ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

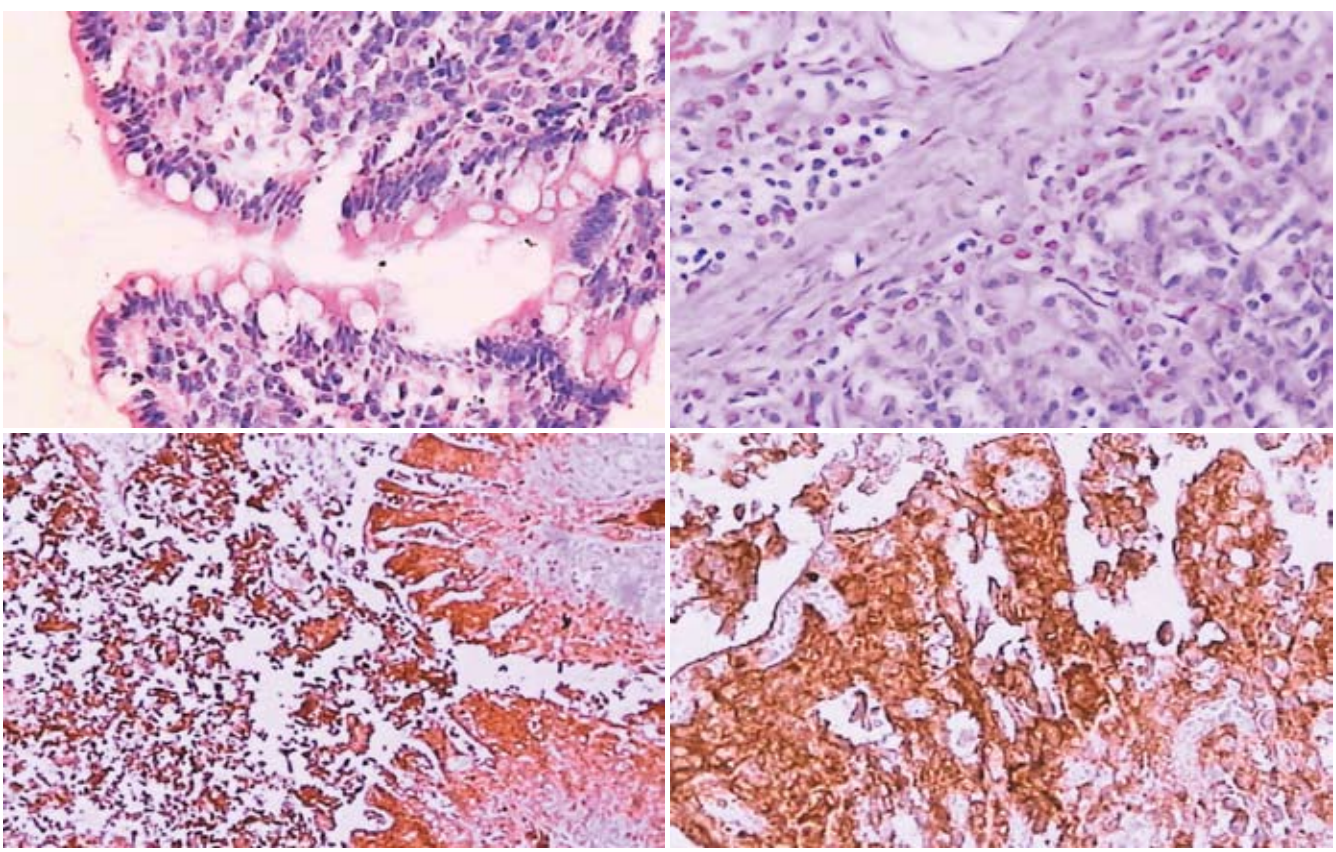
世界华人消化杂志

世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2007 年 12 月 18 日　第 15 卷　第 35 期　(Volume 15 Number 35)



35 / 2007

www.wjgnet.com

二零零七年十二月十八日

第十五卷

第三十五期

名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授
黄象谦教授
黄志强教授
裘法祖教授
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

陈士葆教授
房殿春教授
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
杨思凤教授
姚希贤教授
岳茂兴教授
张万岱教授
周学文教授

常务编委

成军教授
程英升副教授
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
白文元教授
苌新明教授
陈洪副教授
陈尼维主任医师
陈其奎教授
陈卫昌教授
陈贻胜教授
陈玉林教授
程斌副教授
迟宝荣教授
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
冯红主任医师
冯志杰主任医师
傅春彬主任医师
高峰副教授
戈之铮教授
关晓辉主任医师
关玉盘教授
郭晓钟教授
郭新宁教授
洪天配教授
侯晓华教授
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
黄裕新教授
霍丽娟主任医师
季国忠副教授
姜春萌教授
姜慧卿教授
金懋林教授
金瑞教授
蓝宇教授
李定国教授
李继强教授
李淑德教授
李晓宇主任医师
李延青教授
李瑜元教授
李玉民教授
李玉明教授
李兆申教授
林志辉教授
刘冰熔教授
刘改芳主任医师
刘海林主任医师
刘铁夫教授
刘占举教授
陆伦根教授
吕志武教授
马金城教授
马欣主任医师
毛高平主任医师
倪润洲教授
欧希龙副教授
潘秀珍教授
朴熙绪主任医师
朴云峰教授
秦成勇教授
曲智威副主任医师
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
宋于刚教授
孙富强副教授
孙侃教授
唐采白副教授
唐芙爱教授
唐丽安教授
田德安主任医师
童强主任医师
王邦茂教授
王炳元教授
王承党副教授
王吉耀教授
王莉瑛教授
王晓艳副教授
闻勤生教授
吴萍主任医师
徐秀英副教授
许春舫主任医师
许乐主任医师
许亚平副教授
杨冬华教授
杨建民教授
杨希山教授
杨幼林主任医师
杨云生教授
杨昭徐教授
姚树坤教授
叶红军主任医师
于红刚副教授
于晓峰主任医师
袁伟建教授
展玉涛副主任医师
张方信主任医师
张国梁主任医师
张吉翔教授
张集昌主任医师
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
赵晓晏教授
郑鹏远教授
智发朝教授
周国雄主任医师
朱春兰主任医师
朱人敏教授

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
陈建荣副教授
陈克能主任医师
陈力教授
陈立波副教授
陈凛教授
陈强谱教授
陈亚军主任医师
陈知水教授
陈祖林副教授
程爱国教授
程爱群主任医师
程树群副教授
迟强教授
仇毓东副教授
崔彦教授
崔云甫教授
代文杰教授
戴朝六教授
戴冬秋教授
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
高成新教授
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
郭克建教授
韩天权教授
郝纯毅主任医师
何超教授
何生教授
何裕隆教授
何振平教授
黄志勇副教授
季加孚教授
姜波健教授
蒋龙元副教授
兰平教授
黎乐群教授
李国威教授
李华山副主任医师
李靖副教授
李奇林教授
李胜研究员
李涛主治医师
李小荣教授
李旭副教授
李志霞教授
李宗芳教授
梁力建教授
林胜璋副教授
刘建教授
刘颖斌副教授
刘志苏教授
刘作金副教授
卢实春教授
陆才德教授
陆云飞教授
禄韶英主治医师
吕明德教授
吕云福教授
梅铭惠教授
彭波副教授
彭吉润主任医师
彭心宇教授
彭志海教授
钱建民教授
乔岐禄主任医师
秦春宏副主任医师
秦华东教授
秦环龙教授
秦仁义教授
邱宝安主任医师
邱双健副教授

世界华人消化杂志®

编辑委员会

邱伟华副主任医师
裘正军教授
任建安教授
荣大庆教授
邵成浩讲师
邵永孚教授
沈柏用副教授
沈世强教授
沈岩主任医师
师英强博士
施诚仁教授
宋世兵主任医师
宋振顺教授
孙诚谊教授
孙家邦教授
孙学英教授
孙延平副主任医师
邰升副教授
谭群友副教授
汤恢焕教授
汤展宏副教授
唐文皓副主任医师
田素礼教授
田晓峰教授
万德森教授
汪波副主任医师
汪根树副教授
王春友教授
王凤山副教授
王广义教授
王济明教授
王健生副教授
王烈主任医师
王鲁副教授
王蒙副教授
王石林主任医师
王文跃主任医师
王效民教授
王振宁教授
王正康教授
王志刚副主任医师
王忠裕教授
卫洪波教授
吴德全教授
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
席启主任医师
谢敏主任医师
谢晓华副教授
邢光明教授
徐大华主任医师
徐智教授
许戈良教授
严律南教授
严以群主任医师
杨广顺教授
杨维良教授
杨尹默教授
伊力亚尔•夏合丁教授
殷正丰教授
于聪慧教授
于恩达教授
于健春教授
于良副教授
于则利教授
郁宝铭教授
郁正亚副教授
曾勇教授
张柏和教授
张群华教授
张水军教授
张肇达教授
张宗明教授
赵增仁副主任医师
郑民华教授
钟德玠教授
周丁华主任医师
周伟平教授
朱立元教授
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
党双锁副教授
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
郝春秋副教授
何生松教授
江家骥教授
李智伟教授
林菊生教授
刘杞教授
刘正稳教授
孟庆华教授
宁琴教授
牛俊奇教授
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
唐霓副研究员
唐世刚教授
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
谢青教授
徐小元教授
宣世英教授
闫惠平研究员
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
赵桂珍教授
赵连三教授
周伯平教授
周文兴教授
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
劳绍贤教授
李军祥教授
李勇副教授
李振华教授
刘成海研究员
刘平教授
刘绍能主任医师
龙致贤教授
牛建昭教授
沈洪教授
唐旭东主任医师
唐志鹏研究员
王新月教授
徐列明教授
许玲副教授
张声生教授

消化肿瘤学

白玉贤教授
曹秀峰主任医师
曹志成院士
陈公琰主任医师
李瑗教授
刘宝瑞教授
刘彬彬副研究员
刘云鹏教授
马力文主任医师
吴晴教授
熊斌教授
张凤春教授

消化影像学

程红岩教授
韩新巍教授
黄金华副教授
匡安仁教授
李健丁教授
鲁华玉研究员
魏经国教授
肖恩华教授
徐爱民副教授
杨建勇教授

消化内镜学

崔毅主任医师
丁佑铭教授
范志宁主任医师
郝俊鸣副主任医师
潘林娜教授
沈俊教授
孙明军教授
万军教授

消化介入治疗学

卢榜裕教授
茅爱武主任医师
吴硕东教授
袁友红副教授
郑加生主任医师

消化中西医结合学

崔乃强教授
李方儒教授
刘鲁明教授
唐文富主治医师
王学美研究员

消化基础研究

曹洁副教授
樊红副教授
高春芳研究员
高峰教授
高英堂研究员
管冬元副教授
黄文林教授
李东辉教授
李杰副教授
李永哲副研究员
李增山副教授
梅林教授
彭曦副研究员
钱睿哲教授
任超世研究员
孙秀发教授
谭学瑞教授
屠红副研究员
汪思应教授
吴晓东教授
夏建川研究员
徐存拴教授
徐德忠教授
徐宁志研究员
徐迎新研究员
许文燮教授
姚登福教授
阴赖宏研究员
喻荣彬副教授
张青云研究员
张学教授
赵平副教授
周士胜教授
周晓东研究员
周晓武副主任医师
左国营副主任药师

消化病理学

杜祥教授
刘勇钢副主任医师
吕宁主任医师
马大烈教授
潘兴华副主任医师
向德兵讲师
阎晓初副教授
易永芬 教授
于颖彦教授
余宏宇教授
张锦生教授
赵景民教授

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目　次 ●　2007 年 12 月 18 日　第 15 卷　第 35 期　(总第223期)

述　评

3669 胆汁淤积诊治进展
谢正元, 罗忠金, 张吉翔

基础研究

3674 脂肪肝细胞模型的建立及其生物学特性
王炳芳, 朱韶杰, 田培营

3678 双环醇对小鼠日本血吸虫病肝纤维化即早基因与TGF-β1、TIMP1及胶原表达的影响
何生松, 徐标, 韩春荣

3685 5-脂氧合酶抑制TNF-α诱导的胰腺癌细胞凋亡
丁晓凌, 周国雄, 黄介飞

3690 急性胰腺炎大鼠肺组织与肺泡巨噬细胞早期生长反应基因-1的表达
邹树, 田伏洲, 汤礼军, 黎冬暄, 汪涛, 石力

3697 血清IL-2、IL-10及肠黏膜Fas在重症急性胰腺炎大鼠中的动态变化
党胜春, 张建新, 毛正发, 瞿建国, 王旭青, 朱蓓

3703 热休克预处理对大鼠肠缺血-再灌注损伤的保护效应
莫燕娜, 王丹妹, 吉丽敏, 翁阳, 何佟, 陈世民

3710 幽门螺杆菌*OipA*、*HopX*、*HopW*基因的检测及序列分析
王华, 邵世和

3715 DNA聚合酶γ的提取、纯化和鉴定
张颖慧, 林菊生, 李岩, 高琳琳, 王晓燕

临床研究

3722 国人慢性HBV携带者HBV复制水平与T细胞亚群变化的关系
游晶, 庄林, 陈红英, 台虹, 宋建新, 欧阳红梅, 唐宝璋, Hutcha Sriplung, Virasakdi Chongsuvivatwong, Alan Geater, 张一凤, 杨海秋, 黄俊华

3728 肝移植患者术中凝血功能的变化及影响因素
马焕先, 董家鸿, 段伟东, 陈永亮

研究快报

3734 鲜壁虎不同部位提取液对小鼠H22肝癌体内外抑制作用
杨丽华, 杨金霞, 王学美, 富宏, 刘庚信

3738 清胰汤对大鼠急性胰腺炎肺损伤时SP-A表达的影响
张雪梅, 陈海龙, 王朝晖

临床经验

3744 经胃镜使用套扎器单环套扎治疗食管黏膜下肿瘤57例
宁瑞花, 吕志武, 殷积美, 于宏影

3746 树突状细胞治疗HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者的临床观察
司方明, 娄海山, 郑鹏远, 熊灵军, 范毅凯, 李俊红, 白经修

3749 肝炎肝硬化患者肾功能分析39例
蔺武, 刘心娟, 常岩芹, 王莉, 林香春

3752 血管紧张素原基因T174M变异与肝硬化的相关性
肖凡, 魏红山, 樊文梅, 李国力

3755 肝移植术后胆道并发症的磁共振评价
陈军法, 陈卫霞, 宋庆轮, 李昌宪

3761 “四大一支持”综合冲击疗法救治急性重症胆管炎32例
史卫海, 戎亚雄, 岳茂兴
3764 中药治疗癌痛临床文献41篇的分析
许玲, 魏品康, 孙大志, Lixing Lao

会议纪要

3770 首届海峡两岸消化论坛获得圆满成功
胡益群, 任建林, 刘明, 陈建民, 王琳, 司丽娟, 叶震世, 董菁, 陈立刚

致　　谢

3774 致谢世界华人消化杂志编委

消　　息

3673 世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版
3696 世界华人消化杂志个性化服务订购活动
3702 中国科技期刊引证报告(核心版)发布*WJG* 2006年影响因子0.834
3709 欢迎订阅2008年《世界华人消化杂志》
3714 关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报
3721 中国学术期刊综合引证报告(2007)
3727 世界华人消化杂志的同行评价
3743 *WCJD*和*WJG* 2008年对同行评议及作者贡献分布将开始实行公开策略
3748 世界华人消化杂志关于作者署名的声明
3751 *WJG* 2007年1-11月份收稿及发稿数字统计结果
3754 世界华人消化杂志在线办公系统
3760 世界华人消化杂志2007年1-11月份收稿及发稿数字统计结果
3769 中国科技期刊引证报告(核心版)发布世界华人消化杂志2006年影响因子0.373
3773 《世界华人消化杂志》简介

封面故事

党胜春, 张建新, 毛正发, 瞿建国, 王旭青, 朱蓓. 血清IL-2、IL-10及肠黏膜Fas在重症急性胰腺炎大鼠中的动态变化.

世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3697-3702

http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3697.asp

本期责任人

编务 江艳; 送审编辑 程剑侠; 组版编辑 郭海丽; 责任编辑 李军亮; 文字编辑 王先林; 英文编辑 理文编辑; 审核编辑 张海宁; 形式规范 马连生

世界華人消化雜志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平　题写封面刊名
陈可冀　题写版权刊名

(旬刊)

创　刊 1993-01-15
改　刊 1998-01-25
出　版 2007-12-18
原刊名 新消化病学杂志

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

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
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
印刷 北京科信印刷厂
发行 国内: 北京报刊发行局
国外: 中国国际图书贸易总公司
(100044，北京市399信箱)
订购 全国各地邮电局
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

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

世界华人消化杂志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.

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.

2007年版权归世界华人消化杂志所有

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

December 2007 Contents in Brief Volume 15 Number 35

EDITORIAL

3669 Progress in diagnosis and treatment of cholestasis
Xie ZY, Luo ZJ, Zhang JX

BASIC RESEARCH

3674 Establishment of a cellular model of non-alcoholic fatty liver and its biological characteristics
Wang BF, Zhu SJ, Tian PY

3678 Effect of bicyclol on the expression of hepatic immediate early genes, TGF-β1, TIMP1 and collagen in liver tissues of mice infected with *Schistosoma japonicum*
He SS, Xu B, Han CR

3685 5-lipoxygenase suppresses TNF-α-induced apoptosis in pancreatic tumor cell lines
Ding XL, Zhou GX, Huang JF

3690 Early growth response factor 1 expression in rat lungs and alveolar macrophages during acute pancreatitis
Zou S, Tian FZ, Tang LJ, Li DX, Wang T, Shi L

3697 Dynamic changes in the levels of serum interleukin-2 and interleukin-10 and the expression of Fas in the intestinal mucosa of rats with severe acute pancreatitis
Dang SC, Zhang JX, Mao ZF, Qu JG, Wang XQ, Zhu B

3703 Protective effect of previous heat shock treatment on intestinal injury following mesenteric ischemia/reperfusion in rats
Mo YN, Wang DM, Ji LM, Weng Y, He T, Chen SM

3710 Detection and analysis of *OipA*, *HopX* and *HopW* of *Helicobacter pylori*
Wang H, Shao SH

3715 Isolation, purification and identification of DNA polymerase gamma
Zhang YH, Lin JS, Li Y, Gao LL, Wang XY

CLINICAL RESEARCH

3722 Relationship between variations in peripheral T-lymphocyte subsets and viral replication levels in Chinese chronic HBV carriers with normal liver function tests
You J, Zhuang L, Chen HY, Tai H, Song JX, OuYang HM, Tang BZ, Sriplung H, Chongsuvivatwong V, Geater A, Zhang YF, Yang HQ, Huang JH

3728 Change in blood coagulation and correlative influential factors in liver transplantation
Ma HX, Dong JH, Duan WD, Chen YL

RAPID COMMUNICATION

3734 Anti-tumor effects of fresh extracts from different parts of gecho on mouse H22 hepatocellular carcinoma *in vivo* and in *vitro*
Yang LH, Yang JX, Wang XM, Fu H, Liu GX

3738 Influence of Qingyitang on surfactant protein A expression in severe acute pancreatitis-induced lung injury in rats
Zhang XM, Chen HL, Wang ZH

CLINICAL PRACTICE

3744 Experience of endoscopic ligators in treating submucosal tumors of the esophagus: an analysis of 57 cases
Ning RH, Lv ZW, Yin JM, Yu HY

3746 Clinical observation of chronic hepatitis B patients with negative HBeAg following dendritic cell vaccine treatment
Si FM, Lou HS, Zheng PY, Xiong LJ, Fan YK, Li JH, Bai JX

3749 Clinical research on renal injury in patients with cirrhosis and hepatitis: an analysis of 39 cases
Lin W, Liu XJ, Chang YQ, Wang L, Lin XC

3752 Association analysis of T174M variants of the angiotensinogen gene with hepatocirrhosis
Xiao F, Wei HS, Fan WM, Li GL

3755 Assessment of biliary complications after orthotopic liver transplantation with magnetic resonance imaging
Chen JF, Chen WX, Song QL, Li CX

3761 Combined implosion therapy of "FHDOS" for critical patients with acute cholangitis of severe type: an analysis of 32 cases
Shi WH, Rong YX, Yue MX

3764 Quality of reporting in 41 randomized controlled clinical trials of Chinese medicine for cancer pain
Xu L, Wei PK, Sun DZ, Lao LX

MEETING MINUTES

3770 Meeting minutes for the First Cross-straits Digestive Foru
Hu YQ, Ren JL, Liu M, Chen JM, Wang L, Si LJ, Ye ZS, Dong J, Chen LG

ACKNOWLEDGMENT

3774 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology

COVER

Dang SC, Zhang JX, Mao ZF, Qu JG, Wang XQ, Zhu B. Dynamic changes in the levels of serum interleukin-2 and interleukin-10 and the expression of Fas in the intestinal mucosa of rats with severe acute pancreatitis.
Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3697-3702
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3697.asp

RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Yan Jiang* Review Editor: *Jian-Xia Cheng* Electronic Page Editor: *Hai-Li Guo*
Editor-in-Charge: *Jun-Liang Li* Copy Editor: *Xian-Lin Wang* English Language Editor: *Liwen bianji*
Proof Editor: *Hai-Ning Zhang* Layout Editor: *Lian-Sheng Ma*

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 December 18, 2007

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: wcjd@wcjdnet.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: wcjd@wcjdnet.com
http://www.wcjdnet.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
© 2007 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 © 2007 by Editorial Department of *World Chinese Journal of Digestology*

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3669-3673
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

述评 EDITORIAL

胆汁淤积诊治进展

谢正元, 罗忠金, 张吉翔

谢正元, 罗忠金, 张吉翔, 南昌大学第二附属医院消化内科 江西省南昌市 330006
张吉翔, 教授, 博士生导师, 主要从事消化性疾病的研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30360037
通讯作者: 张吉翔, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院消化内科. jixiangz@163.net
电话: 0791－6292706
收稿日期: 2007-05-18 修回日期: 2007-12-04

Progress in diagnosis and treatment of cholestasis

Zheng-Yuan Xie, Zhong-Jin Luo, Ji-Xiang Zhang

Zheng-Yuan Xie, Zhong-Jin Luo, Ji-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30360037
Correspondence to: Dr. Ji-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. jixiangz@163.net
Received: 2007-05-18 Revised: 2007-12-04

Abstract
Cholestasis can be considered a clinically frequent syndrome caused by complicated factors. Although investigation of cholestasis has been carried out at molecular biology level its pathogenesis can be more clearly recognized. However, the diagnosis and management of intrahepatic cholestasis has not improved. How to identify the pathophysiological and pharmacological targets of cholestatic liver disease is a challenging issue facing clinicians, pathophysiologists and pharmacologists.

Key Words: Cholestasis; Diagnosis; Treatment

Xie ZY, Luo ZJ, Zhang JX. Progress in diagnosis and treatment of cholestasis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3669-3673

摘要
胆汁淤积(cholestasis)是临床常见的一组征候群, 产生的原因十分复杂. 尽管对胆汁淤积的研究已进入到分子学水平, 发病机制日益明确, 诊断方法及治疗药物不断更新, 但对肝内胆汁淤积的诊治仍未取得根本突破. 如何在分子水平寻找到胆汁淤积性肝病病理生理及药理作用靶点, 并进行针对性的治疗仍是临床医师、病理生理学家和药理学家共同面临的难题.

关键词: 胆汁淤积; 诊断; 治疗

谢正元, 罗忠金, 张吉翔. 胆汁淤积诊治进展. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3669-3673
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3669.asp

■背景资料
胆汁淤积是由于胆汁生成, 流动障碍而引起的一组临床和生化综合征, 产生的原因十分复杂. 尽管已在分子水平剖析其发病机制, 但至今仍无特效治疗手段. 寻找特异性的治疗方法是当前一大难题.

0 引言
胆汁淤积(cholestasis)是指各种病因引起的胆汁生成、流动障碍, 导致胆汁不能正常进入十二指肠, 而引起的黄疸、皮肤瘙痒、心动过缓等为特征的综合征候群. 一般可分为肝内胆汁淤积和肝外胆汁淤积, 但也有可能重叠, 如肝内、外胆管均有结石, 原发性硬化性胆管炎(PSC)可累及肝内、肝外胆管等. 胆汁淤积的发病机制十分复杂, 临床也缺乏特效的治疗措施, 近年逐渐成为众多学者研究热点. 现就胆汁淤积的诊治现状作一综述.

1 胆汁淤积的诊断
造成胆汁淤积的原因众多, 作出诊断之前须详细了解患者的既往史, 如各种肝炎病毒感染史、饮酒史、用药史以及家族史等. 经国内外学者多年研究总结, 得出胆汁淤积的诊断基本步骤如下[1-2]. 首先根据皮肤、巩膜黄染, 肝功能检测血清胆红素、碱性磷酸酶(ALP)、γ-谷氨酰转肽酶(γ-GT)等升高, 考虑胆汁淤积的存在, 其次进行病毒性肝炎标志物测定以排外传染性肝炎, 然后行B超检查初步确立肝内或肝外胆汁淤积. 若为肝外胆汁淤积, 进一步行CT、MRI、磁共振胰胆管造影术(MRCP)、经内镜逆行性胰胆管造影术(ERCP)、超声内镜(EUS)或经皮肝胆管造影术(PTC)以明确病因(结石、肿瘤等). 若为肝内胆汁淤积, 还应检测抗线粒体抗体(AMA)和抗核抗体(ANA), 甚至肝组织活检和试验性治疗等来确诊. 肝内胆汁淤积的常见病因

■应用要点
本文对国内外胆汁淤积的诊断及治疗方法进行文献分析, 并进行了全面的总结, 对基础医学及临床医务工作者都有一定参考价值.

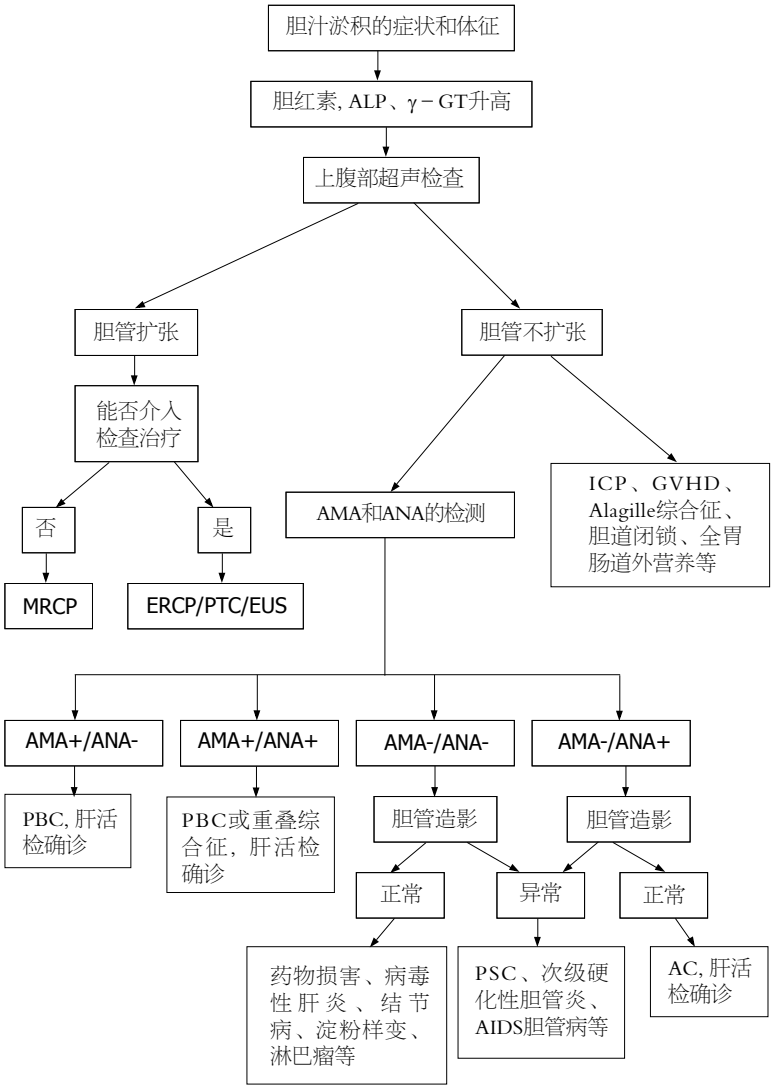


图 1 胆汁淤积诊断流程图.

有病毒感染(肝炎病毒、HIV等)、原发性胆汁性肝硬化(PBC)、PSC、药物性肝损害、妊娠期肝内胆汁淤积症(ICP)、自身免疫性胆管病(AC)、移植排斥、移植物抗宿主病(GVHD)和先天性胆管闭锁综合征等[3]. 诊断流程见图1.

2 胆汁淤积的治疗

胆汁淤积不是单一的疾病, 而是一组临床综合征, 且其病因及发病机制十分复杂. 因此胆汁淤积的治疗应包括病因及相关并发症的治疗, 但其关键是根除病因的治疗, 如抗感染、停用相关致病药物和解除机械梗阻等. 其次是胆汁淤积相关综合征(如瘙痒、疲乏和骨质疏松等)也严重影响患者的工作和生活, 对症治疗亦不容忽视.

2.1 胆汁淤积的手术治疗 手术治疗主要用于肝外胆汁淤积. 肝外胆汁淤积是肝外或近肝门处大胆管的机械梗阻所致, 主要为胆管结石、寄生虫、肿瘤以及感染、发育异常、手术后并发症等引起的肝外胆管阻塞. 因此采用手术治疗解除梗阻, 一般能取得较好的疗效. 目前能采用的手术方式有经内镜介入胆道引流术、经皮肝胆道引流术(PTCD)和开腹手术.

2.1.1 经内镜介入胆道引流术: 以其创伤小、低死亡率、住院周期短等优点而成为解除肝外梗阻的首选方式. 自1973年经内镜十二指肠乳头括约肌切开(EST)治疗胆总管结石以来, 经内镜鼻胆管引流术(ENBD)及经内镜胆管支架引流术(ERBD)广泛用于治疗良、恶性胆道梗阻, 取得较好的效果. 但ERCP术可能因幽门或十二指肠狭窄、先前的胃肠手术、导管无法插入等因素影响而不能获得成功. 近年有报道ERCP和PTCD失败的患者在EUS引导下经食道、胃、小肠胆道引流术取得成功, 拓宽了内镜的治疗范围[4].

2.1.2 经皮肝胆道引流术: 自1974年Molnar和Stocknm首先报道采用PTCD缓解恶性梗阻性黄疸以来, PTCD技术上有很大的改善和发展. 但

PTCD有一定的并发症, 如胆汁外漏, 腹膜炎, 大量胆汁流失电解质的紊乱, 胆道出血, 疼痛和患者生活不便, 以致许多患者不愿接受. 现已成为胆道梗阻经ERCP术治疗失败后一种选择.

2.1.3 *开腹手术*: 因创伤大、并发症多、住院时间长、费用高等弊端而成为胆汁淤积手术治疗的次要选择. 但肝移植术仍不失为治愈复发性、顽固性胆汁淤积瘙痒及某些潜在肝脏疾病的最终办法[5].

2.2 *胆汁淤积的药物治疗* 药物治疗主要用于肝内胆汁淤积及胆汁淤积引起的皮肤瘙痒等相关症状. 肝内胆汁淤积多与遗传、免疫、代谢等因素有关. 国内外学者提出多种治疗药物, 但迄今未发现一种特效药物. 现用于治疗胆汁淤积的药物主要有以下几种.

2.2.1 *熊去氧胆酸*(ursodeoxycholic acid, UDCA): 最早从中国黑熊的胆汁中分离出来, 是一种亲水性胆汁酸, 其化学结构为3α、7β-二羟-5β-胆烷酸, 也存在于正常人胆汁中, 约占人体生理胆汁酸总量的3%. UDCA是初级胆汁酸鹅去氧胆酸(CDCA)在肠道细菌作用下形成的7-C位β羟基反向异构体. 自上世纪70年代UDCA用于溶解胆固醇结石以来, UDCA对胆汁淤积性疾病的潜在作用日益明确. 最初的研究认为他只是改变胆汁酸的组成成份、刺激胆汁分泌和保护肝细胞膜及调节免疫功能. 近10年研究发现UDCA能作为一种细胞信使, 诱导刺激受损肝细胞分泌、抗凋亡及介导胆管细胞保护作用[6]. (1)刺激胆汁分泌: 胆汁分泌、排泄障碍是许多胆汁淤积性肝病的共同特征. 肝细胞的分泌量依赖于胆小管膜上转运蛋白的量及活性. UDCA能在转录和转录后水平刺激转运蛋白表达及插入转运蛋白到胆管膜上, 从而刺激胆汁分泌. 如UDCA能刺激鼠肝胆小管(Mrp2, Bsep)和基底外侧(Mrp3, Mrp4)分子表达, 促进胆盐和其他有机离子排出. 另外, UDCA还能刺激肾脏(Mrp2, Mrp4)和小肠(Mrp2, Mrp3)转运分子的表达, 促进有毒胆汁化合物的代谢[7]. (2)细胞保护作用: 疏水性的胆汁酸(如CDCA和石胆酸)的积聚将影响细胞膜的流动性及渗透性, 引起细胞损害、坏死及凋亡, 而补充外源性的UDCA能改变胆汁酸池的组成成份[8]. 有报道称持续*po* UDCA 13-15 mg/(Kg·d), 可使其在胆汁酸池中的含量升至40%-60%, 从而取代内源性疏水胆汁酸, 降低对细胞膜的损害[9]. (3)抑制细胞调亡: 内源性疏水胆汁酸(如CDCA)能通过CD95受体形成死亡诱导信号复合物和激活caspase 8, caspase 8进而引起线粒体膜通透性转变(MMPT), 导致线粒体内膜对离子通透性的突然增加, 导致caspase级联效应和细胞凋亡. 而UDCA能稳定线粒体膜, 抑制MMPT和凋亡[10]. 其抗凋亡效应还可能通过激活表皮生长因子受体(EGFR)和促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)诱导细胞生存信号来实现[11]. (4)免疫调节作用: 现已证实胆汁淤积时, 肝细胞和胆管上皮细胞的主要组织相容性抗原复合物(MHC)Ⅰ类和Ⅱ类抗原过度表达. MCH-Ⅰ类抗原的异常表达将导致被细胞毒T淋巴细胞识别和破坏. 有研究表明, UDCA能减少PBC患者MCH-Ⅰ类、MCH-Ⅱ类抗原的表达, 并降低血清中IgM和AMA水平[12]. 这意味着UDCA能减少T细胞介导的肝细胞损害及调节体液免疫[13].

2.2.2 *S-腺苷蛋氨酸*(SAMe): 是人体内的一种重要生理活性物质, 由蛋氨酸和三磷酸腺苷(ATP)在S-腺苷蛋氨酸合成酶的催化下生成, 具有转甲基、转硫基、转氨丙基等作用. 起初S-腺苷蛋氨酸用于抑郁症的治疗, 近年研究发现SAMe能治疗胆汁淤积性疾病[14]. 其作用机制可能为: (1)SAMe在体内的许多化学过程中起传递甲基的作用. 其中大部分转甲基反应在肝脏进行, 使肝细胞膜磷脂甲基化而增加肝细胞膜的流动性和Na^+-K^+-ATP酶的活性, 加快胆酸转运, 增加胆盐摄取, 促进胆汁排泄[15]. (2)SAMe通过转硫作用可生成半胱氨酸、谷胱甘肽、牛磺酸等硫化产物. 谷胱甘肽是重要的抗氧化及解毒物质, 同时谷胱甘肽及其结合物也是促非胆汁酸依赖胆汁流的主要成份[16]. 因此补充外源性的SAMe具有护肝、改善胆汁淤积症状的作用.

2.2.3 *消胆胺*(*考来烯胺*): 是一种阴离子交换树脂, 能与肠道内的胆汁酸紧密结合, 形成不溶性复合体从粪便排出, 并促进胆汁酸的排泄, 从而阻断“肠肝循环”, 降低血清中胆汁酸的浓度, 减轻瘙痒症状[17]. 但消胆胺可与多种药物结合, 影响其他药物吸收, 又有口腔异味、便秘等副作用, 限制了其在临床上的使用.

2.2.4 *利福平*: 是一种半合成抗生素, 主要用于胆汁淤积引起的皮肤瘙痒. 利福平能增加肝微粒体酶和胆汁酸的磺化氧化作用, 从而促使致痒原物质分解代谢, 使其易于从肾脏排泄, 同时减少肝脏对胆汁酸的摄取. 另一方面, 利福平激活核受体PXR, 促进CYP3A4 mRNA的表达, 促进

■**同行评价**
本文内容丰富, 叙述全面, 对临床工作具有一定的指导价值.

疏水性胆汁酸代谢, 产生更多亲水性胆汁酸和低毒化合物[18]. 尽管利福平有一定副作用, 但有分析认为利福平治疗慢性胆汁淤积引起的皮肤瘙痒是安全有效的[19].

2.2.5 苯巴比妥: 是一种肝微粒体单加氧酶及细胞色素P450诱导剂, 他可促进肝细胞微粒体和葡萄糖醛酸的结合, 促进胆红素的代谢, 同时还具有加快胆管分泌胆汁酸的能力[20].

2.2.6 阿片受体拮抗剂: 近年的实验发现胆汁淤积引起的皮肤瘙痒与内源性阿片类物质有关. 阿片受体拮抗剂(如纳络酮、纳美芬和纳屈酮)能减轻皮肤瘙痒[21]. 纳络酮通过与内源性阿片类物质竞争结合配体, 从而阻止其生物效应[22]. 纳屈酮还可能降低基质金属蛋白酶活性和增加肝脏SAMe水平起护肝作用[23].

2.2.7 5-羟色胺(5-HT)受体拮抗剂: 中枢5-HT可能参与诱发胆汁淤积性瘙痒, 选择性5-HT3受体拮抗剂昂丹司琼能改善胆汁淤积引起的疲乏及皮肤瘙痒. 但有研究认为昂丹司琼与安慰剂相比, 对原发性胆汁性肝硬化引起的疲乏无明显差异[24]. 近来有人提出5-HT抑制剂舍曲林可作为治疗胆汁淤积瘙痒的-线药物[25].

2.2.8 免疫抑制剂: 有抑制免疫反应和炎症反应、促进胆汁分泌等作用, 能有效改善患者临床症状和肝功能, 可用于多种病因的肝内胆汁淤积[26]. 但免疫抑制剂由于选择性和特异性的限制, 在治疗的同时不可避免地会损害造血、免疫系统及肝、肾功能, 可能引发更为严重的损害. 如硫唑嘌呤的使用可能导致胆汁淤积和肝细胞损害.

2.2.9 中药: 传统中医认为“黄疸”与湿邪有关. 中药茵陈、郁金、大黄等有着明显的利胆作用, 中成药茵梔黄、清开灵、苦黄更是具有消炎利胆、清热利湿的作用. 根据中医的辨证, 主要选用清热解毒、通腑利胆、活血化瘀凉血及改善微循环等方剂为主.

2.3 其他治疗

2.3.1 基础治疗: 长期的胆汁淤积可影响脂肪及脂溶性维生素的吸收, 引起营养不良. 脂溶性维生素D的吸收减少也可造成骨质疏松症, 故应补充不需胆汁作用的中链甘油三酯及各种脂溶性维生素. 发生骨质疏松症时应补充钙制剂. 依替膦酸盐(etidronate), 双磷化物(bisphosphonate)对胆汁淤积性骨质疏松治疗有一定的作用.

2.3.2 物理疗法: 通过物理治疗对胆汁淤积引起的皮肤瘙痒有一定疗效. 如血浆置换(PE)、分子吸附循环系统(MARS)能清除与白蛋白结合型胆红素、胆汁酸以及病原性毒物(药物等抗原和自身抗体), 可缓解瘙痒症状[27-28]. 进行光疗可使脂溶性的胆红素氧化成为一种水溶性的产物双吡咯使其从胆汁或尿液排出, 降低血清胆汁酸水平[29].

3 结论

随着分子生物学的发展, 胆汁分泌机制和胆汁淤积机制得到进一步了解, 但致病基因和药物作用靶位仍不十分清楚. 进行缺陷基因的修复和药物靶向性治疗、肝移植术是未来胆汁淤积疾病的治疗方向.

4 参考文献

1 Perez Fernondez T, Lopez Serrano P, Tomos E, Gutiorrez ML, Lledo JL, Cacho G, Santander C, Fernondez Rodroguez CM. Diagnostic and therapeutic approach to cholestatic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96: 60-73

2 陆伦根. 胆汁淤积的发生机制和诊治策略. 胃肠病学 2005; 10; 188-191

3 Rutherford AE, Pratt DS. Cholestasis and cholestatic syndromes. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 209-214

4 Will U, Thieme A, Fueldner F, Gerlach R, Wanzar I, Meyer F. Treatment of biliary obstruction in selected patients by endoscopic ultrasonography (EUS)-guided transluminal biliary drainage. *Endoscopy* 2007; 39: 292-295

5 Dehghani SM, Bahador A, Gholami S, Nikeghbalian S, Salahi H, Imanieh MH, Haghighat M, Davari HR, Serati Z, Mehrabani D, Malek-Hosseini SA. Pediatric liver transplantation in Iran: evaluation of the first 50 cases. *Pediatr Transplant* 2007; 11: 256-260

6 Pusl T, Beuers U. Ursodeoxycholic acid treatment of vanishing bile duct syndromes. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3487-3495

7 Trauner M, Wagner M, Fickert P, Zollner G. Molecular regulation of hepatobiliary transport systems: clinical implications for understanding and treating cholestasis. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S111-124

8 Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. Ursodeoxycholic acid 'mechanisms of action and clinical use in hepatobiliary disorders'. *J Hepatol* 2001; 35: 134-146

9 Kowdley KV. Ursodeoxycholic acid therapy in hepatobiliary disease. *Am J Med* 2000; 108: 481-486

10 Paumgartner G. Medical treatment of cholestatic liver diseases: From pathobiology to pharmacological targets. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 4445-4451

11 Qiao L, Yacoub A, Studer E, Gupta S, Pei XY, Grant S, Hylemon PB, Dent P. Inhibition of the MAPK and PI3K pathways enhances UDCA-induced apoptosis in primary rodent hepatocytes. *Hepatology* 2002; 35: 779-789

12 Miyachi K, Shibata M, Hasegawa C, Onozuka Y, Fritzler MJ. Case of primary biliary cirrhosis patient with anti-p97/VCP antibodies presenting a mild

clinical course. *Rinsho Byori* 2005; 53: 19-23
13 Correia L, Podevin P, Borderie D, Verthier N, Montet JC, Feldmann G, Poupon R, Weill B, Calmus Y. Effects of bile acids on the humoral immune response: a mechanistic approach. *Life Sci* 2001; 69: 2337-2348
14 Hardy ML, Coulter I, Morton SC, Favreau J, Venuturupalli S, Chiappelli F, Rossi F, Orshansky G, Jungvig LK, Roth EA, Suttorp MJ, Shekelle P. S-adenosyl-L-methionine for treatment of depression, osteoarthritis, and liver disease. *Evid Rep Technol Assess* (*Summ*) 2003; 1-3
15 Mato JM, Lu SC. Role of S-adenosyl-L-methionine in liver health and injury. *Hepatology* 2007; 45: 1306-1312
16 Wu D, Cederbaum AI. Opposite action of S-adenosyl methionine and its metabolites on CYP2E1-mediated toxicity in pyrazole-induced rat hepatocytes and HepG2 E47 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G674-684
17 Houdijk AP, Oosterling SJ, Siroen MP, de Jong S, Richir M, Rijssenbeek AL, Teerlink T, van Leeuwen PA. Hypertaurinemia in bile duct-ligated rats after surgery: the effect of gut endotoxin restriction on organ fluxes and oxidative status. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2006; 30: 186-193
18 Chen JZ, Raymond K. Treatment Effect of Rifampicin on Cholestasis. *Internet J Pharm* 2006; 4: 2
19 Khurana S, Singh P. Rifampin is safe for treatment of pruritus due to chronic cholestasis: a meta-analysis of prospective randomized-controlled trials. *Liver Int* 2006; 26: 943-948
20 Saratikov AS, Novozheeva TP, Akhmedzhanov RR. Efficiency of enzyme-inducing agents in rats with intrahepatic cholestasis. *Bull Exp Biol Med* 2002; 134: 271-273
21 Jones EA, Neuberger J, Bergasa NV. Opiate antagonist therapy for the pruritus of cholestasis: the avoidance of opioid withdrawal-like reactions. *QJM* 2002; 95: 547-552
22 Bergasa NV, Alling DW, Talbot TL, Swain MG, Yurdaydin C, Turner ML, Schmitt JM, Walker EC, Jones EA. Effects of naloxone infusions in patients with the pruritus of cholestasis. A double-blind, randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1995; 123: 161-167
23 Kiani S, Ebrahimkhani MR, Shariftabrizi A, Doratotaj B, Payabvash S, Riazi K, Dehghani M, Honar H, Karoon A, Amanlou M, Tavangar SM, Dehpour AR. Opioid system blockade decreases collagenase activity and improves liver injury in a rat model of cholestasis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 406-413
24 Theal JJ, Toosi MN, Girlan L, Heslegrave RJ, Huet PM, Burak KW, Swain M, Tomlinson GA, Heathcote EJ. A randomized, controlled crossover trial of ondansetron in patients with primary biliary cirrhosis and fatigue. *Hepatology* 2005; 41: 1305-1312
25 Mayo MJ, Handem I, Saldana S, Jacobe H, Getachew Y, Rush AJ. Sertraline as a first-line treatment for cholestatic pruritus. *Hepatology* 2007; 45: 666-674
26 Heurgue A, Vitry F, Diebold MD, Yaziji N, Bernard-Chabert B, Pennaforte JL, Picot R, Louvet H, Fremond L, Geoffroy P, Schmit JL, Cadiot G, Thiefin G. Overlap syndrome of primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis: a retrospective study of 115 cases of autoimmune liver disease. *Gastroenterol Clin Biol* 2007; 31: 17-25
27 Dall M. Plasmapheresis in the treatment of cholestasis-induced pruritus. *Ugeskr Laeger* 2006; 168: 779-781
28 Sen S, Jalan R, Morris EC, Steiner C, Mackinnon S, Williams R. Reversal of severe cholestasis caused by chronic graft-versus-host disease with the MARS liver-support device. *Transplantation* 2003; 75: 1766-1767
29 Lovell P, Vender RB. Management and treatment of pruritus. *Skin Therapy Lett* 2007; 12: 1-6

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志电子杂志的开放存取出版

本刊讯 《世界华人消化杂志》采取开放存取出版方式, 自1995年起, 发表的文章可以在线免费阅读全文(http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp). 自2003-04-15至2007-12-31, 电子版的点击次数为21762951, 平均每天点击12743次. 总下载次数280505, 平均每天下载164次. (世界胃肠病学杂志社 2007-12-10)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3674-3677
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

脂肪肝细胞模型的建立及其生物学特性

王炳芳, 朱韶杰, 田培营

■背景资料
非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是一种肝组织病理学改变与酒精性肝病类似但无过量饮酒史的临床综合征. 其疾病谱包括单纯性脂肪肝, 非酒精性脂肪性肝炎, 脂肪性肝纤维化3种主要类型. 随着社会经济发展, NAFLD患病率迅速增长, 已经成为危害人类健康的三大肝病之一, 与Ⅱ型糖尿病, 中心性肥胖, 高脂血症等代谢综合征密切相关. 因此积极治疗NAFLD具有深刻的社会和经济意义, 也是当今研究的热点.

王炳芳, 朱韶杰, 田培营, 江苏大学附属昆山市第一人民医院消化科 江苏省昆山市 215300
王炳芳, 1995年上海第二医科大学博士毕业, 主任医师, 教授, 主要从事消化系统疾病的临床及实验研究.
上海市自然科学基金资助项目, No. 02ZB14106
通讯作者: 王炳芳, 215300, 江苏省昆山市前进路91号, 江苏大学附属昆山市第一人民医院消化科. bingfang@public4.sta.net.cn
电话: 0512-50180526
收稿日期: 2007-07-25 修回日期: 2007-11-05

Establishment of a cellular model of non-alcoholic fatty liver and its biological characteristics

Bing-Fang Wang, Shao-Jie Zhu, Pei-Ying Tian

Bing-Fang Wang, Shao-Jie Zhu, Pei-Ying Tian, Department of Gastroenterology, Kunshan First People's Hospital Affiliated to Jiangsu University, Kunsan 215300, Jiangsu Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Shanghai, No. 02ZB14106
Correspondence to: Bing-Fang Wang, Department of Gastroenterology, Kunshan First People's Hospital Affiliated to Jiangsu University, 91 Qianjin Road, Kunshan 215300, Jiangsu Province, China. bingfang@public4.sta.net.cn
Received: 2007-07-25 Revised: 2007-11-05

Abstract
AIM: To establish non-alcoholic fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis models at a cellular level.

METHODS: Liver cells HL-7702 were cultured with RPMI-1640 medium containing long chain fat emulsion, which is a nutritional emulsion used in the clinic. Cells were subcultured for two generations to obtain non-alcoholic steatohepatitis models. The similarities between the cellular and animal models were evaluated, especially the utility of the cellular model.

RESULTS: After 48 hours in culture, the TG content in HL-7702 cells cultured in RPMI-1640 medium containing long chain fat emulsion increased remarkably, while there were few variations in biochemical indices such as ALT. When these cells were subcultured for two generations, they showed inflammatory injury.

CONCLUSION: Cellular models of non-alcoholic fatty liver and non-alcoholic steatohepatitis in vivo can be generated in a short time by mixing medium with long chain fat emulsion.

Key Words: Non-alcoholic fatty liver; Non-alcoholic steatohepatitis; Cell model; Long chain fat emulsion

Wang BF, Zhu SJ, Tian PY. Establishment of a cellular model of non-alcoholic fatty liver and its biological characteristics. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3674-3677

摘要
目的: 建立非酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪性肝炎离体细胞模型.

方法: 以正常人肝细胞株HL-7702为实验对象, 采用临床常用静脉营养药物脂肪乳剂加入细胞培养液培养肝细胞建立脂肪肝细胞模型, 并在此基础上传代培养, 建立非酒精性脂肪性肝炎模型. 以细胞内脂滴数量、甘油三酯含量和细胞培养液细胞转氨酶泄漏量等指标, 评价该离体细胞模型与实验动物模型的相似性及其实际应用意义.

结果: 用含20%脂肪乳剂1.0 mL/L的培养液培养肝细胞48 h即可使肝细胞产生明显甘油三酯堆积. 传代培养两代发现肝细胞损伤, 产生炎症性损伤.

结论: 利用脂肪乳剂可以在短时间内建立非酒精性脂肪肝和非酒精性脂肪性肝炎细胞模型.

关键词: 非酒精性脂肪肝; 非酒精性脂肪性肝炎; 细胞模型; 脂肪乳剂

王炳芳, 朱韶杰, 田培营. 脂肪肝细胞模型的建立及其生物学特性. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3674-3677
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3674.asp

0 引言
随着人们生活水平提高, 非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver, NAFL)[1]及非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)[2,11]发

病率呈现逐年升高趋势. NAFL是肝损伤的初期表现, 其后可能会继发NASH、肝纤维化和肝硬化, 成为隐源性肝硬化发生的重要因素之一[3,12]. NAFL还是代谢综合征表现之一[4,25], 常伴有中心性肥胖、胰岛素抵抗、糖耐量异常、血脂代谢异常等, 严重影响人们的生活质量[10,13-14]. 建立NAFLD和NASH体外细胞模型对研究NAFL和NASH的发病机制及防治具有重要的理论意义与广泛的实用价值.

1 材料和方法

1.1 材料 人正常肝细胞株HL-7702购自中科院细胞研究所细胞库, RMPI-1640培养基和血清购自上海实生生物公司, 中长链脂肪乳注射液购自广州乔光制药公司, 油酸(细胞培养用)购自Sigma公司, 油红O购自上海博光试剂公司, 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)试剂盒购自南京建成公司.

1.2 方法 人正常肝细胞株HL-7702, 用含100 mL/L小牛血清、青链霉素各10万U/L的1640培养基传代培养. 肝细胞培养于12孔板, 一孔用正常培养液培养做对照, 其余各孔用含不同浓度脂肪乳剂(中长链脂肪乳剂注射液)的培养液培养48 h后, 油红O染色[5], 测定培养液中ALT、AST值并用台盼兰染色确定细胞活力[5]. 选取导致肝细胞活力与正常培养时无明显差异, 肝细胞内脂滴大而明显, 转氨酶升高不明显且浓度最低作为诱导细胞成为脂肪肝细胞的最佳浓度.

1.2.1 脂肪肝细胞离体细胞模型的建立: 将离体培养的肝细胞分为空白对照组和实验组. 空白对照组: 用正常1640培养基培养. 实验组按照每毫升正常培养基中加入20%脂肪乳剂浓度不同分3组: 0.5 mL/L组, 1.0 mL/L组, 2.0 mL/L组. 采用上述条件, 分两部分进行实验. 第一部分各组在细胞相同条件下, 种入6孔板细胞爬片培养3 d, 油红O染色观察脂滴数量, 收集培养液测定ALT和AST的变化确定有无肝细胞损伤. 第二部分各组在细胞相同条件下, 每组分别种入3个培养瓶中培养, 第3天, 将细胞冻融, 收集细胞冻溶液测定其中TG的含量[6].

1.2.2 NASH细胞离体模型建立: 在上述加脂肪乳剂建立脂肪肝细胞模型基础上, 进一步用脂肪乳剂传代培养法, 建立NASH细胞离体模型. 分为两组, 即对照组(脂肪肝细胞模型组+不含脂肪乳剂的培养基)和实验组(脂肪肝细胞模型组+含脂肪乳剂的培养基). 脂肪乳剂剂量根据2.3实验后的结果而定. 传代培养两代后, 观察细胞形态变化, 并且收集细胞培养液, 测定ALT和AST变化.

1.2.3 生化检测: 冻溶液中TG、ALT和AST的检验严格按试剂盒规范操作.

统计学处理 实验结果以mean±SD表示, 采用SPSS10.0软件包进行方差分析及多重比较.

2 结果

2.1 肝细胞脂肪变性的浓度确定 实验结果表明, 用含10 mL/L及其以下浓度脂肪乳剂(20%)的培养液培养正常肝细胞, 其活力均无下降, 不影响细胞分裂生长且表现出一定的促进作用. 培养液中转氨酶亦无升高, 油红O染色自0.5 mL/L始见较多红色脂滴. 10 mL/L以上浓度会因脂肪乳剂过多, 培养液变得不透明, 显微镜下难以观察. 且以选择最低浓度为肝细胞脂肪变性最佳浓度为原则, 故选择0.5 mL/L、1.0 mL/L和2.0 mL/L作为致肝细胞脂肪变性最佳浓度.

2.2 脂肪乳剂对肝细胞生理生化指标和形态学的影响

2.2.1 光镜下形态学观察及油红O染色结果: 对照组: 细胞边缘清晰, 呈多角形排列呈铺路石样, 细胞间结合紧密, 无缝隙. 油红O染色示细胞边缘清晰, 核大, 细胞内少见红色脂滴. 光镜下观察同对照组. 油红O染色示大部分细胞内开始出现红色脂滴, 数量较少位于细胞膜内侧. 0.5 mL/L组: 细胞边缘清晰, 大部分多角形, 有些细胞变圆, 细胞间结合欠紧密. 油红O染色示细胞内红色脂滴较多, 部分细胞内脂滴成环状位于细胞膜内侧, 可见较大的脂滴. 1.0 mL/L组: 细胞较多变圆, 棱角不清, 细胞间结合不紧密. 油红O染色示细胞内较大脂滴, 偶见较多脂滴将细胞核挤向一侧, 呈印戒样改变. 2.0 mL/L组: 光镜下观察及染色基本同1.0 mL/L组, 脂滴更大脂肪堆积更明显(图1).

2.2.2 脂肪乳剂对肝细胞生化指标和细胞内甘油三酯含量的影响: 自培养液中脂肪乳剂浓度0.5 mL/L始, 细胞内TG含量明显增加. 经统计学处理, 各实验组与对照组比较皆有显著性差异. 转氨酶无显著变化, 肝细胞活力无明显下降, 符合脂肪肝患者和动物NAFL模型特征(表1).

2.3 NASH模型建立

2.3.1 脂肪乳剂传代培养法: 脂肪乳剂传代培养两代后可见细胞生长变慢, 细胞贴壁能力下降,

■**研发前沿**
目前对于脂肪肝的研究多见酒精性肝炎和非酒精性脂肪性肝炎的的动物模型, 存在个体差异较大, 实验条件不易控制等不利因素. 脂肪肝研究的细胞模型尚未见成熟的报道, 这可能与加入干扰因素后细胞的生长传代难以继续下去有关.

■创新盘点
1 本文建立细胞模型，能克服个体差异的影响，更好的控制实验条件，能针对性地研究非酒精性脂肪肝发病机制.
2 本文采用静脉营养药物脂肪乳剂作用于离体培养的肝细胞，造成肝细胞脂肪代谢紊乱，模拟非酒精性脂肪肝发病过程.

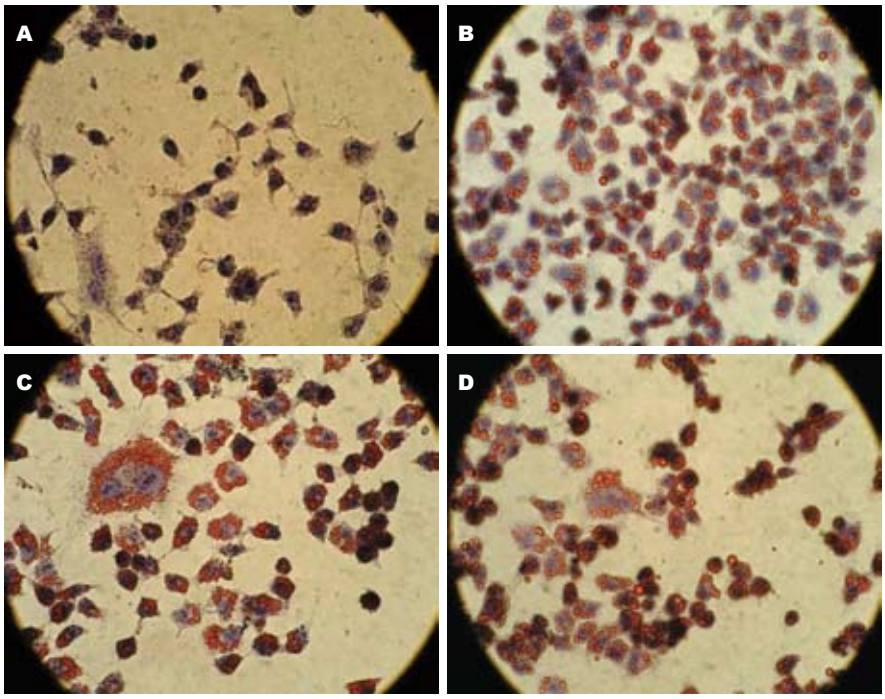


图 1 用不同浓度脂肪乳剂培养细胞，细胞内的甘油三酯含量(油红O染色×400). A: 对照组; B: 0.5 mL/L组; C: 1.0 mL/L组; D: 2.0 mL/L组.

表 1 细胞内甘油三酯含量及肝细胞生化指标变化(mean ± SD, n = 10)

分组	对照组	0.5 mL/L	1.0 mL/L	2.0 mL/L
TG(mmoL/L)	0.22 ± 0.021	0.49 ± 0.027[b]	0.55 ± 0.031[b]	0.72 ± 0.026[b]
AST(U/L)	3.3 ± 0.22	3.2 ± 0.25	2.8 ± 0.21	3.6 ± 0.26
ALT(U/L)	5.5 ± 0.25	6.2 ± 0.25	5.7 ± 0.27	5.3 ± 0.26

[b]P<0.01 *vs* 对照组.

台盼兰染色示细胞活力下降，培养液中AST、ALT升高. 收集细胞冻融液，测得TG含量亦有增加(表2).

3 讨论

从实验结果分析可知，根据非酒精性脂肪肝的发病机制[7]中脂肪进入细胞增加，用脂肪乳剂加入培养液中培养肝细胞，短期内能够使肝细胞脂质代谢紊乱、累积大量TG，形成脂肪肝体外模型. 这种细胞水平的实验性脂肪肝具有基本一致的病理现象，如细胞内出现大量脂滴，形成印戒样细胞而无转氨酶升高等炎症性损伤变化[8,17,20]. 因此我们认为，通过本实验方法，能够建立有效的非酒精性脂肪肝细胞模型，作为与动物模型相互补充的手段，共同用于该疾病发病机制的研究，以及治疗方法和药物的筛选和药效学研究.

目前，对于脂肪肝的研究多见酒精性肝炎和NASH的动物模型[9,16]，存在个体差异较大，实验条件不易控制，整体影响因素众多等不利因素. 建立细胞模型，能克服个体差异的影响，更好的控制实验条件，能针对性地研究非酒精性脂肪肝发病机制且能有效的选择治疗方法并缩短筛选治疗药物的进程. 所查文献资料未见应用脂肪乳剂建立非酒精性脂肪肝和NASH的体外模型报道. 本文采用临床上常用静脉营养药物脂肪乳剂作用于离体培养的肝细胞[26]，造成肝细胞脂肪代谢紊乱. 模拟NAFL发病过程，结合NAFL和NASH的常规检测指标，即TG含量、脂滴数量以及ALT、AST量，验证该细胞模型和实验动物模型可比性，为NAFL乃至代谢综合征的发病机制、药物研究提供一条有效可行的新途

表 2 脂肪乳剂培养液培养细胞传代两代后生化结果(mean ± SD, n = 10)

分组	实验组	对照组
TG(mmol/L)	0.65 ± 0.037[b]	0.55 ± 0.030
ALT(U/L)	8.3 ± 0.28[b]	5.1 ± 0.25
AST(U/L)	5.6 ± 0.22[b]	3.2 ± 0.25

[b]P<0.01 *vs* 对照组.

■应用要点
通过本文所述的方法建立起非酒精性脂肪肝的细胞模型，为非酒精性脂肪肝乃至代谢综合征的发病机制和药物研究提供一条有效可行的新途径.

径[21,23].

实验还发现, 对用含有脂肪乳剂变性后的肝细胞进行传代培养, 细胞活力下降, 生长变慢, 培养后培养液中转氨酶升高, 且各组细胞内累积的TG含量比传代之前显著增高. 结果显示用含脂肪乳剂培养液传代培养肝细胞, 累积损伤肝细胞可导致肝细胞炎症性损伤及细胞活力下降. 根据NASH的“二次打击学说”[1,7,18-19], 可在脂肪肝细胞模型建立的基础上, 加入游离脂肪酸或者其他可导致细胞内氧自由基增多的药物诱导肝细胞进一步损伤. 模拟体内过氧化物增多的二次打击导致的NASH的发病过程[22-24], 建立NASH离体细胞模型, 从而为NASH的发病机制、药物研究提供一条有效可行的新途径, 有望为进一步降低隐源性肝硬化发病率找到好的方法.

4 参考文献

1 范建高, 曾民德. 脂肪性肝病. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 200-203

2 Bahrami H, Daryani NE, Mirmomen S, Kamangar F, Haghpanah B, Djalili M. Clinical and histological features of nonalcoholic steatohepatitis in Iranian patients. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 27

3 Shimada M, Hashimoto E, Kaneda H, Noguchi S, Hayashi N. Nonalcoholic steatohepatitis: risk factors for liver fibrosis. *Hepatol Res* 2002; 24: 429-438

4 Reaven G, Abbasi F, McLaughlin T. Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59: 207-223

5 司徒镇强. 实用生物组织学技术. 第1版. 北京: 科学出版社, 2004: 196-197

6 李影林. 中华医学检验全书(上册). 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 299-301

7 曾民德. 脂肪肝发生机制及其“二次打击”假设. 中华消化杂志 2002; 22: 167-168

8 王家驷. 非酒精性脂肪性肝炎病理病因和发病机制. 中华消化杂志 2002; 22: 360-362

9 范建高, 钟岚, 王国良, 徐正捷, 巫协宁, 李明升. 大鼠非酒精性脂肪性肝炎发病中游离脂肪酸的作用. 世界华人消化杂志 2001; 9: 721-722

10 Abdelmalek MF, Diehl AM. Nonalcoholic Fatty liver disease as a complication of insulin resistance. *Med Clin North Am* 2007; 91: 1125-1149

11 Yeh MM, Brunt EM. Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 837-847

12 Yoneda M, Endo H, Nozaki Y, Tomimoto A, Fujisawa T, Fujita K, Yoneda K, Takahashi H, Saito S, Iwasaki T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Aburatani H, Wada K, Hotta K, Nakajima A. Life style-related diseases of the digestive system: gene expression in nonalcoholic steatohepatitis patients and treatment strategies. *J Pharmacol Sci* 2007; 105: 151-156

13 Chow WC, Tai ES, Lian SC, Tan CK, Sng I, Ng HS. Significant non-alcoholic fatty liver disease is found in non-diabetic, pre-obese Chinese in Singapore. *Singapore Med J* 2007; 48: 752-757

14 Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* 2004; 279: 32345-32353

15 Canbay A, Gieseler RK, Gores GJ, Gerken G. The relationship between apoptosis and non-alcoholic fatty liver disease: an evolutionary cornerstone turned pathogenic. *Z Gastroenterol* 2005; 43: 211-217

16 Otogawa K, Kawada N. Rabbit model for the study of human NASH. *Nippon Rinsho* 2006; 64: 1043-1047

17 Xu P, Zhang XG, Li YM, Yu CH, Xu L, Xu GY. Research on the protection effect of pioglitazone for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006; 7: 627-633

18 Kawada N, Otogawa K. Role of oxidative stress and Kupffer cells in hepatic fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22 Suppl 1: S85-86

19 Fan J, Zhong L, Wang G, Wu X, Li M, Jing D, Zhang P. The role of Kupffer cells in non-alcoholic steatohepatitis of rats chronically fed with high-fat diet. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2001; 9: 16-18

20 Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114: 147-152

21 Medina J, Fernandez-Salazar LI, Garcia-Buey L, Moreno-Otero R. Approach to the pathogenesis and treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Diabetes Care* 2004; 27: 2057-2066

22 de Almeida IT, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr* 2002; 21: 219-223

23 Diraison F, Moulin P, Beylot M. Contribution of hepatic de novo lipogenesis and reesterification of plasma non esterified fatty acids to plasma triglyceride synthesis during non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Metab* 2003; 29: 478-485

24 Malhi H, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* 2006; 281: 12093-12101

25 Baou K, Vlachopoulos C, Manesis E, Archimandritis A, Stefanadis C. Non-alcoholic fatty liver and cardiovascular disease: an emerging relationship. *Hellenic J Cardiol* 2007; 48: 37-41

26 Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 2006; 79: 1100-1107

■**同行评价**
本文研究内容新颖, 具有一定的理论意义和可读性.

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3678-3684
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

双环醇对小鼠日本血吸虫病肝纤维化即早基因与TGF-β1、TIMP1及胶原表达的影响

何生松, 徐 标, 韩春荣

■背景资料
日本血吸虫病肝纤维化是导致门静脉高压、腹水和上消化道出血的主要原因, 也是日本血吸虫病患者死亡的主要原因. 目前国内外尚无理想的抗纤维化药物. 近年研究发现, 肝纤维化时过度表达的即早基因*c-fos*与*c-jun*产物可促进肝纤维化发展.

何生松, 徐标, 韩春荣, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科 湖北省武汉市 430022
何生松, 主任医师, 博士导师, 主要从事病毒性肝炎、血吸虫病、酒精性肝病方面的研究.
通讯作者: 何生松, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院感染科. shengshe168@yahoo.com.cn
电话: 027－85726132
收稿日期: 2007-09-19 修回日期: 2007-12-04

Effect of bicyclol on the expression of hepatic immediate early genes, TGF-β1, TIMP1 and collagen in liver tissues of mice infected with *Schistosoma japonicum*

Sheng-Song He, Biao Xu, Chun-Rong Han

Sheng-Song He, Biao Xu, Chun-Rong Han, Department of Infectious Diseases, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Sheng-Song He, Department of Infectious Diseases, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. shengshe168@yahoo.com.cn
Received: 2007-09-19 Revised: 2007-12-04

Abstract

AIM: To study the therapeutic effect of bicyclol on schistosome-infected mice with liver fibrosis and its mechanism.

METHODS: Eighty mice were divided into four groups. Mice in the low-dose, high-dose and experimental control groups were infected with *Schistosoma japonicum*. After eight weeks, the low-dose and high-dose groups were treated with bicyclol at 60 mg (kg·d) and 120 mg (kg·d), respectively, for 8 weeks. The experimental control group received no treatment. The fourth group was a normal control group. HE staining, RT-PCR and immunohistochemistry were used to observe the pathological changes in liver tissues of mice, the expression levels of hepatic *c-fos* and *c-jun* mRNAs, and the levels of hepatic transforming growth factor β1 (TGF-β1), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP1), and types I and III collagen, before and after treatment.

RESULTS: Bicyclol treatment at a high dosage significantly relieved the degree of hepatic fibrosis compared with the experimental control group. The mRNA expression levels of *c-fos* and *c-jun* in liver tissue were significantly reduced in the high-dose group compared with the experimental control and low-dose groups (*c-fos* mRNA: 0.6511 ± 0.0551 *vs* 0.7844 ± 0.0852, 0.8072 ± 0.0923; *c-jun* mRNA: 0.6803 ± 0.0712 *vs* 0.7982 ± 0.0902, 0.8289 ± 0.094). The levels of hepatic TGF-β1, TIMP1 and types I and III collagen in the high-dose bicyclol treated group (integral light density: 0.1815 ± 0.0231, 0.2324 ± 0.0536, 0.1811 ± 0.0514, 0.1543 ± 0.0603) were significantly lower than those in the experimental control group (0.2139 ± 0.0134, 0.2648 ± 0.0361, 0.2140 ± 0.0271, 0.1862 ± 0.0217), but were still higher than those in the normal control group.

CONCLUSION: The effect of bicyclol on liver fibrosis due to Schistosoma japonicum infection depend on its dosage. The anti-fibrotic effect of high-dose bicyclol treatment may be due to its inhibition on the expression of immediate early genes, which may lead to reduced synthesis of TGFβ and TIMP1.

Key Words: Bicyclol; *Schistosoma japonicum*; Liver fibrosis; Immediate early gene; Transforming growth factor β1; Tissue inhibitor of metalloproteinase 1; RT-PCR

He SS, Xu B, Han CR. Effect of bicyclol on the expression of hepatic immediate early genes, TGF-β1, TIMP1 and collagen in liver tissues of mice infected with *Schistosoma japonicum*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3678-3684

摘要

目的: 研究双环醇对小鼠日本血吸虫病肝纤维化的治疗作用及其机制.

方法: 将80只小鼠随机分为4组, 低剂量, 高

剂量治疗组和实验组各组小鼠感染日本血吸虫8 wk后, 分别以60 mg/(kg•d)、120 mg/(kg•d)双环醇治疗8 wk以及不进行任何治疗, 第4组小鼠作为正常对照组. 应用HE染色、RT-PCR及免疫组化染色法, 观察和分析不同剂量双环醇治疗前后各组小鼠肝组织病理改变和*c-fos* mRNA、*c-jun* mRNA、转化生长因子β1(transforming growth factorβ1, TGF-β1)、基质金属蛋白酶组织抑制因子1(tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP1)和Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达变化.

结果: 高剂量双环醇治疗后肝纤维化组织病理损伤减轻, 高剂量双环醇组TGF-β1、TIMP1和Ⅰ、Ⅲ型胶原含量(平均积分光密度)分别是0.1815±0.0231、0.2324±0.0536、0.1811±0.0514、0.1543±0.0603明显低于实验对照组0.2139±0.0134、0.2648±0.0361、0.2140±0.0271、0.1862±0.0217. 而低剂量双环醇与实验对照组比较无显著差异. 与实验对照组相比, 高剂量双环醇组小鼠肝组织中*c-fos* mRNA, *c-jun* mRNA表达与实验对照组和低剂量双环醇组相比显著降低(*c-fos* mRNA: 0.6511±0.0551 *vs* 0.7844±0.0852, 0.8072±0.0923; *c-jun* mRNA: 0.6803±0.0712 *vs* 0.7982±0.0902, 0.8289±0.094).

结论: 双环醇治疗血吸虫病肝纤维化作用呈剂量依赖性. 高剂量双环醇抗血吸虫肝纤维化作用可能与其抑制肝组织即早基因表达、减少TGF-β1、TIMP1产生有关.

关键词: 双环醇; 日本血吸虫病; 肝纤维化; 即早基因; 基质金属酶组织抑制因子; 转化生长因子β1; 逆转录聚合酶链式反应

何生松, 徐标, 韩春荣. 双环醇对小鼠日本血吸虫病肝纤维化即早基因与TGF-β1、TIMP1及胶原表达的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3678-3684
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3678.asp

0 引言

日本血吸虫病肝纤维化是导致门静脉高压、腹水和上消化道出血的主要原因, 也是日本血吸虫病患者死亡的主要原因. 目前国内外尚无理想的抗纤维化药物. 近年研究发现, 肝纤维化时过度表达的即早基因*c-fos*与*c-jun*产物可促进肝纤维化发展. 文献报道, 双环醇有保护肝损伤作用和抗纤维化作用[1], 鼠感染日本血吸虫发生肝纤维化是理想的实验模型[2]. 本文即研究不同剂量双环醇对小鼠血吸虫病肝组织中即早基因、TGF-β1、TIMP1和Ⅰ、Ⅲ型胶原含量表达的影响, 观察肝组织病理变化, 以探讨双环醇抗日本血吸虫病肝纤维化的作用及其机制.

1 材料和方法

1.1 材料 双环醇由北京协和药厂提供, 产品批号040502, 使用前以生理盐水配制悬浊液. 清洁级昆明小鼠80只(雄雌各40只), 体质量20-25 g, 4-6周龄(购自同济医学院动物实验中心). 将小鼠随机分4组, 每组20只. (1)实验对照组: 每只小鼠人工感染日本血吸虫尾蚴(购自武汉市血吸虫病防治研究所, 下同)25条, 感染8 wk后以生理盐水 ig 8 wk, 每天1 mL/只. (2)高剂量双环醇组: 感染尾蚴8 wk后用双环醇ig 8 wk, 剂量为120 mg/(kg•d), 溶于生理盐水, 每天1 mL/只. (3)低剂量双环醇组: 感染尾蚴8 wk后用双环醇灌胃8 wk, 剂量为60 mg/(kg•d), 溶于生理盐水, 每天1 mL/只. (4)正常对照组: 未感染血吸虫尾蚴, 正常方法饲养16 wk. *c-fos*引物(购于北京奥科公司, 产物382 bp): 上游5'-GGCTCTCCTGTCAACACACA-3', 下游5'-CCGCTTGGAGTGTATCTGTC-3'. *c-jun*引物(购于北京奥科公司, 产物385 bp): 上游5'-CAGTCTGAAGCCGCACCTCC-3', 下游5'-GTTGCTGAGGTTGGCGTAGACC-3'. β-肌动蛋白(β-actin)引物(内参照物, 购于北京奥科公司, 产物246 bp): 上游5'-GTGGGCCGGTGTAGGCACCA-3', 下游5'-GGTTGGCCTTAGGGTTCAGG-3'. TRIzol试剂购于美国GIBCOBRL公司, 琼脂糖购自华美生物工程公司, 兔抗小鼠Ⅰ型及Ⅲ型胶原抗体购自美国Santa Cruz公司, 兔抗小鼠TGF-β1、TIMP1抗体、SABC试剂盒、包括正常山羊血清封闭液、生物素化山羊抗兔IgG、SABC试剂(链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物)、抗原修复液、复合消化液、DAB显色试剂盒等, 均购自武汉博士德生物工程有限公司.

1.2 方法

1.2.1 肝组织切片HE染色光镜检查: 常规石蜡切片经HE染色后, 光镜下观察肝组织的病理变化. 肝纤维化级别标准依病情轻重分3级: "+"为汇管区有轻度纤维组织增生, 并向外伸展; "++"为较明显的纤维组织增生, 并包绕肝小叶或与邻近汇管区纤维组织相互衔接; "+++"纤维组织沿门静脉分支高度增生, 肝组织被挤压.

1.2.2 RNA抽提及RT-PCR分析: 各组标本随机抽取10份样本(50 mg/份), 按TRIzol说明书抽提肝组织总RNA. 每50 mg组织以无菌5号针头粉碎

■相关报道
据相关文献报道, 双环醇有保护肝损伤和抗纤维化的作用, 鼠感染日本血吸虫发生肝纤维化是理想的实验模型, 近来发现, 双环醇不仅能有效降低多种肝损伤后ALT, AST水平升高, 而且对慢性CCl_4引起的大鼠肝纤维化具有明显的抑制作用.

■创新盘点
本文综合应用形态学及分子生物学等技术手段研究了双环醇对血吸虫病肝纤维化的治疗作用.

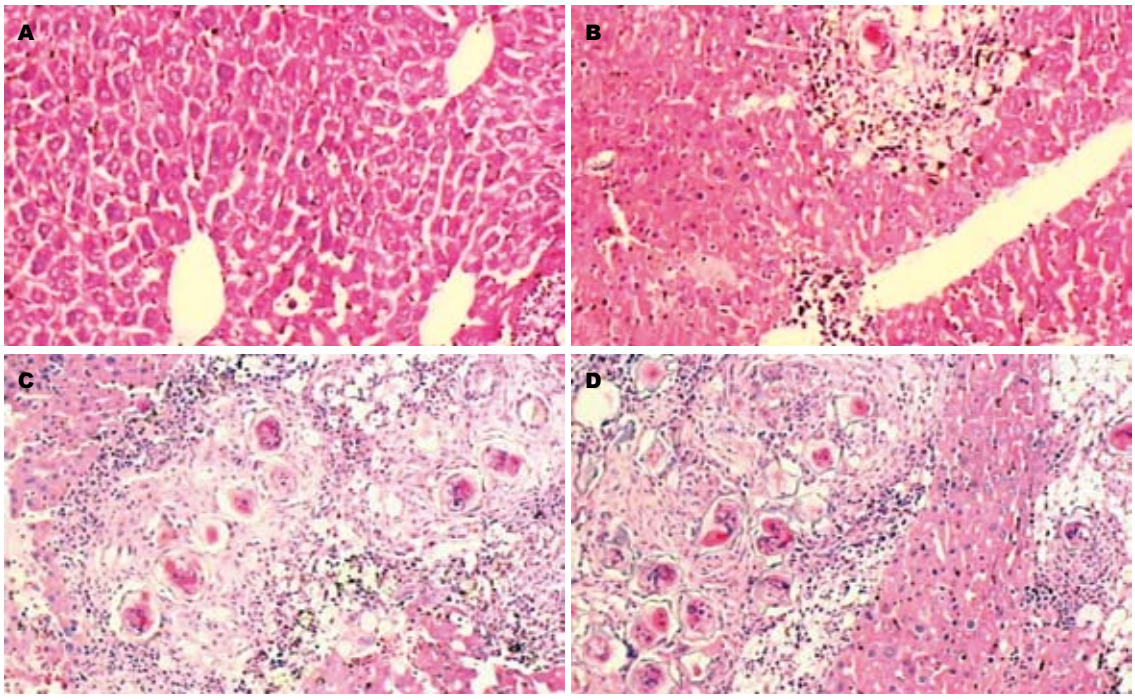


图 1 各组小鼠肝组织HE染色切片(HE×100). A: 正常组; B: 高剂量双环醇组; C: 低剂量双环醇组; D: 实验对照组.

后加入1 mL TRIzol试剂, 匀浆器中匀浆3次×10 s, 入1.5 mL EP管. 每1 mL TRIzol加入0.2 mL氯仿摇15 s, 室温下放置15 min. 于4℃下12 000 *g*离心15 min. 将上部水相转入新管, 每1 mL TRIzol试剂加入0.5 mL异丙醇沉淀RNA, 摇匀, 样品置于室温下10 min. 于4℃下12 000 *g*离心10 min, 凝胶样沉淀物为RNA. 吸去上清, 加1 mL 75%来回倒置洗RNA 1次, 随后于4℃ 7500 r/min离心5 min. 吸去上清, 晾干RNA沉淀, 溶于20 μL DEPC-H_2O(已用高压处理)中. 在分光光度计下测A_{260}/A_{280}值, 计算RNA得率, 调整RNA浓度. 逆转录聚合酶链反应条件: 50℃, 30 min; 94℃, 2 min; 94℃, 30 s; 58℃, 30 s; 72℃, 30 s; 72℃, 10 min(34循环). 在100 V, 35 mA下, PCR产物于15 g/L琼脂糖凝胶中电泳50 min. 电泳结果经电泳凝胶成像分析仪扫描成像. 用Multi-Analyst软件包进行半定量分析. 单位肝组织的*c-fos*及*c-jun* mRNA相对含量用*c-fos*及*c-jun*条带平均积分光度值与β-actin条带平均积分光度比值表示.

1.2.3 免疫组化法检测肝组织TGF-β1、TIMP1和Ⅰ、Ⅲ型胶原表达: 采用链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法: 30 mg/L H_2O_2室温10 min灭活内源性酶, 蒸馏水洗2 min×3次, 滴加复合消化液, 室温消化5 min, 0.01 mol/L PBS洗2 min×3次. 滴加正常山羊血清封闭液, 室温孵育10 min. 甩去多余液体, 分别滴加兔抗小鼠Ⅰ型、Ⅲ型胶原、TGF-β1、TIMP1抗体, 37℃孵育30 min. 0.01 mol/L PBS洗2 min×3次, 滴加生物素化山羊抗兔IgG, 37℃孵育20 min. 0.01 mol/L PBS洗2 min×3次, 滴加SABC试剂, 37℃孵育20 min. 0.01 mol/L PBS洗5 min×4次, DAB显色. 镜下控制反应时间, 蒸馏水洗涤. 脱水, 透明, 封片, 显微镜下观察. 免疫组化结果采用MPZAS-500多媒体彩色病理图文分析系统, 计算平均积分光密度(integral light density, ILD).

统计学处理 免疫组化、RT-PCR结果以mean±SD表示, 两组间比较采用*q*检验. 肝脏纤维化程度为等级资料, 用Ridit分析, α = 0.05或0.01.

2 结果

2.1 肝组织普通病理变化 光镜下, 正常对照组小鼠肝组织未见任何病变. 实验对照组、高剂量双环醇组及低剂量双环醇组与正常组相比, 肝组织病理学观察发现众多慢性虫卵肉芽肿. 其虫卵周围包绕梭形细胞和胶原纤维, 亦可见少部分急性虫卵肉芽肿, 汇管区有大量炎性细胞浸润, 肉芽肿和小静脉周围的胶原纤维束向肝小叶周围延伸. 在病变程度和病变范围上, 高剂量双环醇组比低剂量双环醇组、实验对照组明显减轻, 而低剂量双环醇组无明显减轻(图1). 根据肝纤维化程度级别标准, 统计每组小鼠各级别的小鼠数量(表1).

2.2 肝组织中*c-fos* mRNA, *c-jun* mRNA的表达

表 1 小鼠肝脏纤维化程度

分组	*n*	–	+	++	+++
正常组	20	20	0	0	0
高剂量双环醇组[bd]	15	0	5	6	4
低剂量双环醇组[c]	11	0	1	3	7
实验对照组	10	0	0	2	8

[b]$P<0.01$ *vs* 实验对照组; [c]$P<0.05$ *vs* 高剂量双环醇组; [d]$P<0.01$ *vs* 正常组.

各组小鼠RT-PCR光带吸光度强弱呈梯度变化. 与实验对照组相比, 高剂量双环醇组小鼠肝组织中*c-fos* mRNA, *c-jun* mRNA表达下降非常显著. 与低剂量双环醇组相比, 其含量亦显著下降, 但两者表达仍比正常组高. 低剂量双环醇组肝组织中*c-fos* mRNA, *c-jun* mRNA表达比实验对照组虽有下降, 但无显著差异(表2, 图2).

2.3 肝组织中TGF-β1的表达变化 正常对照组肝内均未见明显TGF-β1阳性着色. 低剂量双环醇组、实验对照组肝内TGF-β1呈棕黄色, 呈片状分布于虫卵肉芽肿内及其周围汇管区、肝血窦. 高剂量双环醇组肝内TGF-β1分布区域同上, 但着色少而浅, 与实验对照组相比, TGF-β1含量下降非常显著. 与低剂量双环醇组相比, 其含量下降亦非常显著, 但其含量仍比正常组高. 低剂量双环醇组肝组织中TGF-β1含量比实验对照组虽有下降, 但无显著差异(表3, 图3).

2.4 肝组织中TIMP1的表达变化 正常对照组肝内未见明显TIMP1阳性着色. 低剂量双环醇组、实验对照组肝内TIMP1呈棕黄色, 表达于窦周、汇管区、虫卵肉芽肿纤维组织内. 高剂量双环醇组肝内TIMP1分布区域同上, 但着色少而浅, 与实验对照组相比, TIMP1含量下降显著, 与低剂量双环醇组相比, 其含量亦显著下降, 但其含量仍比正常组高. 低剂量双环醇组肝组织中TIMP1含量比实验对照组虽有下降, 但无显著差异(表3).

2.5 肝组织中Ⅰ、Ⅲ型胶原的表达变化 正常对照组肝内无明显胶原着色. 低剂量双环醇组、实验对照组肝内Ⅰ、Ⅲ型胶原呈棕黄色, 密集片状, 主要分布在虫卵肉芽肿内及汇管区. 高剂量双环醇组肝内胶原分布区域同上, 但虫卵肉芽肿普遍较小, 胶原分布减少. 与实验对照组相比, Ⅰ、Ⅲ型胶原含量下降非常显著, 与低剂量双环醇组相比, 其含量亦显著下降, 但其含量仍比正常组高. 低剂量双环醇组肝组织中Ⅰ、Ⅲ型含量比实验对照组虽有下降, 但无显著差异(表3, 图4-5).

表 2 各组小鼠肝组织中*c-fos*, *c-jun* mRNA表达变化 (mean ± SD)

分组	*n*	c-fos mRNA	c-jun mRNA
正常组	10	0.2024 ± 0.0312	0.1942 ± 0.0604
高剂量双环醇组	15	0.6511 ± 0.0551[bd]	0.6803 ± 0.0712[bd]
低剂量双环醇组	11	0.7844 ± 0.0852[c]	0.7982 ± 0.0902[c]
实验对照组	10	0.8072 ± 0.0923	0.8289 ± 0.0947

[b]$P<0.01$ *vs* 实验对照组; [c]$P<0.05$ *vs* 高剂量双环醇组; [d]$P<0.01$ *vs* 正常组.

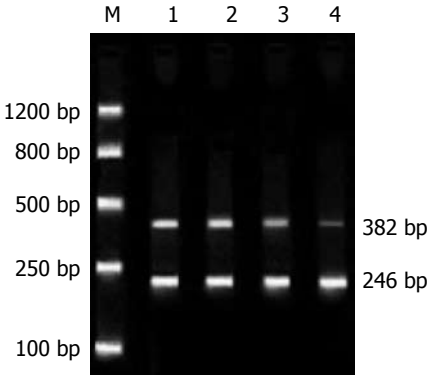


图 2 各组小鼠肝组织中*c-fos* mRNA表达. M: Mark标记; 1: 实验对照组; 2: 低剂量双环醇组; 3: 高剂量双环醇组; 4: 正常组.

3 讨论

双环醇是在五味子素的基础上人工合成的国家一类新药, 化学名称为4, 4'-二甲氧基-5, 6, 5', 6'-双(亚甲二氧基)-2-羟甲基-2'-甲氧羰基联苯. 近来研究发现, 双环醇不仅能有效降低多种肝损伤后ALT、AST水平升高, 而且对慢性四氯化碳引起的大鼠肝纤维化具有明显的抑制作用[3-4], 表明双环醇可保护肝细胞并具有一定的抗肝纤维化作用. 血吸虫肝纤维化是在虫卵肉芽肿基础上产生的, 其核心机制是在可溶性虫卵抗原刺激下, 巨噬细胞与淋巴细胞产生PDGF、TGFβ1等各种细胞因子刺激肝星状细胞(HSC)活化、增殖、转化成肌成纤维细胞, 并大量合成以Ⅰ、Ⅲ型胶原为主的细胞外基质(ECM), 从而导致肝脏ECM的合成与降解失衡, 促进肝纤维化的发生及发展.

在ECM降解过程中起主要作用的为MMPs.

■应用要点
本文的实验结果为临床血吸虫病肝纤维化的治疗提供了新思路.

■同行评价
本文设计思路全面，实验结果可靠，具有较高的参考价值和理论水平.

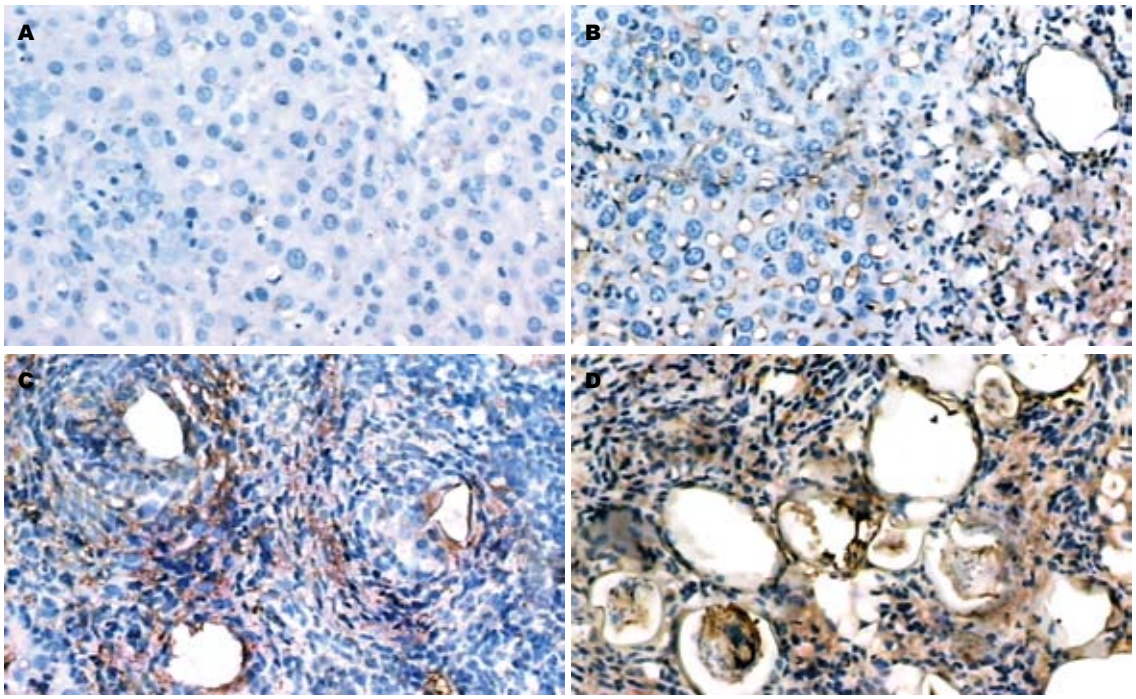


图 3 各组小鼠肝组织中TGF-β1的表达(SABC × 200). A: 正常组; B: 高剂量双环醇组; C: 低剂量双环醇组; D: 实验对照组.

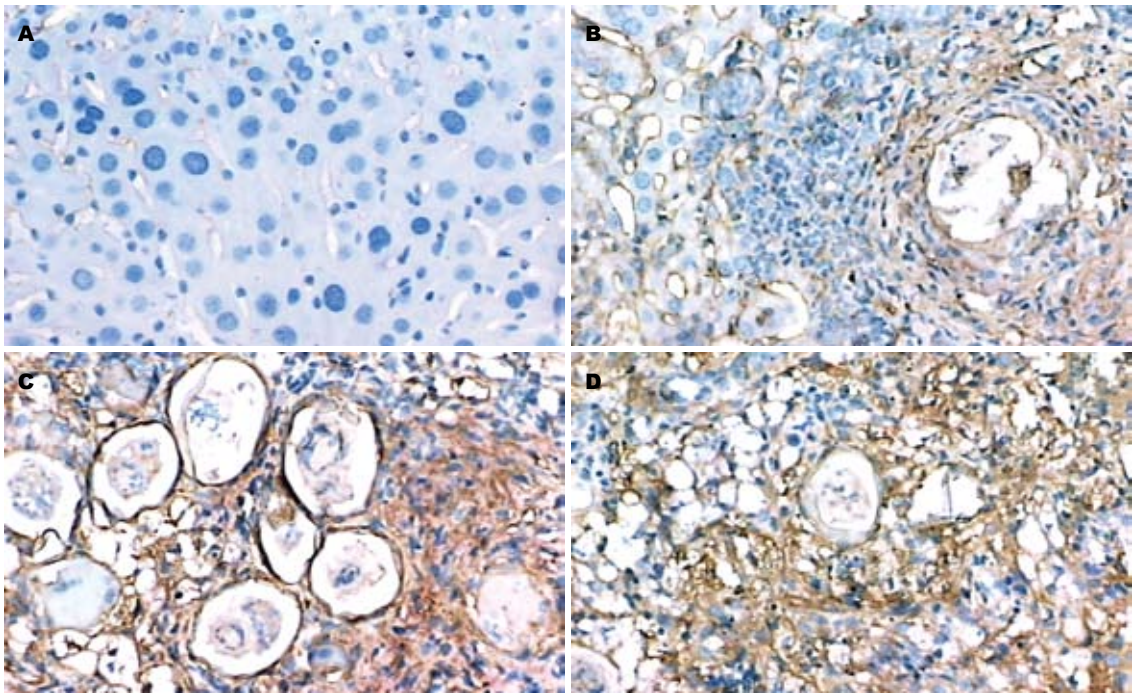


图 4 各组小鼠肝组织中Ⅰ型胶原的表达(SABC × 200). A: 正常组; B: 高剂量双环醇组; C: 低剂量双环醇组; D: 实验对照组.

其中肝内间质胶原酶主要降解Ⅰ、Ⅲ型胶原，在阻止肝脏ECM过度沉积中起着主要作用[5]. 而MMPs活性可被特异性抑制物金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs)所抑制，对间质胶原酶活性起主要抑制作用的是TIMP1. 与活性间质胶原酶以1∶1浓度结合形成复合体，从而抑制其活性，促进ECM的沉积[6]. 肝损伤时HSC通过自分泌或旁分泌的方式产生大量的TGF-β1，炎症或损伤过程中释放的纤溶酶及其他蛋白酶可进一步增强其活性，并通过自身调节机制，产生更多的TGF-β1，形成逐级放大效应，导致TGF-β1的大量生成和激活[7]. TGF-β1在调控肝纤维化中发挥重要作用[8]. TGF-β1可显著抑制肝细胞再生，具有极强的促

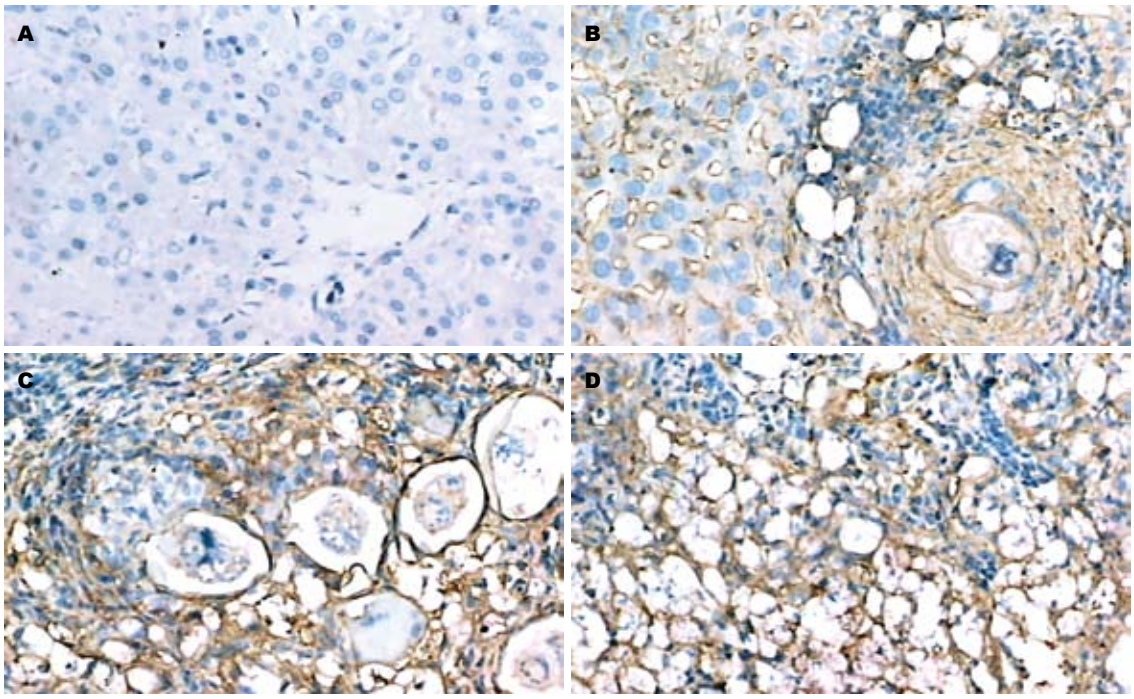


图 5 各组小鼠肝组织中Ⅲ型胶原的表达(SABC × 200). A: 正常组; B: 高剂量双环醇组; C: 低剂量双环醇组; D: 实验对照组.

表 3 各组小鼠肝组织中TGF-β1、TIMP1和Ⅰ、Ⅲ型胶原表达变化(n = 10, mean ± SD)

分组	TGF-β1	TIMP1	Ⅰ型胶原	Ⅲ型胶原
正常组	0.0621 ± 0.0036	0.0761 ± 0.0125	0.0902 ± 0.0031	0.0758 ± 0.0163
高剂量双环醇组	0.1815 ± 0.0231[bd]	0.2324 ± 0.0536[ad]	0.1811 ± 0.0514[bd]	0.1543 ± 0.0603[bd]
低剂量双环醇组	0.2042 ± 0.0522[df]	0.2593 ± 0.0631[de]	0.2087 ± 0.0628[de]	0.1786 ± 0.0634[de]
实验对照组	0.2139 ± 0.0134	0.2648 ± 0.0361	0.2140 ± 0.0271	0.1862 ± 0.0217

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 实验对照组; [d]P<0.01 *vs* 正常组; [e]P<0.05, [f]P<0.01 *vs* 高剂量双环醇组.

进HSC有丝分裂、促进胶原纤维生成作用. 此外TGF-β1还可减少细胞外基质分解, 其机制包括促进HSC分泌TIMP1, 减少间质胶原酶基因的表达[9]. 因此TGF-β1、TIMP1过度表达是ECM生成与降解过程失衡的两个中心环节.

c-fos、*c-jun*基因表达产物分别为Fos蛋白、Jun蛋白. Fos和Jun家族为核内两类重要的转录因子. *fos*在细胞生长的静止期基本不表达, 而*jun*基因家族即使在稳定期也有一定程度的表达. Jun蛋白可形成同源二聚体或与Fos蛋白形成异二聚体构成AP-1, 而Fos蛋白只能与Jun蛋白形成异二聚体构成AP-1. Fos蛋白与Jun蛋白C末段活化区的磷酸化使AP-1具有转录因子活性, 刺激核内其他细胞与增殖有关基因的转录. 各种炎性细胞因子、脂质过氧化物等均能通过细胞内信号传导途径激活早期反应基因*c-fos*和*c-jun*[10], 其表达产物形成同源或异源二聚体的转录激活蛋白(AP-1). TGFβ1基因启动子区域存在AP-1结合位点. *c-fos*及*c-jun*基因表达上调后, AP-1DNA结合活性增高, 可加速HSC中TGFβ1的转录及翻译, 从而增加ECM的合成[11]. TIMP1基因启动子必须与AP-1结合后才能充分活化, 从而启动TIMP1基因转录、翻译出大量TIMP1蛋白[12], 抑制胶原酶活性, 造成ECM合成与降解失衡. 本研究显示, 实验对照组小鼠肝组织*c-fos*及*c-jun* mRNA、TGF-β1、TIMP1的表达明显增强, 经高剂量双环醇治疗后其表达水平随Ⅰ、Ⅲ型胶原含量降低而明显下降. 由于双环醇具有抗炎、抗氧化作用[13], 因而推测其可通过调节*c-fos*与*c-jun*的表达、抑制其AP-1DNA结合活性而减轻TGF-β1、TIMP1的过度表达, 从而抑制胶原合成, 促进其降解而发挥抗肝纤维化作用.

国内外肝病学者普遍认为, 早期肝纤维化是可以逆转的, 而肝硬化是不可逆转的[14]. 目前认为肝窦毛细血管化是肝纤维化的最基本、最

初始特征. 研究发现, 日本血吸虫尾蚴感染8 wk后, 慢性虫卵肉芽肿形成, 肝窦出现毛细血管化, 而此时尚处于血吸虫肝纤维化病变的早期[15]. 对血吸虫肝纤维化开始形成的患者若早期应用抗纤维化治疗, 可能有利于肝纤维化的逆转. 本研究以日本血吸虫尾蚴感染小鼠8 wk后建立肝纤维化病变早期模型, 应用不同剂量的双环醇治疗血吸虫性肝纤维化. 研究发现, 经高剂量双环醇治疗后肝脏病理损伤减轻, 肝组织中纤维化程度比实验对照组明显下降, 但与正常组水平仍差异明显, 表明高剂量双环醇对血吸虫肝纤维化有较好的逆转作用, 但仍未恢复正常. 而低剂量双环醇抗肝纤维化的效果则不明显, 提示其抗肝纤维化效应呈剂量依赖性, 早期、大剂量、长疗程应用时有较好的抗肝纤维化效果.

长期以来, 血吸虫患者经吡喹酮一次性杀虫治疗后并无其他后续治疗. 乌文琳 *et al*[16]经长期调查发现, 吡喹酮治疗后, 血吸虫虫卵所致的肝纤维化仍可继续发展, 其远期抗肝纤维化效果有限, 抗肝纤维化的药物治疗很有必要. 我们认为, 大剂量双环醇可降低血吸虫病肝纤维化组织中TGF-β1、TIMP1的表达而发挥抗血吸虫病肝纤维化作用, 具有作用早、疗效持久、毒副作用小的优势, 可作为杀虫治疗后抗肝纤维化药物使用. 待其作用机制进一步明确后, 临床应用价值会更大.

4 参考文献

1 Li M, Liu GT. Inhibition of Fas/FasL mRNA expression and TNF-alpha release in concanavalin A-induced liver injury in mice by bicyclol. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1775-1779

2 施光峰, 徐肇, 翁心华, 朱运松. 血吸虫病肝纤维化过程中肝脏前胶原mRNA的表达变化研究. 中华传染病杂志 1999; 17: 3

3 Liu GT. The anti-virus and hepatoprotective effect of bicyclol and its mechanism of action. *Chin J New Drug Clin* 2001; 10: 325-327

4 李烨, 李燕, 刘耕陶. 双环醇对实验性肝纤维化的防护作用及分子机制. 中华医学杂志 2004; 84: 2096-2101

5 Watanabe T, Niioka M, Hozawa S, Kameyama K, Hayashi T, Arai M, Ishikawa A, Maruyama K, Okazaki I. Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *J Hepatol* 2000; 33: 224-235

6 Cheng ML, Wu J, Wang HQ, Xue LM, Tan YZ, Ping L, Li CX, Huang NH, Yao YM, Ren LZ, Ye L, Li L, Jia ML. Effect of Maotai liquor in inducing metallothioneins and on hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 520-523

7 Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000; 31: 1094-1106

8 Ueno H, Sakamoto T, Nakamura T, Qi Z, Astuchi N, Takeshita A, Shimizu K, Ohashi H. A soluble transforming growth factor beta receptor expressed in muscle prevents liver fibrogenesis and dysfunction in rats. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 33-42

9 Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Bechstein WO, Neuhaus P, Gressner AM, Schuppan D. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 1997; 150: 1647-1659

10 Tong L, Toliver-Kinsky T, Rassin D, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JR. Hyperoxia increases AP-1 DNA binding in rat brain. *Neurochem Res* 2003; 28: 111-115

11 Wang XD. Chronic alcohol intake interferes with retinoid metabolism and signaling. *Nutr Rev* 1999; 57: 51-59

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

13 Zhao DM, Sun T, Li Y. The protective effect of bicyclol on ischemia-reperfusion induced kidney injury in rats. *Yao Xue Xue Bao* 2002; 37: 412-414

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

15 王雪莉, 张玲敏, 唐福星, 郭祖文, 吴春云, 熊钟瑾. 小鼠血吸虫病肝纤维化的超微结构动态观察. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志 2002; 20: 216-219

16 乌文琳, 周学章, 黄育英, 邵平阳, 杨易平, 徐晓菲. 吡喹酮治疗日本血吸虫病远期疗效分析. 中华传染病杂志 2004; 22: 238-241

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3685-3689
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

5–脂氧合酶抑制TNF–α诱导的胰腺癌细胞凋亡

丁晓凌, 周国雄, 黄介飞

丁晓凌, 周国雄, 黄介飞, 南通大学附属医院消化内科 江苏省南通市 226001
丁晓凌, 2006年南通大学医学硕士研究生毕业, 讲师, 主治医师, 主要从事胰腺癌诊断和治疗研究.
江苏省自然科学基金资助项目, No. BK2004049
通讯作者: 周国雄, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院消化内科. guoxiong_zhou@163.com
收稿日期: 2007–06–16 修回日期: 2007–10–23

5-lipoxygenase suppresses TNF-α-induced apoptosis in pancreatic tumor cell lines

Xiao-Ling Ding, Guo-Xiong Zhou, Jie-Fei Huang

Xiao-Ling Ding, Guo-Xiong Zhou, Jie-Fei Huang, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nangtong 226001, Jiangsu Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK2004049
Correspondence to: Guo-Xiong Zhou, Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Nantong University, 20 Xisi Roud, Nantong 226001, Jiangsu Province, China. guoxiong_zhou@163.com
Received: 2007-06-16 Revised: 2007-10-23

Abstract

AIM: To investigate the effects of 5-lipoxygenase and LTB4 on the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells *in vitro*.

METHODS: The human pancreatic cancer cell lines ASPC-1, PANC-1 and SW1990 were cultured and the levels of 5-LOX and the supernatant product LTB4 were examined by Western blot and ELISA. TNF-α-induced cell apoptosis was analyzed by annexin V/PI double staining with flow cytometry. 5-LOX cDNA stably transfected SW1990 cell lines were established and treated with TNF-α. Their sensitivity to apoptosis induction was examined.

RESULTS: The pancreatic cell lines tested in this study all expressed substitute levels of 5-LOX and LTB4. The percentages of apoptotic wild-type SW1990 cells were 25.4% ± 3.65% and 43.5% ± 5.23% after 12 h and 24 h treatment with 20 μg/L TNF-α, respectively. However, these effects were significantly decreased ($P < 0.01$) in 5-LOX over-expressing cells. The percentages of these cells undergoing apoptosis were 13.2% ± 2.01% and 21.7% ± 3.65% after 12 h and 24 h treatment, respectively. Furthermore, the addition of exogenous LTB4 (10 nmol/L) significantly suppressed the percentage of wild-type cells undergoing apoptosis from 47.6% ± 5.32% to 18.5% ± 5.69%. Blocking LTB4 signals with specific receptor antagonists reversed the sensitivity of 5-LOX transfected cells to apoptosis.

CONCLUSION: High levels of expression of 5-LOX and LTB4 make pancreatic cell lines more resistant to TNF-α-induced apoptosis, suggesting that the 5-LOX pathway plays an important role in the pathogenesis of pancreatic cancer.

Key Words: Pancreatic tumor; 5-lipoxygenase; TNF-α; Apoptosis; Western blotting; RT-PCR

Ding XL, Zhou GX, Huang JF. 5-lipoxygenase suppresses TNF-α-induced apoptosis in pancreatic tumor cell lines. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3685-3689

摘要

目的: 检测胰腺癌细胞中5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)及其代谢产物的表达情况, 分析高表达5-LOX及LTB4对胰腺癌细胞生长凋亡的影响.

方法: 体外培养人胰腺癌细胞株ASPC-1, PANC-1和SW1990, 并构建5-LOX基因稳定转染细胞株. 用RT-PCR和Western blot检测细胞5-LOX mRNA和蛋白的表达, ELISA检测细胞培养上清中LTB4的含量, 采用流式细胞仪、Annexin V/PI双染法检测TNF-α诱导细胞的细胞凋亡.

结果: 三种胰腺癌细胞株均表达5-LOX mRNA和蛋白, 细胞上清中也都检测到一定量LTB4分泌. 5-LOX基因稳定转染细胞株表达5-LOX和LTB4的水平上升. TNF-α(20 μg/L)处理野生型SW1990细胞, 12和24 h后凋亡率分别为25.4%±3.65%和43.5%±5.23%, 但该效应在高表达5-LOX的细胞株中明显减弱, 分别为13.2%±2.01%和21.7%±3.65%. 在野生型SW1990细胞培养中加入外源性LTB4(10

■背景资料
有研究表明, 花生四烯酸(AA)代谢产物与肿瘤的病理形成和发展密切相关. 在胰腺癌的研究中观察到LOX代谢途径异常. 5-脂氧合酶(5-LOX)是催化AA转化成5-羟二十碳四烯酸(5-HETE)和白三烯(LTs)的关键酶.

■研发前沿
胰腺癌预后差, 早期诊断困难, 传统治疗效果不理想. 深入研究胰腺癌的发病机制对探索更有效的预防和治疗方法具有重要意义. 近年来, 5-LOX代谢途径与胰腺癌的关系受到关注.

nmol/L)能抑制TNF-α诱导的细胞凋亡, 野生型与处理组细胞24 h后凋亡率有显著性差异(47.6%±5.32% *vs* 18.5%±5.69%, $P<0.01$). 用LTB4受体阻断剂处理5-LOX高表达细胞株, 能恢复其对凋亡诱导的敏感性.

结论: 胰腺癌细胞均能表达5-LOX并产生LTB4, 高表达5-LOX能抑制TNF-α诱导的胰腺癌细胞凋亡.

关键词: 胰腺癌; 5-脂氧合酶; 肿瘤坏死因子-α; 凋亡; 免疫印迹法; 逆转录聚合酶链式反应

丁晓凌, 周国雄, 黄介飞. 5-脂氧合酶抑制TNF-α诱导的胰腺癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3685-3689
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3685.asp

0 引言

胰腺癌是常见的恶性肿瘤之一, 5年生存率小于2%[1-2]. 受胰腺解剖学和胰腺癌生物学特征等因素的影响, 胰腺癌容易侵犯周围组织器官并发生远处转移, 加之缺乏特异的临床表现和简便可靠的诊断方法, 早期诊断十分困难, 确诊时多已属晚期, 丧失了根治性手术的机会[3-4]. 因此, 深入探讨发病机制, 寻找新的诊治手段是当前胰腺癌研究的热点[5-11]. 流行病学资料和动物研究表明, 高脂饮食, 特别是花生四稀酸(arachidonic acid, AA)和亚油酸等多不饱和脂肪酸的摄入增加与胰腺癌关系密切[12-13]. 5-脂氧合酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)是催化AA转化为白三烯(leukotriene, LT)和5-羟基二十碳四烯酸(5-HETE)的关键酶[14]. 近年来有文献报道, 在胰腺癌组织中5-LOX基因表达上调[15-16]. 我们实验室前期的研究也在胰腺癌细胞株SW1990中检测到5-LOX mRNA和蛋白的表达[17]. 然而到目前为止, 5-LOX高表达究竟对胰腺癌细胞的生长有什么影响还不十分清楚. 我们发现, 多种胰腺癌细胞普遍能表达5-LOX蛋白, 而且无论是细胞内过表达5-LOX还是其代谢产物LTB4, 均能抑制胰腺癌细胞的凋亡. 该结果不仅初步揭示了5-LOX在胰腺癌病理形成中的作用, 而且提示, 抑制5-LOX代谢通路可能成为一个治疗胰腺癌的有效途径.

1 材料和方法

1.1 材料 人胰腺癌细胞株SW1990细胞由上海交通大学附属第一人民医院消化内科王兴鹏教授惠赠, 人胰腺癌细胞株ASPC-1购自上海中科院细胞库, 人胰腺癌细胞株PANC-1由上海市免疫学研究所周芸惠赠. 细胞在含100 mL/L胎牛血清的DMED培养液常规培养. 部分实验在细胞培养过程中加入不同浓度的LTB4(Cayman), 或加入选择性的LTB4受体1、2阻断剂U75302(1 μmol/L, Cayman)或/和LY255283(1 μmol/L, Cayman).

1.2 方法 细胞培养对数期加入TNF-α(20 μg/L, R&D)作用细胞12, 24 h, 收集细胞. 凋亡检测采用BD公司提供的ApoAlert Annexin-V kit. 2×10^5细胞用PBS洗1遍, 加入结合溶液200 μL悬浮细胞, 再加Annexin V 5 μL和PI 5 μL置于室温避光15 min, 上流式细胞仪检测, Annexin V阳性代表凋亡细胞. TRIzol提取总RNA, 逆转录定量PCR试剂盒购自TaKaRa公司, 按说明书操作. PCR扩增5-LOX采用的上游引物: 5'-TCATCGTGGACTTTGAGCTG-3', 下游引物: 5'-AGAAGGTGGGTGATGGTCTG-3'. 从SW1990细胞克隆5-LOX cDNA, 合成上游引物: 5'-CGCCATGCCCTCCTACACGGTCAC-3'和下游引物: 5'- CTGCTCGAGTGCTCAGATGGCCACACTGTT- 3'. 下游引物含*Xho* Ⅰ内切酶识别位点. PCR条件: 94℃ 4 min, 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 4 min, 28个循环后72℃ 10 min中止. 将5-LOX基因克隆到pGEMT-easy(Promega)载体中, 测序确认, 用*Eco*R和*Xho* Ⅰ双酶切, 将5-LOX cDNA插入表达质粒pcDNA3.1中(pcDNA3.1/5-LOX), 细胞转染用FuGENE 6转染试剂(Roche), 同时设pcDNA3.1空质粒转染组. 用1 g/L G418(Calbiochem)筛选稳定转染的细胞株, 并以0.5 g/L G418维持培养. ELISA检测LTB4含量, 试剂盒购自R&D公司, 按说明书操作. 提取总蛋白, 100 g/L聚丙烯酰胺凝胶, 含50 g/L脱脂奶粉TBS封闭, 1∶1000加入抗5-LOX一抗(Cayman), 4℃过夜, 1∶5000加入HRP标记二抗, 作用2 h, 曝光洗片.

统计学处理 采用STATA 7.0统计软件分析, 两组计量资料用*t*检验. 多组计量资料用单因素方差分析. $P<0.05$为显著性判断水准.

2 结果

2.1 胰腺癌细胞中5-LOX及其产物LTB4的表达 我们在ASPC-1, PANC-1和SW1990三种胰腺癌细胞株中均检测到5-LOX mRNA和蛋白的表达(图1). 5-LOX在3种细胞中表达水平无显著差异. 此外, LTB4是5-LOX代谢途径的主要产物. 我们收集对数生长期细胞上清, ELISA检测到3种细

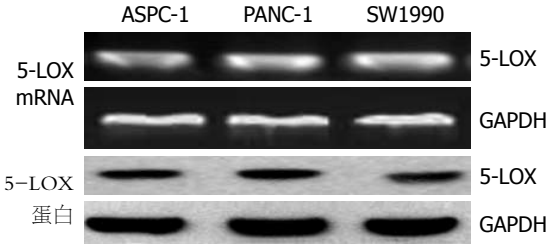


图 1 胰腺癌细胞中5-LOX表达.

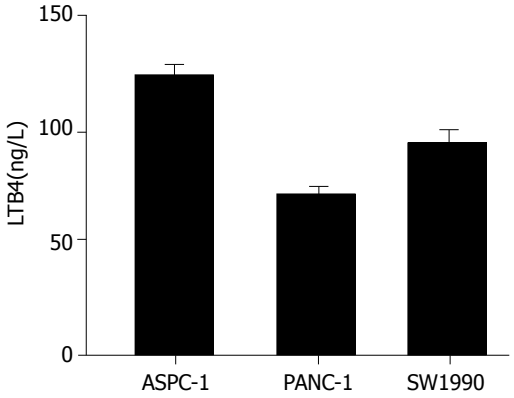


图 2 胰腺癌细胞培养上清中LTB4的表达.

胞都能分泌一定量的LTB4(图2).

2.2 构建高表达5-LOX的胰腺癌细胞株 选择SW1990细胞株, 通过筛选得到稳定转染5-LOX表达质粒的细胞株(SW1990/5-LOX). Western blot结果显示, 在稳定转染的细胞株中, 5-LOX表达量是野生型SW1990的4倍左右(图3A). ELISA分析结果显示, 与野生型SW1990细胞相比, SW1990/5-LOX分泌更高水平的LTB4(图3B).

2.3 高表达5-LOX抑制胰腺癌细胞对TNF-α诱导的细胞凋亡 20 μg/L TNF-α作用12和24 h, 能诱导一定数量的野生型SW1990细胞发生凋亡(图4). 然而, 高表达5-LOX的胰腺癌细胞在TNF-α处理后, Annexin V阳性细胞的百分比(凋亡率)明显减少, 24 h差异更明显. 与野生型细胞(Wt)相比, $P<0.01$(图5), 提示SW1990/5-LOX抵抗TNF-α诱导的凋亡能力增强.

2.4 高水平的LTB4与SW1990/5-LOX细胞凋亡抵抗有关 在野生型SW1990细胞培养体系中加入不同浓度的LTB4, 结果发现, 10 nmol/L LTB4就可以使细胞对TNF-α的杀伤产生明显的抵抗作用($P<0.01$, 图6, Wt+LTB4). 在诱导细胞凋亡前用选择性的LTB4受体1、2阻断剂U75302或/和LY255283对SW1990/5-LOX细胞预处理30 min, 发现能增强细胞对TNF-α的敏感性(图6, $P<0.05$). 其中单独处理时, 发挥主要作用的

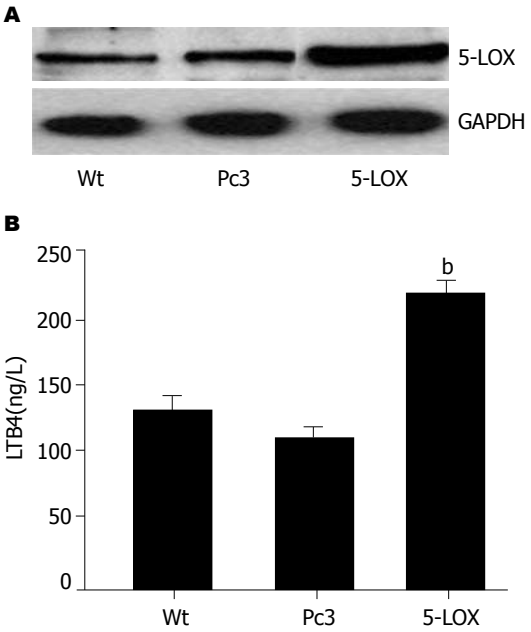


图 3 稳定转染的SW1990细胞表达5-LOX和LTB4的情况. A: SW1990细胞5-LOX蛋白表达; B: LTB4表达. $^bP<0.01$, q = 6.53 *vs* Wt组.

是U75302, 凋亡率恢复到接近野生型细胞的水平. 联合使用U75302和LY255283获得更强的效果, 凋亡率甚至超过野生型细胞的水平($P<0.05$), 说明, 高水平的LTB4与SW1990/5-LOX细胞凋亡抵抗有直接的关系.

3 讨论

近年来大量资料表明, AA代谢产物与肿瘤的病理形成与发展密切相关[18-21]. 在胰腺癌及其癌早期病变中均能检测到5-LOX表达上调[15]. 人胰腺癌组织免疫组化研究也证实, 5-LOX表达上调, 但在正常胰导管细胞中不表达5-LOX, 胰导管细胞分化越好, 5-LOX蛋白的表达越强. 此外, 5-LOX下游主要产物LTB4也在胰腺癌组织, 而不是正常导管细胞中有高水平表达[16]. 我们分析多种胰腺癌细胞系, 证实这些细胞均能表达5-LOX mRNA, 蛋白以及5-LOX主要下游代谢产物LTB4. 我们还发现, 5-LOX高表达能明显抑制TNF-α诱导的胰腺癌细胞凋亡, 而且这种对凋亡的抵抗性可能与细胞分泌LTB4水平增加有关. 体内TNF-α多由杀伤性T细胞分泌, 是机体抗肿瘤免疫的重要因子[22], 由此我们推测, 高表达5-LOX对胰腺癌可能的作用之一是能降低机体免疫系统对肿瘤的攻击效率, 从而促进肿瘤的生长. 此外, 临床上胰腺癌患者常常表现为对多种化疗药物不敏感[23]. 许多化疗药物是通过诱导肿瘤细胞凋亡来发挥作用的. 那么是否除了

■相关报道

据报道, 在胰腺癌中检测到5-LOX mRNA 和蛋白表达上调, 5-LOX下游主要产物LTB4也在胰腺癌中有高水平表达, 进一步提示5-LOX在胰腺癌病理机制中可能具有关键地位.

■**创新盘点**
目前国内外关于5-LOX在胰腺癌中异常表达的报道较多，而关于5-LOX代谢通路对肿瘤细胞的增殖或凋亡的影响还不十分清楚. 本文通过高表达5-LOX的胰腺癌细胞株，体外研究5-LOX及主要代谢产物LTB4对TNF-α诱导的细胞凋亡的影响.

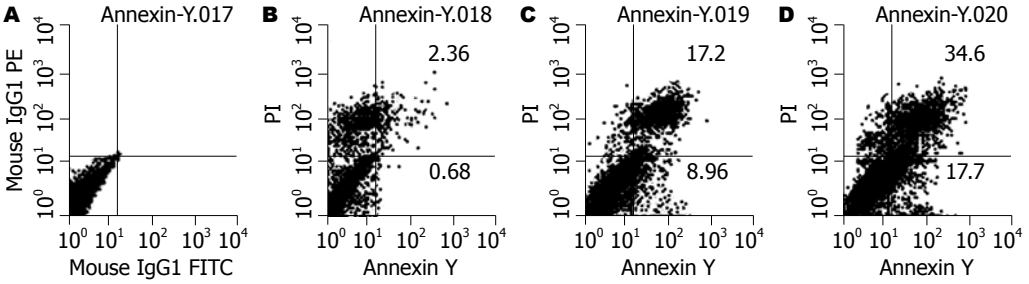


图 4 20 μg/L TNF-α诱导SW1990细胞凋亡(Annexin V阳性凋亡细胞百分比). A: 同型对照; B: 0 h; C: 12 h; D: 24 h.

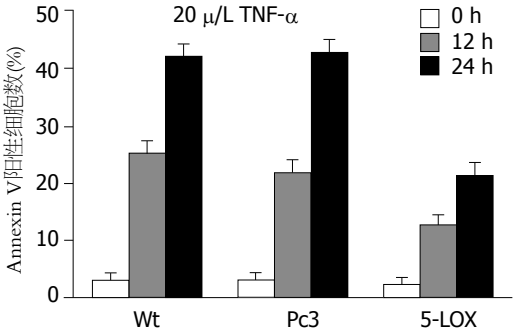


图 5 高表达5-LOX抑制胰腺癌细胞对TNF-α诱导的细胞凋亡.

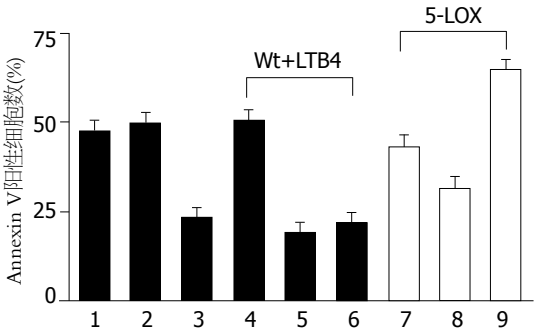


图 6 LTB4信号与SW1990细胞凋亡抵抗有关. 1: Wt; 2: Pc3; 3: 5-LOX; 4: 1 nmol/L; 5: 10 nmol/L; 6: 100 nmol/L; 7: U75302; 8: LY255283; 9: U75302+LY255283.

TNF-α以外，高表达5-LOX还能抑制其他因子，包括常用的化疗药物诱导的细胞凋亡还有待进一步体内外实验来证实.

在胰腺癌中，过度激活的LOX代谢通路使其成为令人注目的潜在治疗靶点[24]. 我们曾报道，5-LOX特异性抑制剂齐留通可显著抑制胰腺癌细胞增殖[25]，进一步说明，5-LOX在胰腺癌病理机制中可能具有关键地位. 齐留通主要通过抑制5-LOX活性而阻断AA转化过程，包括LTB4的产生. 我们研究发现，如果在野生型胰腺癌细胞培养过程中加入外源性LTB4，能明显抑制TNF-α诱导的细胞凋亡. 其次，高表达5-LOX的胰腺癌细胞(SW1990/5-LOX)在经过LTB4受体阻断剂作用后，对凋亡诱导的敏感性恢复到接近正常细胞水平. 最后，我们观察到，高表达5-LOX的胰腺癌细胞(SW1990/5-LOX)分泌LTB4也增加. 总的看来，虽然LTB4如何在体内外影响胰腺癌细胞凋亡的分子机制尚不清楚，但这些结果充分提示我们，LTB4可能是5-LOX发挥抗凋亡作用的直接因素，而抑制LTB4介导的信号可能具有抗胰腺癌的治疗作用.

抑制LTB4的手段之一是应用特异性或非特异性5-LOX抑制剂，包括齐留通. 他们能通过抑制5-LOX的酶活性来减少LTB4产生. 目前具有代表性的5-LOX抑制剂大约有20余个，有些已用于哮喘的临床研究，未发现明显的不良反应[26]. 第二种方法是直接阻断LTB4信号传导. 我们采用LTB4受体阻断剂有效增强了高表达5-LOX的胰腺癌细胞对凋亡诱导的敏感性. 他们以及其类似物是否能在体外和体内发挥抗胰腺癌的作用有待深入研究[27-28]. 最后，直接抑制胰腺癌细胞5-LOX基因表达水平也将是一种有效的策略，但关于细胞5-LOX基因表达调节方面的研究较少[29-30]. 我们曾报道，中药成分雷公藤内酯醇可以抑制胰腺癌细胞增殖，诱导细胞凋亡，其抗肿瘤活性与抑制细胞5-LOX基因表达和LTB4生成有关[31]. 总之，检验单独或协同使用这些手段对肿瘤细胞5-LOX代谢通路和生长、凋亡的影响，可能为胰腺癌的临床治疗提供更多的证据.

4 参考文献

1 Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, Ward E, Thun MJ. Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 2003; 53: 5-26
2 Howard TJ. Pancreatic adenocarcinoma. *Curr Probl Cancer* 1996; 20: 281-328
3 郭晓钟. 重视我国胰腺癌的研究现状及发展趋势. 世界华人消化杂志 2006; 14: 3161-3162
4 Mangray S, King TC. Molecular pathobiology of pancreatic adenocarcinoma. *Front Biosci* 1998; 3: D1148-1160
5 Van Cutsem E, Aerts R, Haustermans K, Topal B, Van Steenbergen W, Verslype C. Systemic treatment of pancreatic cancer. *Eur J Gastroenterol*

Hepatol 2004; 16: 265-274
6 Ducreux M, Boige V, Malka D. Emerging drugs in pancreatic cancer. *Expert Opin Emerg Drugs* 2004; 9: 73-89
7 Ducreux M, Boige V, Malka D. Treatment of advanced pancreatic cancer. *Semin Oncol* 2007; 34: S25-30
8 Welsch T, Kleeff J, Friess H. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer: advances and challenges. *Curr Mol Med* 2007; 7: 504-521
9 Canto MI. Strategies for screening for pancreatic adenocarcinoma in high-risk patients. *Semin Oncol* 2007; 34: 295-302
10 Farrell JJ, van Rijnsoever M, Elsaleh H. Early detection markers in Pancreas Cancer. *Cancer Biomark* 2005; 1: 157-175
11 Goggins M. Identifying molecular markers for the early detection of pancreatic neoplasia. *Semin Oncol* 2007; 34: 303-310
12 Heukamp I, Kilian M, Gregor JI, Kiewert C, Schimke I, Kristiansen G, Walz MK, Jacobi CA, Wenger FA. Impact of polyunsaturated fatty acids on hepato-pancreatic prostaglandin and leukotriene concentration in ductal pancreatic cancer -- is there a correlation to tumour growth and liver metastasis? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006; 74: 223-233
13 陆星华, 王丽, 李辉, 钱家鸣, 邓瑞雪, 周璐. 胰腺癌相关危险因素研究及高危评分模型的建立. 中华消化杂志 2005; 25: 515-520
14 Dixon RA, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, Gillard JW, Miller DK. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* 1990; 343: 282-284
15 Hennig R, Ding XZ, Tong WG, Schneider MB, Standop J, Friess H, Buchler MW, Pour PM, Adrian TE. 5-Lipoxygenase and leukotriene B(4) receptor are expressed in human pancreatic cancers but not in pancreatic ducts in normal tissue. *Am J Pathol* 2002; 161: 421-428
16 Ding XZ, Iversen P, Cluck MW, Knezetic JA, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 261: 218-223
17 吴深宝, 周国雄, 张弘, 黄介飞, 魏群, 徐岷, 鄂群, 成建萍. 胰腺癌细胞中5-脂氧合酶mRNA和蛋白的表达. 胰腺病学 2005; 5: 238-239
18 李勇, 李建英, 王小众. 5-脂氧合酶促癌机制研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 800-804
19 周超, 马洪升. 环氧化酶-2与食管癌. 世界华人消化杂志 2005; 13: 766-768
20 Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Sakamoto K, Bostwick DG, Mukhtar H. Lipoxygenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma. *Cancer* 2001; 91: 737-743
21 Chen X, Wang S, Wu N, Sood S, Wang P, Jin Z, Beer DG, Giordano TJ, Lin Y, Shih WC, Lubet RA, Yang CS. Overexpression of 5-lipoxygenase in rat and human esophageal adenocarcinoma and inhibitory effects of zileuton and celecoxib on carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6703-6709
22 van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist* 2006; 11: 397-408
23 Boeck S, Hinke A, Wilkowski R, Heinemann V. Importance of performance status for treatment outcome in advanced pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 224-227
24 Hennig R, Grippo P, Ding XZ, Rao SM, Buchler MW, Friess H, Talamonti MS, Bell RH, Adrian TE. 5-Lipoxygenase, a marker for early pancreatic intraepithelial neoplastic lesions. *Cancer Res* 2005; 65: 6011-6016
25 周国雄, 吴深宝, 黄介飞, 张弘, 魏群, 鄂群. 5-脂氧合酶特异性抑制剂对胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响. 中华消化杂志 2005; 25: 689-691
26 Chen X, Sood S, Yang CS, Li N, Sun Z. Five-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in carcino-genesis and cancer chemoprevention. *Curr Cancer Drug Targets* 2006; 6: 613-622
27 Ihara A, Wada K, Yoneda M, Fujisawa N, Takahashi H, Nakajima A. Blockade of leukotriene B4 signaling pathway induces apoptosis and suppresses cell proliferation in colon cancer. *J Pharmacol Sci* 2007; 103: 24-32
28 Hennig R, Ventura J, Segersvard R, Ward E, Ding XZ, Rao SM, Jovanovic BD, Iwamura T, Talamonti MS, Bell RH Jr, Adrian TE. LY293111 improves efficacy of gemcitabine therapy on pancreatic cancer in a fluorescent orthotopic model in athymic mice. *Neoplasia* 2005; 7: 417-425
29 Brungs M, Radmark O, Samuelsson B, Steinhilber D. On the induction of 5-lipoxygenase expression and activity in HL-60 cells: effects of vitamin D3, retinoic acid, DMSO and TGF beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 1572-1580
30 Brungs M, Radmark O, Samuelsson B, Steinhilber D. Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 107-111
31 Zhou GX, Ding XL, Huang JF, Zhang H, Wu SB. Suppression of 5-lipoxygenase gene is involved in triptolide-induced apoptosis in pancreatic tumor cell lines. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1770: 1021-1027

■名词解释
LOXs: 一组具有加氧酶和过氧化氢酶双重活性的同功酶, 根据其作用底物位置特异性分别命名为5-, 8-, 12-, 15-LOX. AA经过这四个酶的催化形成5-, 8-, 12-, 15-羟基花生四烯酸, 并进一步转化成LTs.

■同行评价
本文设计合理, 实验方法先进, 技术路线可行, 内容丰富, 具有一定的参考价值.

编辑 何燕 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3690-3696
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

急性胰腺炎大鼠肺组织与肺泡巨噬细胞早期生长反应基因-1的表达

邹 树, 田伏洲, 汤礼军, 黎冬暄, 汪 涛, 石 力

■背景资料
SAP的发病机制一直是研究热点, 而其从"局部炎症"播散成为"全身炎症"是其显著病理生理特征之一. 激活的单核巨噬细胞所产生的炎性细胞因子如TNF-α及IL-1β在急性胰腺炎的发病过程中具有非常重要的作用. EGR-1作为一种核转录因子通过与靶基因启动子或增强子EGR-1结合位点结合而实现对靶基因的表达调控.

邹树, 田伏洲, 汤礼军, 黎冬暄, 汪涛, 石力, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心 四川省成都市 610083
邹树, 博士, 主治医师, 主要从事胰腺与胆道疾病研究.
通讯作者: 田伏洲, 610083, 四川省成都市, 中国人民解放军成都军区总医院全军普通外科中心. tfz30061@yahoo.com.cn
电话: 028-86570351 传真: 0411-83631284
收稿日期: 2007-07-09 修回日期: 2007-10-18

Early growth response factor 1 expression in rat lungs and alveolar macrophages during acute pancreatitis

Shu Zou, Fu-Zhou Tian, Li-Jun Tang, Dong-Xuan Li, Tao Wang, Li Shi

Shu Zou, Fu-Zhou Tian, Li-Jun Tang, Dong-Xuan Li, Tao Wang, Li Shi, Department of General Surgery Center, General Hospital of Chengdu Command of Chinese PLA, Chengdu 610083, Sichuan Province, China
Correspondence to: Professor Fu-Zhou Tian, Department of General Surgery Center, General Hospital of Chengdu Command of Chinese PLA, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. tfz30061@yahoo.com.cn
Received: 2007-07-09 Revised: 2007-10-18

Abstract

AIM: To investigate the possible role of early growth response factor 1 (EGR-1) in a rat model of lung injury complicated by taurocholate sodium-induced acute pancreatitis.

METHODS: Forty male Wistar rats were randomly divided into four groups. Normal saline was injected into the common bile duct (CBD) of rats in group A, and taurocholate sodium was injected into the CBD of rats in groups B, C and D. Three hours after injection, all animals were sacrificed, and blood, pancreas and lungs were harvested. Serum levels of tumor necrosis factor (TNF)-α and interleukin (IL)-1β were measured. Pathological scoring of the pancreas was analyzed, and the pulmonary wet to dry weight ratio was measured. Immunohistochemical staining of EGR-1 on lung paraffin sections was observed and assayed semi-quantitatively. Immunocytochemical staining of EGR-1 of AMs was observed and assayed semi-quantitatively, and the concentration of TNF-α and IL-1β in culture fluid was measured. AMs were divided into four groups and treated with elastase as above. EGR-1, TNF-α and IL-1β mRNA expressions were assessed using RT-PCR.

RESULTS: Pulmonary positive staining of EGR-1 was more intense in the model of severe acute pancreatitis. Furthermore, EGR-1 staining differed among acute pancreatitis models with different severities. EGR-1 expressed in lungs correlated with the parameters that demonstrated pancreatitis severity and pulmonary injury: pathological scoring of pancreatitis (r = 0.59), pulmonary wet to dry weight ratio (r = 0.61), and serum TNF-α (r = 0.63) and IL-1β (r = 0.58). EGR-1 protein and mRNA expressed in AMs were correlated with the TNF-α and IL-1β protein (r = 0.64, 0.51, P < 0.01) and mRNA levels (r = 0.62, 0.59, P < 0.01), and were partly dependent on the ERK 1/2 pathway.

CONCLUSION: EGR-1 may play an important role in lung injury during acute pancreatitis, and the possible mechanism relates to its mediation of production of inflammatory cytokines.

Key Words: Acute pancreatitis; Early growth response factor 1; Lung injury; Elastase; Alveolar macrophage; Extracellular signal-regulated kinase; Real time-polymerase chain reaction

Zou S, Tian FZ, Tang LJ, Li DX, Wang T, Shi L. Early growth response factor 1 expression in rat lungs and alveolar macrophages during acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3690-3696

摘要

目的: 研究观察早期生长反应基因-1(EGR-1)在急性胰腺炎(AP)大鼠肺组织与原代培养肺泡巨噬细胞(AM)中表达的作用.

方法: 将♂Wistar大鼠40只, 随机均分为4组, 分别于胆总管内逆行注入生理盐水或不同浓度牛磺胆酸钠溶液. 3 h后处死动物, 取血分离

血清, 并剪取胰腺及肺组织. 检测血清TNF-α和IL-1β水平, 胰腺组织病理评分, 肺组织湿质量/干质量比, 并对肺组织进行EGR-1免疫组化染色. 原代培养AM分成4组, 分别采用不同浓度胰弹性蛋白酶进行刺激, 免疫细胞化学染色法检测EGR-1在AM的表达, 并检测培养液中TNF-α和IL-1β浓度. RT-PCR分别检测AM, EGR-1, TNF-α, IL-1β mRNA表达.

结果: 肺组织EGR-1表达随AP病情加重而呈增强趋势, 并与血清TNF-α和IL-1β水平、胰腺组织病理评分、肺组织湿质量/干质量比均呈显著正相关(r = 0.63, 0.58, 0.59, 0.61, P<0.01) AM中EGR-1蛋白. mRNA表达程度与TNF-α和IL-1β蛋白(r = 0.64、0.51, P<0.01)以及mRNA水平均呈显著正相关(r = 0.62, 0.59, P<0.01).

结论: EGR-1可能在AP并发肺损伤中起重要作用, 其机制可能与其介导炎性细胞因子生成有关.

关键词: 急性胰腺炎; 早期生长反应基因-1; 肺损伤; 弹性蛋白酶; 肺泡巨噬细胞; 细胞外信号调节激酶; 逆转录聚合酶链反应

邹树, 田伏洲, 汤礼军, 黎冬暄, 汪涛, 石力. 急性胰腺炎大鼠肺组织与肺泡巨噬细胞早期生长反应基因-1的表达. 世界华人消化杂志. 2007; 15(35): 3690-3696
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3690.asp

0 引言

肺损伤是急性胰腺炎(acute pancreatiits, AP)尤其是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)最常发生的胰外器官并发症[1-4]. 临床上50%-70%急性胰腺炎患者有肺损害的表现[5]. 在SAP中约30%-50%合并有肺损伤或急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS), 是AP引起死亡的重要原因之一. 目前认为单核巨噬细胞系统异常激活是引起AP肺损伤的主要原因之一[3,6]. 我们观察早期生长反应基因-1(early growth response factor 1, EGR-1)在AP大鼠肺组织中的表达, 在原代培养肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)中的表达以及与TNF-α和IL-1β水平的关系, 探讨EGR-1在AP肺损伤中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂SPF级Wistar大鼠, 体质量230-250 g, 购自第三军医大学实验动物中心, 牛磺胆酸钠、胰弹力蛋白酶(elastase)、PD98059购自Sigma公司, 兔抗大鼠EGR-1多克隆抗体购自Santa Cruz公司, AMV Reverse Transcriptase购自Promega公司, Taq DNA Polymerase购自大连TaKaRa公司, 大鼠TNF-α及IL-1β ELISA试剂盒购自晶美公司, DMEM培养液购自Gibco公司. S-P试剂盒购自北京中山公司.

1.2 方法

1.2.1 在体实验: ♂Wistar大鼠40只, 利用随机数字表将其随机均分为A, B, C, D 4组. 参考文献[7]制造AP动物模型, 分别于胆管内逆行注射生理盐水, 10 g/L、30 g/L和50 g/L牛磺胆酸钠溶液(1 mL/kg). 注射后3 h, 30 g/L戊巴比妥钠ip麻醉后剪开胸腔, 自主动脉先后灌注生理盐水及40 g/L中性甲醛后剪取肺与胰腺组织. 灌注前穿刺右心耳取血分离血清, ELISA法检测TNF-α及IL-1β. 测肺组织测湿质量/干质量比. 肺组织常规石蜡切片, 根据试剂说明书以Envision二步法检测EGR-1蛋白, 以图像分析软件Image pro plus 4.5进行半定量分析. 胰腺组织常规石蜡切片, HE染色, 根据文献[8]行病理评分.

1.2.2 体外实验: 采用在体支气管肺泡灌洗法分离AM[9]. 先将AM放在有24 mm×24 mm玻片的六孔板内培养12 h, 然后换液加入无血清培养液饥饿培养24 h, 2块六孔板即为一组. 具体分组及处理因素如下(elastase处理剂量参考文献[10]): Ⅰ组: AM+生理盐水(30 mL/L培养液), Ⅱ组: AM+elastase(0.5 kU/L培养液), Ⅲ组: AM+elastase(1 kU/L培养液), Ⅳ组: 预处理AM+elastase(1 kU/L 培养液). 其中Ⅳ组先以PD98059预处理2 h, 后均加入无血清DMEM培养液培养2 h, 根据试剂说明书以Envision二步法检测EGR-1蛋白. 取培养液以ELISA法检测TNF-α及IL-1β水平. 另同上法分离及培养AM, 分组及处理方法相同. 各目的基因引物序列、产物长度及退火温度见表1. PCR扩增条件: 94℃ 5 min, 加Taq酶1 μL(41.675 nkat), 94℃变性30 s, 58℃或57℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 共32个循环, 72℃温育10 min, 4℃结束反应. 10 g/L琼脂糖凝胶常规电泳, 以Doc Gel 2000图像分析系统分析，PCR产物量以吸光度值×面积表示. 各产物与相应内参的比值作为最终结果.

统计学处理 数据以mean±SD表示, 采用SPSS12.0软件进行方差分析及双变量相关分析, 以P<0.05为检验水准.

■创新盘点
本文通过观察EGR-1在AP大鼠肺组织及模拟AP刺激的肺泡巨噬细胞中的表达情况及与TNF-α和IL-1β的关系, 较深入地探讨了EGR-1在AP肺损害中的作用机制.

■相关报道
多项研究表明, 腹腔巨噬细胞和枯否细胞等TNF-α基因启动子上存在与EGR-1结合的特异序列, EGR-1与这一序列相结合参与调控这些细胞TNF-α的表达.

表 1 三种目的基因引物序列、产物长度及退火温度

Gene	GenBank No.	长度(bp)	引物序列(sense/antisense)	退火温度
EGR-1	NM_012551	549	CCCGTATGCTTGCCCTGTTGAGTC CCCGTTGAGGTGCTGAAGGAGTTG	58℃
TNF-α	X66539	316	CATGATCCGAGATGTGGAACTGGC CTGGCTCAGCCACTCCAGC	57℃
IL-1β	M98820	377	TTGTGGCTGTGGAGAAGCTG GCCGTCTTTCATCACACAG	58℃
β-actin	NM_031144	241	TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT CACGATGGAGGGGCCGGACTCATC	–

表 2 各组大鼠TNF-α和IL-1β水平的变化(mean ± SD, ng/L, n = 10)

分组	TNF-α	IL-1β
A	26.8 ± 11.0	25.4 ± 6.7
B	55.5 ± 18.7[a]	87.7 ± 25.1[a]
C	88.9 ± 31.9[a]	182.8 ± 49.3[a]
D	137.9 ± 48.6[b]	248.2 ± 54.7[b]

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* A组.

2 结果

2.1 大鼠胰腺病理评分及肺组织湿质量/干质量比 A、B、C、D 4组动物胰腺病理评分分别为1.41±0.38, 5.75±0.82, 7.17±1.13和8.67±0.68, 肺湿质量/干质量比分别为3.62±0.21, 3.77±0.32, 4.16±0.53和4.38±0.37. 这表明AP病情及肺损伤呈逐渐加重趋势.

2.2 大鼠血清TNF-α和IL-1β变化 B、C、D组血清TNF-α、IL-1β显著高于A组(P<0.05或0.01, 表2), 且亦呈逐渐升高趋势.

2.3 肺组织EGR-1蛋白表达 A组EGR-1仅仅在少量肺间质细胞的胞质中有微弱表达. B组可见EGR-1表达明显增强, 主要位于肺间质巨噬细胞(胞质为主, 少量胞核也有表达), 少量毛细血管内皮细胞及肺泡上皮细胞胞质内也有表达. C组显示大量肺间质巨噬细胞表达. D组示肺间质巨噬细胞强烈表达(胞核和胞质均有), 少量可见的肺泡巨噬细胞也有很强表达(图1). EGR-1半定量分析结果为40.3±11.4, 63.8±12.5, 78.2±12.3, 198.0±49.2. 将EGR-1表达结果与胰腺病理评分、肺组织湿质量/干质量比、TNF-α及IL-1β水平分别进行相关分析, 发现均呈显著正相关(r = 0.59, 0.61, 0.63, 0.58, P<0.01), 显示肺组织EGR-1表达程度与反映AP病情及肺损害指标之间有密切正相关.

2.4 AM中EGR-1表达与TNF-α和IL-1β水平 原代培养AM免疫细胞化学染色结果显示, 对照组(Ⅰ组)AM无EGR-1表达; Ⅱ组部分仅在胞质表达, 另有部分细胞胞核和胞质均有表达; Ⅲ组可见绝大部分细胞均有强烈表达, 大部分胞核和胞质均有表达. PD98059预处理组(Ⅳ组)与Ⅲ组相比, 表达明显减弱(图2). 经过图像分析, Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 4组AM表达EGR-1分别为46.8±8.7, 74.6±11.9, 159.2±28.7, 105.3±14.2. 统计学分析显示, Ⅲ组显著高于Ⅰ组及Ⅱ组(P<0.05及0.01), 而Ⅳ组较以同样浓度胰弹性蛋白酶刺激的Ⅲ组显著减弱(P<0.05). 将各组AM表达EGR-1结果与TNF-α及IL-1β水平(表3)分别进行相关分析, 发现均呈显著正相关(r = 0.64、0.51, P<0.01). RT-PCR结果显示(表3, 图3), Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 4组AM在分别以不同浓度胰弹力酶刺激或经PD98059预处理再以酶来刺激后, 其EGR-1, TNF-α与IL-1β mRNA变化趋势是完全一致的, 即随着胰弹力酶浓度的升高, 3种基因表达也上升. 而经PD98059预处理再以同样浓度胰弹力酶来刺激, Ⅳ组较Ⅲ组有显著下降. 对EGR-1 mRNA与TNF-α及IL-1β mRNA进行相关分析, 发现均呈显著正相关(r = 0.62, 0.59, P<0.01).

3 讨论

EGR-1是立早反应基因家族中最重要的一员, 是一种核转录因子, 与细胞增生、分化、凋亡及炎性反应密切相关. 他偶联细胞外刺激与细胞内信号转导, 介导多种下游致炎因子基因的表达[11-12]. EGR-1的活化成为许多炎症相关性疾病发生发展的重要环节. EGR-1作为一种核转录因子, 调控着30多种与细胞生长分化、细胞凋亡、炎性细胞趋化及免疫刺激有关的靶基因的表达, 有多种是与炎性反应有关的基因, 如血小板源性生长因子(platelet derived growth factor,

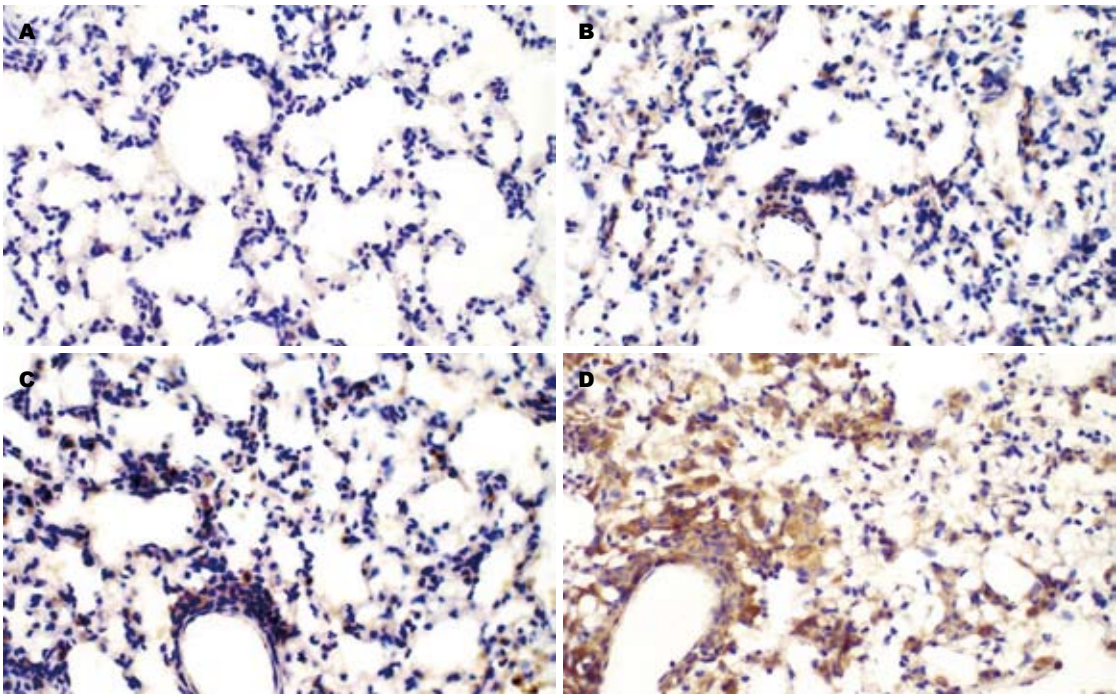


图 1 大鼠肺组织中EGR-1的表达(Envision二步法, ×100). A: 生理盐水胆管注射组; B: 10g/L牛磺胆酸钠溶液胆管注射组; C: 30g/L牛磺胆酸钠溶液胆管注射组; D: 50g/L牛磺胆酸钠溶液胆管注射组.

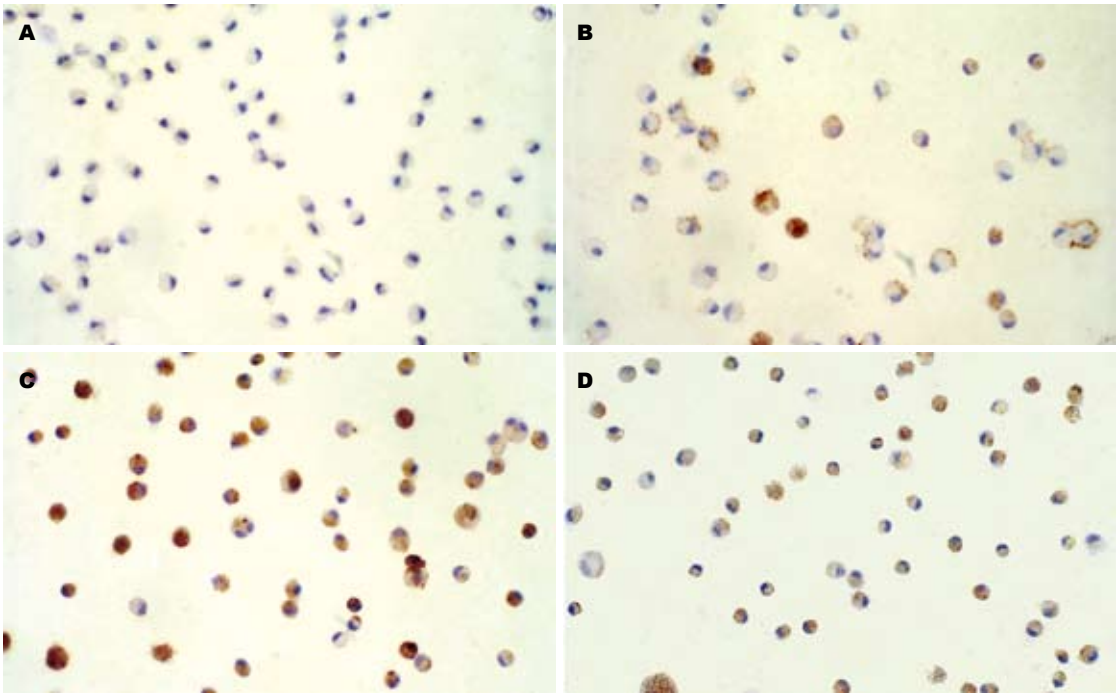


图 2 大鼠AM中EGR-1的表达(Envision二步法, ×100). A: Ⅰ组; B: Ⅱ组; C: Ⅲ组; D: Ⅳ组.

■应用要点

本实验研究肺组织和肺泡的早期生长反应因子-1的表达及其与急性胰腺炎的作用. 研究涉及目前较新的炎症介质和炎症反应过程, 对于了解重症急性胰腺炎的发病机制有较大意义.

PDGF)[13-14]、组织因子(tissue factor, TF)[15]、细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)[16]、纤维连接蛋白(FN)[17]、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)[18]、纤溶酶原激活剂抑制分子-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)[19]、转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)[20]、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)[21-22]等. 所有这些炎性相关基因均认为与急性胰腺炎有或多或少的关系. 众多炎性介质(主要是TNF-α, IL-1β, PAF等)在急性肺损伤中起重要作用. SAP时胰

■同行评价
本文书写规范, 内容新颖, 设计合理, 图片清晰, 结论可信, 对于了解重症急性胰腺炎的发病机制有较大意义.

表 3 大鼠AM炎性细胞因子水平及目的基因表达(mean ± SD, n = 12)

分组	细胞因子(ng/L)		目的基因		
	TNF-α	IL-1β	EGR-1	TNF-α	IL-1β
Ⅰ	19.5 ± 4.8	22.5 ± 8.3	0.22 ± 0.08	1.04 ± 0.22	0.29 ± 0.06
Ⅱ	53.8 ± 10.9[b]	156.1 ± 20.8[b]	0.73 ± 0.16[c]	2.55 ± 0.58[c]	0.84 ± 0.25[c]
Ⅲ	93.2 ± 17.6[b]	247.8 ± 36.4[b]	1.35 ± 0.21[b]	4.30 ± 0.98[b]	1.66 ± 0.29[b]
Ⅳ	47.3 ± 10.2[a]	138.5 ± 17.3[a]	0.82 ± 0.15[a]	1.87 ± 0.26[a]	1.26 ± 0.22[a]

[a]P<0.05 *vs* A组; [b]P<0.01 *vs* A组; [c]P<0.05 *vs* A组.

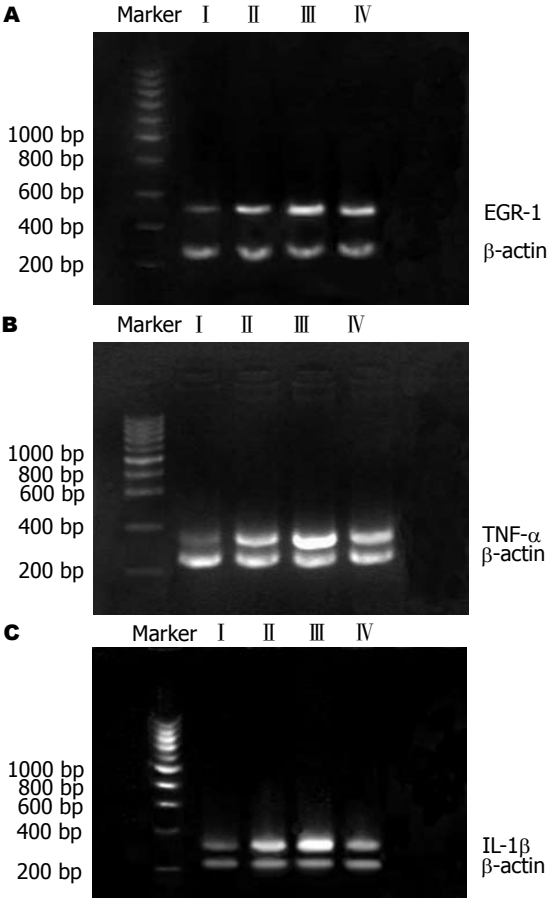


图 3 肺泡巨噬细胞电泳结果. A: EGR-1 mRNA; B: TNF-α mRNA; C: IL-1β mRNA.

腺局部的炎症介质不断产生并大量进入血液循环, 形成全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 导致远处脏器内单核细胞巨噬系统激活, 释放毒性物质, 成为继发肺部严重炎性反应的始动因素[23-26]. 多项研究表明腹腔巨噬细胞、枯否细胞等TNF-α基因启动子上存在与EGR-1结合的特异序列, EGR-1与这一序列相结合后参与调控这些细胞TNF-α的表达[27-28]. Ji *et al*发现, 在EGR-1基因缺失小鼠利用雨蛙素腹腔注射诱导的急性胰腺炎其TF、PAI、IL-6、MCP-1、ICAM-1 mRNA水平较野生型小鼠有显著下降, 因而认为其在急性胰腺炎发病过程中是一种重要的调控因子[29]. 国内曾有Gong *et al*观察了EGR-1在小鼠急性胰腺炎模型上胰腺组织中的基因与蛋白表达情况[30]. EGR-1作为一种立早反应基因在SAP从最初的局部炎症转变为严重威胁生命的全身病变中有无作用, 如何起作用, 目前国内外研究极少. 在本研究中, 我们首先观察了EGR-1在AP大鼠肺组织中的表达. 我们发现, 其表达细胞类型广泛, 包括肺间质巨噬细胞、肺泡巨噬细胞、肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞等. EGR-1表达随大鼠AP病情加重而呈增强趋势, 而且在表达细胞类型上也有很大差别. 对于注射生理盐水的对照组, 仅仅在肺间质细胞胞质中有极少量的表达. 在10 g/L牛磺胆酸钠溶液注射组, 可见在肺间质巨噬细胞有较强表达, 大部分位于胞质, 小部分在胞核有表达, 此外还有小部分毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞胞质内也有表达. 经30 g/L牛磺胆酸钠注射后, 可见有大量的肺间质巨噬细胞表达, 胞核和胞质均有. 而在50 g/L牛磺胆酸钠注射组, 则可见强烈的肺间质巨噬细胞表达, 少量视野中可见的肺泡巨噬细胞中也有表达. 各组AP大鼠肺组织EGR-1表达程度与反映AP程度及肺损伤各指标之间如胰腺病理评分、血清TNF-α和IL-1β水平、肺组织湿质量/干质量比均呈显著正相关. 因此, EGR-1在AP发病过程中可能发挥了重要作用, 并与AP肺损伤有关.

为了进一步了解EGR-1在AP肺损伤中的作用机制, 我们又研究了EGR-1与原代培养AM TNF-α及IL-1β表达的关系. 我们采用在体支气管肺泡灌洗法来分离AM. 在体灌洗法分离AM无需取下肺叶, 操作简便, 另外也减少了因取下肺叶可能造成的污染机会. 多项研究认为, 胰弹性蛋白酶是胰腺局部炎症与全身性炎症反应及胰外器官并发症之间的桥梁和纽带, 在刺激胰

外器官炎性细胞因子生成中起主要作用, 在很多方面可以模拟急性胰腺炎所造成的损害[31-32]. 因此, 我们选用其作为原代培养AM的刺激因子. 免疫细胞化学染色与RT-PCR均表明, 肺泡巨噬细胞EGR-1蛋白与mRNA表达随着胰弹性蛋白酶浓度的升高而呈增强趋势. 染色发现, Ⅱ组与Ⅲ组部分AM胞核内均有强烈表达, 表明有核移位发生, 显示EGR-1可能作为一种核转录因子对目标基因发挥转录调节作用. 为研究其信号转导途径, 我们对Ⅳ组AM先以PD98059行预处理, 再用与Ⅲ组同样剂量弹力酶来进行刺激, 发现EGR-1, TNF-α, IL-1β蛋白表达和mRNA水平均较C组有显著下降. 这表明AM在弹力蛋白酶刺激后EGR-1的表达有ERK1/2信号途径的参与. 对4组肺泡巨噬细胞EGR-1蛋白与mRNA表达分别与TNF-α和IL-1β进行相关分析, 均存在显著正相关. 这提示EGR-1可能与AM受胰弹性蛋白酶刺激后TNF-α与IL-1β生成有关, 并且EGR-1在AM中的表达以及炎性细胞因子TNF-α和IL-1β的生成中有ERK1/2信号途径的参与. 这些表明EGR-1可能在AP并发的肺损伤中起重要作用, 且这种作用可能与其介导炎性细胞因子TNF-α和IL-1β生成有关.

4 参考文献

1 Zhao X, Andersson R, Wang X, Dib M, Wang X. Acute pancreatitis-associated lung injury: pathophysiological mechanisms and potential future therapies. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 1351-1358

2 Shields CJ, Winter DC, Redmond HP. Lung injury in acute pancreatitis: mechanisms, prevention, and therapy. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8: 158-163

3 Pastor CM, Matthay MA, Frossard JL. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights. *Chest* 2003; 124: 2341-2351

4 De Campos T, Deree J, Coimbra R. From acute pancreatitis to end-organ injury: mechanisms of acute lung injury. *Surg Infect* (*Larchmt*) 2007; 8: 107-120

5 Surbatovic M, Jovanovic K, Radakovic S, Filipovic N. Pathophysiological aspects of severe acute pancreatitis-associated lung injury. *Srp Arh Celok Lek* 2005; 133: 76-81

6 许威, 夏时海, 陈虹. 炎症介质与急性胰腺炎相关性肺损伤. 世界华人消化杂志 2006; 14: 1188-1192

7 林振和, 陈垦. 实验性胰腺炎动物模型研究进展. 胰腺病学 2003; 3: 176-178

8 Schmidt J, Lewandrowsi K, Warshaw AL, Compton CC, Rattner DW. Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat. *Int J Pancreatol* 1992; 12: 41-51

9 章静波, 张世馥, 黄东阳. 组织和细胞培养技术. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 86-88

10 Murr MM, Yang J, Fier A, Kaylor P, Mastorides S, Norman JG. Pancreatic elastase induces liver injury by activating cytokine production within Kupffer cells via nuclear factor-Kappa B. *J Gastrointest Surg* 2002; 6: 474-480

11 初令, 曾庆富. 转录因子Egr-1及其在肺病变中的研究进展. 中国病理生理杂志 2004; 20: 268-272

12 Khachigian LM, Collins T. Early growth response factor 1: a pleiotropic mediator of inducible gene expression. *J Mol Med* 1998; 76: 613-616

13 Midgley VC, Khachigian LM. Fibroblast growth factor-2 induction of platelet-derived growth factor-C chain transcription in vascular smooth muscle cells is ERK-dependent but not JNK-dependent and mediated by Egr-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 40289-40295

14 McCaffrey TA, Fu C, Du B, Eksinar S, Kent KC, Bush H Jr, Kreiger K, Rosengart T, Cybulsky MI, Silverman ES, Collins T. High-level expression of Egr-1 and Egr-1-inducible genes in mouse and human atherosclerosis. *J Clin Invest* 2000; 105: 653-662

15 Kamimura M, Bea F, Akizawa T, Katus HA, Kreuzer J, Viedt C. Platelet-derived growth factor induces tissue factor expression in vascular smooth muscle cells via activation of Egr-1. *Hypertension* 2004; 44: 944-951

16 Abdel-Latif MM, Windle HJ, Fitzgerald KA, Ang YS, Eidhin DN, Li-Weber M, Sabra K, Kelleher D. Helicobacter pylori activates the early growth response 1 protein in gastric epithelial cells. *Infect Immun* 2004; 72: 3549-3560

17 Gaggioli C, Deckert M, Robert G, Abbe P, Batoz M, Ehrengruber MU, Ortonne JP, Ballotti R, Tartare-Deckert S. HGF induces fibronectin matrix synthesis in melanoma cells through MAP kinase-dependent signaling pathway and induction of Egr-1. *Oncogene* 2005; 24: 1423-1433

18 Pawlinski R, Pedersen B, Kehrle B, Aird WC, Frank RD, Guha M, Mackman N. Regulation of tissue factor and inflammatory mediators by Egr-1 in a mouse endotoxemia model. *Blood* 2003; 101: 3940-3947

19 Aljada A, Ghanim H, Mohanty P, Kapur N, Dandona P. Insulin inhibits the pro-inflammatory transcription factor early growth response gene-1 (Egr)-1 expression in mononuclear cells (MNC) and reduces plasma tissue factor (TF) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1419-1422

20 Wilder PJ, Bernadt CT, Kim JH, Rizzino A. Stimulation of the murine type II transforming growth factor-beta receptor promoter by the transcription factor Egr-1. *Mol Reprod Dev* 2002; 63: 282-290

21 Shi L, Kishore R, McMullen MR, Nagy LE. Chronic ethanol increases lipopolysaccharide-stimulated Egr-1 expression in RAW 264.7 macrophages: contribution to enhanced tumor necrosis factor alpha production. *J Biol Chem* 2002; 277: 14777-14785

22 Guha M, O'Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan SF, Stern D, Mackman N. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 2001; 98: 1429-1439

23 Bhatia M, Brady M, Shokuhi S, Christmas S, Neoptolemos JP, Slavin J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000; 190: 117-125

24 Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory

mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 2004; 202: 145-156
25 Puneet P, Moochhala S, Bhatia M. Chemokines in acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L3-L15
26 Yamauchi J, Shibuya K, Sunamura M, Arai K, Shimamura H, Motoi F, Takeda K, Matsuno S. Cytokine modulation in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2001; 8: 195-203
27 Faour WH, Alaaeddine N, Mancini A, He QW, Jovanovic D, Di Battista JA. Early growth response factor-1 mediates prostaglandin E2-dependent transcriptional suppression of cytokine-induced tumor necrosis factor-alpha gene expression in human macrophages and rheumatoid arthritis-affected synovial fibroblasts. *J Biol Chem* 2005; 280: 9536-9546
28 Shi L, Kishore R, McMullen MR, Nagy LE. Lipopolysaccharide stimulation of ERK1/2 increases TNF-alpha production via Egr-1. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C1205-C1211
29 Ji B, Chen XQ, Misek DE, Kuick R, Hanash S, Ernst S, Najarian R, Logsdon CD. Pancreatic gene expression during the initiation of acute pancreatitis: identification of EGR-1 as a key regulator. *Physiol Genomics* 2003; 14: 59-72
30 Gong LB, He L, Liu Y, Chen XQ, Jiang B. Expression of early growth response factor-1 in rats with cerulein-induced acute pancreatitis and its significance. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5022-5024
31 Jaffray C, Yang J, Carter G, Mendez C, Norman J. Pancreatic elastase activates pulmonary nuclear factor kappa B and inhibitory kappa B, mimicking pancreatitis-associated adult respiratory distress syndrome. *Surgery* 2000; 128: 225-231
32 Jaffray C, Yang J, Norman J. Elastase mimics pancreatitis-induced hepatic injury via inflammatory mediators. *J Surg Res* 2000; 90: 95-101

编辑 程剑侠 电编 刘勇

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志个性化服务订购活动

本刊讯 为了满足读者的多样化需求, 解决一些作者因为资金不足而导致订阅印刷版的困难, 自2007年开始, 世界华人消化杂志(*WCJD*), 推出以下个性化服务策略来为广大读者服务.

1 精彩专家述评专辑印刷版杂志

*WCJD*旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail发送精彩专家述评PDF; (2)2007年底将精彩专家述评专辑一本挂号邮寄用户收. 定价: 50元/年.

2 *WCJD*电子杂志

*WCJD*旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒PDF电子杂志(1-36期). 定价: 180元/年.

3 *WCJD*网络版杂志

*WCJD*旬刊的服务方式: (1)每月8, 18, 28日通过E-mail提醒网络版杂志(1-36期). 定价: 160元/年.

4 *WCJD*印刷版杂志

*WCJD*印刷版1-36期. 定价: 864元/年.

5 订购信息

邮政编码, 姓名, 地址, 部门, 机构名称, E-mail, 手机号.

6 汇款的方式

邮局汇款: 世界胃肠病学杂志社收, 100023, 北京市2345信箱. 附言注明订购的内容.
银行汇款: 户名: 北京百世登生物医学科技有限公司; 开户银行: 中国工商银行北京商务中心区支行国贸大厦分理处; 账号: 0200041609020180741. 附言注明: 订购的内容和发票的抬头.

总之, *WCJD*将尽自己的最大努力, 满足广大读者的需求, 同时欢迎更多个性化服务的意见和建议E-mail发至: h.n.zhang@wjgnet.com. 谢谢!(**世界胃肠病学杂志社** 2007-12-18).

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3697-3702
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

血清IL-2、IL-10及肠黏膜Fas在重症急性胰腺炎大鼠中的动态变化

党胜春, 张建新, 毛正发, 瞿建国, 王旭青, 朱 蓓

党胜春, 张建新, 毛正发, 瞿建国, 王旭青, 朱蓓, 江苏大学附属医院普外科 江苏省镇江市 212001
党胜春, 硕士, 主要从事胰腺炎的基础与临床研究.
江苏省镇江市社会发展基金资助项目, No. SH2005044
通讯作者: 张建新, 212001, 江苏省镇江市解放北路438号, 江苏大学附属医院普外科. zhangjx@ujs.edu.cn
电话: 0511-85038661 传真: 0511-85038661
收稿日期: 2007-08-27 修回日期: 2007-10-31

Dynamic changes in the levels of serum interleukin-2 and interleukin-10 and the expression of Fas in the intestinal mucosa of rats with severe acute pancreatitis

Sheng-Chun Dang, Jian-Xin Zhang, Zheng-Fa Mao, Jian-Guo Qu, Xu-Qing Wang, Bei Zhu

Sheng-Chun Dang, Jian-Xin Zhang, Zheng-Fa Mao, Jian-Guo Qu, Xu-Qing Wang, Bei Zhu, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China
Supported by: the Zhenjiang Science and Technology Committee, No. SH2005044
Correspondence to: Dr. Jian-Xin Zhang, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Jiangsu University, 438 Jiefang North Road, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. zhangjx@ujs.edu.cn
Received: 2007-08-27 Revised: 2007-10-31

Abstract

AIM: To investigate the dynamic changes in the levels of serum interleukin (IL)-2 and IL-10 sFas and IL-2/IL-10 in rats with severe acute pancreatitis (SAP), and to explore the expression of Fas in the intestinal mucosa of rats with severe acute pancreatitis.

METHODS: A total of 64 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control group and SAP group. A SAP model was induced by injection of 50 g/L sodium taurocholate under the pancreatic membrane. The normal control group received isovolumetric injection of 9 g/L physiological saline solution using the same method. Blood samples from the rats in each group were obtained via the superior mesenteric vein to measure the levels of IL-2, IL-10 and sFas, and to calculate the value of IL-2/IL-10. The levels of IL-2, IL-10 and sFas were determined by ELISA. The severity of pancreas and intestinal mucosal injury was evaluated by pathologic score. The expression of Fas in intestinal mucosal tissue was determined by immunohistochemistry.

RESULTS: The levels of serum IL-2 in the SAP group were significantly higher than those in the normal control group at 0.5 h after injury (3.53 ± 0.62 ng/L *vs* 2.79 ± 0.51 ng/L, 4.35 ± 1.11 ng/L *vs* 2.93 ± 0.89 ng/L, 6.94 ± 1.55 ng/L *vs* 4.81 ± 1.23 ng/L, 4.80 ± 1.10 ng/L *vs* 3.41 ± 0.72 ng/L, $P < 0.01$) and peaked at 6 h after injury. The levels of serum IL-10 in the SAP group were significantly higher than those in the normal control group at 6 h after injury (494.98 ± 11.23 ng/L *vs* 89.18 ± 32.52 ng/L, 93.28 ± 25.81 ng/L *vs* 77.15 ± 22.60 ng/L, $P < 0.01$). The IL-2/IL-10 ratio in the SAP group was significantly higher than that in the normal control group at 0.5 h and 2 h after injury, and significantly lower than that in the normal control group at 6 h after injury ($P < 0.01$), after which this ratio returned to the control level ($P > 0.05$). The pathological changes were significantly aggravated in the SAP group compared with the normal group. Immunohistochemistry staining showed. Fas from normal intestinal tissue. Fas expression in intestinal tissue gradually increased 0.5 h after the induction of pancreatitis, and its a peak at 12 h after induction.

CONCLUSION: Fas is involved in the pathogenesis of pancreatitis-associated intestinal injury. The mechanisms underlying this involvement of Fas may be related to Fas-mediated T helper cell apoptosis.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Fas; IL-2; IL-10; Intestinal mucosal injury; Sodium taurocholate

Dang SC, Zhang JX, Mao ZF, Qu JG, Wang XQ, Zhu B. Dynamic changes in the levels of serum interleukin-2 and interleukin-10 and the expression of Fas in the intestinal mucosa of rats with severe acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3697-3702

■背景资料
重症急性胰腺炎常伴有肠道细菌和内毒素移位. 造成这一现象的主要原因目前认为是由于肠黏膜屏障功能受损. 研究表明, 急性胰腺炎患者血中的sCD4和sFas之间存在正相关, 促炎-抗炎细胞因子平衡在决定重症急性胰腺炎全身表现和临床转归中起着重要作用. 我们设想Fas介导的胰腺的细胞凋亡与CD4+细胞产生的Th1与Th2有关. 通过重症急性胰腺炎Fas介导的细胞凋亡与Th1/Th2偏移相关性的实验与临床研究, 有可能为急性重症胰腺炎的治疗提供新思路.

■研发前沿
测定对照组与胰腺炎组的血清sFas、细胞因子，以及免疫组化法检测肠组织Fas的表达，重点研究重症急性胰腺炎时细胞凋亡发生情况及初步探讨Fas途径在重症急性胰腺炎细胞凋亡发生中的作用以及与Th1/Th2漂移的关系.

摘要

目的：探讨重症急性胰腺炎大鼠血清IL-2、IL-10、sFas及IL-2/IL-10动态变化以及Fas在肠黏膜的表达及意义.

方法：将SD大鼠64只，随机分为对照组和胰腺炎组. 经大鼠胰腺被膜下均匀注射50 g/L牛磺胆酸钠制作重症急性胰腺炎模型，对照组仅胰腺被膜下注射等量生理盐水. 通过肠系膜上静脉取血测定血清IL-2、IL-10和sFas水平，并计算IL-2/IL-10比值. 分别对胰腺损伤、肠损伤程度进行病理评分. 免疫组化方法检测大鼠肠组织内Fas蛋白的表达水平.

结果：0.5 h后血清IL-2水平胰腺组较对照组明显升高(3.53±0.62 ng/L *vs* 2.79±0.51 ng/L, 4.35±1.11 ng/L *vs* 2.93±0.89 ng/L, 6.94±1.55 ng/L *vs* 4.81±1.23 ng/L, 4.80±1.10 ng/L *vs* 3.41±0.72 ng/L, $P<0.01$)，并于6 h达到最高点. 胰腺炎组6 h后血清IL-10水平较对照组明显升高(494.98±11.23 ng/L *vs* 89.18±32.52 ng/L, 93.28±25.81 ng/L *vs* 77.15±22.60 ng/L, $P<0.01$), 12 h血清IL-10水平较6 h降低. 胰腺炎组的IL-2/IL-10先降低后升高，0.5 h后即开始下降，6 h时达到最低点然后开始升高，显著低于对照组($P<0.01$), 12 h接近对照组. 与对照组比较，胰腺炎组各时相胰腺及肠黏膜病理改变明显加重. 免疫组化结果显示，在正常的肠黏膜未见明显表达. 造模0.5 h后，大鼠肠组织内Fas表达增加，至12 h达最高水平.

结论：Fas参与胰腺炎肠损伤的病理过程，其机制可能与其介导的Th细胞凋亡有关.

关键词：重症急性胰腺炎; Fas; 白介素-2; 白介素-10; 肠黏膜损害; 牛磺胆酸钠

党胜春，张建新，毛正发，瞿建国，王旭青，朱蓓. 血清IL-2、IL-10及肠黏膜Fas在重症急性胰腺炎大鼠中的动态变化. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3697-3702
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3697.asp

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)已严重危及人类健康，后期常出现全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)、严重感染、感染性休克及多器官功能障碍综合征(MODS)，导致死亡[1]. SAP常伴有肠道细菌、内毒素移位. 造成这一现象的主要原因目前认为是由于肠黏膜屏障功能受损[2]. 研究表明，急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)患者血中的sCD4和sFas之间存在正相关，促炎-抗炎细胞因子平衡在决定SAP全身表现和临床转归中起着重要作用[3]. 我们设想Fas介导的胰腺的细胞凋亡与CD4+细胞产生的Th1与Th2有关，因而与Th1/Th2偏移有一定的相关性. 通过Fas介导的胰腺的细胞凋亡与Th1/Th2偏移相关性的实验与临床研究，有可能成为SAP的治疗提供新思路. 本研究通过大鼠SAP模型，探讨Fas在SAP肠损伤中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠64只，体质量250-300 g，雌雄不限，由江苏大学医学院实验动物中心提供. 牛磺胆酸钠(美国Sigma公司)，检测大鼠血清IL-10、IL-2以及Fas试剂盒均为分装自美国R&D公司，(生产批号分别为0607182、0607183及0607184)，由上海森雄科技实业有限公司提供.

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理：将SD大鼠64只，随机分为对照组和胰腺炎组. 各组又按模型制备后0.5、2、6、12 h分为4组，每组8只，用于抽取血样及组织学观察. 动物实验前12 h禁食不禁饮.

1.2.2 制模：20 g/L戊巴比妥钠溶液ip麻醉(剂量1 mL/kg体质量)，采用胰腺被膜下均匀注射法制作胰腺炎模型[4]. 开腹后自胰尾至胰头方向在胰腺被膜下均匀注射5 g/L牛磺胆酸钠4 mL/kg体质量. 对照组进行同样操作，仅胰腺被膜下注射等量生理盐水.

1.2.3 取材：实验结束后，将大鼠剖腹，肉眼观察胰腺炎症轻重情况. 下腔静脉穿刺取血，静置2 h后，以3800 r/min离心3 min，取血清-20℃冻存，用于细胞因子及可溶性受体的检测. 取全部胰腺组织及末段回肠，40 g/L甲醛固定，制成石蜡切片.

1.2.4 sFas、IL-2及IL-10的测量：采用双抗体夹心ABC-ELISA法测量sFas、IL-2及IL-10含量(按ELISA试剂盒上的操作说明书进行操作，由上海森雄科技实业有限公司检测).

1.2.5 胰腺及肠组织病理学观察：常规制作病理HE切片，由病理科医生采用盲法在光镜下观察胰腺组织学改变. 按照胰腺组织病理评分标准[5]，每张切片随机选取20个视野，对每个视野按标准进行单独评分，20个视野的平均分数为动物的最后病理评分. 肠黏膜损害分级按照Chiu的标准[6]，病理改变由轻至重分为0级-Ⅴ级.

1.2.6 肠组织Fas蛋白表达：采用DAKO的

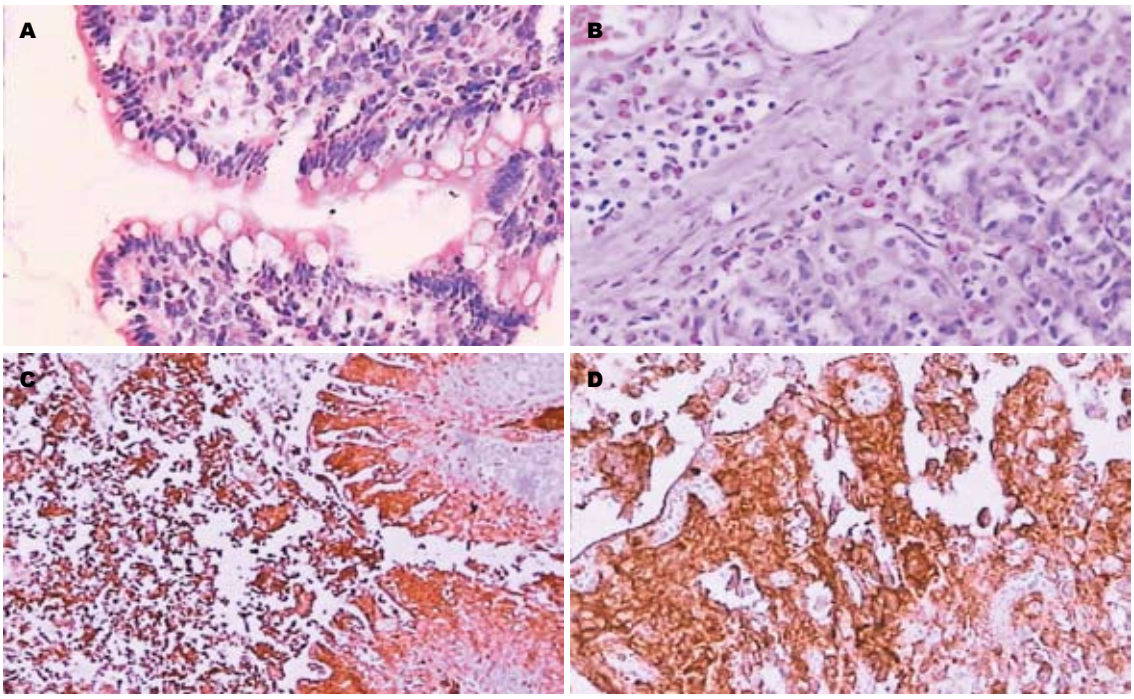


图 1 胰腺炎组大鼠肠组织病理图. A: 0.5 h常规病理; B: 6 h常规病理; C: 0.5 h Fas表达; D: 12 h Fas表达.

■**创新盘点**
本文研究重症急性胰腺炎细胞凋亡中Fas与Th1/Th2漂移的关系. 从细胞凋亡角度探索与炎症介质的关系,寻求急性重症胰腺炎免疫治疗的新途径.

Envision检测肠组织Fas蛋白表达. 操作步骤: 蜡块置冷冻台冷却5-10 min, 切片3-4 μm, 冷水中摊平, 硅化玻片捞取, 再放入45℃水中摊平, 60℃过夜彻底烘干. 切片二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水, 水洗, 蒸馏水洗. 抗原修复: 放入0.01 mol/L pH6.2柠檬酸缓冲液隔水煮沸10 min, 保温20 min, 室温自然冷却. PBS洗×3, 切片置于湿盒, 滴加一抗50 μL, 4℃冰箱过夜. 次日早晨, 切片PBS洗×3, 滴加二抗50 μL室温40 min, PBS洗×3, DAB显色, 显微镜下控制显色程度. 蒸馏水洗, 苏木素复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片.

统计学处理 采用SPSS11.0统计软件包对计量资料进行PostHoc检验, 等级资料用非参数统计法的Man Whitney检验.

2 结果

2.1 血清IL-2水平 0.5 h后血清IL-2水平胰腺组较对照组明显升高(P<0.01), 并于6 h达到最高点, 12 h血清IL-2水平较6 h降低(表1).

2.2 血清IL-10水平 6 h后血清IL-10水平胰腺组较对照组明显升高(P<0.01), 12 h血清IL-10水平较6 h降低(表1).

2.3 IL-2/IL-10变化 胰腺炎组的IL-2/IL-10先降低后升高, 6 h时达到最低点然后开始升高, 显著低于对照组(P<0.01), 12 h接近对照组(P>0.05)(表2).

2.4 血清Fas/APO-1水平 胰腺炎组的sFas水平逐渐升高, 6 h到达最高值, 以后逐渐下降. 与对照组各时间点相比未见有显著差异性(表3).

2.5 组织病理学检查

2.5.1 胰腺组织病理学检查: 肉眼观察, 对照组胰腺外观正常. 胰腺炎各组大鼠胰腺肿胀明显, 质地较硬, 有大片黄色坏死灶. 大网膜、肠系膜上可见大量皂化斑, 腹腔有中至大量血性腹水. 显微镜下对照组胰腺腺泡和导管未见异常, 仅见叶间隙稍增宽. 2 h胰腺炎组出现凝固性坏死及脂肪坏死, 12 h胰腺炎组出现胰腺坏死严重, 失去正常结构, 细胞核消失. 各组大鼠病理评分如表4, 各时相胰腺炎组较对照组有显著差异.

2.5.2 肠组织病理学检查: 肉眼观察, 对照组肠管粉红色, 表面光滑, 蠕动有力. 胰腺炎组肠管颜色随时间延长逐渐变暗, 由深红至暗紫色, 并逐步出现肠管水肿、僵硬、狭窄萎瘪, 12 h后, 肠管暗紫色, 蠕动消失. 各组肠组织损伤分级见表5. 胰腺炎组0.5 h肠黏膜有较轻度炎症伴出血, 绒毛顶层内皮移位. 胰腺炎组6 h肠黏膜光镜所见绒毛脱落明显, 固有层绒毛脱落, 腺体受损明显, 光镜观察见图1.

2.5.3 大鼠肠组织Fas的表达 Fas免疫组化染色阳性结果均为细胞质/膜着色, 呈棕黄色, 胞核呈淡蓝色. 正常对照组大鼠肠组织Fas免疫组化染色显示, 肠组织形态结构正常, Fas几乎不表达. 造模后0.5 h组, 免疫组化染色可见大鼠肠组织Fas呈弱阳性表达. 随着时间的延长, 大鼠肠损伤程

■应用要点
通过对牛磺胆酸钠诱导重症急性胰腺炎模型的制备, 测定对照组与重症急性胰腺炎组的血清sFas与细胞因子, 以及免疫组化法检测肠组织Fas的表达.

表 1 大鼠血清IL-2和IL-10水平(mean ± SD, ng/L)

分组	血清IL-2				血清IL-10			
	0.5 h	2 h	6 h	12 h	0.5 h	2 h	6 h	12 h
对照组	2.79 ± 0.51	2.93 ± 0.89	4.81 ± 1.23	3.41 ± 0.72	54.61 ± 15.81	141.15 ± 40.21	89.18 ± 32.52	77.15 ± 22.60
胰腺炎组	3.53 ± 0.62[b]	4.35 ± 1.11[b]	6.94 ± 1.55[b]	4.80 ± 1.10[b]	47.34 ± 14.62	156.12 ± 43.10	494.98 ± 11.23[b]	93.28 ± 25.81[b]

[b]$P<0.01$ *vs* 对照组.

表 2 IL-2/IL-10水平(mean ± SD)

分组	IL-2/IL-10			
	0.5 h	2 h	6 h	12 h
对照组	0.05 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.01
胰腺炎组	0.07 ± 0.02[b]	0.03 ± 0.01[b]	0.01 ± 0.01[b]	0.05 ± 0.02

[b]$P<0.01$ *vs* 对照组.

表 3 血清Fas/APO-1水平(mean ± SD, ng/L)

分组	血清Fas/APO-1			
	0.5 h	2 h	6 h	12 h
对照组	3.16 ± 0.75	4.05 ± 1.08	5.93 ± 1.52	4.62 ± 1.23
胰腺炎组	3.31 ± 0.80	4.32 ± 1.11	5.41 ± 1.47	4.44 ± 1.16

表 4 大鼠病理评分(mean ± SD)

分组	病理评分			
	0.5 h	2 h	6 h	12 h
对照组	0.70 ± 0.32	0.71 ± 0.51	0.81 ± 0.42	0.85 ± 0.17
胰腺炎组	5.01 ± 0.35[b]	6.03 ± 0.32[b]	7.14 ± 0.22[b]	12.07 ± 0.10[b]

[b]$P<0.01$ *vs* 对照组.

度加重. 6 h肠组织Fas的表达逐渐增强, 12 h表达最强(图1).

3 讨论

SAP已严重危及人类的生命健康, 是当前临床治疗的难点之一. 目前国内外对现有的治疗, 尽管能够改善临床表现和症状, 但都不能根本逆转其已存在的结构改变, 其病死率仍高达20%-30%[7-9]. 由于胃肠道与胰腺同属消化系统, 而且胃、十二指肠及结肠紧邻胰腺, 因此, 胃肠道往往是SAP时首先受影响的器官之一. 目前认为肠黏膜屏障功能障碍和肠道细菌微生态平衡的破坏及机体免疫功能的损害是导致肠黏膜的主要因素[10-12]. 近年来, MODS防治的研究热点已转移至消化道. 肠道细菌和内毒素移位是胰腺和胰周感染的潜在根源. 维护肠黏膜的屏障功能, 确保肠营养的正常进行, 抑制促发SIRS的肠道机制是成功救治MODS的关键[13-15].

在SAP动物实验中发现, 腺泡细胞死亡存在两种不同的方式: 坏死和凋亡. 凋亡很少甚至完全不引起炎症反应, 而坏死则伴随剧烈的炎症反应. 近年来, 人们已注意到急性水肿型胰腺炎的胰腺中存在着较多的凋亡细胞, 而SAP却很少出现凋亡细胞. 这就提示细胞凋亡在SAP的发生和发展过程中起着一定作用, 细胞凋亡对胰腺具有保护作用, 与AP的严重程度呈负相关[16]. 在AP发生MODS时可见血中sFas和sFasL明显增多, 可见Fas/FasL系统与AP的病程有关[17]. 同时国内程勇 *et al*[18-19]报道在AP时, Fas蛋白主要表达在胰腺腺泡细胞胞膜, 急性水肿型胰腺炎组和SAP组均明显高于对照组, 且急性水肿性胰腺炎组高SAP组, 说明Fas/FasL系统在大鼠的AP过程中可能参与诱导胰腺腺泡细胞凋亡, 减轻胰腺炎症反应程度. 研究显示, AP早期阶段的肠上皮细胞凋亡比率明显增加, 肠上皮细胞凋亡参与AP肠道黏膜屏障功能障碍的病理过程[20-21]. 肠黏膜屏障稳定的维持依赖于上皮细胞增殖和凋亡之间的平衡. 凋亡虽然对于机体来说是一种保护机制, 但一旦各种刺激因素引起肠上皮细胞凋亡过度, 修复与再生受阻, 肠黏膜屏障功能就会产生障碍[22].

SAP时细胞凋亡基因水平调控的研究很少, 研究多集中在细胞因子上. 近年来的研究显示, SAP的发病机理更多的与免疫异常有关. Th细胞是免疫应答的中心细胞, 根据CD4+ T细胞分泌

表 5 肠组织损伤分级(n = 8)

分组	0.5 h						2 h						6 h						12 h				
	0	I	II	III	IV	V	0	I	II	III	IV	V	0	I	II	III	IV	V	0	I	III	IV	V
对照组	7	1	0	0	0	0	6	2	0	0	0	0	7	1	0	0	0	0	6	2	0	0	0
胰腺炎组	0	2	5	1	0	0^b	0	0	2	4	2	0^b	0	0	0	1	4	3^b	0	0	0	3	5^b

$^bP<0.01$ *vs* 对照组.

细胞因子和介导免疫功能的不同, 将其分为Th1和Th2两个亚群. Th1分泌IL-2、IFN-γ、TNF-β等, 主要介导细胞免疫. Th2分泌IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13等, 主要介导体液免疫. 他们对机体的作用及临床表现视两类介质相互作用的最终结果而定. 正常机体Th1/Th2类细胞因子处于动态平衡, Th1和Th2因子之间的平衡决定着促炎细胞因子与抗炎细胞因子之间的平衡[23]. 在众多的细胞因子网络中, 最能代表Th1功能的细胞因子分别是以TNF, IFN-γ和IL-2, 最能代表Th2功能的细胞因子IL-4, IL-6和IL-10. 在SAP的早期, 机体以Th1优势应答为主要病理改变, 表现为多种促炎介质升高, 可导致SIRS. 在SAP的中晚期, Th1细胞功能普遍降低, 而Th2细胞功能明显升高, Th1向Th2型细胞漂移. 由于Th1/Th2细胞因子形成动态的复杂的网络, Th1/Th2失衡会造成“瀑布样级联反应”, 导致免疫异常贯穿病程始终[24].

IL-2主要是由Th1细胞释放. AP时IL-2大量释放, 在局部病变发展到全身性病过程中起主要作用, 其水平与疾病的严重程度、病死率和预后呈明显正相关[25]. 本研究发现, 胰腺炎组和对照组血清中0.5 h后IL-2明显升高, 胰腺炎组升高更为明显, 与病理评分显示的胰腺损伤程度一致, 提示IL-2是AP发病中的一个重要炎症介质, 血清的IL-2变化与胰腺炎时胰腺及胰外器官损害程度有关.

IL-10主要是由Th2细胞产生. 有研究显示, IL-10可以减轻AP病程, 并对AP所致的多器官损伤有保护作用[26-30]. IL-10是机体内诸多抗炎细胞因子中最重要的多功能调节因子, 有利于促炎-抗炎细胞因子平衡和炎症的恢复, 是目前所发现的AP时重要的强效抗炎细胞因子, 在阻止胰腺持续坏死, AP的早期诊断、治疗及预防中均起到了关键的作用[31].

本研究结果显示, 胰腺炎组及治疗组血清中IL-10水平也升高. 与IL-2不同的是, 其2 h后才明显升高, 明显滞后于血清中IL-2水平增高时限. 但与IL-2相比, 其幅度增加明显, 提示在SAP病程中存在着由促炎反应向抑炎反应转化趋势. IL-2/IL-10的变化反应了Th1/Th2细胞的功能变化. Th1和Th2的功能变化与机体的细胞免疫及体液免疫有关. 血清sFas的变化与炎症介质的变化一致, 提示Fas与T细胞的免疫调节作用有一定的关系, 这有助于我们寻找更加有效的治疗方法.

4 参考文献

1 Austrums E, Pupelis G, Snippe K. Postoperative enteral stimulation by gut feeding improves outcomes in severe acute pancreatitis. *Nutrition* 2003; 19: 487-491

2 Wang XD, Wang Q, Andersson R, Ihse I. Alterations in intestinal function in acute pancreatitis in an experimental model. *Br J Surg* 1996; 83: 1537-1543

3 Uehara S, Gothoh K, Handa H, Tomita H, Tomita Y. Immune function in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 363-370

4 Zhang JX, Dang SC, Qu JG, Wang XQ. Preventive effect of tetramethylpyrazine on intestinal mucosal injury in rats with acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 6386-6390

5 Kaiser AM, Saluja AK, Sengupta A, Saluja M, Steer ML. Relationship between severity, necrosis, and apoptosis in five models of experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1995; 269: C1295-1304

6 Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-483

7 Takeda K, Mikami Y, Fukuyama S, Egawa S, Sunamura M, Ishibashi T, Sato A, Masamune A, Matsuno S. Pancreatic ischemia associated with vasospasm in the early phase of human acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 2005; 30: 40-49

8 Gerlach H. Risk management in patients with severe acute pancreatitis. *Crit Care* 2004; 8: 430-432

9 Algul H, Tando Y, Schneider G, Weidenbach H, Adler G, Schmid RM. Acute experimental pancreatitis and NF-kappaB/Rel activation. *Pancreatology* 2002; 2: 503-509

10 Ammori BJ. Role of the gut in the course of severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 26: 122-129

11 Dervenis C, Smailis D, Hatzitheoklitos E. Bacterial translocation and its prevention in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2003; 10: 415-418

12 Furuya T, Soeno T, Komatsu M. Strategy for bacterial translocation in acute pancreatitis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2004; 101: 502-509

13 Gramlich L, Taft AK. Acute pancreatitis: practical

■名词解释

Th1/Th2: Th细胞是免疫应答的中心细胞, 根据CD4+ T细胞分泌细胞因子和介导免疫功能的不同, 将其分为Th1和Th2两个亚群, Th1分泌IL-2、IFN-γ、TNF-β等, 主要介导细胞免疫, Th2分泌IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13等, 主要介导体液免疫. 他们对机体的作用及临床表现视两类介质相互作用的最终结果而定, 正常机体Th1/Th2类细胞因子处于动态平衡, Th1和Th2因子之间的平衡决定着促炎细胞因子与抗炎细胞因子之间的平衡.

■同行评价
本研究有一定的创新性, 内容比较具体, 完整, 关键问题选择较准确, 具有很强的学术价值.

considerations in nutrition support. *Curr Gastroenterol Rep* 2007; 9: 323-328
14 McClave SA. Nutrition support in acute pancreatitis. *Gastroenterol Clin North Am* 2007; 36: 65-74
15 Balzan S, de Almeida Quadros C, de Cleva R, Zilberstein B, Cecconello I. Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 464-471
16 Bhatia M. Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G189-196
17 Endo S, Inoue Y, Fujino Y, Yamada Y, Sato N, Wakabayashi G, Sakamoto T, Ishikura H, Tanaka T, Inada K, Sato S. Soluble Fas and soluble Fas L levels in patients with acute pancreatitis. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2000; 108: 179-186
18 程勇, 王卫星, 侯靖. 大鼠急性胰腺炎凋亡相关蛋白Fas、FasL、Bcl-2的表达及意义. 武汉大学学报(医学版) 2004; 25: 286-288, 298
19 邵宏伟, 齐清会. 紫杉醇诱导急性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡机制的研究. 中华普通外科杂志 2004; 19: 163-165
20 Wang X, Wang B, Wu K, Xu M, Gong Z. Growth hormone downregulated the excessive apoptosis of ileal intestinal epithelial cells in rats during the early course of acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas* 2002; 25: 205-209
21 Takeyama Y. Significance of apoptotic cell death in systemic complications with severe acute pancreatitis. *J Gastroenterol* 2005; 40: 1-10
22 张喜平, 张宇. 急性胰腺炎肠道屏障损害机制的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 417-421
23 Coffman RL, Seymour BW, Lebman DA, Hiraki DD, Christiansen JA, Shrader B, Cherwinski HM, Savelkoul HF, Finkelman FD, Bond MW. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 1988; 102: 5-28
24 马小鹏, 易继林. Th1/Th2平衡在急性胰腺炎中的作用. 肝胆胰外科杂志 2005; 17: 337-339, 342
25 孙群, 朱励, 朱金水, 陈维雄, 达炜. 白介素及肿瘤坏死因子对急性胰腺炎预后的影响. 中国临床医学 2003; 10: 355-356, 359
26 Warzecha Z, Dembinski A, Ceranowicz P, Konturek S, Tomaszewska R, Stachura J, Nakamura T, Konturek PC. Inhibition of cyclooxygenase-2 reduces the protective effect of hepatocyte growth factor in experimental pancreatitis. *Eur J Pharmacol* 2004; 486: 107-119
27 Mentula P, Kylanpaa ML, Kemppainen E, Jansson SE, Sarna S, Puolakkainen P, Haapiainen R, Repo H. Plasma anti-inflammatory cytokines and monocyte human leucocyte antigen-DR expression in patients with acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 178-187
28 Chen ZQ, Tang YQ, Zhang Y, Jiang ZH, Mao EQ, Zou WG, Lei RQ, Han TQ, Zhang SD. Adenoviral transfer of human interleukin-10 gene in lethal pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3021-3025
29 Demols A, Deviere J. New frontiers in the pharmacological prevention of post-ERCP pancreatitis: the cytokines. *JOP* 2003; 4: 49-57
30 Han XC, Zhang YC, Wang Y, Jia MK. Clinical evaluation of serum interleukin 10 in patients with acute pancreatitis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003; 2: 135-138
31 王刚, 孙备. 白介素10在急性胰腺炎中的应用现状. 世界华人消化杂志 2005; 13: 69-71

编辑 杜群 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007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* 2006年影响因子0.834

本刊讯 2006年*World Journal of Gastroenterology* (*WJG*)的总被引频次为3576, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第19位, 内科医学类28种期刊的第1位. 2006年*WJG*的影响因子为0.834, 内科医学类28种期刊的第7位. 即年指标0.134, 他引率0.77, 地区数26, 基金论文比0.40, 海外论文比0.78, 学科影响指标0.75. (总编辑: 马连生 2007-11-15)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3703-3709
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

热休克预处理对大鼠肠缺血–再灌注损伤的保护效应

莫燕娜, 王丹妹, 吉丽敏, 翁 阳, 何 佟, 陈世民

莫燕娜, 王丹妹, 吉丽敏, 何佟, 陈世民, 海南医学院机能学实验室 海南省海口市 571101
翁阳, 海南医学院病理学教研室 海南省海口市 571101
莫燕娜, 副教授, 主要从事缺血再灌注损伤发生机制和防治方法研究.
海南省自然科学基金资助项目, No. 30625
海南省普通高校优秀中青年教师科研与教学奖励基金资助项目, No. 琼教高[2000]36
通讯作者: 莫燕娜, 571101, 海南省海口市, 城西学院路海南医学院机能学实验室. yannamo18@126.com
电话: 0898–66895765
收稿日期: 2007–07–13 修回日期: 2007–11–02

Protective effect of previous heat shock treatment on intestinal injury following mesenteric ischemia/reperfusion in rats

Yan-Na Mo, Dan-Mei Wang, Li-Min Ji, Yang Weng, Tong He, Shi-Min Chen

Yan-Na Mo, Dan-Mei Wang, Li-Min Ji, Tong He, Shi-Min Chen, Department of Functional Laboratory, Hainan Medical College, Haikou 571101, Hainan Province, China
Yang Weng, Department of Pathology, Hainan Medical College, Haikou 571101, Hainan Province, China
Supported by: the Natural Science Foundation of Hainan Province, No. 30625 and the Award Funding of Research and Teaching Special for Outstanding Young and Middle-age Teachers of Hainan, No. [2000]36
Correspondence to: Yan-Na Mo, Department of Functional Laboratory, Hainan Medical College, Chengxi Xueyuan Road, Haikou 571101, Hainan Province, China. yannamo18@126.com
Received: 2007-07-13 Revised: 2007-11-02

Abstract

AIM: To investigate the protective effect of previous heat shock treatment on intestinal injury following mesenteric ischemia/reperfusion (I/R).

METHODS: Forty adult male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups (10 in each group): control group (CTRL), ischemia/reperfusion group (IR), previous heat shock treatment group (42C) and ischemia reperfusion group (42IR). The expression of HSP72 was examined in the small intestinal mucosa using Western blotting, and pathological changes in the ileal mucosal tissue were evaluated by microscopy. The apoptosis of intestinal mucosal epithelial cells was examined by terminal deoxylnucleotidyl transferase mediated-dUTP nick end labeling (TUNEL). The enzymatic activity of caspase-3 in mucosal cells was assayed colorimetrically. The percentage of peripheral blood leukocytes undergoing apoptosis was measured by flow cytometry using an annexin-V/PI double staining assay.

RESULTS: The expression of heat-shock protein 72 was significantly increased in 42C and 42IR rats compared with CTRL and IR rats (1.59 ± 0.32, 2.71 ± 0.64 *vs* 0.41 ± 0.1, 0.30 ± 0.04, $P < 0.01$). The enzymatic activity of caspase-3 decreased significantly in the 42IR group compared with the IR group (1.16 ± 0.31 *vs* 2.32 ± 0.54, $P < 0.01$). The percentage of peripheral blood leukocytes undergoing apoptosis was significantly higher in the 42IR group than in the IR group (39.65% *vs* 16.94%, $P < 0.01$). The number of mucosal epithelia cells undergoing apoptosis was decreased in the 42IR the compared with the IR group. There were no significant differences in the enzymatic activity of caspase-3, in the percentage of peripheral blood leukocytes undergoing apoptosis and in the number of mucosal epithelial cells undergoing apoptosis among 42IR, 42C and CTRL rats.

CONCLUSION: Whole body hyperthermia pretreatment can protect against subsequent mesenteric ischemia reperfusion injury by increased induction of heat shock protein 72 and inhibition of peripheral blood leukocyte activation in rats.

Key Words: Intestinal; Ischemia/reperfusion; Previous heat shock treatment; Caspase-3; Peripheral blood leukocyte; Western blotting

Mo YN, Wang DM, Ji LM, Weng Y, He T, Chen SM. Protective effect of previous heat shock treatment on intestinal injury following mesenteric ischemia/reperfusion in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3703-3709

摘要

目的: 探讨全身热休克预处理对肠缺血-再灌注(ischemia/reperfusion, IR)损伤的保护作用.

■背景资料
肠缺血-再灌注损伤(IRI)是临床常见的病理生理过程. 肠IRI不仅会引起肠组织的局部损伤, 还会诱发SIRS和MODS. 白细胞激活是肠IRI过程中引起急性炎症反应的基础. 研究表明热休克预处理对包括小肠在内的器官缺血-再灌注损伤有保护作用, 但机制尚未阐明.

■研发前沿
肠道是对缺血-再灌注损伤最为敏感的器官，肠缺血-再灌注损伤是肠移植、严重创伤后常见的病理生理过程，肠缺血-再灌注损伤的发生机制以及如何防止、减轻肠缺血-再灌注损伤一直是基础和临床研究的热点.

方法：将40只SD♂大鼠随机分为4组：正常体温+假手术对照组(CTRL, n = 10)，正常体温+肠IR组(IR, n = 10)，41.5℃-42℃热休克+假手术组(42C, n = 10)，41.5℃- 42℃热休克+肠IR组(42IR, n = 10). Western blot检测肠黏膜HSP72蛋白表达，原位末端缺口标记法(TUNEL)检测肠黏膜上皮细胞凋亡，比色法检测肠黏膜caspase-3活性，Annexin-V/PI法流式细胞仪检测外周血白细胞凋亡比例.

结果：42C、42IR组HSP72蛋白表达水平比CTRL、IR组显著增高(1.59±0.32、2.71±0.64 *vs* 0.41±0.1、0.30±0.04, P<0.01). 42IR组caspase-3活性，白细胞凋亡比例比IR组相比有显著性差异(1.16±0.31 *vs* 2.32±0.54; 39.65% *vs* 16.94%; P<0.01)，且42IR组肠黏膜上皮细胞凋亡指数比IR组明显减少. 42IR组与42C、CTRL组之间，caspase-3活性，肠黏膜上皮细胞凋亡指数，白细胞凋亡比例均无明显差异.

结论：全身热休克预处理对肠缺血-再灌注损伤有保护作用，其机制可能与增加热休克诱导HSP72的表达和抑制外周血白细胞激活有关.

关键词: 肠; 缺血-再灌注; 热休克预处理; caspase-3; 白细胞凋亡; 免疫印迹法

莫燕娜，王丹妹，吉丽敏，翁阳，何佟，陈世民. 热休克预处理对大鼠肠缺血-再灌注损伤的保护效应. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3703-3709
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3703.asp

0 引言

肠缺血-再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, IRI)是肠移植、严重创伤后常见的病理生理过程. 由于肠IRI不仅会引起肠组织的局部损伤，还会由于肠屏障功能的受损，渗透性增加，而导致肠内细菌和毒素移位到体循环，引起网状内皮系统发生系列反应，诱发全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)[1-2]. 白细胞在IRI的病理生理改变中起重要作用[3-5]. 白细胞激活是肠IRI过程中引起急性炎症反应的基础. 研究表明，热休克预处理对包括小肠在内的器官缺血-再灌注损伤有保护作用[6-13]，但机制尚未阐明. 热休克预处理对肠IRI外周血白细胞的作用尚未清楚. 本研究在热休克预处理大鼠肠IRI模型上观察肠黏膜细胞凋亡，以及外周血白细胞和中性粒细胞凋亡比例，探讨热休克预处理对肠IRI白细胞变化的作用机制，为临床防治肠IRI提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 40只健康SD♂大鼠，体质量200-230 g，由中山大学实验动物中心提供. 随机分为4组：正常体温+假手术对照组(CTRL, n = 10)，正常体温+肠IR组(IR, n = 10)，41.5-42℃热休克+假手术组(42C, n = 10)，41.5-42℃热休克+肠IR组(42IR, n = 10). 鼠抗诱导型HSP70(HSP72)mAb(SPA-810)购自美国Stressgen公司，鼠抗β-actin mAb购自南京建成生物工程研究所，DAB显色试剂购自武汉博士得生物工程公司，caspase-3 Colorimetric Assay购自美国R&D公司，Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自美国ACTGene公司，细胞凋亡原位末端标记法(TUNEL)试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司，流式细胞仪：EPICSXL型，美国库尔特公司，酶标仪：Stat Fax-2100型，美国Awareness；低温高速台式离心机：美国ICE公司；光学显微镜：Olympus B×41型.

1.2 方法

1.2.1 整体动物热休克反应模型和肠缺血-再灌注(IR)损伤模型的复制：整体动物热休克反应模型的复制：大鼠用30 g/L戊巴比妥钠(1.5 mL/kg体质量)麻醉后，置55℃-58℃恒温水浴箱中，使其肛温在20 min内升至41.5℃-42℃后，转至42℃水浴箱中维持10 min，然后置室温恢复24 h后，进行下一步实验. IR损伤模型的复制：大鼠实验前禁食12 h，自由饮水. 手术前ip 30 g/L戊巴比妥钠(1.5 mL/kg体质量)麻醉，经腹正中切口，分离肠系膜上动脉(superior mesenteric. artery, SMA). 10 min后用微动脉夹夹闭SMA，30 min后取出动脉夹，恢复血液灌流. 假手术组只分离不夹闭SMA.

1.2.2 外周血样本采集，白细胞悬液制备及白细胞计数：于再灌注60 min及相应时点，抽取颈总动脉血2 mL于肝素试管中，2000 r/min离心10 min. 吸取中间的白细胞层，先后加入18 g/L生理盐水和预冷PBS缓冲液，离心收集白细胞. 于SMA夹闭前，夹闭30 min、再灌注30 min、再灌注60 min，分别取鼠尾血20 μL计算白细胞数.

1.2.3 肠组织样本及肠黏膜的采集：再灌注60 min及相应时点，自回盲部近端距回盲瓣10 cm处截取2 cm长度的小肠，100 g/L甲醛溶液中固

定后常规病理切片, HE染色观察肠组织形态学变化. 距回盲瓣12 cm处截取足够长度的小肠, 置预冷的生理盐水中, 纵向剖开, 轻柔漂洗2-3次, 刮取肠黏膜, 置-80℃冰箱贮存备用.

1.2.4 HSP72, 肠黏膜上皮细胞凋亡, 肠黏膜caspase-3活性和外周血白细胞凋亡和中性粒细胞凋亡比例检测: Western blot检测HSP72表达, 提取肠黏膜蛋白, 考马斯亮蓝(Bradford)法进行蛋白定量. 将样品的蛋白浓度调整一致, 取30 μL上样, 100 g/L Tris-甘氨酸SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳. 电泳后转至PVDF膜上, 以20 g/L牛血清白蛋白封闭后, 一抗封闭4 h, 辣根过氧化物酶标记的二抗封闭1 h, β-actin为内对照, DAB显色. 用Scion Image软件计算HSP72的灰度值和β-actin的灰度值, 检测样本HSP72表达水平即HSP72灰度值/β-actin灰度值. TUNEL检测肠黏膜上皮细胞凋亡. 石蜡切片常规脱蜡至水, 3 mL/L H_2O_2封闭30 min, 切片滴加蛋白酶K(20 mg/L), 37℃ 15 min, 修复抗原. PBS洗3 min×3次, 滴加50 g/L小牛血清白蛋白, 37℃, 15 min, 封闭非特异性反应. 滴加TUNEL反应液20 μL(terminal deoxynucleotidyltransferaseTdT 2 μL, 荧光素连接的核苷酸混合缓冲液18 μL)置湿盒内, 37℃孵60 min, PBS洗3次, 加ConverterPOD于37℃ 30 min, PBS洗3次, 镜控下DAB显色. 胞核呈棕褐色即用自来水流水冲洗, 苏木精复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树胶封片[14-15]. 高倍镜下见胞核呈棕褐色的细胞为凋亡细胞. 选5个高倍视野分别计数其凋亡细胞数和总细胞数, 以凋亡细胞数/总细胞数×100%作为凋亡指数. 肠黏膜caspase-3活性检测按试剂盒说明书进行操作, 用Stat Fax-2100型酶标仪, 波长 = 405 nm, 读取各孔吸光度值. 检测样本的caspase-3活性值即样本孔的吸光度值-对照孔的吸光度值. 外周血白细胞凋亡和中性粒细胞凋亡比例检测按试剂盒说明书操作. 收集1×10^6个外周血白细胞, 用100 μL染色液重悬细胞, 混匀后置15℃-25℃避光孵育10-15 min, 加入AnnexinV结合缓冲液, 通过流式细胞仪(Ex = 488 nm, Em = 530 nm)FL1通道检测AnnexinV-FITC荧光信号. FL2通道检测PI荧光信号. 计算右下角+右上角细胞比例为样本总的凋亡比例.

统计学处理 实验结果以mean±SD表示. 采用SPSS10.0统计软件对数据进行分析, 计量资料采用析因设计方差分析进行统计学分析, 白细胞计数变化采用重复测量方差分析. 以P<0.05判断为有统计学意义.

2 结果

2.1 大体改变和肠黏膜形态学变化 IR组和42IR组在夹闭SMA后, 见肠系膜血管搏动消失且肠壁由红润变为苍白. 松夹开放血管恢复血液再灌注后, 血管搏动恢复, 肠壁迅速充血. 再灌60 min时发现IR组肠明显淤血水肿, 部分肠段见点状出血, 腹腔可见大量积液. 而42IR组未见明显损伤表现, 少见轻度淤血, 偶见腹腔有少量液体. CTRL组和42C组未见损伤表现. 病理检测发现4组中IR组损伤最重, 镜下可见大量上皮细胞脱落, 绒毛水肿明显, 腺体明显受损, 有出血, 上皮下间隙明显增大, 固有层水肿、充血. 42IR组损伤明显减轻, 腺体轻度受损、少量脱落, 绒毛轻度水肿, 少见上皮下间隙扩大. CTRL组与42C组未见损伤表现(图1).

2.2 肠黏膜上皮细胞凋亡(TUNEL法)及Caspase-3活性检测 TUNEL法检测发现IR组见较密集的染色为棕褐色的凋亡上皮细胞, 42IR组只见较为稀疏的凋亡上皮细胞, CTRL组与42C组见到个别凋亡上皮细胞(图2). 4组大鼠肠黏膜上皮细胞凋亡指数比较见图3A, caspase-3活性值比较见图3B.

2.3 诱导型HSP70(HSP72)在大鼠肠黏膜组织中的表达 再灌注60 min及相应时点, 分别刮取各组大鼠回肠肠黏膜, Western blot检测肠黏膜HSP72蛋白的表达. 如图4所示, 热休克预处理组(42C、42IR)HSP72蛋白的表达较未经热休克处理组(CTRL、IR)显著增高. 该结果显示热休克反应模型的复制是成功的.

2.4 外周血白细胞改变

2.4.1 外周血白细胞数量的改变: IR组缺血30 min外周血白细胞数量就明显增高, 再灌注30 min增高更明显, 与缺血前相比有显著差异(P<0.05). 再灌注60 min时外周血白细胞数量维持在高水平, 与42IR组有显著差异(P<0.05). 42IR、42C、CTRL组各时相点外周血白细胞数量无差异(图5).

2.4.2 外周血白细胞和中性粒细胞凋亡比例(Anexin-V/PI法): 采用Anexin-V/PI法, 流式细胞仪检测4组大鼠外周血白细胞凋亡比例, 结果显示, IR组外周血白细胞和中性粒细胞凋亡比例显著降低. 42IR组与42C组、CTRL组无明显差别(图6).

2.5 相关分析结果 直线相关分析显示, 肠黏膜

■相关报道

以往研究发现HSPs通过多种途径对肠IRI发挥效应. 小肠移植大鼠供体预先诱导HSP72的表达, 可减少肠黏膜细胞凋亡. 热应激诱导HSP70表达保护肠IRI黏膜结构和功能与其降低IRI对Ach作用的抑制有关.

■**创新盘点**
本文发现全身热休克预处理对肠IRI的保护作用机制可能与其抑制外周血白细胞的凋亡障碍有关. 肠黏膜细胞在热诱导HSP72蛋白表达的基础上, 不仅能够耐受肠缺血-再灌注所致的损伤, 且缺血-再灌注作为一新的应激原可以增强热休克处理的作用, 诱导细胞表达更多的HSP72.

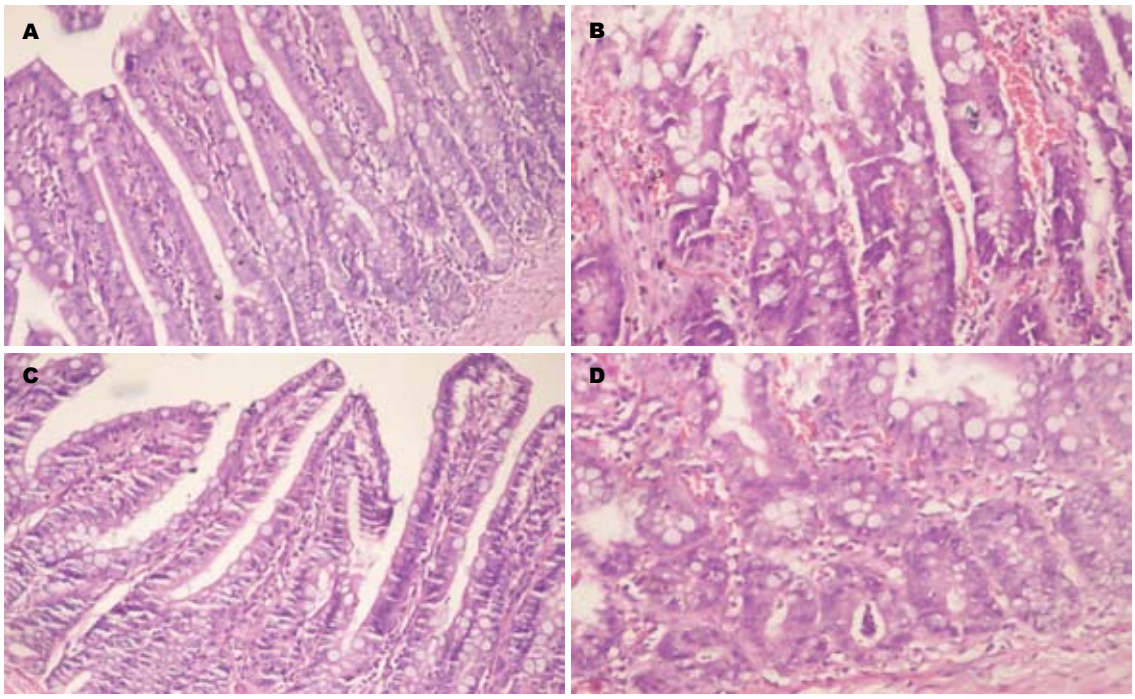


图 1 4组大鼠小肠黏膜形态学变化(HE × 160). A: CTRL组; B: IR组; C: 42C组; D: 42IR组.

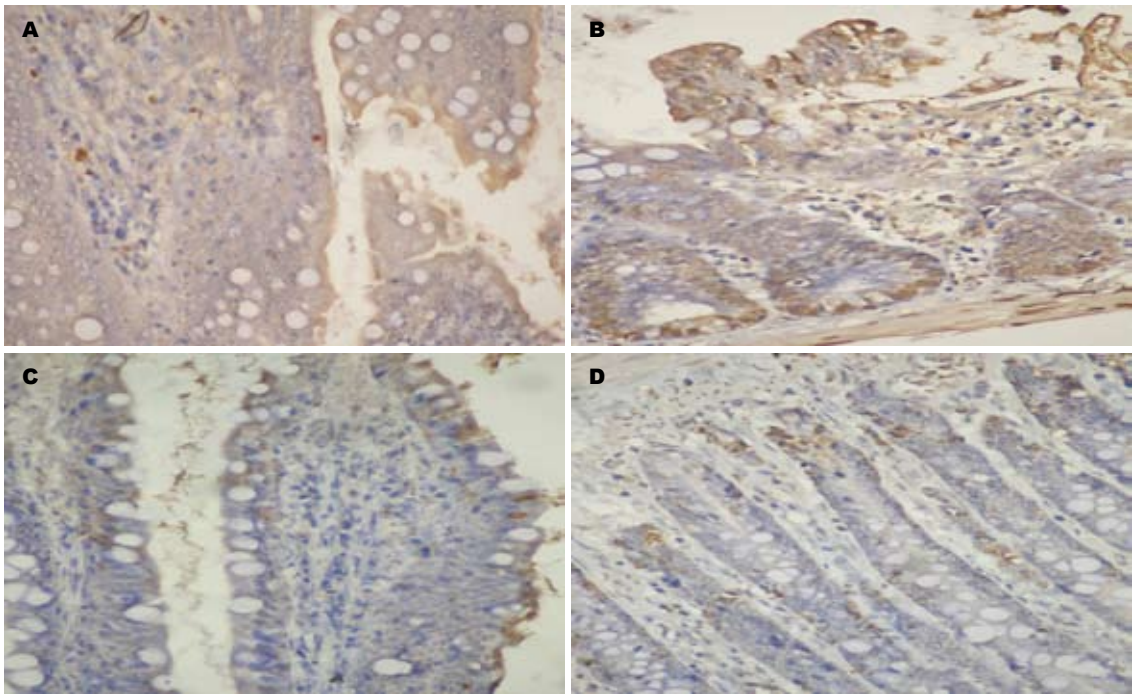


图 2 4组大鼠小肠黏膜上皮细胞凋亡检测(TUNEL × 160). A: CTRL组; B: IR组; C: 42C组; D: 42IR组.

■**应用要点**
本研究提示, 全身热休克预处理对肠IRI的保护作用机制可能与增加热休克诱导HSP72的表达和抑制外周血白细胞激活有关, 为临床正确诱导HSPs以防治肠IRI提供新的治疗思路和策略.

上皮细胞凋亡指数、肠黏膜caspase-3活性值与肠黏膜HSP72蛋白的表达水平无相关(r = -0.278, r = -0.393, P>0.05).

3 讨论

从原核生物到人类, 所有的生物机体都能在多种应激原的作用下产生一系列细胞应激反应, 快速表达多种热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)[16-17]. 研究表明, 应激诱导机体表达HSPs, 可以耐受其他不利因素对机体细胞的损伤[18]. 诱导型HSP70(HSP72)可以作为应激反应的标志, 是HSPs中最受关注的一种[19]. 全身热处理(41.5-42℃)是经典的热休克反应模型, 能诱导HSPs表达, 尤以HSP70表达最丰富, 细胞应激后

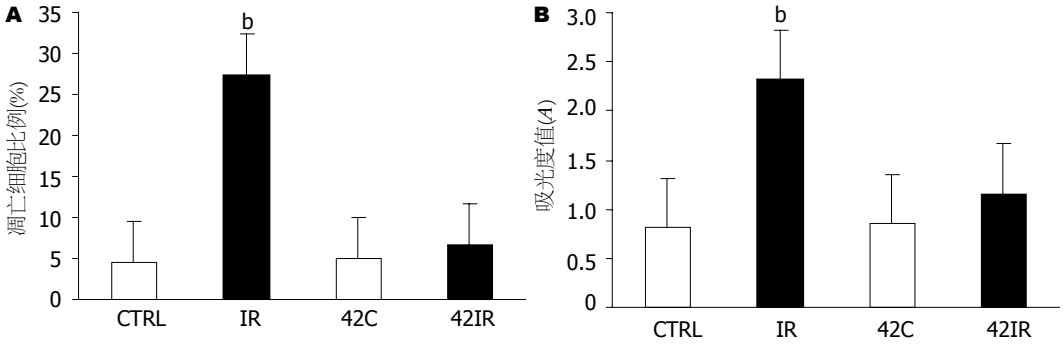


图 3 4组大鼠肠黏膜细胞凋亡检测值比较. A: 肠黏膜上皮细胞凋亡指数比较; B: 肠黏膜caspase-3活性值比较; $^{b}P<0.01$ *vs* CTRL、42C、42IR组.

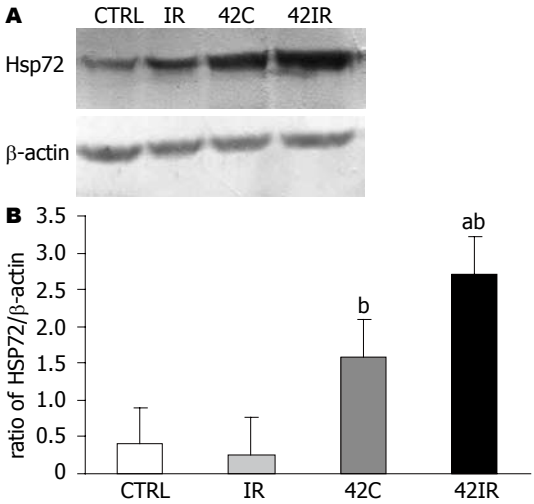


图 4 热休克反应对大鼠肠黏膜中HSP72蛋白表达的影响. A: Western blot检测4组大鼠肠黏膜中HSP72蛋白的表达, 以β-actin作为内对照; B: 对图4A的统计学分析; $^{a}P<0.05$ *vs* 42C组, $^{b}P<0.01$ *vs* CTRL、IR组.

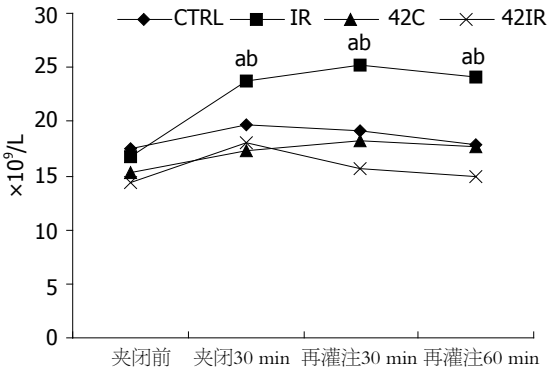


图 5 4组大鼠外周血白细胞计数变化趋势图. $^{a}P<0.05$ *vs* 夹闭前比, $^{b}P<0.01$ *vs* 42IR组.

生成最显著[19].

我们给部分大鼠进行全身热休克处理后检测肠黏膜HSP72的表达, 结果热休克处理组HSP72表达水平较未经热处理组显著增加. 因此, 本实验中整体动物热休克模型的复制是成功的. 同时实验结果还显示, 42IR组肠黏膜HSP72蛋白的表达水平较42C组明显增加, 提示肠黏膜细胞在热诱导HSP72蛋白表达的基础上, 不仅能够耐受IR所致的损伤, 且IR作为一新的应激原可以增强热休克处理的作用, 诱导细胞表达更多的HSP72. 其确切机制有待阐明.

为探讨全身热休克预处理对肠IRI的作用, 我们对经热休克预处理的大鼠复制IRI模型, 同时观察肠黏膜形态学变化、检测肠黏膜上皮细胞凋亡指数、肠黏膜细胞caspase-3活性、外周血白细胞计数及外周血白细胞和中性粒细胞凋亡比例的变化.

实验结果显示, 经热休克预处理的大鼠在IR后肠黏膜病理形态学的改变较未经热处理组明显减轻, 肠黏膜上皮细胞凋亡指数和肠黏膜细胞caspase-3活性明显下降, 与42C和CTRL组无差异. 表明全身热休克预处理对肠IRI有保护作用, 这种保护效应与热休克诱导HSP72表达增加有关. 以往的研究发现, 热应激后细胞产生的HSPs, 能对其他应激原产生交叉耐受而发挥细胞保护效应[20], 可诱导性HSP的表达增加和增强细胞抗凋亡作用[21]. HSP70能抑制通过Fas传导通路诱导的caspase-8/3的活化而防止细胞凋亡[22]. Baba *et al*[23]的研究却发现, 绵羊心肌HSP72表达增加与TUNEL指数呈正相关, 同时发现表达HSP72的细胞个体并不能预防其本身发生凋亡. 本试验结果显示, 肠黏膜HSP72蛋白的表达水平与肠黏膜上皮细胞凋亡指数没有显著的相关(r = -0.278, P = 0.05), 与caspase-3活性值也没有显著的相关(r = -0.393, P = 0.05), 这与以往在其他组织中的研究结果不一致. 说明HSP72表达与细胞凋亡指数的关系非常复杂, HSP72可能不是直接起抗凋亡作用, 而是通过抑制白细胞或其他途径间接起作用.

■名词解释

热休克蛋白(HSPs): 高温环境可以诱发基因转录合成HSPs. 目前已发现HSPs有30余种, 按分子量大小将其分为HSP90, HSP70, HSP60及小分子量HSP等4个家族. HSP70是HSPs中最受关注的一种, HSP70家族主要包括结构型HSP70(HSP73)和诱导型HSP70(HSP72). 在非应激状态下, HSP73就有表达而HSP72几乎不表达.

■同行评价
本文实验设计合理, 选择的指标及检测方法科学, 有一定的创新性, 具有较强的学术价值.

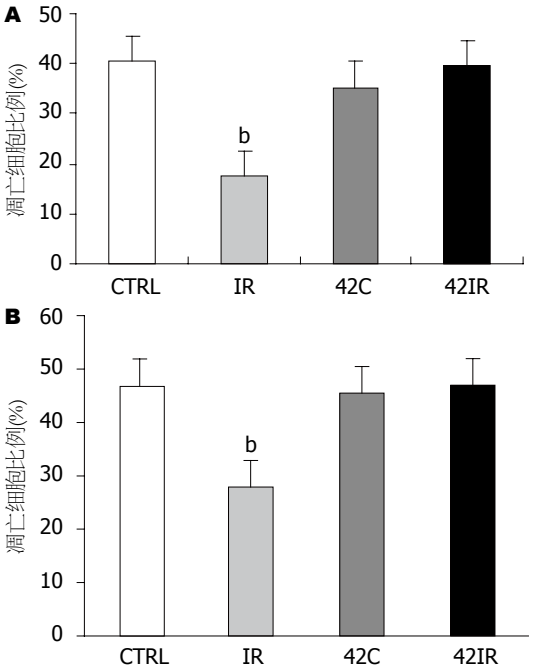


图 6 4组大鼠外周血白细胞和中性粒细胞凋亡比例比较. A: 白细胞凋亡比例比较; B: 中性粒细胞凋亡比例比较; $^{b}P<0.01$ *vs* CTRL、42C、42IR组.

同时检测外周血白细胞计数、外周血白细胞和中性粒细胞凋亡比例, 发现热休克预处理组外周血白细胞计数、外周血白细胞和中性粒细胞凋亡比例与IR组有显著差异. 热休克预处理组外周血白细胞计数比IR组低, 但外周血白细胞和中性粒细胞凋亡比例比IR组高, 说明全身热休克预处理能抑制体内外周血白细胞的活化. 正常情况下, 白细胞以及中性粒细胞会自动启动凋亡程序而发生凋亡. 这一过程不释放蛋白酶和炎症介质, 是机体炎症消散的主要途径. 目前已知, 创伤感染等情况下, 白细胞以及中性粒细胞凋亡障碍是导致SIRS或MODS的重要原因[24]. 激活的白细胞特别是中性粒细胞一方面通过释放趋化因子和上调炎性细胞因子的表达, 参与介导SIRS和MODS的发生发展; 另一方面通过释放氧自由基和蛋白酶等物质, 直接损伤血管内皮细胞和脏器实质细胞. 导致活性氧类介质产生的氧化酶机制被认为是中性粒细胞引起组织损伤的主要因素[25]. 本实验结果提示, 全身热休克预处理对肠IRI的保护作用可能通过抑制外周血白细胞的激活, 从而减少氧自由基、细胞因子释放, 抑制炎症反应, 或通过某种途径抑制肠黏膜细胞凋亡保护肠黏膜.

总之, 全身热休克预处理能抑制大鼠体内外周血白细胞的活化, 抑制肠黏膜caspase-3的活性, 显示对肠IRI有保护作用. 这种保护效应可能与增加热休克诱导HSP72的表达和抑制外周血白细胞的激活有关. 全身热休克预处理及肠IRI过程中, HSP72的增高与肠黏膜上皮细胞凋亡和caspase-3活性之间的关系, 还有待进一步研究.

致谢: 衷心感谢中南大学湘雅医学院病生教研室肖献忠教授和王慷慨副教授在实验条件、实验技术上给予的支持和帮助.

4 参考文献

1 张喜平, 封光华. 小肠缺血再灌注损伤研究进展. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1332-1334
2 Deitch EA, Xu D, Kaise VL. Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review. *Front Biosci* 2006; 11: 520-528
3 Cooper D, Russell J, Chitman KD, Williams MC, Wolf RE, Granger DN. Leukocyte dependence of platelet adhesion in postcapillary venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: H1895-H1900
4 Mbachu EM, Klein LV, Rubin BB, Lindsay TF. A monoclonal antibody against cytokine-induced neutrophil chemoattractant attenuates injury in the small intestine in a model of ruptured abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg* 2004; 39: 1104-1111
5 Sisley AC, Desai T, Harig JM, Gewertz BL. Neutrophil depletion attenuates human intestinal reperfusion injury. *J Surg Res* 1994; 57: 192-196
6 Okada M, Hasebe N, Aizawa Y, Izawa K, Kawabe J, Kikuchi K. Thermal treatment attenuates neointimal thickening with enhanced expression of heat-shock protein 72 and suppression of oxidative stress. *Circulation* 2004; 109: 1763-1768
7 Attuwaybi BO, Hassoun HT, Zou L, Kozar RA, Kone BC, Weisbrodt NW, Moore FA. Hypothermia protects against gut ischemia/reperfusion-induced impaired intestinal transit by inducing heme oxygenase-1. *J Surg Res* 2003; 115: 48-55
8 Uchinami H, Yamamoto Y, Kume M, Yonezawa K, Ishikawa Y, Taura K, Nakajima A, Hata K, Yamaoka Y. Effect of heat shock preconditioning on NF-kappaB/I-kappaB pathway during I/R injury of the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G962-G971
9 Hiratsuka M, Yano M, Mora BN, Nagahiro I, Cooper JD, Patterson GA. Heat shock pretreatment protects pulmonary isografts from subsequent ischemia-reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17: 1238-1246
10 Sugiura M, Kuwabara Y, Mitani M, Sato A, Shinoda N, Kimura M, Yano M, Mitsui A, Suzuki T, Fujii Y. Effect of whole body hyperthermia on ischemia and reperfusion injury of rat intestine: real-time ATP change studied using (31)P-MRS. *Eur Surg Res* 2002; 34: 306-312
11 Sakamoto N, Kokura S, Okuda T, Hattori T, Katada K, Isozaki Y, Nakabe N, Handa O, Takagi T, Ishikawa T, Naito Y, Yoshida N, Yoshikawa T. Heme oxygenase-1 (Hsp32) is involved in the protection of small intestine by whole body mild hyperthermia from ischemia/reperfusion injury in rat. *Int J Hyperthermia* 2005; 21: 603-614
12 Fleming SD, Starnes BW, Kiang JG, Stojadinovic A, Tsokos GC, Shea-Donohue T. Heat stress protection against mesenteric I/R-induced alterations in

intestinal mucosa in rats. *J Appl Physiol* 2002; 92: 2600-2607
13 Stojadinovic A, Kiang J, Smallridge R, Galloway R, Shea-Donohue T. Induction of heat-shock protein 72 protects against ischemia/reperfusion in rat small intestine. *Gastroenterology* 1995; 109: 505-515
14 陈卫兵, 秦永文, 丁鸿钧, 陆良勇, 张国元, 姜远英, 殷明. 用TUNEL法原位检测高血压大鼠心肌细胞凋亡. 第二军医大学学报 1999; 20: 377-379
15 Vyas D, Robertson CM, Stromberg PE, Martin JR, Dunne WM, Houchen CW, Barrett TA, Ayala A, Perl M, Buchman TG, Coopersmith CM. Epithelial apoptosis in mechanistically distinct methods of injury in the murine small intestine. *Histol Histopathol* 2007; 22: 623-630
16 Putics A, Végh EM, Csermely P, Sőti C. Resveratrol Induces the Heat-Shock Response and Protects Human Cells from Severe Heat Stress. *Antioxid Redox Signal* 2008; 10: 65-76
17 Graner MW, Cumming RI, Bigner DD. The heat shock response and chaperones/heat shock proteins in brain tumors: surface expression, release, and possible immune consequences. *J Neurosci* 2007; 27: 11214-11227
18 Otaka M, Okuyama A, Otani S, Jin M, Itoh S, Itoh H, Iwabuchi A, Sasahara H, Odashima M, Tashima Y, Masamune O. Differential induction of HSP60 and HSP72 by different stress situations in rats. Correlation with cerulein-induced pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1473-1479
19 Gilby KL, Armstrong JN, Currie RW, Robertson HA. The effects of hypoxia-ischemia on expression of c-Fos, c-Jun and Hsp70 in the young rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 48: 87-96
20 Callahan TE, Marins J, Welch WJ, Horn JK. Heat shock attenuates oxidation and accelerates apoptosis in human neutrophils. *J Surg Res* 1999; 85: 317-322
21 Arya R, Mallik M, Lakhotia SC. Heat shock genes - integrating cell survival and death. *J Biosci* 2007; 32: 595-610
22 Zhao Y, Wang W, Qian L. Hsp70 may protect cardiomyocytes from stress-induced injury by inhibiting Fas-mediated apoptosis. *Cell Stress Chaperones* 2007; 12: 83-95
23 Baba HA, Wohlschlaeger J, Stubbe HD, Grabellus F, Aken HV, Schmitz KJ, Otterbach F, Schmid KW, August C, Levkau B, Hinder F. Heat shock protein 72 and apoptosis indicate cardiac decompensation during early multiple organ failure in sheep. *Intensive Care Med* 2004; 30: 1405-1413
24 赵钢, 江伟, 王学敏, 杭燕南. 热应激反应对IL-6所致中性粒细胞凋亡障碍的影响. 上海第二医科大学学报 2004; 24: 891-893
25 吕艺, 盛志勇, 郭振荣, 黎君友, 严鸣, 郑玉清. 肠缺血再灌流大鼠远隔器官受损与中性粒细胞粘附扣留的关系. 中华医学杂志 2001; 81: 244-245

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

欢迎订阅 2008 年《世界华人消化杂志》

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

《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用.

《世界华人消化杂志》2008年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079，国内统一刊号 CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元. 欢迎广大消化科医务工作者及科教研人员、各大图书馆订阅. 联系地址: 100023, 北京市2345信箱. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; http://www.wjgnet.com.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3710-3714
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

幽门螺杆菌*OipA*、*HopX*、*HopW*基因的检测及序列分析

王 华, 邵世和

■背景资料
幽门螺杆菌(*H pylori*)是定植于胃黏膜表面的革兰阴性、生长缓慢的螺旋状微需氧菌. 目前已证实, *H pylori*感染是慢性胃炎、消化性溃疡发生的主要病因, 并与胃癌, MALT淋巴瘤的发生密切相关. 近年来, 我国人群感染率呈上升趋势, 达到60%以上. 因此, *H pylori*致病机制的研究及其感染的合理治疗和预防成为关注的热点.

王华, 邵世和, 江苏大学医学技术学院病原生物系 江苏省镇江市 212013
王华, 江苏大学在读博士, 主要从事幽门螺杆菌致病性的研究.
江苏省科技厅资助项目, No. BS2004021
江苏大学高级人才资助项目, No. JDG2004008
通讯作者: 王华, 212013, 江苏省镇江市, 江苏大学医学技术学院病原生物系. wangjiahan1979@163.com
收稿日期: 2007-05-11 修回日期: 2007-11-02

Detection and analysis of *OipA*, *HopX* and *HopW* of *Helicobacter pylori*

Hua Wang, Shi-He Shao

Hua Wang, Shi-He Shao, Department of Medical Microbiology and Parasitology, Medical Technology College, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China
Supported by: the Research Program of Jiangsu Provincial Technology Commission, No. BS2004021 and the Advanced Talent Research Program of Jiangsu University, No. JDG2004008
Correspondence to: Hua Wang, Department of Medical Microbiology and Parasitology, Medical Technology College, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu Province, China. wangjiahan1979@163.com
Received: 2007-05-11 Revised: 2007-11-02

Abstract

AIM: To detect three genes of *Helicobacter pylori* (*H pylori*) outer membrane proteins in NCTC11637 and clinical strains, and to make a homologous comparison of the nucleotides in strains 26695 and J99.

METHODS: The three genes were detected with PCR in *H pylori* strains NCTC11637 and 27. The PCR products were sent for nucleotide sequence analysis, and compared with those in strains 26695 and J99 using GenBank.

RESULTS: The sequences of the genes of interest were obtained in strain NCTC11637. Among 27 clinical samples, *OipA* and *HopX* genes were detected in 10 and 23 *H pylori* strains, respectively. Only the *HopW* gene was obtained in 27 *H pylori* strains. Moreover, in NCTC11637, the homology of the *OipA* gene between NCTC11637 and 26695, and J99 in nucleotide acid was 95.38% and 94.60%, respectively, which was lower than the homology between 26695 and J99, at 95.50%. The homology of the *HopX* gene between NCTC11637 and 26695, and J99 in nucleotide acid was 94.90% and 95.15%, respectively, which was lower than the homology between 26695 and J99, at 96.49%. The homology of the *HopW* gene between NCTC11637 and 26695, and J99 in nucleotide acid was 97.38% and 94.90%, respectively. The homology between 26695 and J99 was 95.20%.

CONCLUSION: The gene sequences can be obtained in NCTC11637 and clinical strains. The *HopW* gene sequence is conservative.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Outer membrane protein; *OipA* gene; *HopX* gene; *HopW* gene; PCR

Wang H, Shao SH. Detection and analysis of *OipA*, *HopX* and *HopW* of *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3710-3714

摘要

目的: 检测幽门螺杆菌(*H pylori*)标准菌株NCTC11637及临床菌株外膜蛋白的三种基因(*OipA*、*HopX*、*HopW*)及比较NCTC11637中三种基因与国际标准菌株(26695和J99)的同源性, 为*H pylori*疫苗的筛选提供实验依据.

方法: 运用PCR方法检测标准菌株NCTC11637及27例临床菌株中的三种基因, 并对其进行测序. 运用GenBank比较与国际标准菌株(26695和J99)的同源性.

结果: 在标准菌株NCTC11637中检测到三种基因. 在27例临床菌株中, 有10例检测到*OipA*基因. 在23例中检测到*HopX*基因, 在27例中均检测到*HopW*基因. NCTC11637中*OipA*基因与26695和J99的核苷酸序列同源性分别为95.38%、94.60%, 均低于两株国际标准菌株的同源性95.50%. *HopX*基因的同源性分别为94.90%和95.15%, 同样低于两株国际标准菌株的同源性96.49%. *HopW*基因与26695和J99的同源性分别为97.38%、94.90%, 两株标准菌株的同源性为95.20%.

结论: 在标准菌株NCTC11637和临床菌株中检测到三种基因. *H pylori HopW*基因核苷酸序列具有一定的保守性.

关键词: 幽门螺杆菌; 外膜蛋白; *OipA*基因; *HopX*基因; *HopW*基因; 聚合酶链式反应

王华, 邵世和. 幽门螺杆菌*OipA*、*HopX*、*HopW*基因的检测及序列分析. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3710-3714
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3710.asp

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)的全基因组序列显示, 在其95个平行基因家族中存在着一个庞大的外膜蛋白(*H pylori* outer membrane protein, Hop)家族, 编码黏附素样蛋白、前炎症蛋白、微孔蛋白等[1-2]. 他们在诊断、保护性免疫和致病性等方面的意义已逐渐引起国内外学者们的关注. 前炎症蛋白(outer inflammatory protein, OipA)作为*H pylori*的外膜蛋白之一, 其重要性日益受到关注. 有研究表明其在*H pylori* 感染致病上的重要性甚至超越传统认识上的CagA[3]. 而对于HopX和HopW, Peck *et al*[4]用其重组体免疫小鼠, 结果得到血清中的抗体是特异的. 目前对于他们的功能和致病性还不是很清楚. 国内外关于*OipA*、*HopW*和*HopX*基因的研究文献报道很少. 本研究运用PCR方法, 对标准菌株NCTC11637和临床菌株三种基因进行检测、测序并对其编码基因与国际标准菌株26695与J99进行同源性比较分析, 以探索研制*H pylori*疫苗的新途径.

1 材料和方法

1.1 *材料* 菌种NCTC11637购自中国预防科学院流行病学研究所, 哥伦比亚培养基、厌氧袋购自Oxoid公司, Taq酶、dNTP、marker(DL2000、DL15000)购自TaKaRa公司, marker(DL200)购自Gereray公司, PCR基因扩增仪(Mastercycler Gracent, Eppendor公司), 自动凝胶成像系统(美国UVP公司). 其他常规试剂按照《分子克隆实验指南》要求配置.

1.2 *方法* NCTC11637标准菌株按常规微需氧方法培养. 临床菌株分离培养: 将尿素酶试验阳性的胃溃疡和十二指肠溃疡患者的胃黏膜活检组织直接涂布于哥伦比亚培养基上, 置37℃微需氧培养, 96 h后挑取可疑菌落进行革兰染色及生化反应鉴定. *H pylori*鉴定标准: 革兰染色阴性的

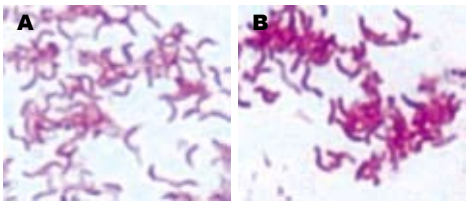


图 1 标准菌珠和临床菌株的形态与染色性. A: NCTC 11637; B: 临床菌株.

S形、弧形、海鸥形细菌, 其尿素酶、氧化酶、触酶试验为阳性. 按照《分子克隆实验指南》提取基因组*H pylori*染色体DNA, -20℃保存备用. 根据GenBank中已报道的*H pylori* 26695的*OipA*和*HopX*、*HopW*基因的序列设计引物, 由上海博亚公司合成. 其序列及其反应条件(表1, 表2). PCR产物经14 g/L琼脂糖凝胶电泳分析鉴定, 用标准菌株NCTC11637的反应体系及反应条件检测临床菌株中的*OipA*、*HopX*及*HopW*基因. 将NCTC11637的*OipA*、*HopX*及*HopW* PCR产物送往TaKaRa公司进行核苷酸序列测定, 其测序结果通过GenBank与*H pylori*国际标准菌株26695与J99相对应的基因进行核苷酸序列比对.

2 结果

2.1 *幽门螺杆菌的分离培养与鉴定* 培养96 h的NCTC11637、*H pylori*1和*H pylori*2革兰染色后, 油镜下可见海鸥状、弧形、S形的革兰阴性菌(图1).

2.2 *PCR扩增产物三种基因琼脂糖凝胶电泳* 根据三种基因(*OipA*、*HopX*及*HopW*)的PCR反应条件及反应体系, 以标准菌株和临床菌株DNA为模板, 扩增反应片段. 反应结束后, 用14 g/L的琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可见反应条带分别在800-1000 bp之间(大约在900 bp左右)和1000-2000 bp之间(大约在1200 bp左右). 在1000 bp 左右, 为目的条带(图2).

2.3 *OipA*、*HopX*及*HopW*基因临床菌株的来源及检测结果 取100例胃黏膜标本, 检测并培养出*H pylori*阳性的标本27例. 提取基因组DNA, 按上述条件、方案, 检测临床菌株*OipA*、*HopX*及*HopW*基因. 可见12例十二指肠溃疡中4株检测出*OipA*基因, 7例胃溃疡中检测出6株, 而在胃炎和胃癌病例中均未检测到*OipA*基因. 对于*HopX*基因, 在27例中只有4例阴性, 其中3例来源于十二指肠溃疡, 1例是胃炎. 只有*HopW*基因在27例中均检测到. NCTC11637 PCR(*OipA*、*HopX*及*HopW*基因)测序结果分别与标准菌株

■创新盘点
本文运用PCR方法, 对标准菌株NCTC11637和临床菌株3种基因进行检测, 测序并对其编码基因与国际标准菌株26695与J99进行同源性比较分析, 探索研制*H pylori*疫苗的新途径.

■应用要点
本文为*H pylori*致病机制的探讨和疫苗的研发提供了依据.

表 1 基因及引物序列

基因	引物序列
OipA	5'-CCGGATCCATGAAAAAAGCTCTCTTACT-3'
	5'-CGCGGCTCGAGTTAATGTTTGTTTTTAAAGTT-3'
HopX	5'-AAAAGGATCCGAAGACGATGGCTTTTATATGGGA-3'
	5'-AAAACTCGAGTTAAAAACCTATCGTGTAGTTGAT-3'
HopW	5'-AAAAAAGGTACCCATGAAAAGAATGGCGCGTTTGTG-3'
	5'-AAAAAAAAGCTTTTATCAAAAAGTATAAACATAGCGCAA-3'

26695, J99相应的基因序列进行同源性比较, 结果为NCTC11637中*OipA*基因与两株国际标准菌株26695和J99的核苷酸序列同源性分别为95.38%、94.60%, 26695和J99为95.50%. *HopX*基因的同源性分别为94.90%和95.15%, 26695和J99为96.49%, *HopW*基因与26695和J99的同源性分别为97.38%、94.90%, 26695和J99为95.20%.

3 讨论

*H pylori*自1994 年被国际癌症研究机构定为Ⅰ类致癌原后受到国内外学者的普遍重视[5]. 以往对*H pylori*的研究多集中在尿素酶和细胞相关毒素、空泡毒素等方面. 然而, *H pylori*的全基因组序列显示, 在其95个平行基因家族中存在着一个庞大的外膜蛋白家族, 如黏附素样蛋白和前炎症蛋白、微孔蛋白等.

*OipA*是一种编码相对分子量为34 kDa的幽门螺杆菌外膜蛋白基因, 又称*HopH*, 基因位置HP0638, 编码产物称前炎症蛋白*OipA*. 早在1998年, Yamaoka *et al*[6]就发现分子量界于33-35 kDa的外膜蛋白与IL-8的水平呈正相关, 而这种相关性是与其他抗原包括CagA在内都无关. 在2000年, Yamaoka做了进一步的研究, 发现HP0638突变株诱导IL-8的量明显减少可达50%, 因此将HP0638基因定名为*OipA*[7]. 还有学者发现HP0638的状态与*CagA*、*vacA*、*iceA*的基因型密切相关[8]. 同时Yamaoka *et al*[9]发现*OipA*的状态是唯一能够将十二指肠溃疡从胃炎中区分出来的指标. 功能性的*OipA*与*H pylori*的密度、中性粒细胞浸润的严重程度以及胃黏膜高水平的IL-8密切相关. 我国学者陈道荣 *et al*对*OipA*基因进行了克隆和序列分析[10].

微孔蛋白为细菌外膜蛋白的一种. 其功能主要是组成亲水样通道, 有选择地允许一些营养物质和小分子通过, 阻止大分子物质和青霉素、溶菌酶等进入细胞[11], 并且是离子进出外膜的主要通路. 此外, 还具有抗原性和致病性. 根据微孔蛋白的理化性质, 组成形式和所处环境的不同, 可以以三聚体或单体形式存在[12]. 三聚体结合牢固, 仅在特殊条件下(如加入SDS前加热至70℃以上)才被裂解. 微孔蛋白的另一个显著特点是他在细菌外膜的高表达, 有些细菌的每个细胞可达10^4-10^6拷贝[7]. 这些特点使微孔蛋白具有高度特异性和可变性, 发挥着多种生物学功能. 他与宿主细胞的凋亡, 信号传导及细菌致病性方面都有一定的关系.

微孔蛋白可为特异性和非特异性2个类型. 非特异性的微孔蛋白具有较宽的孔道, 而特异性的微孔蛋白有特异性的底面结合位点, 其传导力只是非特异性的十分之一. *H pylori*中非特异性的微孔蛋白HopE[1]、HopV和HopX孔道的传导力分别为1.5、1.4和3.0 ns, 而特异性的微孔蛋白HopA、HopB、HopC和HopD的传导力分别为0.36、0.36、0.32和0.24[13]. 虽然目前关于*HopW*和*HopX*的功能还不是很清楚, 但与*H pylori*其他基因不同的是在*HopW*和*HopX*的启动区域没有核苷酸结构的重复及G、C含量的聚集[1,14]. 因此, 在*H pylori*感染的各个阶段均有其蛋白产物的表达. 此外, Peck *et al*[4]用*HopW*和*HopX*的重组体免疫小鼠, 结果得到血清中的抗体是特异的, 没有其他的外膜蛋白抗体, 说明这个保守序列不包含其他的抗原决定簇. 而且, 在免疫荧光实验的检测中, 增加*HopW*的孵育时间产生了明显的信号.

疫苗抗原编码基因的保守性是决定抗原免疫保护率的重要因素. 但目前对多数*H pylori*基因的研究结果表明, *H pylori*不同菌株间基因变异非常大. 因此, 掌握多种*H pylori*不同分离株中同一基因的同源关系, 能够为疫苗抗原的基因筛选提供重要依据.

本实验运用PCR方法在标准菌株NCTC 11637中检测到三种基因. 在27例临床菌株中, 有10例检测到*OipA*基因, 在23例中检测到*HopX*基因, 而*HopW*基因在27例中均被检测

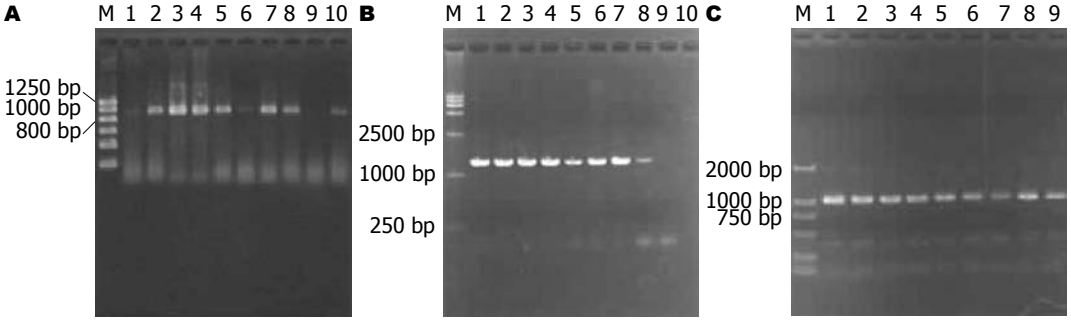


图 2 琼脂糖电泳分析标准菌珠和临床菌株*OipA*, *HopX*和*HopW*基因. A: *OipA*基因, Marker 200 bp; B: *HopX*基因; C: *HopW*基因; 1: NCTC11637; 2−10: 临床菌株.

■同行评价
本文选题新颖, 具有一定的创新性, 结果真实可靠, 符合逻辑.

表 2 反应体系及条件

Gene	反应体系	反应条件
OipA	50 μL反应体系(10×buffer 5 μL、dNTP 4 μL、DNA模板2 μL、浓度为10 μmol/L的引物各1 μL、2 min、72℃ 55 s, 72℃ 7 min Taq聚合酶0.25 μL、ddH_2O 36 μL	94℃ 4 min, 94℃ 2 min、51.7℃ 2 min、72℃ 55 s, 72℃ 7 min(2−4, 40个循环)
HopX	50 μL反应体系(10×buffer 5 μL、dNTP 4 μL、DNA模板2 μL、浓度为10 μmol/L的引物各1.2 μL、Taq聚合酶0.4 μL、ddH_2O 36 μL	3 min, 94℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 1 min, 72℃ 7 min(2−4, 30个循环)
HopW	50 μL反应体系(10×buffer 5 μL、dNTP 4 μL、DNA模板2 μL、浓度为10 μmol/L的引物各1.2 μL、Taq聚合酶0.4 μL、ddH_2O 36 μL	3 min, 94℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 1 min, 72℃ 7 min(2−4, 30个循环)

到. 标准菌株NCTC11637中*OipA*基因与两株国际标准菌株26695和J99的核苷酸序列同源性分别为95.38%、94.60%, 均低于两株国际标准菌株的同源性95.50%. 而*HopX*基因的同源性分别为94.90%和95.15%, 同样低于两株国际标准菌株的同源性96.49%. 与前两个基因不同的是, *HopW*基因与26695和J99的同源性分别为97.38%、94.90%, 两株标准菌株的同源性为95.20%. 在这三种基因中*HopW*的核苷酸序列同源性高, 而且在27株临床菌株中均检测到了*HopW*基因. 上述结果表明, 标准菌株NCTC11637带有三种基因(*OipA*、*HopX*及*HopW*), 但不同菌株的三种基因序列有所不同, 且不同胃部疾病检测到的三种基因的比例各不相同. 其中, *HopW*基因核苷酸序列的同源性最高, 并且在27例临床菌株中均检测到. *HopW*能否作为疫苗的候选抗原, 其核酸的突变点是否引起氨基酸变化, 是否对其抗原性有影响以及他的免疫源性如何还有待进一步研究.

4 参考文献

1 Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzegerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Watthey L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JC. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. *Nature* 1997; 388: 539-547

2 Alm RA, Bina J, Andrews BM, Doig P, Hancock RE, Trust TJ. Comparative genomics of Helicobacter pylori: analysis of the outer membrane protein families. *Infect Immun* 2000; 68: 4155-4168

3 Graham DY, Opekun AR, Osato MS, El-Zimaity HM, Lee CK, Yamaoka Y, Qureshi WA, Cadoz M, Monath TP. Challenge model for Helicobacter pylori infection in human volunteers. *Gut* 2004; 53: 1235-1243

4 Peck B, Ortkamp M, Nau U, Niederweis M, Hundt E, Knapp B. Characterization of four members of a multigene family encoding outer membrane proteins of Helicobacter pylori and their potential for vaccination. *Microbes Infect* 2001; 3: 171-179

5 NIH Consensus Conference. Helicobacter pylori in peptic ulcer disease. NIH Consensus Development Panel on Helicobacter pylori in Peptic Ulcer Disease. *JAMA* 1994; 272: 65-69

6 Yamaoka Y, Kodama T, Graham DY, Kashima K. Search for putative virulence factors of Helicobacter pylori: the low-molecular-weight (33-35 K) antigen.

Dig Dis Sci 1998; 43: 1482-1487
7 Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of Helicobacter pylori. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 7533-7538
8 Ando T, Peek RM, Pride D, Levine SM, Takata T, Lee YC, Kusugami K, van der Ende A, Kuipers EJ, Kusters JG, Blaser MJ. Polymorphisms of Helicobacter pylori HP0638 reflect geographic origin and correlate with cagA status. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 239-246
9 Yamaoka Y, Kikuchi S, el-Zimaity HM, Gutierrez O, Osato MS, Graham DY. Importance of Helicobacter pylori oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Gastroenterology* 2002; 123: 414-424
10 Chen DR, Huang AL, Tao XH, Wang PL, Jiang Z. Cloning and sequence analysis of gene oipA encoding an outer membrane protein of human Helicobacter pylori. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3205-3207
11 周正任. 医学微生物学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 13-21
12 Koebnik R, Locker KP, Van GP. Structure and functional of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 2000; 37: 239-253
13 Exner MM, Doig P, Trust TJ, Hancock RE. Isolation and characterization of a family of porin proteins from Helicobacter pylori. *Infect Immun* 1995; 63: 1567-1572
14 Haas R, Meyer TF. Vaccine development against Helicobacter pylori infections. *Biologicals* 1997; 25: 175-177

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

关于2006年度山西省期刊质量评估结果的通报

本刊讯 为推动期刊出版事业的繁荣和发展, 中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅共同组织了2006年度期刊质量评估工作. 此次参评的为2005年度山西省出版的196种期刊, 其中, 社科期刊110种、科技期刊86种. 评估结果如下: 一级(优秀)期刊共88种, 其中社科期刊42种, 科技期刊46种, 包括世界胃肠病学杂志和世界华人消化杂志; 二级期刊共103种, 其中社科期刊64种, 科技期刊39种; 三级期刊共5种, 其中社科期刊4种, 科技期刊1种. (中共山西省委宣传部、山西省新闻出版局、山西省科学技术厅)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3715-3721
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

基础研究 BASIC RESEARCH

DNA聚合酶γ的提取、纯化和鉴定

张颖慧, 林菊生, 李 岩, 高琳琳, 王晓燕

张颖慧, 林菊生, 李岩, 高琳琳, 王晓燕, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所 湖北省武汉市 430030
张颖慧, 2005年华中科技大学同济医学院硕士, 主要从事肝脏病学研究.
国家自然科学基金资助项目, No. 30330680
通讯作者: 林菊生, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所. linjusheng2001@163.com
电话: 027-83662578
收稿日期: 2007-09-17 修回日期: 2007-11-06

Isolation, purification and identification of DNA polymerase gamma

Ying-Hui Zhang, Ju-Sheng Lin, Yan Li, Lin-Lin Gao, Xiao-Yan Wang

Ying-Hui Zhang, Ju-Sheng Lin, Yan Li, Lin-Lin Gao, Xiao-Yan Wang, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30330680
Correspondence to: Dr. Ju-Sheng Lin, Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. linjusheng2001@163.com
Received: 2007-09-17 Revised: 2007-11-06

Abstract

AIM: To purify and identify the mitochondrial DNA polymerase gamma (polymerase γ, Pol γ) from HeLa cells.

METHODS: Ion exchange chromatography was used to isolate Pol γ from HeLa cells. Protein concentration was measured using the Bradford method. SDS-PAGE was performed to determine the molecular weights of the subunits of Pol γ. Following the incorporation of α-^{32}P-dTTP, the activity of Pol γ was counted using a liquid scintillation spectrometer.

RESULTS: Pol γ was purified by 150-fold to apparent homogeneity, with a 6% yield. SDS-PAGE indicated the presence of one subunit of 140 kDa, and Western blotting identified the specificity. Total activity and specific activity of Pol γ were determined to be 4.81 U and 36.17 U/mg, respectively, by chromatography.

CONCLUSION: Pol γ can be purified by ion exchange chromatography. It can then be activated and used as a target to detect the toxicity of some compounds to mitochondria *in vitro*.

Key Words: HeLa cells; DNA polymerase γ; Mitochondria; Ion exchange chromatography; Purification

Zhang YH, Lin JS, Li Y, Gao LL, Wang XY. Isolation, purification and identification of DNA polymerase gamma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3715-3721

摘要

目的: 提取并纯化人宫颈癌细胞(HeLa)的线粒体DNA聚合酶γ(DNA polymerase γ, Pol γ), 鉴定其纯度和活性.

方法: 运用离子交换层析等方法提取纯化HeLa细胞的线粒体Pol γ, 并用Bradford法检测蛋白浓度. 经SDS-PAGE检测蛋白纯度和相对分子量, Western blotting验证蛋白. 用α-^{32}P-dTTP掺入法, 液体闪烁计数器进行放射性测量以确定Pol γ的活性.

结果: 成功提取并纯化HeLa细胞的线粒体Pol γ, 经SDS-PAGE鉴定, 有一个大约140 kDa的亚基单位, Western blotting证实为Pol γ. 对其进行150倍纯化, 收得率为6%, 酶的总活力为4.81 U, 比活力为36.17 U/mg.

结论: HeLa细胞的线粒体Pol γ通过离子交换层析法提取和纯化后活性较高, 可用于体外药物线粒体毒性的检测.

关键词: 人宫颈癌细胞; DNA聚合酶γ; 线粒体; 离子交换层析

张颖慧, 林菊生, 李岩, 高琳琳, 王晓燕. DNA聚合酶γ的提取、纯化和鉴定. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3715-3721
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3715.asp

0 引言

DNA聚合酶可以进行严格的DNA复制和修复

■背景资料
DNA聚合酶γ(Pol γ)指导着线粒体DNA的正确合成, 保证线粒体很好行使其功能. 近年来新出现的核苷类抗病毒药物毒副作用主要也作用与Pol γ, 并且与许多疾病的发生(如PEO)密切相关.

■**创新盘点**
本文经过多次离子交换层析得到有活性的纯度较高的Pol γ, 并且将其用做体外抗病毒药物毒性的研究.

DNA损伤, 对于保持基因组的完整性是不可缺少的[1]. 在人类细胞中, 现已发现15种不同的DNA聚合酶, 然而只有4种参与DNA的复制, 余下的参与DNA的修复和特定DNA合成[2-3]. 虽然大部分酶参与核DNA的复制和修复, 然而至今, DNA聚合酶γ(DNA polymerase γ, Pol γ)仍然是线粒体内唯一的DNA聚合酶[4], 由核基因编码[5], 对于线粒体DNA(mtDNA)的复制、合成与修复起着独一无二的作用[2,6].

最近有许多抗病毒核苷类似物如治疗HIV的叠氮胸苷(AZT), 治疗乙肝的拉米呋定(lamivudine)和恩替卡韦(entecavir)等, 在治疗方面起了很大的作用, 但其毒副作用不容忽视. 这些药物的毒副作用主要作用于线粒体, 其中Pol γ对其高度敏感[7]. 很多体外研究表明这些药物可以抑制线粒体DNA聚合酶活性从而影响线粒体DNA的合成, 以至影响线粒体的功能[8-9]. 本研究旨在提取并纯化得到有活性的Pol γ, 以利于以后有关药物对于线粒体毒性的研究.

1 材料和方法

1.1 *材料* HeLa S3细胞来自于本学院免疫教研室, 换液传代后, 按批冻存在-70℃冰箱待用. 层析所需预溶胀DE52填料、磷酸纤维素填料(P11)均为Whatman产品, 羟基磷灰石填料(HTP)为Bio-Rad产品, SDS-PAGE所用装置为Bio-Rad MiNi Protean-Ⅲ电泳系统, 兔抗人聚合酶γ抗体购自Neomarkers. 层析柱购自上海锦华层析设备厂, 规格有1.0×20 cm, 1.6×25 cm, 0.5×20 cm. 检测酶活性所需的活化小牛胸腺DNA购自Sigma, 反应底物dNTP为BioLabs公司产品.

1.2 *方法*

1.2.1 *细胞培养*: 常规HeLa S-3细胞培养, 收集处于对数生长期的细胞, 按照马歇克主编的《蛋白质纯化与鉴定实验指南》制备冰冻细胞－70℃保存.

1.2.2 *细胞碎片制备*: 若未特别说明, 所有实验均在0℃-4℃进行, 洗脱液中均含有0.5 mmol/L二硫苏糖醇(DTT). 将分批冻存的细胞从-70℃冰箱取出约20 g, 冰冻细胞悬浮在含有10 mmol/L NaCl, 1 mmol/L K_3PO_4(pH7.8), 0.5 mmol /L DTT的80 mL溶液中, 零度放置20 min后用匀浆器将细胞破碎, 1000 r/min离心10 min, 分离细胞质和细胞核, 留取上清细胞质组分. 将细胞核重悬在含有0.32 mmol/L蔗糖, 1 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmolL K_3PO_4(pH6.8), 0.3% Triton N-101, 0.5 mmol/L DTT的120 mL溶液中, 匀浆后100 r/min离心10 min, 上清中含有细胞质碎片. 将所得上清与第一次上清混合, 20 000 *g*离心20 min后, 收集上清即为细胞质碎片(含有目的蛋白).

1.2.3 *第一次DEAE除核酸*: 按照说明书, 所用填料的质量根据抽出样品测得的蛋白量决定. 称取一定量的预溶胀DEAE填料, 用0.4 mol/L K_3PO_4(pH7.5)和0.5 mmol/L DTT平衡填料, 用同样的溶液平衡1.0×20 cm柱子. 将100 mL细胞质碎片上柱, 再用10倍柱子填料体积的0.4 mol/L K_3PO_4(pH7.5)和0.5 mmol/L DTT洗脱, 核酸被吸附到柱子上, 酶被洗脱. 将洗脱下来的酶溶液用蔗糖溶液浓缩过夜, 并用0.02 mol/L K_3PO_4(pH7.5)和0.5 mmol/L DTT透析平衡.

1.2.4 *第二次DEAE层析*: 用0.02 mol/L K_3PO_4 (pH 7.5)和0.5 mmol/L DTT平衡填料. 灌柱平衡后, 将透析后所得的溶液加入1.0×20 cm柱子, 用一倍填料体积的0.02 mol/L K_3PO_4(pH7.5)冲洗柱子, 然后用0.05-0.23 mol/L K_3PO_4(pH7.5)的浓度梯度、八倍填料的体积洗脱液洗脱柱子. 分别收集得到的洗脱液后测A_{280}值, 找出洗脱峰. 用大量峰值的K_3PO_4(pH7.5)溶液洗脱柱子, 得到的溶液即为含有Pol γ的洗脱液, 蔗糖溶液浓缩过夜, 再用0.01 mol/L K_3PO_4(pH7.5)和0.5 mmol/L DTT透析平衡.

1.2.5 *磷酸纤维素(P11)层析*: 用0.01 mol/L K_3PO_4(pH7.5)和0.5 mmol/L DTT溶胀P11填料, 灌1.6×25 cm柱平衡过夜. 将从DEAE层析获得的透析后的峰值碎片上柱, 八倍体积的K_3PO_4(pH7.5)洗脱液按浓度梯度0.1-0.28 mol/L冲洗柱子. 根据测得的洗脱成分A_{280}值, 找出洗脱峰对应的K_3PO_4(pH7.5)浓度. 大量此溶液冲洗柱子, 洗脱下来的溶液即为含有Pol γ的溶液, 蔗糖溶液浓缩后用0.05 mol/L K_3PO_4(pH7.5)和0.5 mmol/L DTT透析平衡.

1.2.6 *羟基磷灰石(HTP)层析*: 按照说明书用0.05 mol/L K_3PO_4(pH7.5)和0.5 mmol/L DTT平衡HTP粉剂, 灌入0.5×20 cm柱子待其平衡好后, 将P11层析后经过透析平衡后的溶液上柱, 10倍体积的K_3PO_4(pH7.5)洗脱液按浓度梯度0.05-0.40 mol/L冲洗柱子. 收集洗脱成分测其A_{280}, 用大量出现洗脱峰时的K_3PO_4(pH7.5)溶液洗脱柱子上的吸附蛋白. 收集后放在透析袋中, 用蔗糖晶体浓缩溶液一直到不能再浓缩为止.

1.2.7 *线粒体Pol γ活性检测*: 参照文献[10-11]建立酶活性检测反应体系: 50 μL的反应总溶

液, 其中含有45 mg/L牛血清白蛋白, 50 mmol/L Tris-HCl(pH8.5), 7.5 mmol/L $MgCL_2$, 0.5 mmol/L DTT, 100 μg/mL活化的小牛胸腺DNA作为模板, 100 μmol/L dATP, dGTP, dCTP和α-^{32}P-dTTP 3.7 ×10^4 Bq, 37℃孵育30 min. 酶活性定义为: 37℃反应条件下30 min, 催化结合1 nmol脱氧核苷酸的量.

1.2.8 SDS-PAGE变性聚丙烯酰胺凝胶电泳: 制成分离胶浓度为80 mL/L, 浓缩胶为50 mL/L, 层析后抽出的1 mL样品. 分别抽出一部分将其与上样缓冲液混合, 煮沸后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳. 其中浓缩胶所用电压为80 V, 分离胶为120 V. 电泳结束后, 考马斯亮兰染色过夜, 脱色后在凝胶成像系统下拍照.

1.2.9 Western blot检测Pol γ: 样品按照SDS-PAGE变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结束后进行转膜, 然后用兔抗人聚合酶γ抗体进行一抗孵育, 结束后羊抗兔二抗孵育, 最后用DAB在膜上显色.

2 结果

2.1 人HeLa细胞Pol γ纯化 将破碎细胞离心所得组分上入DEAE柱除去核酸后, 收集得到的洗脱液浓缩测得体积为120 mL, 用考马斯亮兰法测得蛋白浓度为2.1 g/L. 经SDS-PAGE电泳看到一条140 kDa的亚基(图1), 并用Western blot证实其特异性(图2). 所得蛋白透析后用不同浓度梯度的K_3PO_4(pH7.5)经过第二次DEAE层析(图3A),收集峰值的洗脱液, 浓缩后约60 mL, 测得蛋白浓度为0.68 g/L. 透析后上磷酸纤维素柱子(图3A), 出现A_{280}峰值时所用的K_3PO_4(pH7.5)溶液洗脱柱子, 收集得到的洗脱液浓缩后约13 mL, 蛋白浓度为0.22 g/L. 透析后进行羟基磷灰石层析(图3A). 按照图中所示的K_3PO_4浓度梯度洗脱柱子, 收集峰值的洗脱液, 即为最后纯化所得的DNA聚合酶γ, 浓缩到最后溶液约为1.9 mL, 测得其浓度为0.07 g/L. 电泳后在140 kDa处看到一条很浅的条带, Western blotting表明此为线粒体DNA聚合酶.

2.2 人HeLa细胞Pol γ鉴定 在Pol γ的逐步层析纯化中对每一步浓缩后的蛋白进行电泳(图1)鉴定其纯度, 发现其杂蛋白条带逐渐减少, 其目的蛋白的一个亚基(140 kDa)条带颜色逐步变浅, 证明其蛋白得到了有效的纯化. 进行Western blot印迹(图2)特异性结合鉴定其为Pol γ. 在纯化过程中每次层析后测得其总蛋白、总活力、比活力、纯化倍数及蛋白收得率, 结果显示酶的活力虽然逐渐降低, 但是其比活力、纯化倍数却逐渐增高, 获得率逐渐降低, 表明目的蛋白得到了逐步的纯化, 杂蛋白量渐少(表1, 图1). 纯化完后蛋白的纯化倍数为150, 达到了较高的纯化, 说明此方法可用来提纯纯度较高的Pol γ.

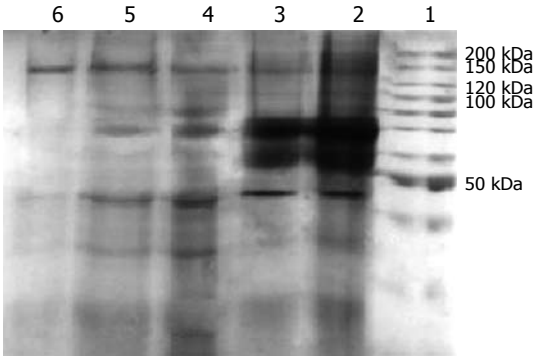


图 1 SDS-PAGE电泳图. 1: 蛋白marker; 2: 破碎细胞后所得溶液; 3: 第1次DEAE层析所得收集液; 4: 第2次DEAE层析纯化后所得蛋白组分; 5: P11层析纯化后所得蛋白组分; 6: 羟基磷灰石层析后所得纯化蛋白.

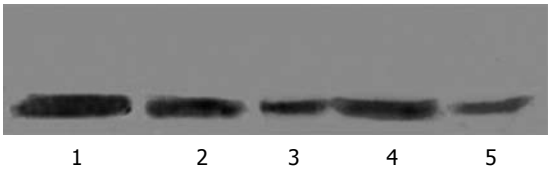


图 2 Western blot印迹. 1: 破碎细胞后所得溶液; 2: 第1次DEAE层析所得收集液; 3: 第2次DEAE层析纯化后所得蛋白组分; 4: P11层析纯化后所得蛋白组分; 5: 羟基磷灰石层析后所得纯化蛋白.

表 1 离子交换层析Hela细胞DNA聚合酶γ

步骤	总蛋白 (mg)	总活力 (Ukat)	比活力 (Ukat/mg)	纯化倍数	收得率(%)
破碎细胞后所得	330	78	0.24	/	/
第1次DEAE层析	252	103	0.40	2	132
第2次DEAE层析	40.8	67	1.64	7	86
P11层析	2.86	54	18.88	78	69
HTP层析	0.133	4.81	36.17	150	6

3 讨论

Pol γ位于线粒体基质[1-2], 是唯一存在于线粒体中的DNA聚合酶. 虽然只占线粒体蛋白的0.008%, 但是对于维持mtDNA连续性和正确性起着重要作用, 保证线粒体正常行使功能[13-14]. 在此, 我们从人HeLa细胞中提取了Pol γ, 并用多步离子交换层析纯化. 虽然收得率较低, 但是得到了较高纯化倍数并具有活性的DNA聚合酶, 经SDS-PAGE电泳表明含有一个明确的亚基(140 kDa). 完整的Pol γ应包含有两个亚基, 一个较大

■应用要点
Pol γ可以用于药物毒性的体外研究, 也可研究其对mtDNA复制和修复的相关机制.

■名词解释
DEAE: 一种阴离子交换纤维素, 装柱后可以使交换剂的外水空间增大, 结构更牢固, 并且电荷分布更均匀, pH变化范围宽, 可以根据需要选择不同的种类吸附不同电荷大小的蛋白质或者核酸, 稳定性较好.

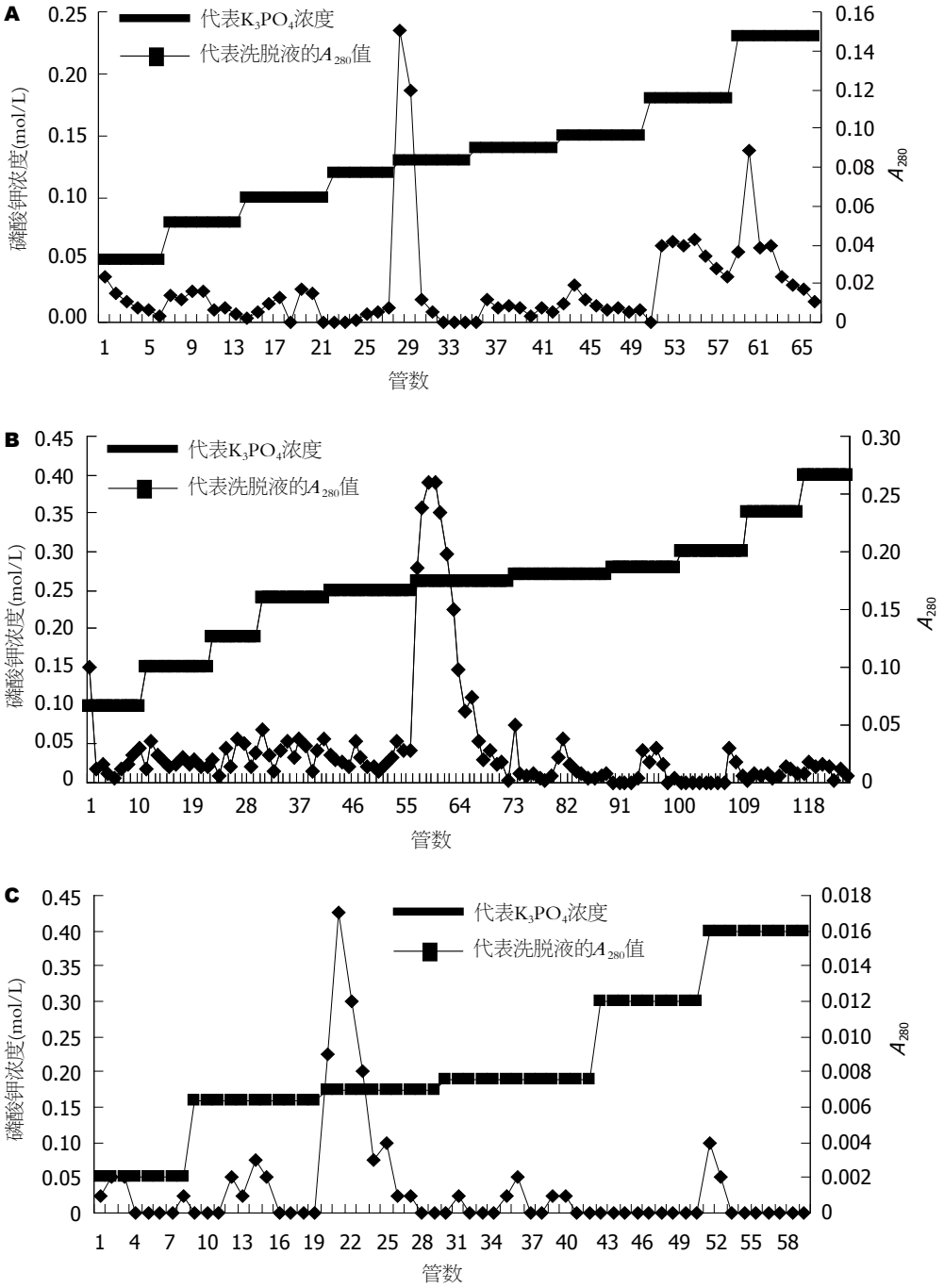


图 3 离子交换层析法. A: 第二次DEAE层析; B: 磷酸纤维素层析; C: 羟基磷灰石层析.

的催化亚基Pol γ A(140 kDa)和一个较小的调节亚基Pol γ B(55 kDa). 大亚基除了主要的聚合酶作用外, 还有3'-5'核酸外切酶的作用, 在碱基切除修复中去除5'脱氧核糖核酸(dRP). 小亚基Pol γ B有增加大亚基持续合成的能力, 在碱基切除修复中起到增强催化亚基的作用, 通过识别RNA引物激发mtDNA的合成[15-19]. 双链DNA(dsDNA)的结合也是通过Pol γ B协助Pol γ A进行定位[20]. 生物化学对于人Pol γ的鉴定表明, 在酶的纯化过程中, 由于Pol γ B的缔合常数太小可导致其丢失[21-22], 故我们电泳只看到一个大的催化亚基, 小亚基可能已丢失. 但是通过活性检测证明, 在体外他仍然有正确合成DNA的作用并具有较高的活性. 酵母菌中提取出来的聚合酶本身就只有一个大亚基, 但是仍然有高的持续合成能力[23].

最近研究显示, 许多疾病与Pol γ的功能密切相关, 如进行性眼外肌麻痹(PEO)[24-26], 弥漫性进行性脑灰质变性[27]、感觉性共济失调、神经病变、发音困难和帕金森综合征[28], 男性不育[29-31]也与其聚合酶的活性有关. 正常mtDNA由于Pol γ的存在, 其错配率很低. 但是随着年龄的

增长, 由于Pol γ的活性和功能的下降, 修复氧化损伤的能力会随着DNA聚合酶的活性及碱基切除修复的能力的下降而下降. 线粒体是进行有氧呼吸的主要场所, 导致活性氧族的堆积, 与氧化损伤的有关疾病如黄斑变性和阿尔茨海默病也由此出现[12]. 曾有研究者用有Pol γ功能缺陷的转基因小鼠模型, 但他缺乏核酸外切酶的校正功能不能保证mtDNA的正确复制, 从而增加线粒体DNA的突变率[32]和心肌病的危险性[33-34]. 另外常染色体显性或隐性疾病的发生也与线粒体DNA聚合酶的活性有关. 如PEO就是由于大脑中突变的mtDNA超过总数的50%, 而Pol γ的功能异常不能正常修复[35-37]. 近年来有许多对于抗HBV和HIV的抗病毒药物(拉米呋定、恩替卡韦和叠氮胸苷等)的研究, 其机制为竞争抑制病毒的逆转录酶或者病毒的DNA聚合酶. 而作为人线粒体中唯一的DNA聚合酶Pol γ对其敏感性很高, 毒性大[38-42]. 大量的基础和临床研究一致报道, 核苷类逆转录酶抑制剂(NRTIs)如扎西他宾、地达诺新、司他夫定对于Pol γ有很强的抑制作用[43-50]. 由此可见DNA聚合酶γ在临床疾病的发生发展及治疗中起着巨大的作用. 他可提供一个新的药理治疗的目标来推动DNA的修复, 也可用于核苷类似物药物的毒性检测及药物的筛选等. 我们提纯有活性的酶以利于体外研究, 而在纯化的过程中, 洗脱液里都加了少量的抗氧化剂DTT. 虽然酶的活性好, 并得到了很好的纯化, 但是酶的获得量仍然很少, 用此来做药物的毒性检测尚可, 但是若要用于其他研究就远远不够. 因此, 我们应寻找到更好的提取与纯化此酶的方法以得到大量有活性的酶.

4 参考文献

1 Graziewicz MA, Longley MJ, Copeland WC. DNA polymerase gamma in mitochondrial DNA replication and repair. *Chem Rev* 2006; 106: 383-405

2 Hance N, Ekstrand MI, Trifunovic A. Mitochondrial DNA polymerase gamma is essential for mammalian embryogenesis. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1775-1783

3 Burgers PM, Koonin EV, Bruford E, Blanco L, Burtis KC, Christman MF, Copeland WC, Friedberg EC, Hanaoka F, Hinkle DC, Lawrence CW, Nakanishi M, Ohmori H, Prakash L, Prakash S, Reynaud CA, Sugino A, Todo T, Wang Z, Weill JC, Woodgate R. Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *J Biol Chem* 2001; 276: 43487-43490

4 Kaguni LS. DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 293-320

5 Stuart GR, Santos JH, Strand MK, Van Houten B, Copeland WC. Mitochondrial and nuclear DNA defects in Saccharomyces cerevisiae with mutations in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 363-374

6 Fan L, Kim S, Farr CL, Schaefer KT, Randolph KM, Tainer JA, Kaguni LS. A novel processive mechanism for DNA synthesis revealed by structure, modeling and mutagenesis of the accessory subunit of human mitochondrial DNA polymerase. *J Mol Biol* 2006; 358: 1229-1243

7 Lim SE, Ponamarev MV, Longley MJ, Copeland WC. Structural determinants in human DNA polymerase gamma account for mitochondrial toxicity from nucleoside analogs. *J Mol Biol* 2003; 329: 45-57

8 Simpson MV, Chin CD, Keilbaugh SA, Lin TS, Prusoff WH. Studies on the inhibition of mitochondrial DNA replication by 3'-azido-3'-deoxythymidine and other dideoxynucleoside analogs which inhibit HIV-1 replication. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 1033-1036

9 Chen CH, Cheng YC. Delayed cytotoxicity and selective loss of mitochondrial DNA in cells treated with the anti-human immunodeficiency virus compound 2',3'-dideoxycytidine. *J Biol Chem* 1989; 264: 11934-11937

10 Ogihara M, Tanno M, Izumiyama N, Nakamura H, Taguchi T. Increase in DNA polymerase gamma in the hearts of adriamycin-administered rats. *Exp Mol Pathol* 2002; 73: 234-241

11 Gray H, Wong TW. Purification and identification of subunit structure of the human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem* 1992; 267: 5835-5841

12 Graziewicz MA, Day BJ, Copeland WC. The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 2817-2824

13 Longley MJ, Ropp PA, Lim SE, Copeland WC. Characterization of the native and recombinant catalytic subunit of human DNA polymerase gamma: identification of residues critical for exonuclease activity and dideoxynucleotide sensitivity. *Biochemistry* 1998; 37: 10529-10539

14 Cortina MS, Gordon WC, Lukiw WJ, Bazan NG. Oxidative stress-induced retinal damage up-regulates DNA polymerase gamma and 8-oxoguanine-DNA-glycosylase in photoreceptor synaptic mitochondria. *Exp Eye Res* 2005; 81: 742-750

15 Carrodeguas JA, Bogenhagen DF. Protein sequences conserved in prokaryotic aminoacyl-tRNA synthetases are important for the activity of the processivity factor of human mitochondrial DNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 1237-1244

16 Carrodeguas JA, Kobayashi R, Lim SE, Copeland WC, Bogenhagen DF. The accessory subunit of Xenopus laevis mitochondrial DNA polymerase gamma increases processivity of the catalytic subunit of human DNA polymerase gamma and is related to class II aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4039-4046

17 Fan L, Sanschagrin PC, Kaguni LS, Kuhn LA. The accessory subunit of mtDNA polymerase shares structural homology with aminoacyl-tRNA synthetases: implications for a dual role as a primer recognition factor and processivity clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 9527-9532

18 Lim SE, Longley MJ, Copeland WC. The

■同行评价

本文思路清晰, 实验步骤严谨, 讨论较为系统, 具有一定的学术价值和临床指导意义.

mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. *J Biol Chem* 1999; 274: 38197-38203

19 Wang Y, Farr CL, Kaguni LS. Accessory subunit of mitochondrial DNA polymerase from Drosophila embryos. Cloning, molecular analysis, and association in the native enzyme. *J Biol Chem* 1997; 272: 13640-13646

20 Pinz KG, Bogenhagen DF. The influence of the DNA polymerase gamma accessory subunit on base excision repair by the catalytic subunit. *DNA Repair* (*Amst*) 2006; 5: 121-128

21 Johnson AA, Tsai Y, Graves SW, Johnson KA. Human mitochondrial DNA polymerase holoenzyme: reconstitution and characterization. *Biochemistry* 2000; 39: 1702-1708

22 Graves SW, Johnson AA, Johnson KA. Expression, purification, and initial kinetic characterization of the large subunit of the human mitochondrial DNA polymerase. *Biochemistry* 1998; 37: 6050-6058

23 Lucas P, Lasserre JP, Plissonneau J, Castroviejo M. Absence of accessory subunit in the DNA polymerase gamma purified from yeast mitochondria. *Mitochondrion* 2004; 4: 13-20

24 Van Goethem G, Dermaut B, Lofgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 2001; 28: 211-212

25 Lamantea E, Tiranti V, Bordoni A, Toscano A, Bono F, Servidei S, Papadimitriou A, Spelbrink H, Silvestri L, Casari G, Comi GP, Zeviani M. Mutations of mitochondrial DNA polymerase gammaA are a frequent cause of autosomal dominant or recessive progressive external ophthalmoplegia. *Ann Neurol* 2002; 52: 211-219

26 Copeland WC, Ponamarev MV, Nguyen D, Kunkel TA, Longley MJ. Mutations in DNA polymerase gamma cause error prone DNA synthesis in human mitochondrial disorders. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 155-167

27 Davidzon G, Mancuso M, Ferraris S, Quinzii C, Hirano M, Peters HL, Kirby D, Thorburn DR, DiMauro S. POLG mutations and Alpers syndrome. *Ann Neurol* 2005; 57: 921-923

28 Van Goethem G, Martin JJ, Dermaut B, Lofgren A, Wibail A, Ververken D, Tack P, Dehaene I, Van Zandijcke M, Moonen M, Ceuterick C, De Jonghe P, Van Broeckhoven C. Recessive POLG mutations presenting with sensory and ataxic neuropathy in compound heterozygote patients with progressive external ophthalmoplegia. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 133-142

29 Rovio AT, Marchington DR, Donat S, Schuppe HC, Abel J, Fritsche E, Elliott DJ, Laippala P, Ahola AL, McNay D, Harrison RF, Hughes B, Barrett T, Bailey DM, Mehmet D, Jequier AM, Hargreave TB, Kao SH, Cummins JM, Barton DE, Cooke HJ, Wei YH, Wichmann L, Poulton J, Jacobs HT. Mutations at the mitochondrial DNA polymerase (POLG) locus associated with male infertility. *Nat Genet* 2001; 29: 261-262

30 Krausz C, Guarducci E, Becherini L, Degl'Innocenti S, Gerace L, Balercia G, Forti G. The clinical significance of the POLG gene polymorphism in male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4292-4297

31 Aknin-Seifer IE, Touraine RL, Lejeune H, Jimenez C, Chouteau J, Siffroi JP, McElreavey K, Bienvenu T, Patrat C, Levy R. Is the CAG repeat of mitochondrial DNA polymerase gamma (POLG) associated with male infertility? A multi-centre French study. *Hum Reprod* 2005; 20: 736-740

32 Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson NG. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 2004; 429: 417-423

33 Zhang D, Ezekiel UR, Chang SW, Zassenhaus HP. Gene expression profile in dilated cardiomyopathy caused by elevated frequencies of mitochondrial DNA mutations in the mouse heart. *Cardiovasc Pathol* 2005; 14: 61-69

34 Zhang D, Mott JL, Chang SW, Stevens M, Mikolajczak P, Zassenhaus HP. Mitochondrial DNA mutations activate programmed cell survival in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H2476-2483

35 Luoma P, Melberg A, Rinne JO, Kaukonen JA, Nupponen NN, Chalmers RM, Oldfors A, Rautakorpi I, Peltonen L, Majamaa K, Somer H, Suomalainen A. Parkinsonism, premature menopause, and mitochondrial DNA polymerase gamma mutations: clinical and molecular genetic study. *Lancet* 2004; 364: 875-882

36 Moslemi AR, Melberg A, Holme E, Oldfors A. Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia: distribution of multiple mitochondrial DNA deletions. *Neurology* 1999; 53: 79-84

37 Ponamarev MV, Longley MJ, Nguyen D, Kunkel TA, Copeland WC. Active site mutation in DNA polymerase gamma associated with progressive external ophthalmoplegia causes error-prone DNA synthesis. *J Biol Chem* 2002; 277: 15225-15228

38 Lewis W, Simpson JF, Meyer RR. Cardiac mitochondrial DNA polymerase-gamma is inhibited competitively and noncompetitively by phosphorylated zidovudine. *Circ Res* 1994; 74: 344-348

39 Feng JY, Murakami E, Zorca SM, Johnson AA, Johnson KA, Schinazi RF, Furman PA, Anderson KS. Relationship between antiviral activity and host toxicity: comparison of the incorporation efficiencies of 2',3'-dideoxy-5-fluoro-3'-thiacytidine-triphosphate analogs by human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and human mitochondrial DNA polymerase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1300-1306

40 Birkus G, Hitchcock MJ, Cihlar T. Assessment of mitochondrial toxicity in human cells treated with tenofovir: comparison with other nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 716-723

41 Moyle G. Toxicity of antiretroviral nucleoside and nucleotide analogues: is mitochondrial toxicity the only mechanism? *Drug Saf* 2000; 23: 467-481

42 White AJ. Mitochondrial toxicity and HIV therapy. *Sex Transm Infect* 2001; 77: 158-173

43 Foli A, Benvenuto F, Piccinini G, Bareggi A, Cossarizza A, Lisziewicz J, Lori F. Direct analysis of mitochondrial toxicity of antiretroviral drugs. *AIDS*

2001; 15: 1687-1694
44 Cossarizza A, Pinti M, Moretti L, Bricalli D, Bianchi R, Troiano L, Fernandez MG, Balli F, Brambilla P, Mussini C, Vigano A. Mitochondrial functionality and mitochondrial DNA content in lymphocytes of vertically infected human immunodeficiency virus-positive children with highly active antiretroviral therapy-related lipodystrophy. *J Infect Dis* 2002; 185: 299-305
45 McComsey G, Tan DJ, Lederman M, Wilson E, Wong LJ. Analysis of the mitochondrial DNA genome in the peripheral blood leukocytes of HIV-infected patients with or without lipoatrophy. *AIDS* 2002; 16: 513-518
46 Walker UA, Setzer B, Venhoff N. Increased long-term mitochondrial toxicity in combinations of nucleoside analogue reverse-transcriptase inhibitors. *AIDS* 2002; 16: 2165-2173
47 Walker UA, Bickel M, Lutke Volksbeck SI, Ketelsen UP, Schofer H, Setzer B, Venhoff N, Rickerts V, Staszewski S. Evidence of nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor--associated genetic and structural defects of mitochondria in adipose tissue of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29: 117-121
48 Miro O, Lopez S, Pedrol E, Rodriguez-Santiago B, Martinez E, Soler A, Milinkovic A, Casademont J, Nunes V, Gatell JM, Cardellach F. Mitochondrial DNA depletion and respiratory chain enzyme deficiencies are present in peripheral blood mononuclear cells of HIV-infected patients with HAART-related lipodystrophy. *Antivir Ther* 2003; 8: 333-338
49 Lopez S, Miro O, Martinez E, Pedrol E, Rodriguez-Santiago B, Milinkovic A, Soler A, Garcia-Viejo MA, Nunes V, Casademont J, Gatell JM, Cardellach F. Mitochondrial effects of antiretroviral therapies in asymptomatic patients. *Antivir Ther* 2004; 9: 47-55
50 Cote HC, Brumme ZL, Craib KJ, Alexander CS, Wynhoven B, Ting L, Wong H, Harris M, Harrigan PR, O'Shaughnessy MV, Montaner JS. Changes in mitochondrial DNA as a marker of nucleoside toxicity in HIV-infected patients. *N Engl J Med* 2002; 346: 811-820

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

中国学术期刊综合引证报告(2007)

本刊讯 根据《中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)》2006年从6500种统计刊源析出的290余万条中国期刊引文数据库及CNKI “中国期刊网”中心网站2006-01/12全文下载记录(2.1亿篇次)的大样本数据统计分析得到: 世界华人消化杂志[标准刊号: ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R; 类目名称: 医药科学\临床科学\呼吸及消化系统疾病(YK5.2.3)]总被引频次为2611, 影响因子为0.460, 5年影响因子为0.482, 即年指标为0.148, 他引总引比为0.80, 被引期刊数为585, 被引半衰期为4.6, 2006载文量为696, 基金论文比为0.44, Web即年下载率为17.7. [中国学术期刊(光盘版)电子杂志社; 中国科学文献计量评价研究中心].

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3722-3727
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

国人慢性HBV携带者HBV复制水平与T细胞亚群变化的关系

游 晶, 庄 林, 陈红英, 台 虹, 宋建新, 欧阳红梅, 唐宝璋, Hutcha Sriplung, Virasakdi Chongsuvivatwong, Alan Geater, 张一凤, 杨海秋, 黄俊华

■背景资料
HBV感染是一个全球性的健康问题. 人体感染HBV的转归主要依赖于机体的免疫状态. 当免疫反应能够清除受病毒感染的细胞时, 感染便得以控制. 否则, 病毒持续存在. 成人感染HBV后多数表现为急性感染过程, 而垂直感染或幼儿期感染者常表现为慢性感染. 长期以来, 人们普遍认为HBV感染的慢性化主要是机体细胞免疫功能低下所致, 但其机制并未完全阐明. 近年来, 随着蛋白质多肽纯化技术的日臻完善, 单克隆抗体技术日趋完美, 分子生物学技术的迅速发展及其与免疫学的结合, 推动了细胞免疫功能和细胞因子研究的进程.

游晶, Hutcha Sriplung, Virasakdi Chongsuvivatwong, Alan Geater, Epidemiology Unit, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkla 90110, Thailand
游晶, 陈红英, 唐宝璋, 张一凤, 杨海秋, 昆明医学院第一附属医院感染病科 云南省昆明市 650032
庄林, 昆明市第三人民医院肝病科 云南省昆明市 650041
台虹, 宋建新, 欧阳红梅, 云南省临床检验中心 云南省第一人民医院 云南省昆明市 650032
黄俊华, 中国人民武装警察部队云南总医院感染病科 云南省昆明市 650111
游晶, 博士, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事病毒性肝炎及感染性疾病的基础与临床研究.
通讯作者: 游 晶, Epidemiology Unit, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkla 90110, Thailand; 云南省昆明市西昌路295号, 昆明医学院第一附属医院感染病科. jingyoukm@126.com
电话: 0871-5324888
收稿日期: 2007-06-26 修回日期: 2007-11-28

Relationship between variations in peripheral T-lymphocyte subsets and viral replication levels in Chinese chronic HBV carriers with normal liver function tests

Jing You, Lin Zhuang, Hong-Ying Chen, Hong Tai, Jian-Xin Song, Hong-Mei OuYang, Bao-Zhang Tang, Hutcha Sriplung, Virasakdi Chongsuvivatwong, Alan Geater, Yi-Feng Zhang, Hai-Qiu Yang, Jun-Hua Huang

Jing You, Hutcha Sriplung, Virasakdi Chongsuvivatwong, Alan Geater, Epidemiology Unit, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkla 90110, Thailand
Jing You, Hong-Ying Chen, Bao-Zhang Tang, Yi-Feng Zhang, Hai-Qiu Yang, Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Lin Zhuang, Department of Hepatopathy, the Third Municipal People's Hospital of Kunming, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Hong Tai, Jian-Xin Song, Hong-Mei OuYang, the Provincial Clinical Lab Center, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China
Jun-Hua Huang, Department of Infectious Diseases, Yunnan General Hospital of the Chinese People's Armed Police Forces, Kunming 650111, Yunnan Province, China
Correspondence to: Dr. Jing You, Epidemiology Unit, Faculty of Medicine, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkla 90110, Thailand; Department of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, 295 Xichang Road, Kunming 650032, Yunnan Province, China. jingyoukm@126.com
Received: 2007-06-26 Revised: 2007-11-28

Abstract

AIM: To investigate the correlations between the variations in peripheral T-cell subpopulations and HBV replication levels in Chinese chronic HBV carriers (HBVc) with normal liver function tests.

METHODS: The relative percentage of T-cell subpopulations in peripheral blood was measured by flow cytometry in 216 HBVc and 100 normal controls. HBV markers were detected by ELISA. Serum viral load was measured by real-time RT-PCR. The relationship between HBV replication level and variations in peripheral T-cell subpopulations was analyzed.

RESULTS: HBVc had a decreased number of $CD3^+$ and $CD4^+$ cells, a decreased $CD4^+/CD8^+$ ratio, and an increased number of $CD8^+$ cells compared with normal controls ($P < 0.01$). The levels of $CD3^+$ and $CD4^+$ cells and the $CD4^+/CD8^+$ ratio decreased 20.4%, 17.8% and 35.7%, respectively ($P < 0.01$), and there was a 21.9% increase in the level of $CD8^+$ cells in HBV DNA (+) HBVc as compared with HBV DNA(-) HBVc ($P < 0.01$). The level of HBeAg(+) HBVc decreased 19.5%, 14.0% and 28.6% in $CD3^+$ and $CD4^+$ cells and $CD4^+/CD8^+$ ratio, respectively ($P < 0.01$), and over 19.6% in $CD8^+$ cells, compared with HBeAg (-) HBVc ($P < 0.01$). There were negative correlations between the levels of $CD3^+$ and $CD4^+$ cells and the $CD4^+/CD8^+$ ratio and viral load (r = -0.67, -0.54, -0.67, $P < 0.01$), and a positive correlation between the level of $CD8^+$ cells and viral load ($r = 0.61$, $P < 0.01$). Compared with the HBV DNA (+) and HBV DNA(-) groups, the number of $CD3^+$ and $CD4^+$ cells and the $CD4^+/CD8^+$ ratio were significant lower, and the number of $CD8^+$ cells was significant higher in the HBV DNA (+)/HBeAg (+) group. A similar pattern was seen in HBVc with maternal HBV-infection (MH) status compared with non-MH HBVc ($P < 0.01$). The percentages of MH HBVc that were HBV DNA (+) and HBeAg (+), and the number with a viral load > 1×10^{10} copies/L, were significantly higher than those of non-MH HBVc fulfilling these criteria (82.2% *vs* 34.5%), *OR* = 8.65, 95% CI: [4.45, 17.33]; (75.2% *vs* 28.7%), *OR*

= 7.44, 95% CI: [3.91, 14.56]; (65.1% *vs* 10.3%), *OR* = 15.94, 95% CI: [7.13, 39.66]. Among the HBVc with MH, the number of $CD3^+$ and $CD4^+$ cells and the $CD4^+/CD8^+$ ratio were obviously lower, while the number of $CD8^+$ cells was significant higher in HBV DNA(+) and HBeAg (+) patients than in HBV DNA(-) and HBeAg (-) patients, respectively ($P < 0.05$, $P < 0.01$). A similar pattern was also seen in non-MH HBVc.

CONCLUSION: Our results suggest that disorders of cellular immunity in Chinese HBVc with normal liver function tests could be caused by HBV infection, and are significantly associated with viral replication level, including viral load and HBeAg expression.

Key Words: Chronic hepatitis B virus carrier; Hepatitis B virus DNA; T lymphocyte subsets; Immune function; Real-time quantitative PCR

You J, Zhuang L, Chen HY, Tai H, Song JX, OuYang HM, Tang BZ, Sriplung H, Chongsuvivatwong V, Geater A, Zhang YF, Yang HQ, Huang JH. Relationship between variations in peripheral T-lymphocyte subsets and viral replication levels in Chinese chronic HBV carriers with normal liver function tests. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3722-3727

摘要

目的: 研究慢性HBV携带者(HBVc)HBV复制水平与T细胞亚群变化的关系.

方法: 应用流式细胞仪检测肝功能正常的HBVc 216例和正常人100例外周血T细胞亚群百分比, ELISA法检测血清乙肝标志物(HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, Anti-HBcAb IgM), 实时荧光定量PCR法检测血清HBV DNA, 对T细胞亚群结果与血清HBV DNA载量和HBeAg表达的关系进行分析.

结果: HBVc外周血$CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$较正常人显著降低($P<0.01$), 而$CD8^+$显著升高($P<0.01$). 与HBV DNA(-)组比较, HBV DNA(+) 组$CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$分别降低20.4%, 17.8%和35.7%, $CD8^+$升高21.9%($P<0.01$). 与HBeAg(-)组比较, HBeAg(+)组$CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$分别降低19.5%, 14.0%和28.6%, $CD8^+$升高19.6%($P<0.01$). 随着病毒载量的升高, $CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$显著下降, 分别与病毒载量呈显著负相关(r = -0.67, -0.54, -0.67, $P<0.01$); $CD8^+$显著升高, 与病毒载量呈显著正相关(r = 0.61, $P<0.01$). HBV DNA(+)和HBeAg(+)组与HBV DNA单阳性组和阴性组比较, $CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$显著降低($P<0.05$, $P<0.01$), $CD8^+$显著升高($P<0.01$). 有母亲感染史者$CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$较无母亲感染史者明显降低, $CD8^+$则显著升高($P<0.01$). 在有母亲感染史者中, 血清HBV DNA(+) 82.2%, HBeAg(+) 75.2%, HBV DNA水平>1×10^{10} copies/L者65.1%, 均分别显著高于无母亲感染史者的34.5%, *OR* = 8.65, 95% CI: [4.45, 17.33], 28.7%, *OR* = 7.44, 95% CI: [3.91, 14.56]和10.3%, *OR* = 15.94, 95% CI: 7.13, 39.66]. 有母亲感染史和无母亲感染史者中, 与HBV DNA(-)组比较, HBV DNA(+)组$CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$), $CD8^+$均显著升高($P<0.01$); 与HBeAg(-)组比较, HBeAg(+)组$CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$比均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$).

结论: 肝功能正常的HBVc T细胞免疫功能紊乱与病毒复制水平之间存在显著相关性, HBV活跃复制进一步加重紊乱.

关键词: 慢性HBV携带者; HBV DNA; T淋巴细胞; 免疫功能; 实时荧光定量PCR

游晶, 庄林, 陈红英, 台虹, 宋建新, 欧阳红梅, 唐宝璋, Hutcha Sriplung, Virasakdi Chongsuvivatwong, Alan Geater, 张一凤, 杨海秋, 黄俊华. 国人慢性HBV携带者HBV复制水平与T细胞亚群变化的关系. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3722-3727
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3722.asp

■研发前沿
HBV感染及其结局与机体的免疫功能状况之间存在着密切的相关性. HBV感染的免疫发病机制及宿主病毒之间的相互作用是目前乙型肝炎国内外研究的热点. 持续携带者的病毒如何影响免疫效应而以高水平病毒血症持久感染还只是研究的初期.

0 引言

目前HBV感染呈世界流行趋势, 感染后可逐渐发展成肝硬化(LC)甚至肝细胞肝癌(HCC), 严重威胁人类健康, 是一个全球性的健康问题[1-4]. 我国1.2亿人长期携带HBV, 其中的35%可发展为慢性肝炎, 65%可演变为LC, 80%的HCC与HBV感染有关[5], 每年因此导致大约50万人死亡[1]. 我国40%-50%的感染者是因母婴传播感染的[6-8]. HBV感染的扩散主要由无症状携带者的扩散, 可见携带者在乙肝感染中的地位. 这些慢性HBV携带者中, 25%以上死于与之相关的肝脏疾病如重型肝炎, LC或HCC.

机体免疫功能状况与HBV长期携带有重要关系. 各种免疫细胞特别是T细胞亚群之间的调节紊乱, 不论原因来自宿主还是源于病毒, 都是体内不能清除病原体及HBV在肝内持续复制的主要原因. 目前持续携带者的病毒如何影响免疫效应而以高水平病毒血症持久感染还只是研究的初期. 我们采用流式细胞术检测HBV携

■**创新盘点**
本文采用流式细胞术对大样本的肝功能正常HBVc检测外周血T细胞亚群, 用实时荧光定量PCR法检测血清HBV DNA载量水平, 并对T细胞亚群结果与病毒复制水平之间的关系进行分析, 同时以母亲感染史为分层变量进行二者之间的关系分析, 探讨HBV复制水平与T细胞免疫功能变化的关系.

带者(HBVc)外周血T淋巴细胞亚群的变化, 并通过分析不同病毒载量和不同HBeAg表达状况HBVc外周血T细胞各亚群变化的规律, 探讨HBV复制水平对T细胞免疫功能的影响情况.

1 材料和方法

1.1 材料 HBVc 216例, 男125例, 女91例, 平均年龄31.5±11.2岁. 诊断符合2005年中华医学会肝病学分会中华医学会感染病学分会联合制订的《慢性乙型肝炎防治指南》诊断标准(HBsAg阳性, 但无肝炎症状和体证, 各项肝功能检查正常, 经半年观察无变化者)[9]. 其中30岁以下124例(57.4%), 30岁以上92例(42.6%), HBV DNA(+)136例(63.0%), HBV DNA(-)80例(37.0%), HBeAg(+)122例(56.5%), HBeAg(-)94例(43.5%). 全部患者排除甲、丙、丁、戊型肝炎和免疫缺陷性疾病, 以及HCC、各种感染、风湿病和结核等, 1年内无应用免疫制剂史. 正常对照组HBsAg(-)100例, 男61例(61.0%), 女39例(39.0%), 平均年龄33.2±10.3岁, 均为健康体检合格人员, 无肝病病史及肝病证据.

1.2 方法 取全血100 μL(EDTA抗凝或肝素抗凝)加入三色mAb(CD3-PE-CY5/CD4-FITC/CD8-PE, Immunotech公司)20 μL, 混匀, 室温避光放置20 min. 放入Muti-Q-Prep处理仪处理(美国Coulter公司)后, 用流式细胞仪(Epics-XL, 美国Coulter公司)检测T细胞亚群. 阴性对照取全血100 μL加入小鼠IgG-PE-CY5/IgG-FITC/IgG-PE(Immunotech公司)20 μL, 其余步骤同上. 血清乙肝标志物(HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb, Anti-HBcAb IgM)检测用ELISA法, 血清HBV DNA检测用实时荧光定量PCR检测系统(FQD-33A型), 最低检测值为1×10^6 copies/L. 操作严格按试剂盒使用说明进行.

统计学处理 结果以mean±SD和百分比表示. 采用R 2.5.0统计软件进行分析, 组间均数比较用ANOVA或*t*检验, 样本率的比较采用χ^2检验或Fisher's exact test. 各T细胞亚群与病毒载量之间的相关性采用相关分析. $P<0.05$为有统计学意义.

2 结果

本组患者HBV DNA(+) 63.0%, HBeAg(+) 56.5%. 有母亲HBV感染史的HBVc 129例, 占59.7%. 感染年龄在8岁以下者80例(37.0%), 8-20岁者56例(25.9%), 20岁以上者58例(26.9%), 有22例(10.2%)未知感染年龄. 有母亲感染史者中, 48.1%感染年龄在8岁以下, 而无母亲感染史者中, 42.5%感染年龄在20岁以上. 在有母亲感染史者中, 血清HBV DNA(+) 82.2%显著高于无母亲感染史者34.5%, OR = 8.65, 95% CI: [4.45 17.33], HBeAg(+) 75.2%显著高于无母亲感染史者28.7%, OR = 7.44, 95% CI: [3.91, 14.56], 而无母亲感染史者的HBeAb(+) 71.3%则显著高于有母亲感染史者24.8%, OR = 7.44, 95% CI: [3.91, 14.56]. 有母亲感染史者血清HBV DNA水平>1.0×10^{10} copies/L者65.1%显著高于无母亲感染史者10.3%, OR = 15.94, 95% CI: [7.13, 39.66], 而无母亲感染史者血清HBV DNA水平<1.0×10^6 copies/L者65.5%显著高于有母亲感染史者17.8%, OR = 8.65, 95% CI: [4.45, 17.33]. 平均血清病毒载量水平前者(7.13±2.36 lg copies/mL) *vs* (4.07±1.74 lg copies/mL, $P<0.01$). 有母亲感染史者, 血清HBV DNA(+)和HBeAg(+) 72.1%显著高于无母亲感染史者21.8%, OR = 9.13, 95% CI: [4.68, 18.5].

2.1 HBVc外周血T细胞亚群变化 HBVc外周血$CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$比正常对照组明显降低($P<0.01$), $CD8^+$高于正常对照组($P<0.01$). 与HBV DNA(-)组比较, HBV DNA(+)组$CD3^+$, $CD4^+$分别降低20.4%和17.8%($P<0.01$), $CD8^+$升高21.9%($P<0.01$), $CD4^+/CD8^+$显著下降35.7%($P<0.01$). 与HBeAg(-)组比较, HBeAg(+)组$CD3^+$, $CD4^+$分别降低19.5%和14.0%($P<0.01$), $CD8^+$升高19.6%($P<0.01$), $CD4^+/CD8^+$显著下降28.6%($P<0.01$). 有母亲感染史者$CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$比较无母亲感染史者明显降低($P<0.01$), $CD8^+$则显著升高($P<0.01$, 表1).

2.2 HBVc病毒载量及状况与T细胞亚群 随着HBV病毒载量的升高, $CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$显著下降, $CD8^+$显著升高. HBV DNA(+)和HBeAg(+)组与HBV DNA单阳性组和阴性组比较, $CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$比显著降低, $CD8^+$显著升高(表2).

2.3 HBVc有母亲感染史外周血T细胞亚群变化 与HBV DNA(-)组相比, 有母亲感染史HBV DNA(+)组$CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$的比显著降低, $CD8^+$显著升高($P<0.01$). 无母亲感染史HBV DNA(+)组$CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$的比显著降低($P<0.01$, 0.05和0.01), $CD8^+$明显升高($P<0.05$). 与HBeAg(-)组相比, 有母亲感染史HBeAg(+)组$CD3^+$, $CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$的比显著降低($P<0.01$, 0.05和0.01), $CD8^+$显著升高($P<0.01$). 无母亲感

表 1 HBVc外周血T细胞亚群变化(mean ± SD)*

分组	*n*	$CD3^+$ (%)	$CD4^+$ (%)	$CD8^+$ (%)	$CD4^+/CD8^+$
HBV(–)	100	71.1 ± 4.8	38.9 ± 3.4	24.0 ± 4.4	1.7 ± 0.3
HBV(+)[b]	216	57.4 ± 13.8	33.9 ± 7.0	33.1 ± 8.0	1.1 ± 0.4
HBV DNA(–)	80	65.8 ± 9.4	37.1 ± 6.3	28.1 ± 5.7	1.4 ± 0.4
HBV DVA(+)[b]	136	52.4 ± 13.6	30.5 ± 6.2	36.0 ± 7.7	0.9 ± 0.3
HBeAg(–)	94	64.5 ± 10.4	35.8 ± 6.7	29.1 ± 6.4	1.3 ± 0.4
HBeAg(+)[b]	122	51.9 ± 13.6	30. 8 ± 6.5	36.2 ± 7.7	0.9 ± 0.3
MH(–)	87	64.7 ± 10.7	35.8 ± 6.1	28.7 ± 5.6	1.3 ± 0.4
MH(+)[b]	129	52.4 ± 13.5	31.1 ± 7.0	36.0 ± 8.0	0.9 ± 0.4

MH: 母亲HBV感染史. [b]$P < 0.01$ *vs* (–).

表 2 HBVc血清病毒载量及状况与T细胞亚群(mean ± SD)

分组(HBV DNA)	*n*	$CD3^+$(%)	$CD4^+$(%)	$CD8^+$(%)	$CD4^+/CD8^+$
1 (≤1×10^6/L)	80	65.8 ± 9.4	37.1 ± 6.3	28.1 ± 5.7	1.4 ± 0.4
2 (>1.0×10^6–1.0×10^8/L)	14	65.4 ± 5.2	34.7 ± 2.8	28.7 ± 6.2	1.3 ± 0.4
3 (>1.0×10^8–1.0×10^{10}/L)	29	66.2 ± 10.0[b]	33.7 ± 6.4[b]	32.4 ± 6.5[b]	1.1 ± 0.2[ab]
4 (>1.0×10^{10}/L)	93	46.1 ± 10.5	28.9 ± 6.0	38.2 ± 7.2	0.8 ± 0.2
A (HBV DNA(–) HBeAg(–))	70	66.1 ± 9.0	37.1 ± 6.6	28.1 ± 5.9	1.4 ± 0.4
B (HBV DNA(–) HBeAg(+))	10	64.3 ± 12.0	37.0 ± 4.1	28.5 ± 4.0	1.3 ± 0.2
C (HBV DNA(+) HBeAg(–))	24	59.8 ± 12.8[c]	32.0 ± 5.6[d]	31.9 ± 7.3[d]	1.1 ± 0.3[d]
D (HBV DNA(+) HBeAg(+))	112	50.8 ± 13.3	30.2 ± 6.4	36.9 ± 7.6	0.9 ± 0.3

[a]$P<0.05$ *vs* 2组; [b]$P<0.01$ *vs* 1, 4组; [c]$P<0.05$, [d]$P<0.01$ *vs* A, D组.

表 3 HBVc有母亲感染史HBV DNA和HBeAg状况与T细胞亚群(mean ± SD)

分组		*n*	$CD3^+$(%)	$CD4^+$(%)	$CD8^+$(%)	$CD4^+/CD8^+$
HBVc有母亲感染史	HBV DNA(–)	23	65.0 ± 7.3	36.2 ± 7.7	28.5 ± 6.3	1.4 ± 0.5
	HBV DVA(+)	106	49.7 ± 13.0[bc]	30.0 ± 6.4[bc]	37.7 ± 7.4[bc]	0.8 ± 0.3[bc]
	HBeAg(–)	32	60.6 ± 11.6	33.6 ± 7.9	30.4 ± 7.5	1.2 ± 0.5
	HBeAg(+)	97	49.7 ± 13.0[e]	30.3 ± 6.5[d]	37.9 ± 7.4[e]	0.8 ± 0.3[e]
HBVc无母亲感染史(non–MH)	HBV DNA(–)	57	66.2 ± 10.2	37.5 ± 5.7	28.0 ± 5.4	1.4 ± 0.4
	HBV DVA(+)	30	61.8 ± 11.4[a]	32.5 ± 5.5[b]	30.1 ± 5.7[a]	1.1 ± 0.2[b]
	HBeAg(–)	62	66.5 ± 9.3	37.0 ± 5.7	28.3 ± 5.8	1.4 ± 0.4
	HBeAg(+)	25	60.3 ± 12.9[d]	32.7 ± 6.0[e]	29.6 ± 4.9	1.1 ± 0.3[e]

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* HBV DNA(–); [c]$P<0.01$ *vs* HBV DNA(+) non–MH; [d]$P<0.05$, [e]$P<0.01$ *vs* HBeAg(–).

染史HBeAg(+)组$CD3^+$, $CD4^+$显著降低($P<0.05$和0.01), $CD4^+/CD8^+$的比明显减低($P<0.01$)(表3).

2.4 HBVc病毒载量与T细胞亚群的相关性 HBVc外周血T细胞亚群$CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$的比与血清病毒载量呈显著负相关(r = -0.67, -0.54, -0.67, $P<0.01$); $CD8^+$与HBV病毒载量呈显著正相关($r = 0.61$, $P<0.01$).

3 讨论

长期以来, 人们普遍认为HBV感染的慢性化主要是机体细胞免疫功能低下所致, 但其机制并未完全阐明. 对HBV呈完全免疫耐受则表现为慢性携带者, 对HBV免疫功能低下. 即对HBV抗原有一定识别和清除能力, 从而导致一定的肝细胞损害, 表现为慢性肝炎. 研究发现, 慢性乙肝患者及HBVc与健康对照比较$CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$下降, $CD8^+$升高[10-15]. 而$CD3^+$的检测结果各不相同, 如有研究发现$CD3^+$较健康对照组降低[12,16-17]、升高[12], 或与正常组比较无显著差异[14,18]. HBV诱导T淋巴细胞Fas表达增加, 通过

■**应用要点**

本文发现, 国人肝功能正常的HBVc T细胞免疫功能紊乱与病毒复制水平之间存在显著相关性, HBV活跃复制进一步加重紊乱. 病毒复制水平与细胞免疫功能紊乱之间的关系研究, 为相关研究和临床工作提供有价值的依据, 二者之间的因果关系值得深入研究. 改进和提高抗病毒治疗的效率应是结束持续感染的最重要措施. 在小儿中普遍实施包括乙肝疫苗接种计划在内的综合措施, 防止慢性HBV携带的发生, 是最根本的措施.

■同行评价
本文方法成熟，设计合理，论证有据，有重要的学术价值.

Fas/FasL的途径使表达Fas的淋巴细胞发生凋亡. 我们发现, HBVc较健康对照组$CD3^+$, $CD4^+$显著下降, $CD8^+$明显升高, $CD4^+/CD8^+$比值降低, 差异具有显著性. 提示HBVc体内细胞免疫功能低下, 可能也是T淋巴细胞凋亡增加所致, 其中$CD3^+$细胞数量的明显下降, 说明机体参加细胞免疫反应的免疫活性细胞不足. 熊一力 *et al*[19]在HBV转基因小鼠免疫耐受机制的实验中发现, HBsAg刺激后的Tg鼠淋巴细胞增生明显降低, 产生细胞因子也显著减少, 说明T细胞对HBV的免疫活化状态欠佳.

本研究结果进一步证实了HBV的影响, 提示HBVc各T细胞亚群改变不仅与HBV感染有关, 也与HBV DNA复制有关. 随着HBV DNA复制增加, 可进一步加重HBVc细胞免疫功能的紊乱, 提示HBeAg在导致HBVc T细胞亚群改变中起重要作用. 首先, 在HBV感染的垂直传播中可起耐受原作用, 导致病毒不能被机体清除, 形成出生后的慢性感染[20]. 在HBeAg转基因小鼠, Th1对HBeAg的应答低于Th2样细胞. 其次, 起诱导原的作用, 诱导Ts细胞增值, 加重免疫抑制[21-23]. 所以HBVc T细胞亚群发生改变, 即$CD4^+$减少, $CD8^+$增高, $CD4^+/CD8^+$比值下降, 提示免疫功能下降. 体外实验发现, 病毒载量低的慢性HBV特异性T细胞水平往往高于高病毒载量患者. 高病毒负荷可抑制HBV特异性T细胞功能. 慢性肝炎自发清除病毒并出现HBeAg抗体血清转换时, 其外周血特异性T细胞反应增加. 在临床实验中运用拉米夫定治疗1 mo后, 乙肝患者血中可检测到HBV特异性的$CD4^+$和$CD8^+$ T细胞, 且与治疗前比较呈上升趋势[10]. 国外临床试验中亦发现拉米夫定迅速抑制病毒血症, 与对照组比较显著增强HBe转换[24]. 这些发现提示, 通过抗病毒抑制HBV的复制在一些患者中可能恢复HBV特异性的免疫反应, 从反面支持我们的实验结果. 我们按高、中、低病毒载量分为3组, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+/CD8^+$均有统计学差异. $CD8^+$随病毒载量升高而增加, $CD3^+$、$CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$的比值随其增加而降低. 相关分析结果也提示外周血T细胞亚群$CD3^+$, $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$比与血清病毒载量呈显著负相关, $CD8^+$与HBV病毒载量呈显著正相关. 此结果进一步提示, HBV复制增加可进一步加重细胞免疫功能的紊乱.

我国是乙型肝炎的高流行区, 感染时年龄越小, 成为慢性携带者的机率越高[25]. 宫内感染者几乎100%发展为HBVc, 新生儿期感染为90%, <2岁时感染为75%-80%, 3-5岁时为35%-45%, 6-14岁时为25%, 免疫力低下的成人为3%-5%[8]. 本研究结果表明, 59.7%的患者有母亲感染史, 且其中大多数(48.1%)感染年龄在8岁以下. 有母亲感染史组血清HBV DNA和HBeAg阳性率及高病毒载量患者数均显著高于无母亲感染史组. 与无母亲感染史组比较, 有母亲感染史组$CD3^+$, $CD4^+$细胞减低, $CD8^+$细胞增高, $CD4^+/CD8^+$比值下降均具显著性差异($P<0.01$). 进一步在HBV DNA(+/-)组间和HBeAg(+/-)组间进行比较, HBV DNA(+)组和HBeAg(+)组$CD3^+$, $CD4^+$显著下降, $CD8^+$明显升高, $CD4^+/CD8^+$比值降低, 差异具有显著性. 此结果进一步提示, HBV复制增加和HBeAg表达增强可进一步加重细胞免疫功能的紊乱.

总之, 肝功能正常的HBVc T细胞免疫功能紊乱与病毒复制水平之间存在显著相关性, HBV活跃复制进一步加重紊乱. HBV在建立和维持持续性感染的过程中, 可能通过多种机制特异性抑制清除病毒的免疫应答, 造成免疫功能紊乱. 而HBeAg在HBV感染的垂直传播中起耐受原作用, 造成免疫耐受. 在我国, 绝大多数HBVc来自小儿期感染, 免疫耐受是其发生的基础, 而HBV的复制又起了进一步诱导耐受的作用. 病毒复制水平与细胞免疫功能紊乱之间的因果关系值得深入研究. 改进和提高抗病毒治疗的效率应是结束持续感染的最重要措施. 在小儿中普遍实施包括乙肝疫苗接种计划在内的综合措施, 可防止慢性HBV携带的发生.

4 参考文献

1 WHO Fact Sheets, available at www.sho.int. Accessed: September 24, 2004
2 Pol S. Natural history of hepatitis B infection. *Presse Med* 2006; 35: 308-316
3 Hu KQ. A Practical Approach to Management of Chronic Hepatitis B. *Int J Med Sci* 2005; 2: 17-23
4 Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65-73
5 Lin CL, Liao LY, Liu CJ, Yu MW, Chen PJ, Lai MY, Chen DS, Kao JH. Hepatitis B viral factors in HBeAg-negative carriers with persistently normal serum alanine aminotransferase levels. *Hepatology* 2007; 45: 1193-11938
6 朱启镕. 重视乙型肝病毒母婴传播的阻断. 中华肝脏病杂志 2003; 11: 199-200
7 许红梅, 刘作义. 乙型肝炎病毒母婴传播及其阻断. 实用儿科临床杂志 2005; 20: 835-837
8 谢新宝, 朱启镕. 乙型肝炎病毒母婴传播和预防研究进展. 国外医学儿科分册 2004; 31: 225-227
9 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝

炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 881-891
10 辛永宁, 孙樱, 张健, 吕维红, 张梅, 初蕾蕾, 李宁, 孙珍娟. 拉米夫定对慢性乙肝患者T细胞亚群影响的研究. 临床肝胆病杂志 2002; 18: 192-193
11 王九平, 连建奇, 王爱莲, 朱勇, 贾战生, 谢玉梅. 慢性乙型肝炎患者T细胞亚群、sIL-2R, TNF-α, IL-6变化及意义. 第四军医大学学报 2000; 21: 814-816
12 李鸣, 林蔚. 慢性乙型肝炎患者外周血T淋巴细胞亚群的变化. 现代临床医学生物工程学杂志 2002; 8: 36
13 蔡莉静, 薛容, 姜长林. 乙型肝炎儿童T细胞亚群的改变. 东南大学学报(医学版) 2003; 22: 49-50
14 李乐, 蔡鹏威, 伍严安, 陈旭征. 慢性乙肝病毒携带者的细胞免疫功能变化及其与血清HBV DNA的关系. 福建医药杂志 2003; 25: 18-20
15 殷樱, 张盈华, 张利朝. 乙肝病程发展中CD4/CD8、TNF-α及Sil-2R水平变化及意义. 免疫学杂志 2002; 18: 74
16 王克霞, 朱玉霞, 许礼发, 杨庆贵. 乙肝病人外周血T细胞亚群和mIL-2R表达水平的研究. 中国基层医药 2002; 9: 589-591
17 刘映霞, 胡国龄, 何淑雅, 李红梅. 慢性乙肝患者PBMC中HBV感染及其对T细胞亚群的影响. 中国现代医学杂志 2002; 12: 70-72
18 蔡莉静, 薛容, 姜长林. 乙型肝炎儿童T细胞亚群的改变. 东南大学学报(医学版) 2003; 22: 49-50
19 熊一力, 刘光泽, 贾彦征. HBV转基因小鼠免疫耐受机制的实验研究. 世界华人消化杂志 2002; 10: 642-645
20 Milich DR. Influence of T-helper cell subsets and crossregulation in hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 1997; 4 Suppl 2: 48-59
21 朱传武, 罗端德, 曾令兰, 李淑莉, 李伟. 慢性重型乙型肝炎患者T细胞免疫状态与HBV前C区基因变异的关系. 中华传染病杂志 2003; 21: 135-137
22 高金华, 李丽君. IL-6和T细胞亚群与慢性乙型肝炎的关系. 交通医学 2001; 15 :387-388
23 宣世英, 孙樱, 张健, 李清华, 吕维红, 姜岭梅, 吴树华, 邹波. 慢性乙型肝炎病人外周血单个核细胞HBV感染后对其细胞免疫功能影响的研究. 中华流行病学杂志 1997; 18: 80-82
24 Leung N. Liver disease-significant improvement with lamivudine. *J Med Virol* 2000; 61: 380-385
25 郑鹏远, 唐芙爱, 卢高峰, 白经修. 慢乙肝母婴传播阻断和治疗策略的建议. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1-6

编辑 潘伯荣 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志的同行评价

本刊讯 《世界华人消化杂志》对所有文章进行在线同行评价, 采用匿名方式. 通常每篇文章邀请2-3位专家审阅, 至少2人通过方可录用, 否则退稿. 每期最后一页致谢本期所有审稿人(含退稿). 文章等级评定: ○A级 ○B级 ○C级 ○D级 ○E级 ○不清楚. 其中A和B属于很好, C和D不算太好, E是很差, 还有一部分是不清楚.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3728-3733
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床研究 CLINICAL RESEARCH

肝移植患者术中凝血功能的变化及影响因素

马焕先, 董家鸿, 段伟东, 陈永亮

■背景资料
我国的临床肝移植近年来发展迅速, 95%的肝源来自死囚的捐献. 为了规范和加强人体器官捐献技术临床应用管理, 国务院于2007-03-21颁布了《人体器官移植条例》, 并于今年05-01全国实行. 这项条例的实行大大减少了"死囚"器官的来源, 继而亲体肝移植术在我院逐渐展开. 此项技术在我国医学领域尚属初步发展阶段, 科学地掌握亲体肝移植患者手术过程中凝血功能的变化及影响因素, 进而合理应用凝血药物及血制品对手术的顺利进行及患者的康复具有重要意义.

马焕先, 董家鸿, 段伟东, 陈永亮, 中国人民解放军总医院肝胆外科 北京市 100853
马焕先, 在读博士, 医师, 主要从事肝移植围手术期处理的研究.
通讯作者: 董家鸿, 100853, 北京市海淀区复兴路28号, 中国人民解放军总医院肝胆外科. dongjh301@163.com
电话: 010-66939817
收稿日期: 2007-06-01 修回日期: 2007-09-19

Change in blood coagulation and correlative influential factors in liver transplantation

Huan-Xian Ma, Jia-Hong Dong, Wei-Dong Duan, Yong-Liang Chen

Huan-Xian Ma, Jia-Hong Dong, Wei-Dong Duan, Yong-Liang Chen, Institute of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Jia-Hong Dong, Institute of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of Chinese PLA, 28 Fuxing Road, Haidian District, Beijing 100853, China. dongjh301@163.com
Received: 2007-06-01 Revised: 2007-09-19

Abstract

AIM: To investigate intraoperative blood coagulation variation and correlative influential factors in liver transplantation.

METHODS: Twenty-nine cases undergoing orthotopic liver transplantation from cadaveric livers from 2006-06 to 2007-05 and 15 cases undergoing living-donor liver transplantation in the same period were studied retrospectively. We assessed prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APPT), international normalizing ratio (INR), fibrinogen (FIB), platelet (PLT), hemoglobin concentration(Hb),a lbumin (ALB) and total carbon dioxide (TCO_2) during the pro-operation period, dissection period, anhepatic period, early and late neohepatic period, respectively. Changes of every value reflecting blood coagulation function and acid-base metabolism condition were observed in all groups, and fluctuation patterns of all values were studied between periods and groups. Perioperative influential factors were also analyzed. In addition, we compared values of living-donor liver transplantation with orthotopic liver transplantation from cadaveric livers in the same period and studied their correlations.

RESULTS: The average blood coagulation condition of CHC group was between the HCC group and FLF group. In the reperfusion 30 min reperfusion period, PT, APTT and INR were more abnormal than in any other period of the operation, while FIB level reached its lowest point in the anhepatic stage (Living-donor liver transplantation: 0.68 ± 0.17 g/L *vs* 0.93 ± 0.37 g/L, 0.77 ± 0.19 g/L, 0.83 ± 0.27 g/L, 0.72±0.31 g/L; Orthotopic liver transplantation: 0.65 ± 0.14 g/L *vs* 0.89 ± 0.10 g/L, 0.71 ± 0.26 g/L, 0.69 ± 0.16 g/L, 0.70 ± 0.23 g/L, $P < 0.05$). In the hepatocelluar carcinoma (HCC) group, their relative parameters were almost normal before LDLT and the change span during LDLT was less than those in the other two groups ($P < 0.05$). Patients in the FLF group were in the worst coagulation state with prolonged PT, APTT, INR and reduced FIB ($P < 0.05$). However, these patients recovered in the shortest time after reperfusion. The MELD score was negatively correlated with intraoperative blood loss and blood transfusion ($r = 0.619$, $P < 0.05$). Compared with liver transplantation from cadaveric liver, the change span of blood coagulation function and acid-base metabolism balance was wider than the frontier, especially in the coagulation function's aggravation aspect in the dissection and anhepatic periods. However, after reperfusion all parameters pertaining to blood coagulation function and acid-base metabolism balance recovered in a shorter time ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Coagulopathy therapy should be individualized according to the perioperative condition of patients to aid the operation and reduce intraoperative blood loss.

Key words: Living-donor liver transplantation; Orthotopic liver transplantation; Blood coagulation

Ma HX, Dong JH, Duan WD, Chen YL. Change in blood coagulation and correlative influential factors in liver transplantation. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3728-3733

摘要

目的: 探讨不同肝移植术式术中凝血功能变化的规律及相关的影响因素.

方法: 将2006-06/2007-05我院15例亲体肝移植患者及29例原位肝移植患者, 分为肝癌组, 肝硬化和急性肝衰组. 综合评估患者术前状态, 于患者术前及术中(无肝前期、无肝期、再灌注期30 min、再灌注期1 h)检测凝血酶原时间(PT)、活化的部分凝血酶原时间(APTT)、国际标准化比值(INR)、纤维蛋白原(FIB)、血小板计数(PLT)、血红蛋白量(HB)、白蛋白(ALB)及CO_2结合力(TCO_2), 观察不同肝移植术式术中各组患者凝血功能及酸碱失衡的变化规律及特点, 分析术前和术中可能存在的影响因素及与凝血功能的相关性.

结果: 肝硬化患者组术前凝血状态介于肝癌组与急性肝衰组之间. 术前PLT明显减少, 与其他两组相比差异显著(P<0.05). 无肝期各项指标进一步恶化. 再灌注30 min PT, APTT, INR值达到峰值, FIB水平于无肝期达到最低点(亲体移植: 0.68±0.17 g/L *vs* 0.93±0.37 g/L, 0.77±0.19 g/L, 0.83±0.27 g/L, 0.72±0.31 g/L; 原位肝移植: 0.65±0.14 g/L *vs* 0.89±0.10 g/L, 0.71±0.26 g/L, 0.69±0.16 g/L, 0.70±0.23 g/L, P<0.05). 肝癌组各指标术前基本正常, 术中变化幅度均较前两组小(P<0.05). 急性肝衰组患者术前PT、APTT、INR延长最为显著, 凝血状态最差(P<0.05), 但术中恢复较快. 除无肝期外, FIB较其他两组明显减少(P<0.05). 应用Pearson相关分析术中出血量与围手术期因素的相关关系, 发现MELD评分与术中出血量具有相关性(r = 0.619, P<0.05). 与原位肝移植相比, 亲体肝移植术中凝血功能及代谢紊乱的变化较大, 尤以无肝前期及无肝期恶化明显. 再灌注后各项凝血指标恢复迅速(P<0.05).

结论: 应根据具体情况个性化治疗肝移植患者.

关键词: 亲体肝移植; 原位肝移植; 凝血功能

马焕先, 董家鸿, 段伟东, 陈永亮. 肝移植患者术中凝血功能的变化及影响因素. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3728-3733
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3728.asp

0 引言

自肝脏移植作为治疗终末期肝病的有效治疗手段在全球得到公认后, 我国于上个世纪90年代迅速开展. 近1年来由于尸体肝源的匮乏, 亲体肝移植术逐渐取代尸体肝移植而成为主要治疗手段. 肝移植围手术期凝血功能的有效调控对确保手术顺利进行有至关重要的意义, 术中低凝状态导致患者术后并发症及死亡率升高, 而术后高凝状态致使肝动脉血栓形成使患者面临再次肝移植的风险[1]. 因此掌握其变化规律及影响因素则是解决这一难题的关键. 我们对本院2006-06/2007-05实施的15例亲体肝移植病例与同期实施的29例原位移植病例进行回顾性分析, 现阐述如下.

■研发前沿
与原位肝移植相比, 亲体肝移植是一项操作难度大, 手术时间较长的技术. 手术操作的顺利进行往往依赖于患者相对平稳的机体状态, 其中凝血功能与代谢状态显得尤为重要. 影响因素繁多复杂, 就凝血状态而言就涉及凝血、抗凝、纤溶、抗纤溶不同领域. 因此彻底掌握亲体肝移植患者在手术过程中各系统在网络变化中的作用是非常重要的.

1 材料和方法

1.1 材料 2006-06/2007-05实施的亲体肝移植病例15例, 男10例, 女5例, 年龄16-58(平均40.27)岁. 按原发病因不同分为3组: 慢性乙型肝炎肝硬化组4例, 原发性肝癌组6例, 急性肝功能衰竭组5例(药物性肝衰4例, 肝豆状核变性1例). 供肝均来自亲属部分肝脏. 供体无1例死亡, 受体1例因曲霉菌感染于术后11 d死亡. 同期实施的原位移植病例29例, 男26例, 女3例, 年龄27-59(平均45.18)岁. 按原发病因不同分为3组: 慢性乙型肝炎肝硬化组6例, 原发性肝癌组18例, 急性肝功能衰竭组4例, 1例肝门胆管癌除外. 供肝来自颅脑损伤致死者. 受体在住院期间无1例死亡.

1.2 方法 按手术进程分别于术始、无肝前期、无肝期、再灌注30 min、再灌注1 h静脉采血, 检测凝血酶原时间(PT)、活化的部分凝血酶原时间(APTT)、国际标准化比值(INR)、纤维蛋白原(FIB)、血小板计数(PLT)、血红蛋白量(HB)、白蛋白(ALB)及CO_2结合力(TCO_2). 并根据检测结果针对性应用浓缩红细胞、新鲜冰冻血浆、机采血小板、凝血酶原复合物、纤维蛋白原、人血白蛋白等血液制品及药物, 以改善凝血功能. 统计患者术前的凝血、生化、血常规, model for end-stage liver disease(MELD)评分, 术中出血量、输血量及血液制品的用量.

统计学处理 所有检测数据以mean±SD表示. 采用Microsoft Excel软件进行统计描述, 同一指标组间的比较采用成组设计的两样本均数t检验, 而同一指标组内不同时期的比较采用配对设计的差值均数与总体均数比较的t检验, P<0.05差异有统计学意义. 应用Pearson相关分析术中出血量与围手术期因素的相关关系. 所有数据均应用SPSS12.0版本软件进行统计学分析.

2 结果

肝硬化患者的凝血指标检测结果提示, 本组患

■相关报道
Ozier *et al*指出在肝移植过程中患者出血是多因素共同作用的结果，在术前不可预知，认为术中应用迅速而灵敏的仪器来监测凝血状态的变化是最重要的.

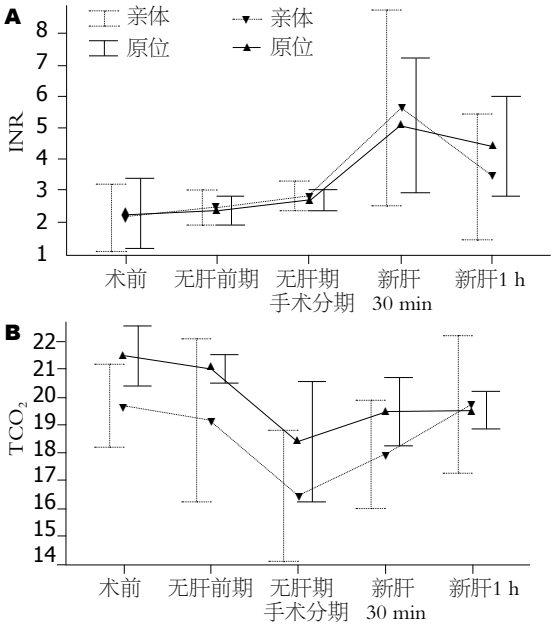


图 1 不同肝移植术患者INR和TCO_2的变化情况(mean ± SD). A: 肝硬化患者; B: 急性肝衰患者.

者从总体水平来看, 术前凝血状态介于肝癌组与急性肝衰组之间, 即PT、APTT、INR和FIB指标. 最为突出的是术前PLT明显减少, 亲体肝移植患者平均仅为32×10^9/L, 原位肝移植患者仅为39.70×10^9/L(100×10^9/L-300×10^9/L),与其他两组相比差异显著($P<0.05$). 无肝前期各凝血指标的时间均有不同程度的延长, 但差异无显著性, FIB进一步降低. 此期PLT的短暂性升高与术前积极补充机采血小板有关. 无肝期各项指标进一步恶化, 至再灌注30 min, PT, APTT, INR值达到峰值, FIB水平于再灌注1 h后达到最低点, 与术前相比均差异显著($P<0.01$), 再灌注1 h逐渐好转. 肝癌组与其他两组相比, 整个手术过程中的凝血指标检测结果较为乐观, 各指标术前基本正常, 术中变化幅度均较前两组小($P<0.05$). 急性肝衰组患者术前PT、APTT、INR延长最为显著, 凝血状态最差($P<0.05$), 但术中恢复较快. 无肝前期PT及INR有所缩短, 可能与手术开始后积极大量地补充血浆及各种凝血因子有关. 相比之下, FIB于各期均明显低于, 与其他两组相比($P<0.05$). 三组患者HB、ALB与CO_2于无肝期较术前均明显降低($P<0.05$), 再灌注后缓慢恢复. 从表1、表2可以看出, 无论是亲体肝移植或原位移植，肝硬化组的患者整个术中的ALB水平较其他两组低, 无肝期与再灌注30 min最为明显($P<0.05$). 应用Pearson相关分析术中出血量与围手术期因素(术前PT、APTT、INR、FIB、ALB、尿素氮、肌酐与MELD评分)的相关性, 发现MELD评分与术中出血量具有相关性($r = 0.619$, $P<0.05$). 与原位肝移植相比，亲体肝移植术中凝血功能及代谢紊乱的变化较前者大, 尤以无肝前期及无肝期患者凝血功能的恶化较原位移植明显. 再灌注后各项凝血指标比原位移植组恢复迅速($P<0.05$)(图1).

3 讨论

接受肝移植手术的患者常为慢性肝病晚期或急性暴发性肝功能衰竭. 由于各种原因导致肝实质破坏, 影响凝血因子的合成或致其质量下降[2], 内源性抗凝因子增加及原发或继发纤溶亢进, 从而出现凝血纤溶失衡而常常形成低凝状态导致肝移植术中的失血倾向. 晚期慢性肝病患者有70%合并脾亢而致的血小板数量减少功能异常加重这一出血. 肝移植术前应积极矫正低凝状态, 针对性补充体内缺乏的凝血因子如凝血酶原复合物、新鲜冰冻血浆和机采血小板等. 凝血因子的半衰期较短, 多在4-24 h, 故应在手术当日早晨给予. 新鲜冰冻血浆含有全部凝血及抗凝因子, 是改善凝血最理想的物质[3]. Camci *et al*[4]报道, 采用新鲜冰冻血浆作为置换液进行血浆置换可有效改善凝血障碍. Kimmings *et al*[5]报道, 高胆红素和胆汁酸血症可激活补体等因子而致凝血/纤溶紊乱促发弥散性血管内凝血(DIC). 因此若非急诊手术, 应于术前经皮肝穿刺胆管置管引流术(PTCD)纠正黄疸.

无肝前期, 手术解剖分离引起的出血及术中的输血补液使凝血因子丢失和稀释. 库存血含有的抗凝物质也随着进入血液循环, 而表现为凝血指标不同程度的下降. 这一时期应结合Sonoclot、凝血弹性描记图(thrombelastography, TEG)与PT、APTT、INR、PLT的监测结果指导输血给药, 减少出血量, 尽量保持凝血与纤溶平衡[6-8]. 同时随着手术时间的延长, 代谢性酸中毒、HB下降、白蛋白丢失使水电解质失衡、代谢紊乱、组织水肿，直接或间接地影响凝血功能, 应进行针对性调整, 保持内环境稳定. 进入无肝期后, 凝血因子迅速下降、组织纤溶酶原激活剂缺乏, 肝脏的清除作用而迅速增高、体内代谢产物及内毒素未经肝脏解毒直接进入血液循环、代谢性酸中毒、低钙血症、失血致凝血因子的进一步丢失等将进一步导致凝血功能进一步恶化. 这一时期凝血功能的维持主要依靠外来补充. 应根据检测结果积极补充新鲜冰

表 1 肝硬化、急性肝衰、肝癌患者亲体移植术前术中凝血指标的变化(mean ± SD)

时间	PT(s)	APTT(s)	INR	FIB(g/L)	PLT(×10^9/L)	HB(g/L)	ALB(g/L)	TCO_2(mmol/L)
肝硬化								
术前	23.55 ± 9.55	73.00 ± 38.09	2.14 ± 1.08	0.93 ± 0.37	32.00 ± 7.96[e]	74.50 ± 14.15	31.20 ± 3.57	22.20 ± 2.78
无肝前期	28.73 ± 5.34	76.38 ± 24.96	2.48 ± 0.55	0.77 ± 0.19	38.50 ± 9.95[e]	68.50 ± 23.00	26.83 ± 5.09	20.83 ± 2.51
无肝期	32.28 ± 4.97[a]	130.1 ± 60.27[a]	2.85 ± 0.48[a]	0.68 ± 0.17[a]	34.00 ± 7.62[e]	65.25 ± 20.96	21.83 ± 3.56[ae]	16.53 ± 3.65[a]
再灌注30 min	49.25 ± 22.05[b]	147.6 ± 52.21[b]	5.64 ± 3.12[b]	0.83 ± 0.27	28.50 ± 7.60[ae]	67.00 ± 19.20	21.05 ± 4.42[e]	18.48 ± 2.86
再灌注60 min	35.35 ± 10.25[a]	137.1 ± 57.47[b]	3.46 ± 1.99[a]	0.72 ± 0.31	37.00 ± 7.39[e]	77.00 ± 21.95	21.40 ± 1.94[e]	20.48 ± 2.55
急性肝衰								
术前	36.90 ± 12.82[c]	97.26 ± 44.79[c]	4.29 ± 1.57[c]	0.62 ± 0.26[c]	91.4 ± 38.06	74.40 ± 26.75	32.44 ± 8.17	19.66 ± 1.48
无肝前期	23.48 ± 3.94[b]	112.5 ± 71.97[a]	2.11 ± 0.48[a]	0.68 ± 0.12[c]	79.2 ± 44.81	74.00 ± 16.14	29.42 ± 4.43	19.16 ± 2.91
无肝期	27.70 ± 1.75[a]	110.1 ± 34.62[a]	2.42 ± 0.11[a]	0.67 ± 0.16	74.2 ± 39.33	69.40 ± 15.67	27.04 ± 2.42	16.48 ± 2.38
再灌注30 min	35.44 ± 3.85	152.9 ± 60.16[b]	3.80 ± 0.27	0.51 ± 0.12[c]	74.6 ± 36.54	73.20 ± 14.74	27.90 ± 5.15	17.94 ± 1.94
再灌注60 min	28.66 ± 6.25[a]	117.7 ± 51.59[a]	2.46 ± 0.43[a]	0.48 ± 0.30[c]	61.4 ± 33.03[a]	80.20 ± 9.60	28.54 ± 2.45	19.72 ± 2.47
肝癌								
术前	18.13 ± 2.71	40.00 ± 23.11	1.49 ± 0.28	2.28 ± 0.93	70.00 ± 61.94	97.67 ± 41.79	34.43 ± 3.62	17.87 ± 4.84
无肝前期	24.30 ± 7.94	47.73 ± 9.33	2.69 ± 1.33	1.60 ± 0.59	75.33 ± 66.40	101.67 ± 42.0	29.43 ± 2.65	17.80 ± 4.51
无肝期	32.25 ± 13.51[b]	84.55 ± 13.79[b]	3.09 ± 1.63[b]	0.79 ± 0.19[b]	45.00 ± 7.07[a]	67.50 ± 3.54[a]	25.85 ± 1.91[a]	14.00 ± 0.14[a]
再灌注30 min	30.17 ± 16.16[b]	72.27 ± 22.16[b]	3.41 ± 2.11[b]	1.26 ± 0.53[a]	64.33 ± 42.15	91.33 ± 25.92	28.00 ± 1.00	16.00 ± 6.08
再灌注60 min	25.33 ± 11.68[a]	54.33 ± 19.14[a]	2.10 ± 0.85[a]	0.89 ± 0.23[b]	53.33 ± 40.42	88.33 ± 27.54	29.67 ± 0.58	17.33 ± 2.52

[a]$P<0.05$, [b]$P<0.01$ *vs* 术前; [c]$P<0.05$ *vs* 其他组同期; [e]$P<0.05$ *vs* 其他组同期.

■创新盘点

本文总结亲体肝移植术手术过程中凝血功能变化及影响因素的相关分析, 并与原位移植进行对比研究, 提出亲体肝移植术中特有的凝血功能变化规律曲线, 影响术中出血量的围手术期因素和相应治疗中的注意事项.

冻血浆. 冷沉淀、凝血因子复合物、纤维蛋白原及新鲜冰冻血浆可明显改善凝血机制[9]. 且应注意代酸的调整, 此期尤为严重. Ozier *et al*[10]认为, 无肝后期和新肝早期凝血功能的明显低下可能与内源性凝血途径受抑制而纤溶活跃有关. 再灌注期, 门腔静脉系统的开放, APTT、INR明显延长, 纤维蛋白原达最低点[11]. 与文献报道相似[12]. 这些变化主要是由于移植肝窦内皮细胞大量组织因子、内源性肝素的释放[13]及再灌注引起的氧自由基, 白细胞介质释放, 大量酸性代谢产物进入循环与外源性肝素的入血所致. 再灌注早期主要表现为严重的低凝状态与纤溶亢进. 此期我们应该采用鱼精蛋白对抗肝素效应, 抑肽酶对抗纤溶和补充纤维蛋白原, 而凝血因子的补充不应过于积极. 亲体肝移植术移植肝脏冷缺血时间较短, 再灌注1 h后凝血功能明显改善. 从图1、图2中我们可以看到凝血功能的恢复常较代谢性酸中毒的纠正迟滞. 因此手术末期若酸中毒逐渐纠正的情况下, 凝血因子的补充同样不应过于积极, 以防止肝移植术后最重要的并发症-血管内血栓形成[14-15].

本文通过对整个手术过程中ALB及TCO_2变化特点进行分析发现, 尽管在手术过程中根据检测结果间断补充人血ALB, 但肝硬化患者在进入无肝期后始终维持在20 g/L左右, 而其他两组患者则不然. 究其原因可能是由于肝硬化患者晚期全身各器官慢性损伤, 储备功能差. 外界侵入性操作易诱发全身炎症反应综合征(SIRS),

■应用要点
本研究掌握了亲体肝移植术中特有的凝血功能变化规律曲线及影响术中出血量的围手术期因素, 对纠正凝血紊乱, 减少术中出血有一定的指导意义.

表 2 肝硬化、急性肝衰、肝癌患者原位移植术前术中凝血指标的变化(mean ± SD)

时间	PT(s)	APTT(s)	INR	FIB(g/L)	PLT(× 10^9/L)	HB(g/L)	ALB(g/L)	TCO_2(mmol/L)
肝硬化								
术前	20.32 ± 7.19	75.00 ± 28.17	2.25 ± 1.12	0.89 ± 0.10	39.70 ± 7.96[e]	69.13 ± 17.95	30.42 ± 6.35	20.14 ± 1.63
无肝前期	25.43 ± 5.17	75.64 ± 23.00	2.37 ± 0.45	0.71 ± 0.26	41.50 ± 6.54[e]	71.34 ± 10.79	28.68 ± 3.58	19.64 ± 3.18
无肝期	30.28 ± 4.97	121.0 ± 53.72[b]	2.70 ± 0.31[a]	0.65 ± 0.14[a]	36.43 ± 9.31[e]	57.12 ± 16.58	19.73 ± 2.69[ae]	17.22 ± 1.02
再灌注30 min	43.25 ± 25.35[b]	145.1 ± 52.70[b]	5.07 ± 2.13[b]	0.69 ± 0.16	25.58 ± 6.57[ae]	63.87 ± 25.49	20.56 ± 4.17[e]	17.49 ± 2.60
再灌注60 min	40.35 ± 15.52[a]	140.7 ± 52.22[b]	4.43 ± 1.57[a]	0.70 ± 0.23	32.55 ± 8.17[e]	70.38 ± 23.57	21.62 ± 2.83	18.58 ± 1.54
急性肝衰								
术前	38.40 ± 8.73[c]	94.57 ± 37.46[c]	4.57 ± 1.92[c]	0.65 ± 0.18[c]	103.5 ± 42.3	70.62 ± 8.51	33.14 ± 6.52	21.49 ± 1.06
无肝前期	37.70 ± 4.61	115.0 ± 47.13[a]	4.00 ± 0.83	0.67 ± 0.23[c]	89.44 ± 35.17	73.65 ± 20.19	29.88 ± 2.79	21.00 ± 0.53
无肝期	35.12 ± 1.47	111.3 ± 32.24[a]	3.92 ± 0.74	0.66 ± 0.14	82.4 ± 32.22	70.43 ± 13.66	28.75 ± 7.45	18.42 ± 2.16
再灌注30 min	32.44 ± 6.75[a]	147.9 ± 53.73[b]	3.49 ± 0.62[a]	0.50 ± 0.21[c]	79.59 ± 45.62[a]	72.76 ± 15.37	27.43 ± 3.81	19.47 ± 1.23
再灌注60 min	30.51 ± 3.59[a]	139.5 ± 60.23[a]	2.91 ± 0.39[a]	0.47 ± 0.30[c]	81.20 ± 31.80	79.41 ± 5.52	27.92 ± 1.63	19.51 ± 0.68
肝癌								
术前	19.00 ± 5.30	45.83 ± 16.22	1.06 ± 0.25	2.37 ± 0.76	83.60 ± 50.31	90.65 ± 45.33	32.15 ± 2.33	17.63 ± 3.34
无肝前期	19.97 ± 4.36	48.14 ± 7.53	1.87 ± 0.58	2.01 ± 0.91	79.42 ± 57.05	95.86 ± 41.97	30.64 ± 1.77	18.09 ± 2.71
无肝期	29.20 ± 10.90[a]	78.75 ± 17.87[b]	2.89 ± 1.55[a]	0.86 ± 0.27[b]	52.14 ± 10.30[a]	58.69 ± 12.56	27.38 ± 1.04	16.05 ± 1.08
再灌注30 min	32.17 ± 14.19[b]	75.64 ± 12.26[b]	2.97 ± 1.94[a]	1.01 ± 0.46[a]	53.62 39.35	85.14 ± 9.62	28.52 ± 4.25	16.72 ± 4.60
再灌注60 min	27.33 ± 11.46[a]	60.13 ± 10.97[a]	2.53 ± 0.44[a]	0.88 ± 0.39[b]	52.22 38.92	82.75 ± 19.88	28.66 ± 2.10	17.06 ± 1.32

[a]P<0.05, [b]P<0.01 *vs* 术前; [c]P<0.05 *vs* 其他组同期; [e]P<0.05 *vs* 其他组同期.

慢性肾功能不全常常伴术中中重度慢性代谢性酸中毒使全身性毛细血管通透性增高, 大量外源性人血ALB渗漏导致术野不清晰, 影响手术操作难度, 产生恶性循环. 因此这一现象提示, 我们肝硬化患者进行肝移植术中, 控制SIRS以及酸碱平衡显得尤为重要.

从本研究结果我们可以看到与原位移植相比, 亲体肝移植术中凝血功能及代谢紊乱的变化较前者大, 尤以无肝前期及无肝期患者凝血功能的恶化较原位移植明显. 再灌注后各项凝血指标的恢复又常常比原位移植迅速. 分析原因有: (1)亲体肝移植与原位移植相比, 是一项要求精细度更高的手术操作. 在进行各管道分支吻合的过程中增加了手术时间, 无肝期延长, 凝血功能随之恶化. (2)出血量前者常常大于后者. (3)与原位移植相比, 亲体肝移植最大的优势是冷缺血时间很短, 约20 min左右, 而热缺血时间几乎为零. 在这种状态下能确保供肝的质量, 因此在受体全身状态较为平稳的情况下可使供肝迅速发挥作用.

亲体肝移植术往往较原位移植出血凶猛, 较难控制. 本文肝硬化组平均出血量为13 425 mL, 其原因可能由于围手术期全身各器官慢性损伤, 储备功能差, 尤以肝肾为主, 常伴有慢性肾功能不全、慢性代谢性酸中毒、黄疸等症状, 造成凝血功能障碍且矫正困难, 从而导致大量出血. 另外, 晚期肝硬化患者PLT明显减少, 脾大, 脾功能亢进, 产生抗血小板自身抗体和肠源性内毒

素, 血小板生成素(TPO)减少, 不仅数量减少, 功能也常常受到不同程度的影响. 肝硬化肝癌患者则出血较少, PT、APTT异常但较易保持轻度低凝状态. 本文肝癌患者术中平均出血量仅2200 mL, 与单纯肝硬化患者相比明显减少. 究其原因可能是由于原发性肝癌患者常表现有伴癌综合征的特点, 如红细胞增多、血液高凝等. 这些表现恰恰适度抵消肝功能不全引起的血液低凝. 急性肝功能衰竭组之出血量居肝硬化与原发性肝癌组之间. 此类患者常急诊行亲体肝移植术, 术时患者内环境紊乱, 在全身应激因子所致的级联反应影响之下, 各器官储备功能虽强但无以发挥. 急诊肝移植术后, 内环境纠正, 各器官功能得以迅速恢复, 其凝血功能亦然. 总体来说, 原位移植术较亲体肝移植平稳, 出血量亦少. 70%的患者仅使用补充凝血因子的药物即可保证手术的顺利进行而不需要额外的血液制品. 再灌注后机体各系统功能的近期恢复较亲体移植迟缓. 有关原位移植与亲体肝移植远期疗效的对比性研究我们还需要进一步的研究与探讨. 总之, 不同的移植方式与不同病因使受者术中的凝血功能变化不尽相同. 因此我们应根据患者的具体情况, 详尽分析与监测, 才能有效地改善移植患者围手术期凝血/纤溶功能, 保证手术顺利进行及术后患者的平稳恢复.

4 参考文献

1 Bassas AF, Chehab MS, Al-Shahed MS, Djurberg HG, Al-Shurafa HA, Jawdat MT, Al-Hussaini HF, Zuleika MA, Al-Hebby HA, Wali SH. Pediatric living-related liver transplantation in Saudi Arabia. *Saudi Med J* 2002; 23: 640-644

2 苏茂生, 周宁新, 史宪杰, 万涛. 肝移植围手术期出凝血功能障碍的防治. 消化外科 2004; 3: 27-30

3 Contreras M, Ala FA, Greaves M, Jones J, Levin M, Machin SJ, Morgan C, Murphy W, Napier JA, Thomson AR. Guidelines for the use of fresh frozen plasma. British Committee for Standards in Haematology, Working Party of the Blood Transfusion Task Force. *Transfus Med* 1992; 2: 57-63

4 Camci C, Akdogan M, Gurakar A, Gilcher R, Rose J, Monlux R, Alamain S, Wright H, Sebastian A, Nour B. The impact of total plasma exchange on early allograft dysfunction. *Transplant Proc* 2004; 36: 2567-2569

5 Kimmings AN, van Deventer SJ, Obertop H, Rauws EA, Huibregtse K, Gouma DJ. Endotoxin, cytokines, and endotoxin binding proteins in obstructive jaundice and after preoperative biliary drainage. *Gut* 2000; 46: 725-731

6 Salooja N, Perry DJ. Thrombelastography. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12: 327-337

7 武宙阳. Sonoclot凝血和血小板功能分析仪在体外循环中的应用.《国外医学》麻醉学与复苏分册 2003; 24: 55

8 邓彩英, 邓小明. Sonoclot凝血和血小板功能分析仪在临床中的应用.《国外医学》麻醉学与复苏分册2001; 22: 168

9 Takatsuki M, Chen CL, Chen YS, Cheng YF, Huang TL. Systemic thrombolytic therapy for late-onset portal vein thrombosis after living-donor liver transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 1014-1018

10 Ozier Y, Steib A, Ickx B, Nathan N, Derlon A, Guay J, De Moerloose P. Haemostatic disorders during liver transplantation. *Eur J Anaesthesiol* 2001; 18: 208-218

11 Leroy-Matheron C, Duvoux C, Van Nhieu JT, Leroy K, Cherqui D, Gouault-Heilmann M. Activated protein C resistance acquired through liver transplantation and associated with recurrent venous thrombosis. *J Hepatol* 2003; 38: 866-869

12 周芸, 徐以南, 刘健. 原位肝移植手术病人凝血及抗凝血指标的动态观察. 临床检验杂志 2006; 24: 60

13 Harding SA, Mallett SV, Peachey TD, Cox DJ. Use of heparinase modified thrombelastography in liver transplantation. *Br J Anaesth* 1997; 78: 175-179

14 Chen JW, Chen DZ, Lu GZ. Asymptomatic process of hepatic artery thrombosis in a patient after orthotopic liver transplantation. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004; 3: 149-151

15 Pawlak J, Grodzicki M, Leowska E, Malkowski P, Michalowicz B, Nyckowski P, Rowinski O, Pacho R, Zieniewicz K, Andrzejewska M, Oldakowska U, Grzelak I, Patkowski W, Alsharabi A, Remiszewski P, Dudek K, Krawczyk M. Vascular complications after liver transplantation. *Transplant Proc* 2003; 35: 2313-2315

■**同行评价**

本文内容丰富，科学性强，具有较好的临床实用价值.

编辑 程剑侠 电编 刘勇

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3734-3737
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

鲜壁虎不同部位提取液对小鼠H22肝癌体内外抑制作用

杨丽华, 杨金霞, 王学美, 富 宏, 刘庚信

■背景资料
肝癌在我国发病率高, 预后差, 寻找有效的抗肝癌药物具有重大的现实意义. 大量基础、临床研究证实壁虎具有良好的抗癌作用, 探究其有效部位可指导临床用药.

杨丽华, 杨金霞, 王学美, 富宏, 刘庚信, 北京大学第一医院中西医结合研究室 北京市 100034
国家自然科学基金资助项目, No. 30472137
国家中医药管理局资助项目, No. 04-05ZP04
通讯作者: 王学美, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院中西医结合研究室. wangxuemei64@sohu.com
电话: 010-66551122-3053 传真: 010-66551328
收稿日期: 2007-09-10 修回日期: 2007-10-30

Anti-tumor effects of fresh extracts from different parts of gecho on mouse H22 hepatocellular carcinoma *in vivo* and *in vitro*

Li-Hua Yang, Jin-Xia Yang, Xue-Mei Wang, Hong Fu, Geng-Xin Liu

Li-Hua Yang, Jin-Xia Yang, Xue-Mei Wang, Hong Fu, Geng-Xin Liu, Department of Integrated Chinese Medicine and Western Medicine, the First Hospital of Peking University, Beijing 100034, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30472137; the State Administration of Traditional Chinese Medicine, No. 04-05ZP04
Correspondence to: Xue-Mei Wang, Department of Integrated Chinese Medicine and Western Medicine, the First Hospital of Peking University, 8 Xishiku Street, Xicheng District, Beijing 100034, China. wangxuemei64@sohu.com
Received: 2007-09-10 Revised: 2007-10-30

Abstract

AIM: To research the anti-proliferation effects of fresh extracts from different parts of gecko on cultured H22 hepatoma cells *in vitro*, and the tumor-inhibiting effects of these extracts on mice with transplanted H22 tumors *in vivo*, to identify the active components.

METHODS: MTT assay was used to evaluate the anti-proliferation effects of fresh extracts from different parts of gecko, such as the skin, head, muscle and bone, internal organs, tail and whole gecko, on cultured H22 hepatoma cells *in vitro*. Transplanted H22 tumor-bearing mice were used as a model for observing the anti-tumor effects of extracts from gecko internal organs, geckos without internal organs and whole geckos. The mice were divided into two groups and given each type of extract, with one group receiving a high dose and the other a low dose.

RESULTS: High doses of gecko internal organ extract revealed an obvious anti-proliferation effect on H22 cells in the *in vitro* experiment, the inhibition rate was 61.6%. Compared with other extracts, the inhibitory effect was significant ($P < 0.01$). In the *in vivo* experiment, the level of inhibition in the 5-FU group was 65.3%. The levels of inhibition of low and high doses of extracts from gecko internal organs extract were 8.4% and 16.8%, respectively. Those seen with low and high doses of extracts from geckos without internal organ were 26.3% and 42.1%, respectively, while those low and high doses of extract from whole gecko were 31.6% and 52.1%, respectively. Compared with the model group, there were statistical differences in tumor weights of mice treated with extract from geckos without internal organs and whole gecko ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). However, compared with the tumor weights of the 5-FU group, only the high-dose of extract from whole gecko showed no difference ($P > 0.05$). There were no differences in thymus weight, thymus index, spleen weight, or spleen index all gecko groups and the model group. However, these four observed items were all significantly lower in the 5-FU group than those in the model group and whole gecko group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Gecko extracts have good anti-tumor effects.

Key Words: *Gecko Swinhonis Gunther*; Anti-tumor Activity; MTT assay

Yang LH, Yang JX, Wang XM, Fu H, Liu GX. Anti-tumor effects of fresh extracts from different parts of gecho on mouse H22 hepatocellular carcinoma *in vivo* and *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3734-3737

摘要

目的: 探讨鲜壁虎不同部位提取液对培养的H22肝癌细胞体外抑制增殖作用和对H22实体型移植瘤小鼠的体内抑制作用, 寻找有效的抗肿瘤活性成分.

方法: MTT法检测高、低剂量的壁虎皮肤、头部、肌肉骨骼、内脏、尾部及全壁虎的提取液对H22肝癌细胞的体外杀伤作用. 采用

昆明小鼠H22移植瘤模型观察壁虎内脏高、低剂量组, 去内脏壁虎高、低剂量组, 全壁虎高、低剂量组的体内抑瘤活性及荷瘤小鼠胸腺和脾脏指数的变化.

结果: 体外实验结果显示, 壁虎内脏提取液高剂量可显著抑制H22细胞的增殖, 抑制率为61.6%, 与其他部位的提取液相比有显著差异(P<0.01). 体内抑瘤实验, 5-FU组的抑瘤率为65.3%, 内脏低剂量和高剂量组的抑瘤率为8.4%和16.8%, 去内脏为26.3%和42.1%, 全壁虎为31.6%和52.1%. 去内脏壁虎的高、低剂量组和全壁虎的高、低剂量组的瘤重与模型组比较有统计学差异(P<0.05或P<0.01). 全壁虎高剂量组与5-FU组的瘤重相比较无统计学差异. 各壁虎组与模型组小鼠的胸腺重、胸腺指数, 脾脏重、脾脏指数相比均没有明显差异. 而5-FU组胸腺重、胸腺指数, 脾脏重、脾脏指数较模型组和各壁虎组均明显降低(P<0.01).

结论: 壁虎具有良好的抗肝癌效果.

关键词: 壁虎; 抗肝癌作用; MTT法

杨丽华, 杨金霞, 王学美, 富宏, 刘庚信. 鲜壁虎不同部位提取液对小鼠H22肝癌体内外抑制作用. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3734–3737

http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3734.asp

0 引言

大量研究报道, 壁虎有显著的抗肿瘤作用(尤其对消化道肿瘤)[1-7]. 本课题组前期实验也证实, 干、鲜壁虎冻干粉对小鼠H22肝癌具有确切的抑制作用[8]. 如何进一步寻找壁虎抗肿瘤的活性成分, 成为研究的关键问题. 对此我们进行如下探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 鲜壁虎购自河北祁澳中药饮片有限公司, 经中国科学院动物研究所两栖爬行类动物专家康景贵研究员鉴定为无蹼壁虎(*gekko swinhonis gunther*). 加工过程: 活体无蹼壁虎冷冻处死即为鲜壁虎. 用清水洗净若干只鲜壁虎, 将壁虎分成皮肤、头部、肌肉骨骼、内脏、尾部五部分. 另取若干只壁虎, 分成内脏和去除内脏两部分, 以及全壁虎若干. 均各加入等2倍重量的去离子水, 粉碎匀浆冻融10次, 低温离心10000 *g* 20 min. 取上清, -20℃冰箱保存备用. 氟尿嘧啶注射液(上海旭东海普药业有限公司, 批号050510), 加入适量的生理盐水中配至3 g/L, 备用. 用于细胞培养体外实验的药物另需用0.22 μm微孔无菌滤器过滤除菌. RPMI 1640培养液和胎牛血清(Gibco), 四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma), 二甲基亚砜(DMSO, Solarbio). 昆明小鼠, 体质量22-30 g, 96只, 雌雄各半, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号: SCXK(京)2002-2003). 小鼠H22肝癌种鼠购自中国医学科学院中国协和医科大学药物研究所. 江苏江阴周庄科研器械厂DS200高速度组织捣碎机, Du Pond company PC-5C低温高速离心机, OLYMPUS CKX41光学显微镜, Shimadzu AEU-210电子天平, Bio-Rad ModeL 1酶标仪, 低速离心机.

表 1 壁虎不同部位提取液对H22肝癌细胞的体外抑制增殖作用(mean ± SD, n = 8)

分组	A_{570nm}	抑制增殖率(%)
对照组	1.029 ± 0.154[d]	0
西药组	0.394 ± 0.037[b]	61. 7
头部低剂量	0.865 ± 0.117[bd]	15. 9
头部高剂量	0.838 ± 0.112[bd]	18. 6
内脏低剂量	0.594 ± 0.057[bd]	42. 3
内脏高剂量	0.395 ± 0.066[b]	61. 6
尾部低剂量	0.877 ± 0.125[bd]	14. 7
尾部高剂量	0.842 ± 0.119[bd]	18. 2
皮肤低剂量	0.757 ± 0.082[bd]	26. 5
皮肤高剂量	0.738 ± 0.097[bd]	28. 3
肌肉低剂量	0.745 ± 0.079[bd]	27. 6
肌肉高剂量	0.667 ± 0.070[bd]	35. 2
全壁虎低剂量	0.693 ± 0.096[bd]	32. 7
全壁虎高剂量	0.535 ± 0.031[bd]	48. 0

[b]P<0. 01 *vs* 对照组, [d]P<0. 01 *vs* 西药组.

1.2 方法

1.2.1 壁虎各部位提取液体外抑制H22肿瘤细胞增殖作用: H22荷瘤小鼠腹腔肿瘤细胞分别接种于小鼠腹腔连续传代, 无菌抽取出生7 d的小鼠腹腔肿瘤细胞, 用含100 g/L胎牛血清的RPMI 1640培养液调整肿瘤细胞浓度至1×10^7/L. 接种于两张96孔板, 每孔100 μL. 实验设对照组, 壁虎皮肤、头部、肌肉和骨骼、内脏、尾部五部分和全壁虎液的高低剂量组, 西药5-FU组, 共14组, 每组设8个复孔. 壁虎皮肤、头部、肌肉骨骼、内脏、尾部、全壁虎的高、低剂量组, 以过滤除菌的各提取液, 加入相同体积的2×1640培养液, 后加入一定量的胎牛血清, 使血清终浓度为10%, 即配成实验所需的药液. 各高剂量组每孔加入150 μL, 低剂量加入100 μL. 西药5-FU组, 每孔加入浓度为3 g/L的5-FU液25 μL. 调整板内各孔液体总量, 使其均为250 μL, 不足者补以含100 g/L

■**研发前沿**
壁虎具有良好的抗肿瘤作用, 但其成分十分复杂, 寻找有效部位成为亟待解决的问题.

■相关报道
杨金霞 *et al*报道, 干鲜壁虎冻干粉含药血清, 能显著抑制肿瘤细胞增殖, 其抗肿瘤作用可能是多途径多靶点.

表 2 H22荷瘤小鼠各组小鼠体质量、抑瘤率、胸腺指数和脾脏指数的比较(mean ± SD, n = 12)

分组	剂量 (mL/d)	体质量 (g) 给药前	体质量 (g) 给药后	瘤质量 (g)	抑瘤率(%)	胸腺质量 (mg)	胸腺指数 (mg/g)	脾质量 (mg)	脾脏指数 (mg/g)
对照组	–	26.2 ± 1.3	36.5 ± 3.0^{d}	1.90 ± 0.64^{d}	0	89.5 ± 20.2^{d}	2.48 ± 0.68^{d}	334.2 ± 70.9^{d}	9.20 ± 2.08^{d}
西药组		26.2 ± 1.4	27.3 ± 4.2^{b}	0.66 ± 0.21^{b}	65.3	29.3 ± 9.1^{b}	1.09 ± 0.35^{b}	153.9 ± 87.1^{b}	5.63 ± 3.10^{b}
内脏组低剂量	0.2	26.1 ± 0.9	34.2 ± 2.9	1.74 ± 0.64^{d}	8.4	74.6 ± 20.6^{d}	2.17 ± 0.66^{d}	292.3 ± 83.6^{d}	8.41 ± 2.27^{d}
内脏组高剂量	0.4	25.9 ± 1.6	33.8 ± 3.4	1.58 ± 0.72^{d}	16.8	72.4 ± 21.5^{d}	2.17 ± 0.71^{d}	306.5 ± 66.0^{d}	9.20 ± 2.43^{d}
去内脏低剂量	0.2	26.1 ± 1.3	33.5 ± 3.1	1.40 ± 0.58^{ad}	26.3	82.1 ± 12.3^{d}	2.47 ± 0.41^{d}	277.8 ± 50.0^{d}	8.32 ± 1.40^{d}
去内脏高剂量	0.4	26.1 ± 1.1	33.3 ± 4.1	1.10 ± 0.63^{bc}	42.1	86.9 ± 29.3^{d}	2.70 ± 1.10^{d}	273.6 ± 63.8^{d}	8.22 ± 1.58^{d}
全壁虎低剂量	0.2	26.0 ± 0.9	33.2 ± 4.0	1.30 ± 0.50^{bc}	31.6	85.5 ± 21.5^{d}	2.57 ± 0.65^{d}	281.8 ± 82.0^{d}	8.76 ± 3.45^{d}
全壁虎高剂量	0.4	26.2 ± 2.0	34.0 ± 3.4	0.91 ± 0.44^{b}	52.1	89.5 ± 21.5^{d}	2.68 ± 1.09^{d}	278.2 ± 74.6^{d}	8.26 ± 2.34^{d}

^{a}P<0.05, ^{b}P<0.01 *vs* 对照组; ^{c}P<0.05, ^{d}P<0.01 *vs* 西药组.

胎牛血清的RPMI 1640培养液. 培养板置于37℃, 50 mL/L CO_2的孵箱中培养72 h后, 每孔加入浓度为5 g/L的MTT液(现用现配)25 μL. 37℃, 5 mL/L CO_2饱湿继续孵育4 h后终止培养. 离心弃上清, 每孔加入200 μL的DMSO, 振荡10 min溶解沉淀, 混匀后以酶标仪于570 nm波长处读取各孔吸光度(A_{570nm}), 计算抑制率. 肿瘤细胞生长抑制率% = (对照孔A_{570nm}均值-实验组A_{570nm}均值/对照A_{570nm}均值)×100%.

1.2.2 壁虎各部位对H22荷瘤小鼠的影响: (1)体内抑瘤率的测定: H22荷瘤小鼠腹腔肿瘤细胞分别接种于小鼠腹腔连续传代, 无菌抽取出生7 d的小鼠腹腔肿瘤细胞, 加入生理盐水调整细胞悬液中肿瘤细胞浓度至4×10^9/L. 于每只小鼠右腋下注射0.2 mL肿瘤细胞悬液, 24 h后, 随机将小鼠分为8组: 模型组, 5-FU组, 壁虎内脏高、低剂量组, 去内脏壁虎高、低剂量组, 全壁虎高、低剂量组, 每组12只小鼠. 各组间体质量无差异(P>0.05). 模型组以生理盐水0.2 mL/d ig, 西药组以5-FU(浓度为3 g/L)0.2 mL隔天ip, 中药组以相应浓度的干、鲜壁虎液ig给药, 高剂量组每只小鼠ig量为0.4 mL/d, 低剂量组为0.2 mL/d. 连续给药12 d后, 第13天引颈处死小鼠, 剥瘤、称质量、计算抑瘤率. 局部实体瘤生长的抑制率 = [(模型组平均瘤质量-实验组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量]×100%. (2)对免疫器官的影响: 引颈处死小鼠后, 立即分离胸腺和脾脏, 剔除周围结缔组织和脂肪, 用滤纸吸干脏器表面水分, 称量, 计算脏器指数. 胸腺(脾脏)指数 = 胸腺(脾脏)质量(mg)/体质量(g).

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件, 数据形式采用mean±SD的形式表示. 组间比较采用单因素方差分析, 检验水准α = 0.05.

2 结果

2.1 壁虎各部位提取液体外抑瘤实验 壁虎各部位提取液体均可抑制H22细胞的体外增殖. 其抑制率以内脏高剂量组最高, 为61.6%. 与西药组的抑制率61.7%齐平, 与壁虎其他部位的提取液抑瘤率比较有显著统计学差异(P<0.01). 此实验重复3次, 重复性较好(表1).

2.2 体内抑瘤实验

2.2.1 对H22荷瘤小鼠体质量的影响: 实验结果显示, 各组小鼠的体质量较对照组均有所减轻, 但无统计学差异. 西药组小鼠体质量较对照组明显减轻(P<0.01, 表2).

2.2.2 对H22荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用及对胸腺脾脏的影响: 所有壁虎给药组的平均瘤质量均小于对照组. 以全壁虎高剂量组抑瘤率最高, 为52.1%. 5-FU组的抑瘤率为65.3%, 内脏低剂量和高剂量组的抑瘤率为8.4%、16.8%, 去内脏低剂量和高剂量组的抑瘤率为26.3%、42.1%, 全壁虎低剂量和高剂量组的抑瘤率为31.6%、52.1%. 去内脏壁虎的低剂量与模型组比较有统计学差异(P<0.05). 去内脏壁虎高剂量和全壁虎的高、低剂量组的瘤质量, 与模型组比较差异更为显著(P<0.01). 仅全壁虎高剂量组与5-FU组的瘤质量相比较没有统计学差异(P>0.05). 所有壁虎给药组与对照组小鼠的胸腺质量、胸腺指数, 脾脏质量、脾脏指数均没有明显差异(P>0.05). 而西药组胸腺质量、胸腺指数, 脾脏质量和脾脏指数较对照组和壁虎各不同部分组明显降低(P<0.01)(表2).

3 讨论

我们多年研究发现, 壁虎具有确切的抗肿瘤作用[9-12]. 寻找壁虎抗肿瘤活性成分, 具有重要意义.

鉴于动物药有效成分的分布具有不同部位成分含量差别很大的特点, 我们把壁虎分为皮肤、头部、肌肉骨骼、内脏、尾部并与全壁虎进行体外抗肝癌效果比较, 以期找到有效成分密集的部位, 以便进一步寻找壁虎抗肝癌的有效成分.

观察壁虎不同部位提取液对体外培养的H22细胞的体外抑制增殖作用, 发现壁虎内脏提取液的作用最为显著. 众所周知, 体外实验本身具有一定的局限性, 其实验结果有假阳性或假阴性的可能. 为进一步验证体外实验结果的真实性, 我们做了体内实验. 体内实验结果显示, 壁虎提取液对小鼠肿瘤组织的生长均有一定的抑制作用. 其中以全壁虎的提取液抗肿瘤效果最佳, 其低、高剂量组的抑瘤率为31.6%和52.1%, 而内脏低、高剂量组的抑瘤率仅为8.4%和16.8%. 体内实验的结果再一次证实了壁虎提取液具有良好的抗肿瘤作用, 但也表明体内、外实验结果差别很大, 单纯靠体外实验的方法得到的结论有一定的不足. 此次体外实验出现假阳性结果的原因可能为壁虎内脏组织本身成分比较复杂, 其本身物理、化学性质不太适合细胞的生长. 体内实验排出了体内实验的这些干扰. 结合体内外实验结果, 我们认为, 内脏提取液作为抗肿瘤活性物质的来源基本可以排除. 体内实验同时显示, 5-FU组小鼠的胸腺质量、胸腺指数和脾脏质量、脾脏指数较对照组和各壁虎组明显降低($P<0.01$), 各壁虎组的胸腺质量、胸腺指数和脾脏质量、脾脏指数较对照组没有明显差异. 可见, 壁虎提取液对荷瘤小鼠免疫功能有保护作用, 优于西药5-FU.

总之, 我们认为壁虎提取液具有良好的抗肿瘤效果, 寻找其抗肿瘤的有效成分需要进一步继续深入研究. 在研究的过程中要坚持体内实验和体外实验相结合的方式, 避免实验出现假阳性或假阴性的结果.

■同行评价
本文层次清楚, 语句通顺, 有一定临床应用前景.

4 参考文献

1 张才擎, 梁铁军, 袁孟彪. 金龙胶囊联合肝动脉化疗栓塞治疗原发性肝癌疗效观察. 北京医学 2005; 27: 357-359
2 陈明, 黄坚航. 中药壁虎现代研究进展. 世界科学技术−中药现代化 2001; 3: 53-55
3 康建功, 张仕状, 李耀辉, 曲林涛. 鲜无蹼壁虎抗肿瘤活性成分抑制CT-26肿瘤细胞生长实验研究. 中国医院药学杂志 2007; 27: 441-444
4 崔永玲. 李建生治疗食管癌的经验. 北京中医 2005; 24: 269-270
5 刘玉琴, 高进, 李建生. 金龙胶囊抗肿瘤复发、转移的实验研究. 北京医学 2005; 27: 554-557
6 吴本端. 复方壁虎粉治疗中晚期食管癌105例临床观察. 中国中西医结合杂志 1999; 19: 502
7 杨金霞, 王学美. 壁虎治疗肿瘤的研究进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2428-2431
8 杨金霞, 王学美, 朱伟, 富宏, 刘庚信. 干、鲜壁虎冻干粉对小鼠H22肝癌体内外抑制作用. 世界华人消化杂志 2007; 15: 157-160
9 谢爽, 王学美, 谢东泽. 鲜壁虎提取液抑制C6胶质瘤细胞增值和诱导凋亡的研究. 肿瘤防治研究 2003; 30: 458-461
10 宋萍, 王学美, 谢爽, 卜定方, 富宏, 刘庚信. 鲜壁虎冻干粉诱导C6胶质瘤细胞凋亡的血清药理学研究. 中国中西医结合杂志 2004; 24: 919-921
11 宋萍, 王学美, 谢爽, 卜定方. 鲜壁虎冻干粉抑制H22肿瘤血管生成机理的实验研究. 中国中西医结合杂志 2006; 26: 58-62
12 杨金霞, 杨国生, 朱伟, 富宏, 刘庚信, 王学美. 干、鲜壁虎冻干粉对S180荷瘤小鼠的抑瘤作用及其急性毒性实验研究. 中国中药杂志 2007; 32: 238-241

编辑 程剑侠 电编 李海寅

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3738-3743
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

清胰汤对大鼠急性胰腺炎肺损伤时SP-A表达的影响

张雪梅, 陈海龙, 王朝晖

■背景资料
肺损伤(ALI)是SAP常见的并发症, 其发生机制尚未明确. 肺泡Ⅱ型上皮细胞功能改变在急性肺损伤中起重要作用, 其主要功能是合成、分泌肺泡表面活性物质, SP-A是肺泡表面活性物质的主要成分之一. SP-A在急性胰腺炎肺损伤时的变化, 及其在SAP合并ALI发生机制中的作用尚未见报道.

张雪梅, 陈海龙, 大连医科大学附属一院普外科 辽宁省大连市 116011
王朝晖, 大连医科大学附属二院消化内科 辽宁省大连市 116027
国家自然科学基金资助项目, No. 90709005
通讯作者: 陈海龙, 116011, 辽宁省大连市西岗区中山路222号, 大连医科大学附属第一医院普外科. hailongchen2006@126.com
电话: 0411-83634153 传真: 0411-83622844
收稿日期: 2007-08-04 修回日期: 2007-10-29

Influence of Qingyitang on surfactant protein A expression in severe acute pancreatitis-induced lung injury in rats

Xue-Mei Zhang, Hai-Long Chen, Zhao-Hui Wang

Xue-Mei Zhang, Hai-Long Chen, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
Zhao-Hui Wang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, Liaoning Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 90709005
Correspondence to: Hai-Long Chen, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, 222 Zhongshan Road, Xigang District, Dalian 116011, Liaoning Province, China. hailongchen2006@126.com
Received: 2007-08-04 Revised: 2007-10-29

Abstract

AIM: To investigate the expression of surfactant protein A (SP-A) in the lungs of rats with severe acute pancreatitis (SAP), and the effect of Qingyitang on acute lung injury (ALI) induced by SAP.

METHODS: SD rats were randomly divided into sham-operation group (SO, n = 10), SAP model group (SAP, n = 10) and Qingyitang group (QYT, n = 10). Severe acute pancreatitis was induced in the SAP and QYT groups. Sham operations were only performed on rats in the SO group. QYT (10 mL/kg) was intragastrically administered 30 min and 12 hours after SAP was induced in the QYT group. Serum amylase (AMY) levels, PaO_2 and lung wet/dry ratio (W/D) were determined. The level of SP-A mRNA expression in lung was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). SP-A protein in lung was detected by Western blotting. Pathological changes in the pancreas, lung and alveolar type II cells were observed 24 hours after the establishment of the model.

RESULTS: The serum levels of AMY (7144.19 U/L ± 727.91 U/L) in rats of the SAP group were remarkably higher than those in rats of the QYT (4283.51 U/L ± 527.52 U/L) and SO (1193.41 U/L ± 192.54 U/L, P < 0.01) groups. The levels of PaO_2 in rats of the SAP group (79.24 mmHg ± 5.84 mmHg) were lower than those in rats of the SO (96.78 mmHg ± 3.81 mmHg) and QYT (88.16 mmHg ± 5.07 mmHg, P < 0.01) groups. The expression levels of SP-A mRNA and SP-A in the rat lungs of the SAP group were significantly decreased compared with those in rats in the SO and QYT groups (P < 0.01). The pathologic changes of the pancreas, lung and alveolar type II cells in rats of the QYT and SO groups were milder than those in rats of the SAP group.

CONCLUSION: The levels of SP-A decrease remarkably in rats with ALI induced by SAP. Administration of QYT reduces injury of lung by protecting alveolar type II cells and increasing the expression of SP-A.

Key Words: Severe acute pancreatitis; Acute lung injury; Surfactant protein A; RT-PCR

Zhang XM, Chen HL, Wang ZH. Influence of Qingyitang on surfactant protein A expression in severe acute pancreatitis-induced lung injury in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3738-3743

摘要

目的: 探讨重症急性胰腺炎(SAP)肺损伤(ALI)时肺表面活性蛋白A(SP-A)的表达及其在ALI发病中的作用, 并观察清胰汤对SP-A表达和病情转归的影响.

方法: 采用胆胰管内逆行注入1.5%去氧胆酸钠建立大鼠SAP时ALI模型. 将SD大鼠随机分为假手术组(n = 10)、模型组(n = 10)和清胰汤组(n = 10). 假手术组仅行剖腹术, 翻动胰腺. 清胰汤组在建立SAP模型后30 min和12 h清胰

汤ig(10 mL/kg). 各组大鼠在术后24 h测PaO_2和血淀粉酶. 应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测肺SP-A mRNA的表达强度, Western-blot观察SP-A表达, 并观察胰、肺病理变化及肺泡Ⅱ型上皮细胞的电镜下变化.

结果: 模型组血淀粉酶(7144.19 U/L±727.91 U/L)显著高于清胰汤组(4283.51 U/L±527.52 U/L)和假手术组(1193.41 U/L±192.54 U/L, P<0.01). 模型组PaO_2显著低于假手术组和清胰汤组(79.24±5.84 *vs* 96.78±3.81, 79.24±5.84 *vs* 88.16±5.07, P<0.01). 清胰汤组肺SP-A mRNA表达显著高于模型组(P<0.01), 肺SP-A蛋白的表达显著高于模型组, SP-A mRNA的表达与肺损伤的程度呈负相关. 清胰汤组胰、肺病理及电镜改变较模型组减轻.

结论: SAP时肺泡Ⅱ型上皮细胞功能受损, SP-A mRNA表达降低导致急性肺损伤的机制之一. 清胰汤能保护肺泡Ⅱ型上皮细胞功能, 恢复SP-A mRNA正常表达, 维持肺泡功能, 从而对肺组织起保护作用.

关键词: 急性重症胰腺炎; 急性肺损伤; 肺表面活性蛋白A; 逆转录聚合酶链式反应

张雪梅, 陈海龙, 王朝晖. 清胰汤对大鼠急性胰腺炎肺损伤时SP-A表达的影响. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3738-3743
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3738.asp

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)死亡率高达15%-25%[1], 其中死亡病例中有50%发生重度肺损伤[2]. 急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)一旦启动胰腺腺泡的炎症过程, 病情进一步发展会导致全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS). 其中急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是SAP常见而严重的并发症之一[3]. 已有研究证实, 肺泡Ⅱ型上皮细胞功能改变在急性肺损伤中起重要作用[4-6], 其主要功能是合成、分泌肺泡表面活性物质. 肺表面活性蛋白A(surfactant protein A, SP-A)是肺泡表面活性物质的主要成分之一, 对维持肺泡的结构、功能具有重要作用[7]. 本文通过大鼠SAP合并ALI模型, 探讨SP-A的变化在急性胰腺炎肺损伤发生机制中的作用及清胰汤对其的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年清洁级♂SD大鼠30只, 体质量180-220 g, 大连医科大学实验动物中心提供, 适应性饲养1 wk. 清胰汤组成: 茵陈20 g、栀子20 g、大黄20 g、芒硝20 g、木香15 g、柴胡5 g、元胡15 g、白芍15 g、甘草6 g、当归15 g、双花20 g、连翘20 g, 制成质量体积比为1∶1的药液, 灭菌处理后瓶装冰箱存放. 去氧胆酸钠为Sigma公司产品, TRIzol为Invitrogen公司产品. 引物由大连宝生物合成, SP-A: 5'-GGAAGCCCTGGGATCCCTGG-3'(上游), 5'-TAATGGTATCAAAGTTGACTG-3'(下游), GAPDH: 5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG3'(上游), 5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'(下游). RT-PCR试剂盒为大连宝生物公司产品, 兔抗大鼠SP-A抗体和生物素标记羊抗兔抗体为Santa Cruz公司产品, PCR扩增仪为Biometra公司产品, 紫外分光光度计为美国Beckman Coulter公司产品, 凝胶图像分析系统(AABI Gel Analysis), Bio-RAD电泳系统.

1.2 方法

1.2.1 分组和造模: 将实验大鼠随机分为假手术组(SO组)、模型组(SAP组)和清胰汤治疗组(QYT组), n = 10. 采用胆胰管内逆行注入1.5%去氧胆酸钠建立大鼠SAP时ALI模型. 大鼠术前12 h禁食、不禁水, 用100 g/L水合氯醛(3 mL/kg)ip麻醉, 无菌条件下, 腹壁正中切口入腹, 显露出十二指肠. 于胆管出肝门端以无损伤小动脉夹暂时阻断胆管, 寻找到胆胰管十二指肠乳头开口处. 在其对侧肠壁插入1 mL小注射器, 针头经胆胰管十二指肠乳头开口入胆胰管, 妥善固定. 以15 g/L去氧胆酸钠匀速注入(1 mL/kg, 0.1 mL/min), 注毕后拔管, 5 min后去除小动脉夹缝合腹壁. SO组于开腹后翻动胰腺数次, 关腹. QYT组分别于造模成功后30 min和12 h给予清胰汤(10 mL/kg) ig. 各组动物分别于造模成功后24 h留取标本. 颈动脉采血做动脉血气分析, 经下腔静脉采血, 用全自动生化分析仪检测血淀粉酶.

1.2.2 肺湿/干比值(W/D)测定: 动物放血致死后取右肺称湿重, 置60℃烤箱连续烘烤24 h. 去除水分至衡重, 称肺干重, W/D.

1.2.3 病理检查: 左肺中叶用40 g/L中性甲醛固定液中, 石蜡包埋制作5 μm切片, HE染色后显微镜观察并照相. 病理医师单盲读片, 肺病理改变采用Derks *et al*[4]描述的评分标准评分. 40 g/L甲醛固定胰腺组织, 切片后行HE染色, 显微镜观察并照相.

1.2.4 肺组织中SP-A mRNA表达的检测: 采用反转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术. TRIzol

■研发前沿

SAP合并ALI时肺部细胞功能的改变是近年的研究热点. 肺泡Ⅱ型上皮细胞是维持肺功能的主要细胞, 其在ALI时的功能改变及在SAP时如何保护肺功能、早期预防ALI是目前急需解决的难题.

■相关报道
Mora *et al*在LPS引起鼠ALI的动物模型中发现24 h内鼠支气管肺泡灌洗液内SP-A和SP-B含量减少, 同时伴有PS功能和肺功能的障碍. 本实验发现SAP合并急性肺损伤模型24 h后, 肺组织SP-A mRNA的表达减弱, 肺SP-A蛋白表达减少. 肺SP-A含量的减少可能发生在转录水平, Ⅱ型肺泡上皮细胞结构的破坏可能是SP-A mRNA表达减弱的原因之一.

试剂抽提肺组织中总RNA, 经紫外光检测A_{260}和A_{280}, A_{260}/A_{280}在1.6-2.2之间, 计算总RNA的浓度. 逆转录后行PCR扩增, 反应条件: 99℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 55℃ 退火30 s, 72℃延伸60 s, 循环30次, 72℃延伸7 min, 最后降至4℃结束反应. PCR产物琼脂糖凝胶电泳后, 用凝胶图像分析系统进行电泳条带密度分析, 以SP-A条带与GAPDH条带密度比代表靶基因mRNA的表达水平.

1.2.5 Western blot检测肺组织SP-A的表达: 左肺下叶置入蛋白裂解液, 制备组织匀浆, 提取蛋白质, 用考马斯亮蓝法测定蛋白含量. 取蛋白100 μg, 12% SDS-PAGE电泳, 转膜, 5%脱脂奶粉37℃封闭1 h, 加入兔抗大鼠的SP-A抗体, 4℃过夜, 漂洗3次, 加入辣根过氧化酶标记的Ⅱ抗(山羊抗兔IgG-HRP), 常温1 h后漂洗, 加入ECL试剂, 即刻压片成像.

1.2.6 电镜观察: 从每组中随机取出3例. 肺组织取材后, 经25 g/L的戊二醛固定1 h, 常规脱水, 浸透, 包埋, 超薄切片, 经锇酸染色后, 置透射电镜下观察肺泡Ⅱ型上皮细胞.

统计学处理 数据以mean±SD表示, 采用*t*检验. 相关性检验采用线性回归分析. 应用SPSS10.0统计软件分析, 以$P<0.05$表示差异有显著性. 等级资料采用Wilcoxon等级资料秩和检验.

2 结果

2.1 动脉血气(PaO_2)、血清淀粉酶(AMY)、肺组织W/D的变化 与SO组比较, SAP模型组PaO_2明显下降($t = 0.7953$, $P<0.01$), 表明SAP组肺功能有明显损伤. QYT组PaO_2与SAP组比较有明显升高, 差别有显著性($t = 3.644$, $P<0.01$). SAP组AMY(7144.19 U/L±727.91 U/L)显著高于SO组(1193.41 U/L±192.54 U/L, $t = 24.993$, $P<0.01$). QYT组AMY(4283.51 U/L±527.52 U/L)与SAP组比较有显著降低($t = 10.063$, $P<0.01$). SAP模型组肺组织W/D(8.57±2.45)较SO组(3.70±0.90)有显著增高($t = 5.280$, $P<0.01$). QYT组肺组织W/D(4.05±0.52)与SAP组比较比值有显著降低($t = 5.113$, $P<0.01$)(表1).

2.2 RT-PCR结果 SAP组SP-A mRNA表达较SO组明显减少($t = 7.453$, $P<0.01$), QYT治疗组SP-A mRNA表达较SAP组显著增高($t = 4.497$, $P<0.01$)(表1, 图1).

2.3 Western-blot结果 SO组SP-A蛋白有明显表达, 与SO组比较, SAP组SP-A表达显著降低; QYT组与SAP组比较SP-A表达有明显升高(图2).

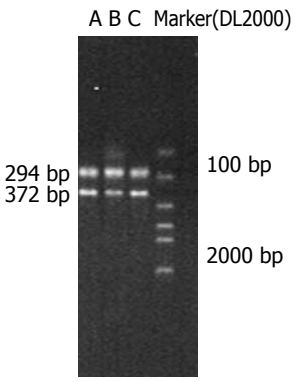


图 1 各组肺组织SP-A mRNA表达. A: SO组; B: SAP组; C: QYT组.

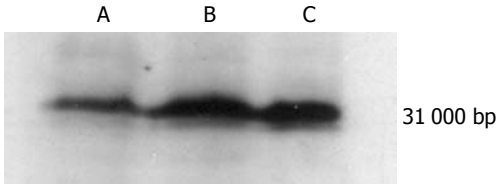


图 2 各组肺组织SP-A Western blot结果. A: SO组; B: SAP组; C: QYT组.

2.4 肺组织病理学改变 SO组为正常肺组织病理切片, 肺组织结构清晰, 肺泡壁薄, 肺泡腔内偶见巨噬细胞, 未见中性粒细胞浸润. SAP模型组可见肺间质高度充血、水肿, 大部肺泡间隔明显增宽, 较多的肺泡萎陷及邻近肺泡隔断裂形成肺大泡, 肺间质大量中性粒细胞浸润, 毛细血管扩张、充血, 灶状肺泡内出血, 组织学评分显著高于SO组($t = 34.069$, $P<0.01$). QYT组可见肺组织结构清晰, 肺泡间质轻度充血, 可见少量白细胞浸润, 组织学评分显著低于SAP组($t = 10.624$, $P<0.01$)(表1, 图3). SP-A mRNA表达与肺损伤评分呈负相关(SAP组: $t = 0.876$, $P<0.01$, QYT组: $t = 0.750$, $P<0.05$).

2.5 胰腺病理组织学改变 SO组胰腺结构大致正常. SAP组可见胰腺弥漫性出血、片状坏死, 胰腺间质及腺泡炎症细胞浸润. QYT组胰腺病变较SAP组明显减轻(图4).

2.7 电镜结果 见SO组肺泡Ⅱ型细胞形状较规则, 细胞表面有很多长短不一、粗细不等的微绒毛, 胞核明显, 胞质内含有数量不等、大小不一的特征性板层小体, 且可看到其不同的成熟阶段. SAP组可见肺泡Ⅱ型细胞相对不规则、细胞变性、甚至崩解、细胞表面微绒毛减少, 胞质内板层小体排空明显增多而致空泡化并可见脱落的板层小体. QYT组可见肺泡Ⅱ型上皮细胞形态较SAP组明显好转, 板层小体空泡化, 较SAP

■创新盘点
本文首次研究SAP合并ALI时肺泡Ⅱ型上皮细胞形态、功能改变. 主要研究了在转录和翻译水平肺SP-A的表达变化, 同时研究了清胰汤治疗后肺泡Ⅱ型上皮细胞形态改变及SP-A表达的变化.

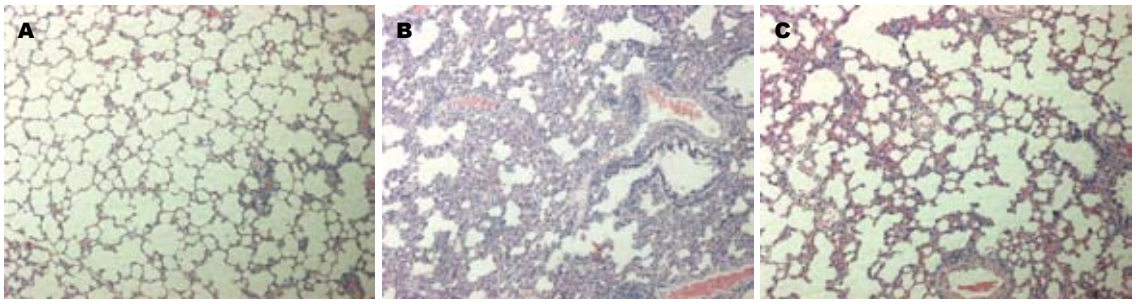


图 3 各组大鼠肺组织HE染色结果照片(×200). A: SO组; B: SAP组; C: QYT组.

■应用要点
本研究表明, 在SAP合并ALI时, 肺泡Ⅱ型上皮细胞SP-A表达降低. 应用清胰汤可以减轻肺损伤, 使SP-A表达较SAP组增高, 为临床上早期应用清胰汤防治SAP合并ALI提供理论依据.

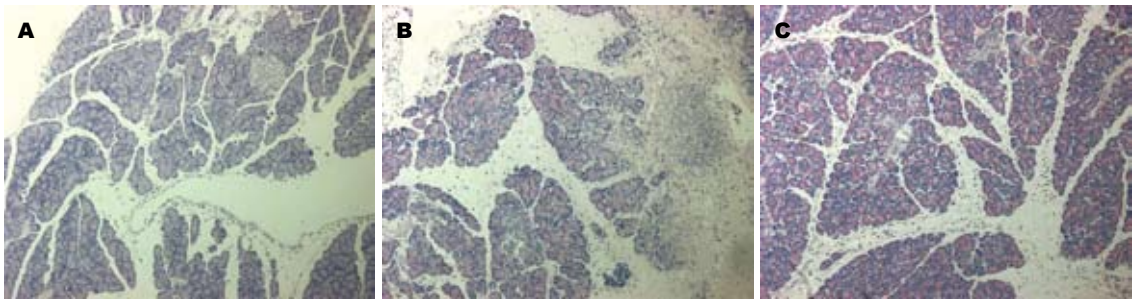


图 4 各组大鼠胰腺组织HE染色照片(×200). A: SO组; B: SAP组; C: QYT组.

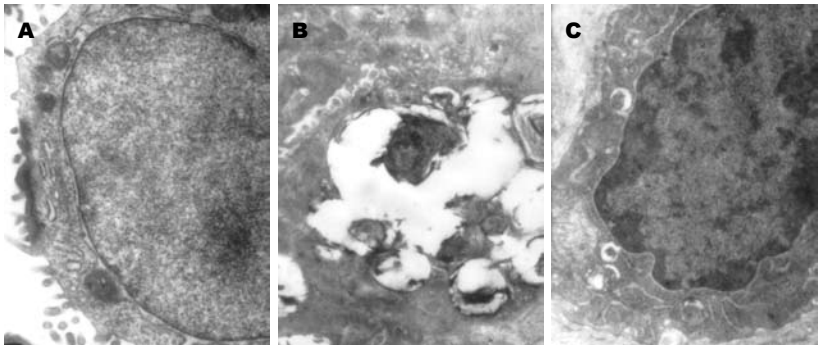


图 5 各组大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞电镜照片(×8000). A: SO组; B: SAP组; C: QYT组.

表 1 大鼠PaO_2、AMY、肺W/D、肺SP-A mRNA和病理评分结果

	PaO_2(mmHg)	AMY(U/L)	W/D	SP-A mRNA	病理评分
SO组	96.78±3.81	1193.41±192.54	3.70±0.90	1.21±0.10	0
SAP组	79.24±5.84[a]	7144.19±727.91[a]	8.57±2.45[a]	0.80±0.11[a]	8.49±0.79[a]
QYT组	88.16±5.07[c]	4283.51±527.52[d]	4.05±0.52[c]	1.10±0.15[c]	5.33±0.57[c]

[a]P<0.05 *vs* SO组; [c]P<0.05 *vs* SAP组.

组明显减轻(图5).

3 讨论

肺表面活性蛋白(surfactant protein, SP)是肺泡表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)的有效活性成分. 其重要功能是促进肺泡气-液界面的表面活性膜的形成和稳定, 防止肺泡萎陷. SP-A是SP含量最多的一种多功能糖蛋白, 由肺泡Ⅱ型细胞及Clara细胞合成并分泌入呼吸道[8]. 其在维护并增强PS系统的表面活性、促进PS磷脂单分子层在气液界面的吸附扩展、调控PS系统的自身稳定、参与宿主呼吸系统局部防御机制等方面都有非常重要的作用[9]. 近年来, 人们认识到肺内PS活性成分的减少可能比总量的减少在肺损伤发病中更有意义. 研究表明, 随着PS系统及肺功能损害, 肺内SP-A减少[9-10]. SP-A减少可使PS活性降低、代谢障碍, 使PS对氧自由基和脂质过氧化物, 以及渗出血浆蛋白灭活作用的

■名词解释
SP-A: 肺泡表面活性蛋白A, 由肺泡Ⅱ型上皮细胞合成并分泌到肺泡腔. 他是肺泡表面活性物质的主要成分, 主要功能是使肺泡气-液界面的表面活性膜形成和稳定, 防止肺泡萎陷.

抵抗能力明显减弱[9,11-14]. Mora *et al*[15]在LPS引起鼠ALI的动物模型中发现, 24 h内鼠支气管肺泡灌洗液内SP-A和SP-B含量减少, 同时伴有PS功能和肺功能的障碍. 本实验发现, SAP合并急性肺损伤模型24 h后, PaO_2下降, 肺W/D明显增加. 病理检查见弥漫性肺实质损伤和肺水肿, 符合急性肺损伤的病理改变. 进一步检测肺组织SP-A mRNA的表达发现, 肺组织SP-A表达减弱, Western blot检查见肺SP-A蛋白表达减少, 提示SAP并发ALI可致大鼠PS有效成分SP-A含量的减少, 肺内SP-A表达降低. 本实验以肺W/D比、肺组织病理评分来判定肺损伤程度, 并将肺损伤程度与肺组织SP-A mRNA表达相关性进行分析, 发现SP-A表达与肺损害程度呈负相关, 提示肺内SP-A含量的减少可能发生在转录水平. 电镜检查可见急性胰腺炎肺损伤后Ⅱ型肺泡上皮细胞微绒毛减少甚至消失, 细胞内线粒体水肿, 嵴消失, 板层小体空泡变性, Ⅱ型肺泡上皮细胞结构的破坏可能是SP-A mRNA表达减弱的原因之一. 本研究表明, 肺内SP-A mRNA表达减弱可能在急性胰腺炎肺损伤时起重要作用.

我们的临床和实验研究已经证明, 清胰汤治疗急性胰腺炎具有较好的疗效, 并发现其有减轻ALI的作用. 其对肺组织SP-A的影响未见报道. 本实验发现, QYT组肺组织SP-A mRNA表达与SAP组比较有显著增高, Western blot检测SP-A蛋白表达也较SAP组有显著增高. 与SAP组比较, QYT组PaO_2显著升高、肺W/D显著降低. 这表明清胰汤有保护肺组织、减轻肺损伤的功能. 进一步电镜检查可见肺泡Ⅱ型上皮细胞损伤较SAP组明显减轻, 同样证明清胰汤对肺的保护功能. 保护肺泡Ⅱ型上皮细胞, 维持其合成、分泌SP-A的功能, 从而保持良好的肺表面张力, 防止肺泡萎陷, 维持肺功能可能是清胰汤治疗急性胰腺炎肺损伤的又一重要机制. 中医理论认为, 肺与大肠相表里. 若肺气被邪毒所遏, 失其宣肃, 则喘促息数, 传入阳明与肠道糟粕搏结, 肺气不通而浊气又不能从下而出, 扰乱了肺与大肠相表里的生理状态而出现喘满症. 而清胰汤有通腑利肠泻肺实的作用, 使肺气得以宣发肃降,在治疗肺系感染中有显著疗效. 总之, 清胰汤在SAP时ALI保护作用机制可概括如下[16-19]: (1)通里攻下有利于肠麻痹的解除, 能促进腹腔内肠腔内血管活性及毒性物质的排除. (2)已经证明通里攻下与清热解毒法是防治肠源性感染与内毒素血症的有效措施, 有助于减轻坏死胰腺的感染及脓肿形成. (3)通里攻下与清热解毒中药对内毒素具有降解作用, 能抑制内毒素介导的细胞因子及其他炎性介质引起的过度炎性反应. (4)通里攻下和活血化瘀药物能改善腹腔内器官的血液灌注, 疏通微循环, 防止过氧化损伤, 并能促进炎性渗出物的吸收. (5)减少中性粒细胞在大鼠肺组织中黏附和聚集, 提高肺的通气和换气功能, 降低肺毛细血管通透性有积极作用. (6)保护肺泡型上皮细胞, 促进SP-A的合成和分泌, 从而防止肺泡萎陷, 维持肺功能, 可能是清胰汤治疗SAP时ALI的重要机制之一. 本研究进一步探讨了急性胰腺炎肺损伤的发生机制, 丰富了中药清胰汤治疗急性胰腺炎的内涵.

4 参考文献

1 Pastor CM, Matthay MA, Frossard JL. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights. *Chest* 2003; 124: 2341-2351

2 Steer ML. Relationship between pancreatitis and lung diseases. *Respir Physiol* 2001; 128: 13-16

3 Raghu MG, Wig JD, Kochhar R, Gupta D, Gupta R, Yadav TD, Agarwal R, Kudari AK, Doley RP, Javed A. Lung complications in acute pancreatitis. *JOP* 2007; 8: 177-185

4 Funk AJ, Mandrell TD, Lokey SJ, Kosanke SD, Li CS, Potters CF. Effects of leukotriene inhibition on pulmonary morphology in rat pup lungs exposed to hyperoxia. *Comp Med* 2007; 57: 186-192

5 Derks CM, Jacobovitz-Derks D. Embolic pneumopathy induced by oleic acid. A systematic morphologic study. *Am J Pathol* 1977; 87: 143-158

6 Wang XD, Borjesson A, Sun ZW, Wallen R, Deng XM, Zhang HY, Hallberg E, Andersson R. The association of type II pneumocytes and endothelial permeability with the pulmonary custocyte system in experimental acute pancreatitis. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 778-785

7 Haque R, Umstead TM, Ponnuru P, Guo X, Hawgood S, Phelps DS, Floros J. Role of surfactant protein-A (SP-A) in lung injury in response to acute ozone exposure of SP-A deficient mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 220: 72-82

8 Heinrich S, Hartl D, Griese M. Surfactant protein A--from genes to human lung diseases. *Curr Med Chem* 2006; 13: 3239-3252

9 Takahashi H, Sano H, Chiba H, Kuroki Y. Pulmonary surfactant proteins A and D: innate immune functions and biomarkers for lung diseases. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 589-598

10 Sorensen GL, Husby S, Holmskov U. Surfactant protein A and surfactant protein D variation in pulmonary disease. *Immunobiology* 2007; 212: 381-416

11 Kishore U, Greenhough TJ, Waters P, Shrive AK, Ghai R, Kamran MF, Bernal AL, Reid KB, Madan T, Chakraborty T. Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 2006; 43: 1293-1315

12 Pastva AM, Wright JR, Williams KL. Immunomodulatory roles of surfactant proteins A and D: implications in lung disease. *Proc Am Thorac Soc*

2007; 4: 252-257
13 Kingma PS, Whitsett JA. In defense of the lung: surfactant protein A and surfactant protein D. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 277-283
14 Touqui L, Wu YZ. Interaction of secreted phospholipase A2 and pulmonary surfactant and its pathophysiological relevance in acute respiratory distress syndrome. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24: 1292-1296
15 Mora R, Arold S, Marzan Y, Suki B, Ingenito EP. Determinants of surfactant function in acute lung injury and early recovery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L342-349
16 闻庆平, 陈海龙, 关凤林. 中药清胰汤治大鼠重症胰腺炎时急性肺损伤的比较. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1341-1345
17 Qiu Y, Li YY, Li SG, Song BG, Zhao GF. Effect of Qingyitang on activity of intracellular Ca2+-Mg2+-ATPase in rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 100-104
18 Li YY, Sibaev A, Zhou MZ, Zhu GY, Yuce B, Storr M. The Chinese herbal preparation Qing Yi Tang (QYT) improves intestinal myoelectrical activity and increases intestinal transit during acute pancreatitis in rodents. *Phytother Res* 2007; 21: 324-331
19 Li YY, Li XL, Yang CX, Zhong H, Yao H, Zhu L. Effects of Tetrandrine and QYT on ICAM-1 and SOD gene expression in pancreas and liver of rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 155-159

■同行评价
本文研究内容新颖, 技术路线和方法科学性强, 具有一定的理论价值和临床参考价值.

编辑 何燕 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WCJD 和 *WJG* 2008 年对同行评议及作者贡献分布将开始实行公开策略

本刊讯 世界华人消化杂志(*WCJD*)和*World Journal of Gastroenterology* (*WJG*)为了确保刊出文章的质量, 即将开始实行接受稿件的同行评议公开策略, 将同行评议者姓名, 职称, 机构的名称与文章一同在脚注出版. 如: 同行评议者: 房静远教授, 上海交通大学医学院附属医院仁济医院, 上海市消化疾病研究所; 韩新巍教授, 郑州大学第一附属医院放射科; 匡安仁教授, 四川大学华西医院核医学科.

*WCJD*和*WJG*即将开始实行在每篇文章的脚注内注明每个作者对文章的贡献率, 如: 作者贡献分布: 陈湘川与庞丽娟对此文所作贡献均等; 此课题由陈湘川, 庞丽娟, 陈玲, 杨兰, 张金芳, 齐妍及李洪安设计; 研究过程由陈玲, 杨兰, 张金芳, 蒋金芳, 杨磊, 李锋及曹秀峰操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由曹秀峰提供; 数据分析由陈湘川, 杨兰及 庞丽娟完成; 本论文写作由陈湘川, 庞丽娟及李洪安完成.

*WCJD*和*WJG*即将开始实行网络版的每篇文章上都有该文发表前纪录的链接, 包括首次提交的稿件, 同行评议人报告, 作者给审稿人回信和作者修回稿, 以PDF格式上传. 读者可以针对论文、审稿意见和作者的修改情况发表意见, 指出问题与不足; 作者也可以随时修改完善自己发表的论文. 使文章的发表成为一个编者、同行评议者、读者、作者互动的动态过程. (总编辑: 马连生 2007-11-15)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3744-3745
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

经胃镜使用套扎器单环套扎治疗食管黏膜下肿瘤57例

宁瑞花, 吕志武, 殷积美, 于宏影

■背景资料
近年来随着内镜下介入治疗的快速发展, 消化系内的许多疾病(如息肉和黏膜下肿瘤等)都可经过内镜下介入治疗来根治. 内镜下介入治疗方法有许多种(如高频电切术、尼龙圈结扎术及本文中所提到的用套扎器单环套扎法等), 这些方法解决了以往需外科手术方能解决的疾病, 减少了患者的痛苦.

■创新盘点
本文采用的单环套扎治疗, 与内镜下高频电切治疗及外科手术相比较, 其损伤小, 无痛苦, 恢复快, 危险性低.

宁瑞花, 吕志武, 殷积美,于宏影, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086
通讯作者: 宁瑞花, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化内科. ningruihua@yahoo
收稿日期: 2007-08-16 修回日期: 2007-11-19

Experience of endoscopic ligators in treating submucosal tumors of the esophagus: an analysis of 57 cases

Rui-Hua Ning, Zhi-Wu Lv, Ji-Mei Yin, Hong-Ying Yu

Rui-Hua Ning, Zhi-Wu Lv, Ji-Mei Yin, Hong-Ying Yu, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Rui-Hua Ning, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. ningruihua@yahoo
Received: 2007-08-16 Revised: 2007-11-19

Abstract
AIM: To evaluate the clinical application of endoscopic ligators in treating submucosal tumors of the esophagus.

METHODS: Fifty seven patients were diagnosed as having submucosal tumors of the esophagus by miniature probe endoscopic ultrasonography (mEUS). Single-ring loop ligature was performed to remove these tumors.

RESULTS: It was possible for all the cases to undergo complete resection of tumors. No complications, such as perforation or bleeding, occurred. No recurrence was observed in any of the 57 cases at 1 mo, 3 mo and 6 mo follow-ups. There were no adverse effects.

CONCLUSION: Single-ring loop ligature should be considered as an effective and safe alternative for treating submucosal tumors of the esophagus.

Key Words: Endoscopy; Submucosal tumors; Endoscopic single-ring loop ligature

Ning RH, Lv ZW, Yin JM, Yu HY. Experience of endoscopic ligators in treating submucosal tumors of the esophagus: an analysis of 57 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3744-3745

摘要
目的: 探讨经胃镜使用套扎器单环套扎食管黏膜下肿瘤的治疗价值.

方法: 对57例经超声胃镜微探头诊断为食管黏膜下肿瘤的患者进行有弹性的单环套扎治疗.

结果: 57例患者的食管黏膜下肿瘤均完全切除, 未发生任何并发症(穿孔、出血). 1例1 mo复查时病变无改变, 给与重新套扎. 经过1 mo、3 mo及6 mo的胃镜随访, 所有病例无复发, 无不良反应.

结论: 经胃镜对食管黏膜下肿瘤进行有弹性的单环套扎术是有效和安全的治疗方法.

关键词: 胃镜; 食管黏膜下肿瘤; 单环套扎术

宁瑞花, 吕志武, 殷积美, 于宏影. 经胃镜使用套扎器单环套扎治疗食管黏膜下肿瘤57例. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3744-3745
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3744.asp

0 引言
黏膜下肿瘤是食管的良性肿瘤, 较少见, 约占所有食管肿瘤的0.5%-0.8%. 黏膜下肿瘤包括血管瘤、肌细胞瘤、脂肪瘤和平滑肌瘤等. 其中平滑肌瘤最常见, 约占3/4以上[1]. 临床上多无明显症状, 有的有轻度吞咽哽咽感或胸骨后钝痛, 缺乏特异性, 因而仅通过临床症状很难做出诊断. 多因上消化道症状就诊, 通过胃镜检查发现. 随着超声胃镜的发展与应用, 可对食管黏膜下肿瘤做出明确诊断. 对食管黏膜下肿瘤传统治疗是以外科手术切除为主[2], 但创伤大, 费用高, 患者术后生活质量下降. 我院自2006-06/2007-06间共收治经超声胃镜微探头诊断, 肿瘤起源于食管黏膜肌层和固有肌层的患者57例, 行套扎器单环套扎治疗, 对其临床资料进行总结, 本文以评价套扎术对食管黏膜下肿瘤的治疗意义.

1 材料和方法

1.1 材料 选取2006-06/2007-06经胃镜及微型探头超声胃镜诊断为黏膜下肿瘤的患者57例. 并且在超声胃镜下测量黏膜下肿瘤的直径都小于1.5 cm. 患者的临床症状及胃镜、超声胃镜下特点如下: 吞咽困难的患者占4例, 胸骨后疼痛的患者有10例, 上腹痛的患者为26例, 无症状的患者占27例. 胃镜下患者食管黏膜下肿瘤位于食道的部位: 57例患者中食道上段的占9例, 食道中段的占21例, 食道下段的占27例. 超声胃镜下患者食管黏膜下肿瘤的大小: 57例患者中肿瘤的大小范围在0.5-0.9 cm的占45例, 肿瘤大小范围在1.0-1.5 cm的占12例. 超声胃镜下57例患者食管黏膜下肿瘤在食管各层中所占的比例为: 黏膜下肿瘤位于黏膜肌层的20例, 黏膜下肿瘤位于食管固有肌层的占37例.

1.2 方法 套扎术中所使用的电子胃镜为OLYMPUS GIF-240系列, 美国WILLSON-COOK套扎器. 进行治疗时将套扎器按常规安装在胃镜前端[3], 打开电动负压吸引器, 进镜至黏膜下肿瘤所在位置, 将套扎器的发射管对准黏膜下肿瘤, 按住吸引按钮, 利用负压将肿瘤完全吸入发射管内, 释放一环套扎用的弹性套扎圈即可, 观察套扎圈将黏膜下肿瘤完全套住后, 退镜, 治疗结束.

2 结果

56例患者均套扎成功彻底根除黏膜下肿瘤, 只有1例1 mo复查时病变无变化, 考虑为套扎圈术后脱落, 重新给与套扎成功. 1例患者在术后24 h内主诉胸骨后疼痛, 2例术后24 h内有轻微恶心, 其余患者均无不适主诉 , 无任何并发症. 56例患者均于1 mo后胃镜复查, 在原病灶处可见一较浅的白色斑痕, 瘢痕处的食道黏膜有细微的纠集现象, 无食道溃疡或狭窄发生. 于3 mo、6 mo后分别复查, 食道黏膜无异常现象.

3 讨论

食管黏膜下肿瘤是消化道肿瘤中较少见的类型, 由于其生长速度慢, 常常没有症状. 尽管肿瘤的大小与吞咽困难, 吞咽不适等症状无相关性, 但随着黏膜下肿瘤的缓慢生长, 体积变大即可出现临床症状或出现恶变[4]. 所以病变虽然很小, 但临床依然主张进行治疗.

本组患者全部经微型探头超声胃镜检查. 对消化系黏膜下肿瘤具有准确的定位作用, 能够清晰显示出病变起源部位, 判断出病变性质及大小[5-7]. 选取的病例经超声胃镜测量直径都小于1.5 cm, 且胃镜下检查病变均为黏膜表面光滑, 广基, 质硬, 推之可滑动, 因此基本排除了恶性病变的可能性.

本组57例患者套扎治疗均成功, 套扎治疗术比以往文献报道(如高频电切术)的手术操作的时间大大缩短, 手术全过程平均只有3 min, 极大的减少患者的痛苦. 最重要的是他的危险性降低, 具有非常高的安全性. 因为食管管壁很薄, 没有完整的浆膜层, 进行高频电切不仅操作困难而且非常容易出血, 穿孔[8]. 而套扎治疗是采用内镜下食管静脉曲张套扎治疗的方法, 用有弹性的套扎圈将黏膜下肿瘤套住, 使其血流中断, 局部发生缺血、坏死, 自然脱落而达到治疗的目的. 他损伤面小且恢复快 , 其整个脱落过程大约10 d左右, 创面1 mo内完全愈合, 其间可适当应用抑酸剂及黏膜保护剂, 促进组织修复. 套扎治疗的术中及术后患者基本无不适感觉. 此外, 套扎治疗患者所负担的经济费用很少. 需要指出的是, 虽然此方法具有操作时间短、痛苦小、损伤小、经济费用低、安全性高等诸多优点, 但是, 我们无法对病变进行进一步组织学检测, 并且只适用于黏膜下肿瘤直径小于1.5 cm的患者, 对于肿瘤直径超过1.5 cm的患者不适用. 这就为我们今后开展更完善的食管黏膜下肿瘤胃镜下治疗提出了新的努力方向.

■同行评价
本文立题新颖, 方法先进, 设计合理, 对临床工作具有很强的指导意义.

4 参考文献

1 郭长青, 曹新广. 胃镜图谱. 第1版, 郑州: 河南科学技术出版社, 2007: 32
2 郑如恒, 冯明祥, 葛棣, 侯英勇. 食管平滑肌瘤的诊断与治疗. 中华胃肠外科杂志 2005; 8: 26-28
3 吴承荣, 黄留业, 周福润, 张娟, 刘运祥. 结扎法治疗食管平滑肌瘤. 中国内镜杂志 2004; 10: 90, 92
4 Iizuka T, Kato H, Watanabe H, Itabashi M, Hirota T. Superficial carcinoma of the esophagus coexisting with esophageal leiomyoma: a case report and review of the Japanese literature. *Jpn J Clin Oncol* 1984; 14: 115-122
5 李姝, 杨玉龙, 刘文天. 微型探头内镜超声对上消化道黏膜下肿物的诊断价值. 中国实用内科杂志 2005; 25: 808-809
6 邹晓平. 上消化道超声内镜临床应用. 第1版, 山东科学技术出版社, 2002: 20-21
7 郑晓玲, 梁玮, 何利平. 小探头超声内镜在食管黏膜下肿物诊断和治疗中的应用(附64例报告). 福建医药杂志 2006; 28: 3-5
8 龚均, 张军, 郭晓丹, 左爱丽. 食管平滑肌瘤内镜下切除3例报告. 中国内镜杂志 2002; 8: 48

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3746-3748
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

树突状细胞治疗HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者的临床观察

司方明, 娄海山, 郑鹏远, 熊灵军, 范毅凯, 李俊红, 白经修

■背景资料
HBeAg阴性慢性乙型肝炎在慢性乙型肝炎中所占比例逐年上升, 而目前尚未有理想的治疗措施.

司方明, 郑鹏远, 熊灵军, 范毅凯, 白经修, 郑州大学第二附属医院消化科 河南省郑州市 450014
娄海山, 李俊红, 河南省许昌市人民医院感染科 河南省许昌市 461000
河南省卫生厅医学创新人才工程资助项目, No. 2004-45
河南省科技厅科技攻关资助项目, No. 0324410006
通讯作者: 郑鹏远, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化科. medp7123@yahoo.com
电话: 0371-65261035
收稿日期: 2007-08-06 修回日期: 2007-10-25

Clinical observation of chronic hepatitis B patients with negative HBeAg following dendritic cell vaccine treatment

Fang-Ming Si, Hai-Shan Lou, Peng-Yuan Zheng, Ling-Jun Xiong, Yi-Kai Fan, Jun-Hong Li, Jing-Xiu Bai

Fang-Ming Si, Peng-Yuan Zheng, Ling-Jun Xiong, Yi-Kai Fan, Jing-Xiu Bai, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450014, Henan Province, China
Hai-Shan Lou, Jun-Hong Li, Department of Infectious Diseases, Xuchang People's Hospital, Xuchang 461000, Henan Province, China
Supported by: the Medical Innovation Talent Program of Health Department of Henan Province, No. 2004-45 and the Key Item of Science and Technology Department of Henan Province, No. 0324410006
Correspondence to: Peng-Yuan Zheng, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 2 Jingba Road, Zhengzhou 450014, Henan Province, China. medp7123@yahoo.com
Received: 2007-08-06 Revised: 2007-10-25

Abstract

AIM: To investigate the efficacy of dendritic cell (DC) vaccines in chronic hepatitis B patients with negative HBeAg.

METHODS: HBV antigen-loaded dendritic cells (DCs) were injected into patients subcutaneously. After six times of treatment with an interval of one month, HBV antigen (86 μg) and HBV-Ig (200 iu) were injected. At the end of treatment, HBV-DNA level, HBV-markers and liver function were examined in the serum.

RESULTS: Of the 17 patients with negative HBeAg CHB, 5 cases initially positive for HBV-DNA became negative. In 2 initially positive cases, the HBV-DNA level was decreased, and in 4 initially positive patients, liver function tests revealed a return to normal.

CONCLUSION: HBsAg-pulsed DCs loaded with HBVIgG are effective in the treatment of CHB patients with negative HBeAg.

Key Words: Hepatitis B virus; Chronic hepatitis B; Dendritic cell; Immunotherapy

Si FM, Lou HS, Zheng PY, Xiong LJ, Fan YK, Li JH, Bai JX. Clinical observation of chronic hepatitis B patients with negative HBeAg following dendritic cell vaccine treatment. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3746-3748

摘要

目的: 观察树突状细胞疫苗对HBeAg(-)慢性乙型肝炎的治疗效果.

方法: HBV抗原肽致敏的树突状细胞, 1次/mo sc于17例HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者, 6次后改为HBV抗原肽和乙肝免疫球蛋白各注射1次/mo, 连用6 mo. 每6月复查肝功能, 乙肝标志, HBV DNA定量及B超.

结果: HBV DNA转阴5例(29.4%), HBV DNA下降2例(11.8%), 肝功能复常4例(23.5%).

结论: HBV抗原肽冲击的树突状细胞疫苗可应用于HBeAg阴性慢性乙型肝炎的治疗.

关键词: 乙型肝炎病毒; 慢性乙型肝炎; 树突状细胞; 免疫治疗

司方明, 娄海山, 郑鹏远, 熊灵军, 范毅凯, 李俊红, 白经修. 树突状细胞治疗HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者的临床观察. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3746-3748
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3746.asp

0 引言

我国三分之一的慢性乙型肝炎(CHB)为HBeAg

表 1 树突状细胞疫苗治疗HBeAg阴性慢性乙型肝炎17例应答情况

诊断	n	单项应答		时间顺序应答			(治疗1年后)联合应答			(治疗2年后)联合应答		
		病毒学	生化学	治疗结束时	持久	复发	完全	部分	无	完全	部分	无
HBeAg(–)慢乙肝	17	7	4	11	10	1	5	6	6	4	6	7

■应用要点
利用HBsAg抗原肽冲击致敏树突状细胞并联合乙肝免疫球蛋白对HBeAg(-)慢性乙型肝炎有一定疗效. 此方法采用皮下、肌肉注射, 较静脉注射法使用更方便, 材料更节省, 费用更低廉, 利于患者使用.

阴性, 且HBeAg(-)CHB患者在CHB中所占比例逐年上升. 其临床表现为HBsAg(+), HBV DNA(PCR法)为(+), 部分患者抗HBe(+), ALT异常或反复活动. HBeAg(-)CHB具有较高的向肝硬化、肝癌发展的倾向[1]. 对HBeAg(-)CHB的治疗以IFN、Peg $IFN_{\alpha\text{-}2a}$, 核苷类似物等药物为主, 但IFN不良反应较大, 疗效有限, 核苷类药物应用疗程难以确定, 长期应用均可诱发HBV耐药突变[2], 且长期用药费用较高. 以上这些因素皆影响抗病毒药物的广泛、合理应用. 故从CHB发病机制入手, 进一步探索以提高机体免疫功能为主的免疫治疗, 对CHB患者的治疗具有重要的临床价值[3]. 本文利用HBV抗原肽冲击致敏的树突状细胞(dendritic cell, DC)制成疫苗, 应用于HBeAg(-)CHB患者的治疗, 现将结果报道如下.

1 材料和方法

1.1 *材料* 健康人外周血分离单个核细胞, 体外培养、扩增, 于第5天收获DC[4]. 根据中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝病学分会联合修订的“病毒性肝炎防治方案”(2000-09西安)和中华医学会肝病学分会与感染病学分会联合制订的“慢性乙型肝炎防治指南”(2005-12-11)[5], 选门诊轻型HBeAg(-)CHB患者17例(男13例, 女4例), 年龄20-45岁, 病程3-25年, HBV DNA(PCR法)定量<5×10^9拷贝/L. 其中2例感乏力、纳差、腹胀等不适, 余皆无自觉症状. 排除肝硬化及其他类型的肝炎病毒感染.

1.2 *方法* 每位患者每次sc HBV抗原肽86 μg致敏DC, 10^6/次, 1次/mo, 共6次为第1疗程. 第2疗程为HBV抗原肽86 μg sc, 乙肝免疫球蛋白200 U, im, 1次/mo, 共6 mo. 每疗程结束后, 每6个月复查乙肝标志、肝功、B超及HBV DNA(PCR法).

2 结果

治疗1年结束后单项病毒学应答为7例(41.2%), 其中HBV DNA转阴5例, HBV DNA下降2例, 10例(58.8%)无应答. 单项生化学应答中4例(23.5%)ALT恢复正常, 13例(76.5%)无应答. 但有2例出现总胆红素略升高, B超仍提示弥漫性肝损伤. 虽然ALT复常, 仍按无应答统计. 发生应答的时间一般出现在治疗结束后, 但也有延迟至治疗1年后才出现应答, 故本文统计时间持续至治疗结束1-2年后的资料. 治疗后应答反应大多可维持1年以上或更久, 但有1例因经常难以控制饮酒致ALT反复异常, HBV DNA定量不稳定而复发(表1).

3 讨论

CHB患者体内HBV持续存在不易清除的原因可能是机体免疫功能低下, 对感染的HBV形成免疫耐受所致[6]. 患者免疫功能缺陷的重要原因之一是其外周血中DC数量下降, 表型不成熟, 功能降低, 无法有效呈递HBV抗原肽, 不能诱发有效的特异的体液免疫和细胞免疫应答[7]. 利用HBsAg冲击致敏DC可使其成熟度提高, MHC、共刺激分子表达增加, 从而激活DC的抗原呈递功能及IL-12、IFNγ等Th1型细胞因子的分泌, 纠正CHB患者Th1/Th2细胞间的失衡, 诱发出HBV特异的CTL反应. 由于T细胞活化增殖, 也有利于其辅助B细胞增殖分化, 致特异性体液免疫增强, 有利于清除HBV[8-9]. 这为DC疫苗用于抗CHB治疗带来了希望.

从本文结果可以看出, HBsAg冲击的DC可用于HBeAg(-)CHB患者的治疗, 可使部分患者肝功能复常, HBV DNA下降或转阴. 这说明经治疗后患者免疫功能有所增强, 因为HBV复制的直接指标为HBV DNA水平, HBV DNA水平高低与机体免疫功能相关[10], HBV DNA水平下降示机体免疫功能提高. 推测其机制可能是HBsAg抗原肽冲击后DC成熟度增加, CD80、CD86、HLA-DR表达增强, IL-12分泌增加, 诱导Th1细胞分化, 增强$CD8^+$ T细胞和NK细胞活性. IFNr分泌增加也可使$CD4^+$ T细胞向Th1分化, 抑制Th2形成, 从而激活HBV特异的CTL克隆增殖, 杀伤HBV[11]. 治疗中联合应用乙肝免疫球蛋白是因为乙肝免疫球蛋白为HBV中和抗体, 其与HBV相应抗原结合形成复合物, 有利于抗原提呈细胞摄取, 增加HBsAg内吞数量, 增强HBsAg特异

■同行评价
本文立题新颖, 病例选择合理, 治疗方法可参考, 结论明确, 具有一定的可读性.

性克隆的增生, 便于HBV清除[12].

总之, HBsAg冲击致敏的DC疫苗可用于HBeAg阴性CHB患者的治疗, 但疗效尚不理想. 今后应加强DC功能恢复的再研究, 还可利用CpG基序的寡聚脱氧核苷酸(CPGODN)等一系列新型佐剂增强HBsAg抗原性, 或利用HBV抗原肽基因转染DC等, 以求取得更佳疗效.

4 参考文献

1 成军. 应充分重视HBeAg阴性慢性乙型肝炎患者的诊断与治疗. 中华传染病杂志 2006; 24: 1-2
2 斯崇文. 对当前慢性乙型肝炎抗病毒治疗的看法. 中华传染病杂志 2005; 23: 73-74
3 张定凤. 乙型肝炎抗病毒治疗的前瞻. 中华肝脏病杂志 2006; 14: 483-488
4 李纪明, 祁元明, 郑惠良, 阮翘, 王柏生, 李永欣. 负载食管癌抗原肽树突状细胞诱导的细胞毒性T淋巴细胞的杀伤效应. 郑州大学学报(医学版) 2005; 46: 259-262
5 中华医学会肝病学分会、感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南. 中华肝脏病杂志 2005; 13: 881-891
6 Tavakoli S, Schwerin W, Rohwer A, Hoffmann S, Weyer S, Weth R, Meisel H, Diepolder H, Geissler M, Galle PR, Lohr HF, Bocher WO. Phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2004; 85: 2829-2836
7 Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487-495
8 Duan XZ, He HX, Zhuang H. Restoration in vitro of impaired T-cell responses in patients with chronic hepatitis B by autologous dendritic cells loaded with hepatitis B virus proteins (R2). *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 970-976
9 梁雪松, 万漠彬. 慢性HBV感染免疫治疗新进展. 世界华人消化杂志 2006; 14: 2778-2782
10 陈明泉, 施光峰, 卢清, 李谦, 张琼华, 秦刚, 翁心华. 不同病毒载量的慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞的表型和功能. 中华肝脏病杂志 2007; 15: 19-23
11 蔡大川, 李静, 曾彦, 李用国, 任红. 人脐血来源树突细胞抗乙型肝炎病毒细胞免疫的体外实验研究. 中华肝脏病学杂志 2007; 15: 88-91
12 刘崇柏, 苏崇鳌. 对乙型肝炎免疫球蛋白阻断母婴围产期传播的浅见. 中国计划免疫 2006; 12: 148-150

编辑 何燕 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3749-3751
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

肝炎肝硬化患者肾功能分析39例

蔺 武, 刘心娟, 常岩芹, 王 莉, 林香春

蔺武, 刘心娟, 常岩芹, 王莉, 林香春, 北京世纪坛医院消化内科 北京市 100038
通讯作者: 蔺武, 100038, 北京市海淀区铁医路10号, 北京世纪坛医院消化内科. haiying68_04@sina.com
电话: 010-63926370
收稿日期: 2007-09-22 修回日期: 2007-11-05

Clinical research on renal injury in patients with cirrhosis and hepatitis: an analysis of 39 cases

Wu Lin, Xin-Juan Liu, Yan-Qin Chang, Li Wang, Xiang-Chun Lin

Wu Lin, Xin-Juan Liu, Yan-Qin Chang, Li Wang, Xiang-Chun Lin, Department of Gastroenterology, Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China
Correspondence to: Wu Lin, Department of Gastroenterology, Beijing Shijitan Hospital, 10 Tieyi Road, Haidian District, Beijing 100038, China. haiying68_04@sina.com
Received: 2007-09-22 Revised: 2007-11-05

Abstract

AIM: To study the renal injury in patients with cirrhosis and viral hepatitis.

METHODS: Twenty nine patients with cirrhosis and viral hepatitis and 20 normal control subjects were selected. Ccr, UmALB, Uα1-MG, Uβ2-MG, NAG-U, TRF-U and RBP levels were measured.

RESULTS: The levels of Ccr were lower in Child C patients than in Child A, Child B and control patients (51.54 ± 25.79 *vs* 105.41 ± 13.75, 95.61 ± 23.09, 89.16 ± 18.19, $P < 0.05$). The levels of UmALB were higher in Child B and Child C patients than in control and Child A patients (42.53 ± 19.12, 108.07 ± 41.64 *vs* 14.10 ± 3.26, 13.11 ± 2.72, $P < 0.05$). The levels of Uα1-MG, Uβ2-MG, NAG-U, RBP were higher in Child C patients than in the control group and Child A and B patients (26.95 ± 35.34 *vs* 6.81 ± 1.88, 6.87 ± 2.10, 5.66 ± 0.81; 747.78 ± 596.72 *vs* 108.85 ± 65.86, 115.00 ± 73.83, 147.25 ± 91.55; 32.30 ± 16.91 *vs* 15.68 ± 3.14, 17.13 ± 5.35, 18.90 ± 10.23; 281.98 ± 133.19 *vs* 119.63 ± 25.94, 124.39 ± 34.90, 168.25 ± 11.76; $P < 0.05$). The levels of TRF-U were higher in all patients than in controls (6.54 ± 2.28, 7.59 ± 3.21, 8.04 ± 5.64 *vs* 0.47 ± 0.21, $P < 0.05$).

CONCLUSION: UmALB, Uα1-MG, Uβ2-MG and NAG-U are sensitive and useful items for the diagnosis of early renal injury in patients with cirrhosis and type B viral hepatitis, but TRF-U and RBP are not.

Key Words: Cirrhosis; Renal injury; Hepatitis

Lin W, Liu XJ, Chang YQ, Wang L, Lin XC. Clinical research on renal injury in patients with cirrhosis and hepatitis: an analysis of 39 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3749-3751

摘要

目的: 探讨肝炎肝硬化患者的肾功能损害.

方法: 检测39例不同分期肝硬化患者(肝硬化组, 肝功能Child A, B, C级分别为15例, 12例, 12例)和20例体检正常者(对照组)的肌酐清除率(Ccr)、尿微量白蛋白(UmALB)、尿α1-MG(Uα1-MG)、尿β2-MG(Uβ2-MG)、尿NAG酶(NAG-U)、尿转铁蛋白(TRF-U)和尿视黄醇结合蛋白(RBP)的活性.

结果: Child C组的Ccr低于对照组和Child A, B组(51.54±25.79 *vs* 105.41±13.75, 95.61±23.09, 89.16±18.19, $P<0.05$), 而后3组间没有差别. Child B、C组UmALB高于对照组和Child A组(42.53±19.12, 108.07±41.64 *vs* 14.10±3.26, 13.11±2.72, $P<0.05$); Child A, B组的Uα1-MG、Uβ2-MG、NAG-U、RBP与对照组无差别, 而Child C组对应指标高于对照组和Child A, B组(26.95±35.34 *vs* 6.81±1.88, 6.87±2.10, 5.66±0.81; 747.78±596.72 *vs* 108.85±65.86, 115.00±73.83, 147.25±91.55; 32.30±16.91 *vs* 15.68±3.14, 17.13±5.35, 18.90±10.23; 281.98±133.19 *vs* 119.63±25.94, 124.39±34.90, 168.25±11.76; $P<0.05$). 肝硬化Child A, B, C组的TRF-U与对照组比较均有显著性差异(6.54±2.28, 7.59±3.21, 8.04±5.64 *vs* 0.47±0.21, $P<0.05$), 肝硬化3组间无差别.

结论: UmALB、Uα1-MG、Uβ2-MG和NAG

■背景资料
许多肝硬化患者在发生肝肾综合征之前就已经有肾功能的损害, 如何尽早诊断出肾功能的损害, 以尽早治疗, 防止肾功能衰竭非常重要. 近年来有学者通过检测肾功能相关指标来探讨肝硬化患者的肾功能表现, 初步得到一些有意义的规律, 但是尚没有形成定论. 本文在研究了肝硬化患者尿微量蛋白、肾小管标志蛋白水平的同时, 也研究了早期肾功能损害的酶学指标, 不仅探讨了肝硬化患者的肾功能情况, 还初步探讨哪些肾功能指标更适合这一患者群肾功能损害的诊断.

■应用要点
本研究通过UmALB、Uα1-MG、Uβ2-MG及NAG-u活性的测定, 不但可以早期发现肝炎肝硬化患者的肾功能损害, 而且还可以明确损害是否延及肾小球和肾小管.

活性的测定有助于早期发现肝炎肝硬化患者的肾功能损害, TRF-U和RBP不适合作为肝硬化患者早期肾功能损害的研究指标.

关键词: 肝硬化; 肾功能损害; 肝炎

蔺武, 刘心娟, 常岩芹, 王莉, 林香春. 肝炎肝硬化患者肾功能分析39例. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3749-3751
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3749.asp

0 引言

肝硬化可以累及肾脏, 严重者可引起肝肾综合征, 发生肾功能衰竭. 临床上, 在肝肾综合征发生之前, 是否就已经存在肾脏损害, 目前尚无定论. 而早发现、早诊断和早治疗, 遏制肾损害, 对防止肾功能恶化甚至衰竭十分重要. 我们通过检测肝炎肝硬化患者的肌酐清除率(Ccr)、尿微量白蛋白(UmALB)、尿α1-MG(Uα1-MG)、尿β2-MG(Uβ2-MG)、尿NAG酶(NAG-U)、尿转铁蛋白(TRF-U)和尿视黄醇结合蛋白(RBP), 探讨肝炎肝硬化与肾功能损害的关系及其临床意义.

1 材料和方法

1.1 *材料* 我院消化内科的肝炎肝硬化患者(肝硬化组)39例, 男29例, 女10例, 其中肝功能Child A级15例, 平均年龄53.6±8.24岁, Child B级12例, 平均年龄56.0±11.12岁, Child C级12例, 平均年龄59.1±12.25岁, 全部患者的诊断符合2000年(西安)修订的病毒性肝炎防治方案中的标准[1]. 20例体检正常者(对照组), 男13例, 女7例, 平均年龄54.3±9.67岁. 所有受试者常规尿检均呈阴性, 无原发肾脏病, 尚无肝肾综合征, 并排除非肝病继发的肾损害.

1.2 *方法* 采集受试者晨起空腹血, 检测肝肾功能和凝血功能等, 并结合临床表现对受试者进行Child分级. 以MDRD法计算受试者的Ccr. 采集首次晨尿作为尿标本, 离心后取上清液待检.

统计学处理 组间比较采取方差分析和q检验.

2 结果

Child A、B组的Ccr较对照组无明显降低(P>0.05), Child C组较对照组和Child A、B组有明显下降(P<0.05), 在Child A、B组间没有显著性差异(组间比较P>0.05). Child A组的UmALB与对照组的比较没有显著性差异(P>0.05), Child B、C组的UmALB与对照组和Child A组的比较有显著性差异(P<0.05), 且肝功能损害越重, UmALB值越高(组间比较P<0.05). Child A、B组的Uα1-MG较对照组无明显增高(P>0.05), Child C组较对照组和Child A、B组有显著增高(P<0.05). Child A、B组的Uβ2-MG较对照组无明显增高(P>0.05), Child C组较对照组和Child A、B组有显著增高(P<0.05). 且该两项指标在Child A、B组间均没有显著性差异(组间比较P>0.05). Child A、B组的NAG-u较对照组无明显增高(P>0.05), Child C组较对照组及Child A、B组有显著增高(P<0.05), 在Child A、B组间均没有显著性差异(组间比较P>0.05). 肝硬化各组的TRF-U与对照组比较均有显著性差异(P<0.05), 肝硬化三组间两两比较均无显著性差异(组间比较P>0.05). Child A、B组的尿RBP较对照组无明显增高(P>0.05), Child C组较对照组及Child A、B组有显著增高(P<0.05), 在Child A、B组间均没有显著性差异(组间比较P>0.05).

3 讨论

近年来, UmALB测定广泛用于评价各种原发或继发性肾脏病变,可检出常规尿检阴性的轻度损害, 具有很高的特异性和敏感性[2-4]. Laffi *et al*[5]提出, 肝硬变患者在肌酐(BUN)升高前就已存在肾小球滤过率和肾血流量下降. 我们通过对肝炎肝硬化患者的Ccr和UmALB的检测, 结果显示Child A组UmALB无明显升高, 但Child B、C组UmALB已有升高, 而Child A、B组的Ccr没有降低, Child C组Ccr才有下降. 由此可见, UmALB作为早期肾小球损害的检测指标, 他能够早于Ccr提示肝炎肝硬化患者的肾功能损害.

Uα1-MG和Uβ2-MG是小分子量蛋白质, 几乎全部可从肾小球自由滤过, 99%以上又被近曲小管上皮细胞以胞饮的方式重吸收并转运到溶酶体分解为氨基酸, 正常尿液中含量很低, 所以被视为肾小管重吸收功能受损的标记性蛋白[6-7]. 本研究显示, 在肝炎肝硬化Child A、B级时尚没有Uα1-MG和Uβ2-MG的升高, 而在Child C级出现Uα1-MG和Uβ2-MG的升高.

NAG是广泛存在于各种组织细胞溶酶体内的一种水解酶, 不能透过肾小球. NAG-u来源于肾小管上皮细胞, 可由于本身的损害, 致溶酶体酶释放增加, 致使尿中活性增高, 是肾小管损害最敏感的指标[8-10]. 本研究显示, 在肝炎肝硬化Child A、B级时尚没有NAG-u的升高, 而在Child C级出现NAG-u的升高. 这与Uα1-MG和

表 1 肝硬化组与对照组肾功能的比较

	Ccr(ml/min)	UmALB(mg/L)	Uα1–MG(mg/L)	Uβ2 – MG(μg/L)	NAG–U(U)	TRF–U(g/L)	RBP(g/L)
对照组	105.41 ± 13.75	14.10 ± 3.26	6.81 ± 1.88	108.85 ± 65.86	15.68 ± 3.14	0.47 ± 0.21	119.63 ± 25.94
肝硬化组							
Child A	95.61 ± 23.09	13.11 ± 2.72	6.87 ± 2.10	115.00 ± 73.83	17.13 ± 5.35	6.54 ± 2.28[a]	124.39 ± 34.90
Child B	89.16 ± 18.19	42.53 ± 19.12[a]	5.66 ± 0.81	147.25 ± 91.55	18.90 ± 10.23	7.59 ± 3.21[a]	168.25 ± 11.76
Child C	51.54 ± 25.79[a]	108.07 ± 41.64[a]	26.95 ± 35.34[a]	747.78 ± 596.72[a]	32.30 ± 16.91[a]	8.04 ± 5.64[a]	281.98 ± 133.19[a]

[a]$P<0.05$ *vs* 对照组.

■同行评价
本文表述清晰, 文笔流畅, 设计合理, 有一定的学术价值.

Uβ2-MG的检测结果相一致.

我们同时研究了TRF-U和RBP这两个早期肾功能损害的酶学指标. 但是因为TRF-U和RBP是在肝脏合成的, 在病毒性肝炎患者, 血清中TRF-U和RBP与肝细胞损害程度有相关性[11]. 因此, 在肝炎肝硬化患者, 由于肝功能的损害, 影响了这两个酶的合成. 所以我们认为TRF-U和RBP不适合作为肝硬化患者早期肾功能损害的研究指标.

总之, 通过UmALB、Uα1-MG、Uβ2-MG及NAG-u活性的测定, 不但可以早期发现肝炎肝硬化患者的肾功能损害, 而且还可以明确损害是否延及肾小球和肾小管.

4 参考文献

1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
2 殷思纯, 翟洁卿, 尹红, 罗北京, 华莉. 肝硬化患者的肾功能改变. 广东医学 2006; 27: 905-906
3 陈晓玲. 尿微量蛋白检测对慢性肝病伴肾损害的早期诊断意义探讨. 四川医学 2004; 25: 354-355
4 王丽萍, 淡莉, 杨小艳, 刘钢. 肝硬化肾损害尿微量蛋白的检测结果分析. 第四军医大学吉林军医学院学报 2003; 25: 146-147
5 Biswas KD, Jain AK. Hepatorenal syndrome. *Trop Gastroenterol* 2002; 23: 113-116
6 陈辉乐, 徐昌隆, 毛朝鸣, 郑君杰. 尿微量蛋白测定对肝硬化早期肾损害诊断的意义. 温州医学院学报 2006; 36: 220-222
7 姚建. 肾小管标志蛋白及其临床意义. 中华肾脏病杂志 1997; 13: 113-115
8 赵继梅, 刘春, 焦玉莲, 柳欣琦. 肝硬化早期肾损害尿酶测定的诊断价值. 滨州医学院学报 1999; 22: 444-445
9 Antoniello S, Auletta M, Vatiero V, Nigro C, Cacciatore L. Beta-hexosaminidase activity in alcoholic fatty liver and in CCl4-induced liver fibrosis of the rat. *Enzyme* 1989; 42: 68-72
10 张元庆, 陈育春, 陈安彬, 李志群, 丁中. 肝硬变病程中的肾脏血流动力学变化与肾损害. 世界华人消化杂志 1998; 6: 212-213
11 崔续玲, 张颖, 金玉. 病毒性肝炎患者血清视黄醇结合蛋白、转铁蛋白、铜蓝蛋白的检测及意义. 徐州医学院学报 2005; 25: 456-457

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

WJG 2007 年 1–11 月份收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology* (*WJG*) 2007年1-48期共发表文章1120篇, 其中国际文章791篇, 占71%; 国内文章329篇, 占29%. 社论63篇, 综述30篇, 专题亮点139篇, 文章663篇(基础研究和临床研究), 病例报告193篇, 读者来信等32篇, 评论性文章占发文总量的21%. 2007年1-11月份共收稿2432篇, 其中国内稿件912篇, 占38%; 国外稿件1520篇, 占62%; 退稿1000篇, 退稿率为41%. (常务副主任: 刘晔 2007-11-15)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3752-3754
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

血管紧张素原基因T174M变异与肝硬化的相关性

肖 凡, 魏红山, 樊文梅, 李国力

■背景资料
已有研究证实AGT基因多态性与多种疾病相关, 包括高血压、脑梗塞、冠心病, 肝纤维化等. 本课题组的前期工作也证实AGT基因核心启动子区的变异与乙肝感染后的肝硬化相关.

肖凡, 魏红山, 樊文梅, 李国力, 北京地坛医院研究室 北京市 100011
通讯作者: 肖凡, 100011, 北京安外大街地坛公园13号地坛医院研究室. cindy2358@163.com
电话: 010-64211031-2358
收稿日期: 2007-08-21 修回日期: 2007-11-02

Association analysis of T174M variants of the angiotensinogen gene with hepatocirrhosis

Fan Xiao, Hong-Shan Wei, Wen-Mei Fan, Guo-Li Li

Fan Xiao, Hong-Shan Wei, Wen-Mei Fan, Guo-Li Li, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China
Correspondence to: Fan Xiao, Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, 13 Ditan Park, Anwai Street, Beijing 100011, China. cindy2358@163.com
Received: 2007-08-21 Revised: 2007-11-02

Abstract
AIM: To detect the relationships between variants in the T174M polymorphism of the angiotensinogen gene and hepatocirrhosis.

METHODS: Genomic DNA from leukocytes was analyzed for genetic variants at the T174M polymorphism of the AGT gene by polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP) and automatic sequencing.

RESULTS: The distributions of MT and TT genotypes were not different between the hepatocirrhosis group (84.6%, 15.4%) and the control group (82.8%, 17.2%) (χ^2 = 0.077, P > 0.05).

CONCLUSION: T174M polymorphism in the AGT gene is not likely to be involved in hepatocirrhosis.

Key Words: Angiotensinogen; Genetic polymorphism; Hepatocirrhosis; PCR

Xiao F, Wei HS, Fan WM, Li GL. Association analysis of T174M variants of the angiotensinogen gene with hepatocirrhosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3752-3754

■研发前沿
最新的研究表明AGT基因核心启动子区的变异与乙肝感染后的肝硬化相关, 暂无ATG基因外显子的变异与肝硬化的关系.

摘要
目的: 研究血管紧张素原(angiotensinogen, AGT)基因T174M分子变异与肝硬化的关系.

方法: 提取正常人64例和肝硬化患者65例白细胞基因组DNA, 通过PCR、限制性片段长度多态性和测序等技术, 观察AGT基因型在肝硬化组和正常组分布的差异.

结果: AGT基因T174M位点MT和TT基因型的频率在正常组和肝硬化组分别为82.8%、17.2%和84.6%、15.4%, 两组之间不存在差异(χ^2 = 0.077, P>0.05).

结论: 血管紧张素原基因T174M变异与肝硬化没有显著关系.

关键词: 血管紧张素原; 遗传多态性; 肝硬化; 聚合酶链式反应

肖凡, 魏红山, 樊文梅, 李国力. 血管紧张素原基因T174M变异与肝硬化的相关性. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3752-3754
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3752.asp

0 引言
魏红山 *et al*报道组织局部肾素-血管紧张素系统的激活与肝纤维化的发生有关[1-2]. 血管紧张素原基因(angiotensinogen, AGT)是存在于血清中的球状糖蛋白, 主要在肝脏合成, 是肾素-血管紧张素系统的唯一初始底物[3]. 人AGT全长13 kb, 含5个外显子和4个内含子[4]. 已有研究证实AGT基因多态性与多种疾病相关, 包括高血压、脑梗塞、冠心病, 肝纤维化等[5-8]. 我们的前期工作也证实AGT基因核心启动子区的变异与乙肝感染后的肝硬化相关[9]. 现在我们通过对人AGT基因第二外显子的T174M分子变异分析, 探讨慢性HBV感染后, AGT基因突变与肝硬化发生的关系.

1 材料和方法
1.1 材料 收集2005-06/2005-12在北京地坛医院住院的慢性HBV感染后转换成的肝硬化患者全血

标本64份, 男25例, 女39例, 年龄40±5岁; 正常人全血标本62份, 男29例, 女33例, 年龄35±5岁. 病例的诊断标准符合2000年西安第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议制定的《病毒性肝炎防治方案》中的相关标准.

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取: 人基因组DNA样品取自实验对象外周血. 采用全血基因组DNA提取试剂盒(北京华美生物公司)提取白细胞基因组DNA, -20℃放置, 备用.

1.2.2 DNA片段的扩增: 5'引物TGGCACCCTGGCCTCTCTCTATCT, 3'引物CAGCCTGCATGAACCTGTCAATCT(上海生物工程有限公司合成). 扩增体系含各引物1 μmol/L, dNTP浓度各为200 μmol/L, Mg^{2+}浓度为2.0 mmol/L, Taq DNA聚合酶2.5 U, 10×缓冲液2.5 μL(深圳晶美生物工程有限公司), 模板DNA约0.1 μg, 加灭菌去离子水补足体积为25 μL. 按下述程序进行DNA扩增反应: 94℃预变性5 min, 94℃变性30 s, 63.5℃退火30 s, 72℃延伸40 s, 循环35次后于72℃继续延伸7 min. 20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察扩增结果.

1.2.3 PCR产物的RFLP分析: *Nco*Ⅰ酶切反应(针对T174M变异), PCR扩增产物8 μL, 10×缓冲液2 μL, *Nco*Ⅰ内切酶12 U, 加灭菌去离子水补足体积至20 μL, 酶切反应在37℃进行12 h. 酶切产物在30 g/L琼脂糖凝胶电泳后在凝腔成像系统仪下观察并保存结果.

统计学处理 分析计数资料组间差异采用χ^2检验分析, $P<0.05$认为组间有显著差异.

2 结果

2.1 PCR扩增结果 PCR扩增片段约为311 bp, 与理论设计片段大小基本一致.

2.2 RFLP酶切分析及测序结果 126个样品经*Nco*Ⅰ酶切, 电泳结果显示出现3种带型. 带型311 bp为TT纯合型, 带型311 bp、140 bp为MT杂合型; 带型140 bp为MM纯合型, 本次实验中未检测出MM纯合型(图1). PCR直接测序结果进一步验证了此结果.

2.3 AGT T174M变异与肝硬化相关性分析 统计分析表明, 实验样本基因型分布符合Hardy-Weiberg平衡. 采用χ^2统计, 对62例正常人样品和64例肝硬化样品AGT基因T174M多态性进行分析, 发现携带AGT基因T174M位点MT、TT基因型的样品数目分别为55(84.6%)、10(15.4%)和53(82.8%)、11(17.2%), 基因型分布差异没有显著性意义($\chi^2 = 0.077$, $P>0.05$).

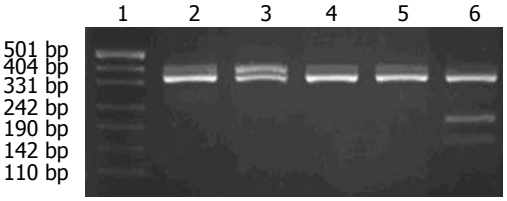


图 1 PCR/RFLP电泳结果. 1: DNA Marker; 2−5: TT纯合型; 6: MT杂合型.

3 讨论

越来越多的研究证明肾素-血管紧张素系统的激活与肝纤维化的发生有关. AGT主要在肝脏合成, 是肾素-血管紧张素系统的唯一初始底物. 其合成不仅受多种激素调节, 更主要的是受基因转录水平的调控. AGT基因的基因变异与人类多种疾病相关[10-12]. 我们的前期工作证实AGT基因5'核心启动子区的变异(A-20C和A-6G)与乙肝感染后的肝硬化相关. 而位于第二外显子的T174M也已被证实与多种疾病相关, 如高血压、肾病、心血管疾病等[13-15]. 因此本课题研究AGT基因T174M多态性是否与慢性乙肝感染后的肝硬化相关.

我们采用PCR、PCR/RFLP、测序等方法分析64个肝硬化血液标本, 62个正常人血液标本. AGT基因T174M位点MT、TT基因型的频率在慢性HBV感染后的正常组和肝硬化组分别为82.8%、17.2%和84.6%、15.4%, 两组之间不存在差异($\chi^2 = 0.077$, $P>0.05$). 分析表明, HBV感染后肝硬化的形成可能与AGT基因T174M分子变异无关.

■名词解释

血管紧张素原基因(AGT): 是存在于血清中的球状糖蛋白, 主要在肝脏合成, 是肾素-血管紧张素系统的唯一初始底物.

4 参考文献

1 Wei HS, Lu HM, Li DG, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Cheng JL, Xu QF. The regulatory role of AT 1 receptor on activated HSCs in hepatic fibrogenesis: effects of RAS inhibitors on hepatic fibrosis induced by CCl(4). *World J Gastroenterol* 2000; 6: 824-828

2 Yang L, Bataller R, Dulyx J, Coffman TM, Gines P, Rippe RA, Brenner DA. Attenuated hepatic inflammation and fibrosis in angiotensin type 1a receptor deficient mice. *J Hepatol* 2005; 43: 317-323

3 Corvol P, Jeunemaitre X. Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen. *Endocr Rev* 1997; 18: 662-677

4 Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S. Induction of rat liver angiotensinogen mRNA following acute inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 129: 826-832

5 Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C, Purdie DM,

■同行评价
本文选题较好, 方法成熟, 结论有些简单, 建议作进一步的研究.

Jonsson JR. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 31: 828-833
6 Dixon JB, Bhathal PS, Jonsson JR, Dixon AF, Powell EE, O'Brien PE. Pro-fibrotic polymorphisms predictive of advanced liver fibrosis in the severely obese. *J Hepatol* 2003; 39: 967-971
7 Inoue I, Nakajima T, Williams CS, Quackenbush J, Puryear R, Powers M, Cheng T, Ludwig EH, Sharma AM, Hata A, Jeunemaitre X, Lalouel JM. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest* 1997; 99: 1786-1797
8 Forrest EH, Thorburn D, Spence E, Oien KA, Inglis G, Smith CA, McCruden EA, Fox R, Mills PR. Polymorphisms of the renin-angiotensin system and the severity of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2005; 12: 519-524
9 Xiao F, Wei H, Song S, Li G, Song C. Polymorphisms in the promoter region of the angiotensinogen gene are associated with liver cirrhosis in patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1488-1491
10 Gross CM, Perrot A, Geier C, Posch MG, Hassfeld S, Kramer J, Schmidt S, Derer W, Dietz R, Ozcelik C. Recurrent in-stent restenosis is not associated with the angiotensin-converting enzyme D/I, angiotensinogen Thr174Met and Met235Thr, and the angiotensin-II receptor 1 A1166C polymorphism. *J Invasive Cardiol* 2007; 19: 261-264
11 Jiang X, Sheng HH, Lin G, Li J, Lu XZ, Cheng YL, Huang J, Xiao HS, Zhan YY. Effect of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms on blood pressure response to antihypertensive treatment. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 782-786
12 Noroozianavval M, Argani H, Aghaeishahsavari M, Veisi P, Ghorbanihaghjo A, Rashtchizadeh N, Jabbarpourbonyadi M, Hamzeiy H. Renin-angiotensin system polymorphisms and hemoglobin level in renal allografts: a comparative study between losartan and enalapril. *Transplant Proc* 2007; 39: 1018-1022
13 Takashima Y, Kokaze A, Matsunaga N, Yoshida M, Sekiguchi K, Sekine Y, Sumiya Y. Relations of blood pressure to angiotensinogen gene T174M polymorphism and alcohol intake. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 2003; 22: 187-194
14 Chang HR, Cheng CH, Shu KH, Chen CH, Lian JD, Wu MY. Study of the polymorphism of angiotensinogen, anigiotensin-converting enzyme and angiotensin receptor in type II diabetes with end-stage renal disease in Taiwan. *J Chin Med Assoc* 2003; 66: 51-56
15 Chistiakov DA, Turakulov RI, Moiseev VS, Nosikov VV. Polymorphism of angiotensinogen T174M gene and cardiovascular diseases in the Moscow population. *Genetika* 1999; 35: 1160-1164

编辑 程剑侠 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx), 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. 凡在在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息.

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3755-3760
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

肝移植术后胆道并发症的磁共振评价

陈军法, 陈卫霞, 宋庆轮, 李昌宪

陈军法, 陈卫霞, 李昌宪, 四川大学华西医院放射科 四川省成都市 610041
宋庆轮, 四川大学华西医院放射科研究生, 现在中国人民解放军第452医院放射科 四川省成都市 610041
通讯作者: 陈卫霞, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院放射科. wxchen25@126.com
电话: 028-81812597
收稿日期: 2007-08-31 修回日期: 2007-11-08

Assessment of biliary complications after orthotopic liver transplantation with magnetic resonance imaging

Jun-Fa Chen, Wei-Xia Chen, Qing-Lun Song, Chang-Xian Li

Jun-Fa Chen, Wei-Xia Chen, Qing-Lun Song, Chang-Xian Li, Department of Radiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Correspondence to: Wei-Xia Chen, Department of Radiology, West China Hospital, Sichuan University, 37 Guoxue Lane, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. wxchen25@126.com
Received: 2007-08-31 Revised: 2007-11-08

Abstract

AIM: To analyze the MR findings of early and late biliary complications after orthotopic liver transplantation (OLT) and to evaluate the clinical value of MR cholangiopancreatography (MRCP) combined with MR cross-sectional images in diagnosing biliary complications after OLT.

METHODS: Fifty-seven consecutive patients with clinical suspicion of biliary complications after receiving OLT were evaluated on the basis of MRCP and MR cross-sectional images, the latter including T1W axial unenhanced and Gadolinum-enhanced sequences, Gadolinum-enhanced VIBE sequences, unenhanced T2W axial images and coronal True-FISP sequences. The diagnostic accuracy rates were compared between MRCP and MRCP combined with MR cross-sectional images.

RESULTS: The incidence of biliary complications after OLT was 64.9% (37/57). The final diagnoses were as follows anastomotic stricture (n = 14), nonanastomotic stricture (n = 8), solitary biliary stone or sludge (n = 5), cholangitis and periangiocholitis (n = 3), biloma (n = 3), donor-to-recipient common bile duct disproportion (n = 3), and elongation of extrahepatic biliary duct (n = 1). In 37 cases of biliary complications, the accuracies of MRCP and MRCP combined with MR cross-sectional images were 75.7% (28/37) and 94.6% (35/37), respectively. The difference was statistically significant ($P < 0.05$).

CONCLUSION: MRCP combined with MR cross-sectional images can improve the diagnostic accuracy of biliary complications, especially the diagnosis of biloma, cholangitis and periangiocholitis.

Key Words: Liver transplantation; Biliary tract; Complication; Magnetic resonance imaging; Cholangiopancreatography

Chen JF, Chen WX, Song QL, Li CX. Assessment of biliary complications after orthotopic liver transplantation with magnetic resonance imaging. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3755-3760

摘要

目的: 探讨磁共振胰胆管成像(MRCP)联合MR断面图像在诊断肝移植术后胆道并发症中的应用价值.

方法: 对57例肝移植术后怀疑有胆道并发症的患者行MR检查, 分析其表现, 并与手术、胆道造影、肝脏活检和临床随访结果进行对照, 比较MRCP和MRCP联合MR断面图像对胆道并发症诊断的确诊率.

结果: 57例患者胆道并发症发生率64.9%(37/57). 其中吻合口狭窄患者14例, 非吻合口狭窄8例, 孤立性胆道结石或胆泥淤积5例, 胆管炎及胆管周围炎3例, 胆汁湖/胆汁瘤 3例, 供体-受体胆总管不匹配3例, 肝外胆管吻合后过长1例. 对胆道并发症诊断的准确率, MRCP为75.7%(28/37), MRCP联合MRI断面图像为94.6%(35/37), 两者差别有统计学意义(P<0.05).

■背景资料
肝移植术后胆道并发症发病率高, 早期临床诊断困难. MR作为一种安全、无创、精确的影像技术已成为早期发现肝移植术后胆道并发症的重要手段, 因此认识胆道并发症的磁共振表现, 并合理运用多种成像序列, 对肝移植术后胆系并发症的评价具有重要意义.

■创新盘点
本文较深入地分析了肝移植术后胆道并发症的MR表现, 提出MRCP联合MR断面图像能提高胆道并发症(尤其是胆管炎, 胆管周围炎, 胆汁瘤)诊断的准确率.

结论: MRCP联合MR断面图像能提高胆道并发症诊断的准确性.

关键词: 肝移植; 胆道; 并发症; 磁共振成像; 胰胆管造影术

陈军法, 陈卫霞, 宋庆轮, 李昌宪. 肝移植术后胆道并发症的磁共振评价. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3755–3760
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3755.asp

0 引言

胆道并发症(biliary complications, BC)是肝移植术后导致肝脏功能障碍甚至移植肝失活的主要原因之一, 约10%-30%的肝移植患者可能出现各种胆道并发症[1], 早期诊断和治疗对于保护移植肝功能和保证患者生存质量具有重要意义[2]. 由于BC的临床表现和相关实验室检查缺乏特异性, 早期诊断较困难. MR作为一种安全、无创、精确的影像技术已成为早期发现肝移植术后胆道并发症的重要手段. 我们通过分析原位肝移植术后胆道并发症的磁共振胆胰管成像(MR cholangiopancreatography, MRCP)及MR断面成像的表现特征, 探讨MRCP及其联合MR断面图像在诊断肝移植术后早期及晚期胆道并发症中的价值.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2004-10/2006-11原位肝移植术后MR随访的连续性患者共57例, 男46例, 女11例, 年龄30-63(平均46.5)岁. 其中乙型肝炎后肝硬化28例, 慢性乙型重症肝炎6例, 胆源性肝硬化2例, 酒精性肝硬化1例, 原发性肝细胞肝癌18例, 肝门胆管癌2例. 8例行原位经典肝移植, 49例行改良背驮式原位肝移植. 胆道重建采用胆管端端吻合52例, 胆肠Roux-en-Y吻合5例, 51例未放置T管. 原位肝移植(orthotopic liver transplantation, OLT)术后至胆道并发症发生的时间间隔0.5-49 mo. 57例患者均经胆道造影、手术或临床随访证实, 其中内镜下逆行性胰胆管造影(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP)21例, T管造影2例, 手术和病理证实9例(二次肝移植5例、胆肠吻合术3例、胆管粘连松解术1例), 肝脏活检4例, 临床随访诊断21例.

1.2 方法

1.2.1 MRI检查: 使用德国西门子公司Sonata 1.5T磁共振扫描仪, 体部相控阵线圈. 对比剂使用钆-二乙烯五胺乙酸(Gadolinium diethylenetriamine pentacetic acid, Gd-DTPA), 商品名为磁显葡胺(北京北陆公司), 剂量0.2 mmol/kg, 经前臂静脉推注.

所有患者均行上腹部横断面T2WI(TR/TE: 1000/83 ms, 层厚8 mm, 层距9.2 mm)和T1WI(TR/TE: 100/4.8 ms, 层厚8 mm, 层距9.2 mm)平扫, 真稳态自由进动快速成像序列冠状面扫描(true fast imaging with steady state procession, True FISP, TR/TE: 4.3/2.1 ms, 层厚5 mm, 层距5 mm). MRCP采用厚层T2加权成像(single shot FSE, SSFSE序列, TR/TE: 4500/983 ms, 层厚60 mm, 多角度采集6-8幅图像). 若发现病变, 在病变部位行3D VIBE(volumetric interpolated breath-hold examination)序列三期动态增强扫描(TR/TE: 4.2/1.8 ms, 层厚2.0-2.5 mm). VIBE检查完成后立即行T1WI横断面(TR/TE: 124/2.5 ms, 层厚8 mm, 层距9.2 mm)和冠状面(TR/TE: 100/4.8 ms, 层厚4 mm, 层距4 mm)增强扫描, 获得平衡期图像.

1.2.2 图像分析: 经从事腹部影像诊断医师2人独立阅片分析, 结论一致即达成诊断, 不一致时协商取得共识. 首先阅读MRCP图像, 然后阅读MRCP联合MR断面图像(包括VIBE序列图像), 观察内容包括: 胆道系统狭窄、扩张、充盈缺损, 狭窄的部位和长度, 胆管壁增厚及强化特征, 胆管周围肝实质异常信号, 胆汁外漏/胆汁瘤形成以及肝外胆管长度、走行. 肝内胆管最大径大于3 mm, 肝外胆管(肝总管及胆总管)最大径大于8 mm记为胆管扩张[1].

统计学处理 分别计算MRCP及MRCP联合MR断面图像诊断胆道并发症的敏感性、阳性预测值、假阳性率、假阴性率和准确率. 率的比较采用卡方检验, $P<0.05$为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 胆道并发症 57例OLT患者中共发现37例(64.9%)胆道并发症. 其中胆汁湖/胆汁瘤3例, 吻合口狭窄14例, 非吻合口狭窄8例, 单纯性胆道结石或胆泥淤积5例, 供体-受体胆总管管径不匹配3例, 胆管炎及胆管周围炎3例, 肝外胆管吻合后过长1例. 胆汁湖/胆汁瘤是早期胆道并发症胆汁漏所致, 本组发生率为8.1%(3/37), 均发生在OLT术后1 mo以内. MRI表现为吻合口周围单发类圆形液性区, 边界清楚, 在各成像序列其信号与胆汁一致(图1). 3例均经ERCP证实存在胆管吻合口漏. 吻合口狭窄是本组最常见的类

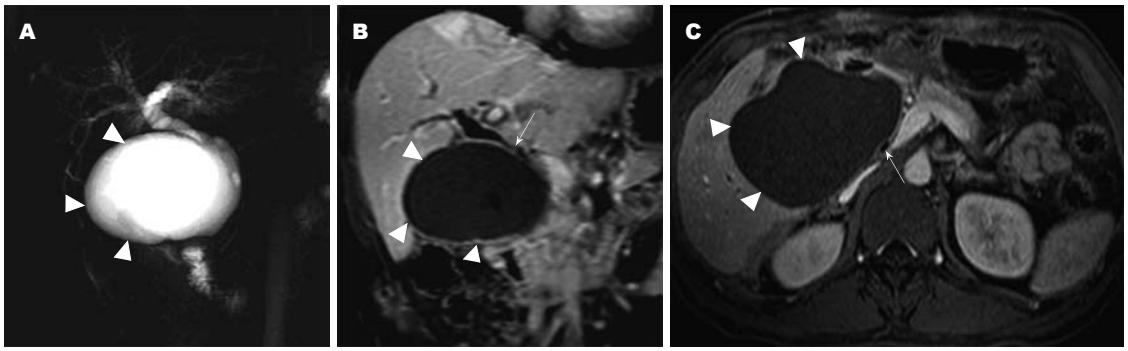


图 1 胆汁瘤(箭头)伴肝外胆管受压(白箭). A: MRCP; B: T1WI增强冠状面; C: VIBE序列横断面.

■应用要点
MRCP和MR断面图像可提供各自特有并互补的信息, 能清楚显示胆管及其周围结构, 有利于临床和影像医生诊断肝移植术后胆道并发症.

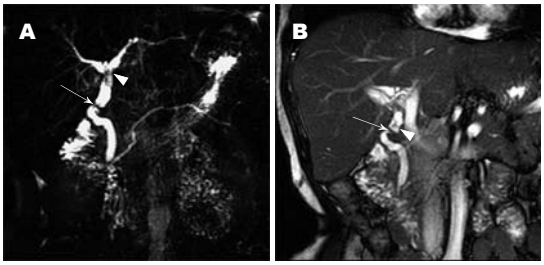


图 2 吻合口狭窄(白箭)伴吻合口上方及左右肝管汇合区多发结石(箭头), 胆管扩张. A: MRCP; B: True-FISP冠状面.

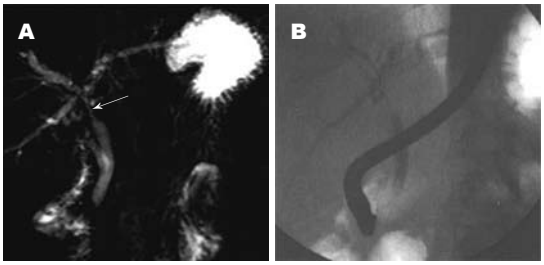


图 3 非吻合口狭窄(箭头). A: MRCP; B: ERCP.

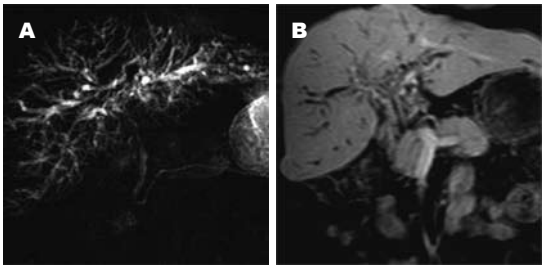


图 4 非吻合口狭窄. A: MRCP; B: T1WI增强冠状面.

型, 占37.8%(14/37). 其中胆管吻合口狭窄12例, 胆肠吻合口狭窄2例, MRCP表现为胆管吻合口处局限性狭窄, 吻合口以上胆管扩张(图2), 5例并发吻合口以上胆管结石或胆淤泥, 3例VIBE序列显示吻合口周围管壁增厚, 4例并发继发性胆管炎. 非吻合口狭窄占21.6%(8/37). MRI表现为肝门部肝总管或/和左右肝管近段狭窄, 外围胆管扩张(图3). 其中5例狭窄段胆管壁增厚(图4), 4例肝内胆管结石. 胆道结石、胆淤泥占13.5%(5/37). 结石位于吻合口以下胆总管2例, 肝总管1例, 肝内外胆管多发结石伴胆淤泥1例, 肝内胆管淤泥1例. 胆道结石表现为胆管内充盈缺损, 边界清楚. 胆淤泥表现为胆管腔内不规则形充盈缺损, 边缘较为模糊, 可分布于单支或多支胆管, 肝内胆管扩张. 肝内胆管炎、胆管周围炎占8.1%(3/37). 胆管炎T1WI表现胆管壁增厚、强化明显(图5), MRCP显示胆管走行僵硬. 胆管周围炎表现为胆管周围肝组织斑片状稍长T1、稍长T2信号, 增强扫描动脉期较明显强化. 供体-受体胆总管管径不匹配占8.1%(3/37). MRCP均表现为受体的胆总管直径大于供体胆总管直径, 在吻合口处形成一明显分界, 不伴管腔狭窄及肝内胆管扩张(图6). 肝外胆管吻合后过长, 长度超过13 cm者1例, MR表现为肝外胆管迂曲、成角伴成角上方及胆总管下段结石形成(图7).

2.2 MR诊断结果分析 37例胆道并发症患者MRCP诊断正确28例, MRCP联合MR断面图像诊断正确35例, 有7例MRCP联合MRI断面图像诊断正确而MRCP诊断错误, 其余2例两种方法均未能正确诊断. 本组结果显示诊断肝移植术后胆道并发症: 仅采用MRCP图像, 其敏感性89.2%(33/37), 阳性预测值84.8%(28/33), 假阳性率2.7%(1/37), 假阴性率10.8%(4/37), 对胆道并发症诊断确诊率75.7%(28/37). MRCP联合MRI断面图像, 敏感性97.3%(36/37), 阳性预测值97.2%(35/36), 假阳性率2.7%(1/37), 假阴性率2.7%(1/37), 对胆道并发症诊断确诊率94.6%(35/37). 二者准确率比较, 差别有统计学意义($P<0.05$). 二者敏感性、阳性预测值、假阳性率、假阴性率差别无统计学意义(表1).

3 讨论

胆道并发症、血管并发症和移植排斥反应是术后移植肝无功能的主要原因[1]. 胆道相关并

■名词解释
VIBE序列：即快速梯度回波三维容积插入法屏气检查序列，是一种运用具有各向同性或类似各向同性空间分辨率的3D射频扰相GRE序列进行数据采集的3D快速梯度回波T1加权成像序列，具有成像速度快、图层薄、无层间距、各向同性的特点，可进行多期动态增强扫描.

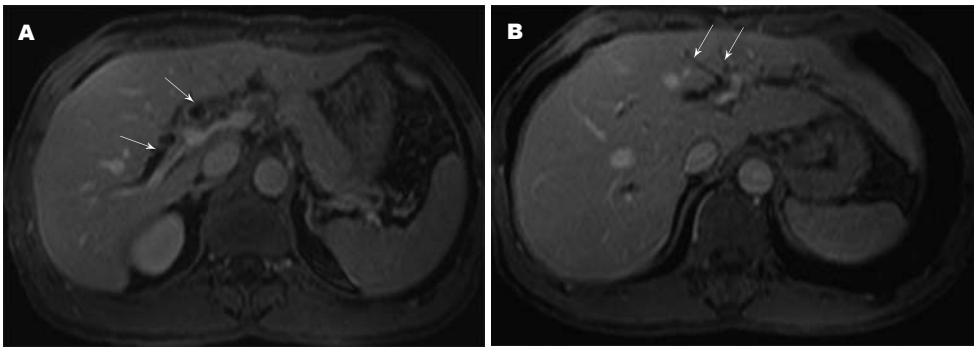


图 5 肝移植术后反复胆道感染5 mo，VIBE序列增强扫描示肝门和肝内胆管壁增厚，明显强化(白箭)，系胆管炎.

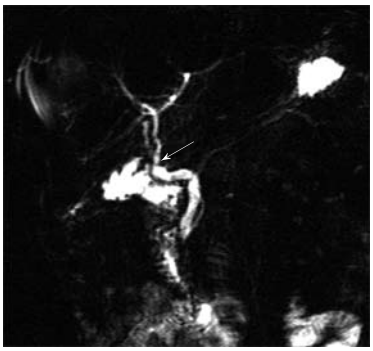


图 6 供体-受体胆管管径不匹配，在吻合口处形成一明显分界(白箭).

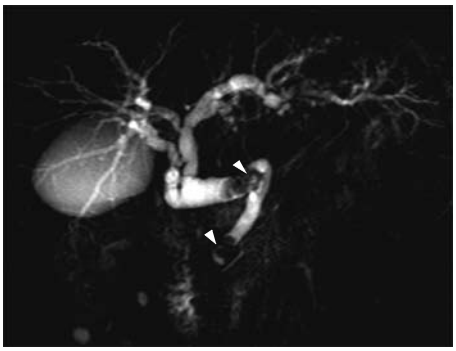


图 7 肝外胆管吻合后过长，成角伴结石(箭头)形成.

表 1 MRCP与MRCP联合MR断面图像对肝移植术后胆道并发症诊断的比较

并发症	n	MRCP			MRCP+MRI		
		确诊(%)	误诊	漏诊	确诊(%)	误诊	漏诊
吻合口狭窄	14	12(85.7)	1	1	13(92.8)	0	1
非吻合口狭窄	8	7(87.5)	1	0	8(100)	0	0
胆石及胆泥形成	5	4(80)	0	1	5(100)	0	0
胆汁漏/胆汁瘤	3	2(67.5)	1	0	3(100)	0	0
胆管炎及胆管周围炎	3	0	1	2	3(100)	0	0
供受者胆管不匹配	3	2(67.5)	1	0	2(67.5)	1	0
肝外胆管吻合后过长	1	1(100)	0	0	1(100)	0	0
合计例数	37	28(75.7)	9		35(94.6[a])	2	

[a]$P<0.05$ *vs* MRCP确诊率.

发症高发病率、早期诊断困难和预后不良，被称为肝移植中的“阿喀琉斯之踵”(Achilles's heel)[3]. 多种影像学方法可用来诊断胆道并发症，如超声、ERCP、PTC和CT等，但都不理想[4]. MR多种成像序列综合应用，能从二维、三维显示胆系的全貌，在肝移植术后胆道并发症的诊断和鉴别诊断方面可发挥重要作用. 有文献[1-2,5-6]着重强调MRCP在肝移植术后胆道并发症中的应用. 但MRCP显示的是胆管腔的形态改变，而不能直接显示胆管壁和胆管腔外的改变. 近年临床亦发现MRCP诊断吻合口狭窄存在一些问题，如较低的空间分辨率导致漏诊轻度的吻合口狭窄，夸大吻合口狭窄的程度. 因此，在评价胆道并发症方面，单纯采用MRCP图像不够全面和精细，应结合MR断面图像来全面评价胆道并发症. 本研究结果示，MRCP联合MR断面图像对胆道并发症的诊断准确率高于单纯MRCP，有统计学差异；而敏感性、阳性预测值、假阳性率、假阴性率两者比较虽无统计学差异，但MRCP联合MR断面图像敏感性、阳性预测值均高于单纯MRCP，而假阴性率则较低. 因此，在临床实际工作中，应重视分析MR断面图像，以提高对胆道系统并发症的诊断.

胆道并发症可分为早期并发症和晚期并发症. 胆汁漏是最常见的早期胆道并发症，晚期胆道并发症包括狭窄、结石、淤泥和Oddi氏括约肌功能不全等.

胆汁漏按发生的不同部位分为“T”管漏、吻合口漏和非吻合口胆漏. 本组3例均为吻合口漏. ERCP是肝移植术后胆汁漏诊断的金标准. MR虽不能直接显示漏口，但能够清楚显

示胆汁外漏积聚的部位、范围. MRCP及T2WI上表现为吻合口周围有高信号的胆汁湖或胆汁瘤形成. Boraschi *et al*[2]认为肝移植术后3 mo内腹腔内可有局限性少量胆汁聚集(胆汁瘤)而不一定伴有活动性胆汁漏. 虽然胆汁瘤的形成不能作为评价是否存在活动性胆汁漏的标准, 但持续性胆汁瘤的存在或胆汁湖增大则提示存在活动性胆汁漏, 应及时行直接胆道造影确诊, 以便选择合理的治疗方案. 胆道狭窄是最常见的胆道并发症, 按发生部位分为吻合口狭窄和非吻合口狭窄. 吻合口狭窄发生于受体胆管或肠管与供体胆管吻合口处, 是由于吻合口在愈合过程中瘢痕形成、挛缩或胆管断端血供不良造成, 多发生在肝移植术后晚期, 常与胆石、胆淤泥等共同存在. 吻合口狭窄是本组最常见类型, 占所有胆道并发症的37.8%(14/37), 占胆道狭窄的63.6%(14/22). MRCP能够清楚地显示吻合口狭窄及肝内胆管扩张的程度. 本组MRCP诊断了14例吻合口狭窄中的12例, 敏感性92.9%, 准确度85.7%. 需要注意的是, 部分肝移植术后梗阻性黄疸的患者未必伴有梗阻近侧胆管的扩张, 这可能与冷保存再灌注损伤的移植肝胆管顺应性下降有关[7]. 本组1例患者因此而漏诊. 非吻合口狭窄主要表现为移植肝脏非吻合口部位胆管树弥漫性或局灶性狭窄、扩张, 是临床上最难处理的肝移植术后胆道并发症. 非吻合口狭窄多与胆管缺血有关, 常见诱因是肝动脉血栓形成[8]. 非吻合口狭窄分为肝外型、肝门型、肝内型和弥漫型[9], 肝门型最常见. MRCP表现为肝总管及左右肝管近段胆管不规则狭窄, 范围较长, 外围胆管扩张, 病变进展向上累及肝内胆管, 向下累及胆总管. MR断面图像特别是VIBE序列能清楚显示狭窄段胆管壁增厚, 是较特征性表现[10]. MRCP亦能清楚显示狭窄近、远侧胆管的形态及腔内改变. 本组发现并确诊了8例狭窄, 同时清楚地显示其中4例(50%)合并胆管内结石/胆泥, 5例(62.5%)胆管壁增厚. MR可以无创、准确地诊断移植肝非吻合口狭窄. 胆道结石、胆淤泥大多数发生在肝移植术后晚期, 多数与吻合口或非吻合口狭窄等其他胆道并发症伴随存在. 单纯依据MRCP即可清楚地显示胆淤泥、胆管结石的分布及肝内外胆管的扩张情况. 本组单纯性胆道结石/胆淤泥5例, 与其他并发症共同存在10例, MRCP正确诊断14例, 与文献报道一致[11]. 肝内胆管炎/胆管周围炎系反复的胆道感染所致. 单一MRCP对该型的诊断价值有限, 而MR增强断面图像, 特别是VIBE序列图像能清楚地显示增厚的胆管壁及胆管周围肝组织的异常信号, 诊断特异性较高. 本组3例全部确诊. 供体-受体胆管管径不匹配的影像学特征表现为受体胆管直径和供体胆管直径不一致, 不伴肝内胆管扩张[12]. 多数为供体胆管光滑、纤细, 而受体的胆管则轻度增宽, 易误诊为胆管狭窄. 两者的区别是胆管狭窄常表现胆管僵直, 管腔粗细不均. 也可表现为受体胆管纤细而供体胆管轻度扩张, 在吻合口处形成一明显分界, MRCP表现类似于吻合口狭窄. 吻合口管腔无狭窄、肝内胆管无扩张为鉴别要点. MRCP反应供、受者胆管生理状态时的管径大小, 能较准确的对该型做出诊断. 一般将肝移植术后肝外胆管长度超过13 cm者定义为肝外胆管吻合后过长[13]. 供受者胆管吻合后过长易发生肝外胆管扭曲成角, 胆汁排出不畅, 致肝外胆管内胆淤泥、结石形成. MRCP能准确判断肝外胆管长度、成角的位置、方向和角度以及胆道有无梗阻.

本研究结果显示, MRCP作为单一的诊断手段判断肝移植术后有无胆道并发症有良好的效果. 在对病因诊断方面, MRCP联合MRI断面图像对胆道并发症诊断准确率达94.6%(35/37), 而单独MRCP仅为75.7%, 前者优于后者, 差别具有统计学意义. 单一的MRCP能对大多数胆管狭窄、胆管结石/胆淤泥、供受者胆管管径不匹配、肝外胆管吻合后过长等并发症做出正确诊断. 联合MR断面图像特别是VIBE序列能提高胆道并发症诊断的准确性和特异性, 尤其是对胆管炎/胆管周围炎、胆汁瘤并发症的诊断. 因此, 磁共振多种序列的联合应用, 对肝移植术后胆系的评价具有重要价值.

■**同行评价**
本文分析合理, 临床资料充分, 讨论有深度, 有一定的临床参考价值.

4 参考文献

1 Valls C, Alba E, Cruz M, Figueras J, Andia E, Sanchez A, Llado L, Serrano T. Biliary complications after liver transplantation: diagnosis with MR cho langiopancreatography. *AJR Am J Roentgenol* 2005; 184: 812-820

2 Boraschi P, Donati F. Complications of orthotopic liver transplantation: imaging findings. *Abdom Imaging* 2004; 29: 189-202

3 Calne RY. A new technique for biliary drainage in orthotopic liver transplantation utilizing the gall bladder as a pedicle graft conduit between the donor and recipient common bile ducts. *Ann Surg* 1976; 184: 605-609

4 Zoepf T, Maldonado-Lopez EJ, Hilgard P, Dechene A, Malago M, Broelsch CE, Schlaak J, Gerken G. Diagnosis of biliary strictures after liver transplantation: which is the best tool? *World J*

Gastroenterol 2005; 11: 2945-2948
5 Beltran MM, Marugan RB, Oton E, Blesa C, Nuno J. Accuracy of magnetic resonance cholangiography in the evaluation of late biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 3924-3925
6 Bridges MD, May GR, Harnois DM. Diagnosing biliary complications of orthotopic liver transplantation with mangafodipir trisodium-enhanced MR cholangiography: comparison with conventional MR cholangiography. *AJR Am J Roentgenol* 2004; 182: 1497-1504
7 St Peter S, Rodriquez-Davalos MI, Rodriguez-Luna HM, Harrison EM, Moss AA, Mulligan DC. Significance of proximal biliary dilatation in patients with anastomotic strictures after liver transplantation. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 1207-1211
8 Linhares MM, Gonzalez AM, Goldman SM, Coelho RD, Sato NY, Moura RM, Silva MH, Lanzoni VP, Salzedas A, Serra CB, Succi T, D'Ippolito G, Szejnfeld J, Trivino T. Magnetic resonance cholangiography in the diagnosis of biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 2004; 36: 947-948
9 Buis CI, Verdonk RC, Van der Jagt EJ, van der Hilst CS, Slooff MJ, Haagsma EB, Porte RJ. Nonanastomotic biliary strictures after liver transplantation, part 1: Radiological features and risk factors for early vs. late presentation. *Liver Transpl* 2007; 13: 708-718
10 Boraschi P, Donati F, Gigoni R, Urbani L, Femia M, Cossu MC, Filipponi F, Falaschi F. Ischemic-type biliary lesions in liver transplant recipients: evaluation with magnetic resonance cholangiography. *Transplant Proc* 2004; 36: 2744-2747
11 Garcia-Criado A, Gilabert R, Bargallo X, Bru C. Radiology in liver transplantation. *Semin Ultrasound CT MR* 2002; 23: 114-129
12 王宏, 穆学涛, 钟心, 董悦. 肝移植术后胆道并发症的MRCP诊断. 中国医学影像技术 2005; 21: 1717-1719
13 范淼, 李子平, 周旭辉, 严超贵, 孟悛非. 肝移植术后胆系并发症的T管造影表现. 临床放射学杂志 2004; 23: 584-588

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志2007年1–11月份收稿及发稿数字统计结果

本刊讯 世界华人消化杂志2007年11月份收稿及发稿数字统计结果: 自2007-01-01/2007-11-30, 世界华人消化杂志共收到稿件1450篇, 退稿585篇, 退稿率40.34%. 发表文章707篇, 其中述评44篇(6.2%), 基础研究181篇(25.6%), 临床研究89篇(12.6%), 文献综述100篇(14.1%), 研究快报84篇(11.9%), 临床经验179篇(25.3%), 病例报告10篇(1.4%), 焦点论坛19篇(2.7%). 会议纪要1篇(0.14%), 英文摘要677篇(95.8%). 其中受国家级基金资助的157篇(22.2%), 省部级基金资助的222篇(31.4%). 作者分布遍及全国各地, 绝大多数来自高等院校及附属医院. (常务副总编辑: 张海宁 2007-11-15)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3761-3763
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

“四大一支持”综合冲击疗法救治急性重症胆管炎32例

史卫海, 戎亚雄, 岳茂兴

史卫海, 戎亚雄, 江苏大学附属武进医院腹部外科中心 江苏省常州市 213000
岳茂兴, 中国人民解放军第306医院腹部外科中心 北京市 100101
通讯作者: 史卫海, 213000, 江苏省常州市永宁北路2号, 江苏大学附属武进医院腹部外科中心. ocean123789@sohu.com
电话: 0519-85336190-2081
收稿日期: 2007-09-06 修回日期: 2007-10-29

Combined implosion therapy of "FHDOS" for critical patients with acute cholangitis of severe type: an analysis of 32 cases

Wei-Hai Shi, Ya-Xiong Rong, Mao-Xing Yue

Wei-Hai Shi, Ya-Xiong Rong, Center of General Surgery, Affiliated Wujin Hospital of Jiangsu University, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China
Mao-Xing Yue, Center of General Surgery, 306 Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China
Correspondence to: Wei-Hai Shi, Center of General Surgery, Affiliated Wujin Hospital of Jiangsu University, 2 Yongning North Road, Changzhou 213000, Jiangsu Province, China. ocean123789@sohu.com
Received: 2007-09-06 Revised: 2007-10-29

Abstract

AIM: To summarize the experience with combined implosion therapy of FHDOS (four high dose and one support) for critical patients with acute cholangitis of severe type (ACST) severe accompanying by multiple organ dysfunction syndrome (MODS), and to evaluate its efficacy.

METHODS: All of the patients with ACST accompanying MODS in our study underwent operation. A routing method was performed in 34 cases (routing group). Thirty-two critical patients were treated with the new combined implosion therapy of FHDOS (combined group). "FHDOS" included: (1) a high dose of anisodamine in short-range, (2) a high dose of dexamethasone in short-range, (3) a high dose of efficacious antibiotics, (4) a high dose of solution to douche abdominal cavity, and (5) etabolic and nutritional support.

RESULTS: The mortality in the combined group (28.1%) was lower than that in the routing group (52.9%) ($P < 0.05$).

CONCLUSION: FHDOS therapy could significantly reduce perioperative mortality in critical patients with ACST accompanying MODS. FHDOS therapy could ameliorate the general conditions of these patients and lead to a safe perioperative stage.

Key Words: Anisodamine; Dexamethasone; Acute cholangitis of severe type; Multiple organ dysfunction syndrome; Combined implosion therapy of "FHDOS"

Shi WH, Rong YX, Yue MX. Combined implosion therapy of "FHDOS" for critical patients with acute cholangitis of severe type: an analysis of 32 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3761-3763

摘要

目的: 探讨“四大一支持”综合冲击疗法在急性重症胆管炎并发多器官功能障碍综合征中的应用效果.

方法: 急性重症胆管炎并发多器官功能障碍综合征66例, 均进行手术. 根据治疗不同分为两组. 常规组(34例)采用传统常规疗法, 冲击组(32例)采用“四大一支持”综合冲击疗法, 即短程大剂量山莨菪碱, 短程大剂量地塞米松, 大剂量抗厌氧菌和抗需氧菌抗生素联合正确应用; 大量灌洗液清洗腹腔, 一支持即代谢营养支持.

结果: 常规组死亡率为52.9%, 冲击组死亡率28.1%, 两组有显著差别($\chi^2 = 4.2$, $P<0.05$). 冲击组治愈患者经2 mo-7年随访, 未发现其他副作用及不良反应.

结论: “四大一支持”综合疗法能降低急性重症胆管炎并发多脏器功能障碍综合征患者的死亡率, 有助于患者渡过手术关, 促进器官功能发生逆转, 最终获得痊愈.

关键词: 山莨菪碱; 地塞米松; 急性重症胆管炎; 多器官功能障碍综合征; “四大一支持”综合疗法

■背景资料
重症急性胆管炎发病急骤、病情复杂, 一旦延误诊治极易导致MODS, 临床处理十分困难, 伤残率、病死率很高. 正确选择手术时机, 早期进行手术减压是降低死亡率非常重要的措施. MODS是急性重症胆管炎的严重并发症, 也是最主要的死亡原因之一. 随着器官功能障碍累及数的增加, 病死率也增加. 防止肝衰、肾衰的关键是及时纠正休克和脱水状态, 保证肝脏和肾脏的足够血流灌注, 抑制胃酸分泌. 围手术期静脉注射H2受体阻滞剂, 对应激性溃疡有预防作用.

■研发前沿
研究证实短程大剂量山莨菪碱与地塞米松联合使用具有扼止机体危重状态进展, 促进症状缓解, 具有增加微循环内灌注量和微循环内微粒移动的数量及扩张微血管而达到改善组织氧供、改善微循环及减少微血栓形成的目的, 具有良好的降温、抗毒、抗炎、抗休克作用.

史卫海, 戎亚雄, 岳茂兴. “四大一支持”综合冲击疗法救治急性重症胆管炎32例. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3761-3763
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3761.asp

0 引言

多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)是严重感染创伤, 休克和大手术等原发病发生24 h后, 机体同时或序贯发生两个或两个以上器官或系统功能障碍的临床综合征[1]. 急性重症胆管炎(acute cholangitis of severe type, ACST)发病急剧, 病死率极高, 可达33.6%[2].一旦延误诊治, 极易导致MODS, 临床处理十分困难. 如何合理救治及降低死亡率仍是现代胆道外科一大课题. 我们采用“四大一支持”综合冲击疗法[3-4]救治ACST并发MODS患者32例, 现报告如下.

1 材料和方法

1.1 *材料* 江苏大学附属武进医院及解放军第306医院腹部外科中心8年来共收治ACST并发MODS 66例, 其中采用传统常规疗法34例(常规组), “四大一支持”综合疗法32例(冲击组). 常规组中男21例, 女13例, 年龄35-81(平均59)岁. 冲击组男22例, 女10例, 年龄31-93(平均62)岁. 发生两个脏器障碍者52例, 三个12例, 四个2例.

1.2 *方法* 传统常规疗法: (1)消除病因; (2)改善氧供, 恢复和改善微循环, 进行血液动力学支持; (3)维持血容量; (4)抗感染治疗; (5)免疫治疗和抗凝治疗等. 在部分常规疗法基础上应用的“四大一支持”综合疗法[3-4]: (1)短程大剂量山莨菪碱: 20 mg/8 h, 或一次静注20-40 mg, 30 min后可根据病情追加40 mg, 总量可达120-240 mg/d, 直至病情控制. (2)短程大剂量地塞米松: 40 mg/8 h, 或一次静注100 mg, 连续用药3 d后逐渐减量. 为预防应激性溃疡的发生, 应同时应用甲氰咪胍(0.4 g/次, 3次/d)或洛赛克. (3)大剂量抗需氧菌和抗厌氧菌抗生素合理联合应用. 我们采用序贯性抗生素治疗. 包括三个阶段: 在取得培养及药敏报告前, 应按照经验性抗生素方案给药, 采用对肝肾功能影响极小的抗生素, 如抗厌氧菌的甲硝唑或替硝唑和抗需氧菌的第三代头孢菌素. 3-4 d后, 根据药敏报告选用抗生素治疗, 同时需预防二重感染的发生. 7-9 d后, 根据患者情况, 可开始改换口服治疗, 以巩固疗效. (4)腹腔灌洗液清洗腹腔: 手术中采用生理盐水2000-3000 mL冲洗腹腔, 以减少坏死组织、细菌总数和稀释毒素. (5)“一支持”即代谢营养支持治疗: 分肠外和肠内两大类, 采用分阶段代谢营养支持治疗: 第一阶段即患者处于高度应激状态, 有效循环量、水盐电解质平衡得到初步处理后, 但胃肠功能仍处在明显障碍时, 应采用完全的胃肠外营养. 患者每日从中心静脉或周围静脉给予低热量营养支持, 一般应用20-30 kcal/kg[5]. 其中糖<5 g/(kg·d), 脂肪<1.0 g/(kg·d), 而氮摄入量应在0.15-0.2 g/(kg·d)左右为宜[6]. 内加电解质、微量元素、胰岛素、ATP和辅酶A等. 第二阶段即病情有缓解, 胃肠道功能有明显恢复时, 可肠内、肠外营养同时进行. 第三阶段即病情得到完全控制, 胃肠道功能完全恢复时, 逐步过渡直至全部应用肠内营养. 代谢支持的重点是尽可能保持正氮平衡, 而非普通的热量供给.

统计学处理 采用χ^2检验, SPSS11.0 for Windows统计软件进行处理, 检验水准$\alpha = 0.05$.

2 结果

两组患者均施行了手术. 常规组中18例于术后3-30 d相继死亡, 病死率52.9%. 冲击组中9例于术后9-56 d相继死亡, 病死率28.1%. 两组比较$\chi^2 = 4.2$, $P<0.05$, 统计学差异具有显著性. 冲击组治愈患者经2 mo-7年随访, 未发现其他副作用和不良反应.

3 讨论

胆管梗阻、扩张、胆汁淤积导致细菌生长繁殖. 发生ACST时, 肝内胆小管压力超过肝细胞分泌压, 胆小管内膜受损、坏死、破溃, 且与肝血窦病理性融通, 使大量脓性胆汁进入血液而引起“五血症”, 即菌血症、内毒素血症、脓毒血症、败血症和胆汁血症. ACST进展很快, 出现顽固中毒性休克、精神症状、细菌性肝脓肿时, 表明病程已进入中期. 并发MODS者则为晚期阶段的表现, 是良性胆道疾病最重要、最直接的死亡原因. 动物和临床研究表明, 肝脏对外来因素打击最为敏感. ACST时, 容易并发肝功能障碍或衰竭, 并以顺序累加方式对其他器官功能带来不利影响, 导致MODS, 死亡率可高达54%-64%. 本组常规治疗的患者死亡率与文献报道相近.

如何早期预防和有效地控制MODS的发生、发展成为ACST是临床救治十分重要的研

究课题. 有关ACST并发MODS时, 是否进行手术治疗尚有争论. 我们体会一旦发生MODS, 保守治疗很难使患者病情发生逆转. 6例患者虽经积极保守治疗但终因MODS继续发展而死亡[3]. 所以我们在实验研究和临床总结的基础上采用“四大一支持”综合冲击疗法. 该方法: (1)能显著改善心、肝、肺、肾功能, 降低死亡率, 减少药物副反应, 优于单独应用; (2)增加微循环灌注量和微循环内微粒移动的数量; (3)逆转胃黏膜内pH值下降, 改善组织氧供; (4)抑制血浆胃泌素、胃动素水平的升高; (5)降低血浆TNF和LPO的水平; (6)减轻组织细胞变性、坏死, 减少微血栓的形成; 使肾脏内皮素mRNA表达水平明显降低等[1,7-8]. 术后因胆道梗阻的致死性触发病因去除, 病情较快发生逆转, 最终获得治愈出院. 冲击组84岁、87岁及93岁各1例患者, 均并发两个器官功能障碍, 经“四大一支持”综合疗法, 在ICU监测渡过了手术关, 治愈出院. 而常规组两例85岁患者均死亡.

“四大一支持”综合冲击疗法与传统治疗的区别如下: (1)“四大一支持”综合疗法是将几种强有力的治疗措施几乎同时用在一个患者身上. (2)给药的方式不同: 一般需静脉快速推入或滴入, 要求在最短时间内在血液中达到最大的药物浓度, 以期发挥最大的效应. (3)给药的剂量不同: 一般给药的剂量是大剂量冲击治疗, 而不是平时的均衡给药. (4)给药持续时间不同: 本法强调的是短程, 一旦病情缓解即可停药或逐渐减量. (5)对于有致死性触发因素的危重患者, 一定要在“四大一支持”综合治疗的同时, 尽快去除致死性的因素, 病情才会逆转. 综合疗法并不等于各种治疗方法的简单叠加, 是考虑和注意到了各种治疗方法疗效的互补性, 从而可避免疗效的拮抗和毒副作用的叠加. 正因如此, “四大一支持”综合冲击疗法才显示出特有的治疗效果. 本资料统计显示冲击组病死率明显低于常规组($P<0.05$).

“四大一支持”综合疗法在实际抢救过程中要根据具体情况, 根据患者的个体差异, 适当调整用药剂量和顺序, 以便获得最佳救治效果. 同时应纠正水、电解质及酸碱平衡, 防治二重感染. 预防性应用抑酸药防治应激性溃疡, 既往有青光眼、溃疡病、凝血机制障碍者可长期应用糖皮质激素, 有精神疾病病史、肿瘤晚期及各种严重消耗性疾病患者应慎用或禁用. 另外, 在MODS时, 机体处在高分解高动力状态, 代谢营养支持已成为脏器支持的一个重要环节, 营养代谢状态实际上将决定患者的最终预后. 代谢支持的时机应依临床情况而定, 需分三个阶段进行. 危重患者发病的初期, 以补充单纯液体、电解质及100-200 g葡萄糖为佳. 如需进行肠外营养支持, 非蛋白热卡摄入量控制在20 kcal/(kg·d)左右, 然后逐渐增加至25-30 kcal/(kg·d)[6]. 临床实践表明, 在危重患者应激初期, 提倡限制性热卡摄入有助于机体平稳度过创伤应激阶段, 减少代谢紊乱. 随着病情稳定, 摄入热卡及氮量可逐渐增加[5].

预防是防止出现ACST患者并发MODS最好的处理方法, 关键是要切实做到早期识别、早期检查、早期诊断和早期治疗. 一旦发生MODS, 要给予强有力的“四大一支持”综合疗法, 遏止住患者的危重状态, 为紧急手术和下一步的治疗赢得时间, 降低死亡率, 而对重要脏器无损伤作用[4]. 本方法在救治ACST并发MODS中具有方便、经济、可靠、疗效显著的特点, 值得在临床推广应用.

4 参考文献

1 岳茂兴, 李成林, 赵尔增, 李新元, 李学彪, 冯凯, 张诗琳, 薛亮, 张连春, 罗放, 王新明, 张圭显. 山莨菪碱及地塞米松对MODS时微循环及免疫病理学改变的实验研究. 中华外科杂志 1997; 35: 392-394

2 李廷坚, 候光, 郭予涛. 急性重症胆管炎130例诊治探讨. 中国临床医学 2004; 11: 388-389

3 岳茂兴, 李学彪, 李成林. 重症急性胆管炎(ACST)96例的救治. 伤残医学杂志 2004; 12: 19-21

4 岳茂兴, 李成林, 李学彪, 刘志国, 杨鹤鸣, 姜玉峰, 张诗琳. 腹部外科脓毒症临床救治258例. 世界华人消化杂志 2006; 14: 109-113

5 吴国豪. 危重患者的营养支持. 临床外科杂志 2006; 14: 206-208

6 Wernerman J. Guidelines for nutritional support in intensive care unit patients: a critical analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005; 8: 171-175

7 岳茂兴, 李成林, 杨鹤鸣, 李建忠, 李新元, 赵尔增. 山莨菪碱联用地塞米松治疗多器官功能障碍综合征机制的研究. 中国危重病急救医学 2000; 12: 341-343

8 岳茂兴. 山莨菪碱联用地塞米松治疗术后并发多器官功能障碍综合征的临床研究方案. 中国中西医结合急救杂志 2004; 11: 264-267

■**创新盘点**
本文将“四大一支持”综合疗法用于治疗急性重症胆管炎并发MODS, 降低了病死率, 不增加远期并发症, 为临床提供一种此种情况下的比较好的治疗方法.

■**同行评价**
本文资料来源可靠, 有一定的临床实用意义和参考价值.

编辑 程剑侠 电编 何基才

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3764-3769
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

临床经验 CLINICAL PRACTICE

中药治疗癌痛临床文献41篇的分析

许 玲, 魏品康, 孙大志, Lixing Lao

■背景资料
癌症疼痛是备受关注的临床症状之一, WHO建议使用三阶梯治疗方案, 但治疗带来的不良反应限制了镇痛西药的临床应用, 因此中医药等疗法在癌痛中的应用受到了重视并在国内临床应用广泛.

许玲, 中国人民解放军第二军医大学长征医院 美国马里兰大学医学院结合医学中心访问学者 上海市 200003
魏品康, 孙大志, 中国人民解放军第二军医大学长征医院 上海市 200003
Lixing Lao, 美国马里兰大学医学院结合医学中心 美国马里兰州 21207-6697
通讯作者: Lixing Lao, Center for Integrative Medicine, University of Maryland, School of Medicine. Kernan mansion, 3rd floor. 2200 Kernan Drive. Baltimore, Maryland 21207-6697, U S A. llao@compmed.umm.edu
电话: 410-448-6873 传真: 410-448-6875
收稿日期: 2007-08-09 修回日期: 2007-10-29

Quality of reporting in 41 randomized controlled clinical trials of Chinese medicine for cancer pain

Ling Xu, Pin-Kang Wei, Da-Zhi Sun, Lixing Lao

Ling Xu, Shanghai Changzheng Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, Visiting Scholar at the Center for Integrative Medicine, University of Maryland School of Medicine. Shanghai 200003, China.
Pin-Kang Wei, Da-Zhi Sun, Shanghai Changzheng Hospital, Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200003, China
Lixing Lao, Center for Integrative Medicine, University of Maryland, School of Medicine. Kernan Mansion, 3rd floor. 2200 Kernan Drive, Baltimore, Maryland 21207-6697, USA
Correspondence to: Lixing Lao, Center for Integrative Medicine, University of Maryland, School of Medicine. Kernan Mansion, 3rd floor. 2200 Kernan Drive, Baltimore, Maryland 21207-6697, U S A. llao@compmed.umm.edu
Received: 2007-08-09 Revised: 2007-10-29

Abstract

AIM: To highlight the importance and necessity of quality assurance in clinical trial reporting by analyzing 41 papers on of Chinese medicine for cancer pain.

METHODS: A search for clinical trial reports published from 1986 to 2006 on the effects, mechanisms, safety and application of Chinese herbal medicine in cancer pain management was conducted using the CBM, Chinese Medical Current Contents (CMCC) and Weipu (available since 1989) databases in Chinese, and PubMed and EMBASE in English. We evaluated the methodological quality of the articles, following the guidelines set forth in Levels of Evidence of Human Studies of Cancer in Complementary and Alternative Medicine by the National Cancer Institute (NCI) and Quality of Reporting of Randomized Controlled Trials of Herbal Medicine Interventions by Gagnier *et al*.

RESULTS: Some research information was insufficiently reported, including methods of randomization, inclusion and exclusion criteria, outcome measurements, blinding and concealment, quality control and quality assurance of herbal preparations, and adverse events.

CONCLUSION: Two crucial elements of high quality scientific reporting are the provision of sufficient research information and the transparency of research methodology. Insufficient reporting may be one of the major reasons. Chinese medicine is not widely and globally used to treat cancer pain.

Key Words: Chinese medicine; Cancer pain; Quality control

Xu L, Wei PK, Sun DZ, Lao LX. Quality of reporting in 41 randomized controlled clinical trials of Chinese medicine for cancer pain. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007; 15(35): 3764-3769

摘要

目的: 本文通过对41篇中药治疗癌痛的临床研究文献进行分析, 讨论提高中医论文质量的重要性和必要性.

方法: 检索《中国生物医学文献数据库》(CBM), 《中国生物医学期刊文献数据库》(Chinese Medical Current Contents, CMCC)和维普中文数据库以及PubMed和荷兰医学文摘数据库(Excerpta Medical Datebase, EMBASE)英文数据库在1986年至2006年中医药治疗癌痛的文献. 根据the National Cancer Institute(NCI)“补充和替代医学领域中癌症临床研究循证医学的强度等级”筛选出属于随机对照临床研究的论文41篇, 并以Gagnier *et al*的“中药治疗随机对照试验的报道质量”一文为参考, 进行论文质量分析.

结果: 41篇论文中一些必要信息如随机方法, 纳入和排除标准, 研究结果测定, 盲法应用, 中药制剂的质量控制和评价, 以及药物的不良反应等表述不足.

结论: 科研论文报告的信息量是影响论文质量的因素, 也是阻碍中医药在癌痛治疗领域被广泛接受的原因之一.

关键词: 中医; 癌痛; 文献质量

许玲, 魏品康, 孙大志, Lixing Lao. 中药治疗癌痛临床文献41篇的分析. 世界华人消化杂志 2007; 15(35): 3764-3769
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/3764.asp

0 引言

疼痛是组织损伤或潜在组织损伤所引起的不愉快感觉和情感体验. 据WHO统计每天至少有500万癌症患者在遭受着疼痛的折磨. 尽管WHO确定了三阶梯方案治疗癌痛, 但是镇痛主要选择的药物为非甾体类抗炎药和阿片类药物, 其副作用严重限制了其实际应用. 如非甾体类抗炎药可产生胃溃疡, 肝肾功能损伤; 阿片类镇痛药可导致恶心、呕吐、便秘、困倦、呼吸抑制, 以及长期应用后可能产生耐药和成瘾等[1-5]. 因此, 其他辅助用药的应用日益受到重视. 尤其不能低估的是中药在这一方面的治疗价值.

近20年来, 中医药学者在癌痛的治疗中进行了可贵的探索. 如汤剂, 片剂或胶囊口服, 膏药, 酊剂外敷, 注射液静脉或肌肉给予等多途径治疗癌痛, 取得了可喜的进展. 检索《中国生物医学文献数据库》(CBM), 中文生物医学期刊文献数据库(Chinese Medical Current Contents, CMCC), 维普中文数据库, 以及PubMed和荷兰医学文摘数据库(Excerpta Medical DataBase, EMBASE)英文数据库, 1986-2006共有373篇文章与中药治疗癌痛有关. 其中有106篇中文和9篇英文文献为癌痛的临床原创性研究. 9篇英文文献中8篇发表在中国期刊英文版. 因此, 中医临床论文质量很可能是影响中医药被国际医学界重视的一个关键.

1 材料和方法

1.1 材料 检索CBM, CMCC, 维普中文数据库, 以及PubMed、EMBASE英文数据库, 1986-2006与中药治疗癌痛有关的文献. 关键词包括“癌痛”, “肿瘤疼痛”, “中药”, “中草药”, “中西医结合”, “作用机理”; 英语关键词包括Chinese medicine, Chinese herbs, cancer pain, neoplasm, and integrative Chinese and western medicine. 在中文数据库中共检索到212文章, 在PubMed和EMBASE上检索到161条英文题录. 除去综述性论文, 会议摘要, 个案病例报道, 以及其他治疗(化疗, 放疗和手术)引起的疼痛等, 有106篇中文和9篇英文文献为原创性临床研究论文. 进一步以NCI公布的论文质量评价方法“Levels of Evidence of Human Studies of Cancer in Complementary and Alternative Medicine(补充和替代医学领域中癌症临床研究循证医学的强度等级)”by the National Cancer Institute (NCI) (http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/levels-evidence-cam/HealthProfessional/page2)”及 Gagnier *et al*[6]发表“Quality of Reporting of Randomized Controlled Trials of Herbal Medicine Interventions(中药治疗随机对照试验的报道质量)”为参考, 其中41篇为随机对照临床试验(randomized controlled clinical trials, RCT). 本文就对这41篇进行文献质量分析.

2 结果

41篇随机对照的临床试验文献均有明确的研究目的, 摘要中87.8%有齐全的目的, 方法, 结果和结论. 95%提及随机, 87.8%描述诊断标准. 但是, 只有32.5%报告随机方法和程序, 58.5%和24.4%提及纳入标准和排除标准. 9.8%使用安慰剂对照, 70.7%报告不良反应, 7.3% 随访达半年. 无一篇报道提及样本量的计算方法等(表1).

3 讨论

从文献资料的阅读中发现, 中医临床论文的报道缺少很多必要的信息. 尤其是针对中药疗效的研究, 与药物有效性和安全性相关的信息也有遗漏. 以下就几个显着的问题进行讨论.

首先, 是随机入组问题. 目前, 在中医药临床研究中, 研究者大多为中医工作者, 有意或无意地会把个人主观因素或偏倚带到实验研究中去, 特别是对有很大商业利益的新药评估上. 所以在药物的临床研究中遵循随机、盲法、严格对照是避免和降低人为偏倚干扰研究结果最有效的研究方法. 在本文分析的41篇文献中除一篇为自身对照研究外, 虽有38篇(38/40, 95.0%)提及了随机, 但其中只有13篇(参考文献11, 15-17, 22, 29, 31, 38, 40, 44-47)(13/40, 32.5%)描述了如何随机, 如随机数字法, 根据齐同对比原

■**研发前沿**
有关中医药治疗癌痛临床研究报道, 存在着课题设计不合理, 或内容缺项等问题, 使得中医药在该领域的推广应用受到了影响.

■**创新盘点**
检索范围全面, 对CBM, CMCC和维普中文数据库以及PubMed和EMBASE英文数据库进行全面检索. 对41篇文献进行评价, 集中对随机入组问题、疼痛强度的评价、中药制剂问题、对照组问题进行总结分析.

表 1 详细评估情况

评估内容	所占比例	所在文献
有中文摘要	32/39[1](82.1%)	7–10, 12–23, 25–28, 30–36, 39–41, 43, 44
目的, 方法, 结果, 结论齐全	36/41(87.8%)	7–28, 30–36, 39–41, 43, 44, 46, 47
有关键词	38/41(92.7%)	7–28, 30–37, 39–44, 46, 47
有英文摘要	10/41(24.4%)	17, 20, 21, 23, 33, 40, 41, 43, 46, 47
提及随机(除自身对照, 文献34)	38/40(95.0%)	7–23, 26–33, 35–47
提及如何入组(除自身对照, 文献34)	13/40(32.5%)	11, 15, 16, 17, 22, 29, 31, 38, 40, 44–47
有诊断标准	36/41(87.8%)	7–17, 19–34, 37, 38–41, 43, 45–47
有入选标准	24/41(58.5%)	8–11, 15–17, 19–24, 27–31, 34, 37, 40, 43, 46, 47
有排除标准	10/41(24.4%)	8, 11, 15, 17, 34, 37, 40, 41, 46
使用安慰剂对照	4/41(9.8 %)	20, 23, 29, 36
使用阳性对照, 同时药物或治疗方法明确, 剂量明确	29/41(70.7%)	7–9, 11, 13–19, 21–23, 28, 31, 32, 35, 37–47
写明疼痛强度的评价方法	38/41(92.7%)	
VRS(主诉疼痛的程度分级法)	18/41(43.9%)	7–10, 12–15, 17, 19, 21–23, 28, 29, 37, 43, 45
NRS(数字分级法)	7/41(17.1%)	11, 17, 24, 34, 38, 40, 41
VAS(视觉模拟法)	6/41(14.6%)	18, 35, 36, 42, 44, 46
其他方法	7/41(17.1%)	16, 20, 25, 32, 39, 45, 47
提及两组治疗前的基本信息, 包括病种分布, 疼痛程度和部位, 以及性别、年龄等资料比较(除自身对照, 文献34)	28/40(70.0%)	7–13, 15–17, 19–23, 28–31, 33, 35, 37, 40–42, 44–47
自制制剂(外用药或汤药)有明确的药物组成和剂量	8篇[2]	10, 15, 20, 36, 38, 39, 42, 46
提及疗效标准, 且写明依据	25/41(61.0%)	7, 9, 11, 14, 16, 18–21, 23–25, 28–30, 32, 34, 37, 38, 40, 41, 44–47
提及疼痛治疗有效率	41/41(100.0%)	7–47
评价止痛作用起始时间	17/41(41.5%)	7, 9, 11, 16, 20, 21, 23, 25, 29, 34–36, 38, 40, 41, 45, 46
评价止痛作用持续时间	16/41(39.0%)	7, 11, 15–17, 20, 22, 25, 29, 34, 35, 38, 40, 41, 43, 46
有不良反应描述	29/41(70.7%)	7–11, 14, 15, 17–20, 22–24, 28–30, 32, 34–38, 40, 41, 43–47
疼痛观察的疗程		
<1 wk	6/41(14.6%)	7, 15, 18, 22, 23, 40
1–2 wk	17/41(41.5%)	8–12, 16, 17, 20, 21, 34, 36, 38, 41–44, 46
>2 wk	14/41(34.1%)	13, 14, 19, 25–31, 33, 35, 37, 47
疗程不明确	4/41(9.8%)	24, 32, 39, 45
随访达半年, 但未报道提及随访方法	3/41(7.3%)	13, 14, 19
有统计方法, 但未提及样本量计算	41/41(100.0%)	7–47
有较完善的讨论, 体现了中医特色	21/41(51.2%)	7, 9–11, 15, 17, 19, 21, 28, 31, 34, 36, 38, 39, 41–47

[1]41篇文献中有2篇发表在英文版期刊, 因此中文摘要计算时除外这2篇文献; [2]仅就自制制剂和汤剂进行分析, 不包括成药类, 针剂类.

则直接配对法等及随机的程序. 40篇文章均未提及如何实施盲法研究. 如由谁确定受试者入组, 由谁执行受试者的治疗, 由谁收集研究数据及评价和参与者是否被盲等. 这些研究也均未提及样本量大小是如何计算得出的.

通常, 临床研究是针对某一特定疾患者群(如癌症疼痛患者)的研究, 受试者的筛选及随机入组是临床研究的基本要素. 87.8%的文献提到了诊断标准, 然而, 只有58.5%有纳入标准, 24.4%有排除标准. 30.0%的文献未报告治疗组和对照组治疗前的基本信息, 包括病种分布, 疼痛程度和部位, 以及性别和年龄等资料的可比性. 有2篇文献[13-14]进行了性别和年龄等一般资料的分析, 但未就治疗前组别间疼痛的程度进行可比性分析.

其次, 是疼痛强度的评价. 关于疼痛强度的

评价方法有很多种. 比较常用的有数字分级法(NRS), 根据主诉疼痛的程度分级法(VRS), 视觉模拟法(VAS), 疼痛强度评分Wong-baker等. 国际上普遍通用的是NRS和VAS. 41篇论文中接近半数(43.9%)采用的是根据主诉疼痛的VRS. 我们认为, 这个方法是调查者根据受试者的主诉下的判断, 故有其局限性, 不如NRS法或VAS法完全由受试者自己确定疼痛程度更客观和合理, 避免了调查者人为因素的影响. 41篇文献中只有92.7%写明了疼痛强度的评价方法. 我们无法对其中没有疼痛评价方法却进行疼痛药物有效性分析的研究文献进行分析.

第三, 中药制剂问题. 中药制剂治疗癌痛大体可分为外用、*po*、注射针剂以及其他疗法(吸入和灌肠等). 随着制剂质量控制和工艺的发展, 现在有很多中药做成了类似西药的片剂和胶囊等, 这对于临床研究质量控制是非常有益的. 鉴于传统的给药方法治疗癌痛有效, 而且仍然较为广泛地应用于临床, 如自制外用膏药、酊剂、煎汤服用的汤剂等, 但是关于药物组成、剂量和制作方法, 一些研究者未予以明确说明. 作为科学研究, 适当的透明度是必要的, 以便让其他研究者进一步验证试验结果, 检验研究质量. 这对于推广研究结果在临床的应用是有积极意义的.

第四, 对照组问题. 综观癌痛的临床研究文章, 所选对照组大多是阳性对照组, 阿片类镇痛药和非甾体类抗炎药是主要的选择. 有些因为考虑与肿瘤相关, 也有采用化疗或放疗对照治疗的. 但是, 一些研究提及用三阶梯治疗方案作对照, 却未报告具体药物名称和使用方法[10,25,34]. 采用自身对照的一项研究[34], 对于轻中度疼痛患者实施治疗时, 先采用西药三阶梯疗法, 然后改用中药针剂, 按照中药针剂治疗前后进行自身对照比较. 我们都知道药物有半衰期, 西药停用改用中药期间必须要有一个清洗期, 但是作者未作交代, 缺少了这些必要的信息, 势必影响读者对此类文章研究结论的接受程度.

研究者采用阳性对照的方法进行研究, 可能基于医学伦理的考虑. 然而, 药物临床研究的前提是实验用药存在有效和无效两种可能性. 对于癌痛受试者而言, 如果实验用药是无效的, 而在观察研究期间不能使用其他止痛药, 这样岂不违背了伦理的要求. 假如我们在设计研究方案时, 对照组使用安慰剂, 同时允许治疗组和对照组受试者根据疼痛控制在4(按照NRS法)以下的要求, 应用镇痛药解救, 记录镇痛药的实际用量并作为一项评价指标. 这样既达到了研究的目的, 也符合了伦理的要求. 因此, 用安慰剂作对照更合理. 陈长怀 *et al*[20], 魏琳 *et al*[23]以及施俊 *et al*[29]就应用了安慰剂作对照.

阅读中药治疗癌痛的文献, 其研究结论均提示中药能在一定程度上减轻疼痛, 且发现部分制剂的止痛作用与西药镇痛药物相当. 正因为中药有如此显著的效果, 我们就应该把实验设计得更严谨, 报道得更透明, 并向国际医学界推荐, 将论文发表于国际性期刊, 真正让中医药走向世界. 但是, 也有可能一些研究因为得出的是阴性结果就未公之于众. 其实, 阴性结果可以提醒临床医生和中医药研究者少走弯路, 其研究结果的报道也很有价值.

最后, 药物的不良反应. 药物研究除有效性外, 安全性也是不可忽视的, 这也是中医药走向世界的关键问题. 41篇文献中仅70.7%提到药物的不良反应. 即使报告不良反应, 大多只是简单的文字描述, 没有具体的评价方法和必要的分析. 只有7.3%的文献提到了随访, 而且文献中均未对随访的方法进行描述. 2007-03-05/06在美国国立卫生研究院(NIH)召开了一个关于“疼痛, 阿片类药及成瘾性”的研讨会. 与会专家一致认为阿片类药是有效的镇痛药, 他的耐药性和成瘾性问题尽管发生的比例较低, 但不容忽视. 同时他们寄希望于开发出副作用少的止痛药物. 应该说, 目前缺少的不是有效的止痛药物, 而是高效低毒的药物. 中药是否属于高效低毒之品, 现在还言之过早. 我们应该进行中药的安全性研究, 拿出具体的数据, 审慎地下结论. 目前NCI已经提供了用于评价毒副反应的标准NCI Common Toxicity Criteria CTC version 3(http://ctep.info.nih.gov), 这为药物安全性研究提供了参考.

科学、严谨的临床研究设计和合理、客观的报道是中医药被国际医学界接受的重要途径. 高质量的研究论文是应该清晰阐明每一个研究步骤. 必要的信息越清楚, 其可靠性和可信度越强. 国外文章虽有字数限制, 页数比较合理, 5-6页的临床研究很常见, 有些甚至达10余页, 使研究者有机会将重要信息阐述清楚. 国内的期刊大多限制在5000字左右. 本文分析的文献大多只占2个版面, 因为期刊字数的限制也可能是某些重要信息被遗漏的原因之一. 因此, 建议杂志编辑考虑给予临床研究足够的篇幅, 以

■应用要点

本文以规范的论文书写方法及要点为重点分析当前国内文章报道的缺陷, 意欲引起研究者对临床研究设计规范性和研究报道严谨性的重视, 特别是对疼痛临床研究的随机方法、盲法、对照、疼痛评价方法的客观化、中药制剂的成分组成说明、须知情同意的伦理问题及人体试验审查委员会的批准等, 以便中医药治疗癌痛早日得到国际医学界的认可并推广应用.

■同行评价
本文内容新颖, 论据充分, 分析很有深度, 是一篇很难得的论文.

便把研究信息完整报道. 另外关于药物组成和制剂的含糊表达, 可能是考虑个人知识产权的问题. 还有关于知情同意的伦理问题及人体试验审查委员会(human research ethic committee or institutional review board)的批准在文章中未提及几乎是个普遍性问题. 目前在西方进行临床人体试验都须通过研究单位的人体试验审查委员会的审查. 无此程序的临床实验课题是无资格取得政府研究资金的, 其研究结果也不被医学杂志所接受. 因此, 要提高临床研究的质量, 进一步完善相关法律法规也是非常重要的.

诚然, 我们现在是用西医西药的研究方法来分析中医药临床研究. 应该说, 中医和西医是两种完全不同的理论体系, 中医药研究有其特殊性, 如个体化治疗和辩证论治等, 生搬硬套西医的研究方法不一定合适. 但是, 有些研究方法是相通的, 比如随机和盲法等. 无论西药还是中药研究, 都需要避免人为主观因素或偏倚, 而且是完全可以. 随着对中医理论的深入理解以及科学技术的发展, 相信今后能有更适于中医中药的研究方法和评价方法的出现. 同时中医药临床工作者将更重视研究的临床报道, 真正反映出中医药的科学价值和实用价值.

致谢: 感谢中国人民解放军第二军医大学和长征医院对许玲留学美国及完成该论文的支持!

4 参考文献

1 Schaffer D, Florin T, Eagle C, Marschner I, Singh G, Grobler M, Fenn C, Schou M, Curnow KM. Risk of serious NSAID-related gastrointestinal events during long-term exposure: a systematic review. *Med J Aust* 2006; 185: 501-506
2 Lapeyre-Mestre M, de Castro AM, Bareille MP, Del Pozo JG, Requejo AA, Arias LM, Montastruc JL, Carvajal A. Non-steroidal anti-inflammatory drug-related hepatic damage in France and Spain: analysis from national spontaneous reporting systems. *Fundam Clin Pharmacol* 2006; 20: 391-395
3 Chan FK. Primer: managing NSAID-induced ulcer complications--balancing gastrointestinal and cardiovascular risks. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 563-573
4 Schneider V, Levesque LE, Zhang B, Hutchinson T, Brophy JM. Association of selective and conventional nonsteroidal antiinflammatory drugs with acute renal failure: A population-based, nested case-control analysis. *Am J Epidemiol* 2006; 164: 881-889
5 Goldstein FJ. Adjuncts to opioid therapy. *J Am Osteopath Assoc* 2002; 102: S15-21
6 Gagnier JJ, DeMelo J, Boon H, Rochon P, Bombardier C. Quality of reporting of randomized controlled trials of herbal medicine interventions. *Am J Med* 2006; 119: 800.e1-11
7 陈树泉, 王兆香, 赵守荣, 王达, 李增云. 康复止痛膏治疗癌性疼痛的临床和实验研究. 山东中医杂志 2001; 20: 332-333
8 孙玉冰, 周亦农, 张诚光, 李霞. 癌痛宁散外敷治疗癌性疼痛45例. 中医药学刊 2005; 23: 728-729
9 嵇玉峰, 黄金活, 梁洪江, 李金昌, 王书浩, 李大鹏, 张华. 麝冰膏外敷治疗肝癌疼痛26例临床观察. 江西中医学院学报 2005; 17: 31-32
10 李永浩. 双柏散外敷治疗肝癌疼痛疗效观察. 中医外治杂志 2004; 13: 26-27
11 万冬桂, 李佩文. 痛块消巴布剂治疗癌症疼痛的临床研究. 中国中医药信息杂志 2005; 12: 68-69
12 寇胜玲, 薄丽亚, 李自朋, 王建清. 元麝止痛液治疗癌性疼痛38例临床观察. 中国中医急症 2003; 12: 421, 432
13 刘召苓, 徐梅, 郑丽. 中药涂搽配合放射治疗癌性骨转移疼痛疗效观察. 中国中医急症 2006; 15: 142
14 和劲光. 中药止痛膏配合放射治疗癌性骨转移疼痛33例. 山东中医杂志 2005; 24: 20-21
15 曹建雄, 许桂英. 壮骨止痛散联合西药治疗骨转移性癌痛41例疗效观察. 中国中医药科技 2006; 13: 48-49
16 石海澄, 刘绪银, 石凯歌, 黄笃高. 癌痛宁治疗恶性肿瘤疼痛90例临床观察. 中医药导报 2005; 11: 21-22
17 吴勉华, 周学平, 程海波, 周红光, 周仲瑛, 王瑞平, 许尤琪, 葛信国. 癌痛平胶囊治疗癌性疼痛的临床研究. 中国中西医结合杂志 2005; 25: 218-221
18 李洪亮, 郝民安, 王宝太, 白亮. 藏药独一味对癌痛的镇痛作用. 河北医药 2002; 24: 146-147
19 张明. 复方马钱子胶囊治疗癌性疼痛的疗效观察. 上海中医药大学学报 2001; 15: 31-32
20 陈长怀, 孙桂芝, 唐文秀, 李佩文, 张灿珍, 吕任齐, 高越, 马惠兰, 陈玮. 桂参止痛合剂治疗癌性疼痛临床观察. 中国新药杂志 2000; 9: 196-200
21 马廷行, 李晓丽, 宋振华, 余昆. 加味保安颗粒治疗胃癌疼痛的临床研究. 肿瘤防治杂志 2003; 10: 297-299
22 林东, 李芳, 陈立生, 林汉森, 陈英斌. 加味拈痛胶囊治疗癌性疼痛30例疗效观察. 新中医 2001; 33: 18-19
23 魏琳, 杨晨光, 苗文红. 天蟾胶囊治疗癌性疼痛Ⅱ期临床研究. 中国新药杂志 2003; 12: 663-665
24 金始宇, 葛日光, 全秀莲, 曲贵民. 复方苦参注射液在老年肺癌性疼痛中的应用. 中国误诊学杂志 2004; 4: 1675-1676
25 王正艳, 孙洪杰. 复方苦参注射液治疗癌症疼痛的临床观察. 上海中医药杂志 2004; 38: 19
26 安煜致, 王新华. 复方苦参注射液治疗晚期肿瘤56例. 上海中医药杂志 2003; 37: 15-16
27 庄国芳, 顾炳岐. 复方苦参注射液治疗中、晚期恶性肿瘤临床观察. 上海医药 2006; 27 : 323-324
28 刘云霞, 匡唐洪, 蒋沈君. 华蟾素注射液改善晚期癌症患者生活质量的临床观察. 中国中医药科技 2005; 12: 45-46
29 施俊, 许玲, 魏品康. 华蟾素注射液穴位注射治疗肿瘤疼痛17例临床观察. 中国中西医结合杂志 2002; 22: 121
30 王裕环, 韩辉, 付君, 徐玉梅. 康莱特与化疗或放疗合用治疗晚期癌症的临床效果观察. 肿瘤防治杂志 2002; 9: 340-341
31 罗智辉, 孔令言. 康莱特注射液改善晚期食管癌患者生活质量的临床观察. 肿瘤防治杂志 2001; 8 : 418-419
32 曾家耀, 兰碧洋, 李振洪, 黄绍华, 黄显实, 罗强, 农文伟, 钟醒能. 岩舒(复方苦参注射液)联合化疗治疗胃肠道恶性肿瘤的临床观察. 广西医学 2003; 25 : 1657-1658
33 官成浓, 蔡良真, 岳利群, 张英. 岩舒注射液配合化疗治疗晚期原发性肝癌的临床研究. 中国中药杂志 2006; 31: 510-512
34 罗健, 林洪生, 刘淑俊, 王禹堂, 唐劲天, 朱允中, 储大

同. 岩舒注射液治疗癌症疼痛IV期临床研究. 湖南中医学院学报 2003; 23: 40-42, 50
35 王瑞平, 杨文娟. 辛香止痛剂治疗癌性疼痛疗效观察. 中医研究 1997; 10: 37-39
36 田华琴, 黄志庆, 梁贵文, 陈卫军. 癌理通外敷治疗癌性疼痛60例. 陕西中医 2004; 25: 232-235
37 孙金芳, 芦连菊, 臧建华, 荆振海. 痛舒膏外敷治疗癌性疼痛临床观察. 中国中医药信息杂志 2006; 13: 56
38 杨学峰, 陈玉英. 中药涂布剂治疗癌性疼痛68例. 中国民间疗法 2003; 11: 24-25
39 袁明, 黄桂林, 边文贵, 邹楠. 癌痛围腰带治疗肝癌癌性疼痛的临床观察. 四川中医 2005; 23: 49-50
40 陈孟溪, 黄立中, 何英红, 张红, 曹建雄. 复方蟾酥散外敷治疗癌痛60例临床观察. 湖南中医学院学报 2004; 24: 37-39
41 贾英杰, 刘晏, 孙一予, 陈军, 贾彦焘, 窦志英. 化坚拔毒膜治疗中度癌痛80例临床观察. 天津中医学院学报 2002; 21: 11-12
42 陈康成. 失痛汤治疗消化道癌痛73例. 中国中医急症 2004; 13: 846
43 高同军, 史鹤玲, 刘哲, 徐丽琰, 张新勇, 唐俊舫, 孟弃逸. 康赛德止痛汤治疗癌性疼痛临床观察. 结合病与胸部肿瘤 1998; 1: 18-21
44 陈高阳, 刘延庆, 高鹏, 邰亚宏. 中药止痛胶囊治疗癌性疼痛25例临床研究. 江苏中医药 2005; 26: 16-17
45 马茉莉. 帕米磷酸二钠联合参附注射液治疗多发性骨髓瘤骨痛临床观察. 中国中西医结合杂志 2004; 24: 67-68
46 Zhang T, Ma SL, Xie GR, Deng QH, Tang ZZ, Pan XC, Zhang M, Xu S. Clinical research on nourishing yin and unblocking meridians recipe combined with opioid analgesics in cancer pain management. *Chin J Integr Med* 2006; 12: 180-184
47 Lin JJ, Jin CN, Zheng ML, Ouyang XN, Zeng JX, Dai XH. Clinical study on treatment of primary hepatocellular carcinoma by Shenqi mixture combined with microwave coagulation. *Chin J Integr Med* 2005; 11: 104-110

编辑 何燕 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007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2006年影响因子0.373

本刊讯 2006年世界华人消化杂志的总被引频次为1855, 位居全部1723种中国科技论文统计源期刊的第104位, 内科医学类28种期刊的第7位. 2006年世界华人消化杂志的影响因子为0.373, 内科医学类28种期刊的第21位. 即年指标0.134, 他引率0.71, 地区数27, 基金论文比0.42, 海外论文比0.02, 学科影响指标 0.50. (总编辑: 马连生 2007-11-15)

世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com
世界华人消化杂志 2007年12月18日; 15(35): 3770-3773
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

会议纪要 MEETING MINUTES

首届海峡两岸消化论坛获得圆满成功

胡益群, 任建林, 刘 明, 陈建民, 王 琳, 司丽娟, 叶震世, 董 菁, 陈立刚

首届海峡两岸消化论坛由福建省医学会、消化病学分会、消化内镜学分会、肝病学分会主办, 厦门市医学会、厦门大学附属中山医院, 厦门大学消化疾病研究所, 厦门市消化疾病诊治中心承办, 哈佛大学麻省总医院、香港大学玛丽医院、北京协和医院、台湾中山医学大学附设医院、台湾高雄医学大学附设医院、澳门镜湖医院、上海交通大学仁济医院、上海交通大学瑞金医院、北京解放军总医院、武汉大学人民医院等多家医院以及中华消化杂志、中华消化内镜杂志、胃肠病学、世界华人消化杂志协办.

胡益群, 任建林, 刘明, 陈建民, 王琳, 司丽娟, 叶震世, 董菁, 陈立刚, 厦门大学附属中山医院消化内科, 厦门大学消化疾病研究所, 厦门市消化疾病诊治中心 福建省厦门市 361004
通讯作者: 任建林, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科 厦门市消化疾病研究所.
jianlinr@msn.com
电话: 0592-2993170
收稿日期: 2007-11-20 修回日期: 2007-12-18

首届海峡两岸消化论坛于2007-11-17/2007-11-18在美丽宜人的鹭岛城市-厦门成功举行. 共有来自大陆、台湾、香港及澳门等两岸四地的消化领域专家、学者500余名代表参加了此次盛会, 此次会议是迄今为止海峡两岸之间举办的规模最大的一次消化疾病领域学术交流活动.

莅临本次会议的专家有中国工程院院士, 中华医学会消化病学分会主任委员, 第四军医大学校长樊代明教授; 中华医学会消化病学分会名誉主任委员、北京大学第三医院消化中心林三仁教授; 中华医学会消化内镜学分会主任委员, 第二军医大学长海医院内科学与野战内科学教研室主任兼消化内科主任李兆申教授; 中华医学会肝病学分会主任委员, 亚太地区肝病学会(APASL)、美国肝病学会(AASLD)、欧洲肝病学会(EASL)会员, 首都医科大学北京友谊医院肝病中心主任贾继东教授; 英国皇家内科医学院院士, 英国爱丁堡皇家内科医学院荣授院士, 英国伦敦皇家内科医学院荣授院士香港大学玛丽医院消化病研究中心主任王振宇教授; 香港大学玛丽医院消化病研究中心内视镜中心吴马太教授; 台湾内视镜学会秘书长台大医院胃肠内科王秀伯教授; 高雄医学大学附设医院胃肠内科主任, 高雄医学大学附设医院内视镜检查中心主任吴登强教授; 台湾中山医学大学附设医院小儿外科主任巫堂鑾教授; 中华医学会消化内镜学分会副主任委员, 南方医科大学附属南方医院消化疾病研究所所长姜泊教授; 澳门镜湖医院消化内科组组长, 澳门镜湖医院内窥镜中心主管李婺芳教授等特邀专家参加了此次盛会. 另外来自海峡两岸和港澳地区及其他部分亚太地区的50余位消化病学、肝脏病学及消化内镜方面的知名专家出席本次医学盛会.

经过紧张的筹备, 海峡两岸消化论坛于2007-12-17正式开幕. 会议由厦门大学附属中山医院消化内科主任任建林教授主持, 厦门大学附属中山医院院长王效民首先致欢迎词, 他对远道而来的朋友表示热烈欢迎, 厦门市副市长郭振家先生, 厦门大学医学院院长刘祖国教授代表厦门市、厦门大学对本次大会的成功召开表示祝贺, 并高度赞扬海峡两岸消化论坛召开的历史与现实意义. 来自香港、台湾、澳门与会嘉宾也分别发言, 感谢厦门大学附属中山医院举办的此次学术盛会, 不仅为两岸四地的医学专家提供了交流的平台, 而且促进了大陆、香港、台湾及澳门医学领域的联系与友谊, 并为将来的相互交流、共同发展提供了机遇.

开幕式后的高峰论坛上, 首先由樊代明教授进行了主题为“生命科学3000年”的主题演讲, 他回顾了人类医学科学3000年的历史与变迁, 总结了中华民族生命科学由盛到衰, 而后重新崛起的历程和经验, 提出了生命科学由微观到宏观, 由局部到整体思维转变的重大意义, 从战略的高度对医学的理念进行阐释说明, 并对医学的发展前景进行前瞻, 其独特的思维、诙谐的语言、深入浅出的讲解受到了与会学者高度的评价.

随后吴登强教授做了主题为“胃干细胞的新发展”的精彩报告. 干细胞的研究目前为世界医学界研究热点, 近年来虽然干细胞的研究已有许多重要的发现与进展, 但要确认真正的干细胞仍很困难. 由于胃干细胞目前并无特异的细胞标志, 研究人员仍无法明确定义出人类或动物胃干细胞, 故对之进行体外分离更加困难. 吴登强教授领导的科研团队经过艰苦努力, 在人类胃干细胞的分离上有了显著的突破. 医学界认为胃癌组织的形成可能来自胃上皮干细胞的特化, 吴登强教授胃干细胞的研究成果对将来利用胃干细胞来探讨胃致癌机制具有重大意义.

肝炎病毒的感染尤其是乙型肝炎的问题一直我国医学界关注的焦点. 此次会议由贾继东教授给与会者带来了“中国病毒性肝炎流行病学与治疗现状”主题报告. 报告中分析了中国大陆病毒性肝炎尤其是乙型肝炎和丙型肝炎的诊治现状. 他指出我国是一个乙型肝炎感染大国, 因此非常重视乙型病毒性肝炎的防治工作, 采取了以乙肝疫苗接种为中心的综合预防措施, 经过多年努力终于取得了长足进步. 目前乙型肝炎病毒发病率及感染率呈现逐年下降趋势, 特别是新生儿感染率下降尤其显著. 他总结指出, 虽然肝炎防治和研究工作仍任重道远, 面临诸多困难, 但经过医学科学工作者的不懈努力, 目前以乙型肝炎为主的肝炎防治工作已经曙光初现, 前景光明. 贾教授的讲话为与会学者尤其是致力于传染病学防治工作的工作者带来了极大的鼓舞, 与会学者相信经过不懈的努力, 战胜乙型肝炎为主的肝炎病毒的希望前景光明.

随着人们生活水平的提高, 胆胰肿瘤的发病率逐年提高, 为此李兆申教授就胆胰肿瘤介入治疗做了“胆胰肿瘤介入治疗现状及展望”专题报告, 李兆申教授指出, 近年来, 随着内镜和放射介入技术的不断发展, 介入治疗已经成为一个介于传统内科学和外科学之间的临床治疗体系, 具有安全、简便、并发症低等优点. 肿瘤介入治疗是在不同医学影像的引导下利用微创的方法对肿瘤进行物理性、机械性或化学性的治疗, 其治疗手段多种多样, 肿瘤介入治疗不仅是为了达到延长患者带瘤生存期、提高生活质量的目的, 还力争实现治愈肿瘤的目标. 目前以内镜技术为代表的介入治疗在胆胰肿瘤治疗中作用也越来越大, 逐渐被临床工作广泛应用, 我们有理由相信胆胰肿瘤介入的推广展开, 会对胆胰肿瘤患者带来更多的选择和更大的生存希望.

2007-11-17下午的会议中, 林三仁教授做了题为“Barrett'食管诊断要点”的报告. 他通过对国内外研究进展的总结与归纳, 结合临床实际, 对临床工作中Barrett'食管的诊断要点做了充分讲解, 对临床医师内镜下Barrett'食管的诊断要点作出了诠释. 他的专题图文并茂, 讲解深入浅出, 不仅回答了临床医生诊断急需解决的问题, 而且对Barrett'食管的治疗有极大的帮助, 他的演讲受到了与会代表的热烈响应.

胃肠动力一直是胃肠病学的重点与难点, 罗金燕教授为我们带来了“FGIDs药物治疗现状与进展概况”主题报告, 她总结了了FGIDs药物治疗当前存在的问题, 并对FGIDS药物进展与希望做了充分的说明. 她提出FGIDs的药物学和基因易感性的研究是目前功能性胃肠病研究的热点, 也是胃肠病学颇受关注的领域, 她指出尽管FGIDs和发病机制是多因素的, 但其神经胃肠学的病理生理机制是属运动感知障碍性疾病, 也是当前和未来药物治疗学发展的主要焦点. 随着人类基因组的解密和神经胃肠病学的飞速发展, 治疗FGIDs, DGIMs药物已进入了基因药物时代, 相信更具有靶向作用的药物, 会给这些患者带来福音. 罗教授的演讲使我们对胃肠功能性疾病的发展与现状有了充分的了解, 使大家受益匪浅.

中风患者的进食困难是临床工作常常遇到棘手的问题, 处理不当常常带来一系列不良后果. 吴马太教授结合临床实际, 为与会代表介绍了对中风导致吞咽困难的患者处理办法和原则. 对这些患者, 通过鼻饲和经皮胃造瘘营养供给成为有效选择, 但这些方法引起的一些问题、解决的办法, 以及这些方法的长期使用带来的后果, 很多医师还不是很熟知. 吴马太教授结合国外同行的经验对这些问题一一做了详细的介绍, 与会代表反映强烈, 都认为吴教授的专题对临床工作有重要的指导意义.

幽门螺旋杆菌与胃疾病的关系问题一直是人们关注的问题. 王振宇教授向大家介绍了*H pylori*的根除对胃癌预防作用的最新研究成果. 他认为胃癌目前是人类主要的死因之一, 慢性*H pylori*的感染是胃癌发生的危险因素, 因此*H pylori*相关胃炎的治疗以及*H pylori*相关的肠上皮化生处理能否逆转癌前病变从而减少胃癌的发生, 成为目前国内外学者非常关注的焦点问题, 王振宇教授通过对国内长达10余年的随访调查结果研究认为, *H pylori*相关胃炎的患者通过抗*H pylori*治疗, 可以预防胃癌的发生. 国外研究显示抗*H pylori*治疗对具有癌前期病变的患者有益. 因此王振宇教授认为抗*H pylori*治疗对防治胃癌的发生有效, 而对无癌前病变的人益处更大. 这些成果无疑会对*H pylori*治疗与研究工作的深入具有巨大的推动作用.

三叶肽与胃癌的相关研究是消化领域的新热点, 任建林教授介绍了他带领的团队在胃黏膜病变、三叶肽、胃癌基础

此次大会共有来自大陆、台湾、香港及澳门等两岸四地的消化领域专家、学者500余名代表参加了此次盛会, 另外来自海峡两岸和港澳地区及其他部分亚太地区的50余位消化病学、肝脏病学及消化内镜方面的知名专家出席本次医学论坛.

大会上, 50名消化病学、消化内镜权威专家就酸相关疾病、功能性胃肠病、幽门螺杆菌、消化系统肿瘤、各类肝病、胆胰疾病、消化内镜等领域的最新进展和发展动态作出了精彩的报告. 世界华人消化杂志(*WCJD*)科学编辑程剑侠也应邀参加了此次论坛.

与临床方面的相关研究. 结果表明三叶肽与胃癌的发生、发展、浸润、转移密切相关.

缺血性结肠炎是临床上诊断与治疗的难点. 来自澳门镜湖医院的李婺芳教授通过27例缺血性结肠炎的内镜及临床特点总结显示: 缺血性结肠炎好发于50岁以上老年人, 以动脉硬化所致者多见. 常合并基础病, 以腹痛、血便及腹泻为主要表现. 内镜下病变多位于左半结肠, 黏膜呈水肿充血、糜烂出血、坏死及溃疡, 早期结肠内镜检查是诊断之主要方法. 其转归之优劣关键在于早期诊断、正确治疗及控制基础病, 这些调查结果可以加强临床医生对缺血性结肠炎的正确认识, 提高早期诊断水平, 为缺血性结肠炎患者带来福音.

2007-11-18的会议分为2个分会场, 在白鹭洲酒店的分会场讲座主要以肝胆腺疾病的诊治进展为主题展开. 首先由唐承薇教授对生长抑素预防和治疗重症胰腺炎基础研究做出了精彩的讲解, 使大家对生长抑素预防和治疗重症胰腺炎的机制有了更深入的认识, 从循证医学的角度对生长抑素预防和治疗重症胰腺炎给予充分的肯定. 王兴鹏教授, 郭晓钟教授分别向大家介绍了胰腺癌浸润转移机制最新的认识, 即“胰腺星状细胞与胰腺癌细胞的相互作用”和“胰腺癌的治疗进展”专题. 他们认为, 胰腺星状细胞与胰腺癌细胞相互作用是导致胰腺癌浸润转移的主要原因之一, 并对此机制进行了详细的论证. 此学说的提出使我们对胰腺癌浸润转移的机制有了更深入的认识. 江家骥教授对抗乙肝病毒治疗与免疫重建的关系进行了诠释. 他认为HBeAg与HBV的感染、复制及装配等过程无关, 可诱导抗原特异性T细胞耐受, 帮助HBV逃避宿主免疫攻击, HBeAg诱导抗原特异性T细胞耐受的机制主要有克隆清除、克隆失能及克隆忽略等, 抗病毒治疗可抑制病毒复制及表达, 降低病毒血症和抗原血症, 减轻病毒对宿主免疫系统的压力, 帮助宿主打破耐受, 重建抗HBV特异性免疫应答. 抗病毒治疗增强免疫应答的时间并不能持久, 核苷(酸)类似物/疫苗联合疗法可能是一个有前景的临床CHB治疗方案. 金震东教授和王秀伯教授结合自己的工作, 对超声内镜临床应用现状与前景进行了充分的演示与说明, 为我们揭示超声内镜广阔的临床用途与发展空间. 姜泊教授也在会议上为我们展示了内镜下对大肠癌早期诊断的最新研究进展. 使在座的学者尤其是内镜医师收获颇多. 生物活性食物成份预防大肠癌是一个全新的话题, 房静远教授就此作了一个令各位代表耳目一新的精彩报告. 在金雁酒店的分会场, 主要以胃食管反流病、胃肠动力性疾病、小肠疾病内容为主题内容展开, 袁耀宗教授为我们讲解中华医学会消化病学分会动力学今年7月份根据1995年美国胃肠病学会发表的胃食管反流病(GERD)诊治指南及1999年和2005年两次更新内容, 以及2003年新加坡亚太地区消化疾病周通过的亚太地区对GERD诊治共识内容, 结合国内外有关文献, 经反复讨论提出我国胃食管反流病治疗共识意见, 使与会代表了解了我国胃食管反流病治疗目标、治疗措施和治疗目的, 为胃食管反流病的诊治工作提供了明确的理论指导. 陈安安副教授为我们讲解了功能性便秘的原因, 如肠道敏感性降低、大脑皮层活动下降等, 以及针对不同原因治疗应对策略. 智发朝教授为我们阐述了小肠疾病的诊治进展方面的内容. 智教授指出, 长期以来, 由于小肠特殊的解剖结构和有效检查手段的缺乏, 使小肠疾病的临床诊疗比较困难, 随着各种内镜技术的发展, 特别和影象技术结合, 使小肠疾病的诊疗水平明显提高, 胶囊内镜和CT或MRI仿真内镜的应用, 尤其双气囊内镜的应用及软硬镜结合, 将会使小肠疾病的诊断率明显提高.

2007-11-18的会议上, 张万岱教授做了主题为“胃癌前病变的诊治进展”的报告. 胃癌前病变的研究是目前胃癌防治研究中最为活跃的领域, 存在着许多未解决的问题. 张教授就胃癌前病变向胃癌转化的因素、癌前病变与胃癌的关系等问题做了详细的阐述. 他认为通过可靠、有效的切入点对IM、ATP等胃癌前病变进行阻断和干预治疗, 阻止癌变发生, 可以使胃癌发病率和死亡率不断下降, 对胃癌前病变的深入研究意义重大, 为人类攻克肿瘤作出应有的贡献. 刘新光教授从特定的角度对IBS和IBD这两种疾病共同的临床特征进行了分析, 他认为IBS和IBD可能具有相同的病理生理学机制, 包括黏膜通透性改变、肠道菌群改变与黏膜免疫间的相互作用、持续存在肠道黏膜免疫激活、肠道动力改变及生活应激影响临床症状等. 他的观点独特, 为我们从不同的角度对IBS和IBD的关系有了更加深入的认识. 刘明教授为我们展示了消化内镜在消化道穿孔缝合中的应用. 消化道穿孔的治疗往往认为是外科医生的领域,

消化内镜的进展使消化道穿孔有了更多的治疗选择, 其内容让大家耳目一新; 余汉濠主任医师为我们带来了胃石的非常规治疗方法-N-乙酰半胱胺酸及可乐联用疗法. 余汉濠医师研究发现, 通过对2例患者胃石患者先予N-乙酰半胱胺酸口服治疗可部份溶解胃石, 再给予Coca-Cola治疗可使胃石消失. 其方法新颖, 疗效显著, 使胃石治疗有了更加有效而又风险较小的方法, 受到大家的好评. 此外, 厦门大学附属中山医院消化科陈建民教授、王琳教授、司丽娟教授、董菁副教授还就超声内镜介入治疗、功能性胃肠病、胆胰内镜、HBV与HCC的相关研究作了精彩报告.

首届“海峡两岸消化论坛”历时2 d, 于2007-11-18晚落下帷幕. 任建林教授对会议进行了总结, 他指出在2 d的时间里, 与会专家就胃酸相相关疾病、功能性胃肠病、幽门螺杆菌、消化系统肿瘤、各类肝病、胆胰疾病、消化内镜等领域的最新进展和发展动态进行了广泛的交流. 海峡两岸四地专家还分别介绍各自对目前消化病学热点和焦点的研究成果和认识, 交流两岸四地在消化病学和消化内镜方面应用新技术和新疗法方面的经验. 此次会议为海峡两岸和港澳消化病学专家学者搭建一个沟通、交流、学习和切磋的平台, 圆满达到了提高两岸四地消化系统疾病的诊治水平、加强两岸四地学者相互交流的目的, 是一次高水平学术盛会.

消化系统疾病一直是影响人类生存质量的主要疾病, 特别是消化系统肿瘤严重威胁人类健康. 加强学术的交流与合作、提高诊疗水平. 解决临床实际工作中的难点问题, 一直是我们共同面对的课题, 此次消化论坛的圆满召开, 对未来消化病诊疗的发展方向提出了很多新的看法和见解, 对消化疾病诊疗的进展和理念进行了充分的交流和诠释, 也为将来的两岸四地医学界相互协作与交流打下了坚实的基础. 此次消化论坛的是一次学术的盛会, 也是一次交流的盛会, 不仅促进我国消化领域的整体水平, 而且为中华民族生命科学的复兴做出了自己独特的贡献.

本届论坛由海峡两岸的专家重点对目前消化病学的热点和焦点分别介绍了各自的研究成果, 交流了两岸在消化病学和消化内镜方面应用新技术和新疗法的经验. 此次消化论坛是一次学术的盛会, 也是一次交流的盛会, 提高了两岸四地消化系统疾病的诊治水平, 促进了我国消化领域的整体水平.

编辑 李军亮 电编 李军亮

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界华人消化杂志》简介

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 国际标准刊号ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的大型综合性消化病学类学术期刊. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号.《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量, 对所有来稿均进行同行评议, 是一份被中国科技论文统计源核心期刊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》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录.《世界华人消化杂志》综合介绍消化病学前沿基础与临床研究的发现, 覆盖消化病学领域中经临床实验证明的技术进展. 从1993-2007《世界华人消化杂志》发表的文章可以在线http://www.wjgnet.com免费阅读全文.《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容: 消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊.《世界华人消化杂志》开通了http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx在线办公系统, 实现了在线投稿和审稿等功能.

• 致谢 •

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!

程爱群 主任医师
上海华东医院普外科

崔云甫 教授
哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科

范志宁 主任医师
南京医科大学第二附属医院内镜中心

龚建平 教授
重庆医科大学附属第二医院肝胆外科

巩鹏 副教授
大连医科大学附属第一医院普外二科

韩天权 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科、上海消化外科研究所

黄金华 副教授
广州市中山大学肿瘤医院影像介入科

李定国 教授
上海交通大学医学院附属新华医院消化内科

李国威 教授
西安交通大学医学院第二附属医院普通外科

李涛 主治医师
北京大学人民医院肝胆外科

梁力建 教授
广州市中山大学附属第一医院肝胆外科

刘宝瑞 教授
南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心

刘绍能 主任医师
中国中医科学院广安门医院消化科

刘颖斌 副教授
浙江大学医学院附属第二医院外科

宁琴 教授
武汉市同济医院感染科

牛建昭 教授
北京中医药大学细胞生物化学实验室与中加抗纤维化研究中心

欧希龙 副教授
东南大学中大医院消化科

沈柏用 副教授
上海市交通大学医学院附属瑞金医院肝胆胰外科中心

孙殿兴 主任医师
石家庄市白求恩国际和平医院肝病科

唐晓鹏 教授
中南大学肝病研究所/中南大学湘雅二医院感染科

田晓峰 教授
大连医科大学附属第二医院普通外科

王晓艳 副教授
中南大学湘雅三医院消化内科

闻勤生 教授
第四军医大学唐都医院消化内科

吴泰璜 教授
山东省立医院肝胆外科

宣世英 主任医师
青岛市市立医院肝病科

严以群 教授
上海第二军医大学附属东方肝胆外科医院肝外一科

张青云 研究员
北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院检验科

张晓岚 教授
河北医科大学第二医院消化内科

张占卿 主任医师
上海市(复旦大学)公共卫生中心

朱春兰 主任医师
黑龙江省医院附属消化病医院消化二科