

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

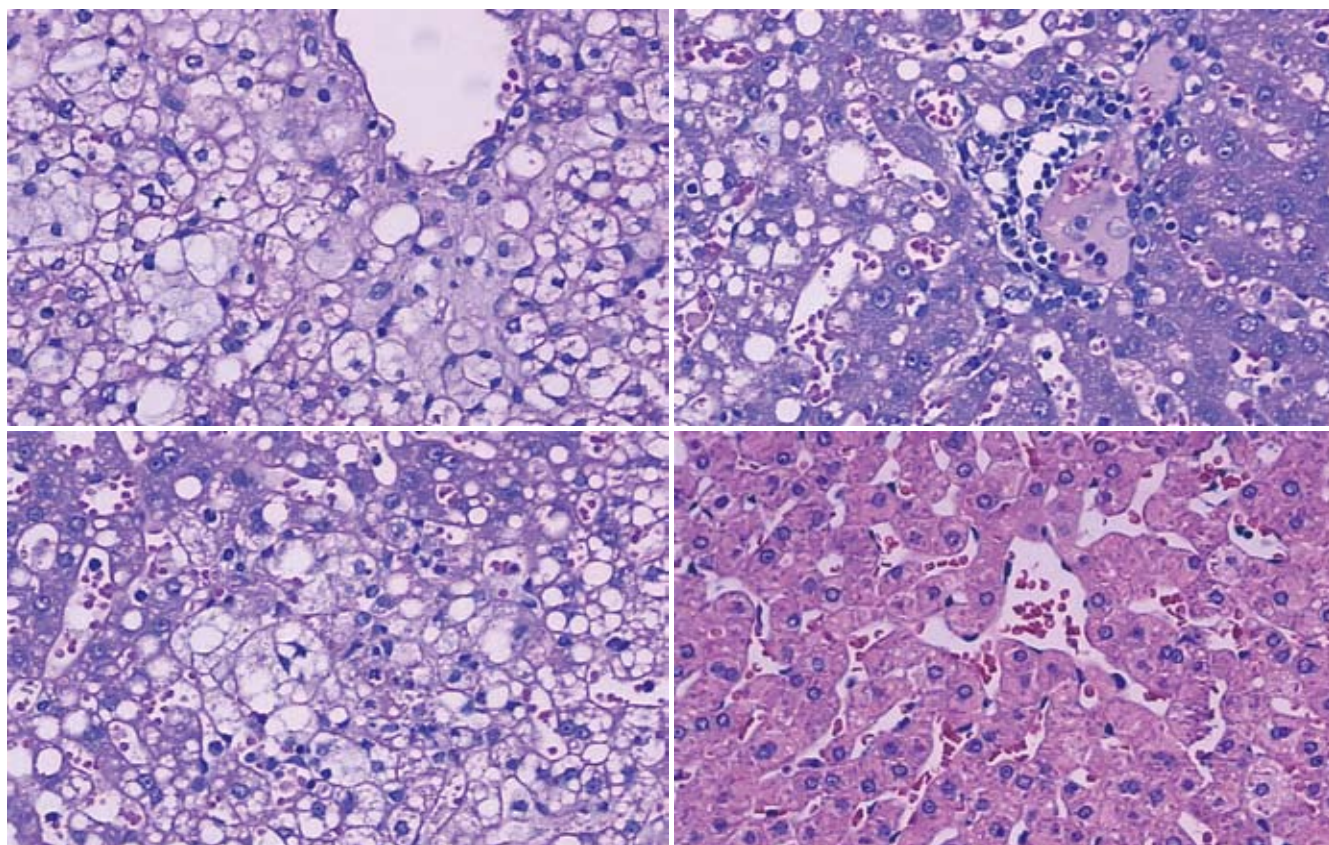
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2009年3月8日

第17卷

第7期

(Volume 17 Number 7)



7 / 2009

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2009-01-01/2011-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

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

名誉总编辑

潘伯荣教授

社长/总编辑

马连生教授

副总编辑

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

常务编委

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

编委

消化内科学

白爱平副教授
聂新明教授
陈洪副教授

陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
程斌副教授
迟宝荣教授
崔立红副教授
邓长生教授
丁士刚主任医师
董蕾教授
杜雅菊主任医师
樊晓明主任医师
房静远教授
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关玉盘教授
郭晓钟教授
何松教授
洪天配教授
胡伏莲教授
胡和平主任医师
黄晓东副主任医师
黄颖秋教授
黄缘教授
季国忠副教授
江米足主任医师
姜春萌教授
姜慧卿教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李淑德教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李祖国副教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘凤斌教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘占举教授
陆伦根教授
马欣主任医师

倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴云峰教授
秦成勇教授
任粉玉副教授
任建林教授
邵先玉教授
沈琳主任医师
沈守荣教授
沈薇教授
施瑞华教授
宋军副教授
宋于刚教授
唐世刚教授
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
夏冰教授
夏时海副教授
徐可树教授
许乐主任医师
杨建民教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
张春清教授
张国梁主任医师
张军教授
张小晋主任医师
张晓岚教授
张筱茵副教授
张志坚教授
郑培永副教授
郑鹏远教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
邹晓平主任医师

消化外科学

别平教授
蔡开琳副教授
蔡三军主任医师
曹杰主任医师

陈光教授
陈海龙教授
陈积圣教授
陈进宏副主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凜教授
陈强谱教授
陈汝福教授
陈亚军主任医师
陈钟教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
仇毓东副教授
崔云甫教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
单云峰副主任医师
丁义涛教授
董明教授
房林副教授
傅红副教授
傅华群教授
傅志仁主任医师
葛海燕教授
龚建平教授
巩鹏副教授
谷俊朝主任医师
顾岩教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何裕隆教授
黄志勇副教授
季加孚教授
英卫东副主任医师
蒋龙元副教授
李国威教授
李华副教授
李华山副主任医师
李靖副教授
李奇林教授
李胜研究员
李涛副主任医师

李文岗副教授
李旭副教授
梁力建教授
刘超副教授
刘建教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
禄韶英副主任医师
吕明德教授
吕云福教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦建民副主任医师
邱宝安主任医师
邱双健副教授
邱伟华副主任医师
裘正军教授
沈柏用副教授
沈世强教授
施诚仁教授
石毓君副研究员
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邵升副教授
汤恢煊教授
田晓峰教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王德盛副主任医师
王凤山教授
王广义教授
王健生教授
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王要军教授
王悦华副主任医师

世界华人消化杂志®

编辑委员会

王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
吴河水教授
吴健雄教授
吴金术教授
吴泰璜教授
吴志勇教授
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐迅迪副主任医师
徐泱副主任医师
许戈良教授
严律南教授
杨柏霖副主任医师
杨家和主任医师
杨秋蒙副主任医师
杨维良教授
伊力亚尔·夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于则利教授
郁宝铭教授
元云飞教授
张佳林教授
张进祥副教授
张俊副研究员
张群华教授
张水军教授
张宗明教授
周伟平教授
邹小明教授

消化感染病学

陈国凤主任医师
陈红松副研究员
陈建杰教授
陈仕珠主任医师
陈耀凯副教授
陈志辉副主任医师
党双锁教授
丁惠国教授
范建高教授
范小玲主任医师

高润平教授
高泽立副教授
龚国忠教授
管世鹤副教授
何生松教授
胡国信副主任医师
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
貌盼勇研究员
宁琴教授
钱林学主任医师
秦波教授
石统东副教授
孙殿兴主任医师
谭德明教授
汤华研究员
唐霓副研究员
唐晓鹏教授
王凯教授
王怡主任医师
魏来教授
吴建国教授
吴君主任医师
宣世英教授
杨江华副主任医师
杨林副研究员
姚鹏副教授
张继明教授
张明辉副主任医师
张绪清副教授
张占卿主任医师
赵桂鸣主任医师
赵连三教授
周霞秋教授
朱传武副主任医师
庄林主任医师

消化中医药学

蔡淦教授
陈治水主任医师
杜群副研究员
黄恒青主任医师
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员

刘孟安教授
刘平教授
刘绍能主任医师
沈洪教授
唐志鹏研究员
王富春教授
王新月教授
谢鸣教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

曹秀峰主任医师
曹志成院士
陈公琰主任医师
李璠教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
沈克平主任医师
肖文华主任医师
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

白彬主任医师
陈克敏教授
官泳松教授
韩新巍教授
李健丁教授
龙学颖副主任医师
倪才方教授
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
徐克教授
杨业发教授
杨建勇教授
赵卫主任医师

消化内镜及介入治疗学

丁佑铭教授
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
孙明军教授
万军教授

吴硕东教授
袁友红副教授

消化中西医结合学

唐文富副教授
王学美研究员
魏睦新教授
张春虎副教授

消化基础研究

曹洁副教授
曹鹏副研究员
樊红副教授
高春芳研究员
高国全教授
高英堂研究员
管冬元副教授
胡旭初副教授
黄文林教授
李刚教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
刘克辛教授
梅林教授
彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
任浩副教授
台桂香教授
谭学瑞教授
田颖刚副研究员
汪思应教授
吴军研究员
吴俊华副教授
徐宁志研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赧宏研究员
郁卫东副研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周南进研究员
周士胜教授
周素芳教授

周晓东研究员
周晓武副主任医师

消化病理学

杜祥教授
李淳副教授
刘丽江教授
刘勇钢副主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
王鲁平主任医师
王娅兰教授
魏蕾教授
阎晓初副教授
颜宏利副教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授
朱亮副教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2009 年 3 月 8 日

第 17 卷

第 7 期

(总第267期)

述 评

637 加强对食管腐蚀伤的认识及伤后瘢痕狭窄的防治

谭群友, 王如文, 蒋耀光

基 础 研 究

642 丹参酮 II A 对低氧培养下人胃癌SGC7901细胞增殖、凋亡及HIF-1 α 表达的影响

宗绪山, 冯玉光, 王鑫, 邢国辉, 吴美英, 朱芸

647 抑癌基因Pdc4的表达对羟基喜树碱细胞毒活性的影响

王汉卿, 孙震晓

652 IRAK-M在内毒素诱导Kupffer细胞耐受中的表达及其意义

李旭宏, 陈先锋, 游海波, 刘海忠, 刘作金, 龚建平

657 葛根素对大鼠酒精性肝炎的影响及其机制

曲智威, 温春阳, 王爱平, 菊文博, 任爱华, 刘卯阳, 周艳

662 梗阻性黄疸大鼠NF- κ B的变化及其对免疫应答的影响

成小林, 时开网, 徐锦, 李伟

667 吡咯列酮对重症急性胰腺炎大鼠肺组织中ICAM-1表达的影响

谢俊锋, 刘志坚, 白爱平, 姜景平, 范海青, 陈江, 谢勇, 徐萍

临 床 研 究

672 脂联素与维吾尔族非酒精性脂肪肝病的关系

石光英, 郭新文, 王隽, 冯慧, 许爱云, 何方平

文 献 综 述

677 食管癌危险因素及预防研究进展

张小刚, 钟理, 王建飞

681 p53基因网络与幽门螺杆菌致胃病关系的研究进展

齐淑文, 谢立群, 舒徐, 王华

687 炎症性肠病肠道淋巴细胞归巢研究进展

储昭新, 秦环龙

研 究 快 报

694 奥曲肽对SGC-7901胃癌细胞中Fas, FasL及P53表达的影响

唐卓斌, 杜楠, 房殿春

699 靶向ASGPR1的外源性microRNA对HBV表达和复制的抑制作用

郜玉峰, 余莉, 李家斌, 魏少峰, 李旭, 沈继龙

临 床 经 验

705 单纯性肥胖伴暴食行为者胃排空速率的变化特征

刘红芬, 刘丽, 常丽丽, 范亚坤

708 胃肠激素和胃黏膜pH值在体外循环心脏手术中的变化

黑飞龙, 王泽锋, 崔勇丽, 于坤, 周伯颐, 龙村

712 乙型肝炎病毒cccDNA与HBx蛋白在肝细胞性肝癌中表达的关系及意义

潘爱萍, 黄古叶, 陈晶, 何燕玲

716 恩替卡韦联合乙肝免疫球蛋白预防肝移植术后乙肝再感染

郑俊福, 韩大康, 李丽, 罗晓岚, 肖默, 卢实春, 闫军

720 腹腔镜超声和经皮超声在肝癌射频消融治疗中的联合应用

王峰, 牟培源, 周宁新, 周丁华, 白媛媛

724 DNA倍体分析与癌胚抗原检测对良、恶性腹水鉴别诊断的意义

张爱军, 许琳, 李文利, 马师洋, 钮自宇, 王青

	<p>729 老年原发性肝癌的临床资料分析176例 董为民, 吴本伊</p> <p>733 黛力新治疗无明显精神症状的腹泻型感染后肠易激综合征30例 陈浩, 林李森, 郑君杰</p> <p>737 sCD40L在炎症性肠病中的表达及临床意义 谢芳</p>
病例报告	<p>740 ERCP胆总管结石取石术后并发胆道蛔虫病1例 吴炜景, 赵亚刚, 孙大勇, 曾海萍</p>
致 谢	742 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	<p>641 《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆2008年版《中文核心期刊要目总览》</p> <p>651 第二十一次全国中西医结合消化学术会议征文通知</p> <p>656 中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志2007年影响因子0.568</p> <p>661 世界华人消化杂志英文摘要要求</p> <p>671 2007年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序</p> <p>676 世界华人消化杂志标点符号用法</p> <p>686 2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知</p> <p>698 世界华人消化杂志参考文献要求</p> <p>704 世界华人消化杂志名词术语标准</p> <p>711 世界华人消化杂志数字用法标准</p> <p>715 世界华人消化杂志栏目设置</p> <p>732 世界华人消化杂志被收录情况</p> <p>736 中国科技期刊引证报告(核心版)发布WJG 2007年影响因子0.745</p> <p>739 WJG荣获2007年“中国百种杰出学术期刊”和2008年中国国际化精品科技期刊</p>
封面故事	<p>Fu JF, Fang YL, Liang L, Wang CL, Hong F, Dong GP. A rabbit model of pediatric nonalcoholic steatohepatitis: The role of adiponectin. <i>World J Gastroenterol</i> 2009; 15(8): 912-918 http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/912.asp</p>
本期责任人	<p>编务 刘晓芳; 送审编辑 李军亮; 组版编辑 吴鹏朕; 责任编辑 李军亮; 英文编辑 张海宁, 张晓枚; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生</p>

<div>世界华人消化杂志</div> <div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div> <div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (旬刊)</div> <div>创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2009-03-08 原刊名 新消化病学杂志</div> <div>名誉总编辑 潘伯荣 总 编 辑 马连生 常务副总编辑 张海宁 编辑部主任 张海宁 期 刊 名 称 世界华人消化杂志 主 管 单 位 山西省科学技术厅 主 办 单 位 太原消化病研治中心</div>		<div>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div> <div>出版 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div> <div>印刷 北京科信印刷厂</div> <div>发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱)</div> <div>订购 全国各地邮电局</div> <div>邮购 世界华人消化杂志编辑部 030001, 山西省太原市双塔西街77号 电话: 0351-4078656 E-mail: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com</div>		<div>世界华人消化杂志是一份同行评议性的旬刊, 是一份被《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊.《世界华人消化杂志》的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》和俄罗斯《文摘杂志》收录.</div> <div>世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://wcjd.wjgnet.com), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流.</div> <div>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</div> <div>2009年版权归世界华人消化杂志所有</div>	
中国标准连续出版物号 ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R		邮发代号 82-262	国外代号 M 4481	国内定价 每期24.00元 全年864.00元	广告经营许可证 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

March 2009 Contents in Brief Volume 17 Number 7

EDITORIAL	637 Strengthening the understandings on corrosive esophageal burn and prevention and management of corrosive esophageal stricture <i>Tan QY, Wang RW, Jiang YG</i>
BASIC RESEARCH	<p>642 Effects of Tan II A on the proliferation, apoptosis and expression of HIF-1α of human gastric cancer cell line SGC7901 under hypoxia <i>Zong XS, Feng YG, Wang X, Xing GH, Wu MY, Zhu Y</i></p> <p>647 Effect of Pdc4 tumor suppressor gene expression on cytotoxicity of hydroxycamptothecine <i>Wang HQ, Sun ZX</i></p> <p>652 Expression of IRAK-M in endotoxin-tolerant Kupffer cells and its significance <i>Li XH, Chen XF, You HB, Liu HZ, Liu ZJ, Gong JP</i></p> <p>657 Protective effect of puerarin on rats with alcoholic hepatitis <i>Qu ZW, Wen CY, Wang AP, Ju WB, Ren AH, Liu MY, Zhou Y</i></p> <p>662 Variation of NF-κB and its effect on immune response in rats with obstructive jaundice <i>Cheng XL, Shi KW, Xu J, Li W</i></p> <p>667 Effect of pioglitazone on expression of intercellular adhesion molecule-1 in pulmonary tissues of rats with severe acute pancreatitis <i>Xie JF, Liu ZJ, Bai AP, Jiang JP, Fan HQ, Chen J, Xie Y, Xu P</i></p>
CLINICAL RESEARCH	672 Relationship between adiponectin and non-alcoholic fatty liver disease in Uygur national minority <i>Shi GY, Guo XW, Wang J, Feng H, Xu AY, He FP</i>
REVIEW	<p>677 Evaluation of risk factors and prevention strategies of esophageal cancer <i>Zhang XG, Zhong L, Wang JF</i></p> <p>681 Research progress in the relationship between p53 gene network and <i>H pylori</i>-induced gastric disease <i>Qi SW, Xie LQ, Xu S, Wang H</i></p> <p>687 Progress of gut associated lymphocyte homing in inflammatory bowel diseases <i>Chu ZX, Qin HL</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>694 Effects of octreotide on expression of Fas, FasL and P53 in human gastric cancer SGC-7901 cells <i>Tang ZB, Du N, Fang DC</i></p> <p>699 Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by artificial microRNA targeted ASGPR1 <i>Gao YF, Yu L, Li JB, Wei SF, Li X, Shen JL</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>705 Characteristics of gastric emptying rate in simple obesity accompanied by bulimia <i>Liu HF, Liu L, Chang LL, Fan YK</i></p> <p>708 Changes in gastrointestinal hormone and gastric intramucosal pH during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass <i>Hei FL, Wang ZF, Cui YL, Yu K, Zhou BY, Long C</i></p> <p>712 Relationship of hepatitis B virus covalently closed circular DNA expression to expression of HBx protein in hepatocellular carcinoma and their significance <i>Pan AP, Huang GY, Chen J, He YL</i></p> <p>716 Intramuscular hepatitis B immunoglobulin combined with entecavir for long-term prophylaxis of hepatitis B re-infection after liver transplantation <i>Zheng JF, Han DK, Li L, Luo XL, Xiao M, Lu SC, Lv J</i></p>

	<p>720 Combined application of laparoscopic ultrasonography and percutaneous ultrasonography in radiofrequency ablation for hepatic cancer <i>Wang F, Mu PY, Zhou NX, Zhou DH, Bai YY</i></p> <p>724 Significance of DNA ploidy analysis and carcinoembryonic antigen assay for differential diagnosis between benign and malignant ascites <i>Zhang AJ, Xu L, Li WL, Ma SY, Niu ZY, Wang Q</i></p> <p>729 Primary liver carcinoma in elderly patients: an analysis of 176 cases <i>Dong WM, Wu BY</i></p> <p>733 Treatment of diarrhea-predominant Post-infectious irritable bowel syndrome with Deanxit: an analysis of 30 cases <i>Chen H, Lin LM, Zheng JJ</i></p> <p>737 Expression of soluble CD40L in inflammatory bowel disease and its clinical significance <i>Xie F</i></p>
CASE REPORT	<p>740 One-case analysis of biliary tract ascariasis after removal of choledocholithiasis by endoscopic retrograde cholangiopancreatography <i>Wu WJ, Zhao YG, Sun DY, Zeng HP</i></p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>742 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Fu JF, Fang YL, Liang L, Wang CL, Hong F, Dong GP.</i> A rabbit model of pediatric nonalcoholic steatohepatitis: The role of adiponectin. <i>World J Gastroenterol</i> 2009; 15(8): 912-918 http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/912.asp</p>
RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE	<p>Assistant Editor: <i>Xiao-Fang Liu</i> Review Editor: <i>Jun-Liang Li</i> Electronic Page Editor: <i>Peng-Zhen Wu</i> Editor-in-Charge: <i>Jun-Liang Li</i> English Language Editor: <i>Hai-Ning Zhang, Xiao-Mei Zhang</i> Proof Editor: <i>Hai-Ning Zhang</i> Layout Editor: <i>Lian-Sheng Ma</i></p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993
Renamed on January 25, 1998
Publication date March 8, 2009

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

RESPONSIBLE INSTITUTION

Department of Science and Technology
of Shanxi Province

SPONSOR

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

EDITING

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

PRINTING

Beijing Kexin Printing House

PUBLISHING

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

OVERSEAS DISTRIBUTOR

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

HONORARY EDITOR-IN-CHIEF

Bo-Rong Pan

EDITOR-IN-CHIEF

Lian-Sheng Ma

SCIENCE EDITORS

Director: Hai-Ning Zhang

SUBSCRIPTION

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

CSSN

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

COPYRIGHT

© 2009 Published by *WCJD*. All rights reserved; no part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise without the prior permission of *WCJD*. Authors are required to grant *WCJD* an exclusive licence to publish.

SPECIAL STATEMENT

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

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

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

Copyright © 2009 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

加强对食管腐蚀伤的认识及伤后瘢痕狭窄的防治

谭群友, 王如文, 蒋耀光

谭群友, 王如文, 蒋耀光, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所胸外科 重庆市 400042

谭群友, 2005年中国人民解放军第三军医大学博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事胸部疾病的外科治疗研究, 尤其擅长食管和肺部疾病的外科治疗。

通讯作者: 蒋耀光, 400042, 重庆市渝中区长江支路10号, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所胸外科。tanqy001@163.com

电话: 023-68757982 传真: 023-68816736

收稿日期: 2009-02-02 修回日期: 2009-03-02

接受日期: 2009-03-05 在线出版日期: 2009-03-08

Strengthening the understandings on corrosive esophageal burn and prevention and management of corrosive esophageal stricture

Qun-You Tan, Ru-Wen Wang, Yao-Guang Jiang

Qun-You Tan, Ru-Wen Wang, Yao-Guang Jiang, Department of Thoracic Surgery, Daping Hospital & Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400042, China

Correspondence to: Yao-Guang Jiang, Department of Thoracic Surgery, Daping Hospital & Research Institute of Surgery, the Third Military Medical University of Chinese PLA, 10 Changjiang Branch Road, Yuzhong District, Chongqing 400042, China. tanqy001@163.com

Received: 2009-02-02 Revised: 2009-03-02

Accepted: 2009-03-05 Published online: 2009-03-08

Abstract

Caustic esophageal injuries are corrosive burns of esophagus mostly caused by ingestion of chemical caustic substances such as strong acid or alkali. There is often "saddle" dysphagia following three pathologic phases after injury. In addition to early emergency treatment, it is very important to prevent corrosive esophageal stricture by medication, dilation, stenting and so on. Different surgical operations can be selected for those with cicatrix stricture of esophagus. In this paper, we comment on the causes, pathology, diagnosis of caustic esophageal injury and prevention and management of corrosive esophageal stricture.

Key Words: Corrosive burn of esophagus; Diagnosis; Prevention; Management; Corrosive esophageal stricture

Tan QY, Wang RW, Jiang YG. Strengthening the understandings on corrosive esophageal burn and prevention and management of corrosive esophageal stricture. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 637-641

摘要

食管腐蚀伤为吞服强酸或强碱等化学腐蚀剂后引起的食管化学性灼伤。灼伤后随着病理过程的不同阶段常有典型的“马鞍形”吞咽困难临床表现。食管腐蚀伤后除早期急救处理外,采用药物、扩张和置管等方法预防食管瘢痕狭窄至关重要。对预防措施失败、已形成严重食管瘢痕狭窄者,可根据情况采用不同的手术治疗方式。本文结合作者的临床实践与国内外文献,就食管腐蚀伤的病因、病理、诊断和伤后食管瘢痕狭窄的预防与治疗作一述评。

关键词: 食管腐蚀伤; 诊断; 防治; 食管瘢痕狭窄

谭群友, 王如文, 蒋耀光. 加强对食管腐蚀伤的认识及伤后瘢痕狭窄的防治. *世界华人消化杂志* 2009; 17(7): 637-641

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/637.asp>

0 引言

食管腐蚀伤大多为吞服强碱或强酸等腐蚀性化学腐蚀剂所致的食管灼伤。美国每年大约发生5000-15000例,但绝大多数不严重,很少需行食管重建手术治疗。我国虽无确切统计,但临床并不少见。严重食管腐蚀伤后除早期可能危及生命外,若预防不及时或措施失败,可导致食管瘢痕狭窄,影响患者进食,出现营养不良并影响生活质量,临床处理甚为棘手^[1-4]。近年来,在食管腐蚀伤后的诊断处理和瘢痕狭窄的防治方面有了一些新进展。本文在对食管腐蚀伤的病因、病理进行分析的基础上,结合我们的诊治体会,简介并评述目前国内外常用的食管腐蚀伤的诊断和伤后食管瘢痕狭窄的防治方法。

1 食管腐蚀伤的病因与病理

除强碱强酸外,常见的腐蚀剂还有农药、过氧乙酸及其他化学制品或药物。除部分是因为成

■背景资料

食管腐蚀伤临床并不少见。严重食管腐蚀伤后除早期可能危及生命外,若处理不及时或措施失败,可导致食管瘢痕狭窄,严重影响患者生活质量,临床处理甚为棘手。近年来,在食管腐蚀伤后的诊断处理和瘢痕狭窄的防治方面有些新进展。

■同行评议者

伊力亚尔·夏合丁, 教授, 新疆医科大学第一附属医院胸外科

■研究前沿

除早期急救处理外,食管腐蚀伤后采用药物、扩张和置管等方法预防食管瘢痕狭窄,探索采用不同的手术方式治疗已形成严重食管瘢痕狭窄,均是目前研究的热点。

人自杀时故意吞服外,在儿童和大多数成人主要是误服所致,因此,加强这类化学物质的保管非常重要^[5]。

食管腐蚀伤的严重程度,取决于吞服化学腐蚀剂的种类、浓度、剂量、性状、食管的解剖特点、伴随的呕吐情况及腐蚀剂与组织接触的时间等因素。强碱产生较严重的溶解性坏死,可引起食管蛋白溶解脂肪皂化,碱性腐蚀伤是酸性腐蚀伤的11倍;而强酸产生蛋白凝固性坏死,一般较浅表,但由于不能像强碱一样被胃酸中和,可引起胃甚至十二指肠严重损伤。吞服液态腐蚀剂很快通过食管到达胃内,损伤面广,大多食管和胃损伤严重,瘢痕狭窄较重;固态腐蚀剂如结晶或粉末,易黏附于口腔黏膜,服入后立即发生剧痛,迫使停止继续吞服,故损伤多局限于口腔和咽喉部,食管以下损伤较轻。化学腐蚀剂通常与食管的三个生理狭窄接触时间最长,因此常在这些部位发生较严重的灼伤^[1-2]。

食管腐蚀伤的病理变化类似皮肤烧伤,根据严重程度可分为三度:Ⅰ度损伤局限于黏膜或黏膜下层,组织充血水肿或轻度上皮脱落,一般不造成瘢痕狭窄;Ⅱ度损伤累及食管肌层,黏膜严重充血、出血、渗出,表层坏死、深度溃疡,食管纤维增生,大多愈合后形成瘢痕导致狭窄;Ⅲ度损伤累及食管全层及周围组织,食管坏死穿孔、大出血,可导致纵隔炎、败血症,常致休克、中毒甚至死亡,幸存者产生严重的食管瘢痕狭窄^[1,6]。

2 食管腐蚀伤的诊断

一般根据吞服强酸或强碱等腐蚀性化学药物病史,体检发现口唇、舌、口腔及咽部发现灼伤的痕迹,患者有食管腐蚀伤的相应临床表现即可做出诊断^[2]。采集病史时除了解吞服腐蚀剂的剂量、浓度、性质(酸或碱)及原因(误服或自杀),还应了解损伤的范围及损伤程度。早期食管镜和超声食管镜检查可了解病理变化、损伤程度及部位^[7-8]。但检查应十分细心、谨慎,以免发生穿孔。后期食管造影检查可明确瘢痕狭窄部位、范围及程度。

吞服腐蚀剂后的临床表现与吞服化学腐蚀剂的种类、浓度、剂量、性状、吞服方式、损伤部位、范围及严重程度有关^[1]。主要有:(1)疼痛与呕吐,吞服腐蚀剂后立即感唇、口腔、咽部、胸骨后疼痛。胃腐蚀伤时可有上腹痛,随即反射性呕吐,呕吐物为血性。亦可有上腹部压痛,若胃壁坏死或穿孔则腹部压痛更为明显,甚

至出现腹肌紧张及反跳痛等腹膜炎表现。(2)吞咽困难,食管腐蚀伤后典型的吞咽困难表现呈“马鞍型”,即早期因疼痛和口、咽、食管充血水肿,出现不同程度的拒食或吞咽困难,约10 d左右局部充血、水肿消退,可逐渐恢复经口进食,若食管损伤严重,由于瘢痕组织增生挛缩,再度出现进行性加重的吞咽困难。(3)其他并发症,吞服强酸、强碱量多且浓度高者可出现发热、昏迷、休克等中毒症状,严重者导致死亡;若伤及会厌、喉部及呼吸道,可出现咳嗽、声音嘶哑及呼吸困难,因反流误吸可引起肺部并发症^[9];视食管、胃损伤的严重程度,可有少量或大量呕血、黑便,严重者出现食管穿孔破入纵隔引起纵隔炎,穿入胸腔引起液气胸,穿入气管引起误吸及肺炎,胃穿孔则造成弥漫性腹膜炎;若伤后严重瘢痕狭窄,患者因进食困难而引起严重营养障碍,小儿生长发育受到影响。

3 食管腐蚀伤的急救处理

食管腐蚀伤后应简要采集病史,包括吞服腐蚀剂的种类、时间、浓度和量。于伤后数小时内来医院者,最关键的是迅速判断患者一般情况后,立即进行急救处理。(1)全身治疗,禁食、抗感染、镇静、止痛,纠正低血压和低血容量,保持水电解质及酸碱平衡,早期营养支持;(2)保持呼吸道通畅,必要时行气管切开及机械辅助呼吸;(3)吞服量大者放置鼻胃管用少量温盐水反复洗胃,以减少毒素吸收。胃管予以保留,可早期鼻饲饮食,同时对食管腔起着支撑作用,避免食管完全闭锁。针对腐蚀剂性质采用中和治疗,以弱酸中和强碱,常用橘子汁、柠檬汁和食醋;以弱碱中和强酸,如肥皂水、氧化镁、蛋清和植物油等。但由于担心中和治疗可能因酸碱反应产热加重对消化系的损伤,因此尚有争议;(4)对吞服腐蚀剂量多、浓度高的患者,可有上消化系的广泛坏死、穿孔、严重出血,常需急诊手术。视损伤情况可施行胸腔闭式引流术、纵隔扩清术、食管切除、颈部食管外置、食管胃切除术或空肠造瘘术等。但这类手术死亡率很高。Dapri *et al*^[10]对浓盐酸腐蚀伤,中下段食管和胃严重损伤穿孔的病例采用腹腔镜经膈肌裂孔行食管切除术,创伤较小,术后6 mo再行食管结肠颈部吻合术,术后恢复顺利。

4 食管腐蚀伤后瘢痕狭窄的预防

4.1 药物预防 肾上腺皮质激素有抗炎、减轻组

织水肿, 促进上皮化及抑制纤维组织增生的作用, 对中等程度食管腐蚀伤有效, 已广泛用于临床^[11]. 但单用激素治疗可能加重感染, 因此, 同时应用广谱抗生素可提高治疗效果. β -氨基丙晴、青霉胺及秋水仙素等具有较强的抗胶原代谢作用, 能抑制瘢痕形成, 但由于毒性大, 难以长期应用以达到治疗目的. 上皮生长因子和干扰素 γ 动物实验证实有效, 但尚未用于临床. 皮下注射肝素7 d有较好的预防效果, 其机制是抗凝、抗血栓及对上皮保护作用, 其他如曲美他嗪、蔗糖铝^[12]、白藜芦醇^[13]、臭氧^[14]和Ebselen^[15]在动物实验中对食管腐蚀伤后瘢痕狭窄的预防均有明显效果, 但尚未在临床得到肯定. 抗结核药物异烟肼的衍生物肼苯哒嗪为单胺氧化酶抑制剂, 能够影响胶原的交联而抑制胶原合成, 我科将其用于预防食管腐蚀伤后瘢痕狭窄的研究. 实验研究发现异烟肼组食管狭窄部管径、食管顺应性均非常显著大于对照组, 而胶原含量及胶原密度明显低于对照组, 也显著低于激素组, 说明异烟肼具有非常显著的预防食管腐蚀后瘢痕狭窄的作用, 其效果明显优于激素. 经医院伦理委员会批准, 临床试用异烟肼有一定辅助治疗效果.

4.2 食管扩张 对瘢痕狭窄较轻或病变较短的病例, 早期采用探条式或循环式食管扩张可获较肯定的疗效^[16]. 美国许多中心食管扩张的成功率在60%-80%, 但严重、多发及广泛狭窄则效果不佳. 一般超过3处的多发狭窄、超过5 cm长的狭窄, 引导钢丝不能通过弯曲的狭窄或伴有食管气管瘘者, 都不宜扩张治疗. 扩张多在食管腐蚀伤后10 d开始进行. 但近一些年来, 不少人主张早期扩张, 其效果更为显著. 除采用扩张器进行食管扩张外, 亦可采用循环扩张法, 这种方法虽然早已用于临床, 但最近国外仍有人采用, 认为这种方法较为简单、方便、穿孔危险性较小, 效果可靠, 特别在我国一些经济不发达地区更为适用. 对于咽喉闭锁的病例, Vimalraj *et al*^[17]等采用逆行扩张法, 取得了较好的疗效.

4.3 食管腔内置管 Reys *et al*^[18]最先报道了食管腔内置管预防食管腐蚀伤后瘢痕狭窄. 此后不断有学者报道长时间的食管腔内置管预防食管腐蚀伤后瘢痕狭窄, 疗效显著^[19-20]. 我们对食管腔内置管预防食管腐蚀伤后瘢痕狭窄的机制采用犬进行了实验研究, 结果显示置管组食管组织胶原蛋白沉积减少及排列趋向一致, TGF- β 1、Smad3 mRNA及蛋白水平高, Smad7

mRNA及蛋白水平下降是预防腐蚀伤后瘢痕狭窄的可能机制^[21]. 尽管有采用记忆合金支架治疗食管腐蚀伤后瘢痕狭窄的报道, 但因支架管较短, 容易移位, 且难以取出, 而且按我们的实验研究对组织的刺激反应非常显著, 较应用硅胶管严重, 因而难以用于食管腐蚀伤后瘢痕狭窄的预防. 临床上我们采用改良食管腔内两端固定的加压置管法预防食管腐蚀伤后瘢痕狭窄33例, 28例避免了手术治疗, 有效率达84.9%. 其方法是, 在食管腐蚀伤后急性炎症水肿消退后, 一般约10 d左右, 于食管腔内全程置入约1.5 cm直径的医用硅橡胶管为支架, 上端缝一软塑料管经鼻引出固定, 下端经胃造口引出腹壁, 导管胃内部剪一超过1/2周径的侧孔, 经口进食及胃造口饲食, 可通过此孔进入胃内, 固定支撑约4-6 mo后拔除^[22].

5 食管腐蚀伤后瘢痕狭窄的外科治疗

若上述药物或扩张、支架等方法疗效不佳, 需行手术治疗, 以恢复患者经口进食^[23]. 对儿童, 尽可能选择微创手术方式^[24]. 手术时机一般在腐蚀伤后半年、瘢痕稳定后. 手术适应证包括: (1)广泛食管狭窄, 扩张治疗有导致食管穿孔危险者; (2)短而硬的狭窄经扩张疗效不佳者; (3)伴幽门梗阻者.

5.1 局限性食管、幽门瘢痕狭窄 多仅需行局部成形手术即可.

5.2 广泛食管狭窄 扩张无效均需手术治疗. 但瘢痕狭窄段食管是否切除, 目前仍有争议. 主张切除者认为, 瘢痕段食管癌的发生率超过普通人群1000倍, 切除瘢痕段食管并非想象那样困难^[25]; 主张旷置者认为切除瘢痕段食管易损伤邻近器官, 即使癌变多在数十年之后, 旷置的获益大于手术切除狭窄段食管. 欧美国家多采用切除而国内多旷置瘢痕段食管. 不论瘢痕段食管是否切除, 多采用胃或结肠替代食管, 少数用空肠代胃者.

5.2.1 胃代食管: 国外无论切除或旷置瘢痕段食管常采用管状胃经食管床或胸骨后隧道与颈部食管吻合. 而管状胃具有长度足够、血供好、无反流等优点, 较以往我国常用的全胃延长5-6 cm, 将胃上提至颈部甚至咽部吻合均无困难^[26]. 我科切除瘢痕段食管用胃重建31例, 其中弓下吻合22例, 弓上及颈部吻合8例, 颈部吻合1例. 术中2例主动脉弓部游离困难, 但术后恢复顺利, 无严重并发症. 亦可采用食管胃颈部侧侧吻合方法, 方

■创新盘点

本文着重讨论食管腐蚀伤后瘢痕狭窄的预防与治疗, 尤其是改良食管腔内加压置管和一整套根据不同病情确定不同手术方式的措施, 在国内报道不多.

■应用要点

通过介绍复杂病例的实际处理效果,总结出根据具体病情手术治疗复杂病例的经验。

法简便,显著减少吻合口瘘及狭窄的发生。

5.2.2 结肠代食管:国内大多采用结肠重建,经腹切取带血管蒂的左半结肠或右半结肠,以右半结肠重建占多数。切除瘢痕段食管经食管床与口端食管吻合,或旷置瘢痕段食管经胸骨后隧道与颈部食管或咽部吻合^[27-28]。亦可采用两期结肠重建,第一期游离结肠经胸骨后上提至颈部,二期行结肠食管吻合术,可避免广泛游离及经胸骨后上提结肠在缺血情况下进行吻合,减少吻合口狭窄。我科80例结肠重建中,均旷置瘢痕段食管,术后死亡5例(6.2%),颈部吻合口瘘14例,狭窄4例。

5.2.3 结肠代食管、空肠代胃术:适用于食管广泛狭窄伴胃挛缩者,临床此类病例不多。

5.2.4 复杂病例的手术方法: (1)腐蚀伤已累及咽部,需行咽结肠吻合术,如咽隐窝已形成瘢痕,可在离声门稍远后外侧壁开口与结肠吻合,吻合口应足够大,至少3 cm以上,单层宽边吻合^[29]。我科施行15例,均恢复经口进食^[30]。(2)食管腐蚀伤后颈段食管局限性狭窄或结肠重建颈部吻合口狭窄,食管扩张治疗效果不佳者,国外报道采用胸锁乳突肌瓣修复^[31]。由于颈阔肌皮瓣肌质较薄,血供丰富,转移灵活,我科收治26例均应用颈阔肌皮瓣进行修复,全部患者肌皮瓣存活,恢复经口进食。远期观察移入食管腔内颈阔肌皮瓣类似食管黏膜,病理观察为皮肤类角化^[32]。动物实验研究证实肌皮瓣能与食管较好愈合,也能耐受常规剂量的放射。(3)食管及胃均受累及,食管严重狭窄及胃挛缩,我科收治3例,行结肠代食管、空肠代胃术,均顺利恢复经口进食。(4)重建食管替代物坏死,我科先后收治2例。1例为第1次重建结肠坏死,予以切除后胃造口饲食,17年后再次在外院采用空肠重建食管,3 mo后空肠又扭转坏死,转来我科后切除坏死空肠、通过胃造口饲食,逐渐增加饲食量,使胃扩大,9 mo后采用胃重建食管成功。另1例为重建结肠坏死亦采用上述扩大胃的方法,采用管状胃与颈段食管吻合,恢复经口进食^[33]。(5)结肠重建术后,胸骨后结肠严重狭窄,我科曾收治2例均采用背阔肌皮瓣修复。

6 结论

食管腐蚀伤后随着病理过程的不同阶段常有典型的“马鞍形”吞咽困难临床表现。除早期急救处理外,在吞咽梗阻缓解期需采用药物、扩张和置管等方法预防食管瘢痕狭窄,对预防措

施失败、已形成严重食管瘢痕狭窄的病例,病变局限者可采用食管成形术,病变广泛者应视具体情况采用切除或旷置瘢痕段食管,胃、结肠、空肠或颈阔肌皮瓣代食管手术治疗。

4 参考文献

- 1 蒋耀光. 现代小外科学. 第1版. 重庆: 重庆出版社, 2000: 363-365
- 2 Cibisev A, Nikolova-Todorova Z, Bozinovska C, Petrovski D, Spasovski G. Epidemiology of severe poisonings caused by ingestion of caustic substances. *Prilozi* 2007; 28: 171-183
- 3 Keh SM, Onyekwelu N, McManus K, McGuigan J. Corrosive injury to upper gastrointestinal tract: Still a major surgical dilemma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5223-5228
- 4 Zhou JH, Jiang YG, Wang RW, Lin YD, Gong TQ, Zhao YP, Ma Z, Tan QY. Management of corrosive esophageal burns in 149 cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 449-455
- 5 Contini S, Tesfaye M, Picone P, Pacchione D, Kuppers B, Zambianchi C, Scarpignato C. Corrosive esophageal injuries in children. A shortlived experience in Sierra Leone. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007; 71: 1597-1604
- 6 Tohda G, Sugawa C, Gayer C, Chino A, McGuire TW, Lucas CE. Clinical evaluation and management of caustic injury in the upper gastrointestinal tract in 95 adult patients in an urban medical center. *Surg Endosc* 2008; 22: 1119-1125
- 7 Cheng HT, Cheng CL, Lin CH, Tang JH, Chu YY, Liu NJ, Chen PC. Caustic ingestion in adults: the role of endoscopic classification in predicting outcome. *BMC Gastroenterol* 2008; 8: 31
- 8 Chiu HM, Lin JT, Huang SP, Chen CH, Yang CS, Wang HP. Prediction of bleeding and stricture formation after corrosive ingestion by EUS concurrent with upper endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 827-833
- 9 Crema E, Fatureto MC, Gonzaga MN, Pastore R, da Silva AA. Tracheoesophageal fistula after caustic ingestion. *J Bras Pneumol* 2007; 33: 105-108
- 10 Dapri G, Himpens J, Mouchart A, Ntounda R, Claus M, Dechamps P, Hainaux B, Kefif R, Gernay O, Cadière GB. Laparoscopic transhiatal esophago-gastrectomy after corrosive injury. *Surg Endosc* 2007; 21: 2322-2325
- 11 Fulton JA, Hoffman RS. Steroids in second degree caustic burns of the esophagus: a systematic pooled analysis of fifty years of human data: 1956-2006. *Clin Toxicol (Phila)* 2007; 45: 402-408
- 12 Temir ZG, Karkiner A, Karaca I, Ortaç R, Ozdamar A. The effectiveness of sucralfate against stricture formation in experimental corrosive esophageal burns. *Surg Today* 2005; 35: 617-622
- 13 Uguralp S, Irsi C, Aksoy T, Karabulut AB, Kirimlioglu H, Mizrak B. Resveratrol attenuates inflammation and stricture formation in experimental caustic esophageal burns. *Pediatr Surg Int* 2008; 24: 425-430
- 14 Guven A, Gundogdu G, Sadir S, Topal T, Erdogan E, Korkmaz A, Surer I, Ozturk H. The efficacy of ozone therapy in experimental caustic esophageal burn. *J Pediatr Surg* 2008; 43: 1679-1684
- 15 Ocakci A, Coskun O, Tumkaya L, Kanter M, Gurel A, Hosnuter M, Uzun L. Beneficial effects of

- Ebselen on corrosive esophageal burns of rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006; 70: 45-52
- 16 Ilkin Naharci M, Tuzun A, Erdil A, Ates Y, Bagci S, Yamanel L, Dagalp K. Effectiveness of bougie dilation for the management of corrosive esophageal strictures. *Acta Gastroenterol Belg* 2006; 69: 372-376
 - 17 Vimalraj V, Rajendran S, Jyotibas D, Balachandar TG, Kannan D, Jeswanth S, Ravichandran P, Surendran R. Role of retrograde dilatation in the management of pharyngo-esophageal corrosive strictures. *Dis Esophagus* 2007; 20: 328-332
 - 18 Reyes HM, Hill JL. Modification of the experimental stent technique for esophageal burns. *J Surg Res* 1976; 20: 65-70
 - 19 Mutaf O. Treatment of corrosive esophageal strictures by long-term stenting. *J Pediatr Surg* 1996; 31: 681-685
 - 20 Atabek C, Surer I, Demirbag S, Caliskan B, Ozturk H, Cetinkursun S. Increasing tendency in caustic esophageal burns and long-term polytetrafluorethylene stenting in severe cases: 10 years experience. *J Pediatr Surg* 2007; 42: 636-640
 - 21 Zhou JH, Jiang YG, Wang RW, Fan SZ, Gong TQ, Tan QY, Ma Z, Zhao YP, Deng B. Prevention of stricture development after corrosive esophageal burn with a modified esophageal stent in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 136: 1336-1342, 1342.e1-e7
 - 22 Wang RW, Zhou JH, Jiang YG, Fan SZ, Gong TQ, Zhao YP, Tan QY, Lin YD. Prevention of stricture with intraluminal stenting through laparotomy after corrosive esophageal burns. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 30: 207-211
 - 23 Han Y, Cheng QS, Li XF, Wang XP. Surgical management of esophageal strictures after caustic burns: a 30 years of experience. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2846-2849
 - 24 Nwomeh BC, Luketich JD, Kane TD. Minimally invasive esophagectomy for caustic esophageal stricture in children. *J Pediatr Surg* 2004; 39: e1-e6
 - 25 Kochhar R, Sethy PK, Kochhar S, Nagi B, Gupta NM. Corrosive induced carcinoma of esophagus: report of three patients and review of literature. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 777-780
 - 26 Chen TP, Yeh CH, Wu YC, Liu HP. Combined pedicled antropyloplasty and gastric pull-up reconstruction for corrosive esophagogastric stricture. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133: 1669-1670
 - 27 Bothereau H, Munoz-Bongrand N, Lambert B, Montemagno S, Cattani P, Sarfati E. Esophageal reconstruction after caustic injury: is there still a place for right coloplasty? *Am J Surg* 2007; 193: 660-664
 - 28 Chirica M, de Chaisemartin C, Goasguen N, Munoz-Bongrand N, Zohar S, Cattani P, Brette MD, Sarfati E. Colopharyngoplasty for the treatment of severe pharyngoesophageal caustic injuries: an audit of 58 patients. *Ann Surg* 2007; 246: 721-727
 - 29 Yannopoulos P, Lytras D, Paraskevas KI. Esophageal reconstruction with intraoperative dilatation of the hypopharynx for the management of chronic corrosive esophageal strictures. A technical tip. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 30: 940-942
 - 30 Jiang YG, Lin YD, Wang RW, Zhou JH, Gong TQ, Ma Z, Zhao YP, Tan QY. Pharyngocolonic anastomosis for esophageal reconstruction in corrosive esophageal stricture. *Ann Thorac Surg* 2005; 79: 1890-1894
 - 31 Ananthakrishnan N, Parthasarathy G, Maraju NK, Kate V. Sternocleidomastoid muscle myocutaneous flap for corrosive pharyngoesophageal strictures. *World J Surg* 2007; 31: 1592-1596
 - 32 Lin YD, Jiang YG, Wang RW, Gong TQ, Zhou JH. Platysma myocutaneous flap for patch stricturoplasty in relieving short and benign cervical esophageal stricture. *Ann Thorac Surg* 2006; 81: 1090-1094
 - 33 Deng B, Wang RW, Jiang YG, Gong TQ, Zhou JH, Lin YD, Zhao YP, He Y, Tan QY. Prevention and management of complications after colon interposition for corrosive esophageal burns. *Dis Esophagus* 2008; 21: 57-62

■同行评价

本文就近年来国内外在食管腐蚀伤后的诊断处理和瘢痕狭窄防治方面的最新进展, 结合自己的诊治体会进行述评, 具有一定的临床参考价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏联

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)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、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12400余种。本版还加大了专家评审力度, 5500多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1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目。《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页)。(常务副总编辑: 张海宁 2009-03-08)

丹参酮 II A对低氧培养下人胃癌SGC7901细胞增殖、凋亡及HIF-1 α 表达的影响

宗绪山, 冯玉光, 王鑫, 邢国辉, 吴美英, 朱芸

■背景资料

肿瘤微环境低氧是多种肿瘤的特点,是导致肿瘤发生发展的重要原因。寻找低氧下对肿瘤有抑制作用的小分子化合物是目前国际肿瘤界热点。中医学理论认为,“瘀血在经络脏腑之间,结为症瘕(肿瘤)”,并以此为依据采用活血化瘀抗肿瘤的治疗肿瘤。本课题组推测中医所指的“瘀血”在分子细胞水平很可能就是肿瘤的缺氧现象。

宗绪山, 王鑫, 邢国辉, 吴美英, 朱芸, 潍坊医学院 山东省潍坊市 261042

冯玉光, 潍坊医学院附属医院消化内科 山东省潍坊市 261042

宗绪山, 2006级潍坊医学院研究生, 主要从事消化系统肿瘤的研究。山东省中医管理局中医药科技发展计划基金资助项目, No. 2007-156

作者贡献分布: 此课题由冯玉光与宗绪山设计; 研究过程由宗绪山, 王鑫, 邢国辉, 吴美英及朱芸共同完成; 研究用新试剂及分析工具由冯玉光提供; 数据分析由宗绪山完成; 本论文写作由宗绪山与冯玉光完成。

通讯作者: 冯玉光, 副教授, 261042, 山东省潍坊市胜利东街288号, 潍坊医学院附属医院消化内科。f-yg2008@163.com
电话: 0536-8068885

收稿日期: 2008-12-22 修回日期: 2009-02-12

接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-08

Effects of Tan II A on the proliferation, apoptosis and expression of HIF-1 α of human gastric cancer cell line SGC7901 under hypoxia

Xu-Shan Zong, Yu-Guang Feng, Xin Wang, Guo-Hui Xing, Mei-Ying Wu, Yun Zhu

Xu-Shan Zong, Xin Wang, Guo-Hui Xing, Mei-Ying Wu, Yun Zhu, Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China

Yu-Guang Feng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China

Supported by: the Foundation from Administration Bureau of Chinese Medicine of Shandong Province, No. 2007-156

Correspondence to: Yu-Guang Feng, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Weifang Medical College, Weifang 261042, Shandong Province, China. f-yg2008@163.com

Received: 2008-12-22 Revised: 2009-02-12

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To study the effects of Tan II A on the proliferation, apoptosis and expression of HIF-1 α of human gastric cancer cell line SGC7901 under hypoxia.

METHODS: The model of hypoxia was established by CoCl₂. There were four groups: normal control group, hypoxia control group, and hypoxia combined with different concen-

trations of Tan II A group. After Tan II A was added to the media with 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0 mg/L, respectively for 24, 48 and 72 h during hypoxia, and the cells' proliferative vitality was detected by MTT. After Tan II A was added to the media with 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 and 10.0 mg/L respectively for 48 and 72 h during hypoxia, the apoptosis of SGC7901 human gastric cancer cells was detected by HOECHST staining. After Tan II A was added to the media with 0.5, 2.0 and 10.0 mg/L respectively for 48 h during hypoxia, the expression of HIF-1 α protein was detected by immunocytochemical staining.

RESULTS: MTT confirmed that the proliferation of SGC7901 cancer cells was obviously inhibited by Tan II A ($P < 0.01$) in a dose- and time-dependent manner under hypoxia, and the inhibition rate reached 71.2% after treatment with 10 mg/L Tan II A for 72 h. HOECHST staining found Tan II A induced apoptosis of gastric cancer cells in a dose- and time-dependent manner after treatment with 0.5-10.0 mg/L Tan II A for 48 h and 72 h respectively under hypoxia ($F = 60354.00, 187922.10$, both $P < 0.05$), and the apoptosis rate reached $40.70\% \pm 1.55\%$ after treatment with 10.0 mg/L Tan II A for 72 h. Immunocytochemical staining revealed that the expression of HIF-1 α protein was inhibited by Tan II A in a dose-dependent manner under hypoxia ($F = 712.326, P < 0.01$).

CONCLUSION: Tan II A inhibits the proliferation of SGC7901 human gastric cancer cells and induces the apoptosis of them under hypoxia, which may be related to the down regulation of HIF-1 α protein expression by Tan II A.

Key Words: Tan II A; Hypoxia; Gastric cancer cell; Apoptosis; Hypoxia inducible factor-1 alpha

Zong XS, Feng YG, Wang X, Xing GH, Wu MY, Zhu Y. Effects of Tan II A on the proliferation, apoptosis and expression of HIF-1 α of human gastric cancer cell line SGC7901 under hypoxia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 642-646

■同行评议者

唐文富, 副教授, 四川大学华西医院中西医结合科

摘要

目的: 观察丹参酮 II A (Tan II A) 对低氧培养下人胃癌 SGC7901 细胞增殖、凋亡及 HIF-1 α 表达的影响。

方法: 用氯化钴 (CoCl₂) 创建低氧模型, 设常氧对照组、低氧对照组和低氧加不同浓度 Tan II A 组。分别取 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L 的 Tan II A 干预低氧胃癌 SGC7901 细胞 24、48、72 h 后, MTT 法检测细胞活力; 用上述同样浓度的 Tan II A 干预低氧胃癌细胞 48 h 和 72 h 后, HOECHST 染色法检测细胞凋亡。Tan II A (0.5、2.0、10.0 mg/L) 干预低氧胃癌细胞 48 h 后, 免疫细胞化学二步法检测 HIF-1 α 蛋白表达的变化。

结果: MTT 法证实, 低氧条件下, Tan II A 呈时间、剂量依赖性地抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖 ($P < 0.01$), 10.0 mg/L Tan II A 作用细胞 72 h 后, 其抑制率达 71.2%。HOECHST 染色法发现, 低氧条件下, 分别用 0.5-10.0 mg/L 浓度的 Tan II A 作用胃癌细胞 48、72 h, Tan II A 可呈时间、剂量依赖性地诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡 ($F = 60354.00, 187922.10$, 均 $P < 0.05$), 10.0 mg/L Tan II A 作用细胞 72 h 后, 凋亡率达 $40.70\% \pm 1.55\%$ 。免疫细胞化学法显示, Tan II A 呈剂量依赖性地抑制低氧诱导的 HIF-1 α 蛋白表达 ($F = 712.326, P < 0.01$)。

结论: 低氧条件下, Tan II A 抑制胃癌细胞增殖并诱导其凋亡, 这种作用可能与其抑制 HIF-1 α 蛋白表达有关。

关键词: 丹参酮 II A; 低氧; 胃癌细胞; 凋亡; 低氧诱导因子-1 α

宗绪山, 冯玉光, 王鑫, 邢国辉, 吴美英, 朱芸. 丹参酮 II A 对低氧培养下人胃癌 SGC7901 细胞增殖、凋亡及 HIF-1 α 表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 642-646
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/642.asp>

0 引言

肿瘤低氧是多种实体瘤包括胃癌的特点, 而低氧环境下低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 alpha, HIF-1 α) 的表达是肿瘤发生发展、血管生成、放化疗抵抗、恶性演进、侵袭与转移的关键环节之一^[1-4, 10-11]。特别是低氧导致克隆选择, 使恶性程度高、凋亡机制缺陷的肿瘤细胞群得以在低氧环境下逆境生存增殖并对各种化疗药物耐药, 使肿瘤不断演进^[5-9]。因此, 寻找低氧下对肿瘤有抑制作用或抑制 HIF-

1 α 表达或活性的小分子化合物是目前国际肿瘤界热点^[12-17]。而中医学理论认为, “瘀血在经络脏腑之间, 结为症瘕(肿瘤)”, 并以此为依据采用活血化瘀抗肿瘤的治则治疗肿瘤, 取得了良好的治疗效果, 但其分子机制尚待深入探索^[18]。我们推测, 肿瘤低氧现象和中医的“瘀血”理论暗合。丹参是著名的活血化瘀中药, 丹参酮 II A (Tan II A) 是其重要单体成分之一, 临床和基础研究表明, 丹参及 Tan II A 具有抗肿瘤活性, 目前已发现其对多种肿瘤细胞具有生长抑制、诱导凋亡和诱导分化作用, 并调节多种肿瘤相关基因的表达^[19]。根据前述理论, 我们推测 Tan II A 活血化瘀抗肿瘤的分子机制可能是通过抑制低氧微环境下肿瘤细胞 HIF-1 α 的表达或活性发挥抗肿瘤作用。Tan II A 对低氧肿瘤的影响未见报道。本课题研究了 Tan II A 对经典低氧模拟剂氯化钴 (CoCl₂)^[20] 培养的胃癌 SGC7901 细胞增殖、凋亡和 HIF-1 α 表达的影响, 以深化对丹参及其有效成分活血化瘀抗肿瘤作用和机制的认识, 为其抗肿瘤的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 SGC7901 购自山东省医学科学院, 接种于含 100 mL/L 胎牛血清、青霉素、链霉素各 1×10^5 U/L 的 RPMI 1640 培养液中, 置 37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO₂ 培养箱内常规传代培养。丹参酮 II A (Tan II A) 为中国药品生物制品检定所的标准品, 用二甲亚砜 (DMSO) 溶解, 终浓度为 0.2 g/L, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。HOECHST32258 荧光染色试剂盒及 CoCl₂ 购于美国 Sigma 公司。RPMI 1640 培养基、MTT 均购自美国 Gibco 公司。胎牛血清 (杭州四季青), HIF-1 α mAb 及 PV-9000 免疫组化试剂盒均为北京中山金桥生物技术有限公司产品。二氧化碳恒温培养箱 (HREA Cell Germany); TE300 倒置显微镜及 BH-2 型荧光显微镜 (Olympus 公司)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法测定 Tan II A 对低氧下培养的胃癌细胞生长的抑制率: 取对数生长期的人胃癌 SGC7901 细胞, 按照 3×10^7 /L 的密度接种于 96 孔培养板, 每孔体积为 100 μL , 设常氧对照组、低氧模拟剂 (CoCl₂, 150 $\mu\text{mol/L}$) 对照组及 CoCl₂ 加 Tan II A 组, 待细胞贴壁后分别加入 CoCl₂ 及 Tan II A (0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L), 每个浓度组设 6 个复孔, 四周加入不含药物的细胞培养液为空白对照。分别培养至 24、48、72 h 后, 每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL , 继续培养 4 h, 轻轻

■ 研发前沿

依据中医的“瘀血”理论, 从活血化瘀中药中筛选在低氧环境下对肿瘤有抑制作用的小分子化合物具有广阔的前景, 同时有助于揭示活血化瘀药物抗肿瘤的分子机制, 具有重要的理论和临床价值。

■创新盘点

本研究选择典型的活血化瘀中药丹参的主要有效单体成分丹参酮ⅡA,从低氧角度阐明其活血化瘀抗肿瘤的微观机制,达到中西医两种理论的内在统一。

表 1 不同浓度Tan II A干预对低氧SGC-7901细胞增殖活性的影响 (mean ± SD, $n = 6$)

	24 h		48 h		72 h	
	A值	IR(%)	A值	IR(%)	A值	IR(%)
常氧组	0.496 ± 0.042		0.722 ± 0.028		0.834 ± 0.030	
低氧组	0.407 ± 0.014	18.0	0.582 ± 0.035	19.4	0.659 ± 0.035	21.4
低氧加Tan II A组(mg/L)						
0.5	0.395 ± 0.024	22.0	0.516 ± 0.019	27.8	0.602 ± 0.020	28.6
1.0	0.370 ± 0.026	26.0	0.438 ± 0.031	38.9	0.506 ± 0.020	39.3
2.0	0.329 ± 0.017	34.0	0.365 ± 0.048	48.6	0.432 ± 0.037	48.8
5.0	0.294 ± 0.113	40.0	0.295 ± 0.026	59.7	0.331 ± 0.016	60.7
10.0	0.251 ± 0.028	50.0	0.220 ± 0.034	69.4	0.290 ± 0.013	71.2

吸尽上清液,加入二甲基亚砷150 μ L/每孔,振荡10 min,在酶标仪上以490 nm波长测每孔的吸光度A值,并取6孔的平均值,细胞生长抑制率 = (A常氧对照组 - A低氧对照组或用药组)/A常氧对照组 × 100%。

1.2.2 HOECHST染色法检测Tan II A对低氧下培养的胃癌细胞凋亡的影响:取对数生长期的SGC7901制成 2×10^8 /L的细胞悬液,每孔0.5 mL,加入放有盖玻片的24孔板内,设常氧对照组、低氧模拟剂CoCl₂(150 μ mol/L)对照组及CoCl₂加不同浓度Tan II A组,待细胞贴壁后分别加入CoCl₂及Tan II A(0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mg/L)作用48 h和72 h后分别取出细胞爬片,甲醇/冰醋酸固定液固定5 min后,加入荧光染液HOECHST33258重悬细胞,室温避光1 h, PBS冲洗,用抗荧光液封片。判定标准:正常细胞核为蓝色,凋亡的细胞核为白色。每片连续观察10个细胞分布均匀的200倍镜视野,每视野计数50个细胞,共500个细胞,计算其阳性率百分数,并取其均值。凋亡率 = 凋亡细胞数/(正常细胞数+凋亡细胞数)。

1.2.3 免疫细胞化学二步法观察Tan II A对低氧下培养的胃癌细胞HIF-1 α 表达的影响:取对数生长期的SGC7901制成 2×10^8 /L的细胞悬液,每孔0.5 mL,加入放有盖玻片的24孔板内,设常氧对照组、低氧模拟剂CoCl₂(150 μ mol/L)对照组及CoCl₂加不同浓度Tan II A组,待细胞贴壁后分别加入CoCl₂及不同浓度的Tan II A(0.5、2.0、10.0 mg/L),48 h后取出细胞爬片,冷丙酮固定5 min, PBS冲洗,按PV-9000试剂盒步骤检测HIF-1 α , DAB显色,脱水,透明,中性树胶封片。用已知阳性的乳腺癌切片作为阳性对照,以PBS代替一抗作为阴性对照。结果判定: HIF-1 α 阳性结果为细胞质或胞核内有棕黄色颗粒出现。采用HPAIS-1000彩色病理图文分析系统,检测HIF-

表 2 不同浓度Tan II A干预对低氧SGC-7901细胞凋亡率的影响 (mean ± SD, $n = 6$, %)

	48 h	72 h
常氧组	1.07 ± 0.13	2.32 ± 0.16
低氧组	3.01 ± 0.35	5.07 ± 0.32
低氧加Tan II A组(mg/L)		
0.5	4.23 ± 0.39	6.74 ± 0.34
1.0	6.73 ± 0.58	10.05 ± 0.48
2.0	11.06 ± 1.30	18.87 ± 1.24
5.0	20.58 ± 1.46	26.97 ± 1.77
10.0	31.03 ± 1.47	40.70 ± 1.55

1 α 阳性细胞的平均A值,以间接反映HIF-1 α 蛋白的表达量,并取其均值。

统计学处理 数据用mean ± SD表示,组间比较用t检验和方差分析,用SPSS13.0统计软件分析。

2 结果

2.1 Tan II A对低氧下培养的胃癌细胞生长的抑制作用 低氧下胃癌细胞的增殖受抑制,并呈时间依赖性;而Tan II A则可呈剂量和时间依赖性地进一步抑制低氧胃癌细胞的生长(24 h F值63.804, $P < 0.05$; 48 h F值166.895, $P < 0.01$; 72 h F值405.185, $P < 0.01$), 10.0 mg/L Tan II A作用细胞72 h后,其抑制率达71.2%(表1)。

2.2 Tan II A对低氧下培养的胃癌细胞凋亡的影响 常氧组细胞培养48、72 h,只有少数细胞发生凋亡;单纯低氧培养48、72 h,细胞凋亡率分别为3.01 ± 0.35、5.07 ± 0.32,提示低氧可诱导胃癌细胞凋亡(单纯低氧组与常氧对照组比较 $P = 0.001$)。而0.5-10.0 mg/L浓度的Tan II A低氧下作用胃癌细胞48、72 h,凋亡率呈浓度和时间依赖性进一步升高(24 h F值60354.00, $P < 0.05$; 48 h F值187922.10, $P < 0.01$,表2)。10.0 mg/L Tan II A

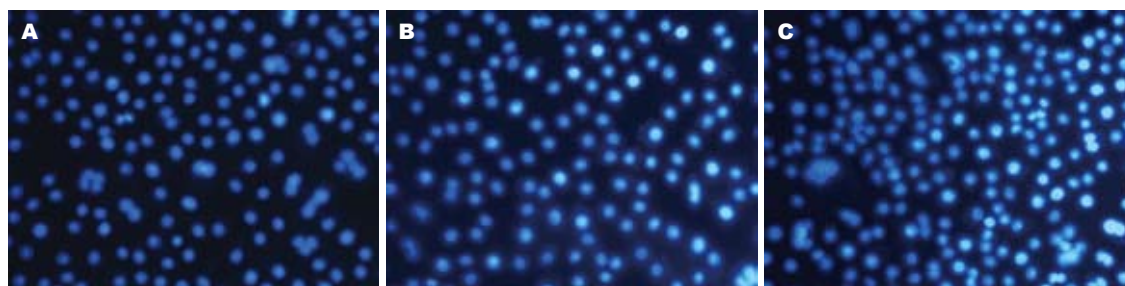


图 1 胃癌细胞株 SGC7901 细胞的凋亡 (Hoechst 染色法 $\times 200$)。A: 常氧对照组; B: 低氧对照组; C: 低氧加 10.0 mg/L Tan II A 组。

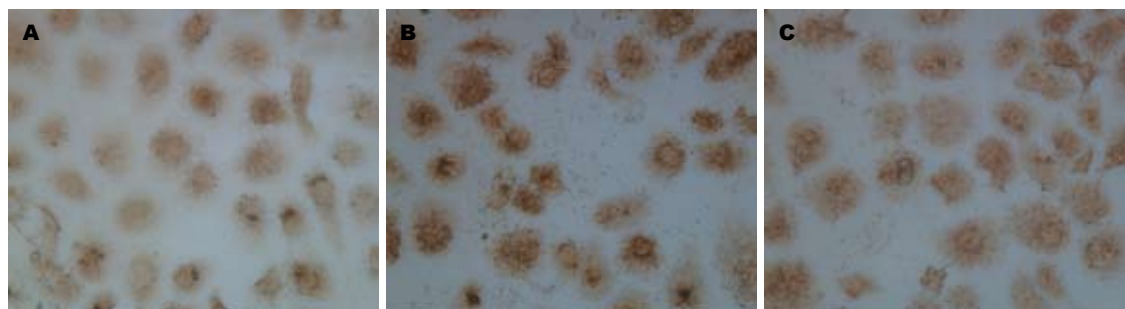


图 2 胃癌细胞株 SGC7901 HIF-1 α 蛋白的表达 (免疫细胞化学二步法 $\times 400$)。A: 常氧对照组; B: 低氧对照组; C: 低氧加 10.0 mg/L Tan II A 组。

■应用要点

本研究发现, 低氧条件下, 丹参酮 II A 可抑制胃癌细胞增殖并诱导其凋亡, 这种作用可能与其抑制 HIF-1 α 蛋白表达有关。该研究结果表明, 丹参酮 II A 可能是对低氧肿瘤有效的小分子单体化合物。通过该研究, 初步揭示了丹参活血化瘀药物抗肿瘤分子机制, 为其抗肿瘤的临床应用提供了初步理论依据。

低氧培养 72 h 后细胞凋亡率达 40.70 ± 1.55 (图 1)。

2.3 Tan II A 对低氧下培养的胃癌细胞 HIF-1 α 表达的影响 常氧对照组 HIF-1 α 蛋白呈低水平表达, 单纯低氧培养细胞 48 h 后 HIF-1 α 蛋白表达明显增高, 而低氧加 Tan II A 组 HIF-1 α 蛋白表达随 Tan II A 浓度的增加而逐渐降低。常氧组、单纯低氧组、低氧加 Tan II A 0.5、2.0、10.0 mg/L 各组 A 值分别为 0.177 ± 0.019 、 0.670 ± 0.044 、 0.552 ± 0.035 、 0.438 ± 0.031 、 0.379 ± 0.034 。说明 Tan II A 呈剂量依赖性的抑制低氧诱导的 HIF-1 α 的表达 ($F = 712.326$, $P < 0.01$, 图 2)。

3 讨论

肿瘤低氧是多种实体瘤包括胃癌的特点, 其缺氧主要是由于实体瘤低分化, 恶性程度高, 生长迅速, 血管生长的相对滞后, 常常引起血供不足, 循环和淋巴系统紊乱。而 HIF-1 α 的表达, 是肿瘤发生发展、血管生成、放化疗抵抗、恶性演进、侵袭与转移的关键环节之一^[1-11]。低氧还导致肿瘤基因组和蛋白质组不稳定, 通过克隆选择, 使发生肿瘤相关基因突变的肿瘤细胞亚群在低氧逆境下生存增殖, 耐受放化疗打击, 进而浸润转移^[5-9]。因此, 探索低氧环境下有效的抗肿瘤药物已经成为国内外学者的共识^[12-17]。已经发现, 作为丹参的主要有效提取成分, Tan II A 在常氧下抑制人肺癌细胞、鼻咽癌细胞、肝癌细

胞、胃癌细胞等多种实体瘤肿瘤细胞以及人早幼粒白血病细胞及其耐药细胞株的增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡及分化^[19], 然而低氧下 Tan II A 对肿瘤细胞包括胃癌细胞的影响尚未见报道。本研究通过细胞增殖抑制实验发现, 与常氧组比较, 低氧下胃癌细胞增殖减慢, 而 Tan II A 对低氧下胃癌细胞的生长增殖具有进一步的抑制作用, 10.0 mg/L 浓度时其抑制率达 71.2%, 并呈剂量、时间依赖性。有研究表明, 低氧对肿瘤细胞周期有明显影响, 低氧使肿瘤细胞停止于 G₁/S 期, 而这种细胞群不易被放化疗手段杀伤, 成为放化疗抵抗的原因之一^[20-22]。而我们的结果表明, Tan II A 对低氧下的胃癌细胞增殖有明显抑制作用, 推测 Tan II A 可能对处于 G₁/S 期的低氧细胞群有杀伤或诱导凋亡作用。我们应用 Hoechst 染色法进一步观察了 Tan II A 对低氧下培养的胃癌细胞凋亡的影响。结果表明, 低氧本身可一定程度的诱导胃癌细胞凋亡, 而 Tan II A 则可呈剂量和时间依赖性的诱导胃癌细胞进一步凋亡, 结合 MTT 结果, 我们推测 Tan II A 可能对处于细胞周期各期特别是 G₁/S 期的细胞群均有诱导凋亡作用。研究表明, 低氧环境下, 多种肿瘤细胞包括胃癌细胞存在凋亡异常, 一方面低氧使凋亡敏感细胞群发生凋亡, 另一方面低氧使凋亡耐受细胞群得以克隆增殖进而成为具有放化疗抵抗和高侵袭转移能力的优势细胞群, 这种细

■同行评价

本研究结合肿瘤低氧特点探索中药来源的单体成分丹参酮的作用机制,具有一定的新意,如能进一步进行中药或者复方研究,则更有临床应用前景和价值。

胞群的治疗是放化疗的难点^[5-9]。我们的结果提示, Tan II A可能对此类细胞群具有诱导凋亡作用。HIF-1是低氧条件下由HIF-1 α 和HIF-1 β 两个亚单位聚合产生的一种异源二聚体转录因子,是调控多种低氧反应靶基因表达的关键转录因子。其中HIF-1 α 蛋白在低氧下稳定,而常氧下则被泛素-蛋白酶系统迅速降解;而HIF-1 β 则呈组成性表达,不受氧分压的调控^[3]。研究发现HIF-1通过调控多种靶基因的表达以及与肿瘤相关基因的相互作用,对肿瘤的发生发展、血管生成、放化疗抵抗、恶性演进、侵袭与转移、克隆选择与凋亡抵抗等有重要影响^[1-11]。多数研究表明, HIF-1 α 表达升高使肿瘤细胞耐受凋亡,放化疗抵抗,这与肿瘤细胞的癌基因和抑癌基因的具体变化有关^[23-26]。我们应用免疫细胞化学法发现:常氧下胃癌SGC7901细胞HIF-1 α 呈低水平表达,低氧下HIF-1 α 表达明显增高,而Tan II A可呈剂量依赖性地抑制低氧下HIF-1 α 的表达。因此,我们推测Tan II A诱导低氧胃癌细胞凋亡的作用可能与其抑制HIF-1 α 的表达相关。总之,我们的初步研究结果表明, Tan II A在低氧下可抑制胃癌细胞的增殖,并诱导其凋亡;其机制至少部分可能是通过抑制HIF-1 α 的表达来实现的。这一发现有助于揭示Tan II A活血化瘀抗肿瘤的分子机制。低氧下Tan II A对胃癌细胞的上述作用的具体分子机制值得进一步深入探讨。

4 参考文献

- Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, Hankinson O, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 8104-8109
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59: 5830-5835
- Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 266-276
- Stoeltzing O, McCarty MF, Wey JS, Fan F, Liu W, Belcheva A, Bucana CD, Semenza GL, Ellis LM. Role of hypoxia-inducible factor 1 α in gastric cancer cell growth, angiogenesis, and vessel maturation. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 946-956
- Semenza GL. Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35: 71-103
- Bangoura G, Yang LY, Huang GW, Wang W. Expression of HIF-2 α /EPAS1 in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 525-530
- Zhou J, Schmid T, Schnitzer S, Brüne B. Tumor hypoxia and cancer progression. *Cancer Lett* 2006; 237: 10-21
- Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treat Rev* 2003; 29: 297-307
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 1996; 379: 88-91
- 郭花, 朱金水. 低氧微环境与胃癌. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2381-2384
- 周炜, 姜政. 低氧诱导因子-1与消化道肿瘤的研究进展. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2620-2625
- Melillo G. Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 601-605
- Rapisarda A, Uranchimeg B, Scudiero DA, Selby M, Sausville EA, Shoemaker RH, Melillo G. Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res* 2002; 62: 4316-4324
- Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732
- Melillo G, Semenza GL. Meeting report: exploiting the tumor microenvironment for therapeutics. *Cancer Res* 2006; 66: 4558-4560
- Powis G, Kirkpatrick L. Hypoxia inducible factor-1 α as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 647-654
- Wouters A, Pauwels B, Lardon F, Vermorken JB. Review: implications of in vitro research on the effect of radiotherapy and chemotherapy under hypoxic conditions. *Oncologist* 2007; 12: 690-712
- 闫俊杰, 陈信义. 恶性肿瘤与活血化瘀研究进展. *北京中医药大学学报* 2000; 23: 77-79
- 徐俊丽, 和水祥. 丹参酮抗肿瘤作用机制的研究进展. *西北药学杂志* 2006; 21: 188-190
- Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α . *J Biol Chem* 2003; 278: 15911-15916
- 李建军, 李宏宇, 辛彦, 陈延治, 李光, 刘意, 张素敏, 吴东瑛. 乏氧对胃癌细胞系MGC803细胞周期、乏氧相关基因和蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2539-2542
- Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem* 2001; 276: 7919-7926
- Sullivan R, Paré GC, Frederiksen LJ, Semenza GL, Graham CH. Hypoxia-induced resistance to anticancer drugs is associated with decreased senescence and requires hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 1961-1973
- Liu L, Ning X, Sun L, Zhang H, Shi Y, Guo C, Han S, Liu J, Sun S, Han Z, Wu K, Fan D. Hypoxia-inducible factor-1 α contributes to hypoxia-induced chemoresistance in gastric cancer. *Cancer Sci* 2008; 99: 121-128
- Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1009-1014
- Kilic M, Kasperczyk H, Fulda S, Debatin KM. Role of hypoxia inducible factor-1 α in modulation of apoptosis resistance. *Oncogene* 2007; 26: 2027-2038

抑癌基因Pdc4的表达对羟基喜树碱细胞毒活性的影响

王汉卿, 孙震晓

王汉卿, 孙震晓, 北京中医药大学中药学院 北京市 100102
王汉卿, 北京中医药大学硕士, 主要从事分子细胞药理方向的研究。

作者贡献分布: 此课题由孙震晓与王汉卿设计; 研究过程由王汉卿操作完成; 研究所用试剂及分析工具由孙震晓提供; 数据分析由王汉卿完成; 本论文写作主要由王汉卿完成。

通讯作者: 孙震晓, 100102, 北京市, 北京中医药大学中药学院。

sunzxcn@hotmail.com

电话: 010-84738646

收稿日期: 2008-10-16 修回日期: 2008-11-19

接受日期: 2008-11-24 在线出版日期: 2009-03-08

Effect of Pdc4 tumor suppressor gene expression on cytotoxicity of hydroxycamptothecine

Han-Qing Wang, Zhen-Xiao Sun

Han-Qing Wang, Zhen-Xiao Sun, College of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Correspondence to: Zhen-Xiao Sun, College of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China. sunzxcn@hotmail.com

Received: 2008-10-16 Revised: 2008-11-19

Accepted: 2008-11-24 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To investigate the effect of Pdc4 tumor suppressor gene expression on the cytotoxic activity of hydroxycamptothecine (HCPT) to the human gastric cancer cell line BGC-823 and its mechanism.

METHODS: Lipid-mediated transfection was used to obtain Pdc4 high-expressed BGC-823 cell line and the control cell lines. MTT method was used to determine the growth inhibition of HCPT to the transfected BGC-823 cells. Flow cytometry was used to analyze the effects of HCPT to the cell cycle and apoptosis rate of the transfected BGC-823 cells. Western blot was used to analyze the transfection results and the expression of Pdc4 protein in the transfected BGC-823 cells treated with HCPT.

RESULTS: A stable Pdc4 high-expressed BGC-823 cell line was established. MTT results showed that after the transfection treated with

HCPT for 24 and 72 hours, the IC_{50} of the Pdc4 high-expressed group was lower than that of the control groups (pCDNA3.1 and pCDNA-Pdc4-D418A) (74.48 $\mu\text{mol/L}$ vs 87.67, 102.30 $\mu\text{mol/L}$; 14.30 $\mu\text{mol/L}$ vs 40.59, 29.54 $\mu\text{mol/L}$, all $P < 0.05$). After the transfected BGC-823 cells were treated with 80 $\mu\text{mol/L}$ HCPT for 72 hours, the cell proportion in G_0/G_1 phase declined, while the cell proportion in S phase increased and the apoptosis cell rate increased significantly (pCDNA3.1: 45.40% vs 5.65%; pCDNA-Pdc4-D418A: 36.21% vs 3.07%; pCDNA-Pdc4: 46.17% vs 4.25%, all $P < 0.05$). Western blot results showed that after transfected BGC-823 cells were treated with 80 $\mu\text{mol/L}$ HCPT for 72 hours, the expression of Pdc4 protein was increased.

CONCLUSION: High expression of Pdc4 increases the sensitivity of BGC-823 cells to HCPT. HCPT induces BGC-823 cells S-stage arrest and apoptosis. HCPT up-regulates the expression of Pdc4 protein in BGC-823 cells.

Key Words: Programmed cell death 4; Hydroxycamptothecine; Human gastric cancer; BGC-823 cell

Wang HQ, Sun ZX. Effect of Pdc4 tumor suppressor gene expression on cytotoxicity of hydroxycamptothecine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 647-651

摘要

目的: 探讨抑癌基因Pdc4的表达对羟基喜树碱细胞毒活性的影响及其机制。

方法: 采用脂质体转染法将带有全长Pdc4 cDNA的质粒转入BGC-823细胞, MTT法测定羟基喜树碱对Pdc4cDNA转染BGC-823细胞的生长抑制作用, 流式细胞术检测羟基喜树碱作用前后细胞周期和凋亡率的变化, Western blot蛋白印迹法检测Pdc4蛋白表达。

结果: 建立了稳定转染Pdc4cDNA的BGC-823细胞系; 羟基喜树碱作用转染细胞24, 72 h后, 药物对Pdc4cDNA转染组细胞的半数抑制浓度均低于两对照组(pCDNA3.1与pCDNA-Pdc4-D418A)(74.48 $\mu\text{mol/L}$ vs 87.67,

■背景资料

Pdc4是一个新发现的抑癌基因, 在多种癌症中表达下调或缺失。前人研究发现, 在肾癌细胞中表达Pdc4 cDNA, 可以增强其对抗肿瘤抗生素 geldanamycin 的敏感性。

■同行评议者

管冬元, 副教授, 上海中医药大学基础医学院实验医学教研室

■研发前沿

Pdcd4基因表达下调或其产物泛素化途径的激活可能是部分癌症发生发展的原因之一。Pdcd4可能是抗癌药物研究的新靶点。Pdcd4的表达对抗癌药物细胞毒作用的影响以及抗癌药物对Pdcd4表达的影响还缺乏广泛深入的研究。

102.30 $\mu\text{mol/L}$; 14.30 $\mu\text{mol/L}$ vs 40.59, 29.54 $\mu\text{mol/L}$, 均 $P<0.05$); 流式细胞仪测定结果表明, 80 $\mu\text{mol/L}$ 羟基喜树碱作用转染细胞24 h, 处于细胞周期 G_0/G_1 期的细胞比例下降, S期细胞比例升高, 出现细胞周期S期阻滞, 72 h, 细胞凋亡率显著升高(pCDNA3.1: 45.40% vs 5.65%; pCDNA-Pdcd4-D418A: 36.21% vs 3.07%; pCDNA-Pdcd4: 46.17% vs 4.25%, $P<0.05$); Western blot结果表明80 $\mu\text{mol/L}$ 羟基喜树碱作用转染细胞72 h, Pdcd4蛋白表达水平升高。

结论: 提高人胃腺癌细胞BGC-823中Pdcd4蛋白的表达能增强其对羟基喜树碱的敏感性; 羟基喜树碱能引起BGC-823细胞S期阻滞, 并能诱导细胞凋亡; 羟基喜树碱本身也可上调BGC-823中Pdcd4的表达。

关键词: 程序性细胞死亡因子4; 羟基喜树碱; 人胃腺癌; BGC-823细胞

王汉卿, 孙震晓. 抑癌基因Pdcd4的表达对羟基喜树碱细胞毒活性的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 647-651

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/647.asp>

0 引言

程序性细胞死亡因子4(programmed cell death 4, Pdcd4)是近年来新发现的一个抑癌基因, 他在人肺癌、肠癌等多种人癌组织中表达下调或缺失^[1-2]. 羟基喜树碱(hydroxycamptothecine, HCPT)是一种具有选择性抑制DNA拓扑异构酶 I (Topo I)的植物抗癌药, 具有广谱抗癌作用, 临床上用于治疗原发性肝癌、胃癌等. 对抗癌药物减毒增效的研究一直是一个重要而困难的课题. 有报道指出, 细胞中Pdcd4的表达水平可能影响某些抗癌药物的抗癌活性^[3]. 本实验拟通过建立Pdcd4 cDNA稳定转染BGC-823细胞系, 测定羟基喜树碱对转染细胞的增殖抑制作用、细胞周期和凋亡率的变化及Pdcd4的表达情况, 以考察抗癌药物羟基喜树碱对人胃腺癌细胞BGC-823的细胞毒活性与BGC-823细胞中抑癌基因Pdcd4的表达的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640培养基为Gibco公司产品, 胎牛血清购于中国医学科学院生物工程研究所-灏阳生物, G418为Inalco公司产品, 10-羟基喜树碱购于Sigma公司, 原药以DMSO溶解并配成80 mmol/L贮存液, 分装后-20℃贮存; DH5 α 工程菌

为Biodee公司产品, 转染试剂Lipofectamine为Invitrogen公司产品; 噻唑蓝(MTT)为Ameresco公司产品; 兔抗人Pdcd4抗体为美国肯塔基大学医学院杨新盛博士(Dr. Hsin-Sheng Yang)惠赠, 兔抗actin、辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG和ECL试剂购于北京中杉金桥生物技术有限公司, Santa Cruz Biotech公司产品. 蛋白酶抑制剂Protease Inhibitor Cocktail Set III为Calbiochem公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人胃腺癌细胞BGC-823购自协和基础所细胞库. 采用含100 mL/L小牛血清, 100 kU/L青霉素和100 mg/L链霉素的RPMI 1640培养液, 37℃, 50 mL/L CO₂饱和湿度培养箱中培养, 2-3 d换液传代1次. 取对数生长期细胞为实验对象. 转染细胞采用含100 mL/L小牛血清, 300 mg/L G418的RPMI 1640培养液, 37℃, 50 mL/L CO₂的饱和湿度培养箱中培养, 2-3 d换液传代1次. 取对数生长期细胞为实验对象。

1.2.2 脂质体转染建立稳定表达Pdcd4 cDNA的人胃腺癌BGC-823细胞系: 转染质粒分别为pcDNA3.1(空质粒)、pcDNA3.1-Pdcd4(Pdcd4 cDNA表达质粒)及pcDNA3.1-Pdcd4D418A(Pdcd4 cDNA突变质粒), 以上质粒均为美国肯塔基大学医学院杨新盛博士惠赠。

1.2.3 MTT法测定羟基喜树碱对BGC-823细胞的增殖抑制作用: 取对数生长期细胞, 重悬于含体积分数为100 mL/L FBS的RPMI 1640培养液中, 以 1×10^3 个细胞/孔的终浓度接种于96孔培养板, 24 h后加入0、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的HCPT, 每个浓度重复3个孔, 培养不同时间后, 加MTT, 置37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中孵育6 h, 小心吸去上清, 加入DMSO后震荡, 使蓝紫色沉淀充分溶解. 在酶标仪555 nm波长处读取吸光度值, 测定细胞增殖抑制率, 并绘制抑制率曲线, 计算不同时间药物对癌细胞的半数抑制浓度(IC₅₀). 实验重复3次。

1.2.4 流式细胞术测定细胞周期变动和凋亡: 收集80 $\mu\text{mol/L}$ HCPT作用不同时间的BGC-823细胞, 用PBS(pH7.2)洗涤2次, 700 mL/L冰乙醇固定, 4℃保存过夜. 1000 r/min离心5 min弃去固定液. 1 mL PBS重悬, 1000 r/min离心5 min弃上清. 加入30 mg/L的RNaseA 200 μL , 37℃, 40 min. 1000 r/min离心5 min弃上清. 加入50 mg/L的PI染液200 μL , 4℃避光60 min. 上机前常规进行光路流路校准, 流式细胞仪检测结果经CELLQuest

■相关报道

国外有报道在具有抗癌活性药物geldanamycin和tamoxifen的作用下, Pdcd4蛋白的表达水平高于平均值. 稳定表达Pdcd4反义核酸能显著降低乳腺癌MCF-7细胞对geldanamycin和tamoxifen的敏感性. 在肾癌UO-31细胞中表达Pdcd4 cDNA后, 增强了其对geldanamycin的敏感性。

表 1 80 $\mu\text{mol/L}$ HCPT处理三种转染细胞24、72 h细胞周期及凋亡率分布 (%)

	24 h				72 h			
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	Apo	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	Apo
3.1c	65.13	13.33	21.54	1.09	55.08	31.71	13.20	5.65
3.1t	12.42	64.63	22.95	1.71	32.11	56.84	11.05	45.40
D418Ac	61.96	15.35	22.69	0.67	66.46	23.52	10.02	3.07
D418At	11.97	67.11	20.92	1.17	21.89	66.42	9.69	36.21
Pdc4c	70.01	11.89	17.10	1.05	51.75	37.40	10.85	4.25
Pdc4t	16.64	66.68	16.68	1.68	22.73	66.56	10.71	46.17

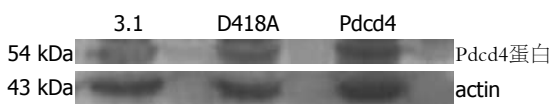


图 1 三种BGC-823转染细胞中Pdc4蛋白的表达。3.1: pcDNA3.1转染细胞; D418A: pcDNA3.1-Pdc4D418A转染细胞; Pdc4: pcDNA3.1-Pdc4转染细胞。

Software分析.

1.2.5 Western blot检测Pdc4表达: 80 $\mu\text{mol/L}$ HCPT作用BGC-823细胞72 h后, 加含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液裂解细胞, 离心取上清液, 测定蛋白浓度, SDS-PAGE电泳, 然后样品带电转移至硝酸纤维素膜, 50 g/L脱脂牛奶封闭, 一抗(兔抗人Pdc4, 1:1000稀释)过夜, 辣根过氧化物酶标记二抗(羊抗兔, 1:5000稀释)室温作用1 h, ECL试剂显影。

2 结果

2.1 建立稳定转染Pdc4 cDNA的BGC-823细胞系 采用脂质体转染法, 分别将pcDNA3.1(3.1组)、pcDNA3.1-Pdc4(Pdc4组)、pcDNA3.1-Pdc4D418A(D418A组)转染BGC-823细胞, 300 mg/L G418筛选2-4 wk, 通过Western blot法分析, 结果Pdc4组(表达有功能的Pdc4蛋白)和D418A组(表达突变的功能部分丧失的Pdc4蛋白)的Pdc4蛋白表达明显强于3.1组, 确认三种质粒已稳定转染(图1)。

2.2 上调Pdc4表达对BGC-823细胞HCPT药物敏感性的影响 分别用0、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ HCPT作用3种BGC-823转染细胞24、72 h后, MTT法测定细胞增殖抑制率, 并绘制抑制率曲线(图2), 计算IC₅₀。结果表明, 羟基喜树碱对三组转染细胞均有显著增殖抑制作用, 比较HCPT作用三种转染细胞24、72 h的半数抑制浓度, 结果HCPT对Pdc4 cDNA转染组(pCDNA-Pdc4)细胞的半数抑制浓度(24 h: 74.48 $\mu\text{mol/L}$; 72

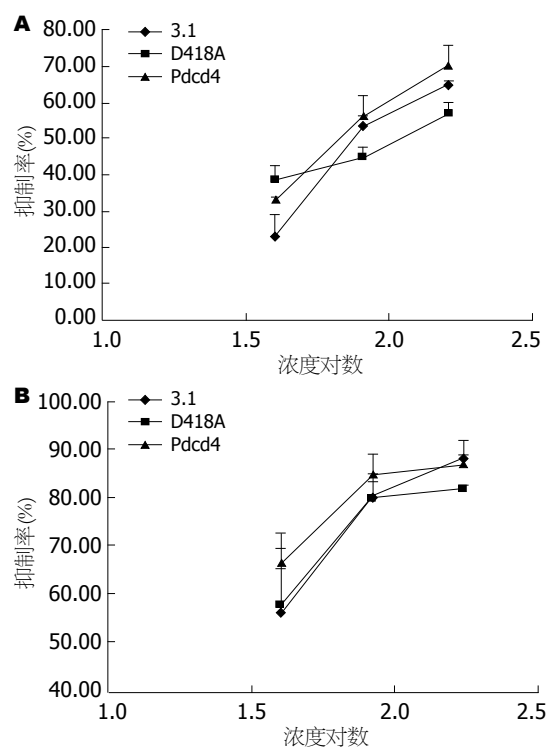


图 2 HCPT作用三种转染细胞抑制率曲线。A: 24 h; B: 72 h; 3.1: pcDNA3.1转染细胞; D418A: pcDNA3.1-Pdc4D418A转染细胞; Pdc4: pcDNA3.1-Pdc4转染细胞。

h: 14.30 $\mu\text{mol/L}$)均低于两对照组(24 h: pCDNA3.1: 87.67、pCDNA-Pdc4-D418A: 102.30 $\mu\text{mol/L}$; 72 h: pCDNA3.1: 40.59 $\mu\text{mol/L}$; pCDNA-Pdc4-D418A: 29.54 $\mu\text{mol/L}$)。低浓度(40、80 $\mu\text{mol/L}$)HCPT作用3种转染细胞72 h, 高浓度(160 $\mu\text{mol/L}$)HCPT作用三种转染细胞24 h后, Pdc4组抑制率均高于其他两转染组(图3)。以上结果说明Pdc4增强了人胃腺癌细胞BGC-823对HCPT的敏感性。

2.3 HCPT对转染细胞的细胞周期和凋亡率的影响 采用80 $\mu\text{mol/L}$ HCPT作用三种BGC-823转染细胞24、72 h后, 流式细胞术检测细胞周期和凋亡率的变化, 结果发现各转染组加入HCPT24后, 与溶剂对照组(3.1c, D418Ac, Pdc4c)相比, 加药

■创新盘点

本文通过脂质体转染技术把含有Pdc4 cDNA的质粒导入人胃腺癌BGC-823细胞中实现了稳定转染, 并利用转染细胞株研究Pdc4的表达对10-羟基喜树碱细胞毒活性的影响, 同时考察了10-羟基喜树碱对Pdc4蛋白表达的影响。

■应用要点

Pdcd4基因可增强胃腺癌BGC-823细胞对10-羟基喜树碱的敏感性,为进一步提高羟基喜树碱临床疗效提供了新思路.

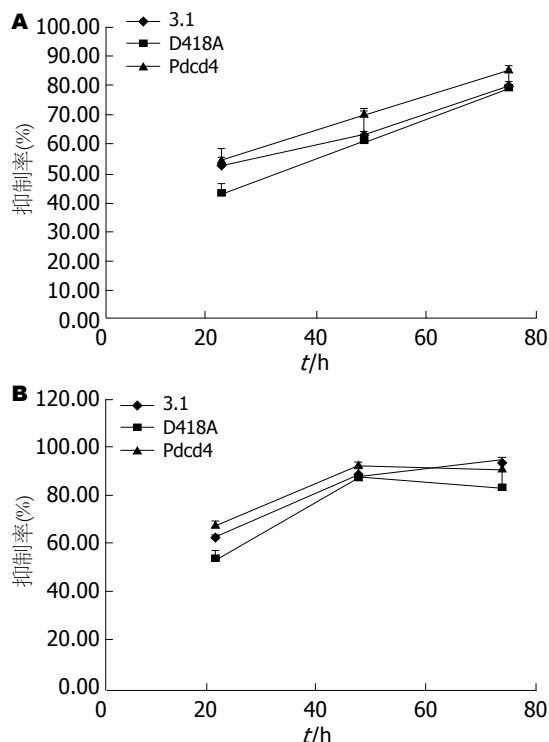


图3 HCPT作用三种转染细胞抑制率曲线. A: 80 μmol/L; B: 160 μmol/L; 3.1: pcDNA3.1转染细胞; D418A: pcDNA3.1-Pdcd4D418A转染细胞; Pdcd4: pcDNA3.1-Pdcd4转染细胞.

组(3.1t, D418At, Pdcd4t)细胞G₀/G₁期细胞比例显著下降, S期细胞比例显著升高, 但是3组转染细胞间无明显差别, 72 h后, 各加药组细胞凋亡率显著升高(表1). 说明HCPT能引起BGC-823细胞S期阻滞, 进而能诱导肿瘤细胞凋亡, HCPT对3转染组的细胞周期影响相近, 没有显著差别.

2.4 HCPT对Pdcd4表达的影响 采用80 μmol/L HCPT作用3种BGC-823转染细胞72 h后, Western blot法检测Pdcd4蛋白的表达情况, 结果发现3种转染细胞中Pdcd4蛋白表达量均升高(图4), 说明HCPT能显著上调Pdcd4蛋白表达.

3 讨论

喜树碱(camptothecine, CPT)是从珙桐科植物喜树中分离提取的五环生物碱, 是有选择性抑制DNA Topo I作用的植物抗癌药. 由于喜树碱的水溶性和脂溶性都比较差, 其钠盐的抗癌活性较低, 临床应用受到严格限制. 10-羟基喜树碱其化学结构与喜树碱相似, 仅第10位碳原子上的氢为羟基所取代. 与喜树碱相比, 羟基喜树碱毒性小、抗肿瘤作用更强, 使喜树碱类药物在肿瘤防治中起到了重大作用. 尤其在抗癌药紫杉醇生产用原料严重枯竭的形势下, 羟基喜树碱的发展前景更加看好^[4]. 已有的体外研究表

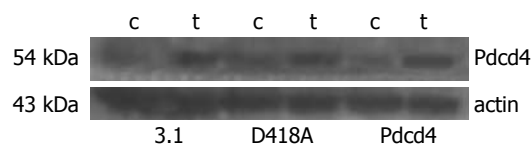


图4 80 μmol/L HCPT作用三种转染细胞72 h Pdcd4蛋白的表达. 3.1: pcDNA3.1转染细胞; D418A: pcDNA3.1-Pdcd4D418A转染细胞; Pdcd4: pcDNA3.1-Pdcd4转染细胞. c: 对照组; t: 处理组.

明羟基喜树碱对多种癌细胞均有抑制或杀伤作用, 本实验同样发现羟基喜树碱能抑制人胃腺癌细胞BGC-823增殖, 引起BGC-823细胞S期阻滞, 继而诱导肿瘤细胞凋亡率升高, 结果与涂水平 *et al*^[5]的报道一致, 而Zhang *et al*^[6]研究发现羟基喜树碱诱导人肝癌细胞G₂/M期阻滞, 说明HCPT对不同来源不同类型的肿瘤细胞周期变化的影响有所不同.

Pdcd4最初发现是小鼠上皮JB6细胞恶性转化的抑制物, Pdcd4可与真核细胞翻译起始复合物中的eIF4A起始因子等直接作用, 进而影响与细胞增殖有关的转录因子蛋白质合成^[7]. Jansen *et al*通过Western blot方法分析美国癌症研究所(NCI)60种癌细胞中Pdcd4蛋白表达情况, 发现在大多数的肾源、肺源和神经胶质源的肿瘤细胞中, Pdcd4蛋白的表达水平下降^[3]. 提高Pdcd4的表达可作为抗癌研究新的靶点^[8].

Jansen *et al*^[3]实验还证明, 在肾癌UO-31细胞中表达Pdcd4 cDNA, 增强了其对geldanamycin的敏感性, 并伴随着细胞周期阻滞和凋亡的增加. 本研究发现, 人胃腺癌BGC-823细胞转染Pdcd4 cDNA后, 与对照组相比, HCPT对Pdcd4转染组细胞增殖抑制率增加, 药物对癌细胞的半数抑制浓度降低, 说明提高BGC-823细胞中Pdcd4的表达水平增加了癌细胞对羟基喜树碱的敏感性.

为了弄清Pdcd4引起羟基喜树碱细胞毒活性增加是药物抗癌活性与Pdcd4抑癌基因作用的简单叠加还是Pdcd4通过某种作用途径诱导了药物的抗癌活性的提高, 我们测定了不加药情况下3种转染细胞的生长曲线、细胞周期和细胞凋亡情况, 结果发现各转染细胞的生长情况和细胞周期分布无明显差别, 说明Pdcd4 cDNA转染本身并没有明显影响BGC-823细胞的增殖和凋亡, 转染Pdcd4 cDNA组引起羟基喜树碱细胞毒活性增加不是药物抗癌活性与Pdcd4抑癌基因作用的简单叠加. 本研究还发现羟基喜树碱本身可增加BGC-823细胞中Pdcd4蛋白表达, 其机制尚不清楚. 提高Pdcd4在细胞

中的表达能增加癌细胞对羟基喜树碱的敏感性, 而羟基喜树碱能使Pdc4上调表达, 二者协同作用可能大大增加了羟基喜树碱对癌细胞的细胞毒作用, 提示Pdc4可能参与了羟基喜树碱对癌细胞的杀伤作用, 其分子机制有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Chen Y, Knösel T, Kristiansen G, Pietas A, Garber ME, Matsushashi S, Ozaki I, Petersen I. Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis. *J Pathol* 2003; 200: 640-646
- 2 Wang Q, Sun Z, Yang HS. Downregulation of tumor suppressor Pdc4 promotes invasion and activates both beta-catenin/Tcf and AP-1-dependent transcription in colon carcinoma cells. *Oncogene* 2008; 27: 1527-1535
- 3 Jansen AP, Camalier CE, Stark C, Colburn NH. Characterization of programmed cell death 4 in multiple human cancers reveals a novel enhancer of drug sensitivity. *Mol Cancer Ther* 2004; 3: 103-110
- 4 郭鹏, 张莉. 喜树碱类抗癌药的研究进展. 武警医学院学报 2001; 10: 255-256
- 5 涂水平, 江石湖, 谭继宏, 钟捷, 乔敏敏, 蒋晓华, 章永平, 袁耀宗, 吴云林, 吴裕忻. 羟基喜树碱诱导胃癌细胞凋亡的作用机制初步研究. 中华消化杂志 2001; 21: 274-277
- 6 Zhang XW, Jiang JF, Xu B. Differentiation-inducing action of 10-hydroxycamptothecin on human hepatoma Hep G2 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2000; 21: 364-368
- 7 Yang HS, Jansen AP, Komar AA, Zheng X, Merrick WC, Costes S, Lockett SJ, Sonenberg N, Colburn NH. The transformation suppressor Pdc4 is a novel eukaryotic translation initiation factor 4A binding protein that inhibits translation. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 26-37
- 8 Stålberg P, Lopez-Egido JR, Wang S, Gobl A, Oberg K, Skogseid B. Differentially expressed cDNAs in PLCbeta3-induced tumor suppression in a human endocrine pancreatic tumor cell line: activation of the human mismatch repair protein 3 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 227-231

■同行评价

本研究方法比较先进, 思路清晰, 论述合理, 创新性较强, 具有较好的学术价值.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第二十一次全国中西医结合消化学术会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2009-07-23/26在南宁市召开第二十一次全国中西医结合消化系统疾病学术会议, 并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为功能性胃肠病、炎症性肠病和消化内镜新技术临床应用演示)新技术新理论继续教育学习班. 学习班招收对象: 中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等. 参加学习班者授予国家级1类继续教育学分; 大会论文报告者另授继续教育学分6分.

1 征稿内容

功能性胃肠病、炎症性肠病中西医结合基础与临床治疗研究; 幽门螺杆菌相关疾病的中西医结合基础与治疗研究; 脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究; 消化系统肿瘤中西医结合诊疗; 脾胃学说及其临床应用; 其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等.

2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编. 稿件请附800字论文摘要, 尽可能以电子信件的形式将稿件传送, 截稿日期: 2009-06-30.

3 联系方式

袁海锋, 朱永苹, 530011, 广西壮族自治区南宁市华东路10号广西中医学院瑞康医院, 电话: 0771-2188107; 13597004049; 13077766271, 传真: 0771-2411156, rxhnhk@sina.com或czs.xiaohua@163.com

IRAK-M在内毒素诱导Kupffer细胞耐受中的表达及其意义

李旭宏, 陈先锋, 游海波, 刘海忠, 刘作金, 龚建平

■背景资料

内毒素又名脂多糖, 是G⁻细菌最重要的致病物质, 能激活单核-巨噬细胞系统并引起大量炎症介质释放, 导致全身过度炎症反应及器官损害。内毒素耐受是生物在长期进化过程中形成的一种保守的负反馈调节机制, 能避免机体对脂多糖刺激的持续过度反应。

李旭宏, 重庆三峡中心医院肝胆外科 重庆市 404000
陈先锋, 游海波, 刘海忠, 刘作金, 龚建平, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 重庆市 400010
李旭宏, 2002级重庆医科大学外科学博士, 主要从事感染信号转导机制的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30471696; No. 30500473

作者贡献分布: 本课题由刘作金与龚建平设计; 研究过程由李旭宏, 陈先锋, 游海波, 刘海忠及刘作金操作完成; 数据分析及论文写作由李旭宏完成。

通讯作者: 龚建平, 教授, 400010, 重庆市渝中区临江路74号, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科。gongjianping11@hotmail.com
电话: 023-63036701

收稿日期: 2008-12-09 修回日期: 2009-01-12

接受日期: 2009-01-19 在线出版日期: 2009-03-08

Expression of IRAK-M in endotoxin-tolerant Kupffer cells and its significance

Xu-Hong Li, Xian-Feng Chen, Hai-Bo You, Hai-Zhong Liu, Zuo-Jin Liu, Jian-Ping Gong

Xu-Hong Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404000, China

Xian-Feng Chen, Hai-Bo You, Hai-Zhong Liu, Zuo-Jin Liu, Jian-Ping Gong, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471696, No. 30500473

Correspondence to: Dr. Jian-Ping Gong, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, 74 Lingjiang Road, Yuzhong District, Chongqing 400010, China. gongjianping11@hotmail.com

Received: 2008-12-09 Revised: 2009-01-12

Accepted: 2009-01-19 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To observe the expression of IRAK-M in endotoxin-tolerant Kupffer cells and to explore its role in endotoxin tolerance of Kupffer cells.

METHODS: The model of endotoxin-tolerant Kupffer cells was established by lipopolysaccharide (LPS, 10 µg/L) pretreatment, and was compared with control cells. At different time points after LPS (100 µg/L) stimulation, the TNF-α level in culture medium was measured by ELISA. The mRNA expression of TNF-α and IRAK-M in Kupffer cells was detected by RT-PCR. TransAM NF-κB Kit was used to examine the activation

of NF-κB. The expression of IRAK-M protein in Kupffer cells was detected by Western blot.

RESULTS: In both groups, LPS stimulation increased TNF-α level in culture medium, and enhanced TNF-α mRNA expression and NF-κB activation in Kupffer cells, but these parameters were significantly lower in tolerant group than in control group ($P < 0.05$). In control group, the expression of IRAK-M mRNA could not be detected until 24 h after LPS stimulation. However, this expression was slight in tolerant group before LPS stimulation and was rapidly up-regulated after stimulation, peaking at 6 h and was still stronger than the expression in control group at 24 h ($P < 0.05$). In addition, there was no IRAK-M protein expression in control group until 24 h after LPS stimulation, but this expression could be detected in tolerant group before LPS stimulation and was up-regulated in a time-dependent manner. There was significant difference between two groups ($P < 0.01$).

CONCLUSION: IRAK-M expression is significantly up-regulated in endotoxin-tolerant Kupffer cells and it may play an important role in endotoxin tolerance of Kupffer cells.

Key Words: Kupffer cell; Endotoxin tolerance; Interleukin-1 receptor associated kinase-M

Li XH, Chen XF, You HB, Liu HZ, Liu ZJ, Gong JP. Expression of IRAK-M in endotoxin-tolerant Kupffer cells and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 652-656

摘要

目的: 观察内毒素耐受状态下Kupffer细胞中白介素-1受体相关激酶-M(IRAK-M)的表达并探讨其在Kupffer细胞内毒素耐受形成中的作用。

方法: 通过脂多糖(LPS, 10 µg/L)预处理建立内毒素耐受Kupffer细胞模型, 并与对照组细胞进行比较; 在LPS(100 µg/L)刺激后不同时间, 用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测细胞培养液中TNF-α水平, 逆转录聚合酶链反应(RT-

■同行评议者

陈光, 教授, 吉林大学第一医院普外科; 戴朝六, 教授, 中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

PCR)检测细胞中TNF- α 和IRAK-M的mRNA表达, TransAM NF- κ B Kit检测细胞中NF- κ B活性, 蛋白印迹法(Western blot)检测细胞中IRAK-M蛋白表达。

结果: LPS刺激在两组细胞中均引起TNF- α 释放增加, TNF- α mRNA表达以及NF- κ B活性增强, 但耐受组细胞的三种指标明显低于对照组($P<0.05$); 对照组细胞在LPS刺激24 h后才能检测出IRAK-M mRNA的表达, 而耐受组细胞在LPS刺激前已可检测到IRAK-M的基因表达, 且该表达在LPS刺激后迅速增强, 于6 h达高峰, 24 h时仍明显高于对照组($P<0.05$); 对照组细胞在LPS刺激24 h后才有微弱的IRAK-M蛋白表达, 而耐受组细胞在LPS刺激前已有IRAK-M的蛋白表达, 并随LPS刺激进一步上调, 两组有显著差异($P<0.01$)。

结论: 内毒素耐受状态下, Kupffer细胞中的IRAK-M表达明显增强, IRAK-M可能在Kupffer细胞内毒素耐受形成中起重要作用。

关键词: Kupffer细胞; 内毒素耐受; 白介素-1受体相关激酶-M

李旭宏, 陈先锋, 游海波, 刘海忠, 刘作金, 龚建平. IRAK-M在内毒素诱导Kupffer细胞耐受中的表达及其意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 652-656

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/652.asp>

0 引言

内毒素又名脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 为G-细菌最重要的致病物质, 他能激活单核-巨噬细胞系统(mononuclear phagocytic system, MPS), 引起TNF- α 等大量炎症介质释放, 导致全身过度炎症反应及器官损害^[1-3]。内毒素耐受(endotoxin tolerance)是生物在长期进化过程中形成的一种保守的负反馈调节机制, 是一种适应性应答, 能避免机体对LPS刺激的持续过度反应。所谓内毒素耐受是指: 机体或单核-巨噬细胞受LPS初次刺激后, 对LPS的再次刺激呈低反应性^[4-5]。最近有研究表明, 白介素1受体相关激酶-M(interleukin-1 receptor associated kinase-M, IRAK-M)对LPS信号通路起负性调节作用, 可能参与内毒素耐受的形成机制^[6-7]。业已证明, IRAK-M主要在单核-巨噬细胞中表达^[6-9]。Kupffer细胞为常驻肝血窦的巨噬细胞, 占单核-巨噬细胞总量的80%-90%, 是MPS的典型代表^[10-11]。但目前尚无有关Kupffer细胞中IRAK-M表达的研究报道。本研究通过建立

内毒素耐受Kupffer细胞模型, 观察IRAK-M在Kupffer细胞中的表达, 并探讨其在Kupffer细胞内毒素耐受形成中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 δ 健康成年昆明小鼠, 清洁级, 体质量20-25 g, 购自重庆医科大学实验动物中心; 脂多糖(*E.coli* O111:B4)及IV型胶原酶购自美国Sigma公司; DMEM培养基及特级胎牛血清购自美国Hyclone公司; 兔抗IRAK-M多克隆抗体购自美国AnaSpec公司; 小鼠TNF- α ELISA试剂盒、Western blot检测试剂盒等购自武汉博士德生物技术有限公司; RT-PCR试剂盒为TaKaRa公司产品; 核蛋白提取试剂盒Nuclear Extraction Kit及NF- κ B活性检测试剂盒TransAM NF- κ B Kit为美国Active Motif公司产品。

1.2 方法

1.2.1 Kupffer细胞分离、培养和鉴定: 阻断肝上下腔静脉, 经门静脉插管灌注, 灌注液由肝下下腔静脉插管引出; 用D-Hanks液灌注洗净肝内血液后, 行肝脏原位循环灌注0.05% IV型胶原酶; 充分消化后切下肝脏用200目不锈钢滤网过滤后经50 g离心5 min去掉实质细胞; 非实质细胞在50%与25%的Percoll配成的梯度离心液上经1000 g离心15 min进一步纯化后, 于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基中孵育, 6 h后洗去未贴壁细胞即得Kupffer细胞。台盼蓝染色显示细胞成活率>95%。乳胶颗粒吞噬试验显示枯否细胞纯度>90%。

1.2.2 细胞模型建立及分组: 将纯化后的Kupffer细胞用含100 mL/L FBS的DMEM培养基调整细胞浓度为 5×10^8 /L并接种于24孔培养板中, 每孔1 mL, 培养12 h后随机分为两组: (1)对照组, 细胞换用新鲜培养基继续培养, 24 h后再换用含LPS 100 μ g/L的培养基进行培养; (2)耐受组, 细胞先在含LPS 10 μ g/L的培养基中孵育, 24 h后处理同对照组。各组在随后的相应时相点收集标本。每时点均设有重复孔。

1.2.3 培养液中TNF- α 含量: 各组分别在相应时间收集培养上清液, 于-70℃保存备用; 采用武汉博士德生物技术有限公司的小鼠TNF- α ELISA试剂盒检测, 具体方法参见试剂盒说明书。

1.2.4 Kupffer细胞中NF- κ B活性: 提取各细胞样本的核蛋白并定量, 按2 μ g/孔加入96孔板(孔内已包被与NF- κ B结合位点相一致的脱氧寡核苷酸序列), 置100 r/min摇床室温孵育1 h; 洗涤后,

■ 研发前沿

白介素1受体相关激酶-M(IRAK-M)对脂多糖信号通路起负性调节作用, 可能参与内毒素耐受的形成机制。

■ 相关报道

文献报道, IRAK-M主要在单核-巨噬细胞中表达。Kupffer细胞为常驻肝血窦的巨噬细胞, 占单核-巨噬细胞总量的80%-90%, 是单核-巨噬细胞系统的典型代表, 但目前尚无有关Kupffer细胞中IRAK-M表达及其作用的研究报道。

■创新盘点

本研究从蛋白质与mRNA水平研究了IRAK-M在内毒素诱导Kupffer细胞耐受中的表达及其意义。

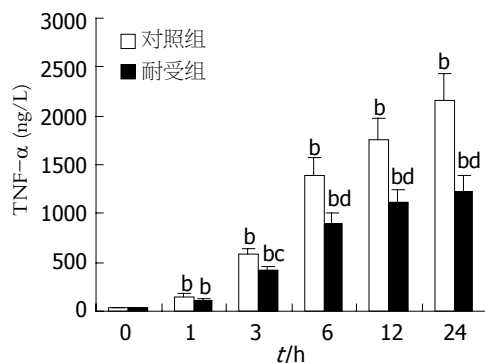


图1 LPS刺激不同时间后培养液中的TNF-α水平($n = 6$). ^b $P < 0.01$ vs 各组0时点; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 对照组同时点。

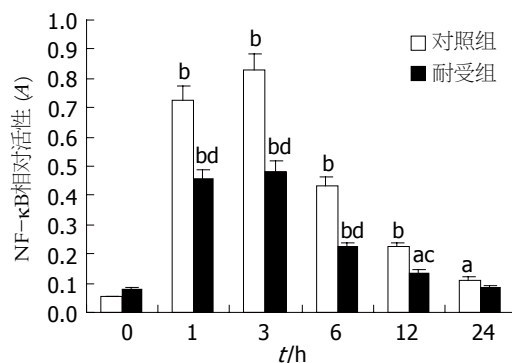


图2 LPS刺激不同时间后Kupffer细胞中的NF-κB活性改变($n = 4$). ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 各组0时点; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 对照组同时点。

每孔加入1:1000的NF-κB p65亚单位抗体100 μL, 室温孵育1 h; 洗涤后, 每孔加入1:1000辣根过氧化物酶标记的二抗100 μL, 室温孵育1 h; 洗涤后, 每孔加入显色液100 μL, 室温避光孵育10 min; 每孔加入终止液100 μL, 于5 min内用全自动酶标仪在450 nm波长下测出A值, 即表示NF-κB相对活性。

1.2.5 Kupffer细胞中TNF-α和IRAK-M的mRNA表达: 采用美国Life Technologies公司的TRIzol试剂盒提取Kupffer细胞总RNA; 用TaKaRa公司两步法逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒检测细胞中的mRNA表达; PCR引物由上海鼎安生物科技有限公司设计并合成。IRAK-M引物: 上游5'-GAA AAC GAC CCT GGA CCT CT-3', 下游5'-CAC GGC TGA GTG TTG TGC AA-3', 扩增产物大小为500 bp; TNF-α引物: 上游5'-TCT ACT GAA CTT CGG GGT GA-3', 下游5'-AGT AGA CCT GCC CGG ACT C-3', 扩增产物大小为542 bp; 内参照β-actin引物: 上游5'-CAT TGT GAT GGA CTC CGG AG-3', 下游5'-ATA GTG ATG ACC TGG CCG TC-3', 扩增产物大小为300 bp。PCR条件为: 94℃ 45 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 30个循环, 72℃延伸5 min。扩增产物经15 g/L琼脂糖凝胶电泳后, 采用Gel Doc 2000凝胶成像系统成像, 并作半定量分析, 结果以相对吸光度值(RA)×面积(mm²)表示。mRNA相对含量 = (目的基因条带RA × mm²) / (β-actin条带RA × mm²)。

1.2.6 Western blot检测Kupffer细胞中IRAK-M蛋白表达: 提取Kupffer细胞的胞质蛋白并定量; 将蛋白经100 g/L SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离并电转印至硝酸纤维素(NC)膜; 将NC膜用含50 g/L脱脂奶粉的PBS-Tween液室温封闭1 h; 洗涤后, 与兔抗IRAK-M多克隆抗体溶液在37℃孵育2 h; 洗涤后, 再与辣根过氧化物酶标记的羊抗兔

IgG在37℃孵育1 h; 洗涤后, NC膜用二氨基联苯胺显色。用Gel Doc 2000凝胶成像系统对目的条带成像并作半定量分析, 蛋白含量以相对吸光度值(RA)×面积(mm²)表示。

统计学处理 实验数据以mean ± SD表示, 组间比较采用SPSS10.0软件进行方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 培养液中TNF-α含量的变化 两组细胞培养液中TNF-α水平均随LPS刺激的持续呈逐渐升高趋势, 刺激后1 h与刺激前相比已有显著差异($P < 0.01$); 但耐受组细胞培养液中的TNF-α水平升高相对缓慢, 自LPS刺激后3 h开始显著低于对照组($P < 0.05$), 自6 h起差异更加显著($P < 0.01$, 图1)。

2.2 Kupffer细胞中核因子NF-κB的活性变化 LPS刺激后, 两组细胞中的NF-κB活性迅速增强, 并于3 h达高峰, 而后逐渐下降; 但耐受组细胞的NF-κB活性在LPS刺激后明显低于对照组细胞, 两组间的显著性差异一直持续到LPS刺激后12 h($P < 0.05$), 而在此之前两组间的差异更为显著($P < 0.01$, 图2)。

2.3 Kupffer细胞中TNF-α mRNA的表达 LPS刺激后, 两组细胞中的TNF-α mRNA表达均明显增强, 并于3 h达高峰; 但耐受组细胞的表达强度弱于对照组, LPS刺激后1 h两组间已有显著差异($P < 0.05$), 3 h及6 h时两组间的差异更加显著($P < 0.01$, 图3)。

2.4 Kupffer细胞中IRAK-M mRNA的表达 对照组细胞直到LPS刺激后24 h才能检测到IRAK-M mRNA的微弱表达。LPS刺激前, 耐受组细胞内已有微弱的IRAK-M mRNA表达; LPS刺激后, 耐受细胞中的IRAK-M mRNA表达迅速上调并于6 h达

■应用要点

本研究表明IRAK-M可能对Kupffer细胞的LPS信号通路起负性调节作用, 并可能参与Kupffer细胞内毒素耐受状态的形成, 为内毒素血症的临床治疗提供了潜在的干预靶点。

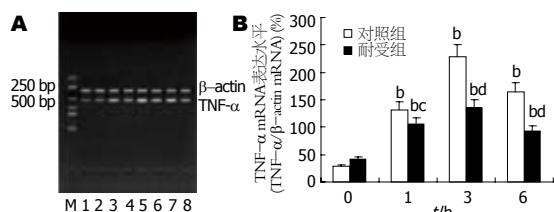


图3 LPS刺激不同时间后Kupffer细胞中TNF- α mRNA表达。A: RT-PCR检测结果, M: 分子质量标准; β -actin: 内参照, 1、3、5、7: 对照组0、1、3、6 h; 2、4、6、8: 耐受组0、1、3、6 h; B: 相对含量($n = 4$), ^b $P < 0.01$ vs 各组0时点; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 对照组同时点。

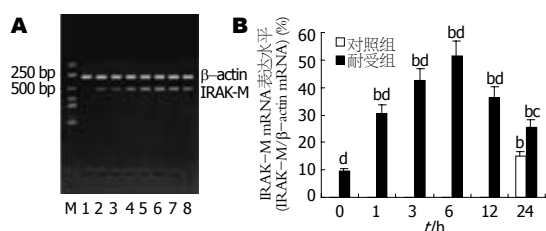


图4 LPS刺激不同时间后Kupffer细胞中IRAK-M的mRNA表达。A: RT-PCR检测结果; M: 分子质量标准; β -actin: 内参照, 1-2: 对照组12、24 h, 3-8: 耐受组0、1、3、6、12、24 h; B: 相对含量($n = 4$), ^b $P < 0.01$ vs 各组0时点; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 对照组同时点。

高峰, 与对照组细胞有显著差异($P < 0.01$), 24 h时表达虽有所减弱, 但仍强于对照组($P < 0.05$, 图4)。

2.5 Kupffer细胞中IRAK-M蛋白的表达 Western blot检测显示, 对照组细胞直到LPS刺激24 h后才能检测到微弱的IRAK-M蛋白表达。耐受组细胞在LPS刺激前已有微弱的IRAK-M蛋白表达, LPS刺激后该表达迅速上调, 且随LPS刺激的时间进一步增强, 与对照组相比有显著性差异($P < 0.01$, 图5)。

3 讨论

内毒素又名脂多糖(LPS), 是G⁻细菌细胞壁上的重要成分, 且属病原相关分子模式(pathogen associated molecular patterns, PAMPs)能为单核-巨噬细胞表面的Toll样受体4(toll like receptor 4, TLR4)所识别, 并经髓样分化因子88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)、白介素-1受体相关激酶(Interleukin-1 receptor-associated kinase, IRAK)、TNF受体相关因子6(TNF receptor associated factor 6, TRAF6)等细胞内信号分子的参与, 引起NF- κ B等转录因子的活化, 从而导致TNF- α 等大量炎症介质释放, 造成机体过度炎症反应及器官损害^[12-14]。然而, 生物在长期进化过程中形成了一种针对内毒素损害的内源性保护机制, 即内毒素耐受, 能避免了机体对LPS刺激

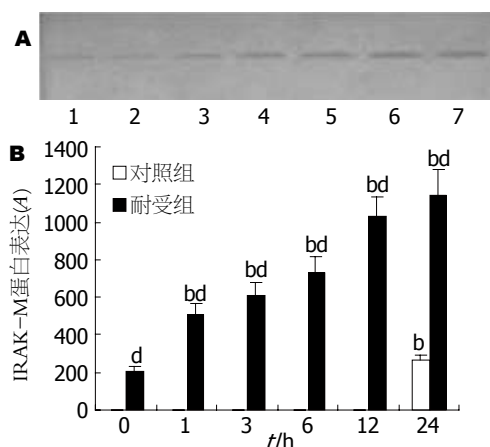


图5 Kupffer细胞中IRAK-M蛋白表达。A: Western blot检测结果, 1: 对照组24 h, 2-7: 耐受组0、1、3、6、12、24 h; B: 蛋白含量($n = 4$), ^b $P < 0.01$ vs 各组0时点; ^d $P < 0.01$ vs 对照组同时点。

的持续过度反应。所谓内毒素耐受是指: 机体或单核-巨噬细胞经LPS预处理后, 对LPS的再次刺激呈低反应性^[4-5]。

IRAK-M是IRAK家族成员之一, 主要在单核-巨噬细胞内表达, 为无活性的激酶^[6-9]。近来有研究表明, IRAK-M对LPS信号通路具有负性调节作用并可能参与内毒素耐受的形成^[6-7]。Kupffer细胞是定居在肝脏中的巨噬细胞, 其数量占体内单核-巨噬细胞总数的80%-90%, 是单核-巨噬细胞系统中最大的细胞群及典型代表^[10-11]。因位于肝血窦内, Kupffer细胞能清除进入门静脉血液的肠源性细菌及其毒性产物如LPS, 故成为机体的一道重要防线。然而, 当大量LPS随血液循环进入肝脏后, 则可引起Kupffer细胞的过度激活。此时的Kupffer细胞作为一个巨大的“炎症介质库”, 对机体过度炎症反应和器官损害的发生起重要作用^[10-11, 15-16]。由于Kupffer细胞代表着单核-巨噬细胞的绝大部分功能, 因此Kupffer细胞的内毒素耐受与整个体内毒素耐受状态密切相关。然而, 目前尚无有关Kupffer细胞中IRAK-M表达的研究报道。

本实验中, 我们在成功分离小鼠肝脏Kupffer细胞的基础上, 采用低浓度LPS(10 μ g/L)预处理的方式诱导Kupffer细胞的内毒素耐受状态。研究发现, 经低浓度LPS预处理后的Kupffer细胞对更高浓度LPS(100 μ g/L)刺激呈现出明显的低反应性, 表现为: (1)细胞对TNF- α 的释放明显减少; (2)细胞中的TNF- α mRNA的表达明显减弱; (3)细胞中转录因子NF- κ B的活化程度降低。上述结果从转录因子活化、前炎症细胞因子的基因表达及释放等不同层面证实了内毒

■名词解释

内毒素耐受: 指机体或单核-巨噬细胞受脂多糖初次刺激后, 对脂多糖的再次刺激呈低反应性。

■同行评价

本研究对机体炎症介质释放, 信号分子传递造成机体过度炎症反应及器官损害的可能机制进行了较深入的探讨, 具有一定的理论意义。

素耐受Kupffer细胞模型的成功建立。此外, 我们发现对照组细胞在LPS刺激后24 h才开始有IRAK-M的基因转录及蛋白表达, 且程度微弱; 而耐受组细胞在LPS再度刺激前在mRNA和蛋白水平上均能检测出IRAK-M的表达, 且两种水平的表达在LPS刺激后均迅速上调, 同时伴随着NF- κ B活化程度的减弱。由于NF- κ B活化是LPS激活单核-巨噬细胞的中心环节, 也是LPS信号转导的必然结果^[17-18], 故本实验结果表明IRAK-M可能对Kupffer细胞的LPS信号通路起负性调节作用, 并可能通过该作用参与Kupffer细胞内毒素耐受状态的形成。

4 参考文献

- 1 Li L, Pan J, Yu Y. Development of sorbent therapy for multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Biomed Mater* 2007; 2: R12-R16
- 2 Chiao CW, Lee SS, Wu CC, Su MJ. Thaliporphine increases survival rate and attenuates multiple organ injury in LPS-induced endotoxaemia. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2005; 371: 34-43
- 3 Martins JO, Ferracini M, Ravanelli N, Landgraf RG, Jancar S. Insulin inhibits LPS-induced signaling pathways in alveolar macrophages. *Cell Physiol Biochem* 2008; 21: 297-304
- 4 West MA, Koons A. Endotoxin tolerance in sepsis: concentration-dependent augmentation or inhibition of LPS-stimulated macrophage TNF secretion by LPS pretreatment. *J Trauma* 2008; 65: 893-898; discussion 898-900
- 5 Fan H, Cook JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res* 2004; 10: 71-84
- 6 Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R, Flavell RA. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002; 110: 191-202
- 7 del Fresno C, Soler-Rangel L, Soares-Schanoski A, Gómez-Piña V, González-León MC, Gómez-García L, Mendoza-Barberá E, Rodríguez-Rojas A, García F, Fuentes-Prior P, Arnalich F, López-Collazo E. Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *J Endotoxin Res* 2007; 13: 39-52
- 8 Rosati O, Martin MU. Identification and characterization of murine IRAK-M. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 1472-1477
- 9 Janssens S, Beyaert R. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell* 2003; 11: 293-302
- 10 Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 2004; 37: 16-28
- 11 Xu FL, You HB, Li XH, Chen XF, Liu ZJ, Gong JP. Glycine attenuates endotoxin-induced liver injury by downregulating TLR4 signaling in Kupffer cells. *Am J Surg* 2008; 196: 139-148
- 12 Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 2004; 113: 153-162
- 13 Medvedev AE, Piao W, Shoenfelt J, Rhee SH, Chen H, Basu S, Wahl LM, Fenton MJ, Vogel SN. Role of TLR4 tyrosine phosphorylation in signal transduction and endotoxin tolerance. *J Biol Chem* 2007; 282: 16042-16053
- 14 Dong W, Liu Y, Peng J, Chen L, Zou T, Xiao H, Liu Z, Li W, Bu Y, Qi Y. The IRAK-1-BCL10-MALT1-TRAF6-TAK1 cascade mediates signaling to NF-kappaB from Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2006; 281: 26029-26040
- 15 Thomas P, Hayashi H, Lazure D, Burke PA, Bajenova O, Ganguly A, Forse RA. Inhibition of lipopolysaccharide activation of Kupffer cells by transition metals. *J Surg Res* 2008; 148: 116-120
- 16 Abrahám S, Szabó A, Kaszaki J, Varga R, Eder K, Duda E, Lázár G, Tiszlavicz L, Boros M, Lázár G Jr. Kupffer cell blockade improves the endotoxin-induced microcirculatory inflammatory response in obstructive jaundice. *Shock* 2008; 30: 69-74
- 17 Gobejishvili L, Barve S, Joshi-Barve S, McClain C. Enhanced PDE4B expression augments LPS-inducible TNF expression in ethanol-primed monocytes: relevance to alcoholic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 295: G718-G724
- 18 Higuchi Y, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. The potential role of fucosylated cationic liposome/ NFkappaB decoy complexes in the treatment of cytokine-related liver disease. *Biomaterials* 2007; 28: 532-539

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志 2007年影响因子0.568

本刊讯 2007年世界华人消化杂志的总被引频次为2353, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第86位, 内科医学类28种期刊的第5位。2007年世界华人消化杂志的影响因子为0.568, 内科医学类28种期刊的第15位。即年指标0.082, 他引率0.69, 引用刊数372种, 扩散因子15.81, 学科影响指标0.54。(编辑: 程剑侠 2009-03-08)

葛根素对大鼠酒精性肝炎的影响及其机制

曲智威, 温春阳, 王爱平, 鞠文博, 任爱华, 刘卯阳, 周 艳

曲智威, 温春阳, 王爱平, 北华大学附属医院消化内科 吉林省吉林市 132011

鞠文博, 任爱华, 刘卯阳, 周艳, 北华大学解剖教研室 吉林省吉林市 132011

曲智威, 副主任医师, 副教授, 主要从事胃肠及肝脏疾病的研究。
作者贡献分布: 此课题由曲智威, 温春阳及王爱平设计; 研究过程由鞠文博, 任爱华, 刘卯阳及周艳操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由鞠文博提供; 数据分析由曲智威与鞠文博完成; 本论文写作由曲智威, 温春阳及王爱平完成。

通讯作者: 曲智威, 132011, 吉林省吉林市解放大路中12号, 北华大学附属医院消化内科, zhiweiwu@sina.com.cn

电话: 0432-2166402 传真: 0432-2034309

收稿日期: 2008-11-23 修回日期: 2009-01-15

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-08

Protective effect of puerarin on rats with alcoholic hepatitis

Zhi-Wei Qu, Chun-Yang Wen, Ai-Ping Wang,
Wen-Bo Ju, Ai-Hua Ren, Mao-Yang Liu, Yan Zhou

Zhi-Wei Qu, Chun-Yang Wen, Ai-Ping Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Beihua University, Jilin 132011, Jilin Province, China

Wen-Bo Ju, Ai-Hua Ren, Mao-Yang Liu, Yan Zhou, Department of Anatomy, Beihua University, Jilin 132011, Jilin Province, China

Correspondence to: Dr. Qu Zhi-Wei, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Medical College of Beihua University, 12 Jiefang Middle Road, Jilin 132011, Jilin Province, China. zhiweiwu@sina.com.cn

Received: 2008-11-23 Revised: 2009-01-15

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To investigate mechanism of puerarin on alcoholic hepatitis in rats.

METHODS: Twenty-one Wistar rats were divided into three groups randomly, with intragastric administration of the control group by corn oil + 500 g/L glucose 20 mL/(kg·d); intragastric administration of the model group by 400 mL/L alcohol 8 g/(kg·d) + corn oil; peritoneal injection of the puerarin group by puerarin 5 mg/(kg·d); After thirty days. Serum and liver tissue samples were prepared, and the levels of alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), and γ -glutamyltranspeptidase (GST) were determined by chromatometry, serum PGE₂, TNF- α and IL-6 by radioimmunity method, and COX-2 expression on the hepatic tissue by Western blot.

Pathological changes on hepatic tissue was determined by light microscopy.

RESULTS: The serum ALT, AST and GST was significantly higher in model group than in control group (107.5 ± 6.81 vs 33.20 ± 10.55 , 138.29 ± 9.72 vs 47.86 ± 14.3 , 3.57 ± 0.53 vs 1.43 ± 0.43 , all $P < 0.01$). The serum ALT and AST was significantly lower in puerarin group than in model group (52.33 ± 13.19 , 63.33 ± 7.03 , $P < 0.01$). The serum GST level was lower, but not significantly. The levels of serum PGE₂, TNF- α and IL-6 were significantly higher in model group than in control group (274.13 ± 26.15 vs 193.84 ± 23.97 , 1.85 ± 0.11 vs 0.90 ± 0.18 , 68.07 ± 12.64 vs 40.50 ± 5.09 , all $P < 0.01$), and the levels of the serum PGE₂, TNF- α and IL-6 were significantly lower in puerarin group than in model group (227.05 ± 21.55 , 1.35 ± 0.19 , 53.16 ± 5.62 , all $P < 0.01$). Expression of COX-2, was weak, but had high expression in model group ($P < 0.01$). The expression of COX-2 in puerarin group was down regulated, compared with model group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Puerarin has effects on hepatic injury in alcoholic hepatitis.

Key Words: Puerarin; Alcoholic hepatitis; Prostaglandin E₂; Tumor necrosis factor; Interleukin-6; Cyclooxygenase type 2

Qu ZW, Wen CY, Wang AP, Ju WB, Ren AH, Liu MY, Zhou Y. Protective effect of puerarin on rats with alcoholic hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 657-661

摘要

目的: 探讨葛根素对酒精性肝炎的作用机制。

方法: 21只Wistar大鼠, 随机分为3组, 正常对照组($n = 7$)用玉米油+500 g/L葡萄糖20 mL/(kg·d)灌胃, 模型组($n = 7$)用400 mL/L乙醇按8 g/(kg·d)+玉米油灌胃, 葛根素组($n = 6$): 葛根素+酒精, 按葛根素5 mg/(kg·d)腹腔注射给药。采用比色法测定血清AST, ALT及GST, 放免法测定血浆PGE₂, TNF及IL-6, Western blot方法

■背景资料

酒精性肝炎(AL)目前尚无特效的治疗药物, 本研究为葛根素对酒精性肝炎的实验研究, 探讨了葛根素对酒精性肝炎的作用机制。

■同行评议者

李军祥, 教授, 北京中医药大学附属东方医院消化内科

■相关报道

Bykov *et al*报道酒精性肝病PGE2及TNF升高,而用COX-2抑制剂Celecoxib可以显著改善酒精性肝病的肝损害。

检测肝组织COX-2表达,并通过光镜观察肝组织病理变化。

结果: 血浆ALT, AST及GST模型组与正常对照组比较有明显升高(107.5 ± 6.81 vs 33.20 ± 10.55 , 138.29 ± 9.72 vs 47.86 ± 14.3 , 3.57 ± 0.53 vs 1.43 ± 0.43 , 均 $P < 0.01$); 与模型组比较, 葛根素组血浆ALT及AST水平(52.33 ± 13.19 , 63.33 ± 7.03)有明显下降($P < 0.01$)。GST有下降趋势, 但无显著意义; 模型组与正常对照组比较血浆PGE2, TNF及IL-6明显上升(274.13 ± 26.15 vs 193.84 ± 23.97 , 1.85 ± 0.11 vs 0.90 ± 0.18 , 68.07 ± 12.64 vs 40.50 ± 5.09 , 均 $P < 0.01$); 与模型组比较, 葛根素组血浆PGE2, TNF及IL-6明显下降(227.05 ± 21.55 , 1.35 ± 0.19 , 53.16 ± 5.62 , 均 $P < 0.01$), COX-2正常对照组呈弱表达, 模型组显著高表达, 与正常对照组比较差别显著($P < 0.01$), 葛根素组COX-2表达下调, 与模型组相比有明显下调($F = 27.94$, $P < 0.01$)。

结论: 葛根素通过抑制肝脏COX-2的表达, 从而减少炎症介质PGE2、TNF及IL-6的生成, 最终减轻酒精对肝脏的损伤作用。

关键词: 葛根素; 酒精性肝炎; 前列腺素2; 肿瘤坏死因子; 白介素6; 环氧化物酶2

曲智威, 温春阳, 王爱平, 鞠文博, 任爱华, 刘卯阳, 周艳. 葛根素对大鼠酒精性肝炎的影响及其机制. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 657-661

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/657.asp>

0 引言

酒精性肝炎(alcoholic hepatitis, AL)为常见病及多发病, 严重者发展为肝坏死或肝功能衰竭, 进一步发展为肝硬化、肝癌、肝昏迷等合并症^[1-2]。目前尚无特效的治疗药物。目前应用于临床试验研究的药物有糖皮质激素, 己酮可可碱, 抗氧化剂, 抗TNF- α 抗体等^[2]。从中医中药角度为治疗酒精性肝炎提供了新途径, 葛根素(puerarin)是从豆科植物野葛的干燥根中提取的一种化学成分, 其化学名为8- β -D葡萄糖吡喃糖-4', 7二羟基异黄酮^[3-6]。葛根素药理实验研究表明, 其具有抗酒精中枢抑制作用, 对心肌的保护作用, 对肾的保护作用, 抗氧化作用抗缺血再灌注损伤作用, 抗酒精中枢抑制作用, 降血糖, 防治糖尿病及其并发症, 改善血液流变学指标, 改善微循环和抗血小板聚集的作用。临床上有报道用葛根素治疗酒精性肝炎冠心病等^[9-12], 但对酒精性肝炎的

实验研究国内外未见报道。

1 材料和方法

1.1 材料 兔抗鼠COX-2多克隆抗体(美国Cayman公司); 小鼠抗大鼠, β -actin mAb(美国Sigma公司); 生物素标记的羊抗兔二抗(英国KPL公司), 辣根过氧化物酶标记羊抗兔及羊抗鼠二抗、化学发光剂ECL北京中山生物技术有限公司), PGE2, TNF及IL-6放免试剂盒(北京北方生物技术有限公司)。葛根素注射液为北京协和药厂生产(批号国药准字H2003122), 硝酸纤维素膜(北京鼎国生物科技有限责任公司), 其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 分组: 21只Wistar大鼠, δ , 体质量170-220 g, 购于吉林大学动物部(许可证号SCXK 2003-007), 随机分为3组, 对照组($n = 7$)用玉米油2 g/(kg·d)+500 g/L葡萄糖20 mL/(kg·d)灌胃, 模型组($n = 7$)用400 g/L乙醇按8 g/(kg·d)+玉米油2 g/(kg·d)灌胃, 葛根素组($n = 7$): 葛根素+酒精, 葛根素0.05 g/dL, 按葛根素5 mg/kg ig给药, 处死大鼠取血清及肝脏。给药30 d造模结束后, 采用巴比妥钠麻醉、腹主动脉采血后处死大鼠, 共剩余对照组7只, 模型组7只, 葛根素组6只。各取全血约4-5 mL, 4000 r/min, 10 min离心后收集上清分装-70℃保存。取肝右叶生理盐水洗净, 滤纸吸干盐水后分成数份, 1份于100 g/L中性甲醛溶液中固定, 其他于液氮速冻数分钟后-70℃保存。

1.2.2 血清AST, ALT, GST的测定: 采用比色法, 用日立7170全自动生化分析仪检测。

1.2.3 血清PGE2, TNF及IL-6的测定: 采用¹²⁵I标记放射免法测定, 按试剂盒说明书进行。所用仪器为FJ-2008PS γ 计数器。3000 r/min, 3 s离心, -70℃保存待检, 检测前40℃ 3500 r/min, 离心15 min, 取上清液分别检测。

1.2.4 肝组织病理学检查: 光镜观察肝组织, 100 g/L甲醛固定标本, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明。

1.2.5 COX-2表达检测: 使用Western blot方法检测肝组织COX-2表达, 冷冻的肝组织称质量后按1:10比例用三去污蛋白裂解液裂解, 离心10000 r/min, 5 min, 2次, 取上清。用考马斯亮蓝(G250)测定蛋白含量。以每样品总蛋白为150 μ g上样, 用不连续100 g/L SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳, 半干转蛋白至硝酸纤维素膜: 100 g/L脱脂奶粉封闭; 一抗4℃过夜; TBS洗膜; 辣根过氧化物酶标记二抗37℃ 2 h, TBST洗膜, ECL作用后X胶

表 1 各组血清ALT, AST及GST变化 (mean ± SD, IU/L)

分组	n	ALT	AST	GST
对照组	7	33.20 ± 10.55	47.86 ± 14.30	1.43 ± 0.43
模型组	7	107.50 ± 6.81 ^b	138.29 ± 9.72 ^b	3.57 ± 0.53 ^b
葛根素组	6	52.33 ± 13.19 ^d	63.33 ± 7.03 ^d	3.00 ± 0.63
F值		96.82	134.49	30.02

^b*P*<0.01 vs 对照组; ^d*P*<0.01 vs 模型组.

表 2 血清PGE2, TNF及IL-6的变化 (mean ± SD, μg/L)

分组	n	PGE2	TNF	IL-6
对照组	7	193.84 ± 23.97	0.90 ± 0.18	40.50 ± 5.09
模型组	7	274.13 ± 26.15 ^b	1.85 ± 0.11 ^b	68.07 ± 12.64 ^b
葛根素组	6	227.05 ± 21.55 ^c	1.35 ± 0.19 ^c	53.16 ± 5.62 ^c
F值		19.60	61.04	17.83

^b*P*<0.01 vs 对照组; ^c*P*<0.05 vs 模型组.

片曝光, 经显影、定影等处理后观察结果. 并用Bandscan软件作灰度扫描分析, 用COX-2与内参(β-actin)灰度值比值表示各样本COX-2表达强度, 并作统计学处理.

统计学处理 数据以mean ± SD表示, 用SPSS13.5统计软件处理数据, 采用方差分析和最小显著法检验, *P*<0.05或0.01具有显著性差异.

2 结果

2.1 一般情况 实验过程中乙醇灌胃组有1只大鼠死亡, 死因为灌胃误入气管. 正常对照组存活大鼠初始体质量各组相比没有显著性差异. 实验中, 大鼠的一般表现: 正常对照组被毛光滑, 精神状态好, 食欲佳, 体质量增加. 模型组大鼠精神萎靡, 活动减少, 食欲减退, 消瘦, 皮毛无光泽, 有脱毛现象, 体质量较前有所下降. 给药组大鼠精神、食欲及活动介于正常组与模型组之间.

2.2 肝脏的病理学变化

2.2.1 肉眼观: 正常大鼠肝脏被膜光滑, 呈红褐色, 明亮有光泽. 模型组大鼠肝脏体积明显增大, 包膜紧张, 边缘圆钝, 颜色浅黄或土黄色, 与周围组织有粘连, 可见局灶性黄白色变性灶, 切面油腻, 无光泽. 给药组肝脏变化介于正常组与模型组之间, 颜色较正常组浅, 较模型组深, 无局灶黄白色变性灶, 切面无明显油腻感, 尚有光泽.

2.2.2 HE染色: 正常对照组, 大鼠肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 细胞形态正常, 小叶结构正常(图1A); 模型组有细胞肿胀, 细胞内轻

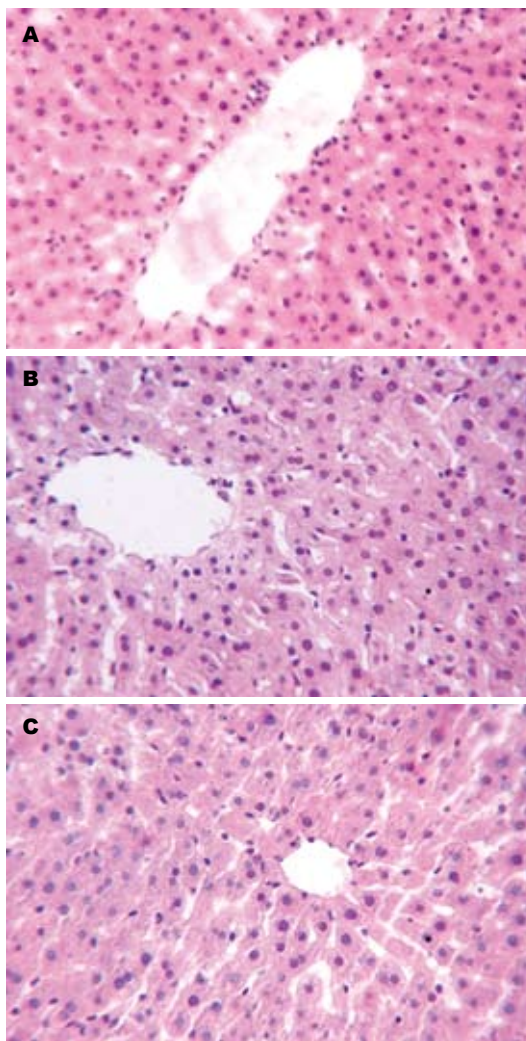


图 1 肝脏组织病理学变化(HE染色 × 400). A: 对照组; B: 模型组; C: 葛根素组.

度气球样变, 有小叶结构紊乱, 但无明显肝细胞坏死、炎症细胞浸润及明显脂肪肝改变(图1B); 葛根素组肝细胞亦有轻度细胞肿胀, 几乎无气球样变, 小叶结构基本正常(图1C).

2.3 肝脏生化指标的变化 由表1所见血浆ALT, AST及GST模型组与正常对照组比较有明显升高, 差别均有显著性意义(*P*<0.01); 葛根素组与模型组比较血浆ALT, AST及与正常对照组比较有明显下降, 差别均有显著性意义(*P*<0.01), GST与模型组比较有下降趋势, 但无显著意义(*P*>0.05), 葛根素具有保护肝细胞损伤作用.

2.4 血清PGE2, TNF及IL-6的变化 由表2所见模型组血清PGE2, TNF及IL-6与正常对照组比较有明显升高, 差别均有显著性意义(*P*<0.01); 葛根素组与模型组比较血清PGE2, TNF及IL-6明显下降, 差别均有显著性意义(*P*<0.05), 葛根素具有减少炎症介质PGE2, TNF及IL-6作用.

■创新盘点

本文从组织学、免疫学及分子生物学角度探讨了葛根素对酒精性肝炎的作用机制.

■应用要点

本文从中医中药角度为治疗酒精性肝炎提供了新途径。

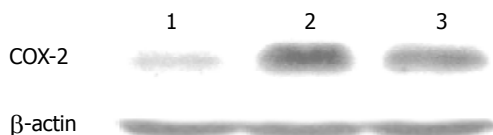


图2 COX-2在肝组织中的表达。1: 对照组; 2: 模型组; 3: 葛根素组。

2.5 肝组织COX-2表达 正常对照组呈弱表达, 模型组显著高表达, 与对照组比较差别显著 ($P < 0.01$, 图2)。葛根素组COX-2表达下调, 与模型组相比有明显下调 ($P < 0.01$), $F = 27.94$ 。经计算机Bandscan软件分析其灰度值, COX-2灰度值与 β -actin灰度值比值为: 对照组($n = 7$)为 0.196 ± 0.079 , 模型组($n = 7$)为 0.421 ± 0.033 , 葛根素组($n = 6$)为 0.281 ± 0.046 。

3 讨论

COX是前列腺素类(prostaglandins, PGs)物质合成过程中的一个限速酶。COX-2是他的一个亚型, 他在正常组织中不表达或低表达, 但在炎症、肿瘤等病理状态下, 可受众多因素的刺激, 使其表达明显升高^[13-15]。已经有实验证实, 在酒精性肝炎中, 肝脏COX-2表达明显升高, 使其合成产物PGE2升高, 加重酒精性肝炎的各种病理损伤。本实验通过建立酒精性肝损伤的大鼠模型, 观察葛根素对大鼠酒精肝损伤的影响, 同时测定肝组织COX-2的表达, 以明确COX-2与肝损伤的关系, 探索葛根素及选择性COX-2抑制剂对酒精性肝损伤的影响。本实验表明对照组呈弱表达, 模型组显著高表达, 与对照组比较差别显著。葛根素组COX-2表达下调, 与模型组相比有明显下调, 与Bykov *et al*报道一致^[16]。

酒精性肝损伤时, 首先损害线粒体, 因肝细胞内线粒体AST浓度大大超过肝窦血液中的浓度, 即使肝细胞无明显坏死, 而仅有肝细胞膜的通透性增加时, 血中AST的浓度就可明显升高^[17-20], 故他是酒精性肝损伤的敏感指标而血清ALT则在酒精性肝炎时可正常或轻微升高。本实验中, 虽然肝组织学改变没有达到明显脂肪肝、酒精性肝纤维化的程度, 但仍明显存在肝细胞损伤, 故其血清ALT、AST在模型组中较对照组均有明显升高。而经葛根素组, 其AST、ALT较肝损伤组均有降低, 提示葛根素可以减轻酒精所致大鼠肝细胞损伤。GST主要存在于细胞膜和微粒体上, 参与谷胱甘肽的代谢, 当肝细胞损伤时, 即释放到血液中^[21]。本实验结果显

示, 在酒精性肝损伤的模型组中, 血浆GST活性升高, 模型组与对照组相比均有显著性意义, 其同时出现的血清AST、ALT升高也说明了这一点^[22-24]。在使用葛根素血浆GST有下降趋势, 但无统计学意义, 表明葛根素可以减轻酒精所致大鼠肝细胞损伤。

急性酒精性肝炎的病理学特点是伴有肝细胞损伤的炎症性改变, 其机制为炎症因子释放, 过氧化物打击, 内毒素的释放, Kupffer的浸润等, 炎症因子有PGE2, TNF, TGF及IL-6等, PGE2为COX-2的代谢产物, Bykov *et al*报道酒精性肝病PGE2及TNF升高, 而用COX-2抑制剂Celecoxib可以显著改善酒精性肝病的肝损害^[16], 我们的结果表明模型组血清PGE2, TNF及IL-6与对照组比较有明显升高, 差别均有显著性意义; 葛根素组与模型组比较血清PGE2, TNF及IL-6明显下降, 差别均有显著性意义, 葛根素具有减少炎症介质PGE2, TNF及IL-6作用。

以上结果表明, 在酒精性肝损伤过程中, 早期的肝组织化学性炎症改变即可刺激其COX表达, 进而导致炎症介质PGE2, TNF及IL-6的释放。而使用葛根素可以拮抗上述变化, 从而减轻酒精导致的肝组织损伤。

4 参考文献

- David AB. Sigmund S. pathogenesis of alcoholic hepatitis, *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: S229-S235
- Reuben A. Alcohol and the liver. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 283-291
- Irie M, Suzuki N, Sohda T, Anan A, Iwata K, Takeyama Y, Watanabe H, Fischer P, Scherberich JE, Sakisaka S. Hepatic expression of gamma-glutamyltranspeptidase in the human liver of patients with alcoholic liver disease. *Hepatol Res* 2007; 37: 966-973
- Day CP. Treatment of alcoholic liver disease. *Liver Transpl* 2007; 13: S69-S75
- Nagata K, Suzuki H, Sakaguchi S. Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *J Toxicol Sci* 2007; 32: 453-468
- Tome S, Lucey MR. Review article: current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 19: 707-714
- Zhang SY, Chen G, Wei PF, Huang XS, Dai Y, Shen YJ, Chen SL, Sun-Chi CA, Xu HX. The effect of puerarin on serum nitric oxide concentration and myocardial eNOS expression in rats with myocardial infarction. *J Asian Nat Prod Res* 2008; 10: 373-381
- Ding MP, Feng F, Hu HT. [Effects of puerarin on expression of nuclear factor kappaB after cerebral ischemia/reperfusion in rats] *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2007; 32: 2515-2518
- Tan Y, Liu M, Wu B. Puerarin for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2008: CD004955
- Liu R, Meng F, Bai H, Liu Y, Tang CW, Liu BW.

- [Inhibitory effect of quercetin, rutin and puerarin on LDL oxidation induced by Cu^{2+}] *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 2007; 32: 2058-2062
- 11 Hwang YP, Choi CY, Chung YC, Jeon SS, Jeong HG. Protective effects of puerarin on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Arch Pharm Res* 2007; 30: 1309-1317
- 12 Singh AK, Jiang Y, Benlhabib E, Gupta S. Herbal mixtures consisting of puerarin and either poly enylphosphatidylcholine or curcumin provide comprehensive protection against alcohol-related disorders in P rats receiving free choice water and 15% ethanol in pure water. *J Med Food* 2007; 10: 526-542
- 13 Samaka RM, Abdou AG, Abd El-Wahed MM, Kandil MA, El-Kady NM. Cyclooxygenase-2 expression in chronic gastritis and gastric carcinoma, correlation with prognostic parameters. *J Egypt Natl Canc Inst* 2006; 18: 363-374
- 14 Harada N, Okajima K, Uchiba M, Kushimoto S, Isobe H. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats by activation of cyclooxygenase-1. *Thromb Haemost* 2004; 92: 550-558
- 15 Warford-Woolgar L, Peng CY, Shuhya J, Wakefield A, Sankaran D, Ogborn M, Aukema HM. Selectivity of cyclooxygenase isoform activity and prostanoid production in normal and diseased Han:SPRD-cy rat kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F897-F904
- 16 Bykov IL, Palmen M, Rainsford KD, Lindros KO. Chronic effects of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, cause enhanced alcohol-induced liver steatosis in rats. *Inflammopharmacology* 2006; 14: 36-41
- 17 Nanji AA, Jokelainen K, Lau GK, Rahemtulla A, Tipoe GL, Polavarapu R, Lalani EN. Arginine reverses ethanol-induced inflammatory and fibrotic changes in liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 832-839
- 18 Senthilkumar R, Nalini N. Effect of glycine on tissue fatty acid composition in an experimental model of alcohol-induced hepatotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31: 456-461
- 19 Saravanan N, Nalini N. Antioxidant effect of Hemidesmus indicus on ethanol-induced hepatotoxicity in rats. *J Med Food* 2007; 10: 675-682
- 20 Tipoe GL, Liong EC, Casey CA, Donohue TM Jr, Eagon PK, So H, Leung TM, Fogt F, Nanji AA. A voluntary oral ethanol-feeding rat model associated with necroinflammatory liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 2008; 32: 669-682
- 21 Irie M, Suzuki N, Sohma T, Anan A, Iwata K, Takeyama Y, Watanabe H, Fischer P, Scherberich JE, Sakisaka S. Hepatic expression of gamma-glutamyltranspeptidase in the human liver of patients with alcoholic liver disease. *Hepatol Res* 2007; 37: 966-973
- 22 Izu H, Shobayashi M, Manabe Y, Goto K, Iefuji H. Sake yeast suppresses acute alcohol-induced liver injury in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70: 2488-2493
- 23 Cui JW, Hu YY, Fang ZH, Wang XN, Cheng Y, Jing-Hua P, Feng Q, Hui Z. Intervention effects of Jianpi Liqi Huoxue Decoction on lipid peroxidative liver injury induced by alcohol. *Chin J Integr Med* 2006; 12: 281-286
- 24 Pari L, Karthikesan K. Protective role of caffeic acid against alcohol-induced biochemical changes in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; 21: 355-361

■同行评价

本文总体设计合理, 方法恰当, 结果可靠, 具有较好的参考价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志英文摘要要求

本刊讯 本刊英文摘要包括目的、方法、结果、结论, 书写要求与中文摘要一致。具体格式要求如下: (1) 题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致; (2) 作者 署名一般不超过8人。作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号。格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”; (3) 单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码。例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China; (4) 基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801; (5) 通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wcjd@wjgnet.com; (6) 收稿及修回日期 格式如: Received: Revised: . (常务副总编辑: 张海宁 2009-03-08)

梗阻性黄疸大鼠NF- κ B的变化及其对免疫应答的影响

成小林, 时开网, 徐锦, 李伟

■背景资料

梗阻性黄疸(OJ)是外科常见的临床表现。围手术期发生的感染、肝衰竭、多器官功能不全综合征(MODS)等并发症和高死亡率与术前机体的免疫功能受抑有密切关系。NF- κ B是一种广泛存在于体内细胞的核转录因子,通过对多种免疫相关因子的调节,调控机体正常免疫功能,可导致梗阻性黄疸时肝脏炎症损伤以及继发的机体免疫功能改变。

成小林, 时开网, 徐锦, 李伟, 南京医科大学附属南京第一医院普外科 江苏省南京市 210006

成小林, 南京医科大学硕士, 主要从事梗阻性黄疸疾病的机制研究。

南京市卫生局基金资助项目, No. 200507003

作者贡献分布: 此课题由时开网指导; 成小林设计; 研究过程由成小林和徐锦操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由时开网提供; 数据分析成小林和李伟完成; 本论文写作由成小林完成。

通讯作者: 时开网, 210006, 江苏省南京市, 南京医科大学附属南京第一医院普外科八病区, zhangyun-chun@163.com

收稿日期: 2008-11-23 修回日期: 2009-01-14

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-08

Variation of NF- κ B and its effect on immune response in rats with obstructive jaundice

Xiao-Lin Cheng, Kai-Wang Shi, Jin Xu, Wei Li

Xiao-Lin Cheng, Kai-Wang Shi, Jin Xu, Wei Li, Department of General Surgery, the Affiliated Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China

Supported by: the Nanjing Science and Technology Bureau, No. 200507003

Correspondence to: Kai-Wang Shi, Department of General Surgery, the Affiliated Nanjing First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China. zhangyun-chun@163.com

Received: 2008-11-23 Revised: 2009-01-14

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To investigate the variation of NF- κ B and its effect on immune response in rats with obstructive jaundice (OJ).

METHODS: Sixty male Wistar rats were randomized into 3 groups, that is, sham operation group, common bile duct ligation (CBDL) group, and CBDL+PDCT group. Liver histopathology, levels of serum TB, ALT and LPS, liver IL-1 β , IL-6, IL-10 and NF- κ B were detected at 7 d and 14 d after operation respectively in each group ($n = 10$).

RESULTS: In CBDL group, all rats were injured with the liver histological damage, in which the level of serum TB, ALT, LPS were all increased as compared with those in SHAM group 7 d and 14 d post-operation (7 d: 140.14 ± 10.17 vs 7.309

± 1.04 , 134.479 ± 10.20 vs 35.79 ± 3.76 , 189.33 ± 11.05 vs 2.816 ± 0.58 ; 14 d: 194.608 ± 12.73 vs 36.142 ± 3.51 , 217.797 ± 12.37 vs 7.321 ± 1.03 , 292.816 ± 14.53 vs 2.664 ± 0.53 , all $P < 0.01$), besides, expressions of IL-1 β , IL-6, IL-10 and NF- κ B in liver were increased at day 7 ($P < 0.01$) and even more significant at day 14 ($P < 0.01$). After PDTC administration, compared with those in CBDL group, the level of serum TB, ALT as well as the expressions of IL-1 β , IL-6 and NF- κ B in liver were all significantly decreased at 7 d ($P < 0.01$), while at 14 d there was no significant difference. However, after PDTC administration, compared with those in CBDL group, there was no significant difference for the level of LPS and IL-10 at both 7 d or 14 d.

CONCLUSION: In the early days (7 d), PDTC does play a protective role in OJ by down-regulating the activation of NF- κ B and down-regulating IL-1 β and IL-6, so as to alleviate the injuries of liver tissues. While in the late days (14 d), PDTC has no significant effect, which may be caused by LPS, IL-10 and other functional channels.

Key Words: Obstructive jaundice; Nuclear factor- κ B; Pyrrolidine dithiocarbamate; Total bilirubin; ALT; Lipopolysaccharides

Cheng XL, Shi KW, Xu J, Li W. Variation of NF- κ B and its effect on immune response in rats with obstructive jaundice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 662-666

摘要

目的: 探讨梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)时NF- κ B的变化及其对免疫应答的影响。

方法: 60只Wistar δ 大鼠随机分成3组: 假手术组(SHAM组)、梗阻性黄疸组(CBDL组)和梗阻性黄疸+NF- κ B抑制剂吡硫代氨基甲酸酯(PDTC)组(PDTC组)。每组术后7、14 d分批($n = 10$)检测光镜下肝脏病理组织学, 血清总胆红素(TB), 谷丙转氨酶(ALT), 内毒素(LPS)水平, 肝组织促炎因子IL-1 β 、IL-6, 抑炎因子IL-10以及NF- κ B蛋白表达。

■同行评议者

崔云甫, 教授, 哈尔滨医科大学第二附属医院普外科

结果: CBDL组7、14 d大鼠均出现肝组织病理损伤, CBDL组较SHAM组血清TB、ALT、LPS增高(7 d: 140.14 ± 10.17 vs 7.309 ± 1.04 , 134.479 ± 10.20 vs 35.79 ± 3.76 , 189.33 ± 11.05 vs 2.816 ± 0.58 ; 14 d: 194.608 ± 12.73 vs 36.142 ± 3.51 , 217.797 ± 12.37 vs 7.321 ± 1.03 , 292.816 ± 14.53 vs 2.664 ± 0.53 , 均 $P < 0.01$), 肝组织IL-1 β 、IL-6、IL-10和NF- κ B表达增强(均 $P < 0.01$), 且14 d较7 d变化更为显著. PDTC组大鼠血清TB、ALT和肝组织IL-1 β 、IL-6、NF- κ B表达在7 d时相点时比CDBL组显著下降($P < 0.01$), 而到14 d时相点时比较CDBL组无明显变化; LPS和IL-10表达与CDBL组各时相点相比无明显差异.

结论: 梗阻性黄疸大鼠早期(7 d)通过PDTC抑制NF- κ B活化表达, 可下调促炎因子的表达, 减轻肝损. 后期(14 d)作用不明显, 其机制可能是通过LPS、IL-10等其他途径所致.

关键词: 梗阻性黄疸; 核因子 κ B; 脯氨酸二硫化氨基甲酸酯; 血清总胆红素; 谷丙转氨酶; 内毒素

成小林, 时开网, 徐锦, 李伟. 梗阻性黄疸大鼠NF- κ B的变化及其对免疫应答的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 662-666

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/662.asp>

0 引言

梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)是外科常见的临床表现, 围手术期发生的感染、肝衰竭、多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)等并发症和高死亡率与术前机体的免疫功能受抑有密切关系^[1]. NF- κ B是一种广泛存在于体内细胞的核转录因子, 通过对多种免疫相关因子的调节, 调控机体正常免疫功能, 可导致梗阻性黄疸时肝脏炎症损伤以及继发的机体免疫功能改变^[2]. 本实验检测OJ时肝脏病理组织学, 血清总胆红素(total bilirubin, TB)、谷丙转氨酶(ALT)和内毒素(lipopolysaccharides, LPS)的水平, 肝组织促炎细胞因子IL-1 β 、IL-6, 抗炎细胞因子IL-10和NF- κ B蛋白的表达, 同时应用PDTC抑制NF- κ B的活化后, 再次检测上述指标的变化, 来探讨NF- κ B在OJ大鼠不同时期对机体免疫应答、肝损伤的影响机制, 为进一步研究干预治疗早期梗阻性黄疸时机体的免疫力降低、肝损伤提供新的理论依据和实践经验.

1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级, δ , Wistar大鼠60只, 体

质量220-230 g, 购于中科院上海实验动物中心. 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)购于Sigma公司. IL-1 β 、IL-6、IL-10细胞因子ELISA试剂盒购于美国R&B公司. 蛋白抽提试剂盒购于Active Motif公司, BCA蛋白定量试剂盒和EMSA(电泳迁移率变迁检测)试剂盒购于Pierce公司. Olympus AU7200全自动生化仪, 北京金山川公司MB-80内毒素定量测定系统.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: 大鼠随机分成3组, 假手术组(SHAM组), 梗阻性黄疸组(CBDL组), 梗阻性黄疸+PDTC组(PDTC组), 每组10只大鼠. 氯胺酮(50 mg/kg)麻醉, SHAM组取上腹正中切口约2-3 mm, 解剖肝蒂, 仅游离胆总管, 不予结扎. CBDL、PDTC组在距肝门5 mm处用4-0丝线双道结扎胆总管, 逐层关腹, 操作严格无菌. PDTC组在术前24 h ip 100 g/L PDTC (75 mg/kg, Sigma), 术后每天给予100 g/L PDTC ip(50 mg/kg), 直至处死. SHAM组和CDBL组则同期ip等量生理盐水. 各组分别于术后7、14 d分批($n = 10$)下腔静脉采血, 制备血清, 取出肝组织, 部分置于40 g/L多聚甲醛溶液固定, 部分置液氮保存, 最后将大鼠处死.

1.2.2 肝脏组织病理学检查: 取40 g/L多聚甲醛液固定的肝组织, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片. 切片HE染色, 观察肝组织病理变化.

1.2.3 血清生化指标测定: TB和ALT用Olympus AU7200全自动生化仪检测; LPS由北京金山川公司MB-80微生物快速动态检测系统检测, 取下腔静脉血6 mL, 3000 r/min离心15 min后, 取血浆进行测定(鲎试剂偶氮基质显色法).

1.2.4 肝组织匀浆的制备及其IL-1 β 、IL-6、IL-10细胞因子含量测定: 取100 mg肝组织, 内切式匀浆机冰上匀浆后, 以3000 r/min离心30 s, 取上清液冰上继续裂解20 min, 加入50 μ L 10% Nonidet P(NP)-40, 震荡30 s, 4 $^{\circ}$ C 3000 r/min离心10 min, 取上清液, -80 $^{\circ}$ C冰箱冻存备用. 通过大鼠IL-1 β 、IL-6、IL-10定量ELISA试剂盒测定, 严格参照试剂盒操作说明进行.

1.2.5 EMSA法检测NF- κ B活化表达: 新鲜肝脏取材组织称质量匀浆后抽提核蛋白, 步骤按试剂盒说明书. 以BCA法测定抽得的蛋白浓度. 步骤按试剂盒说明书. 本实验中NF- κ B探针序列如下: 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3', 采用3'末端生物素标记^[3]. 制备60 g/L聚丙

■ 研发前沿

梗阻性黄疸内毒素血症是机体免疫功能受损的结果, 内毒素血症刺激炎症细胞产生的细胞因子及炎症介质可能是抑制细胞免疫的主要因素.

■相关报道

在体外试验中, Tabary *et al* 研究发现IL-10可以通过抑制I κ B激酶复合体来抑制NF- κ B的活性, 进而抑制NF- κ B对炎症因子的调控作用。

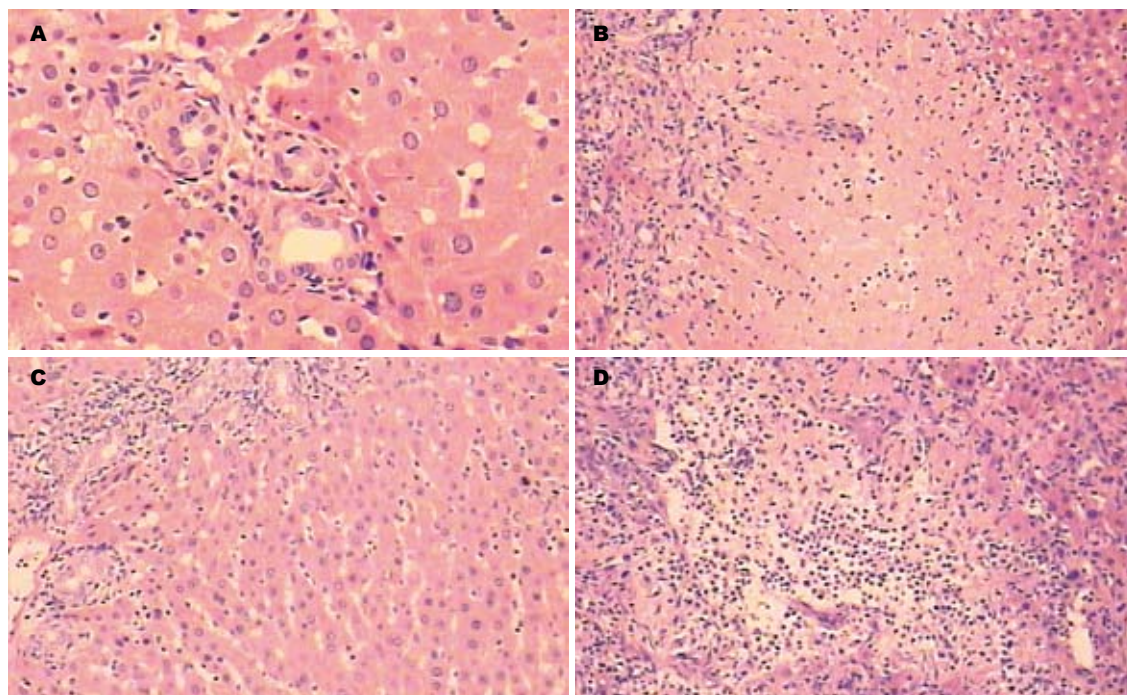


图1 光镜下肝脏病理组织学改变. A: CBDL组7 d; B: CBDL组14 d; C: PDTC组7 d; D: PDTC组14 d.

表1 各组大鼠血清生化指标值

	ALT (U/L)		TB (mol/mL)		LPS (ng/L)	
	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d
SHAM组	35.79 \pm 3.76	36.142 \pm 3.51	7.309 \pm 1.04	7.321 \pm 1.03	2.816 \pm 0.58	2.664 \pm 0.53
CBDL组	134.479 \pm 10.20 ^b	194.608 \pm 12.73 ^b	140.14 \pm 10.17 ^b	217.797 \pm 12.37 ^b	189.33 \pm 11.05 ^b	292.816 \pm 14.53 ^b
PDTC组	91.659 \pm 7.47 ^{bd}	182.713 \pm 15.38 ^b	103.886 \pm 10.96 ^{bd}	209.107 \pm 12.06 ^b	188.624 \pm 11.12 ^b	289.533 \pm 15.76 ^b

^b $P < 0.01$ vs SHAM组; ^d $P < 0.01$ vs CBDL组.

烯酰胺凝胶. 按照EMSA试剂盒, 每孔取抽提的核蛋白6 μ g, 与缓冲液及探针混匀, 室温孵育20 min后, 上样电泳, 100 V, 60 min, 半干电转移(280 mA 40 min)将蛋白转至带阳性电荷的尼龙膜. 紫外灯交联后化学发光显色. 显影后采用图像分析系统对条带灰度进行分析.

统计学处理 结果数据以mean \pm SD表示, 用SPSS14.0软件进行统计学分析. 组内前后不同时间点间两两比较采用成组 t 检验; 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义.

2 结果

2.1 光镜下肝脏病理组织学改变 光镜下假手术组肝组织结构正常, CBDL组7 d可见肝内胆管扩张, 肝细胞肿胀、水样变性, 空泡变性、有少量点状或灶状坏死; 汇管区有明显的小胆管、毛细血管以及结缔组织增生(图1A). 结扎14 d可

见大范围的汇管区周围肝细胞变性、坏死; 胆管细胞大量增生, 并伸入肝实质内; 纤维结缔组织增生向肝小叶内扩展, 肝小叶有形态改变(图1B). PDTC组在胆总管结扎7 d时肝病理改变较之CBDL组明显减轻(图1C), 可见少量纤维组织、新生胆管增生, 但仍可见肝细胞肿胀以及少量灶性坏死; 结扎14 d时与CBDL组相比肝病理改变差别不显著(图1D).

2.2 血清生化指标变化 血清ALT、TB、LPS水平在CBDL组各时相均明显高于假手术组($P < 0.01$), 且在术后14 d较7 d增高更明显($P < 0.01$); PDTC组在术后7 d其血清ALT、TB水平明显低于同时相的CBDL组($P < 0.01$), 术后14 d与CBDL组无明显差异. PDTC组各时相的LPS值与CBDL组无明显差异($P < 0.01$, 表1).

2.3 肝组织细胞因子变化 CBDL组肝组织IL-1 β , IL-6, IL-10各时相点较SHAM组明显增高, 有统

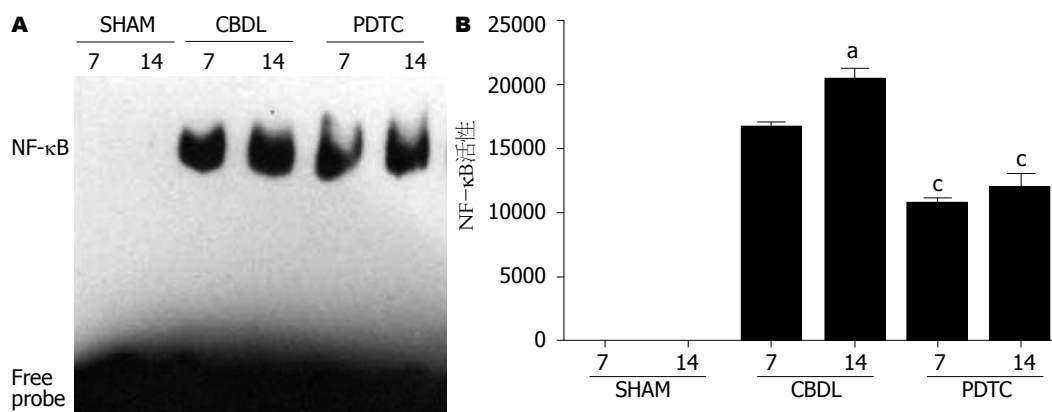
表 2 各组大鼠肝脏IL-1 β , IL-6, IL-10表达的水平变化

	IL-1 β		IL-6		IL-10	
	7 d	14 d	7 d	14 d	7 d	14 d
SHAM组	6.88 \pm 1.3	6.81 \pm 1.06	35.6 \pm 6.89	36.56 \pm 6.30	50.76 \pm 5.2	53.74 \pm 6.9
CBDL组	140.65 \pm 12.15 ^b	193.02 \pm 15.02 ^b	179.12 \pm 9.81 ^b	232.7 \pm 16.61 ^b	78.96 \pm 8.83 ^b	104.65 \pm 10.08 ^b
PDTC组	90.75 \pm 11.81 ^d	178.15 \pm 14.09 ^d	130.41 \pm 12.57 ^d	229.8 \pm 15.04 ^b	73.19 \pm 8.94 ^b	100.53 \pm 8.33 ^b

^b $P < 0.01$ vs SHAM组; ^d $P < 0.01$ vs CBDL组.

■应用要点

PDTC是一种抗氧化剂, 可通过直接清除活性氧中间产物(ROIs)减少局部自由基产生从而抑制NF- κ B激活, 使致炎细胞因子基因表达受到抑制, 进而减少致炎细胞因子的释放.

图 2 NF- κ B活化表达. ^a $P < 0.05$ vs 同组7 d; ^c $P < 0.05$ vs CBDL组同时点.

计学意义($P < 0.01$), 且14 d时相点较7 d增高明显($P < 0.01$); PTDC组7 d时相点肝组织IL-1 β , IL-6较CBDL组降低($P < 0.01$), 而14 d时相点无明显差异($P < 0.01$); CBDL组和PDTC组肝组织IL-10相应时相点对比均无明显差异($P < 0.01$, 表2).

2.4 NF- κ B活化表达 SHAM组无特异性阻滞条带; CBDL组可见活化蛋白与探针结合产生的明显阻滞条带, 14 d时相点阻滞条带的面积与灰度较7 d强($P < 0.05$); PDTC组有较少量蛋白活化, 阻滞条带的面积与灰度各时相点均弱于对应的CBDL组($P < 0.05$, 图2).

3 讨论

梗阻性黄疸患者术后较多并发症和高死亡率与术前机体的免疫功能受抑有密切关系. 细胞因子是免疫细胞调节细胞生长、分化、发挥免疫功能的关键信使. 梗阻性黄疸可以启动机体内细胞因子的分泌, 在梗阻性黄疸的发生、发展过程中参与其对多器官功能障碍的启动. 而内毒素是细胞因子产生的主要诱导剂, 诱导细胞分泌多种炎性因子, 并借助这些炎性因子发挥免疫调节作用. NF- κ B是NF- κ B/Rel家族中的最主要成员之一^[4], 是细胞因子释放的开关^[5]. 正常情况下NF- κ B以无活性状态存在于细胞质中,

由多肽链P50与P65两亚基构成的二聚体, 与其抑制蛋白I κ B结合形成非活性的三聚体, 处于不表达状态. 细胞外的许多刺激物如内毒素、炎症细胞因子、生长因子、病毒蛋白等均可激活NF- κ B, 首先引起NF- κ B诱导激酶的活化, 继而活化I κ B激酶, I κ B激酶磷酸化, I κ B从NF- κ B复合体上脱落, 活化的NF- κ B移向细胞核内, 结合到靶基因的启动子或增强子的 κ B结构域, 引起许多因子的转录, 包括促炎因子IL-1 β , IL-6等^[6-7]. NF- κ B蛋白激活引起的多种基因表达的改变将会导致炎症性疾病和肿瘤的发生. 在阻塞性黄疸中NF- κ B作为一种重要的炎症转录调控子, 对肝组织的炎症反应、氧化应激以及肝细胞凋亡和再生发挥着重要作用^[8]. 本实验发现梗阻性黄疸发生后肝组织NF- κ B蛋白表达逐渐增多. 与此同时, 血清中反映肝损伤的指标ALT、TB也明显上升, 血清LPS也逐渐升高. 肝脏组织的促炎细胞因子表达逐渐增多, 而抗炎因子IL-10也随时间OJ延长表达增多. 肝脏组织病理损伤随时间加重.

PDTC是一种抗氧化剂, 可通过直接清除活性氧中间产物(reactive oxygen intermediates, ROIs)减少局部自由基产生从而抑制NF- κ B激活, 使致炎细胞因子基因表达受到抑制, 进而减少致

■同行评价

本文探讨梗阻性黄疸时NF- κ B的变化及其对免疫应答的影响,选题较好,对以后指导临床有较大意义。

炎细胞因子的释放^[9-12]。PDTC干预OJ大鼠后,早期(7 d)较CBDL组NF- κ B蛋白表达减少,肝脏促炎细胞因子IL-1 β , IL-6表达不同程度降低,肝组织损伤减轻,血清ALT、TB降低。这表明早期抑制NF- κ B的激活对减轻阻塞性黄疸病程早期的肝脏炎性损伤有积极的作用,IL-1 β , IL-6则可能是NF- κ B抑制剂PDTC减轻阻塞性黄疸时肝脏损伤的机制之一。后期(14 d)较CBDL组NF- κ B蛋白表达亦降低,而细胞因子IL-1 β , IL-6则无明显降低,肝组织损伤,血清ALT、TB; PDTC组的LPS和抗炎细胞因子IL-10较CBDL组早晚期均无明显变化。梗阻性黄疸内毒素血症是机体免疫功能受损的结果,内毒素血症刺激炎症细胞产生的细胞因子及炎症介质可能是抑制细胞免疫的主要因素^[13]。在体外试验中,Tabary *et al*^[14]研究发现IL-10可以通过抑制I κ B激酶复合体来抑制NF- κ B的活性,进而抑制NF- κ B对炎症因子的调控作用。IL-10主要由T淋巴细胞产生,可抑制LPS等诱导的单核巨噬系统的活化及炎症细胞因子的合成,抑制创伤、感染等炎症介质介导的炎症反应,对抑制早期炎症反应、保护器官功能方面有重要意义,但后期介导的细胞免疫抑制是感染性休克和免疫功能下降的重要原因。OJ后期, LPS和IL-10在PDTC组同CBDL组均明显升高,所以本实验推测, OJ后期通过LPS和IL-10等其他因素对促炎因子的表达起较主要的作用,从而提高了机体感染和多器官功能损伤的风险,而NF- κ B对促进炎症因子表达的作用相对不明显。另外其他细胞因子、细胞凋亡也有可能影响NF- κ B的表达作用, NF- κ B的具体机制有待进一步的研究,使其对保护机体器官功能产生积极的临床意义。

总之,梗阻性黄疸时NF- κ B的活化上调了细胞因子的表达,导致肝损伤,早期通过PDTC可抑制NF- κ B活化而减轻肝损伤,后期PDTC作用不明显,由此推出阻黄机体免疫功能改变是多种因素调节的结果, LPS和IL-10可能是重要的影响因素,我们应尽早改善机体的免疫功能。

4 参考文献

- Jiang WG, Puntis MC. Immune dysfunction in patients with obstructive jaundice, mediators and implications for treatments. *HPB Surg* 1997; 10: 129-142
- Hiscott J, Kwon H, Génin P. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest* 2001; 107: 143-151
- Nai YJ, Jiang ZW, Wang ZM, Li N, Li JS. Prevention of cancer cachexia by pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) in colon 26 tumor-bearing mice. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2007; 31: 18-25
- Liu HS, Pan CE, Liu QG, Yang W, Liu XM. Effect of NF-kappaB and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2513-2518
- Steinle AU, Weidenbach H, Wagner M, Adler G, Schmid RM. NF-kappaB/Rel activation in cerulein pancreatitis. *Gastroenterology* 1999; 116: 420-430
- Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Krönke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. *Nature* 1993; 365: 182-185
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 1994; 10: 405-455
- Panés J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 1998; 114: 1066-1090
- Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 13-23
- Liu SF, Ye X, Malik AB. Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation* 1999; 100: 1330-1337
- Si X, McManus BM, Zhang J, Yuan J, Cheung C, Esfandiari M, Suarez A, Morgan A, Luo H. Pyrrolidine dithiocarbamate reduces coxsackievirus B3 replication through inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway. *J Virol* 2005; 79: 8014-8023
- Ha T, Li Y, Gao X, McMullen JR, Shioi T, Izumo S, Kelley JL, Zhao A, Haddad GE, Williams DL, Browder IW, Kao RL, Li C. Attenuation of cardiac hypertrophy by inhibiting both mTOR and NFkappaB activation in vivo. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 1570-1580
- 江涛, 朱永康. 梗阻性黄疸围手术期细胞免疫功能障碍发生机制研究进展. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 991-993
- Tabary O, Muselet C, Escotte S, Antonicelli F, Hubert D, Dusser D, Jacquot J. Interleukin-10 inhibits elevated chemokine interleukin-8 and regulated on activation normal T cell expressed and secreted production in cystic fibrosis bronchial epithelial cells by targeting the I(k)B kinase alpha/beta complex. *Am J Pathol* 2003; 162: 293-302

编辑 李军亮 电编 何基才

吡咯列酮对重症急性胰腺炎大鼠肺组织中ICAM-1表达的影响

谢俊锋, 刘志坚, 白爱平, 姜景平, 范海青, 陈江, 谢勇, 徐萍

谢俊锋, 刘志坚, 白爱平, 姜景平, 范海青, 陈江, 谢勇, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006
徐萍, 上海交通大学附属第一人民医院松江分院消化科 上海市 201600

作者贡献分布: 此课题由谢俊锋, 徐萍, 刘志坚, 白爱平及谢勇设计; 研究过程由谢俊锋, 范海青, 白爱平, 姜景平及陈江操作完成; 数据分析由谢俊锋, 徐萍, 白爱平及陈江完成; 本论文写作由谢俊锋与徐萍完成。

通讯作者: 徐萍, 201600, 上海市松江区中山中路746号, 上海交通大学附属第一人民医院松江分院消化科。

yfyxp@yahoo.com.cn

电话: 021-67720432 传真: 021-67722251

收稿日期: 2008-12-25 修回日期: 2009-02-12

接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-08

Effect of pioglitazone on expression of intercellular adhesion molecule-1 in pulmonary tissues of rats with severe acute pancreatitis

Jun-Feng Xie, Zhi-Jian Liu, Ai-Ping Bai, Jin-Ping Jiang, Hai-Qing Fan, Jiang Chen, Yong Xie, Ping Xu

Jun-Feng Xie, Zhi-Jian Liu, Ai-Ping Bai, Jin-Ping Jiang, Hai-Qing Fan, Jiang Chen, Yong Xie, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Ping Xu, Department of Gastroenterology, Songjiang Branch of the Affiliated First People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 201600, China

Correspondence to: Ping Xu, Department of Gastroenterology, Songjiang Branch of the First Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiao Tong University, 746 Zhongshan Middle Road, Songjiang District, Shanghai 201600, China. yfyxp@yahoo.com.cn

Received: 2008-12-25 Revised: 2009-02-12

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To investigate the expression changes of pulmonary intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) after pioglitazone treatment in rats with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: A total of 54 Sprague Dawley rats were randomly and divided into 3 groups, named group A, C and T ($n = 18$). Group A and C served as SAP model group and sham operation group, respectively. Rats in group T were treated with pioglitazone, an agonist of

peroxisome proliferator activated receptor. The modified Li Qing-hua's method was used to reproduce SAP models. Histopathological changes of pulmonary tissues were examined by microscopy. The activity of myeloperoxidase (MPO) in pulmonary tissues was measured. The expression of pulmonary ICAM-1 was determined by immunohistochemical staining (ABC).

RESULTS: The histological examination revealed intensive inflammatory response in pulmonary tissues after SAP model was induced, but inflammatory response was significantly alleviated in group T. The activity of MPO (6 h: 5.12 ± 0.71 vs 6.03 ± 0.63 , $P < 0.05$; 12 h: 5.20 ± 0.66 vs 8.05 ± 0.62 , $P < 0.01$) in the lung tissues were significantly decreased. After modeling, the expression of ICAM-1 was persistently increased from the 3rd hour on. In group A, the expression of ICAM-1 was 0.82 ± 0.23 , 1.03 ± 0.31 and 1.40 ± 0.58 at the 3rd, 6th, and 12th hour, respectively, and there was significant difference between those at the 12th and 3rd hour ($P < 0.05$). In group T, ICAM-1 expression was 0.62 ± 0.18 , 0.75 ± 0.27 and 0.78 ± 0.31 at the 3rd, 6th, and 12th hour, respectively, and there was marked difference at the 12th hour between group A and group T ($P < 0.05$). ICAM-1 expression was weakly positive in group C, and faded away as time went by.

CONCLUSION: The severity of pancreatitis and degree of lung injury could be predicted by detection of ICAM-1 expression and pioglitazone inhibits the expression of ICAM-1 in SAP.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Lung injury; Pioglitazone; Intercellular adhesion molecule-1

Xie JF, Liu ZJ, Bai AP, Jiang JP, Fan HQ, Chen J, Xie Y, Xu P. Effect of pioglitazone on expression of intercellular adhesion molecule-1 in pulmonary tissues of rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 667-671

摘要

目的: 探讨PPAR γ 激动剂吡咯列酮对重症急性胰

■背景资料

SAP患者常并发全身多器官功能衰竭,成为SAP的主要死亡原因,其中,尤以APALI最为突出。SAP时大量中性粒细胞(PMN)聚集于肺组织是APALI早期的基本病理改变,也是导致APALI的重要因素。ICAM-1促使白细胞的游走、聚集。PPAR γ 途径在动物模型及体外实验中均具有抑制单核/巨噬细胞系统活化,减少炎症细胞积聚和炎症因子的释放,从而发挥抗炎作用。

■同行评议者

李国威, 教授, 西安交通大学医学院第二医院普通外科

■研发前沿

PPAR γ 与多种细胞因子、黏附分子基因的转录和表达关系密切,并借此影响急性、慢性炎症的发生、发展。

腺炎大鼠肺组织ICAM-1表达的影响及其意义。

方法: 将54只健康雄性SD大鼠随机分为假手术组(A组)、SAP组(B组)、吡格列酮治疗组(C组), $n = 18$, 制作SAP模型, 通过免疫组织化学方法动态观察3组大鼠肺组织中ICAM-1的表达, 同时观察肺组织病理及髓过氧化物酶(MPO)的改变。

结果: A组大鼠肺组织出现明显的充血水肿和中性粒细胞增多, 而T组肺部炎症反应明显减轻。T组肺组织MPO明显低于A组(6 h: 5.12 ± 0.71 vs 6.03 ± 0.63 , $P < 0.05$; 12 h: 5.20 ± 0.66 vs 8.05 ± 0.62 , $P < 0.01$)。从造模3 h起, A组大鼠肺部ICAM-1即持续上调, 呈时间依赖性, 3, 6, 12 h表达分别为 0.82 ± 0.23 , 1.03 ± 0.31 , 1.40 ± 0.58 , 12 h与3 h比较差异有统计学意义($P < 0.05$); T组ICAM-1在3, 6, 12 h表达分别为 0.62 ± 0.18 , 0.75 ± 0.27 , 0.78 ± 0.31 , 12 h明显低于A组($P < 0.05$); C组呈弱阳性表达, 并随时间推移而消失。

结论: SAP合并肺损伤时, 肺组织中ICAM-1过度表达, 中性粒细胞大量浸润, 吡格列酮对其的表达有抑制作用。

关键词: 重症急性胰腺炎; 肺损伤; 吡格列酮; 细胞间黏附分子-1

谢俊锋, 刘志坚, 白爱平, 姜景平, 范海青, 陈江, 谢勇, 徐萍. 吡格列酮对重症急性胰腺炎大鼠肺组织中ICAM-1表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 667-671

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/667.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎相关性肺损伤(acute pancreatitis-associated lung injury, APALI)是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)早期最常见、最严重的并发症, 临床症状从较轻的低氧血症到成人呼吸窘迫综合征(adult respiratory distress syndrome, ARDS)均可出现。1 wk内死亡的AP患者大约60%伴有肺损伤或ARDS。目前治疗尚无良策。我们的前期实验证实, 吡格列酮对重症急性胰腺炎具有防治作用, 本实验旨在探讨AP早期肺损伤的发生机制, 并观察吡格列酮对其的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 健康 δ SD大鼠(由南昌大学医学院动物科提供)54只, 体质量160-200 g, 盐酸吡格列

酮(成都宇洋高科技发展公司), 牛磺胆酸钠购自Sigma公司, 细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)由北京中杉金桥生物技术有限公司提供, MPO试剂盒购自南京建成生物研究所。

1.2 方法

1.2.1 SAP模型建立和分组: 应用编号法随机分成SAP组(A组)、假手术组(C组)和吡格列酮治疗组(T组), 每组18只。采用李清华的方法制作SAP模型^[1]: 实验前大鼠禁食12 h、自由饮水, 术前2 h腹腔注射无菌处理的10% DMSO溶液(1 mL/100 g), A组采用盐酸氯胺酮腹腔注射麻醉开腹, 逆行胰胆管内加压注射5%牛磺胆酸钠溶液(1 mL/kg)。C组手术方式同A组, 但开腹后不注射5%牛磺胆酸钠溶液, 仅翻动胰腺并以钝器轻划胰腺3次。T组制模方法同A组, 但以DMSO-吡格列酮(50 mg/kg)代替10% DMSO于术后立即腹腔内注射。

1.2.2 取材与检测: 各组大鼠于术后3、6、12 h分批麻醉后腹主动脉放血法处死, 分别取各时段肺组织标本。取左下肺组织以中性甲醛固定, 部分肺组织用-80℃液氮冻存。肺组织经固定、包埋、常规HE染色制片, 依据雷文章 *et al*^[2]标准进行评分。肺组织ICAM-1表达检测如下: 切片常规脱蜡至水, 微波修复抗原, 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶, PBS冲洗, 加兔抗ICAM-1(1: 50), 湿盒内4℃冰箱过夜, 加非生物素化的二抗, 37℃孵育20 min, PBS冲洗, DAB显色, 苏木素复染、中性树胶封片。PBS代替一抗为阴性对照。胞膜或胞质呈棕黄色为阳性。阳性积分计算方法^[3]: 随机观察3个高倍视野, 分别计算阳性细胞数 N_1 、总细胞数 N ; 同时进行阳性细胞着色强度(F)判断: 浅黄色为1分, 黄色为2分, 棕黄色为3分, 最终的阳性积分 = $N_1/N \times F$ 。MPO参照说明书进行。

统计学处理 数据采用mean \pm SD表示, 采用SPSS13.0软件包进行统计学分析, 各组间比较采用单因素方差分析, 不同指标间的相关性用两个变量相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学 假手术组大鼠肺组织中肺间质有轻度水肿, 可能与应激有关, 随时间延长, 肺损伤逐渐减轻。A组大鼠肺组织损伤严重, 术后3 h肺组织损伤主要表现为肺泡间隔水肿、增宽, 少量炎症细胞浸润, 随时间延长, 肺组织损害更加明显, 可出现肺泡腔内有渗出物及肺

■相关报道

Ito *et al*在缺血-再灌注大鼠模型研究结果表明, 吡格列酮可通过抑制TNF- α 、CINC-1等炎症因子的产生, 减少中性粒细胞在肺内聚集及脂质过氧化作用, 从而达到保护作用。

表 1 三组大鼠肺组织病理学评分及MPO变化 (mean \pm SD, $n = 6$)

分组	肺组织病理学评分			MPO		
	3 h	6 h	12 h	3 h	6 h	12 h
C	0.67 \pm 0.52	0.50 \pm 0.55	0.33 \pm 0.52	3.27 \pm 0.90	3.22 \pm 0.59	3.15 \pm 0.64
A	2.17 \pm 0.75 ^b	2.33 \pm 0.52 ^b	2.50 \pm 0.55 ^b	4.47 \pm 0.60 ^a	6.03 \pm 0.63 ^{bf}	8.05 \pm 0.62 ^{bfn}
T	1.83 \pm 0.75 ^b	1.67 \pm 0.52 ^{bc}	1.50 \pm 0.55 ^{bd}	3.83 \pm 0.75	5.12 \pm 0.71 ^{bdf}	5.20 \pm 0.66 ^{bdf}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs C组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs A组; ^f $P < 0.01$ vs 同组3 h; ⁿ $P < 0.01$ vs 同组6 h.

表 2 三组大鼠肺组织ICAM-1比较 (mean \pm SD, $n = 6$)

分组	ICAM-1		
	3 h	6 h	12 h
C	0.18 \pm 0.11	0.20 \pm 0.11	0.15 \pm 0.12
A	0.82 \pm 0.23 ^b	1.03 \pm 0.31 ^b	1.40 \pm 0.58 ^{be}
T	0.62 \pm 0.18 ^b	0.75 \pm 0.27 ^b	0.78 \pm 0.31 ^{ac}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs C组; ^c $P < 0.05$ vs A组; ^e $P < 0.05$ vs 同组3 h.

泡腔塌陷等病理改变, 综合评分以12 h改变最明显. T组镜下表现与A组大体相似, 亦呈现出不同程度的肺损伤, 但与A组同时段相比病变程度轻, 并随着时间的延长而逐渐减轻. T组病理评分与A组同时段比较, 术后3 h差异无统计学意义($P > 0.05$), 术后6 h差异有统计学意义($P < 0.05$), 术后12 h差异有显著性($P < 0.01$). C组与A、T组同时段相比差异均有显著性($P < 0.01$, 表1).

2.2 MPO的变化 A组肺组织MPO 12 h与3 h、6 h比较差异均有显著性($P < 0.01$); T组肺组织MPO 6、12与3 h比较差异均有显著性($P < 0.01$); 与C组相比, A组术后3 h差异有统计学意义($P < 0.05$), 术后6 h、12 h差异均有显著性($P < 0.01$); 与C组相比, T组术后6、12 h差异均有显著性($P < 0.01$); T组与A组相比, 6 h差异有统计学意义($P < 0.05$), 12 h差异有显著性($P < 0.01$, 表1).

2.3 ICAM-1的表达 阳性染色定位于肺组织血管内皮细胞、细支气管及肺泡上皮细胞的胞膜、胞质(图1). C组仅有少量弱阳性表达位于肺组织血管和细支气管上皮细胞. 随时间延长阳性染色消失; 术后3 h, A组ICAM-1在血管内皮细胞、肺泡上皮细胞和细支气管上皮细胞的胞膜及胞质有较强表达, 此后表达持续增强, 12 h与3 h比较差异有统计学意义($P < 0.05$); T组各时段均见阳性染色, 但较同时段A组弱, 不同时段之间差异无统计学意义($P > 0.05$); A组与C组同时段相比差异均有显著性($P < 0.01$); T组与C组同时段相比, 在3 h、6 h组差异有显著性($P < 0.01$), 12 h差

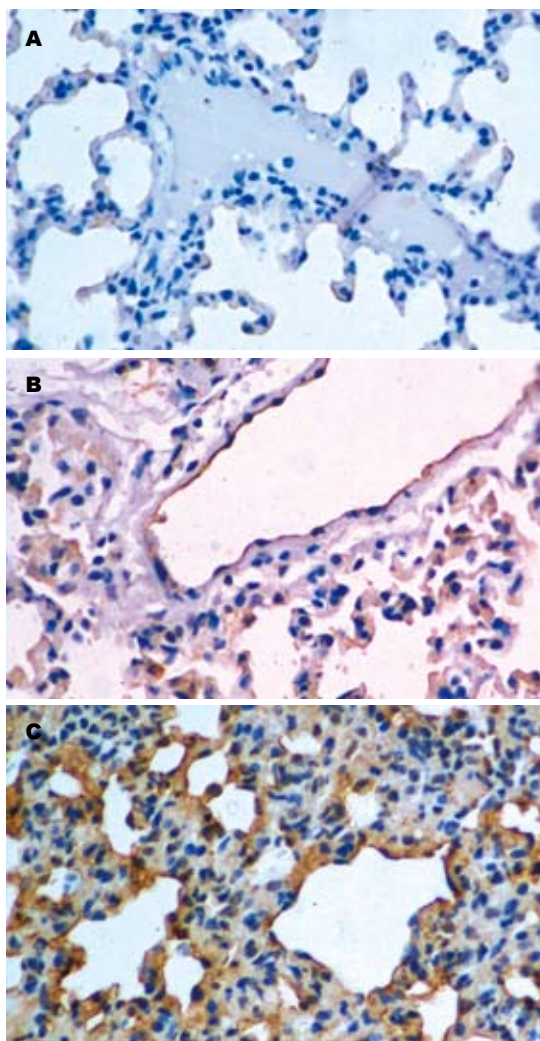


图 1 各组大鼠术后12 h ICAM-1免疫组化染色($\times 200$). A: C组; B: T组; C: A组.

异有统计学意义($P < 0.05$); A组与T组比较, 术后12 h差异有统计学意义($P < 0.05$, 表2).

2.4 ICAM-1及MPO与组织病理学评分的相关性 T组和A组肺组织ICAM-1及MPO与肺组织病理学评分均明显正相关($P < 0.01$).

3 讨论

噻唑烷二酮类化合物是PPAR γ 合成激动剂, 包括

■创新盘点

噻唑烷二酮类化合物具有广泛的抗炎特性. 目前, 国内外对PPAR γ 激动剂与肺损伤的研究主要集中在缺血-再灌注或内毒素引起的肺损伤. PPAR γ 激动剂对急性胰腺炎引起的肺损伤研究甚少. 本实验首次研究了吡咯列酮对APALI的影响.

■名词解释

ICAM-1(细胞间黏附分子-1): 又称CD54, 是一条单链跨膜糖蛋白, 是最早发现的免疫球蛋白超家族黏附分子之一。

吡格列酮、环格列酮、曲格列酮、罗格列酮等, 临床上主要用于2型糖尿病的治疗。近年来的研究显示, 此类药物具有广泛的抗炎特性。但迄今为止尚未发现炎症因子基因的顺式作用元件中具有PPAR γ 结合区域, 由此看来PPAR γ 对炎症因子的转录抑制可能是间接效应。PPAR γ 配体的抗炎机制仍有待进一步研究。

在我们的前期研究中发现^[4], 吡格列酮可以通过PPAR γ 、NF- κ B等两条途径, 调节炎症因子的表达, 如促炎因子IL-6、TNF- α 表达受抑, 而抗炎因子IL-10表达增强。另外, Wan *et al*^[5]在胰腺炎的体外研究中发现, 吡格列酮可通过抑制IKK活性, 减少I κ B α 的磷酸化及降解, 进而减少P65的表达, 同时, 胰腺内PPAR γ 表达上升, 而PPAR γ 拮抗剂GW9662几乎可以完全阻断吡格列酮的这种作用, 从而认为, 吡格列酮是通过PPAR γ 受体依赖途径来减轻胰腺炎的炎症反应。

APALI是重症急性胰腺炎早期严重并发症之一。PPAR γ 激动剂在肺损伤中亦起抗炎作用, 但相关研究主要集中在缺血-再灌注或内毒素引起的肺损伤。Ito *et al*^[6]在缺血-再灌注大鼠模型研究结果表明, 吡格列酮可通过抑制TNF- α 、CINC-1等炎症因子的产生, 减少中性粒细胞在肺内聚集及脂质过氧化作用, 从而达到保护作用。然而PPAR γ 激动剂对急性胰腺炎引起的肺损伤研究甚少。本实验首次研究了用吡格列酮对APALI的影响。

研究表明^[7], 中性粒细胞在APALI的发展过程中起着关键作用。在胰腺炎发展中, 中性粒细胞过度被激活, 通过血液循环到达肺脏后, 再由血管内游入肺组织, 产生一系列炎症介质(如: 活化氧、弹力蛋白酶等), 直接或间接导致肺脏损伤。MPO存在于中性粒细胞的嗜天青颗粒中, 约占细胞干质量的5%, MPO活性的高低可以反映组织中的中性粒细胞聚集程度。本研究结果显示, 造模3 h后, A组肺组织中MPO即显著升高, 而T组能明显抑制MPO活性, 减少中性粒细胞在肺部的聚集, 从而减轻肺损伤的严重程度。

在中性粒细胞发挥炎症效应时, 中性粒细胞与血管内皮细胞之间的黏附是中性粒细胞到达肺组织的重要条件。细胞间黏附是一个复杂的过程, 需要多种细胞表面黏附分子的参与, 而PMN表面的整合素CD11b/CD18 β 2复合体与血管内皮细胞表面的ICAM-1以受体-配体的形式相结合是细胞黏附过程中的关键环节。研究表

明, AP鼠的胰腺、肺脏有大量PMN浸润, 而敲除ICAM-1基因或应用抗ICAM-1抗体后, AP鼠胰腺、肺脏中PMN积聚数目明显减少, 微血管通透性降低, 组织损伤也明显减轻^[8-11]。本实验结果表明, C组肺组织中ICAM-1少量表达于血管内皮细胞膜上; A组肺组织中ICAM-1呈高表达, 并随时间推移而表达增强; 与A组同时时间段相比, T组ICAM-1表达明显下降。此结果表明, 吡格列酮可降低ICAM-1的表达, 进而减轻APALI的严重程度。

APALI发生、发展的许多中间环节尚未完全阐明, 尤其是炎症从胰腺局部到远端脏器的扩散机制, 值得我们进一步研究和探索。我们的研究表明, 在APALI的发病过程中, 中性粒细胞被过度激活, 在肺部聚集。而吡格列酮可以降低血管内皮细胞ICAM-1的表达, 抑制中性粒细胞的游出及肺内聚集, 从而达到减轻肺脏损伤程度。表明PPAR γ 激动剂有可能成为一种治疗SAP肺损伤的有效手段。

4 参考文献

- 1 李清华, 徐萍, 陈令全, 陈江, 刘丕, 吕农华. 重症急性胰腺炎大鼠模型的改良. 实用临床医学 2006; 7: 1-3
- 2 雷文章, 韦靖江, 沈文律, 金立人. 实验性坏死性胰腺炎多器官损害与内毒素血症的关系. 中华实验外科杂志 1995; 12: 131-132
- 3 Sasaki H, Nio M, Iwami D, Funaki N, Sano N, Ohi R, Sasano H. E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin in biliary atresia: correlation with apoptosis and cell cycle. *Pathol Int* 2001; 51: 923-932
- 4 Xu P, Zhou XJ, Chen LQ, Chen J, Xie Y, Lv LH, Hou XH. Pioglitazone attenuates the severity of sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1983-1988
- 5 Wan H, Yuan Y, Qian A, Sun Y, Qiao M. Pioglitazone, a PPAR γ ligand, suppresses NF κ B activation through inhibition of I κ B kinase activation in cerulein-treated AR42J cells. *Biomed Pharmacother* 2008; 62: 466-472
- 6 Ito K, Shimada J, Kato D, Toda S, Takagi T, Naito Y, Yoshikawa T, Kitamura N. Protective effects of preischemic treatment with pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand, on lung ischemia-reperfusion injury in rats. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 530-536
- 7 de Campos T, Deree J, Martins JO, Loomis WH, Shenvi E, Putnam JG, Coimbra R. Pentoxifylline attenuates pulmonary inflammation and neutrophil activation in experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 2008; 37: 42-49
- 8 Frossard JL, Saluja A, Bhagat L, Lee HS, Bhatia M, Hofbauer B, Steer ML. The role of intercellular adhesion molecule 1 and neutrophils in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Gastroenterology* 1999; 116: 694-701
- 9 Lundberg AH, Fukatsu K, Gaber L, Callicutt S, Kotb M, Wilcox H, Kudsk K, Gaber AO. Blocking pulmonary ICAM-1 expression ameliorates lung

- injury in established diet-induced pancreatitis. *Ann Surg* 2001; 233: 213-220
- 10 Zaninovic V, Gukovskaya AS, Gukovsky I, Mouria M, Pandol SJ. Cerulein upregulates ICAM-1 in pancreatic acinar cells, which mediates neutrophil adhesion to these cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G666-G676
- 11 Zhao X, Dib M, Wang X, Widegren B, Andersson R. Influence of mast cells on the expression of adhesion molecules on circulating and migrating leukocytes in acute pancreatitis-associated lung injury. *Lung* 2005; 183: 253-264

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

■同行评价

本课题具有新颖性, 对防止急性胰腺炎的肺损伤及导致的多脏器衰竭具有重要的理论参考价值, 是一篇优秀的论文。

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2007 年内科学类期刊总被引频次和影响因子排序

代码	期刊名称	总被引频次			影响因子		
		数值	学科排名	离均差率	数值	学科排名	离均差率
1170	JOURNAL OF GERIATRIC CARDIOLOGY	19	44	-0.98	0.059	44	-0.89
G275	WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	4431	1	3.46	0.745	10	0.38
G803	肝脏	467	28	-0.53	0.537	17	-0.01
G938	国际呼吸杂志	521	25	-0.48	0.386	32	-0.29
G415	国际内分泌代谢杂志	654	20	-0.34	0.520	19	-0.04
G939	国际脑血管病杂志	662	19	-0.33	0.480	22	-0.11
G501	临床肝胆病杂志	497	26	-0.50	0.318	36	-0.41
G291	临床骨科杂志	689	18	-0.31	0.455	25	-0.16
G658	临床荟萃	1169	13	0.18	0.233	40	-0.57
G257	临床内科杂志	651	21	-0.35	0.367	34	-0.32
G855	临床消化病杂志	292	36	-0.71	0.394	30	-0.27
G261	临床心血管病杂志	866	17	-0.13	0.474	24	-0.12
G293	临床血液学杂志	341	34	-0.66	0.347	35	-0.36
G491	岭南心血管病杂志	157	41	-0.84	0.110	43	-0.79
G662	内科急危重症杂志	276	37	-0.72	0.318	36	-0.41
G746	实用肝脏病杂志	297	35	-0.70	1.100	3	1.04
G190	世界华人消化杂志	2353	5	1.37	0.568	15	0.05
G800	胃肠病学	376	33	-0.62	0.372	33	-0.31
G326	胃肠病学和肝病学杂志	468	27	-0.53	0.399	29	-0.26
G451	现代消化及介入诊疗	84	43	-0.92	0.230	41	-0.58
G083	心肺血管病杂志	214	40	-0.78	0.206	42	-0.62
G419	心血管病学进展	467	28	-0.53	0.419	27	-0.23
G260	心脏杂志	523	24	-0.47	0.392	31	-0.28
G610	胰腺病学	223	38	-0.78	0.282	38	-0.48
G234	中国动脉硬化杂志	869	16	-0.13	0.521	18	-0.04
G422	中国脑血管病杂志	223	38	-0.78	0.503	21	-0.07
G267	中国实用内科杂志	2121	7	1.13	0.601	13	0.11
G211	中国糖尿病杂志	1284	11	0.29	0.931	7	0.72
G203	中国心脏起搏与心电生理杂志	616	23	-0.38	0.599	14	0.11
G633	中国血液净化	449	31	-0.55	0.478	23	-0.12
G119	中国循环杂志	643	22	-0.35	0.411	28	-0.24
G231	中华肝脏病杂志	2746	4	1.76	1.056	4	0.95
G235	中华高血压杂志	982	15	-0.01	0.757	9	0.40
G639	中华老年多器官疾病杂志	143	42	-0.86	0.235	39	-0.57
G876	中华老年心脑血管病杂志	465	30	-0.53	0.431	26	-0.20
G150	中华老年医学杂志	1010	14	0.02	0.510	20	-0.06
G155	中华内分泌代谢杂志	1548	9	0.56	1.032	5	0.91
G156	中华内科杂志	3238	3	2.26	0.847	8	0.57
G161	中华肾脏病杂志	1477	10	0.49	1.018	6	0.88
G285	中华消化内镜杂志	1271	12	0.28	0.607	12	0.12
G168	中华消化杂志	2249	6	1.26	1.123	2	1.08
G892	中华心衰失常学杂志	384	32	-0.61	0.568	15	0.05
G170	中华心血管病杂志	3705	2	2.73	1.217	1	1.25
G172	中华血液学杂志	1632	8	0.64	0.633	11	0.17
	平均值	994			0.541		

以上数据摘自《中国科技期刊引证报告》(2008年版). 科学技术文献出版社, 160-161.

脂联素与维吾尔族非酒精性脂肪肝病的关系

石光英, 郭新文, 王隽, 冯慧, 许爱云, 何方平

■背景资料

近年, 随着对脂联素的深入研究, 已有研究证实脂联素水平降低是NAFLD发病的独立危险因素, 但血清脂联素水平与维吾尔族脂肪肝关系的研究尚未见报道。因此, 本研究通过对维吾尔族NAFLD患者的脂联素水平分析, 探讨维吾尔族NAFLD患者血清脂联素变化特点, 以及脂联素与HOMA-IR、血脂、血压、血糖等的关系。

石光英, 何方平, 新疆医科大学第一附属临床医学院肝病中心 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054
郭新文, 王隽, 冯慧, 许爱云, 新疆阿克苏地区第一人民医院消化科 新疆维吾尔自治区阿克苏市 843000
石光英, 2008年硕士研究生, 主治医师, 主要研究方向是肝病诊治。

作者贡献分布: 石光英与郭新文对此文所作贡献均等; 此课题由何方平设计; 研究过程由石光英, 郭新文, 王隽, 冯慧及许爱云操作完成; 研究所用试剂及分析工具由何方平提供; 数据分析由石光英与郭新文完成; 本论文写作由石光英完成。

通讯作者: 何方平, 副主任医师, 830054, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学第一附属临床医学院肝病中心。

hefp5577@yahoo.com.cn

电话: 0991-4366305

收稿日期: 2009-01-12 修回日期: 2009-02-01

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-08

Relationship between adiponectin and non-alcoholic fatty liver disease in Uygur national minority

Guang-Ying Shi, Xin-Wen Guo, Jun Wang, Hui Feng, Ai-Yun Xu, Fang-Ping He

Guang-Ying Shi, Fang-Ping He, Hepatopathy Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical College, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Xin-Wen Guo, Jun Wang, Hui Feng, Ai-Yun Xu, Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Aksu, Aksu 843000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Correspondence to: Fang-Ping He, Hepatopathy Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical College, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. hefp5577@yahoo.com.cn

Received: 2009-01-12 Revised: 2009-02-01

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To investigate the relation of adiponectin with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in Uygur national minority.

METHODS: Two hundred and sixty patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) served as fatty liver disease group, while 129 healthy people served as normal control group who were all Uygur nationality. Blood pressure, height, physique were measured and 2-hour intravenous blood of empty stomach and OGTT were collected to measure blood fat, insulin, blood glucose and adiponectin level. BMI and

HOMA-IR were assessed. Relationship of lipoprotein with NAFLD and with index described above were analyzed and investigated.

RESULTS: After correcting such confounding factors as sex, age, BMI, SBP, DBP, TC, HDL, LDL, TG, FBG, PBG, FINS, PINS, serum adiponectin level was significantly reduced in fatty liver group compared with normal group. And the incidence rate, BMI, SBP, DBP, TC, HDL, LDL, TG, FBG, PBG, FINS, HOMA-IR level decreased as serum lipoprotein increased ($P < 0.05$). Logistic return analysis showed that after consideration of confounding factors such as sex, age, BMI, SBP, DBP, HOMA-IR, TC, HDL, LDL, TG, FBG, PBG, FINS, PINS, the OR values for second, third and four layer were 0.460 ($P = 0.031$), 0.449 ($P = 0.022$), 0.099 ($P = 0.000$) respectively compared with the first layer

CONCLUSION: NAFLD adiponectin level is lower in Uygur nationality, and is also an independent risk factor.

Key Words: Uygur; Non-alcoholic fatty liver disease; Adiponectin

Shi GY, Guo XW, Wang J, Feng H, Xu AY, He FP. Relationship between adiponectin and non-alcoholic fatty liver disease in Uygur national minority. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 672-676

摘要

目的: 探讨脂联素与维吾尔族非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的关系。

方法: 选择非酒精性脂肪肝患者260人(脂肪肝组)和健康对照129人(正常对照组), 均为维吾尔族, 检测血压、身高、体质量, 抽取空腹及OGTT的2 h静脉血, 检测血脂、胰岛素、血糖及脂联素水平, 计算BMI、HOMA-IR, 分析脂联素与NAFLD及上述指标的关系。

结果: 在校正性别、年龄、BMI、SBP、DBP、TC、HDL、LDL、TG、FBG、PBG、FINS、PINS的影响因素后, 与正常组相比, 脂

■同行评议者

范小玲, 教授, 北京地坛医院综合科; 陈国凤, 主任医师, 中国人民解放军第302医院感染科

脂肪肝组血清脂联素水平降低, 差异具有统计学意义; 而脂肪肝组患病率、BMI、SBP、DBP、TC、HDL、LDL、TG、FBG、PBG、FINS、HOMA-IR水平随着血清脂联素的增高呈现下降趋势($P < 0.05$); Logistic回归分析结果提示在校正了性别、年龄、BMI、SBP、DBP、HOMA-IR、TC、HDL、LDL、TG、FBG、PBG、FINS、PINS的影响的情况下, 以血清脂联素四分位最低层为对照, 第二、三、四分位层时患脂肪肝的OR值分别为0.460($P = 0.031$)、0.449($P = 0.022$)、0.099($P = 0.000$).

结论: 维吾尔族NAFLD脂联素水平降低, 亦是其独立危险因素.

关键词: 维吾尔族; 非酒精性脂肪肝; 脂联素

石光英, 郭新文, 王隽, 冯慧, 许爱云, 何方平. 脂联素与维吾尔族非酒精性脂肪肝病的关系. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 672-676

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/672.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率呈逐年上升的趋势, 被认为是肝脏相关性疾病及其相关性死亡的一个主要原因, 其发病机制尚不清楚. 目前认为脂代谢异常(尤其是甘油三脂)与胰岛素抵抗所引发的高游离脂肪酸、高胰岛素血症是NAFLD发病机制的中心环节^[1]. 近年, 随着对脂联素(adiponectin, 又名Acrp30, AdipoQ, apM1, GBP28)的深入研究, 已有研究证实脂联素水平降低是NAFLD发病的独立危险因素^[2], 但血清脂联素水平与维吾尔族脂肪肝关系的研究尚未见报道. 因此, 本研究通过对维吾尔族NAFLD患者的脂联素水平分析, 探讨维吾尔族NAFLD患者血清脂联素变化特点, 以及脂联素与HOMA-IR、血脂、血压、血糖等的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 选择2006-01/2008-01在我科住院的NAFLD患者260例(脂肪肝组)和我院体检中心健康对照129例(正常对照组), 其中男220例, 女169例, 年龄30-60(平均 46.77 ± 8.32)岁, 均为维吾尔族, 所有患者均为初诊, 未接受任何治疗措施, 包括饮食、运动及药物治疗. 排除标准为: 病毒性肝炎(主要是乙型和丙型肝炎); 自身免疫性肝炎; 各种肝硬化; 胆道梗阻; 长期饮酒, 每日摄入酒精量, 女性 ≥ 40 g, 男性 ≥ 80 g, 连续5年以上; 严重

感染和糖尿病并发症; 一些遗传性疾病, 包括肝豆状核变性, α -1抗胰蛋白酶缺乏, 血色病等; 服用导致脂肪肝形成的药物等; 无内、外科急性疾患; 使用避孕药的女性. NAFLD的诊断按2006-03中华医学会标准^[3]执行: B超显示: (1)肝肾回声差异, 肝回声 $>$ 肾回声; (2)肝前后回声差异, 近场回声密度增强而远场衰减; (3)肝内静脉结构模糊不清; 边缘角圆钝; (4)肝脏轻至中度肿大; (5)彩色多普勒血流显像提示肝内彩色血流信号减少或不易显示, 但肝内血管走向正常.

1.2 方法

1.2.1 标本和相关数据收集: 受试者过夜空腹, 于上午9:00-10:00抽取前臂静脉血约8 mL, 其中4 mL用于检测肝肾功能、肝炎病毒标志物、血糖、血脂等, 另3 mL立即加入抑肽酶, 离心分离血清, 于 -20°C 保存待测空腹胰岛素(fasting serum insulin, FINS)和脂联素. 然后行75 g *po*葡萄糖耐量(oral glucose tolerance test, OGTT)试验, 抽取服糖后2 h的前臂静脉血约4 mL, 其中1 mL用于测定糖负荷后2 h血糖(postprandial blood glucose, PBG), 3 mL离心分离血清, -20°C 保存待测糖负荷后2 h胰岛素(postprandial insulin, PINS). 所有样本收集后统一测定胰岛素和脂联素. 体检: 由同一护士测量受试者的血压、身高、体质量、腰围及臀围, 并计算体质量指数(body mass index, BMI) = 体质量/身高²(kg/m^2). 肝脏B超采用美国GE400彩色超声诊断仪(探头频率315 MHz)进行, 由同一经验丰富的技术人员负责测量.

1.2.2 实验室检测: 血脂、血糖、肝功能的测定采用日本罗氏P800型自动生化仪检测. 胰岛素、脂联素和肝炎病毒标志物均用放射免疫法测定, 试剂盒分别购于上海放射免疫分析技术研究和美国Linco公司. 胰岛素批内CV $< 4.2\%$, 批间CV $< 7.6\%$; 脂联素批内CV $< 6.21\%$, 批间CV $< 9.25\%$. 胰岛素抵抗指数(insulin resistance index, HOMA-IR) = 空腹血糖 \times 空腹胰岛素/22.5.

统计学处理 采用SPSS13.0统计软件包进行数据处理. 计量资料采用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 率的比较采用卡方检验, 均数间比较采用 t 检验、单因素方差分析、协方差分析, NAFLD危险因素分析采用Logistic回归模型, 均采用双侧检验, 检验标准 $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 脂肪肝组和对照组间脂联素水平 从表1可以

■ 研究前沿

非酒精性脂肪肝病(NAFLD)的发病率呈逐年上升的趋势, 被认为是肝脏相关性疾病及其相关性死亡的一个主要原因, 其发病机制尚不清楚.

■相关报道

研究表明70%的糖尿病患者肝功能异常是由于并发NAFLD所致,肝活检显示75%以上的肥胖者患有NAFLD.

表 1 脂肪肝组、对照组间血清脂联素、血脂、血压、BMI水平

	对照组 (n = 129)	脂肪肝组 (n = 260)	t/χ^2	P
年龄(岁)	45.61 ± 9.03	47.76 ± 8.46	2.301	0.022
BMI(kg/m ²)	26.96 ± 3.69	27.54 ± 3.55	1.489	0.137
SBP(mmHg)	127.43 ± 19.71	129.29 ± 21.19	0.883	0.405
DBP(mmHg)	78.71 ± 11.08	80.10 ± 12.11	1.099	0.272
TC(mmol/L)	4.09 ± 1.00	4.62 ± 1.02	4.835	0.000
HDL(mmol/L)	1.03 ± 0.30	1.08 ± 0.28	1.494	0.136
LDL(mmol/L)	2.25 ± 0.80	2.61 ± 0.80	4.128	0.000
TG(mmol/L)	1.43 ± 0.70	1.79 ± 0.91	3.887	0.000
FBG(mmol/L)	5.11 ± 0.93	5.61 ± 1.49	3.466	0.001
2HPG(mmol/L)	7.07 ± 1.87	7.65 ± 2.91	2.363	0.019
FINS(mIU/L)	9.82 ± 5.06	9.93 ± 4.65	0.189	0.850
2h PINS(mIU/L)	19.06 ± 12.34	17.79 ± 11.16	1.019	0.309
HOMA-IR	2.26 ± 1.32	2.56 ± 1.73	1.724	0.085
脂联素(mg/L)	26.32 ± 5.11	21.88 ± 4.65	8.578	0.000
性别(男/女)	83/46	137/123	4.762	0.029

表 2 校正其他影响因素情况下脂肪肝组、对照组间脂联素差异的协方差分析

	MS	F	P
脂联素(mg/L)	663.040	49.792	0.000
性别(男/女)	0.017	0.016	0.899
年龄(岁)	51.360	3.857	0.050
BMI(kg/m ²)	2.667	0.200	0.665
SBP(mmHg)	110.936	8.331	0.004
DBP(mmHg)	40.129	3.014	0.083
TC(mmol/L)	727.970	54.670	0.000
HDL(mmol/L)	17.258	1.296	0.256
LDL(mmol/L)	5.344	0.401	0.527
TG(mmol/L)	47.108	3.538	0.061
FBG(mmol/L)	0.385	0.029	0.865
2HPG(mmol/L)	457.210	34.335	0.000
FINS(mIU/L)	65.239	4.899	0.027
3HPINS(mIU/L)	1.320	99.000	0.753

看到,脂肪肝组的脂联素水平低于正常对照组,且差异具有统计学意义.

2.2 脂肪肝组和对照组间脂联素水平协方差分析 为进一步了解脂肪肝组、对照组间血清脂联素水平的差异是否独立于其他因素,采用协方差分析,校正性别、年龄、BMI、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、总胆固醇(TC)、高密度胆固醇脂蛋白(HDL)、低密度胆固醇脂蛋白(LDL)、甘油三脂(TG)、空腹血糖(FBG)、PBG、FINS、PINS后,两组间脂联素水平的差异仍有统计学意义(表2).

2.3 不同脂联素水平时脂肪肝患病率及BMI、HOMA-IR、血压、血糖、血脂水平比较 不同血清脂联素水平分层,分析脂肪肝患病率的情况.按血清脂联素的四分位数(19、23、27 mg/L)将研究对象分成4组后,发现随着脂联素水平的增高,脂肪肝患病率呈现下降趋势,差异具有统计学意义;而BMI、SBP、DBP、TC、HDL、LDL、TG、FBG、PBG、FINS、HOMA-IR的水平随着血清脂联素的增高也呈现下降趋势,且差异具有统计学意义,脂联素与上述指标呈负相关(表3).

2.4 血清脂联素水平与脂肪肝的Logistic回归分析结果 为进一步了解血清脂联素水平和脂肪肝的关系是否独立于其他因素,采用Logistic回归模型,校正性别、年龄、BMI、SBP、DBP、HOMA-IR、TC、HDL、LDL、TG、FBG、PBG、FINS、PINS,以血清脂联素四分位最低

层为对照,在血清脂联素第二、三、四分位层时患脂肪肝的OR值分别为0.460($P = 0.031$)、0.449($P = 0.022$)、0.099($P = 0.000$).随着血清脂联素水平的升高,患脂肪肝的OR值呈降低的趋势(表4).

3 讨论

目前普遍认为肥胖、胰岛素抵抗、糖尿病、高血脂、高血压等疾病在NAFLD发生中起重要作用.研究表明70%的糖尿病患者肝功能异常是由于并发NAFLD所致,肝活检显示75%以上的肥胖者患有NAFLD.成年人NAFLD的发病率约17%-33%,而至少有20%的NAFLD可能进展为肝纤维化及肝硬化.因此,在肥胖、糖尿病、高血压、高血脂等疾病高发的今天,脂肪肝给人类的健康带来了巨大威胁.而维吾尔族人群由于饮食结构等原因(在饮食方面主要以面食、肉类和奶制品为主)超重和肥胖现象极其明显.本研究为进一步研究维吾尔族NAFLD的相关研究奠定了基础.

脂联素是近几年新发现的脂肪细胞因子,主要在白色脂肪组织中表达和分泌,血清生理浓度为5-30 mg/L,是血浆浓度最高的脂肪细胞因子,约占血浆蛋白总量的0.01%.大量临床资料和动物实验表明,与目前已知的其他脂肪细胞因子所不同的是,肥胖、糖尿病、高血压患者的血清脂联素水平较正常人明显下降,血清脂联素水平与空腹胰岛素及血糖水平呈负相关,也就是说在脂肪容量增大时,脂联素分泌反而减少.研究表明:脂联素可增加胰岛素敏感性,

表 3 不同脂联素水平时脂肪肝患病率及BMI、血压、血脂水平比较(mg/L)

	脂联素1 ≤19	脂联素2 19<脂联素≤23	脂联素3 23<脂联素≤27	脂联素4 >27	F/χ^2	P
n	101	98	123	67		
年龄(年)	48.35 ± 7.77	47.88 ± 7.98	46.09 ± 9.67	45.63 ± 8.95	2.158	0.093
BMI(kg/m ²)	28.10 ± 3.81	27.69 ± 3.85	27.37 ± 3.14	25.69 ± 3.24	6.735	0.000
SBP(mmHg)	135.96 ± 22.57	132.06 ± 22.08	125.23 ± 17.69	119.07 ± 15.46	11.909	0.000
DBP(mmHg)	84.66 ± 12.63	80.91 ± 12.49	77.46 ± 10.05	74.21 ± 8.87	13.913	0.000
TC(mmol/L)	4.98 ± 1.36	4.75 ± 0.83	4.31 ± 0.47	3.42 ± 0.74	44.739	0.000
HDL(mmol/L)	1.10 ± 0.31	1.09 ± 0.30	1.05 ± 0.25	0.97 ± 0.29	3.419	0.017
LDL(mmol/L)	2.73 ± 0.93	2.66 ± 0.75	2.49 ± 0.68	1.87 ± 0.60	19.939	0.000
TG(mmol/L)	2.10 ± 1.05	1.72 ± 0.82	1.48 ± 0.65	1.32 ± 0.68	15.790	0.000
FBG(mmol/L)	6.151 ± 1.97	5.26 ± 0.81	5.32 ± 1.06	4.84 ± 0.69	16.420	0.000
PBG(mmol/L)	8.98 ± 3.69	7.43 ± 1.95	6.82 ± 1.95	6.37 ± 1.32	20.271	0.000
FINS(mIU/L)	11.35 ± 5.98	9.86 ± 3.83	9.52 ± 4.36	8.43 ± 4.26	5.673	0.001
2h PINS(mIU/L)	20.27 ± 11.63	18.78 ± 12.23	16.69 ± 10.90	17.06 ± 11.36	2.100	0.100
HOMA-IR	3.20 ± 2.31	2.35 ± 1.12	2.30 ± 1.29	1.86 ± 0.97	12.300	0.000
性别(男/女)	59/42	67/31	50/73	44/23	20.634	0.000
脂肪肝(否/是)	15/86	29/69	39/84	46/21	54.042	0.000

■同行评价
本文通过不同分析方法分析了脂联素与维吾尔族人群非酒精性脂肪肝的相关性,分析较为透彻,深入,全面,可以较明确的说明二者的关系,但新颖性一般.

表 4 血清脂联素水平与脂肪肝的Logistic回归分析结果

	B	Standard Error	Odds Ratons	95%CI	P
脂联素≤19 mg/L			1.000		0.000
19<脂联素≤23 mg/L	-0.777	0.361	0.460	0.227-0.993	0.031
23<脂联素≤27 mg/L	-0.801	0.349	0.449	0.226-0.890	0.022
脂联素>27 mg/L	-2.315	0.395	0.099	0.046-0.214	0.000
进入方程的其他变量					
TG	0.341	0.160	1.407	1.027-1.926	0.033
HOMA-IR	0.581	0.273	1.492	1.030-1.931	0.021

降低血脂,保护肝脏^[4-9],脂联素水平降低与胰岛素抵抗、血脂异常、肝脏对活性氧和细胞因子损害的敏感性增加以及肝内炎症、坏死的发生等密切相关^[4].我们的研究发现,在校正性别、年龄、BMI、SBP、DBP、TC、HDL、LDL、TG、FBG、PBG、FINS、PINS的影响因素后,与正常组相比,脂肪肝组血清脂联素水平降低,差异具有统计学意义;而脂肪肝患病率、BMI、SBP、DBP、TC、HDL、LDL、TG、FBG、PBG、FINS、HOMA-IR水平随着血清脂联素的增高呈现下降趋势.

脂联素改善胰岛素抵抗和糖代谢的作用,源于他能增加骨骼肌脂肪酸氧化,并抑制肝糖异生.脂联素通过磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶B途径,改善骨骼肌中胰岛素信号的传递,促进信号分子(骨骼肌胰岛素受体、胰岛素受体底物-1)的络氨酸磷酸化,从而增加骨骼肌脂肪酸

氧化,使甘油三脂降低,改善胰岛素抵抗.脂联素还可抑制参与糖异生的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶和葡萄糖-6-磷酸酶的活性,增强胰岛素对肝细胞内糖异生和肝糖输出的抑制作用.国外有研究表明,脂联素能够抑制TNF-α在巨噬细胞中的合成,而TNF-α又可降低GLUT4 mRNA水平和胰岛素受体的数目及对胰岛素的亲和力,从而导致胰岛素抵抗^[10].所以,脂联素是机体脂质代谢和血糖稳态调控网络中的重要调节因子.在瘦素抵抗及脂联素缺乏时,丧失抗脂肪毒性的保护能力,便发生与糖脂毒性相关的NAFLD^[11].有研究证实,NAFLD患者血清脂联素水平低,并与肝脏坏死性炎症程度相关,由此认为低脂联素血症将导致坏死性炎症型NAFL的发生、发展,且发挥了独立于胰岛素抵抗的作用^[12].本研究的Logistic回归分析结果提示在校正了性别、年龄、BMI、SBP、DBP、

HOMA-IR、TC、HDL、LDL、TG、FBG、PBG、FINS、PINS的影响的情况下,脂联素水平降低是维吾尔族NAFLD的独立危险因素。

总之,本研究仅在维吾尔族中探讨了脂联素与NAFLD及其影响因素的关系,研究结果证实维吾尔族中脂联素水平降低是NAFLD形成的独立危险因素,调节脂联素水平对NAFLD的预防和治疗具有一定临床意义。查阅相关文献,我们还发现,排除维吾尔族人群(正常和NAFLD患者)的脂联素水平较本次研究结果低,下一步我们将利用流行病学调查、基因分析等方法进行维吾尔族、汉族人群NAFLD危险因素的进一步研究。

4 参考文献

- 1 Choudhury J, Sanyal AJ. Insulin resistance and the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 575-594, ix
- 2 Matsubara M, Maruoka S, Katayose S. Decreased plasma adiponectin concentrations in women with dyslipidemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 2764-2769
- 3 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南. *中华肝病杂志* 2006; 3: 161-163
- 4 López-Bermejo A, Botas P, Funahashi T, Delgado E, Kihara S, Ricart W, Fernández-Real JM. Adiponectin, hepatocellular dysfunction and insulin sensitivity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60: 256-263
- 5 Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 2005-2010
- 6 Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, Shimizu T, Nagai R, Kadowaki T. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 2003; 423: 762-769
- 7 Younossi ZM, Diehl AM, Ong JP. Nonalcoholic fatty liver disease: an agenda for clinical research. *Hepatology* 2002; 35: 746-752
- 8 Díez JJ, Iglesias P. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol* 2003; 148: 293-300
- 9 Statnick MA, Beavers LS, Conner LJ, Corominola H, Johnson D, Hammond CD, Rafaeloff-Phail R, Seng T, Suter TM, Sluka JP, Ravussin E, Gadski RA, Caro JF. Decreased expression of apM1 in omental and subcutaneous adipose tissue of humans with type 2 diabetes. *Int J Exp Diabetes Res* 2000; 1: 81-88
- 10 Halse R, Pearson SL, McCormack JG, Yeaman SJ, Taylor R. Effects of tumor necrosis factor- α on insulin action in cultured human muscle cells. *Diabetes* 2001; 50: 1102-1109
- 11 曾民德. 葡萄糖毒性、脂肪毒性与非酒精性脂肪性肝病. *中华肝病杂志* 2005; 13: 81-82
- 12 Pagano C, Soardo G, Esposito W, Fallo F, Basan L, Donnini D, Federspil G, Sechi LA, Vettor R. Plasma adiponectin is decreased in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Endocrinol* 2005; 152: 113-118

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末。标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体。(常务副总编辑:张海宁 2009-03-08)

食管癌危险因素及预防研究进展

张小刚, 钟理, 王建飞

张小刚, 钟理, 王建飞, 河北大学生命科学学院生物芯片研究室 河北省保定市 071002

钟理, City of Hope National Medical Center, Duarte, California CA 91010, USA

河北省引进海外留学人员工作启动基金资助项目, No. 2006173

作者贡献分布: 文献检索, 资料分析及论文撰写由张小刚完成; 选题与审校由钟理完成; 部分文献由王建飞检索提供。

通讯作者: 钟理, 071002, 河北省保定市五四东路180号, 河北大学生命科学学院生物芯片研究室. lee_z@yahoo.com

电话: 0312-5079364

收稿日期: 2008-12-31 修回日期: 2009-01-17

接受日期: 2009-01-19 在线出版日期: 2009-03-08

Evaluation of risk factors and prevention strategies of esophageal cancer

Xiao-Gang Zhang, Li Zhong, Jian-Fei Wang

Xiao-Gang Zhang, Li Zhong, Jian-Fei Wang, Biochip Laboratory, Hebei University College of Life Sciences, Baoding 071002, Hebei Province, China

Li Zhong, City of Hope National Medical Center, Duarte, California 91010, USA

Supported by: the Launching Foundation for the Overseas Scholars Introduced into Hebei Province, No. 2006173

Correspondence to: Li Zhong, Biochip Laboratory, Hebei University College of Life Sciences, 180 Wusi Road, Baoding 071002, Hebei Province, China. lee_z@yahoo.com

Received: 2008-12-31 Revised: 2009-01-17

Accepted: 2009-01-19 Published online: 2009-03-08

Abstract

Esophageal cancer is one of the most common fatal cancers worldwide. There are two major types of esophageal cancer, squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. Because of the poor survival rate of esophageal cancer, successful assessment of risk factors and prevention strategies become crucial in prevention and treatment of this cancer. This article reviews the most updated research discoveries and reveals that tobacco, alcohol consumption and bad eating habits are considered as the major risk factors for esophageal cancer. Carcinogens-contaminated food, unbalanced diet, genetic susceptibility and some chronic gastrointestinal disease are also factors contributed to esophageal cancer development. To prevent this disease, there are two major strategies, primary and

secondary preventions.

Key Words: Esophageal cancer; Risk factors; Barrett's esophagus; Primary prevention; Secondary prevention; Molecular markers

Zhang XG, Zhong L, Wang JF. Evaluation of risk factors and prevention strategies of esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 677-680

摘要

食管癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 主要包括鳞癌和腺癌两种类型, 严重威胁着人类健康。由于食管癌较差的预后存活率, 准确的了解其发生的危险因素和采取有效地预防措施成为防治该种癌症的关键。本文综述了近些年在食管癌危险因素和预防领域的研究成果, 发现吸烟饮酒、不良的饮食习惯、食用被致癌物或霉菌污染的食物、膳食失衡、遗传易感背景和某些慢性消化系统疾病等都是危险因素, 预防主要涉及一级和二级预防两个部分。

关键词: 食管癌; 危险因素; Barrett's食管; 一级预防; 二级预防; 分子标志物

张小刚, 钟理, 王建飞. 食管癌危险因素及预防研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(7): 677-680

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/677.asp>

0 引言

世界范围内食管癌的发病率和致死率在常见癌症中分别排第8位和第6位^[1], 其发病学上的地理学差异是所有癌症中最明显的。在食管癌高发区中国此种癌症发病率比非洲西部低发区高出20倍^[2], 我国的太行山南端三省交界地区更成为全球食管癌发病率最高的区域。食管癌的主要类型包括鳞癌和腺癌, 在发展中国家(如中国)以不良饮食习惯和膳食失衡为危险因素的鳞癌占优势; 而在西方等发达国家腺癌的发病率相对较高, 且主要以白人为主, 这与肥胖以及胃食管反流病和Barrett's食管等癌前疾病发病率较高有关^[3]。食管癌的早期症状通常不明显, 临床诊治患者大都处于中晚期, 预后效果很差, 5年生存

■背景资料

食管癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 在世界范围内其发病率和致死率在常见癌症中分别排第8位和第6位。食管癌主要包括鳞癌和腺癌两种类型, 发展中国家食管癌主要以鳞癌为主, 西方等发达国家则为腺癌占优势。

■同行评议者

王健生, 教授, 西安交通大学医学院第一附属医院

■ 研发前沿

食管癌危险因素和预防研究是目前一研究热点。除了对饮食因素、生活习惯等传统认知的食管癌危险因素进行更深入的研究之外,基因层面与食管癌发生的关系以及癌前病变的研究成为较新颖的内容,而筛选出与食管癌发生相关的分子标志物并用以对高危人群进行普筛或结合现有检查方法提高癌前病变和癌症早诊率,更成为研究前沿。但要获得具有满意的特异性和敏感性的标志物还有很多工作要做。

率只有10%左右。但早期食管癌(包括上皮内癌和黏膜内癌)的5年生存率可达90%-100%。故了解食管癌的危险因素并指导人们日常生活中积极预防,提高癌前病变或癌症的早诊率并加以治疗,对降低食管癌的发生率和死亡率有重要意义。

1 食管癌危险因素

食管癌是多因素疾病,其发生往往是环境和遗传因素综合作用的结果。

1.1 吸烟和饮酒 研究显示吸烟是食管癌危险因素。Freedman *et al*^[4]发现吸烟是引发食管腺癌和鳞癌的危险因素,刘伯齐 *et al*^[5]研究也表明烟草的使用与食管癌死亡风险存在显著正相关,每日吸烟支数越多、吸烟年限越长,则吸烟者与非吸烟者食管癌死亡的相对危险度(*RR*: 1.20-2.45)越大。饮酒也是食管癌危险因素,Freedman *et al*^[4]报道饮酒是鳞癌的危险因素,对于还有抽烟嗜好的人危险程度更高。我国的研究显示饮酒在食管癌低发区危险因素大小与饮酒剂量相关^[6]。

1.2 不良饮食习惯和膳食失衡 进食速度快和喜吃热烫食物可能会使食管黏膜受损,易发展为慢性食管炎、食管溃疡和食管上皮异型增生等疾病,治疗不及时可能癌变。一项对中国江苏省食管癌高发区赣榆和低发区大丰的影响因素研究发现,进食速度快是食管癌危险因素,两地的*OR*(让步比:暴露中结果几率除以未暴露中结果几率)分别为赣榆:*OR* = 3.09;大丰:*OR* = 4.01^[6]。张钦凤 *et al*^[7]利用随机模型对研究食管癌危险因素的文献进行Meta分析后发现吃热烫食物为食管癌危险因素(合并后*OR* = 2.41)。高盐饮食也是食管癌危险因素(*OR* = 4.463)^[8]。

膳食失衡,主要表现为新鲜蔬菜和水果摄入不足,造成人体内核黄素、维生素A、C以及铁、硒等元素缺乏,动物实验表明这些物质的缺乏作为辅助因素,可直接或间接影响食管癌变过程中启动和促发两个阶段。已有研究证实食物纤维、新鲜蔬菜和水果的摄入不足,以及高脂肪食物的过量摄入也是食管腺癌的危险因素^[9]。

1.3 食物因素 在食管癌高发区居民喜食的酸菜、虾油蟹酱等腌制或发酵食品中检测到硝酸盐、亚硝酸盐或亚硝胺类物质的存在,亚硝胺类化合物是一种强致癌物质,可以引发不同动物食管等多种器官的癌变^[10-12],而硝酸盐和亚硝酸盐类是亚硝胺化合物的前体物质。汪求真

et al^[13]对国内多项关于食管癌饮食因素的病例对照研究文献中的饮食因素进行Meta分析后发现腌制食品与食管癌的*OR*合并为2.79,在中国人群食管癌发病中的作用较强。另外,食管癌高发区含氮化肥的不合理使用和工业污染,使水体中含有亚硝胺化合物,增大了亚硝胺的可能摄入量,提高了食管癌发病率。

此外,早些年的研究证实食用被霉菌污染的食物也是食管癌危险因素。高发区林州食物中曾检测到几种常见的霉菌,如串珠镰刀菌、杂色曲菌、园弧青菌、萎地青霉、念珠菌、白地霉等,实验证实他们均可促进亚硝胺的形成^[14]。对河北食管癌高发区粮食进行了霉菌分离培养,经鉴定有17种,用污染较多的黄曲霉菌制成饲料喂大鼠、小鼠,先后诱发出食管癌前病变和肺癌;利用分离培养的串珠镰刀菌饲喂大鼠诱发了前胃乳头状瘤和食管乳头状瘤^[15]。

1.4 遗传因素 Wei *et al*^[16]发现,有食管癌家族史的发病率增高(*OR* = 1.57),说明遗传因素在食管癌发生中有重要作用。这些因素主要包括与细胞周期和凋亡相关的基因多态性,与代谢酶相关的基因多态性,以及这些基因的表达异常。

P53与细胞周期及凋亡相关,其第72密码子的CGT/CCT单核苷酸多态性可形成分别携带Arg/Arg, Pro/Pro, Arg/Pro基因型的人群。Lee *et al*^[17]报道携带Pro/Pro基因型者易患食管鳞癌。Bcl-2是另一种与细胞凋亡相关的基因,其表达可抑制细胞凋亡。闫增荣 *et al*^[18]发现*bcl-2*在食管癌中的表达与其他危险因素间有着协同效应,饮酒、吃新鲜蔬菜少、吃肉蛋鱼少与*bcl-2*阳性表达的*OR*值分别为2.583、2.234和4.030,但未发现食管癌家族史与*bcl-2*异常表达之间有联系。研究还发现肿瘤分化程度越高*bcl-2*表达率越高,表明该基因异常表达可作为判定食管癌恶性程度的重要参数。

关于代谢酶基因多态性和食管癌关系的研究发现,携带CYP2E1c1/c1基因型或ALDH2*1*2基因型,以及CYP1A1第七外显子发生突变的个体患食管癌的危险明显增加^[19],但各代谢酶基因型之间未发现明确的交互作用。

1.5 消化系疾病 具有某些慢性消化系疾病的患者罹患食管鳞癌和腺癌的风险会不同程度的升高。不良的饮食习惯可能会使食管黏膜受损,易发展为慢性食管炎、食管溃疡和食管上皮增生异常等疾病,而发展为异型增生特别是重度增生是这些疾病癌变的先兆。Wang *et al*^[20]在一组

878例内镜检查加黏膜活检后经3.5年随访, 病理组织学为基底细胞增生、轻度、中度和重度异型增生者, 食管鳞癌的发生率为5.0%、5.3%、26.7%和65.2%, 中度和重度异型增生只占随访例数的9.5%, 而发生癌症占总发癌数65.9%, 提示中度和重度异型增生是食管鳞癌的癌前病变。一项对191例病理诊断均为鳞癌患者的调查发现, 胃与十二指肠溃疡史($OR = 1.980$)也是食管鳞癌发生的危险因素^[8]。

引发腺癌的高风险慢性疾病主要是胃食管反流症和Barrett's食管。Solaymani-Dodaran *et al*研究证实Barrett's食管患者患食管腺癌的风险比普通人群高约30倍, 单纯的胃食管反流患者患食管腺癌的风险也有轻度增加^[21]。Shaheen *et al*也报道胃食管反流和食管腺癌的发生有关, Barrett's食管可看成是食管腺癌的癌前状态, 并认为腺癌发展具有几个阶段, 先是长期的胃食管反流症状使正常的食管鳞状上皮化生为特殊肠化生型上皮, 形成Barrett's食管, 再发展为柱状上皮异型增生, 最后发展为食管腺癌^[22]。

1.6 其他因素 食管癌发生率和人的社会经济地位呈负相关^[23], 这可能是由于具有较高教育背景和经济地位的人享有较好的生活条件和卫生保健所致。还有研究指出肥胖是食管腺癌的危险因素^[9]。心情郁闷, 心理素质差也可能增加食管癌的发生率, 可能是由于心理原因导致机体免疫机能和抵抗力降低, 从而为其他危险因素发生作用提供机会或发生协同作用, 但心理因素的作用难以量化还有待深入研究^[24]。

2 可采取的预防措施

对食管癌防治有决定意义的包括一级(病因)预防和二级(临床前, “早发现、早诊断、早治疗”)预防。一级预防的目标是防止癌的发生, 了解病因和危险因素, 并采取相应预防措施, 增进身心健康。二级预防则是防治初发疾病的发展, 包括阻断癌前发展和食管癌“三早”措施, 使患者最大程度的恢复健康。

2.1 食管癌的一级预防 不吸烟, 适量饮酒或不饮酒; 吃饭时细嚼慢咽, 不吃热烫和高盐食物; 多吃新鲜粮食、蔬菜和水果, 保证肉蛋类食品的适量摄入。适当生吃大蒜类食物, 其中的丙基硫化物、硒等成分可在癌变过程的启动、促进阶段阻止肿瘤形成^[25]。饮茶也可以预防食管癌发生^[26]。另外, 适当补充维生素C、 β -胡萝卜素、维生素E、核黄素和硒复方营养素可以降低食管癌发

病风险^[27]。

改善食物储存和加工方法, 防止粮食发霉和减少腌制、发酵类食品比例。利用亚硝酸胺易光解, 能被水蒸汽引带, 并在漂白粉作用下分解的理化特性, 可对饮用水源进行晒水和漂白粉消毒, 减少外界环境的亚硝酸胺摄入量。

2.2 食管癌的二级预防 采用内镜下碘染色以及多点活检开展食管癌及癌前病变的检查, 可确诊和定位轻、中和重度异型增生, 原位癌, 黏膜内癌等早期微小病灶。对于重增、原位癌和黏膜内癌等采取操作简单、痛苦小、恢复快、效价比高的内镜下黏膜切除、APC等新的微创治疗手段可使五年生存率达86%-100%。特别是对重度异型增生采取内镜下微创治疗, 可以有效切断目标人群癌变风险的主要来源, 使食管癌的发病率下降2/3^[28]。

对于轻、中度增生患者可以进行药物防治和营养干预等癌前病变阻断治疗。贺宇彤 *et al*^[29]运用Meta-analysis对7个使用抗癌乙片, 复方苍豆丸, 六味地黄丸等中草药预防食管癌发生的研究进行合并分析, OR 值为0.359。

3 结论

食管癌的危险因素已基本研究清楚, 但由于不同地域的人群暴露于各种危险因素的程度不同, 个别因素的确切作用效果还有待研究。下一步可以根据现有的研究成果在人群中开展相关健康教育, 使一级预防渗透到日常生活中。

另外, 患有前文提到的几种疾病的癌前状态人群只有一部分会发展为食管癌, 无法筛选出这一部分人群是现有检测手段不足之处, 由此导致现阶段二级预防中对某些无癌变风险对象的无效预防和治疗, 造成医疗资源的浪费, 也给患者带来严重的精神和物质负担。因此如何能准确识别癌前病变的人群是未来工作应解决的主要问题。一些细胞周期调控基因、DNA修复基因和代谢基因的遗传变异及异常表达可作为分子标志物, 用来指示食管癌癌前病变的发生和发展, 使得解决这个问题成为可能, 并已经取得一定的进展。白经修 *et al*^[30]研究发现对 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)阳性伴重增的患者进行干预可明显提高食管癌防治的效价比。目前还发现一些可用于早期食管癌诊断的血清标志物如癌胚抗原(CEA)、鳞状上皮细胞癌相关抗原(SCC)和P53抗体等^[31], 这种检测手段痛苦小, 对于食管癌癌前病变的检出也具有一定临床意义, 但是

■创新盘点

本文第1次将食管癌危险因素、预防和癌前病变及癌症早期检测3个关系密切的研究领域的成果进行了整合论述。

同行评价

本文内容丰富, 语言流畅, 具有很好的临床意义。

这些标志物的特异性和敏感性还有待提高。

总之, 了解并远离食管癌危险因素和对癌前病变积极治疗可以降低食管癌的发生率和死亡率, 但要根本实现防治食管癌的目标还有很多的工作要做。

参考文献

- Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37 Suppl 8: S4-S66
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- Forman D. Review article: oesophago-gastric adenocarcinoma -- an epidemiological perspective. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20 Suppl 5: 55-60; discussion 61-62
- Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF, Mouw T, Subar AF, Hollenbeck AR, Schatzkin A. A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 1424-1433
- 刘伯齐, 姜晶梅, 陈铮鸣, 陈君石, 张孔来, 曾宪嘉, 赵平, Jillian Boreham, 武燕平, 黎均耀, Richard Peto. 中国103个地区吸烟与食管癌风险研究: 死因调查中的病例对照方法学研究. *中华医学杂志* 2006; 86: 380-385
- Wu M, Zhao JK, Hu XS, Wang PH, Qin Y, Lu YC, Yang J, Liu AM, Wu DL, Zhang ZF, Frans KJ, van 't Veer P. Association of smoking, alcohol drinking and dietary factors with esophageal cancer in high- and low-risk areas of Jiangsu Province, China. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1686-1693
- 张钦凤, 高艳霞, 吴多文, 薛亚卓. 食管癌发病影响因素Meta分析. *中国肿瘤* 2004; 13: 277-279
- 周艳丽, 史习舜, 周紫荆, 李国梁, 陈子龙, 李文明, 谢文港, 易晓滨. 安溪县食管癌危险因素的病例对照研究. *肿瘤* 2006; 26: 657-661
- Kristal AR, Blount PL, Schenk JM, Sanchez CA, Rabinovitch PS, Odze RD, Standley J, Vaughan TL, Reid BJ. Low-fat, high fruit and vegetable diets and weight loss do not affect biomarkers of cellular proliferation in Barrett esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2377-2383
- Opitz OG, Harada H, Suliman Y, Rhoades B, Sharpless NE, Kent R, Kopelovich L, Nakagawa H, Rustgi AK. A mouse model of human oral-esophageal cancer. *J Clin Invest* 2002; 110: 761-769
- Fong LY, Nguyen VT, Farber JL. Esophageal cancer prevention in zinc-deficient rats: rapid induction of apoptosis by replenishing zinc. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1525-1533
- Lin K, Shen W, Shen Z, Wu Y, Lu S. Dietary exposure and urinary excretion of total N-nitroso compounds, nitrosamino acids and volatile nitrosamine in inhabitants of high- and low-risk areas for esophageal cancer in southern China. *Int J Cancer* 2002; 102: 207-211
- 汪求真, 周晓彬, 滕洪松. 中国人群饮食因素与食管癌Meta分析. *中国肿瘤* 2007; 16: 3-7
- 王建璋. 食管癌的预防. *中国肿瘤* 1993; 2: 23-25
- 王兆一, 严霞, 高建国, 张祥宏, 谢同欣, 王凤荣, 王俊

灵. 食管癌高发区粮食防霉实验. *中国环境科学* 1996; 16: 31-33

- Wei WQ, Abnet CC, Lu N, Roth MJ, Wang GQ, Dye BA, Dong ZW, Taylor PR, Albert P, Qiao YL, Dawsey SM. Risk factors for oesophageal squamous dysplasia in adult inhabitants of a high risk region of China. *Gut* 2005; 54: 759-763
- Lee JM, Lee YC, Yang SY, Shi WL, Lee CJ, Luh SP, Chen CJ, Hsieh CY, Wu MT. Genetic polymorphisms of p53 and GSTP1, but not NAT2, are associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer* 2000; 89: 458-464
- 闫增荣, 王秀琴, 闫各, 罗荣, 李兆志. Bcl-2基因在食管癌中的表达与食管癌危险因素的关系. *兰州医学院学报* 2004; 30: 7-9
- Hiyama T, Yoshihara M, Tanaka S, Chayama K. Genetic polymorphisms and esophageal cancer risk. *Int J Cancer* 2007; 121: 1643-1658
- Wang GQ, Abnet CC, Shen Q, Lewin KJ, Sun XD, Roth MJ, Qiao YL, Mark SD, Dong ZW, Taylor PR, Dawsey SM. Histological precursors of oesophageal squamous cell carcinoma: results from a 13 year prospective follow up study in a high risk population. *Gut* 2005; 54: 187-192
- Solaymani-Dodaran M, Logan RF, West J, Card T, Coupland C. Risk of oesophageal cancer in Barrett's oesophagus and gastro-oesophageal reflux. *Gut* 2004; 53: 1070-1074
- Shaheen N, Ransohoff DF. Gastroesophageal reflux, barrett esophagus, and esophageal cancer: scientific review. *JAMA* 2002; 287: 1972-1981
- Brown LM, Silverman DT, Pottern LM, Schoenberg JB, Greenberg RS, Swanson GM, Liff JM, Schwartz AG, Hayes RB, Blot WJ. Adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in white men in the United States: alcohol, tobacco, and socioeconomic factors. *Cancer Causes Control* 1994; 5: 333-340
- 赵金扣, 武鸣, 王旭善, 吴德林, 覃玉, 张晓凤, 顾绍升, 胡晓抒. 江苏省恶性肿瘤低发区食管癌危险因素研究. *中国肿瘤* 2005; 14: 229-231
- Engel LS, Chow WH, Vaughan TL, Gammon MD, Risch HA, Stanford JL, Schoenberg JB, Mayne ST, Dubrow R, Rotterdam H, West AB, Blaser M, Blot WJ, Gail MH, Fraumeni JF Jr. Population attributable risks of esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1404-1413
- 赵金扣, 武鸣, 刘爱民, 圣龙贵, 陆应昶, 覃玉, 陈娟, 顾晓平, 胡晓抒. 江苏省恶性肿瘤高发地区食管癌1:1配对病例-对照研究. *中国慢性病预防与控制* 2005; 13: 17-19
- 王研, 乔友林. 食管癌的营养学预防前景. *中国肿瘤* 2002; 11: 12-13
- 魏文强, 乔友林, 邵壮, 王贵齐, 李新庆, 范金虎, 王国清, 董志伟. 食管癌高危人群的预防与控制研究进展. *实用肿瘤杂志* 2001; 16: 371-373
- 贺宇彤, 侯浚. 我国食管癌二级预防的Meta-analysis. *中国慢性病预防与控制* 1997; 5: 133-134
- 白经修, 胡建平, 白蓉, 鲁照明, 刘韵源, 王国清. 食管癌防治的新策略. *胃肠病学和肝病杂志* 2002; 11: 265-268
- 黄潇, 戴益民. 食管癌早期诊断的分子生物学标志物. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1168-1171

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

*p53*基因网络与幽门螺杆菌致胃病关系的研究进展

齐淑文, 谢立群, 舒徐, 王华

齐淑文, 武警江西省总队第一支队卫生队 江西省南昌市 330043

谢立群, 中国人民武装警察部队医学院附属医院消化内科 天津市 300162

舒徐, 南昌大学第一附属医院消化内科 江西省南昌市 330006

王华, 南昌大学第一附属医院移植科 江西省南昌市 330006

江西省卫生厅课题资助项目, No. 051036

作者贡献分布: 本文写作主要由齐淑文完成, 王华参与; 由谢立群、舒徐审核。

通讯作者: 齐淑文, 330043, 江西省南昌市, 武警江西省总队第一支队卫生队. qishuwen008@126.com

电话: 0791-5274225

收稿日期: 2008-12-30 修回日期: 2009-02-01

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-08

Research progress in the relationship between *p53* gene network and *H pylori*-induced gastric diseases

Shu-Wen Qi, Li-Qun Xie, Shu Xu, Hua Wang

Shu-Wen Qi, Medical Team of the First Crew, Jiangxi Provincial Unit of Chinese People's Armed Police Force, Nanchang 330043, Jiangxi Province, China

Li-Qun Xie, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Chinese People's Armed Police Force Medical College, Tianjin 300162, China

Shu Xu, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Hua Wang, Transplant Department, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by: the Foundation from Health Department of Jiangxi Province, No. 051036

Correspondence to: Shu-Wen Qi, Medical Team of the First Crew, Jiangxi Provincial Unit of Chinese People's Armed Police Force, Nanchang 330043, Jiangxi Province, China. qishuwen008@126.com

Received: 2008-12-30 Revised: 2009-02-01

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-08

Abstract

The close relationship between *H pylori* and gastric mucosa lesions have been commonly recognized. *H pylori* infection may cause the unbalance of gastric mucosal cell multiplication and apoptosis, which are closely related to the pathogenesis of various gastric diseases such as gastric cancer. The complex network system of *p53* gene plays a vital role in the regulation of cell multiplication and apoptosis. This review

makes a summary about the relationship among *p53* gene downstream network, *H pylori* infection and gastric mucosal cell multiplication and apoptosis.

Key Words: *p53* gene; *Helicobacter pylori*; Gastric disease

Qi SW, Xie LQ, Xu S, Wang H. Research progress in the relationship between *p53* gene network and *H pylori*-induced gastric diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 681-686

摘要

*H pylori*与胃黏膜病变关系密切已被公认, *H pylori*感染可引起胃黏膜细胞增殖与凋亡的失衡, 这与其致病致癌密切相关. *p53*基因这一复杂的网络系统在调控细胞凋亡与增殖的过程中, 发挥重要的作用. 就*p53*下游基因网络与*H pylori*、胃黏膜细胞增殖凋亡之间的关系作一综述.

关键词: *p53*; 幽门螺杆菌; 胃疾病

齐淑文, 谢立群, 舒徐, 王华. *p53*基因网络与幽门螺杆菌致胃病关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 681-686

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/681.asp>

0 引言

自1983年Warren与Mashall从胃黏膜中分离出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)后, 国内外学者对*H pylori*感染与胃十二指肠疾病的关系从多方面做了研究. 现已明确, *H pylori*是慢性胃炎的主要致病菌, 与胃癌的发生密切相关, 1994年世界卫生组织国际癌症研究机构已将*H pylori*列为人类I类致癌因子. 在胃黏膜癌变的过程中, Correa提出的正常胃黏膜→慢性浅表性胃炎(chronic superficial, CSG)→慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)→肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)→非典型增生(dysplasia, DYS)→胃癌(gastric carcinoma, GC)这一病变模式被大家普遍认可, *H pylori*被认为在这一过程中起着始发和先导作用, 但其确切

■背景资料

自1983年Warren与Mashall从胃黏膜中分离出幽门螺杆菌(*H pylori*)后, 国内外学者对*H pylori*感染与胃十二指肠疾病的关系从多方面做了研究. 现已明确, *H pylori*是慢性胃炎的主要致病菌, 与胃癌的发生密切相关. *H pylori*感染可引起胃黏膜细胞增殖与凋亡的失衡, 这与其致病致癌密切相关. 新近的研究表明, *p53*基因这一复杂的网络系统在调控细胞凋亡与增殖的过程中, 发挥重要的作用.

■同行评议者

黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

■研究前沿

*H. pylori*感染和

的作用机制尚未完全阐明. *H. pylori*感染可引起胃黏膜细胞增殖与调亡的失衡,这与其致病致癌密切相关. 新近的研究表明, *p53*基因这一复杂的网络系统在调控细胞调亡与增殖的过程中,发挥重要的作用. 现就*p53*下游基因网络与*H. pylori*、胃黏膜细胞增殖、调亡之间的关系作一综述如下.

1 *p53*基因网络结构及与细胞调亡、增殖的关系

1.1 *p53*的结构和功能 人*p53*基因定位于17号染色体(17p^{13,17}),全长约20 kb,有11个外显子和10个内含子,编码393个氨基酸残基的P53蛋白. P53蛋白为核内磷酸化蛋白,以四聚体形式低水平表达于体内. *p53*基因中有5个高度保守区,其中4个位于5-8外显子,是突变热点. 正常*p53*基因以序列专一的方式与DNA调控区结合,使P53蛋白起转录因子的作用. DNA损伤后, *p53*基因活化,从而使*p53*依赖的细胞周期素依赖激酶(cyclin dependent kinase, CDK)抑制剂*p21*^{WAF1}和DNA修复基因GADD45的转录上调,使细胞在G₁期出现生长停滞,进行DNA修复. 在*p53*基因缺失或突变的细胞, DNA损伤后不能通过*p53*介导的途径进入G₁期停滞和DNA修复,遗传信息受损的细胞进入增殖,最终导致恶性肿瘤的发生^[1-2].

1.2 *mdm2*基因的结构和功能 *mdm2*基因定位于人染色体12q^{13,14},其转录产物mRNA广泛表达于正常人体的多个器官,骨骼肌含量最高,其次为肝、肺、胰等,与细胞基本生理活动有关^[3]. MDM2蛋白产物上有五个保守区,从氨基端开始,分别为: I区, 19-102氨基酸区域,是*mdm2*与*p53*相互结合部位; II区, 181-185氨基酸区域,核定位序列; III区, 221-272氨基酸区域,该区域为含有40%谷氨酸和精氨酸残基的高度酸性区域,能与核糖体L5蛋白及5SrRNA结合; IV区: 305-322氨基酸区域,该区域含有一个锌指结构; V区: 438-478氨基酸区域,该区域含有一个环指结构,可介导蛋白质-蛋白质的相互作用,也可以与DNA或RNA结合^[4].

MDM2蛋白主要功能是与P53蛋白酸性活化域直接结合形成P53-MDM2复合物,从而抑制*wtp53*介导的转录激活功能. 此外, *mdm2*基因的酸性活化域具有反式激活作用,与转录调控有关^[3].

1.3 PUMA的结构与功能 *p53*上调的细胞调亡调控因子(*p53* up-regulated modulator of

apoptosis, PUMA)是2001年由Yu *et al*^[5]和Nakano *et al*^[6]2个独立研究小组同时发现,是Bcl-2蛋白家族的促调亡成员之一,具有强大的促调亡作用,可被内、外源性*p53*快速诱导活化. PUMA基因定位于19q, cDNA全长1.9 kb,转录本由4个外显子(1 α 、2、3、4)组成,编码1个由193个氨基酸组成的蛋白,该蛋白定位于线粒体膜上. Bcl-2蛋白家族中促调亡蛋白的共同点是都含有1个由9个氨基酸(LRRMADDLN)组成的BH3保守结构域. PUMA的BH3结构域位于其氨基酸序列的第141-149位,缺少此结构域的PUMA突变体也将丧失诱导调亡的功能^[7].

PUMA是*p53*的下游靶基因, PUMA上游启动子序列中含*p53*的结合位点,受到调亡信号刺激后, *p53*可直接与其靶位点结合从而促进PUMA转录和蛋白表达, PUMA通过其BH3结构域与Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-W、Mcl-1等抑调亡蛋白结合,导致线粒体通透性增加并释放细胞色素C和Smac/DIABLO(second mitochondrial-driven activator caspase/direct IAP-binding protein with low PT),启动细胞调亡.

1.4 *p21*基因的结构和功能 *p21*^{WAF1/CIP1}基因定位于人染色体6p21.2,其DNA长度85 kb. 该基因上游2.4 kb和8 kb处各有一个P53蛋白特殊序列结合位点,在上游1-2 kb核苷酸处有MyoD (myogenic D, 肌源性转录因子)结合区,在上游50-104 bp核苷酸处有Sp1结合区. *p21*基因的表达产物P21蛋白定位于细胞核中,由164个氨基酸构成,富含精氨酸, N末端第21-26氨基酸与细胞周期素D、E(cyclin D、cyclin E)结合, C末端第124-164氨基酸与增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)结合,中间第49-72氨基酸与细胞周期依赖性蛋白激酶2(cyclin-dependent kinase2, CDK2)结合.

*p21*可通过由*p53*介导的途径发挥作用, *p21*^{WAF1/CIP1}基因是*p53*基因最重要的下游基因之一,该基因上游2.4 kb处含有一个P53蛋白的特异性结合位点. 当细胞受到来自体内和体外的各种损伤后,野生型P53蛋白作用于*p21*基因,使其迅速表达. *p21*基因的表达产物P21蛋白是目前已知的具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白. *p21*可与几乎每一个Cyclin2CDK复合物结合,广泛的抑制各Cyclin-CDK复合物,如cyclinD-CDK4/CDK6、cyclinE-CDK2和cyclinA-CDK2,但对cyclinB相关的复合物抑制活性较弱. 已有研究证明, *p21*的过表达可使细

胞周期阻滞于G₁期、G₂期或S期^[8];如果DNA的损伤发生在S期之前, P21蛋白主要通过与CDK-Cyclin结合并抑制其功能使细胞周期停滞于G₁期;而发生在S期的损伤, P21蛋白主要是通过PCNA的结合来抑制DNA的合成^[9].

1.5 *bax*的结构和功能 Oltvai *et al*^[10]在1993年首先在白介素3(IL-3)依赖细胞的凋亡过程中发现了*bax*基因, *bax*基因是编码21 kDa的蛋白质, 由192个氨基酸组成, Bax蛋白与Bcl-2蛋白同源性较高, 因mRNA剪接方式不同, Bax mRNA有 α 、 β 、 δ 、 γ 、 σ 、 ζ 6种亚型^[11]. Bax是Bcl-2家族中第一个被确认有细胞凋亡促进作用的成员.

Bax蛋白在凋亡发生过程中起到重要枢纽作用. Bax蛋白作为*p53*下游应答蛋白, 与Bcl-2、P53共同参与调节细胞凋亡的过程. 如果细胞损伤严重, 则在*p53*的调控下发生凋亡. 表现为调控Bcl-2蛋白表达减少, Bax蛋白表达增多, Bcl-2/Bax比例下降, Bcl-2与Bax的异源二聚体减少, Bax同源二聚体增多. Bax与线粒体膜结合, 形成渗透性膜转移孔复合物, 建立线粒体膜通道, 介导线粒体发生释放反应, 包括: 细胞色素C、凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)、促凋亡蛋白等. 细胞色素C等与凋亡促进因子-1(Apuf-1)和Caspase-9, 结合形成复合体, 在ATP参与下, 使caspases蛋白酶家族发生酶解级联激活, 主要通过caspase-3激活破坏基因组DNA的caspase激活的核酸内切酶(caspase activated endonuclease, CAD), 造成基因组DNA裂解;失活DNA修复相关酶(DNA-PK、PARP), 造成DNA修复能力降低;分解细胞骨架(如Lamins)等凋亡执行过程.

2 *H pylori*与胃上皮细胞凋亡、增殖的关系

正常胃黏膜的结构与功能依赖于黏膜上皮细胞增殖(Pro-liferation)和凋亡(apoptosis)之间的动态平衡, 两者失衡就可能引起病变. 大量研究表明*H pylori*感染可引起胃黏膜上皮动力学改变, 即细胞过度增殖和凋亡, 是*H pylori*感染致胃癌发生的机制之一.

2.1 *H pylori*引起胃黏膜上皮细胞增殖加速 由于增殖细胞的基因组具有不稳定性, 细胞增殖加快的同时, 也增加了DNA损伤和产生非整倍体的危险性. 且有丝分裂期细胞较静止期细胞更容易受致癌物质的损伤而发生癌变. 若损伤的DNA得不到及时修复又不能启动凋亡系统使该细胞自动死亡, 就有可能由不典型增生发展

为癌肿. 增殖细胞核抗(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)主要表达于G₁晚期和S期, G₂早期及其他各期内均能检出低水平. PCNA能与DNA多聚酶结合, 他的表达合成与细胞增殖状态密切相关, 故检测PCNA可反映细胞增殖特征. Kuipers *et al*^[12]研究了*H pylori*感染对胃上皮细胞增殖的影响, 发现*H pylori*阳性慢性胃炎组与*H pylori*阴性慢性胃炎组相比, 胃窦部黏膜细胞增殖明显加快, 经完整三联治疗4 wk后, 不论*H pylori*是否根除, 黏膜增殖现象均明显好转. 同时用PCNA的mAb进行检测, 发现*H pylori*感染的胃黏膜PCNA呈过度表达, 在清除*H pylori*后, 其表达水平显著下降. 说明*H pylori*能促进黏膜细胞增殖, 增加了上皮细胞发生癌变的可能性. 研究表明*H pylori*感染与增殖细胞数量增加有关, 从正常胃黏膜到慢性胃炎、肠上皮化生、不典型增生、胃癌, 细胞增殖数量逐级增加, 在慢性胃炎的*H pylori*感染组和非感染组之间存在很大差异^[13], 提示*H pylori*感染可诱导增殖发生.

2.2 *H pylori*诱导胃黏膜上皮细胞凋亡增加 Moss *et al*^[14]对*H pylori*感染的胃黏膜进行细胞凋亡的研究, 发现*H pylori*感染的胃黏膜上皮凋亡细胞占16.8%, 较*H pylori*阴性(2.9%)和根除*H pylori*治疗后(3.1%)显著增加($P<0.05$). 表明*H pylori*感染能诱导细胞凋亡, 并刺激胃上皮细胞增殖与畸变, 导致胃癌发生. Peek *et al*^[15]研究发现CagA(+) *H pylori*感染者胃窦部上皮细胞的增殖指数(proliferation index, PI)较CagA(-)及无*H pylori*感染者明显增加, 而凋亡指数(apoptosis index, AI)则相对较低. 因此, 在没有相应成比例的凋亡增加的情况下, 细胞增殖的增加会导致CagA(+) *H pylori*携带者发生胃癌的危险性增加. 有结果显示随着胃黏膜萎缩、化生、不典型增生的出现, *H pylori*感染与非感染的胃黏膜上皮细胞凋亡程度差异逐渐减少或消失, 提示*H pylori*感染主要在胃癌的起始阶段起作用^[16-17].

为了保持胃黏膜细胞总量, 过量的细胞凋亡会诱发代偿性细胞增殖, 一旦出现细胞过度增殖, 那么易受基因毒性损害及有“利他性”细胞死亡(凋亡的一种自我防御形式)倾向的分裂细胞比率增加. 一旦这种“利他性”机制失灵, 那么, 组织就可能出现无限制增殖^[18].

总之, *H pylori*感染早期引起胃上皮细胞凋亡增加, 随后降低, 而增殖水平持续升高, 过度

■ 相关报道

Wang *et al*研究了胃癌及其癌前病变中*H pylori*感染癌基因表达, 结果发现在慢性胃炎组、萎缩性胃炎组、肠化生组、早期胃癌组、高分化胃癌组均有感染, 且抑癌基因*p53*在肠化生组、早期胃癌组、和高分化胃癌组分别有3例(30%)、2例(33%)、18例(60%)高表达, 其中18例*p53*阳性高分化胃癌有11例*H pylori*阳性, 说明*H pylori*感染可在胃癌发生的早期诱导*p53*突变.

■同行评价

本文系统阐述了 *p53* 下游基因网络与 *H pylori*、胃黏膜细胞增殖及凋亡之间的关系, 文笔流畅, 学术价值较好。

增殖并且不伴随相应的凋亡, 细胞增殖和凋亡失衡最终导致发生突变的细胞继续生长而癌变。

3 *p53* 基因网络与 *H pylori* 感染致胃上皮细胞凋亡、增殖的关系

3.1 *p53* 基因网络的关系 *p53* 介导的信息传递途径是一个复杂的网络系统, 其生物学效应主要是通过激活或抑制大量下游基因表达来完成细胞周期负调控、DNA 复制与修复、细胞凋亡等。*p53* 活化其相应靶基因可诱导细胞周期停滞和(或)细胞凋亡。P21 和 PUMA 分别是 *p53* 诱导细胞周期停滞和细胞凋亡的关键靶基因。PUMA 在 *p53* 依赖性凋亡中起重要作用, PUMA 上游启动子序列中含 *p53* 的结合位点, 受到凋亡信号刺激后, *p53* 可直接与其靶位点结合从而促进 PUMA 转录和蛋白表达。*p53* 可以上调 Bax 的表达水平, Bax 和 PUMA 合作可诱导细胞凋亡^[8]。另外, *p21* 作为 *p53* 的下游激活产物, 执行 *p53* 的部分功能。当细胞 DNA 损伤后, *p53* 蛋白积聚, 使 *p21* 基因表达上调使细胞阻滞于 G₁ 期, 以赢得时间, 在细胞进入 S 期前修复损伤的 DNA。有趣的是在 *p53* 的靶基因中, *MDM2* 却是一种癌基因, *MDM2* 既是 *p53* 重要的下游基因, 又是调节 *p53* 的重要因子, *p53* 与 *MDM2* 之间存在一种互相反馈调节环路: 一方面, *p53* 能特异性地结合 *MDM2* 基因并刺激他的转录, 同时 *MDM2* 又能结合 *p53*, 其结合位点正好位于 *p53* 反式活化区, 从而抑制 *p53* 的功能。*MDM2* 与 *p53* 的结合能够使 *p53* 转运至胞质, 通过蛋白溶解作用促进 *p53* 降解^[3,19]。这一调节途径的重要性在于使得 *p53* 保持低水平, 不干扰细胞的正常生长和发育过程。

3.2 *p53* 基因网络、*H pylori* 与胃上皮细胞凋亡、增殖的关系 *H pylori* 感染不仅可诱导细胞有丝分裂加速, 导致细胞 DNA 损伤和产生非整倍体的危险性增高, 而且可引起细胞的癌基因突变、活化或过度表达, 使细胞恶变。

正常 *p53* 存在于所有体细胞中, 并作为“分子警察”(molecular police-men)监视细胞基因组的完整性。若 DNA 损伤, *p53* 能使复制停止, 修复损伤的 DNA; 若修复失败, 则 *p53* 启动凋亡系统使细胞死亡, 阻止有癌变倾向的基因突变细胞产生。*p53* 突变以后即丧失正常 *p53* 具有的抑癌功能。突变的 *p53* 不仅抑癌活性丧失, 反而促使细胞向恶性转变, 即由抑癌基因变成癌基因。Wang *et al*^[20] 研究了胃癌及其癌前病变中 *H pylori* 感染癌基因表达, 结果发现在慢性胃炎组、萎缩性

胃炎组、肠化生组、早期胃癌组、高分化胃癌组均有感染, 且抑癌基因 *p53* 在肠化生组、早期胃癌组、和高分化胃癌组分别有 3 例(30%)、2 例(33%)、18 例(60%)高表达, 其中 18 例 *p53* 阳性高分化胃癌有 11 例 *H pylori* 阳性, 说明 *H pylori* 感染可在胃癌发生的早期诱导 *p53* 突变。高华 *et al*^[21] 研究了根除 *H pylori* 对 P53 蛋白表达的影响, 结果显示 *p53* 表达阳性率在 *H pylori* 阳性胃良性疾病与 *H pylori* 阴性胃良性疾病相比有非常显著性差异($P < 0.01$)。除菌后 *H pylori* 阴性组与除菌前及除菌后 *H pylori* 仍阳性组相比, 差异非常显著($P < 0.01$)。表明 *H pylori* 感染可促进突变型 *p53* 表达增强, *H pylori* 根除治疗后其表达降低。另外还发现, P53 蛋白染色阳性组 PCNA 显著高于染色阴性组, 提示 P53 蛋白的表达与细胞增殖密切相关, 表明 *H pylori* 感染可促进胃黏膜上皮细胞增殖, 使突变型 *p53* 基因不断增强, 这可能是胃癌发生的一个重要原因。

研究发现 MDM2 蛋白对 *wtp53* 具有负性调节功能, 在肿瘤组织中, MDM2 的异常主要表现为基因的扩增和过表达, 从而使 *wtp53* 的抑癌活性丧失。Kodama *et al*^[22] 研究了 *H pylori* 根除对胃黏膜中 MDM2 的表达的影响, 结果显示未感染组 MDM2 的表达明显低于感染组, 在感染组 *H pylori* 根除后 6 mo 后, MDM2 表达水平明显降低。

p53 正向细胞凋亡调控因子 PUMA, 是近年来新发现的一个 Bcl-2 家族、BH3-only 亚家族成员, PUMA 可以通过 *p53* 依赖性途径快速诱导凋亡。Wei *et al*^[23] 研究了 *H pylori* 通过 P53 蛋白家族对胃上皮细胞的作用, 结果显示 *H pylori* 作用于胃上皮细胞后导致 P53 蛋白家族中 P73 蛋白表达上调, P73 的增加又导致前凋亡基因 PUMA 在胃上皮细胞中的表达上调。张宇雯 *et al*^[24] 研究了 *puma* 基因转染对人胃癌 SGC-7901 细胞株增殖和凋亡的影响及其作用机制, 结果显示 PUMA 的表达使 SGC-7901 细胞的增殖能力降低并诱导凋亡。

Tian *et al*^[25] 研究了 *H pylori* 与肿瘤抑制基因在胃癌和相关损伤中表达之间的关系, 结果显示 *p21*^{WAF1} 在胃萎缩性炎、肠化生、异型增生、胃癌组表达逐渐降低, 但与 *H pylori* 感染无相关性。凌红 *et al*^[26] 在研究 *H pylori* 感染与 *ras* 基因产物 P21 蛋白表达关系时发现, 胃癌或胃癌前病变组织中的 *ras* 基因第 12 位密码子点突变者 *H pylori* 感染率高于无突变者, 且 P21 蛋白

过度表达在*H pylori*感染组显著高于无感染组,提示*H pylori*感染后可能引起*ras*基因第12位密码子的点突变。*ras*基因突变可引起产物P21蛋白分子的氨基酸发生改变,导致其功能异常和过表达,并能持续向细胞内传递信号,引起细胞持续增殖,导致细胞癌变。

*bax*是重要的促细胞凋亡基因之一。刘海峰 *et al*^[27]研究了*H pylori*感染及根除治疗对胃癌前病变组织中促凋亡基因Bax蛋白表达的影响,结果显示*H pylori*阳性胃癌前病变组Bax蛋白阳性表达率显著高于*H pylori*阴性胃癌前病变(72.3% vs 48.0%, $\chi^2 = 4.191$, $P < 0.05$), *H pylori*感染与Bax阳性表达及分级呈正相关($r = 0.978$, $P < 0.01$)。经三联治疗根除*H pylori*后, Bax蛋白阳性表达率较治疗前显著降低(70.3% vs 43.2%, $\chi^2 = 5.506$, $P < 0.05$), 而*H pylori*仍为阳性者Bax蛋白阳性表达率则无变化。Lee *et al*^[28]研究了*H pylori*对胃上皮细胞的影响及凋亡相关蛋白在胃癌发生中的表达, 结果显示Bax在慢性胃炎及肠化生胃炎中*H pylori*阳性组较*H pylori*阴性组表达明显上调。表明*H pylori*感染可以促进Bax蛋白的表达, 这可能是*H pylori*感染诱导胃黏膜上皮细胞凋亡的主要机制, 导致胃黏膜上皮细胞增生与凋亡的调节紊乱, 从而使胃黏膜上皮细胞易于向恶性转化。

*H pylori*感染能导致不同胃黏膜病变的增殖与凋亡的失衡及相关凋亡调控基因的改变; 根除*H pylori*后, 胃黏膜细胞增殖与凋亡的失衡的恢复在不同病变有所不同; 同时胃癌前病变的病理改变的逆转和阻滞也有所不同^[29]。因此, 寻找*H pylori*感染后胃癌前病变逆转的临界点具有重要的意义, 而*H pylori*感染和p53及其下游基因关系的研究就显得尤为重要, 有待进一步揭示其中的奥妙。

4 参考文献

- 1 史爱学, 杨举轮. p53基因治疗恶性肿瘤的现状与趋势. 西南国防医药 2004; 14: 101-103
- 2 王朝霞, 束永前. 重组腺病毒p53基因治疗肺癌的研究进展. 中国肺癌杂志 2005; 8: 148-151
- 3 赵劲风. 肝癌组织中p53基因及其下游基因的研究进展. 中国现代医学杂志 2003; 13: 70-73
- 4 顾军, 尹大力. 抗肿瘤药物研制的新靶点MDM2-P53. 药学进展 2003; 27: 1-5
- 5 Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 2001; 7: 673-682
- 6 Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 2001; 7: 683-694
- 7 Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhang L. PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 1931-1936
- 8 Radhakrishnan SK, Feliciano CS, Najmabadi F, Haegebarth A, Kandel ES, Tyner AL, Gartel AL. Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle. *Oncogene* 2004; 23: 4173-4176
- 9 杨安强, 郑兴征, 潘晓琳, 付锦艳. 细胞周期调控基因p21^{WAF1/CIP1}与肿瘤的关系. 现代肿瘤医学 2006; 14: 342-345
- 10 Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-619
- 11 Wadleigh M, Ho V, Momtaz P, Richardson P. Hepatic veno-occlusive disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Curr Opin Hematol* 2003; 10: 451-462
- 12 Kuipers EJ, Meuwissen SG. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1996; 218: 103-105
- 13 Lee KM, Lee DS, Yang JM, Ahn BM, Lee EH, Yoo JY, Kim YJ, Chung IS, Sun HS, Park DH. [Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cell kinetics and expression of apoptosis-related proteins in gastric carcinogenesis] *Korean J Gastroenterol* 2003; 42: 12-19
- 14 Moss SF, Calam J, Agarwal B, Wang S, Holt PR. Induction of gastric epithelial apoptosis by Helicobacter pylori. *Gut* 1996; 38: 498-501
- 15 Peek RM Jr, Moss SF, Tham KT, Pérez-Pérez GI, Wang S, Miller GG, Atherton JC, Holt PR, Blaser MJ. Helicobacter pylori cagA+ strains and dissociation of gastric epithelial cell proliferation from apoptosis. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 863-868
- 16 蔡跃芳, 张明亮, 严悦卿, 黄维军, 陈韬. 胃癌形成中Hp感染与其细胞凋亡和增殖的关系. 中国现代医学杂志 2006; 16: 1792-1797
- 17 王颖, 施瑞华, 张红杰. 幽门螺杆菌感染对胃上皮细胞动力学影响的研究. 南京医科大学学报(自然科学版) 2006; 26: 1067-1105
- 18 Shirin H, Moss SF. Helicobacter pylori induced apoptosis. *Gut* 1998; 43: 592-594
- 19 孙利平, 李岩, 张宁, 姜乃佳, 付伟, 薛一雪. MDM2基因扩增和蛋白表达与胃癌相关性的研究. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1800-1801
- 20 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. Helicobacter pylori infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 107-113
- 21 高华, 袁媛, 吴焯秋, 王兰, 董明, 张忠. 根除Hp对增殖细胞核抗原P53蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 1999; 7: 995-996
- 22 Kodama M, Fujioka T, Murakami K, Okimoto T, Sato R, Watanabe K, Nasu M. Eradication of Helicobacter pylori reduced the immunohistochemical detection of p53 and MDM2 in gastric mucosa. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 941-946
- 23 Wei J, O'Brien D, Vilgelm A, Piazuolo MB, Correa P, Washington MK, El-Rifai W, Peek RM, Zaika A. Interaction of Helicobacter pylori with gastric epithelial cells is mediated by the p53 protein family. *Gastroenterology* 2008; 134: 1412-1423
- 24 张宇雯, 刘兴汉, 马洪星, 曲天舒, 李冀红, 栗亚. Puma基因转染对胃癌SGC-7901细胞的促凋亡作用及机制.

- 中国肿瘤 2008; 17: 137-141
- 25 Tian SF, Xiong YY, Yu SP, Lan J. [Relationship between *Helicobacter pylori* infection and expressions of tumor suppressor genes in gastric carcinoma and related lesions] *Ai Zheng* 2002; 21: 970-973
- 26 凌红, 甘爱华, 黄庆祖, 刘集鸿. 幽门螺杆菌感染与增殖细胞核抗原及p53和p21蛋白表达的关系. *广东医学* 2000; 21: 25-26
- 27 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 根除幽门螺杆菌对胃癌前病变组织中bax蛋白表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 22-24
- 28 Lee KM, Lee DS, Yang JM, Ahn BM, Lee EH, Yoo JY, Kim YJ, Chung IS, Sun HS, Park DH. [Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cell kinetics and expression of apoptosis-related proteins in gastric carcinogenesis] *Korean J Gastroenterol* 2003; 42: 12-19
- 29 Shu X, Lu NH, Cheng J, Zhu Y, Xie Y, Xu P, Wang CW. Effects of *helicobacter pylori* eradication on intestinal metaplasia of gastric mucosa: a 5-year prospective study. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19 (Suppl.): A355

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2009年广东省中西医结合、中医脾胃消化病学术会议暨 国家级继续教育项目消化病进展研讨班征文通知

本刊讯 由广东省中西医结合学会脾胃消化病专业委员会, 广东省中医药学会消化病专业委员会主办的2009年脾胃消化病学术会议暨国家级继续教育项目消化病进展研讨班将于2009-09-25/27在广东省广州市召开, 现将会议征文有关事项通知如下:

1 征稿内容

中西医结合、中医治疗消化系统疾病的基础理论研究、临床经验总结、诊治的新进展, 名老中医、西医和中西医结合专家个人诊治特色总结.

2 征稿要求

论文资料务必真实可靠, 书写规范, 简明扼要, 每篇以3000字以内为宜, 并附800字左右的摘要1份; 来稿请用电脑打印, 用word软件编入, 并附软盘, 或发送电子邮件, 文稿中请注明作者姓名、单位、通讯地址、邮政编码及联系电话. 截稿日期: 2009-07/30

3 交流方式

专题报告、论文宣读与讨论答疑相结合. 入选论文并参会者给予记I类学分6分, 另外将择优编入《现代消化及介入诊疗》杂志. 参加继续教育研讨班者另给予国家级一类学分12分.

4 投稿地址

(1)E-mail: zhangwdcn@163.com; (2)全文、摘要并附软盘寄至广东省广州市广州大道北1838号南方医院消化编辑部罗永华同志(邮编: 510105); 并注明脾胃消化病学术会议投稿. 无论文者也欢迎参会或报名参加研讨班.

5 联系方式

姚永莉, 510105, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医院消化内科, 电话: 13189096556

炎症性肠病肠道淋巴细胞归巢研究进展

储昭新, 秦环龙

储昭新, 秦环龙, 上海第六人民医院普外科 上海市 200233
国家重点基础研究计划(973计划)基金资助项目, No. 2008CB517403;
黎介寿院士肠道屏障研究专项基金资助项目, No. LJS_2009001
作者贡献分布: 文献检索、资料分析和论文撰写由储昭新完成;
选题和审校由秦环龙完成。
通讯作者: 秦环龙, 200233, 上海市宜山路600号, 上海第六人民
医院普外科. hlqin@sjtu.edu.cn
电话: 021-64361349 传真: 021-64368920
收稿日期: 2008-12-29 修回日期: 2009-02-11
接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-08

Progress of gut associated lymphocyte homing in inflammatory bowel disease

Zhao-Xin Chu, Huan-Long Qin

Zhao-Xin Chu, Huan-Long Qin, Department of Surgery,
Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China
Supported by: the National Key Basic Research Plan Pro-
gram of China (973 Program), No. 2008CB517403, and the
Special Foundation for Academician Jie-Shou Li (Intestinal
Barrier Research), No. LJS_2009001
Correspondence to: Huan-Long Qin, Department of Sur-
gery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233,
China. hlqin@sjtu.edu.cn
Received: 2008-12-29 Revised: 2009-02-11
Accepted: 2009-02-19 Published online: 2009-03-08

Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is characterized by chronic inflammation of intestinal tract, and it is classified into 2 subtypes traditionally, namely ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Many investigations have shown that intestinal lymphocyte homing (lymphocyte homing, LH) is closely related to IBD. This paper reviews the advances in the relationship between inflammatory bowel disease and lymphocyte homing.

Key Words: Inflammatory bowel disease; Lymphocyte homing; Adhesion molecules

Chu ZX, Qin HL. Progress of gut associated lymphocyte homing in inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 687-693

摘要

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)

是慢性肠道炎症疾病, 传统上分为溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD). 诸多研究表明, IBD与肠道淋巴细胞归巢(lymphocyte homing, LH)密切相关, 本文就IBD与LH研究进展作一综述.

关键词: 炎症性肠病; 淋巴细胞归巢; 黏附分子

储昭新, 秦环龙. 炎症性肠病肠道淋巴细胞归巢研究进展. *世界华人消化杂志* 2009; 17(7): 687-693
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/687.asp>

0 引言

20世纪60年代, Gowans和Knight *et al*^[1-2]从正常鼠的输出淋巴管分离出淋巴细胞, 用放射性物质标志后注入受体动物的血循环, 再通过闪烁显像术和放射自显影术来探测这些细胞的分布, 观察到小淋巴细胞分布于全身次级淋巴组织, 而激活的免疫母细胞则选择性的迁移至黏膜部位. 受这个实验的启发, 随后多个小组的科学家进行了一系列活体研究. 这些试验奠定了淋巴细胞再循环和归巢概念的基础. 目前认为炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)发病与基因易感性个体对正常肠道共栖菌群的异常免疫反应有关^[3-4], 肠道淋巴细胞归巢(lymphocyte homing, LH)作为免疫反应的一个关键环节, 在IBD的发病和复发中发挥重要作用.

1 基本概念

成熟淋巴细胞离开中枢免疫器官后, 经血液循环趋向性迁移并定居于外周免疫器官或组织特定区域, 称为LH. LH的分子基础是淋巴细胞与内皮细胞黏附分子的相互作用. 介导LH的黏附分子称为淋巴细胞归巢受体(lymphocyte homing receptor), 其相应配体为血管地址素(vascular addressin), 主要表达于血管内皮细胞表面^[5].

2 淋巴细胞归巢机制, 淋巴细胞归巢受体、地址素、趋化因子

淋巴细胞从循环募集到目标组织是一个高度调节的过程, 依赖一系列黏附分子的相继作用.

■背景资料

目前认为炎症性肠病(IBD)发病与基因易感性个体对正常肠道共栖菌群的异常免疫反应有关. IBD传统上被分为两个亚型: 即溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD). 失控的肠道炎症是他们共同的路径. 自循环中增强的淋巴细胞归巢在肠道炎症的发病和复发中发挥重要作用.

■同行评议者

房林, 副教授, 同济大学附属第十人民医院普外科

■ 研发前沿

胃肠病学家和药物学家一直致力于开发出更加安全有效的拮抗淋巴细胞归巢药物来治疗IBD及相关疾病。因此必须进一步深入研究淋巴细胞归巢的分子和信号传导机制,探讨可能影响淋巴细胞归巢的因素,选择合适的药物作用靶点。

需经历贴壁、滚动(rolling);趋化因子对整合素的激活(activating);整合素介导的淋巴细胞牢固黏附(adhereing);淋巴细胞于高内皮静脉(high-endothelial venules, HEV)内皮细胞间隙的游出。该过程涉及到一系列归巢受体、地址素及趋化因子的级联作用^[6-7]。各亚群的具体归巢步骤有所不同^[8-12]。

2.1 淋巴细胞归巢受体 主要包括选择素家族的L-选择素^[13]、整合素家族的 $\alpha 4\beta 7$ 和淋巴细胞功能相关抗原LFA-1($\alpha L\beta 2$)等。其与相对应的地址素相互识别、相互作用可介导淋巴细胞与内皮细胞间的黏附和游出过程。

2.2 地址素 L-选择素、 $\alpha 4\beta 7$ 和LFA-1的配体(地址素)分别为黏膜地址素细胞黏附分子-1(mucosal addressin cell adhesion molecule-1, MAdCAM-1)和细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)/血管细胞黏附分子-1(vascular adhesion molecule-1, VCAM-1),均属于免疫球蛋白超家族(immunoglobulin super family, IgSF),具有与Ig相似的结构特征。外周淋巴结地址素(peripheral lymph node addressin, PNAd)是一种特殊形式的MAdCAM-1,即为碳水化合物抗原决定簇修饰的MAdCAM-1。

2.3 趋化因子 趋化性细胞因子是一个蛋白质家族,分子质量多为8-10 kDa。与淋巴细胞归巢相关的趋化性细胞因子很多^[14-19],按半胱氨酸的位置、排列方式和位置可分为四个亚家族,其中最具代表性的是CCR9。CCR9和整合素 $\alpha 4\beta 7$ 联合表达于归巢至肠道的淋巴细胞,选择性运输至小肠。通过活体显微镜检查能直观的观察在正常和TNF- α 刺激条件下淋巴细胞依赖CCR9/CCL25黏附于鼠小肠内皮^[20]。

3 炎症性肠病中淋巴细胞归巢

3.1 淋巴细胞 有研究表明IBD中炎症浸润部位的肠黏膜中T、B细胞总数量增加,各具体亚群有增有减。SAMP1/Yit小鼠能自发性发生回肠炎,是研究IBD的重要动物模型。Matsuzaki *et al*^[21]用荧光标记T细胞,再从尾静脉注入受体小鼠,并用活体显微镜监测派伊尔淋巴结(peyer patches, PP)毛细血管后微静脉、黏膜下层微血管和末端回肠绒毛毛细血管内的T细胞归巢,发现与AKR/J小鼠和15 wk龄的SAMP1/Yit小鼠相比,35 wk的SAMP1/Yit的小鼠HEV内T淋巴细胞归巢明显增强,免疫组化技术证实CD4、CD8和 $\beta 7$ 整合素阳性的细胞浸润增加。与此相似,

Teramoto *et al*^[22]把从脾脏提取的T和B淋巴细胞用荧光标记后注入受体小鼠,再用右旋葡聚糖硫酸钠(dextran sulfate sodium, DSS)诱导结肠炎,活体显微镜观察提示受体结肠黏膜及黏膜下层内T和B淋巴细胞的黏附均显著增强。诸多文献认为,LH增多是肠道淋巴细胞数目增加的重要机制之一^[21-22]。

3.1.1 CD4⁺T细胞: CD和UC中CD4⁺T细胞归巢显著增加,其中CD以分泌IFN- γ 和IL-2的Th1型细胞为主,而UC以非典型的Th2型细胞占优势,其分泌TGF- β 和IL-5而不分泌IL-4^[4]。

大量的实验性结肠炎模型都表现为Th1型炎症,其炎症特征在肉眼和光镜水平下均和CD相似。研究的较多的有三硝基苯磺酸(trinitrobenzene sulfonic acid, TNBS)结肠炎和IL-10基因敲除小鼠发生的结肠炎。IL-10是Th2型反应的促进因子,Th1型反应的抑制因子。通过动物试验技术把编码IL-10的基因敲除后,小鼠可自发肠道炎症,病变以直肠和结肠为主,病理学特征与人类CD十分相似,炎症部位T浸润,分泌高水平IFN- γ 和TNF- α ,表现为显著的Th1型免疫反应。

IFN- γ 是Th1型炎症的关键因子,其产生过度主要与两个分子有关,一个为T-bet,另一个为STAT4(signal transducer and activator of transcription 4)。Furuta *et al*^[23]比较同一遗传背景下T-bet(-/-)、STAT4(-/-)及T-bet(-/-)和STAT4(-/-)小鼠发现,单独敲除T-bet或STAT4基因,Th1型反应均显著降低,若同时敲除两基因,则几乎检测不到Th1型反应。Thieu *et al*^[24]发现T-bet促进Th1型分化,需要STAT4的参与。有学者报道CD患者表达特征性受体IL-12R $\beta 2$ 的Th1细胞数量显著增加,炎症组织中的T细胞的核提取物中的STAT4和T-bet含量也显著增加^[25]。

从目前资料来看,UC类似于一种缓和的Th2型免疫反应^[26],Th2介导的B细胞激活的证据是自身抗体的出现,包括核旁型抗中性粒细胞胞质抗体(perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies, pANCA)和抗IgG1、IgG4亚类抗体^[27-28]。最近有研究发现,IL-13在UC的发病中起重要作用,可影响肠道上皮细胞的紧密连接、凋亡和再生^[29-30]。

3.1.2 CD8⁺T细胞: IBD的发生发展与上皮内淋巴细胞含量也密切相关。外周血及肠黏膜固有层以CD4⁺T细胞占优势,而上皮内淋巴细胞(intraepithelial lymphocytes, IELs)90%以上是

CD3⁺的T细胞, 其中主要是CD8⁺T细胞, 而CD4⁺T细胞极少. 肠黏膜固有层中一部分CD8⁺T淋巴细胞可迁移至绒毛顶部附近形成IELs. CD8⁺T IEL群包括CD8 $\alpha\alpha$ 和CD8 $\alpha\beta$ T细胞, 可表达 $\gamma\delta$ 或 $\alpha\beta$ 受体. Natascha *et al*^[31]报道CD患者肠上皮内淋巴细胞对上皮来源的靶细胞的细胞溶解活动明显加强, CD8⁺IEL较正常人明显升高; CD患者T细胞表型和功能上的改变只限于肠黏膜的淋巴细胞, 而血液中T细胞的功能没有变化, IEL对肠组织的细胞溶解活动明显加强.

不同于CD4⁺T细胞促炎作用, $\gamma\delta$ T细胞在IBD的发生和发展过程中起保护调节作用^[32-35], 其一般均为CD8 $\alpha\alpha$. Inagaki-Ohara *et al*^[36]报道 $\gamma\delta$ T基因敲除小鼠能自发结肠炎, 其幼鼠表现出对TNBS诱导结肠炎的高度敏感性. Hoffmann *et al*^[37]把提取自野生型或IL-10转基因小鼠的 $\gamma\delta$ T细胞, 预防性转移至同类系TNBS诱导的结肠炎小鼠, 发现TNBS小鼠肠道和脾脏淋巴细胞分泌TNF- α 减少, IL-10和TGF- β 增加, 从而使小鼠生存时间延长, 组织损伤减轻. Kühl *et al*^[38]研究了在多种IBD动物模型中删除或敲除 $\gamma\delta$ T, 发现早期干预使黏膜固有层中淋巴细胞及脾细胞IFN- γ 分泌增加, 提示 $\gamma\delta$ T细胞在肠道炎症的早期发挥重要作用, 可能的机制是影响IFN- γ 分泌和上皮细胞再生. 另有研究表明 $\gamma\delta$ T细胞是细胞因子Th17的重要来源, 有细菌感染时, 可快速诱导Th17型反应, 保护肠黏膜^[39-40].

3.2 LH相关分子

3.2.1 MAdCAM-1: IBD中LH显著增强, 淋巴细胞及上皮细胞表面归巢相关分子表达也伴随增加, 其中最重要的是 $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1分子. 多种IBD动物模型中均能检测到显著增加的MAdCAM-1蛋白. 近年来开发出一种可增强超声成像的胶囊, 其内含有可与MAdCAM-1特异结合的微气泡(microbubbles, MB). Bachmann *et al*^[41]给SAMP1/Yit结肠炎小鼠服用此种胶囊后作腹部超声, 发现MB可聚集于肠道炎症部位, 产生显著增强的回声.

Souza *et al*^[42]以激惹性肠炎为对照组, 通过内窥镜及经口空肠活检取得CD和UC患者的结肠和空肠标本后, 做免疫组织染色并用计算机软件分析图像, 发现IBD患者 $\alpha 4\beta 7$ 整合素和MAdCAM-1表达水平显著增加; 日本学者Arihiro *et al*^[43]等收集CD(40例)和UC(24例)手术切除标本作冰冻切片, 用免疫组化技术分析也发现CD和UC炎症部位的黏膜中MAdCAM-1阳

性血管含量增加.

CD和UC患者炎症部位的肠黏膜中都含大量的MAdCAM-1阳性的血管, 并且在炎症部位的溃疡底部E-选择素表达相似, 但前者溃疡底部MAdCAM-1阳性的血管明显比后者丰富. MAdCAM-1阳性的血管在肠道深层表达, 主要在集合淋巴结, 是CD的特征之一. MAdCAM-1在CD中的广泛表达可导致肠道透壁性炎症^[43].

3.2.2 ICAM-1: 在UC急性期, 内皮细胞表达ICAM-1也明显增加^[44-46], 同时伴有其配体LFA-1表达增加, 提示其在炎症细胞进入病变组织过程中起重要作用. 有研究表明嗜酸性粒细胞在结肠的聚集依赖于 $\beta 2$ 整合素/ICAM-1而不是 $\alpha 4\beta 7$ ^[47], 在ICAM-1^{-/-}的小鼠, 嗜酸性粒细胞性的结肠炎表现明显缓解. 另外, ICAM-1基因的多态性与IBD的发病密切相关^[48-50].

3.2.3 趋化因子: CCL25/CCR9是生理条件下调节小肠LH的重要趋化因子, 随着CD炎症进展, CCL25和CCR9在调节小肠淋巴细胞归巢中的显著作用减弱. 针对CCL25和CCR9的靶向治疗只有在SAMP1/Yit小鼠模型疾病的早期有效, 提示在疾病后期非特异的炎症信号起主要作用^[51]. 在CD的炎症部位趋化因子Fractalkine(CX3CL1)表达增加, 其两种同质异型配体之一的T280M能影响克罗恩病的临床表现和发病部位^[52].

3.3 树突状细胞(dendritic cells, DC)与LH生理和炎症状态下的LH都与DC细胞密切相关, DC和T细胞的相互作用参与IBD的发病过程. Drakes *et al*^[53]通过输入CD45RBhiCD4⁺T细胞至重症联合免疫缺陷小鼠建立结肠炎模型, 分离结肠的DC细胞与同系基因型、同种异体基因型脾脏CD4⁺T细胞和自体结肠分离T细胞的免疫反应, 发现结肠DC与自体固有层的T细胞共同培养时所产生的IFN- γ 和IL-6数量显著高于与同系基因或同种异体基因型脾脏T细胞共同培养的含量. Hart *et al*^[54]用多色流式细胞计量术分析IBD患者黏膜固有层中DC细胞表面分子, 并用胞内染色分析DC在无外源性刺激下产生的细胞因子, 发现IBD时, DC细胞激活, 表面微生物识别受体上调并产生更多的促炎细胞因子. 与此相对应, Baumgart *et al*^[55]研究了活动性和非活动性IBD患者及其正常人类浆DC(PDC)和髓系DC(MDC), 观察到IBD急性期外周血中未成熟的DC细胞显著减少, 缓解期IBD患者PDC和MDC数量与正常对照组基本接近.

■相关报道

拮抗淋巴细胞归巢新药的临床应用需要特别小心, 有报道指出, 作用于 $\alpha 4$ 整合素的新药那他珠单抗(natalizumab), 可破坏了大脑的正常免疫监视功能, 导致JC-多瘤病毒属的感染, 引起进行性多病灶性脑白质病(PML).

■创新盘点

本文就淋巴细胞归巢(LH)相关淋巴细胞、LH相关分子、树突状细胞、及其在IBD作用等进行了综述,并对可影响IBD中LH的因素及如何拮抗LH治疗IBD进行了初步综述,介绍了目前研究进展情况和趋势,希望能为更深入的研究提供文献参考。

3.4 IBD中的白细胞募集 虽然CD和UC的发病机制和临床表现不全相同,但他们都有大量免疫细胞浸润肠道。在IBD中促炎症细胞因子的上调可导致血管黏附分子的表达增加,使炎症细胞持续浸润。与黏膜血管上的MAdCAM-1表达增加相对应,IBD患者中的炎症细胞可通过肠道特异的方式归巢至黏膜固有层。

一旦炎症已经建立,引导器官特异归巢到组织的信号的作用往往不及一般性的炎症相关过程所起的作用。对肠道共栖菌的免疫失调,过多的TLR配体和促炎细胞因子的持续过分泌能激活上皮和内皮细胞,因此能促进白细胞募集至肠黏膜间隙^[3]。激活的中性粒细胞能产生大量的超氧阴离子和活性氧(reactive oxygen species, ROS),这些分子具有很高的反应性,可以与细菌的细胞膜、核酸分子及蛋白质发生氧化还原反应,造成微生物的损伤和死亡。此外,ROS还可上调一些细胞因子及黏附分子如TNF- α 、IL-1、ICAM-1的表达水平,放大炎症效应。Yousefi *et al*^[56]最近发现嗜酸性粒细胞一种全新的呼吸爆发机制。嗜酸性粒细胞生理条件下在嗜酸细胞活化趋化因子的作用下在肠道黏膜固有层中维持较高基线水平。在IBD的炎症部位内毒素(lipopolysaccharide, LPS)、C5a等可与IL-5发挥协同作用,触发嗜酸性粒细胞瞬时弹射出线粒体DNA和阳离子蛋白,在胞外形成黏性网络捕获并在胞外杀灭细菌,同时造成自身组织损伤^[57]。

4 IBD中LH的影响因素

多种因素可通过作用于归巢受体、地址素等黏附分子的表达,从而影响肠道淋巴细胞的归巢进而影响IBD的病理和转归。

4.1 一些酶对黏附分子的活力有作用 N-乙酰葡萄糖胺-6-磺化酶对L-选择素的配体活力是必须的,前者又被表达于高内皮静脉的N-乙酰葡萄糖胺-6-O-磺基转移酶(N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase-1, GlcNAc6ST-1)催化,一旦缺乏,L-选择素的配体严重受损^[58-59]。在UC的急性期能诱导HEV样血管表达PNAd,这与编码GlcNAc6ST-1的基因转录增加相关,他能指导MECA-79表位的表达,提示通过为循环中的T细胞提供额外的黏附位置,GlcNAc6ST-1在UC的发病中起一定的作用。亦有研究指出表达于HEV的唾液酸蛋白,当其被一系列转糖酶和转磺酶作用后,才能够作为L-选择素的配体^[60]。

4.2 细胞因子 报道的最多的是TNF- α 细胞因子,Ando *et al*^[61]研究用TNF- α 刺激一种新的结肠上皮细胞株MJC-1,发现24 h内MAdCAM-1的表达量明显增加,并与TNF- α 呈剂量依赖性,同时淋巴细胞的黏附增加了2-6倍,其可运用MAdCAM-1抗体来抑制。诱导MAdCAM-1表达增加的信号通路包括:蛋白激酶C、酪氨酸激酶、P38丝裂原活化蛋白激酶和转录因子核因子NF- κ B。另有研究表明通过激活转录因子核因子NF- κ B, TNF- α 也能激活其他的细胞黏附分子:如E-选择素、ICAM-1和VCAM-1。LPS也能够刺激鼠小肠内ICAM-1、E及P-选择素的表达。

4.3 维生素D的衍生物 Stio *et al*^[62-64]的一系列研究表明,维生素D的衍生物(1,25-二羟维生素、DEB 1089、KH 1060、TX 527)能影响IBD中的LH相关分子的表达。其最新的研究发现无论是否和TNF- α 或LPS联合应用,维生素D的衍生物(1,25-二羟维生素D和EB 1089)均能显著降低IBD患者和正常人ICAM-1的表达,体外的细胞试验也得出相似的结论^[65]。

4.4 微生态制剂 Angulo *et al*^[65]通过手术在大鼠结肠中创造一段无粪流的肠段,用抗生素除去该肠段原有菌群后,植入来自炎症大鼠结肠的正常菌群,其是否含干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*, *L. casei*)作对照研究, TNBS诱导结肠炎,发现*L. casei*干酪能显著降低结肠淋巴细胞归巢,同时伴有ICAM-1表达明显降低。Okada *et al*^[67]报道给予DSS干预之前或之后,在饮水中添加费氏丙酸杆菌的提取物1,4-二羟基-2-萘甲酸(1,4-Dihydroxy-2-naphthoic acid, DHNA),均能提高DSS诱导IBD小鼠的存活率,改善炎症评分,并能显著缓解结肠部位增高的MAdCAM-1和 β 7-整合素阳性细胞数量。

4.5 超氧化物歧化酶 Seguí *et al*^[68]观察到TNBS诱导结肠炎大鼠,每天给予超氧化物歧化酶达13 mg/kg时,能显著降低结肠HEV内淋巴细胞的黏附,同时伴有内皮细胞VCAM-1表达明显降低。随后他们在IL-10基因敲除和DSS模型中也得到相似的结论^[69]。

5 拮抗淋巴细胞归巢治疗IBD

从CD的炎症环境可知针对Th1的细胞因子的抑制治疗是有益的。抗TNF的单抗英夫利昔(infliximab)在两个关键的临床实验中,已证明对CD患者有效并被美国FDA批准应用于临床。然而抗TNF- α 的治疗在UC中疗效较差,这进一

步突出了理解UC和CD之间不同的免疫病理机制的重要性. 其他一些作用于TNF的药物如CDP571、依那西普(etanercept)也在临床评估中. 其中CDP571对CD的效果与英夫利昔相似, 而依那西普在CD中的疗效有限. 相似的, 人们正满怀希望的探讨抗IL-12和抗IL-6治疗. IL-11是一种能增强肠上皮屏障功能且能抑制炎症细胞因子分泌的白介素, 但其作用仍在临床评估中.

抑制拥有CD和UC特征的破坏性免疫细胞的流入, 为IBD的治疗提供了另外的一个途径. 因为淋巴细胞募集是一个高度调节的过程, 所以潜在的可设计出有高度选择性的抗炎治疗方案. $\alpha 4\beta 7$ /MAdCAM-1和CCR9/CC25可作为小肠中CD的选择性靶点, 而对于UC可能需要更多的途径. Alicaforsen(ISIS 2302)是一种能抑制ICAM-1反义核苷酸^[70], 已证明在公开标签的研究中对UC有效, $\alpha 4\beta 7$ 的抑制物(MLN02, Millennium)和CCR9的抑制物(Traficet-EN, Chemocentryx)对CD的作用也在评估中. 这些药物的应用不仅有益于IBD患者, 也有助于正罹患原发性硬化性胆管炎等肠外疾病的患者.

6 结论

肠道LH是多种黏附分子参与、多步骤的反应过程, 其对肠免疫屏障的平衡有重要意义, 并且是IBD重要发病机制之一. 因此通过干预淋巴细胞归巢为该疾病提供了新的治疗途径. 相信随着分子生物学和临床药理学研究的进展, 必将推进这一重要领域的深入研究.

7 参考文献

- Gowans JL, Knight EJ. The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1964; 159: 257-282
- Marchesi VT, Gowans JL. The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: an electron microscope study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1964; 159: 283-290
- Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 521-533
- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 417-429
- Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272: 60-66
- Salmi M, Jalkanen S. Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment. *Immunol Rev* 2005; 206: 100-113
- Sackstein R. The lymphocyte homing receptors: gatekeepers of the multistep paradigm. *Curr Opin Hematol* 2005; 12: 444-450
- Mora JR, von Andrian UH. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol* 2006; 27: 235-243
- Marelli-Berg FM, Cannella L, Dazzi F, Mirenda V. The highway code of T cell trafficking. *J Pathol* 2008; 214: 179-189
- Marelli-Berg FM, Okkenhaug K, Mirenda V. A two-signal model for T cell trafficking. *Trends Immunol* 2007; 28: 267-273
- Krüger K, Mooren FC. T cell homing and exercise. *Exerc Immunol Rev* 2007; 13: 37-54
- Tanaka T, Umemoto E, Miyasaka M. [Lymphocyte trafficking and immunosurveillance] *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* 2006; 29: 359-371
- Sperandio M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J* 2006; 273: 4377-4389
- Kim CH. The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond. *Curr Opin Hematol* 2005; 12: 298-304
- Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006; 354: 610-621
- Bono MR, Elgueta R, Sauma D, Pino K, Osorio F, Michea P, Fierro A, Roseblatt M. The essential role of chemokines in the selective regulation of lymphocyte homing. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18: 33-43
- Schaerli P, Moser B. Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic. *Immunol Res* 2005; 31: 57-74
- Stein JV, Nombela-Arrieta C. Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* 2005; 116: 1-12
- Bromley SK, Mempel TR, Luster AD. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat Immunol* 2008; 9: 970-980
- Hosoe N, Miura S, Watanabe C, Tsuzuki Y, Hokari R, Oyama T, Fujiyama Y, Nagata H, Ishii H. Demonstration of functional role of TECK/CCL25 in T lymphocyte-endothelium interaction in inflamed and uninfamed intestinal mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G458-G466
- Matsuzaki K, Tsuzuki Y, Matsunaga H, Inoue T, Miyazaki J, Hokari R, Okada Y, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Matsumoto S, Miura S. In vivo demonstration of T lymphocyte migration and amelioration of ileitis in intestinal mucosa of SAMP1/Yit mice by the inhibition of MAdCAM-1. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 22-31
- Teramoto K, Miura S, Tsuzuki Y, Hokari R, Watanabe C, Inamura T, Ogawa T, Hosoe N, Nagata H, Ishii H, Hibi T. Increased lymphocyte trafficking to colonic microvessels is dependent on MAdCAM-1 and C-C chemokine mLAR/CCL20 in DSS-induced mice colitis. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 421-428
- Furuta S, Kagami S, Tamachi T, Ikeda K, Fujiwara M, Suto A, Hirose K, Watanabe N, Saito Y, Iwamoto I, Nakajima H. Overlapping and distinct roles of STAT4 and T-bet in the regulation of T cell differentiation and allergic airway inflammation. *J Immunol* 2008; 180: 6656-6662
- Thieu VT, Yu Q, Chang HC, Yeh N, Nguyen ET, Sehra S, Kaplan MH. Signal transducer and activator of transcription 4 is required for the transcription factor T-bet to promote T helper 1 cell fate determination. *Immunity* 2008; 29: 679-690
- Parrello T, Monteleone G, Cucchiara S, Monteleone

■应用要点

相信随着分子生物学和临床药理学研究的进展, 更深入地了解肠道淋巴细胞黏附、归巢的分子机制, 及其影响因素, 可通过干预淋巴细胞归巢为炎症性肠病(IBD)及相类似的疾病提供有效并且可靠的治疗途径.

同行评价

本文条理清晰, 文字通顺, 学术价值较好.

- I, Sebkova L, Doldo P, Luzzo F, Pallone F. Up-regulation of the IL-12 receptor beta 2 chain in Crohn's disease. *J Immunol* 2000; 165: 7234-7239
- 26 Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 390-400
- 27 Yamamoto-Furusho JK, Uscanga-Dominguez L, Lopez-Martinez A, Granados J. Association of the HLA-DRB1*0701 allele with perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in Mexican patients with severe ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 1617-1620
- 28 Panani AD, Grigoriadou M, Magira E, Roussos C, Raptis SA. Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibody myeloperoxidase-positive vasculitis in association with ulcerative colitis. *Clin Rheumatol* 2006; 25: 35-37
- 29 Heller F, Florian P, Bojarski C, Richter J, Christ M, Hillenbrand B, Mankertz J, Gitter AH, Bürgel N, Fromm M, Zeitz M, Fuss I, Strober W, Schulzke JD. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology* 2005; 129: 550-564
- 30 Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497
- 31 Nüssler NC, Stange B, Hoffman RA, Schraut WH, Bauer AJ, Neuhaus P. Enhanced cytolytic activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in patients with Crohn's disease. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385: 218-224
- 32 Hirsh ML, Junger WG. Roles of heat shock proteins and gamma delta T cells in inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 39: 509-513
- 33 Kistowska M, Rossy E, Sansano S, Gober HJ, Landmann R, Mori L, De Libero G. Dysregulation of the host mevalonate pathway during early bacterial infection activates human TCR gamma delta cells. *Eur J Immunol* 2008; 38: 2200-2209
- 34 Casetti R, Martino A. The plasticity of gamma delta T cells: innate immunity, antigen presentation and new immunotherapy. *Cell Mol Immunol* 2008; 5: 161-170
- 35 Girardi M. Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 25-31
- 36 Inagaki-Ohara K, Chinen T, Matsuzaki G, Sasaki A, Sakamoto Y, Hiromatsu K, Nakamura-Uchiyama F, Nawa Y, Yoshimura A. Mucosal T cells bearing TCRgammadelta play a protective role in intestinal inflammation. *J Immunol* 2004; 173: 1390-1398
- 37 Hoffmann JC, Pawlowski NN, Grollich K, Loddenkemper C, Zeitz M, Kühl AA. Gammadelta T lymphocytes: a new type of regulatory T cells suppressing murine 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 909-920
- 38 Kühl AA, Pawlowski NN, Grollich K, Loddenkemper C, Zeitz M, Hoffmann JC. Aggravation of intestinal inflammation by depletion/deficiency of gammadelta T cells in different types of IBD animal models. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 168-175
- 39 Roark CL, Simonian PL, Fontenot AP, Born WK, O'Brien RL. gammadelta T cells: an important source of IL-17. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 353-357
- 40 Dalton JE, Cruickshank SM, Egan CE, Mears R, Newton DJ, Andrew EM, Lawrence B, Howell G, Else KJ, Gubbels MJ, Striemen B, Smith JE, White SJ, Carding SR. Intraepithelial gammadelta+ lymphocytes maintain the integrity of intestinal epithelial tight junctions in response to infection. *Gastroenterology* 2006; 131: 818-829
- 41 Bachmann C, Klibanov AL, Olson TS, Sonnenschein JR, Rivera-Nieves J, Cominelli F, Ley KF, Lindner JR, Pizarro TT. Targeting mucosal addressin cellular adhesion molecule (MAdCAM)-1 to noninvasively image experimental Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006; 130: 8-16
- 42 Souza HS, Elia CC, Spencer J, MacDonald TT. Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, alpha4beta7/MAdCAM-1 and OX40/OX40 ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1999; 45: 856-863
- 43 Arihiro S, Ohtani H, Suzuki M, Murata M, Ejima C, Oki M, Kinouchi Y, Fukushima K, Sasaki I, Nakamura S, Matsumoto T, Torii A, Toda G, Nagura H. Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Pathol Int* 2002; 52: 367-374
- 44 Gulubova MV, Manolova IM, Vlaykova TI, Prodanova M, Jovchev JP. Adhesion molecules in chronic ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2007; 22: 581-589
- 45 Vainer B. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ulcerative colitis: presence, visualization, and significance. *Inflamm Res* 2005; 54: 313-327
- 46 Papa A, Danese S, Urgesi R, Grillo A, Guglielmo S, Roberto I, Semeraro S, Scaldaferrì F, Pola R, Flex A, Fedeli G, Gasbarrini G, Pola P, Gasbarrini A. Intercellular adhesion molecule 1 gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2004; 8: 187-191
- 47 Forbes E, Hulett M, Ahrens R, Wagner N, Smart V, Matthaei KI, Brandt EB, Dent LA, Rothenberg ME, Tang M, Foster PS, Hogan SP. ICAM-1-dependent pathways regulate colonic eosinophilic inflammation. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 330-341
- 48 Ozen SC, Dagli U, Kiliç MY, Törtüner M, Celik Y, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. NOD2/CARD15, NOD1/CARD4, and ICAM-1 gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2006; 41: 304-310
- 49 Hong J, Leung E, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. Polymorphisms in NFKBIA and ICAM-1 genes in New Zealand Caucasian Crohn's disease patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1666-1670
- 50 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
- 51 Rivera-Nieves J, Ho J, Bamias G, Ivashkina N, Ley K, Oppermann M, Cominelli F. Antibody blockade of CCL25/CCR9 ameliorates early but not late chronic murine ileitis. *Gastroenterology* 2006; 131: 1518-1529
- 52 Brand S, Hofbauer K, Dambacher J, Schnitzler F, Staudinger T, Pfennig S, Seiderer J, Tillack

- C, Konrad A, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P. Increased expression of the chemokine fractalkine in Crohn's disease and association of the fractalkine receptor T280M polymorphism with a fibrostenosing disease Phenotype. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 99-106
- 53 Drakes ML, Blanchard TG, Czinn SJ. Colon lamina propria dendritic cells induce a proinflammatory cytokine response in lamina propria T cells in the SCID mouse model of colitis. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1291-1300
- 54 Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA, Stagg AJ. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2005; 129: 50-65
- 55 Baumgart DC, Metzke D, Schmitz J, Scheffold A, Sturm A, Wiedenmann B, Dignass AU. Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells. *Gut* 2005; 54: 228-236
- 56 Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozlowski E, Schmid I, Straumann A, Reichenbach J, Gleich GJ, Simon HU. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* 2008; 14: 949-953
- 57 Nizet V, Rothenberg ME. Mitochondrial missile defense. *Nat Med* 2008; 14: 910-912
- 58 Kawashima H, Petryniak B, Hiraoka N, Mitoma J, Huckaby V, Nakayama J, Uchimura K, Kadomatsu K, Muramatsu T, Lowe JB, Fukuda M. N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferases 1 and 2 cooperatively control lymphocyte homing through L-selectin ligand biosynthesis in high endothelial venules. *Nat Immunol* 2005; 6: 1096-1104
- 59 Uchimura K, Kadomatsu K, El-Fasakhany FM, Singer MS, Izawa M, Kannagi R, Takeda N, Rosen SD, Muramatsu T. N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase-1 regulates expression of L-selectin ligands and lymphocyte homing. *J Biol Chem* 2004; 279: 35001-35008
- 60 Suzawa K, Kobayashi M, Sakai Y, Hoshino H, Watanabe M, Harada O, Ohtani H, Fukuda M, Nakayama J. Preferential induction of peripheral lymph node addressin on high endothelial venule-like vessels in the active phase of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1499-1509
- 61 Ando T, Jordan P, Wang Y, Itoh M, Joh T, Sasaki M, Elrod JW, Carpenter A, Jennings MH, Minagar A, Alexander JS. MAdCAM-1 expression and regulation in murine colonic endothelial cells in vitro. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 258-264
- 62 Stio M, Martinesi M, Bruni S, Treves C, d'Albasio G, Bagnoli S, Bonanomi AG. Interaction among vitamin D(3) analogue KH 1060, TNF-alpha, and vitamin D receptor protein in peripheral blood mononuclear cells of inflammatory bowel disease patients. *Int Immunopharmacol* 2006; 6: 1083-1092
- 63 Stio M, Martinesi M, Bruni S, Treves C, Mathieu C, Verstuyf A, d'Albasio G, Bagnoli S, Bonanomi AG. The Vitamin D analogue TX 527 blocks NF-kappaB activation in peripheral blood mononuclear cells of patients with Crohn's disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103: 51-60
- 64 Stio M, Treves C, Martinesi M, d'Albasio G, Bagnoli S, Bonanomi AG. Effect of anti-TNF therapy and vitamin D derivatives on the proliferation of peripheral blood mononuclear cells in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 328-335
- 65 Martinesi M, Treves C, d'Albasio G, Bagnoli S, Bonanomi AG, Stio M. Vitamin D derivatives induce apoptosis and downregulate ICAM-1 levels in peripheral blood mononuclear cells of inflammatory bowel disease patients. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 597-604
- 66 Angulo S, Llopis M, Antolín M, Gironella M, Sans M, Malagelada JR, Piqué JM, Guarner F, Panés J. Lactobacillus casei prevents the upregulation of ICAM-1 expression and leukocyte recruitment in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 291: G1155-G1162
- 67 Okada Y, Tsuzuki Y, Miyazaki J, Matsuzaki K, Hokari R, Komoto S, Kato S, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Watanabe T, Miura S. Propionibacterium freudenreichii component 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (DHNA) attenuates dextran sodium sulphate induced colitis by modulation of bacterial flora and lymphocyte homing. *Gut* 2006; 55: 681-688
- 68 Seguí J, Gironella M, Sans M, Granell S, Gil F, Gimeno M, Coronel P, Piqué JM, Panés J. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 537-544
- 69 Seguí J, Gil F, Gironella M, Alvarez M, Gimeno M, Coronel P, Closa D, Piqué JM, Panés J. Down-regulation of endothelial adhesion molecules and leukocyte adhesion by treatment with superoxide dismutase is beneficial in chronic immune experimental colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 872-882
- 70 Philpott JR, Miner PB Jr. Antisense inhibition of ICAM-1 expression as therapy provides insight into basic inflammatory pathways through early experiences in IBD. *Expert Opin Biol Ther* 2008; 8: 1627-1632

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

奥曲肽对SGC-7901胃癌细胞中Fas, FasL及P53表达的影响

唐卓斌, 杜楠, 房殿春

■背景资料

奥曲肽(OCT)是近年人工合成的一种长效八肽生长抑素类似物,其分子结构为一环形肽,具有活性的四个氨基酸排列顺序与SS相同,OTC的生物活性明显强于SS,且作用时间更加持久。目前OTC主要应用于消化系统疾病和多种内分泌肿瘤的治疗。临床和基础大量研究均表明,OTC不仅能抑制多种内分泌激素分泌,而且具有抑制肿瘤增殖的功能,他对肿瘤细胞的抑制作用正受到越来越多的重视。

唐卓斌, 中国人民解放军第二五四医院干三科 天津市 300142

杜楠, 中国人民解放军总医院第一附属医院肿瘤内科 北京市 100037

房殿春, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心 重庆市 400038

作者贡献分布: 此课题由唐卓斌, 杜楠及房殿春设计; 研究过程由唐卓斌与杜楠操作完成; 数据分析由唐卓斌与杜楠完成; 本文写作由唐卓斌完成。

通讯作者: 唐卓斌, 300142, 天津市, 中国人民解放军第二五四医院干三科。tang_zhuo_bin@126.com

电话: 022-84683062

收稿日期: 2008-09-09 修回日期: 2009-02-06

接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-08

Effects of octreotide on expression of Fas, FasL and P53 in human gastric cancer SGC-7901 cells

Zhuo-Bin Tang, Nan Du, Dian-Chun Fang

Zhuo-Bin Tang, Department of Third Cadre Ward, the 254th Hospital of Chinese PLA, Tianjin 300142, China

Nan Du, Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100037, China

Dian-Chun Fang, Gastroenterology Research Center, Southwest Hospital, the Third Military Medical University of Chinese PLA, Chongqing 400038, China

Correspondence to: Zhuo-Bin Tang, Department of Third Cadre Ward, the 254th Hospital of Chinese PLA, Tianjin 300142, China. tang_zhuo_bin@126.com

Received: 2008-09-09 Revised: 2009-02-06

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To investigate whether OCT affects the expression of Fas, FasL, P53, P21, P27 and c-Myc in SGC-7901 HGC cells.

METHODS: Expression percentage of Fas, FasL, P53, P21, P27, c-Myc-positive cells and G₀/G₁, S, G₂/M stage were detected by using flow cytometry (FCM) with or without OCT treatment. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and FCM in SGC-7901 HGC cells were applied to evaluate the mRNA and protein expression levels of Fas, FasL, P53, P21, P27 and c-Myc in SGC-7901 HGC cells treated with and

without OCT.

RESULTS: After treatment with 1×10^{-7} mol/L OCT for 6, 12, 24, 48 h, although P53 mRNA expression was significantly decreased, Fas and FasL mRNA expression were both significantly increased in SGC-7901 HGC cells. However, P21, P27 and c-Myc mRNA expression did not significantly change in SGC-7901 HGC cells with or without OCT treatment. The relative intensity of Fas and FasL protein expression were also enhanced, but the relative intensity of P53 protein expression was decreased in SGC-7901 HGC cells (5.5 ± 0.3 vs 3.2 ± 0.1 , 5.1 ± 0.3 vs 4.5 ± 0.1 , 3.3 ± 0.2 vs 4.9 ± 0.3 , $P < 0.05$ or 0.01). The relative intensity of P21, P27 and c-myc protein expression did not change. However, G₀/G₁, S, G₂/M stage did not significantly change in SGC-7901 HGC cells with or without OCT treatment.

CONCLUSION: Our data suggest that OCT leading to apoptosis is associated with down-regulation of mutant-type P53 and up-regulation of Fas and FasL in SGC-7901 HGC cells.

Key Words: Stomach neoplasm; Apoptosis; Octreotide; Fas; FasL; P53; Reverse transcription-polymerase chain reaction; Flow cytometry

Tang ZB, Du N, Fang DC. Effects of octreotide on expression of Fas, FasL and P53 in human gastric cancer SGC-7901 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 694-698

摘要

目的: 探讨奥曲肽(OCT)对胃癌细胞SGC-7901中Fas, FasL, P53, P21, P27和c-Myc表达的影响。

方法: 流式细胞术和RT-PCR法分别用于检测经OCT(1×10^{-7} mol/L)处理前后胃癌细胞SGC-7901中Fas, FasL, P53, P21, P27, c-Myc阳性癌百分率、mRNA表达和蛋白表达及细胞周期G₀/G₁、S、G₂/M的变化。

结果: 胃癌细胞SGC-7901经OCT诱导6、12、

■同行评议者

关玉盘, 教授, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科; 葛海燕, 教授, 同济大学附属第十人民医院普通外科

24和48 h后, Fas和FasL mRNA表达均明显增加, P53 mRNA表达则显著减少, 而P21, P27和c-Myc mRNA表达均无明显变化; 胃癌细胞SGC-7901经OCT诱导12 h后, Fas和FasL蛋白相对表达强度也显著增加, P53蛋白相对表达强度则明显降低(5.5 ± 0.3 vs 3.2 ± 0.1 , 5.1 ± 0.3 vs 4.5 ± 0.1 , 3.3 ± 0.2 vs 4.9 ± 0.3 , $P < 0.05$ 或 0.01), 而P21, P27和c-Myc蛋白相对表达强度均无明显改变. 细胞周期G₀/G₁、S、G₂/M在OCT处理前后的变化并不明显.

结论: OCT能上调SGC-7901胃癌细胞中Fas和FasL表达, 下调突变型p53表达, 是其诱导凋亡作用的重要机制之一.

关键词: 胃肿瘤; 凋亡; 奥曲肽; Fas; FasL; P53; 逆转录多聚酶链反应; 流式细胞术

唐卓斌, 杜楠, 房殿春. 奥曲肽对SGC-7901胃癌细胞中Fas, FasL及P53表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 694-698
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/694.asp>

0 引言

奥曲肽(octreotide, OCT)是近年人工合成的一种长效八肽生长抑素类似物, 其分子结构为一环形肽, 具有活性的四个氨基酸排列顺序与SS相同, OCTC的生物学活性明显强于SS, 且作用时间更加持久. 目前OTC主要应用于消化系统疾病和多种内分泌肿瘤的治疗. 临床和基础大量研究均表明, OTC不仅能抑制多种内分泌激素分泌, 而且具有抑制肿瘤增殖的功能, 他对肿瘤细胞的抑制作用正受到越来越多的重视^[1-6]. 我们以前的研究发现OTC可抑制人胃癌细胞株SGC-7901的生长并可诱导其凋亡^[7], 但其抗凋亡机制目前仍不清楚. 为此, 我们就OTC对胃癌细胞SGC-7901中Fas, FasL, p53, p21, p27和c-myc基因的调控作用进行了研究.

1 材料和方法

1.1 材料 OTC由瑞士Sandoz药厂惠赠, 人胃癌细胞株SGC-7901为中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化内科中心冻存细胞. 37℃水浴快速复苏后, 加入5 mL含100 mL/L小牛血清, 100 U/mL链霉素和青霉素的RPMI 1640培养液中, 置37℃、50 mL/L CO₂的环境中培养. 总RNA提取试剂盒(Tripure™ Isolation Reagent)为德国Boehringer Mannheim(B.M)公司产品, RT-PCR检测试剂盒(Access RT-PCR system,

A1250)为美国Promega公司产品, DNA Marker为上海华美公司产品. Fas引物序列: F: 5'-GACCCAGAATACCAAGTGCAGATGTA-3' R: 5'-CTGTTTCAGGATTTAAGGTTGGAGATT-3', 产物长度296 bp. FasL引物序列: F: 5'-CTGGGATGTTTCAGCTCTTC-3', R: 5'-CTTCACTCAGAAAGCAGGAC-3' 产物长度304 bp. p53引物序列: F: 5'-TTGGATCCATGTTTTGCCAACTGGCC-3', R: 5'-TTGAATTCAGGCTCCCCTTTCTTGCG-3', 产物长度489 bp. p21引物序列: F: 5'-CTCAGAGGAGGCGCCATG-3', R: 5'-GGGCGGATTAGGGCTTCC-3', 产物长度517 bp. p27引物序列: F: 5'-AGGATGTCAGCGGGAGCCG-3', R: 5'-CTTCTTGGGCGTCTGCTCCA-3', 产物长度250 bp. c-myc引物序列: F: 5'-CCAGGACTGTATGTGGAGCG-3', R: 5'-CCTGAGGACCAGTGGGCTGT-3', 产物长度505 bp. 看家基因GAPDH引物序列: F: 5'-CCACCCATGGCAAATCCATGGCA-3', R: 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCAC-3', 产物长度598 bp. 所有引物均由上海Sangon公司合成, PAGE纯化.

1.2 方法

1.2.1 反转录聚合酶链反应(RT-PCR): 选择对数生长期SGC-7901细胞, 以 4.5×10^8 个/L浓度接种于6孔培养板中, 每孔1.5 mL, 待其生长至对数生长期, 每孔加入终浓度为 1×10^{-7} mol/L的OTC, 继续无血清培养6、12、24、48 h. 设未经OTC(1×10^{-7} mol/L)处理的胃癌细胞为空白对照. RNA提取采用Tripure提取液(宝灵曼公司), 按宝灵曼RNA提取试剂盒说明书操作. RT-PCR采用一步一管法, 反应体系为: 总体积25 μL, 5 × Buffer 5 μL、MgSO₄ 1 μL、dNTP 0.5 μL、Primer mix 1.5 μL、AMV 0.5 μL、Tfl 0.5 μL、模板RNA 1 μL, 加灭菌水至终体积25 μL. 2400型PCR仪(美国Perkin-Elmer公司产品)扩增反应参数为: 首先将RNA反转录成cDNA, 于94℃变性2 min后, 开始PCR的热循环: 94℃变性30 s, 60℃退火40 s, 68℃延伸1 min, 共35个循环; 最后68℃延伸7 min. 用GAPDH作为外参照物. PCR产物在15 g/L琼脂糖凝胶上电泳. 电泳结果经Gel Doc 100型成像仪(美国Bio-Rad公司产品)输入电脑, 应用四星SX-100图象分析软件(上海四星生物技术实业有限公司产品), 对条带进行吸光度峰值下面积积分, 各个目的基因与其相应的GAPDH积分之比, 即为该目的基因mRNA相对水平.

■ 研发前沿

诱导细胞凋亡可能是OCT杀伤肿瘤细胞的途径之一, 但其具体机制尚不清楚.

■相关报道

张青云 *et al* 发现胃癌细胞SGC-7901第6外显子204位密码子由GAG-GCG, 使编码的Glu变成Ala. 即SGC-7901的第6个外显子发生了点突变及缺失, 因而可使其表达的P53蛋白结构发生变化, 野生型P53丧失了功能.

表 1 OCT对SGC-7901细胞中Fas、FasL和P53蛋白表达的影响 (% , mean \pm SD)

OCT (mol/L)	Fas		FasL		P53	
	阳性率	相对强度	阳性率	相对强度	阳性率	相对强度
0	53.4 \pm 5.2	3.2 \pm 0.1	64.2 \pm 2.2	4.5 \pm 0.1	60.8 \pm 5.2	4.9 \pm 0.3
1 $\times 10^{-7}$	70.6 \pm 6.7 ^b	5.5 \pm 0.3 ^b	71.8 \pm 2.9 ^a	5.1 \pm 0.3	48.6 \pm 4.8 ^a	3.3 \pm 0.2 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 0 mol/L OCT.

表 2 OCT对SGC-7901细胞中P21、P27和c-Myc蛋白表达的影响 (% , mean \pm SD)

OCT (mol/L)	P21		P27		c-Myc	
	阳性率	相对强度	阳性率	相对强度	阳性率	相对强度
0	65.4 \pm 6.5	4.7 \pm 0.1	60.7 \pm 2.6	5.4 \pm 0.3	72.6 \pm 8.5	4.2 \pm 0.4
1 $\times 10^{-7}$	68.2 \pm 5.7	5.1 \pm 0.2	63.8 \pm 3.1	4.9 \pm 0.1	70.1 \pm 7.4	3.8 \pm 0.2

1.2.2 流式细胞术分析: 消化收集经OTC(1 $\times 10^{-7}$ mol/L)作用12 h后的SGC-7901细胞, PBS清洗两次, 加入1:100稀释的一抗100 μ L, 在37 $^{\circ}$ C恒温水浴中温育30 min, PBS洗2次, 然后加入1:20稀释的FITC标记的二抗100 μ L, 37 $^{\circ}$ C水浴30 min, PBS洗2次, 离心去上清, 除去未结合的多余荧光抗体. 加入1.0 mL PBS, 经200目滤网过滤, 上机检测. 测量数据及图形输入计算机, 应用相应程序软件进行资料处理, 测定前以鸡血红细胞标准样品调整仪器的CV值在5%以内. 设未经OTC(1 $\times 10^{-7}$ mol/L)处理的胃癌细胞为空白对照.

1.2.3 流式细胞仪检测胃癌细胞凋亡: 消化收集经OTC(1 $\times 10^{-7}$ mol/L)诱导6、12、24 h后的胃癌细胞, 细胞用PBS清洗两次, 加入700 mL/L冷乙醇固定24 h以上(4 $^{\circ}$ C). 随后清洗细胞, 与含1 g/L RNA酶的PBS缓冲液(pH7.4)200 μ L(含4% Triton X-100)共同孵育(37 $^{\circ}$ C)30 min. 然后用碘丙锭(PI)400 μ L作细胞DNA染色, 暗处15 min或4 $^{\circ}$ C过夜. 200目尼龙膜过滤. 应用流式细胞仪FACS 420(美国BD公司)检测, 观察是否存在凋亡细胞并测定其含量, 设未经OTC(1 $\times 10^{-7}$ mol/L)处理的胃癌细胞为空白对照. 所有资料均经Iysis II软件收集, 储存和分析.

统计学处理 实验数据以mean \pm SD表示, 组间比较行 t 检验.

2 结果

2.1 胃癌细胞中Fas, FasL, *p53*, *p21*, *p27*和*c-myc* mRNA表达水平的变化 经RT-PCR检测, 在胃癌细胞SGC-7901中均发现有Fas, FasL, *p53*, *p21*,

*p27*和*c-myc*产物的出现. 胃癌细胞SGC-7901经OCT诱导6、12、24和48 h后, Fas和FasL mRNA表达均明显增加, *p53* mRNA表达则显著减少, 而*p21*, *p27*和*c-myc* mRNA表达均无明显变化(图1).

2.2 胃癌细胞中Fas, FasL, P53, P21, P27和c-Myc蛋白阳性细胞比例的变化 胃癌细胞SGC-7901经OCT诱导12 h后, Fas和FasL蛋白阳性细胞比例明显增加, P53蛋白阳性细胞比例则显著降低, 与OCT处理前相比均有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$, 表1), 但P21, P27和c-Myc蛋白阳性细胞比例在OCT处理前后的变化并不明显, 未显示显著性差异($P > 0.05$, 表2).

2.3 胃癌细胞中Fas, FasL, P53, P21, P27和c-Myc蛋白表达强度的变化 胃癌细胞SGC-7901经OCT诱导12 h后, Fas和FasL蛋白相对表达强度均显著增加, 而P53蛋白相对表达强度则显著减少, 与OCT处理前相比均有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$, 表1), 而P21, P27和c-Myc蛋白相对表达强度在胃癌细胞SGC-7901中的改变不明显, 与OCT处理前相比均无显著性差异($P > 0.05$, 表2).

2.4 OCT对胃癌细胞SGC-7901周期分布的影响 经流式细胞术检测, 1 $\times 10^{-7}$ mol/L的OCT作用SGC-7901细胞12 h后, 各细胞周期G₀/G₁、S、G₂/M均无明显变化, 与OCT处理前相比均无显著性差异($P > 0.05$, 表3).

3 讨论

诱导细胞凋亡可能是OCT杀伤肿瘤细胞的途径之一, 但其具体机制尚不清楚. 为此, 我们就OCT对胃癌细胞SGC-7901中凋亡及细胞周期相关基因的调控作用进行了研究. Fas/FasL信号传

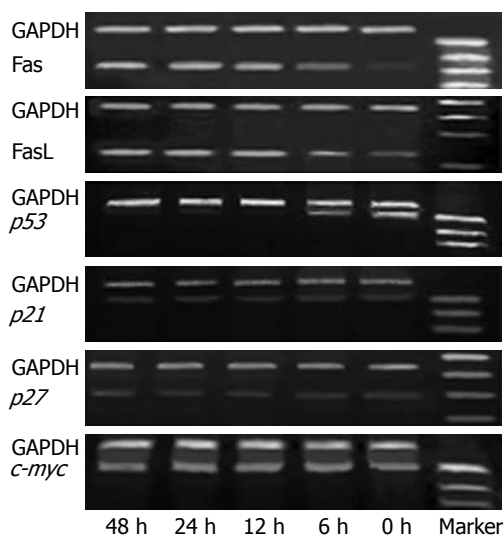


图 1 OCT对胃癌细胞SGC-7901中Fas, FasL, *p53*, *p21*, *p27*和*c-myc* mRNA表达的影响。

导途径是一个独特的凋亡途径。目前认为FasL是死亡因子, 而Fas抗原是他的受体, Fas与FasL的结合抗Fas抗体交联Fas, 可诱导表达Fas的靶细胞凋亡^[8-9]。人类某些肿瘤细胞常常异常高表达Fas抗原, 但对于不表达或低表达Fas抗原的肿瘤细胞也可以通过某些细胞因子^[10], 诱导其表达或增量表达。有研究表明胃癌细胞上Fas受体表达的量低于正常的胃组织, 胃癌细胞从基因水平下调Fas分子的表达^[11], 从而逃避机体Fas/FasL系统的监控, 细胞凋亡受抑制, 使得胃癌细胞不断增殖。如果使肿瘤细胞的Fas表达上调, 可恢复肿瘤细胞对Fas/FasL介导的凋亡的敏感性。本实验的结果显示OCT不仅可使SGC-7901细胞中的Fas mRNA和蛋白表达增加, 而且还可使FasL mRNA和蛋白表达显著增加。结果提示OCT可通过上调Fas和FasL基因的mRNA和蛋白表达, 以诱导SGC-7901细胞凋亡。

目前认为, 在诱导凋亡过程中, *p53*和*c-myc*有协同作用^[12]。在许多肿瘤中, *c-myc*的高表达和*p53*功能缺失共存^[13]。张青云 *et al*发现胃癌细胞SGC-7901第6外显子204位密码子由GAG-GCG, 使编码的Glu变成Ala。即SGC-7901的第6个外显子发生了点突变及缺失, 因而可使其表达的P53蛋白结构发生变化, 野生型*p53*丧失了功能^[14]。有研究表明突变型*p53*不但失去了抑癌功能, 而且还能促进细胞异常生长, 并能阻止细胞凋亡^[13,15-17]。我们发现胃癌细胞SGC-7901经OCT处理后, 突变型*p53*表达明显减少, 而*c-myc*表达无明显变化。本实验结果提示在胃癌细胞SGC-7901中, 失去了*p53*和*c-myc*在诱导凋亡过程中的协同作用,

表 3 OCTSGC-7901细胞周期分布的影响 (% , mean \pm SD)

OCT (mol/L)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	66.2 \pm 6.7	15.4 \pm 1.5	18.3 \pm 2.0
1 \times 10 ⁻⁷	72.0 \pm 7.4	15.0 \pm 1.9	12.9 \pm 2.2

OCT可通过下调突变型*p53*表达, 抑制胃癌细胞SGC-7901生长, 促进细胞凋亡。

*p53*和*c-myc*都是半衰期很短的转录因子, 前者对细胞周期负调控, 使细胞阻滞于G₁期, 而后者则正调控, 可取消*p53*诱导的G₁期阻滞, 从而促进细胞进入增殖周期, 两者的作用是对立的^[18]。*p27*能抑制cyclinD1/CDK4功能, 从而阻滞G₁期^[15]。含野生型*p53*的细胞, 在DNA受到损伤时, 此信号传递给P53, 表现为P53蛋白的升高。P53蛋白启动*p21*的转录, 又使P21蛋白迅速升高。*p21*是细胞周期内通用性抑制物, 通过抑制CDK的激活, 导致G₁期阻滞, 使细胞赢得时间, 在进入S期之前修复损伤的DNA^[19-20]。当*p53*突变时, 其促进*p21*转录的功能丧失, 从而使细胞不能阻滞于G₁期以修复损伤的DNA。有报告OCT不引起癌细胞G₁期阻滞, 与OCT不能诱导*p21*、pRb、*c-myc*有关^[21-22]。这与我们的研究结果一致。

总之, OCT可通过上调Fas和FasL表达, 下调突变型*p53*表达, 诱导SGC-7901细胞凋亡, 抑制细胞生长。OCT诱导SGC-7901细胞凋亡并不需要G₁期阻滞, 这与OCT不能诱导*p21*、pRb、*c-myc*有关。这可能是OCT诱导细胞凋亡和抑制细胞生长的重要机制之一, 为OCT应用到临床治疗胃癌提供了新的思路和实验依据。

4 参考文献

- Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. Octreotide. *N Engl J Med* 1996; 334: 246-254
- Kath R, Höffken K. The significance of somatostatin analogues in the antiproliferative treatment of carcinomas. *Recent Results Cancer Res* 2000; 153: 23-43
- Zou Y, Xiao X, Li Y, Zhou T. Somatostatin analogues inhibit cancer cell proliferation in an SSTR2-dependent manner via both cytostatic and cytotoxic pathways. *Oncol Rep* 2009; 21: 379-386
- Ferrante E, Pellegrini C, Bondioni S, Peverelli E, Locatelli M, Gelmini P, Luciani P, Peri A, Mantovani G, Bosari S, Beck-Peccoz P, Spada A, Lania A. Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 955-962
- Wang JH, Xing QT, Yuan MB. Antineoplastic effects of octreotide on human gallbladder cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1043-1046
- 张利, 于红刚, 于皆平, 罗和生. 奥曲肽联合wort-

■同行评价

本研究方法较成熟, 语言流畅, 但是该论文只是研究了胃癌细胞株SGC-7901的变化, 如果能检测临床上胃癌患者的相关变化, 则更加有说服力。

- mannin对人胃癌细胞BGC-823生长抑制作用的研究. 中国实用内科杂志 2008; 28: 180-183
- 7 唐卓斌, 刘为纹. 奥曲肽对人胃癌细胞株SGC-7901生长的影响. 癌症 2002; 21: 103-104
- 8 Akagi T, Yoshino T, Kondo E. The Fas antigen and Fas-mediated apoptosis in B-cell differentiation. *Leuk Lymphoma* 1998; 28: 483-489
- 9 Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* 1994; 6: 1567-1574
- 10 Owen-Schaub LB, Radinsky R, Kruzel E, Berry K, Yonehara S. Anti-Fas on nonhematopoietic tumors: levels of Fas/APO-1 and bcl-2 are not predictive of biological responsiveness. *Cancer Res* 1994; 54: 1580-1586
- 11 Li Z, Wang Z, Zhao Z, Zhang Y, Ke Y. [Expression of Fas, FasL and IFN-gamma in gastric cancer] *Beijing Daxue Xuebao* 2003; 35: 386-389
- 12 Bello-Fernandez C, Packham G, Cleveland JL. The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 7804-7808
- 13 Hermeking H, Eick D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* 1994; 265: 2091-2093
- 14 张青云, 吕有勇, 李净, 李文梅, 崔建涛, 谢山海, 邓国仁. 人胃癌细胞系中p53抑癌基因变异的检测及其序列分析. 中国生物化学与分子生物学报 1995; 11: 311-315
- 15 Culotta E, Koshland DE Jr. p53 sweeps through cancer research. *Science* 1993; 262: 1958-1961
- 16 Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH. Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 1993; 362: 849-852
- 17 Lowe SW, Schmitt EM, Smith SW, Osborne BA, Jacks T. p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 1993; 362: 847-849
- 18 Hoshino R, Tanimura S, Watanabe K, Kataoka T, Kohno M. Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G1 cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells in which the pathway is constitutively activated: up-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem* 2001; 276: 2686-2692
- 19 Bourdon JC, Deguin-Chambon V, Lelong JC, Dessen P, May P, Debuire B, May E. Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene* 1997; 14: 85-94
- 20 Sheikh MS, Chen YQ, Smith ML, Fornace AJ Jr. Role of p21Waf1/Cip1/Sdi1 in cell death and DNA repair as studied using a tetracycline-inducible system in p53-deficient cells. *Oncogene* 1997; 14: 1875-1882
- 21 Sharma K, Patel YC, Srikant CB. Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 1688-1696
- 22 Sharma K, Srikant CB. Induction of wild-type p53, Bax, and acidic endonuclease during somatostatin-signaled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Cancer* 1998; 76: 259-266

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号.如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>).期刊:序号,作者(列出全体作者).文题,刊名,年,卷,起页-止页, PMID编号;书籍:序号,作者(列出全部),书名,卷次,版次,出版地,出版社,年,起页-止页.(常务副总编辑:张海宁 2009-03-08)

靶向ASGPR1的外源性microRNA对HBV表达和复制的抑制作用

邵玉峰, 余莉, 李家斌, 魏少峰, 李旭, 沈继龙

邵玉峰, 李家斌, 魏少峰, 李旭, 安徽医科大学第一附属医院
感染病科 安徽省合肥市 230032

邵玉峰, 余莉, 沈继龙, 安徽省人兽共患病实验室, 教育部省
部共建重点实验室(安徽医科大学) 安徽省合肥市 230022

国家自然科学基金资助项目, No. 30700698

作者贡献分布: 此课题由沈继龙, 李旭及邵玉峰设计; 研究过程
由邵玉峰, 余莉, 李家斌, 魏少峰及李旭完成, 数据分析由邵玉峰
和余莉完成, 本文写作由邵玉峰和沈继龙完成.

通讯作者: 沈继龙, 教授, 230022, 安徽省合肥市, 安徽省人兽共
患病实验室. shenjilong53@126.com

电话: 0551-5161057

收稿日期: 2008-12-25 修回日期: 2009-01-30

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-08

Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by artificial microRNA targeted ASGPR1

Yu-Feng Gao, Li Yu, Jia-Bin Li, Shao-Feng Wei, Xu Li,
Ji-Long Shen

Yu-Feng Gao, Jia-Bin Li, Shao-Feng Wei, Xu Li, Depart-
ment of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of
Anhui Medical University, Hefei 230032, Anhui Province,
China

Yu-Feng Gao, Li Yu, Ji-Long Shen, Anhui Key Labora-
tory of Zoonoses, Key Laboratory of Gene Resource Utili-
zation for Severe Diseases, Ministry of Education of China
and Anhui Province, Hefei 230022, Anhui Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of
China, No. 30700698

Correspondence to: Professor Ji-Long Shen, Anhui Key
Laboratory of Zoonoses, Hefei 230022, Anhui Province,
China. shenjilong53@126.com

Received: 2008-12-25 Revised: 2009-01-30

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effects on hepatitis B virus (HBV) replication and expression by transfecting artificial microRNA targeted ASGPR1 into HepG2.2.15 cells.

METHODS: Three amiRNA-HBV plas-
mids were constructed and transfected into
HepG2.2.15 cells via Lipofectamine™ 2000
reagent. The level of ASGPR1 mRNA was mea-
sured by semi-quantitative RT-PCR. The level
of ASGPR1 protein was measured by western
blot. HBV antigen secretion was detected in the

cells with transient and stable transfection by
time-resolved fluoroimmunoassays (TRFIA).
HBV DNA replication was examined by fluo-
rescence quantitative PCR.

RESULTS: Three amiRNA significantly reduced
ASGPR1 mRNA and protein expression, and
the greatest reduction was seen in amiRNA-
ASGPR1-610 transfected group. Expressions
of ASGPR1 mRNA and protein were down-
regulated by 57.3% and 49.8% at 72 h ($P < 0.01$).
At the virus level, three amiRNA-ASGPR1
plasmids obviously inhibited the secretion of
HBsAg and HBeAg with the greatest reduc-
tion seen in amiRNA-ASGPR1-610 transfected
group. Expression levels of HBsAg and HBeAg
were down-regulated by 31.3% and 33.6% after
72 h ($P < 0.01$) and HBV DNA level was down-
regulated by 29.7% at 72 h ($P < 0.01$).

CONCLUSION: In HepG2.2.15 cells, HBV rep-
lication and expression could be inhibited by
artificial microRNA targeted ASGPR1. Artificial
microRNA targeted ASGPR1 could be a prom-
ising therapeutic approach for chronic HBV
infection.

Key Words: Hepatitis B virus; RNA interference; Mi-
croRNA; HepG2.2.15 cell

Gao YF, Yu L, Li JB, Wei SF, Li X, Shen JL. Inhibition
of hepatitis B virus gene expression and replication by
artificial microRNA targeted ASGPR1. *Shijie Huaren
Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 699-704

摘要

目的: 设计并构建ASGPR1靶向的microRNA
表达载体, 观察其对ASGPR1基因的抑制作用
及其在HBV感染基因治疗中的应用价值.

方法: 以ASGPR1为靶基因, 设计并构建3个
针对ASGPR1不同位点的microRNA表达载
体, 通过脂质体方法转染HepG2.2.15细胞, RT-
PCR和Western blot检测其对ASGPR1 mRNA
和蛋白的抑制作用, 乙肝五项定量和HBV

■背景资料

大量研究发现, 许多病毒在治疗
选择压力下可
以通过靶基因序
列的突变来逃避
RNAi, 针对病毒
的RNAi治疗可能
会因为病毒变异
而降低疗效. 针
对病毒复制所需
要宿主基因进行
RNAi可能是避免
病毒抗性突变株
出现的一种解决
办法.

■同行评议者

范学工, 教授, 中
南大学湘雅医院
感染病科

■研发前沿

RNAi抗HBV基因治疗有着广泛的应用前景,已有对HCV、HIV病毒感染宿主基因治疗的报道,均取得了较好的疗效。包括宿主基因在内的多靶位的RNAi已成为抗病毒基因治疗的热点。

DNA检测其对HBV的抑制作用。

结果: ASGPR1 mRNA和蛋白的平均水平分别下降了57.3%和49.8% ($P<0.01$); 在病毒水平3种amiRNA均能明显抑制相应细胞株中HBsAg和HBeAg的分泌,其中以amiRNA-ASGPR1-610抑制作用最强,对培养72 h的细胞上清中的HBsAg和HBeAg抑制率分别为31.3%和33.6% ($P<0.01$), HBV DNA的抑制率为29.7% ($P<0.01$)。

结论: 靶向ASGPR1的外源性microRNA能显著抑制靶基因的表达,进而抑制HBV的复制和表达。ASGPR1可以作为慢性HBV感染基因治疗的候选靶点。

关键词: 乙型肝炎病毒; RNA干扰; MicroRNA; HepG2.2.15细胞

郜玉峰, 余莉, 李家斌, 魏少峰, 李旭, 沈继龙. 靶向ASGPR1的外源性microRNA对HBV表达和复制的抑制作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 699-704

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/699.asp>

0 引言

去唾液酸糖蛋白1(asialoglycoprotein receptor 1, ASGPR1)是在肝细胞膜表面特异性表达的转膜分子,可介导去唾液酸糖蛋白黏附并进入肝细胞^[1]。研究表明,ASGPR1可能是介导HBV进入肝细胞的主要受体之一,应用ASGPR1的配基、抗体等抑制ASGPR1的水平可阻断HBV进入肝细胞,进而抑制HBV的复制^[2-3]。进一步研究发现,在已感染HBV的肝细胞中,阻断ASGPR1表达后,HBV的表达和复制水平下降^[4]。因此,推测阻断ASGPR1的表达可抑制HBV的复制,ASGPR1可成为抗HBV的潜在作用靶点。

MicroRNA(miRNA)是一种大小约22 nt的非编码小分子单链RNA,可以通过对靶基因mRNA的剪切或抑制靶基因mRNA的翻译调控靶基因的表达^[5]。miRNA作用方式很大程度上和siRNA介导的RNAi途径重叠^[6]。与siRNA相比,miRNA仅仅需要和靶基因部分的结合即可以发挥作用,因而可以在很大程度上避免因病毒变异导致的RNAi治疗失败,这将对容易发生变异的病毒感染(如HCV, HBV, HIV)的治疗更有优势^[7-8]。miRNA功能的研究可能有助于提出治疗病毒感染性疾病的新方法,但尚未见microRNA介导的RNAi用于HBV基因治疗研究的报道。为探讨ASGPR1在HBV RNA干扰基因治疗中的

应用价值,本研究设计并合成靶向ASGPR1的microRNA序列,构建外源性microRNA的表达载体,转染HepG2.2.15细胞,观察其对ASGPR1的抑制作用,并进一步观察ASGPR1抑制后对HBV表达和复制的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 pcDNA6.2-G/W-EmGFP-miRNA表达质粒购自美国Invitrogen公司,稳定表达HBV的HepG2.2.15细胞系由本室保存,DMEM为Gibco公司产品,T4 DNA连接酶为TaKaRa公司产品,TRIzol、脂质体Lipofectamine 2000为Invitrogen公司产品,A3500逆转录试剂盒、质粒纯化试剂盒和G418为Promega公司产品,山羊抗人ASGPR1多克隆抗体和鼠抗人actin抗体购自Santa Cruz公司。乙肝五项定量检测试剂盒为苏州宏波生物有限公司产品,其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 microRNA表达载体的构建、质粒纯化: 根据ASGPR1基因序列(NM_001671),应用Invitrogen公司的在线RNAi设计软件设计针对ASGPR1基因的microRNA,利用BLAST对选择的靶序列进行同源分析,排除非特异性microRNA。miRNA相应的单链DNA序列由上海英俊公司合成。退火合成双链,利用T4连接酶与载体链接,将连接后的载体转化入TOP10细菌,质粒抗性筛选,提取质粒测序证实插入序列的正确性。

1.2.2 HepG2.2.15细胞的转染: 将HepG2.2.15细胞按每孔 1×10^5 的数量接种于6孔培养板,DMEM培养液(含100 g/L小牛血清,100 kU/L青霉素,100 kU/L链霉素)37℃、50 mL/L CO₂培养,待细胞生长融合至80%左右,更换无抗生素、无血清的DMEM培养液继续培养4 h后,用脂质体2000进行转染。按其说明书方法进行,每孔细胞分别加入2 μg质粒和5 μL脂质体,转染6 h更换含100 g/L小牛血清的无抗生素的DMEM培养液。转染后24、48、72 h分别收集细胞和培养上清液待检。

1.2.3 RT-PCR检测转染后HepG2.2.15细胞ASGPR1 mRNA的表达: 细胞转染后72 h,在每孔细胞中加入0.5 mL TRIzol,按照说明书方法提取总RNA,各取1 μg总RNA,按照逆转录试剂盒说明进行cDNA第一链的合成。用于扩增ASGPR1基因上游引物为P1: 5'-TGCTGCTTGT

■相关报道

Yang *et al*通过反义寡核苷酸技术研究显示,靶向ASGPR1的反义寡核苷酸可以特异性和剂量依赖性地阻断ASGPR1的表达,并进一步抑制HBV的复制。

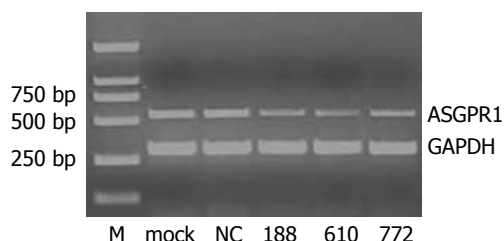


图1 瞬时转染amiRNA-ASGPR1-188, 610, 772对ASGPR1 mRNA的抑制。

GGTTGTCTGTG-3'; 下游引物为P2: 5'-AGCCC GTCTCGTAGTCCGTC-3', 预期扩增片段长 535 bp. 用于扩增内参照GAPDH基因的上游引物为P3: 5'-CCACTCCTCCACCTTTGACGC-3'; 下游引物为P4: 5'-AGTTATTTTCATGGGACAC GAGTT-3'; 预期扩增片段长337 bp. PCR 反应条件为: 94℃预变性5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 循环30次; 最后72℃延伸10 min. 扩增结束后取PCR产物5 μL琼脂糖凝胶电泳, 观察并记录结果。

1.2.4 Western blot检测HepG2.2.15细胞转染后ASGPR1蛋白的表达: 细胞转染72 h后, 在每孔细胞中加入RIPA裂解液裂解细胞, 获得蛋白, 裂解上清用BCA试剂盒定量蛋白浓度. 各组分别取蛋白30 μg, 100 g/L SDS-PAGE后200mA转膜2 h, 用含50 g/L牛奶的PBST室温封闭1 h, 洗膜3次, 加入稀释的山羊抗人ASGPR1多克隆抗体(1:4000)或鼠抗人actin(1:5000), 室温轻摇1 h. PBST洗膜3次, 每次10 min. 分别加入稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG、兔抗羊IgG酶标二抗, 稀释比例为1:5000-10000, 室温轻摇1 h. 用PBST洗膜3次, 每次10 min, 暗室下ECL发光显色, 曝光, 观察结果。

1.2.5 乙肝五项定量和HBV DNA荧光定量PCR检测: 乙肝五项定量采用双抗体夹心时间分辨免疫荧光分析法进行检测, HBV DNA应用ABI GeneAmp PE7500荧光定量PCR仪检测, 正向引物: 5'-GGAGTATGG ATTCGCACTCCTC-3'; 反向引物: 5'-TTGTTGTTGTAGGGGACCTGCCT-3', 荧光探针: 5'-ACTTCCGGAACTACTGTTA GACGA-3'.

统计学处理 数据以mean±SD表示, 由SPSS13.0统计软件处理, 采用t检验和单因素方差分析得出P值, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ASGPR1靶向microRNA表达载体的构建结果 将3对合成的64 nt的寡核苷酸序列进行合成

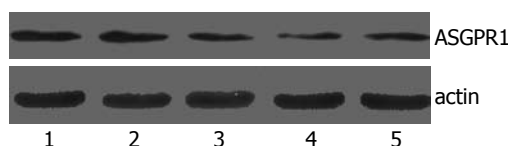


图2 瞬时转染amiRNA-ASGPR1-188, 610, 772对ASGPR1蛋白的抑制。

双链, 合成双链后经3%琼脂糖凝胶电泳进行确认. 然后进行载体的连接, 经测序引物进行PCR扩增插入片段后送Invitrogen公司测序证实插入序列的正确性, 均排除碱基的突变, 分别命名为amiRNA-ASGPR1-188, 610, 772.

2.2 瞬时转染amiRNA-ASGPR1对ASGPR1 mRNA的抑制作用 靶向ASGPR1 mRNA的3个质粒转染HepG2.2.15细胞72 h后, 提取细胞总RNA并逆转录, 以看家基因GAPDH为内参照, 进行PCR反应, 扩增产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳分析, 然后对电泳条带应用半定量分析, 以对照组细胞ASGPR1 mRNA与GAPDH mRNA的比值为100%, 计算治疗组的相对百分比, 结果显示: 转染72 h后, amiRNA-ASGPR1-188、amiRNA-ASGPR1-610和amiRNA-ASGPR1-772组ASGPR1 mRNA水平较空白转染组和阴性质粒转染组均显著降低(P<0.05), 而空白组和阴性质粒转染组相比无显著性差异(P>0.05, 图1). 在这三组质粒中, amiRNA-ASGPR1-610组的ASGPR1 mRNA水平下降最为显著, 抑制率为57.3%, amiRNA-ASGPR1-188和amiRNA-ASGPR1-772组的抑制率分别为44.5%和35.6%。

2.3 瞬时转染amiRNA-ASGPR1对ASGPR1蛋白的抑制作用 Western blot印迹结果显示转染后72 h ASGPR1蛋白的表达量与空白转染组和阴性质粒转染组相比均有显著降低(P<0.05), amiRNA-La-610组的ASGPR1蛋白表达减少最明显, 为49.8%, amiRNA-ASGPR1-188组为46.3%, amiRNA-ASGPR1-772组为39.3%, 而阴性质粒组组表达量无明显改变(图2), P>0.05, 与mRNA检测结果基本一致。

2.4 瞬时转染amiRNA-ASGPR1对HBsAg和HBeAg的抑制作用 转染后的第2天细胞上清中的HBsAg和HBeAg即开始受到抑制, 但无明显显著性差别. 在转染后48 h抑制效果较明显, 72 h病毒抑制达到高峰, 96 h后抑制作用开始渐减弱. 3个质粒对HBV的表达均有抑制作用, 其中, 以amiRNA-ASGPR1-610作用最为明显, 而阴性对照组对蛋白表达的影响不明显. amiRNA-ASGPR1-610在转染后的48、72和96 h三个时

■创新盘点

siRNA通过序列特异性的方式发挥作用, 而microRNA可以通过与靶mRNA完全或部分配对两种作用方式发挥其生物功能. 本研究首次采用microRNA介导的RNAi技术干扰宿主基因用于HBV基因治疗研究。

■应用要点

本文为HBV基因治疗的研究提供了新的思路,并为慢性HBV感染临床基因治疗提供新的基因靶点。

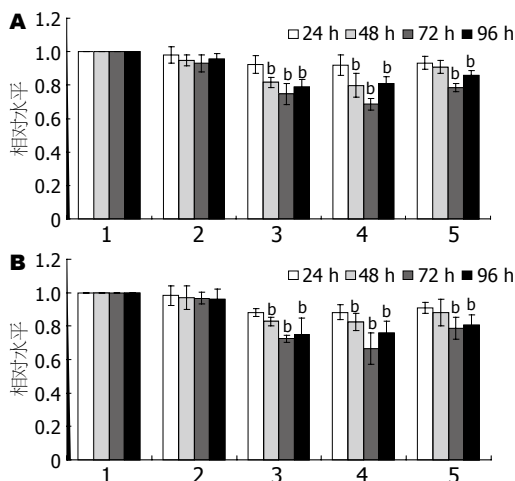


图3 瞬时转染amiRNA-ASGPR1对HBsAg和HBeAg的抑制作用。A: HBsAg; B: HBeAg。1: mock; 2: negative control; 3: amiRNA-ASGPR1-188; 4: amiRNA-ASGPR1-610; 5: amiRNA-ASGPR1-772。

间点对HBsAg的抑制率分别为20.2%、31.3%和19.1%(图3A),对HBeAg的抑制率分别为17.6%、33.6%和24.3%(图3B),其他2个质粒的抑制率相对较低。考虑到瞬时转染质粒的转染效率仅能达到50%-60%左右,所以我们判断amiRNA-ASGPR1-610的实际抗原分泌抑制率最高能达到50%-60%以上,说明在提高转染效率的前提下,amiRNA-ASGPR1介导的RNA干扰能达到较好的治疗效果,可以作为抗HBV的基因治疗靶位。

2.5 瞬时转染amiRNA-ASGPR1对HBV DNA的抑制作用 为明确amiRNA-ASGPR1转染后对HBV复制的影响,对瞬时转染各个时间点培养上清中的HBV DNA水平采用实时荧光定量PCR进行了检测,结果表明,特异性靶向ASGPR1的amiRNA能降低细胞培养上清中的拷贝数。与HBsAg和HBeAg抑制的作用相似,3个质粒对培养上清中的HBV DNA也均有不同程度的抑制作用,而阴性对照组载体对HBV DNA几乎没有作用(图4)。其中amiRNA-ASGPR1-610的抑制效果最为明显。amiRNA-ASGPR1-610在转染后48、72和96 h对HBV DNA的抑制率为23.2%、29.7%和19.0%。因为载体的转染效率较低只有50%-60%,同样可以认为,amiRNA-HBV实际的病毒复制抑制率可以达到50%以上。

2.6 amiRNA-ASGPR1转染对细胞增殖的影响 质粒转染后,每日在倒置显微镜下观察细胞形态,治疗质粒转染组和对照组形态无明显变化,在开始的24 h细胞生长较空白细胞生长的速度稍慢,其后基本和空白对照生长速度一致。在转染细胞后72 h,加入MTT,继续孵育4 h后,490 nm

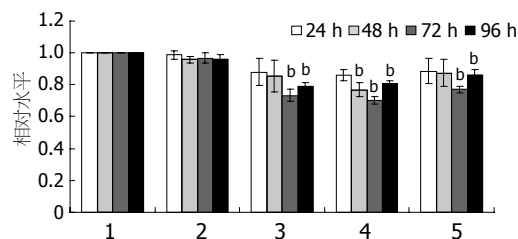


图4 瞬时转染amiRNA-ASGPR1对HBV DNA的抑制作用。1: mock; 2: negative control; 3: amiRNA-ASGPR1-188; 4: amiRNA-ASGPR1-610; 5: amiRNA-ASGPR1-772。

波长检测各细胞培养孔中的吸光度,以细胞对照组的A值为1,计算各个质粒转染组的相对A值,结果显示:各质粒转染组的A值与空白细胞相比无显著性差异, $P>0.05$ 。

3 讨论

RNA干扰(RNA interference, RNAi)是一项新兴的基因沉默技术,主要通过siRNA和microRNA(miRNA)两种小RNA分子来发挥作用^[9]。大量体内外实验研究已经证明,使用siRNA控制HBV表达和复制具有高效性和可行性^[10-13]。但越来越多的研究发现,许多病毒在治疗选择压力下可以通过靶基因序列的突变来逃避siRNA介导的RNAi,针对病毒的RNAi治疗效果可能会因为病毒的变异而降低疗效,甚至失去治疗作用^[14-17]。microRNA通过两种作用方式发挥其生物功能:当他们与靶mRNA完全或几乎完全配对时,可以引起靶mRNA的剪切反应即RNA干扰作用;在不完全配对的时候,可以引起靶mRNA的翻译抑制^[7-8],这是其较之siRNA优越之处。

外源性人工合成的microRNA(artificial microRNA, amiRNA)技术是指利用内源性miRNA前体分子产生小RNA去介导动物或植物中的靶基因沉默^[18-20]。最近,几个基于miRNAs表达框架的pol II启动子驱动的RNAi载体被构建,这种RNAi载体能表达外源性miRNA通过RNA干扰途径指导RNA的清除或转录抑制^[8,21-22]。利用microRNA表达框架产生外源性miRNA特异性降解靶基因的体内外实验已经展示了极好的应用前景。我们采用的以microRNA介导的RNAi研究显示:靶向ASGPR1的外源性miRNA表达质粒能特异性的显著降低ASGPR1 mRNA和蛋白水平的表达。

另一种有效的病毒RNAi治疗途径将是针对病毒感染和复制所需要的宿主细胞因素进行

RNA干扰研究. 以宿主基因为靶位RNAi治疗的优点是他不依赖于病毒的基因组, 因而能避免病毒通过突变逃避RNAi的缺点. Xue *et al*针对HCV复制所需的几个宿主基因进行了RNA干扰治疗研究. 结果显示针对宿主基因hVAP-A、La和PTB的siRNA能显著降低宿主基因的表达, 同时发现HCV的复制水平受到了显著的抑制^[23-24]. 另外, 这些治疗对细胞的活性并没有明显的影响. 提示与病毒复制相关的宿主基因可能作为抑制病毒复制的一个靶点. ASGPR1不仅是HBV感染肝细胞的候选受体, 而且可以促进HBV在体内的复制. Yang *et al*^[4]通过反义寡核苷酸技术研究显示: 靶向ASGPR1的反义寡核苷酸可以特异性和剂量依赖性地抑制HepG2.2.15细胞中的ASGPR1表达, ASGPR1表达下调后, HepG2.2.15细胞培养液中的HBV DNA, HBsAg和HBeAg的水平也显著降低, 证实阻断ASGPR1的表达可阻断HBV的复制. 我们采用的以microRNA介导的RNAi研究显示: 靶向ASGPR1的外源性amiRNA表达质粒能特异性的阻断ASGPR1 mRNA和蛋白水平的表达. 随后的病毒抑制水平检测显示: 阻断ASGPR1表达后, 细胞培养上清中的HBsAg、HBeAg和HBV DNA水平有明显的下降, 其中amiRNA-ASGPR1-610治疗组对HBV DNA的抑制率可以达到32.4%, 如果考虑到转染效率的影响, 我们判断实际的抑制率可以达到50%-60%左右, 与Yang *et al*的研究结果一致, 也和我们以前的稳转实验研究抑制效率相符^[25]. 说明ASGPR1的确在HBV的感染和复制中起到重要作用, ASGPR1可以作为HBV抗病毒治疗的一个候选靶点. 目前尚无HBV易感的肝细胞株, 如果利用HBV易感肝细胞株进行可能会取得更理想的疗效. 另外, 为了证实靶向ASGPR1的外源性amiRNA对HBV的复制不是由质粒和脂质体的细胞毒性引起, 我们检测了治疗组转染细胞的细胞增殖情况. 实验结果显示, 在转染后72 h, 转染组细胞的形态无明显变化, 转染组细胞的A值与空白细胞对照组相比没有显著的差异, 因此, 可以判断对HBV复制的抑制并不是由细胞毒性引起的.

外源性amiRNA介导的RNA干扰可以高效阻断ASGPR1宿主靶基因的表达. ASGPR1的表达水平与HBV的复制和表达有密切关系, 进一步证实其在HBV的感染和复制中起着关键作用. 与HBV感染和复制相关的宿主基因可以作为HBV基因治疗的一个候选靶位. 在提高转染效

率的情况下, 外源性amiRNA能够作为一种新的抗HBV的基因治疗手段. microRNA介导的RNAi作为一种新型的HBV基因治疗技术, 展示了良好的应用前景, 但RNAi要应用于临床, 其组织靶向性和表达效率、药代动力学及如何选择最有效的靶序列等问题仍有待解决, 比如本研究中所采用的质粒载体, 若具有肝器官靶向性, 则可能提高其效果.

4 参考文献

- 1 Meier M, Bider MD, Malashkevich VN, Spiess M, Burkhard P. Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor. *J Mol Biol* 2000; 300: 857-865
- 2 Treichel U, Meyer zum Buschenfelde KH, Dienes HP, Gerken G. Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Arch Virol* 1997; 142: 493-498
- 3 Treichel U, Meyer zum Buschenfelde KH, Stockert RJ, Poralla T, Gerken G. The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers. *J Gen Virol* 1994; 75 (Pt 11): 3021-3029
- 4 Yang J, Bo XC, Ding XR, Dai JM, Zhang ML, Wang XH, Wang SQ. Antisense oligonucleotides targeted against asialoglycoprotein receptor 1 block human hepatitis B virus replication. *J Viral Hepat* 2006; 13: 158-165
- 5 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297
- 6 Cullen BR. Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res* 2004; 102: 3-9
- 7 Ossowski S, Schwab R, Weigel D. Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *Plant J* 2008; 53: 674-690
- 8 Stegmeier F, Hu G, Rickles RJ, Hannon GJ, Elledge SJ. A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 13212-13217
- 9 Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 657-685
- 10 Arbutnot P, Longshaw V, Naidoo T, Weinberg MS. Opportunities for treating chronic hepatitis B and C virus infection using RNA interference. *J Viral Hepat* 2007; 14: 447-459
- 11 Ying RS, Zhu C, Fan XG, Li N, Tian XF, Liu HB, Zhang BX. Hepatitis B virus is inhibited by RNA interference in cell culture and in mice. *Antiviral Res* 2007; 73: 24-30
- 12 Li GQ, Gu HX, Li D, Xu WZ. Inhibition of Hepatitis B virus cccDNA replication by siRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355: 404-408
- 13 Xuan B, Qian Z, Tan C, Min T, Shen S, Huang W. esiRNAs purified with chromatography suppress homologous gene expression with high efficiency and specificity. *Mol Biotechnol* 2005; 31: 203-209
- 14 Zheng ZM, Tang S, Tao M. Development of resistance to RNAi in mammalian cells. *Ann N Y*

■名词解释

MicroRNA (miRNA): 一种大小约22 nt的非编码小分子单链RNA, 他可以通过对靶基因mRNA的剪切或抑制靶基因mRNA的翻译调控靶基因的表达.

■同行评价

本文对靶向ASGPR1的外源性microRNA抑制HBV表达和复制进行了初步观察,其结果有较好的科学意义和潜在的应用价值。

- 15 Das AT, Brummelkamp TR, Westerhout EM, Vink M, Madiredjo M, Bernards R, Berkhout B. Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J Virol* 2004; 78: 2601-2605
- 16 Konishi M, Wu CH, Kaito M, Hayashi K, Watanabe S, Adachi Y, Wu GY. siRNA-resistance in treated HCV replicon cells is correlated with the development of specific HCV mutations. *J Viral Hepat* 2006; 13: 756-761
- 17 Wu HL, Huang LR, Huang CC, Lai HL, Liu CJ, Huang YT, Hsu YW, Lu CY, Chen DS, Chen PJ. RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant. *Gastroenterology* 2005; 128: 708-716
- 18 Niu QW, Lin SS, Reyes JL, Chen KC, Wu HW, Yeh SD, Chua NH. Expression of artificial microRNAs in transgenic Arabidopsis thaliana confers virus resistance. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1420-1428
- 19 Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* 2002; 9: 1327-1333
- 20 Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* 2006; 18: 1121-1133
- 21 Chung KH, Hart CC, Al-Bassam S, Avery A, Taylor J, Patel PD, Vojtek AB, Turner DL. Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: e53
- 22 Du G, Yonekubo J, Zeng Y, Osisami M, Frohman MA. Design of expression vectors for RNA interference based on miRNAs and RNA splicing. *FEBS J* 2006; 273: 5421-5427
- 23 Xue Q, Ding H, Liu M, Zhao P, Gao J, Ren H, Liu Y, Qi ZT. Inhibition of hepatitis C virus replication and expression by small interfering RNA targeting host cellular genes. *Arch Virol* 2007; 152: 955-962
- 24 Zhang J, Yamada O, Sakamoto T, Yoshida H, Iwai T, Matsushita Y, Shimamura H, Araki H, Shimotohno K. Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. *Virology* 2004; 320: 135-143
- 25 Gao YF, Yu L, Wei W, Li JB, Luo QL, Shen JL. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by artificial microRNA. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4684-4689

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志名词术语标准

本刊讯 本刊名词术语一律标准化,前后统一,如原词过长且多次出现者,可于首次出现时写出全称加括号内注简称,以后直接用简称。医学名词以全国自然科学名词审定委员会公布的《生理学名词》、《生物化学名词与生物物理学名词》、《化学名词》、《植物学名词》、《人体解剖学名词》、《细胞生物学名词》及《医学名词》系列为准,药名以《中华人民共和国药典》和卫生部药典委员会编的《药名词汇》为准,国家食品药品监督管理局批准的新药,采用批准的药名;创新性新药,请参照我国药典委员会的“命名原则”,新译名词应附外文。公认习用缩略语可直接应用(建议第一次也写出全称),如ALT, AST, mAb, WBC, RBC, Hb, T, P, R, BP, PU, GU, DU, ACTH, DNA, LD₅₀, HBsAg, HCV RNA, AFP, CEA, ECG, IgG, IgA, IgM, TCM, RIA, ELISA, PCR, CT, MRI等。为减少排印错误,外文、阿拉伯数字、标点符号必须正确打印在A4纸上。中医药名词英译要遵循以下原则:(1)有对等词者,直接采用原有英语词,如中风stroke,发热fever;(2)有对应词者应根据上下文合理选用原英语词,如八法eight principal methods;(3)英语中没有对等词或相应词者,宜用汉语拼音,如阴yin,阳yang,阴阳学说yinyangology,人中renzhong,气功qigong;汉语拼音要以词为单位分写,如weixibao nizhuanwan(胃细胞逆转丸),guizhitang(桂枝汤)。通常应小写。(常务副总编辑:张海宁 2009-03-08)

单纯性肥胖伴暴食行为者胃排空速率的变化特征

刘红芬, 刘丽, 常丽丽, 范亚坤

刘红芬, 刘丽, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050051

刘红芬, 常丽丽, 石家庄市第一医院消化内科 河北省石家庄市 050011

范亚坤, 石家庄市第一医院干部科 河北省石家庄市 050011
作者贡献分布: 此课题由刘红芬与刘丽设计; 研究过程由刘红芬与常丽丽操作完成; 数据分析由刘红芬与范亚坤完成; 本论文写作由刘红芬与范亚坤完成。

通讯作者: 刘红芬, 050011, 河北省石家庄市, 石家庄市第一医院消化内科. liuhongfen001@sina.com

电话: 0311-86750052

收稿日期: 2008-11-09 修回日期: 2009-01-31

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-08

Characteristics of gastric emptying rate in simple obesity accompanied by bulimia

Hong-Fen Liu, Li Liu, Li-Li Chang, Ya-Kong Fan

Hong-Fen Liu, Li Liu, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, Hebei Province, China

Hong-Fen Liu, Li-Li Chang, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China

Ya-Kong Fan, Department of Cadre, the First Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China

Correspondence to: Hong-Fen Liu, Department of Gastroenterology, the First Hospital of Shijiazhuang City, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China. liuhongfen001@sina.com

Received: 2008-11-09 Revised: 2009-01-31

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To observe gastric emptying rates in simple obesity accompanied by bulimia, simple obesity with normal diet and normal weight people, and to investigate the characteristics of gastric emptying.

METHODS: Forty two subjects with simple obesity accompanied by bulimia, 32 subjects with simple obesity and normal food intake and 40 people with normal weight were studied with SPECT. After subjects eating test meal marked ^{99m}Tc -DTPA, picture of stomach was collected, and gastric emptying rate was calculated according to a fixed formula.

RESULTS: Gastric emptying halftime of simple obesity accompanied by bulimia was shorter than that of normal control (71.21 ± 19.2 min

vs 81.25 ± 14.08 min, $P < 0.01$). Gastric emptying halftime of normal food intake group was similar to that of normal control group. Gastric emptying rate of simple obesity with bulimia was quicker than normal control (30 min: $22.35\% \pm 4.53\%$ vs $15.82\% \pm 4.72\%$; 60 min: $55.13\% \pm 9.21\%$ vs $47.25\% \pm 8.18\%$; 90 min: $76.35\% \pm 5.76\%$ vs $69.29\% \pm 8.85\%$; 120 min: $92.22\% \pm 7.41\%$ vs $84.92\% \pm 6.53\%$, all $P < 0.01$). Gastric emptying rate of normal food intake group was similar to that of normal control group.

CONCLUSION: The gastric emptying rate in simple obesity with bulimia become is quicker, which may partly account for obesity.

Key Words: Simple obesity; Single-photon emission computed tomography; Gastric emptying

Liu HF, Liu L, Chang LL, Fan YK. Characteristics of gastric emptying rate in simple obesity accompanied by bulimia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 705-707

摘要

目的: 观察单纯性肥胖伴暴食行为者、肥胖饮食正常者及正常体质量者胃排空速率, 并探讨三者胃排空速率的变化特征。

方法: 采用SPECT(单光子发射计算机扫描), 对42例单纯性肥胖伴暴食行为者32例饮食正常者及40例正常体质量健康志愿者进食 ^{99m}Tc -DTPA标记的实验餐后胃部图象采集, 按公式计算出胃半排空时间及各时相胃排空率。

结果: 单纯性肥胖伴暴食行为组较正常体质量组胃半排空时间明显缩短(71.21 ± 19.2 min vs 81.25 ± 14.08 min, $P < 0.01$)。单纯性肥胖饮食正常组较正常体质量组胃半排空时间无明显差别。单纯性肥胖伴暴食行为组较正常体质量组各时间段胃排空率明显加快(30 min: $22.35\% \pm 4.53\%$ vs $15.82\% \pm 4.72\%$; 60 min: $55.13\% \pm 9.21\%$ vs $47.25\% \pm 8.18\%$; 90 min: $76.35\% \pm 5.76\%$ vs $69.29\% \pm 8.85\%$; 120 min: $92.22\% \pm 7.41\%$ vs $84.92\% \pm 6.53\%$, 均 $P < 0.01$)。单纯性肥胖饮食正常组与正常体质量组各时间段胃排空率比较无明显差异。

■背景资料

肥胖症在美国及其他西方发达国家是发病率最高的公共健康问题之一。据最新统计, 在美国成人中19.5%的男性和25%的女性患有肥胖症。据我国2004年全国营养与健康综合调查结果显示, 成人肥胖率7.1%, 约6000万人, 其中儿童约960万人。相关疾病的发病率也增高。肥胖与胃排空过速或胃动力亢进有关。

■同行评议者

张军, 教授, 西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

■研究前沿

肥胖患者胃排空情况是研究热点。SPECT法测定肥胖伴暴食行为者胃排空报道较少。胃排空与其影响因素胃肠激素的相关性有待进一步研究。

结论:单纯性肥胖伴暴食行为者胃排空速率加快,这可能是导致肥胖的一个重要原因。

关键词:单纯性肥胖;单光子发射计算机扫描;胃排空

刘红芬, 刘丽, 常丽丽, 范亚坤. 单纯性肥胖伴暴食行为者胃排空速率的变化特征. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 705-707
http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/705.asp

0 引言

肥胖症在美国及其他西方发达国家是发病率最高的公共健康问题之一。据最新统计,在美国成人中19.5%的男性和25%的女性患有肥胖症。据我国2004年全国营养与健康综合调查结果显示,成人肥胖率7.1%,约6000万人,其中儿童约960万人。相关疾病的发病率也增高^[1-3]。肥胖与胃排空过速或胃动力亢进有关^[4]。胃半排空时间被认为是胃排空定量分析中的金指标。本研究采用SPECT观察了单纯性肥胖伴暴食行为者进食实验餐后胃半排空时间及各时间段胃排空速率的变化特征,探讨了其胃排空速率变化的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 单纯性肥胖伴暴食行为组(A组)(进餐速度快,一次进餐量大于正常人,或进餐次数多,易饥饿)体质量指数BMI ≥ 30 kg/m² 42例,男22例,女20例,平均年龄(28.2 \pm 9.3)岁,BMI为(31.55 \pm 1.52);单纯性肥胖伴饮食正常组(B组)(进餐速度及进餐量与正常人相似)32例,男17例,女15例,平均年龄(29.1 \pm 8.5)岁,BMI为(31.72 \pm 1.64);正常体质量健康志愿者(C组)40例为对照组,男20例,女20例,平均年龄(23.5 \pm 5.2)岁,BMI为(22.1 \pm 2.4)kg/m²,所有受试对象无胃肠道疾病史,无其他系统重大疾病史,受试者半年内未曾应用任何药物。排除(1)继发于神经-内分泌-代谢紊乱基础上的多种疾病中伴肥胖症:下丘脑病、垂体病、胰岛疾病、甲状腺功能减退症、肾上腺皮质功能亢进症、性腺功能低下症、其他(水钠贮留性肥胖症等,除外糖尿病胃轻瘫)。(2)女性受试者在妊娠期、哺乳期。

1.2 方法 受检者检测前1 wk内禁用胃肠动力药,禁食8 h,要求在5 min内进食完99mTc-DTPA标记的实验餐,方便面(康师傅牌)80 g放入400 mL开水中煮2 min,并放入切成碎丁状火腿肠(双汇牌)50 g;将生鸡蛋打入一次性纸杯中,并将1毫居^{99m}Tc-DTPA标注入蛋黄中搅匀,用5 mL鲁花

表 1 三组各时间段胃排空率的比较 (mean \pm SD, %)

餐时间 (min)	A组	B组	C组
30	22.35 \pm 4.53 ^b	16.23 \pm 3.41	15.82 \pm 4.72
60	55.13 \pm 9.21 ^a	49.81 \pm 5.85	47.25 \pm 8.18
90	76.35 \pm 5.76 ^a	70.75 \pm 2.45	69.29 \pm 8.85
120	92.22 \pm 7.41 ^a	86.11 \pm 3.58	84.92 \pm 6.53

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs C组。

牌花生油放入不粘锅煎炒4-5 min成鸡蛋饼。总热量400 kJ。待食物全部进入胃内后,直立位用低能高分辨率准直器以胃部为中心进行平面采集,矩阵位256 \times 256,每帧采集60 s,每隔30 min采集一帧,共采集2-2.5 h。若2 h放射性尚未下降50%,可继续延长观察时间至3 h。将胃部感兴趣区(ROI)选择在第1帧,然后计算出每帧计数,用计算机程序,放射性活度-时间作图,求出半排空时间及排空率。勾画出胃的轮廓对ROI采集资料,并按下述公式计算出各时相的胃排空率。 $GEt(\%) = [C_{max} - (Ct/k)/C_{max}] \times 100\%$ (GEt: 时间为t时的胃排空率; C_{max}: 胃区内最大计数率; Ct: 时间为t时胃区计数; k: 衰减校正常数)。

统计学处理 计量资料数据以mean \pm SD表示,采用STATA8.0软件,样本均数间比较采用方差分析,q检验。

2 结果

2.1 各组半排空时间 A、B、C组胃半排空时间71.21 \pm 19.2 min、79.88 \pm 15.43 min、81.25 \pm 14.08 min。A组较C组胃半排空时间明显缩短(P<0.01); B组C组胃半排空时间无明显差异(P>0.05)。

2.2 各组各时间段胃排空率 A组较C组各时间段胃排空率明显加快; B组较C组各时间段胃排空率无明显差异(表1)。

3 讨论

WHO公布BMI ≥ 30 kg/m²即为肥胖^[5],单纯性肥胖症的病因和发病机制是复杂的。遗传、环境和社会经济因素均可影响进食行为,决定体质量、脂肪组织的分布,而肥胖发生的基本机制是食物摄入超过能量消耗,而决定食物摄入量的主要因素是胃容量及胃排空速度。在胃排空过快的情况下,食物在胃内停留的时间变短。由胃内食物引起的负反馈饱胀感信号很快变弱,从而引发饥饿

感, 导致进餐间隙变短, 进餐次数增加, 从而引起肥胖^[6]。在肥胖患者中胃动力发生了变化^[7]。胃动力亢进或胃排空加速在肥胖形成中可能起重要作用^[8]。对胃排空的检测方法很多种^[9], 有放射性核素法、实时超声法、X线法、磁共振成像、呼吸实验、胃阻抗测定法、药代动力学间接检测法、插管法。其中放射性核素法是一种灵敏的、无创的、符合生理过程的检测方法, 其胃半排空时间被认为是胃排空定量分析中的金指标^[10-11]。性别对胃排空有影响^[12]。这项研究尽量克服了这一影响。有研究发现采用半固体试餐发现其正常半排空时间介于液体及固体两种食餐之间, 测试结果更符合正常人消化的过程。本实验采用半固体试餐应用放射性核素法检测肥胖者的胃排空时间。国外一些对肥胖者胃排空的研究中肥胖患者胃排空加快及减慢均有报道, 但大多数观点认为肥胖患者胃排空加速^[13]。胃容量增加或无明显变化^[14]。国内有报道单纯性肥胖症患者液体胃排空加速^[15]。应用¹³C呼气实验检查肥胖症患者与正常体质量者进食固体餐后胃排空情况, 结果发现肥胖组胃排空时间明显缩短, 而半固体餐肥胖组与正常组胃排空无明显差别。这与这项研究结果不太相符, 可能与核素法及¹³C呼气实验法两种对胃排空的检查方法不同有关。但总趋势均证实肥胖者胃排空加快。肥胖患者饮食习惯大致可分为以下几种: 伴暴食行为者: 进餐速度快、一次进餐量大于正常人, 或进餐次数多、易饥饿。饮食正常者: 饮食速度和进餐量与正常体质量者相似。伴功能性消化不良者: 早饱、腹胀、进餐量小于正常人。饮食习惯可影响到胃排空速率。暴食行为是没有节制的进食大量食物, 是肥胖症的一个亚型, 多数肥胖患者有暴食倾向, 有实验将肥胖患者分为三组: 暴食行为组, 亚暴食行为组, 非暴食行为组, 结果发现暴食行为组胃容量最大、胃排空加快, 相关的胃肠激素也有相应变化^[16]。暴食症者多发展为肥胖这与该项研究结果一致: 肥胖伴暴食行为组胃排空速率较正常体质量组明显加快($P<0.05$)有统计学意义。而单纯性肥胖饮食正常者和正常体质量者胃排空速率无明显差异($P>0.05$)无统计学意义。这方面的研究较少, 可能与肥胖患者伴饮食正常及功能性消化不良者数量较少, 病例不易收集有关。本课题研究结果发现, 单纯性肥胖伴暴食行为者比单纯性肥胖饮食正常者

和正常体质量者胃排空速率显著加快, 单纯性肥胖饮食正常者和正常体质量者胃排空速率无显著差异。单纯性肥胖症的病因和发病机制是复杂的, 暴食、胃排空加快可能是部分肥胖者肥胖形成的主要原因之一, 这对肥胖的治疗及新药开发可能有一定实用价值。

4 参考文献

- 1 Dai Z, Xu YC, Niu L. Obesity and colorectal cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4199-4206
- 2 Piretta L, Alghisi F, Anzini F, Corazziari E. Prevalence of overweightedness in patients with gastro-esophageal reflux. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4602-4605
- 3 Qureshi K, Abrams GA. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 3540-3553
- 4 Lee JS. [Obesity and gastrointestinal motility] *Korean J Gastroenterol* 2006; 48: 89-96
- 5 叶任高, 陆再英. 内科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 832-835
- 6 周吕, 柯美云. 神经胃肠病学与动力. 第1版. 北京: 科学出版社, 2005: 440-441
- 7 Park MI, Camilleri M. Gastric motor and sensory functions in obesity. *Obes Res* 2005; 13: 491-500
- 8 常丽丽, 姚树坤, 任锡玲, 高富贵, 周晓娜, 张淑梅, 刘润. 单纯性肥胖者进餐前后自主神经功能的变化特征. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2955-2957
- 9 Gilja OH, Hatlebakk JG, Odegaard S, Berstad A, Viola I, Giertsen C, Hausken T, Gregersen H. Advanced imaging and visualization in gastrointestinal disorders. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1408-1421
- 10 翟宏丽. 胃动力检测方法的研究新进展. *胃肠病学和肝病学杂志* 2004; 13: 150-151
- 11 Waseem S, Moshiree B, Draganov PV. Gastroparesis: Current diagnostic challenges and management considerations. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 25-37
- 12 Córdova-Fraga T, De la Roca-Chiapas JM, Solís S, Sosa M, Bernal-Alvarado J, Hernández E, Hernández-González M. Gender difference in the gastric emptying measured by magnetogastrography using a semi-solid test meal. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2008; 38: 240-245
- 13 Clegg M, Shafat A. Conference on "Multidisciplinary approaches to nutritional problems". Postgraduate Symposium. The role of fat in gastric emptying and satiety: acute and chronic effects. *Proc Nutr Soc* 2009; 68: 89-97
- 14 Csendes A, Burgos AM. Size, volume and weight of the stomach in patients with morbid obesity compared to controls. *Obes Surg* 2005; 15: 1133-1136
- 15 王宝西, 王茂贵. 儿童单纯性肥胖症和营养不良胃排空分析. *第四军医大学学报* 2003; 24: 472-474
- 16 Geliebter A, Yahav EK, Gluck ME, Hashim SA. Gastric capacity, test meal intake, and appetitive hormones in binge eating disorder. *Physiol Behav* 2004; 81: 735-740

■同行评价

本研究设计合理, 方法和结论可靠, 具有一定的学术价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

胃肠激素和胃黏膜pH值在体外循环心脏手术中的变化

黑飞龙, 王泽锋, 崔勇丽, 于坤, 周伯颐, 龙村

■背景资料

体外循环和手术创伤等应激因素作用于中枢神经系统和胃肠道, 使神经内分泌系统胃肠激素的分泌发生变化, 导致胃酸分泌增多, 过多的胃酸可对胃肠道黏膜屏障造成破坏, 而发生消化系统并发症, 监测CPB期间pHi能预防和减少胃黏膜酸中毒, 减少术后消化系统并发症的发生。

黑飞龙, 崔勇丽, 于坤, 周伯颐, 龙村, 中国医学科学院阜外心血管病医院体外循环科 北京市 100037

王泽锋, 兰州大学第一医院心脏外科 甘肃省兰州市 730030
作者贡献分布: 此课题由黑飞龙设计; 研究过程由黑飞龙, 王泽锋, 崔勇丽, 于坤, 周伯颐及龙村操作完成; 数据分析由王泽锋完成; 本论文写作由黑飞龙完成。

通讯作者: 黑飞龙, 100037, 北京市西城区, 中国医学科学院阜外心血管病研究所阜外心血管病医院体外循环科。

heifeilong@yahoo.com

电话: 010-88398285

收稿日期: 2008-12-29 修回日期: 2009-01-13

接受日期: 2009-01-19 在线出版日期: 2009-03-08

Changes in gastrointestinal hormone and gastric intramucosal pH during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass

Fei-Long Hei, Ze-Feng Wang, Yong-Li Cui, Kun Yu, Bo-Yi Zhou, Cun Long

Fei-Long Hei, Yong-Li Cui, Kun Yu, Bo-Yi Zhou, Cun Long, Department of Cardiopulmonary Bypass, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China

Ze-Feng Wang, Department of Cardiac Surgeon, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, Gansu Province, China

Correspondence to: Fei-Long Hei, Department of Cardiopulmonary Bypass, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China. heifeilong@yahoo.com

Received: 2008-12-29 Revised: 2009-01-13

Accepted: 2009-01-19 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To investigate the changes of blood lactate concentration, gastric intramucosal pH (pHi), plasma motilin (MOT), gastrin (Gas) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in perioperation of cardiopulmonary bypass (CPB) in 20 patients.

METHODS: Blood samples were obtained respectively at the following intervals: before anesthesia, before CPB, CPB 15 minutes, 5 minutes after unclamping aorta, 20 minutes after CPB and 3 hours after operation. MOT, Gas and CGRP in samples were measured by radioimmunoassay.

RESULTS: MOT and Gas were higher during and after CPB than before starting of CPB (89.72 ± 21.59 vs 57.20 ± 13.26 , 271.35 ± 45.61 vs 196.93 ± 42.56 , both $P < 0.05$). On the contrary, CGRP were significantly lower during and after CPB than that before starting of CPB (63.17 ± 20.26 vs 115.37 ± 29.04 , $P < 0.05$). Blood lactate concentration was higher and pHi was lower during CPB than that before starting and after ending of CPB, but there were no significant difference.

CONCLUSION: During CPB, as time goes by, motilin concentration and gastrin are significantly elevated while CGRP is decreased. Decreased pHi is a potential risk factor for gastrointestinal complication after the heart operation.

Key Words: Cardiopulmonary bypass; Calcitonin gene-related peptide; Motilin; Gastrin; Gastric intramucosal; pH

Hei FL, Wang ZF, Cui YL, Yu K, Zhou BY, Long C. Changes in gastrointestinal hormone and gastric intramucosal pH during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 708-711

摘要

目的: 探讨体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)中血乳酸, 胃黏膜pH值, 胃肠激素变化。

方法: 20例心脏直视手术患者, 分别在麻醉前、CPB前、CPB 15 min、开放升主动脉后5 min、停止CPB 20 min和术后3 h, 测定红细胞压积, 血乳酸(Lac), 计算胃黏膜pH值(pHi)。放射免疫法测定降钙素基因相关肽(CGRP)、胃泌素(GAS)和胃动素(MOT)浓度。

结果: GAS和MOT在CPB15 min浓度均显著高于CPB前(89.72 ± 21.59 vs 57.20 ± 13.26 , 271.35 ± 45.61 vs 196.93 ± 42.56 , 均 $P < 0.05$), 相反, CGRP在CPB中浓度与CPB前相比明显降低(63.17 ± 20.26 vs 115.37 ± 29.04 , $P < 0.05$)。尽管体外循环期间血Lac浓度高于CPB前, pHi低于CPB前, 但与体外循环前相比差异无显著性。

结论: CPB过程中随时间延长, 血清中MOT和

■同行评议者

郑鹏远, 教授, 郑州大学第二附属医院消化科; 周国雄, 主任医师, 南通大学附属医院消化内科

Gas显著增高, CGRP显著降低, pH_i下降是CPB术后发生胃肠道并发症的潜在的危险因素。

关键词: 体外循环; 降钙素基因相关肽; 胃泌素; 胃动素; 胃黏膜; pH

黑飞龙, 王泽锋, 崔勇丽, 于坤, 周伯硕, 龙村. 胃肠激素和胃黏膜pH值在体外循环心脏手术中的变化. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 708-711

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/708.asp>

0 引言

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)心脏手术后消化系并发症的发病率为2.1%, 但死亡率却高达19.4%-87%^[1-2]。随着CPB及手术技术的提高, 重症、复杂手术的逐年增多, 消化系并发症越来越受到重视。胃黏膜pH(pH_i)是反映胃黏膜缺血缺氧最敏感的指标, 胃肠激素在胃酸分泌的调控中起着非常重要的作用, 本文旨在了解CPB心脏外科手术期间pH_i和胃肠激素的变化。

1 材料和方法

1.1 材料 20例CPB心脏手术患者, 术前患者均无服用相关药物或消化系疾病病史, 血尿常规、肝肾功能检查基本正常。

1.2 方法 患者全部采用咪唑安定、芬太尼和泮库溴铵诱导, 气管插管后行机械通气, 术中用芬太尼-异氟醚和泮库溴铵维持麻醉。CPB采用德国Stockt滚压泵, 日本Terumo膜式氧合器, 平流灌注。预充液为乳酸林格氏液、血定安、新鲜血浆等, 浅低温、轻度血液稀释, 中高流量灌注。术中监测血流动力学、ACT、血气、尿量。胃黏膜pH测定^[3]: 剑突下体表听诊定位置入胃管, 将胃内容物吸尽后注入无菌生理盐水30 mL, 夹闭胃管稳定30 min, 使胃液PCO₂与胃黏膜PCO₂平衡。分别于麻醉前、CPB前、CPB 15 min、开放升主动脉后5 min和停CPB 20 min和停CPB 3 h 6个时点抽出2 mL胃液, 立即测定胃液PCO₂。同时抽动脉血测定pH、HCO₃⁻。基于CO₂是一可自由弥散的气体, 胃黏膜PCO₂与胃液PCO₂相等, 胃黏膜内HCO₃⁻与动脉血HCO₃⁻相近, pH_i通过PCO₂和胃黏膜HCO₃⁻代入Henderson-Hasselbach公式 $\text{pH}_i = 6.1 + \log[\text{HCO}_3^- / (\text{PCO}_2 \times 0.0307)]$ 而计算出, pH_i反映胃黏膜的酸碱度。

全部患者分别在麻醉前、CPB前、CPB 15 min、开放升主动脉后5 min和停CPB 20 min和停CPB 3 h 5个时点从中心静脉采血, 离心分离出血浆低温保存。胃泌素、胃动素、降钙素基

表 1 患者一般情况

项目	mean ± SD
年龄(岁)	41.3 ± 23.85
体质量(kg)	57.62 ± 11.37
体外循环时间(min)	82.50 ± 35.36
主动脉阻断时间(min)	45.72 ± 15.54
辅助时间(min)	21.55 ± 8.75
最低鼻温(°C)	31.23 ± 2.96

因相关肽用放免法测定, 试剂盒由东亚放免研究所提供。为排除CPB中血液稀释因素对测定值的影响, 所有测定值按如下公式校正: 校正 = 实测值 × (1 - 采样Hct) / (1 - 术前Hct) (Hct: 红细胞压积)。

统计学处理 所有实验结果用mean ± SD表示, 用SPSS11.0 for Windows进行统计处理, 组内比较用 q 检验。以 $P < 0.05$ 表示有差异, $P < 0.01$ 有显著差异。

2 结果

2.1 患者一般情况 所有患者均无服用相关药物或消化系疾病病史, 血尿常规、肝肾功能检查基本正常, 在CPB支持下进行心脏手术, 术后均痊愈出院, 术中CPB情况见表1。

2.2 围CPB期胃黏膜pH值变化 pH_i和血浆乳酸水平在CPB 15 min、开放升主动脉后5 min比麻醉前、CPB前、停CPB 20 min和停CPB 3 h降低(表2)。

2.3 围CPB期胃肠激素变化 胃泌素和胃动素浓度在CPB期比术前和术后明显升高, CGRP浓度在CPB期比术前和术后明显降低($P < 0.05$, 表3)。

3 讨论

CPB和手术创伤等应激因素作用于中枢神经系统和胃肠道, 使神经内分泌系统胃肠激素的分泌发生变化, 导致胃酸分泌增多, 过多的胃酸可对胃肠道黏膜屏障造成破坏, 而发生消化系统并发症。一旦发生消化系统并发症, 临床后果常很严重, 死亡率很高^[4-8]。

胃泌素是由胃幽门窦和十二指肠黏膜分泌, 主要生理作用之一为激活壁细胞上胃泌素受体促进胃底腺分泌盐酸。创伤应激时儿茶酚胺水平增高, 胃黏膜血流量减少, 刺激胃壁黏膜细胞基底部颗粒释放, 诱发胃泌素分泌增加。同时迷走神经兴奋可直接作用壁细胞或通过G细胞释放胃泌素, 而产生大量胃酸。另外术前禁食

■ 研究前沿

对围体外循环期消化系统状态的监测是围术期管理的难点, 监测pH_i能预防和减少胃肠黏膜酸中毒, 减少术后消化系统并发症的发生。

■创新盘点

本研究通过监测手术期间pHi和胃肠激素的变化,了解术中胃肠道损伤的情况,采取积极的措施,减少术后消化系统并发症的发生。

表 2 围CPB期pHi和Lac变化

指标	麻醉前	CPB前	CPB 15 min	主动脉开放5 min	停CPB 20 min	停CPB 3 h
pHi	7.43 ± 0.04	7.39 ± 0.03	7.31 ± 0.10	7.28 ± 0.08	7.33 ± 0.05	7.32 ± 0.03
Lac(mol/L)	1.3 ± 0.5	1.2 ± 0.3	2.3 ± 0.8	3.7 ± 1.9	3.1 ± 1.5	2.7 ± 0.9

表 3 围CPB期GSA, MOT和CGRP变化

指标	麻醉前	CPB前	CPB 15 min	主动脉开放5 min	停CPB 20 min	停CPB 3 h
GSA(μg/L)	69.27 ± 11.35	57.20 ± 13.26	89.72 ± 21.59 ^{ac}	101.37 ± 19.63 ^{ad}	77.31 ± 17.59	65.27 ± 21.64
MOT(μg/L)	152.47 ± 34.27	196.93 ± 42.56	271.35 ± 45.61 ^{ac}	351.57 ± 53.13 ^{ad}	229.44 ± 51.79 ^a	237.26 ± 47.12 ^a
CGRP(μg/L)	121.15 ± 29.48	115.37 ± 29.04	63.17 ± 20.26 ^{ac}	68.59 ± 23.22 ^{ac}	98.36 ± 28.35	88.27 ± 18.67

^a*P* < 0.05 vs 麻醉前; ^c*P* < 0.05, ^d*P* < 0.01 vs CPB前。

所致的低血糖也是引起GAS释放增加的重要因素。本实验结果显示胃泌素浓度在CPB 15 min、开放升主动脉后5 min比麻醉前、CPB前、停CPB 20 min和停CPB 3 h明显增高,说明随着手术进行,应激刺激逐步加强,到复温前后,由于机体降温后又复温以及升主动脉开放,再次温度变化使机体对应激的刺激达到最强,胃泌素浓度也达到峰值。随后机体复温和自体循环的逐步恢复,应激刺激减弱,胃泌素浓度开始下降,但由于强烈的应激原依然存在,所以停机后胃泌素浓度仍难恢复术前水平。与本实验相似, Hanekamp、徐鹏 *et al* 研究显示体外膜肺氧合支持和CPB手术患者的强烈应激反应,加剧胃泌素的产生和释放^[9-11]。胃动素由十二指肠黏膜分泌,可刺激胃及肠管的机械性收缩运动。创伤时机体产生应激反应导致血中MOT升高,而高水平MOT可刺激GAS的释放增加, GAS刺激胃酸分泌并降低幽门括约肌张力导致十二指肠液返流入胃,从而使胃黏膜受损。胃酸过多分泌所致的胃排空延缓及胃肠道缺血均也刺激MOT分泌增加。MOT和GAS不仅引起创伤后应激性溃疡的重要因素,而且可能对胃黏膜损伤的病理过程产生重要影响^[7]。本实验结果显示胃动素浓度在CPB 15 min、开放升主动脉后5 min比麻醉前、CPB前、停CPB 20 min和停CPB 3 h明显增高,围CPB期胃动素浓度的变化类似胃泌素。

降钙素基因相关肽是37个氨基酸组成的具有舒血管作用的神经肽。在胃内CGRP除了神经来源,还有旁分泌及内分泌来源,分泌细胞主要分布于胃窦的腺上皮中,而他的神经纤维见于消化管的各壁层,主要沿黏膜下微动脉、消

化腺及黏膜下肌间神经丛分布,其释放受辣椒素敏感传入神经支配。目前认为CGRP通过一氧化氮和前列腺素的介导,抑制胃酸分泌,舒张血管,参与胃肠道血流的应变性调节,对胃肠血管有扩张作用,同时对胃肠激素的释放也有调节作用^[12-13]。本研究显示围术期胃动素和胃泌素升高的同时, CGRP却显著降低。CGRP浓度在CPB 15 min、开放升主动脉后5 min比麻醉前、CPB前、停CPB 20 min和停CPB 3 h明显降低, CGRP浓度随手术应激刺激增强而降低。CGRP降低可能会加重胃动素和胃泌素升高所致的胃酸过度分泌及胃肠道缺血的程度。

研究表明pHi是反映胃肠黏膜缺血缺氧的敏感指标^[14]。在CPB期间由于低温低压和平流灌注,机体尤先保证重要脏器的血供,患者不同程度地存在胃黏膜低灌注和酸中毒;这种状态持续时间过长或程度严重时可导致术后胃肠道并发症的发生。本实验结果显示pHi和血浆乳酸水平在CPB 15 min、开放升主动脉后5 min比麻醉前、CPB前、停CPB 20 min和停CPB 3 h降低。随着手术进行,应激刺激逐步加强,复温期机体耗氧量急剧增加,更加重了胃肠黏膜缺血缺氧,说明CPB期间存在胃肠道黏膜低灌注和酸中毒。停止CPB后随着应激刺激减弱, pHi逐渐恢复到术前水平。

胃肠激素对胃酸的分泌起重要作用,有刺激、抑制或双重作用,各种胃肠激素对胃酸和胃肠道血流的调节是相互制约,保持平衡^[15]。一旦CPB和外科创伤等应激因素打破这种平衡,胃肠激素会发生明显变化,促使胃酸分泌增多,造成程度不同的消化系损伤。本研究显示CPB心脏

手术期间胃动素和胃泌素升高及CGRP浓度降低可能与心脏手术后消化系统并发症有关。pHi是反映胃肠黏膜缺血缺氧最敏感的指标, 监测CPB期间pHi能预防和减少胃肠黏膜酸中毒, 减少术后消化系统并发症的发生。

4 参考文献

- 1 Alebouyeh N, Toefigh M, Ghasemzadeh N, Mirheydari S, Azargashb E. Predictors of gastrointestinal perforation in patients undergoing coronary artery bypass graft (CABG) surgery in Tehran, Iran. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 13: 251-253
- 2 Geissler HJ, Fischer UM, Grunert S, Kuhn-Régnier F, Hoelscher A, Schwinger RH, Mehlhorn U, Hekmat K. Incidence and outcome of gastrointestinal complications after cardiopulmonary bypass. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2006; 5: 239-242
- 3 Yamaura K, Okamoto H, Akiyoshi K, Irita K, Taniyama T, Takahashi S. Effect of low-dose milrinone on gastric intramucosal pH and systemic inflammation after hypothermic cardiopulmonary bypass. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2001; 15: 197-203
- 4 McSweeney ME, Garwood S, Levin J, Marino MR, Wang SX, Kardatzke D, Mangano DT, Wolman RL. Adverse gastrointestinal complications after cardiopulmonary bypass: can outcome be predicted from preoperative risk factors? *Anesth Analg* 2004; 98: 1610-1617, table of contents
- 5 Fitzgerald T, Kim D, Karakozis S, Alam H, Provido H, Kirkpatrick J. Visceral ischemia after cardiopulmonary bypass. *Am Surg* 2000; 66: 623-626
- 6 D'Ancona G, Baillot R, Poirier B, Dagenais F, de Ibarra JL, Bauset R, Mathieu P, Doyle D. Determinants of gastrointestinal complications in cardiac surgery. *Tex Heart Inst J* 2003; 30: 280-285
- 7 Perugini RA, Orr RK, Porter D, Dumas EM, Maini BS. Gastrointestinal complications following cardiac surgery. An analysis of 1477 cardiac surgery patients. *Arch Surg* 1997; 132: 352-357
- 8 Zacharias A, Schwann TA, Parenteau GL, Riordan CJ, Durham SJ, Engoren M, Fenn-Buderer N, Habib RH. Predictors of gastrointestinal complications in cardiac surgery. *Tex Heart Inst J* 2000; 27: 93-99
- 9 Hanekamp MN, Spoel M, Sharman-Koendjibiharie M, Hop WC, Hopman WP, Jansen JB, Tibboel D. Gut hormone profiles in critically ill neonates on extracorporeal membrane oxygenation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 40: 175-179
- 10 徐鹏, 易定华. 兔体外循环对胃泌素及其受体的影响. *第四军医大学学报* 2000; 21: 502-504
- 11 程光华, 陶进. 急性颅脑损伤患者胃动素和胃泌素水平测定的临床意义. *中国急救医学* 1997; 17: 5-7
- 12 Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein C, Hsu SY. Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem* 2004; 279: 7264-7274
- 13 赵平, 凌亦凌. 胃肠激素与危重症胃肠功能障碍的研究进展. *中国危重病急救医学* 2006; 18: 634-636
- 14 李建忠, 余飞飞, 岳茂兴. 胃肠功能障碍患者胃黏膜内pH值的监测方法和意义. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 983-984
- 15 潘秀珍, 蔡立勉. 胃肠激素研究的现状. *世界华人消化杂志* 1999; 7: 67-71

■同行评价

本研究方法先进, 结果可靠, 结论明确, 具有较大的理论及实际意义。

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志数字用法标准

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 本刊论文中数字作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍体、四联球菌、五四运动、星期六等。统计学数字采用阿拉伯数字, 如1000-1500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等。测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度。任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成3.6 \pm 0.4 kg, 过多的位数并无意义。又如8.4 \pm 0.27 cm, 其SD/3 = 0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的, 应该舍。末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成, 不得多次完成。例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24。年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定: 分母 \leq 100, 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 \leq 1 000, 百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行! (常务副总编辑: 张海宁 2009-03-08)

乙型肝炎病毒cccDNA与HBx蛋白在肝细胞性肝癌中表达的关系及意义

潘爱萍, 黄古叶, 陈 晶, 何燕玲

■背景资料

HBV cccDNA是HBV复制的中间体, 是HBV mRNA和前基因组RNA的合成模板, 同时也是HBV持续感染的关键因素, 对HBV的复制和感染状态的建立具有十分重要的意义。HBx是HBV的X开放阅读框架(ORF)编码的一种具有反式激活作用的多功能蛋白质, 在调节基因转录、细胞信号转导、控制细胞增殖和转化中具有重要作用。但是两者间的关系及如何致癌的机制仍未清楚。

潘爱萍, 广西中医学院第一附属医院检验科 广西壮族自治区南宁市 530023

黄古叶, 广西中医学院第一附属医院肝病科 广西壮族自治区南宁市 530023

陈晶, 广西中医学院第一附属医院分子生物学实验室 广西壮族自治区南宁市 530023

何燕玲, 广西中医学院第一附属医院病理科 广西壮族自治区南宁市 530023

作者贡献分布: 本文由黄古叶, 潘爱萍及陈晶设计; 研究过程由潘爱萍, 陈晶及何燕玲操作完成; 数据分析由陈晶完成; 本论文写作由潘爱萍完成。

通讯作者: 潘爱萍, 530023, 广西壮族自治区南宁市, 广西中医学院第一附属医院检验科. ksfw1@163.com

收稿日期: 2008-08-19 修回日期: 2009-02-13

接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-08

Relationship between hepatitis B virus covalently closed circular DNA and HBx protein expression in hepatocellular carcinoma and its significance

Ai-Ping Pan, Gu-Ye Huang, Jing Chen, Yan-Ling He

Ai-Ping Pan, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Medicine College, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Gu-Ye Huang, Department of Hepatology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Medicine College, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Jing Chen, Department of Biology Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Medicine College, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Yan-Ling He, Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Medicine College, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Correspondence to: Ai-Ping Pan, Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Traditional Medicine College, Nanning 530023, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China. ksfw1@163.com

Received: 2008-08-19 Revised: 2009-02-13

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To explore relationship of hepatitis B virus covalently closed circular DNA (HBV cccDNA) expression to the expression of HBx protein within hepatocellular carcinoma and to

investigate their significance.

METHODS: The tumor tissues and their adjacent-tumor tissues of 42 HCC cases were selected. The expression of the HBx protein was detected by SABC immunohistochemistry and the expression levels of hepatitis B virus covalently closed circular DNA were measured by real time polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: The expression of the HBx protein was negative in normal liver tissues while there were 31 positive cases (73.8%) in tumor tissues and 35 positive cases (83.3%) in adjacent-tumor tissues without significant difference. The levels of HBV cccDNA in the adjacent-tumor tissues were higher than those in HCC tissues but no significant difference was detected between them. The levels of HBV cccDNA in tumor tissues whose HBx proteins expression were positive were higher than those whose HBx proteins expression were negative ($P < 0.05$), and similar result existed in the adjacent-tumor tissues ($P < 0.05$). There was a positive correlation between HBx protein expression and the expression levels of HBV cccDNA ($r = 0.778$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: There is a positive correlation between the expression of the HBx protein and the level of HBV cccDNA, and their interaction might have a very important effect on emergence and development of HCC.

Key Words: Covalently closed circular DNA; Hepatitis B virus x protein; Hepatocellular carcinoma; Real time polymerase chain reaction

Pan AP, Huang GY, Chen J, He YL. Relationship between hepatitis B virus covalently closed circular DNA and HBx protein expression in hepatocellular carcinoma and its significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 712-715

摘要

目的: 探讨肝细胞性肝癌中乙型肝炎病毒(HBV)cccDNA与HBx蛋白表达的关系及其意义。

■同行评议者

张占卿, 主任医师, 上海市(复旦大学)公共卫生中心

方法: 取42例肝细胞性肝癌患者的癌和癌旁组织, 采用SABC法检测组织中的HBx蛋白; 采用RT-PCR法检测组织中的HBV cccDNA水平。

结果: HBx蛋白在癌及癌旁组织中的阳性例数分别为31例(73.8%)和35例(83.3%), 无显著性差异; 癌旁组织中cccDNA水平较癌组织中的高, 但是统计学检验无显著性差异; 癌组织和癌旁组织中HBx蛋白(+)者的cccDNA水平均明显高于HBx蛋白(-)者($P < 0.05$)。HBx蛋白表达与cccDNA水平呈正相关($r = 0.778, P < 0.01$)。

结论: HBx蛋白的表达与cccDNA水平明显相关, 他们相互作用、相互影响并在肝癌的发生发展中起重要作用。

关键词: 共价闭环状DNA; 乙型肝炎病毒X蛋白; 肝细胞性肝癌; 适时聚合酶链反应

潘爱萍, 黄古叶, 陈晶, 何燕玲. 乙型肝炎病毒cccDNA与HBx蛋白在肝细胞性肝癌中表达的关系及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 712-715
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/712.asp>

0 引言

乙型肝炎是世界上流行最严重的病毒性疾病, 全球有约3.5亿乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染者。慢性乙型肝炎是肝硬化和肝癌的高危因素。HBV复制的中间体, 是HBV mRNA和前基因组RNA的合成模板, 同时也是HBV持续感染的关键因素^[1], 对HBV的复制和感染状态的建立具有十分重要的意义^[2]。HBx是HBV的X开放阅读框架(ORF)编码的一种具有反式激活作用的多功能蛋白质, 在调节基因转录、细胞信号转导、控制细胞增殖和转化中具有重要作用^[3]。为探讨HBV cccDNA的复制与HBx蛋白表达间的关系, 选取我院42例肝癌患者的组织进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料 收集2002-04/2008-06本院手术切除的肝细胞性肝癌患者42例, 其中男35例, 女7例, 年龄28-71(中位年龄46)岁。每例肝癌患者取癌组织和癌旁组织, 所有标本均经100 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μ m连续切片。肿瘤均经术后病理证实, 肝癌患者经血清学检查均呈HBsAg阳性。所有标本另取一小份立即放入液氮内保存, 转移至-80℃冰箱备用。兔抗HBx蛋白多克隆抗体购自武汉晶美生物工程有限公司, 免疫组

化SABC试剂盒购自武汉博士得生物工程有限公司。Taq酶、dNTP、氯化镁溶液、超纯水和DNA分子量标准等购自大连宝生物公司。DNA提取试剂盒购自美国Promega公司。Plasmid-Safe™ ATP依赖性DNA酶购自美国Epicentre公司。乙型肝炎病毒cccDNA核酸荧光PCR检测试剂盒购于上海之江生物科技有限公司。PCR仪为美国伯乐公司生产的MJ-1型荧光定量PCR仪。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化实验: 石蜡切片经二甲苯脱蜡后, 逐级酒精入水。按照免疫组化SABC试剂盒使用说明, 采用SABC法, 抗原热修复用微波修复15 min, 一抗4℃过夜, 生物素标记的二抗(通用型, 即可用于抗兔又可用于抗鼠)37℃孵育1 h, SABC复合物37℃孵育30 min, DAB显色, 苏木素复染, 中性树胶封固。设阳性对照和阴性对照。阳性对照为经重复实验证实为阳性的切片; 在阳性切片上分别用PBS替代一抗和用正常兔血清IgG代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 免疫组化实验结果的判定标准: 免疫组化阳性反应物为棕黄色颗粒, 在细胞的胞质或胞核内呈棕黄色染色为阳性细胞。参照判定标准^[2], 一方面按照阳性细胞面积占切片总面积的百分比进行积分: 设0%-5%为0分; 5%-25%为1分; 25%-50%为2分; 50%-75%为3分; 75%-100%为4分。另一方面按阳性细胞中染色的强度积分: 设弱阳性为1分; 中等阳性为2分; 强阳性为3分。将上述两项相加, 之和大于1的即判定为阳性标本。

1.2.3 RT-PCR: (1)肝组织中DNA及cccDNA的提取: 按照DNA提取试剂盒说明书提取肝癌组织及癌旁组织的总DNA。提取肝组织中HBV cccDNA: 取1 μ g总DNA用Plasmid-Safe™ ATP依赖性DNA酶常规酶切, 于70℃水浴30 min以灭活该酶。(2)cccDNA引物与探针: 上游引物: 5'-ATACGGGTCAATGTCCATGC-3'(nt 1551-1571); 下游引物: 5'-CCGTCTGTG CCTTCTCATCT-3'(nt 1991-2011)。探针: 5'-FAM-CCGTCTGTG CCTTCTCATCT-TAMRA-3'(nt 1880-1900)。扩增片段大小为370 bp。(3)cccDNA定量扩增反应: PCR系统包括10 \times Buffer 2.5 μ L, Mg²⁺ 6 μ L, 6 mmol/L, dNTP 2 mL, 200 μ mol/L, 引物1 μ L, 400 μ mol/L, 探针1 μ L, 200 μ mol/L, ROX 0.5 μ L, Taq酶0.2 μ L, 1 U, 标本0.5 μ g, 加双蒸水至25 μ L。循环条件为94℃ 2 min, 1个循环, 90℃ 20 s至60℃ 1 min, 45个循

■ 研发前沿

HBV感染后, 病毒基因组常整合入宿主细胞基因组造成宿主细胞染色体不稳定。X基因是最常被整合的基因, 整合形式的HBx蛋白在体内和体外都具有反式激活作用。HBx蛋白是一种多功能蛋白质, 可促进肝细胞转化, 亦与HBV感染后HCC的发生密切相关。

■应用要点

本研究结果表明, 深入探讨cccDNA与HBx蛋白的关系, 可能会为阐明HBV相关性HCC的发生和发展提供有益线索。

表 1 HBx蛋白在癌组织、癌旁组织中的表达 $n(\%)$

分组	HBx蛋白表达	
	+	-
癌组织	31(73.8)	11(26.2)
癌旁组织	35(83.3)	7(16.7)

表 2 HBx蛋白表达与cccDNA水平的关系 (mean \pm SD, log)

HBx蛋白表达	cccDNA水平(copies/mg)	
	癌组织	癌旁组织
+	6.25 \pm 1.31 ^a	6.15 \pm 1.36
-	4.64 \pm 1.25	5.64 \pm 1.45

^a $P < 0.05$ vs HBx蛋白表达(-)。

环。阳性标准品为cccDNA标准质粒。取标准质粒 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 作标准曲线。样本及标准品均做3复管, 结果取其均值。每次扩增均设阳性对照及阴性对照。

统计学处理 用SPSS13.0进行统计处理。率的比较用 χ^2 检验, cccDNA水平的比较用 t 检验。HBx蛋白表达与cccDNA水平的关系用相关性分析。 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 HBx蛋白表达 HBx蛋白在癌及癌旁组织中的阳性例数分别为31例和35例, 阳性率分别为73.8%和83.3%, 无显著性差异($P > 0.05$, 表1); HBx蛋白阳性反应物主要位于胞质(图1A-B), HBx蛋白阳性反应细胞多呈弥漫性分布。阳性对照为阳性结果; 阴性对照, 即阳性切片用PBS及正常兔血清代替一抗, 结果均为阴性(图1C)。

2.2 肝组织中cccDNA的表达 癌旁组织中cccDNA水平(5.72 ± 1.23 copy/mg)较癌组织中(5.31 ± 1.21 copy/mg)的高, 但是统计学检验无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 HBx蛋白表达情况与cccDNA表达水平的关系 癌组织和癌旁组织中HBx蛋白(+)者的cccDNA水平均明显高于HBx蛋白(-)者($P < 0.05$, 表2)。HBx蛋白表达与cccDNA水平呈正相关($r = 0.778$, $P < 0.01$)。

3 讨论

乙型肝炎病毒共价闭环状DNA(hepatitis B virus covalently closed circular DNA, HBV cccDNA)是HBV复制的中间体, 是HBV mRNA和前基因组RNA的合成模板, 也是HBV持续感染的关键因素^[4-5], 是病毒活跃复制状态的重要指标, 是HBV生活周期的核心部分^[6]。最近有报道HBV病毒负荷和活跃复制与HCC的发生相关^[7-8]。HBV病毒活跃复制通过增加病毒DNA整合到癌基因、抑癌基因或细胞DNA调控元件附近直接启动恶性转化, 导致基因组不稳定, 还增加转录活化蛋白HBVx蛋白的产生, 通过与p53

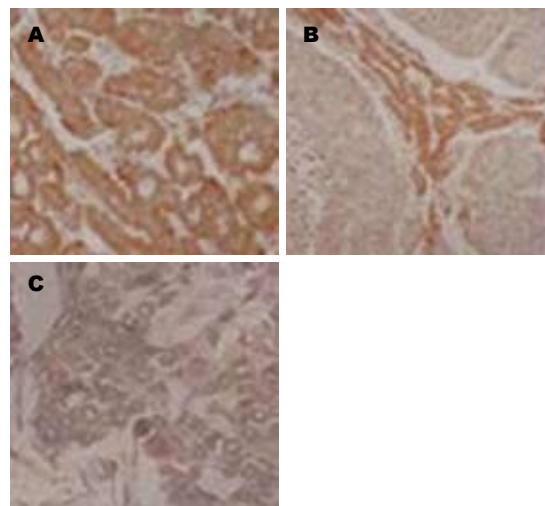


图 1 免疫组化染色结果。A: 肝癌组织中HBxAg阳性; B: 癌旁组织中HBxAg阳性; C: 阴性对照: 肝癌组织阴性。

抑制基因的结合阻断其诱导的凋亡, 从而诱导癌变。HBV病毒活跃复制还通过引起肝脏坏死炎症反应间接诱导癌变^[9]。

HBV感染后, 病毒基因组常整合入宿主细胞基因组造成宿主细胞染色体不稳定。X基因是最常被整合的基因, 整合形式的X基因产生的HBx蛋白在体内和体外都具有反式激活作用^[3]。HBx蛋白是一种多功能蛋白质^[3]促进肝细胞转化^[10], 亦与HBV感染后HCC的发生密切相关^[11]。

虽然研究发现cccDNA和HBx蛋白均可能与HBV感染后HCC的发生有着密切关系^[7-8, 11], 但是他们的之间的关系以及他们如何致癌的机制仍未清楚。因此深入探讨cccDNA和HBx蛋白的表达及他们在HCC发生发展中的作用是本研究的重点。

本研究表明, 癌旁组织HBx蛋白的表达略高于癌组织中HBx蛋白的表达, 但是没有显著性差异($P > 0.05$)。说明HBx蛋白本身可能未直接参与肝癌的发生发展。同时也发现癌旁组织中cccDNA水平较癌组织中的高, 但是亦无显著性差异($P > 0.05$)。这也表明, 虽然文献报道, cccDNA的表达水平反映HBV复制状态的活跃程度, 同时

HBV活跃复制状态与肝癌的发生密切相关^[2],但是本研究未能证实cccDNA在HCC发生中的直接的显著作用. Zhang *et al*^[12]提出cccDNA在肝脏中的分布是不均匀的, 本研究也发现cccDNA在癌旁组织中的水平高于癌组织中的水平, 虽然无显著性差异($P>0.05$), 但这一结果支持上述观点.

在癌及癌旁组织中, HBx蛋白表达阳性者cccDNA水平均明显高于HBx蛋白表达阴性者($P<0.05$), 同时发现HBx蛋白的表达与cccDNA水平呈正相关($r = 0.778, P<0.01$). 张涛 *et al*^[2]认为, HBV病毒活跃复制可增加HBVx蛋白的产生, 并通过与p53结合诱导癌变. 而cccDNA水平可以反映HBV病毒复制的活跃程度, 因此我们的数据似乎表明, 活跃复制的HBV感染是通过HBVx蛋白的作用而致癌的. 但是, Chou *et al*^[1]在研究HBV cccDNA的转录能力时发现, 细胞内转录因子可以被HBx蛋白激活, HBV cccDNA的转录活性很大程度上被HBx蛋白调控, HBx蛋白可看作一种潜在的转录激活子, 推测HBx可通过提高细胞内转录因子的表达而改变HBV cccDNA的转录能力, 缺乏X蛋白的表达导致源自HBV cccDNA的病毒转录物产量降低, 由于X蛋白的缺乏引起病毒pgRNA的表达下调, 基因组进入细胞核及HBV cccDNA库的扩增或被间接终止. 因此, 在乙肝相关性HCC中, cccDNA与HBx蛋白相互作用, 相互影响, cccDNA可能通过增加HBx蛋白的表达并通过其作用而致癌, 而HBx蛋白也调控着cccDNA的转录, 使得HBV的复制处于活跃状态. 虽然两者在肝癌发生发展中的确切机制尚未阐明, 但是本研究的结果提示, 深入探讨cccDNA与HBx蛋白的关系, 可能会为阐明HBV相关性HCC的发生和发展提供有益线索, 值得深入研究.

4 参考文献

- 1 Chou YC, Jeng KS, Chen ML, Liu HH, Liu TL, Chen YL, Liu YC, Hu CP, Chang C. Evaluation of transcriptional efficiency of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by reverse transcription-PCR combined with the restriction enzyme digestion method. *J Virol* 2005; 79: 1813-1823
- 2 张涛, 韩涛, 高英堂, 陈浩, 杜智, 王毅军. 乙型肝炎病毒感染的肝癌患者肝组织中乙型肝炎病毒cccDNA的检测. *中华肝脏病杂志* 2007; 15: 232-233
- 3 Wu CG, Salvay DM, Forgues M, Valerie K, Farnsworth J, Markin RS, Wang XW. Distinctive gene expression profiles associated with Hepatitis B virus x protein. *Oncogene* 2001; 20: 3674-3682
- 4 Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 51-68
- 5 Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepatol* 2006; 44: S71-S76
- 6 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129
- 7 Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, Hsiao CK, Chen PJ, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002; 347: 168-174
- 8 Yu MW, Yeh SH, Chen PJ, Liaw YF, Lin CL, Liu CJ, Shih WL, Kao JH, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B virus genotype and DNA level and hepatocellular carcinoma: a prospective study in men. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 265-272
- 9 张峰, 邵永孚, 许杨, 高纪东, 刘国亭, 徐立斌, 孙宗棠. 乙肝病毒活跃复制与肝细胞癌发生的相关性研究. *中华普通外科杂志* 2006; 21: 1-3
- 10 Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL, Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 25858-25864
- 11 Chen GG, Li MY, Ho RL, Chak EC, Lau WY, Lai PB. Identification of hepatitis B virus X gene mutation in Hong Kong patients with hepatocellular carcinoma. *J Clin Virol* 2005; 34: 7-12
- 12 Zhang YY, Zhang BH, Theele D, Litwin S, Toll E, Summers J. Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 12372-12377

■同行评价

本文设计合理, 结论可靠, 具有一定学术价值, 但新颖性一般.

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志栏目设置

本刊讯 本刊栏目设置包括述评, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要. 文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确. (常务副总编辑: 张海宁 2009-03-08)

恩替卡韦联合乙肝免疫球蛋白预防肝移植术后乙肝再感染

郑俊福, 韩大康, 李丽, 罗晓岚, 肖默, 卢实春, 闫军

■背景资料

目前OLT是治疗HBV相关性终末期肝病非常有效的方法。但移植肝HBV复发,可导致移植肝功能衰竭,甚至受体死亡,因此在LT术前、术中术后进行抗HBV治疗对改善肝移植患者的预后具有关键作用。国内外研究揭示LAM加HBIG的抗病毒方案能有效预防OLT后HBV的复发,但存在长期应用LAM,病毒发生YMDD变异后,引起拉米夫定耐药,乙肝复发,而恩替卡韦有抗病毒活性强,变异率低,对YMDD变异有效的特点。比较ETV加HBIG与LAM加HBIG的疗效,寻找更好的抑制肝移植后预防乙肝复发的方案。

■同行评议者

邱双健, 副教授, 复旦大学中山医院肝病外科; 于颖彦, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院消化外科研究所与器官移植中心

郑俊福, 韩大康, 李丽, 罗晓岚, 肖默, 闫军, 首都医科大学附属北京佑安医院肿瘤生物治疗科 北京市 100069
卢实春, 首都医科大学附属北京佑安医院外科 北京市 100069

作者贡献分布: 此课题由郑俊福与闫军酝酿及设计; 郑俊福采集和分析数据, 由郑俊福, 李丽及韩大康起草和审阅文章; 卢实春, 李丽, 罗晓岚及肖默指导。

通讯作者: 闫军, 100069, 北京市丰台区右安门外西头条8号, 首都医科大学附属北京佑安医院肿瘤生物治疗科。

yazlswk@gmail.com

电话: 010-63291028 传真: 010-63291028

收稿日期: 2009-01-09 修回日期: 2009-02-11

接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-08

Intramuscular hepatitis B immunoglobulin combined with entecavir for long-term prophylaxis of hepatitis B re-infection after liver transplantation

Jun-Fu Zheng, Da-Kang Han, Li Li, Xiao-Lan Luo, Mo Xiao, Shi-Chun Lu, Jun Lv

Jun-Fu Zheng, Da-Kang Han, Li Li, Xiao-Lan Luo, Mo Xiao, Jun Lv, Department of Tumor Biological Treatment, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Shi-Chun Lu, Department of Surgery, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Correspondence to: Dr. Jun Lv, Department of Tumor Biological Treatment, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China. yazlswk@gmail.com

Received: 2008-01-19 Revised: 2009-02-09

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To evaluate BIG on HBV recurrence after orthotopic liver transplantation (OLT), and to investigate prevention strategies for liver transplantation with YMDD.

METHODS: One hundred and twenty four cases who underwent orthotopic liver transplantation and fulfilled the enrollment criteria, were retrospectively analyzed. HBV reinfection was analyzed and compared between long-term intramuscular hepatitis B virus immunoglobulin & entecavir group and intramuscular hepatitis B virus & immunoglobulin and Lamivudine group. The effect of the prophylaxis for HBV

reinfection in patients with YMDD mutants was investigated. HBV markers in serum, HBV DNA and the ratio of HBV reinfection were analyzed.

RESULTS: Entecavir group with a follow-up period of 19.5 ± 9.4 mo, showed no HBV reinfection. However, 10 patients had been traced for 18.1 ± 6.4 mo in lamivudine group. The rate of HBV reinfection in entecavir group was significantly lower than lamivudine group (0% vs 11.9%, $P < 0.05$). The patients with YMDD mutants before transplantation in Entecavir group had been traced no postoperative HBV reinfection.

CONCLUSION: Entecavir and intramuscular HBIG as the prophylaxis of HBV reinfection is more effective than the lamivudine and intramuscular HBIG, especially for patients with preoperative YMDD mutants.

Key Words: Liver transplantation; Hepatitis B virus; Entecavir; Immunoglobulin

Zheng JF, Han DK, Li L, Luo XL, Xiao M, Lu SC, Lv J. Intramuscular hepatitis B immunoglobulin combined with entecavir for long-term prophylaxis of hepatitis B re-infection after liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 716-719

摘要

目的: 评价恩替卡韦联合乙肝免疫球蛋白(HBIG)预防原位肝移植(OLT)术后HBV再感染的效果,并探讨术前存在YMDD患者的预防策略。

方法: 回顾性分析2003-05/2008-01行同种异体原位肝移植术患者,比较长期使用与拉米夫定+肌注型HBIG预防HBV再感染的效果;并观察术前出现YMDD患者应用恩替卡韦+肌注型HBIG的疗效;两组患者观察截止2008-10,对HBV DNA定量水平、乙肝两对半、HBV再感染率进行统计学分析。

结果: 恩替卡韦组40例患者,随访时间 19.5 ± 9.4 mo,未发现HBV再感染;拉米夫定组共84

例患者, 随访时间 18.1 ± 6.4 mo, 其中10例出现了HBV再感染, 再感染率为11.9%, 两组差异有统计学意义. 6例术前出现YMDD患者应用恩替卡韦+肌注型HBIG预防, 无术后乙肝再感染.

结论: 恩替卡韦联合HBIG与拉米夫定联合HBIG相比, 有效地降低了肝移植术后HBV再感染率, 对术前存在YMDD变异的患者的有效.

关键词: 肝移植; 乙型肝炎病毒; 恩替卡韦; 免疫球蛋白

郑俊福, 韩大康, 李丽, 罗晓岚, 肖默, 卢实春, 闫军. 恩替卡韦联合乙肝免疫球蛋白预防肝移植术后乙肝再感染. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 716-719
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/716.asp>

0 引言

肝移植已成为目前治疗终末期肝病的最有效的方法, 如果乙肝患者在肝移植后不加任何防治乙肝复发的措施, 其乙肝复发率高达80%-100%, 可导致移植肝功能衰竭, 需要再移植, 甚至受体死亡^[1]. 肝移植术后HBV再感染和肝炎复发是影响移植存活和肝移植长期疗效的重要因素. 目前使用拉米夫定(lamivudine, LAM)联合乙肝免疫球蛋白预防肝移植术后HBV在感染取得良好效果^[2]. 但对于不同抗病毒药物和拉米夫定变异的患者疗效仍有待评价. 国内外研究表明, LAM治疗期间, 病毒DNA编码的DNA聚合酶基因序列发生了变异, 这种变异在YMDD序列及其附近, 因而称为YMDD变异. 30%的患者在服药1年时发生了YMDD变异, 服药时间延长到2年时, 病毒变异率达到58%. 发生YMDD变异的病毒株对LAM有耐药性, 变异病毒对肝脏有明显损伤作用. 目前常用的核苷类抗病毒药物用法为: 在肝移植前只要存在HBV DNA复制均需应用抗病毒药物包括LAM、阿德福韦(adeфовir, ADV)和恩替卡韦(entecavir, ETV), 通常建议应用抗病毒药物时间超过3 wk以上, 以保证在移植时HBV DNA定量阴性, 肝移植后, 无论HBV DNA及乙肝病毒检测指标如何, 均需持续口服抗病毒药物加肌注小剂量乙肝免疫球蛋白预防乙肝复发, 如长期应用LAM, 出现YMDD变异, 则应加用ADV, 或换用ETV 1.0 g/d. 抗病毒药物中ETV抗病毒作用最强, 起效迅速且变异率低^[3]. 现将我院2003-05/2008-01因乙肝相关的终末期肝病接受肝移植病例的随访

资料分析, 比较ETV与LAM联合乙肝免疫球蛋白预防肝移植术后乙肝复发的效果.

1 材料和方法

1.1 材料 佑安医院2003-05/2008-01因乙肝相关的终末期肝病或合并肝细胞癌接受肝移植手术者164例, 40例随访过程中脱落, 共124例作为本次研究的对象. LAM联合小剂量乙肝免疫球蛋白(对照组)84例, 男63例, 女21例, 平均年龄 48.1 ± 9.3 岁, 其中肝细胞癌37例, 肝硬化或重型肝炎47例, 无LAM耐药病例, 术前HBeAg(+) 24例, 术前HBV DNA阳性45例, 随访时间 18.1 ± 6.4 mo. ETV联合小剂量乙肝免疫球蛋白40例, 男31例, 女9例, 平均年龄 46.3 ± 8.6 岁, 其中肝细胞癌16例, 肝硬化或重型肝炎24例, LAM耐药病例6例, 术前HBeAg(+) 16例, 术前HBV DNA阳性23例, 随访时间 19.5 ± 9.4 mo. 两组患者在年龄、性别、术前HBeAg(+), 术前HBV DNA阳性(HBV DNA $>1 \times 10^6$ 拷贝/L)、随访时间等方面差异无统计学差异, 但对于术前LAM耐药存在差异.

1.2 方法

1.2.1 分组及给药: 所有病例常规应用HBIG肌肉注射给药, 术中无肝期肌肉注射800 U, 术后1 wk内肌肉注射400 U/d, 术后3 mo内血清持HBsAb目标滴度保持在400 U/L以上, 术后3-6 mo保持在300 U/L以上, 6 mo之后保持在100 U/L以上, 并根据应用抗病毒预防方案的不同分为两组: (1)LAM组84例, 术前接受口服抗病毒治疗, 术后继续口服LAM抗病毒治疗, 若在肝移植术后治疗过程中出现对LAM耐药的YMDD变异株的患者, 则联合应用LAM和ADV(ADF)或改用ETV 1.0 g/d; (2)ETV组: 术前存在LAM变异 po ETV 1.0 g/d, 无LAM变异 po ETV 0.5 g/d, 术后继续口服抗病毒药.

1.2.2 抗排斥方案: 采用FK506+骁悉+激素或新山地明+骁悉+激素三联疗法, 激素于术后6 mo内停药, 临床或肝穿提示急性排斥予以调整治疗方案后无效者予以激素冲击治疗.

1.2.3 血清学HBV标志物检测: 乙型肝炎病毒检测指标: 包括HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb和HBcAb水平, 术后1 mo内每周复查1次, 之后每个月复查1次, 连续3 mo, 若无并发症3 mo后复查1次. 采用ELISA法.

1.2.4 肝功能检测: 肝功能术后1 wk内每天检查1次, 术后2-4 wk内每周检查3次, 之后每周检查1次, 连续3 mo, 若无并发症1 mo检查1次.

■ 研发前沿

恩替卡韦具有抗乙肝病毒活性强, 变异率低, 对LAM耐药的病毒株有效的特点, 在乙肝患者的治疗中取得良好效果, 但对于在肝移植术后的患者中的疗效仍有待评价, 特别是与LAM加HBIG的疗效的比较.

■ 创新盘点

本文通过对124例HBV相关性终末期肝病肝移植的临床资料分析, 揭示低剂量乙肝免疫球蛋白(HBIG)联用恩替卡韦(ETV)可以有效预防OLT后HBV再感染, 对术前存在YMDD变异的患者的有效. 恩替卡韦联合HBIG与拉米夫定联合HBIG相比, 有效地降低了肝移植术后HBV再感染率, 是目前理想的控制OLT后HBV复发的治疗措施, 但更长期的临床预防效果仍需要观察.

■名词解释

YMDD变异: 拉米夫定治疗期间, 病毒DNA编码的DNA聚合酶基因序列发生了变异, 这种变异在YMDD序列及其附近, 因而称为YMDD变异。

1.2.5 HBV DNA定性和定量测定及YMDD变异: 若HBsAg(+), 采用PCR法定性测定HBV DNA; 若HBV DNA(+), 则定量检测, 其敏感度 $<1 \times 10^6$ 拷贝/L, 扩增病毒DNA编码的DNA聚合酶基因序列, 进一步检测酪氨酸-蛋氨酸-天门冬氨酸-天门冬氨酸(YMDD)变异, 最常见的变异是M(酪氨酸)被V(缬氨酸)或I(异亮氨酸)取代。

1.2.6 肝组织活检及免疫组化染色检查: 主要为HBsAg和HBcAg, Envision法, 全套免疫组化试剂。肝穿刺活检在出现临床症状, 临床怀疑HBV再感染或复发时进行。

1.2.7 HBV再感染及乙肝复发标准: 根据2001年7月中华医学会器官移植分会主办的“肝脏移植术后预防乙肝复发专题研讨会”制定的标准, HBV再感染: 血清HBsAg(+); 血清HBV DNA(+); 肝组织HBsAg和(或)HBcAg(+); 肝组织HBV DNA(+). 必须符合以下标准才可诊断为肝移植术后乙肝复发: 有以上HBV再感染的证据; 肝功能化验异常, 并可排除其他原因; 肝活检组织病理学符合病毒性肝炎改变。

统计学处理 运用SPSS11.5统计软件行检验。

2 结果

124例肝移植患者随访时间为6-36 mo, 平均 18 ± 2.17 mo. 在随访期内, LAM组有4例和ETV组有2例患者因为肿瘤复发在1年内死亡, 至死亡时无HBV再感染, 其余患者均存活至随访结束。

LAM组84例患者中, 术后1 wk内77例患者HBsAg转阴, 其余2 mo内转阴; 45例患者1 wk内出现HBsAb, 其余3 wk内出现HBsAb. 据诊断标准, 在随访期内共有10例患者发现有HBV再感染, 再感染率11.9%; 其中6例证实有乙肝复发, 复发时间平均为 8.2 ± 4.3 mo, 复发率为7.14%, 5例检测到YMDD变异株, 发现时间平均为术后9.1 mo. ETV组40例患者, 术后1 wk内37例患者HBsAg转阴, 其余2 wk内转阴; 32例患者术后1 wk内出现HBsAb, 其余3 wk内出现HBsAb. 患者随访期内并未出现HBV再感染. 两组疗效比较见表1。

使用SPSS11.5软件, 进行Fisher校正的 χ^2 检验, 再感染率两组间差异具有统计学意义($P = 0.034$), 其余指标两组间无明显统计学差异。

3 讨论

肝移植术是各种终末期肝病的有效治疗手段, 国内接受肝移植术的患者大多为乙肝相关性疾

表 1 LAM组与ETV组疗效的比较 $n(\%)$

分组	<i>n</i>	术后1 wk内 HbsAg转阴率	再感 染率	复发率	YMDD 变异
LAM	84	77(91.7)	10(11.9)	6(7.14)	5(5.9)
ETV	40	37(92.5)	0	0	0
<i>P</i>		0.974	0.033	0.176	0.323

病, 术后须长期进行抗病毒治疗以预防HBV再感染和肝炎复发^[5-9]. 目前常用的, 预防效果获得认可的预防肝移植术后乙肝复发的治疗方法为LAM联合小剂量乙肝免疫球蛋白^[9,13,21-25]. 但是仍面临由YMDD变异引起LAM耐药的问题. ETV可通过在HBV多聚酶的启动、前基因组mRNA逆转录酶形成和HBV DNA正链合成等多个环节中的作用抑制HBV多聚酶活性, 变异率低^[3]. 多个体外和临床研究已证实ETV具有强大的抗病毒作用, 且起效最为迅速, 并且HBV发生变异后耐药仍有效。

本研究比较了LAM及ETV联合乙肝免疫球蛋白预防乙肝复发的疗效, 拉米夫定联合乙肝免疫球蛋白组84例患者, 10例出现乙肝再感染, 再感染率为11.9%, 其中6例出现复发, 复发率为7.14%, 与国内其他文献报道的复发率基本一致. 再感染病例均为术前HBV DNA阳性患者, 考虑术后再感染与乙肝病毒复制未能完全控制有明显相关. ETV能更有效的控制乙肝病毒复制, 在其治疗的40例患者中, 无1例出现乙肝再感染, 再感染率及复发率为0, 未发现YMDD变异, 疗效令人满意. 与LAM组对比, 在乙肝再感染率上明显优于对方, 但在复发率上差异不明显, 可能是因为LAM联合乙肝免疫球蛋白复发率已较低, 因此应增加病例数可能出现差异. ETV组有6例术前出现YMDD变异的患者, 应用ETV治疗后, 平均随访时间达 18 ± 2.17 mo, 未出现HBV再感染, 这充分说明对YMDD变异的患者, ETV仍能有效地预防HBV再感染。

在LAM组乙肝复发6患者中, 4例加用ETV1.0抗病毒治疗, 3例肝功能稳定, 病毒定量转阴, 1例肝功能恶化, 再次肝移植. 2例加用ADV治疗, 肝功能稳定. 使用LAM联合乙肝免疫球蛋白预防HBV再感染失败的患者, 治疗效果仍不理想。

总之, ETV联合乙肝免疫球蛋白能有效预防肝移植术后HBV再感染, 对术前存在YMDD变异的患者的患者有效. ETV联合HBIG与LAM联合HBIG

相比, 有效地降低了肝移植术后HBV再感染率。

4 参考文献

- Samuel D, Feray C, Bismuth H. Hepatitis viruses and liver transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: S335-S341
- 赵辉, 陆敏强, 蔡常洁, 杨扬, 陈规划. 肝移植术后HBV再感染的危险因素分析及对策. *消化外科* 2006; 5: 250-253
- Chang TT, Gish RG, de Man R, Gadano A, Sollano J, Chao YC, Lok AS, Han KH, Goodman Z, Zhu J, Cross A, DeHertogh D, Wilber R, Colonna R, Apelian D. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006; 354: 1001-1010
- 卢实春, 李波, 严律南, 文天夫, 赵纪春, 王晓波, 刘冲, 马玉奎, 张秀辉. HBV活跃复制肝移植受体在拉米夫定预防下HBV标志物动态变化的研究. *肝脏* 2002; 7: 76-78
- Lai CL, Shouval D, Lok AS, Chang TT, Cheinquer H, Goodman Z, DeHertogh D, Wilber R, Zink RC, Cross A, Colonna R, Fernandes L. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006; 354: 1011-1020
- Yilmaz N, Shiffman ML, Todd Stravitz R, Sterling RK, Luketic VA, Sanyal AJ, Maluf D, Cotterell A, Posner MP, Fisher RA. Prophylaxis against recurrence of hepatitis B virus after liver transplantation: a retrospective analysis spanning 20 years. *Liver Int* 2008; 28: 72-78
- Karademir S, Astarcioglu H, Akarsu M, Ozkardesler S, Ozzeybek D, Sayiner A, Akan M, Tankurt E, Astarcioglu I. Prophylactic use of low-dose, on-demand, intramuscular hepatitis B immunoglobulin and lamivudine after liver transplantation. *Transplant Proc* 2006; 38: 579-583
- 张雅敏, 朱志军, 郑虹, 邓永林, 蒋文涛, 蔡金贞, 沈中阳. 阿德福韦在预防肝移植后乙肝复发的应用. *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 313-315
- 夏念信, 傅志仁, 邱宝安, 王正昕, 李先兴, 白刚, 杨英祥, 王昆. 低剂量乙肝免疫球蛋白与拉米夫定长期联合预防肝移植后HBV复发. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1288-1293
- 王笑梅, 兰孟东, 段英, 志军, 高岚, 马烈, 王凤水, 成军. 肝移植后乙型肝炎复发的临床表现与预后. *胃肠病学和肝病杂志* 2008; 17: 55-85
- Sugauchi F, Orito E, Ohno T, Kato H, Suzuki T, Hashimoto T, Manabe T, Ueda R, Mizokami M. Liver transplantation-associated de novo hepatitis B virus infection: application of molecular evolutionary analysis. *Intervirology* 2002; 45: 6-10
- 毕颖, 陈规划, 何晓顺, 胡瑞德, 文剑明. 肝移植术后免疫抑制剂引起肝损害的病理学改变(附26例肝活检报告). *中华肝胆外科杂志* 2006; 12: 306-308
- 巫林伟, 何晓顺, 朱晓峰, 马毅, 王东平, 钱世鹏, 鞠卫强, 黄洁夫. 乙肝免疫球蛋白预防肝移植后乙肝复发. *热带医学杂志* 2006; 6: 788-790
- 刘爱兵, 李玲, 郝钦芳, 王海燕. 肝移植临床化学指标实验诊断价值. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 1156-1159
- 施晓雷, 丁义涛, 吴亚夫, 吴星宇, 仇毓东, 周建新, 江春平, 张炜炜. 肝移植后慢性移植肝失功的病因诊断和治疗18例. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 2669-2672
- 许赤, 杨扬, 陆敏强, 蔡常洁, 赵辉, 李华, 易述红, 汪根树, 姜华, 陈规划. 肝移植术后长期联合应用拉米夫定和小剂量乙肝免疫球蛋白预防乙型肝炎复发的疗效. *热带医学杂志* 2006; 6: 1164-1166
- Marzano A, Gaia S, Ghisetti V, Carenzi S, Premoli A, Debernardi-Venon W, Alessandria C, Franchello A, Salizzoni M, Rizzetto M. Viral load at the time of liver transplantation and risk of hepatitis B virus recurrence. *Liver Transpl* 2005; 11: 402-409
- Perrillo R, Hann HW, Mutimer D, Willems B, Leung N, Lee WM, Moorat A, Gardner S, Woessner M, Bourne E, Brosgart CL, Schiff E. Adefovir dipivoxil added to ongoing lamivudine in chronic hepatitis B with YMDD mutant hepatitis B virus. *Gastroenterology* 2004; 126: 81-90
- Toniutto P, Fumo E, Caldato M, Apollonio L, Perin A, Pirisi M. Favourable outcome of adefovir-dipivoxil treatment in acute de novo hepatitis B after liver transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 472-473
- 蒋力, 穆毅, 黄容泽, 赵凤林, 李传胜, 鲁岩, 赫荣, 毛羽. 肝移植术后乙肝复发的临床特点分析. *肝胆外科杂志* 2006; 14: 663-863
- 王风水. 肝移植后肝炎复发的防治. *中国实用内科杂志* 2005; 9: 789-792
- 秦红波, 曹浩强. 肝移植术后乙肝复发的预防. *肝胆外科杂志* 2006; 14: 76-78
- Chan HL, Chui AK, Lau WY, Chan FK, Hui AY, Rao AR, Wong J, Lai EC, Sung JJ. Outcome of lamivudine resistant hepatitis B virus mutant post-liver transplantation on lamivudine monophylaxis. *Clin Transplant* 2004; 18: 295-300
- 张相良, 朱晓峰, 石慧娟, 崔书中, 唐云强, 王嘉康, 赵宏宇, 麦聪. 肝移植术后乙肝复发的预防和治疗. *广州医学* 2008; 29: 115-117
- 奚志峰, 夏强, 张建军, 陈小松, 张明, 李齐根, 徐宁, 薛峰, 宋玉, 韩龙志, 王鑫, 沈从欢, 罗毅, 邢天宇. 肝移植术后乙肝复发的预防与处理. *肝胆外科杂志* 2007; 15: 350-354
- 沈中阳. 肝移植术后乙肝复发的综合防治. *中国医学科学院学报* 2005; 27: 431-434
- Westland CE, Yang H, Delaney WE 4th, Wulfsohn M, Lama N, Gibbs CS, Miller MD, Fry J, Brosgart CL, Schiff ER, Xiong S. Activity of adefovir dipivoxil against all patterns of lamivudine-resistant hepatitis B viruses in patients. *J Viral Hepat* 2005; 12: 67-73
- Yi NJ, Suh KS, Cho JY, Kwon CH, Lee KW, Joh JW, Lee SK, Kim SI, Lee KU. Recurrence of hepatitis B is associated with cumulative corticosteroid dose and chemotherapy against hepatocellular carcinoma recurrence after liver transplantation. *Liver Transpl* 2007; 13: 451-458
- Seehofer D, Berg T. Prevention of hepatitis B recurrence after liver transplantation. *Transplantation* 2005; 80: S120-S124
- Schiff E, Lai CL, Hadziyannis S, Neuhaus P, Terrault N, Colombo M, Tillmann H, Samuel D, Zeuzem S, Villeneuve JP, Arterburn S, Borroto-Esoda K, Brosgart C, Chuck S. Adefovir dipivoxil for wait-listed and post-liver transplantation patients with lamivudine-resistant hepatitis B: final long-term results. *Liver Transpl* 2007; 13: 349-360
- 朱志军. 肝移植术后乙型肝炎复发的防治. *外科理论与实践* 2008; 13: 313-315

同行评价

本文病例数较多, 研究设计合理, 结果可靠, 对于正在开展肝移植的单位以及肝病研究单位有参考价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

腹腔镜超声和经皮超声在肝癌射频消融治疗中的联合应用

王峰, 牟培源, 周宁新, 周丁华, 白媛媛

■背景资料

射频消融是近年来开展的高效微创的肿瘤治疗新技术, 在肝脏恶性肿瘤的治疗方面取得了较好的疗效, 腹腔镜超声和经皮超声引导下射频消融治疗肝癌优势各有所长, 联合应用对患者的临床效果较好, 生存率较高且并发症较低。

王峰, 辽宁医学院外硕士培养点, 中国人民解放军北京二炮总医院 北京市 100088

王峰, 牟培源, 周宁新, 周丁华, 白媛媛, 中国人民解放军二炮总医院全军肝胆胃肠病医学专科中心 北京市 100088

作者贡献分布: 此课题由导师牟培源与王峰共同设计; 研究过程由牟培源, 王峰, 周宁新, 周丁华及白媛媛实施完成; 本文撰写由王峰与牟培源完成。

通讯作者: 牟培源, 100088, 北京市西城区新外大街16号, 中国人民解放军二炮总医院肝胆胃肠病研究所. pymu@sina.com
电话: 010-66343097

收稿日期: 2008-12-17 修回日期: 2009-02-21

接受日期: 2009-02-23 在线出版日期: 2009-03-08

Combined application of laparoscopic ultrasonography and percutaneous ultrasonography in radiofrequency ablation for hepatic cancer

Feng Wang, Pei-Yuan Mu, Ning-Xin Zhou, Ding-Hua Zhou, Yuan-Yuan Bai

Feng Wang, Master Education Office, Liaoning Medical College, Chinese PLA Erpao General Hospital, Beijing 100088, China

Feng Wang, Pei-Yuan Mu, Ning-Xin Zhou, Ding-Hua Zhou, Yuan-Yuan Bai, Institute of Hepatobiliary and Gastrointestinal Disease, Chinese PLA Erpao General Hospital, Beijing 100088, China

Correspondence to: Pei-Yuan Mu, Institute of Hepatobiliary and Gastrointestinal Disease, Chinese PLA Erpao General Hospital, 16 Xinwai Avenue, Xicheng District, Beijing 100088, China. pymu@sina.com

Received: 2008-12-17 Revised: 2009-02-21

Accepted: 2009-02-23 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To evaluate combined application of laparoscopic ultrasonography and percutaneous ultrasonography in radiofrequency ablation for hepatic cancer.

METHODS: Between September 2007 and November 2008, 25 patients with 43 malignant liver nodules were treated with laparoscopic ultrasonography-guided and percutaneous ultrasonography-guided radiofrequency ablation at our hospital. Of 25 patients, there were 18 males and 7 females with a mean age of 42 (28-77) year, with 20 Hepatic cancer 2.7-7.5 cm in

diameter with the mean size of 3.8 cm. Hepatitis B positive was diagnosed preoperatively in 14 patients, and hepatitis C positive in 2 patients. There were sixteen patients with liver cirrhosis and thirteen patients with chronic calculous cholecystitis. One lesion was found in 14 patients, two lesions in 3 patients, three lesions in 4 patients, and dotted lesions in 4 patients. All patients were followed up with helical computed tomographie (CT) scan and ultrasonography.

RESULTS: Laparoscopic RFA therapy was performed successfully in 25 patients combined with laparoscopic ultrasonography, and 4 patients experienced local recurrence at the ablation site, 3 patients had a new malignant nodule, for whom percutaneous RFA therapy was performed successfully with percutaneous ultrasonography. Of all cases, 11 patients were performed laparoscopic cholecystectomy simultaneously. With laparoscopic ultrasonography guidance, the mean RFA time per lesion was 39.3 ± 12.1 min, the mean total operation time was 95.5 ± 25.8 min, and the mean blood loss was 148.5 ± 84.3 mL. With percutaneous ultrasonography guidance, the mean RFA time per lesion was 28.3 ± 10.3 min, the mean total operation time was 50.2 ± 11.5 min, and no bleeding sign was found by ultrasound after RFA. No specific complications such as bleeding, gallbladder injury, gastrointestinal tract damage, diaphragmatic injury, bile leakage, stricture of bile duct and liver function failure developed during and after RFA therapy. During a follow-up period of 3-14 months, three of these patients experienced primary liver cancer recurrence, for which surgeons recommended liver transplantation. The remaining cases are alive so far.

CONCLUSION: We are relatively satisfied with long curative effect of combined application of laparoscopic ultrasonography and percutaneous ultrasonography in radiofrequency ablation for hepatic cancer.

Key Words: Liver; Laparoscopic ultrasonography; Percutaneous ultrasonography; Hepatic cancer

Wang F, Mu PY, Zhou NX, Zhou DH, Bai YY. Combined

■同行评议者

吕宾, 教授, 浙江中医学附属第一医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科

application of laparoscopic ultrasonography and percutaneous ultrasonography in radiofrequency ablation for hepatic cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2009; 17(7): 720-723

摘要

目的:探讨腹腔镜超声和经皮超声在肝癌射频消融治疗中的联合应用。

方法:2007-09/2008-11我院对25例肝癌患者的43个肝内肿瘤在腹腔镜超声和经皮超声引导下射频消融治疗。肿瘤直径2.7-7.5(平均3.8)cm。本组中,HBV(+)14例,HCV(+)2例,合并有不同程度肝硬化16例,胆囊结石13例。其中1个癌灶14例,2个癌灶3例,3个癌灶4例,4例多发。术后采用超声检查及螺旋CT增强扫描评价RFA疗效。

结果:25例患者顺利完成腹腔镜超声引导下射频消融治疗,有4例射频治疗部位复发和3例肝内新发病灶又采取经皮超声引导下射频消融治疗。全部病例中,11例同时行胆囊切除术,在腹腔镜超声引导下,单个肿瘤平均射频治疗时间为 39.3 ± 12.1 min,平均总手术时间 95.5 ± 25.8 min,平均总出血量 148.5 ± 84.3 mL。在经皮超声引导下,单个肿瘤平均射频治疗时间 28.3 ± 10.3 min,平均总手术时间 50.2 ± 11.5 min,治疗后超声检查肝周、腹腔未见明确积液。患者术中、后均未出现严重并发症。术后随访,有3例CT提示原发性肝癌复发,外科医生建议行肝移植,其余22例随访至2008-11均存活。

结论:腹腔镜超声和经皮超声在肝癌射频消融治疗中的联合应用,使患者的远期疗效比较满意。

关键词:肝脏;腹腔镜超声;经皮超声;射频消融;肝癌

王峰,牟培源,周宁新,周丁华,白媛媛.腹腔镜超声和经皮超声在肝癌射频消融治疗中的联合应用. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 720-723

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/720.asp>

0 引言

肝癌常发生在乙肝、肝硬化的基础上,使肝储备功能明显降低,以至手术切除率^[1],总体切除率仅有30%左右^[2]。射频消融(radiofrequency ablation, RFA)技术随着仪器性能完善,对深藏于肝实质内的或位于肝门区靠近大血管的肝癌,能起到手术般的疗效且损伤小^[3]。腹腔镜超声

(laparoscopic ultrasound, LUS)在临床应用后,扩展了经皮超声引导下RFA术的适应证,由于其清晰度优于经皮超声,能够更好地判断肿瘤的大小、数目以及肿瘤与周围血管的关系,使LUS引导下穿刺部位更加准确^[4]。但对于复发或转移的位置较安全的小肝癌,我们仍采取经皮超声引导下RFA治疗。二者的联合应用,使许多随肿瘤的多发、复发及转移需进行反复多次治疗的肝癌患者以最小的创伤得到手术切除治疗的效果。

1 材料和方法

1.1 材料 2007-09/2008-11我院在LUS和经皮超声引导下对25例患者的43个肝内肿瘤实施RFA治疗,其中,LUS引导下射频治疗36个病灶,经皮超声引导下射频治疗7个治疗后复发和转移病灶。其中男18例,女7例,年龄28-77(平均年龄42)岁。原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)20例(28个癌灶), (其中肝细胞癌14例,4例合并门静脉癌栓,胆管细胞癌2例),转移性肝癌(metastasis liver cancer, MLC)5例(8个癌灶)。HBV(+)14例,HCV(+)2例,合并有不同程度肝硬化16例,胆囊结石13例。肝功能ChildA级11例,B级6例,C级3例。血小板计数 $\leq 40 \times 10^9/L$ 9例。所有病例均经病理学确诊。肿瘤直径2.7-7.5 cm,平均直径3.8 cm,其中 ≤ 5 cm 10例,AFP $\geq 400 \mu g/L$ 8例,其中1个癌灶14例,2个癌灶3例,3个癌灶2例,4例多发。18例为原发性肝癌首次就诊,4例为原发性肝癌治疗后复发来治疗,3例为结肠癌肝转移。采用ALOKA-3500超声诊断仪(超声探头为专用ALOKALUS探头,型号:UST-MC11-8731,频率8.0 MHz,轴直径10 mm,长度310 mm),腹腔镜设备(AIM型),RFA治疗仪(RITA-1500X型)。

1.2 方法

1.2.1 LUS引导下RFA治疗:腹腔镜RFA治疗组按腹腔镜手术的术前常规准备,全身麻醉。将腹腔镜放入腹腔观察肝脏形态和表面情况,再用LUS常规检查确定肝脏占位性病灶的位置、数目、大小是否与术前检查相符,以及避免遗漏手术前影像学没有发现的病灶。根据肿瘤情况,外科医生采取措施,将肿瘤调节到合适的位置,以便插入射频电极进行RFA治疗。治疗前常规用18G-BARD活检枪对肝脏病灶进行穿刺活检。根据术前影像学检查、腹腔镜所见及LUS检查确定瘤体布针部位及进针深度,超声监视下伞状打开集束电极针后锁定,接射频治疗仪(RITA-1500X)进行RFA治疗。治疗结束后,立即行LUS

■研发前沿

随着RFA技术应用的深入和普及,LUS或经皮超声引导下单一的对肝癌患者RFA治疗已经不能获得很好的临床效果,二者的联合应用有突出的优势,使患者的远期疗效比较满意。

■创新盘点

本文通过总结25例肝癌患者RFA治疗资料,较系统地探讨了LUS和经皮超声在肝癌RFA治疗中联合应用的优点。

■应用要点

本研究总结了LUS和经皮超声在肝癌RFA治疗中联合应用的临床价值,二者的联合应用更能体现出外科微创化的优势,在肝脏恶性肿瘤的治疗方面取得了不少经验,值得总结及推广应用。

监测射频治疗效果及肿瘤周围血管和胆管情况,对于直径小于3 cm的肿瘤只要一次射频治疗就可以使肿瘤完全凝固坏死,对于较大的肿瘤可以穿刺2-3次完成一个病灶的RFA治疗。

1.2.2 经皮超声引导下RFA治疗:经皮超声RFA治疗组按术前常规准备,患者需空腹8-12 h,治疗前患者取仰卧位或左侧卧位,常规经皮超声检查结合CT确定肿瘤的位置、大小、数目及血流情况,确定最佳进针点,应注意与周围组织的关系,防止发生严重并发症。术中根据肿瘤的大小和患者耐受情况决定治疗时间。治疗范围包括肿块周边1 cm外科安全带。在超声引导下将集束电极穿刺入治疗区底部,超声监视下伞状打开集束电极针后锁定,接射频治疗仪(RITA-1500X)进行RFA治疗,治疗停止后收电极针,退针1 cm后重复治疗直至治疗区域浅面即完成一次进针治疗,最后烧灼针道后退出。术后常规超声检查射频治疗效果及肿瘤周围血管和胆管情况,腹腔内有无出血。

1.2.3 观察指标:观察血常规、肝肾功能、体温、进食、腹部症状及体征等情况,疗效判断以治疗后7-14 d复查彩色多普勒超声血流显像(CDFI)和1 mo后CT增强扫描为标准。病灶完全灭活:CDFI检查病灶内无血流,整个病灶回声增强;CT增强扫描病灶无强化。病灶部分灭活:CDFI检查病灶内有血流,病灶回声部分增强或不增强;CT增强扫描病灶部分强化。

2 结果

25例顺利完成LUS引导下RFA治疗,有4例射频治疗部位复发和3例肝内新发病灶又采取经皮超声引导下RFA治疗。其中,1例左外叶巨大肿瘤伴右叶转移;另有1例发现肝内未知的多发低回声结节。术后病理学检查证实:16例为肝细胞癌合并肝硬化。术中超声显示肿瘤组织治疗区回声增强,其内血流信号消失,回声增强区涵盖病灶周围0.5-1.0 cm。术中行胆囊切除11例,就诊时3例患者已经切除胆囊。LUS和经皮超声在肝癌RFA治疗中的应用情况比较(表1)。24例患者的31次治疗术后出现一过性发热、血清转氨酶升高,其中8例体温超过39℃。本组患者术中、术后均未出现大出血、胆囊灼伤、胃肠道损伤、膈肌损伤、胆漏、胆管狭窄、肝功能衰竭等严重并发症。术后7-14 d复查超声,治疗部位的回声比治疗前增强,但不均匀,瘤体内血供全部消失。术后1 mo行增强CT检查,43个结节中有37

表1 LUS和经皮超声在肝癌RFA治疗中的应用

分组	LUS引导下	经皮超声引导下
单个肿瘤平均射频治疗时间	(39.3 ± 12.1)min	(28.3 ± 10.3)min
平均总手术时间	(95.5 ± 25.8)min	(50.2 ± 11.5)min
平均总出血量	(148.5 ± 84.3)mL	极少或无
肿瘤直径	3.7-7.5 cm	2.7-4.5 cm
肿瘤个数	以多发为主	1-3个
肿瘤治疗位置禁忌	无	有(膈顶、胆囊旁等)
术中相关疾病治疗	胆囊切除(11例)、结肠癌切除(3例)	无

个(86.5%)表现为边界清晰的射频致凝固坏死的未增强区。术后随访3-14 mo,有3例定期复查时,CT提示原发性肝癌复发,又处于肝硬化失代偿期,已失去手术指征,外科医生建议行肝移植术而中断随访,其余22例随访至2008-11均存活。

3 讨论

RFA是一种微创性肿瘤物理治疗技术,其热能随时间逐渐向外周传导,从而使局部组织细胞发生热凝固性坏死和变性,达到消融目的,可以起到对早期肿瘤的根治性治疗和对中晚期肿瘤的姑息性治疗。本组中大多数患者伴有不同程度肝硬化,这一与肝癌发生密不可分的基础病变,使肝癌经常复发,对于这些包括肿瘤直径≥5 cm者或合并血管、胆管癌栓或治疗后复发或肝外转移以及合并肝功能失代偿等不能采取多次手术切除的中晚期肝癌患者^[5],我们采取姑息性治疗,RFA由于操作简便、微创、安全,可在LUS和经皮超声引导下操作,可随肿瘤复发、转移而反复治疗,解决了传统开腹手术二次手术困难的问题,故适宜中晚期肝癌的治疗。

腹腔镜外科经过十余年的发展,随着手术技巧的提高以及器械的改进,其触角不断向新的外科领域延伸,比如:腹腔镜下肝脏切除术、腹腔镜下胆总管切开取石术、腹腔镜下结、直肠癌切除术等^[6]。本组中,由于大多数肝癌患者同时合并胆囊结石及结肠癌等,所以,均采取了腹腔镜下RFA治疗联合胆囊切除或结肠切除等,既减轻了患者的症状和痛苦,又为术后复发再次治疗减少了顾虑。Tsioulis *et al*^[7]将Lus和螺旋CT以及MRI、PET等术前检查进行比较,发现Lus对于腹部肿瘤的分期以及可切除性判断具有更高的准确性,可以帮助外科医生决定手术的方案,减少不必要的开腹术。Gómez-Rubio

et al^[8]的初步经验提示:结合了LUS的腹腔镜能够进行一次安全、有效、相对简单的检查过程,显示肝癌情况并做出最佳的选择:肝脏切除或肝移植。例如:本组中1例患者计划做LUS引导下RFA,经腹腔镜及LUS检查后,发现肝内未知的多发低回声结节,鉴于患者肝硬化严重,术中仅对最大的血供丰富的病灶行RFA治疗,如果继续RFA治疗可能导致肝功能衰竭,随采取其余留待观察,1 mo后又对生长较快的病灶行经皮超声引导下RFA治疗。翟博 *et al*^[9]研究发现肝硬化程度及与肝硬化程度有关的凝血机制障碍(PT值和血小板数量异常)是针道出血的重要决定因素。由于肝癌多合并肝炎后肝硬化和门脉高压,即肝功能损害引起凝血功能障碍和脾功能亢进引起血小板减少,因此出血不易自止,对于这类患者,最理想的治疗手段是LUS引导下肝癌RFA治疗,由于腹腔镜下易于识别和处理肝穿刺部位的出血^[10],而要采取经皮超声引导下RFA治疗,就会出现很大危险。尽管腹腔镜下治疗相比开腹切除术创伤要小的多,相比经皮超声引导下还是有很大创伤,大多数经皮超声引导下RFA治疗后的患者都可以走向病房,从本研究中可以看出平均总出血量极少或无,但经皮超声引导下RFA治疗仅局限于病灶相对安全及自身体质好的患者。

Santambrogio *et al*^[11]研究证实,结合了LUS的腹腔镜在术中探查腹部肿瘤时,相比传统的术前影像检查更精确。尽管采取了腹腔镜及LUS和术前的大量影像学检查,隐性癌灶还会被遗漏,再就是硬化肝脏这一与肝癌发生密不可分的基础病变和RFA治疗的不彻底,对于复发的肿瘤主要采取经皮超声引导下RFA治疗。仅很少一部分肝转移癌适合手术切除治疗,主要的原因是肝内多发转移或转移灶靠近大血管及胆管,对于这类病例,根治性的外科切除术可能导致术后肝脏储备功能不足^[12]。经皮超声引导下RFA作为局部微创治疗,可较好的灭活肝内转移灶,而且对肝脏损伤小,当肝内出现再发病灶时可再次或反复多次治疗,因此RFA为治疗肝转移癌的有效方法,长期观察可延长生存期^[13-14],例如:本组中有1例结肠癌术后半年肝转移患者,定期复查时被确诊,当即入院行经皮超声引导下RFA治疗,由于创伤小,患者术后可以走向病房。

总之,在腹腔镜下开展的LUS引导下RFA治

疗肝癌仅是手术的一部分,治疗原则以小创口开展大手术,而经皮超声引导下RFA仅对复发或转移的局部癌灶进行治疗,二者的联合应用,总的临床效果是有突出的优势,对肝癌患者多次反复治疗,其疗效优于单一治疗,使患者的远期疗效比较满意。我国原发性肝癌及转移性肝癌的发生率较高,临床上以中晚期癌为主。因此,当前提高肝癌治疗总体效果的关键在于外科技术的微创以及对术后复发选择合理的综合治疗。

4 参考文献

- 1 王峰,牟培源,周宁新,周丁华,白媛媛.腹腔镜超声在肝癌射频消融治疗中的临床应用.世界华人消化杂志 2009; 17: 205-208
- 2 Sotiropoulos GC, Lang H, Frilling A, Molmenti EP, Paul A, Nadalin S, Radtke A, Brokalaki EI, Saner F, Hilgard P, Gerken G, Broelsch CE, Malagò M. Resectability of hepatocellular carcinoma: evaluation of 333 consecutive cases at a single hepatobiliary specialty center and systematic review of the literature. *Hepatogastroenterology* 2006; 53: 322-329
- 3 吴孟超,吴在德.黄家驷外科学.第7版.北京:人民卫生出版社,2008: 1721
- 4 Okabayashi T, Kobayashi M, Akimori T, Akisawa N, Iwasaki S, Onishi S, Araki K. Usefulness of laparoscopic radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma. *Surg Technol Int* 2005; 14: 177-181
- 5 杨甲梅,李叶晟.中晚期肝癌的外科治疗.临床外科杂志 2008; 16: 579-580
- 6 王国斌.积极稳健地推进腹腔镜外科发展.腹部外科 2006; 19: 4-5
- 7 Tsioulis GJ, Wood TF, Chung MH, Morton DL, Bilchik A. Diagnostic laparoscopy and laparoscopic ultrasonography optimize the staging and resectability of intraabdominal neoplasms. *Surg Endosc* 2001; 15: 1016-1019
- 8 Gómez-Rubio M, Moya-Valdés M, García J. Diagnostic laparoscopy and laparoscopic ultrasonography with local anesthesia in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4120-4123
- 9 翟博,徐爱民,盛月红,刘晟,李晓燕,陈夷.肝癌射频消融后针道出血防治21例.世界华人消化杂志 2006; 16: 2423-2427
- 10 蔡秀军,王一帆.肝脏恶性肿瘤的微创手术治疗.中国现代手术学杂志 2005; 9: 1-3
- 11 Santambrogio R, Barabino M, Opocher E. Laparoscopic ultrasonography for abdominal tumors. *Ultrasound Med Biol* 2006; 32 suppl: 48
- 12 Joosten J, Ruers T. Local radiofrequency ablation techniques for liver metastases of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 62: 153-163
- 13 Seidenfeld J, Korn A, Aronson N. Radiofrequency ablation of unresectable liver metastases. *J Am Coll Surg* 2002; 195: 378-386
- 14 Lau TN, Lo RH, Tan BS. Colorectal hepatic metastases: Role of radiofrequency ablation. *Ann Acad Med Singapore* 2003; 32: 212-218

■同行评价

本文选题较好,设计合理,具有一定的临床参考价值。

编辑 李军亮 电编 何基才

DNA倍体分析与癌胚抗原检测对良、恶性腹水鉴别诊断的意义

张爱军, 许琳, 李文利, 马师洋, 钮自宇, 王青

■背景资料

临床上不明原因腹水的鉴别诊断常较困难,但又具有非常重要的意义,其中以鉴别腹水的良恶性预后价值更大。迄今为止,在腹水中找到恶性肿瘤细胞仍是确诊恶性腹水的“金标准”,但是,由于受到各种原因限制,目前腹水常规细胞学检查的诊断率仅有50%-60%,远不能满足临床需求,有必要在这方面开展更多的研究。

张爱军, 许琳, 李文利, 马师洋, 钮自宇, 青岛市市立医院消化科 山东省青岛市 266011

王青, 青岛市市立医院东区消化科 山东省青岛市 266071

作者贡献分布: 此课题由张爱军, 许琳及王青设计; 研究过程由张爱军, 许琳, 李文利, 马师洋及钮自宇操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由张爱军与王青提供; 数据分析由张爱军, 许琳及李文利完成; 本论文写作由张爱军完成。

通讯作者: 王青, 266071, 山东省青岛市东海中路5号, 青岛市市立医院东区消化科, qingwangqingdao@yahoo.com.cn
电话: 0532-88905630

收稿日期: 2008-12-25 修回日期: 2009-01-25

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-08

Significance of DNA ploidy analysis and carcinoembryonic antigen assay for differential diagnosis between benign and malignant ascites

Ai-Jun Zhang, Lin Xu, Wen-Li Li, Shi-Yang Ma, Zi-Yu Niu, Qing Wang

Ai-Jun Zhang, Lin Xu, Wen-Li Li, Shi-Yang Ma, Zi-Yu Niu, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266011, Shandong Province, China

Qing Wang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital East Branch, Qingdao 266071, Shandong Province, China

Correspondence to: Qing Wang, Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital East Branch, 5 Donghai Middle Road, Qingdao 266071, Shandong Province, China. qingwangqingdao@yahoo.com.cn

Received: 2008-12-25 Revised: 2009-01-25

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To investigate the differential diagnostic significance of DNA ploidy analysis and serum, ascitic carcinoembryonic antigen (CEA), ascites/serum CEA ratios assay in malignant (PHC and non-PHC malignancy) and benign ascites.

METHODS: Flow cytometry (FCM) was used for DNA ploidy analysis and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for CEA assay in 56 malignant (31 PHC and 25 non-PHC) ascites. As a control, 50 nonmalignant ascites were evaluated at the same time. If the serum or ascitic CEA value $>5 \mu\text{g/L}$, and the ascites/serum CEA

ratios >1 , then the CEA assay was defined as positive. If an aneuploidy was detected, the result of the DNA ploidy analysis was defined as positive.

RESULTS: The sensitivity and specificity of ascitic CEA, ascites/serum CEA ratios >1 and aneuploidy in differential diagnosis of PHC ascites and non-PHC with malignant ascites or with benign ascites were 35.48%, 84% and 72%, 84%; 35.48%, 98% and 72%, 98%; 70.97%, 86% and 71.43%, 86%, respectively. The sensitivity and specificity of the combination assay of aneuploidy and ascites/serum CEA ratios >1 in differential diagnosis of PHC ascites and non-PHC with malignant ascites or with benign ascites were 93.55%, 100%; 92%, 100%, respectively.

CONCLUSION: Our study confirmed the differential diagnostic value between benign and malignant ascites of the combination assay of ascites/serum CEA ratios assay and the DNA ploidy analysis.

Key Words: Primary hepatic carcinoma; Malignant ascites; Carcinoembryonic antigen; Ascites/serum carcinoembryonic antigen ratios; DNA ploidy analysis; Aneuploidy; Differential diagnosis

Zhang AJ, Xu L, Li WL, Ma SY, Niu ZY, Wang Q. Significance of DNA ploidy analysis and carcinoembryonic antigen assay for differential diagnosis between benign and malignant ascites. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 724-728

摘要

目的: 探讨DNA倍体分析与癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)检测对良、恶性腹水鉴别诊断的意义。

方法: 应用流式细胞术对106例腹水患者(良性腹水50例, 原发性肝癌并腹水31例, 非肝癌恶性腹水25例)进行腹水细胞DNA倍体分析, 以腹水细胞中发现异倍体为阳性; 同时采用ELISA法进行腹水及血清CEA测定, 以血清或

■同行评议者

张吉翔, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科; 黄颖秋, 教授, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

腹水CEA浓度 $>5\text{ }\mu\text{g/L}$ 、腹水/血清CEA比值 >1 为阳性。

结果: 腹水CEA、腹水/血清CEA比值阳性和腹水中检出异倍体鉴别肝癌并腹水及非肝癌恶性腹水与良性腹水的灵敏度和特异度分别为35.48%, 84%及72%, 84%; 35.48%, 98%及72%, 98%; 70.97%, 86%和71.43%, 86%。腹水中检出异倍体与腹水/血清CEA比值阳性联合检测鉴别肝癌并腹水及非肝癌恶性腹水与良性腹水的灵敏度分别为93.55%和92%, 特异度均为100.00%。

结论: DNA倍体分析联合腹水/血清CEA比值检测对于鉴别良、恶性腹水是有价值的生物学指标。

关键词: 原发性肝癌; 恶性腹水; 癌胚抗原; 腹水/血清癌胚抗原比值; DNA倍体分析; 异倍体; 鉴别诊断

张爱军, 许琳, 李文利, 马师洋, 钮自宇, 王青. DNA倍体分析与癌胚抗原检测对良、恶性腹水鉴别诊断的意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 724-728

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/724.asp>

0 引言

腹水的病因诊断是一个临床难题, 恶性肿瘤引起的恶性腹水约占腹水病因的10%, 发生后预后极差。临床上以腹水为主要表现的患者, 应该首先鉴别其良、恶性质。而肝癌是引起恶性腹水的常见原因。本研究检测了良、恶性腹水患者中腹水细胞的DNA异倍体、腹水、血清癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)以及腹水/血清CEA比值, 探讨其在良、恶性腹水鉴别诊断中的临床价值。同时对这些指标在原发性肝癌合并腹水与非肝癌恶性腹水中的不同意义进行分析比较。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2005-01/2007-03在我院消化科住院的腹水患者共106例, 其中男65例, 女41例, 平均年龄 57.2 ± 10.1 岁。经腹水常规、生化、细胞学检查、腹腔镜检查或剖腹手术等方法确诊为原发性肝癌并腹水31例; 其他恶性肿瘤并腹水25例(包括胃癌6例, 结直肠癌6例, 胆管癌3例, 胰腺癌3例, 卵巢癌2例, 乳腺癌1例, 恶性腹膜间皮瘤1例, 非何杰金氏淋巴瘤1例, 原发灶来源不明的腹膜转移癌2例); 良性腹水50例: 肝硬化腹水34例, 结核性腹膜炎6例, 慢性心功能衰竭4例,

胰腺炎2例, 细菌性腹膜炎1例, 肾病综合征1例, 慢性肾功能衰竭1例, 系统性红斑狼疮1例; 两组患者在性别和年龄构成上均无显著性差异。其中经腹水行细胞学检查确诊25例, 阳性率44.6%。另选取10例健康体检者的静脉全血作为流式细胞仪检测DNA倍体时的二倍体对照。CEA酶联免疫反应试剂盒购自瑞典CanAg公司; DNA-Prep试剂盒购自美国Beckman Coulter公司。全自动酶标分析仪(伯乐680型, 美国), 流式细胞仪(EPICS XL-MCL型, 美国), 低温高速离心机(Contifuge Stratos型, 德国)。

1.2 方法

1.2.1 标本制备: 按腹膜腔常规穿刺方法进行腹腔穿刺, 抽取腹水100 mL行DNA倍体分析及ELISA法检测腹水CEA浓度; 同时常规静脉穿刺取血2 mL, 离心分离血清, 行ELISA法检测血清CEA浓度。

1.2.2 流式细胞仪腹水DNA倍体分析: 由我院中心实验室按试剂盒说明书对腹水脱落细胞进行DNA倍体分析, 以正常人新鲜淋巴细胞的DNA荧光信号主峰值作为二倍体细胞DNA含量的参考值, 以腹水中二倍体细胞DNA含量作为内标, 由仪器自带程序对样品细胞的DNA指数、增殖指数、S期细胞百分率等指标进行分析, 并作出直方图。以直方图上出现与二倍体细胞 $G_{0/1}$ 峰完全分离的荧光信号峰($DI \neq 1$), 即判断受检标本含有DNA异倍体细胞为阳性。

1.2.3 血清及腹水CEA浓度测定: 按试剂盒说明书操作, 将25 μL 血清或腹水标本、标准液、控制液及100 μL 抗体加入反应微孔中, 室温下反应1 h; 用稀释的洗液反复冲洗6次, 再加入100 μL 染色剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化30 min; 然后加入100 μL 反应终止液, 在15 min内在405 nm吸光度下读出吸光度(A)值, 以 A 值为纵坐标, 以标准品浓度为横坐标, 绘制标准曲线。根据血清或腹水样品的 A 值可在标准曲线上查出其浓度, 结果由全自动酶标分析仪自动产生。血清和腹水的CEA标准均采用 $>5\text{ }\mu\text{g/L}$ 为阳性。若血清或腹水CEA阳性, 则计算腹水/血清CEA比值, 以比值 >1 为阳性。

统计学处理 计量资料采用 $\text{mean}\pm\text{SD}$ 表示, 均数比较采用 t 检验; 计数资料采用率或构成比表示, 应用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 腹水细胞DNA倍体分析结果 二倍体DNA细胞直方图及异倍体DNA细胞直方图见图1。31例

■ 研发前沿

近年来, 随着对恶性腹水形成机制的研究进展, 针对恶性腹水的治疗研究也不断深入, 一些新疗法不论在动物实验还是临床研究中均显示了明显疗效, 对于缓解症状、提高生存质量都有一定作用, 甚至可使小部分患者获得较长期生存。而准确的诊断是合理治疗的基础, 因此寻找理想的检测方法以提高恶性腹水的鉴别诊断效能已成为目前研究的热点。

■ 相关报道

Trape *et al*发现,恶性浆膜腔积液肿瘤标志物浓度明显高于良性积液或血清中浓度。积液/血清比值分析在CEA、CA19-9和CA15-3较单一积液检测结果显示了更好的灵敏度和最大的特异度。曾志勇 *et al*发现恶性腹水组CEA几项指标均明显高于良性组,其中腹水与血清CEA比值的灵敏度和准确度均显著高于腹水CEA和血清CEA标准。

表 1 良、恶性腹水细胞DNA倍体分析和CEA检测结果 $n(\%)$

分组	n	血清CEA阳性	腹水CEA阳性	腹水/血清CEA比值阳性	异倍体阳性
PHC组	31	9(29.03) ^d	11(35.48) ^{ad}	11(35.48) ^{bd}	22(70.97) ^b
non-PHC组	25	16(64.00) ^b	18(72.00) ^b	18(72.00) ^b	18(72.00) ^b
良性腹水组	50	13(26.00)	8(16.00)	1(2.00)	8(16.00)

PHC组: 肝癌并腹水组; non-PHC组: 非肝癌恶性腹水组; ^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 良性腹水组; ^d $P<0.01$ vs non-PHC组。

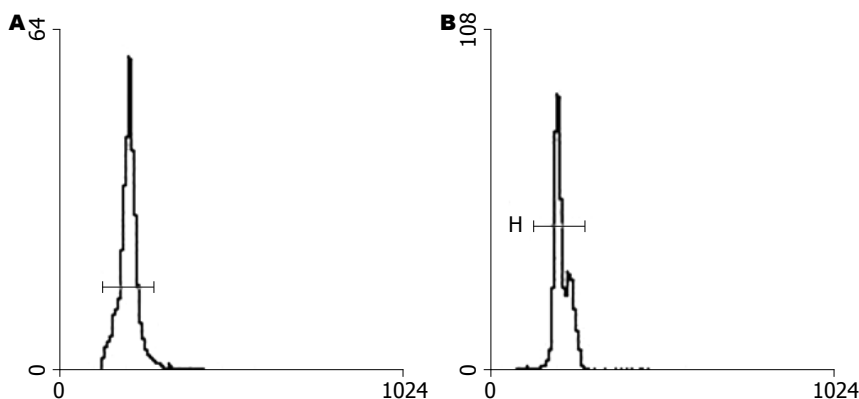


图 1 腹水细胞DNA倍体检测结果. A: 二倍体; B: 异倍体。

肝癌并腹水患者有22例(70.97%)检出异倍体, 25例非肝癌恶性腹水患者有18例(72%)检出异倍体, 均明显高于良性腹水患者的异倍体检出率(7/50, 14%), 差异有统计学意义($\chi^2_{\text{PHC}} = 27.02$, $P<0.01$; $\chi^2_{\text{non-PHC}} = 25.23$, $P<0.01$), 而肝癌并腹水和非肝癌恶性腹水患者之间异倍体检出率无差别; 异倍体区别肝癌并腹水及非肝癌恶性腹水与良性腹水的灵敏度分别为70.97%和72%, 特异度均为86%(表1)。

2.2 血清CEA检测结果 25例非肝癌恶性腹水患者的血清CEA浓度为 $9.79 \pm 10.04 \mu\text{g/L}$, CEA阳性率64%(16/25), 高于肝癌并腹水患者(分别为 $3.34 \pm 1.47 \mu\text{g/L}$ 及29.03%), 差异有统计学意义($t = 3.538$, $P<0.01$ 及 $\chi^2 = 27.02$, $P<0.01$); 也高于良性腹水组患者(分别为 $3.32 \pm 2.27 \mu\text{g/L}$ 及26%), 差异有统计学意义($t = 4.366$, $P<0.01$ 及 $\chi^2 = 10.15$, $P<0.01$)。而肝癌并腹水患者的血清CEA浓度及CEA阳性率与良性腹水组患者之间均无差别。血清CEA区别非肝癌恶性腹水与良性腹水的灵敏度为64%(16/25), 特异度为74%(表1)。

2.3 腹水CEA检测结果 31例肝癌并腹水患者的腹水CEA浓度为 $4.13 \pm 3.78 \mu\text{g/L}$, CEA阳性率35.48%, 高于良性腹水组患者(分别为 $2.61 \pm 1.88 \mu\text{g/L}$ 及16%), 差异有统计学意义($t = 2.409$, $P<0.05$ 及 $\chi^2 = 4.046$, $P<0.05$); 但低于非肝癌恶性腹水患者(分别为 $31.77 \pm 46.90 \mu\text{g/L}$ 及72%), 差异有统计学意义($t = 3.275$, $P<0.01$ 及 $\chi^2 = 7.391$,

$P<0.01$); 非肝癌恶性腹水患者的腹水CEA浓度及腹水CEA阳性率均较良性腹水患者高, 差异有统计学意义($t = 4.420$, $P<0.01$ 及 $\chi^2 = 23.08$, $P<0.01$)。腹水CEA区别肝癌并腹水及非肝癌恶性腹水与良性腹水的灵敏度分别为35.48%和72%, 特异度均为84%(表1)。

2.4 腹水/血清CEA比值检测结果 31例肝癌并腹水患者腹水/血清CEA比值阳性有11例(35.48%), 高于良性腹水组患者的腹水/血清CEA比值阳性率(2%), 但低于非肝癌恶性腹水患者的腹水/血清CEA比值阳性率(72%), 差异均有统计学意义($\chi^2 = 14.45$, $P<0.01$ 及 $\chi^2 = 7.391$, $P<0.01$)。非肝癌恶性腹水患者的腹水/血清CEA比值阳性率高于良性腹水组, 差异有统计学意义($\chi^2 = 43.17$, $P<0.01$)。腹水/血清CEA比值区别肝癌并腹水及非肝癌恶性腹水与良性腹水的灵敏度分别为35.48%和72%, 特异度均为98%(表1)。

2.5 腹水细胞DNA倍体分析联合腹水/血清CEA比值检测结果 肝癌并腹水患者DNA倍体分析与腹水/血清CEA比值同时阳性为12.90%(4/31), 非肝癌恶性腹水组为52%(13/25), 良性腹水组为0.00%(0/50); 肝癌并腹水患者DNA倍体分析或腹水/血清CEA比值阳性的阳性率为93.55%(29/31), 非肝癌恶性腹水组为92%(23/25), 良性腹水组为18%(9/50), DNA倍体分析联合腹水/血清CEA比值检测鉴别肝癌并腹水及非肝癌恶性腹水与良性腹水的灵敏度分别

为93.55%和92%, 特异度均为100.00%(表1).

3 讨论

恶性肿瘤引起的腹水称为恶性腹水, 通常是恶性肿瘤腹腔内侵犯的第一个体征, Garrison *et al*^[1]报道, 52%恶性肿瘤患者在原发癌诊断时已有明显腹水. 腹腔穿刺抽取腹水进行常规、生化、细胞学等方面的检查, 可较准确的鉴别腹水的性质, 尤其是腹水细胞病理学检查, 阳性者有确诊意义, 至今仍作为“金标准”. 但其阳性率仅有50%左右^[2], 限制了其在临床上的应用. 寻找能够更有效鉴别良、恶性腹水的方法, 现已成为临床研究的热点. 肝癌是引起恶性腹水的最常见病因之一, 除癌肿向腹膜种植转移外, 还常因为合并肝硬化、门静脉高压、门静脉或下腔静脉癌栓等原因所致^[3], 故肝癌合并腹水在临床上与其他恶性腹水有许多不同, 鉴别诊断时应特别注意.

CEA最初发现于成人结肠癌组织中, 1965年由Gold *et al*^[4]首先报道. CEA是一种结构复杂的可溶性糖蛋白, 分子质量约为200 kDa, 具有二级以上结构. 胚胎期主要存在于胎儿的胃肠道、胰腺和肝脏, 出生后逐渐消失或仅存留微量. 当细胞癌变时, 此类抗原可重新合成, 并表达于肿瘤细胞表面, 也可分泌到血流中, 因此血液中可检测到异常增高. CEA也可被分泌入浆膜腔内, 由于其分子质量大, 分泌后能滞留在浆膜腔内而不会像在血浆中那样被迅速降解, 研究表明检测其浓度有助于鉴别良恶性浆膜腔积液^[5].

因为血中CEA可漏出和渗出到胸腹水中, 使胸腹水中的CEA值升高, 所以单纯以胸腹水中CEA值作为诊断依据假阳性多, 特异度差. Trapé *et al*^[6]评估了联合测定浆膜腔积液和血清中的5种肿瘤标志物在鉴别诊断胸腹膜腔积液性质中的作用. 结果发现, 恶性浆膜腔积液中肿瘤标志物浓度明显高于良性积液或血清中浓度. 积液/血清比值分析在CEA、CA19-9和CA15-3较单一积液检测结果显示了更好的灵敏度和最大的特异度, 认为CEA检测其积液/血清比值能够提高诊断的灵敏度和特异度. 国内曾志勇 *et al*^[7]检测了腹水及血清中的CEA水平, 并计算了腹水与血清CEA比值, 发现恶性组三者均明显高于良性组, 但灵敏度较低, 分别为32%、28%和66%, 特异度分别为92%、90%和94%, 准确度分别为62%、59%和80%, 其中腹水与血清CEA比值的灵敏度和准确度均显著高于腹水CEA和血

清CEA标准.

目前研究发现CEA具有促进转移的作用, 可能与干扰原发灶内肿瘤细胞间连接有关. Benchimol *et al*^[8]从分子水平上证实CEA是一种黏附因子, 它具有同型细胞聚集和识别现象, 从而有可能使转移瘤细胞在血液循环及转移脏器中形成集落, 成活性较单个细胞明显增高, 对肿瘤的转移起重要作用. 因此CEA常与肿瘤的转移浸润有关. CEA升高, 主要见于结肠癌、胃癌、肺癌、胆管癌, 肝癌等亦可引起增高^[9], 但CEA作为肿瘤标志物应用于肝癌诊断, 敏感度和特异度都较差, 被推荐作为转移性肝癌的标志^[10].

本研究中非肝癌恶性腹水组患者血清CEA浓度明显高于肝癌并腹水及良性腹水组; 血清CEA在非肝癌恶性腹水组患者中的表达阳性率也明显高于肝癌并腹水及良性腹水组, 而在肝癌并腹水与良性腹水组之间无差别, 表明血清CEA在良恶性腹水的鉴别诊断中有一定价值, 但仅限于非肝癌恶性腹水与良性腹水组. 其鉴别诊断灵敏度为64%, 特异度为74%, 与文献报道类似^[11]. 总体来说, 诊断价值有限. 原因是一些非肿瘤疾病如肝功能衰竭、大量吸烟者、慢性溃疡性结肠炎、Crohn病等亦常见血CEA升高, 故特异性不高. 而本组良性病患者中以肝硬化患者为多, 可能是造成这种现象的主要原因.

本研究中肝癌并腹水患者腹水CEA浓度高于良性腹水组, 但较非肝癌恶性腹水患者低; 腹水CEA在肝癌并腹水患者中的表达阳性率也高于良性腹水组, 较非肝癌恶性腹水低. 表明腹水CEA在良恶性腹水的鉴别诊断中有一定价值, 其鉴别诊断肝癌并腹水及非肝癌恶性腹水与良性腹水的灵敏度分别为35.48%和72%, 特异度均为84%. 文献报道^[12]将腹水CEA检测与常规细胞病理学检测结合, 使67例恶性腹水的阳性率由58.2%提高到85.07%, 灵敏度82.6%, 特异度94.5%. 另有研究^[13]表明, 胸腹水中CEA值较血中CEA值的正确诊断率、灵敏度、特异度均好(分别为82.4%对58.8%, 95.7%对56.5%, 71.4%对60.7%), 本研究中, 腹水CEA检测阳性率在肝癌并腹水组明显低于文献报道, 进一步提示导致恶性腹水的病因不同, CEA的表达会有差异. 我们检测了患者腹水/血清CEA比值, 发现其阳性率在恶性腹水组均高于良性腹水组, 其鉴别诊断肝癌并腹水及非肝癌恶性腹水与良性腹水的灵敏度分别为35.48%和72%, 特异度均为98%.

■创新盘点

本研究将流式细胞术DNA倍体分析与腹水/血清CEA比值联合检测用于良恶性腹水的鉴别诊断, 最大限度的发挥了二者各自在灵敏度和特异度方面的长处, 有效的提高了鉴别诊断的效能. 同时发现肝癌并腹水与非肝癌恶性腹水存在一些不同的特点, 为进一步研究提出了一些新的思路.

■同行评价

本文设计合理, 结果可靠, 具有较好的临床参考价值, 但新颖性一般.

与文献报道[7]相比, 肝癌并腹水组腹水/血清CEA比值的特异度相似, 而灵敏度较低. 说明单纯使用CEA尚不能作为鉴别良恶性腹水的敏感指标.

正常人体细胞多为二倍体(即 $2N = 46$ 条染色体), 非整倍体和多倍体很少见, 而恶性肿瘤细胞具有不可抑制的克隆性增殖, 且分裂呈多极、紊乱. 恶性腹水中有一定数量的癌细胞分裂象, 并有明显的染色异常改变. 周秀彦 *et al*^[14]应用高分辨染色技术, 发现恶性腹水患者中, 其染色体出现多倍体、超二倍体、亚四倍体及染色体出现缺失、畸变者达82.35%, 提示腹水染色体检查对良、恶性腹水的鉴别具有重要意义. 本研究中DNA异倍体在肝癌并腹水及非肝癌恶性腹水患者中的阳性率分别为70.97%和72%, 明显高于良性腹水组的阳性率14%. 以腹水中找到异倍体细胞为标准鉴别诊断肝癌并腹水及非肝癌恶性腹水与良性腹水的灵敏度分别为70.97%和72%, 特异度均为86%. 与文献报道^[15-19]接近, 提示检测腹水中的异倍体对于鉴别诊断良恶性腹水有一定价值. 但仍存在一定的假阳性率和假阴性率. 假阳性的产生可能与标本制作过程中的某些染色体发生机械性缺失有关, 标本中存在较多炎性细胞和多核细胞也可导致检出非整倍体可能, 少数良性疾病细胞内的染色体可产生一过性畸变也是造成假阳性的原因之一^[20]; 造成假阴性的主要原因分析与肿瘤细胞未脱落至浆膜腔以及存在高分化的二倍体肿瘤等因素有关.

如前所述, CEA与腹水细胞异倍体在恶性腹水的鉴别诊断中都有一定价值, 也都存在一定的局限性. 我们将DNA倍体分析与腹水/血清CEA比值联合检测, 结果发现二者联合鉴别肝癌并腹水及非肝癌恶性腹水与良性腹水的灵敏度分别为93.55%和92%, 特异度均为100.00%. 联合检测较各单项指标灵敏度与特异度均有明显提高, 说明二者具有较好的互补性, 可以克服单项检测固有的一些缺陷, 对于良、恶性腹水鉴别诊断有很高的应用价值.

4 参考文献

- 1 Garrison RN, Kaelin LD, Galloway RH, Heuser LS. Malignant ascites. Clinical and experimental

- observations. *Ann Surg* 1986; 203: 644-651
- 2 Parsons SL, Watson SA, Steele RJ. Malignant ascites. *Br J Surg* 1996; 83: 6-14
- 3 陈灏珠. 实用内科学(下册). 第12版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 2013
- 4 Gold P, Freedman SO. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* 1965; 122: 467-481
- 5 Nystrom JS, Dyce B, Wada J, Bateman JR, Haverback B. Carcinoembryonic antigen titers on effusion fluid. A diagnostic tool? *Arch Intern Med* 1977; 137: 875-879
- 6 Trapé J, Molina R, Sant F. Clinical evaluation of the simultaneous determination of tumor markers in fluid and serum and their ratio in the differential diagnosis of serous effusions. *Tumour Biol* 2004; 25: 276-281
- 7 曾志勇, 钟英强, 黄志清. 腹水与血清的癌胚抗原比值对恶性腹水的诊断价值. *临床消化病杂志* 2003; 15: 7-8
- 8 Benchimol S, Fuks A, Jothy S, Beauchemin N, Shirota K, Stanners CP. Carcinoembryonic antigen, a human tumor marker, functions as an intercellular adhesion molecule. *Cell* 1989; 57: 327-334
- 9 曲万云. 肿瘤标志物的临床意义及其评价. *解放军保健医学杂志* 2002; 4: 207-210
- 10 万文徽. 肿瘤标志物临床应用与研究. 第2版. 北京: 北京大学医学出版社, 2007: 67
- 11 Sari R, Yildirim B, Sevinc A, Bahceci F, Hilmioglu F. The importance of serum and ascites fluid alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen, CA 19-9, and CA 15-3 levels in differential diagnosis of ascites etiology. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1616-1621
- 12 Torresini RJ, Prolla JC, Diehl AR, Morais EK, Jobim LF. Combined carcinoembryonic antigen and cytopathologic examination in ascites. *Acta Cytol* 2000; 44: 778-782
- 13 刘秀丽, 张传峰. 细胞学诊断和CEA测定在胸腹水恶性诊断中的作用. *日本医学介绍* 1998; 19: 515-516
- 14 周秀彦, 郭春华, 赵婕, 赵心凯. 染色体检查对良恶性腹水的鉴别诊断价值. *山西临床医药* 2000; 9: 323
- 15 Saha I, Dey P, Vhora H, Nijhawan R. Role of DNA flow cytometry and image cytometry on effusion fluid. *Diagn Cytopathol* 2000; 22: 81-85
- 16 Lazcano O, Chen LM, Tsai C, Li CY, Katzmman JA, Sebo TJ, Kimlinger TK, Baker J. Image analysis and flow cytometric DNA studies of benign and malignant body cavity fluids: reappraisal of the role of current methods in the differential diagnosis of reactive versus malignant conditions. *Mod Pathol* 2000; 13: 788-796
- 17 殷纛, 张盈华, 郝晓柯, 张利朝. 流式细胞术在胸腔积液及腹水细胞诊断中的价值. *肿瘤防治杂志* 2002; 9: 59-61
- 18 冯萍, 单卫民, 俞秋兴. 浆膜腔积液脱落细胞DNA倍体分析在肿瘤良恶性判断中的应用. *苏州医学院学报* 2001; 21: 42-45
- 19 翟志敏, 戴海明, 张明黎, 吴工祥, 王巧民. DNA含量测定对恶性腹水的诊断价值. *癌症* 2002; 21: 105-106
- 20 王强, 吴清明, 于皆平. 食管黏膜脱落细胞DNA倍体和端粒酶活性检测对食管癌诊断的价值. *肿瘤防治杂志* 2004; 11: 1054-1056

编辑 李军亮 电编 何基才

老年原发性肝癌的临床资料分析176例

董为民, 吴本俨

董为民, 吴本俨, 中国人民解放军总医院南楼消化科 北京市 100853
中国人民解放军总医院科技创新基金资助项目, No. 06LN02

作者贡献分布: 董为民对此文作出主要贡献; 此课题由董为民与吴本俨设计; 研究过程由董为民操作完成; 数据分析由董为民完成; 本文写作由董为民完成。

通讯作者: 董为民, 100853, 北京市海淀区复兴路28号, 中国人民解放军总医院南楼临床部消化内科。

weimin-dong@263.sina.com

电话: 010-66876286

收稿日期: 2008-12-05 修回日期: 2009-01-07

接受日期: 2009-01-12 在线出版日期: 2009-03-08

Primary liver carcinoma in elderly patients: an analysis of 176 cases

Wei-Min Dong, Ben-Yan Wu

Wei-Min Dong, Ben-Yan Wu, Department of Gastroenterology, South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Supported by: the Science and Technology Innovation Program of Chinese PLA General Hospital, No. 06LN02

Correspondence to: Wei-Min Dong, Department of Gastroenterology, South Building, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Haidian District, Beijing 100853, China. weimin-dong@263.sina.com

Received: 2008-12-05 Revised: 2009-01-07

Accepted: 2009-01-12 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To summarize the clinical features of primary liver carcinoma prognosis in hope of shedding light on factors that affect prognosis in elderly patients.

METHODS: Clinical data, including age, gender, hepatitis virus infection status, degree of hepatic cirrhosis, tumor size, and treatment of 176 elderly patients who were diagnosed with primary hepatocellular carcinoma, were analyzed for clinical features.

RESULTS: Among those with confirmed liver carcinoma, 94.9% patients were infected with hepatitis virus, 63.6% patients had history of chronic hepatitis, and 56.8% had complicated hepatic cirrhosis or liver fibrosis. The 1-, 2- and 5-year survival rates for patients which received surgical operation were 83.1%, 66.0% and 28.8%,

respectively, for those which received intervention treatment, 73.0%, 56.2% and 10.1%, for those who received conservation treatment, 14.3%, 7.1% and 0.0%. The 5-year survival rates of the patients who suffered small liver cancer were higher than of those who suffered big or huge liver cancer.

CONCLUSION: Hepatitis infection virus was the main pathogenic factor of the primary hepatocellular carcinoma. Surgical operation would improve the survival rates of the elderly patients.

Key Words: Primary hepatocellular carcinoma; Therapy; Aged

Dong WM, Wu BY. Primary liver carcinoma in elderly patients: an analysis of 176 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 729-732

摘要

目的: 总结老年人原发性肝癌的临床资料, 分析影响老年人原发性肝癌预后的临床特点, 探讨影响老年人原发性肝癌患者预后的临床因素。

方法: 总结分析176例老年原发性肝癌患者的临床特点, 包括年龄、性别、肝炎病毒感染、肝硬化程度、肿瘤大小以及接受不同的治疗方法。

结果: 在所有确诊肝癌的患者中, 94.9%有肝炎病毒(HBV及HCV)感染史, 63.6%有慢性肝炎病史, 56.8%合并肝硬化或肝纤维化。接受手术治疗患者的1、2、5年生存率分别为83.1%、66.0%及28.8%; 接受介入治疗的患者的1、2、5年生存率分别为73.0%、56.2%及10.1%; 采取保守治疗患者则为14.3%、7.1%、0%。小肝癌患者5年生存率明显高于大肝癌及巨大肝癌患者。

结论: HBV感染是导致老年人原发性肝癌的主要原因。手术治疗是提高患者生存率的重要方法, 介入治疗同样可以取得理想效果。

关键词: 原发性肝癌; 治疗; 老年

■背景资料

我国是原发性肝癌的高发区, 原发性肝癌的患者总数已经高达全球的40%-50%, 全球每年54.1万新发肝癌患者中有31.8万发生在中国。从流行病学特点看, 原发性肝癌患者中绝大多数患者有肝炎病毒感染史, HBV及HCV感染是导致老年人原发性肝癌发生的重要因素。

■同行评议者

高润平, 教授, 吉林大学第一医院肝病科

■研究前沿

选择适宜的治疗方法、提高肝癌患者的生存率及改善生活质量是临床医师需要面对的实际问题。

董为民, 吴本俨. 老年原发性肝癌的临床资料分析176例. 世界华人消化杂志 2009; 17(7): 729-732

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/729.asp>

0 引言

原发性肝癌(primary hepatocellular carcinoma, PHC)是我国常见的恶性肿瘤之一, 根据流行病学调查统计我国原发性肝癌的年死亡率位列所有恶性肿瘤年死亡率的第2位^[1]. 本研究旨在通过对老年肝癌患者临床资料的回顾性总结, 分析老年人原发性肝癌临床特点, 影响预后的因素, 以探讨老年人肝癌合理的治疗方式.

1 材料和方法

1.1 材料 收集并随访2000-01/2006-12在我院住院治疗、资料完整的老年原发性肝癌患者176例. 年龄范围65-92(平均 74.5 ± 8.2)岁, 其中男145例(82.4%), 女31例(17.6%). 发病时小于80岁的146例, 大于80岁30例. 患者均经影像、肝组织学及血液生化检查, 其中组织学检查证实为肝细胞癌125例, 胆管细胞癌11例, 所有患者均符合原发性肝癌诊断标准^[2].

1.2 方法 本研究主要分析不同因素对老年人肝癌患者预后的影响, 包括患者的性别、年龄、肝炎病毒感染情况、肝硬化程度、肿瘤大小、以及接受不同的治疗方法. 按照全国肝癌研究协作会议拟订的分期标准^[2], 根据患者肿瘤大小分为: 小肝癌(单个肿瘤直径 <3 cm或2个肿瘤直径 <5 cm)88例, 大肝癌(单个肿瘤或2个肿瘤直径 >5 cm而 <10 cm)60例, 巨大肝癌(单个肿瘤或2个肿瘤直径 >10 cm)28例. 同时根据所接受的治疗方法因此将病例资料分为: (1)手术治疗组: 外科手术切除肿瘤或姑息性外科治疗(包括有肝动脉结扎和(或)肝动脉插管化疗、术中冷冻、射频、微波治疗), 共59例. (2)介入治疗组: 包括肝动脉栓塞化疗(TACE)、超声引导下微波固化或无水酒精注射, 89例. (3)保守治疗组: 接受中医中药及免疫治疗, 28例. 治疗方法的选择主要依据患者的肿瘤大小、部位、年龄、肝功能及心、肾、肺、脑等全身重要脏器功能耐受情况综合分析并结合患者及其家属意见制定.

统计学处理 生存率的估计使用Kaplan-Meier法, 影响生存曲线的因素分析采用log-rank检验, 三组治疗方法死亡风险的比较采用COX比例风险模型调整已知的对预后影响因素, 检验水准 α = 为0.05.

2 结果

2.1 一般情况 在所有确诊肝癌的患者中, 年龄范围65-92岁, 平均年龄 74.5 ± 8.2 岁, 其中男性145例, 占82.4%, 女性31例, 占17.6%. 167例(94.9%)的患者有肝炎病毒感染史, 其中157例(89.2%)有乙肝病毒(HBV)感染史, 这之中有132例(75.0%)表现为HBsAg阳性; 10例(5.7%)患者有丙肝病毒(HCV)感染史, 其中2例(1.1%)同时合并乙肝病毒感染, 无任何肝炎病毒感染依据者只有9例(5.1%), 另外, 100例(56.8%)合并肝硬化或肝纤维化.

2.2 影响老年原发性肝癌患者生存率的单因素分析 单因素分析(Log-rank检验)显示, 在整个随访期间内发生死亡的可能性, 80以下的患者要低于80及以上患者($P < 0.01$), 小肝癌患者要低于大肝癌患者($P < 0.01$), 大肝癌患者要低于巨大肝癌患者($P < 0.05$), 手术治疗要低于介入治疗, 介入治疗要低于保守治疗; 性别、发病时有无肝硬化以及是否有肝炎病毒感染对老年原发性肝癌患者生存率的影响差异无统计学意义($P > 0.05$). 具体的1、2、5年生存率见表1.

2.3 不同治疗方法与老年原发性肝癌患者生存率关系 图1显示的是不同方法治疗后不同随访时间内老年原发性肝癌患者的生存率变化情况. 从图中可以发现, 手术治疗优于介入治疗, 介入治疗优于保守治疗. 为排除不同治疗组患者的性别、年龄、肿瘤大小、病毒感染历史、肝硬化历史的构成不同对治疗效果评价的干扰, 采用多因素COX回归分析, 结果如表2所示.

整个随访期内, 保守治疗的死亡风险为手术治疗的7.51倍($P < 0.01$), 为介入治疗的5.90倍($P < 0.01$), 手术治疗和介入治疗差别不明显($P > 0.05$); 1年内, 保守治疗的死亡风险为手术治疗的5.78倍($P < 0.01$), 为介入治疗的5.61倍($P < 0.01$), 手术治疗和介入治疗差别不明显($P > 0.05$); 2年内, 保守治疗的死亡风险为手术治疗的5.59倍($P < 0.01$), 为介入治疗的5.41倍($P < 0.01$), 手术治疗和介入治疗差别不明显($P > 0.05$); 5年内, 保守治疗的全部受访者已全部死亡, 手术治疗和介入治疗差别不明显($P > 0.05$); 5年后, 手术治疗和介入治疗死亡风险差别亦不明显($P > 0.05$).

3 讨论

我国是原发性肝癌的高发区, 原发性肝癌的患者总数已经高达全球的40%-50%, 全球每年54.1万

表 1 影响老年原发性肝癌患者生存率的单因素分析 (*n*)

	取值	<i>n</i>	生存率(%)			<i>P</i> 值
			1年	2年	5年	
性别	男	145	99(68.3)	77(53.1)	24(16.6)	0.527
	女	31	20(64.5)	14(45.2)	2(6.5)	
年龄	80以下	146	105(71.9)	83(56.8)	25(17.1)	0.008
	80及以上	30	14(46.7)	8(26.7)	1(3.3)	
肿瘤大小	小肝癌	88	70(79.5)	55(62.5)	28(23.9)	<0.001
	大肝癌	60	37(61.7)	31(51.7)	6(8.3)	
	巨大肝癌	28	12(42.9)	5(17.9)	0(0)	
病毒感染史	有	167	109(65.3)	84(50.3)	22(13.2)	0.060
	无	9	9(100.0)	7(77.8)	4(44.4)	
肝硬化史	有	100	61(61.0)	48(48.0)	11(11.0)	0.061
	无	76	58(76.3)	43(56.6)	15(19.7)	
治疗方式	手术治疗	59	49(83.1)	39(66.0)	17(28.8)	<0.001
	介入治疗	89	65(73.0)	50(56.2)	9(10.1)	
	保守治疗	28	4(14.3)	2(7.1)	0(0)	

■相关报道

国内外多项大规模回顾性研究证实, 原发性肝癌患者接受外科根治性切除可获得最好疗效, 仍然是该病首选的治疗方法. 肝癌患者根治性切除术后的5年生存率可达40%左右, 小肝癌可达60%-70%.

表 2 三种方法治疗后患者死亡风险比的比较

	校正前		校正后	
	HR(95%CI)	<i>P</i>	HR(95%CI)	<i>P</i>
保守治疗与手术治疗比较				
Entire follow-up period	8.09(4.20-15.58)	<0.001	7.51(3.61-15.60)	<0.001
0 to 1 y follow-up	7.58(3.67-15.68)	<0.001	5.78(2.62-12.76)	<0.001
0 to 2 y follow-up	6.20(3.36-11.42)	<0.001	5.59 (2.78-11.27)	<0.001
保守治疗与介入治疗比较				
Entire follow-up period	4.74(2.82-7.97)	<0.001	5.90(3.40-10.23)	<0.001
0 to 1 y follow-up	5.39(3.00-9.70)	<0.001	5.61(3.15-10.74)	<0.001
0 to 2 y follow-up	4.57(2.72-7.67)	<0.001	5.41(3.11-9.42)	<0.001
介入治疗与手术治疗比较				
Entire follow-up period	1.85(1.26-2.70)	0.002	1.27(0.80-2.03)	0.314
0 to 1 y follow-up	1.37(0.66-2.82)	0.398	1.07(0.32-2.11)	0.674
0 to 2 y follow-up	1.40(0.82-2.41)	0.219	1.10(0.45-1.86)	0.706
0 to 5 y follow-up	1.73(1.19-2.52)	0.004	1.20(0.76-1.91)	0.436
5 y to end of follow-up	1.36(0.54-2.32)	0.387	1.16(0.34-1.92)	0.277

新发肝癌患者中有31.8万发生在中国^[1,3]. 从流行病学特点看, 原发性肝癌患者中绝大多数患者有肝炎病毒感染史, HBV及HCV感染是导致老年人原发性肝癌发生的重要因素^[4]. 本研究显示, 肝癌患者中94.9%有乙肝病毒(HBV)及丙肝病毒(HCV)感染史, 63.6%有慢性肝炎病史, 56.8%合并肝硬化或肝纤维化, 男性患者高达82.4%. 本研究显示, 老年肝癌患者肝炎病毒感染率明显高于国内相关报道结果, 而患者合并肝硬化比例与国内相关报道相似^[4].

随着医学科技水平的发展, 肝癌治疗的手段和方法不断提高与完善, 目前外科切除术、

介入治疗、聚能刀治疗、光子刀治疗及中西医结合对症治疗已经广泛应用于原发性肝癌的治疗. 选择适宜的治疗方法、提高肝癌患者的生存率及改善生活质量是临床医师需要面对的实际问题. 国内外多项大规模回顾性研究证实, 原发性肝癌患者接受外科根治性切除可获得最好疗效, 仍然是该病首选的治疗方法. 肝癌患者根治性切除术后的5年生存率可达40%左右, 小肝癌可达60%-70%^[1]. 本研究也显示, 手术组患者平均生存期接近4年, 其5年生存率接近30%, 均明显高于接受其他治疗方法的患者, 这与国内相关报道类似^[5-6]. 但手术组患者5年生存率明显

■同行评价

本文研究病例绝大多数经病理证实,同时作者对患者生存期进行了长期随访,因而本研究方法较为可靠,结果可信,对临床医师有较好的参考价值。

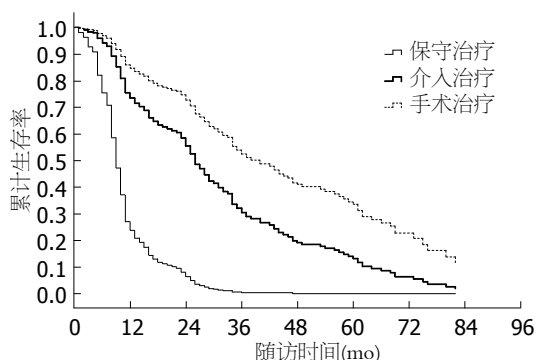


图1 三种治疗方法不同随访时间的累计生存率。

低于国内一般人群报道,除了本研究例数相对少,带有局限性外,也要考虑到本研究对象为老年人群,病后平均预期寿命相对较短的因素。

由于老年人多器官功能代偿不足,手术风险大,临床上真正适合进行手术治疗的老年患者比例相对较低,本研究显示只有33%的患者获得手术治疗的机会。近年来介入治疗广泛地应用于临床,无疑是为原发性肝癌患者带来了福音^[7]。本研究接受介入治疗的老年肝癌患者其1、2年生存率分别为73.0%、56.2%,与接受手术治疗的患者无协助差异,这与国内相关报道相似^[8],这对于老年肝癌患者具有重要的临床意义。

本研究也针对其他可能影响老年原发性肝癌患者预后的因素进行了分析,结果显示性别对老年原发性肝癌患者预后无显著差异,这与国内相关报道结果相似^[6]。对比病例中高龄老年患者

与非高龄老年患者的生存率,结果也未显示出显著差异,这一结果也从某种意义上说明对于老年原发性肝癌患者来说,年龄并非是决定取舍采取积极治疗的唯一因素,只要选择合适的治疗方式,同样可以取得一定效果。当然,高龄患者病例数偏少、高龄患者肿瘤细胞发生发展的特殊生物学行为,也可能是出现这一结果的原因。和国内外研究结果相似^[5],本研究显示小肝癌患者的1、2、5年生存率分别为79.5%、62.5%及23.9%,其预后明显好于大肝癌及巨大肝癌患者,说明即使是对于一般状况较差、综合条件不佳的老年原发性肝癌患者,“早期发现、早期治疗”仍然具有显著的临床意义。

4 参考文献

- 1 汤钊猷. 肝癌诊治现状与前景. 中国普外基础与临床杂志 2003; 3: 191
- 2 中国抗癌协会肝癌专业委员会. 原发性肝癌诊断标准. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 135
- 3 陈知水, 王海瀛. 中国肝癌肝移植的现状与展望. 世界华人消化杂志 2006; 14: 939-941
- 4 郑树森, 梁廷波, 吴应盛. 老年人原发性肝癌的诊治. 中华老年多器官疾病杂志 2002; 1: 34-35
- 5 周信达. 肝癌诊治的若干进展及展望. 中华消化杂志 1999; 19: 5-7
- 6 陈琪, 吴本俨, 王孟薇. 老年人原发性肝癌70例临床随访. 中华老年医学杂志 2000; 19: 7-9
- 7 袁爱力, 侯淑琴, 兰琳, 林煥建, 张春恩, 陈村龙. 综合序贯介入治疗原发性肝癌疗效分析. 中华消化杂志 1998; 18: 13-15
- 8 倪利宇, 赵卫, 金银慧, 庞瑞麟, 向述天. 肝癌根治性切除术后优化综合治疗. 中华普通外科杂志 2002; 17: 287-288

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志被收录情况

本刊讯 世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部遴选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2008年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。(常务副总编辑: 张海宁 2009-03-08)

黛力新治疗无明显精神症状的腹泻型感染后肠易激综合征30例

陈浩, 林李淼, 郑君杰

陈浩, 林李淼, 郑君杰, 温州医学院附属第二医院消化内科
浙江省温州市 325027

作者贡献分布: 陈浩直接参与整个研究的设计、研究、数据分析以及撰写文章; 林李淼参与部分设计以及数据分析工作; 郑君杰给予工作支持。

通讯作者: 陈浩, 325027, 浙江省温州市学院西路109号, 温州医学院附属第二医院研究生科. chenhaocn@hotmail.com
电话: 0577-88879197

收稿日期: 2009-01-21 修回日期: 2009-02-12

接受日期: 2009-02-16 在线出版日期: 2009-03-08

Treatment of diarrhea-predominant Post-infectious irritable bowel syndrome with Deanxit: an analysis of 30 cases

Hao Chen, Li-Miao Lin, Jun-Jie Zheng

Hao Chen, Li-Miao Lin, Jun-Jie Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China

Correspondence to: Dr. Hao Chen, Postgraduate Division, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, Zhejiang Province, China. chenhaocn@hotmail.com

Received: 2009-01-21 Revised: 2009-02-12

Accepted: 2009-02-16 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To observe the effect and safety of Deanxit in combination with Birid Triple Viable (BIFICO) in treatment of diarrhea-predominant postinfectious irritable bowel syndrome (PI-IBS) without obvious psychiatric symptoms.

METHODS: Sixty cases of diarrhea-predominant PI-IBS without obvious psychiatric symptoms were divided into 2 groups, and each group had 30 cases. Combination treatment group received both Deanxit and BIFICO treatment, while the control group received BIFICO treatment only. After 2-week treatment, the therapeutic effect and drug safety were compared between the 2 groups.

RESULTS: The total effective rate was 90.0% in combination treatment group, and 60.0% in BIFICO group. The total effective rate in combi-

nation treatment group was significantly higher than that of BIFICO group ($P < 0.05$). There were no obvious side-effects found in both groups.

CONCLUSION: Deanxit combined with BIFICO is safe and effective in treatment of PI-IBS without obvious psychiatric symptoms.

Key Words: Deanxit; Birid triple viable; Irritable bowel syndrome

Chen H, Lin LM, Zheng JJ. Treatment of diarrhea-predominant Post-infectious irritable bowel syndrome with Deanxit: an analysis of 30 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 733-736

摘要

目的: 观察黛力新联合培菲康治疗无明显精神症状的腹泻型感染后肠易激综合征的疗效和安全性。

方法: 将60例无明显精神症状的腹泻型感染后肠易激综合征患者分为2组, 每组病例均30例。联合治疗组采用黛力新联合培菲康治疗; 对照组单用培菲康治疗。治疗2 wk后, 比较药物疗效和安全性。

结果: 联合治疗组总有效率90.0%, 单用培菲康组总有效率60.0%, 联合治疗组总有效率明显优于单用培菲康对照组($P < 0.05$), 两组患者均未发现明显的不良反应。

结论: 黛力新联合培菲康治疗无明显精神症状的腹泻型感染后肠易激综合征安全、有效。

关键词: 黛力新; 培菲康; 肠易激综合征

陈浩, 林李淼, 郑君杰. 黛力新治疗无明显精神症状的腹泻型感染后肠易激综合征30例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(7): 733-736

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/733.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是

■背景资料

肠易激综合征(IBS)是最常见的功能性肠道疾病, IBS的发病与胃肠动力学异常、内脏感觉异常、精神因素以及感染等诸多因素有关。近年来的研究提出感染后肠易激综合征(PI-IBS)的新概念。

■同行评议者

杜群, 副研究员, 广州中医药大学脾胃研究所

■研发前沿

IBS尚无特效治疗,单一药物治疗疗效欠佳,联合用药已成为目前治疗的趋势。

最常见的一种功能性肠道疾病,以腹痛伴排便习惯改变为特征。IBS分为腹泻型、便秘型、混合型以及未分型,临床上以腹泻型多见,女性患者多见。IBS的发病与胃肠动力学异常、内脏感觉异常、精神因素以及感染等诸多因素有关^[1-3]。近年来研究发现,IBS的发病率在肠道感染后显著增加^[4]。患者被肠道病毒、细菌或寄生虫等感染,在病原体清除及黏膜炎症逐渐消退后,出现IBS症状,称之为感染后肠易激综合征(post-infectious irritable bowel syndrome, PI-IBS)^[5-7]。PI-IBS也以腹泻型多见,其比例可达70%以上^[6]。虽然IBS严重影响患者的生活质量^[8],但是目前尚无特效治疗^[9],已被公认为一种具有特殊病理生理基础的身心疾患。对于难治性IBS单一药物往往不能达到满意效果,本研究应用黛力新联合培菲康短期治疗无明显精神症状,常规药物治疗疗效欠佳的PI-IBS患者,疗效满意,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2004-06/2007-12在温州医学院附属第二医院消化内科住院或门诊PI-IBS患者60例,其中男11例,女49例,年龄22-48(平均年龄35.3)岁;病程12-72(平均18.3) mo,其中病程≤15 mo 13例,病程>15 mo 17例。腹痛、腹泻症状严重程度分级标准:0级=无明显症状;1级=症状轻微,偶尔影响某些社会活动;2级=症状频繁,影响较多社会活动;3级=症状持续且严重,影响所有社会活动。根据上述分级法,入选的PI-IBS患者均属于1-2级。

1.2 方法

1.2.1 病例选择及排除标准: PI-IBS患者入选标准:(1)符合罗马II诊断标准。(2)患病前无肠功能紊乱症状。(3)就诊6 mo之前有明确急性胃肠炎病史,或对急性胃肠炎患者进行随访6 mo,如症状符合罗马II诊断标准即入选。(4)胃肠道急性感染症状持续1 d以上,治疗未超过5 d而治愈,没有复发者。(5)血液生化、腹部B超、结肠镜等检查,除外了器质性疾病。PI-IBS患者排除标准:(1)有肠道器质性疾病及手术史者。(2)有全身其他系统器质性疾病者。(3)孕妇和哺乳期妇女。(4)有近期用药史者。根据Zung自评量表,采用医患交谈和自填量表评分的方式进行焦虑自评量表(SAS)和抑郁自评量表(SDS)的测评,除外伴有失眠、抑郁、焦虑等精神症状的患者。

1.2.2 分组及给药: 将60例PI-IBS患者分成两组,两组患者的年龄、性别、病程及症状严重程度

表 1 两组治疗效果比较 n(%)

分组	总有效	显效	有效	无效
黛力新+培菲康	27(90.0)	20(66.7)	7(23.3)	3(10)
培菲康	18(60.0)	14(46.7)	4(13.3)	12(40)

$\chi^2 = 7.28, P < 0.05$ 。

比较无显著性差异。黛力新联合培菲康治疗组30例,予口服黛力新1片/次,每日晨服,口服培菲康胶囊每次0.63 g,每日2次;单用培菲康组30例,予口服培菲康胶囊每次0.63 g,每日2次。两组患者疗程均为2 wk,疗程中禁用其他药物,不改变饮食及生活习惯。疗程结束后进行疗效评定,并复查肝肾功能,记录药物不良反应。

1.2.3 疗效判断标准: 显效:自觉症状消失,腹泻停止,大便成形,每日1-2次;有效:症状减轻,大便软,基本成形,每日2-3次;无效:症状无改善,腹泻不能控制。总有效率=(显效病例数+有效病例数)/总例数×100%。

统计学处理 疗效评价采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 两组治疗效果比较 总有效率分别是黛力新联合培菲康组90.0%,培菲康组60.0%。联合治疗组总有效率明显优于单用培菲康对照组($P < 0.05$)。两组患者均未发现明显药物不良反应(表1)。

2.2 药物不良反应 黛力新联合培菲康组中,1例患者出现轻微口干症状,1例患者出现轻微乏力症状,继续服药后症状消失。培菲康组未见明显药物不良反应出现。

3 讨论

培菲康为双歧杆菌、嗜酸乳杆菌和肠球菌的三联活菌制剂,口服后通过重建肠道菌群间的微生态平衡,广泛用于治疗感染后肠道菌群失调引起的腹泻^[10-11]。但是单独使用培菲康治疗PI-IBS存在局限性:(1)肠道菌群主要分布在大肠,小肠相对“无菌”但长度占肠道总长度的4/5,因此培菲康在治疗上存在“先天不足”;(2)口服活菌易被消化液破坏。(3)肠道菌群失调仅仅是产生PI-IBS症状的一个可能原因,PI-IBS还有前述很多其他的病因,即使能完全纠正菌群失调,也不是对所有PI-IBS都有疗效。本研究中,单独使用培菲康治疗组的总有效率仅为60.0%,因

■相关报道

较多的研究发现针对肠道菌群失调,单用培菲康效果欠佳。而针对炎症相关的内脏高敏感和动力异常的主要药物泻药可由于药物安全性问题以及主要针对便秘型IBS患者而无法应用于腹泻型PI-IBS患者。对于伴有抑郁、焦虑症状的IBS患者,有较多的报道发现临床上应用黛力新有较好的疗效,但是对于没有明显精神症状的PI-IBS患者的治疗鲜有报道。

此,临床上常将培菲康与其他药物联合使用,提高疗效。

黛力新每片含相当于0.5 mg氟哌噻吨的二盐酸氟哌噻吨以及相当于10 mg美利曲辛的盐酸美利曲辛。氟哌噻吨作用于突触前膜多巴胺受体,增加突触间隙多巴胺的含量。美利曲辛抑制突触前膜对去甲肾上腺素及5-羟色胺(5-HT)的再摄取,提高突触间隙单胺类递质的含量。氟哌噻吨与美利曲辛联合应用的优点是:(1)提高多种神经递质的含量,疗效相加;(2)三氟噻吨可拮抗美利曲辛的抗胆碱作用,美利曲辛拮抗三氟噻吨的锥体外系症状。因此,联合应用能快速有效地改善焦虑、抑郁情绪,降低内脏的高敏感性,且无明显嗜睡等不良反应。

20世纪60年代,研究发现PI-IBS约占IBS总患者的三分之一。目前认为肠道感染后遗留的肠道炎症与患者精神因素的共同作用^[12],促进了PI-IBS的出现。一次细菌性胃肠炎发作可以使患者在此后1年内出现IBS症状的危险性增加12倍。病毒性胃肠炎发作后出现PI-IBS也很常见,但是维持时间较短暂^[13]。临床上PI-IBS以腹泻型多见,其原因可能是急性胃肠道感染后持续存在的炎症破坏肠黏膜上皮屏障,引起水钠吸收障碍而产生腹泻。本研究选取常见的腹泻型PI-IBS患者作为研究对象,具有较大的代表性。

短暂的肠道感染可导致内脏敏感性增高和持续的肠道动力异常^[14]。黏膜炎症减轻后遗留的神经肌肉功能紊乱可能是黏膜局部产生的炎症介质的维持作用。即使内镜下正常的黏膜也并不能排除肠壁深层炎症改变肠道功能的可能性。严重IBS患者肠神经丛区域的神经节内及其周围还有淋巴细胞浸润,部分患者还有平滑肌起搏细胞Cajal细胞形态的改变,而该细胞是影响胃肠动力的主要细胞。

IBS患者肠黏膜肥大细胞(mast cell, MC)增多和活性增强与其肠道敏感性增高、动力异常等密切相关^[15]。肠黏膜浸润增多的MC与神经纤维的接近程度与IBS患者症状的严重程度和出现频率明显相关^[16]。作为脑肠轴的终末效应细胞,MC能够将患者精神方面的压力转换成以5-HT为代表的生物活性介质的释放,从而刺激胃肠道神经纤维末梢并且影响其感知,通过肠道局部的神经内分泌免疫网络的复杂作用引起肠神经系统-平滑肌功能可逆性的改变,最终导致肠道通透性增高,引起腹泻。

此外,IBS患者还普遍存在下丘脑-垂体-肾

上腺轴的过度反应现象。与IBS发病密切相关的焦虑情绪与炎症相关的细胞因子有着密切的关系^[17]。焦虑和抑郁等精神症状和黏膜炎症改变伴随PI-IBS而产生。多种细胞因子以及心理应激均可刺激促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin-releasing factor, CRF)的释放,CRF一方面致敏杏仁核导致中枢性感觉过敏,另一方面刺激CRF1受体并通过激活5-HT受体导致结肠运动加快。

PI-IBS患者就诊时,大部分患者肠道感染已消失,但其遗留的前述肠道非特异性炎症目前尚无特效药物治疗。针对既往肠道感染遗留的菌群失调,单用培菲康效果欠佳。而针对炎症相关的内脏高敏感和动力异常的主要药物泽马可由于药物安全性问题以及主要针对便秘型IBS患者而无法应用于腹泻型PI-IBS患者。对于伴有抑郁、焦虑症状的IBS患者,临床上应用黛力新有较好的疗效,并已积累了一定的经验。在此基础上,本研究进一步试探性地在没有明显精神症状的患者中短期小剂量应用黛力新联合培菲康治疗PI-IBS患者,其总有效率达到90.0%,疗效显著,其可能原因是:(1)PI-IBS患者临床症状的轻重不仅取决于感染的严重程度^[13-18],还受前述胃肠动力、内脏感觉、以及精神因素^[19-20]等共同影响。临床上同样是感染诱发的PI-IBS,由于中青年女性面临较多的家庭以及社会问题,容易产生抑郁和焦虑情绪,因此好发^[18,21]且迁延难愈。在漫长的病程中,精神及心理因素存在明显的波动,并不一定和症状同时出现。新近研究也发现焦虑、抑郁总积分和肠黏膜炎症相关的5-HT浓度之间无明显相关性^[15],即精神因素和肠道炎症因素的分离现象。在IBS不同亚型中,抑郁症状对患者疼痛阈值存在不同的影响^[22]。抑郁症状对于这一年龄人群中精神、心理方面的不稳定性为黛力新提供了应用的前提。(2)细菌性胃肠炎后4%-31%患者出现PI-IBS^[23],提示不同个体在胃肠道感染后患PI-IBS的概率相差悬殊,其原因与患PI-IBS之前3 mo之内个体存在的易患因素有关。这些易患因素对个体患病的影响从大到小依次排序如下:原发疾病严重性>细菌毒性>疑病心理、抑郁情绪、神经官能症以及不良生活事件^[23]。随着PI-IBS病程的进展,上述易患因素(比如抑郁情绪)可能会减轻,但是肠黏膜的炎症如前述仍然长期存在,并改变内脏感觉和动力。对于处于这一阶段的患者,黛力新可能更主要地是通过调解内脏感觉的途径,改善

■创新盘点

目前国内外研究主要针对伴有抑郁、焦虑症状的IBS患者的临床药物治疗,而本文从临床实际出发,观察了联合应用黛力新与培菲康对无明显精神症状的腹泻型PI-IBS患者进行治疗的疗效。

■名词解释

感染后肠易激综合征(PI-IBS):指患者被肠道病毒、细菌或寄生虫等感染,在病原体清除及黏膜炎症逐渐消退后,出现IBS症状的综合征。

■同行评价

本研究选题较好, 科学性强, 对临床有一定的指导作用。

PI-IBS患者的内脏高敏感状况而起到缓解症状的作用。

总之, 根据PI-IBS发病机制的复杂性, 针对内脏感觉、胃肠动力、精神因素、菌群失调等诸多因素, 应用黛力新与培菲康对无明显精神症状的腹泻型PI-IBS患者进行治疗, 疗效显著, 且优于单用培菲康治疗。此外, 两种药物联合应用无明显不良反应, 因此安全性良好, 值得临床推广。

4 参考文献

- 1 Shinozaki M, Fukudo S, Hongo M, Shimosegawa T, Sasaki D, Matsueda K, Harasawa S, Miura S, Mine T, Kaneko H, Arakawa T, Haruma K, Torii A, Azuma T, Miwa H, Fukunaga M, Handa M, Kitamori S, Miwa T. High prevalence of irritable bowel syndrome in medical outpatients in Japan. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 1010-106
- 2 Spinelli A. Irritable bowel syndrome. *Clin Drug Investig* 2007; 27: 15-33
- 3 康明祥, 贾红. 肠易激综合征内脏高敏感性机制的研究进展. *世界华人消化杂志* 2008; 16: 1554-1558
- 4 余颖聪, 姚健敏, 樊宇靖, 陈淑洁. 肠易激综合征患者肠道微生态对照研究. *中华消化杂志* 2004; 24: 427
- 5 De Giorgio R, Barbara G. Is irritable bowel syndrome an inflammatory disorder? *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10: 385-390
- 6 Frieling T. [Functional and inflammatory bowel disorders] *Med Klin (Munich)* 2006; 101 Suppl 1: 139-142
- 7 肖海刚, 郭津生. 细菌性痢疾与肠易激综合征相关性分析. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1012-1014
- 8 Rey E, Garcia-Alonso MO, Moreno-Ortega M, Alvarez-Sanchez A, Diaz-Rubio M. Determinants of quality of life in irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2008; 42: 1003-1009
- 9 Frissora CL. Nuances in treating irritable bowel syndrome. *Rev Gastroenterol Disord* 2007; 7: 89-96
- 10 Snelling AM. Effects of probiotics on the gastrointestinal tract. *Curr Opin Infect Dis* 2005; 18: 420-426
- 11 Doron S, Gorbach SL. Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006; 4: 261-275
- 12 陈浩, 柯美云. 肠易激综合征与炎症关系的研究现状. *国际消化病杂志* 2007; 27: 172-174
- 13 Marshall JK, Thabane M, Borgaonkar MR, James C. Postinfectious irritable bowel syndrome after a food-borne outbreak of acute gastroenteritis attributed to a viral pathogen. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 457-460
- 14 La JH, Kim TW, Sung TS, Kang JW, Kim HJ, Yang IS. Visceral hypersensitivity and altered colonic motility after subsidence of inflammation in a rat model of colitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2791-2795
- 15 陈文科, 邹益友, 李富军, 罗丹. 肠易激综合征精神心理因素、肠黏膜肥大细胞及5-羟色胺的变化. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 46-50
- 16 Barbara G, Stanghellini V, De Giorgio R, Cremon C, Cottrell GS, Santini D, Pasquinelli G, Morselli-Labate AM, Grady EF, Bunnett NW, Collins SM, Corinaldesi R. Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2004; 126: 693-702
- 17 Liebrechts T, Adam B, Bredack C, Roth A, Heinzel S, Lester S, Downie-Doyle S, Smith E, Drew P, Talley NJ, Holtmann G. Immune activation in patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2007; 132: 913-920
- 18 Marshall JK, Thabane M, Garg AX, Clark WF, Salvadori M, Collins SM. Incidence and epidemiology of irritable bowel syndrome after a large waterborne outbreak of bacterial dysentery. *Gastroenterology* 2006; 131: 445-450; quiz 660
- 19 Santos J, Alonso C, Vicario M, Ramos L, Lobo B, Malagelada JR. Neuropharmacology of stress-induced mucosal inflammation: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Curr Mol Med* 2008; 8: 258-273
- 20 Nicholl BI, Halder SL, Macfarlane GJ, Thompson DG, O'Brien S, Musleh M, McBeth J. Psychosocial risk markers for new onset irritable bowel syndrome--results of a large prospective population-based study. *Pain* 2008; 137: 147-155
- 21 Heitkemper MM, Jarrett ME. Update on irritable bowel syndrome and gender differences. *Nutr Clin Pract* 2008; 23: 275-283
- 22 de Medeiros MT, Carvalho AF, de Oliveira Lima JW, Dos Santos AA, de Oliveira RB, Nobre E Souza MA. Impact of depressive symptoms on visceral sensitivity among patients with different subtypes of irritable bowel syndrome. *J Nerv Ment Dis* 2008; 196: 711-714
- 23 Spiller RC. Role of infection in irritable bowel syndrome. *J Gastroenterol* 2007; 42 Suppl 17: 41-47

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

● 消息 ●

中国科技期刊引证报告(核心版)发布 WJG 2007 年影响因子 0.745

本刊讯 2007年World Journal of Gastroenterology(WJG)的总被引频次为4431, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类28种期刊的第1位。2007年WJG的影响因子为0.745, 内科医学类28种期刊的第10位。即年指标0.163, 他引率0.85, 引用刊数482种, 扩散因子10.88, 学科影响指标0.73。(编辑: 程剑侠 2009-03-08)

sCD40L在炎症性肠病中的表达及临床意义

谢芳

谢芳, 成都市第二人民医院消化内科 四川省成都市 610017
通讯作者: 谢芳, 610017, 四川省成都市庆云南街10号, 成都市
第二人民医院消化内科. bearjoe2000@163.com
电话: 0411-83600680 传真: 0411-83631284
收稿日期: 2008-12-16 修回日期: 2009-01-15
接受日期: 2009-01-19 在线出版日期: 2009-03-08

Expression of soluble CD40L in inflammatory bowel disease and its clinical significance

Fang Xie

Fang Xie, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610017, Sichuan Province, China

Correspondence to: Fang Xie, Department of Gastroenterology, the Second People's Hospital of Chengdu, Chengdu 610017, Sichuan Province, China. bearjoe2000@163.com
Received: 2008-12-16 Revised: 2009-01-15

Accepted: 2009-01-19 Published online: 2009-03-08

Abstract

AIM: To determine the expression levels of soluble CD40L in sera of patients with inflammatory bowel disease (IBD), and to study its clinical significance to the pathogenesis.

METHODS: Sera were collected from 12 patients with crohn's disease (CD), 42 patients with ulcerative colitis (UC) and 34 healthy controls. sCD40L was analyzed by ELISA. These patients were treated routinely and sCD40L was detected after clinical remission.

RESULTS: Levels of sCD40L were significantly increased in sera of patients with CD and UC compared with healthy controls (2456.5 ± 264.3 ng/L, 2105.4 ± 238.1 ng/L vs 564.8 ± 188.6 ng/L, both $P < 0.005$). Moreover, sCD40L was found to be markedly decreased in sera from IBD patients after effective treatment ($P < 0.005$). Further analysis demonstrated that no relationship was present between sCD40L and other biochemical parameters such as CRP and liver and kidney function tests.

CONCLUSION: sCD40L is significantly increased in sera from patients with IBD, suggesting that

sCD40L is involved in the development of disease. Therefore, it can be used to evaluate early diagnosis and predict efficacy and prognosis.

Key Words: sCD40L; Crohn's disease; Ulcerative colitis; Inflammatory bowel disease

Xie F. Expression of soluble CD40L in inflammatory bowel disease and its clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 737-739

摘要

目的: 检测炎症性肠病(IBD)患者外周血清中可溶性CD40L(sCD40L)水平, 并探讨其在疾病发生过程中的临床意义。

方法: 收集12例克罗恩病、42例溃疡性结肠炎和34例健康者的外周血, 离心分离血清, 使用ELISA检测sCD40L水平。患者经有效治疗, 待症状控制后, 检测外周血sCD40L水平变化, 分析sCD40L与疾病发展的关系。

结果: CD和UC患者外周血清中sCD40L水平明显高于健康对照组(2456.5 ± 264.3 ng/L, 2105.4 ± 238.1 ng/L vs 564.8 ± 188.6 ng/L, 均 $P < 0.005$)。患者经过有效治疗, 发现外周血sCD40L水平明显降低($P < 0.005$)。进一步分析发现, sCD40L水平与患者的其他生化指标如CRP、肝肾功能指标等之间无相关关系。

结论: sCD40L在IBD患者外周血中明显升高, 可能作为早期诊断, 判断疗效和预后的指标。

关键词: 可溶性CD40L; 克罗恩病; 溃疡性结肠炎; 炎症性肠病

谢芳. sCD40L在炎症性肠病中的表达及临床意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17(7): 737-739

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/737.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC), 其病因和发病机制仍

■背景资料

炎症性肠病(IBD)包括克罗恩病(CD)和溃疡性结肠炎(UC), 其病因和发病机制仍不清楚。目前大多学者认为肠壁黏膜免疫调节异常, 持续的肠道感染, 肠壁黏膜屏障缺损, 遗传和环境因素等参与疾病进程。CD40主要表达在B细胞、单核巨噬细胞、树突状细胞和少数成纤维细胞上的辅助信号分子, 而CD40L主要表达在其激活的T细胞。本文分析IBD患者外周血清中可溶性CD40L(sCD40L)水平, 旨在探讨其在IBD发生过程中的免疫病理作用, 以及疗效评价。

■同行评议者

潘秀珍, 教授, 福建省立医院消化研究室

■相关报道

既往报道显示, CD40和CD40L分子在IBD患者炎症肠壁内有较高表达方式. CD40主要表达在肠壁内B细胞和CD68⁺巨噬细胞,而CD40L主要表达在肠壁固有层内CD4⁺ T细胞.

不清楚. 目前大多学者认为肠壁黏膜免疫调节异常, 持续的肠道感染, 肠壁黏膜屏障缺损, 遗传和环境因素等参于疾病进程^[1-2]. CD40主要表达在B细胞、单核巨噬细胞、树突状细胞和少数成纤维细胞上的辅助信号分子, 而CD40L主要表达在其激活的T细胞. CD40和CD40L信号对相互作用可以诱导T细胞和抗原递呈细胞激活, 表达辅助信号分子, 以及分泌促炎症细胞因子^[3]. 已研究报道^[4-5], CD40和CD40L在IBD患者炎症肠壁黏膜组织中表达增高, CD40信号刺激可以激活IBD患者肠黏膜组织内T细胞分泌高水平的促炎症细胞因子, 如TNF和IFN- γ , 提示CD40信号在IBD发生过程中起着重要的病理作用. 本文分析IBD患者外周血清中可溶性CD40L(sCD40L)水平, 旨在探讨其在IBD发生过程中的免疫病理作用, 以及疗效评价.

1 材料和方法

1.1 材料 于2005-06/2008-10收集了在我院消化内科门诊和住院的CD患者12例, 其中男8例, 女4例, 年龄18-42(平均31)岁, 包括5例回肠末端病变, 4例回肠末端及降结肠病变, 3例降结肠病变. 其中8例接受柳氮磺吡啶或美沙拉秦治疗, 4例未接受任何治疗. 42例UC患者, 男性28例, 女14例, 年龄19-63(平均44)岁. 其中25例接受柳氮磺吡啶或美沙拉秦、甲硝唑和/或泼尼松治疗, 17例未接受任何药物治疗. 所有患者均未接受任何免疫抑制剂和生物免疫抑制剂治疗, 且均未合并其它自身免疫性疾病和HIV感染. 诊断符合中华医学会消化病学分会炎症性肠病学科组制定的诊断指南^[6]. 另外还采集34例健康体检者, 男21例, 女13例, 年龄18-51(平均35)岁. 所有检查对象在征求同意后, 行纤维结肠镜检查 and/或 X-线钡餐造影, 并经组织病理学检查得到确诊. 本研究得到医院医政科批准后进行.

1.2 方法 所有观察对象均于早晨空腹采集静脉血, 离心分离血清, 置于-80℃冰箱保存待用. 离心分离血清, 使用ELISA检测sCD40L水平. 试剂盒有美国R&D公司提供, 实验操作严格按照说明书进行. 上述患者经过有效治疗, 待症状控制后, 继续检测外周血sCD40L水平变化, 分析sCD40L与疾病发展的关系.

统计学处理 数据以mean \pm SD表示. 两组之间数据比较采用t检验, $P<0.05$ 认为差异有显著.

2 结果

2.1 IBD患者外周血sCD40L变化 如表1所示, CD

表 1 IBD患者治疗后sCD40L变化分析 (mean \pm SD, μ g/L)

分组	n	治疗前	治疗后
克罗恩病	11	2324.4 \pm 242.7	769.4 \pm 198.5 ^a
溃疡性结肠炎	39	2265.1 \pm 251.4	691.1 \pm 201.3 ^a

^a $P<0.05$ vs 健康者.

患者外周血清中sCD40L水平为2456.5 \pm 264.3 μ g/L, UC患者外周血清sCD40L水平为2105.4 \pm 238.1 μ g/L, 而健康对照组血清中sCD40L水平仅为564.8 \pm 188.6 μ g/L, 经统计学分析发现IBD患者sCD40L浓度明显比健康者升高($P<0.005$).

2.2 IBD患者有效治疗后sCD40L变化 上述IBD患者接受正规药物治疗, 如柳氮磺胺吡啶(1.0, qid)片剂或美沙拉秦颗粒剂(艾迪莎, 1.0, tid), 结合强的松片剂治疗(开始剂量0.75-1.0 mg/kg, 2-3 wk后减量5 mg/wk). 经治疗3-4 wk后, 其中11例CD患者、39例UC患者的临床症状得到控制, 收集这些患者的外周血清, 通过ELISA分析sCD40L水平, 结果发现IBD患者的sCD40L水平比治疗前显著下降($P<0.005$, 表1).

2.3 IBD患者血清sCD40L水平与其他生化指标相关分析 经统计学分析发现, IBD患者sCD40L水平与患者的其他生化指标, 如CRP、ALT、AST、T-Bil、 γ -GT等之间无相关关系($P>0.05$).

3 讨论

既往报道显示^[7], CD40和CD40L分子在IBD患者炎症肠壁内有较高表达方式. CD40主要表达在肠壁内B细胞和CD68⁺巨噬细胞, 而CD40L主要表达在肠壁固有层内CD4⁺ T细胞. CD40L可直接刺激外周血单核细胞分泌IL-12和TNF. 这些促炎症细胞因子可引起肠壁组织损伤. 动物实验证实, 使用抗小鼠CD40L单克隆抗体可有效阻断实验性慢性结肠炎的发生^[4]. 这些研究工作均说明CD40-CD40L信号通路在炎症性肠病时炎症发生起着重要作用.

CD40主要表达在B细胞、单核巨噬细胞、树突状细胞和少数成纤维细胞等. 而CD40L主要表达在激活的T细胞, 以及部分NK细胞和NK-T细胞等. 通过CD40信号可诱导T细胞激活, 并产生细胞因子; 刺激B细胞可诱导其产生免疫球蛋白; 刺激单核巨噬细胞、树突状细胞可诱导它们分泌细胞因子、杀伤肿瘤细胞和抑制细胞凋亡; CD40可刺激血管内皮细胞表达辅助信号分子如CD54、CD58和CD62E等^[3]. 这些分子

生物学特征说明了CD40信号可以参与机体细胞与体液免疫反应. 近年来研究报道, CD40信号通路已在许多自身免疫性疾病和炎症性疾病中起着重要作用, 如类风湿性关节炎、红斑狼疮疾病、多发性硬化和器官移植等^[8-9]. CD40L在上述疾病中外周血或炎症组织的T细胞上有很高表达, 通过CD40信号可诱导各种淋巴细胞激活并产生各种促炎症细胞因子(如IL-1、IL-2、IFN- α 、TNF), 吸引白细胞血管外浸润, 引起组织损伤和功能障碍.

我们检测IBD患者外周血清中sCD40L水平, 发现IBD患者比健康对照组明显升高, 经过有效治疗后, sCD40L水平呈显著下降. 这些结果说明CD40L信号通路可直接诱导IBD的发生, 与既往报道接近^[10-11]. 目前, 在临床上已开展使用抗人CD40L单克隆抗体对个别自身免疫性疾病展开治疗, 如类风湿性关节炎和血小板减少性紫癜, 而在CD患者中也进行了二期临床试验^[12]. 因此, 进一步研究CD40-CD40L信号通路在IBD中的免疫病理作用显的尤其重要.

4 参考文献

- 1 Strober W, Fuss I, Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 514-521
- 2 刘占举, 王丽萍. 肠黏膜先天性免疫应答与炎症损伤. *胃肠病学* 2007; 12: 120-123
- 3 Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 307-328
- 4 Daness S, Sans M, Fiocchi C. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004; 53: 1035-1043
- 5 刘占举, 酒金霞. CD40辅助信号诱导对炎症性肠病患者淋巴细胞因子分泌的影响. *郑州大学学报(医学版)* 2006; 41: 823-825
- 6 中华医学消化病学会炎症性肠病协作组. 中国炎症性肠病诊断治疗规范的共识意见. *中华内科杂志* 2008; 47: 73-79
- 7 Liu Z, Colpaert S, D'Haens GR, Kasran A, de Boer M, Rutgeerts P, Geboes K, Ceuppens JL. Hyperexpression of CD40 ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production. *J Immunol* 1999; 163: 4049-4057
- 8 Howard LM, Miller SD. Immunotherapy targeting the CD40/CD154 costimulatory pathway for treatment of autoimmune disease. *Autoimmunity* 2004; 37: 411-418
- 9 Toubi E, Shoenfeld Y. The role of CD40/CD40L interactions in autoimmunity and the benefit of disruption this pathway. *Autoimmunity* 2004; 37: 457-464
- 10 Danes S, Katz JA, Saibeni S, Papa A, Gasbarrini A, Vecchi M, Fiocchi C. Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in the circulation of inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52: 1435-1441
- 11 Koutroubakis IE, Theodoropoulou A, Xidakis C, Sfiridaki A, Notas G, Kolios G, Kouroumalis EA. Associated between enhanced soluble CD40 ligand and prothrombotic state in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 1147-1152
- 12 Kasran A, Boon L, Wortel CH, Hogezaand RA, Scheriber S, Goldin E, Boer M, Geboes K, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Safety and tolerability of antagonist anti-human CD40 Mab cd5D12 in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 111-122

编辑 史景红 电编 吴鹏朕

■同行评价

本文立题有依据, 设计严谨, 目的明确, 内容集中, 研究方法较先进, 结果可靠, 讨论条理尚清晰, 有利于炎症性肠病发病机制的理论探讨和临床诊治的参考.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 荣获 2007 年“中国百种杰出学术期刊” 和 2008 年中国国际化精品科技期刊

本刊讯 由中国科学技术信息研究所主办的中国科技论文统计结果发布会于2008-12-09在北京国际会议中心召开, 世界胃肠病学主编马连生和编辑部主任程剑侠参加此项发布会. 本次会议介绍了中国精品科技期刊服务与保障系统, 中国科技论文研究项目进展及精品科技期刊遴选, 百篇最具影响学术论文评选, 世界科技产出趋势和利用科学计量学工具分析领域发展趋势以及发布了中国科技论文统计结果. 根据2007年度中国科技论文与引文数据库(CSTPCD2007)统计结果, WJG荣获2007年度“中国百种杰出学术期刊”称号, 同时被选入2008年中国国际化精品科技期刊, 中国精品科技期刊包括23种中国国际化精品期刊和301种中国精品科技期刊.(编辑: 程剑侠 2009-03-08)

ERCP胆总管结石取石术后并发胆道蛔虫病1例

吴炜景, 赵亚刚, 孙大勇, 曾海萍

■背景资料

胆石病是我国常见病之一, 发病率较高。在我国某些地区, 胆道结石患者多并发肠道蛔虫病。胆道结石的取石治疗术可能刺激肠道蛔虫上窜并钻入胆道引起胆道蛔虫病, 造成患者再次出现腹痛。ERCP治疗术对于胆道结石、胆道蛔虫病皆具有良好的治疗效果。

吴炜景, 赵亚刚, 孙大勇, 曾海萍, 中国人民解放军广州军区广州总医院消化内科 广东省广州市 510010

作者贡献分布: 吴炜景与赵亚刚对此文所作贡献均等; 此课题由吴炜景与赵亚刚设计; 病例收集由吴炜景与孙大勇完成; 研究过程由赵亚刚, 孙大勇及曾海萍操作完成; 本论文写作由吴炜景与赵亚刚完成。

通讯作者: 赵亚刚, 510010, 广东省广州市荔湾区流花路111号, 中国人民解放军广州军区广州总医院消化内科。

wwwj0713@163.com

电话: 020-36653552 传真: 020-36222793

收稿日期: 2008-12-07 修回日期: 2009-01-06

接受日期: 2009-01-12 在线出版日期: 2009-03-08

One-case analysis of biliary tract ascariasis after removal of choledocholithiasis by endoscopic retrograde cholangiopancreatography

Wei-Jing Wu, Ya-Gang Zhao, Da-Yong Sun, Hai-Ping Zeng

Wei-Jing Wu, Ya-Gang Zhao, Da-Yong Sun, Hai-Ping Zeng, Department of Gastroenterology, Guangzhou General Hospital of Chinese PLA Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China

Correspondence to: Ya-Gang Zhao, Department of Gastroenterology, Guangzhou General Hospital of Chinese PLA Guangzhou Military Command, 111 Liuhua Road, Liwan District, Guangzhou 510010, Guangdong Province, China. wwwj0713@163.com

Received: 2008-12-07 Revised: 2009-01-06

Accepted: 2009-01-12 Published online: 2009-03-08

Abstract

A 55-year-old farmer was admitted to hospital because of repeated epigastric pain for 2 months and aggravating for 1 wk. The definite diagnosis, made by endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) is choledocholithiasis, and the pain was lessened after the operation. But the severe epigastric pain appeared again after the naso-biliary tube was pulled out. So the emergent ERCP was performed and he was diagnosed with biliary tract ascariasis. This case is typical and useful in clinical demonstration.

Key Words: Choledocholithiasis; Biliary tract; Ascariasis; Endoscopic retrograde cholangiopancreatography

Wu WJ, Zhao YG, Sun DY, Zeng HP. One-case analysis of biliary tract ascariasis after removal of choledocholithiasis by endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(7): 740-741

摘要

患者, 男, 55岁, 农民, 因“反复上腹痛2 mo余, 加重1 wk”入院。入院后经ERCP治疗术明确诊断为“胆总管结石”, 术后腹痛减轻。于拔除鼻胆管后再次出现剧烈腹痛, 行急诊ERCP治疗术, 诊断为“胆道蛔虫病”。本病例典型, 有示教意义。

关键词: 胆总管结石; 胆道; 蛔虫; 逆行胰胆管造影

吴炜景, 赵亚刚, 孙大勇, 曾海萍. ERCP胆总管结石取石术后并发胆道蛔虫病1例. *世界华人消化杂志* 2009; 17(7): 740-741
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/740.asp>

0 引言

腹痛是内镜逆行胆胰管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)治疗术后常见症状之一, 及时明确术后腹痛的原因并治疗影响患者预后, 现将我院收治的1例ERCP胆总管结石取石术后并发胆道蛔虫的病例报道如下。

1 病例报告

男, 55岁, 农民, 因“反复上腹痛2 mo余, 加重1 wk”入院。患者于入院前2 mo以来, 间断出现剑突下、右上腹疼痛, 向腰背部放射, 近1 wk疼痛程度、次数均加剧。求诊当地医院, 行胃镜检查示慢性浅表性胃炎、十二指肠球部溃疡, 上腹部CT示胆总管结石伴肝内胆管扩张, 谷丙转氨酶76.7 U/L, 经治疗效果欠佳转入我科。既往无特殊病史, 否认传染病史, 无异嗜嗜好。入院查体: T: 37.0, P: 80次/min, R: 20次/min, Bp: 124/70 mmHg, 全身皮肤黏膜、巩膜无黄染, 心肺未见异常, 剑突下、右上腹压痛, 无反跳痛, Murphy's征可疑阳性。辅助检查: 三大常规正常, 肝功能示胆红素、转氨酶正常, 碱性磷酸酶243

■同行评议者

巩鹏, 教授, 大连医科大学附属第一医院普外科; 宋振顺, 教授, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

U/L, γ -谷氨酰转肽酶241 U/L, 淀粉酶正常. 于入院次日行ERC+EST+ENBD术, 术中见胆总管直径约1.0 cm, 有散在结石透光影, 予网篮、球囊反复取出数颗小结石, 未见胆总管有残留结石, 十二指肠乳头切开处未见出血, 术后留置鼻胆管, 胆汁引流通畅. 患者诉腹痛明显减轻, 术后肝功正常, 4 h淀粉酶轻度升高, 12 h后复查恢复正常. 于入院第5天行鼻胆管造影示胆总管无明显扩张及结石影, 造影剂排出通畅, 予拔除鼻胆管, 患者无诉不适. 于入院第6天患者突发右上腹剧痛, 向腰背部放射, 呈阵发性钻顶样绞痛. 急查肝功示总胆红素33.7 $\mu\text{mol/L}$; 直接胆红素22.5 $\mu\text{mol/L}$; 谷丙转氨酶116 U/L; 谷草转氨酶193 U/L; 碱性磷酸酶286 U/L; γ -谷氨酰转肽酶346 U/L; 总胆汁酸106.4 $\mu\text{mol/L}$; 血淀粉酶39 U/L. 急查腹部B超未见明显异常. 予急诊行ERC术, 于胆总管中上段示一条状充盈缺损, 长约8 cm, 其以上胆总管轻度扩张, 予网篮套取蛔虫活体1条, 再次造影示胆总管未见充盈缺损. 术后患者无明显腹痛, 复查肝功等指标恢复正常, 予口服“肠虫清”祛蛔治疗, 嘱出院后定期复查粪常规、腹部B超等, 注意个人饮食卫生.

2 讨论

胆石病是我国常见病之一, 随着生活方式及饮食习惯的改变, 发病率逐渐上升. 根据结石部位的不同可将胆石病分为胆囊结石、肝外胆管结石、肝内胆管结石等类型. 结合患者临床表现及影像学检查等, 可诊断该病. 经ERCP对胆石病的诊断准确性高, 且可进行活检、治疗等措施, 具有安全、有效、微创、迅速减轻病患痛苦、恢复快等优点.

胆道蛔虫病是肠道蛔虫病的常见并发症之一^[1]. 蛔虫寄生部位以空肠最多, 回肠次之, 十二指肠最少. 因其具有乱窜、钻孔、恶酸等习性, 故当肠道寄生环境因素改变, 如发热、恶心、呕吐、腹泻、便秘、大量饮酒、手术等所致肠道功能紊乱及Oddi括约肌功能失调, 可使蛔虫上窜并钻入胆道引起胆道蛔虫病. 该病急性发作时造成患者极大痛苦, 且可并发重症胆管炎、胆痿、急性胰腺炎、败血症等, 可危及生命. 患者常以突发上腹部钻顶样绞痛求诊, 症状较重, 而体征轻微, 多仅有剑突下压痛, 腹部B超是首选检查方法, 多可见胆总管轻中度扩张, 平行双线状回声(双轨征), 蛔虫蠕动影像等. 但在

胆管缺少胆汁, 或有气泡、胆泥, 或是死亡虫体萎缩等情况下, 则不易诊断. 部分病例可于内镜检查过程中发现嵌顿于十二指肠乳头的虫体, 并将其钳出. 对于完全钻入胆道的蛔虫, 既往多采用口服药保守治疗, 效果不确定, 或外科手术治疗, 创伤较大. 随着内镜技术的发展, ERCP诊疗术不仅能明确蛔虫的位置、形态、数量, 而且能在内镜下进行取虫治疗, 是早期治愈胆道蛔虫病的最佳方案^[2].

本病例“胆总管结石”诊断明确, 行ERC诊疗术取出结石后, 患者症状缓解明显, 术后肝功能、淀粉酶、血象等均正常. 但于拔除鼻胆管次日, 患者突发剧烈腹痛, 检验提示有肝损害, 腹部B超大致正常, 当时考虑可能肝内胆管或胆囊仍有泥沙样结石陆续排入胆管引起梗阻性黄疸伴胆管炎或胰腺炎, 亦不排除胆道蛔虫的可能性, 而脏器穿孔、出血可能性则比较小.

据报道, 在胆总管结石中, 胆石核心由虫体或虫卵构成者可高达70%, 往往胆道结石患者多并发肠道蛔虫, 在内、外科手术取石治疗等刺激因素下, 蛔虫逆行入胆道, 发生胆道蛔虫病. 本病例急诊腹部B超未提示明确阳性病变, 遂再次行急诊ERC诊疗术, 明确“胆道蛔虫病”的诊断. 追溯患者所生活地区, 自然人群胆石病及蛔虫病的发病率均较高. 术前患者已禁食多日, 术中EST术破坏了乳头括约肌部分功能, 加之手术本身的刺激, 皆为肠道蛔虫逆行入胆道创造条件.

该病例提示我们: (1)内、外科取石治疗前后皆应强调“蛔虫病”的排除, 重视粪便蛔虫卵镜检、腹部B超等简单易行的诊疗手段的应用, 若诊断该病, 则应延缓手术, 先行祛虫治疗. (2)胆道结石术后早期, 患者突发剧烈腹痛时, 不应忽视胆道蛔虫病的可能性, 尤其是来自蛔虫病高发区的患者. (3)胆道蛔虫病应及早诊断, 及时治疗, 避免并发症, 其诊断多依靠病史、症状、体征, 但准确率不高, 在粪检、腹部B超或CT呈阴性结果时, 可考虑行ERCP诊疗术. (4)对于蛔虫病患者, 应进行规范的药物祛蛔治疗, 对其进行健康教育, 嘱其养成良好的卫生习惯, 并定期复查、随访, 避免复发.

3 参考文献

- 1 陈灏珠. 实用内科学(下册). 第12版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 703-704
- 2 张国福, 周淑艳, 贾大忠. 内镜下取胆道蛔虫31例分析. 中华消化内镜杂志 2003; 20: 136

■同行评价

本文属于个案报道, 具有特殊意义. 该病例的学习, 有助于医师在临床工作中提高对胆道结石、胆道蛔虫病二者联系的重视, 完善诊断思维, 规范治疗, 有较高的示教意义.

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!

陈光 教授

吉林大学第一医院消化器官外科

陈国凤 主任医师

中国人民解放军第302医院感染七科

崔云甫 教授

哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

戴朝六 教授

中国医科大学第二临床学院(盛京医院)肝胆外科

杜群 副研究员

广州中医药大学脾胃研究所药理室

范小玲 主任医师

北京地坛医院综合科

范学工 教授

中南大学湘雅医院感染病科

房林 副教授

同济大学附属上海市第十人民医院普外科

高润平 教授

吉林大学第一医院肝病科

葛海燕 教授

同济大学附属第十人民医院普通外科

巩鹏 教授

大连医科大学附属第一医院普外二科

关玉盘 教授

首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

管冬元 副教授

上海中医药大学基础医学院实验中医教研室

黄颖秋 教授

本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科

姜春萌 教授

大连医科大学附属第二医院消化科

李国威 教授

西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

李军祥 教授

北京中医药大学附属东方医院消化内科

吕宾 教授

浙江中医学院附属医院消化科

潘秀珍 教授

福建省立医院消化研究室

邱双健 副教授

复旦大学附属中山医院肝癌研究所、肝肿瘤外科

宋振顺 教授

中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科

唐文富 副教授

四川大学华西医院中西医结合科

王健生 教授

西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

伊力亚尔·夏合丁 教授

新疆医科大学第一附属医院胸外科

于聪慧 教授

中国人民解放军北京军区总医院肝胆外科

于颖彦 教授

上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室

张军 教授

西安交通大学医学院第二附属医院消化内科

张占卿 主任医师

上海市(复旦大学)公共卫生中心

郑鹏远 教授

郑州大学第二附属医院消化科

周国雄 主任医师

南通大学附属医院消化内科