疫表型** 在培养第 13 d 收集 CIK 细胞, 用平衡液洗细胞后, 用 FITC 或 PE 标记的 CD3, CD4, CD8, CD16/CD56 孵育细胞, 30 min, 4°C. 洗去多余的抗体, 用流式细胞仪 (Coulter Epics-XL, Beckman-coulter Epics-XL3, Immuno-PREP, USA) 检测阳性细胞数。

**统计学处理** 数据以均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示。

## 2 结果

**2.1 CIK 细胞在倒置显微镜下的形态特点** CIK 细胞形态似外周血淋巴细胞, 但体积稍大. 在培养 3 d 后, 细胞增殖, 呈团, 可观察到不规则形的细胞. 细胞体积增大, 胞质少, 胞核大、圆. 有时可观察到细胞分裂相. 在培养 5-7 d, 细胞团更大, 并悬浮在培养液中 (图 1)。

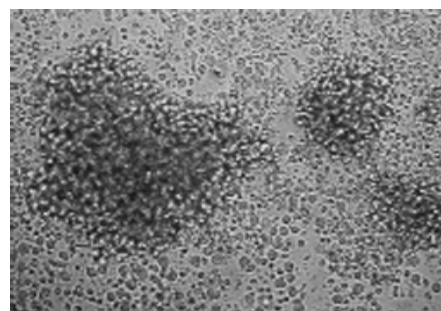


图1 培养第 13 d 的 CIK 细胞,  $\times 200$ .

**2.2 CIK 细胞体外扩增情况** 在培养第 1-3 d 细胞没有明显增殖. 4-5 d 可观察到细胞呈团、集落样生长, 数量明显增多. 在培养 4, 7, 10, 13 d 细胞数量分别增加  $2.7 \pm 0.9$ ,  $14.1 \pm 3.7$ ,  $23.0 \pm 5.0$  和  $31.2 \pm 3.0$  倍。

**2.3 CIK 细胞的免疫表型** 在培养第 13 d, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> 和 CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 细胞分别从 (62.8  $\pm$  7.6)%, (31.5  $\pm$  5.8)%, (44.9  $\pm$  8.2)% 和 (1.9  $\pm$  0.9)% 增加到 (90.6  $\pm$  9.0)%, (48.0  $\pm$  6.3)%, (57.3  $\pm$  9.0)% 和 (41.0  $\pm$  12.7)% (图 2)。

## 3 讨论

CIK 细胞是一组非 MHC 和非 T 细胞受体限制性的免疫活性细胞, 其主要效应细胞是以 CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> 为主的异质细胞群<sup>[5-6]</sup>. CIK 细胞是目前认识到的细胞毒活性最强的免疫效应细胞, 回输体内后达到杀灭癌细胞、抑制肿瘤生长及清除残留微小病灶的作用<sup>[7-8]</sup>. 由于 CIK 细胞对正常人体细胞、免疫系统没有任何毒副作用, 而且对多重耐药的肿瘤敏感. 因此, CIK 细胞过继免疫治疗被公认为继手术、放疗、化疗之后的第四种新型肿瘤治疗模式之一. 我们在体外通过 rhIFN- $\gamma$ , rhIL-2 和 Anti-CD3mAb 联合诱导

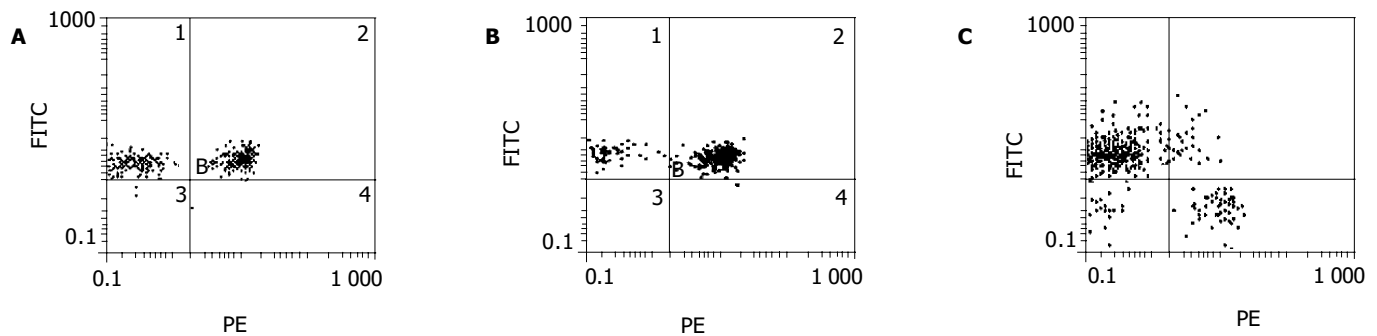


图2 培养13 d的CIK细胞免疫表型. A: CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>; B: CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>; C: CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup>.

活化大肠癌患者外周血单个核细胞为CIK细胞,探讨了其增殖能力以及免疫表型的变化,为临床肿瘤患者过继免疫治疗提供理论依据.

在培养第1 d加入rhIFN- $\gamma$ ,预诱导细胞表达IL-2受体、促进细胞增殖及分泌细胞因子.次日加入rhIL-2和Anti-CD3mAb联合诱导促进T淋巴细胞增殖并加强T淋巴细胞的细胞毒作用.健康状况下,外周血CIK细胞大约为1-5%,而我们的研究表明,大肠癌患者外周血单个核细胞在rhIFN- $\gamma$ , rhIL-2和Anti-CD3mAb联合作用下培养13 d,细胞数量增加31.2倍,CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>T细胞扩增近23倍.可以看出,CIK细胞是一种增殖活力强的免疫效应细胞.据报道,其他细胞因子IL-1, IL-2, IL-7, IL-12, IL-15等<sup>[9-10]</sup>的不同组合也可诱导单个核细胞为CIK细胞.但我们的操作方法简便,且细胞因子rhIFN- $\gamma$ , rhIL-2为上市药品.总之,本文联合应用多种细胞因子活化大肠癌患者外周血单个核细胞为CIK细胞,其体外增殖力强,是以CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>为主的异质细胞群.该研究为临床开展大肠癌患者CIK细胞过继免疫治疗奠定理论基础.

#### 4 参考文献

- 1 Peeters M, Haller DG. Therapy for early-stage colorectal cancer. *Oncology* 1999;13:307-315
- 2 Blattman JN, Greenberg PD. Cancer immunotherapy: a treat-

ment for the masses. *Science* 2004;305:200-205

- 3 Yamaguchi Y, Ohshita A, Kawabuchi Y, Ohta K, Shimizu K, Minami K, Hihara J, Miyahara E, Toge T. Adoptive immunotherapy of cancer using activated autologous lymphocytes-current status and new strategies. *Hum Cell* 2003;16:183-189
- 4 Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, Blume KG, Weissman IL. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor or cell activity. *J Exp Med* 1991;174:139-149
- 5 Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2002;8:464-468
- 6 Linn YC, Hui KM. Cytokine-induced killer cells: NK-like T cells with cytolytic specificity against leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003;44:1457-1462
- 7 Hongeng S, Petvises S, Worapongpaiboon S, Rerkamnuaychoke B, Pakakasama S, Jootar S. Generation of CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> cytokine-induced killer cells and their in vitro cytotoxicity against pediatric cancer cells. *Int J Hematol* 2003;77:175-179
- 8 Schmidt-Wolf IG, Lefterova P, Mehta BA, Fernandez LP, Huhn D, Blume KG, Weissman IL, Negrin RS. Phenotypic characterization and identification of effector cells involved in tumor cell recognition of cytokine-induced killer cells. *Exp Hematol* 1993;21:1673-1679
- 9 Zoll B, Lefterova P, Csipai M, Finke S, Trojanek B, Ebert O, Micka B, Roigk K, Fehlinger M, Schmidt-Wolf GD, Huhn D, Schmidt-Wolf IG. Generation of cytokine-induced killer cells using exogenous interleukin-2, -7 or -12. *Cancer Immunol Immunother* 1998;47:221-226
- 10 Li Y, Huang SL, Wu YF, Wei J, Bao R, Zhou DH. Expansion of CIK/NK cells from cord blood by using different combinations of stem cell factor, FLT3 ligand and interleukin 2, 7, 15 in vitro. *Zhongguo Shiyen Xueyexue Zazhi* 2004;12:350-354

编辑 张海宁

# 四君子汤防治大鼠应激性胃溃疡的初步研究

王海燕, 朱跃科, 陈煜

王海燕, 朱跃科, 陈煜, 首都医科大学附属北京佑安医院人工肝科  
北京市 100054

通讯作者: 王海燕, 100054, 北京市右安门外西头条8号, 首都医科大学附  
属北京佑安医院人工肝科. tiankonghaiyan@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-04-07 接受日期: 2005-04-09

## 摘要

**目的:** 观察不同剂量四君子汤防治大鼠应激性胃溃疡(stress ulcer, SU)的药物疗效, 并确定最佳药效剂量。

**方法:** 以低、中、高不同剂量的四君子汤给大鼠灌胃 14 d 后, 制备大鼠冷-束缚SU模型, 观察大鼠一般活动情况、用药后与用药前动物体质量变化、胃溃疡指数、胃液游离酸度及胸腺、脾脏质量。

**结果:** 四君子汤高剂量组可增加动物摄食量, 促进动物体质量增长及胸腺、脾脏发育( $P<0.05$ );降低应激所致溃疡指数( $P<0.05$ )。

**结论:** 高剂量四君子汤对大鼠应激性胃溃疡(SU)有明显防治作用。

王海燕, 朱跃科, 陈煜. 四君子汤防治大鼠应激性胃溃疡的初步研究. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1595-1596

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1595.asp>

## 0 引言

四君子汤是中医健脾补气的基础方剂. 大量动物实验证实四君子汤可有效治疗大鼠幽门结扎、食醋及冷-束缚应激所致胃溃疡<sup>[1]</sup>. 临床上也有用四君子汤有效治疗消化性溃疡的报道<sup>[2-3]</sup>. 而有关四君子汤防治应激性溃疡的作用国内外尚未见报道. 本实验通过给药后, 制备大鼠冷-束缚应激模型, 观察四君子汤对应激性溃疡(stress ulcer, SU)的预防作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 四君子汤按文献及临床参考剂量由人参、白术、茯苓、甘草以 10:9:9:6 比例组方, 按常规方法水煎制备. 以上药物均由北京同仁堂药店提供. 甲氧咪胍注射剂规格为 0.2 g/支, 由北京市永康制药厂生产, 批号 20000323. 酚红及氢氧化钠均为分析纯, 由北京化学试剂公司提供. 实验动物及分组: 二级健康Wistar雄性(♂)大鼠, 体质量 250 ± 10 g, 由中国医学科学院实验动物中心提供. 于室温 20 ± 1℃ 清洁动物实验室中饲养, 自由进食、饮水. 适应 1 wk 后, 随机分为 6 组, 每组 10 只. 分设正常对照组、模型对照组、甲氧咪胍组、四君子汤低

剂量组、中剂量组和高剂量组. 甲氧咪胍组于造模前给予甲氧咪胍 400 mg/kg 灌胃, 四君子汤(SJ)低、中、高剂量组分别为 3.0 g/kg、9.0 g/kg、27.0 g/kg, 正常及模型对照组给予等量生理盐水灌胃, 连续 3 wk. **1.2 方法** 大鼠末次给药后禁食 24 h, 制备冷-束缚应激模型, 将大鼠四肢固定于鼠板上, 直立浸水, 水面平剑突, 水温 18 ± 1℃, 约 6 h. 在乙醚麻醉下收取胃液后, 结扎贲门、幽门, 并向胃内注射 100 mL/L 甲醛溶液 5 mL, 摘除全胃进一步固定 24 h. 摘除胃沿胃大弯剪开平展于白色固定板上, 观察大体情况. 观察指标: (1) 大鼠一般活动情况. (2) 用药前与用药后比较体质量增加值. (3) 按Guth标准计数胃溃疡指数<sup>[4]</sup>. (4) 胃液游离酸度<sup>[5]</sup>. (5) 胸腺、脾脏质量. (6) 胃黏膜病理组织学变化。

**统计学处理** 实验数据以 mean ± SD 表示, 用 SPSS10.0 统计软件双样本 *t* 检验进行统计分析,  $P<0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

高剂量四君子汤组大鼠活动频繁, 精神好, 皮毛光亮. 与模型组比较, 甲氧咪胍组及四君子汤高剂量组均可降低溃疡指数, 差异显著( $P<0.05$ ). 甲氧咪胍组与四君子汤高剂量组间差异无显著性. 与模型组比较四君子汤高剂量组可促进大鼠体质量增长( $P<0.05$ )及胸腺、脾脏发育( $P<0.05$ );与甲氧咪胍组比较四君子汤高剂量组促进大鼠体质量增长( $P<0.05$ )及胸腺、脾脏发育( $P<0.05$ ), 差异显著. 与模型组比较甲氧咪胍可降低胃液游离酸度( $P<0.05$ );四君子汤各组均无显著性差异(表 1, 2)。

**胃黏膜病理组织学变化:** 镜下按病变程度分为 4 级. 0 级病变: 正常胃黏膜; 1 级病变: 胃黏膜糜烂; 2 级病变: 胃黏膜局灶性坏死; 3 级病变: 胃黏膜全层坏死. 每张切片进行连续 5 个视野内病变程度计数(表 3). 50 个视野内各用药组均比模型对照组病变程度轻, 其中四君子汤高剂量组病变程度最轻。

## 3 讨论

机体在面临各种应急突发事件、严重创伤和危重疾病时, 可产生应激反应, 导致体内下丘脑-垂体-肾上腺轴为主的应激系统反应, 血管活性物质释放增多, 胃肠黏膜血管收缩, 抗损伤作用减弱. 其中 SU 是常见并发症之一, SU 易并发上消化道出血, 危及生命。

迄今对 SU 的防治尚属经验性, 西药常以抑酸剂预防<sup>[6]</sup>. 已报道的中草药如生大黄、云南白药、白芨、川芎嗪



表1 四君子汤对大鼠各观测指标的影响(mean ± SD)

组别	n	剂量(g/kg)	体质量增长值(g)	UI	胃液游离酸度(mmol/L)
正常对照组	10	—	34.08 ± 10.65	0	23.28 ± 4.16
模型对照组	10	—	36.50 ± 8.49	38.81 ± 12.46	25.96 ± 2.51
甲氧咪胍组	10	0.4	33.90 ± 8.74	22.89 ± 7.96 <sup>a</sup>	11.13 ± 3.96 <sup>a</sup>
SJ 低剂量组	10	3.0	35.89 ± 10.01	34.32 ± 9.03	24.83 ± 7.10
SJ 中剂量组	10	9.0	42.09 ± 7.74	28.11 ± 5.87	22.45 ± 6.66
SJ 高剂量组	10	27.0	59.35 ± 15.64 <sup>ac</sup>	20.65 ± 8.61 <sup>a</sup>	20.76 ± 5.02

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs模型组; <sup>c</sup>*P*<0.05 vs甲氧咪胍组.

表2 四君子汤对实验大鼠胸腺、脾脏质量的影响(mean ± SD)

组别	n	剂量(g/kg)	胸腺质量(g)	脾脏质量(g)
正常对照组	10	—	0.33 ± 0.05	0.52 ± 0.08
模型对照组	10	—	0.23 ± 0.07	0.41 ± 0.04
甲氧咪胍组	10	0.4	0.31 ± 0.11	0.39 ± 0.09
SJ 低剂量组	10	3	0.29 ± 0.06	0.47 ± 0.06
SJ 中剂量组	10	9	0.35 ± 0.08	0.53 ± 0.06
SJ 高剂量组	10	27	0.58 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.79 ± 0.1 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs模型组.

表3 连续视野内各级病变计数(计数/视野数)

	n	0级病变	1级病变	2级病变	3级病变	2级以上
模型对照组	10	8/50	7/50	25/50	10/50	35/50
甲氧咪胍组	10	15/50	19/50	8/50	8/50	16/50
SJ 低剂量组	10	8/50	20/50	13/50	9/50	22/50
SJ 中剂量组	10	12/50	10/50	20/50	8/50	28/50
SJ 高剂量组	10	29/50	11/50	7/50	3/50	10/50

等治疗SU虽有一定疗效,但也多是从阻断SU发病机制的某一环节出发,缺乏辨证施治的整体疗效<sup>[7-9]</sup>.经典方剂四君子汤具有强壮补益和治疗消化性溃疡的作用.其作用机制与黏膜保护、调整胃肠肽激素分泌促进物质吸收作用有关<sup>[10]</sup>.方中人参为君药,甘温大补元气,健脾养胃,并已证实对应激反应有明显抑制作用.白术为臣药,苦温健脾燥湿.茯苓为佐药,甘温渗湿健脾;白术、茯苓合用更能促进脾胃运动消化功能,以滋生气血并驱除水

湿.炙甘草为使药,甘温和中.

本实验为研究四君子汤对SU的防治作用,制备大鼠冷-束缚应激模型,模拟人的SU发病过程.采用甲氧咪胍为阳性对照.结果表明与模型组比较高剂量四君子汤可明显增加大鼠摄食量,促进体质量增长及胸腺、脾脏发育,提高大鼠免疫力,降低溃疡的严重程度.虽然四君子汤抑酸作用不如甲氧咪胍显著,但高剂量组四君子汤的整体抗溃疡作用明显优于甲氧咪胍组.

本次实验结果初步表明四君子汤在多个作用环节对SU一定防治作用.为提高防治作用,下一步可以在四君子汤基础方剂上加味,进行复方方剂及其作用机制的研究.

#### 4 参考文献

- 1 彭成,雷载权.四君子汤对消化、运动、吸收作用的实验研究.中药药理与临床 1995;6:6-8
- 2 杭传珍.芪乳四君子汤治疗十二指肠溃疡60例.四川中医 2001;19:47
- 3 武和平.传统中医药对消化病的研究.世界华人消化杂志 2000;8(特刊8):33
- 4 李兆申,段义民,湛先保,许国铭.内皮素在大鼠冷束缚应激性溃疡中的作用.解放军医学杂志 1999;24:15-17
- 5 陈奇.中药药理研究方法学,第一版,天津,人民卫生出版社,1993:37-78
- 6 张一楚.应激性溃疡.上海医学 1999;22:454-456
- 7 黄进.生大黄治疗应激性溃疡出血疗效观察.实用中医药杂志 1999;15:6-7
- 8 刘宝文.加用云南白药和白芨治疗严重颅脑损伤及出血性中风并发上消化道出血的疗效观察.中西医结合实用临床急救 1996;3:485-486
- 9 董淑云,郑素琴,门秀丽,张硕森,景肖伶,张连元.应激性溃疡的发生及川芎嗪的防治效应.中国中西医结合脾胃杂志 1996;4:218-220
- 10 许得盛,沈自尹,王文健,陈伟华,应健,何瑞瑾,鲁珊妹.右归饮、四君子汤、桃红四物汤调节肾虚、脾虚、血瘀症患者免疫功能.中国中西医结合杂志 1999;19:712-714

编辑 王谨晖 审读 张海宁

# p14ARF 基因在大肠癌中的表达及意义

刘 辉, 罗丽明, 倪国文, 李 华, 郭建国, 周中银

刘辉, 罗丽明, 倪国文, 李华, 郭建国, 武汉市普仁医院消化内科  
湖北省武汉市 430081  
周中银, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
通讯作者: 刘辉, 430081, 湖北省武汉市青山区红卫路本溪街1号, 武汉市  
普仁医院消化内科. whzzy@tom.com  
电话: 027-68868236  
收稿日期: 2005-03-18 接受日期: 2005-04-13

## 摘要

**目的:** 探讨 p14ARF 基因在大肠癌中的表达及其生物学意义。

**方法:** 应用免疫组织化学(S-P)法和 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术原位观察 60 例大肠癌患者的癌组织、癌旁组织和正常组织中 p14ARF 基因蛋白的表达和细胞凋亡。

**结果:** 癌组织 p14ARF 基因的阳性表达相对含量(PU)( $9.57 \pm 1.03$ )明显低于癌旁( $28.17 \pm 5.26$ ,  $t = 2.51$ ,  $P = 0.02 < 0.05$ )和正常组织( $43.76 \pm 7.14$ ,  $t = 3.61$ ,  $P = 0.006 < 0.01$ );癌旁凋亡指数(AI)( $8.51 \pm 2.63\%$ )高于癌组织凋亡指数(AI)( $5.65 \pm 1.76\%$ ,  $t = 2.18$ ,  $P = 0.04 < 0.05$ );p14ARF 基因蛋白的阳性表达按患者的性别、年龄、肿瘤大小分组比较各组间无明显区别;按癌组织的分化程度、淋巴结转移和 Dukes 分期比较, 低分化组、有淋巴结转移组和 Dukes C+D 期组的 p14ARF 基因蛋白表达分别低于高分化组( $7.93 \pm 1.89$  vs  $12.76 \pm 2.28$ ,  $t = 2.36$ ,  $P = 0.03 < 0.05$ )、无淋巴结转移组( $7.21 \pm 1.95$  vs  $13.12 \pm 2.33$ ,  $t = 2.34$ ,  $P = 0.03 < 0.05$ )和 Dukes A+B 期组( $7.87 \pm 1.18$  vs  $12.03 \pm 2.15$ ,  $t = 2.36$ ,  $P = 0.03 < 0.05$ )。

**结论:** p14ARF 基因在大肠癌组织中表达下调, 从而抑制大肠癌的细胞凋亡, 这可能是大肠癌发生、发展的机制之一; p14ARF 基因的表达下调与大肠癌的恶性生物学行为有关。

刘辉, 罗丽明, 倪国文, 李华, 郭建国, 周中银. p14ARF 基因在大肠癌中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1597-1599  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1597.asp>

## 0 引言

INK4a/ARF 基因位于人第9号染色体短臂2区1带(9p21), p14ARF 是 INK4a 的可变读框基因, 由三个外显子 E1 $\beta$ 、E2、E3 和两个内含子组成, 三个外显子共同编码分子质量为 14 kd 的蛋白(即 p14ARF), 其由 133 个氨基酸组成, 能诱导细胞周期阻滞于 G<sub>1</sub> 或 G<sub>2</sub> 期, 是第一个直接调控细胞周期并抑制细胞分裂的新型抑癌基因<sup>[1-2]</sup>. p14ARF 是一种重要的凋亡调控基因, 其独特的结构和生物学功能在肿瘤分子生物学研究中日益受到重视. 大肠癌是常见的严重威胁人类健康的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率均较高, 尤其是近年, 由于人们的饮食结构和生活方式的改

变, 其发病率正在逐年增加<sup>[3-4]</sup>. 细胞凋亡受到抑制是大肠肿瘤形成的重要原因之一<sup>[5]</sup>, 而 p14ARF 在大肠癌中的表达及意义尚不完全清楚. 我们通过检测 p14ARF 蛋白在大肠癌中的表达, 观察其与细胞凋亡的关系, 探讨 p14ARF 基因的表达在大肠癌发生、发展和预后中的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 所有标本为武汉普仁医院和湖北省肿瘤医院 2000-2004 年手术切除大肠癌石蜡标本, 共 60 例, 其中男性 32 例, 女性 28 例, 年龄 37-75 岁, 平均  $58 \pm 7.8$  岁. 所有病例术前均未行放疗和化疗, 并由两位病理医生确诊. 每例取癌组织, 距癌 5 cm(癌旁)组织, 距癌 10 cm(正常)组织各一块, 中性甲醛(40 g/L)固定, 常规脱水, 石蜡包埋和制备 4  $\mu$ m 厚连续切片(切片事先用多聚赖氨酸处理), 切片分别进行 HE 染色作组织病理学、免疫组织化学研究和 TUNEL 染色。

### 1.2 方法

**1.2.1 免疫组织化学染色** 切片脱蜡至水, 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶, 胰酶消化, 采用 S-P 染色法, 切片置于抗原修复液(0.01 mol/L 柠檬酸盐)中微波抗原修复 12 min, 100 mL/L 羊血清封闭, 加入鼠抗人 p14ARF 单克隆抗体(抗体购自美国 Neomarkers 公司), 4℃ 过夜; 免疫组化染色均按 S-P 试剂盒推荐方法进行。

**1.2.2 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术(TUNEL)法染色** 按原位凋亡检测试剂盒说明书的步骤检测凋亡细胞(试剂盒购自德国 Roche 公司)。

**1.2.3 结果判断** (1)免疫组织化学定量: 采用 HIPAS-2000 型计算机图像分析系统(同济千屏影像工程公司产品), 摄取放大 400 倍的图像, 输入图像分析系统. 对图像进行灰度变换, 使染色阳性面积与背景分开, 进行自动检测. 以测量窗口为固定面积, 对阳性染色及背景的灰度级和面积进行测试, 参照申氏方法<sup>[6]</sup>计算阳性单位(positive unit, PU), PU 代表阳性染色的相对含量. 每张切片选 5 个视野, 求 PU 均值. (2)细胞凋亡判断及评价标准: 以细胞核呈棕黄色染色者为凋亡细胞. 在 400 倍高倍视野下, 每例标本随机选取 5 个癌区, 计算凋亡细胞在全部癌细胞中所占的比例, 即凋亡指数(apoptosis index, AI)。

**统计学处理** 应用 SPSS10.0 软件统计包对数据进行处理, 计量资料以 mean  $\pm$  SD 表示, 采用  $t$  检验。

## 2 结果

**2.1 大肠癌、癌旁和正常组织 p14ARF 基因蛋白表达和凋**

亡指数 p14ARF蛋白的阳性表达主要为胞质和胞膜着色,部分胞核着色,为浅黄和棕黄色,染色均匀.阳性细胞多呈局灶样分布,少数呈散在分布.取阳性细胞局灶样分布处作图像分析测PU值. p14ARF在大肠癌旁和大肠癌中的表达(PU值)均明显低于正常结肠组织,二者之间差异均有显著性( $P<0.05$ ),在癌旁和癌组织中的表达差异亦有显著性( $P<0.05$ ),癌组织中的表达(PU值)低于癌旁组织.免疫组织化学定量分析见表1.凋亡阳性细胞在组织中为单个散在或簇状分布,核物质呈现棕黄色.大肠正常黏膜凋亡细胞数量很少,多位于表层上皮中.癌组织和癌旁组织呈散在分布.癌旁和癌组织凋亡指数(AI)分别为  $8.51 \pm 2.63\%$  和  $5.65 \pm 1.76\%$ ,二者比较差异有显著性( $P<0.05$ ).

表1 大肠癌、癌旁、正常组织中p14ARF蛋白表达、AI的比较(mean  $\pm$  SD)

项目	癌组织	癌旁组织	正常组织
p14ARF(PU)	$9.57 \pm 1.03^a$	$28.17 \pm 5.26$	$43.76 \pm 7.14$
AI(%)	$5.65 \pm 1.76^a$	$8.51 \pm 2.63$	$1.75 \pm 0.49$

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 癌旁组织和正常组织.

2.2 p14ARF蛋白表达与大肠癌临床病理参数的关系(表2) p14ARF蛋白的阳性表达与患者的性别、年龄、肿瘤大小、无相关性( $P>0.05$ ),与癌组织的分化程度、淋巴结转移和Dukes分期相关( $P<0.05$ ),低分化组、有淋巴结转移和Dukes C/D期的p14ARF蛋白表达低于相对应组别( $P<0.05$ ).

表2 大肠癌 p14ARF 蛋白表达与病理参数的关系(mean  $\pm$  SD)

临床病理参数	组别	n	p14ARF PU
性别	男	32	$9.95 \pm 1.87$
	女	28	$8.96 \pm 1.06$
年龄	<55	20	$8.92 \pm 1.16$
	$\geq 55$	40	$10.36 \pm 1.37$
肿瘤长径(cm)	<3	26	$9.15 \pm 1.29$
	$\geq 3$	34	$9.78 \pm 1.16$
组织学类型	高中分化管理腺癌	35	$12.76 \pm 2.28^a$
	低分化管理腺癌	25	$7.93 \pm 1.89$
淋巴结转移	无	33	$13.12 \pm 2.33^c$
	有	27	$7.21 \pm 1.95$
Dukes 分期	A + B	27	$12.03 \pm 2.15^c$
	C + D	33	$7.87 \pm 1.18$

<sup>a</sup> $P<0.05$  vs 低分化管理腺癌组;<sup>c</sup> $P<0.05$  vs 淋巴结转移组;<sup>e</sup> $P<0.05$  vs C + D组.

### 3 讨论

大肠癌的发生发展是一个多基因参与,多步骤的复杂过程.分子生物学研究表明,肿瘤是一种癌基因的激活和抑

癌基因失活的基因病<sup>[7]</sup>.在人类肿瘤细胞中,p53-mdm2-p14ARF这条分子通路的作用日益受到重视<sup>[8]</sup>.p53通路在调控人类肿瘤发生的过程中有两种情况:细胞凋亡和细胞周期阻滞于G<sub>1</sub>期和(或)G<sub>2</sub>期<sup>[9-10]</sup>.p53和mdm2基因研究较多,其在肿瘤组织中的表达和意义比较明确.INK4a/ARF基因是1993年Serrano *et al*<sup>[11]</sup>采用酵母双杂交筛选法研究与CDK4结合的蛋白时发现的第一个直接调控细胞周期并抑制细胞分裂的新型抑癌基因,是除p53基因之外人类肿瘤中最常见失活的抑癌基因座.他定位于人第9号染色体短臂2区1带(9p21),可编码两种抑癌基因:P16INK4a和p14ARF.有关p14ARF基因的研究,目前报道不多.

我们运用免疫组化的方法显示p14ARF在大肠正常黏膜中表达较强,在癌旁组织中有部分表达,较正常黏膜组织阳性细胞少,染色较弱,在癌组织中阳性细胞相对较少,即p14ARF蛋白在大肠癌旁组织和大肠癌中分别存在着不同程度的缺失,在大肠癌组织中较癌旁组织中缺失较多.提示p14ARF的缺失与大肠癌的发生、发展有明确的关系.这与在脑恶性肿瘤、肺癌和乳腺癌等中的研究报道是一致的<sup>[11-13]</sup>.

在评估p14ARF蛋白表达和大肠癌各临床病理学参数的关系时,本实验提示p14ARF蛋白表达与肿瘤患者的性别、年龄、肿瘤大小等无显著关系,但与组织分化程度、淋巴结转移和Dukes分期存在着高度的相关性,分化程度低、有淋巴结转移和Dukes分期为C/D期的p14ARF蛋白表达明显低于对应组( $P<0.05$ ),这提示p14ARF蛋白表达与大肠癌的恶性生物学行为有关,上述结果提示p14ARF虽然参与了大肠癌的发生,但他的缺失对大肠癌的发展和浸润的作用更大,这与国外报道的结果是一致的<sup>[14]</sup>.p14ARF蛋白在大肠癌组织中表达的减少,影响了P53通路信号的传导,使其对大肠癌细胞的生长抑制作用减弱,在一定程度上促进了大肠癌的发生、发展.这也说明p14ARF表达的降低对于大肠癌的诊断和预后的判断具有一定的价值.

ARF位点的失活,常常导致ARF肿瘤抑制功能的丧失,诱发肿瘤的形成<sup>[15]</sup>.因此ARF与肿瘤的形成相关,他参与细胞的增殖,生长,凋亡.Radfar *et al*<sup>[16]</sup>研究表明ARF缺失以及P53缺失的鼠前B细胞中不表现凋亡特征.本实验结果显示,正常大肠黏膜的凋亡细胞位于表面上皮内,癌组织和癌旁组织则散在分布,癌旁组织细胞凋亡指数高于癌组织,提示p14ARF蛋白表达下调可能与大肠癌细胞的凋亡抑制有关,这可能是其参与大肠癌发生的机制之一.

### 4 参考文献

- 1 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
- 2 Larsen CJ. pRB, p53, p16INK4a, senescence and malignant transformation. *Bull Cancer* 2004;91:399-402
- 3 陈世耀, 吴同法, 刘厚钰, 王吉耀, 张善身, 张希德. 10 a 内镜检查分析. 世界华人消化杂志 1999;7:15-17

- 4 Wang Z, Wang F, Wang WQ, Gao Q, Wei WL, Yang Y, Wang GY. Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 overexpression with progressive growth of colorectal neoplasm. *World J Gastroenterol* 2004;10:550-554
- 5 宋今丹, 高丰, 蒋英丽, 赵欣, 陈誉华, 王芸庆. 细胞凋亡与大肠肿瘤. *世界华人消化杂志* 2002;10:429-431
- 6 申洪. 免疫组织化学染色定量方法的研究(III). *中国组织化学与细胞化学杂志* 1995;4:89-92
- 7 Qiao D, Gaitonde SV, Qi W, Martinez JD. Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation. *Carcinogenesis* 2001;22:957-964
- 8 Calabro V, Mansueto G, Santoro R, Gentilella A, Pollice A, Ghioni P, Guerrini L, La Mantia G. Inhibition of p63 transcriptional activity by p14ARF: functional and physical link between human ARF tumor suppressor and a member of the p53 family. *Mol Cell Biol* 2004;24:8529-8540
- 9 Ito T, Nishida N, Fukuda Y, Nishimura T, Komeda T, Nakao K. Alteration of the p14 (ARF) gene and p53 status in human hepatocellular carcinomas. *J Gastroenterol* 2004;39:355-361
- 10 Xiao EH, Li JQ, Huang JF. Effects of P53 on apoptosis and proliferation of hepatocellular carcinoma cells treated with transcatheter arterial chemoembolization. *World J Gastroenterol* 2004;10:190-194
- 11 Martinez JC, Palomino JC, Cabello A, Sepulveda JM, de la Camara AG, Ricoy JR. HDM2 overexpression and focal loss of p14/ARF expression may deregulate the P53 tumour suppressor pathway in meningeal haemangiopericytomas. *Histopathology* 2005;46:184-194
- 12 Wang YC, Lin RK, Tan YH, Chen JT, Chen CY, Wang YC. Wild-type P53 overexpression and its correlation with MDM2 and p14ARF alterations: an alternative pathway to non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:154-164
- 13 Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/P16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55:4525-4530
- 14 Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation-associated inactivation of p14 (ARF) is independent of P16 (INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 2000;60:129-133
- 15 Sarbia M, Geddert H, Klump B, Kiel S, Iskender E, Gabbert HE. Hypermethylation of tumor suppressor genes (p16INK4A, p14ARF and APC) in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer* 2004;111:224-228
- 16 Radfar A, Unnikrishnan I, Lee HW, DePinho RA, Rosenberg N. p19 (Arf) induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13194-13199

编辑 张海宁

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

• 研究快报 •

## 胆囊收缩素受体在胰腺癌细胞中的表达及胆囊收缩素对胰腺癌细胞周期的影响

石建群, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 曹亮, 魏群

石建群, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 魏群, 南通大学附属医院消化内科  
江苏省南通市 226001  
曹亮, 南通市第一人民医院 江苏省南通市 226001  
通讯作者: 周国雄, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院消化内科.  
zhouquoxiong@pub.nt.jsinfo.net  
电话: 0513-5777166 传真: 0513-5519820  
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

### 摘要

**目的:** 观察胆囊收缩素受体(CCKR)在人胰腺癌细胞株 SW1990 中的表达及胆囊收缩素(CCK)-8 肽对胰腺癌细胞周期的影响。

**方法:** 应用 RT-PCR 方法检测人胰腺癌细胞株 SW1990 中胆囊收缩素受体(CCKR)mRNA 的表达, 细胞化学法检测 SW1990 细胞中胆囊收缩素受体(CCKR)蛋白水平的表达, 流式细胞仪检测不同浓度的 CCK-8 肽对 SW199 细胞周期的影响。

**结果:** 在人胰腺癌细胞株 SW1990 中不表达 CCK-A 亚型受

体, 但表达 CCK-B 亚型受体; CCKR 在癌细胞株 SW1990 中的表达主要位于细胞膜上, 细胞浆内也可见。在  $10^{-8}$  g/L -  $10^{-5}$  g/L 浓度范围内, CCK-8 肽促进 SW1990 细胞的增殖, 呈剂量依赖性, 细胞周期分析发现 S 期细胞增加, G<sub>2</sub>/M 期细胞减少。

**结论:** CCKB 受体在人胰腺癌细胞株 SW1990 中表达, CCK-8 肽能促进 SW1990 细胞的增殖, 抑制细胞的凋亡, CCK 通过 CCKR 在胰腺癌细胞的增殖中发挥重要作用。

石建群, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 曹亮, 魏群. 胆囊收缩素受体在胰腺癌细胞中的表达及胆囊收缩素对胰腺癌细胞周期的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(13):1599-1602  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1599.asp>

### 0 引言

胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)是人体正常胰腺

- 4 Wang Z, Wang F, Wang WQ, Gao Q, Wei WL, Yang Y, Wang GY. Correlation of N-myc downstream-regulated gene 1 overexpression with progressive growth of colorectal neoplasm. *World J Gastroenterol* 2004;10:550-554
- 5 宋今丹, 高丰, 蒋英丽, 赵欣, 陈誉华, 王芸庆. 细胞凋亡与大肠肿瘤. *世界华人消化杂志* 2002;10:429-431
- 6 申洪. 免疫组织化学染色定量方法的研究(III). *中国组织化学与细胞化学杂志* 1995;4:89-92
- 7 Qiao D, Gaitonde SV, Qi W, Martinez JD. Deoxycholic acid suppresses p53 by stimulating proteasome-mediated p53 protein degradation. *Carcinogenesis* 2001;22:957-964
- 8 Calabro V, Mansueto G, Santoro R, Gentilella A, Pollice A, Ghioni P, Guerrini L, La Mantia G. Inhibition of p63 transcriptional activity by p14ARF: functional and physical link between human ARF tumor suppressor and a member of the p53 family. *Mol Cell Biol* 2004;24:8529-8540
- 9 Ito T, Nishida N, Fukuda Y, Nishimura T, Komeda T, Nakao K. Alteration of the p14 (ARF) gene and p53 status in human hepatocellular carcinomas. *J Gastroenterol* 2004;39:355-361
- 10 Xiao EH, Li JQ, Huang JF. Effects of P53 on apoptosis and proliferation of hepatocellular carcinoma cells treated with transcatheter arterial chemoembolization. *World J Gastroenterol* 2004;10:190-194
- 11 Martinez JC, Palomino JC, Cabello A, Sepulveda JM, de la Camara AG, Ricoy JR. HDM2 overexpression and focal loss of p14/ARF expression may deregulate the P53 tumour suppressor pathway in meningeal haemangiopericytomas. *Histopathology* 2005;46:184-194
- 12 Wang YC, Lin RK, Tan YH, Chen JT, Chen CY, Wang YC. Wild-type P53 overexpression and its correlation with MDM2 and p14ARF alterations: an alternative pathway to non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:154-164
- 13 Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB. Inactivation of the CDKN2/P16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res* 1995;55:4525-4530
- 14 Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation-associated inactivation of p14 (ARF) is independent of P16 (INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 2000;60:129-133
- 15 Sarbia M, Geddert H, Klump B, Kiel S, Iskender E, Gabbert HE. Hypermethylation of tumor suppressor genes (p16INK4A, p14ARF and APC) in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer* 2004;111:224-228
- 16 Radfar A, Unnikrishnan I, Lee HW, DePinho RA, Rosenberg N. p19 (Arf) induces p53-dependent apoptosis during abelson virus-mediated pre-B cell transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13194-13199

编辑 张海宁

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

• 研究快报 •

## 胆囊收缩素受体在胰腺癌细胞中的表达及胆囊收缩素对胰腺癌细胞周期的影响

石建群, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 曹亮, 魏群

石建群, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 魏群, 南通大学附属医院消化内科  
江苏省南通市 226001  
曹亮, 南通市第一人民医院 江苏省南通市 226001  
通讯作者: 周国雄, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院消化内科.  
zhouquoxiong@pub.nt.jsinfo.net  
电话: 0513-5777166 传真: 0513-5519820  
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

### 摘要

**目的:** 观察胆囊收缩素受体(CCKR)在人胰腺癌细胞株 SW1990 中的表达及胆囊收缩素(CCK)-8 肽对胰腺癌细胞周期的影响。

**方法:** 应用 RT-PCR 方法检测人胰腺癌细胞株 SW1990 中胆囊收缩素受体(CCKR)mRNA 的表达, 细胞化学法检测 SW1990 细胞中胆囊收缩素受体(CCKR)蛋白水平的表达, 流式细胞仪检测不同浓度的 CCK-8 肽对 SW199 细胞周期的影响。

**结果:** 在人胰腺癌细胞株 SW1990 中不表达 CCK-A 亚型受

体, 但表达 CCK-B 亚型受体; CCKR 在癌细胞株 SW1990 中的表达主要位于细胞膜上, 细胞浆内也可见。在  $10^{-8}$  g/L -  $10^{-5}$  g/L 浓度范围内, CCK-8 肽促进 SW1990 细胞的增殖, 呈剂量依赖性, 细胞周期分析发现 S 期细胞增加,  $G_2/M$  期细胞减少。

**结论:** CCKB 受体在人胰腺癌细胞株 SW1990 中表达, CCK-8 肽能促进 SW1990 细胞的增殖, 抑制细胞的凋亡, CCK 通过 CCKR 在胰腺癌细胞的增殖中发挥重要作用。

石建群, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 曹亮, 魏群. 胆囊收缩素受体在胰腺癌细胞中的表达及胆囊收缩素对胰腺癌细胞周期的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(13):1599-1602  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1599.asp>

### 0 引言

胆囊收缩素 (cholecystokinin, CCK) 是人体正常胰腺

生长过程中的重要调节递质,在人体内存在多种分子形式:胆囊收缩素受体(cholecystokinin receptor, CCKR)是位于细胞膜上的G蛋白偶联受体,参与细胞内多种信号传导,CCK与受体结合后影响细胞的增殖.根据CCKR对CCK和胃泌素的亲和力高低,可将其分为CCK-A受体和CCK-B受体(胃泌素受体)两种亚型.CCK及其受体在胰腺癌发生、发展中的重要作用已受到广泛重视.本研究旨在观察CCKR在人胰腺癌细胞株SW1990中的表达情况及CCK-8肽对胰腺癌细胞周期的影响.

## 1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株SW1990由上海交通大学附属医院第一人民医院消化内科王兴鹏教授惠赠.细胞培养基(低糖型DMEM)由美国Gibco公司生产.小牛血清及胎牛血清购自中国科学院上海实生细胞生物技术有限公司.免疫组化试剂CCKR抗体和过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物(Peroxidase-Antiperoxidase, PAP)试剂均购自上海森雄公司.流式细胞仪(FACScalibur型)由美国BD公司生产,分析软件为AppLe公司随机软件.倒置显微镜由上海精密仪器厂生产.细胞摄像机由德国Leica公司生产.

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞传代后加入100 mL/L的胎牛血清10 mL,约12 h后细胞融合达50%左右弃去上清液,改用无血清培养基孵育24 h,使细胞同步化.

1.2.2 免疫细胞化学法 固定后的细胞爬片先用PBS洗涤,再用10 g/L  $H_2O_2$ /甲醇阻断内源性过氧化物酶10-20 min, PBS洗涤后再用正常羊血清(二抗的正常血清)1:20室温封闭20 min.使用1:50的CCK-A受体或CCK-B受体的单克隆抗体(羊抗人)于37℃下孵育1 h,洗涤后加入1:100用生物素标记的二抗(马抗羊),于37℃下孵育30 min后用PBS洗涤,再加入适当稀释的兔PAP复合物,在37℃下孵育1 h后予以PBS洗涤,最后用0.4 mg/L DAB+0.3 mg/L  $H_2O_2$ 显色5-15 min,苏木素衬染.阳性染色为细胞膜及细胞浆出现棕黄色颗粒,部分呈深棕黄色颗粒.

1.2.3 本实验采用一步法RT-PCR进行mRNA检测 (1)细胞模板RNA的提取:采用TRIZOL法提取细胞中的总RNA, (2)引物设计合成:根据GeneBank中目的基因序列,通过Primer 3软件进行设计引物.CCK-A受体引物序列:上游引物为5'-tgc ttt gaa ggt gat tgc tg-3',下游引物为5'-gta aca ccc atc gct gtc ct-3',扩增产物大小为340 bp. CCK-B受体引物序列:上游引物为5'-gga gct ggc cat tag aat ca-3',下游引物为5'-acc ccc atg agg tag gaa ac-3',扩增产物大小为252 bp. 上游引物为5'-tca ttg aca aac tgc gct tc-3',下游引物为5'-cac aca gct tca cct gag ga-3';扩增产物大小为342 bp. 内参基因 $\beta$ -

actin引物序列:上游引物5'-aag tac tcc gtg tgg atc gg-3',下游引物为5'-atg cat tca cct ccc ctg tg-3',扩增产物大小为486 bp. 以上引物均由上海生物工程公司合成. (3)反应扩增条件:在0.5 mL EP管中分别加入下列试剂:10×Buffer 5  $\mu$ L, 50 mmol/L  $MgCl_2$  1.5  $\mu$ L, dNTPs mix(10 mmol/L 每管)1  $\mu$ L, 模板RNA 1  $\mu$ L, CCK受体的上游引物、下游引物各1  $\mu$ L(引物共三对,其中CCK-A受体引物为一对,CCK-B受体引物为两对),内参 $\beta$ -actin上游引物、下游引物各1  $\mu$ L, RT逆转录酶 1  $\mu$ L, DNA聚合酶 1  $\mu$ L, 加DEPC水至50  $\mu$ L,最后在各管内各滴入一滴石蜡油.55℃温育45 min. PCR循环条件:预变性温度:92℃, 30 s;变性温度:92℃, 30 s;退火温度55℃, 30 s;延伸温度72℃, 1 min;循环40次,终止反应后延伸温度为72℃,延后2 min,反应结束后吸取10  $\mu$ L最终反应的产物,17 g/L琼脂糖凝胶在120 V条件下电泳25 min后,于紫外线下观察电泳结果,用图像分析仪摄像、记录分析.

1.2.4 细胞周期 同步化的细胞最终接种浓度为 $1 \times 10^8$ 个细胞/L,取细胞悬液1 mL接种在两块12孔的培养板上,接种后每孔中加入无血清的培养基1 mL及相关浓度的CCK-8肽0.25 mL(经此处理后CCK-8肽浓度被稀释为所需的浓度).细胞药物干预试验共设立六组,其中一组为空白对照组,另五组分别加入不同浓度的CCK-8肽( $1 \times 10^{-3}$  g/L、 $1 \times 10^{-4}$  g/L、 $1 \times 10^{-5}$  g/L、 $1 \times 10^{-6}$  g/L、 $1 \times 10^{-7}$  g/L的CCK-8肽浓度),每组均重复三次.细胞增殖6 h和12 h后,收集各组细胞,制成细胞悬液,用0.01 mol/L PBS水洗涤两次,经700 mL/L的酒精于4℃下固定24 h后,以无药物组作空白对照组,用流式细胞仪检测不同浓度CCK-8肽对细胞周期的影响.

统计学处理 数据以mean  $\pm$  SD表示,由WSTATA统计软件进行方差分析.

## 2 结果

2.1 免疫细胞化学染色结果 CCK-A受体未见阳性染色,CCK-B受体的阳性染色表现为细胞膜及细胞浆出现棕黄色颗粒,部分呈深棕黄色颗粒(图1).

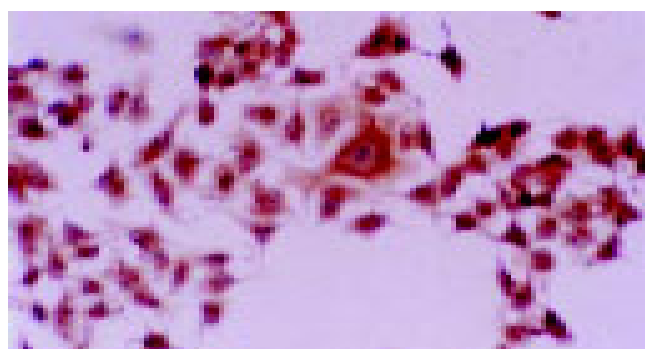


图1 胰腺癌细胞SW1990 CCKB受体免疫细胞化学染色( $\times 250$ ).

**2.2 RT-PCR 检测结果** 人胰腺癌细胞株SW1990总RNA经RT-PCR成功扩增出CCK-B受体的基因片段和内参 $\beta$ -actin基因片段,相应的片段大小为CCK-B受体为252 bp, $\beta$ -actin为486 bp,所检出基因片段与原设计完全一致,但未能扩增出CCK-A受体的基因片段(图2)。

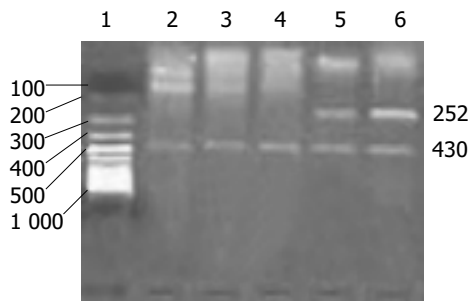


图2 人胰腺癌细胞SW1990中CCKR的表达. 1: marker; 2: 正常胰腺组织对照; 3-4: CCK-A受体; 5-6: CCK-B受体.

**2.3 CCK-8 肽干预结果** (1)CCK-8 肽干预后6 h结果:流式细胞仪检测发现,空白对照组细胞各周期比例分别为: $G_0/G_1$ 期85.71%, $G_2/M$ 期14.28%,S期0.01%.药物干预组( $10^{-5}$  g/L) $G_0/G_1$ 期77.97%, $G_2/M$ 期20.49%,S期1.54%.在CCK-8肽使用后6 h,SW1990细胞处于静止期( $G_0/G_1$ 期)细胞比例减少,而处于有丝分裂期( $G_2/M$ 期)及DNA合成活跃期(S期)比例均增加.同时发现随着CCK-8肽浓度的增加,增殖期细胞的比例呈升高趋势.当CCK-8肽浓度为 $10^{-5}$  g/L时,增殖期细胞比例已接近最大,CCK-8肽浓度增为 $10^{-4}$  g/L时,增殖期细胞比例升高较 $10^{-5}$  g/L已不明显.(2)CCK-8肽干预后12 h的结果:流式细胞仪检测发现,空白对照组细胞各周期比例分别为: $G_0/G_1$ 期2.30%, $G_2/M$ 期97.66%,S期0.04%.CCK-8肽干预组( $10^{-5}$  g/L) $G_0/G_1$ 期1.02%, $G_2/M$ 期93.97%,S期5.01%.结果证实细胞接种12 h后绝大多数都进入有丝分裂期( $G_2/M$ 期),两组在该期的比例基本一致.但在CCK-8肽使用后, $10^{-5}$  g/L组提前进入DNA合成活跃期(S期)比例增加(表1).(3)经统计软件WSTATATA进行方差分析: $G_2/M$ 期:各组间F值为31.19, $P<0.01$ ,在统计学上有显著性意义.对照组与 $10^{-8}$  g/L组差异无显著性( $P=0.16$ ),而与其他组之间在统计学上有显著性差异( $P<0.05$ ); $10^{-5}$  g/L组与各组之间有显著性差异;其他各组间均无统计学意义.S期:各组间F值为124.08, $P<0.01$ ,在统计学上有显著性意义.空白对照组与其他各组间有显著性差异( $P<0.05$ ); $10^{-8}$  g/L组与其他各组间有显著性差异( $P<0.05$ ); $10^{-7}$  g/L组与其他组间有显著性

差异; $10^{-6}$  g/L组与其他组间有显著性差异; $10^{-5}$  g/L与 $10^{-4}$  g/L组间无显著性差异.

### 3 讨论

近年来,胆囊收缩素及其受体在胰腺癌发生中的作用日益受到重视.Reubi *et al*<sup>[1]</sup>采用放射自显影技术对人类多种肿瘤进行研究,发现,在胰腺癌、小细胞肺癌等多种肿瘤中均有CCK-B受体的表达.Caplin *et al*<sup>[2]</sup>研究证实,在正常胰腺标本中无CCK-B/胃泌素受体、前胃泌素、甘氨酸延伸胃泌素或酰胺胃泌素的表达,但在胰腺癌细胞则显示中度到高度表达:CCK-B/胃泌素受体95%,前胃泌素91%,甘氨酸延伸胃泌素55%,酰胺胃泌素23%.本研究采用RT-PCR法,检测了人胰腺癌细胞株SW1990中CCKR mRNA的表达情况,结果证实在人胰腺癌细胞株SW1990中表达CCK-B受体的mRNA,与Ji *et al*<sup>[3]</sup>的结果吻合.采用免疫细胞化学法证实,在人胰腺癌细胞株SW1990中,CCK-B受体也有中度到高度的阳性表达,与De Weerth *et al*<sup>[4]</sup>的结果类似.本研究在mRNA水平及蛋白水平上共同证实,在人胰腺癌细胞株SW1990中有CCK-B受体的表达.人胰腺癌细胞株SW1990中CCKR表达表明了CCK-B受体在胰腺癌的发生、发展中起重要作用.

多个研究已证实CCK-B受体为细胞膜受体,属于G蛋白偶联受体超家族,能与鸟苷酸可逆性结合,是一种激素受体和信号传导的功能蛋白.本研究通过免疫细胞化学法证实,在人胰腺癌细胞株中,CCK-B受体不仅存在于细胞膜上而且存在于细胞浆内.细胞膜上CCK-B受体的表达强度高于细胞浆,在细胞浆内CCK-B受体分布比较均匀,细胞浆内CCK-B受体的出现可能与CCK-B受体的内在化有关.Tarasova *et al*<sup>[5]</sup>观察到胃泌素在细胞膜表面与CCK-B受体结合后,可通过包涵素依赖机制内吞入胞,在激素释放到细胞内特定区域后,受体通过再循环机制回到细胞膜上,其再循环时间约1 h左右.当受体处于跨膜期,细胞膜上和细胞浆内同时可见受体表达.

本研究采用CCK-8肽对人胰腺癌细胞株SW1990进行药物干预试验.通过流式细胞仪检测证实CCK-8肽能促进该细胞株的增殖,在CCK-8肽作用6 h后即可检测到胰腺癌细胞株SW1990有部分细胞已提前进入S期.有关CCK促进细胞增殖的机制,目前认为与CCK通过CCKR激活细胞增殖信号转导途径有关.CCK与受体结合后可激活肌醇磷脂信使系统,通过G蛋白激活磷脂酶C而使磷脂酰肌醇二磷酸水解,有1,4,5-三磷酸肌醇和二酰基甘油,并进一步激活蛋白激酶C,从而使胞内多种底物

表1 12 h的CCK-8肽对SW1990细胞周期的影响(mean  $\pm$  SD)

细胞周期	空白对照	$10^{-8}$ g/L	$10^{-7}$ g/L	$10^{-6}$ g/L	$10^{-5}$ g/L	$10^{-4}$ g/L
$G_2/M$	97.57 $\pm$ 0.12	96.46 $\pm$ 0.38	95.71 $\pm$ 0.56	95.15 $\pm$ 0.14	93.85 $\pm$ 0.18	95.38 $\pm$ 0.33
S	0.075 $\pm$ 0.02	1.285 $\pm$ 0.35	2.430 $\pm$ 0.41	3.525 $\pm$ 0.21	5.015 $\pm$ 0.17	4.280 $\pm$ 0.85

蛋白磷酸化,而激活与基因表达有关的激酶,最终引起丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)的激活,直接导致核内转录因子活化而达到调节增殖的作用;转录因子NF- $\kappa$ B也可将活化信号由细胞浆传至细胞核。

尽管不同浓度CCK-8肽都对人胰腺癌细胞株SW1990的增殖(增殖)周期有影响,但本研究结果仍表明当CCK-8肽浓度为 $10^{-5}$  g/L左右时,促进细胞增殖的作用最大,同时抑制细胞凋亡作用也较明显。实验结果表明,CCK-8肽能促进SW1990细胞提前进入S期,随着CCK-8肽浓度的升高进入S期的SW1990细胞比例也逐渐升高;但当CCK-8肽浓度超过 $10^{-5}$  g/L时,增加CCK-8肽的浓度并不明显增加进入S期细胞比例。因此,CCK-8肽浓度为 $10^{-5}$  g/L是人胰腺癌细胞株SW1990增殖的一个较佳浓度,同时也提示一定浓度的CCK在人胰腺癌的发生、发展中起重要作用。

实验中CCK-8肽对人胰腺癌细胞株SW1990的增殖存在一个较佳的浓度,这与人胰腺癌细胞株仅为单因素CCK-8肽作用有关。尽管对正常人体内CCK的作用规律目前知之不深,但由于人体内存在着多种细胞生长因子和细胞生长抑制因子,调控肿瘤细胞增殖的因素更加复杂,机制更加多样,多种因素作用的结果或许对所需的CCK浓度不会太高。本研究表明,不仅CCK-8肽的作用浓度对SW1990的增殖和凋亡均有影响,而且CCK-8肽的作用时间也对细胞的增殖和凋亡有影响。在6 h的 $10^{-5}$  g/L浓度下,SW1990提前进入S期的比例已超过12 h的对照组(1.54%

vs 0.075%);而该浓度12 h S期细胞的比例也比6 h的明显升高(5% vs 1.54%)。表明在 $10^{-8}$ – $10^{-5}$  g/L浓度范围内,CCK-8肽作用时间越长,进入增生期的细胞比例越多。因而提示CCK的浓度及作用时间在促进胰腺癌的发生、发展中均起重要作用。尽管CCK-8肽24 h内的作用结果表明,药物浓度能影响SW1990细胞的增殖和细胞凋亡,但对24 h后的CCK-8肽的作用结果,还有待于进一步研究。

胰腺癌的早期发现、早期诊断和治疗是提高患者生存率的主要策略。尽管目前对胰腺癌采用较多的诊断及治疗方法,但实际效果仍不如人意,深入了解CCK及其受体和其他因素在胰腺癌中的作用,可以筛选出合理有效的胰腺癌生物学标记及药物,更好的用于临床诊断和治疗。

#### 4 参考文献

- 1 Reubi JC, Scheer JC, Waser B. Cholecystokinin (CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res* 1997; 57:1377-1386
- 2 Caplin M, Savage K, Khan K, Brett B, Rode J, Varro A, Dhillon A. Expression and processing of gastrin in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 2000;87:1035-1040
- 3 Ji B, Bi Y, Simeone D, Mortensen RM, Logsdon CD. Human pancreatic acinar cells do not respond to cholecystokinin. *Pharmacol Toxicol* 2002;91:327-332
- 4 De Weerth A, von Schrenck T, Lohr M, Mirau S, Greten H, Kalthoff H. Human pancreatic cancer cell Lines express the CCKB receptor. *Hepatogastroenterology* 1999;46:472-478
- 5 Tarasova NI, Wank SA, Hudson EA, Romanov VI, Czerwinski G, Resau JH, Michejda CJ. Endocytosis of gastrin in cancer cells ex-pression gastrin/CCK-B receptor. *Cell Tissue Res* 1997; 287:325-333

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 •

## 直肠癌病理和分子生物特征与预后的多因素分析

顾 军,王 梅,李永梅,王雅杰,薛春燕,高 伟

顾军,王梅,李永梅,王雅杰,薛春燕,高伟,中国人民解放军解放军第二军医大学附属长海医院肿瘤科 上海市 200433

通讯作者:顾军,200433,上海市杨浦区长海路174号,中国人民解放军解放军第二军医大学附属长海医院肿瘤科。mingqi999@yahoo.com.cn

电话:021-25072062 传真:021-25070608

收稿日期:2005-03-31 接受日期:2005-04-09

### 摘要

目的:探讨直肠癌临床病理特征和生物学因素与预后的关系。

方法:143例直肠癌患者,青年组31例,中年组60例,

老年组52例,中高分化腺癌101例,其他42例,低于C期的67例,淋巴结转移31例,应用EnVision法分析切片P16<sup>ink4a</sup>、P53、PCNA和PKC- $\alpha$ 的表达,单因素和多因素分析其对预后的影响。

结果:各年龄组5 a生存率分别为56.5%,61.4%和59.4%。单因素分析,预后与病理类型( $\chi^2 = 18.994$ ,  $P = 0.002$ )、淋巴结转移情况( $\chi^2 = 13.311$ ,  $P = 0.021$ )、临床病理分期( $\chi^2 = 17.075$ ,  $P = 0.004$ )及年龄( $\chi^2 = 11.249$ ,  $P = 0.047$ )均



蛋白磷酸化,而激活与基因表达有关的激酶,最终引起丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)的激活,直接导致核内转录因子活化而达到调节增殖的作用;转录因子NF- $\kappa$ B也可将活化信号由细胞浆传至细胞核。

尽管不同浓度CCK-8肽都对人胰腺癌细胞株SW1990的增殖(增殖)周期有影响,但本研究结果仍表明当CCK-8肽浓度为 $10^{-5}$  g/L左右时,促进细胞增殖的作用最大,同时抑制细胞凋亡作用也较明显。实验结果表明,CCK-8肽能促进SW1990细胞提前进入S期,随着CCK-8肽浓度的升高进入S期的SW1990细胞比例也逐渐升高;但当CCK-8肽浓度超过 $10^{-5}$  g/L时,增加CCK-8肽的浓度并不明显增加进入S期细胞比例。因此,CCK-8肽浓度为 $10^{-5}$  g/L是人胰腺癌细胞株SW1990增殖的一个较佳浓度,同时也提示一定浓度的CCK在人胰腺癌的发生、发展中起重要作用。

实验中CCK-8肽对人胰腺癌细胞株SW1990的增殖存在一个较佳的浓度,这与人胰腺癌细胞株仅为单因素CCK-8肽作用有关。尽管对正常人体内CCK的作用规律目前知之不深,但由于人体内存在着多种细胞生长因子和细胞生长抑制因子,调控肿瘤细胞增殖的因素更加复杂,机制更加多样,多种因素作用的结果或许对所需的CCK浓度不会太高。本研究表明,不仅CCK-8肽的作用浓度对SW1990的增殖和凋亡均有影响,而且CCK-8肽的作用时间也对细胞的增殖和凋亡有影响。在6 h的 $10^{-5}$  g/L浓度下,SW1990提前进入S期的比例已超过12 h的对照组(1.54%

vs 0.075%);而该浓度12 h S期细胞的比例也比6 h的明显升高(5% vs 1.54%)。表明在 $10^{-8}$ – $10^{-5}$  g/L浓度范围内,CCK-8肽作用时间越长,进入增生期的细胞比例越多。因而提示CCK的浓度及作用时间在促进胰腺癌的发生、发展中均起重要作用。尽管CCK-8肽24 h内的作用结果表明,药物浓度能影响SW1990细胞的增殖和细胞凋亡,但对24 h后的CCK-8肽的作用结果,还有待于进一步研究。

胰腺癌的早期发现、早期诊断和治疗是提高患者生存率的主要策略。尽管目前对胰腺癌采用较多的诊断及治疗方法,但实际效果仍不如人意,深入了解CCK及其受体和其他因素在胰腺癌中的作用,可以筛选出合理有效的胰腺癌生物学标记及药物,更好的用于临床诊断和治疗。

#### 4 参考文献

- 1 Reubi JC, Scheer JC, Waser B. Cholecystokinin (CCK)-A and CCK-B/gastrin receptors in human tumors. *Cancer Res* 1997; 57:1377-1386
- 2 Caplin M, Savage K, Khan K, Brett B, Rode J, Varro A, Dhillon A. Expression and processing of gastrin in pancreatic adenocarcinoma. *Br J Surg* 2000;87:1035-1040
- 3 Ji B, Bi Y, Simeone D, Mortensen RM, Logsdon CD. Human pancreatic acinar cells do not respond to cholecystokinin. *Pharmacol Toxicol* 2002;91:327-332
- 4 De Weerth A, von Schrenck T, Lohr M, Mirau S, Greten H, Kalthoff H. Human pancreatic cancer cell lines express the CCKB receptor. *Hepatogastroenterology* 1999;46:472-478
- 5 Tarasova NI, Wank SA, Hudson EA, Romanov VI, Czerwinski G, Resau JH, Michejda CJ. Endocytosis of gastrin in cancer cells ex-pression gastrin/CCK-B receptor. *Cell Tissue Res* 1997; 287:325-333

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 •

## 直肠癌病理和分子生物特征与预后的多因素分析

顾 军,王 梅,李永梅,王雅杰,薛春燕,高 伟

顾军,王梅,李永梅,王雅杰,薛春燕,高伟,中国人民解放军解放军第二军医大学附属长海医院肿瘤科 上海市 200433

通讯作者:顾军,200433,上海市杨浦区长海路174号,中国人民解放军解放军第二军医大学附属长海医院肿瘤科。mingqi999@yahoo.com.cn

电话:021-25072062 传真:021-25070608

收稿日期:2005-03-31 接受日期:2005-04-09

### 摘要

目的:探讨直肠癌临床病理特征和生物学因素与预后的关系。

方法:143例直肠癌患者,青年组31例,中年组60例,

老年组52例,中高分化腺癌101例,其他42例,低于C期的67例,淋巴结转移31例,应用EnVision法分析切片P16<sup>ink4a</sup>、P53、PCNA和PKC- $\alpha$ 的表达,单因素和多因素分析其对预后的影响。

结果:各年龄组5 a生存率分别为56.5%,61.4%和59.4%。单因素分析,预后与病理类型( $\chi^2 = 18.994$ ,  $P = 0.002$ )、淋巴结转移情况( $\chi^2 = 13.311$ ,  $P = 0.021$ )、临床病理分期( $\chi^2 = 17.075$ ,  $P = 0.004$ )及年龄( $\chi^2 = 11.249$ ,  $P = 0.047$ )均

有显著相关;与 P16<sup>ink4a</sup> 的表达缺失( $\chi^2 = 15.179$ ,  $P = 0.01$ )、突变型 P53 的过度表达( $\chi^2 = 28.185$ ,  $P < 0.001$ )显著相关. COX 模型分析显示, 临床病理类型、病理分期、P16<sup>ink4a</sup> 的表达缺失、突变型 P53 的过度表达是独立预后因素,  $P$  值分别为 0.029, 0.028,  $<0.001$  和  $<0.001$ , 风险比分别为 1.982, 2.049, 0.219 和 4.175.

**结论:** 直肠癌病理类型、病理分期和 P16<sup>ink4a</sup>、P53 是重要的预后指标, 可以指导直肠癌患者术后个体化治疗.

顾军, 王梅, 李永梅, 王雅杰, 薛春燕, 高伟. 直肠癌病理和分子生物特征与预后的多因素分析. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1602-1606  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1602.asp>

## 0 引言

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一. 据报道, 1990 年全世界约有 43 700 例患者死于结直肠癌, 其好发年龄为 50.5-68.4 岁, 通常将发病年龄大于 65 岁者称为老年人直肠癌. 目前, 结直肠癌的治疗较前有了很大的进步, 5 a 生存率达到 60% 左右, 但直肠癌的预后相对差. 有关直肠癌预后的临床病理因素已经有较多的研究, 但结果还不一致, 对分子生物标记物在预后中的影响报道的尚少<sup>[1-2]</sup>. 我们选取我院手术治疗的 143 例直肠癌的临床病理资料和分子生物学标记与预后的关系进行回顾性分析, 为预后的判断提供综合性指标, 以利于临床选择术后辅助治疗措施.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院 1997-06/2000-06 手术治疗并经病理检查证实的直肠癌患者共 223 例, 选取完整临床病理资料和随访资料的 143 例, 按年龄分组, 青年组 ( $<40$  岁) 31 例 (21.7%, 平均年龄  $35 \pm 4.3$  岁), 41-65 岁组 60 例 (41.9%, 平均年龄  $56 \pm 5.4$  岁),  $>65$  岁组 52 例 (36.4%, 平均年龄  $71 \pm 4.7$  岁), 其中男 95 例, 女 48 例. 随访 1997-06/2004-04, 共 82 mo, 平均 52 mo, 中位随访时间 61 mo. 全部患者术后第 1 a 内 3 mo 随访一次, 以后每 6 mo 随访一次, 建立随访病历档案, 所有临床病理资料指标编码后输入计算机系统, 建立 SPSS 数据文件, 生存时间从手术后至发生死亡事件 (排除与肿瘤无关的死亡). 随访方式采取门诊随访、人访、电话或信件, 随访率 100%.

**1.2 方法** 143 例患者石蜡切片进行回顾性免疫组化分析, 所有病例术前均未经放疗和化疗. 抗蛋白激酶 c- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ )、突变型 P53 蛋白、增殖细胞核抗原 (PCNA) 及 ink4a 编码蛋白 P16<sup>ink4a</sup> 单抗购自晶美生物公司, EnVision 反应液购自 Dako 公司. 存档蜡块制备 4  $\mu$ m 连续切片, 二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后置于 pH6.0 的枸橼酸盐缓冲液中, 微波法修复抗原:  $95^\circ\text{C}$ , 5 min  $\times$  4 次, EnVision<sup>TM</sup> 免疫组化法染色, DAB 显色, 按试剂盒说明书常规操作, 各抗体工作浓度按试剂盒说明, 阴性对照用 PBS 代替一抗, 阳性对照由试剂盒提供. P53 及 PCNA 的表达以胞核

出现棕黄色颗粒为阳性; P16 为瘤细胞浆和 / 或核着黄褐色, PKC- $\alpha$  为胞质着色, 阳性细胞  $>5\%$  为阳性, 阳性细胞  $<5\%$  为阴性. P16 阳性细胞数  $>25\%$  为阳性, 否则记为阴性. P53 和 PCNA 标记指数 (PCNA LI) 为每 500 个细胞的阳性百分比, 切片组织中无阳性细胞为 -, 阳性细胞  $<25\%$  为 +, 阳性细胞达 25-50% 为 ++, 阳性细胞达  $>50\%$  为 +++.

**统计学处理** 应用 SPSS 11.5 软件包进行统计分析, 非参数的 Kruskal-Wallis 检验, 生存率计算采用 Kaplan-Meier 法, Log-rank 比较各组间生存率, 用 Cox 回归模型进行多因素分析.

## 2 结果

**2.1 各组的临床病理资料比较** (表 1) 各组在手术方式, 肿瘤至肛门距离, 肿瘤大小方面无明显差异, 青年组比老年组的淋巴结转移比率高 ( $P = 0.573$ ), 但相差不显著; 青年组分化差的低分化腺癌和黏液腺癌、印戒细胞癌的比例较高 ( $P = 0.259$ ), 相差亦无统计学意义; 老年组 A、B 病例多, 占 57.7%, 青年组 C 期和可切除肝转移的 D 期病例占 64.5%, 但两组相差无统计学差异.

**2.2 免疫组化染色情况比较** (表 1) 全组 PKC 阳性表达各组间无显著差异, P16、P53 和 CA19-9 的表达也无显著差异; 青年组和 40-65 岁组 PCNA 表达强度比老年组明显高, 强阳性的分别为 77.4%、73.3% 和 53.8% ( $\chi^2 = 6.693$ ,  $P = 0.035$ ). 老年组和 40-65 岁组相差无统计学差异 ( $P = 0.10$ ).

**2.3 生存时间与临床病理情况、癌基因及抑癌基因表达情况的相关性** 生存时间和病理类型、淋巴结转移情况、临床分期及年龄有显著相关, 和肿瘤大小、肿瘤到肛门距离及性别无明显相关; 抑癌基因 P16<sup>ink4a</sup> 的表达缺失、突变型 P53 的过度表达显著相关, 和 PKC- $\alpha$  及 PCNA 的表达无显著相关性 (表 2).

**2.4 生存曲线及 COX 回归模型** 经 Kaplan-Meier 法计算各组 5 a 生存率分别为老年组 56.5%, 中年组 61.4%, 青年组 59.4%, 各年龄组累积生存率见图 1, 经 Log-rank 检验差异无统计学意义 ( $P = 0.8212$ ). Cox 回归模型分析认为生存时间与病理类型、临床病理分期和 P16、P53 的表达显著相关, P16 阳性表达患者成活期长, 野生型 P53 蛋白表达成活期短 (表 3).

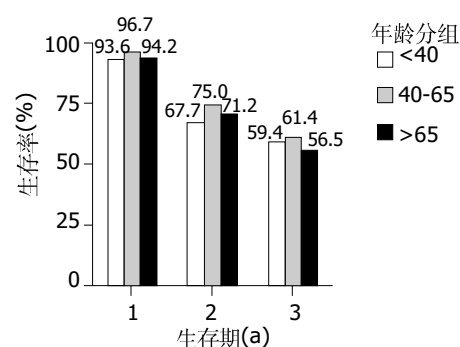


图1 直肠癌各年龄组 1、3、5 a 累积生存率.

表1 直肠癌各组临床病理资料和免疫组化染色分析

		65 以上		40-65 岁		40 岁以下	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
性别	男	36	69.2	42	70.0	17	54.8
	女	16	30.8	18	30.0	14	45.2
手术方式	dixon	30	57.7	26	43.3	21	67.7
	miles	16	30.8	27	45.0	9	29.0
	其他	6	11.5	7	11.7	1	3.2
肛门距离	≤ 7 cm	29	55.8	36	60.0	19	61.3
	>7 cm	23	44.2	24	40.0	12	38.7
肿瘤大小	≤ 5 cm	48	92.3	49	81.7	24	77.4
	>5 cm	4	7.7	11	18.3	7	22.6
病理类型	高中分化腺癌	41	78.8	40	66.7	20	64.5
	低分化腺癌, 黏液腺癌和印戒细胞癌	11	21.2	20	33.3	11	35.5
分期	AB 期	30	57.7	26	43.3	11	35.5
	C 期, 包括部分可切除肝转移的 D	22	42.3	34	56.7	20	64.5
淋巴结转移	无淋巴结转移	31	59.6	32	53.3	14	45.2
	黏膜外淋巴结转移	10	19.2	13	21.7	8	25.8
	肠系膜淋巴结转移	11	21.2	15	25.0	9	29.0
PKC-α	(-)	22	42.3	27	45.0	13	41.9
	(+)	30	57.7	33	55.0	18	58.1
P16	(-)	28	53.8	31	51.7	13	41.9
	(+)	24	46.2	29	48.3	18	58.1
P53	~ +	27	51.9	35	58.3	16	51.6
	+ + ~ + + +	25	48.1	25	41.7	15	48.4
PCNA	~ +	24	46.2	16	26.7	7	22.6
	+ + ~ + + +	28	53.8	44	73.3	24	77.4 <sup>a</sup>

$\chi^2 = 6.693$ ,  $P < 0.05$  vs 老年组.

表2 直肠癌患者生存时间与免疫组化及临床病理的 Kruskal Wallis 检验

	PKC-α	P16	P53	PCNA	分组	性别	手术方式	肛门距离	肿瘤大小	病理类型	淋巴结转移	分期
卡方值	3.945	15.18	28.19	4.675	11.25	3.450	1.710	4.857	6.556	18.99	13.31	17.08
自由度	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<i>P</i> 值	0.557	0.010	0.000	0.457	0.047	0.631	0.888	0.434	0.256	0.002	0.021	0.004

表3 直肠癌的 COX 比例风险回归模型

								相对危险度 95.0% 可信区间	
		回归系数	标准误	Wald 卡方值	<i>g</i>	<i>P</i> 值	相对危险度	Lower	Upper
Step 1	P53	1.288	0.287	20.086	1	0.000	3.626	2.064	6.369
Step 2	P16	-1.177	0.292	16.295	1	0.000	0.308	0.174	0.546
	P53	1.670	0.302	30.505	1	0.000	5.314	2.938	9.613
Step 3	病理类型	0.924	0.295	9.804	1	0.002	2.519	1.413	4.493
	P16	-1.468	0.316	21.636	1	0.000	0.230	0.124	0.428
	P53	1.613	0.308	27.379	1	0.000	5.017	2.742	9.180
Step 4	病理类型	0.684	0.313	4.788	1	0.029	1.982	1.074	3.656
	分期	0.717	0.326	4.845	1	0.028	2.049	1.082	3.880
	P16	-1.519	0.316	23.059	1	0.000	0.219	0.118	0.407
	P53	1.429	0.316	20.458	1	0.000	4.175	2.248	7.755

### 3 讨论

近几年直肠癌治疗取得了一些进展,但是患者的总体生存率仍不能令人满意,且不同患者临床预后差别很大,如果能够找到明确的预后因子,提早鉴别哪类患者需要更积极的治疗和密切随访,将为提高直肠癌的长期生存、减少复发和肿瘤相关死亡带来较好的益处<sup>[2]</sup>.我们就临床病理因素和分子生物因素对预后的影响进行探索.

**3.1 临床病理因素对预后的影响** 文献报道结直肠癌总的存活率韩国为62%,美国为61%,维多利亚和澳大利亚为76%.而局限的直肠腺癌的5 a生存率为53-56%,区域转移性腺癌为39-42%,有远处转移的腺癌为9-11%.本组病例各年龄组5 a生存率在56.5-61.4%,与国外报道的一致<sup>[3-5]</sup>.在直肠癌的预后因素中,多数认为与肿瘤的细胞分化程度、病理分期、肠壁浸润程度,淋巴结转移和远处转移等显著相关,而与年龄、性别、肿瘤距肛门的距离及手术方式无明显相关,但还存在差异. Di Fabio *et al*<sup>[6]</sup>研究认为T4病变、年龄大于70岁、淋巴管浸润和神经浸润与生存期减低显著相关,其中T4(风险比率12.75,  $P < 0.001$ )和年龄大于70岁(风险比率3.08,  $P = 0.04$ )是独立预后因素. Alici *et al*<sup>[7]</sup>比较了小于40岁(80例)与大于40岁(382例)的结直肠癌的预后因素,认为年龄、肿瘤分期、直肠癌位置、淋巴结浸润及血清LDH、CEA水平与预后相关,肿瘤部位和TNM分期是独立的预后因素.本组资料显示青年组肿瘤大于5 cm的占22.6%,高于老年组的7.7%,C、D期占64.5%,而老年组占42.3%,低分化腺癌、黏液腺癌和印戒细胞癌各组分别是21.2%、33.3%和35.5%,但均无统计学差异.生存分析中,各年龄组生存期Kruskal-Wallis检验差异有统计学意义( $P = 0.047$ ),但Log-rank检验并无显著差异, Cox回归分析年龄不是影响生存的独立危险因素,与文献[7-8]报道不同.其原因可能是年龄分组的差异,多数报道把青年组定为小于40岁,老年组定为大于65岁;同时本研究青年组病例较少,为便于统计,将C期和伴可切除肝转移的D期病例合并,预后差的低分化腺癌和黏液腺癌、印戒细胞癌合并,这是否影响统计效率,有待进一步扩大病例数验证.在单因素分析中病理类型、淋巴结转移情况和病理分期与生存时间差异有统计学意义( $P = 0.002, 0.021, 0.004$ ), Cox模型的多因素分析也认为病理类型和疾病分期是影响生存期的独立危险因素,与文献[1, 7-8]报道一致.

**3.2 细胞生物因素对预后的影响** 每种肿瘤发生都有其基因谱系.结直肠癌的基因研究比较多,但单独研究直肠癌发生的基因谱系研究尚少. p53基因是迄今发现的与人类肿瘤相关性最强的基因,与p14<sup>ARF</sup>基因通过mdm2基因相互作用,三者构成P53-mdm2-p14细胞周期调控分子通路. P53蛋白在DNA损伤应答反应中引起DNA合成抑制基因的表达或诱导凋亡<sup>[9]</sup>.研究表明突变P53可能直接地参

与肿瘤的扩散,肿瘤细胞从基因突变中获得转移潜能,或从原发肿瘤分离出来后有较强的成活能力<sup>[10]</sup>.本组突变型P53强阳性比率分别为48.1%、41.7%和48.4%,各组间无显著差异,但单因素和多因素分析均与预后显著相关( $P < 0.001$ ),与文献[11-12]报道一致. Cimoli *et al*<sup>[13]</sup>用Meta分析认为野生型P53增加细胞对细胞毒药物的敏感性,而突变型P53对药物的耐受性增加.这也是表达突变型P53蛋白预后差的原因之一.

P16<sup>ink4a</sup>是细胞周期蛋白依赖激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)抑制因子,妨碍pRb蛋白磷酸化,将细胞周期阻断在G1期,是Rb细胞周期控制通路(P16-Rb-p21ras)中关键分子之一,在大多数人类肿瘤细胞下调,其调控失常的机制多为基因缺失、突变、启动子甲基化、其产物被癌基因蛋白所结合及转录后修饰.文献报道P16在结直肠癌中的缺失频率在50-67%之间,本研究各组的P16表达缺失频率分别为53.6%、51.7%和41.9%,其表达缺失与年龄无明显相关,但与生存期显著相关, Cox回归分析P16阴性直肠癌预后差<sup>[14-15]</sup>.

蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)是一类Ca<sup>2+</sup>、磷脂依赖性的蛋白激酶,在跨膜信号传递过程中起着重要作用.肿瘤PKC- $\alpha$ 活性增加引起抗凋亡分子数量增加,增强多药耐药,抑制凋亡,增强细胞渗透能力和浸润能力,促进肿瘤生长.而在尚未知的状态下, PKC- $\alpha$ 活性增加也呈现低浸润性的表型<sup>[16]</sup>. PKC- $\alpha$ 过度表达与结肠癌的多药耐药(MDR)相关,其耐药性与mdr基因无关,在PKC- $\alpha$ 表达的细胞系中, doxorubicin和vincristine摄入减少,而5-氟脲嘧啶的摄入不受影响,阻断PKC- $\alpha$ 后耐药表型被逆转,细胞对丝裂霉素、5-氟脲嘧啶和vincristine更敏感<sup>[16]</sup>.本组PKC- $\alpha$ 阳性表达率在55.0-58.1%之间,与患者的长期生存无关( $P = 0.557$ ).可能PKC- $\alpha$ 使肿瘤浸润和抗肿瘤的双重性取消其对生存期的影响<sup>[16]</sup>.进一步研究PKC- $\alpha$ 同工酶在直肠癌中的表达谱,可以为临床应用PKC- $\alpha$ 的抑制剂提供佐证.

PCNA是DNA聚合酶的辅助蛋白,是细胞增殖周期中的一种核蛋白,其表达在细胞增殖周期G1后期开始升高, G2/S期交界时达到高峰, G2、M期明显下降,因此PCNA的阳性表达率可直接反映肿瘤细胞的功能状态和增殖活性.这种增殖活性的升高与预后的关系存在相当的差异,尚无一致的结论<sup>[12, 17]</sup>.本组PCNA增殖指数大于25%的表达在53.8-77.4%,青年组表达强度比老年组明显高( $P = 0.035$ ),但这种表达强度的差异并未表现出对生存的影响( $P = 0.457$ ),与多数文献结论相同<sup>[12]</sup>.

总之,直肠癌的病理类型、淋巴结转移情况、病理分期和生物学标记P53、P16<sup>ink4a</sup>是影响预后的危险因素,其中病理类型、病理分期和P16<sup>ink4a</sup>、P53是重要的独立变量,而年龄、肿瘤大小、肿瘤距肛门的部位、手术方式及PKC- $\alpha$ 、PCNA的表达不是影响预后的独立变量.

结合临床病理资料和直肠癌相关基因谱分析可能是评估预后的一条良好途径. 进一步分析直肠癌的基因表达谱及对预后的意义可能是今后研究的方向, 以便更准确判断预后, 指导制定个体化治疗和随访方案.

#### 4 参考文献

- 1 汪建平, 杨祖立, 王磊, 董文广, 黄奕华, 覃建章, 詹文华. 结直肠癌临床病理特征与预后的多因素回归分析. *中华肿瘤杂志* 2003; 25:59-61
- 2 Renehan AG, O'Dwyer ST, Whynes DK. Cost effectiveness analysis of intensive versus conventional follow up after curative resection for colorectal cancer. *Br Med J* 2004;328:81
- 3 Park YJ, Park KJ, Park JG, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. Prognostic factors in 2230 korean colorectal cancer patients: analysis of consecutively operated cases. *World J Surg* 1999;23:721-726
- 4 Gatta G, Ciccolallo L, Capocaccia R, Coleman MP, Hakulinen T, Moller H, Berrino F; EUROCORE Working Group. Differences in colorectal cancer survival between Europe and U. S. populations: the importance of sub-site and morphology. *Eur J Cancer* 2003;39:2214-2222
- 5 McLeish JA, Thursfield VJ, Giles GG. Survival from colorectal cancer in victoria: 10-year follow-up of the 1987 management survey. *ANZ J Surg* 2002;72:352-356
- 6 Di Fabio F, Nascimbeni R, Villanacci V, Baronchelli C, Bianchi D, Fabbretti G, Casella C, Salerni B. Prognostic variables for cancer-related survival in node-negative colorectal carcinomas. *Dig Surg* 2004;21:128-133
- 7 Alici S, Aykan NF, Sakar B, Bulutlar G, Kaytan E, Topuz E. Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome. *Tohoku J Exp Med* 2003;199:85-93
- 8 汪建平, 王磊, 杨祖立, 黄奕华, 董文广, 覃建章, 詹文华. 青年结直肠癌的临床病理特征及预后. *中华胃肠外科杂志* 2002;5:256-258
- 9 Halaschek-Wiener J, Wacheck V, Kloog Y, Jansen B. Ras inhibition leads to transcriptional activation of p53 and down-regulation of Mdm2: two mechanisms that cooperatively increase p53 function in colon cancer cells. *Cell Signal* 2004;16: 1319-1327
- 10 McKay JA, Douglas JJ, Ross VG, Curran S, Loane JF, Ahmed FY, Cassidy J, McLeod HL, Murray GI. Analysis of key cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumours. *J Pathol* 2002; 196:386-393
- 11 Tang R, Wang JY, Fan CW, Tsao KC, Chen HH, Wu CM, Chen JS, Changchien CR, Hsieh LL. P53 is an independent pre-treatment markers for long-term survival in stage II and III colorectal cancers: an analysis of interaction between genetic markers and fluorouracil-based adjuvant therapy. *Cancer Lett* 2004;201:101-109
- 12 阎晓初, 柳凤轩, 贺光友, 于冬梅, 王宗梅. 大肠肿瘤 cyclin D1, p21WAF1/CIP1, P53 和增殖细胞核抗原的免疫组化研究. *癌症* 2000;19:974-977
- 13 Cimoli G, Malacarne D, Ponassi R, Valenti M, Alberti S, Parodi S. Meta-analysis of the role of p53 status in isogenic systems tested for sensitivity to cytotoxic antineoplastic drugs. *Biochim Biophys Acta* 2004;1705:103-120
- 14 Esteller M, Gonzalez S, Risques RA, Marcuello E, Mangués R, Germa JR, Herman JG, Capella G, Peinado MA. K-ras and P16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:299-304
- 15 Cui X, Shirai Y, Wakai T, Yokoyama N, Hirano S, Hatakeyama K. Aberrant expression of pRb and p16<sup>INK4a</sup>, alone or in combination, indicates poor outcome after resection in patients with colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2004;35:1189-1195
- 16 Lahn M, Paterson BM, Sundell K, Ma D. The role of protein kinase C- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ) in malignancies of the gastrointestinal tract. *Eur J Cancer* 2004;40:10-20
- 17 卫洪波, 王吉甫, 陈规划. 增殖细胞核抗原表达与结直肠癌预后关系的研究. *中华胃肠外科杂志* 2001;4:114-117

编辑 张海宁

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

• 研究快报 •

## CCl<sub>4</sub> 致肝硬变门静脉高压大鼠肠黏膜通透性的变化

姚国相, 沈忠义, 薛新波, 杨 镇

姚国相, 薛新波, 杨镇, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科湖北省武汉市 430030  
沈忠义, 大连医科大学附属第一医院普通外科 辽宁省大连市 116011  
通讯作者: 姚国相, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科.  
电话: 027-61048672 传真: 027-61048672  
收稿日期: 2005-05-17 接受日期: 2005-06-01

### 摘要

目的: 研究CCl<sub>4</sub>致肝硬化门静脉高压大鼠肠道黏膜通透性变化.

方法: 以镉为示踪剂观察肠道黏膜通透性在CCl<sub>4</sub>致肝硬化门静脉高压组和对照组大鼠的变化, 采用透射电镜观察镉在

肠道黏膜内的通透情况, 同时检测两组大鼠肠道细菌和内毒素移位的情况.

结果: 内毒素测定: 门静脉高压组大鼠体静脉血( $0.083 \pm 0.012$  EU/mL)、门静脉血( $0.126 \pm 0.012$  EU/mL)、腹水中的内毒素水平( $0.062 \pm 0.012$  EU/mL)均较对照组( $0.046 \pm 0.009$  EU/mL)明显升高( $P < 0.05$ ). 细菌培养: 门静脉高压组肠系膜淋巴结的细菌检出率显著高于对照组(85% vs 20%,  $P < 0.05$ ). 腹水中细菌的检出率门静脉高压组显著高于对照组(41% vs 0,  $P < 0.01$ ). 透射电子显微镜观察: 门静脉高压大鼠肠黏膜的通透性明显增加, 镉呈线状沉积在肠道黏膜的上皮细胞之间,

结合临床病理资料和直肠癌相关基因谱分析可能是评估预后的一条良好途径. 进一步分析直肠癌的基因表达谱及对预后的意义可能是今后研究的方向, 以便更准确判断预后, 指导制定个体化治疗和随访方案.

#### 4 参考文献

- 1 汪建平, 杨祖立, 王磊, 董文广, 黄奕华, 覃建章, 詹文华. 结直肠癌临床病理特征与预后的多因素回归分析. *中华肿瘤杂志* 2003; 25:59-61
- 2 Renehan AG, O'Dwyer ST, Whynes DK. Cost effectiveness analysis of intensive versus conventional follow up after curative resection for colorectal cancer. *Br Med J* 2004;328:81
- 3 Park YJ, Park KJ, Park JG, Lee KU, Choe KJ, Kim JP. Prognostic factors in 2230 korean colorectal cancer patients: analysis of consecutively operated cases. *World J Surg* 1999;23:721-726
- 4 Gatta G, Ciccolallo L, Capocaccia R, Coleman MP, Hakulinen T, Moller H, Berrino F; EUROCARE Working Group. Differences in colorectal cancer survival between Europe and U. S. populations: the importance of sub-site and morphology. *Eur J Cancer* 2003;39:2214-2222
- 5 McLeish JA, Thursfield VJ, Giles GG. Survival from colorectal cancer in victoria: 10-year follow-up of the 1987 management survey. *ANZ J Surg* 2002;72:352-356
- 6 Di Fabio F, Nascimbeni R, Villanacci V, Baronchelli C, Bianchi D, Fabbretti G, Casella C, Salerni B. Prognostic variables for cancer-related survival in node-negative colorectal carcinomas. *Dig Surg* 2004;21:128-133
- 7 Alici S, Aykan NF, Sakar B, Bulutlar G, Kaytan E, Topuz E. Colorectal cancer in young patients: characteristics and outcome. *Tohoku J Exp Med* 2003;199:85-93
- 8 汪建平, 王磊, 杨祖立, 黄奕华, 董文广, 覃建章, 詹文华. 青年结直肠癌的临床病理特征及预后. *中华胃肠外科杂志* 2002;5:256-258
- 9 Halaschek-Wiener J, Wacheck V, Kloog Y, Jansen B. Ras inhibition leads to transcriptional activation of p53 and down-regulation of Mdm2: two mechanisms that cooperatively increase p53 function in colon cancer cells. *Cell Signal* 2004;16:1319-1327
- 10 McKay JA, Douglas JJ, Ross VG, Curran S, Loane JF, Ahmed FY, Cassidy J, McLeod HL, Murray GI. Analysis of key cell-cycle checkpoint proteins in colorectal tumours. *J Pathol* 2002; 196:386-393
- 11 Tang R, Wang JY, Fan CW, Tsao KC, Chen HH, Wu CM, Chen JS, Changchien CR, Hsieh LL. P53 is an independent pre-treatment markers for long-term survival in stage II and III colorectal cancers: an analysis of interaction between genetic markers and fluorouracil-based adjuvant therapy. *Cancer Lett* 2004;201:101-109
- 12 阎晓初, 柳凤轩, 贺光友, 于冬梅, 王宗梅. 大肠肿瘤 cyclin D1, p21WAF1/CIP1, P53 和增殖细胞核抗原的免疫组化研究. *癌症* 2000;19:974-977
- 13 Cimoli G, Malacarne D, Ponassi R, Valenti M, Alberti S, Parodi S. Meta-analysis of the role of p53 status in isogenic systems tested for sensitivity to cytotoxic antineoplastic drugs. *Biochim Biophys Acta* 2004;1705:103-120
- 14 Esteller M, Gonzalez S, Risques RA, Marcuello E, Manges R, Germa JR, Herman JG, Capella G, Peinado MA. K-ras and P16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001;19:299-304
- 15 Cui X, Shirai Y, Wakai T, Yokoyama N, Hirano S, Hatakeyama K. Aberrant expression of pRb and p16<sup>INK4a</sup>, alone or in combination, indicates poor outcome after resection in patients with colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2004;35:1189-1195
- 16 Lahn M, Paterson BM, Sundell K, Ma D. The role of protein kinase C- $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ) in malignancies of the gastrointestinal tract. *Eur J Cancer* 2004;40:10-20
- 17 卫洪波, 王吉甫, 陈规划. 增殖细胞核抗原表达与结直肠癌预后关系的研究. *中华胃肠外科杂志* 2001;4:114-117

编辑 张海宁

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

• 研究快报 •

## CCl<sub>4</sub> 致肝硬变门静脉高压大鼠肠黏膜通透性的变化

姚国相, 沈忠义, 薛新波, 杨 镇

姚国相, 薛新波, 杨镇, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科湖北省武汉市 430030  
沈忠义, 大连医科大学附属第一医院普通外科 辽宁省大连市 116011  
通讯作者: 姚国相, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科.  
电话: 027-61048672 传真: 027-61048672  
收稿日期: 2005-05-17 接受日期: 2005-06-01

### 摘要

目的: 研究CCl<sub>4</sub>致肝硬化门静脉高压大鼠肠道黏膜通透性变化.

方法: 以镉为示踪剂观察肠道黏膜通透性在CCl<sub>4</sub>致肝硬化门静脉高压组和对照组大鼠的变化, 采用透射电镜观察镉在

肠道黏膜内的通透情况, 同时检测两组大鼠肠道细菌和内毒素移位的情况.

结果: 内毒素测定: 门静脉高压组大鼠体静脉血( $0.083 \pm 0.012$  EU/mL)、门静脉血( $0.126 \pm 0.012$  EU/mL)、腹水中的内毒素水平( $0.062 \pm 0.012$  EU/mL)均较对照组( $0.046 \pm 0.009$  EU/mL)明显升高( $P < 0.05$ ). 细菌培养: 门静脉高压组肠系膜淋巴结的细菌检出率显著高于对照组(85% vs 20%,  $P < 0.05$ ). 腹水中细菌的检出率门静脉高压组显著高于对照组(41% vs 0,  $P < 0.01$ ). 透射电子显微镜观察: 门静脉高压大鼠肠黏膜的通透性明显增加, 镉呈线状沉积在肠道黏膜的上皮细胞之间,

并向下沉积到黏膜细胞下面的固有层;而对照组大鼠没有出现这样的变化。

**结论:** 门静脉高压症时肠黏膜上皮细胞之间,而不是上皮细胞本身的通透性增高,可能是导致细菌和内毒素的移位的途径。

姚国相, 沈忠义, 薛新波, 杨镇.  $\text{CCl}_4$  致肝硬变门静脉高压大鼠肠黏膜通透性的变化. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1606-1608  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1606.asp>

## 0 引言

虽然目前很多学者已经认同应激和危重患者可以发生肠道内细菌及其成分的移位,即细菌移位. 国外一些研究认为在肝硬化门静脉高压时也可以发生细菌移位,但是对于在肝硬化门静脉高压时发生细菌移位的具体机制,特别是在肝硬化门静脉高压时肠道黏膜通透性的变化上的研究,目前的报道较少<sup>[1-3]</sup>.

关于细菌移位的途径,一些研究报道细菌及其产物主要是通过肠道黏膜上皮细胞进入下方的间质;我们以往采用肝前门静脉结扎的方法发现,肠道黏膜上皮细胞之间的通透性明显增强;本研究我们进一步了解 $\text{CCl}_4$ 致肝硬化门静脉高压症肠道黏膜上皮通透性的变化<sup>[4-6]</sup>.

本研究通过建立肝硬化门静脉高压大鼠的动物模型,以镧为示踪剂在透射电镜下观察肠黏膜屏障的通透性改变,同时测定其细菌和内毒素移位的情况。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 健康成年 Sprague-Dawley 大鼠,共 60 只,重量在 250-300 g. 动物习惯实验室环境 6 d 后进行实验研究. 此期间自由进食和饮水. 主要试剂和仪器:内毒素试剂盒,硝酸镧,巧克力麦康凯琼脂和透射电子显微镜。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型的建立** 随机取 30 只大鼠作为肝硬化门静脉高压组,另外 30 只作为对照组. 肝硬化门静脉高压组大鼠每天在浅的乙醚麻醉下灌胃. 初次  $\text{CCl}_4$  剂量为 20  $\mu\text{L}$ ,而后根据每次灌胃 48 h 后的体重计算下一次灌胃剂量. 当腹水出现后,剂量减为 40  $\mu\text{L}/\text{wk}$ ;如果腹水消失,剂量要相应增加. 对照组 30 只大鼠进行同样的灌胃但用的是蒸馏水<sup>[7]</sup>.

**1.2.2 标本的采取和检测** 当腹水出现 4 wk 后,在乙醚麻醉下,严格无菌操作,采用腹部正中切口开腹. 从门静脉和体静脉取血放入无热源试管中,进行内毒素的测定;并各取上述血 0.5 mL 立即放入血培养瓶中进行培养. 留取腹水、肠系膜淋巴结、肝脏和脾称重、匀浆,而后取上清液进行细菌培养;腹水进行内毒素测定. 所有的标本均进行需氧培养 3-5 d,采用常规方法鉴定培养基中细菌的种类<sup>[8]</sup>. 而后取末端回肠,用乳酸林格氏液漂洗后,将

小块组织立即放入含 40 mg/L 硝酸镧的 20 mg/L 戊二醛中固定液中浸泡 1 h. 随后切割成 1  $\text{mm}^3$  的小块. 随后在上述固定液中冲洗 3 次,每次 10 min. 再用二甲砷酸钠配制的 10 mg/L 钨酸中固定 1 h,钨酸中也含有硝酸镧. 逐级酒精脱水,EPON812 包埋. 超薄切片不再染色,在透射电镜下观察<sup>[9-10]</sup>.

**统计学处理**  $\chi^2$  检验用于比较细菌检出率,内毒素的比较用方差分析.  $P < 0.05$  为有显著性差异。

## 2 结果

**2.1 大体观察** 门静脉高压组大鼠在剖腹后均观察到肝脏表面有明显结节形成,肝叶有变形和缩小. 均有明显的腹水形成,脾脏明显肿大。

**2.2 内毒素测定结果** 门静脉高压组大鼠体静脉血 ( $0.083 \pm 0.012$  EU/mL)、门静脉血 ( $0.126 \pm 0.012$  EU/mL)、腹水中的内毒素水平 ( $0.062 \pm 0.012$  EU/mL) 均较对照组 ( $0.046 \pm 0.009$  EU/mL) 明显升高. 各组与对照组之间有显著性差异 ( $P < 0.05$ ).

**2.3 细菌培养结果** 门静脉高压组肠系膜淋巴结的细菌检出率显著高于对照组 (85% vs 20%,  $P < 0.05$ ). 腹水中细菌的检出率门静脉高压组显著高于对照组 (41% vs 0,  $P < 0.01$ ).

**2.4 透射电子显微镜观察** 门静脉高压组大鼠的肠黏膜上皮细胞之间,黏膜上皮下方的固有层细胞之间. 沿着细胞之间呈密度基本一致的线条分布. 线条的粗细不尽相等,沿着细胞间隙的走向,呈弯曲或缠绕成不规则圈网状,镧颗粒也可以呈串珠样排列;在细胞间的各种连接处也可以见到镧颗粒沉淀. 如图 1-2 所示。

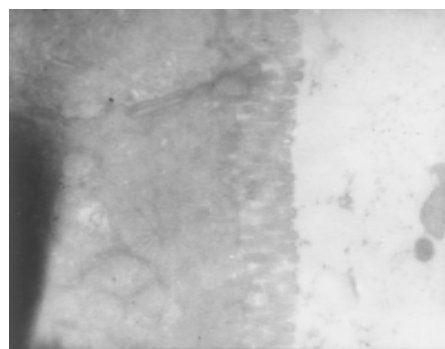


图1 透射电镜显示门静脉高压的大鼠肠黏膜上皮细胞的微绒毛较对照组变得短而且稀疏。

## 3 讨论

目前认为创伤和应激等情况下机体容易出现肠道黏膜通透性增高而导致细菌和内毒素移位. 近来一些文献报告门静脉高压症时机体也可以出现细菌和内毒素的移位,但是具体发生的机制没有深入的研究<sup>[11]</sup>. 另外,相当多的动物研究采用的是肝前门静脉结扎方法制成门静脉高压的动物模型,采用肝纤维化的方法制成门静脉高压动物模型

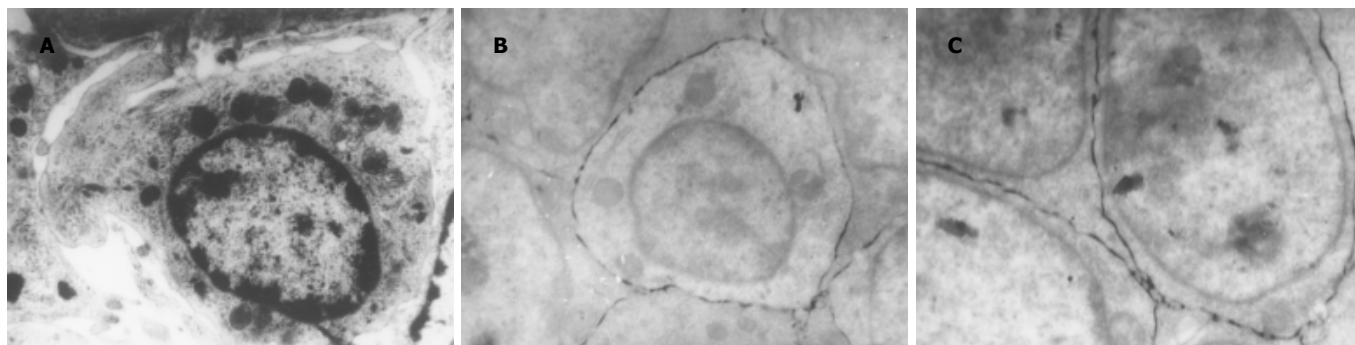


图2 透射电镜显示示踪剂镧在大鼠肠黏膜的情况. A: 对照组, 没有镧的沉积; B: 研究组, 镧沉积在上皮细胞之间和上皮细胞下面的固有层细胞之间; C: 研究组, 可见镧沉积在不同细胞连接处.

是否发生细菌和内毒素的移位, 目前的研究较少<sup>[12]</sup>. 因为采用CCl<sub>4</sub>制成的动物模型在腹水出现后继续用药容易造成动物死亡, 我们在研究中采用调整用药的办法, 研究中没有动物死亡. 我们的动物模型更加确切的模拟了人肝硬化门静脉高压症<sup>[13]</sup>.

我们的研究显示, 门静脉高压的大鼠门静脉、体静脉和腹水中内毒素水平平均高于对照组, 肠系膜淋巴结中的细菌检出率也高于对照组. 提示在肝硬化门静脉高压症的情况下确实可以发生细菌和及其组成成分(内毒素)的移位.

重金属镧目前是研究黏膜屏障的一种有效手段, 一般是在体外对黏膜屏障通透性进行研究. 与其他的一些研究肠黏膜屏障的方法比, 具有直接和简便的优点. 在接下来透射电镜下的观察发现, 镧沉积在上皮细胞之间以及上皮细胞下面的固有细胞层, 因为镧的直径为4 nm, 正常情况下不能通过细胞和细胞间隙, 如果已经通过, 说明其通透性明显升高. 本文是首次报道在肝硬化门静脉高压症时肠道黏膜通透性变化的研究. 本研究显示: 肝硬化门静脉高压时肠黏膜屏障的通透性增强主要在肠黏膜上皮细胞间, 而不是如某些报告所描述的上皮细胞本身的通透性增高. 接下来在上皮细胞层下面的固有层中也出现了镧的沉积, 而微静脉和微淋巴管均从固有层里收集液体进入循环, 所以说在肝硬化门静脉高压症时肠道黏膜的通透性升高在上皮细胞之间<sup>[14-15]</sup>.

肝硬化门静脉高压时肠黏膜屏障的通透性增强的原因有以下几个方面: (1) 门静脉高压症可能因为门静脉系统的压力升高引起肠壁的水肿和充血而引起通透性的增强. (2) 淋巴引流不畅导致末梢的微淋巴管压力升高, 引起细胞水肿, 导致上皮细胞之间的通透性增强. (3) 肠道淤血后肠管内的细菌过度繁殖. 通透性增强后使得活细菌或细菌的成分, 如内毒素或细菌DNA容易通过黏膜进入循环之中, 引起一系列病理生理改变<sup>[16-17]</sup>.

总之, 门静脉高压症时肠黏膜上皮细胞之间, 而不是上皮细胞本身的通透性增高, 可能是导致细菌和内毒素的移位的途径.

#### 4 参考文献

- 1 Thalheimer U, Triantos CK, Samonakis DN, Patch D, Burroughs AK. Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut* 2005;54:556-563
- 2 Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005;41:422-433
- 3 Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the Pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:353-372
- 4 姚国相, 沈忠义. 门静脉高压症时细菌移位与内毒素血症和一氧化氮之间关系的实验研究. *中华普通外科杂志* 2001;49:1567-1570
- 5 Chiva M, Guarner C, Peralta C, Llovet T, Gomez G, Soriano G, Balanzo J. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15:145-150
- 6 Sola R, Soriano G. Why do bacteria reach ascitic fluid? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:351-354
- 7 Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taura P, Fuster J, Garcia-Valdecasas JC, Lacy A, Suarez MJ, Rimola A, Rodes J. Bacterial translocation of enteric organisms in Patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001;34:32-37
- 8 Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infection in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993;18:353-358
- 9 Sheer TA, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Dis* 2005;23:39-46
- 10 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
- 11 Deitch EA. Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. *Arch Surg* 1989;124:699-701
- 12 Wiest R, Cadelina G, Milstien S, McCuskey RS, Garcia-Tsao G, Groszmann RJ. Bacterial translocation up-regulates GTP-cyclohydrolase I in mesenteric vasculature of cirrhotic rats. *Hepatology* 2003;38:1508-1515
- 13 Arendt T. Penetration of lanthanum through the main pancreatic duct epithelium in rats following exposure to infected human bile. *Dig Dis Sci* 1991;36:75-81
- 14 Runyon BA, Borzio M, Young S, Squier SU, Guarner C, Runyon MA. Effect of selective bowel decontamination with Norfloxacin on spontaneous bacterial Peritonitis, translocation, and survival in an animal model of cirrhosis. *Hepatology* 1995;21:1719-1724
- 15 Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, Pyles T, Childress CP, Ash SK. The Process of microbial translocation. *Ann Surg* 1990;212:496-511
- 16 Deitch EA, Bridge RM. Effect of stress and trauma on bacterial translocation from the gut. *J Surg Res* 1987;42:536-542
- 17 Cole GT, Seshan KR, Pope LM, Yancey RJ. Morphological aspects of gastrointestinal tract invasion by *Candida albicans* in the infant mouse. *J Med Vet Mycol* 1988;26:173-185



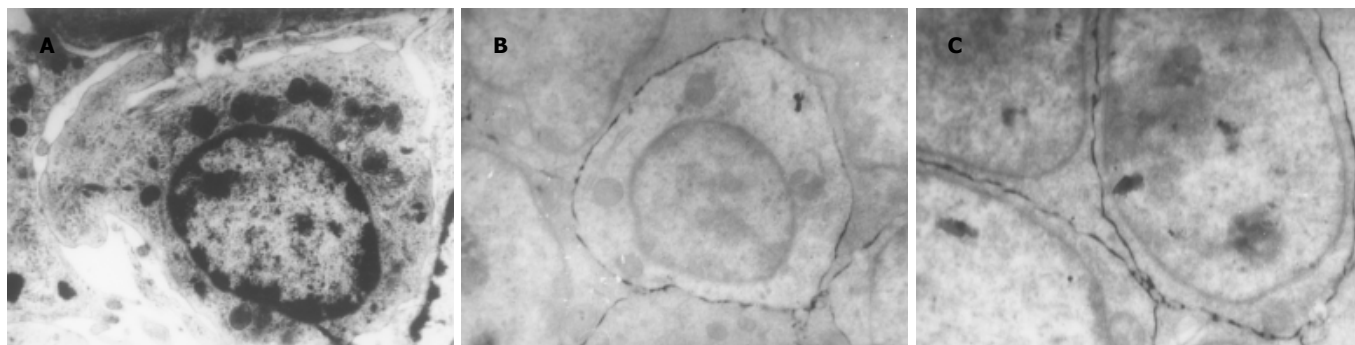


图2 透射电镜显示示踪剂镧在大鼠肠黏膜的情况. A: 对照组, 没有镧的沉积; B: 研究组, 镧沉积在上皮细胞之间和上皮细胞下面的固有层细胞之间; C: 研究组, 可见镧沉积在不同细胞连接处.

是否发生细菌和内毒素的移位, 目前的研究较少<sup>[12]</sup>. 因为采用CCl<sub>4</sub>制成的动物模型在腹水出现后继续用药容易造成动物死亡, 我们在研究中采用调整用药的办法, 研究中没有动物死亡. 我们的动物模型更加确切的模拟了人肝硬化门静脉高压症<sup>[13]</sup>.

我们的研究显示, 门静脉高压的大鼠门静脉、体静脉和腹水中内毒素水平平均高于对照组, 肠系膜淋巴结中的细菌检出率也高于对照组. 提示在肝硬化门静脉高压症的情况下确实可以发生细菌和及其组成成分(内毒素)的移位.

重金属镧目前是研究黏膜屏障的一种有效手段, 一般是在体外对黏膜屏障通透性进行研究. 与其他的一些研究肠黏膜屏障的方法比, 具有直接和简便的优点. 在接下来透射电镜下的观察发现, 镧沉积在上皮细胞之间以及上皮细胞下面的固有细胞层, 因为镧的直径为4 nm, 正常情况下不能通过细胞和细胞间隙, 如果已经通过, 说明其通透性明显升高. 本文是首次报道在肝硬化门静脉高压症时肠道黏膜通透性变化的研究. 本研究显示: 肝硬化门静脉高压时肠黏膜屏障的通透性增强主要在肠黏膜上皮细胞间, 而不是如某些报告所描述的上皮细胞本身的通透性增高. 接下来在上皮细胞层下面的固有层中也出现了镧的沉积, 而微静脉和微淋巴管均从固有层里收集液体进入循环, 所以说在肝硬化门静脉高压症时肠道黏膜的通透性升高在上皮细胞之间<sup>[14-15]</sup>.

肝硬化门静脉高压时肠黏膜屏障的通透性增强的原因有以下几个方面: (1) 门静脉高压症可能因为门静脉系统的压力升高引起肠壁的水肿和充血而引起通透性的增强. (2) 淋巴引流不畅导致末梢的微淋巴管压力升高, 引起细胞水肿, 导致上皮细胞之间的通透性增强. (3) 肠道淤血后肠管内的细菌过度繁殖. 通透性增强后使得活细菌或细菌的成分, 如内毒素或细菌DNA容易通过黏膜进入循环之中, 引起一系列病理生理改变<sup>[16-17]</sup>.

总之, 门静脉高压症时肠黏膜上皮细胞之间, 而不是上皮细胞本身的通透性增高, 可能是导致细菌和内毒素的移位的途径.

#### 4 参考文献

- 1 Thalheimer U, Triantos CK, Samonakis DN, Patch D, Burroughs AK. Infection, coagulation, and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut* 2005;54:556-563
- 2 Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005;41:422-433
- 3 Garcia-Tsao G, Wiest R. Gut microflora in the Pathogenesis of the complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:353-372
- 4 姚国相, 沈忠义. 门静脉高压症时细菌移位与内毒素血症和一氧化氮之间关系的实验研究. *中华普通外科杂志* 2001;49:1567-1570
- 5 Chiva M, Guarner C, Peralta C, Llovet T, Gomez G, Soriano G, Balanzo J. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15:145-150
- 6 Sola R, Soriano G. Why do bacteria reach ascitic fluid? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:351-354
- 7 Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taura P, Fuster J, Garcia-Valdecasas JC, Lacy A, Suarez MJ, Rimola A, Rodes J. Bacterial translocation of enteric organisms in Patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001;34:32-37
- 8 Caly WR, Strauss E. A prospective study of bacterial infection in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 1993;18:353-358
- 9 Sheer TA, Runyon BA. Spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Dis* 2005;23:39-46
- 10 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
- 11 Deitch EA. Simple intestinal obstruction causes bacterial translocation in man. *Arch Surg* 1989;124:699-701
- 12 Wiest R, Cadelina G, Milstien S, McCuskey RS, Garcia-Tsao G, Groszmann RJ. Bacterial translocation up-regulates GTP-cyclohydrolase I in mesenteric vasculature of cirrhotic rats. *Hepatology* 2003;38:1508-1515
- 13 Arendt T. Penetration of lanthanum through the main pancreatic duct epithelium in rats following exposure to infected human bile. *Dig Dis Sci* 1991;36:75-81
- 14 Runyon BA, Borzio M, Young S, Squier SU, Guarner C, Runyon MA. Effect of selective bowel decontamination with Norfloxacin on spontaneous bacterial Peritonitis, translocation, and survival in an animal model of cirrhosis. *Hepatology* 1995;21:1719-1724
- 15 Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, Pyles T, Childress CP, Ash SK. The Process of microbial translocation. *Ann Surg* 1990;212:496-511
- 16 Deitch EA, Bridge RM. Effect of stress and trauma on bacterial translocation from the gut. *J Surg Res* 1987;42:536-542
- 17 Cole GT, Seshan KR, Pope LM, Yancey RJ. Morphological aspects of gastrointestinal tract invasion by *Candida albicans* in the infant mouse. *J Med Vet Mycol* 1988;26:173-185

# 应用抑制性消减杂交技术克隆乙型肝炎病毒前-X蛋白反式激活基因

杨倩, 张黎颖, 成军, 洪源, 刘妍, 王琳, 董菁, 张树林

杨倩, 张黎颖, 成军, 洪源, 刘妍, 王琳, 董菁, 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、五科技攻关面上项目, No. 01MB135

通讯作者: 成军, 100039, 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 cj@genetherapy.com.cn

电话: 010-64481639 传真: 010-64281540

收稿日期: 2005-01-17 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)前-X基因反式激活基因差异表达的cDNA消减文库, 克隆前-X反式激活相关基因, 了解该段基因的可能生物学功能。

**方法:** 构建表达质粒pcDNA3.1(-)-前-X, 转染HepG2细胞, 以空载体pcDNA3.1(-)转染的HepG2细胞为对照; 提取转染后细胞的mRNA, 反转录为cDNA. 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多聚酶链反应(PCR), 将产物与pGEM-Teasy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:** 成功构建前-X基因反式激活基因差异表达的cDNA消减文库. 文库扩增后得到45个白色克隆, 进行菌落PCR分析, 均得到200-1 000 bp插入片段. 挑取含有插入片段的30个克隆进行测序, 并通过生物信息学分析获得13种已知功能基因序列。

**结论:** 应用SSH技术成功构建了前-X基因反式激活基因差异表达的cDNA消减文库. 该文库的建立为阐明该基因生物学功能提供理论依据。

杨倩, 张黎颖, 成军, 洪源, 刘妍, 王琳, 董菁, 张树林. 应用抑制性消减杂交技术克隆乙型肝炎病毒前-X蛋白反式激活基因. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1609-1611

http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1609.asp

## 0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)为3.2 kb部分双链的DNA病毒, 其基因组结构紧密, 特点为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. 1979年Gelibert *et al*首次报告了HBV DNA的全基因序列并确定4个主要的开放读码框架(ORF): P、前-S/S、前-C/C和X. 研究者对这一界定沿用至今. 关于这一紧密DNA结构中是否存在

新的编码序列, 一直没有进行系统的研究. 在1990年代曾有日本学者报道在X基因上游存在一段新的基因, 但并未对该基因的真实性及生物学功能进行研究<sup>[1]</sup>. 我们课题组通过分子流行病学研究、上游启动子活性鉴定, 确定了前-X基因存在的真实性, 并利用分子生物学技术对其功能进行了研究<sup>[2-4]</sup>. 为了研究HBV感染肝细胞之后, 前-X基因编码的前-X蛋白对于肝细胞的基因表达谱的影响, 我们应用抑制性消减杂交(SSH)技术对于表达和不表达前-X蛋白的肝母细胞瘤细胞系HepG2的基因表达类型进行了差异比较。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 肝母细胞瘤细胞系HepG2细胞及大肠杆菌DH5 $\alpha$ (本室保存), pcDNA3.1(-)真核表达载体(Invitrogen), FuGENE6转染试剂(Roche), TRIZOL提取试剂(LIFE TECHNOLOGIES), poly A T tract mRNA Isolation system III试剂盒(Promega), PCR-Select cDNA Subtraction试剂盒(Clontech), 50  $\times$  PCR Enzyme Mix, Advantage PCR Cloning试剂盒(Clontech), High Pure PCR Product Purification试剂盒(Promega), pGEM-Teasy载体(Promega). 真核表达质粒pcDNA3.1(-)-前X由本室构建. DNA序列测定由上海申友公司完成。

### 1.2 方法

**1.2.1 真核表达载体的细胞转染及mRNA提取** 用FuGENE6转染试剂将2  $\mu$ g pcDNA3.1(-)-前-X及pcDNA3.1(-)空载体分别转染35 mm平皿HepG2细胞, 48 h后收获细胞. 使用QuikPrePmico mRNA Purification试剂盒从HepG2细胞中直接提取重组表达质粒及空载体的HepG2细胞的mRNA, 经分光光度计分别进行定量分析。

**1.2.2 消减杂交文库的建立** 采用PCR-Select cDNA Subtraction Kit, 常规SSH方法按说明书进行: 以转染了重组表达质粒及空载体的HepG2细胞mRNA为模板逆转录合成双链cDNA(dscDNA), 并分别标记为Tester和Driver, dscDNA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dscDNA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 dscDNA进行杂交; 合并两种杂交产物后再与Driver dscDNA作第2次杂交; 然后将杂交产物做选择性PCR扩增, 使Tester dscDNA中特异性表达或高表达的片段得到特异性扩增。

**1.2.3 消减文库扩增及克隆分析** 扩增产物与pGEM-

Teasy 载体连接, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细菌, 在含氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 $^{\circ}$ C 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. 应用生物信息学将测得序列与 GenBank 数据库进行在线同源性分析 ([www.ncbi.nlm.gov/blast/blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.gov/blast/blast.cgi)).

## 2 结果

**2.1 mRNA 的定性、定量分析** 紫外分光检测显示, 转染了真核表达质粒及空载体的 HepG2 细胞提取 mRNA 分别为 3.2  $\mu$ g 和 3.6  $\mu$ g,  $A_{260}/A_{280} = 1.79$ . 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实 mRNA 质量完全满足进行消减杂交的要求.

**2.2 cDNA 消减文库消减效率的鉴定** 以消减及未消减 PCR 产物为模板, 用 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  $\mu$ L 进行电泳鉴定. 结果显示: 与未消减组 PCR 产物相比, 消减组 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).

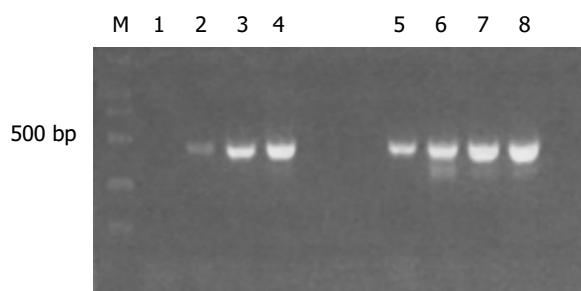


图1 消减效率分析结果. 1–4: 消减组, 引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33; 5–8: 未消减组, 引物为 G3PDH3'、5', PCR 循环次数分别为 18、23、28、33.

**2.3 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 85 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).

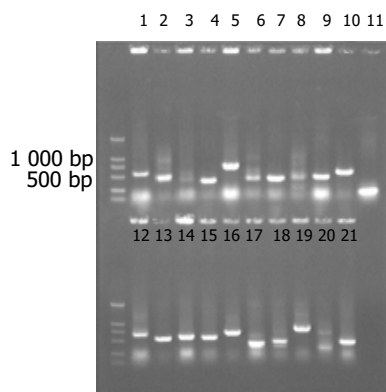


图2 部分克隆菌落 PCR 鉴定电泳图.

**2.4 cDNA 测序与同源性分析结果** 挑选 30 个克隆测序, 与 GenBank 数据库进行初步比较. 其中 13 个克隆均与已知基因的部分序列高度同源 (96–100%) (表 1).

表1 阳性克隆与 GenBank 已知功能基因同源序列比较结果

已知基因	相同克隆数	同源性
A174 线粒体	2	100%
细胞核核糖体 A1	1	95%
RNA 结合蛋白	3	94%
核糖体蛋白 L31	1	100%
NEDD5	1	99%
跨膜 4 超家族成员 1	2	100%
胎盘绒毛细胞表达的 mRNA	3	99%

## 3 讨论

SSH 技术是一种以抑制 PCR 反应为基础, 将标准化测试 cDNA 单链步骤和消减杂交步骤合为一体的技术<sup>[5–6]</sup>. 抑制消减杂交技术对高、低丰度的差异表达基因都能有效分离, 在分离稀少基因方面比 cDNA 消减杂交、代表性差异分析、mRNA 差异显示方法具有明显优势; 一次 SSH 反应可同时分离到几十到几百个差异表达基因<sup>[7–8]</sup>.

应用软件的蛋白质分析功能分析了前-X 基因的完全表达产物. 前-X 区编码多肽含有 5 个 C, 可能形成多个二硫键, 易于产生新的二级结构. 前-X 多肽含有 24 个极性氨基酸, 形成一个亲水功能域, 可能影响到整个蛋白的空间构象. 根据针对前-X 多肽的氨基酸组成分析, 发现该区域含有多个 S, 可能是磷酸化的重要区域, 与细胞内信号转导有关. 我们利用 SSH 技术分别对前-X 和全-X 对人肝癌细胞系基因表达谱的改变进行了研究, 力图阐述这个新基因的功能. 成功构建前-X 基因真核表达质粒, 转染 HepG2 细胞, 利用 SSH 技术对差异性表达基因进行同源性分析后发现, 上调表达基因包括核糖体, 转膜蛋白等<sup>[9–10]</sup>. 转膜蛋白参与肿瘤细胞的转移和细胞间的黏附. 上调表达胎盘绒毛细胞中的 mRNA, 有 3 个相同克隆, 是否与 HBV 垂直传播有关, 值得进一步探讨.

NEDD5 是近年来发现的哺乳动物 septin 蛋白家族中的一个成员, 具有 GTPase 酶活性. 类似于酵母和果蝇的 septin 蛋白, 与细胞浆移动移动相关. Kinoshita *et al*<sup>[11]</sup> 研究发现鼠 NEDD5 基因编码一个 41.5 ku 的 GTP 酶, 类似于酵母及果蝇的细胞浆移动必须蛋白-septin 蛋白. 在细胞分裂间期和后期, NEDD5 聚集成纤维状或粒状结构, 有赖于细胞的生长状态. 富含 NEDD5 的纤维可被微注射 GTP $\gamma$ S 和缺乏 GTP 结合活性的 NEDD5 突变体破坏, 提示 GTP 的水解需要 NEDD5 的集合装配. 富含 NEDD5 的纤维也可以与肌动蛋白束和局灶性黏附复合物相互作用, 也可被细胞松弛素 D、C3 毒素及血清饥饿所破坏, 认为 NEDD5 在细胞间期与基于肌动蛋白的细胞骨架系统由功能性相互作用. 从细胞分裂后期至末期, NEDD5 则聚积在收缩环附

近,直到最后形成中间体.Vega *et al*<sup>[12]</sup>研究神经细胞中NEDD5与胞外复合物之间的关系,以及NEDD5在分化的pc12细胞中的突触生长中的角色发现,当应用神经生长因子诱导分化时,内源性NEDD5在未分化的pc12细胞中富集在核周,成放射状向外形成锥形.NEDD5与其他septin蛋白家族成员相同,可与小鼠脑细胞裂解物中的胞外复合物及微管蛋白共沉淀.GTPase缺陷的NEDD5过表达可促使PC12细胞异常突触的生长.这一结果表明NEDD5与其他septin蛋白一起共同与囊泡外复合物及微管蛋白相互作用,推测NEDD5的GTPase活性可能是神经突生长的重要因素.总之,NEDD5可能为神经细胞极化所必需,也许在神经细胞分化过程中通过促进囊泡外复合物的功能起作用.目前HBV感染后只有在引起肝性脑病时患者才会出现神经精神症状,但是在之前有没有神经系统的病变基础,目前很少有人报道,而且肝性脑病的发生机制目前仍然处于研究当中,本文发现前X-蛋白可以激活NEDD5基因的表达,提示有必要对肝性脑病的发病机制,以及HBV感染者的神经系统是否存在潜在的或前期的病变进行研究.

总之,本研究对于前-X基因的分析鉴定,为前-X和全-X功能的研究,为进一步了解HBV的发病机理提供了新的方向.

#### 4 参考文献

- 1 Takahashi K, Akahane Y, Hino K, Ohta Y, Mishihiro S. Hepatitis B virus genomic sequence in the circulation of hepatocellular carcinoma patients: comparative analysis of 40 full-length isolates. *Arch Virol* 1998;143:2313-2326
- 2 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
- 3 杨倩, 董菁, 成军. 乙型肝炎病毒基因组前-X-S基因区的分子流行病学研究. 世界华人消化杂志 2004;12:785-789
- 4 董菁, 杨倩, 成军. 乙型肝炎病毒基因组前-X区的分子流行病学研究. 世界华人消化杂志 2004;12:794-800
- 5 Yokota N, Mainprize TG, Taylor MD, Kohata T, Loreto M, Ueda S, Dura W, Grajkowska W, Kuo JS, Rutka JT. Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization. *Oncogene* 2004;23:3444-3453
- 6 Majda BT, Meloni BP, Rixon N, Knuckey NW. Suppression subtraction hybridization and northern analysis reveal upregulation of heat shock, trkB, and sodium calcium exchanger genes following global cerebral ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 2001;93:173-179
- 7 Su ZZ, Kang DC, Chen Y, Pekarskaya O, Chao W, Volsky DJ, Fisher PB. Identification of gene products suppressed by human immunodeficiency virus type 1 infection or gp120 exposure of primary human astrocytes by rapid subtraction hybridization. *J Neurovirol* 2003;9:372-389
- 8 Kiss C, Nishikawa J, Dieckmann A, Takada K, Klein G, Szekely L. Improved subtractive suppression hybridization combined with high density cDNA array screening identifies differentially expressed viral and cellular genes. *J Virol Methods* 2003; 107:195-203
- 9 Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, Hattori N, Taki T, Hasegawa H, Satoh S, Kobayashi N, Yamaoka Y, Miyake M. Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *Br J Cancer* 2003;89:158-167
- 10 Solmi R, De Sanctis P, Zucchini C, Ugolini G, Rosati G, Del Governatore M, Coppola D, Yeatman TJ, Lenzi L, Caira A, Zanotti S, Taffurelli M, Carinci P, Valvassori L, Strippoli P. Search for epithelial-specific mRNAs in peripheral blood of patients with colon cancer by RT-PCR. *Int J Oncol* 2004;25: 1049-1056
- 11 Kinoshita M, Kumar S, Mizoguchi A, Ide C, Kinoshita A, Haraguchi T, Hiraoka Y, Noda M. Nedd5, a mammalian septin, is a novel cytoskeletal component interacting with actin-based structures. *Genes Dev* 1997;11:1535-1547
- 12 Vega IE, Hsu SC. The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells. *Neuroreport* 2003;14:31-37

编辑 王谨晖 审读 张海宁

## 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.

# 乙型肝炎病毒前-X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. 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-X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-X基因, 将前-X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-X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M<sub>r</sub>27 000。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-X蛋白, 对于研究HBV的前-X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-X在大肠杆菌中的表达和纯化. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1612-1614

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1612.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<sup>[1]</sup>。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)<sup>[2-3]</sup>。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<sup>[4-12]</sup>。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X基因序列的理论<sup>[13-14]</sup>, 并重新确定了X区启动子的位置, 提出全X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X基因序列的真实存在, 特别是关于前X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X是一种编码蛋白, 那么对前X编码基因的真实性将更有说服力, 这将改写HBV DNA编码基因序列研究的历史。

由于前X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-blotting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X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, T<sub>4</sub>DNA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-X的PCR扩增** 根据报道的前X蛋白基因序列<sup>[13]</sup>, 设计序列特异性引物P1、P2, P1: GGATCCATGGGGCTTGGCTATTGG, P2: AAGCTTGGAAAGGAGGTGTATTC, 在P1-5'端含有BamHI酶切位点, P2-5'端含有HindIII酶切位点。利用pcDNA3.1(-)-前X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HindIII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HindIII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-X 的序列分析结果 应用 PCR 技术扩增得到了乙型肝炎病毒 DNA 中前-X 序列,含 168 nt,编码产物为 56 aa(图1)。

```

ATG GGG CTT GGC TAT TGG CCA TGG CCG CAT GCG TGG AAC CTT TGT GGC TCC
M G L G Y W P S P H A W N L C G S
TCT GCC GAT CCA TAC TGC GGA ACT CCT AGC AGC TTG TTT TGC TGC CAG CCG
S A D P Y C G T P S S L F C S Q P
GTC TGG AGC AAA ACT TAT CCG AAC CGA CAA CTC TGT TGT CCT CTC TCG GAA
V W S K T Y R N R Q L C C P L S E
ATA CAC CTC CTT TCC
I H L L S

```

图1 乙型肝炎病毒前-X 基因及其编码产物序列。

2.2 重组前X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,  $M_r$  27 000,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  $M_r$  27 000 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<sup>[15]</sup>。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。我们课题组<sup>[13-14]</sup>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,在 X 区之前发现还存在一个 ORF,长度 168 bp,编码 56 aa,  $M_r$  6 200,有15个疏水氨基酸,24个极性氨基酸。应用 DNASIS 软件的蛋

白分析功能分析了前-X 基因的完全表达产物,前-X 区较以往认为的 X 蛋白多出一个小的亲水区。前-X 区编码多肽含有5个C,可能形成多个二硫键,易于产生新的二级结构。前-X 多肽含有24个极性氨基酸,形成一个亲水功能域,可能影响到整个蛋白的空间构象。根据针对前-X 多肽的氨基酸组成分析,发现该区域含有多个S,可能是磷酸化的重要区域,与细胞内信号转导有关。我们应用2种方法来证实前X的真实存在。其一是在 GenBank 中选择不同血清型的 HBV 基因组全序列,应用 DNASIS 软件重新确定其 ORF,结果发现甘人宝 *et al*<sup>[15]</sup> 发现的 HBV 基因组序列中存在前-X 区 ORF。其他亚型不表达前-X 区多是由于前-X 区起始密码子 ATG 发生替换突变所致,其他亚型的克隆表现为 TTG(X04615),或 CTG(克隆 X02763、Z35717 和 G329640)。另一 *adr* 亚型克隆 D12980 保留了第一起始密码子 ATG,但在两个起始密码子之间由于发生替换突变,而终止了前-X 多肽的表达。初步推定前-X 区起始密码子处发生的替换突变可能是血清型特异性的。其二是利用 NIH 网站的 BLAST 软件,将前-X 区编码氨基酸序列输入后进行同源性搜索,结果发现在已经存入 GenBank 中的序列中,有19个克隆中含有的氨基酸序列与本研究获得的序列有较高的同源性,分别为来自2组报道,其中2个克隆是来自同一序列的不同解释,另17个克隆均来自日本学者对 HCC 患者体内存在的 HBV 基因组分析所获得。将克隆的氨基酸序列与18例相关克隆比较,发现同源性为85-94%。这些克隆的共性为:第一,均为 *adr* 亚型;第二,均克隆自 HCC 患者。综合上述两种方法证实的结果,可以肯定前-X 区是实际存在的。

从蛋白水平和临床资料中证实前X是一种编码蛋白,是支持该理论的关键点所在,由于前X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X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<sup>[16]</sup>。pET32a+ 含有一段辅助蛋白基因,该辅助蛋白包括 Trx, His 和 S 等标签序列,有助于提高目的蛋白的表达效率,即对表达产物进行纯化和检测,  $M_r$  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

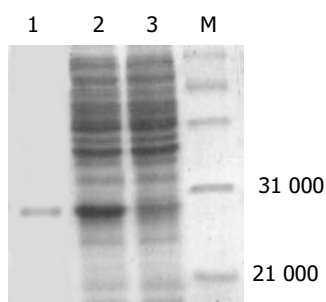


图2 前X融合蛋白的SDS-PAGE凝胶电泳分析。M: Marker; 1: 纯化后的包涵体; 2: 诱导的前X融合蛋白裂解液; 3: 未诱导的前X融合蛋白裂解液。

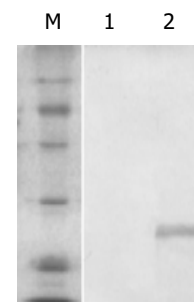


图3 前X融合蛋白的蛋白印迹试验。M: Marker; 1: 未诱导的前X融合蛋白裂解液; 2: 诱导的前X融合蛋白裂解液。

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  $M_r$  27 000, 这与预测的前X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X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<sup>[17]</sup>, 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.

本研究在基因水平已证实前X区存在前提下, 成功构建了前X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X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X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, 皇甫竞坤, 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, 皇甫竞坤, 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, 刘妍, 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, 皇甫竞坤, 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, 皇甫竞坤, 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, 皇甫竞坤, 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 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 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 刘妍, 董菁, 皇甫竞坤, 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-S区编码基因的界定. *世界华人消化杂志* 2003;11:1091-1096
- 14 杨倩, 董菁, 成军, 刘妍, 洪源, 王建军, 王琳, 张树林. 乙型肝炎病毒基因组中前-X-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;28:765-767
- 15 甘人宝, 储美谨, 沈绿萍, 钱苏雯, 李载平. 克隆的adr亚型乙型肝炎病毒(pADR-1)的核苷酸顺序. *中国科学B辑* 1986;5:55-65
- 16 Swartz JR. Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:195-201
- 17 Kiefhaber T, Rudolph R, Kohler HH, Buchner J. Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N Y)* 1991;9:825-829

编辑 王谨晖 审读 张海宁

# CT灌注成像对终末期肝病肝移植后肝脏双期灌注量的监测

黄勇慧, 杨建勇, 李家平

黄勇慧, 杨建勇, 李家平, 中山大学第一附属医院放射科介入专科  
广东省广州市 510080  
国家自然科学基金资助项目, No. 30270417  
通讯作者: 杨建勇, 510080, 广东省广州市中山二路 58 号, 中山大学第一附属医院放射科介入专科.  
收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-02-26

## 摘要

**目的:** 通过 CT 灌注成像明确肝移植后早期肝脏血流动力学的变化规律, 确定肝移植后围手术期的动、门脉灌注量变化范围.

**方法:** 选取 11 例因终末期肝病行肝移植手术且无并发症的病例, 于术后 12-20 d 行 CT 灌注成像扫描, 获得其肝动脉灌注量(HAP)、灌注指数(HAI)、门静脉灌注量(HPP)、总灌注量(TLP)、动脉峰值到达时间(PT)等指标. 并与 18 名无肝病的健康人相应指标进行对比.

**结果:** 肝移植组和对照组的灌注参数分别是: 肝动脉灌注量:  $0.512 \pm 0.220$  和  $0.275 \pm 0.171$  L/(min · L); 门静脉灌注量:  $1.534 \pm 0.479$  和  $1.141 \pm 0.482$  L/(min · L); 肝总灌注量:  $2.046 \pm 0.458$  L/(min · L) 和  $1.416 \pm 0.544$  L/(min · L); 肝动脉灌注指数:  $HPI 25.65 \pm 10.92\%$  和  $27.22 \pm 19.41\%$ . 对比对照组肝移植组肝动脉、门静脉和总灌注量明显上升 ( $P = 0.003$ ,  $0.042$  和  $0.003$ ). 灌注指数变化不明显.

**结论:** 在慢性终末期肝病肝移植后早期, 肝动脉、门静脉和总灌注量呈现明显上升的趋势. 肝移植后血管并发症的 CTP 诊断标准应根据这一变化趋势来制定.

黄勇慧, 杨建勇, 李家平. CT 灌注成像对终末期肝病肝移植后肝脏双期灌注量的监测. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1615-1617  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1615.asp>

## 0 引言

近年来, 临床肝移植获得了巨大的进展. 肝移植术后最长存活者已达 27 a. 目前原位肝移植 (OLT) 已被公认为终末期肝病的最有效治疗手段<sup>[1-2]</sup>. 肝移植后血管并发症是肝移植术后最严重的并发症之一, 它是一种导致移植肝功能丧失和患者死亡的直接原因. 影像监测肝移植后肝脏动静脉血流量是预防移植后血管并发症的有效途径. 超声频谱检测是传统的监测手段, 但存在稳定性和阳性预测价值不理想的缺陷. 对及时发现和治疗血管并发症不利. CT 灌注成像 (CTP) 作为功能影像学的一种新技术, 经 Miles *et al* 和 Blomley *et al* 证明他是评价肝灌注的可靠方法<sup>[3-4]</sup>. 但相对于使用该方法对其他肝脏病变的研究, 目前对肝

移植后肝脏血流动力学进行的探讨仍有限. 我们从临床角度使用 CT 灌注成像技术对肝移植后肝脏灌注变化的趋势进行了初步地分析和探讨.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 研究组: 选取我院 2002-11/2004-05 接受肝移植的患者 11 例, 均为男性, 年龄 33-54 岁, 平均  $39 \pm 5$  岁. 术前 6 例为肝炎后肝硬化失代偿期病例, 5 例为肝癌合并肝硬化, 患者术前 CT 检查均显示存在中度到重度的脾脏增大. 供肝为缺血肝脏, 冷缺血期用 UW 液保存 3-5 h (平均  $3.2$  h), 热缺血时间为 5-10 min (平均  $7$  min). 术中均未采用缺血预处理手段. 患者术后进 ICU 给予机械通气 (2-12 d), 通气模式为容量控制 (A/C), 潮气量为 8-10 mL/kg, 频率为每分钟 12-16 次, 吸氧浓度为 40-60%. 术后通过肝功能和超声监测明确诊断为无早期移植后并发症的患者. 对实验组病例进行灌注成像扫描的时间限制在术后 12-20 d, 扫描前 2 d 内未使用过血管活性药物. 对照组: 18 例无肝病史, 肝功能、肝炎系列无异常、无服用肝损害药物史的临床志愿者或无相关疾病患者, 年龄 28-53 岁, 平均  $41 \pm 7$  岁, 男 12 例, 女 6 例.

**1.2 方法** 采用东芝 X-press/SX 单层螺旋 CT 行常规全肝平扫后, 以肝门部作为靶层面, 用预设定好的肝脏 Perfusion 程序扫描. 从注射造影剂后的 7 s 到 39 s 行每 2 s 一层的连续扫描, 接着使用每 7 s 一层的连续扫描延续至第 94 s. 其间嘱患者尽量屏气, 但无法屏气时采用频浅呼吸. 扫描参数为 120 KV, 200 mA/s, 层厚 10 mm. 用 Envision CT 型高压注射器, 18G 或 19G 静脉头皮针, 经前臂静脉一次性快速团注优维显 300 35-45 mL, 速度 5-7 mL/s, 于 7 s 内注完. 每次扫描中, 肝、脾、动脉、门静脉的衰减均以 HU 测量出来, 为了测量肝、脾衰减, 使用不规则兴趣区既包括脏器实质且又不含大的血管. 对于主动脉和门静脉的测量不接近血管边缘, 避免部分容积效应. 根据相应地斜率法肝脏灌注量计算公式对肝脏双期灌注参数进行计算. 其中由肝动脉供给的血量为肝动脉灌流量 (HAP). 由门静脉供给肝的血量为门静脉灌流量 (HPP). 二者之和即为肝总灌流量 (TLP). 从器官开始增强到动脉期第一次增强峰值之间的时间为动脉峰值到达时间 (PT).

**统计学处理** 所有数据均用统计软件包 SPSS11.0 处理, 对两组数据之间的比较使用 Student-*t* 检验.  $P < 0.05$  为组间存在显著差异.



## 2 结果

肝动脉灌注量、门静脉灌注量、肝总灌注量、肝动脉灌注指数、动脉峰值到达时间的统计描述检验以及变化趋势见表1及图1A-D。

表1 肝移植术后与正常人肝脏灌注情况的统计描述和检验

分组和分类	灌注量(L/(min · L))		范围(L/(min · L))	
	均值	标准差	最大值	最小值
对照组				
肝动脉	0.275	0.171	0.700	0.040
门静脉	1.141	0.482	2.010	0.510
总灌注量	1.416	0.544	2.460	0.740
肝动脉灌注指数	0.272	0.194	0.620	0.060
动脉峰值到达时间	9.317	0.791	8.020	10.280
研究组				
肝动脉	0.512	0.220 <sup>b</sup>	0.950	0.260
门静脉	1.534	0.479 <sup>a</sup>	2.600	0.940
总灌注量	2.046	0.458 <sup>b</sup>	3.020	1.410
肝动脉灌注指数	0.257	0.109	0.450	0.140
动脉峰值到达时间	10.518	0.877	9.500	11.500

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照组。

## 3 讨论

肝移植后血管并发症一种导致移植肝脏功能丧失和患者死亡的直接原因。有动物实验表明, HAT形成后, 如果缺血时间超过60 min, 其术后生存率将由90%下降到40%<sup>[5]</sup>。病理证实早期移植肝内没有自然串联成网的动脉侧支循环。任何因素持续影响动脉或门静脉系统的血供, 就会致肝移植的失败。可见肝移植后肝实质微循环状况是肝移植

后移植肝存活的最重要的因素之一, 但终末期肝病肝移植后肝脏双期血流灌注量与正常人群存在变化。明确这种变化以及转归规律, 对及时发现移植后肝脏供血不足有重要意义。进而可以达到有效防止循环障碍导致的移植肝不可逆损害, 避免再次肝移植的目的。

Bolognesi *et al*<sup>[6]</sup>采用彩色多普勒超声监测肝移植术后病例。基于彩超的局限性, 目前对肝动脉血流量尚很难作出准确的定量。Bader *et al*<sup>[7]</sup>采用CTP对肝移植术后病例进行血流灌注测量。但二者取得的结论不尽一致。本研究在病例选择方面, 改进了Bader的方法, 强调了术前病例肝硬化病史, 而未将仅存在肝肿瘤和其他原因引起的非慢性肝功能衰竭病例列入研究组。因为研究表明急性肝功能衰竭的病例和慢性肝功能衰竭病例在病程发展以及术后转归的病理生理学机制上存在较大区别。肝移植前高血流动力学状态越明显, 肝移植后血流动力学异常的程度越大<sup>[8-9]</sup>。另外本研究还强调了对移植肝脏冷、热缺血时间和缺血预处理措施的限制, 因为研究表明冷、热缺血时间等导致的再灌注损伤的直接后果就是肝脏微循环障碍<sup>[10]</sup>。

本研究结果显示肝动脉与门静脉血流量增加, 动脉灌注指数与动脉峰值到达时间变化不明显。我们认为其变化存在以下理论依据: (1) 目前大多数研究认为慢性肝病肝移植后内脏血流量, 包括脾脏和肠道血流量将会增加, 因此门静脉血流量的增加存在合理的依据<sup>[11]</sup>。术前慢性肝病存在的高动力循环状态在术后将维持一段时间也是造成门静脉血流量增加的一个重要原因<sup>[8-9]</sup>。(2) 导致肝动脉灌注增加的关键因素在于肝的某些代谢物(特别是腺苷)对动脉的扩张作用。研究表明肝动脉对上述代谢物存在较高的反应能力, 这是调节肝动脉灌注量的一个重要因素。而门静脉对上述产物的反应不敏感, 故腺苷并非导致门静脉灌注

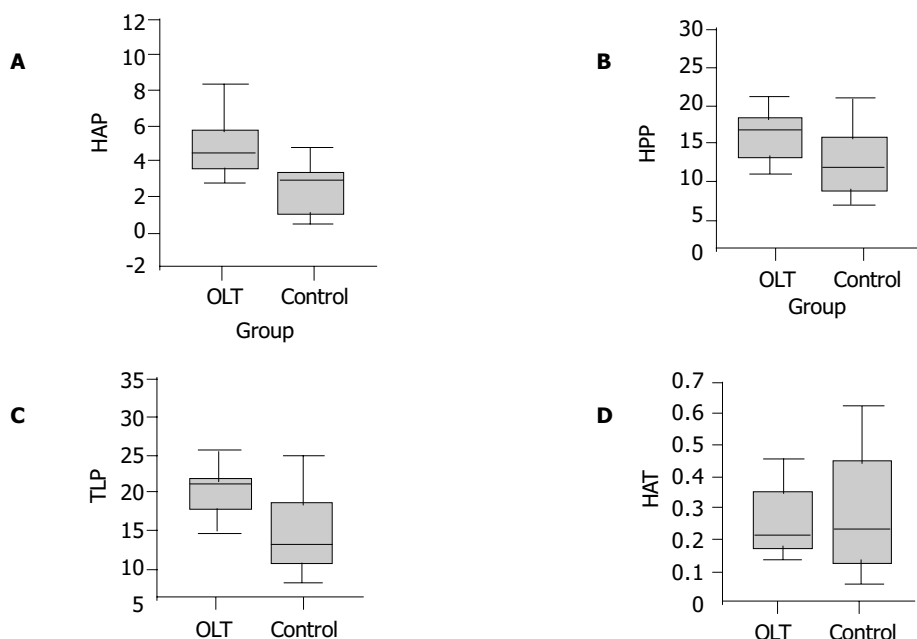


图1 灌注量及灌注指数变化特征。A: 肝动脉; B: 门静脉; C: 总灌注量; D: 肝动脉灌注指数。

量增加的主要因素. 肝移植后由于缺血再灌注过程会导致腺苷的堆积, 在术后一定时间内会导致肝动脉扩张, 降低肝动脉阻力, 使肝动脉灌注量增加<sup>[11-12]</sup>. (3) 由于肝脏动、门脉血流量变化存在相互影响的“缓冲器效应”(Buffer response). 当门静脉血流增加时, 血管活性物质减少, 动脉血流也会减少. 但这种代偿效应在血流量上并非等值的, 也就是说门静脉灌注量减少50%时, 肝动脉增加远不及门静脉血流量的50%, 反之亦然. 本研究测得结果来看, 门静脉灌注量增加幅度并非特别显著, 在门静脉少量增加的前提下, 其不足以消除移植缺血过程堆积的腺苷. 故测得肝动脉灌注量增加是合理的. (4) 在动脉灌注指数与动脉峰值到达时间不变的基础上, 总灌注显著增加的现象是肝移植后移植肝脏具备保护作用的适应性改变, 提示肝移植后移植肝脏在各种因素影响下处于一种相对平衡的高循环代谢状态. 但对于肝移植后这种血流灌注变化趋势能够维持到术后多长时间有待进一步研究探明.

本研究提示: 因为在肝移植后短期内肝动脉灌注相对正常人存在增加的趋势, 以正常人为标准的灌注量并不能完全满足移植后肝脏的代谢需要. 有报道以正常人肝动脉灌注量  $0.16 \pm 0.02 \text{ L}/(\text{min} \cdot \text{L})$  为标准, 动脉狭窄度需大于50%时, 方能显示出灌注量上的差异, 这意味着CTP在诊断肝动脉狭窄与血管造影形态学判断上存在一定差异. 按照正常人标准会产生较多的假阴性病例<sup>[13]</sup>. 故在肝移植后肝脏血流动力学恢复至正常人水平的一段时间内, 根据相应肝移植后肝脏灌注指标制定肝移植后血管并发症的诊断标准才是科学的. 我们曾对1例肝移植后17 d的动脉狭窄病例行动脉内球囊扩张后进行CTP测量, 我们发现虽然动脉狭窄程度已减轻至70%, 但动脉灌注量仅为0.0802, 小于同期无并发症灌注指标的95%可信区间下限值, 此病例术后肝功能恢复不理想. 可见对移植后肝动脉并发症进行诊断, 首先必须明确同期肝移植后的肝动脉灌注量范围, 并以此建立依据. 我们目前的研究为进一

步制定合理的肝移植后动门脉灌注量诊断标准奠定了一定的基础.

**致谢:**感谢陈伟教授、庄文副教授对本论著的指导、支持和帮助.

#### 4 参考文献

- 1 王宏光, 管文贤, 窦科峰, 李开宗. 活体肝移植的伦理学问题. *医学与哲学* 2001;22:12-14
- 2 夏穗生. 我国肝移植现状. *世界华人消化杂志* 1999;7:645-646
- 3 Miles KA, Griffiths MR, Perfusion CT. A worthwhile enhancement? *Br J Radiol* 2003;76:220-231
- 4 Blomley MJ, Coulden R, Dawson P, Korman M, Donlan P, Bufkin C, Lipton MJ. Liver perfusion studied with ultrafast CT. *J Comput Assist Tomogr* 1995;19:424-433
- 5 向国安, 黎一鸣, 秦兆寅. 肝动脉血供在肝脏移植中的意义. *陕西医学杂志* 1996;25:186-187
- 6 Bolognesi M, Sacerdoti D, Bombonato G, Merkel C, Sartori G, Merenda R, Nava V, Angeli P, Feltracco P, Gatta A. Change in portal flow after liver transplantation: effect on hepatic arterial resistance indices and role of spleen size. *Hepatology* 2002;35:601-608
- 7 Bader TR, Herneth AM, Blaicher W, Steininger R, Muhlbacher F, Lechner G, Grabenwoger F. Hepatic perfusion after liver transplantation: noninvasive measurement with dynamic single-section CT. *Radiology* 1998;209:129-134
- 8 顾勤, 朱章华, 葛敏. 终末期肝衰竭患者肝移植术后血流动力学变化. *中国危重病急救医学* 2002;14:432-433
- 9 Navasa M, Feu F, Garcia-Pagan JC, Jimenez W, Llach J, Rimola A, Bosch J, Rodes J. Hemodynamic and humoral changes after liver transplantation in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1993;17:355-360
- 10 张文海, 洪生明, 高长利. 鼠肝冷保存与移植肝原发性无功能的研究. *新消化病学杂志* 1996;4:432-433
- 11 Sacerdoti D, Merkel C, Bolognesi M, Amodio P, Angeli P, Gatta A. Hepatic arterial resistance in cirrhosis with and without portal vein thrombosis: relationships with portal hemodynamics. *Gastroenterology* 1995;108:1152-1158
- 12 Richter S, Mucke I, Menger MD, Vollmar B. Impact of intrinsic blood flow regulation in cirrhosis: maintenance of hepatic arterial buffer response. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:454-462
- 13 沈文, 尹建中, 陈光, 王鹏辉, 祁吉. 多层螺旋CT对肝移植术后肝动脉狭窄肝灌注的研究. *临床放射学杂志* 2003;22:482-485

编辑 张海宁

# 胃肠因素对成人乳糖不耐受的作用

钟燕, 黄承钰, 阴文娅

钟燕, 黄承钰, 阴文娅, 四川大学华西公共卫生学院营养与食品卫生教研室 四川省成都市 610041  
国家自然科学基金资助项目, No. 30271126  
通讯作者: 黄承钰, 四川省成都市人民南路3段17号, 四川大学华西公共卫生学院营养与食品卫生教研室.  
电话: 028-85501170 传真: 028-85501170  
收稿日期: 2005-04-11 接受日期: 2005-05-14

## 摘要

**目的:** 研究胃肠因素对成人乳糖酶缺乏者出现不同程度乳糖不耐受症状的作用。

**方法:** 乳糖酶缺乏者(呼气  $H_2$  浓度  $>20 \mu\text{mol/mol}$ ) 43 例, 根据乳糖不耐受症状评分结果分为乳糖吸收不良(lactose malabsorption, LM)组和乳糖不耐受(lactose intolerance, LI)组; LI 组根据有无腹泻症状又分为轻度(LIa)及重度(LIb)乳糖不耐受组。采用双标记稳定同位素  $^{13}\text{C}$ -乳糖/ $^2\text{H}$ -葡萄糖负荷试验计算受试者的乳糖消化指数、乳糖消化量和胃排空时间, 并采用  $H_2$  呼气试验分析受试者摄入一定量乳糖之后的口-结肠转运时间、累积  $H_2$  呼出量。

**方法:** LM 组的乳糖消化指数和乳糖消化量( $0.47 \pm 0.15$  和  $11.8 \pm 3.9 \text{ g}$ ) 显著高于 LI 组( $0.34 \pm 0.14$  和  $8.5 \pm 3.5 \text{ g}$ ) ( $P = 0.008$ ), 胃排空时间和口-结肠转运时间( $44.0 \pm 14.4 \text{ min}$  和  $105 \text{ min}$ ,  $60-120 \text{ min}$ ) 显著长于 LI 组( $33.9 \pm 12.2 \text{ min}$  和  $60 \text{ min}$ ,  $30-90 \text{ min}$ ) ( $P = 0.021$  和  $P = 0.003$ ); 乳糖消化指数与口-结肠转运时间之间呈显著正相关( $r = 0.30$ ,  $P = 0.048$ )。而 LIa 组和 LIb 组之间以上各项指标均无显著性差异。

**结论:** 乳糖消化能力(主要受乳糖酶活性决定)、胃排空时间和口-结肠转运时间是引起乳糖酶缺乏者出现 LI 症状的主要原因, 但不是引起不同严重程度 LI 症状产生的主要原因, 这种症状差异的产生可能与其他因素, 如结肠代谢因素的作用有关。

钟燕, 黄承钰, 阴文娅. 胃肠因素对成人乳糖不耐受的作用. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1618-1620  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1618.asp>

## 0 引言

原发性乳糖酶缺乏(primary lactose deficiency, LD) 在世界范围内普遍存在, 与人类健康密切相关。根据 LD 者摄入乳糖之后是否出现腹部不适症状, 又可分为乳糖不耐受(lactose intolerance, LI) 和乳糖吸收不良(lactose malabsorption, LM) 两种情况。我国 LD 和 LI 的发生率分为 75-95% 和 85% 左右, 成为限制人们摄入乳制品的一个重要因素<sup>[1]</sup>。

流行病学显示, 大多数 LD 者可以耐受一定量的乳

糖, 如摄入 5-10 g 乳糖不会发生不耐受症状。不同个体对乳糖的耐受能力不完全相同, 在同样条件下摄入等量乳糖后是否出现 LI 症状及其严重程度有很大差异<sup>[2-3]</sup>。长期以来, 由于受研究方法的限制, 人们对 LI 发生的相关影响因素研究很难深入。本研究采用本课题组新近发展的双标记稳定同位素  $^{13}\text{C}$ -乳糖/ $^2\text{H}$ -葡萄糖负荷试验技术, 从小肠黏膜乳糖酶活性、乳糖吸收量、胃肠转运时间等方面对可能影响 LI 症状产生的胃肠道因素进行研究。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 乳糖酶缺乏者(口服 25 g 乳糖之后呼气  $H_2$  浓度值与空腹基础浓度值之差  $\Delta H_2 >20 \mu\text{mol/mol}$ ) 43 例, 男 21 例, 女 22 例, 22-56 岁。实验前 3 d 开始禁止食用富含  $^{13}\text{C}$ -乳糖的食物, 如蔗糖、玉米、菠萝及其制品。乳糖负荷试验前 1 d 晚餐集中进食, 避免食用牛奶及其制品、豆制品、葱、蒜及其他富含膳食纤维的食物; 试验前至少禁食 12 h, 试验开始后 2 h 内不能进食、饮水, 2 h 后可以饮水。 $H_2$  呼气仪(type 60 HP, 德国, 试验前调零并用  $96 \mu\text{mol/mol}$  标准  $H_2$  校正); 气相色谱/质谱联用仪(Finnigan MAT, Finnigan SSQ7000, 德国); HP5980 气相色谱仪(HP, 美国); 气相色谱/燃烧/同位素比质谱联用仪(IRMS, Finnigan MAT, 德国);  $\gamma$ -放免计数仪(ERIA Diagnostics Pasteur, 法国); 高速离心机(Eppendorf, 德国)。  $^{13}\text{C}$ -乳糖(荷兰乳制品研究所提供, 荷兰);  $6, 6-^2\text{H}$ -葡萄糖(Isotec 公司, 美国); 静脉留置针(Becton Dickinson GMBH, 德国);  $H_2$  收集管(BD 公司, 德国); 胰岛素放免分析试剂盒(LINCO Research 公司, 美国);  $96 \mu\text{mol/mol}$  标准  $H_2$  (成都分院化学所)。

## 1.2 方法

**1.2.1  $^{13}\text{C}$ -乳糖/ $^2\text{H}$ -葡萄糖负荷试验** 实验日清晨, 于受试者肘前静脉处插入留置针, 在给予受试底物  $^{13}\text{C}$ -乳糖和  $^2\text{H}$ -葡萄糖之前 15 min 抽取 2 mL 静脉血, 作为空白基础值。将 25 g  $^{13}\text{C}$ -乳糖和 0.5 g  $6, 6-^2\text{H}$ -葡萄糖溶于 250 mL 温水中, 让受试者在 2 min 内饮完, 在摄入底物后的 2 h 内每 15 min 通过留置针抽取 2 mL 静脉血, 用肝素抗凝, 置于真空血样收集管中, 并立即冰浴降温,  $900 \text{ r/min}$  离心 10 min, 取血浆置于塑料离心管,  $-80^\circ\text{C}$  保存至分析。

**1.2.2 呼气的收集及  $H_2$  浓度测定** 在摄入受试底物之前, 先测定呼气  $H_2$  浓度 2 次, 取平均值作为  $H_2$  浓度基础值。 $H_2$  的收集和测定持续 6 h, 在摄入底物后的头 4 h 内每

表1 LM与LI组的胃肠指标结果比较

	<i>n</i>	LDI	乳糖消化量(g)	OCTT(min) <sup>1</sup>	GET(min)	BHE(μmol/mol)
LM组	15	0.47 ± 0.15	11.8 ± 3.9	105(60–120)	44.0 ± 14.4	293 ± 166
LI组	28	0.34 ± 0.14	8.5 ± 3.5	60(30–90)	33.9 ± 12.2	357 ± 194
<i>P</i> 值		0.008	0.008	0.003	0.021	>0.05

<sup>1</sup>中位数(四分位数).

表2 LIa组与LIb组的胃肠指标结果比较

	<i>n</i>	LDI	乳糖消化量(g)	OCTT(min) <sup>1</sup>	GET(min)	BHE(μmol/mol)
LIa组	17	0.30 ± 0.14	7.5 ± 3.5	60(30–90)	35.6 ± 13.3	358 ± 225
LIb组	11	0.39 ± 0.15	9.8 ± 3.8	60(26–83)	28.6 ± 8.09	357 ± 140

<sup>1</sup>中位数(四分位数).

15 min收集1次气体,后2 h每30 min收集1次.要求受试者缓慢呼气,收集末段1/3呼出气,然后立即用H<sub>2</sub>呼气仪测定浓度;H<sub>2</sub>浓度实测值减去H<sub>2</sub>浓度基础值为各时间点H<sub>2</sub>浓度值.

1.2.3 问卷调查及症状评分 记录受试者摄入乳糖后12 h内出现的腹部不适症状及其严重程度,同时记录受试者的健康史、饮奶史和一般状况(年龄、身高、体重等).LI症状分腹胀、腹痛、腹泻,其评分系数分别为2、3、4;症状严重程度分类如下:(1)腹胀、腹痛:0无症状,1轻度不适,2中度不适,3重度不适;(2)腹泻:0大便正常、成形,1疏松软便,2水样便.症状评分(SSC)为各症状评分系数与其严重程度乘积之和.

1.2.4 对象分组 根据记录症状评分结果将实验对象分为LM组(SSC = 0)15例,轻度LI组(有乳糖不耐受症状但无腹泻,LIa组)17例,以及重度LI组(有腹泻症状,LIb组)11例.

1.2.5 血浆<sup>13</sup>C-葡萄糖/<sup>2</sup>H-葡萄糖分析 采用气相色谱/同位素比质谱法分析各时间点血浆<sup>13</sup>C-葡萄糖和<sup>2</sup>H-葡萄糖浓度<sup>[4]</sup>.

1.2.6 指标计算 (1)乳糖消化指数(lactose digestion index, LDI):计算各时间(<sup>13</sup>C-葡萄糖)/(<sup>2</sup>H-葡萄糖)吸收百分率的比值,以45 min、60 min、75 min这3个时间点所得比值的均值作为LDI<sup>[4]</sup>. (2)乳糖消化量:以<sup>13</sup>C-乳糖的摄入总量25 g乘以个体的LDI即为乳糖消化量. (3)6 h累积H<sub>2</sub>呼出量(BHE):某时间点的累积H<sub>2</sub>呼出量 = Σ[(某时间点H<sub>2</sub>浓度值/2+上一时间点H<sub>2</sub>浓度值/2) × 两次测量时间间隔(min)/60]. (4)口-结肠转运时间(OCTT):从摄入受试底物结束到呼气H<sub>2</sub>浓度值持续超过空腹基础值5 μmol/mol的时间点作为OCTT时间<sup>[5]</sup>. (5)胃排空时间(GET):从摄入受试底物结束到血浆<sup>2</sup>H-葡萄糖浓度达到峰值的时间.

**统计学处理** 实验数据采用SPSS 10.0软件进行方差分析和相关分析.OCTT结果数据不符合正态分布,因此采用秩合检验.

## 2 结果

2.1 LM组与LI组的胃肠指标结果 LM组的LDI和乳糖消化量显著高于LI组(*P* = 0.008);LM组的OCTT(*P* = 0.003)和GET(*P* = 0.021)显著长于LI组;LM组与LI组之间的6 h BHE没有显著性差异;LM组的平均年龄(23.0 ± 0.5)显著低于LI组(30.0 ± 10.0) (*P* = 0.001) (表1).

2.2 LIa组与LIb组的胃肠指标结果 LIa组和LIb组之间的LDI、乳糖消化量、OCTT、GET、6 h BHE以及年龄均无显著性差异(表2).

2.3 LDI与OCTT、GET以及6 h BHE之间的相关性分析 LDI与OCTT之间有显著性正相关关系(*r* = 0.30, *P* = 0.048) (图1),未发现LDI与GET(*r* = -0.24, *P* = 0.12)、LDI与6 h BHE(*r* = 0.12, *P* = 0.46)之间有显著性相关关系.

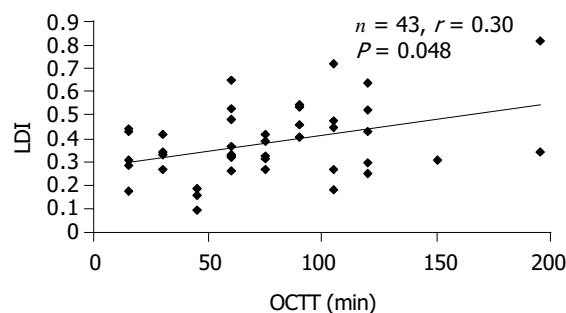


图1 OCTT与LDI之间的相关性.

## 3 讨论

本研究所选的43例研究对象均为具有相同基因背景的LD个体,在摄入25 g乳糖之后,15例(34.9%)可以耐受25 g乳糖(约相当于500 g牛奶中所含乳糖)而没有出现LI症状;28例(65.1%)出现了程度不同的LI症状,其中17例(39.5%)无腹泻症状,另外11例(25.6%)有腹泻症状.该结果说明LD个体对乳糖的耐受性不同,其中74.4%的个体在摄入25 g乳糖后不会出现严重症状,与其他

一些学者的研究结论一致<sup>[6-7]</sup>。

通过对LDI和乳糖消化量的分析结果显示,LM和LI组个体的小肠黏膜都有一定量乳糖酶残留,可以消化部分乳糖;但两组之间在酶活性和乳糖消化能力上存在差异,LM组对象的LDI和乳糖消化量均显著高于LI组( $P = 0.008$ )。

3.1 影响LI症状出现的相关因素 (1)GET:GET加快会导致单位时间内进入小肠的乳糖量增多,从而增加小肠的负荷,并可能引起LI症状.目前常用的GET分析方法有 $^{13}\text{C}$ -氨基乙酸(或乙酸)呼气试验, $^{13}\text{CO}_2$ 呼气试验等,但这些方法均比较复杂.本研究以摄入25 g  $^{13}\text{C}$ -乳糖和0.5 g  $^2\text{H}$ -葡萄糖之后血浆 $^2\text{H}$ -葡萄糖浓度达到峰值时间作为判断GET的标准,因为 $^2\text{H}$ -葡萄糖从胃进入小肠之后不需经过消化就可以直接被吸收入血,因此血浆浓度升高时间可以反映其从胃进入小肠的时间.本研究结果显示LM组的GET显著长于LI组( $P = 0.021$ ),说明延长GET在一定程度上有助于改善LI症状. (2)口-结肠转运时间:乳糖在小肠内的消化程度主要由小肠黏膜乳糖酶活性和OCTT所决定<sup>[8-9]</sup>.延长OCTT可以增加乳糖与小肠内乳糖酶的接触时间,从而有助于发挥有限的乳糖酶的消化作用.采用 $\text{H}_2$ 呼气试验检测OCTT的原理:当未被小肠消化的乳糖进入结肠后,在结肠菌群作用下发酵产生的 $\text{H}_2$ 通过肺呼出,因此呼气 $\text{H}_2$ 浓度升高的时间可以用来代表乳糖通过小肠进入结肠的时间.本研究结果显示OCTT与LDI之间有显著性正相关关系( $P = 0.048$ ),说明延长OCTT有改善乳糖消化的作用.导致LI组的OCTT显著快于LM组的原因不明确,其中一个原因可能是未被消化的乳糖引起肠腔渗透压增高,促进肠蠕动和OCTT加快的原因.以几种非消化性寡糖为底物进行试验发现吸收不良可以加速肠转运<sup>[10-11]</sup>.但另一方面,LM组与LI组之间未被吸收的乳糖量相差仅有3 g左右,从理论上讲3 g左右的差异似乎不会引起肠腔渗透压发生很大的改变,不应该造成肠转运时间出现大的差别,因此是否由于乳糖消化量不同引起组间肠转运的差异尚不能肯定,还值得进一步研究. (3)结肠 $\text{H}_2$ 产生量: $\text{H}_2$ 呼出量常被用来反映乳糖消化程度<sup>[12]</sup>,但是作为定量测量乳糖酶活性的指标尚存在争议<sup>[13]</sup>.本研究中LM组的乳糖消化量高于LI组( $P = 0.008$ ),6 h BHE低于后者但无显著性差异( $P > 0.05$ ),提示结肠产 $\text{H}_2$ 量少与LI症状的产生有关,有利于避免由于产气过多引起的腹胀和排气增多症状。

3.2 影响不同严重程度LI症状产生的因素 通过对LIa和LIb组的胃肠指标分析,显示两组之间的LDI、乳糖消化量、GET、OCTT和6 h BHE均没有显著性差异,提示以上胃和小肠因素可能不是引起LIa组与LIb组出现不同严重程度LI症状的原因,而可能与其他因素有关,如结肠菌群对乳糖的代谢水平.Clausen *et al*<sup>[14]</sup>的研究结果也显示,给予实验对象一定量乳果糖之后,只有部分个体而非全部个体出现腹泻症状;而且如果LI个体持续

摄入一段时间乳糖之后,LI症状往往会减轻,因为我们知道小肠乳糖酶活性是不可被诱导的<sup>[15]</sup>,因此这种适应性的产生也可能与结肠代谢因素的作用有关<sup>[16]</sup>。

以上研究结果充分表明,小肠黏膜乳糖酶活性、乳糖在小肠内被消化吸收程度、胃排空时间、肠转运时间等胃和小肠因素是乳糖酶缺乏者是否产生乳糖不耐受症状的重要原因,但出现乳糖不耐受症状严重程度差异可能与未被消化吸收的乳糖在结肠内的进一步代谢有关,如结肠菌群对乳糖的发酵过程。

#### 4 参考文献

- 1 Matthews SB, Waud JP, Roberts AG, Campbell AK. Systemic lactose intolerance: A new perspective on an old problem. *Postgrad Med J* 2005;81:167-173
- 2 Vonk RJ, Priebe MG, Koetse HA, Stellaard F, Lenoir-Wijnkoop I, Antoine JM, Zhong Y, Huang CY. Lactose intolerance: analysis of underlying factors. *Eur J Clin Invest* 2003;33:70-75
- 3 Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet* 2003;37:197-219
- 4 Vonk RJ, Stellaard F, Priebe MG, Koetse HA, Hagedoorn RE, De Bruijn S, Elzinga H, Lenoir-Wijnkoop I, Antoine JM. The  $^{13}\text{C}/^2\text{H}$ -glucose test for determination of small intestinal lactase activity. *Eur J Clin Invest* 2001;31:226-233
- 5 Zhong Y, Yin W, Huang C, Vonk RJ. Study on the expired gas of subjects with lactose intolerance by using  $\text{H}_2/^{13}\text{CO}_2$  breath test. *Weisheng Yanjiu* 2002;31:180-183
- 6 Sibley E. Genetic variation and lactose intolerance: detection methods and clinical implications. *Am J Pharmacogenomics* 2004;4:239-245
- 7 Jarvinen RM, Loukaskorpi M, Uusitupa MI. Tolerance of symptomatic lactose malabsorbers to lactose in milk chocolate. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:701-705
- 8 Labayen I, Forga L, Gonzalez A, Lenoir-Wijnkoop I, Nutr R, Martinez JA. Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:543-549
- 9 Di Stefano M, Veneto G, Malservisi S, Strocchi A, Corazza GR. Lactose malabsorption and intolerance in the elderly. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1274-1278
- 10 Priebe MG, Wachters-Hagedoorn RE, Stellaard F, Heiner AM, Elzinga H, Vonk RJ. Oro-cecal transit time: influence of a subsequent meal. *Eur J Clin Invest* 2004;34:417-421
- 11 Burge MR, Tuttle MS, Violett JL, Stephenson CL, Schade DS. Potato-lactulose breath hydrogen testing as a function of gastric motility in diabetes mellitus. *Diabetes Technol Ther* 2000;2:241-248
- 12 Casellas F, Malagelada JR. Applicability of short hydrogen breath test for screening of lactose malabsorption. *Dig Dis Sci* 2003;48:1333-1338
- 13 Di Stefano M, Missanelli A, Miceli E, Strocchi A, Corazza GR. Hydrogen breath test in the diagnosis of lactose malabsorption: accuracy of new versus conventional criteria. *J Lab Clin Med* 2004;144:313-318
- 14 Clausen MR, Jorgensen J, Mortensen PB. Comparison of diarrhea induced by ingestion of fructooligosaccharide Idolax and disaccharide lactulose: role of osmolarity versus fermentation of malabsorbed carbohydrate. *Dig Dis Sci* 1998;43:2696-2707
- 15 Lee SY, Madan A, Furuta GT, Colgan SP, Sibley E. Lactase gene transcription is activated in response to hypoxia in intestinal epithelial cells. *Mol Genet Metab* 2002;75:65-69
- 16 Pribila BA, Hertzler SR, Martin BR, Weaver CM, Savaiano DA. Improved lactose digestion and intolerance among African-American adolescent girls fed a dairy-rich diet. *J Am Diet Assoc* 2000;100:524-528

# 克拉玛依市区胃食管反流症状流行病学调查及防治

张军汉, 周黎黎, 杨晓燕, 肖翠兰, 迟雪梅, 原旭华, 张 晖

张军汉, 周黎黎, 杨晓燕, 肖翠兰, 迟雪梅, 原旭华, 张晖, 克拉玛依市人民医院 新疆克拉玛依市 834000

通讯作者: 张军汉, 834000, 新疆克拉玛依市风华新村 19-9, 克拉玛依市人民医院. zhangjunhany@sohu.com

电话: 0990-6884374

收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-06

## 摘要

**目的:** 了解克拉玛依市胃食管反流病(GERD)和反流性食管炎(RE)在 2004-02/04 调查时的患病率及其相关性疾病和危险因素, 最后选取部分患者进行干预治疗。

**方法:** 本市区常住居民 5 000 例, 18-75 岁, 以二级厂处为单位进行整群随机抽样调查. 以反酸、烧心、反食症状程度和频度的积分( $S_c$ , 最高 18 分)作为反流的指标,  $S_c \geq 6$  表明存在症状性反流(GER), 抽取部分反流阳性的患者和对照者进一步行胃镜等检查, 根据精查的正确率对普查结果校正后计算出患病率。

**结果:** 共 4 980 例完成筛查, 人群中  $S_c \geq 6$  者 528 例(10.60%), 男女之比为 1.09:1, 精查正确率为 78.57%, 据此推算 GERD 的患病率为 8.33%, RE 为 2.27%. 分层分析显示, 30-39 岁年龄组  $S_c \geq 6$  人数已明显升高, 40-49 岁年龄组患病率最高. 反流组伴发咽喉疾患、哮喘和支气管炎频率比非患病人群明显为高( $P < 0.01$ ).

**结论:** 本调查结果显示, GERD 为多发病, 饮食习惯、高脂食物等因素和反流有密切关系. 单纯改变生活方式对控制胃食管反流症状有益。

张军汉, 周黎黎, 杨晓燕, 肖翠兰, 迟雪梅, 原旭华, 张晖. 克拉玛依市区胃食管反流症状流行病学调查及防治. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1621-1624  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1621.asp>

## 0 引言

克拉玛依市位于新疆北部, 随着生活水平的提高, 人们的生活方式发生改变, 聚餐、饮酒、吸烟、饮茶、脂肪摄入较多, 户外活动减少; 部分职工工作压力重, 进餐后急于休息, 逐渐出现烧心、反食、胸骨后疼痛、腹胀, 症状加重时影响生活、工作, 年龄大者误以为心绞痛而导致焦虑, 以上症状是胃食管反流病(GERD)的主要表现. 据文献报道, 反流性食管炎(RE)与食管腺癌有明显相关性, 而目前多数非专科医务人员对其缺乏正确认识, 未引起足够重视, 常规钡餐、胃镜检查未见明显异常而忽视本病. GERD 是指过多的胃、十二指肠内容物反流入食管, 引起烧心、反酸等, 甚至有食管黏膜的病理性损害, 但 GERD 并不一定均伴有 RE. 本症还可

引起口、咽、喉、气道等食管外的组织损害. GERD 的治疗以 1999-08 在烟台全国反流性食管病/炎研讨会推荐的方案为例, 质子泵抑制剂(PPI)为 7 000 元左右, 而  $H_2$  受体阻滞剂( $H_2RA$ )费用为 2 000 元左右, 其中还不包括大部分患者维持治疗的费用. 因此, GERD 的预防就显得尤为重要。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 所有研究对象均为本市区常住居民(居住 3 a 以上), 共 5 000 例, 18-75 岁, 排除长期外出及因病无法调查者, 以二级厂处为单位进行整群随机抽样调查。

### 1.2 方法

**1.2.1 调查内容与方式** 按照克拉玛依市人口年龄、性别职业构成, 以假设患病率为 8% 计算样本含量约 4 600 例, 考虑样本可能缺失情况, 实际抽样 5 000 人, 完成问卷调查者 4 980 例. 样本覆盖人群: 本市区常住人口 113 593 人, 18-75 岁人群占本市常住人口的 78.28%. 样本量 5 000 例, 覆盖各年龄组人群为  $5\,000/78.28\% = 6\,387$  例, 调查结束后, 选择部分被调查者的问卷由另人复核, 正确率为 96.2%. 采用集中调查, 对研究对象进行问卷调查. 问卷内容涉及反流症状、发生频度及程度、伴随症状以及疾病、职业、饮食习惯、生活方式和危险因素等。

**1.2.2 症状评分及统计** 调查反酸、反食、烧心、胸骨后疼痛、腹胀等症状的发生情况, 以烧心、反酸、反食作为评分症状: 无症状为 0 分; 症状轻微可以忍受为 1 分; 症状重, 不能忍受, 需休息和药物治疗为 3 分; 症状中等(介于以上二者之间)为 2 分. 另根据频度, 如每月有症状为 1 分, 每周有症状为 2 分, 每日有症状为 3 分. 根据症状程度及频度, 积分之和为总分( $S_c$ ), 最高 18 分, 将调查资料输入电脑, 分档统计(表 1). 以上  $S_c \geq 6$  共 528 例, 占总调查人数的 10.6%, 其中  $S_c \geq 10$  共 168 例, 占 3.37%,  $S_c < 6$  占 86.02%, 我们以  $S_c \geq 6$  作为症状性反流(GER)的诊断标准, 将  $S_c < 6$  设定为非反流人群组作为对照. 以这段时间内有反流症状人群的检出率代表患病率. 对 GER 人群的患病率、不同年龄和职业的患病率及脑力、体力劳动患病率的差别以及不同饮食生活方式与患病率之间的关系等进行了调查。

表1 调查人群症状积分( $S_c$ )

$S_c$	0	2-5	6-9	10-12	$\geq 13$
$n$	3 597	855	360	126	42
%	72.23	17.17	7.23	2.53	0.84

1.2.3 精查 在4 980例普查人群中,按反流症状积分高低分组,随机抽签,对低分组( $Sc < 6$ )、中高分组( $Sc \geq 10$ )及对照组( $Sc < 6$ )各21例作进一步精查( $\alpha = 0.01$ ,  $1-\beta = 0.95$ ),以除外伴随其他器质性疾病并确定GERD的诊断.精查项目包括体格检查、常规化验、心电图、胸透,肝、胆、胰、脾、B超以及电子胃镜检查.胃镜下观察有无食管炎,以1999-08烟台会议分级为标准,将RE分为4级<sup>[1]</sup>.

1.2.4 治疗 GERD确诊患者70例,随机分为奥美拉唑(OME)组、雷尼替丁(RNT)组和改变生活方式组( $\alpha = 0.05$ ,  $1-\beta = 0.85$ ).前两组均为23例,在生活方式方面未予干预,OME组男13例,女10例,18-75岁,平均49.2岁;RNT组男12例,女11例,17-73岁,平均50.4岁;改变生活方式组24例,男14例,女10例,20-70岁,平均48.7岁,三组年龄、性别之间均有可比性,均排除有其他器质性疾病.改变生活方式包括:抬高床头、减少脂肪摄入量,避免过饱,避免巧克力、咖啡等刺激性食物,戒烟限酒,进餐后3 h避免平卧.方法及疗效判定:OME组每日晨口服OME 20 mg;RNT组口服RNT 150 mg,2次/d,早晚各1次.治疗期间停用其他抗酸药物及胃动力药物,治疗4 wk后进行疗效判定.以烧心、反酸、反食症状消失或改善为疗效判定标准,症状改善标准为烧心、反酸、反食症状积分减少2分(包括2分)以上.

**统计学处理** 用卡方或logistic回归作统计学分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义.

## 2 结果

2.1 GER的患病率 (1)不同年龄的患病率:30-39岁年龄组GER患病率(10.20%)和18-29岁年龄组GER患病率(5.37%)相比已明显升高,40-49岁年龄组患病率(13.18%)最高,30岁以上各组同18-29岁组患病率有显著性差异( $P < 0.01$ ),40岁以上各组同30-39岁年龄组患病率差别无显著性( $P > 0.05$ )(表2);(2)不同性别的患病率:被调查者男2 597例,女2 383例,GER男性患病率为10.94%,女性为10.23%,男女比例(1.09:1),显示性别之间无显著性差异( $P > 0.05$ );(3)不同族别患病率比较:本地区汉族、维族患病率分别为9.60%(384/4 000),16.22%(120/740),二者有显著性差异( $P < 0.001$ ).哈族18.18%(4/22).(4)不同职业的患病率:体力劳动者和脑力劳动者(干部、知识分子、学生)GER的患病率未显示明显差别.多种职业GER症状的患病率依次为无业14.20%(25/176),机关干部12.29%(102/830),工人10.76%(170/1 580),离退休10.50%(127/1 200),知识分子9.49%(101/1 064),学生2.50%(3/120).(5)GERD和RE患病率的测定:对照组21例中有4例(19.0%)有其他器质性疾病,3例为胃十二指肠溃疡,1例为胆结石、胆囊炎.低分组( $Sc < 6$ )21例中4例发现有胃十二指

肠,高分组( $Sc \geq 10$ )发现5例胃十二指肠溃疡.这些患者的酸反流为症状性反流,不能诊断为GERD或RE.测算GERD的正确诊断率平均为78.57%,有反流症状( $Sc \geq 6$ )的528例中,GERD应有 $528 \times 78.57\% = 415$ 例,占筛查人群4 980例的(415/4 980)8.33%,同样,可预测RE在本人群中的阳性率为2.27%(表3).

表2 不同年龄 GER 的患病率

年龄(岁)	n	Sc $\geq$ 6	患病率(%)
18-29	932	50	5.37
30-39	1 127	115	10.20 <sup>a</sup>
40-49	1 085	143	13.18 <sup>b</sup>
50-59	862	106	12.30 <sup>b</sup>
60-69	874	104	11.90 <sup>b</sup>
$\geq 70$	101	10	9.90 <sup>b</sup>
总数	4 980	528	10.60

<sup>a</sup> $P < 0.01$  vs 18-29岁组.

表3 精查中GERD和RE的正确诊断率

	n	GERD(%)	RE(%)
对照组	21	1(4.76)	1(4.76)
Sc 6-9	21	17(80.95)	4(19.05)
Sc $\geq$ 10	21	16(76.19)	5(23.81)

GERD中包括RE.

2.2 反流症状的发生情况 烧心、反酸、反食、咽部异物感、上腹不适、恶心、呕吐、嗝气、胸骨后疼痛及吞咽困难等10个与反流有关症状的发生频率,在 $Sc \geq 6$ 组和 $Sc < 6$ 的非患者中进行了比较,在反流组中,其发生频率明显高于非患者组( $P \leq 0.01$ ).在反流组( $Sc \geq 6$ )中,每日1次反酸、烧心、反食的发生率分别为28.42%,26.18%和24.12%.Logistic多因素回归分析结果显示,烧心( $OR = 35.92$ )、反酸( $OR = 23.80$ )和反食( $OR = 60.32$ )在诸症状中最有意义( $P < 0.001$ ).

2.3 GER伴发口咽及呼吸系统疾患 GER患者常伴发食管外症状(表4).

表4 GER伴发口咽部及呼吸道疾病

伴随疾患	Sc $\geq$ 6(528例)		Sc < 6(4 452例)		P值
	n	%	n	%	
打鼾	148	28.03	861	19.34	<0.001
支气管炎	58	10.98	232	5.21	<0.001
哮喘	28	5.30	152	3.41	<0.01
咽炎	102	19.32	450	10.11	<0.001
肺炎	8	1.52	53	1.19	>0.50

表5 两组治疗4 wk后症状改善情况

	OME组(23例)				RNT组(23例)				<i>P</i>
	出现 <i>n</i>	治疗后消失 <i>n</i>	治疗后改善 <i>n</i>	有效率(%)	出现 <i>n</i>	治疗后消失 <i>n</i>	治疗后改善 <i>n</i>	有效率(%)	
烧心	20	12	6	90.0	21	6	8	66.7	<0.05
反酸	18	15	1	88.9	19	6	5	57.9	<0.05
反食	16	8	7	87.5	15	3	6	60.0	<0.05

2.4 胃食管反流相关因素的研究 Logistic多元回归分析显示, 饮食特别是经常进食过饱( $OR = 6.78$ )、油腻饮食( $OR = 5.76$ )、体位( $OR = 2.23$ )、酗酒( $OR = 2.23$ )与GER的患病关系较大, 其他因素有精神紧张( $OR = 1.76$ )、便秘( $OR = 1.32$ )、生气( $OR = 1.25$ )、咖啡( $OR = 1.21$ )和饮茶( $OR = 1.02$ )等。

2.5 分组治疗结果 治疗4 wk后OME组症状改善优于RNT组, ( $P < 0.05$ , 表5). 单纯改变生活方式4 wk后症状消失和改善情况见表6。

表6 改变生活方式4 wk后症状改变情况

症状	出现 <i>n</i>	改变生活方式后消失 <i>n</i>	改变生活方式后改善 <i>n</i>	有效率(%)
烧心	18	2	3	27.8
反酸	20	0	4	20.0
反食	15	1	3	26.7

### 3 讨论

胃食管反流病(GERD)是指过多的胃、十二指肠内容物反流入食管, 引起烧心、反酸、反食等, 甚至有食管黏膜的病理性损害—反流性食管炎(RE). GERD的发病机制主要为下食管括约肌功能降低, 尤其是一过性下食管括约肌松弛是引起胃食管反流的最主要因素. 其本质是酸移位, 而不是酸增多. GERD是一种慢性疾病, 以往认为长时间反流可导致Barrett食管、食管腺癌等严重并发症和食管外临床表现. 由于本病目前尚无非常可靠的诊断标准, 即使24 h pH值监测, 敏感性<90%, 而且侵入性的检查方法, 在大规模流行病学调查中也不易被接受, 所以有关本病患病的文献报道多建立在症状学的基础上. 西方国家人群中烧心和反酸的发生率在15-45%之间<sup>[2]</sup>, 日本学者<sup>[3]</sup>对1 700例成人进行的调查表明, 有烧心/反酸拟诊为GERD者占10.3%. 北京、上海对5 000例成人进行的调查表明, GER的检出率北京10.19%, 上海7.76%, 平均8.97%. 测算GERD的患病率为5.77%, RE为1.99%, 我们以反流的三个主要症状烧心、反酸、反食为评分症状, 根据其程度和发生频率计算积分, 进行人群反流症的调查, 以积分 $\geq 6$ 作为GER的诊断标准, 结果显示GER检出率为10.60%, 进一步精查的结果表明, 这样划分对GER预测的正确率约78.6%, 由此预测本市区GERD的患病率为8.33%, RE为2.27%, GER检

出率和北京、日本相似. GERD患病率较北京、上海两市明显升高, RE患病率二者接近, 其中可能有两方面原因: 其一本市区GER患病率比北京、上海高, 其二北京、上海精查时进行24 h pH监测, 其诊断的敏感性降低。

本研究对GERD伴发咽喉及呼吸道疾病的频率进行统计, 发现反流组( $Sc \geq 6$ )伴发咽部疾病、哮喘和支气管炎的频率要比非患者人群明显为高, 与文献[4]相符. 目前认为酸反流可造成食管以上咽部和气道的并发症. 其机制主要为迷走神经介导的反射使呼吸系统总阻力增加, 另外食管内酸通过局部神经反射引起支气管黏膜释放炎性物质如P物质等, 从而导致气道水肿<sup>[5-7]</sup>.

对与反流相关因素调查的结果显示, 年龄、经常进食过饱、油腻饮食、劳累、大量饮酒、饮茶和反流较密切相关. 这可以解释本市区GER患病率较高, 尤其是维吾尔族GER患病率(16.22%)明显增高的原因. 维吾尔族的饮食习惯以羊肉、牛奶等高脂、油腻食物为主, 维吾尔族患者经常进食过饱和油腻食物过多, 二者增加腹压和延迟胃排空时间, 导致胃食管、胃酸和胃蛋白酶对食管黏膜的损害增强, 胆酸, 胰酶能增加食管黏膜的通透性, 起到促进和加重胃酸、胃蛋白酶对食管黏膜的损害作用<sup>[8]</sup>, 当胃内PH显碱性时, 非结合胆酸和胰酶成为主要攻击因子, 易发生GERD和RE. 另外, 本市区大量饮酒者多, 维吾尔族又习惯喝浓茶, 酒精和浓茶能刺激胃酸大量分泌, 胃容积增大, 促使食管下段括约肌呈一过性松弛, 易导致GERD和RE的发生<sup>[9]</sup>, 故在防治方面要注意饮食生活的调理。

本调查显示>40岁者占反流组的68.75%, 而>30岁者占90.53%, 与北京、上海调查>40岁患病率(86.77%)接近, 显示本市区发病年龄提前. 经常便秘、精神紧张也是反流的危险因素. 目前对下食管括约肌和胃食管运动中枢调节机制还不完全明了。

本研究显示单纯改变生活方式1 mo后, 烧心、反酸、反食症状改善分别为27.8%、20.0%和26.7%. 此外即使采用药物治疗的患者也应改变生活方式, 这样可减少药物维持治疗的剂量, 增强治疗效果. 药物治疗常用 $H_2$ 受体拮抗剂, 其价格适宜, 初用时抑酸效果较好, 长期使用会出现受体耐受性而使抑酸作用降低, 因此不适合长期治疗. 而PPI几乎可以完全抑制胃酸的分泌, 药效维持时间长, 每日OME20毫克可抑制胃酸分泌90%以上, 使反流症状明显改善, 其唯一的缺点是短期治疗费



用明显增高,我们治疗的时间较短,尚难从卫生经济学角度对这两种治疗方案作一全面分析。

#### 4 参考文献

- 1 中华医学会消化内镜学会. 反流性食管病(炎)诊断及治疗方案(试行). 中华消化内镜杂志 2000;17:60
- 2 Drossman DA, Li Z, Andruzzi E, Temple RD, Talley NJ, Thompson WG, Whitehead WE, Janssens J, Funch-Jensen P, Corazziari E. U.S. householder survey of functional gastrointestinal disorders. *Dig Dis Sci* 1993;38:1569-1580
- 3 Tsolauri J, Laippala P. Prevalence of symptoms suggestive of Gastro-oesophageal reflux disease in an adult population. *Ann Med* 1995;27:67-70
- 4 Wienbeck M, Barnert J. Epidemiology of reflux disease and

- reflux esophagitis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;156:7-13
- 5 Crisera CA, Connelly PR, Marmureanu AR, Li M, Rose MI, Longaker MT, Gittes GK. TTF-1 and HNF-3beta in the developing tracheoesophageal fistula: further evidence for the respiratory origin of the distal esophagus. *J Pediatr Surg* 1999;34:1322-1326
- 6 Field SK. A critical review of the studies of the effects of simulated or real gastroesophageal reflux on pulmonary function in asthmatic adults. *Chest* 1999;115:848-856
- 7 Ricciardolo FL, Rado V, Fabbri LM, Sterk PJ, Di Maria GU, Geppetti P. Bronchoconstriction induced by citric acid inhalation in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:557-562
- 8 王进海, 罗金燕, 龚均, 陶明. 反流性食管炎的流行病学及临床研究. 中华消化内镜杂志 2000;17:345-348
- 9 潘国宗, 曹世植. 现代胃肠病学. 第一版. 北京: 科学出版社, 1998: 729-739

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 •

## 老年人结肠镜检查肠道清洁方法比较观察

张 烁, 吕 宾, 江丽萍, 孟立娜

张烁, 吕宾, 江丽萍, 孟立娜, 浙江中医学院附属医院消化科  
浙江省杭州市 310006  
通讯作者: 张烁, 310006, 浙江省杭州市邮电路 54 号, 浙江中医学院附属医院消化科. sudei@163.com  
电话: 0571-87071026  
收稿日期: 2005-04-07 接受日期: 2005-04-09

张烁, 吕宾, 江丽萍, 孟立娜. 老年人结肠镜检查肠道清洁方法比较观察. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1624-1626  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1624.asp>

### 摘要

**目的:** 观察老年患者在电子结肠镜检查前, 采用结肠灌注机、电解质导泻液、常规灌肠肠道准备的效果。

**方法:** 择期行电子结肠镜检查患者 105 例, 年龄 60-90 岁, 分为 3 组: 结肠灌注机组(A 组)、电解质液导泻组(B 组)和常规灌肠组(C 组)各 35 例, A 组采用 CPC-1 型结肠灌注治疗机, 检查当天上午反复灌洗约 30 min; B 组检查当日上午应用自制电解质导泻盐加入 3 000 mL 温水中, 3 h 内服完; C 组应用灌肠液于检查前灌洗 3-6 次。评估患者对灌肠舒适、满意程度和肠道清洁程度。

**结果:** 患者对灌肠舒适满意程度: A 组优良率 48.6%, B 组优良率 14.3%, C 组优良率 8.6%; 肠道清洁程度: A 组优良率 80%, B 组优良率 68.6%, C 组优良率为 31.4%;

**结论:** 对于老年患者, 与电解质液导泻和常规灌肠相比, 肠镜检查前采用结肠灌注机的方法行清洁灌肠, 不仅具有简便、省时, 患者舒适、满意, 清洁更彻底等优点, 更有助于降低老年患者肠镜检查的风险, 减轻痛苦。

### 0 引言

结肠镜检查前的肠道清洁准备对检查的成功与否非常重要。老年患者对结肠镜检查耐受性差, 部分患者因肠道准备时间长、饮食受限, 感到体力下降, 出现心慌、出汗、体力不支、虚脱, 甚至诱发心律失常及心衰<sup>[1]</sup>。为此, 我们观察了结肠灌注机与电解质液导泻及常规灌肠的舒适程度、肠道清洁程度, 为临床老年患者电子结肠镜检查前的肠道准备提供指导。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 2004-08/2004-12 在我院门诊和住院部需行电子结肠镜检查的患者 105 例。按来我院就诊顺序依次分为结肠灌注机组(A 组)、电解质液导泻组(B 组)、常规灌肠组(C 组)各 35 例。符合下列情况者纳入观察: 年龄 60-90 岁; 不明原因的腹痛、慢性腹泻和大便习惯改变者; 不明原因下消化道出血; 腹部肿块疑是结肠病变者。3 组患者性别、年龄、结肠镜下诊断均无统计学差异, 具有可比性。结肠灌注治疗机(CPC-1 型), 由上海康强医疗器材有限公司研制。

用明显增高,我们治疗的时间较短,尚难从卫生经济学角度对这两种治疗方案作一全面分析。

#### 4 参考文献

- 1 中华医学会消化内镜学会. 反流性食管病(炎)诊断及治疗方案(试行). 中华消化内镜杂志 2000;17:60
- 2 Drossman DA, Li Z, Andruzzi E, Temple RD, Talley NJ, Thompson WG, Whitehead WE, Janssens J, Funch-Jensen P, Corazziari E. U.S. householder survey of functional gastrointestinal disorders. *Dig Dis Sci* 1993;38:1569-1580
- 3 Tsolauri J, Laippala P. Prevalence of symptoms suggestive of Gastro-oesophageal reflux disease in an adult population. *Ann Med* 1995;27:67-70
- 4 Wienbeck M, Barnert J. Epidemiology of reflux disease and

- reflux esophagitis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989;156:7-13
- 5 Crisera CA, Connelly PR, Marmureanu AR, Li M, Rose MI, Longaker MT, Gittes GK. TTF-1 and HNF-3beta in the developing tracheoesophageal fistula: further evidence for the respiratory origin of the distal esophagus. *J Pediatr Surg* 1999;34:1322-1326
- 6 Field SK. A critical review of the studies of the effects of simulated or real gastroesophageal reflux on pulmonary function in asthmatic adults. *Chest* 1999;115:848-856
- 7 Ricciardolo FL, Rado V, Fabbri LM, Sterk PJ, Di Maria GU, Geppetti P. Bronchoconstriction induced by citric acid inhalation in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:557-562
- 8 王进海, 罗金燕, 龚均, 陶明. 反流性食管炎的流行病学及临床研究. 中华消化内镜杂志 2000;17:345-348
- 9 潘国宗, 曹世植. 现代胃肠病学. 第一版. 北京: 科学出版社, 1998: 729-739

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 •

## 老年人结肠镜检查肠道清洁方法比较观察

张 烁, 吕 宾, 江丽萍, 孟立娜

张烁, 吕宾, 江丽萍, 孟立娜, 浙江中医学院附属医院消化科  
浙江省杭州市 310006  
通讯作者: 张烁, 310006, 浙江省杭州市邮电路 54 号, 浙江中医学院附属医院消化科. sudei@163.com  
电话: 0571-87071026  
收稿日期: 2005-04-07 接受日期: 2005-04-09

张烁, 吕宾, 江丽萍, 孟立娜. 老年人结肠镜检查肠道清洁方法比较观察. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1624-1626  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1624.asp>

### 摘要

**目的:** 观察老年患者在电子结肠镜检查前, 采用结肠灌注机、电解质导泻液、常规灌肠肠道准备的效果。

**方法:** 择期行电子结肠镜检查患者 105 例, 年龄 60-90 岁, 分为 3 组: 结肠灌注机组(A 组)、电解质液导泻组(B 组)和常规灌肠组(C 组)各 35 例, A 组采用 CPC-1 型结肠灌注治疗机, 检查当天上午反复灌洗约 30 min; B 组检查当日上午应用自制电解质导泻盐加入 3 000 mL 温水中, 3 h 内服完; C 组应用灌肠液于检查前灌洗 3-6 次。评估患者对灌肠舒适、满意程度和肠道清洁程度。

**结果:** 患者对灌肠舒适满意程度: A 组优良率 48.6%, B 组优良率 14.3%, C 组优良率 8.6%; 肠道清洁程度: A 组优良率 80%, B 组优良率 68.6%, C 组优良率为 31.4%;

**结论:** 对于老年患者, 与电解质液导泻和常规灌肠相比, 肠镜检查前采用结肠灌注机的方法行清洁灌肠, 不仅具有简便、省时, 患者舒适、满意, 清洁更彻底等优点, 更有助于降低老年患者肠镜检查的风险, 减轻痛苦。

### 0 引言

结肠镜检查前的肠道清洁准备对检查的成功与否非常重要。老年患者对结肠镜检查耐受性差, 部分患者因肠道准备时间长、饮食受限, 感到体力下降, 出现心慌、出汗、体力不支、虚脱, 甚至诱发心律失常及心衰<sup>[1]</sup>。为此, 我们观察了结肠灌注机与电解质液导泻及常规灌肠的舒适程度、肠道清洁程度, 为临床老年患者电子结肠镜检查前的肠道准备提供指导。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 2004-08/2004-12 在我院门诊和住院部需行电子结肠镜检查的患者 105 例。按来我院就诊顺序依次分为结肠灌注机组(A 组)、电解质液导泻组(B 组)、常规灌肠组(C 组)各 35 例。符合下列情况者纳入观察: 年龄 60-90 岁; 不明原因的腹痛、慢性腹泻和大便习惯改变者; 不明原因下消化道出血; 腹部肿块疑是结肠病变者。3 组患者性别、年龄、结肠镜下诊断均无统计学差异, 具有可比性。结肠灌注治疗机(CPC-1 型), 由上海康强医疗器材有限公司研制。

表1 3组患者灌肠满意程度和清洁程度比较( $n = 35$ )

组别	患者的满意舒适度				肠道清洁度			
	优	良	中	差	优	良	一般	差
A	2(5.7%)	15(42.9%)	13(37.1%)	5(14.3%)	13(37.1%)	15(42.9%)	5(14.3%)	2(5.7%)
B	0(0)	5(14.3%)	9(25.7%)	21(60.0%)	10(28.6%)	14(40.0%)	6(17.1%)	5(14.3%)
C	0(0)	3(8.6%)	9(25.7%)	23(65.7%)	4(11.4%)	7(20.0%)	18(51.4%)	6(17.7%)

## 1.2 方法

1.2.1 结肠灌注机组(A组) 检查前1 d少渣饮食, 肠镜检查前灌肠. 患者先取屈膝左侧卧位, 常规行肛门指检后, 将涂有润滑油的插肛器轻柔地插入肛门约5-7 cm, 然后改后屈膝平卧位, 以保持腹肌放松, 并告诉患者水进入肠道的感受. 开机缓慢注入38-40℃清洗肠液(氯化钠30 g, 碳酸氢钠20 g加入5 000 mL温水中), 通过机器注排系统进行反复冲洗, 必要时翻转体位, 直至排出液基本清亮, 方可达到节段性清洗整个结肠的目的, 整个清洗过程约需30 min. 清洗完毕后即可行肠镜检查.

1.2.2 电解质液导泻组(B组) 检查前2 d无渣饮食, 前1 d晚间服用果导2片, 检查当日上午应用本院自制电解质导泻盐(氯化钠、氯化钾、碳酸氢钠等电解质为主)加入3 000 mL沸水中, 待水温合适后, 配成电解质导泻液, 于3 h内服完. 一般1-3 h开始腹泻3-10余次不等, 下午排空大便后行肠镜检查.

1.2.3 常规灌肠组(C组) 采用38-40℃灌肠液(本院自制, 主要为浓度1-2 g/L肥皂水液)缓慢灌洗肠道, 每次灌注约500-1 000 mL, 当自觉腹胀有排便感时暂停向肠道灌注, 并嘱患者坚持5-10 min后再排便, 一般检查前灌洗3-6次, 以排出的肠内液无明显粪便为宜.

1.2.4 评估标准 (1)按对肠道清洁过程舒适、满意程度分为四级. 优(无不适感); 良(对灌洗过程稍有不适感); 中(对灌洗操作过程有较明显的不适感和不方便); 差(对灌洗过程感到明显的不适和不方便). (2)肠道清洁程度由内镜医生依据结肠镜检查时肠腔内所见的内容物评估. 优(肠腔内不见粪渣, 残留粪水清亮); 良(肠腔内不见粪渣, 残留粪水呈黄色); 一般(肠腔内见少量粪渣, 残留粪水黄色浑浊, 结肠镜抽吸可排出, 不影响检查); 差(肠腔内残留明显粪便, 影响检查)<sup>[2]</sup>.

统计学处理 采用 $\chi^2$ 检验,  $P < 0.05$ 具有统计学意义.

## 2 结果

2.1 舒适及满意程度 A、B、C组优良率分别为48.6%, 14.3%, 和8.6%, A组明显优于其他两组( $\chi^2 = 26.711$ ,  $P < 0.005$ , 表1).

2.2 肠道清洁效果评价 A、B、C组优良率分别为80%, 68.6%和31.4%. A组优良率明显优于C组, 差异具有统计学意义( $\chi^2 = 16.73$ ,  $P < 0.005$ , 表1).

## 3 讨论

3.1 传统肠道清洁的方法、优缺点 结肠镜检查对老年人结肠疾病的诊断和治疗是非常安全和准确的, 故有建议结肠镜检查应作为老年人常规体检项目<sup>[3]</sup>, 但前提是肠腔要清洁, 以便于观察肠黏膜情况. 目前清洁肠道的方法有多种, 即在饮食控制的基础上进行灌肠或导泻(口服电解质液或甘露醇、番泻叶等). 对于老年患者而言, 灌肠法费时、费事, 还容易引起黏膜充血、水肿, 不利于炎性病变的诊断; 右半结肠清洁度差, 回盲部常有粪便团块残余; 导泻法短期内需要大量饮水, 不易耐受, 且易出现恶心、呕吐、腹胀等症状, 排便次数频繁, 体弱者易虚脱; 甘露醇在大肠息肉高频电治疗时, 可产生爆炸性气体<sup>[4]</sup>; 番泻叶使腹痛发生率增高. 电解质液可引起老年患者体内电解质变化, 有增加了心、肾负荷, 诱发心律失常、心衰、肾功能不全等风险; 同时由于肠道清洁准备时间的延长, 造成大部分患者体力消耗大, 出现不同程度的饥饿感, 尤其是体弱多病的患者对检查不能耐受, 表现为出虚汗、低血糖, 影响检查结果.

3.2 结肠灌注机肠道清洁的优点 随着年龄的增加, 老年人整体机能减退, 大多患有多种疾病, 身体适应能力差, 存在着特殊的生理、心理反应. 采用结肠灌注机的方法进行清洁灌肠, 缩短了准备时间及等待检查的时间, 肠道准备同样清洁, 患者安全、风险小、舒适及满意度提高, 有效地改善了传统方法给老年患者带来的不适.

理想的肠道准备应安全、迅速, 清洁效果好, 方法简便、经济, 对肿瘤刺激少<sup>[5]</sup>. 我们使用的结肠灌注治疗机(CPC-1型)较常规灌肠方法方便、省时, 患者对整个灌洗过程也感到舒适、满意. 结肠灌注治疗机是将温水反复多次缓慢地注入结肠, 稀释软化结肠内的粪便, 通过循环系统及时排出体外, 逐段清洗直肠、乙状结肠、降结肠、横结肠和升结肠, 并通过观察管可清楚地观察到清洗后排出物的清洁程度; 而且反复多次注水, 并带有一定压力, 不仅可将隐藏在结肠黏膜皱襞内的宿便清洗干净, 而且还能将整个结肠彻底清洁. 所以, 与传统的肠道清洁相比, 结肠灌注治疗机组的肠道清洁程度, 80%属优良, 和常规灌肠组则有显著性差异. 患者舒适满意度48.6%为优良, 与电解质液导泻组、常规灌肠组都有显著性差异. 2例清洁效果较差, 分析原因主要有(1)插管手法需要提高, 可适当延长灌洗时间, 合理利用体位变化. (2)某些疾病, 如结肠肿瘤、炎性肠病等, 降低肠腔通过性, 肠壁缺乏正常蠕动, 影响清洁结果.

#### 4 参考文献

- 1 吴锡琛. 消化道内镜术. 第2版. 江苏: 江苏科学技术出版社, 1992:151
- 2 罗兰, 王为忠, 管文贤, 李秦, 冯颜, 郑建勇, 季刚. 肠道水疗仪用于结直肠癌术前准备的临床观察. 第四军医大学学报 2004;25:258-260
- 3 柳扬, 肖林华, 刘瑞琪, 坛继业, 介亚慧. 272例老年人结肠镜检查随访分析. 中华消化内镜杂志 2001;18:118-119
- 4 Valverde A, Hay JM, Fingerhut A, Boudet MJ, Petroni R, Pouliquen X, Msika S, Flamant Y. Senna vs polyethylene glycol for mechanical preparation the evening before elective colonic or rectal resection: a multicenter controlled trial. French Association for Surgical Research. Arch Surg 1999; 134:514-519
- 5 Zmora O, Pikarsky AJ, Wexner SD. Bowel preparation for colorectal surgery. Dis Colon Rectum 2001;44:1537-1549

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 •

## 两种剂量干复津联合利巴韦林治疗慢性丙型肝炎

王 帅, 胡大荣, 闻 炜, 龚利娟, 李 杨

王帅, 胡大荣, 闻炜, 龚利娟, 北京军区总医院肝病治疗中心 北京市 100700  
李杨, 军事医学科学院二所八室 北京市 100850

通讯作者: 王帅, 100700, 北京市东城区东四南门外 5 号, 北京军区总医院肝病治疗中心. shuaishuai73@163.com

电话: 010-66721183-201

收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-05-14

### 摘要

**目的:** 观察两种不同剂量干复津联合利巴韦林胶囊治疗慢性丙型肝炎的疗效及不良反应。

**方法:** 48 例慢性丙型肝炎患者随机分成两组, 每组 24 例。两组分别接受干复津 15  $\mu\text{g}$  和 9  $\mu\text{g}$  的治疗, 3 次/周, 并联合使用利巴韦林胶囊 900 mg/d, 疗程 24 wk。本研究以治疗结束时(24 wk)和随访结束时(48 wk)血清 ALT 复常和丙肝病毒核酸(HCV-RNA)转阴考核药物近期和远期疗效, 同时观察不良反应。

**结果:** 近期应答(ETR): 治疗结束(24 wk)时干复津 15  $\mu\text{g}$  组和 9  $\mu\text{g}$  组 ALT 复常率分别为 78.26% 和 79.17%, HCV-RNA 转阴率分别为 78.26% 和 70.83%, 完全应答率分别为 56.52% 和 54.17%。持续应答(SR): 随访结束(48 wk)时干复津 15  $\mu\text{g}$  组和 9  $\mu\text{g}$  组 ALT 复常率分别为 73.91% 和 70.83%, HCV-RNA 转阴率分别为 69.57% 和 66.67%, 完全应答率分别为 52.17% 和 50.00%。两组患者不良反应发生率无显著性差异。

**结论:** 两种不同剂量干复津治疗慢性丙型肝炎的疗效和安全性相似。

王帅, 胡大荣, 闻炜, 龚利娟, 李杨. 两种剂量干复津联合利巴韦林治疗慢性丙型肝炎. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1626-1627

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1626.asp>

### 0 引言

重组集成干扰素  $\alpha$  是一种重组的、非自然存在的 I 型干

扰素, 通过已知干扰素  $\alpha$  亚型序列筛选, 采用每个位点上最常见出现的氨基酸决定簇, 用基因重组技术复合而成。干复津(Infergen)是安进公司生产的重组集成干扰素  $\alpha$  的商品名。本研究对 48 例慢性丙型肝炎患者采用随机分组对照比较, 对两种不同剂量干复津分别联合利巴韦林治疗慢性丙型肝炎的疗效及安全性进行临床观察。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院 1997/2002 年门诊及住院慢性丙型肝炎患者 48 例, 其中男 26 例, 女 22 例, 19-57 岁, 平均 38.7 岁。全部病例血清 HCV-RNA 阳性, 病例均排除甲、乙、丁、戊型肝炎病毒感染, 不合并自身免疫性、酒精性、药物性、中毒性等肝炎, 诊断均符合 1995 年(北京)第五次全国传染病与寄生虫病学术会议的诊断标准。血清总胆红素 TBil < 34.2  $\mu\text{mol/L}$ , ALT < 10 倍正常值, ALB > 32 g/L; 血清 BUN、凝血酶原时间(PT)及活动度(PTA)均在正常范围; 外周血 WBC >  $3.5 \times 10^9/\text{L}$ , Hb 男性 > 120 g/L, 女性 > 110 g/L, 中性粒细胞 >  $1.5 \times 10^9/\text{L}$ , PLT >  $80 \times 10^9/\text{L}$ 。48 例患者随机分成两组, 其中干复津 15  $\mu\text{g}$  组(A 组)男 13 例, 女 11 例, 19-55 岁; 9  $\mu\text{g}$  组(B 组)男 13 例, 女 11 例, 23-57 岁。两组病例性别与年龄无统计学差异。

**1.2 方法** A 组采用重组集成干扰素  $\alpha$  注射液(美国安进公司生产, 干复津) 15  $\mu\text{g}$ , 每周 3 次, 皮下注射, 联合口服利巴韦林胶囊(温州第三制药厂生产) 450 mg, 每日 2 次。B 组采用 9  $\mu\text{g}$  干复津联合利巴韦林胶囊, 使用方法与 A 组相同。观察项目: 治疗前常规检查 PT、T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub>、抗核抗体(ANA)、HIV 抗体、胸片、心电图、血压、脉搏、肝脾及胆囊 B 超。治疗前、治疗中每隔 4 wk 及随访结束时化验血常规、肝肾功能。治疗前、治疗结束

#### 4 参考文献

- 1 吴锡琛. 消化道内镜术. 第2版. 江苏: 江苏科学技术出版社, 1992:151
- 2 罗兰, 王为忠, 管文贤, 李秦, 冯颜, 郑建勇, 季刚. 肠道水疗仪用于结直肠癌术前准备的临床观察. 第四军医大学学报 2004;25:258-260
- 3 柳扬, 肖林华, 刘瑞琪, 坛继业, 介亚慧. 272例老年人结肠镜检查随访分析. 中华消化内镜杂志 2001;18:118-119
- 4 Valverde A, Hay JM, Fingerhut A, Boudet MJ, Petroni R, Pouliquen X, Msika S, Flamant Y. Senna vs polyethylene glycol for mechanical preparation the evening before elective colonic or rectal resection: a multicenter controlled trial. French Association for Surgical Research. Arch Surg 1999; 134:514-519
- 5 Zmora O, Pikarsky AJ, Wexner SD. Bowel preparation for colorectal surgery. Dis Colon Rectum 2001;44:1537-1549

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 •

## 两种剂量干复津联合利巴韦林治疗慢性丙型肝炎

王 帅, 胡大荣, 闻 炜, 龚利娟, 李 杨

王帅, 胡大荣, 闻炜, 龚利娟, 北京军区总医院肝病治疗中心 北京市 100700  
李杨, 军事医学科学院二所八室 北京市 100850

通讯作者: 王帅, 100700, 北京市东城区东四南门外 5 号, 北京军区总医院肝病治疗中心. shuaishuai73@163.com

电话: 010-66721183-201

收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-05-14

### 摘要

**目的:** 观察两种不同剂量干复津联合利巴韦林胶囊治疗慢性丙型肝炎的疗效及不良反应。

**方法:** 48 例慢性丙型肝炎患者随机分成两组, 每组 24 例。两组分别接受干复津 15  $\mu\text{g}$  和 9  $\mu\text{g}$  的治疗, 3 次/wk, 并联合使用利巴韦林胶囊 900 mg/d, 疗程 24 wk。本研究以治疗结束时(24 wk)和随访结束时(48 wk)血清 ALT 复常和丙肝病毒核酸(HCV-RNA)转阴考核药物近期和远期疗效, 同时观察不良反应。

**结果:** 近期应答(ETR): 治疗结束(24 wk)时干复津 15  $\mu\text{g}$  组和 9  $\mu\text{g}$  组 ALT 复常率分别为 78.26% 和 79.17%, HCV-RNA 转阴率分别为 78.26% 和 70.83%, 完全应答率分别为 56.52% 和 54.17%。持续应答(SR): 随访结束(48 wk)时干复津 15  $\mu\text{g}$  组和 9  $\mu\text{g}$  组 ALT 复常率分别为 73.91% 和 70.83%, HCV-RNA 转阴率分别为 69.57% 和 66.67%, 完全应答率分别为 52.17% 和 50.00%。两组患者不良反应发生率无显著性差异。

**结论:** 两种不同剂量干复津治疗慢性丙型肝炎的疗效和安全性相似。

王帅, 胡大荣, 闻炜, 龚利娟, 李杨. 两种剂量干复津联合利巴韦林治疗慢性丙型肝炎. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1626-1627

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1626.asp>

### 0 引言

重组集成干扰素  $\alpha$  是一种重组的、非自然存在的 I 型干

扰素, 通过已知干扰素  $\alpha$  亚型序列筛选, 采用每个位点上最常见出现的氨基酸决定簇, 用基因重组技术复合而成。干复津(Infergen)是安进公司生产的重组集成干扰素  $\alpha$  的商品名。本研究对 48 例慢性丙型肝炎患者采用随机分组对照比较, 对两种不同剂量干复津分别联合利巴韦林治疗慢性丙型肝炎的疗效及安全性进行临床观察。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 我院 1997/2002 年门诊及住院慢性丙型肝炎患者 48 例, 其中男 26 例, 女 22 例, 19-57 岁, 平均 38.7 岁。全部病例血清 HCV-RNA 阳性, 病例均排除甲、乙、丁、戊型肝炎病毒感染, 不合并自身免疫性、酒精性、药物性、中毒性等肝炎, 诊断均符合 1995 年(北京)第五次全国传染病与寄生虫病学术会议的诊断标准。血清总胆红素 TBil < 34.2  $\mu\text{mol/L}$ , ALT < 10 倍正常值, ALB > 32 g/L; 血清 BUN、凝血酶原时间(PT)及活动度(PTA)均在正常范围; 外周血 WBC >  $3.5 \times 10^9/\text{L}$ , Hb 男性 > 120 g/L, 女性 > 110 g/L, 中性粒细胞 >  $1.5 \times 10^9/\text{L}$ , PLT >  $80 \times 10^9/\text{L}$ 。48 例患者随机分成两组, 其中干复津 15  $\mu\text{g}$  组(A 组)男 13 例, 女 11 例, 19-55 岁; 9  $\mu\text{g}$  组(B 组)男 13 例, 女 11 例, 23-57 岁。两组病例性别与年龄无统计学差异。

**1.2 方法** A 组采用重组集成干扰素  $\alpha$  注射液(美国安进公司生产, 干复津) 15  $\mu\text{g}$ , 每周 3 次, 皮下注射, 联合口服利巴韦林胶囊(温州第三制药厂生产) 450 mg, 每日 2 次。B 组采用 9  $\mu\text{g}$  干复津联合利巴韦林胶囊, 使用方法与 A 组相同。观察项目: 治疗前常规检查 PT、T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub>、抗核抗体(ANA)、HIV 抗体、胸片、心电图、血压、脉搏、肝脾及胆囊 B 超。治疗前、治疗中每隔 4 wk 及随访结束时化验血常规、肝肾功能。治疗前、治疗结束

及随访结束时用 RT-PCR 法检测 HCV-RNA. 并全程观察不良反应. 疗效判断: 近期应答 (ETR) 于 24 wk 治疗结束时判断, ALT 复常率和 HCV-RNA 转阴率为主要观察指标. 持续应答 (SR) 于随访 24 wk 结束时判断, 评判标准同近期应答. ALT 复常且 HCV-RNA 转阴为完全应答.

**统计学处理** 两组比较的  $t$  检验.  $P < 0.05$  为有统计学意义.

## 2 结果

A 组 24 例患者中有 1 例因精神症状未能完成治疗, 其余 23 例完成治疗, B 组 24 例患者均完成治疗. 在治疗 24 wk 结束时和随访 24 wk 结束时比较两组患者的 ALT 复常率和 HCV-RNA 转阴率. 近期应答: A 组患者 ALT 复常率和 HCV-RNA 转阴率分别为 78.26% 和 78.26%, 而 B 组分别为 79.17% 和 70.83%; A、B 两组的完全应答率分别为 56.52% 和 54.17%. 持续应答: A 组患者 ALT 复常率和 HCV-RNA 转阴率分别为 73.91% 和 69.57%, 而 B 组分别为 70.83% 和 66.67%; A、B 两组的完全应答率分别为 52.17% 和 50.00%. A 组近期及远期完全应答率均稍高于 B 组, 但并无统计学差异 ( $P > 0.05$ ).

两种方案治疗后出现不良反应的患者共计 42 例, 其中男 23 例 (占 23/26), 女 19 例 (占 19/22), 二者比较无显著性差异. 记录不良反应情况时分为轻度、中度、重度、威胁生命及致死五个级别, 除 A 组 1 例患者因精神症状 (严重抑郁) 未能完成治疗外, 其余不良反应均为轻或中度. A、B 两组患者不同程度发热分别为 18 例和 17 例, 坚持治疗 2 wk 左右体温逐渐恢复正常; WBC 下降 ( $2.5-4.7 \times 10^9/L$ ) 分别为 13 例和 12 例; 恶心、纳差等胃肠反应分别各为 12 例和 13 例; 肌痛分别 15 例和 12 例; 轻度脱发分别 4 例和 3 例. 两组比较, 不良反应发生率无显著性差异 ( $P > 0.05$ ).

## 3 讨论

重组集成干扰素  $\alpha$  分别于 1997-10 和 1997-12 被美国 FDA 和中国卫生部批准用于慢性丙型肝炎的治疗, 是近年国内外应用广泛的新型干扰素. 利巴韦林是治疗呼吸道合胞病毒和 HIV 感染的鸟苷类药. 国内外大量临床和基础研究表明, 干扰素和利巴韦林联合用药能增强慢性丙型肝炎患

者对于干扰素的应答率<sup>[1-2]</sup>.

本研究两组患者分别应用不同剂量干复津进行治疗, 两组之间在治疗 24 wk 及随访结束时 ALT 复常率、HCV-RNA 转阴率及完全应答率均无显著性差异, 但均优于其他干扰素的治疗效果<sup>[3-4]</sup>.

文献报道干扰素的不良反应具有剂量相关性<sup>[5]</sup>, 但本研究中两种干复津的各种不良反应发生率并无显著性差异, 而且不良反应程度均较轻. 干复津的确是一种安全有效的药物. 同时似乎提示: 患者对应用干复津治疗产生不良反应的剂量相关性并不明显, 发生不良反应的个体化差异似乎更为重要.

本研究两组患者疗效和不良反应发生率相似, 并不意味着 15  $\mu g$  干复津不甚经济实用. 因为其中不排除病例数量较少的因素影响, 并且 15  $\mu g$  干复津在丙型肝炎患者再治疗上的优越性是很突出的<sup>[6-7]</sup>.

慢性丙型肝炎的治疗问题一直困扰着我们临床医生, 干复津的问世一度给我们带来一线希望, 然而治疗效果仍然不能让我们满意. 但就目前治疗水平而言, 其仍为慢性丙型肝炎患者最理想的选择.

## 4 参考文献

- 1 Kallinowski B, Liehr H, Moeller B, Stremmel W, Wechsier JG, Wiese M, Goeser T. Combination therapy with interferon-alpha 2b and ribavirin for the treatment of relapse patients and non-responders with chronic HCV infection. *Z Gastroenterol* 2001;39:199-204
- 2 Bacosi M, Patsouri M, Migliorese L, Patrizi F, Russo F, Ricci GL. Combined treatment of HCV infection: is there a need for meta-analysis? *Hepatol Res* 2001;20:359-371
- 3 Lindsay KL. Therapy of hepatitis C: overview. *Hepatology* 1997;26(3 Suppl 1):71-77
- 4 Poynard T, Leroy V, Cohard M, Thevenot T, Mathurin P, Opoion P, Zarski JP. Meta-analysis of interferon randomized trials in the treatment of viral hepatitis C: effects of dose and duration. *Hepatology* 1996;24:778-789
- 5 张小帆, 奚倚. 两种干扰素治疗慢性乙型肝炎不良反应的观察. *现代医药卫生* 2003;19:403
- 6 Heathcote EJ, Keefe EB, Lee SS, Feinman SV, Tong MJ, Reddy KR, Albert DG Jr, Witt K, Blatt LM. Re-treatment of chronic hepatitis C with consensus interferon. *Hepatology* 1998;27:1136-1143
- 7 Heathcote EJ, James S, Mullen KD, Hauser SC, Rosenblatt H, Albert DG Jr. Chronic hepatitis C virus patients with breakthroughs during interferon treatment can successfully be re-treated with consensus interferon. The Consensus Interferon Study Group. *Hepatology* 1999;30:562-566

编辑 王谨晖 审读 张海宁

# 早期内镜下治疗急性胆源性胰腺炎 56 例

胡建文, 杜海军, 许冬兰

胡建文, 杜海军, 许冬兰, 浙江省东阳市人民医院消化科  
浙江省东阳市 322100  
通讯作者: 胡建文, 322100, 浙江省东阳市吴宁镇吴宁西路60号, 东阳市人民医院消化科. hujwqshcy@yahoo.com.cn.  
电话: 0579-6856133 传真: 0579-6856878  
收稿日期: 2005-03-31 接受日期: 2005-04-09

## 摘要

**目的:** 探讨早期内镜下治疗急性胆源性胰腺炎(AGP)的疗效。

**方法:** 在急性胆源性胰腺炎早期应用内镜逆行胰胆管造影术(ERCP)、经内镜鼻胆管引流(ENBD)及经内镜乳头括约肌切开(EST)治疗 AGP 56 例, 其中轻症胰腺炎 39 例, 重症胰腺炎 17 例。

**结果:** 治愈 54 例, 1 例重症胰腺炎内镜治疗后转外科手术, 1 例因合并急性心肌梗塞而死亡。

**结论:** 早期内镜下治疗 AGP 是安全和有效的, 对明确诊断 AGP 者应及早进行内镜下治疗。

胡建文, 杜海军, 许冬兰. 早期内镜下治疗急性胆源性胰腺炎 56 例. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1628-1629  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1628.asp>

## 0 引言

急性胆源性胰腺炎(acute gallstone pancreatitis, AGP)在我国是急性胰腺炎中最常见的类型, 目前对 AGP 是否早期内镜下治疗仍有争议, 本文总结我院2001-01/2004-10 间 56 例 AGP 患者进行早期十二指肠镜下逆行胰胆管造影(ERCP)、经鼻胆管引流(ENBD)及十二指肠乳头括约肌切开术(EST)和取石术治疗, 取得了较好的临床效果, 现总结报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2001-01/2004-10 我院 AGP 患者 56 例, 男 42 例, 女性 14 例, 年龄 26-83 岁, 平均 56.7 岁, 80 岁以上 3 例, 60-79 岁 38 例, 23-60 岁 15 例, 根据临床症状、体征、血淀粉酶检查及影像学检查(B超或CT)确诊为急性胰腺炎。AGP 的诊断标准<sup>[1]</sup>: (1) 上腹部疼痛, 同时伴有压痛; (2) 血淀粉酶或尿淀粉酶异常增高; (3) 血清胆红素 >40 mg/L 或 AKP >225U/L 或 ALT >75U/L; (4) B 超或 CT 检查提示胆总管下端结石, 胆总管不同程度扩张和急性胰腺炎改变; (5) 排除其他原因引起的胰腺炎(酒精性、高钙血症、高血脂症和外伤)。AGP 的严重程度根据 Ranson 标准<sup>[2]</sup>、APACHE-II 评分<sup>[3]</sup>, 入院时凡符合

Ranson 标准  $\geq 3$  分、APACHE-II 评分  $\geq 8$  分, 为重症急性胰腺炎(SAP), 凡达不到以上标准为轻型急性胰腺炎(MAP)。本组 SAP 17 例, MAP 39 例。本组 56 例患者均有较典型的急性胰腺炎表现, 上腹部疼痛 56 例(100%)、恶心呕吐 48 例(85.7%)、黄疸 44 例(78.6%)、总胆红素增高 49 例(87.5%)、ALT 增高 48 例(85.7%)、AKP 增高 36 例(64.2%)、WBC 增高 51 例(90.1%), 以中性粒细胞增高为主。

**1.2 方法** 患者入院后先行内科综合治疗, 包括吸氧、禁食、胃肠减压、补液, 纠正酸碱平衡及支持治疗、抗生素的应用以及使用质子泵抑制剂和生长抑素的应用。所有患者在入院后 48-72 h 内进行内镜下治疗。术前咽部局部麻醉、肌注安定 10 mg、哌替啶 75 mg、解痉灵 1 mg, 对所有患者在治疗过程中均给以吸氧。全部病例先行 ERCP 造影检查, 明确胆管梗阻部位、病变性质及程度后决定内镜治疗方法。对插管容易、胆汁流出较通畅、胆总管及乳头无明显狭窄; 胆总管结石 >2 cm 者, 单纯行 ENBD; 对乳头结石嵌顿、胆总管结石  $\leq 2$  cm、乳头狭窄等梗阻明显者行 EST, 根据结石的大小及乳头的不同形态, 决定切口大小; 切口均为中小切口(1-2 cm)。EST 后采用网篮取石, 尽可能取尽结石, 取石后放置 ENBD, ENBD 放置时间为 3-7 d。每天应用抗生素、生理盐水经鼻胆管进行稀释冲洗; 对不能取尽结石者或结石 >2 cm 者, 则待胰腺炎好转或痊愈后择期进行内镜取石或外科手术治疗。

## 2 结果

所有病例均成功进行了 ERCP、EST, 其中单纯行 ENBD 14 例, 42 例行 EST 后用取石网篮尽可能取尽结石, 然后放置 ENBD; 单纯 ENBD 中因结石直径 >2 cm 和经 EST 取石+ENBD 42 例中的 11 例因不能取尽结石或不能耐受当时取石者, 共 25 例则待胰腺炎好转或痊愈后择期进行第 2 次内镜下取石。56 例患者中顺利治愈 52 例, 内镜治疗后第 2 d 起, 黄疸开始消退, 腹痛有所缓解, 血淀粉酶多在 2-7 d 降到正常; 血象、总胆红素及其他生化指标在 2-10 d 内恢复正常; 患者症状、体征消失, 体温降至正常。治疗时间 7-15 d; 平均 9.6 d。1 例因早期内镜治疗后加重而转外科手术, 1 例因合并急性广泛性心肌梗塞而死亡; 2 例后期发生假性囊肿。ERCP 和 EST 术后均无明显重大并发症, 其中 11 例 EST 后切口有少量渗血, 经喷洒孟氏液和对症止血处理后出血停止。ENBD 治疗中未见内镜治疗相关并发症。

### 3 讨论

急性胰腺炎发病原因较多,胆石症是最常见发病原因,国内占50%以上<sup>[4]</sup>。胆石性胰腺炎的发病机制是由于结石嵌顿在Vater壶腹部或小结石不断通过壶腹部而引起Oddi括约肌痉挛水肿,阻塞了胆胰管共同通路,导致胆管内压力增高,胆汁逆流入胰管,激活胰蛋白酶原而诱发或加重胰腺炎的发作。因此治疗时必须及早迅速地解除梗阻,引流胆汁、胰液;降低胆管内压力和中止反流,保持胆汁和胰液的引流通畅,以阻断胰酶进一步被激活。

本组56例AGP均在发病早期(72 h内)行内镜下治疗,其中54例治愈,取得了显著的疗效。本组14例经ERCP发现胆总管结石>2 cm、胆总管扩张;以及EST+ENBD内镜治疗中的11例估计内镜治疗操作时间较长或需碎石或取石困难者,只行EST+ENBD或ENBD引流,而待急性胰腺炎好转或治愈后再行第二次内镜下取石或碎石后取石,同样也取得了良好的疗效。25例患者均治愈。故我们认为AGP患者,可以先行ENBD以及早迅速地解除梗阻,使胆、胰管引流通畅,并可以中止反流和阻断胰酶的进一步被激活;同时可以减低胆管内压力,黄疸消退,使肝功能也恢复正常。并可以缩短内镜操作时间、提高患者内镜治疗的耐受性和急诊内镜下ENBD的成功率;并能减少因内镜治疗而加重急性胰腺炎病情的可能性,降低了切开取石的风险。待病情好转后再作二次内镜下取石。已有研究表明<sup>[5-6]</sup>胆道梗阻时间与胰腺局部和全身的病理变化成正比,尽早除去结石能防止胰腺的进行性坏死,阻断胰腺炎的病理过程。Sarli *et al*<sup>[7]</sup>认为AGP患者应用ENBD是安全的,能阻断急性胰腺炎的重症化,故不论是否取出结石或取尽结石,均应常规行ENBD。因此,尽早引流胆、胰管终止胆汁持续进入胰腺是治疗AGP的关键。

内镜治疗AGP的同时也会出现内镜的并发症,虽然发生率较低,但也应引起足够的重视。EST常见的并发症为乳头切口出血、肠穿孔、胰腺炎症状加剧等。本组无一例并发肠穿孔,有11例EST后出现切口出血,经局部喷洒孟氏液及经保守治疗后治愈。我们认为只要患者凝血功能正常,乳头切口采用中小切口(1-2 cm),就既可以避免肠穿孔的发生,又可以减少切口出血。而在行ERCP、EST及ENBD等内镜操作中,应尽量争取选择性插管,禁忌诊断性的造影,对造影剂滞留者,应尽可能将其抽吸

干净。当选择胰管造影时,切勿反复插管,以免刺激损伤胰管开口,造成医源性胰管狭窄;注射造影剂时压力及速度需要严格控制,严禁腺泡显影。Christoforidis *et al*<sup>[8]</sup>认为ERCP后腺泡显影是发生胰腺炎的重要因素。并提出对急性胰腺炎患者特别是急性胆源性胰腺炎应尽早行ERCP,以明确诊断及尽早治疗。

尽管本组AGP的内镜下治疗取得了显著的疗效,同时许多临床研究也证实早期ERCP治疗AGP是安全有效的,但AGP的发病机制复杂,故认为对AGP的治疗应强调个体化的综合性治疗,有报道内镜联合应用施他宁<sup>[9]</sup>和中西医结合<sup>[10]</sup>治疗AGP能取得更好的疗效。

近年来,随着ERCP和EST的广泛开展,使胰腺炎外科治疗的传统观念发生巨大变化,目前关于AGP治疗方法观点基本一致<sup>[11-12]</sup>,即胰腺炎缓解后行确定胆道手术,包括胆囊切除、胆管取石及乳头狭窄切开手术。

### 4 参考文献

- 1 张中林,刘志苏,孙权. 急性胆源性胰腺炎预后影响因素分析. 肝胆外科杂志 2003;11:15-17
- 2 Ranson JH, Rifkind KM, Roses DF, Fink SD, Eng K, Spencer FC. Prognostic signs and the role of operative management in acute pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1974;139:69-81
- 3 Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE-II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818-829
- 4 丁谷华. 胰管反流与急性胆源性胰腺炎. 中华消化杂志 2001;21:315-316
- 5 Acosta JM, Rossi R, Galli OM, Pellegrini CA, Skinner DB. Early surgery for acute gallstone pancreatitis: evaluation of a systematic approach. *Surgery* 1978;83:367-370
- 6 张肇达,田伯乐. 急性胆源性胰腺炎. 中华肝胆外科杂志 2002;8:93
- 7 Sarli L, Iusco D, Sgobba G, Roncoroni L. Gallstone cholangitis: a 10-year experience of combined endoscopic and laparoscopic treatment. *Surg Endosc* 2002;16:975-980
- 8 Christoforidis E, Goulamaris I, Kanellos I, Tsalis K, Demetriades C, Betsis D. Post-ERCP pancreatitis and hyperamylasemia: patient-related and operative risk factors. *Endoscopy* 2002;34:286-292
- 9 沈建伟,徐咏仙,栾双梅,朱美萍,陈光兰. 思他宁联合早期内镜治疗急性胆石性胰腺炎. 胰腺病学 2003;3:220-222
- 10 付庆江,袁楠,曹立瀛,王宝强,刘四清,郭振武. 内镜治疗胆道阻塞性急性胰腺炎35例报告. 肝胆外科杂志 2003;11:24-26
- 11 李兆申,柏愚,王洛伟. 急性胆源性胰腺炎内镜治疗进展. 国外医学·消化系疾病分册 2004;24:1-3
- 12 Ashley SW, Perez A, Pierce EA, Brooks DC, Moore FD Jr, Whang EE, Banks PA, Zinner MJ. Necrotizing pancreatitis: contemporary analysis of 99 consecutive cases. *Ann Surg* 2001;234:572-579

编辑 王谨晖 审读 张海宁



# 磁共振血管成像对肝移植术后血管的评价

郭友, 张雪林, 陈 墨

郭友, 张雪林, 陈墨, 南方医科大学南方医院影像中心

广东省广州市 510515

通讯作者: 郭友, 510515, 广东省广州市广州大道北 1838 号, 南方医科大学南方医院影像中心.

电话: 0769-2223412-3601

收稿日期: 2005-04-20 接受日期: 2005-05-23

## 摘要

**目的:** 探讨磁共振血管造影(MRA)对肝移植术后血管解剖的显示及诊断并发症的价值.

**方法:** 11 例原位肝移植术后患者均用磁共振(MR)快速自选回波(TSE)序列及快速小角度激发梯度回波(FLASH)序列常规扫描、钆喷替酸葡甲胺(Gd-DTPA)动态增强 3D MRA 检查, 分析各序列图像特点.

**结果:** 术后血管正常 4 例. 血管并发症 7 例: 肝动脉过长迂曲 2 例, 肝动脉供体端瘤样轻度扩张 2 例; 门静脉轻度狭窄 2 例, 位于吻合口; 肝静脉末梢分支样扩张 2 例; 下腔静脉血栓 1 例.

**结论:** MRA 可清楚显示肝移植术后血管解剖并准确、快速诊断肝移植术后出现的血管并发症, 对指导临床诊断及治疗具有重要意义.

郭友, 张雪林, 陈墨. 磁共振血管成像对肝移植术后血管的评价. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1630-1632

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1630.asp>

## 0 引言

肝移植是目前公认的肝脏终末期疾病治疗方法之一, 但与肝移植手术相关的术后并发症, 特别是血管并发症, 仍然是导致移植肝功能衰竭和患者死亡的主要原因之一. 磁共振血管造影(MRA)作为一种安全、无创、精确的影像技术已成为早期发现肝移植后血管并发症的一种重要手段<sup>[1-5]</sup>. 我们分析 11 例原位肝移植术后 MRA 影像学表现, 并结合文献复习探讨 MRA 对肝移植术后血管解剖的显示及并发症的诊断价值.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 收集东莞市人民医院和南方医院 2002-07/2004-12 同时具有 MR 和多普勒超声资料的 11 例肝移植患者, 全为男性, 年龄 40-58 岁, 平均 49 岁. 术前临床诊断为原发性肝癌 2 例, 重症肝硬化 9 例. 9 例行原位经典式肝移植, 所有血管采用端端吻合, 2 例行背驮式原位肝移植术, 其下腔静脉采用端侧吻合, 肝动脉及门静脉端端吻合. 移植后至首次

MRA 检查最短时间为 15 d, 最长为 2 a. 复查间隔时间为每月 1 次, 3 次以后根据病情延长为每 2-3 月 1 次. 所有患者均在 MRA 检查的同时行多普勒超声检查.

**1.2 方法** 11 例患者移植术后共作 MR 检查 25 次. MRA 成像应用超导型 Siemens 1.5 T 系统及 TORSOPA 相控阵线圈. (1) MR 平扫: 冠状面定位相: 真实稳态进动快速成像(true FISP) T<sub>2</sub>WI, TR 4.3 ms, TE 2.1 ms, 视野(FOV) 42 cm × 45 cm, 矩阵 360 × 512. 上腹部轴面常规 FLASH T<sub>1</sub>WI: TR 107 ms, TE 4.8 ms; TSE T<sub>2</sub>WI: TR 4 000 ms, TE 101 ms. FOV 26 cm × 35 cm, 层厚 6 mm, 层间距 1.8 mm, 矩阵 230 × 512. T<sub>1</sub>WI 包括不抑脂和抑脂序列, T<sub>2</sub>WI 序列抑脂. 所有序列均屏气扫描. (2) 三维增强磁共振血管成像(3D-CE-MRA): 用高压注射器以 3 mL/s 流率经肘静脉注射 0.3 mmol/kg 对比剂钆喷替酸葡甲胺(Gd-DTPA)和 30 mL 生理盐水. 采用团注对比剂测试时间以计算扫描延迟时间, 分三次扫描获得动脉期、门静脉期和腔静脉期图像. 原始图像行 MIP 和 MPR 重建. (3) 增强扫描: 在 MRA 成像后, 迅速采用与平扫 FLASH T<sub>1</sub>WI 抑脂序列完全相同参数行轴面和冠状面扫描.

## 2 结果

**2.1 MRA 对血管解剖的显示** 3D-CE-MRA 原始图像 MIP 重建及容积或者曲面 MPR 重建可以很好显示血管吻合口以及迂曲血管走行. 可显示从腹腔干到肝内动脉的近段分支(图 1AB)、门静脉主干及分支、脾静脉、肠系膜上静脉(图 1C)和肝静脉及下腔静脉(图 1CD).

**2.2 移植术后血管正常表现** 肝动脉、门静脉和下腔静脉吻合口通畅 3 例(图 1A). 1 例供体门静脉管径略小于受体门静脉. 肝移植术后早期 MR T<sub>2</sub>WI 图像见到门静脉周围高信号 1 例, 持续 3 wk 后消失.

**2.3 血管并发症** 肝动脉过长迂曲 2 例, 肝动脉供体端瘤样轻度扩张 2 例(图 1B), 但肝动脉末梢分支显影正常. 门静脉轻度狭窄 2 例, 位于吻合口(图 1C), 且门静脉供体段与受体段的管径不相等, 门静脉肝内分支均正常. 肝静脉末梢分支样扩张 2 例(图 1D), 而其下腔静脉未见异常. 下腔静脉血栓 1 例, MR 表现为高信号血管腔内椭圆形低无信号区. 追踪复查, 2 例肝静脉末梢分支样扩张患者 6 mo 后肝静脉末梢分支扩张程度降低, 但仍有轻度扩张, 下腔静脉血栓治疗 1 mo 后多普勒超声及 MRA 复查血栓消失. 其余血管并发症影像学表现均无明显变化.

**2.4 多普勒超声** 1 例肝动脉过长迂曲合并肝动脉供体端瘤样轻度扩张诊断为肝动脉过长迂曲. 门静脉轻度狭窄 1 例

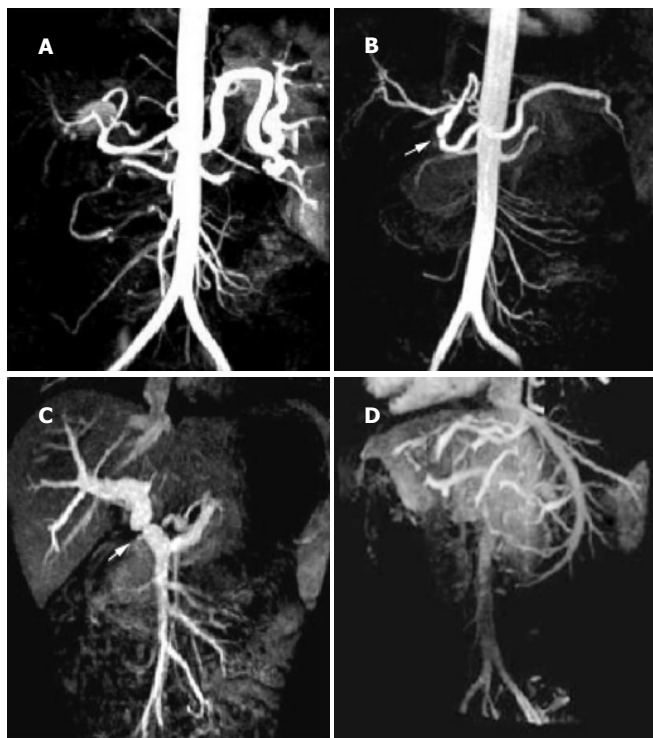


图1 3D-CE-MRA MIP重建图像. A: 从腹主动脉到肝内动脉的近段分支, 肝动脉吻合口通畅, 未见狭窄. 脾动脉扩张. B: 肝动脉供体端瘤样轻度扩张, 肝动脉末梢分支显影正常, 箭头所指为肝动脉吻合口. C: 门静脉、脾静脉、肠系膜上静脉和下腔静脉吻合口清楚显示, 门静脉吻合口(箭头所指)轻度狭窄. 门静脉供体段主干较受体段粗, 门静脉肝内分支均正常. D: 肝静脉末梢分支杵状扩张.

诊断为正常, 1例诊断为可疑狭窄. 肝静脉末梢分支杵状扩张未发现. 其余诊断与MRA相符.

### 3 讨论

3.1 影像学检查方法的比较 多普勒超声对肝移植术后并发症的检测价值已被广泛研究, 多数学者认为超声发现血栓形成和血管狭窄的灵敏度相当高, 然而其对血管吻合口的直接显示较困难<sup>[6]</sup>. 不同学者对多普勒超声诊断血栓形成和狭窄的结果不同. 从本组实验看MRA对血管解剖的显示及并发症的诊断均优于多普勒超声, 所以MRA可有效弥补多普勒超声的缺陷.

MR检查比计算机断层成像(CT)或多普勒超声困难得多. 但是, 在约40 min的MR检查过程中, 绝大多数患者能够配合检查. 屏气时间通常为15-20 s. 对于缺氧患者可适当调整扫描视野和空间分辨率等以降低扫描时间. MR可实现“一站式”检查, 即一次检查可获得腹部血管、胰胆管成像以及上腹部器官的形态学改变. 而且, MR对比剂毒副作用很小. CT因为其X线辐射以及对比剂肝、肾毒性的限制, 不适合肝移植术后反复应用. 数字减影血管造影术对血管分支显影良好, 但是对迂曲血管难以充分显示其走行的细节, 而且是有创性检查, 患者难以接受.

3.2 肝移植术后正常的血管表现 熟悉肝移植术后正常的MRA表现有助于正确评价肝移植术后并发症<sup>[3, 5-6]</sup>. 肝移

植术后最完美的血管表现是吻合口通畅, 血管分支移行正常. 肝移植术后早期MR T<sub>2</sub>WI图像常可见到门静脉周围高信号, 可持续数周. 门静脉周围异常高信号与移植手术阻断淋巴正常引流而导致淋巴水肿有关. 肝移植术后早期肝门门静脉可有暂时狭窄, 可能与周围水肿有关. 供体门静脉管径与受体门静脉不相等, 这也是肝移植术后较常见的表现.

3.3 移植术后血管并发症 MRA 评价 3D-CE-MRA作为一种相对较新的影像技术, 其最优化的扫描参数还未统一. 本组实验采用更薄层厚、更短的TR以缩短扫描时间, 屏气扫描, 因为屏气完全时运动伪影相对较少, 血管末梢分支显影更清楚. 运用零插入内插法K空间填充技术、脂肪抑制扫描、部分重叠重建后处理可使图像质量获得质的提高<sup>[7]</sup>. 本组实验所有病例均采用团注对比剂测试时间以计算扫描延迟时间, 从而获得最佳扫描时期.

血管并发症主要包括血管吻合口狭窄和血栓形成. 文献报道肝动脉狭窄的发生率为11%, 肝动脉血栓形成是最常见、最具破坏性的血管并发症<sup>[8]</sup>, 其成人肝移植术后的发生率为4-12%, 而儿童肝移植术后的发生率高达42%. 静脉并发症的发生率低于动脉并发症, 门静脉血栓形成和狭窄的发生率为1-2%, 下腔静脉并发症的发生率低于1%. 但本组实验中仅见1例血栓形成, 可能与移植术前准备充分、术后预防措施得力有关.

本组实验中肝动脉过长迂曲及肝固有动脉供体段瘤样轻度扩张可能与手术操作有关. 肝动脉瘤样扩张文献报道仅有假性动脉瘤<sup>[2]</sup>, 但是本例不支持假性动脉瘤的诊断, 因为该瘤壁在增强延迟期未见强化表现, 而且术后1 a内3次CE-MRA检查肝动脉改变无明显变化. 另外肝静脉末梢分支杵状扩张, 可能与排斥反应有关. 以上两种血管改变均未见文献报道类似并发症, 尚待进一步研究.

总之, 磁共振血管造影作为一种非侵袭性影像检查方法, 可清楚显示肝移植术后血管解剖并准确、快速诊断肝移植术后出现的血管并发症, 对指导临床诊断及治疗具有重要意义.

### 4 参考文献

- 1 Pandharipande PV, Lee VS, Morgan GR, Teperman LW, Krinsky GA, Rofsky NM, Roy MC, Weinreb JC. Vascular and extravascular complications of liver transplantation: comprehensive evaluation with three-dimensional contrast-enhanced volumetric MR imaging and MR cholangiopancreatography. *Am J Roentgenol* 2001;177:1101-1107
- 2 Glockner JF, Forauer AR, Solomon H, Varma CR, Perman WH. Three-dimensional gadolinium-enhanced MR angiography of vascular complications after liver transplantation. *Am J Roentgenol* 2000;174:1447-1453
- 3 Ito K, Siegelman ES, Stolpen AH, Mitchell DG. MR imaging of complications after liver transplantation. *Am J Roentgenol* 2000;175:1145-1149
- 4 Stafford-Johnson DB, Hamilton BH, Dong Q, Cho KJ, Turcotte JG, Fontana RJ, Prince MR. Vascular complications of liver transplantation: evaluation with gadolinium-enhanced MR angiography. *Radiology* 1998;207:153-160
- 5 Nghiem HV, Tran K, Winter TC 3rd, Schmiedl UP, Althaus SJ, Patel NH, Freeny PC. Imaging of complications in liver

- transplantation. *Radiographics* 1996;16:825-840
- 6 Crossin JD, Muradali D, Wilson SR. US of liver transplants: normal and abnormal. *Radiographics* 2003;23:1093-1114
- 7 Lee VS, Lavelle MT, Rofsky NM, Laub G, Thomasson DM, Krinsky GA, Weinreb JC. Hepatic MR imaging with a dynamic contrast-enhanced isotropic volumetric interpolated breath-hold examination: feasibility, reproducibility, and technical quality. *Radiology* 2000;215:365-372
- 8 Nolten A, Sproat IA. Hepatic artery thrombosis after liver transplantation: temporal accuracy of diagnosis with duplex US and the syndrome of impending thrombosis. *Radiology* 1996;198:553-559

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 •

## 两种剂量生长抑素序贯治疗静脉曲张破裂反复大出血

李迎春, 王 萍, 周 红, 李 爽

李迎春, 周红, 李爽, 上海市宝山中心医院消化内科 上海市 239000  
王萍, 上海市宝山中心医院物理诊断科 上海市 239000  
通讯作者: 李迎春, 239000, 上海市友谊路 181 号, 上海市宝山中心医院  
消化内科. alanycli@yahoo.com.cn  
电话: 021-56601100 传真: 021-36070892  
收稿日期: 2005-04-20 接受日期: 2005-05-14

### 摘要

**目的:** 观察两种剂量生长抑素(施他宁)序贯应用治疗肝硬化食管胃底静脉曲张破裂反复大出血的治疗效果和安全性。

**方法:** 反复大出血患者 47 例, 分为 2 组, 施他宁 250  $\mu\text{g/h}$  和 500  $\mu\text{g/h}$  序贯剂量组 26 例, 施他宁 250  $\mu\text{g/h}$  常规剂量组 21 例。

**结果:** 再次止血开始时间序贯组为  $3.22 \pm 1.39$  h, 常规剂量组为  $9.25 \pm 6.04$  h, 有显著差异性( $P < 0.001$ ); 再次出血停止时间序贯组为  $5.11 \pm 1.62$  h, 常规剂量组为  $14.87 \pm 9.11$  h, 有显著差异性( $P < 0.01$ ); 24 h 和 48 h 止血成功率序贯组 88.46% (23/26) 和 96.15% (25/26), 明显高于常规剂量组的 47.61% (10/21) 和 71.43% (14/21) ( $P < 0.005$  和  $P < 0.01$ )。近期再出血率: 序贯组 7.69% (2/26), 常规剂量组 28.57% (6/21), 有显著差异性( $P < 0.005$ )。平均输血量: 序贯组  $384.62 \pm 137.67$  mL, 少于常规剂量组的  $580.95 \pm 153.68$  mL, 有显著差异性( $P < 0.05$ )。死亡率: 序贯组 3.85% (1/26), 常规剂量组 33.34% (7/21), 有显著差异性( $P < 0.05$ )。两组均未发生明显不良反应。

**结论:** 两种剂量施他宁序贯治疗对重度肝硬化食管静脉曲张破裂反复大出血的疗效优于常规剂量组, 且止血时间快, 近期再出血率低, 死亡率下降, 无不良反应。

李迎春, 王萍, 周红, 李爽. 两种剂量生长抑素序贯治疗静脉曲张破裂反复大出血. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1632-1634  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1632.asp>

### 0 引言

食管胃底静脉曲张破裂大出血是肝硬化患者的常见死亡原因, 随着生长抑素(Stilamin, 商品名施他宁)等药物的临床应用, 止血成功率明显提高<sup>[1]</sup>, 但仍有部分患者止血效果不满意, 或反复再次出血, 而早期再出血是大部分死亡病例的主要死因<sup>[2]</sup>。为提高对这部分反复出血患者的止血治疗效果, 降低死亡率, 我们 1998-01/2005-01 采用两种剂量施他宁序贯治疗重度肝硬化食管胃底静脉曲张破裂反复大出血的患者, 报告如下。

### 1 材料和方法

1.1 材料 病例组为 1998-01/2005-01 因上消化道大出血住院且治疗期间再次或反复出血病例, 临床表现为呕血和/或黑便, 并经临床、实验室及 B 超或 CT 证实为肝硬化, 胃镜证实为食管胃底静脉曲张破裂出血的患

- transplantation. *Radiographics* 1996;16:825-840
- 6 Crossin JD, Muradali D, Wilson SR. US of liver transplants: normal and abnormal. *Radiographics* 2003;23:1093-1114
- 7 Lee VS, Lavelle MT, Rofsky NM, Laub G, Thomasson DM, Krinsky GA, Weinreb JC. Hepatic MR imaging with a dynamic contrast-enhanced isotropic volumetric interpolated breath-hold examination: feasibility, reproducibility, and technical quality. *Radiology* 2000;215:365-372
- 8 Nolten A, Sproat IA. Hepatic artery thrombosis after liver transplantation: temporal accuracy of diagnosis with duplex US and the syndrome of impending thrombosis. *Radiology* 1996;198:553-559

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 •

## 两种剂量生长抑素序贯治疗静脉曲张破裂反复大出血

李迎春, 王 萍, 周 红, 李 爽

李迎春, 周红, 李爽, 上海市宝山中心医院消化内科 上海市 239000  
王萍, 上海市宝山中心医院物理诊断科 上海市 239000  
通讯作者: 李迎春, 239000, 上海市友谊路 181 号, 上海市宝山中心医院  
消化内科. alanycli@yahoo.com.cn  
电话: 021-56601100 传真: 021-36070892  
收稿日期: 2005-04-20 接受日期: 2005-05-14

### 摘要

**目的:** 观察两种剂量生长抑素(施他宁)序贯应用治疗肝硬化食管胃底静脉曲张破裂反复大出血的治疗效果和安全性。

**方法:** 反复大出血患者 47 例, 分为 2 组, 施他宁 250  $\mu\text{g/h}$  和 500  $\mu\text{g/h}$  序贯剂量组 26 例, 施他宁 250  $\mu\text{g/h}$  常规剂量组 21 例。

**结果:** 再次止血开始时间序贯组为  $3.22 \pm 1.39$  h, 常规剂量组为  $9.25 \pm 6.04$  h, 有显著差异性( $P < 0.001$ ); 再次出血停止时间序贯组为  $5.11 \pm 1.62$  h, 常规剂量组为  $14.87 \pm 9.11$  h, 有显著差异性( $P < 0.01$ ); 24 h 和 48 h 止血成功率序贯组 88.46% (23/26) 和 96.15% (25/26), 明显高于常规剂量组的 47.61% (10/21) 和 71.43% (14/21) ( $P < 0.005$  和  $P < 0.01$ )。近期再出血率: 序贯组 7.69% (2/26), 常规剂量组 28.57% (6/21), 有显著差异性( $P < 0.005$ )。平均输血量: 序贯组  $384.62 \pm 137.67$  mL, 少于常规剂量组的  $580.95 \pm 153.68$  mL, 有显著差异性( $P < 0.05$ )。死亡率: 序贯组 3.85% (1/26), 常规剂量组 33.34% (7/21), 有显著差异性( $P < 0.05$ )。两组均未发生明显不良反应。

**结论:** 两种剂量施他宁序贯治疗对重度肝硬化食管静脉曲张破裂反复大出血的疗效优于常规剂量组, 且止血时间快, 近期再出血率低, 死亡率下降, 无不良反应。

李迎春, 王萍, 周红, 李爽. 两种剂量生长抑素序贯治疗静脉曲张破裂反复大出血. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1632-1634  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1632.asp>

### 0 引言

食管胃底静脉曲张破裂大出血是肝硬化患者的常见死亡原因, 随着生长抑素(Stilamin, 商品名施他宁)等药物的临床应用, 止血成功率明显提高<sup>[1]</sup>, 但仍有部分患者止血效果不满意, 或反复再次出血, 而早期再出血是大部分死亡病例的主要死因<sup>[2]</sup>。为提高对这部分反复出血患者的止血治疗效果, 降低死亡率, 我们 1998-01/2005-01 采用两种剂量施他宁序贯治疗重度肝硬化食管胃底静脉曲张破裂反复大出血的患者, 报告如下。

### 1 材料和方法

1.1 材料 病例组为 1998-01/2005-01 因上消化道大出血住院且治疗期间再次或反复出血病例, 临床表现为呕血和/或黑便, 并经临床、实验室及 B 超或 CT 证实为肝硬化, 胃镜证实为食管胃底静脉曲张破裂出血的患

者.同时排除:(1)合并食管贲门撕裂综合征、急性胃黏膜病变、消化道溃疡等可引起上消化道出血的非静脉曲张性消化道出血性疾病.(2)严重的心肺功能不全者.(3)孕妇或哺乳期妇女.(4)对本药有严重反应而终止治疗者(不作为疗效统计数,但需记录在不良反应中).(5)因不可预料因素而中断本药治疗者.符合上述条件的入选患者共47例,分为常规剂量组21例,序贯治疗组26例.其中男29例,女18例,年龄35-76岁,平均48.2岁;入院时肝功能Child-Pugh分级B级15例,C级32例;凝血酶原时间均延长;二组患者均有明确的肝炎后肝硬化病史,病程7-21 a.病史中出血次数2-5次.出血量大于800-1 000 mL/24 h.二组病例的年龄、性别、病程、出血次数及出血量、肝功能分级等一般情况具有可比性,统计学无显著差异.

## 1.2 方法

1.2.1 分组及治疗方法 (1)分组:本研究采用回顾性对照试验:1998-01/2001-06治疗的患者予以施他宁250  $\mu$ g/h常规剂量治疗(常规剂量组);2001-07/2005-01治疗的患者先予以250  $\mu$ g/h常规剂量再予以500  $\mu$ g/h加倍剂量序贯治疗(序贯治疗组).(2)给药方法:全部患者入院后即给予施他宁250  $\mu$ g,缓慢静脉注射(不少于5 min),冲击治疗后,再予以施他宁250  $\mu$ g/h,总量600  $\mu$ g加入1 000 mL液体中,静脉滴注,以输液微泵控制维持24 h.24 h内再出血时:序贯治疗组仍先予以施他宁250  $\mu$ g,缓慢静脉注射(不少于5 min)后,再予以加倍剂量施他宁500  $\mu$ g/h,总量1 200  $\mu$ g加入1 000 mL液体中,静脉滴注,微泵维持24 h有效者再连用4 d;常规剂量组同样给予施他宁250  $\mu$ g,缓慢静脉注射(不少于5 min),冲击治疗后,仍予以施他宁250  $\mu$ g/h,总量600  $\mu$ g加入1 000 mL液体中,静脉滴注,以输液微泵控制维持24 h,有效者再连用4 d.二组病例在继续治疗无效时则改用其他疗法.(3)注意事项:两组患者在治疗观察期间均予以凝血酶、止血敏、止血环酸、VitK1及质子泵抑制剂及保肝等一般性药物治疗,不用其他降低门脉压的药物;治疗观察期间均放置三腔二囊管(气囊不充气),不进行胃镜检查及治疗;必要时可予以输血治疗;对用药24 h后出血仍严重且出现危及生命情况时,则增加其他治疗措施.

1.2.2 观察指标 (1)治疗前后予以床边监护仪详细监测生命体征血压、脉搏,检测尿量、呕血和/或大便次数、量及颜色和临床症状.(2)用适量生理盐水定时进行胃管冲洗以便观察胃管抽吸液的量和颜色.(3)治疗前和治疗结束后行血常规、尿常规、粪常规及隐血、肝肾功能、凝血全套及心电图等检查.(4)记录用药前后的输血量及药物副反应.

1.2.3 疗效判断 (1)再次出血标准:治疗观察期间出血停止后临床再次出现呕血或便血,胃管内抽出液由清亮又转为血性,或用药24 h胃管抽吸液颜色仍为血性.(2)再次止血开始时间:用药后患者呕血和/或便血停止,胃管抽吸

液量减少且胃液颜色明显变淡(如转为浅咖啡色),血压及心率恢复正常且稳定.(3)再次出血停止时间:胃管抽吸液转为清亮,血压、脉搏持续稳定,Hb和RBC稳定.(4)近期再出血率:治疗2 wk内再次出现上消化道出血.疗效判断:据上述再次出血停止时间,判定从开始治疗至24 h、48 h止血率和近期再出血率.

**统计学处理** 本研究计量资料用 $t$ 检验;计数资料用 $\chi^2$ 检验及校正 $\chi^2$ 检验.

## 2 结果

2.1 输血情况 因本研究对象为再出血病例,且出血量较大,均予以输血治疗.平均输血量:序贯组为384.62  $\pm$  137.67 mL,常规剂量组为580.95  $\pm$  153.68 mL,两组比较差异显著( $t = 2.6481, P < 0.05$ ).

2.2 止血时间与止血成功率 见表1、2.

2.3 近期再出血率 见表3.

表1 二组止血时间比较(mean  $\pm$  SD)

分组	再次止血开始时间	再次出血停止时间
序贯治疗组(26例)	3.22 $\pm$ 1.39	5.11 $\pm$ 1.62
常规剂量组(21例)	9.25 $\pm$ 6.04	14.87 $\pm$ 9.11
$t$ 值	4.9430	5.3722
$P$	<0.05	<0.01

表2 二组止血成功率比较

分组	止血(%)		未止血(%)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
序贯治疗组(26例)	23(88.46)	25(96.15)	3(11.54)	1(3.85)
常规剂量组(21例)	10(47.61)	14(66.67)	11(52.39)	7(33.33)
$\chi^2$ 值(校正 $\chi^2$ 值)	9.2609	(5.2162)		
$P$	<0.005	<0.01		

表3 二组近期再出血率比较

分组	未出血(%)	再出血(%)
序贯治疗组(26例)	24(92.31)	2(7.69)
常规剂量组(21例)	15(71.43)	6(28.57)
$\chi^2$ 值		20.4402
$P$		<0.005

2.4 死亡率 序贯组1例死亡,死亡率3.85%(1/26),常规组死亡7例,死亡率33.34%(7/21),两组比较,有显著差异(校正 $\chi^2 = 5.2162, P < 0.05$ ).

2.5 不良反应 比较治疗前后的血液生化及肝肾功能、凝血酶原时间、心电图、及临床肝功能分级等均无显著差异.临床应用中出现不良反应.

## 3 讨论

食管胃底静脉曲张破裂出血的死亡率可达30-70%,反复

出血的发生率80%<sup>[3]</sup>.反复出血的死亡率更高,大部分死亡发生在早期再出血,常在入院后的第1 wk内死亡<sup>[2]</sup>.如何降低这部分患者的死亡率,关键在于早期及时有效的止血.由于肝功能损害严重如Child分级为B、C级时,凝血因子合成减少,当食管胃底静脉曲张破裂大出血时,临床常因出血量大合并有血液动力学异常,出血后心肌缺血及并发肝昏迷等,病情凶险,常不能耐受内镜下局部硬化剂、套扎治疗或外科手术治疗.此时作为内科传统的常规抢救手段的三腔二囊管压迫止血法和垂体后叶素、特利加压素等药物治疗因有一定的副作用和失败率,临床应用受到一定的限制.而早期药物治疗,尤其在控制出血上,生长抑素显示出比其他药物更显著的优势,且副作用更少,故到目前为止,生长抑素可能是治疗静脉曲张出血的最佳选择,并可能大大改善预后<sup>[1]</sup>,为内镜或手术治疗创造条件.

但即便如此,仍有约10-20%的急性静脉曲张破裂出血患者对药物或内镜治疗反应较差<sup>[2]</sup>.本组资料显示这部分病例多为肝功能极差,Child分级B、C级的患者,可能与长期门脉压增高至奇静脉代偿性曲张及血流量较大有关,因而在活动性出血期间,任何可诱发门脉压升高及奇静脉血流增大的因素,如过度输血、输液和肠道内积血等,都可诱发再次出血致病情恶化<sup>[4]</sup>.本研究表明两种剂量生长抑素序贯治疗重度肝硬化静脉曲张反复破裂大出血或对药物治疗无反应、反应较差的患者,在缩短止血时间及再次出血停止时间、提高止血成功率、减少输血量及降低近期再出血率、尽快恢复血流动力学,减少并发症的发生几率和降低死亡率等方面疗效优于常规剂量组,经统计学检验有显著性差异.因此我们认为对重度肝硬化患者反复大出血时的药物止血关键必须能确实有效的降低门脉压,尤其是将奇静脉血流迅速降低并维持在较低状态.Cirera *et al*<sup>[5]</sup>研究表明,通过肝静脉压梯度(HVPG)的测量,250  $\mu\text{g}$ 常规剂量生长抑素静脉缓慢注射可引起门脉压迅速显著降低,奇静脉血流(AzBF)也显著降低,但静脉滴注常规剂量生长抑素浓度为250 $\mu\text{g}/\text{h}$ 时对奇静脉血流(AzBF)没有任何作用,而静脉滴注浓度在500  $\mu\text{g}/\text{h}$ 则可引起AzBF下降并维持到给药结束.Moitinho *et al*<sup>[6]</sup>研究发现,常规剂量生长抑素250  $\mu\text{g}/\text{h}$ 的静脉输

注量在很大程度上是基于临床经验而非剂量探索的血液动力学研究,接受500  $\mu\text{g}/\text{h}$ 输注量治疗的患者出血停止时间显著缩短,出血控制率更高,生存率更高、死亡率更低,无严重副反应.本组资料观察结果与文献报道相符,提示生长抑素序贯治疗重度肝硬化静脉曲张破裂反复大出血的机理正是通过有效、持久地将门脉压进一步降低尤其是降低奇静脉血流及奇静脉压而有效地控制出血.未发现明显的不良反应,对凝血功能及肝肾功能无明显影响.

Burroughs *et al*<sup>[1]</sup>推荐在治疗的首个小时内注射三次250  $\mu\text{g}$ ,静脉输注剂量500  $\mu\text{g}/\text{h}$ 生长抑素,可以在肝硬化患者取得实质性的血液动力学效应.结合我国患者的实际情况,我们建议,在抢救肝硬化门脉高压食管胃底静脉曲张破裂反复大出血的危重患者,尤其肝功能重度损害、不能耐受或无条件进行内镜下治疗或手术治疗的,在常规剂量生长抑素治疗12-24 h无效既予以生长抑素序贯治疗,可提高止血成功率,降低死亡率,从而为进一步抢救治疗赢得宝贵时间、创造条件使内镜及手术治疗成为可能,不失为一种相对有效的治疗手段,具有一定的临床实用价值.

#### 4 参考文献

- 1 Burroughs AK, Planas R, Svoboda P. Optimizing emergency care of upper gastrointestinal bleeding in cirrhotic patients. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1998;33:14-24
- 2 Garcia-Tsao G. Current management of the complications of cirrhosis and portal hypertension: variceal hemorrhage, ascites, and spontaneous bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 2001; 120:726-748
- 3 许国铭, 李石. 现代消化病学. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 1999:421-431
- 4 Villanueva C, Ortiz J, Minana J, Soriano G, Sabat M, Boadas J, Balanzo J. Somatostatin treatment and risk stratification by continuous portal pressure monitoring during acute variceal bleeding. *Gastroenterology* 2001;121:110-117
- 5 Cirera I, Feu F, Luca A, Gareia-Pagan JC, Fernandez M, Escorsell A, Bosch J, Rodes J. Effects of bolus injections and continuous infusions of somatostatin and placebo in patients with cirrhosis: a double-blind hemodynamic investigation. *Hepatology* 1995;22:106-110
- 6 Moitinho E, Planas R, Banares R, Albillos A, Ruiz-del-Arbol L, Galvez C, Bosch J; Vascular Bleeding Study Group. Multicenter randomized controlled trial comparing different schedules of somatostatin in the treatment of acute variceal bleeding. *J Hepatol* 2001;35:712-718

编辑 王谨晖 审读 张海宁

• 临床经验 •

# 十二指肠溃疡瘢痕狭窄梗阻内镜下球囊扩张治疗 28 例

吴杰, 贾叶贵, 李红燕, 陈时, 甘洪颖, 胡赤丁, 张勇

吴杰, 贾叶贵, 李红燕, 陈时, 甘洪颖, 胡赤丁, 张勇, 江汉大学附属医院(武汉市第六医院)消化科 湖北省武汉市 430015

通讯作者: 吴杰, 430015, 湖北省武汉市, 江汉大学附属医院(武汉市第六医院)消化科, wujie988@sina.com

收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

## 摘要

**目的:** 观察十二指肠溃疡瘢痕狭窄梗阻内镜下球囊扩张治疗疗效。

**方法:** 根据临床表现和内镜诊断 28 例十二指肠溃疡伴狭窄梗阻患者均收入院内科严格保守治疗 1 wk 无好转, 行内镜下球囊扩张治疗, 并观察其疗效。

**结果:** 28 例十二指肠溃疡伴狭窄梗阻患者一次扩张治疗无复发的 25 例(89.3%), 3 例复发经第二次扩张治疗再无复发, 总有效率 100%(28/28), 2 例出现穿孔(7.1%), 内科保守治疗治愈。

**结论:** 内镜下球囊扩张治疗十二指肠溃疡瘢痕狭窄梗阻是一种安全、方便、患者痛苦小、易接受、副反应少及费用低的临床适用方法。

吴杰, 贾叶贵, 李红燕, 陈时, 甘洪颖, 胡赤丁, 张勇. 十二指肠溃疡瘢痕狭窄梗阻内镜下球囊扩张治疗 28 例. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1635-1636  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1365.asp>

## 0 引言

十二指肠溃疡是临床常见疾病, 瘢痕狭窄是其常见并发症, 在治疗上过去以手术治疗为主. 近年来国内外开展了内镜下的多种治疗方法<sup>[1-2]</sup>. 我院在 2003-03/2005-02 对 28 例十二指肠溃疡瘢痕狭窄的患者行内镜下球囊扩张治疗, 现将治疗结果及疗效予以报告。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 门诊根据临床表现和内镜诊断 28 例十二指肠溃疡伴狭窄梗阻患者均收入院, 男 20 例、女 8 例, 年龄在 16-68 岁, 平均年龄为 32.5 岁. 溃疡病程 2-34 a, 平均 17.3 a. 接受不规则治疗 25 例, 3 例病史短的未接受过治疗. 28 例患者中胃镜结果幽门狭窄梗阻 12 例、十二指肠狭窄梗阻 16 例, 所有患者均有不同程度的消瘦和营养不良, 胃镜活检病理结果均排除恶性病变. 入院后予鼻胃管闭式引流 7 d, 同时用奥美拉唑针剂 40 mg、bid, 根据患者情况给予营养支持治疗. 经过保守治疗 28 例患者狭窄梗阻无缓解。

**1.2 方法** 内镜检查均用日产 Pentax EG 2940 胃镜, 球囊扩张用 Willson Cook 公司 QD-14 × 8、QD-16 × 8

球囊、QID-1 压力推注器, 28 例患者经过 7 d 保守治疗后行内镜下球囊扩张治疗. 治疗方法: 所有患者在行气囊扩张前通过胃管抽出胃内容物, 按胃镜检查准备及进镜观察狭窄部位情况, 在胃镜直视下通过胃镜活检孔将直径 14 cm 球囊送入狭窄处, 使球囊中段正在狭窄部, 球囊送到位后用压力推注器与球囊外端连接, 然后推注气体, 使压力达到 40 psi, 在推注压力过程中, 不断调整球囊位置, 让球囊扩张后, 球囊的中部正在狭窄处, 观察 2 min, 松解压力, 尔后用同法行第二次扩张治疗. 治疗完后, 将胃镜和球囊一同退出, 在体外从胃镜取出球囊, 取出后再给患者插入胃镜观察狭窄部位是否扩开, 胃镜是否顺利通过. 若经治疗后梗阻复发, 则用直径 16 cm 球囊按上述方法进行治疗. 术后处理和疗效观察: 扩张治疗后, 24 h 心电监护, 禁食 24 h, 用奥美拉唑针剂 40 mg bid 及营养支持治疗, 共 7 d, 24 h 后患者无不良反应, 可予饮食由流质、半流质到正常饮食. 7 d 后按溃疡“三联疗法”<sup>[3]</sup>治疗. 从以下方面观察疗效: (1) 在行扩张治疗时患者有疼痛感; (2) 扩张处有少许出血; (3) 扩张后胃镜能顺利通过; (4) 扩张治疗 24 h 后患者进食无呕吐或胃潴留。

## 2 结果

28 例患者中行扩张治疗时 28 例均有扩张处的少许出血, 但无 1 例因扩张治疗后临床出血表现, 有 2 例扩张后 3-4 h 明显腹痛、压痛和反跳痛, 腹部 X 线检查隔下有游离气体, 证实穿孔, 经过禁食、胃管闭式引流、奥美拉唑针剂 40 mg bid、营养支持及抗生素治疗 7 d 保守治疗病情得到治愈. 2 例穿孔的患者, 1 例在第一次扩张时发生, 发生率为 3.6%(1/28), 1 例为第二次发生, 总发生率 7.1%(2/28). 25 例有疼痛感, 26 例扩张后胃镜能顺利通过, 26 例扩张治疗 24 h 后进食无呕吐或胃潴留. 经过扩张治疗后随访最长时间为 24 mo, 最短时间为 1 mo, 平均 15.5 mo, 25 例(89.3%) 治疗 1 次后腹痛和梗阻临床症状消失, 无复发, 体重和营养不良得到明显改善. 有 3 例复发均为男性患者, 年龄分别为 16 岁、45 岁和 63 岁; 复发的时间为 3 wk、4 wk 和 6 wk. 3 例复发患者再入院用直径 16 cm 球囊扩张治疗后再无复发. 第一次治疗的总有效率为 89.3%(25/28), 3 例经过第二次治疗后均未复发, 28 例患者治疗的总有效率达 100%。

## 3 讨论

幽门梗阻是消化性溃疡的常见并发症, 占消化性溃疡的 11%, 十二指肠溃疡伴梗阻占十二指肠溃疡的 1.2%<sup>[4]</sup>,

但瘢痕狭窄梗阻的发生率尚不明了,在治疗方面按以往常规是内科严格保守治疗1 wk无效转外科手术治疗.术后带来的问题是:(1)溃疡仍有复发可能;(2)可发生近、远期不同并发症;(3)胃部分切除后的残胃癌的发生率明显增高;(4)手术费用高.为了保持正常生理功能、减轻患者的痛苦、减少患者的费用及避免手术后并发症的发生,我们采用内镜下球囊扩张治疗方法.本文28例患者经过内镜下球囊扩张治疗临床疗效是确切的.对此方法的临床应用我们的体会是:首先排除恶性狭窄及上胃管严格内科保守治疗1 wk无效者;扩张治疗先采用直径14 cm球囊,若无效或复发则采用直径16 cm球囊;在扩张治疗时按疗效判断标准进行;扩张治疗后禁食24 h及用质子泵抑酸注射剂治疗1 wk,1 wk后按溃疡的“三联疗法”治疗;对扩张治疗后出现穿孔并发症的患者采取严格的内科保守治疗.穿孔的发生可能为狭窄处的纤维组织瘢痕撕裂所

致,患者此时胃内除有少许胃内分泌物外,无食物等,出现的腹膜炎仅为化学性,本文2例穿孔的患者经过胃管闭式引流、抑制胃酸分泌、抗生素和营养支持治疗1 wk治愈,无1例手术治疗.

内镜下球囊扩张治疗十二指肠溃疡瘢痕狭窄梗阻是一种安全、方便、患者痛苦小、易接受、费用低而效果好的方法.

#### 4 参考文献

- 1 陶浩祥. 内镜微波与探条扩张联合治疗重度食管贲门狭窄12例. 世界华人消化杂志 2004;10:2509-2510
- 2 景华, 凌贞, 李明峰, 赵建华. 胃镜扩张治疗溃疡性幽门狭窄一例. 中华消化内镜杂志 2004;21:305
- 3 胡品津, 李瑜元, 陈湖, 吴惠生, 崔毅, 黎庆宁. 克拉霉素甲硝唑和兰索拉唑联合治疗幽门螺杆菌感染的临床疗效观察. 中华消化杂志 1997;17:204-206
- 4 任权, 杨斌, 李国华, 聂玲. 2614例十二指肠球部溃疡的临床及胃镜分析. 中华消化内镜杂志 2004;21:403-404

编辑 张海宁

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

• 临床经验 •

## <sup>125</sup>I 粒子组织间内放射治疗在大肝癌治疗中的临床应用

罗开元, 毛文源, 何晓明, 杨 嵘, 李 波, 杨国凯, 邵庆华

罗开元, 毛文源, 何晓明, 杨嵘, 李波, 杨国凯, 邵庆华, 云南省第二人民医院普通外科 云南省昆明市 650021

云南省自然科学基金资助项目, NO. 2003c0088M

通讯作者: 罗开元, 650021, 云南省昆明市青年路176号, 云南省第二人民医院普通外科. ynluoky@vip.sina.com

电话: 0871-5156650-2970 传真: 0871-5157157

收稿日期: 2005-03-31 接受日期: 2005-04-09

### 摘要

**目的:** 探讨<sup>125</sup>I组织间内放射疗法在大肝癌和巨大肝癌治疗中的临床效果.

**方法:** 选择大肝癌和巨大肝癌患者80例,行手术治疗(部分巨大肝癌姑息手术)、术中永久植入<sup>125</sup>I粒子行组织间内放射治疗、化疗和免疫治疗;观察治疗前后患者血象、免疫指标、临床症状、脏器功能(ALT、AST)、肿瘤标记物(AFP)、肿瘤影像学(CT)等的变化;并观察3 a生存率.

**结果:** 术后1 wk与术后3 mo检查外周白细胞有显著差异,但均在正常范围内,术前血象亦在正常范围内.免疫指标前后变化无统计学意义;治疗后患者临床症状缓解率为95.3%(61/64);ALT、AST由异常降至正常水平者占83%(50/60)、75%(45/60);AFP降低超过原数值50%者占80%(40/50);直径在

5-10 cm的95个瘤体的有效率为80%(76/95),直径>10 cm的42个瘤体治疗有效率为78.6%(33/42).

**结论:** <sup>125</sup>I组织间内放射治疗大肝癌方法简单、疗效显著、不良反应少.

罗开元, 毛文源, 何晓明, 杨嵘, 李波, 杨国凯, 邵庆华. <sup>125</sup>I粒子组织间内放射治疗在大肝癌治疗中的临床应用. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1636-1638  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1636.asp>

### 0 引言

目前原发性肝癌主要治疗方法为手术切除、局部或全身化疗等,随着现代科学技术的高速发展,一些治疗肝癌的新技术相继出现,不断在临床上推广应用,并取得了一定的效果.这些技术包括:放射介入治疗技术、射频治疗技术、X刀治疗技术、<sup>125</sup>I粒子永久性植入组织间内放射治疗技术<sup>[1-3]</sup>冷冻治疗技术、微波治疗技术及无水乙醇(酒精)瘤内治疗技术等,这些新技术可改善患者的症状、提高生存率.自2000-08/2005-01,我们采用姑息手术结合<sup>125</sup>I粒子永久性植入组织间内放射治疗大肝癌患



但瘢痕狭窄梗阻的发生率尚不明了,在治疗方面按以往常规是内科严格保守治疗1 wk无效转外科手术治疗.术后带来的问题是:(1)溃疡仍有复发可能;(2)可发生近、远期不同并发症;(3)胃部分切除后的残胃癌的发生率明显增高;(4)手术费用高.为了保持正常生理功能、减轻患者的痛苦、减少患者的费用及避免手术后并发症的发生,我们采用内镜下球囊扩张治疗方法.本文28例患者经过内镜下球囊扩张治疗临床疗效是确切的.对此方法的临床应用我们的体会是:首先排除恶性狭窄及上胃管严格内科保守治疗1 wk无效者;扩张治疗先采用直径14 cm球囊,若无效或复发则采用直径16 cm球囊;在扩张治疗时按疗效判断标准进行;扩张治疗后禁食24 h及用质子泵抑酸注射剂治疗1 wk,1 wk后按溃疡的“三联疗法”治疗;对扩张治疗后出现穿孔并发症的患者采取严格的内科保守治疗.穿孔的发生可能为狭窄处的纤维组织瘢痕撕裂所

致,患者此时胃内除有少许胃内分泌物外,无食物等,出现的腹膜炎仅为化学性,本文2例穿孔的患者经过胃管闭式引流、抑制胃酸分泌、抗生素和营养支持治疗1 wk治愈,无1例手术治疗.

内镜下球囊扩张治疗十二指肠溃疡瘢痕狭窄梗阻是一种安全、方便、患者痛苦小、易接受、费用低而效果好的方法.

#### 4 参考文献

- 1 陶浩祥.内镜微波与探条扩张联合治疗重度食管贲门狭窄12例.世界华人消化杂志 2004;10:2509-2510
- 2 景华,凌贞,李明峰,赵建华.胃镜扩张治疗溃疡性幽门狭窄一例.中华消化内镜杂志 2004;21:305
- 3 胡品津,李瑜元,陈湖,吴惠生,崔毅,黎庆宁.克拉霉素甲硝唑和兰索拉唑联合治疗幽门螺杆菌感染的临床疗效观察.中华消化杂志 1997;17:204-206
- 4 任权,杨斌,李国华,聂玲.2614例十二指肠球部溃疡的临床及胃镜分析.中华消化内镜杂志 2004;21:403-404

编辑 张海宁

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

• 临床经验 •

## <sup>125</sup>I 粒子组织间内放射治疗在大肝癌治疗中的临床应用

罗开元,毛文源,何晓明,杨 嵘,李 波,杨国凯,邵庆华

罗开元,毛文源,何晓明,杨嵘,李波,杨国凯,邵庆华,云南省第二人民医院普通外科 云南省昆明市 650021

云南省自然科学基金资助项目, NO. 2003c0088M

通讯作者:罗开元,650021,云南省昆明市青年路176号,云南省第二人民医院普通外科, ynluoky@vip.sina.com

电话:0871-5156650-2970 传真:0871-5157157

收稿日期:2005-03-31 接受日期:2005-04-09

### 摘要

**目的:**探讨<sup>125</sup>I组织间内放射疗法在大肝癌和巨大肝癌治疗中的临床效果.

**方法:**选择大肝癌和巨大肝癌患者80例,行手术治疗(部分巨大肝癌姑息手术)、术中永久植入<sup>125</sup>I粒子行组织间内放射治疗、化疗和免疫治疗;观察治疗前后患者血象、免疫指标、临床症状、脏器功能(ALT、AST)、肿瘤标记物(AFP)、肿瘤影像学(CT)等的变化;并观察3 a生存率.

**结果:**术后1 wk与术后3 mo检查外周白细胞有显著差异,但均在正常范围内,术前血象亦在正常范围内.免疫指标前后变化无统计学意义;治疗后患者临床症状缓解率为95.3%(61/64);ALT、AST由异常降至正常水平者占83%(50/60)、75%(45/60);AFP降低超过原数值50%者占80%(40/50);直径在

5-10 cm的95个瘤体的有效率为80%(76/95),直径>10 cm的42个瘤体治疗有效率为78.6%(33/42).

**结论:**<sup>125</sup>I组织间内放射治疗大肝癌方法简单、疗效显著、不良反应少.

罗开元,毛文源,何晓明,杨嵘,李波,杨国凯,邵庆华.<sup>125</sup>I粒子组织间内放射治疗在大肝癌治疗中的临床应用.世界华人消化杂志 2005;13(13):1636-1638  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1636.asp>

### 0 引言

目前原发性肝癌主要治疗方法为手术切除、局部或全身化疗等,随着现代科学技术的高速发展,一些治疗肝癌的新技术相继出现,不断在临床上推广应用,并取得了一定的效果.这些技术包括:放射介入治疗技术、射频治疗技术、X刀治疗技术、<sup>125</sup>I粒子永久性植入组织间内放射治疗技术<sup>[1-3]</sup>冷冻治疗技术、微波治疗技术及无水乙醇(酒精)瘤内治疗技术等,这些新技术可改善患者的症状、提高生存率.自2000-08/2005-01,我们采用姑息手术结合<sup>125</sup>I粒子永久性植入组织间内放射治疗大肝癌患

表1 术前术后白细胞及免疫球蛋白的变化( $n = 80$ , mean  $\pm$  SD)

时间	白细胞( $\times 10^9/L$ )	中性粒细胞( $\times 10^9/L$ )	IgG(g/L)	IgA(g/L)	IgM(g/L)
术前	5.83 $\pm$ 1.92	3.11 $\pm$ 0.38	1.46 $\pm$ 0.48	0.31 $\pm$ 0.15	0.21 $\pm$ 0.11
术后 1 wk	4.20 $\pm$ 1.40	2.60 $\pm$ 0.67	1.34 $\pm$ 0.37	0.32 $\pm$ 0.14	0.20 $\pm$ 0.13
术后 3 wk	5.02 $\pm$ 1.65 <sup>a</sup>	3.02 $\pm$ 0.76	1.40 $\pm$ 0.46	0.31 $\pm$ 0.12	0.21 $\pm$ 0.10

$t = 19.6$ , <sup>a</sup> $P < 0.05$  vs 术后 1 wk 有显著差异.

者 80 例, 可有效改善大肝癌和巨大肝癌患者症状, 提高治疗有效率.

## 1 材料和方法

1.1 材料 2000-08/2005-01 我院大肝癌(肿瘤直径 5-10 cm)或巨大(>10 cm)患者 80 例, 男 51 例, 女 29 例, 年龄 28-68 岁, 平均  $52.5 \pm 2.4$  岁, 其中原发性肝癌 52 例, 转移性肝癌 28 例. 肿瘤单个结节者 40 例, 2 个结节者 28 例, 3 个以上结节者 12 例, 肿瘤直径 5-10 cm 者 95 个, 肿瘤直径>10 cm 者 42 个. 所有病例均经病理组织学检查明确诊断. 肿瘤 TNM 临床分期均为 III-IV 期患者. 本研究选择美国欣科公司生产的  $^{125}\text{I}$  粒子(每粒 0.5-0.6 mCi)作放射源.

### 1.2 方法

1.2.1 放射源的选择 国际用于组织间永久植入治疗恶性肿瘤的放射源, 最常用的有 2 种:  $^{125}\text{I}$  和  $^{198}\text{Au}$ .  $^{125}\text{I}$  半衰期为 59.6 d, 其能量为 27.4-31.5 Kev X 射线及 35.5 Kev  $\gamma$  射线. 半衰期较长, 应用方便, 能量较低, 易于防护, 植入后不易产生过热点而损伤主要脏器. 从放射生物学观点, 低量率, 较长期放射更易杀灭新生物细胞, 因而临床应用较广.

1.2.2 手术方法及  $^{125}\text{I}$  粒子植入情况 术前或术中制定治疗计划系统, 术中姑息性切除病灶, 术中依据治疗计划系统所制定的剂量, 将  $^{125}\text{I}$  粒子植入肿瘤床、残留癌组织、后腹膜及肝十二指肠韧带软组织内. 粒子立体距离保持在 1.0-1.5 cm, 植入前用戊二醛液浸泡 20 min, 采用 18 号针可防辐射可视性植入器穿刺植入, 动作轻柔准确, 避免损坏粒子外壳引起放射泄露. 术后给予化疗和免疫治疗.

1.2.3 放射检测和放射防护 采用 Radiometer 及普通 X 线片对碘粒子进行定量及定位监测, 必要时用  $\gamma$  照相机追踪. 在术中和术后治疗患者时穿带铅橡皮围裙, 经检测可防护 99% 的碘粒子放射. 所有接受  $^{125}\text{I}$  粒子植入的患者应告知  $^{125}\text{I}$  粒子的物理特性, 放射性存在时间, 患者、患者的亲属及有关的医务人员应进行放射安全的培训教育.

1.2.4 疗效监测 术前、术后 1 wk 和 3 mo 内监测 WBC、免疫指标; 临床症状变化, 肝功能变化, 肿瘤标记物(AFP)的变化, 肿瘤影像学(CT)的变化, 局部复发及 3 a 生存情况. 疗效评定按 WHO 相关肿瘤评定标准<sup>[4]</sup>: 肿瘤消失维持 1 mo 为完全缓解(CR), 体积缩小 50% 以上维持 1 mo 为部分缓解(PR), 缩小不足 50% 为无变化(NC)或稳定

(SD), 肿瘤体积增大>25% 或有新病灶出现为进展(PD), 有效为 CR+PR.

统计学处理 数据以 mean  $\pm$  SD 表示, 采用  $t$  或  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  有统计学意义.

## 2 结果

2.1 外周血白细胞及免疫球蛋白的变化 术后 1 wk 与术后 3 mo 检查外周白细胞有显著差异, 但均在正常范围内, 术前血象亦在正常范围内. 免疫球蛋白指标无显著差异, 无明显的骨髓抑制及免疫抑制(表1).

2.2 疗效观察 80 例大肝癌患者中, 64 例有临床症状, 行手术治疗(部分巨大肝癌姑息手术)、术中永久植入  $^{125}\text{I}$  粒子行组织间内放射治疗后, 61 例症状完全改善: 食欲增加, 体重升高, 右上腹不适、疼痛消失, 占 95.3% (61/64). 肝功能异常患者(ALT、AST) 60 例, 术后 3 wk 正常率分别为 83% (50/60) 和 75% (45/60). 术前 AFP 升高 50 例, 术后 4 wk 降低超过原数值 50% 者占 80% (40/50). 80 例患者 132 个瘤体治疗后, 瘤体完全缓解 83 个, 部分缓解 26 个, 稳定 13 个, 进展 10 个, 总有效率 82.6% (109/132) (表2). 1、2、3 a 生存率分别为 91.7%、86.7%、75.0%, 生存率有显著提高(表3).

表2  $^{125}\text{I}$  粒子行组织间内放射治疗大肝癌的疗效

瘤体大小 (cm)	瘤体数(个)	疗效				有效率(%)
		CR	PR	MR	PD	
5-10	95	56	20	8	5	80
>10	42	27	6	5	5	78.6

表3 60 例患者的 3 a 生存率

随访时间	观察例数	存活例数	生存率
1 a	62	57	91.9
2 a	40	36	90.0
3 a	30	20	66.6

## 3 讨论

大肝癌和巨大肝癌手术切除的疗效尚不令人满意, 其主要原因之一是手术不能完全根治, 人们越来越意识到大肝癌的治疗单靠手术姑息切除病灶难达治愈目的. 肝切缘距肿瘤

2-3 cm, 肉眼所见肿瘤完全切除, 术中B超也未见残癌, 以为是“根治切除”, 但不是真的根治. 事实上, 术前、术中影像学检查不一定能发现较小肿瘤(<1 cm), 特别是伴有肝大结节肝硬化时. 术中认为是“根治”, 术后2-3 mo复发并非罕见, 特别是包膜不完整的肝癌<sup>[5]</sup>.

<sup>125</sup>I 粒子源特点为半衰期长, 低能量, 持续性, 正好针对肿瘤组织细胞无节制的增殖, 具有杀伤作用. 实验研究表明:M期及G<sub>2</sub>期细胞放射敏感性最高, 所以肿瘤组织在射线的作用下, 处于照射的敏感时相(G<sub>2</sub>-M期)和非敏感时相细胞的比例存在再分配, 这样就可能增加后续照射的杀伤机会. 连续不断的照射可以使癌细胞的损伤效应累计叠加, 增殖期的细胞被杀伤, 静止期的细胞则进入合成和分裂期, 细胞周期延长, 提高了G<sub>2</sub>-M期总照射剂量, 从而有助于提高放射敏感性. 由于局部<sup>125</sup>I粒子植入无外放射治疗引起的全身并发症, 因此效果优于外照射放疗<sup>[5-6]</sup>. 组织间内放射治疗是指放射源(<sup>125</sup>I粒子)永久性植入肿瘤之内或附近受癌浸润的组织中, 包括其淋巴扩散的途径等组织内治疗癌症的一种方法. 目前, 国外一些发达国家用<sup>125</sup>I粒子永久性植入治疗前列腺癌, 已取得了很好的临床效果<sup>[6-7]</sup>.

我们施行切除肝癌病灶或姑息切除的同时永久插植<sup>125</sup>I粒子组织间内放射治疗, <sup>125</sup>I粒子的有效半径为1.7 cm, 能持续释放γ射线, 对手术难以完善的亚临床病灶给予最大限度杀伤, 可提高治疗效果, 同时保护正常组织. 本研究显示: 患者白细胞与术前有显著差异, 但均在正常范围之内, 免疫球蛋白变化无统计学意义, 无明显的免疫及骨髓抑制. 治疗后患者临床症状缓解率为95.3%(61/64); ALT、AST由异常降至正常水平者占83%(50/60)、75%

(45/60); AFP降低超过原数值50%者占80%(40/50); 直径在5-10 cm的95个瘤体的有效率为80%(76/95), 直径>10 cm的42个瘤体治疗有效率为78.6%(33/42). 总有效率82.6%(109/132). 本研究显示, <sup>125</sup>I粒子源永久植入的技术可有效提高瘤体治疗有效率和提高生存率. 由于<sup>125</sup>I粒子源的半衰期为59.6 d, 其能量为27.4-1.5 keV X射线及35.5 keV γ射线, 在3-4 mo后, 剂量减少, 作用亦减低, 所以我们设想, 将来能有更简易的办法自体外多次植入, 治疗效果将会更佳.

总之, <sup>125</sup>I粒子永久植入组织间内放射治疗对肝癌的局部控制较好, 提高中晚期肝癌患者的生活质量和生存期等方面有积极意义. 另外, 粒子植入具有创伤小、肿瘤靶区剂量准确分布均匀、操作简便、疗效显著、不良反应少等特点.

#### 4 参考文献

- 1 罗开元, 李波, 杨嵘, 王明春, 刘文卓, 曹卫弘, 黄明龙. <sup>125</sup>I粒子组织间放射治疗恶性肿瘤的临床应用. 中华医学杂志 2001;81:754-755
- 2 杨国凯, 罗开元, 杨镛, 杨嵘, 王明春, 毛文源, 邵庆华, 刘文卓. <sup>125</sup>I粒子永久植入组织间治疗胰腺癌的临床报告. 临床外科杂志 2003; 11:92-93
- 3 罗开元, 郑江华, 李波, 邵庆华, 杨国凯, 赵泉, 杨嵘. <sup>125</sup>I粒子永久性植入组织间放射治疗肝癌. 肝胆胰外科杂志 2004;16:29-31
- 4 汤钊猷. 现代肿瘤学. 第1版. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 425
- 5 周信达. 重视原发性肝癌的综合治疗. 肝胆外科杂志 2000;8:401
- 6 Blasko JC, Wallner K, Grimm PD, Ragde H. Prostate specific antigen based disease control following ultrasound guided <sup>125</sup>Iodine implantation for stage T1/T2 prostate carcinoma. J Urol 1995;154:1096-1099
- 7 Critz FA, Levinson AK, Williams WH, Holladay CT, Griffin VD, Holladay DA. Simultaneous radiotherapy for prostate cancer: <sup>125</sup>I prostate implant followed by external-beam radiation. Cancer J Sci Am 1998;4:347-348

编辑 王谨晖 审读 张海宁

• 临床经验 •

# 肝动脉自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化 30 例

姚 鹏, 王 帅, 胡大荣, 闻 炜, 周一鸣, 龚丽娟

姚鹏, 王帅, 胡大荣, 闻炜, 周一鸣, 龚丽娟, 北京军区总医院肝病治疗中心  
北京市 100700

通讯作者: 姚鹏, 100700, 北京东四南门外 5 号, 北京军区总医院肝病治疗  
中心. pyao1@sohu.com

电话: 010-66721394

收稿日期: 2005-05-08 接受日期: 2005-05-30

## 摘要

**目的:** 探讨肝动脉插管自体骨髓干细胞移植的可行性及其对肝硬化患者肝功的改善作用。

**方法:** 肝硬化失代偿期患者 30 例, 分离其自体骨髓干细胞, 行肝动脉插管自体干细胞移植治疗。患者于移植后 1、2、4、8 wk 和 12 wk 进行肝功能等检测, 并观察其移植后临床症状的改善情况及术后的不良反应。

**结果:** 移植 1, 4, 8 wk 和 12 wk 后, 22 例(73.3%)患者 ALT 逐渐降低, 由平均  $180.35 \pm 15.6$  U/L 降至  $70.36 \pm 21.3$  U/L; 21 例(70%)患者 TBIL 逐渐下降, 由平均  $155.32 \pm 23.1$   $\mu\text{mol/L}$  降至  $80.19 \pm 18.4$   $\mu\text{mol/L}$ ; 23 例(76.6%)患者 ALB 逐渐升高, 由平均  $26.36 \pm 16.3$  g/L 升至  $32.64 \pm 12.8$  g/L。移植后全部(100%)患者 PTA 不同程度升高, 由治疗前平均  $26.18 \pm 13.9\%$  上升至治疗 12 wk 后的  $51.63 \pm 22.7\%$ 。移植后大多数患者临床症状有明显改善: 移植后 12 wk 内腹水减轻的 14 例(46%); 食欲改善的 22 例(73%); 乏力好转 18 例(60%); 腹胀减轻 13 例(43%); 在 30 例移植患者中未发现严重不良反应及并发症。

**结论:** 自体骨髓干细胞移植作为治疗肝硬化的一种新的措施安全有效。

姚鹏, 王帅, 胡大荣, 闻炜, 周一鸣, 龚丽娟. 肝动脉自体骨髓干细胞移植治疗失代偿期肝硬化 30 例. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1639-1640  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1639.asp>

## 0 引言

对于各种终末期肝病, 原位肝移植是最理想的治疗选择, 但是供体的紧缺、移植后的免疫排斥反应以及高额的治疗费用限制了该种治疗方法的临床应用, 故迫切需要建立一种简便、安全并有效的治疗方法。骨髓干细胞移植是肝功能衰竭治疗的一个新的研究方向。本研究采用肝动脉导管自体骨髓干细胞移植进行失代偿期肝硬化治疗, 旨在探讨该治疗方法的疗效、可行性、安全性和实用性。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 2004-10/2005-02 我科住院患者 30 例, 临床诊断为肝硬化失代偿期(Child C 级), 其中女 11 例,

男 19 例, 26-65 岁, 平均年龄 47.3 岁。诊断均 2000 年病毒性肝炎防治方案诊断标准<sup>[1]</sup>。

## 1.2 方法

**1.2.1 术前准备** 所有患者均于术前 1 d 行碘过敏实验, 双侧腹股沟备皮, 术前 4 h 禁食水。

**1.2.2 自体骨髓干细胞分离制备** 患者行局部麻醉消毒, 在无菌条件下, 以 18 号骨髓穿刺针从髂后上棘进行穿刺, 抽取骨髓 50-100 mL, 以 4000 U 肝素抗凝, 避免污染。参考 Kai Wollert 的方法<sup>[2]</sup>, 患者骨髓离心去除脂肪层, 用等量 DMEM 培养液稀释骨髓, 制成细胞悬液。将骨髓轻轻加到密度  $1.073$  g/mL 的 Percoll 分离液上,  $1200$  r/min 离心 25 min(室温下)。吸取界面细胞层, 用生理盐水洗脱,  $1500$  r/min 离心 5 min, 共 3 次, 生理盐水重悬细胞, 镜下计数所用细胞为  $1.0 \times 10^{11}$ /L, 置于  $37^{\circ}\text{C}$  二氧化碳孵箱待用。

**1.2.3 肝动脉导管干细胞移植** X 光透视下, 经股动脉插管至肝固有动脉, 注射造影剂, 观察肝内血管情况及有无占位病变后, 将分离好的骨髓干细胞悬液注入肝内。穿刺点加压包扎。术后 24 h 插管侧髋关节呈伸直位并制动, 预防性应用抗生素 3 d。行肝动脉导管治疗后常规护理。

**1.2.4 术后观察** 术后 1、4、8 wk 及 12 wk 分别复查谷丙转氨酶(ALT)、总胆红素(TBIL)、白蛋白(ALB)、凝血酶原活动度(PTA)等。并注意观察患者乏力、纳差、腹胀等症状的改善情况及不良反应发生情况。

## 2 结果

**2.1 手术成功率** 30 例患者手术全部成功, 手术成功率为 100%。

**2.2 临床检验结果** 移植 1, 4, 8 wk 和 12 wk 后, 22 例(73.3%)患者 ALT 逐渐降低, 由平均  $180.35 \pm 15.6$  U/L 降至  $70.36 \pm 21.3$  U/L; 21 例(70%)患者 TBIL 逐渐下降, 由平均  $155.32 \pm 23.1$   $\mu\text{mol/L}$  降至  $80.19 \pm 18.4$   $\mu\text{mol/L}$ ; 23 例(76.6%)患者 ALB 逐渐升高, 由平均  $26.36 \pm 16.3$  g/L 升至  $32.64 \pm 12.8$  g/L。移植后全部(100%)患者 PTA 不同程度升高, 由治疗前平均  $26.18 \pm 13.9\%$  上升至治疗 12 wk 后的  $51.63 \pm 22.7\%$ 。

**2.3 临床症状** 移植后大多数患者临床症状有明显改善: 移植后 12 wk 内腹水减轻的 14 例(46%); 食欲改善的 22 例(73%); 乏力好转 18 例(60%); 腹胀减轻 13 例(43%)。

**2.4 不良反应** 30 例移植患者中未发现严重不良反应及并发症。术后轻度恶心 1 例, 发热 1 例。未见明显 WBC 下降、肝区疼痛、出血等并发症。

### 3 讨论

干细胞是指一类具有自我更新和分化能力的细胞<sup>[3-5]</sup>,干细胞的增殖及定向分化具有巨大的应用潜能,已成为细胞生物学以及整个生命科学的研究热点。

干细胞定向分化为功能细胞并且应用于器官损伤的治疗,一直是人类医学的梦想及追求目标,研究表明,在肝损伤及肝细胞再生的过程中<sup>[6-7]</sup>,干细胞起着重要的作用,而骨髓干细胞是肝细胞的重要的肝外来源<sup>[8-9]</sup>。骨髓干细胞在特定环境下可分化成肝干细胞及肝细胞,从而参与肝功能的修复和重构<sup>[10-11]</sup>。为探索骨髓干细胞对人类肝损伤的治疗作用,我们在大量研究的基础上,首次将骨髓干细胞应用于肝病治疗。本研究采用患者自体骨髓干细胞作为供体,在体外分离纯化后移植患者体内,观察骨髓干细胞移植能否使损伤的肝功能得以改善和恢复。

我们对30例肝硬化失代偿期的患者顺利进行了自体骨髓干细胞移植治疗。观察发现,在移植12 wk后,22例(73.3%)患者ALT逐渐降低,21例(70%)患者TBIL逐渐下降,23例(76.6%)患者ALB逐渐升高,移植后全部(100%)患者PTA不同程度升高,表明,骨髓干细胞移植治疗后,患者肝脏功能明显改善。我们还观察了自体骨髓干细胞移植后患者临床症状的变化,发现移植后大多数患者有明显的改善。在30例移植患者中未发现严重不良反应及并发症。

重症肝病的治疗一直以来并没有令人满意的进展,临床上主要仍以保肝对症及预防并发症为主。尤其是终末期肝病的治疗总体效果不甚理想。近年来原位肝移植已成为终末期肝病最理想的治疗选择,但是供体的紧缺、移植后的免疫排斥反应以及高额的治疗费用限制了其临床应用。骨髓干细胞移植作为肝功能衰竭治疗的一个新的研究方向<sup>[12-13]</sup>,已经引起广泛关注,并具有巨大的应用前景<sup>[14-15]</sup>。

本研究中,我们初步探讨了自体骨髓干细胞移植对失代偿期肝硬化患者肝功能改善的作用,结果令人满意。以上30例患者治疗后情况似乎提示:自体骨髓干细胞移植治疗对肝硬化患者肝功能改善、治疗时间缩短等有明显效果。然而,自体骨髓干细胞在人受体肝脏内定植、生长分化及肝脏病理学改变情况还有待进一步研究。我们首次应用患者自体骨髓干细胞作为供体,对肝硬化患者进行治疗,探索干细胞在严重肝病患者的临床应用。这将为肝病治疗探索崭新的途径,为干细胞治疗的进一步研究打下基础。

### 4 参考文献

1 中华医学会传染病与寄生虫病分会、肝病学会。病毒性肝炎

防治方案。中华肝脏病杂志 2000;8:324-329

- 2 Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141-148
- 3 Yao P, Zhan Y, Xu W, Li C, Yue P, Xu C, Hu D, Qu CK, Yang X. Hepatocyte growth factor-induced proliferation of hepatic stem-like cells depends on activation of NF-kappaB. *J Hepatol* 2004;40:391-398
- 4 姚鹏, 詹轶群, 许望翔, 李长燕, 杨晓明, 胡大荣. 细胞生长因子体外对大鼠肝干细胞的影响. 中华肝脏病杂志 2003;11:33-36
- 5 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
- 6 Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004;40:1275-1284
- 7 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
- 8 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
- 9 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-1302
- 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 Cantz T, Sharma AD, Jochheim-Richter A, Arseniev L, Klein C, Manns MP, Ott M. Reevaluation of bone marrow-derived cells as a source for hepatocyte regeneration. *Cell Transplant* 2004;13:659-666
- 12 Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-1302
- 13 Kushida T, Inaba M, Hisha H, Ichioka N, Esumi T, Ogawa R, Iida H, Ikehara S. Crucial role of donor-derived stromal cells in successful treatment for intractable autoimmune diseases in MRL/lpr mice by BMS via portal vein. *Stem Cell* 2001;19:226-235
- 14 Wang X, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Liver repopulation and correction of metabolic liver disease by transplanted adult mouse pancreatic cells. *Am J Pathol* 2001;158:571-579
- 15 Sukhikh GT, Shtil AA. Stem cell transplantation for treatment of liver diseases: from biological foundations to clinical experience (review). *Int J Mol Med* 2003;11:395-400

编辑 王谨晖 审读 张海宁

# 纤维蛋白胶在氩氦刀冷冻治疗肝癌中的止血作用

钟洪才, 池达智

钟洪才, 南方医科大学附属珠江医院肝胆外科 广东省广州市 510282  
池达智, 南方医科大学附属珠江医院急诊外科 广东省广州市 510282  
通讯作者: 钟洪才, 510282, 广东省广州市工业大道中253号, 南方医科大学  
附属珠江医院肝胆外科. zhonghc318@sina.com  
电话: 020-61643211  
收稿日期: 2005-04-15 接受日期: 2005-05-14

## 摘要

**目的:** 探讨纤维蛋白胶(finbrin sealant, FS)在氩氦刀冷冻治疗(argon super-cryosurgery system, ASCS)肝癌时的止血作用。

**方法:** 将45例行术中ASCS治疗的肝癌患者随机分为对照组(用明胶海绵填塞)和治疗组(FS封闭), 分别测定术后3、6、12、24、48 h腹腔引流液总量及相应时间点引流液中Hb含量。

**结果:** 全组无手术死亡病例。术后3、6、12、24、48 h腹腔引流液总量对照组与治疗组相比无显著性差异( $141.9 \pm 99.8$  vs  $118.9 \pm 72.3$ ,  $216.1 \pm 142.2$  vs  $172.1 \pm 74.2$ ,  $254.3 \pm 145.7$  vs  $224.8 \pm 91.8$ ,  $301.2 \pm 156.3$  vs  $273.8 \pm 101.6$ ,  $349.6 \pm 202.2$  vs  $330.5 \pm 137.4$  mL);相应时间点引流液中Hb含量两组相比具有显著性差异( $50.7 \pm 17.4$  vs  $39.1 \pm 12.3$  g/L,  $49.9 \pm 13.8$  vs  $38.5 \pm 8.5$  g/L,  $45.1 \pm 12.6$  vs  $31.9 \pm 7.8$  g/L,  $26.5 \pm 8.9$  vs  $14.1 \pm 5.0$  g/L,  $11.0 \pm 3.9$  vs  $5.0 \pm 3.1$  g/L,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 纤维蛋白胶有很好的止血功能, 可作为ASCS治疗肝癌的创面止血材料。

钟洪才, 池达智. 纤维蛋白胶在氩氦刀冷冻治疗肝癌中的止血作用. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1641-1642  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1641.asp>

## 0 引言

纤维蛋白胶(finbrin sealant, FS)是一种新型外用创面封闭止血剂, 但对其在氩氦刀冷冻治疗(argon super-cryosurgery system, ASCS)肝癌时的止血作用

尚无研究报道。为探讨其对创面的止血作用, 我们分别用明胶海绵、FS作为ASCS治疗肝癌时创面的止血材料, 测定其术后引流液的血红蛋白浓度, 现报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 45例行ASCS治疗的肝癌患者随机分为明胶海绵组(对照组,  $n = 21$ )和FS组(治疗组,  $n = 24$ ), 二组术前临床资料(性别、年龄、肝功分期、病理类型、肝转移癌例数、切除肿瘤例数)、Hb、血小板计数(PLA)、活化部分凝血激酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、血浆凝血酶原时间(PT)、纤维蛋白原(Fg)均无统计学差异( $P < 0.05$ ), 具有可比性。

**1.2 方法** 二组患者均采用气管插管全麻下行开腹ASCS治疗, 切口及手术步骤两组相同, 能切除或减体积切除肿瘤者首先予以切除, 残余病灶及不能切除者按文献报道的方法<sup>[1]</sup>进行ASCS治疗。创面(包括手术切除后的创面和冷冻枪孔创面)处理: 治疗组喷洒FS(广州倍绣生物技术公司生产), 对照组用明胶海绵。术后处理原则相同。

**1.2.1 FS配置方法** 取2.5 mL医用FS, 以红色注射器抽取主体溶解液溶解主体胶, 以蓝色注射器抽取催化剂溶解液, 溶解催化剂。待完全溶解后再用同颜色的注射器抽取相应的溶解后液体分别注入推液器上的注射器内, 把连接针座固定在推液器锥头上备用。

**1.2.2 检测指标** 分别在术后3、6、12、24、48 h计算腹腔引流液总量, 并在相应时间点留取腹腔引流液0.5-1.0 mL并测定其中Hb含量。

**统计学处理** 数据用SPSS10.0处理, 计数资料用 $\chi^2$ 检验, 计量资料用独立样本 $t$ 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

全组无手术死亡病例。术后3、6、12、24、48 h腹腔引流液总量及各时间点引流液中Hb含量见表1。各时

表1 术后腹腔引流量及其中Hb测定结果比较表(mean  $\pm$  SD)

术后时间(h)	术后引流量(mL)		$t$	$P$	术后Hb(g/L)		$t$	$P$
	对照组	治疗组			对照组	治疗组		
3	142.0 $\pm$ 100.0	119.0 $\pm$ 72.0	0.894	0.376	51.0 $\pm$ 17.0	39.0 $\pm$ 12.0	2.607	0.013
6	216.0 $\pm$ 142.0	172.0 $\pm$ 74.0	1.326	0.192	50.0 $\pm$ 14.0	39.0 $\pm$ 9.0	3.369	0.002
12	254.0 $\pm$ 146.0	225.0 $\pm$ 92.0	0.823	0.415	45.0 $\pm$ 13.0	32.0 $\pm$ 8.0	4.298	0.000
24	301.0 $\pm$ 156.0	274.0 $\pm$ 102.0	0.704	0.485	27.0 $\pm$ 9.0	14.0 $\pm$ 5.0	5.848	0.000
48	350.0 $\pm$ 202.0	331.0 $\pm$ 137.0	0.374	0.710	11.0 $\pm$ 4.0	5.0 $\pm$ 3.0	5.687	0.000

间点两组引流液总量无显著性差异, 两组Hb含量有显著性差异( $P<0.05$ )。二组患者均未发生不良反应。

### 3 讨论

近年来开展的ASCS使部分肝癌患者得到有效的治疗<sup>[1-3]</sup>, 但此方法仍是一种有创治疗, 有一定并发症发生; 尤其是其创面处理不当有术后大出血甚至死亡可能<sup>[4-5]</sup>。通常用明胶海绵作为创面止血材料, 但其作为固体材料在填堵孔时有操作不便、塑形性差、创面黏合性欠佳等缺点, 出血并发症仍时有发生。因此, 寻找更好的创面止血材料有重要意义。

FS是从人或哺乳动物血中提取的多种凝血因子组成的复合物, 近年广泛应用于外科手术创面处理, 对胃静脉曲张破裂出血亦有较好疗效<sup>[6-9]</sup>。但对其在ASCS治疗肝癌时的创面止血作用尚未见有报道。本组结果提示: 术后48 h内FS较明胶海绵能更有效地降低血液中有有效成分的丢失, 减少失血量。其原因在于: (1) FS是一种新型止血药, 由生物组织中提取的多种可凝性蛋白质组成。其成分包括以下二部分: 生物胶主体(纤维蛋白原、X因子)和主体溶解液; 另一部分为催化剂(凝血酶)和催化剂溶解液(内含 $\text{Ca}^{2+}$ 等), 当二者混合时产生类似凝血过程的最后阶段在创面产生一种纤维蛋白膜达到止血作用。对大面积组织渗血及实质性脏器创面渗血有明显止血作用, 在喷洒后3-4 min止血效果明显强化, 达到较理想的止血、封闭作用, 尤其对小静脉出血、毛细血

管渗血效果好。(2) 各组分混合后为半流体状物质, 因此有较理想的塑形性和黏合性, 能有效封堵、黏合创面, 预防漏(瘘), 覆盖及保护手术创面, 填充缺损。我们认为, FS可作为ASCS治疗肝癌时较理想的创面止血材料。

二组患者术后均未出现全身及局部异物反应, 说明二种材料均有良好的生物组织相容性。尽管如此, 仍有使用FS后发生严重过敏反应的报道<sup>[10]</sup>, 因此注入FS后应加强监测, 以防严重后果发生。

### 4 参考文献

- 1 Fang CH, Zhang MZ, Yu JL, Fang SG. Volume-reduced operation or operation together with Argon super-cryo surgical system on treatment of late massive multifocal malignant liver tumor. *J Fourth Mil Med Univ* 2002;23:162-166
- 2 方驰华, 钟洪才, 陈小伍, 高鹏. 氩氦刀冷冻治疗中晚期肝癌的临床研究. *中华普通外科杂志* 2005;20:87-88
- 3 钟洪才, 方驰华. 应用微创技术治疗肝癌的进展. *世界华人消化杂志* 2004;12:1176-1178
- 4 张慧, 宋旭东, 秦启生. 氩氦刀治疗肝转移癌引发医疗纠纷1例. *法律与医学杂志* 2003;10:201-202
- 5 钟洪才, 方驰华, 池达智. 术中氩氦刀靶向冷冻损毁术治疗中晚期肝癌的并发症及其防治. *世界华人消化杂志* 2005;13:145-147
- 6 郑真, 李新建, 王春红. 内镜喷洒生物蛋白胶治疗胃静脉曲张破裂出血的探讨. *中华消化内镜杂志* 2001;18:98-99
- 7 张玉新, 程黎阳, 吴良平, 蒲淼水. 医用生物蛋白胶在消化道外瘘治疗中的应用. *中国普通外科杂志* 2003;12:532-534
- 8 张志伟, 陈孝平, 吴在德. 纤维蛋白胶止血效果的临床研究. *腹部外科* 2002;15:293-294
- 9 李健, 赵家宏. 新型外用生物止血剂—纤维蛋白胶. *消化外科* 2003;2:72-74
- 10 钱若筠, 徐亚英, 赵涛. 剖宫产术中应用生物蛋白胶致严重过敏反应1例. *中华围产医学杂志* 2002;5:255

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 •

## 2005年下半年国外消化病学术会议

本刊讯 为促进国内外消化病学术知识的交流, 提高我国消化领域学术水平, 现将2005年国外消化病学术公布如下:

### 1 亚太消化疾病周

地点: 韩国; 时间: 2005-09-25/2005-09-28; 大会网址: [www.APDW2005.org](http://www.APDW2005.org).

### 2 第13届全欧胃肠病周

地点: 丹麦 / 哥本哈根; 时间: 2005-10-15/2005-10-20; 大会网址: [www.uegf.org](http://www.uegf.org).

### 3 美国肝病学会第56届年会

地点: 旧金山; 时间: 2005-11-11/2005-11-15; 大会网址: [www.aasld.org](http://www.aasld.org).

## • 病例报告 •

## 肠结核并发肠梗阻术前误诊为克罗恩病 1 例

李春艳, 刘丽娜, 王丽霞

李春艳, 刘丽娜, 王丽霞, 大连医科大学附属一院消化科  
辽宁省大连市 116011  
通讯作者: 李春艳, 116011, 辽宁省大连市西岗区中山路 222 号, 大连医科大学附属一院消化科. lichunyan-dl@sohu.com  
电话: 0411-83635963-2173  
收稿日期: 2005-04-26 接受日期: 2005-05-14

## 摘要

本文报道 1 例因反复腹胀、腹痛 8 mo 入院的患者, 据临床表现、影像学及肠镜检查诊断为克罗恩病、不全肠梗阻, 而术后病理证实为肠结核. 提示肠结核与克罗恩病鉴别诊断困难, 腹腔多处钙化灶及回盲部有病变对肠结核的诊断有帮助.

李春艳, 刘丽娜, 王丽霞. 肠结核并发肠梗阻术前误诊为克罗恩病 1 例. 世界华人消化杂志 2005;13(13):1643  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1643.asp>

## 1 病例报告

患者, 男, 53 岁, 因反复腹胀、腹部不适 8 mo, 加重半月入院. 患者 8 mo 前始出现腹胀、腹部不适、腹痛, 有时自觉腹部“鼓包”, 腹胀明显时有腹痛, 多位于右下腹及脐周, 间断便秘和腹泻, 无发热、盗汗, 食欲差, 体重下降约 10 公斤. 既往 20 a 前曾患肺结核, 经口服抗结核药“治愈”. 体检: 体温 36.3℃, 脉搏 66 次/min, 呼吸 18 次/min, 血压 110/75 mmHg, 略消瘦, 全身浅表淋巴结未触及肿大, 巩膜无黄染, 结膜无苍白, 心、肺(-), 腹软, 饱满, 未见胃肠型及蠕动波, 肝脾未及, 右下腹近腹股沟处可触及一索条形包块, 大小约 3×6 cm<sup>2</sup>, 质硬, 不活动, 略压痛, 肠鸣音活跃, 8 次/min, 未闻及气过水声. 实验室检查: 白细胞 6.02×10<sup>9</sup>/L, 红细胞 5.0×10<sup>12</sup>/L, 血红蛋白 136 g/L, 血小板 370×10<sup>9</sup>/L, 白蛋白 21.6 g/L, 球蛋白 22 g/L, 血沉 8 mm/h, 腹水常规: 总细胞 530×10<sup>9</sup>/L, 白细胞 136×10<sup>9</sup>/L, 中性粒细胞 12%, 淋巴细胞 70%, 比重 1.012, 蛋白(-), 脱落细胞(-), PPD(-), 胸片: 双上肺钙化灶, 左上肺纤维索条影. 立位腹平片: 中腹部广泛高密度影(钙化或造影剂?), 肠管内积气, 右上腹见多个气液平. 全腹 CT 及增强扫描示腹腔少量积液, 肠系膜及腹膜后多组淋巴结钙化, 回肠中段肠壁增厚改变, 继发小肠梗阻, 考虑回肠炎性病变可能性大, 回肠肿瘤不排除. 肠镜示回肠末段黏膜散在淋巴滤泡增生, 回盲瓣周边黏膜不规则充血, 散在结节样增生、水肿, 边界不清, 病理示炎症改变. 初步诊断: 回盲部克隆氏病, 不全肠梗阻, 肠肿瘤不排除. 行内科保守治疗, 梗阻症状没

有解除, 遂转入外科行剖腹探查术, 术中见淡黄色腹水约 300 mL, 大网膜, 大、小肠系膜间可见多个大小不等质硬、色白结节, 腹膜后可触及肿大质硬淋巴结, 并融合成团, 最大约 5×5 cm<sup>2</sup>, 距回盲部 40 cm 小肠触及一肿块, 约 10×10 cm<sup>2</sup>, 质硬, 粘连致小肠梗阻, 肠腔狭窄, 近段肠段扩张, 肠壁肥厚、水肿, 结肠未及肿块, 切除部分大网膜, 术中病理示炎性肉芽肿改变, 回肠肿块切除, 病理示肉芽肿病变, 诊断结核, 术后抗结核治疗, 恢复良好.

## 2 讨论

肠结核是由于结核杆菌侵犯肠道而引起的慢性炎症, 多数继发于肠外结核. 肠结核好发于回盲部, 其临床表现及影像检查均无特异性, 发病率低, 诊断困难, 误诊率高<sup>[1]</sup>. 该病诊断的关键在于临床医师对该病临床表现及实验室检查的全面认识. 临床上主要表现为腹痛、腹块、大便习惯改变、腹泻与便秘交替, 如同时伴有结核中毒症状和/或肺部结核病变, 则提示肠结核, 并发结核性腹膜炎时, 可有发热、腹部压痛、血沉快、渗出性腹水<sup>[2]</sup>. 该病与克罗恩病的鉴别极为困难, 有时二者的病理改变、临床表现和 X 线检查极其相似, 容易误诊, 其鉴别诊断主要依赖于病理学检查, 有干酪样坏死的肉芽肿是结核所致; 而非干酪样坏死的肉芽肿则是克罗恩病. 本患者病史 8 mo, 表现为腹痛、腹部包块, 有肠梗阻征象, 且有腹水, 但患者结核中毒症状不明显, 无发热、盗汗, 血沉不快, 结核菌素试验 (PPD) 阴性, 腹水为漏出液, 肠镜及 X 线检查示回盲部与回肠中段病变, 呈节段性分布, 术前诊断为克罗恩病. 回顾本病例, 回盲部而非回肠末段病变, 腹平片示多处明显钙化灶, 以至于放射线科医师以为是胃肠造影后钡剂存留所致, 而该患近期并未行胃肠造影; CT 见肠系膜及腹膜后多组淋巴结钙化, 提示腹部钙化灶是肠结核的重要特征, 克罗恩病不具备这种特点. 因此, 临床上二者鉴别困难时, 如腹部平片检查发现多处钙化灶、且回盲部有病变对肠结核的诊断有帮助. 另外, 患者腹水为漏出液, 考虑与低蛋白血症有关, 而不是结核性腹膜炎所致.

## 3 参考文献

- 1 叶琳, 陈掌珠, 刘斌, 何萍. 40 例肠结核临床分析. 中华消化杂志 2002;22:563-564
- 2 Marshall JB. Tuberculosis of the gastrointestinal tract and peritoneum. *Am J Gastroenterol* 1993;88:989-999



## 致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈仕珠 主任医师

中国人民解放军第451医院

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

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

谷俊朝 副教授

首都医科大学附属北京友谊医院普外科

纪小龙 教授

中国人民解放军解放军总医院病理科

江学良 副主任医师

济南军区总医院消化内科

来茂德 教授

浙江大学医学院病理学教研室

李东辉 副研究员

厦门大学生命科学学院抗癌研究中心

李增山 讲师

中国人民解放军第四军医大学病理教研室

李兆申 教授

中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科

罗和生 教授

武汉大学人民医院消化内科

毛青 教授

中国人民解放军第三军医大学第一附属医院全军感染病研究所

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

彭淑牖 教授

浙江医科大学附属第二院外科研究所

邱双健 副教授

上海复旦大学附属中山医院

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

石雪迎 讲师

北京大学医学部病理学系

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

王庆国 教授

北京中医药大学

王维 教授

中南大学湘雅三医院

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

向德兵 讲师

中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科

徐克成 教授

深圳市养和医疗中心

徐小元 教授

北大医院感染科

许洪卫 教授

上海同济大学附属铁路医院普通外科

严律南 教授

华西医科大学附属第一医院

杨希山 教授

广东省中医药局

殷晓煜 副教授

广州中山大学附属第一医院肝胆外科

于聪慧 副主任医师

北京军区总医院肝胆外科

于皆平 教授

湖北医科大学附属第一医院消化内科

喻荣彬 副教授

南京医科大学流行病与卫生统计学系

章国良 教授

北京大学医学部基础医学院药理学系

周士胜 教授

中国人民解放军第四军医大学生理学教研室