

我国轻微型肝性脑病的研究现状

贾林

贾林, 广州市第一人民医院消化内科 广东省广州市 510180
贾林, 男, 1964-11-05 生, 河南省方城县人, 汉族. 广州市第一人民医院消化内科主任医师, 硕士生导师, 先后承担广东省和广州市科研基金 5 项, 获广东省和广州市科技成果奖逾 10 项.
项目负责人: 贾林, 510180, 广东省广州市盘福路 1 号, 广州市第一人民医院消化内科. gzjalin@hotmail.com
电话: 020-81628877 传真: 020-81628809
收稿日期: 2004-03-16 接受日期: 2004-04-20

摘要

我国轻微型肝性脑病(MHE)在流行病学、诊断学、治疗学、预后学和中西医结合研究等方面获得重要进展. 我国学者把 MHE 病因从肝硬化拓展至各种类型的急、慢性肝病, 1991/2003 年国内资料显示, 肝硬化 MHE 发生率为 38.8-85.0%, 肝功能衰竭(未合并肝硬化)和慢性重症肝炎分别为 75% 和 55%, 晚期血吸虫病为 32.0%, MHE 发病率差异较大的原因可能与病例选择(病因和病情程度)、样本数、诊断手段、正常值及其是否年龄校正等因素有关. 数字连接试验、智力检测和脑诱发电位为常用诊断方法, 各有优缺点, 多种指标联用可提高诊断率, 因缺乏 MHE “诊断金标准”的精细定义, 导致诊断方法的特异性和敏感性难以确定, MHE公认的诊断标准也未达成共识, 目前仍多把智力检测及脑诱发电位二项之一异常或二项均异常定为 MHE 诊断标准, 确立统一和标准化的、且行年龄校正的诊断指标及诊断标准至关重要. 乳果糖和乳梨醇仍为公认的 MHE 经典药物. 随访研究发现 MHE 患者如未行干预治疗, 约 40% 智能进一步衰退, 在半年内恶化为 HE; 乳果糖短程疗法只能暂时改善患者智能和生活质量, 却不能改善自然病程, 半年内有 30% 发展为 HE; 长程维持治疗则能显著减慢这种转化趋势, 半年 HE 发生率减至 5%, 乳果糖长程疗法为较理想的 MHE 治疗方案, 但胃肠道副反应限制了临床推广. 微生态制剂高效低毒, 有望成为乳果糖的替代方法. 中西医结合治疗也具有良好前景.

贾林. 我国轻微型肝性脑病的研究现状. 世界华人消化杂志 2004;12(6): 1261-1263
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1261.asp>

0 引言

轻微型肝性脑病(minimal hepatic encephalopathy, MHE) 主要意指某些肝病患者缺乏临床常规手段可检测的大脑功能失调, 但具有可计量的智力检测和脑诱发电位异常, 过去多被称为亚临床型肝性脑病(SHE)^[1-2]. HE 最新共识认为 SHE 和 MHE 为概念不同的两个术语, 前者重在区别“临床肝性脑病”概念, 后者则侧重于

描述临床症状的轻重, 国内外学者建议将 SHE 更名为 MHE(本文把 SHE 统称为 MHE)^[1-5]. 1991 年许其增 et al^[6] 报道 MHE 以来, 我国 MHE 研究在流行病学、诊断学、治疗学、预后学和中西医结合研究等方面获得重要进展. 既往把 MHE 病因多局限于肝硬化, 近年来被我国学者拓展至各类急、慢性肝病, 尤其是肝硬化^[6-38]. 综述 1991-2003 年国内 MHE 发病学资料, 肝硬化 MHE 发生率为 38.8-85.0%^[6-21]; 肝硬化合并肝癌为 40.7%, 其中肝功能 Child A 级和 B 级分别为 25.5% 和 73.1%^[22]; 肝癌肝动脉化疗栓塞术后患者的发生率为 68.8%^[23]; 肝功能衰竭(未合并肝硬化)和慢性重症肝炎分别为 75% 和 55%^[24-26]. 湖北医科大学二院报道晚期血吸虫病的 MHE 发生率为 32.0%, 与肝硬化组(38.8%)无显著性差异^[27]; TIPS 相关性 MHE 只见个案报道^[28-29]. 各地 MHE 发病率差异较大, 可能与病例选择(病因和病情程度)、样本数、诊断手段、正常值及其是否年龄校正等因素有关, 如 NCT 和 DST 等不经年龄校正会导致 MHE “滥诊” 和发病率高估, 给患者带来不必要的心理负担和医治费用^[30]. 我院 1998/2002 年开展了一项以年龄校正 NCT 和 DST 为指标的多中心大样本调查, 发现肝硬化患者的 NCT, DST 和总异常率分别为 37.9%, 42.1% 和 51.3%, 其中 Child A, B 和 C 级异常率分别为 39.9%, 55.2% 和 71.8%, Logistic 回归分析提示肝功能评分为 MHE 发病的重要影响因素^[31], 与国内许多同行的结果一致.

1 MHE 的诊断

MHE 诊断方法包括智力检测、神经电生理和神经电心理、脑形态学检查 3 类, 他们的神经学基础不同, 不可相互代替, 依赖一种方法易造成临床漏诊^[18, 22].

1.1 智力检测 NCT 和 IQ 检测(韦氏成人智力量表)作为常用的智力检测方法, 肝硬化 MHE 检出率分别为 19.4-30.0% 和 58%^[13], 智力操作试验较言语检测更具诊断价值, 约 23.2% MHE 患者的操作 IQ 和 / 或总 IQ 值低于 85 分^[11]. 中山大学一院发现, NCT 单用的 MHE 检出率远低于全套 IQ, 联用 IQ 三项(木块图、图片排列和图形拼凑)则与全套 IQ 无异, 敏感性和特异性高达 87% 和 94%, 可代替全套 IQ 用于 MHE 诊断^[13]. NCT 方法简便可行、价廉和易复诊, 但特异性稍差, 具有学习效应和易受年龄、教育程度影响, 设计多套难度相同的 NCT、行年龄校正和联合其他智力检测可有效纠正上述不足^[15, 33]. 我院首次确定了年龄校正 NCT 和 DST 正常值, 并应用于流行病学调查和治疗学研究^[30-31].

1.2 神经电生理和神经电心理检测 包括脑诱发电位(EP)、脑电图(EEG)和脑地形图(BEAM)等，其中肝硬化患者的EEG和BEAM的联合异常率为75%^[34]，但EEG在敏感性和定量化方面低于BAEP^[9]。EP包括脑干听觉诱发电位(BAEP)、视觉诱发电位(VEP)和体感诱发电位(SEP)3种，BAEP，VEP，SEP和3项联合的肝硬化MHE检出率分别为25.0-48.3%，25.0-51.2%，41.3-43.0%和65.0-75.2%^[16, 21, 35]，高于NCT检出率，而且BAEP和SEP异常率随着肝病加重而逐渐增高，有助于MHE的预后判断^[21]。EP检测具有简便、无创伤、客观、可重复等优点，为MHE诊断敏感指标，但设备和价格因素严重影响患者复查和基层普及。浙江王波 et al^[36]报道事件相关电位P₃₀₀的MHE检出率为71.4%，显著高于BAEP(41.0%)和NCT(41.0%)，为迄今最敏感的诱发电位指标。

1.3 脑影像学检查 基于生化改变的神经影像技术(MRI, CT和PET)有助于MHE早期诊断和鉴别诊断，但国内仅见MRI弛豫时间及磁化转移计算方法的文献^[37]介绍。

总之，由于缺乏MHE“诊断金标准”的精细定义，导致诊断方法的特异性和敏感性难以确定，MHE公认的诊断标准也未达成共识，目前仍多把智力检测及脑诱发电位二项之一异常或二项均异常定为MHE诊断标准^[1, 5]，确立统一和标准化的、且行年龄校正的诊断指标及诊断标准至关重要。哈尔滨医科大学一院提出了MHE三级分级标准：智力检测、SEP和BEAM(广泛轻度异常)中任一项异常定为MHE一级；上述3项中任2项异常或BEAM呈广泛中度异常定为MHE二级；若3项均异常则为MHE三级^[32, 38]，该方案对患者预后判断和疗法选择的临床指导价值尚待进一步论证。

2 MHE的治疗学

2.1 疗效学指标 国外MHE治疗学常用门体性肝性脑病指数(PSE index)和诱发电位等指标，国内研究则多采用智力检测(NCT最常用)、诱发电位、脑电图和血氨等诸多指标的一种或多种组合，疗效指标的不统一导致结果难以比较^[39]。由于PSE index的5项指标相当繁琐，我院于1999年把脑诱发电位和NCT定为MHE简化疗效指标^[40]，并证实乳果糖可使简化疗效指标明显改善，总有效率达66.7%，MHE简化疗效指标具有良好的实用价值^[41]，但尚待进一步完善。

2.2 临床治疗 涉及不同疗法、临床疗效和副反应探讨等方面，治疗药物包括西药(乳果糖，乳梨醇，古拉定，纳洛酮，胞二磷胆碱)^[41-56]和中药(生白术颗粒、中药提取物水苏糖)^[57-58]，乳果糖治疗占大多数；除一篇随机双盲试验外^[42]，多为前瞻对照研究，尚无循证医学报道。研究一致表明，乳果糖和乳梨醇能显著改善MHE患者智能和脑诱发电位，改变自然病程，防止进一步发展为临床HE，为公认的MHE经典药物^[41-47]。我院进一步发现乳果糖短程治疗(8 wk)的疗效维持较短，停药后指标逐渐恶化，长程疗法(24 wk)可使血氨和智力指标持续

改善，防止SEP恶化和降低临床HE发生率，是迄今最有效的MHE疗法^[54-56]。恶心，腹部胀气和腹泻等副反应较为常见，乳果糖和乳梨醇的发生率分别为7.1-33.3%和31.3%，与乳果糖的剂量相关^[46-47, 53, 56]。长程疗法尽管采用小剂量乳果糖，仍有9.1%患者不能耐受腹泻而难以坚持治疗^[56]。微生态制剂高效低毒，国内仅见HE的临床和实验研究，尚未见MHE的临床报道。

2.3 实验研究 北京天坛医院李瑞军 et al^[52]首次把脑诱发电位应用于乳果糖对硫代乙酰胺(TAA)致兔HE/MHE模型的防治研究，发现乳果糖可显著降低血氨和改善兔体感诱发电位，惜未建立MHE模型和确立MHE的诊断标准。2004年，我院以BAEP为鼠MHE诊断指标，以正常组BAEP I波潜伏期均值±1.96标准差为MHE诊断标准，率先建立了小剂量TAA(200 mg/kg隔日腹腔内注射2次)致大鼠MHE模型^[59]，并证实微生态制剂金双歧(双歧杆菌，乳酸杆菌和嗜热链球菌三联活菌)能有效降低血氨和内毒素水平，改善肝脏病理，使MHE发生率由83.3%降至33.3%(降低了1.5倍)，有望成为乳果糖的理想替代物。

2.4 中西医结合治疗 MHE属中医郁症、失眠和便秘等范畴，为疫毒外邪侵袭，或情志饮食内伤，日久损及脾胃，精微失运而致心脾两虚，故应以补益心脾为主。河南杨守峰 et al^[57]发现单味生白术颗粒起效迅速，改善MHE患者智能和症状与乳果糖类似，在改善心烦、失眠方面则优于乳果糖。王灵台 et al^[60]报道清开冲剂同样具有降低MHE患者血氨，明显缩短NCT的作用。中药提取物水苏糖与乳果糖同属低聚糖分子，不被人消化酶分解和肠道吸收，通过酸化肠道、促进肠蠕动和双歧杆菌增长等机制，降低血氨和内毒素水平，与乳果糖一样对HE/MHE具有显著的防治价值^[58]。我院潘锦瑶 et al 发挥我国中医清肝开窍之优势，配制清肝醒脑汤，把清氨导泻的乳果糖与作用肝脏、大脑具有清肝解毒、开窍醒脑的中药相结合，旨在探索MHE的中西医结合治疗方案。

3 MHE的预后学

国内少见MHE自然病程和预后学研究报道。我院曾峥 et al^[54-55]对60例MHE患者的分组治疗和随访研究发现，20例MHE患者如未行干预治疗，有8例(40%)患者智能进一步衰退，在半年内恶化为HE；乳果糖的8 wk短程疗法只能暂时改善患者智能和生活质量，却不能改善自然病程，半年内有30%患者发展为HE；乳果糖的24 wk长程维持治疗则能显著减慢这种转化趋势，半年HE发生率减至5%，显著优于空白对照和短程治疗，因此推荐长期维持治疗方案。昆明医学院一院周曾芬 et al^[10]认为检测指标异常越多提示MHE的程度越重，若IQ, EP, BEAM等多项检测全部异常则提示重度MHE，常预示患者近期可能发生HE。哈尔滨医科大学一院(1995)把MHE粗分为I和II级，21例II级患者未经治疗，约76.2%患者于1 a内进展为HE^[38]，1997年

进一步细化 MHE 分级方案和应用于疗法选择, 认为一级无需治疗, 二级需严密观察或选择性治疗, 三级需按临床型 HE 治疗, 避免恶化为 HE^[32].

总之, 经过国内学者的 10 a 不懈努力, 中国 MHE 研究已从初始的诊断学、流行病学研究, 向临床治疗学、预后学等方面发展, MHE 已从一个单纯的医学概念上升为一个具有重要现实意义的社会问题, 其社会学意义已引起全社会的高度重视^[5]. 由于缺乏统一和标准化的 MHE 诊断指标和诊断标准、多数研究未考虑到 NCT 指标的学习效应、大多数智力指标未行年龄校正等因素, 直接导致了研究结果经不起同行论证而影响了成果推广. 因此, 参考国外 HE 最新共识^[1-4], 开展多中心大样本研究, 制订一套既符合我国国情, 又能与国际接轨的简便 MHE 诊断标准已成为当务之急, 有助于诊断学和治疗学的规范化研究及其研究结果的相互比较.

4 参考文献

- 1 贾林, 张美华. 肝性脑病的定义、命名、诊断和定量标准修订方案的新进展. 世界华人消化杂志 2003;11:2008-2010
- 2 贾林. 建议将亚临床型肝性脑病更名为轻微型肝性脑病. 世界华人消化杂志 2004;12:432-433
- 3 王宇明. 肝性脑病的最新共识. 中华肝脏病杂志 2003;11:261-364
- 4 肖扬, 陈成伟. 肝性脑病的新认识. 肝脏 2002;6:201-202
- 5 贾林, 李瑜元. 亚临床型肝性脑病. 中华内科杂志 1996;35:495-497
- 6 许其增, 洪一飞, 杨文英, 何利平, 周新民, 杨渤海, 雷旗. 肝硬化患者脑诱发电位检查的临床意义. 中华消化杂志 1991;11:80-83
- 7 朱权, 王明俊, 刘冰熔, 杨幼林. 亚临床肝性脑病的初步探讨. 中华消化杂志 1992;12:267-269
- 8 沈清燕, 易淑倩, 赵英恒, 熊希民, 陈敏. 亚临床型肝性脑病诊断的初探. 广州医学院学报 1994;22:41-44
- 9 杨文英, 许其增, 安榕榕, 谢雨觉. 脑诱发电位与脑电图对亚临床肝性脑病的诊断意义. 中华医学杂志 1994;74:699-700
- 10 周曾芬, 李桂萍, 刘文斌, 颜琳, 王云华, 贺英群. 亚临床肝性脑病的诊断探讨. 昆明医学院学报 1995;16:23-25
- 11 刘冰熔, 陈立杰, 邹颖秀, 赵艳红, 朱权, 王明俊. 亚临床肝性脑病患者智力功能的对照研究. 中国临床心理学杂志 1996;4:83-84
- 12 聂玉强, 李瑜元, 沙卫红, 曾峥, 胡中伟, 杨富英, 平丽, 贾林. 智力测验调查亚临床肝性脑病的发病. 中华消化杂志 2001;21:677-679
- 13 钟碧慧, 陈旻湖, 王锦辉, 袁育红, 胡品津. 数字连接试验对诊断亚临床肝性脑病的价值. 中华内科杂志 2001;40:13-15
- 14 钟碧慧, 王锦辉, 陈旻湖, 刘思纯, 袁育红, 胡品津. 脑诱发电位在诊断亚临床型肝性脑病的价值. 新医学 1999;30:564-565
- 15 叶瑞繁, 龚耀先. 神经心理学测验与亚临床肝性脑病的检测. 中国心理卫生杂志 2001;15:254-259
- 16 孙自勤, 王要军, 权启镇, 刘晓峰, 张志坚. 神经诱发电位对肝硬变患者亚临床肝性脑病的诊断意义. 新消化病学杂志 1994;2:217-218
- 17 王一林, 沈翠茹, 沈香春, 宋荣蓉, 段淑荣. 视觉诱发电位对亚临床肝性脑病的诊断价值. 哈尔滨医科大学学报 2000;34:65-66
- 18 石虹, 刘厚钰, 傅志君, 朱一皓, 刘天舒. 亚临床型肝性脑病智能测试与体表感觉诱发电位相关性的研究. 肝脏 1999;4:144-145
- 19 张干, 武爱云, 唐桂华. 亚临床肝性脑病的脑干听觉诱发电位研究. 安徽医科大学学报 1999;34:346-347
- 20 曹锐, 曾孝平, 李梦东. 肝硬变病人亚临床肝性脑病的发生及诊断. 解放军医学杂志 1997;22:202-203
- 21 李建生, 高雯, 段红阳, 李书鑫. 肝硬化患者亚临床肝性脑病的诱发电位检测. 胃肠病学和肝病学杂志 2000;9:221-222
- 22 李薇, 吴积炯, 李惠芳, 顾海蔚. 心理智能测验检测肝动脉化疗栓塞对肝癌合并肝硬化患者亚临床肝性脑病的影响. 胃肠病学 2000;5:46-48
- 23 马淑霞, 黄绥仁. 亚临床肝性脑病患者躯体感觉事件相关电位研究. 临床神经电生理学杂志 2002;11:155-157
- 24 张丽华, 崇雨田, 庄鹏, 张伟东, 梅咏予, 舒欣. 数字连接试验等对亚临床肝性脑病诊断的意义. 中华肝脏病杂志 2003;11:198
- 25 张丽华, 崇雨田, 庄鹏, 张伟东, 梅咏予, 舒欣. 肝功能衰竭患者亚临床肝性脑病发生情况的探讨. 中国现代医学杂志 2003;13:141-142
- 26 何念海, 李梦东, 宫树君, 曾孝平. 连续反应时间测定诊断亚临床肝性脑病的初步评价. 重庆医学 1998;27:155-158
- 27 王兮, 李长春, 虞涤霞. 晚期血吸虫病与肝炎肝硬化患者亚临床肝性脑病初步研究. 中国寄生虫病防治杂志 2000;13:79-80
- 28 贾林, 李瑜元. TIPSS 相关性亚临床型肝性脑病 1 例. 中华消化杂志 1999;19:18
- 29 贾林, 李瑜元, 吴惠生, 余庆珠. TIPS 相关性肝性脑病新概念以及国人发病率. 广州医药 1998;29:7-8
- 30 贾林, 李瑜元. 年龄校正数字连接试验及其临床应用. 广州医药 1999;30:11-12.
- 31 贾林, 李瑜元, 曾峥, 聂玉强, 吴惠生, 易世林. 门体分流性肝性脑病的临床发病学特征及其治疗 10 年研究总结. 广州医药 2002;33:7-9
- 32 王明俊, 李跃平, 朱权, 杨幼林, 刘冰熔, 王德生, 侯晓华, 李国霖, 沈翠茹. 亚临床肝性脑病分级诊断标准的探讨. 黑龙江医学 1997;157:1-2
- 33 朱权. 亚临床肝性脑病的诊断手段及评价. 实用医学杂志 2002;18:1018-1019
- 34 许俊, 顾翔, 袁成林, 张桁忠, 朱艳, 曹珍兰. 亚临床肝性脑病 32 例脑电图脑地形图观察. 齐齐哈尔医学院学报 2001;22:1348-1349
- 35 李瑞军, 杨昭徐. 诱发电位对亚临床型肝性脑病的诊断价值. 首都医科大学学报 2003;24:296-297
- 36 王波, 胡乐明. 事件相关电位 P₃₀₀ 对亚临床肝性脑病诊断价值探讨. 中华消化杂志 2002;22:375
- 37 付建新, 李坤成. 弛豫时间及磁化转移的计算及其在亚临床肝性脑病诊断中的应用. 中国医学影像技术 2002;18:288-290
- 38 杨幼林, 朱权, 王明俊, 刘冰熔, 李跃平, 史立君, 陈淑香, 刘铁夫. 亚临床肝性脑病的诊断研究. 哈尔滨医科大学学报 1995;29:463
- 39 贾林, 李瑜元. 门体性肝性脑病指数及其临床应用. 中华消化杂志 1997;17:362-363
- 40 贾林, 李瑜元, 吴惠生, 余庆珠. 简化门体性肝性脑病指数的临床应用. 世界华人消化杂志 1999;7:635-636
- 41 贾林, 李瑜元. 杜密克治疗亚临床型肝性脑病的多中心疗效报告. 广东药学 1999;9:47-48
- 42 石虹, 刘厚钰, 傅志君, 朱梁, 陈伟忠. 乳果糖对亚临床性肝性脑病的疗效观察 - 随机双盲临床试验. 中华消化杂志 1997;17:221-223
- 43 刘厚钰, 石虹. 亚临床性肝性脑病检测方法的评价. 肝脏 2002;7(增):38-41
- 44 邢全台, 刘连水. 乳果糖对亚临床肝性脑病的作用研究. 世界华人消化杂志 2003;11:108-109
- 45 汪佩文, 姜海琼, 王兴鹏. 乳果糖治疗亚临床肝性脑病的疗效观察. 胃肠病学 2003;8:118-124
- 46 陈范嵘, 杨蒲芳, 陆国义. 乳果糖治疗亚临床肝性脑病疗效观察. 华中医学杂志 1999;23:183-184
- 47 相龙云, 王素珍. 乳果糖治疗亚临床肝性脑病. 中国新药与临床杂志 2000;19:523-524
- 48 张学武, 胡国启, 周敏. 古拉定在肝硬化亚临床肝性脑病治疗中的临床意义. 安徽医药 2003;7:106-107
- 49 刘建生, 鲍念慈, 费正权, 傅极. 纳洛酮治疗肝硬化亚临床型肝性脑病疗效观察. 新医学 2000;31:589-590
- 50 刘建生, 左京昱, 费正权, 鲍念慈, 李继强. 胞二磷胆碱对亚临床型肝性脑病疗效观察. 医师进修杂志 1998;21:411-412
- 51 高月求, 陈建杰, 王灵台. 乳果糖治疗亚临床肝性脑病的临床及实验研究. 河北医学 2001;7:113-115
- 52 李瑞军, 杨昭徐. 乳果糖对临床及亚临床肝性脑病预防作用的实验研究. 胃肠病学 2000;5:214-215
- 53 乳果糖临床试验协作组. 乳果糖治疗肝性脑病和亚临床肝性脑病 149 例临床观察. 肝脏 1999;4:66-69
- 54 曾峥, 李瑜元. 乳果糖干预治疗对亚临床肝性脑病病程的影响. 中华医学杂志 2003;83:1126-1129
- 55 曾峥, 李瑜元. 乳果糖长短程治疗对亚临床肝性脑病智力测验影响的研究. 广州医学院学报 2003;31:14-17
- 56 聂玉强, 曾峥, 李瑜元, 沙卫红, 平丽, 戴寿军. 乳果糖治疗亚临床肝性脑病的临床研究. 中华内科杂志 2003;42:261-263
- 57 杨守峰, 陈华. 生白术颗粒剂治疗亚临床肝性脑病 33 例疗效观察. 新中医 2002;34:16-18
- 58 李瑞军, 唐晓山, 杨昭徐. 中药提取物水苏糖对临床 / 亚临床肝性脑病的预防作用. 中国新药杂志 2001;10:428-430
- 59 贾林, 张美华, 苏常青, 李泽. 硫代乙酰胺致大鼠轻微型肝性脑病模型的建立. 世界华人消化杂志 2004;12:1207-1208
- 60 王灵台, 高月求, 唐靖一, 陈建杰. 清开冲剂治疗亚临床肝性脑病 20 例对比观察. 中西医结合肝病杂志 1999;9:14-15

MNNG诱导大鼠胃癌中亚硒酸钠和胃黏膜内分泌细胞的作用

苏衍萍, 唐军民, 唐 岩, 高慧英

苏衍萍, 高慧英, 泰山医学院组胚教研室 山东省泰安市 271000
唐军民, 唐岩, 北京大学医学部人体解剖与组织胚胎学系 北京市 100083
苏衍萍, 女, 1966-06-01生, 山东省菏泽市人, 汉族。1999年北京大学医学部硕士, 副教授, 教研室副主任。主要从事硒与肿瘤关系的研究。
山东省教育厅资助项目, No. J00K67
项目负责人: 苏衍萍, 271000, 山东省泰安市, 泰山医学院组胚教研室. su-yanping@163.com
电话: 0538-6225198
收稿日期: 2004-02-11 接受日期: 2004-03-16

Influence of Na_2SeO_3 and gastric endocrine cells on MNNG induced gastric carcinogenesis in rats

Yang-Ping Su, Jun-Min Tang, Yan Tang, Hui-Ying Gao

Yang-Ping Su, Hui-Ying Gao, Department of Histology and Embryology, Taishan Medical College, Taian 271000, Shandong Province, China
Jun-Min Tang, Yan Tang, Department of Histology and Embryology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China
Supported by the Research Funds of Shandong Educational Office, No. J00K67

Correspondence to: Yang-Ping Su, Department of Histology and Embryology, Taishan Medical College, Taian 271000, Shandong Province, China. su-yanping@163.com
Received: 2004-02-11 Accepted: 2004-03-16

Abstract

AIM: To investigate influence of Na_2SeO_3 and gastric endocrine cells on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) induced gastric carcinogenesis in rats and its mechanism.

METHODS: Weaning male Wistar rats were divided randomly into four groups: The normal control group, experiment control group, low selenium (2 mg/L) group and high selenium group (4 mg/L). The Wistar rat gastric cancer was induced by MNNG (20 mg/kg) gavage daily for 10 days. Na_2SeO_3 was given by piped drinking before one week of MNNG (20 mg/kg) gavage. The Wistar rats were killed at the 43th week. The surface characters of gastric mucosa were observed with nude eyes. Histopathologic changes were observed by HE stain and AB-PAS methods. Changes of gastric endocrine cells were detected by immunohistochemical S-P method. The immunohistochemical results were quantitatively analyzed by the image analyzer. Statistical analysis was taken by SPSS.

RESULTS: Dietary Na_2SeO_3 (2 mg/L, 4 mg/L) aggravated gastric erosion and hemorrhage and promoted intestinal metaplasia of gastric mucosa (45.5%, 66.7%, 92.9%; 92.9% vs 45.5%, $P < 0.05$). Leiomyoma formed in the process of induced rats gastric carcinoma. Dietary Na_2SeO_3 (2 mg/L, 4 mg/L) increased incidence rate of leiomyoma. The nu-

meric density of area (N_A) of SP immunohistochemical positive cells was significantly increased in low selenium group than those of normal control group (9.909 ± 5.665 vs 4.455 ± 2.583 , $P < 0.05$). Absorbance mean (Amean) of gastrin immunohistochemical positive cells was significantly decreased in experimental control group, low selenium than that of normal control group (0.187 ± 0.033 , 0.119 ± 0.024 vs 0.306 ± 0.011 , $P < 0.01$), and low selenium group than experiment control group (0.119 ± 0.024 vs 0.187 ± 0.033 , $P < 0.01$). N_A and Amean of somatostatin cells (SOM) were not significantly different in each group.

CONCLUSION: These findings suggested that dietary Na_2SeO_3 by piped drinking might not decrease incidence of Wistar rat gastric cancer induced by MNNG. The mechanism may be involved in that selenium promoted SP cells proliferation and decreased secretion of gastrin cells in gastric mucosa.

Su YP, Tang JM, Tang Y, Gao HY. Influence of Na_2SeO_3 and gastric endocrine cells on MNNG induced gastric carcinogenesis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1264-1267

摘要

目的: 探讨N甲基-N - 硝基-N亚硝胍(MNNG)诱导Wistar大鼠胃癌形成过程中亚硒酸钠和胃黏膜内分泌细胞的作用。

方法: 用MNNG (20 mg/kg)诱导大鼠胃癌形成. 用HE染色、显微镜观察和AB-PAS方法比较了硒在MNNG诱导大鼠胃癌形成过程中的作用, 用免疫组织化学SP法研究在此过程中胃黏膜内P物质(SP)、胃泌素(GAS)和生长抑素(SOM)阳性细胞的免疫组织化学变化, 并对以上结果进行定性、定位、图像分析和统计学处理。

结果: 饮水中加入2 mg/L 和4 mg/L 的亚硒酸钠加重胃黏膜糜烂、出血, 促进胃黏膜肠上皮化生(45.5%, 66.7%, 92.9%; 92.9% vs 45.5%, $P < 0.05$), 在MNNG诱癌过程中发生了浆膜下平滑肌瘤, 亚硒酸钠可以增加平滑肌瘤的发生率. 胃黏膜内P物质阳性细胞的面数密度(N_A)低硒组比正常对照组显著升高(9.909 ± 5.665 vs 4.455 ± 2.583 , $P < 0.05$); GAS阳性细胞的吸光度(Amean)实验对照组和低硒组显著低于正常对照组(0.187 ± 0.033 , 0.119 ± 0.024 vs 0.306 ± 0.011 , $P < 0.01$), 低硒组显著低于实验对照组(0.119 ± 0.024 vs 0.187 ± 0.033 , $P < 0.01$); SOM阳性细胞的NA和Amean各组之间无显著性差异。

结论: 在MNNG所致胃癌形成过程中亚硒酸钠并不能降低

大鼠胃癌的发生率; 其机制可能与硒促进SP阳性细胞的增生和抑制G细胞的分泌功能有关.

苏衍萍, 唐军民, 唐岩, 高慧英. MNNG 诱导大鼠胃癌中亚硒酸钠和胃黏膜内分泌细胞的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1264-1267
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1264.asp>

0 引言

因胃癌而死亡者居我国各种恶性肿瘤之首. 体内激素水平与胃癌的发生和发展有很大的关系. 肿瘤细胞以自分泌方式产生激素^[1-4], 通过旁分泌方式发挥作用^[5]. 硒是人体所必需的营养元素, 硒对肿瘤的预防和治疗作用尚不能肯定^[6-7], 硒与胃癌的关系中是否胃黏膜内分泌细胞参与了作用还没有报道.

1 材料和方法

1.1 材料 断乳♂ Wistar 大鼠 62 只, 体质量 31-56 g, 由北京大学医学部实验动物科学部提供, 分 4 组(表 1). MNNG(N 甲基-N-硝基-N 亚硝胍)由北京大学第一临床医院基因室邓大君教授惠赠, 用二甲基亚砜(DMSO)助溶, 配成 100 g/L 溶液, 再用生理盐水稀释 100 倍即可使用, 现用现配. 实验开始 1 wk 后(即断乳大鼠饲养 1 wk 后), 给 Wistar 大鼠 MNNG 灌胃(20 mg/kg), 正常对照组以相同浓度的二甲基亚砜 - 生理盐水灌胃, 1 次/d, 连续 10 d, 期间每天称体质量以调整致癌剂 MNNG 给药量. 每 2 d 换含硒水和自来水并记录每只大鼠的摄水量.

表 1 Wistar 的大鼠分组

| 分组 | n | MNNG 剂量 | 硒水浓度 | 开始补硒时间 |
|------|----|----------|--------|--------------------|
| 正常对照 | 10 | 0 | 0 | 自来水 |
| 实验对照 | 22 | 20 mg/kg | 0 | 自来水 |
| 低硒 | 15 | 20 mg/Kg | 2 mg/L | 灌 MNNG 前 1wk 饮用含硒水 |
| 高硒 | 15 | 20 mg/kg | 4 mg/L | 灌 MNNG 前 1wk 饮用含硒水 |

1.2 方法 密切观察大鼠的营养状况及摄食和饮水情况. 实验开始后 43 wk 开始取材, 一次性处死大鼠. 取大鼠腺胃组织, 固定在 40 g/L 多聚甲醛溶液中, 常规石蜡包埋, 切成 5-6 μm 厚切片, 行 HE 和 AB-PAS 染色, 进行病理诊断, 胞质内蓝色及紫蓝色颗粒的细胞为肠上皮化生. 分别选用兔抗人和鼠胃泌素(GAS)、P 物质(SP)和生长抑素(SOM)多克隆抗体, 行常规 SP 免疫组织化学染色. 用 LeicaQ500MC 图像分析仪进行图像分析. 平均吸光度(Amean)值 = 1 g GREV0/GREV1; GREV0 : 空白度灰值; GREV1 : 被测视野灰度值.

统计学处理 应用 SPSS 软件进行方差分析, 对病理诊断结果进行 χ^2 分析.

2 结果

2.1 病理诊断结果 正常组大鼠胃的浆膜面光滑、红

润, 黏膜皱襞清晰. 实验对照组和加硒组均有不同只数的大鼠胃黏膜糜烂、出血、有白色或黄色的渗出物(图 1), 并且低硒组重于实验对照组, 高硒组重于低硒组, 特别高硒组胃壁失去弹性, 黏膜皱襞消失. 实验对照组和加硒组均有不同只数的大鼠胃大弯浆膜面可见 1 肿块, 直径约 0.2-1 cm, 位置约在距离幽门 1 cm 处, 表面光滑、突破浆膜, 与周围组织无粘连, 除了 1 只有出血外, 其余均无出血和坏死, 肿块大小, 加硒组大于实验对照组, 高硒组略大于低硒组, 均为单发肿块(图 2A, 表 2). HE 染色: 浆膜面肿块为平滑肌瘤. 显微镜下观察可见肿瘤处平滑肌增厚、排列紊乱, 而且增生活跃, 细胞核略增大, 不见核分裂像(图 2B). 胃黏膜腺体排列规律, 但是可见高硒组胃底腺腺腔略大, 腺细胞无异常发现. AB-PAS 反应: 显微镜下观察所见, 正常组大鼠胃黏膜的游离面均为紫红色颗粒, 黏膜面完整(图 3A). 其他各组均发现一定数量的大鼠胃黏膜近游离面细胞胞质内有蓝色及紫蓝色颗粒, 多少不等, 其为肠上皮化生, 黏膜不完整(图 3B). 并且低硒组高于实验对照组, 高硒组高于低硒组(表 2).

表 2 大鼠病理诊断结果

| 分组 | n | 平滑肌瘤 | 肠上皮化生 |
|------|----|-------|--------------------|
| 正常对照 | 10 | 0 | 0 |
| 实验对照 | 22 | 23% | 45.5% |
| 低硒 | 15 | 46.6% | 66.7% |
| 高硒 | 14 | 42.8% | 92.9% ^a |

^aP <0.05 vs 实验对照组.

表 3 SP、GAS 和 SOM 阳性细胞的 N_A 和 Amean(mean±SD)

| 细胞 | 正常对照 | 实验对照 | 低硒 | 高硒 |
|----------------|-----------------|----------------------------|-----------------------------|----------------|
| SP | 4.455 ± 2.583 | 7.000 ± 3.838 | 9.909 ± 5.665 ^a | 6.750 ± 3.845 |
| N _A | G 6.833 ± 2.137 | 8.467 ± 3.357 | 7.333 ± 3.011 | 9.100 ± 1.663 |
| D | 4.000 ± 2.479 | 3.444 ± 2.007 | 12.111 ± 9.943 | 4.333 ± 3.317 |
| SP | 0.154 ± 0.048 | 0.168 ± 0.056 | 0.182 ± 0.044 | 0.155 ± 0.028 |
| Amean G | 0.306 ± 0.011 | 0.187 ± 0.033 ^b | 0.119 ± 0.024 ^{bd} | 0.246 ± 0.0639 |
| D | 0.189 ± 0.028 | 0.166 ± 0.019 | 0.171 ± 0.024 | 0.159 ± 0.033 |

^aP <0.05 vs 正常对照组; ^bP <0.01 vs 正常对照组; ^{bd}P <0.01 vs 实验对照组.

2.2 免疫组织化学结果 免疫组织化学阳性结果呈棕黄色, 定位于胞质中, 阴性对照未见阳性着色. 大鼠 SP 阳性细胞(EC 细胞)多分布在胃底和幽门部, 大多分布在胃底腺的体部, 细胞呈圆形或椭圆形, 有的细胞有短小的突起(图 4A). 大鼠 G 细胞呈圆形、卵圆形或长梭形, 其细胞质呈棕黄色, 多分布在胃幽门腺的体部, 而腺体峡、颈部较少(图 4B). D 细胞呈卵圆形、长梭形或不规则形, 基部有长的突起, 突起末端可有一球形膨大(图 4C). 阳性细胞可分布于胃黏膜各处, 以胃幽

门部稍多，而胃体部、胃底部较少。SP 细胞的面数密度低硒组比正常对照组显著增高($P < 0.05$)。G 细胞的面数密度及 D 细胞的面数密度组间比较没有明显的差异(表3)。P 物质阳性细胞的吸光度在各组之间没有显著性的差异。G 细胞的吸光度实验对照组和低硒组比正常对照组明显降低，低硒组也明显低于实验对照组($P < 0.01$)，高硒组与其他各组相比没有显著性差异。D 细胞的吸光度实验对照组、加硒各组比正常对照组略有下降(表 3)。

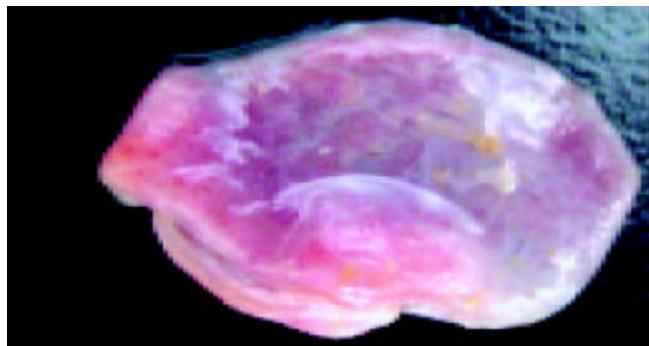


图1 大鼠糜烂胃黏膜。

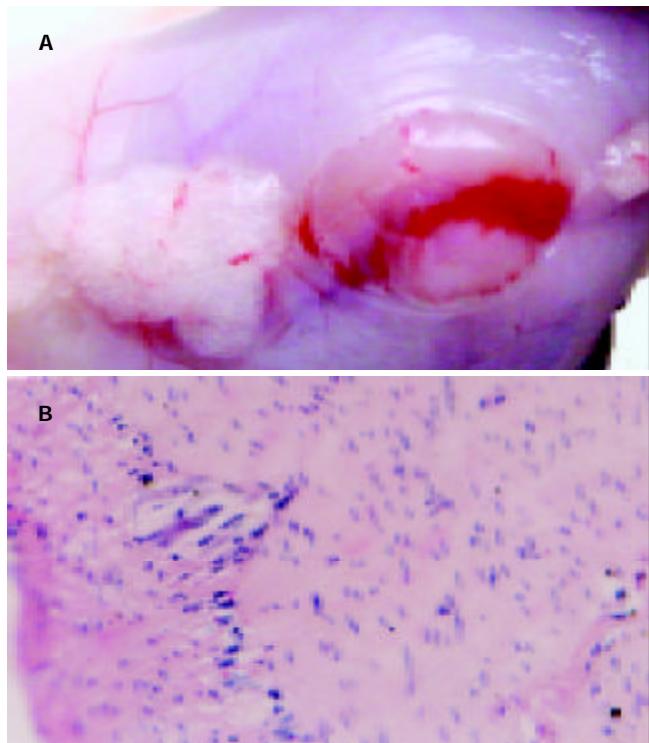


图2 浆膜下肿瘤. A: 大体; B: HE $\times 200$.

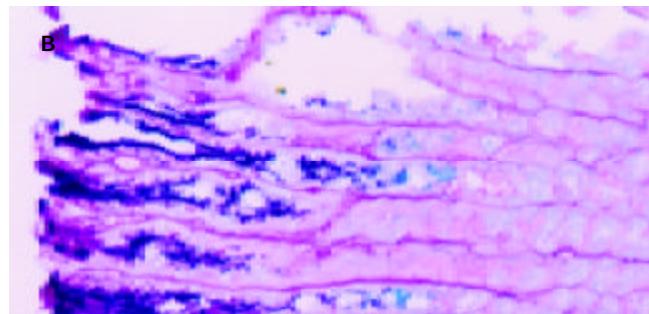
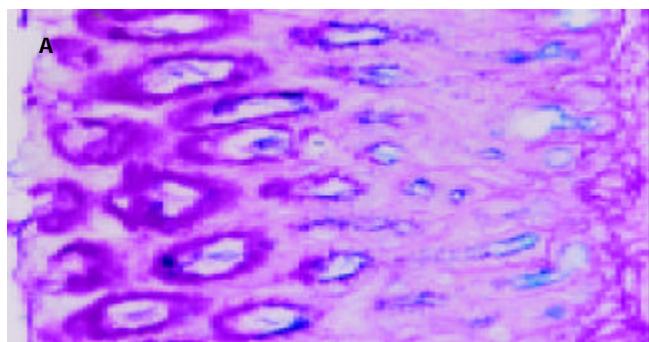


图3 大鼠胃黏膜. A: 正常胃黏膜; B: 糜烂胃黏膜 AB - PAS, $\times 200$.

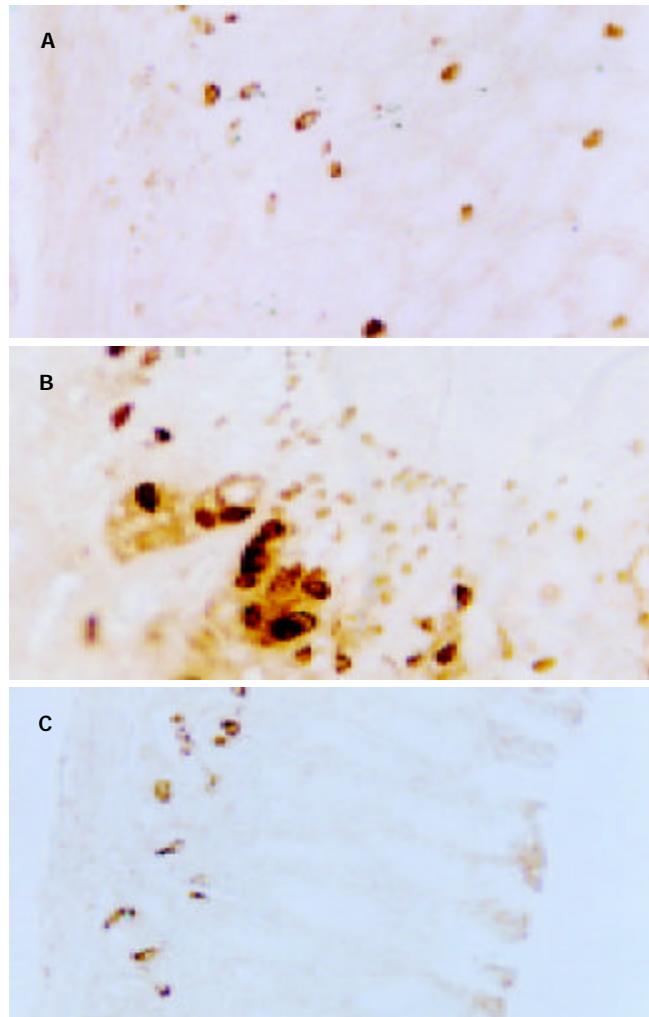


图4 免疫组织化学显示大鼠胃黏膜内分泌细胞. A: SP 阳性内分泌细胞; B: G 细胞; C: D 细胞. SP $\times 200$.

3 讨论

硒的摄入可以预防肿瘤的发生和发展，降低癌症患者的死亡率^[8-15]。事实上各国学者对硒是否具有普遍的抗癌作用一直存在争议^[6-7]，甚至有促进肿瘤发生和发展的报道^[16]。我们在给大鼠 MNNG 灌胃的前 1 wk 饮用含硒水，持续整个实验过程，在实验开始的 43 wk 处死大鼠，在 MNNG 诱导 Wistar 大鼠腺胃癌过程中，饮水中加入 2 mg/L 和 4 mg/L 的亚硒酸钠可以增加胃黏膜糜烂、出血、肠上皮化生的发生率，提示在饮水中加入 2 mg/L 和 4 mg/L 的亚硒酸钠并不能预防肿瘤

的发生, 而是可能促进大鼠实验性胃癌的形成。并且在MNNG诱癌过程中发生了浆膜下平滑肌瘤, 亚硒酸钠可以增加平滑肌瘤的发生率。

硒是人体所必需的营养元素, 是构成谷胱甘肽过氧化物酶的重要成分, 能够保护细胞膜和线粒体膜免受脂质过氧化的损伤, 从而对肿瘤及对多种疾病起到预防和治疗作用^[17-21]。同时硒具有生物毒性, 损害人体健康, 早期的毒性作用主要是影响人体内分泌功能。因为I型碘甲腺原氨酸5'脱碘酶(I-5' Iodothyronine deiodinase)是一种硒蛋白, 在甲状腺素的代谢过程中, 可使T4(Thyroxine)转化为T3(3,5,3'-Triiodothyronine)^[22], 硒又有重要的胰岛素样模拟作用^[23-25], 因此对硒与内分泌关系的研究主要集中在甲状腺素合成代谢相关疾病^[22, 26], 以及对生长激素和胰岛素样生长因子I(IGF-I)的代谢、作用影响^[27]。胃黏膜内存在大量的内分泌细胞, 亚硒酸钠增加胃黏膜糜烂、出血、肠上皮化生的发生率是否与胃黏膜内分泌细胞有关? 尚未见报道。本结果提示, 实验对照组和补硒各组比正常对照组P物质免疫阳性细胞吸光度略有增强, 面数密度也略有增高, 特别是低硒组的面数密度明显的升高。说明在MNNG所致胃癌的过程中P物质免疫阳性细胞增生较活跃, 分泌功能也略有加强, 补硒可能进一步促进SP阳性细胞的增生; 也可能亚硒酸钠通过其他机制促进了胃黏膜糜烂、出血和肠上皮化生, 而这一阶段P物质阳性细胞的增生和分泌也相对活跃。胃泌素大部分由胃窦部G细胞分泌, 而胃癌又好发于胃窦部小弯侧, 二者是否相关, 已引起人们重视。许多实验也已证实有些胃癌在发生、发展过程中有胃泌素参与, 但胃泌素对致癌剂诱发胃癌的作用也有相互矛盾的结论。本结果提示, 在MNNG所致胃癌的过程中胃泌素细胞的分泌活性实验对照组和低硒组比正常对照组明显降低, 低硒组也明显低于实验对照组($P < 0.01$)。说明在MNNG所致胃癌的过程中胃泌素细胞的分泌活性发生了一定的变化, 加硒对其分泌也发生一定的抑制作用。SOM是D细胞分泌的胃、肠、胰内重要的内分泌激素。SOM的分泌对胃癌发生、发展的影响可能是双向的局部作用, 即SOM可直接刺激胃黏膜癌前病变细胞增生, 而另一方面又抑制其他激素的释放, 抑制胃癌的发生和发展。本结果提示, 加硒组胃、肠黏膜D细胞数量略有增加, 但是激素分泌有所减少。因此, 在MNNG所致胃癌形成过程中亚硒酸钠并不能降低大鼠腺胃癌的发生, 其机制可能与亚硒酸钠促进胃黏膜SP阳性细胞增生, 抑制G内分泌细胞分泌功能有关。

4 参考文献

- 1 Matsuo M, Koga S, Kanetake H, Ohtani H, Higami Y, Shimokawa I, Watanabe J. EPO-producing gastric carcinoma in a hemodialysis patient. *Am J Kidney Dis* 2003;42:E3-4
- 2 Ota H, Azuma K, Horiuchi T, Kazama H, Araki A, Hosoi T, Sawabe M, Amizuka N, Orimo H. An elderly case of non-Hodgkin's lymphoma (NHL) with hypercalcemia. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2003;40:167-171
- 3 Papotti M, Cassoni P, Volante M, Deghenghi R, Muccioli G, Ghigo E. Ghrelin-producing endocrine tumors of the stomach and intestine. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5052-5059
- 4 Dockray GJ, Varro A, Dimaline R, Wang T. The gastrins: their production and biological activities. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:119-139
- 5 Varro A, Hemers E, Archer D, Pagliocca A, Haigh C, Ahmed S, Dimaline R, Dockray GJ. Identification of plasminogen activator inhibitor-2 as a gastrin-regulated gene: Role of Rho GTPase and menin. *Gastroenterology* 2002;123:271-280
- 6 Vinceti M, Wei ET, Malagoli C, Bergomi M, Vivoli G. Adverse health effects of selenium in humans. *Rev Environ Health* 2001; 16:233-251
- 7 Vinceti M, Nacci G, Rocchi E, Cassinadri T, Vivoli R, Marchesi C, Bergomi M. Mortality in a population with long-term exposure to inorganic selenium via drinking water. *J Clin Epidemiol* 2000;53:1062-1068
- 8 Klein EA. Selenium: epidemiology and basic science. *J Urol* 2004;171(2 Pt 2):S50-53
- 9 Klein EA, Thompson IM. Update on chemoprevention of prostate cancer. *Curr Opin Urol* 2004;14:143-149
- 10 Sinha R, El-Bayoumi K. Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds. *Curr Cancer Drug Targets* 2004;4:13-28
- 11 Nakaji S, Fukuda S, Sakamoto J, Sugawara K, Shimoyama T, Umeda T, Baxter D. Relationship between mineral and trace element concentrations in drinking water and gastric cancer mortality in Japan. *Nutr Cancer* 2001;40:99-102
- 12 La Vecchia C, Franceschi S. Nutrition and gastric cancer. *Can J Gastroenterol* 2000;14(Suppl D):51D-54D
- 13 Prokopczyk B, Rosa JG, Desai D, Amin S, Sohn OS, Fiala ES, El-Bayoumi K. Chemoprevention of lung tumorigenesis induced by a mixture of benzo(a)pyrene and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol by the organoselenium compound 1,4-phenylenebis(methylene)selenocyanate. *Cancer Lett* 2000;161:35-46
- 14 Beno I, Klvanova J, Magalova T, Brtkova A. Blood levels of natural antioxidants in gastric and colorectal precancerous lesions and cancers in Slovakia. *Neoplasma* 2000;47:37-40
- 15 Yang CS. Vitamin nutrition and gastroesophageal cancer. *J Nutr* 2000;130(2S Suppl):338S-339S
- 16 Thompson HJ, Becci PJ. Effect of graded dietary levels of selenium on tracheal carcinomas induced by 1-methyl-1-nitrosourea. *Cancer Lett* 1979;7:215-219
- 17 Tinggi U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicol Lett* 2003;137:103-110
- 18 Kim SY, Kim JW, Ko YS, Koo JE, Chung HY, Lee-Kim YC. Changes in lipid peroxidation and antioxidant trace elements in serum of women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cancer. *Nutr Cancer* 2003;47:126-130
- 19 Wu Q, Huang K. Effect of long-term se deficiency on the antioxidant capacities of rat vascular tissue. *Biol Trace Elem Res* 2004;98:73-84
- 20 Foster HD. How HIV-1 causes AIDS: implications for prevention and treatment. *Med Hypotheses* 2004;62:549-553
- 21 Karunasinghe N, Ryan J, Tuckey J, Masters J, Jamieson M, Clarke LC, Marshall JR, Ferguson LR. DNA stability and serum selenium levels in a high-risk group for prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:391-397
- 22 Duntas LH, Mantzou E, Koutras DA. Effects of a six month treatment with selenomethionine in patients with autoimmune thyroiditis. *Eur J Endocrinol* 2003;148:389-393
- 23 Heart E, Sung CK. Insulin-like and non-insulin-like selenium actions in 3T3-L1 adipocytes. *J Cell Biochem* 2003;88:719-731
- 24 Stapleton SR. Selenium: an insulin-mimetic. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1874-1879
- 25 Battell ML, Delgatty HL, McNeill JH. Sodium selenate corrects glucose tolerance and heart function in STZ diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 1998;179:27-34
- 26 Gartner R, Gasnier BC, Dietrich JW, Krebs B, Angstwurm MW. Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid peroxidase antibodies concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1687-1691
- 27 Aydin K, Bideci A, Kendirci M, Cinaz P, Kurtoglu S. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 levels of children living in an iodine- and selenium-deficient endemic goiter area. *Biol Trace Elem Res* 2002;90:25-30

胃癌组织血小板衍化内皮细胞生长因子、环氧化酶2的表达与血管生成和细胞凋亡的关系

潘 峰,任建国,周传文,张振玉,赵君宁,周锡荣

潘峰,任建国,周传文,张振玉,赵君宁,南京医科大学附属淮安第一医院消化内科 江苏省淮安市 223001
张振玉,赵君宁,南京医科大学附属南京第一医院消化内科 江苏省南京市 210006
潘峰,男,1971-07-10生,江苏省常熟市人,汉族,1994年徐州医学院本科毕业,2003年南京医科大学硕士研究生毕业,主治医师,主要从事胃肠道肿瘤基础与临床研究。
项目负责人:潘峰,223001,江苏省淮安市淮阴区北京西路3号,南京医科大学附属淮安第一医院消化内科. panliufeng@sohu.com
电话: 0517-3275209
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-03-24

Correlation of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase and Cox-2 expression to angiogenesis and apoptosis in gastric carcinoma

Feng Pan, Jian-Guo Ren, Chuan-Wen Zhou, Zhen-Yu Zhang, Jun-Ning Zhao, Xi-Rong Zhou

Feng Pan, Jian-Guo Ren, Chuan-Wen Zhou, Xi-Rong Zhou, Department of Gastroenterology, The Affiliated Huai'an First Hospital of Nanjing Medical University, Huai'an 223001, Jiangsu Province, China
Zhen-Yu Zhang, Jun-Ning Zhao, Department of Gastroenterology, The Affiliated First Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Dr. Feng Pan, Department of Gastroenterology, The Affiliated Huai'an First Hospital, Nanjing Medical University, Huai'an 223001, Jiangsu Province, China. panliufeng@sohu.com
Received: 2004-01-15 Accepted: 2004-03-24

Abstract

AIM: To investigate the relationship of the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase (PD-ECGF/TP) and Cox-2 to angiogenesis and apoptosis in gastric carcinoma.

METHODS: The expression of PD-ECGF and Cox-2 and the microvascular density (MVD) level were examined by immunohistochemical staining, and apoptotic index (AI) was examined by flow cytometry in 67 cases of gastric carcinoma.

RESULTS: There was a close correlation between PD-ECGF expression and several clinicopathological factors including lymph node metastasis ($P < 0.05$), histology ($P < 0.05$) and histological type ($P < 0.05$). The expression of Cox-2 was closely related to lymph node metastasis ($P < 0.05$); The expression of PD-ECGF or Cox-2 in gastric cancer tissues was positively correlated with MVD ($P < 0.01$) and negatively correlated with AI ($P < 0.01$). Combined analysis of PD-ECGF and Cox-2 showed that tumors with positive expression of both factors had a significantly lower AI and a

significantly higher MVD than tumors with negative expression of both factors ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Up-regulation of PD-ECGF and Cox-2 may facilitate tumor angiogenesis and inhibit apoptosis in gastric carcinoma, indicating cooperation between PD-ECGF and Cox-2 in gastric cancer, and therefore promote tumor growth and metastasis.

Pan F, Ren JG, Zhou CW, Zhang ZY, Zhao JN, Zhou XR. Correlation of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase and Cox-2 expression to angiogenesis and apoptosis in gastric carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1268-1272

摘要

目的:探讨血小板衍化内皮细胞生长因子(platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF)和环氧化酶2(Cox-2)在胃癌组织中的表达及与血管生成和细胞凋亡的关系。

方法:应用免疫组化技术对67例胃癌组织进行PD-ECGF、Cox-2 及肿瘤组织微血管密度(microvascular density, MVD)检测,流式细胞术检测胃癌细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)。

结果:PD-ECGF 的表达与胃癌淋巴结转移($P < 0.05$)、分化程度($P < 0.05$)及组织分型($P < 0.05$)显著相关, Cox-2的表达与胃癌淋巴结转移($P < 0.01$)显著相关;二者与MVD ($P < 0.01$)显著正相关,与 AI ($P < 0.01$)显著负相关,二者共同表达阳性者MVD显著高于共同表达阴性者($P < 0.01$),二者共同表达阳性者AI显著低于共同表达阴性者($P < 0.01$)。

结论:胃癌组织中PD-ECGF 和 Cox-2 可促进血管生成,抑制胃癌细胞凋亡,二者起协同作用,促进胃癌的增生与转移。

潘峰,任建国,周传文,张振玉,赵君宁,周锡荣. 胃癌组织血小板衍化内皮细胞生长因子、环氧化酶2的表达与血管生成和细胞凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1268 - 1272

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1268.asp>

0 引言

胃癌的发生、发展是多因素、多基因作用的过程。而肿瘤的增生与凋亡是其基本过程。胃癌在其增生及转移过程中,肿瘤血管的形成起着重要作用,为肿瘤的生长和播散提供了途径。Folkman et al^[1]指出如果没有血管生

成, 原发肿瘤的生长不会超过 $1\text{-}2 \text{ mm}^3$. 血小板衍化内皮细胞生长因子(platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF)是血管生成研究领域相对较新的一一个血管生长因子; 环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)促进肿瘤增生, 抑制凋亡发生. 二者在胃癌组织中的关系目前国内外未见报道. 本文用免疫组化法和流式细胞术研究胃癌组织中 PD-ECGF 与 COX-2 的表达与二者相互之间的关系, 以及二者对胃癌血管密度(MVD)的影响和细胞凋亡指数(AI)的关系.

1 材料与方法

1.1 材料 67 份胃癌组织标本取自我院 2001-03/2002-09 手术切除者, 均经病理证实. 全部病例术前均未接受放疗和化疗. 67 例患者中, 男性 49 例, 女性 18 例. 年龄 31-78 岁, 中位年龄 61.0 岁. 其中早期胃癌 5 例, 进展期胃癌 62 例, 进展期胃癌按 Borrmann 肉眼分型为 I、II、III、IV 型. 按组织分化程度、Lauren 分型及是否合并淋巴结转移分组. 免疫组化 SP 试剂盒购自福州迈新公司. 特异性一抗分别为即用型鼠抗人 PD-ECGF 单克隆抗体(P-GF.44C, Neomarker 公司); 兔抗人 COX-2 单克隆抗体(武汉博士德公司), 按 1:80 稀释; 鼠抗人 VIII 因子多克隆抗体(Z002, Neomarker 公司), 按 1:100 稀释. 流式细胞 DNA 细胞周期分析试剂盒(Cycle Test DNA Reagent Kit)购自美国 BD 公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组化法 所有标本均经 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 5 μm 厚连续切片. 免疫组化采用 SP 法, DAB 染色. 加一抗前行微波抗原修复. 每次染色前均采用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照, 光镜下观察. 结果判断: PD-ECGF 采用半定量积分法^[2], 着色细胞比例 1/3 以下为 1 分, 1/3-2/3 为 2 分, 2/3 以上为 3 分. 着色程度: 无着色为 0 分, 浅黄色 1 分, 棕黄色为 2 分. 根据二者之和判断阳性等级, 0-3 分为阴性, 4 分以上为阳性. VIII 因子计数参照 Weidner^[3]法, 计算 5 个光镜视野最高微血管染色区域微血管密度(microvascular density, MVD)平均数.

1.2.2 流式细胞术 癌灶部位多点取材, 剪碎、搓揉组织, 生理盐水冲洗, 300 目尼龙滤网过滤成单细胞悬液, 离心, 取细胞沉淀, 离心, 用 PBS 液洗涤、离心两遍. 调整细胞数, 悬液在显微镜下细胞计数 $2\times 10^6/\text{mL}$ 个, 加入 DNA 分析试剂(破膜剂、PI 染料、RNA 酶等), 避光, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育 30 min, 上机检测, 观察细胞凋亡峰, 计算凋亡指数 AI.

统计学处理 PD-ECGF、cox-2、MVD、AI 和临床病理因素之间的关系采用 χ^2 检验、t 检验和 Spearman 相关检验, SPSS11.5 统计软件分析.

2 结果

2.1 PD-ECGF 和 COX-2 的表达及 MVD 和 AI 测定

ECGF 阳性表达多位于肿瘤细胞的胞质内和间质细胞中, 为棕黄色颗粒(图 1). COX-2 主要在胃癌细胞胞质中表达(图 2), VIII 因子染色显示 MVD(图 3). 胃癌细胞凋亡检测显示凋亡峰及凋亡百分率(图 4), AI 范围在本组中为 0.16-6.10, 平均 1.69 ± 1.35 .



图 1 PD-ECGF 在胃癌细胞胞质内表达($\times 400$).

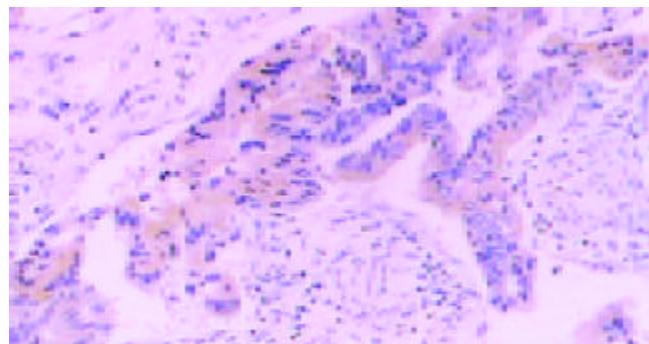


图 2 COX-2 在胃癌细胞胞质内表达($\times 100$).

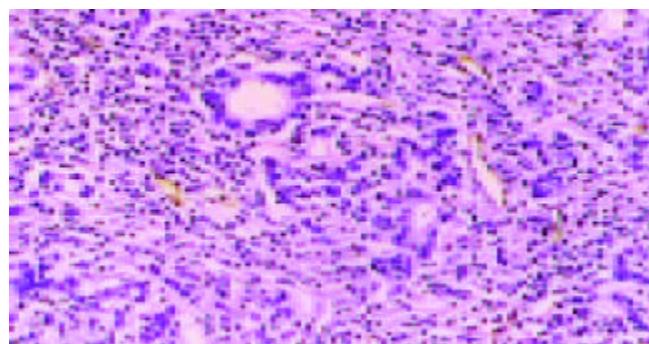


图 3 胃癌细胞 VIII 因子染色阳性($\times 100$).

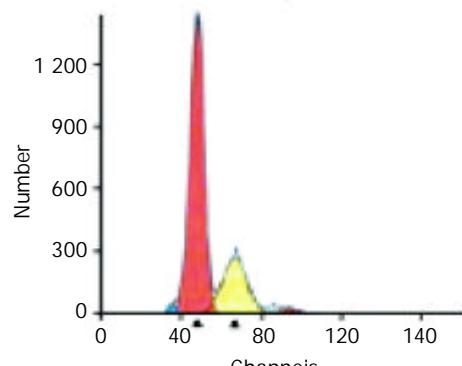


图 4 胃癌细胞凋亡(AI).

表1 PD-ECGF、Cox-2的表达和MVD、AI与临床病理因素的关系

| 临床病理因素 | PD-ECGF | | P值 | COX-2 | | P值 | MVD | P值 | AI | P值 |
|-------------------|---------|-------|--------------------|-------|-------|--------------------|-------------|--------------------|-----------|--------------------|
| | 阳性(n) | 阴性(n) | | 阳性(n) | 阴性(n) | | | | | |
| Borrmann分型 | | | | | | | | | | |
| I + II | 18 | 10 | 0.092 | 20 | 8 | 0.484 | 40.82±7.97 | 0.982 | 1.95±1.44 | 0.07 |
| III + IV | 15 | 19 | | 23 | 11 | | 40.76±11.26 | | 1.37±1.03 | |
| 组织分化程度 | | | | | | | | | | |
| 低分化+未分化 | 13 | 20 | 0.033 ^a | 22 | 11 | 0.535 | 39.62±10.35 | 0.791 | 1.57±1.19 | 0.482 |
| 中分化+高分化 | 22 | 12 | | 22 | 12 | | 40.27±9.77 | | 1.80±1.51 | |
| Lauren分型 | | | | | | | | | | |
| 肠型 | 23 | 11 | 0.010 ^b | 25 | 9 | 0.132 | 42.03±10.10 | 0.083 | 1.75±1.47 | 0.677 |
| 弥漫型 | 12 | 21 | | 19 | 14 | | 37.79±9.56 | | 1.62±1.22 | |
| 淋巴结转移 | | | | | | | | | | |
| 有 | 25 | 14 | 0.020 ^a | 31 | 8 | 0.005 ^c | 42.82±10.11 | 0.005 ^d | 1.39±0.92 | 0.031 ^e |
| 无 | 10 | 18 | | 13 | 15 | | 35.93±8.48 | | 2.10±1.72 | |

^aP <0.05, ^bP <0.01, ^cP <0.01, ^dP <0.01, ^eP <0.05.

2.2 PD-ECGF、Cox-2的表达和MVD、AI与临床病理因素的关系 PD-ECGF表达与胃癌的Lauren分型、组织分化程度和淋巴结转移均密切相关(P <0.05). Cox-2的表达与胃癌组织分型(P <0.01)显著相关. MVD与胃癌淋巴结转移显著正相关(P <0.01), AI值与胃癌淋巴结转移显著负相关(P <0.05). (表1).

2.3 PD-ECGF和Cox-2的表达与MVD、AI的关系 PD-ECGF、COX-2表达阳性的胃癌组织MVD显著高于阴性者(P <0.01); PD-ECGF、COX-2表达阳性的胃癌组织AI显著低于阴性者(P <0.05). PD-ECGF、COX-2共同表达阳性的胃癌组织MVD显著高于只有其中一种因子表达阳性者(P <0.05)和二者均阴性者(P <0.01), 其AI值显著低于只有其中一种因子表达阳性者(P <0.05)和二者均阴性者(P <0.01). 胃癌组织中PD-ECGF和COX-2表达呈显著相关(P <0.05), 提示PD-ECGF与COX-2可能起协同作用. 见(表2-4).

表2 胃癌组织中PD-ECGF和COX-2表达与MVD及AI的关系1

| | PD-ECGF | | COX-2 | | P | |
|-----|-------------|------------|-------|------------|------------|-------|
| | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | | |
| MVD | 43.37±11.39 | 36.19±6.53 | 0.003 | 45.30±8.96 | 32.00±4.85 | 0.004 |
| AI | 1.23±0.83 | 2.18±1.6 | 0.003 | 1.55±1.1 | 1.89±1.63 | 0.017 |

表3 胃癌组织中PD-ECGF和COX-2表达与MVD及AI的关系2

| PD-ECGF和COX-2表达 | 比例 | MVD | AI |
|-----------------|---------|-------------------------|------------------------|
| 共同表达阳性 | (25/67) | 48.12±9.93 | 1.18±0.69 |
| 二者之一表达阳性 | (25/67) | 36.96±5.78 ^a | 1.84±1.35 ^a |
| 二者均阴性者 | (17/67) | 32.29±5.80 ^b | 2.19±1.82 ^b |

^aP <0.05, 与共同表达阳性组比较, ^bP <0.01 与共同表达阳性组比较.

表4 胃癌组织中PD-ECGF和COX-2相互之间的关系

| 分组 | PD-ECGF | |
|--------------|------------|------------|
| | 阳性n(%) | 阴性n(%) |
| COX-2 | | |
| 阳性(n) | 25(37.31%) | 15(22.39%) |
| 阴性(n) | 10(14.93%) | 17(25.37%) |

3 讨论

PD-ECGF是一类较新发现的促血管生长因子, 体外可趋化内皮细胞, 体内有诱导血管生成的作用^[4]. 胸苷酶解产物胸腺嘧啶和2-脱氧核糖-1-磷酸本身也有趋化内皮细胞和促血管生成作用^[5-6]. PD-ECGF在结肠癌、肺癌、肝癌、乳腺癌等肿瘤中的表达显著增高^[7-11]. Yoshikawa et al^[12]用ELISA法发现PD-ECGF与胃癌肉眼分型及组织分化程度显著相关, 与淋巴结转移无关. 而我们的研究发现PD-ECGF的表达与Lauren分型、组织分化程度及淋巴结转移密切相关, 而与肉眼分型的关系无显著性. 这种差异可能与选择病例的比例、测定方法、计数差异等不同有关. Matsushita et al将PD-ECGF转入大鼠KB细胞(即KB-TP)后发现其平均微血管密度显著增高^[13], 我们的研究证实PD-ECGF可诱导血管生成, 促进胃癌的生长和转移. 我们认为, PD-ECGF促进肿瘤微血管生成的机制一方面在于他的酶活性, 可降低抑制内皮细胞活性的胸苷水平而促进血管生成, 其反应产物胸腺嘧啶、2-脱氧核糖-1-磷酸和2-脱氧-D-核糖均有趋化内皮细胞和促血管生成作用; 另一方面可能与多种促血管因子起协同作用相关. 肿瘤的发生不仅依赖于细胞的增生, 也依赖于细胞凋亡的发生. 我们的研究同时证实凋亡减少与淋巴结转移呈正相关, 有助于进一步判断预后, 这与Osaki et al^[14]

的结论相似, 其机制可能为(1)胸苷产物的减少、细胞周期DNA的复制或修复障碍。(2)PD-ECGF产物2-脱氧-D-核糖抑制Caspase 3活性, 下调Bcl-2和Bcl-x(L)水平, 抑制凋亡发生^[15-16]。(3)影响细胞内信号传导(4)高的肿瘤微血管环境和逃避凋亡机制等。研究表明, PD-ECGF过度表达的胃癌细胞对5-FU和5'-DFUR敏感性显著增高^[17], 提示PD-ECGF表达对于化疗药物的选择及疗效有重要意义。

近年来众多研究表明COX-2参与了癌症的发生、进展^[18-20]。一般认为COX-2高表达是癌症发生的早期事件^[21]。COX-2表达与胃癌的类型、分级、分化和淋巴结转移的关系许多学者作了相关研究, 结论也有相当的差异。Yamagata et al^[22]研究发现COX-2在肠型胃癌中的表达显著高于弥漫型胃癌。Murata et al^[23]则发现COX-2表达促进胃癌淋巴管侵犯和淋巴结转移, 而与胃癌大小、组织病理类型、静脉侵犯等因素无关。我们的研究与前者有差异而与后者相似, 提示COX-2的过表达与胃癌的侵袭和转移能力密切相关, 其机制尚不明确。Fosslien et al^[24]研究发现新生血管在COX-2表达的区域显著增生, 而COX-2抑制剂可显著抑制血管生成, 提示COX-2在血管生成中起重要作用。COX-2的过表达在肿瘤局部产生过多PGs, 可促进新生血管的生成, 可能是肿瘤组织生长、侵袭和转移的基础。我们的研究同时显示胃癌组织中COX-2的表达与AI呈负相关, 这一结果与大多数研究相一致^[25-28]。COX-2诱导细胞凋亡的机制可能为: (1)COX-2可增加细胞黏附于细胞外基质的能力, 抑制凋亡。(2)致肿瘤细胞 CyclinD1 表达下降, G1期延长而抑制凋亡。(3)COX-2催化产物与核内受体PPARs结合, 下调TNF α , 抑制NF- κ B的活性而抑制细胞凋亡。(4)促进bcl-2、bcl-xL、bax、survivin等基因的表达。(5)可能通过蛋白激酶C(PCK)依赖途径抑制凋亡发生。为COX-2抑制剂防治肿瘤提供了依据^[29-32]。

PD-ECGF与COX-2在肿瘤组织中的关系目前资料甚少。Fujiwaki et al^[33]发现子宫内膜癌患者PD-ECGF与COX-2共同表达者微血管密度显著增高, 并认为低氧、多种细胞因子等因素可上调PD-ECGF与COX-2的表达^[34-37], 促进肿瘤的增生和血管生成。我们进一步研究了PD-ECGF与COX-2在胃癌组织中的关系以及与MVD和AI的关系, 结果表明, PD-ECGF、COX-2表达阳性者MVD显著高于阴性者, AI显著低于阴性者, 且二者共同表达阳性的胃癌组织MVD显著高于只有其中一种因子表达阳性者($P < 0.05$)和二者均阴性者($P < 0.01$), AI显著低于只有其中一种因子表达阳性者($P < 0.05$)和二者均阴性者($P < 0.01$)。这一结果提示PD-ECGF、COX-2在胃癌血管生成和细胞凋亡过程中起协同作用。研究表明, 表皮生长因子(EGF)主要通过酪氨酸蛋白激酶(PKC)途径激活COX-2基因^[38]; 胰岛素样生长因子(IGF)通过磷脂酰肌醇-3激酶上调COX-2的表达^[39], 各种激酶并不直接促进COX-2的转录, 而是通过激活其下

游的转录因子而促进COX-2基因的转录的, 我们推测PD-ECGF与COX-2之间可能也存在某种中间途径, 最终相互激活、促进转录和翻译过程, 但究竟经过哪种中间途径, 尚需进一步研究。PD-ECGF具胸苷磷酸化酶活性, 可降低抑制内皮细胞的胸苷水平而促进血管生成, 其代谢产物也有趋化内皮细胞和促血管生成作用, COX-2可能通过PGs表达途径促血管生成, 二者对胃癌微血管生成有协同作用, 他们自身及其代谢产物之间有怎样的关系, 或是通过中间环节相互作用以及他们对胃癌细胞凋亡的相互作用机制, 还需要我们在以后的研究中进一步探讨。

4 参考文献

- 1 Folkman J, Cotran R. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int Rev Exp Pathol* 1976;16:207-248
- 2 Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, Kitada S, Reed JC. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol* 1996;148:1567-1576
- 3 Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36:169-180
- 4 Akiyama S. Thymidine phosphorylase and angiogenesis. *Gan To Kagaku Ryoho* 2000;27:1208-1211
- 5 Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, Sumizawa T, Furukawa T, Yamada K, Akiyama S, Yamada Y. Angiogenic activity of enzymes. *Nature* 1994;368:198
- 6 Sengupta S, Sellers LA, Matheson HB, Fan TP. Thymidine phosphorylase induces angiogenesis *in vivo* and *in vitro*: an evaluation of possible mechanisms. *Br J Pharmacol* 2003;139:219-231
- 7 Morinaga S, Yamamoto Y, Noguchi Y, Imada T, Rino Y, Akaike M, Sugimasa Y, Takemiya S, Takanashi Y. Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) is up-regulated in human hepatocellular carcinoma (HCC) and the corresponding hepatitis liver. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1521-1526
- 8 Yang Q, Barbareschi M, Mori I, Mauri F, Muscara M, Nakamura M, Nakamura Y, Yoshimura G, Sakurai T, Caffo O, Galligioni E, Dalla Palma P, Kakudo K. Prognostic value of thymidine phosphorylase expression in breast carcinoma. *Int J Cancer* 2002;97:512-517
- 9 Tominaga T, Toi M, Ohashi Y, Abe O. Prognostic and predictive value of thymidine phosphorylase activity in early-stage breast cancer patients. *Clin Breast Cancer* 2002;3:55-64
- 10 Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N. Thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in colorectal carcinoma and patients prognosis. *Langenbecks Arch Surg* 2002;387:240-245
- 11 Sato J, Sata M, Nakamura H, Inoue S, Wada T, Takabatake N, Otake K, Tomoike H, Kubota I. Role of thymidine phosphorylase on invasiveness and metastasis in lung adenocarcinoma. *Int J Cancer* 2003;106:863-870
- 12 Yoshikawa T, Suzuki K, Kobayashi O, Sairenji M, Motohashi H, Tsuburaya A, Nakamura Y, Shimizu A, Yanoma S, Noguchi Y. Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor is upregulated in advanced solid types of gastric cancer. *Br J Cancer* 1999;79:1145-1150
- 13 Matsushita S, Nitanda T, Furukawa T, Sumizawa T, Tani A, Nishimoto K, Akiba S, Miyadera K, Fukushima M, Yamada Y, Yoshida H, Kanzaki T, Akiyama S. The effect of a thymidine phosphorylase inhibitor on angiogenesis and apoptosis in tumors. *Cancer Res* 1999;59:1911-1916
- 14 Osaki M, Sakatani T, Okamoto E, Goto E, Adachi H, Ito H. Thymidine phosphorylase expression results in a decrease in apoptosis and increase in intratumoral microvessel density in human gastric carcinomas. *Virchows Arch* 2000;437:31-36
- 15 Ikeda R, Furukawa T, Kitazono M, Ishitsuka K, Okumura H,

- Tani A, Sumizawa T, Haraguchi M, Komatsu M, Uchimiya H, Ren XQ, Motoya T, Yamada K, Akiyama S. Molecular basis for the inhibition of hypoxia-induced apoptosis by 2-deoxy-D-ribose. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;291:806-812
- 16 Mori S, Takao S, Ikeda R, Noma H, Mataki Y, Wang X, Akiyama S, Aiko T. Role of thymidine phosphorylase in Fas-induced apoptosis. *Hum Cell* 2001;14:323-330
- 17 Kubota T, Sasano N, Abe O, Nakao I, Kawamura E, Saito T, Endo M, Kimura K, Demura H, Sasano H. Potential of the histoculture drug-response assay to contribute to cancer patient survival. *Clin Cancer Res* 1995;1:1537-1543
- 18 Sung YK, Hwang SY, Kim JO, Bae HI, Kim JC, Kim MK. The correlation between cyclooxygenase-2 expression and hepatocellular carcinogenesis. *Mol Cells* 2004;17:35-38
- 19 Sinicrope FA, Gill S. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:63-75
- 20 Hashimoto Y, Kondo Y, Kimura G, Matsuzawa I, Sato S, Ishizaki M, Imura N, Akimoto M, Hara S. Cyclooxygenase-2 expression and relationship to tumour progression in human renal cell carcinoma. *Histopathology* 2004;44:353-359
- 21 Shiotani H, Denda A, Yamamoto K, Kitayama W, Endoh T, Sasaki Y, Tsutsumi N, Sugimura M, Konishi Y. Increased expression of cyclooxygenase-2 protein in 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinomas and chemopreventive efficacy of a specific inhibitor, nimesulide. *Cancer Res* 2001;61:1451-1456
- 22 Yamagata R, Shimoyama T, Fukuda S, Yoshimura T, Tanaka M, Munakata A. Cyclooxygenase-2 expression is increased in early intestinal-type gastric cancer and gastric mucosa with intestinal metaplasia. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002;14:359-363
- 23 Murata H, Kawano S, Tsuji S, Tsuji M, Sawaoka H, Kimura Y, Shiozaki H, Hori M. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1999;94:451-455
- 24 Fosslien E. Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 2001;31:325-348
- 25 Nagai N, Tian X, Mukai K, Hirata E, Kusuda T, Shiroyama Y, Shigemasa K, Ohama K. Overexpression of cyclooxygenase-2 protein and its relationship to apoptosis in cervical carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Int J Mol Med* 2003;12:709-714
- 26 Wang HX, Chen QK. Expression and significance of cyclooxygenase-2 in human pancreatic carcinomas. *Ai Zheng* 2003;22:649-652
- 27 Kawai N, Tsujii M, Tsuji S. Cyclooxygenases and colon cancer. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002;68-69:187-196
- 28 Kirschenbaum A, Liu X, Yao S, Levine AC. The role of cyclooxygenase-2 in prostate cancer. *Urology* 2001;58(2 Suppl 1):127-131
- 29 Becerra C. Cox-2 inhibition for the treatment of colon cancer. *Int J Cancer* 2004;110:310
- 30 Wang D, Dubois RN. Cyclooxygenase-2: a potential target in breast cancer. *Semin Oncol* 2004;31(1 Suppl 3):64-73
- 31 Lin DW, Nelson PS. The role of cyclooxygenase-2 inhibition for the prevention and treatment of prostate carcinoma. *Clin Prostate Cancer* 2003;2:119-126
- 32 Altorki N. COX-2: a target for prevention and treatment of esophageal cancer. *J Surg Res* 2004;117:114-120
- 33 Fujiwaki R, Iida K, Kanasaki H, Ozaki T, Hata K, Miyazaki K. Cyclooxygenase-2 expression in endometrial cancer: correlation with microvessel count and expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase. *Hum Pathol* 2002;33:213-219
- 34 Herschman HR. Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1996;1299:125-140
- 35 Eda H, Fujimoto K, Watanabe S, Ura M, Hino A, Tanaka Y, Wada K, Ishitsuka H. Cytokines induce thymidine phosphorylase expression in tumor cells and make them more susceptible to 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Cancer Chemother Pharmacol* 1993;32:333-338
- 36 Griffiths L, Dachs GU, Bicknell R, Harris AL, Stratford II. The influence of oxygen tension and pH on the expression of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase in human breast tumor cells grown *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 1997;57:570-572
- 37 Schmedtje JF Jr, Ji YS, Liu WL, Dubois RN, Runge MS. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF- κ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1997;272:601-608
- 38 Slice LW, Hodikian R, Zhukova E. Gastrin and EGF synergistically induce cyclooxygenase-2 expression in Swiss 3T3 fibroblasts that express the CCK2 receptor. *J Cell Physiol* 2003;196:454-463
- 39 Di Popolo A, Memoli A, Apicella A, Tuccillo C, di Palma A, Ricchi P, Acquaviva AM, Zarrilli R. IGF-II/IGF-I receptor pathway up-regulates COX-2 mRNA expression and PGE2 synthesis in Caco-2 human colon carcinoma cells. *Oncogene* 2000;19:5517-5524

胃腺癌组织学异质性与淋巴结转移程度相关

刘丽江,舒细记,镇鸿燕,邱晓东,邓昊,周红艳,张应天

刘丽江,舒细记,镇鸿燕,邱晓东,邓昊,周红艳,江汉大学医学与生命科学院病理学与病生理学教研室,湖北省武汉市 430056
张应天,江汉大学医学与生命科学院外科学教研室,湖北省武汉市 430015
刘丽江,女,1955-09-20生,山东省博兴县人,汉族。1982年武汉市职工医学院本科毕业,教授,主要从事胃癌的临床病理研究。
武汉市重大科技项目资助, No. 20025007170
项目负责人: 刘丽江, 430056, 湖北省武汉市, 江汉大学医学与生命科学院病理学与病生理学教研室. liulijiang@netease.com
电话: 027-84226503 传真: 027-84226503
收稿日期: 2003-11-18 接受日期: 2004-01-08

Correlation of histological heterogeneity and lymph node metastasis in gastric adenocarcinoma

Li-Jiang Liu, Xi-Ji Shu, Hong-Yan Zhen, Xiao-Dong Qiu, Hao Deng, Hong-Yan Zhou, Ying-Tian Zhang

Li-Jiang Liu, Xi-Ji Shu, Hong-Yan Zhen, Xiao-Dong Qiu, Hao Deng, Hong-Yan Zhou, Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicines and Life Sciences, Jianghan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China
Ying-Tian Zhang, Department of Surgery, School of Medicines and Life Sciences, Jianghan University, Wuhan 430015, Hubei Province, China
Supported by the Science and Technology Foundation of Wuhan, No. 20025007170
Correspondence to: Dr. Li-Jiang Liu, Jianghan University, Wuhan 430056, Hubei Province, China. liulijiang@netease.com
Received: 2003-11-18 Accepted: 2004-01-08

Abstract

AIM: To study the possible correlation between the intratumor histological heterogeneity and degree of lymph node metastasis in gastric adenocarcinoma and to explore the clinical significance of histological heterogeneity in gastric adenocarcinoma.

METHODS: Tumor specimens were collected from 138 gastric adenocarcinoma cases in which lymph nodes were also checked. All tumor specimens were consecutively cut into serial sections and examined by microscope. The intratumor histological heterogeneity was defined by finding of at least two histological subtypes. Total number of metastatic lymph nodes was counted. And staging was conducted according to the classification of UICC/AJCC standard. The N stage distributions of intratumor histological heterogeneity were examined and compared.

RESULTS: The incidence of intratumor histological heterogeneity was 58.7% in 138 specimens of gastric adenocarcinoma. It was two-subtype histological heterogeneity that were found in most positive specimens (69/81, 85%). More than half of them were of glandular plus poorly differential types (42/69, 60.9%). A total of 8568 lymph nodes were found in 138 cases (average 62.1). 33 cases of N₀, 36 N₁, 29 N₂ and 40 N₃ were identified according to the N classification of UICC/AJCC standard. Intratumor histo-

logical heterogeneity was found in 36% of the N₀ group and 80% of N₃ group. Distribution of intratumor histological heterogeneity displayed difference among the N stages, which was of high statistical significance ($\chi^2=14.86$, P < 0.001). When classified through the currently prevailing method, however, the 138 sample cases of gastric adenocarcinoma presented no significant pertinence to lymph nodes metastasis and its magnitude ($\chi^2=5.24$, P > 0.05).

CONCLUSION: The intratumor histological heterogeneity can be seen as a frequent event in gastric adenocarcinoma (58%). Intratumor histological heterogeneity is found evidently correlated with lymph node metastasis in gastric adenocarcinoma.

Liu LJ, Shu XJ, Zhen HY, Qiu XD, Deng H, Zhou HY, Zhang YT. Correlation of histological heterogeneity and lymph node metastasis in gastric adenocarcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1273-1276

摘要

目的: 研究胃腺癌组织学异质性与淋巴结转移程度的关系, 探讨胃腺癌组织学异质性的临床意义。

方法: 收集 138 例胃腺癌手术切除标本, 对全部肿块进行间断连续切片后, 在光镜下检查, 以出现两种和两种以上的组织学亚型为有组织学异质性。对切除的淋巴结进行全数检查, 并按照UICC/AJCC的标准进行N分期, 比较不同的N分期中胃腺癌组织学异质性的分布。

结果: 138例胃腺癌中组织学异质性的出现率仅为58.7%。组织学异质性以同时存在两种组织学亚型者居多(69/81, 85%), 其中半数以上是管状型腺癌 + 低分化型腺癌(42/69, 60%)。138例胃腺癌检查出淋巴结 8568 个, 平均每例 62.1 个。N₀: 33 例, N₁: 36 例, N₂: 29 例, N₃: 40 例。N₀ 组中有组织学异质性的胃腺癌仅占 36%, N₃ 组中占 80%。有无组织异质性在不同的 N 分期中分布不同, 差异有显著性(χ^2 值 = 14.86, P < 0.001)。若按照占优势的组织学结构进行分型, 138 例胃腺癌与有无淋巴结转移以及淋巴结转移的程度之间并无以上关系(χ^2 值 = 5.24, P > 0.05)。

结论: 胃腺癌的组织学异质性常见, 出现率为58%。胃腺癌组织学异质性与淋巴结转移有明显的关系。

刘丽江, 舒细记, 镇鸿燕, 邱晓东, 邓昊, 周红艳, 张应天. 胃腺癌组织学异质性与淋巴结转移程度相关. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1273-1276
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1273.asp>

0 引言

胃癌在我国常见^[1-10], 转移尤其是淋巴结转移是临床

治疗失败的重要原因之一^[11-17]. 淋巴结转移是胃癌预后的最重要指标, 胃腺癌出现组织异质性与淋巴结转移之间是否存在一定的相关性, 少有研究报告. 我们收集138例胃腺癌的8 568个淋巴结(平均每例62.1个), 以全面详实的胃腺癌肿块与淋巴结检查资料为研究对象, 探讨胃腺癌组织异质性与淋巴结转移程度之间的关系如下.

1 材料和方法

1.1 材料 我院外科1988/2003年胃腺癌手术切除标本138例. 男99例, 女39例. 年龄 57 ± 12 (中位年龄: 58岁). 96.4%的病例(133例)为胃腺癌根治性手术切除, 3.6%的病例(5例)为姑息性手术切除.

1.2 方法 肿块与淋巴结检查: 每个肿块均按每1 cm间距连续取材后全部进行显微镜下检查, 常规HE染色. 全组病例肿块最大为16 cm × 13 cm, 最小为0.3 cm × 0.3 cm, 取材镜检最多61块组织, 最少2块组织. 淋巴结经染色溶脂后获取全部切除淋巴结, 常规HE染色和免疫组织化学染色镜下判断有无淋巴结转移与微转移. 淋巴结微转移的标准参照乳腺癌等^[18], 即转移灶小于或等于0.2 mm或转移癌细胞数小于或等于50个. 淋巴结转移分期按UICC/AJCC标准^[19], N₀: 无淋巴结转移, N₁: 1-6个淋巴结转移, N₂: 7-15个淋巴结转移, N₃: 大于15个淋巴结转移. 组织学分型: 本组胃癌病例全部是腺癌, 组织学分型按照WHO标准(1990)和日本胃癌学会标准(1995)分为: 管状型腺癌、乳头状型腺癌、低分化型腺癌、黏液型腺癌和印戒细胞癌(统计学处理时将乳头状型合并到管状型组). 每例胃腺癌标本组织学类型只要出现两种或两种以上者为有组织学异质性组, 仅有两种者为无组织学异质性组.

统计学处理 使用软件SAS(8.0)及Excel 2000计算机分析统计处理, 数据进行t检验和 χ^2 检验, 以P<0.05为有统计学意义.

2 结果

2.1 本组管状型腺癌57例, 低分化腺癌59例, 黏液细胞型腺癌15例, 印戒细胞型腺癌7例(表1). 按照出现的组织学类型划分, 在138例胃腺癌中肿瘤内表现为一种组织学类型的57例, 2种组织学类型69例, 3种组织学类型10例, 4种组织学类型2例. 有组织异质性组81例, 无组织异质性组57例(图1, 2), 胃腺癌组织异质性的出现率为58.7%. 有组织异质性组中以出现两种组织类型者居多(69/81, 85.2%, 图3, 4), 其中半数以上是管状型腺癌+低分化型腺癌(42/69, 60.9%, 表2, 3).

表1 胃腺癌组织学类型与具有单一组织学类型的分布

| | 管状型(%) | 低分化型(%) | 黏液细胞型(%) | 印戒细胞型(%) | 合计(n) |
|----------|-----------|-----------|-----------|----------|-------|
| 占优势组织学类型 | 57 (42.8) | 59 (40.6) | 15 (10.9) | 7 (5.7) | 138 |
| 单一组织学类型 | 20 (34.5) | 28 (48.3) | 6 (10.3) | 4 (6.9) | 57 |

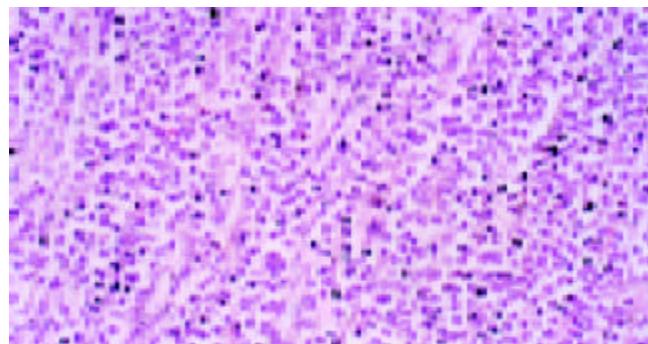


图1 胃低分化型腺癌无组织学异质性. HE × 200.

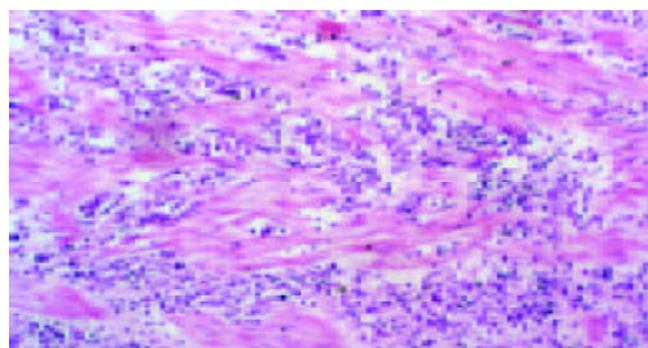


图2 无异质性的低分化型腺癌侵及肌层. HE × 200.

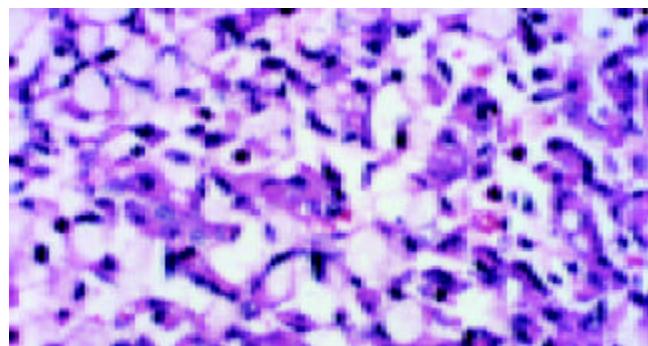


图3 低分化型 + 印戒细胞型腺癌. HE × 200.

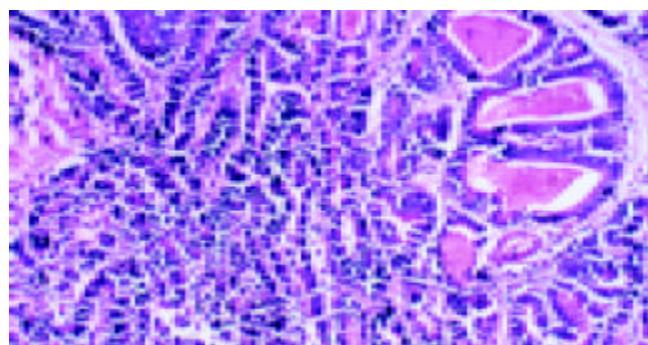


图4 管状型 + 低分化型腺癌. HE × 200.

2.2 138例胃腺癌共检查出淋巴结8 568个, 平均每例 62.1 ± 27.4 (95% CI: 57.48, 66.70). 共检查出有转移淋巴结1847个, 平均每例 13.4 ± 17.8 (95% CI: 13.38, 16.38). 共检查出淋巴结微转移256个, 平均每例 1.9 ± 3.3 (95% CI: 1.34, 2.42). 全组淋巴结检出个数(18-157

个)、淋巴结转移个数(0~96个)以及淋巴结微转移个数(0~21个)之间差幅巨大(图5). 淋巴结检出数最少18个, 最多157个; 淋巴结转移数最少1个, 最多96个; 淋巴结微转移数最少1个, 最多21个, 差距幅度巨大.

表2 胃腺癌中具有两种组织学亚型的分布

| 组织学类型(A+B) | n (%) | 以A型为主 | 以B型为主 |
|------------|-----------|-----------|-----------|
| | | n (%) | n (%) |
| 管状型+乳头状型 | 4 (5.8) | 3 (75.0) | 1 (25.0) |
| 管状型+低分化型 | 43 (62.3) | 23 (53.5) | 20 (46.5) |
| 管状型+黏液型 | 5 (7.3) | 5 (100.0) | 0 |
| 管状型+印戒细胞型 | 2 (2.9) | 1 (50.0) | 1 (50.0) |
| 低分化型+黏液型 | 4 (5.8) | 2 (50.0) | 2 (50.0) |
| 低分化型+印戒细胞型 | 6 (8.7) | 6 (100.0) | 0 |
| 黏液型+印戒细胞型 | 5 (7.3) | 3 (60.0) | 2 (40.0) |
| 合计 | 69 | 43 | 26 |

表3 胃腺癌中含有两种以上组织亚型的分布¹

| n | 低/管/印 | 低/管/粘 | 低/粘/印 | 粘/印/管 | 低/粘/管/印 | 粘/印/低/管 | 合计 |
|---|-------|-------|-------|-------|---------|---------|----|
| n | 2 | 4 | 2 | 2 | 1 | 1 | 12 |

¹ 低/管/印: 即低分化型+管状型+印戒细胞型, 依次类推.

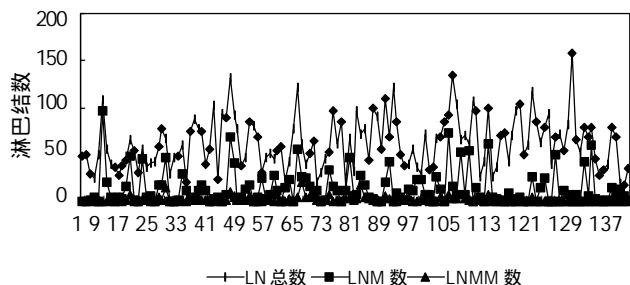


图5 胃腺癌淋巴结(LN)检出数、淋巴结转移(LNM)数以及淋巴结微转移(LNMM)数分布图.

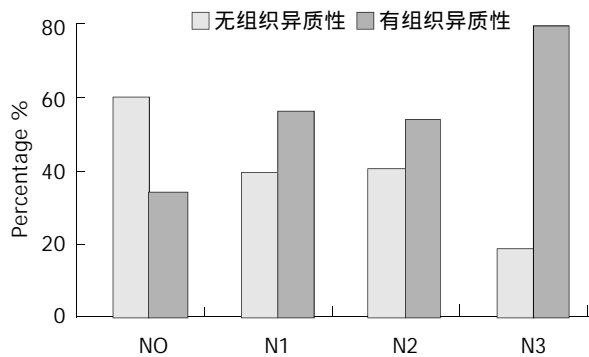


图6 胃腺癌按组织异质性与淋巴结转移个数相关.

2.3 138例中N₀33例, N₁36例, N₂29例, N₃40例. 组织异质性的出现频率随淋巴结转移个数的增加而增大, 有组织异质性的胃腺癌在无淋巴结转移(N₀)组中所占比例最低为36%, 在大于15个淋巴结转移组(N₃)最高达

80%(图6). 胃腺癌有无组织异质性在不同的N分期中分布不同, 差异有显著性(χ^2 值=14.86, P<0.001). 按占优势的组织学类型进行分组, 胃腺癌不同的组织学类型在各N分期中差别无统计学意义(χ^2 值=5.24, P>0.05). (图7).

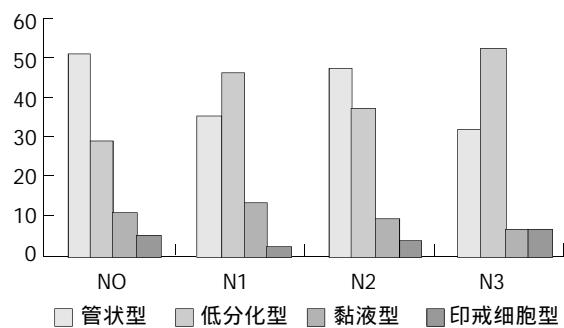


图7 胃腺癌占优势组织学类型与淋巴结转移.

2.4 胃腺癌组织有无异质性在淋巴结检出的个数之间并无差异(t =0.37, P=0.71). 但有组织异质性的胃腺癌淋巴结转移与微转移个数(平均个数)均高于无组织异质性的胃腺癌(P=0.01, 0.003; 表4).

表4 胃腺癌组织异质性与淋巴结转移数(mean±SD)的关系

| | 有组织异质性 | 无组织异质性 | t值 | P值 |
|-------|-------------|-------------|------|-------|
| 检查总数 | 62.8 ± 26.1 | 61.1 ± 29.3 | 0.37 | 0.71 |
| 转移个数 | 16.4 ± 18.6 | 9.0 ± 15.7 | 2.45 | 0.01 |
| 微转移个数 | 2.5 ± 3.8 | 0.9 ± 1.7 | 3.00 | 0.003 |

3 讨论

胃癌95%是腺癌, 组织学类型复杂多样. 不同胃癌的组织学类型不一样, 同一癌肿内也会出现不同的组织学类型, 通常以占主要成分者命名, 已为多数临床病理学家所接受. 如果不同组织学类型在一个癌肿内所占比例相似时也可以混合型命名. 但是, 按照上述的组织学分类, 其结果并不能很好地反映胃癌的生物学行为, 使组织学分型在胃癌预后中不具有重要的价值. 进展期胃癌预后不好, 5a生存率低, 影响预后最重要的原因是肿瘤的浸润的深度和有无淋巴结转移及淋巴结转移的程度^[20~27]. 组织学类型与淋巴结转移个数之间的关系, 尚未见报道.

我们对138例胃腺癌手术切除标本进行了系统地细致地观察, 采用对肿块进行间断连续取材镜下检查(肿块每间隔0.5~1cm间距进行镜检)的方法, 并对该组病例的8568个淋巴结进行了检查, 每例62.1±27.4个, 其结果发现(1)胃腺癌出现组织异质性的频率为58.7%, 虽然较为常见, 但非全部的病例. 组织异质性以出现两种组织学亚型居多(管状型与低分化型), 占85.2%(69/81); (2)胃腺癌组织异质性与淋巴结转移有明显的关系, 随淋巴结转移个数的增加, 胃腺癌组织异质性出现的频率增大, 即淋巴结转移程度越重的病例, 胃腺癌组织

学异质性也越明显($P < 0.001$)，尤其是 N_3 (15个以上淋巴结有癌转移)的病例中有80%出现组织异质性(32/40例)；(3)胃腺癌组织异质性与淋巴结微转移个数(均数)之间有一定的关系，即出现组织异质性的胃腺癌更容易找到淋巴结微转移。结果提示，胃腺癌并非全部出现组织异质性，但出现组织异质性的胃腺癌更容易发生淋巴结转移。因此，胃腺癌组织异质性的确定比以占主导地位的组织学分型更具有应用价值，尤其是对推测胃癌淋巴结转移的程度以及推测预后有一定的帮助。因为，当胃腺癌出现组织异质性时，淋巴结转移的可能性大大增加了。

胃癌淋巴结转移的程度是最重要的预后指标之一，近期UICC/AJCC对胃癌淋巴结转移的分期进行了修订，以转移个数作为N分期的标准，即 N_0 :无淋巴结转移， N_1 :1-6个淋巴结转移， N_2 :7-15个淋巴结转移， N_3 :大于15个淋巴结转移^[19]，简化了以淋巴结的解剖部位或按照距肿瘤边缘的距离进行淋巴结转移分期的标准，得到了包括日本在内的众多国家的赞同。本项研究，对根治性手术切除的胃癌病例的全数淋巴结(8502个淋巴结/138例)进行检查，在此基础之上进行了N分期，其结果确认了胃腺癌组织学异质性与淋巴结转移程度之间的关系，对胃腺癌的组织学分型具有重要的补充。我们认为在胃癌的组织学分型上应该注明有否肿瘤内的组织学异质性。

胃癌手术切除标本淋巴结的检出数存在较大的差别，本组资料中最少18个，最多157个。胃癌淋巴结转移个数也与之相似，最少转移个数1个，最多96个，差距幅度巨大。本项研究结果提示，在评价胃癌淋巴结转移程度时，均数不是很好的评价指标。

胃癌淋巴结微转移能否进入胃癌N分期，尚无一致的意见。我们确定的淋巴结微转移的标准为转移灶小于或等于0.2 mm或转移癌细胞数小于或等于50个(比AJCC/UICC确定的乳腺癌淋巴结微转移的标准尺度要严)，发现胃腺癌组织学异质性与淋巴结微转移也有一定的关系，即有组织异质性的胃腺癌更容易出现淋巴结微转移，但其临床价值还需要进一步积累病例才能做出评价。

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 Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2002;52:23-47
- 3 Hansson LE, Sparén P, Nyren O. Survival in stomach cancer is improving: results of a nationwide population-based Swedish study. *Ann Surg* 1999;230:162-169
- 4 刘婷, 王新允, 宋文静, 朱丛中, 李艳. 天津市20 a间胃恶性肿瘤发病分析. 世界华人消化杂志 2004;12:20-22
- 5 袁媛, 宫伟, 徐荣天, 王选杰, 高华, 董明, 吴烨秋, 王兰, 王梅先, 宋新军, 王法成, 姜华, 宋丽艳, 李霞, 周宝森, 张荫昌. 中国胃癌高发区庄河16村镇5万自然人口胃癌普查报告. 世界华人消化杂志 1998;6(特刊7):478
- 6 史奎雄. 胃癌的流行病学. 胃肠病学 2002;7:166-167
- 7 林三仁, 张莉. 胃癌研究的回顾与展望. 胃肠病学 2002;7:133-135
- 8 陈峻青. 我国胃癌外科治疗的反思与展视. 中国普通外科杂志 2003;12:1-2
- 9 毛伟征, 陈峻青. 东西方胃癌预后差异及其原因分析. 中国现代普通外科进展 2001;4:65-67
- 10 Zhang Y, Zhang Z. Exploration on treatment of chronic superficial gastritis and gastric precancerous with integrated Chinese and Western medicine. *World J Gastroenterol* 1998;4(Suppl 2):103
- 11 Wen CY, Nakayama T, Wang AP, Nakashima M, Ding YT, Ito M, Ishibashi H, Matsuu M, Shichijo K, Sekine I. Expression of pituitary tumor transforming gene in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:481-483
- 12 Doglietto GB, Pacelli F, Caprino P, Sgadari A, Crucitti F. Surgery: independent prognostic factor in curable and far advanced gastric cancer. *World J Surg* 2000;24:459-463
- 13 Pan W, Ishii H, Ebihara Y, Gobe G. Prognostic use of growth characteristics of early gastric cancer and expression patterns of apoptotic, cell proliferation, and cell adhesion proteins. *J Surg Oncol* 2003;82:104-110
- 14 Ding YB, Chen GY, Xia JG, Zang XW, Yang HY, Yang L, Liu YX. Correlation of tumor-positive ratio and number of perigastric lymph nodes with prognosis of patients with surgically-removed gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10:182-185
- 15 Msika S, Benhamiche AM, Jouve JL, Rat P, Faivre J. Prognostic factors after curative resection for gastric cancer. A population-based study. *Eur J Cancer* 2000;36:390-396
- 16 Yokota T, Kunii Y, Saito T, Teshima S, Narushima Y, Yamada Y, Iwamoto K, Kagami M, Takahashi M, Kikuchi S, Yamauchi H. Clinicopathologic prognostic factors in patients with Borrmann type 4 gastric cancer: univariate and multivariate analyses. *Ups J Med Sci* 2000;105:227-234
- 17 刘丽江, 镇鸿燕, 舒细记, 邱晓东, 王翠兰, 张应天. 胃癌转移与微转移淋巴结的临床病理学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1082
- 18 Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett LW, Berry D, Bland KI, Borgen PI, Clark GM, Edge SB, Hayes DF, Hughes LL, Hutter RV, Morrow M, Page DL, Recht A, Theriault RL, Thor A, Weaver DL, Wieand HS, Greene FL. Staging system for breast cancer: revisions for the 6th edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *Surg Clin North Am* 2003;83:803-819
- 19 Hayashi H, Ochiai T, Suzuki T, Shimada H, Hori S, Takeda A, Miyazawa Y. Superiority of a new UICC-TNM staging system for gastric carcinoma. *Surgery* 2000;127:129-135
- 20 Pacelli F, Papa V, Caprino P, Sgadari A, Bossola M, Doglietto GB. Proximal compared with distal gastric cancer: multivariate analysis of prognostic factors. *Am Surg* 2001;67:697-703
- 21 Adachi Y, Shiraishi N, Suematsu T, Shiromizu A, Yamaguchi K, Kitano S. Most important lymph node information in gastric cancer: multivariate prognostic study. *Ann Surg Oncol* 2000;7:503-507
- 22 Xin Y, Li XL, Wang YP, Zhang SM, Zheng HC, Wu DY, Zhang YC. Relationship between phenotypes of cell-function differentiation and pathobiological behavior of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001;7:53-59
- 23 Shiraishi N, Adachi Y, Kitano S, Bandoh T, Inomata M, Yasuda K, Tsuchihashi J, Kinukawa N. Gastric cancer with extragastric lymph node metastasis: multivariate prognostic study. *Gastric Cancer* 2000;3:211-218
- 24 Shimada S, Yagi Y, Honmyo U, Shiromori K, Yoshida N, Ogawa M. Involvement of three or more lymph nodes predicts poor prognosis in submucosal gastric carcinoma. *Gastric Cancer* 2001;4:54-59
- 25 Adachi Y, Shiraishi N, Inomata M, Yasuda K, Hirabayashi Y, Kitano S. Location of tumor and distribution of lymph node metastasis in gastric cancer: lesser curve or greater curve. *Int J Surg Investig* 2000;1:517-523
- 26 Matsuzaki H, Kikuchi S, Kakita A. Evaluation of the morphology of submucosal tumor invasion and its volume in early gastric cancer. *In Vivo* 2003;17:41-44
- 27 Nitti D, Marchet A, Olivieri M, Ambrosi A, Mencarelli R, Bellucco C, Lise M. Ratio between metastatic and examined lymph nodes is an independent prognostic factor after D2 resection for gastric cancer: analysis of a large European monoinstitutional experience. *Ann Surg Oncol* 2003;10:1077-1085

α干扰素对人高转移肝癌细胞系 HCCLM3 血管形成因子表达的影响

赵铭锋, 王鲁, 许祖德, 赵燕, 汤钊猷

赵铭锋, 复旦大学附属华山医院外科病理室 上海市 200040
王鲁, 赵燕, 汤钊猷, 复旦大学中山医院肝癌研究所 上海市 200032
许祖德, 复旦大学上海医学院病理学系 上海市 200032
赵铭锋, 男, 1974-11-08生, 山东省滨州市人, 汉族, 2001年复旦大学附属华山医院病理学硕士
国家自然科学基金资助项目, No. 30100077; 上海市科技发展基金资助项目, No. 03QD14008; 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项基金资助项目, No. 200263
项目负责人: 王鲁, 200032, 上海市医学院路136号, 复旦大学中山医院肝癌研究所。wlu@zshospital.net
电话: 021-54233058
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-09

Effects of IFN- α on expression of angiogenic factors in highly metastatic human hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3 cells

Ming-Feng Zhao, Lu Wang, Zu-De Xu, Yan Zhao, Zhao-You Tang

Ming-Feng Zhao, Department of Surgical Pathology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China
Lu Wang, Yan Zhao, Zhao-You Tang, Liver Cancer Institute and Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China.
Zu-De Xu, Department of Pathology, Fudan University, Shanghai 200032, China
Supported by the Natural Scientific Foundation of China, No. 30100077
Correspondence to: Wang Lu, Liver Cancer Institute and Zhongshan Hospital, Fudan University, 136 Yixueyuan Road, Shanghai 200032, China. wlu@zshospital.net
Received: 2003-12-10 Accepted: 2004-02-09

Abstract

AIM: To study the effects of IFN- α on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and IL-8 in human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line HCCLM3 cells and to explore the mechanism of antiangiogenic activity of IFN- α .

METHODS: The HCCLM3 cells were incubated for 72 h in high glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (GibcoBRL, NY) or the medium containing different doses of IFN- α (30, 300 or 3 000 KU/L). The concentrations of VEGF, bFGF, MMP-2, MMP-9 and IL-8 in cell culture supernatants were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: IFN- α treatment significantly decreased the expression of VEGF and MMP-2 in HCCLM3 cells. The concentrations of VEGF, MMP-2, bFGF, and IL-8 were $2\ 666.0 \pm 122.6$, $4\ 400 \pm 1\ 000$, 28.0 ± 5.1 and $1\ 160.0 \pm 69.4$ ng/L respectively in the control group, whereas those of VEGF, MMP-2, bFGF, and IL-8 were $2\ 476.5 \pm 125.7$

($P < 0.05$), $2\ 400 \pm 600$ ($P < 0.01$), 25.8 ± 1.6 and $1\ 079 \pm 5$ ng/L when the concentration of IFN- α was 300 KU/L. But MMP-9 protein was not detected in all the groups.

CONCLUSION: IFN- α treatment significantly inhibits the expression of VEGF and MMP-2 in HCCLM3 cells in a dose-dependent manner. However, no significant difference is found in the levels of bFGF, IL-8 and MMP-9 among the control and the groups of different doses of INF- α ranging from 30-3 000 KU/L. The down-regulation of VEGF and MMP-2 levels contributes, at least in part, to the antiangiogenic activity of IFN- α .

Zhao MF, Wang L, Xu ZD, Zhao Y, Tang ZY. Effects of IFN- α on expression of angiogenic factors in highly metastatic human hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004; 12(6):1277-1279

摘要

目的: 研究IFN- α 对高转移潜能的人肝癌细胞系HCCLM3细胞血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和白介素-8(IL-8)表达的影响, 探索IFN- α 抗肿瘤血管形成的机制。

方法: 将HCCLM3细胞在高糖DMEM培养液(Dulbecco's modified Eagle medium)和加入了不同剂量(30, 300或3 000 KU/L)IFN- α 的DMEM培养液中孵育72 h. ELISA法检测IFN- α 干预组与对照组(未加入IFN- α)中VEGF, bFGF, MMP-2, MMP-9和IL-8的表达情况。

结果: HCCLM3细胞空白对照组中VEGF, MMP-2, bFGF和IL-8的表达浓度分别为 $2\ 666 \pm 122.6$, $4\ 400 \pm 1\ 000$, 28.0 ± 5.1 和 $1\ 160 \pm 69.4$ ng/L. 同时IFN- α 为300 KU/L时, VEGF, MMP-2, bFGF和IL-8的浓度分别为 $2\ 476.5 \pm 125.7$ ($P < 0.05$), $2\ 400 \pm 600$ ($P < 0.01$), 25.8 ± 1.6 和 $1\ 079 \pm 5$ ng/L; IFN- α 为3 000 KU/L时, VEGF, MMP-2, bFGF和IL-8的浓度分别为 $2\ 289.5 \pm 119.5$ ($P < 0.01$), $2\ 000 \pm 500$ ($P < 0.01$), 25.1 ± 2.9 和 $1\ 087.9 \pm 83.9$ ng/L. 各组中均未检测到MMP-9的表达。

结论: IFN- α 对HCCLM3细胞VEGF和MMP-2蛋白的表达均具有明显的抑制作用, 并呈剂量依赖性. bFGF, IL-8和MMP-9的表达浓度在IFN- α 各剂量组与对照组间无

显著性差别。IFN- α 对肝癌细胞中VEGF和MMP-2表达水平的下调在其抗肝癌血管形成机制中发挥重要作用。

赵铭锋, 王鲁, 许祖德, 赵燕, 汤钊猷。 α 干扰素对人高转移肝癌细胞系HCCLM3血管形成因子表达的影响。世界华人消化杂志 2004;12(6):1277-1279
http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1277.asp

0 引言

肝癌在我国常见^[1-2], 大剂量长疗程的IFN- α 可剂量依赖性的抑制裸鼠人肝癌转移模型(LCI-D20)肿瘤的转移复发和肿瘤生长, 临床随机对照临床试验也证实IFN- α 可提高肝癌切除术后3 a无瘤生存率10%^[3]。在裸鼠角膜接种LCI-D20肝癌组织后, 可诱导角膜形成新生血管, 应用IFN- α 治疗后, 肿瘤血管形成受到明显抑制^[4]; IFN- α 还可有效的抑制血管内皮细胞的增生和迁移^[4-5]。这些结果提示抗肝癌血管形成是IFN- α 作用的主要机制。我们利用自发性肺转移人肝癌细胞系HCCLM3细胞, 检测IFN- α 干预后血管形成因子VEGF, bFGF, MMP-2, MMP-9, IL-8的表达水平, 探索IFN- α 的抗肝癌血管形成机制。

1 材料和方法

1.1 材料 使用复旦大学肝癌研究所建立的自发性肺转移人肝癌细胞系HCCLM3细胞^[6]。IFN- α 1b购自深圳科兴生物制品有限公司。VEGF, bFGF, MMP-9和IL-8 ELISA试剂盒购自R&D公司, MMP-2 ELISA试剂盒购自Oncogene公司。

1.2 方法 取 1×10^6 HCCLM3细胞在 25 cm^2 培养瓶中培养, 加高糖DMEM培养液(Giboco)7 mL, 在 37°C , 50 mL/L CO_2 条件下, 培养6 h, 待细胞贴壁后分别加入剂量为30, 300, 3 000 kU/L的IFN- α 并换液, 对照组中不加IFN- α 。72 h后提取上清液, 1000 g 离心10 min, 去除所含微粒, 分装后贮存于 -20°C 待用。血管形成因子表达量的测定采用夹心式酶联免疫测定技术(ELISA法), 试验步骤按说明书操作。根据标准曲线计算各标本中5种细胞因子浓度值。

统计学处理 试验数据以均数 \pm 标准差($n=5$, mean \pm SD)表示, 采用SPSS11.5软件包One-Way ANOVA方法对资料进行统计分析, 两两比较采用最小显著性差数法(LSD)。P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 上清液VEGF和bFGF蛋白浓度 对HCCLM3细胞培养72 h后的上清液进行ELISA法测定, 各IFN- α 干预组(30, 300和3 000 kU/L)VEGF蛋白浓度低于对照组。其中300和3 000 kU/L组与对照组比较有显著性差别(P<0.05和P<0.01, 表1)。IFN- α 为30 kU/L时, VEGF浓度降低, 但没有显著性差别(P>0.05)。各IFN- α 干预组(30, 300和3 000 kU/L)bFGF蛋白浓度与对照组比较略有降低, 但差别均没有显著性(P>0.05)。

表1 上清中VEGF, bFGF蛋白的浓度(mean \pm SD ng/L)

| IFN- α (kU/L) | VEGF | bFGF |
|----------------------|----------------------------------|----------------|
| 对照组 | 2 666.0 \pm 122.6 | 28.0 \pm 5.1 |
| 30 | 2 631.5 \pm 166.8 | 25.9 \pm 4.2 |
| 300 | 2 476.5 \pm 125.7 ^a | 25.8 \pm 1.6 |
| 3 000 | 2 289.5 \pm 119.5 ^b | 25.1 \pm 2.9 |

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs对照组。

2.2 上清液MMP-2, MMP-9和IL-8蛋白浓度 在IFN- α 剂量为300, 3 000 kU/L时, HCCLM3细胞MMP-2的表达与对照组比较明显降低, 差别具有显著性(P<0.01, 表2)。IFN- α 浓度为30 kU/L时MMP-2蛋白的表达亦有所降低, 但差别没有显著性(P>0.05)。在空白对照组和各IFN- α 干预组中均未检测到MMP-9蛋白的表达。在IFN- α 剂量为300, 3 000 kU/L时, IL-8浓度与对照组比较略有降低, 但差别没有显著性(P>0.05)。

表2 上清中MMP-2, IL-8蛋白表达(mean \pm SD ng/L)

| IFN- α (kU/L) | MMP-2 | IL-8 |
|----------------------|------------------------------|---------------------|
| 对照组 | 4 400 \pm 1 000 | 1 160.0 \pm 69.4 |
| 30 | 3 800 \pm 900 | 1 167.57 \pm 28.0 |
| 300 | 2 400 \pm 600 ^b | 1 079.00 \pm 50.0 |
| 3 000 | 2 000 \pm 500 ^b | 1 087.86 \pm 83.9 |

^bP<0.01 vs对照组。

3 讨论

肿瘤血管生成是多种血管形成因子共同作用的结果^[7-10]。肝细胞癌(HCC)癌组织中VEGF蛋白和bFGF蛋白的表达水平与微血管密度(MVD)的增高密切相关(P<0.05, P=0.0001), 并且二者在肿瘤血管形成中存在协同作用^[11-13]。MMP-2和MMP-9在肿瘤组织中的表达水平与MVD的增高密切相关以及在肝细胞癌组织中与CD34表达呈正相关, 表明二者在促进肿瘤血管形成中也发挥重要作用^[14-16]。IL-8可直接提高内皮细胞的生存能力, 促进内皮细胞增生并上调基质金属蛋白酶的表达, 进而调节血管生成^[17]。HCC是典型的多血管肿瘤^[18-19]。抗肿瘤血管生成研究在抑制肝癌的转移复发及提高术后生存率方面均具有重要意义。von Marschall et al^[20]证实IFN- α 可通过Sp1-和(或)Sp3-转录因子抑制VEGF增强子的活性, 在转录水平上降低内分泌肿瘤细胞系中VEGF基因的表达。在体内试验中IFN- α 可降低肿瘤微血管密度、VEGF mRNA水平和血浆VEGF水平发挥抗血管形成活性。Slaton et al^[21]研究表明IFN- α 可下调人膀胱癌细胞(253J B-V IFN(R)细胞)中bFGF蛋白的表达水平。

我们既往研究证实, 在裸鼠人肝癌转移模型(LCI-D20)大剂量(每日 1.5×10^7 及 $3\times10^7\text{ U/kg}$)长疗程(连续35 d)应用IFN- α , 肿瘤的肝内复发率、复发的病灶大小、肺转移率、MVD及血清VEGF水平均明显降低, 差

别具有显著性($P < 0.05$)，而与对照组比较血清中 bFGF 水平差别无显著性($P > 0.05$)^[22-23]。我们证实在体外试验中，大剂量的 IFN- α 可抑制自发性肺转移人肝癌细胞系 HCCLM3 细胞 VEGF 的表达，并呈现剂量依赖性。而对 bFGF 蛋白的表达水平无明显影响，数据与前期试验相符。但与 Slaton 的结论不一致，可能与采用不同的细胞系有关。

此外，我们还检测了 IFN- α 对 HCCLM3 细胞 MMP-2, MMP-9 的表达的影响，结果首次证实大剂量的 IFN- α 可显著下调 HCCLM3 细胞 MMP-2 的表达水平。而在各组中均未发现有 MMP-9 蛋白的表达。MMP-2 在肿瘤的生长侵袭和转移过程中主要通过降解 IV 型胶原发挥作用^[24-27]。IFN- α 对 HCCLM3 细胞 MMP-2 表达的抑制作用说明在肿瘤血管形成和肿瘤细胞浸润两个层面上 IFN- α 均发挥作用。而 HCC 中 MMP-2 mRNA 主要在肿瘤前沿浸润区的基质中表达，有学者认为肿瘤细胞通过分泌细胞因子调节基质中巨噬细胞或成纤维细胞 MMP-2 的表达。

我们还检测到 IFN- α 对 HCCLM3 细胞 IL-8 的表达具有一定的抑制作用，但数据显示差别未达到统计学意义。本结果显示，在体外培养试验中，IFN- α 对 HCCLM3 细胞 VEGF 和 MMP-2 的表达均具有明显的抑制作用，而对 bFGF 及 IL-8 的表达无明显影响。

4 参考文献

- 1 杨秉辉, 夏景林, 黄力文, 汤钊猷, 陈敏山, 李锦清, 梁安民, 莫钦国, 卢辉山, 戴朝六, 严律南, 于志坚, 饶荣生, 黎乐群, 苏智雄, 方壮伟. 我国肝癌“临床相”30年的变迁—原发性肝癌3250例的对比研究. 中华医学杂志 2003;83:1053-1057
- 2 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma—cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 3 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- 4 Wang L, Tang ZY, Qin LX, Wu XF, Sun HC, Xue Q, Ye SL. High-dose and long-term therapy with interferon-alfa inhibits tumor growth and recurrence in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma xenografts with high metastatic potential. *Hepatology* 2000;32:43-48
- 5 Giannopoulos A, Adamakis I, Evangelou K, Giannopoulou M, Zacharatos P, Zsantoulis P, Perunovic B, Athanasiou A, Retalis G, Constantidis C, Gorgoulis VG. Interferon-a2b reduces neo-microvascular density in the ‘normal’ urothelium adjacent to the tumor after transurethral resection of superficial bladder carcinoma. *Oncologie* 2003;26:147-152
- 6 李雁, 汤钊猷, 叶胜龙, 刘银坤, 陈洁, 薛琼, 黄晓武, 陈军, 鲍卫华, 杨炯, 高东梅. 体内连续筛选法建立自发性肺转移人肝癌细胞系. 中华医学杂志 2002;82:601-605
- 7 Tang YC, Li Y, Qian GX. Reduction of tumorigenicity of SMMC2721 hepatoma cells by vascular endothelial growth factor antisense gene therapy. *World J Gastroenterol* 2001;7:22-27
- 8 Qin LX, Tang ZY. The prognostic significance of clinical and pathological features in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:193-199
- 9 Kim S, Park HS, Son HJ, Moon WS. The role of angiostatin, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 9 and 12 in the angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *Korean J Hepatol* 2004;10:62-72
- 10 Saftoiu A, Ciurea T, Banita M, Georgescu C, Comanescu V, Rogoveanu I, Gorunescu F, Georgescu I. Immunohistochemical assessment of angiogenesis in primary hepatocellular carcinoma. *Rom J Gastroenterol* 2004;13:3-8
- 11 Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, Lee DG, Yu HC, Yeum JH, Koh GY, Tarnawski AS. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? *Mod Pathol* 2003;16:552-557
- 12 El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, Kohno H, Nagasue N. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1299-1305
- 13 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Huber J, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Imazu H, Fukui H. Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in murine hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:834-842
- 14 Zhang X, Yamashita M, Uetsuki H, Kakehi Y. Angiogenesis in renal cell carcinoma: Evaluation of microvessel density, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases. *Int J Urol* 2002;9:509-514
- 15 Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* 2001;61:2276-2281
- 16 洪照友, 俞金龙, 张云生, 高毅. 基质金属蛋白酶-9, CD34 的表达与肝癌侵袭转移的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:170-174
- 17 Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003;170:3369-3376
- 18 Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Yang ZF, Fan ST, Wong J. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *J Clin Oncol* 2002;20:1775-1785
- 19 Ng IO, Poon RT, Lee JM, Fan ST, Ng M, Tso WK. Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2001;116:838-845
- 20 von Marschall Z, Scholz A, Cramer T, Schafer G, Schirner M, Oberg K, Wiedenmann B, Hocker M, Rosewicz S. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:437-448
- 21 Slaton JW, Perrotte P, Inoue K, Dinney CP, Fidler IJ. Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. *Clin Cancer Res* 1999;5:2726-2734
- 22 Wang L, Wu WZ, Sun HC, Wu XF, Qin LX, Liu YK, Liu KD, Tang ZY. Mechanism of interferon alpha on inhibition of metastasis and angiogenesis of hepatocellular carcinoma after curative resection in nude mice. *J Gastrointest Surg* 2003;7:587-594
- 23 Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Qin LX, Sun HC, Ye QH, Wang L, Zhou J, Qiu SJ, Li Y, Ji XN, Liu H, Xia JL, Wu ZQ, Fan J, Ma ZC, Zhou XD, Lin ZY, Liu KD. A decade's studies on metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:187-196
- 24 Li Y, Shang P, Qian AR, Wang L, Yang Y, Chen ZN. Inhibitory effects of antisense RNA of HAb18G/CD147 on invasion of hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2003;9:2174-2177
- 25 Chantrain CF, Shimada H, Jodele S, Groshen S, Ye W, Shalinsky DR, Werb Z, Coussens LM, DeClerck YA. Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. *Cancer Res* 2004;64:1675-1686
- 26 Kumar M, Liu ZR, Thapa L, Chang Q, Wang DY, Qin RY. Antiangiogenic effect of somatostatin receptor subtype 2 on pancreatic cancer cell line: Inhibition of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 expression *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2004;10:393-399
- 27 Edwards JG, McLaren J, Jones JL, Waller DA, O'Byrne KJ. Matrix metalloproteinases 2 and 9 (gelatinases A and B) expression in malignant mesothelioma and benign pleura. *Br J Cancer* 2003;88:1553-1559

MIB-1 和 bcl-2 在肝癌及癌旁组织中的表达

周金莲, 张建中, 赵尔增, 张卫国, 吴继华

周金莲, 张建中, 赵尔增, 张卫国, 吴继华, 中国人民解放军解放军第306医院病理科 北京市 100101
周金莲, 女, 1962-12-10生, 湖南衡阳人, 汉族, 1993年湖南医科大学硕士研究生毕业, 副主任医师, 主要从事临床病理诊断。
项目负责人: 张建中, 100101, 北京市朝阳区安翔北里9号, 中国人民解放军解放军第306医院病理科。zhangjz55@sina.com.cn
电话: 010-66356237 传真: 010-64871261
收稿日期: 2004-02-27 接受日期: 2004-03-24

Expression of MIB-1 and bcl-2 in hepatocellular carcinoma and paracarcinomatous tissues

Jin-Lian Zhou, Jian-Zhong Zhang, Er-Zeng Zhao, Wei-Guo Zhang, Ji-Hua Wu

Jin-Lian Zhou, Jian-Zhong Zhang, Er-Zeng Zhao, Wei-Guo Zhang, Ji-Hua Wu, Department of Pathology, PLA 306 Hospital, Beijing 100101, China
Correspondence to: Dr. Jian-Zhong Zhang, Department of Pathology, PLA 306 Hospital, Beijing 100101, China. Zhangjz55@sina.com.cn
Received: 2004-02-27 Accepted: 2004-03-24

Abstract

AIM: To investigate the effects of MIB-1 and bcl-2 proteins expression in the primary hepatocellular carcinoma (HCC) and their paracarcinomatous tissues.

METHODS: The expression of MIB-1 and bcl-2 proteins was evaluated in paraffin-embedded tissue by immunohistochemical techniques (S-P) in 40 cases of hepatocellular carcinoma.

RESULTS: The positive expression of MIB-1 was located in nucleus. The mean MIB-1 positive rate in HCCs was $27.61 \pm 13.26\%$, while MIB-1 positive cells in paracarcinomatous tissues were $1.24 \pm 1.67\%$ ($P < 0.001$). The expression of MIB-1 in HCCs was related to the cancer grading, the lower the differentiation of HCCs, the higher the MIB-1 proliferation index ($P < 0.01$). As for the paracarcinomatous tissues the MIB-1 proliferation index of small liver cell dysplasia (LCD) was higher than that of its adjacent liver tissue. However, in larger cell LCD, the MIB-1 index had no significant difference compared with that of its adjacent tissue. The positive rates of bcl-2 in cancer and paracarcinomatous tissues were 17.5% (7/40) and 77.5% (31/40) respectively. The bcl-2 expression was located in cytoplasm and its positive signals were strong and cluster-like in paracarcinomatous tissues, while the number of the bcl-2 positive cell was sporadic and the signals were weak and "piece-meal like" in HCCs.

CONCLUSION: This study shows that the MIB-1 proliferation index reflects the proliferation speed and the degree of anaplasia in HCCs. The higher expression of MIB-1 in small cell LCD suggests that its proliferation is faster than that of large cell LCD and their adjacent liver tissues, so

the small cell LCD is more approximate to HCCs. The study also shows that bcl-2 may not directly play a role in liver cell proliferation during the processes of liver cell carcinogenesis, but it may take part in liver cell apoptosis regulated by the reduction of bcl-2 protein level.

Zhou JL, Zhang JZ, Zhao EZ, Zhang WG, Wu JH. Expression of MIB-1 and bcl-2 in hepatocellular carcinoma and paracarcinomatous tissues. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1280-1283

摘要

目的: 探讨肝癌及癌旁组织中MIB-1和bcl-2的表达及意义。

方法: 采用S-P法对40例肝细胞癌及癌旁组织进行MIB-1和bcl-2免疫组化染色, 并作HE染色, 进行肝癌组织学分级(I-IV级, Edmondson-Kondo标准)和癌旁肝细胞结构不良分类(大细胞LCD和小细胞LCD, Anthony-Watanabe标准)。

结果: (1)40例肝细胞癌I级3例, II级20例, III级13例, IV级4例; 癌旁有肝硬化改变者32例, 3例有纤维化, 10例呈气球样变和/或碎屑状坏死病变, 大细胞LCD和小细胞LCD改变者各12例, 上述改变常多种同时混合存在; (2)肝癌组织中MIB-1均呈核阳性, MIB-1平均增生指数为 $27.61 \pm 13.26\%$, 而癌旁肝细胞阳性者甚少, 增生指数 $1.24 \pm 1.67\%$, 差异十分显著($P < 0.001$)。肝癌MIB-1表达与其分级有关, 分化越差, 增生指数越高($P < 0.01$)。癌旁组织中小细胞性LCD的MIB-1增生指数明显高于大细胞LCD、气球样变和正常肝组织; (3)癌旁bcl-2阳性率为77.5% (31/40), 呈簇状和或片状分布, 癌组织中bcl-2阳性率为17.5% (7/40), 且阳性细胞数较癌旁少得多, 多数呈碎点状; (4)癌组织bcl-2阳性病例的MIB-1增生指数与癌组织bcl-2阴性者的MIB-1增生指数无明显区别。

结论: (1)MIB-1表达可反映肝癌细胞的增生及恶性程度; (2)小细胞LCD中MIB-1高表达提示其比大细胞LCD、气球样变和正常肝组织增生活跃, 发展为癌的可能性大; (3)bcl-2在肝细胞癌变过程中所起的作用可能不是直接引起细胞增生, 而是通过表达水平下降参与肝癌细胞的凋亡调控。

周金莲, 张建中, 赵尔增, 张卫国, 吴继华. MIB-1 和 bcl-2 在肝癌及癌旁组织中的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1280-1283

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1280.asp>

0 引言

近年来, 随着细胞凋亡概念的确立, 人们对肿瘤的发

生和发展产生了新的认识。肿瘤发生不仅与细胞过度增生有关, 也与细胞凋亡减少有关。MIB-1(Ki-67)是检测细胞增生活力的有效客观指标, 能反映肿瘤细胞增生水平和肿瘤分化程度^[1-7]。抗凋亡基因 bcl-2 是从 B 淋巴细胞中首先分离出的一种原癌基因, 其产物可抑制淋巴细胞的凋亡过程, 导致肿瘤的发生。现在已知 bcl-2 在一些非淋巴组织中也发挥类似作用, 被认为是广义的抗凋亡癌基因^[8-21]。本研究采用免疫组织化学方法检测肝癌及癌旁组织中 MIB-1 及 bcl-2 蛋白表达, 旨在探讨其与肝细胞癌发生、发展的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 自中国人民解放军第 306 医院病理科档案材料手术切除的肝癌标本 40 例, 用甲醛固定, 常规组织处理, 石蜡包埋, 4 μm 厚切片, 全部病例作 HE 染色。40 例肝癌标本均带有癌旁组织。

1.2 免疫组化标记 MIB-1 和 bcl-2 单克隆抗体及 S-P 试剂盒系 Santa Cruz 公司产品。切片经常规脱蜡至水后, 3% H₂O₂ 处理 10 min。将切片放入盛有 0.01 M 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)的容器中, 置微波炉内加热, 温度保持 92-98 ℃持续 10 min, 室温冷却, PBS 洗涤。第一抗体(MIB-1 1:1 000, bcl-2 1:100) 4 ℃孵育过夜, 然后经 S-P 试剂盒染色, DAB 显色, 苏木素复染, 封片。用扁桃体组织作阳性对照, 磷酸盐缓冲液(PBS)代替第一抗体作阴性对照。

1.3 HE 切片观察指标 肝癌组织学分级采用 Edmondson-Kondo 标准^[22]。LCD 采用 Anthony-Watanabe^[23-24] 形态标准。

1.4 MIB-1 阳性细胞半定量计数方法 MIB-1 以核内有明显的棕色颗粒为阳性。每张切片的癌和癌旁组织各随机计数 5 个高倍镜视野, 每个视野数 100 个肝癌细胞或肝细胞。结缔组织细胞和增生的小胆管细胞不计。切片边缘视野不计, 以排除“边缘效应”的干扰。取 5 个高倍视野 500 个细胞的平均 MIB-1 阳性细胞百分率作为 MIB-1 指数。计数癌旁 LCD 的 MIB-1 指数时, 从每个病灶中选取典型的高倍镜视野, 共数 100 或 200 个细胞, 取平均值。计算 LCD 周围正常肝细胞 MIB-1 阳性率时, 固定计算其右侧一个高倍镜视野不足 100 个细胞时则以顺时针方向扩大视野。

1.5 bcl-2 阳性评价标准 少于 1% 细胞着色为阴性(-), 1-50% 细胞阳性为弱阳性(+), 50-70% 细胞阳性为中度阳性(++) , 75% 以上细胞阳性为强阳性(+++).

统计学处理 分析肝癌分级与 MIB-1 阳性率的关系采用 Student's t 检验统计学处理, 以 P <0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色切片观察 40 例肝癌按上述 Edmondson-Kondo 标准进行分级, 结果为: I 级 3 例, II 级 20 例,

III 级 13 例, IV 级 4 例。40 例肝癌中癌旁有肝硬化改变者 32 例, 3 例有纤维化, 10 例呈气球样变和/或碎屑状坏死病变, 大细胞 LCD 和小细胞 LCD 改变者各 12 例, 上述改变常多种同时混合存在。

2.2 MIB-1 免疫组化结果分析 40 例肝癌组织中 MIB-1 均呈核阳性, 阳性信号分布于整个细胞核, 各切片中阳性的发生率、分布和染色强度均不一致。

2.2.1 MIB-1 指数与肝癌分级的关系 40 例肝癌各级平均 MIB-1 阳性细胞百分比为: 肝癌 I 级的 MIB-1 阳性细胞数占 12.1 ± 2.8%, II 级为 18.6 ± 6.4%(图 1), III 级为 36.8 ± 8.9%(图 2), IV 级为 54.50 ± 20.3%。将分化较好的肝癌(I 级与 II 级)与分化较差者(III 和 IV 级)进行比较, MIB-1 表达有明显的差别, 前者 MIB-1 指数为 17.6 ± 5.25%, 后者为 40.9 ± 15.2% (t = 6.052, P <0.01)。

2.2.2 癌与癌旁组织 MIB-1 结果比较 肝癌组织中 MIB-1 平均增生指数为 27.61 ± 13.26%, 而癌旁肝细胞阳性者甚少, 增生指数 1.24 ± 1.67%。癌组织 MIB-1 指数与癌旁组织 MIB-1 指数有非常明显的差异(t = 12.474, P <0.001)。

2.2.3 癌旁 LCD 与其周围正常组织 MIB-1 表达的比较 本组标本癌旁组织中小细胞 LCD 灶和大细胞 LCD 灶各有 12 例, 每例的 LCD 灶数目不等, 共有 36 个小细胞 LCD 灶和 12 个大细胞 LCD 灶可供分析。大细胞 LCD 平均 MIB-1 指数为 0.2 ± 0.17%, 其周围正常肝组织为 0.4 ± 0.23%, 二者无显著性差异(P >0.05)。小细胞 LCD 平均 MIB-1 百分比为 2.4 ± 1.89%, 而其周围正常肝组织为 1.0 ± 1.24%, 二者有显著性差异(t = 3.917, P <0.05), 显示小细胞 LCD 的增生较为活跃。

2.3 bcl-2 免疫组化结果 肝癌及癌旁肝组织中 bcl-2 阳性反应产物主要位于细胞胞质内, 呈棕黄色细颗粒状, 染色强度深浅不一, 分布亦不规则, 无核阳性。癌旁肝组织中 bcl-2 阳性信号绝大多数充满细胞质, 染色深, 且阳性细胞呈簇状或大片状分布(图 3)。癌组织 bcl-2 阳性切片中, bcl-2 信号稀少, 为碎点状撒落于胞质, 与癌旁阳性表现明显不同(图 4)。癌旁肝硬化组织小胆管细胞质阳性, 新生的假胆管强表达。所有病例中间质淋巴细胞染色阳性。40 例标本中癌旁 bcl-2 阳性者 31 例(77.5%), 癌组织中 bcl-2 阳性者 7 例(17.5%), 此 7 例癌旁组织亦阳性, 没有单独癌组织阳性而癌旁阴性者。31 例癌旁阳性者, 其中 13 例轻度阳性, 11 例中度阳性, 7 例强阳性。而 7 例癌组织阳性切片中阳性信号均呈轻度阳性反应。统计表明癌组织 bcl-2 表达低于癌旁组织, 有显著性差异($\chi^2 = 26.53$, P <0.005)。

2.4 癌组织中 MIB-1 与 bcl-2 的关系 7 例 bcl-2 阳性表达病例由 MIB-1 代表的细胞增生指数为 24.61 ± 6.51%, 33 例 bcl-2 阴性病例由 MIB-1 代表的细胞增生指数为 23.69 ± 4.74%, 两组比较无明显差异(P >0.05)。

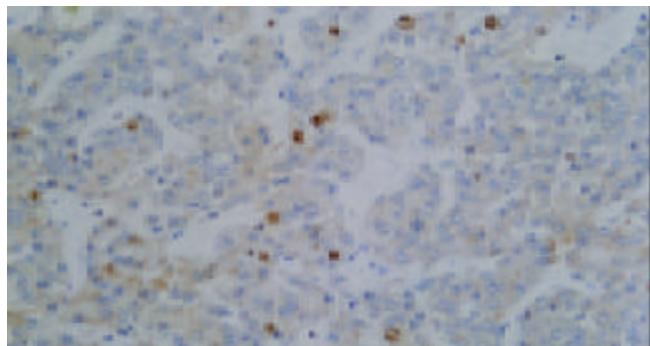


图1 II级肝癌的MIB-1表达情况.×200.

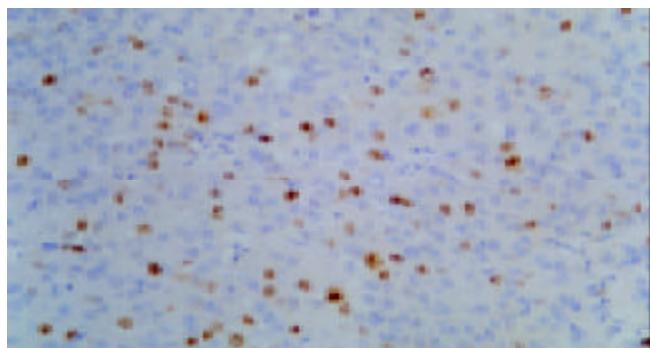


图2 III级肝癌的MIB-1表达情况.×200.

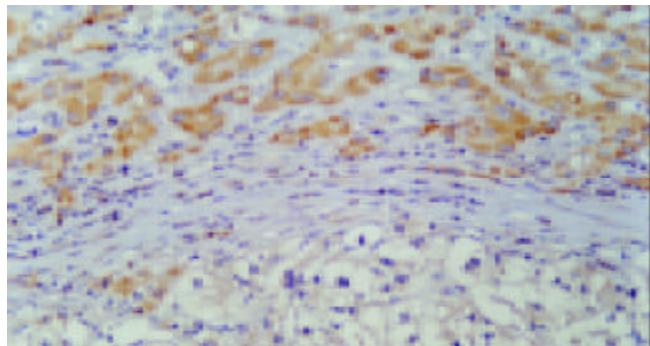


图3 癌旁Bcl-2阳性,阳性信号充满胞质,呈大片状分布;癌组织中Bcl-2阴性.×200.

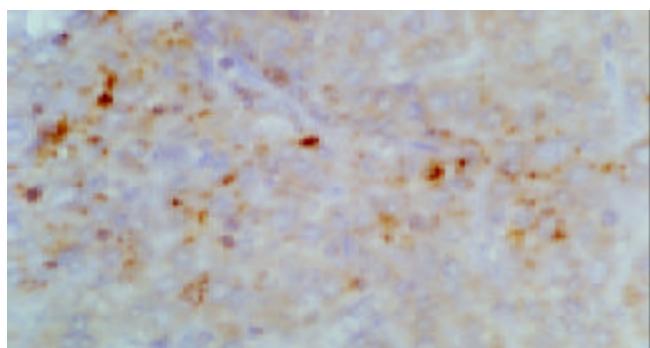


图4 癌组织中Bcl-2阳性,呈碎点状.×400.

3 讨论

肿瘤的增生速度一直被认为与肿瘤发展有关。迄今为止,有诸多方法被用来检测肿瘤的增生水平。Ki-67是一种敏感而特异的增生细胞标记物,但其抗体只限于冰冻新鲜标本,不便推广使用。单克隆MIB-1抗体同样

可以识别Ki-67核抗原,并适用于石蜡包埋组织,从而使大量回顾性研究得以实施。MIB-1增生指数是较多被用于衡量细胞增生水平的指标。肿瘤细胞增生水平与肿瘤分化有关^[1-7]。本文结果显示MIB-1指数与肝癌的分级明显相关,肝癌分化愈差,MIB-1指数愈大,说明MIB-1可反映肝癌细胞的增生程度和恶性程度,可作为肝细胞癌恶性程度和分级的标记物。

bcl-2是一种原癌基因,其编码一个26KD的蛋白,定位于细胞内质网膜、线粒体膜和核膜上,是一种膜定位蛋白,促进细胞由G1期向S期转化并修复染色体损伤,或在细胞分化早期通过对抗前凋亡分子bax延长细胞的生存期,使细胞永生化,与肿瘤的早期形成有关^[8-21]。Nakapoulou et al 报道,肝细胞癌组织低表达bcl-2蛋白,有时阳性率低于癌旁组织,与其他多种肿瘤不同,bcl-2在肝细胞癌细胞凋亡调控中的作用可能具有一定特殊性^[9]。本研究发现,bcl-2在肝癌及癌旁肝组织中均有表达,癌组织中bcl-2阳性率为17.5%,与文献[10-11]报道近似,但其癌旁肝组织bcl-2阳性率高达77.5%。针对免疫组织化学法检测bcl-2蛋白阳性率较低的情况,Fiorentino et al^[12]对肝细胞癌组织应用免疫组织化学法检测bcl-2蛋白(阳性率为20.0%)的同时,使用原位杂交法检测bcl-2基因的mRNA,其阳性率为65.0%,说明肝细胞癌的bcl-2蛋白表达水平较低,但是具有一定水平的bcl-2转录,这在肝癌发生过程的调控中可能具有一定的意义。肝细胞癌组织中bcl-2弱阳性表达,并且有时阳性率低于癌旁组织,提示在癌形成后分化异常的癌细胞对bcl-2蛋白合成减少即转录后水平下降^[25]。本研究还观察到bcl-2蛋白在肝癌和癌旁组织中信号强弱及形态表现有一定的特殊性,癌旁阳性信号绝大多数充满细胞质,染色深,且阳性细胞呈簇状或大片状分布,而癌组织阳性切片中,阳性信号稀少,为碎点状散落于胞质中,与癌旁bcl-2阳性表现有明显不同。这种量和形态上的不同,我们认为可能为组织癌变后bcl-2基因发生了突变,以至分子结构出现变异,造成bcl-2蛋白表达变化而显示与癌旁者不同。这一点需作分子水平的抗原分析才能进一步证实。笔者分析MIB-1与Bcl-2的关系,未发现他们之间有相关性,提示bcl-2在HCC的发生发展过程中并不直接引起细胞增生,只是通过阻止细胞凋亡和延长细胞存活,使细胞数量增多。细胞增生可能是多种因素作用的结果。

肝细胞肝癌的发病机制尚未明确,普遍认为HCC的发生是一个多因素、多步骤的演变过程。越来越多的学者认为,LCD的出现与肝硬变及肝细胞癌等多种肝病的发生发展有关,LCD是HCC的癌前病变;小细胞LCD的核浆比值处于正常肝细胞核浆比值和肝癌细胞核浆比值之间,而大细胞LCD的核浆比值与正常者相同,故认为作为癌前病变,小细胞LCD更为重要^[26-30]。本文将小细胞LCD、大细胞LCD、及其旁正常肝细胞的MIB-1指数进行相互比较,结果发现小细胞LCD的MIB-1

指数比大细胞 LCD 及其旁正常肝细胞的 MIB-1 指数高, 而大细胞 LCD 的 MIB-1 指数与其旁正常肝细胞的 MIB-1 指数无差异, 说明小细胞 LCD 的增生活跃, 发展成癌的可能性更大, 此结果支持小细胞 LCD 更接近癌变的说法.

4 参考文献

- 1 Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992;168:357-363
- 2 Moul JW, Bettencourt MC, Sesterhenn IA, Mostofi FK, McLeod DG, Srivastava S, Bauer JJ. Protein expression of p53, bcl-2, and Ki-67 (MIB-1) as prognostic biomarkers in patients with surgically treated, clinically localized prostate cancer. *Surgery* 1996;120:159-166
- 3 Nolte M, Werner M, Nasarek A, Bektas H, von Wasielewski R, Klempnauer J, Georgii A. Expression of proliferation associated antigens and detection of numerical chromosome aberrations in primary human liver tumours: relevance to tumour characteristics and prognosis. *J Clin Pathol* 1998;51:47-51
- 4 Tiniakos DG, Brunt EM. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 labeling in hepatocellular nodules: a comparative study. *Liver* 1999;19:58-68
- 5 Yeh TS, Chen TC, Chen MF. Dedifferentiation of human hepatocellular carcinoma up-regulates telomerase and Ki-67 expression. *Arch Surg* 2000;135:1334-1339
- 6 Kalogeraki A, Garbagnati F, Santinami M, Zoras O. DNA fragmentation and cell proliferation correlated with tumor grade in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;96:301-305
- 7 张建中, 黄英武, 刘冬梅, 杨利桃, 韩瑞刚, 王晋芬, 岳茂兴. 组织芯片技术的建立及其在大肠癌的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:157-160
- 8 Walker C, Robertson L, Myskow M, Dixon G. Expression of the Bcl-2 protein in normal and dysplastic bronchial epithelium and in lung carcinomas. *Br J Cancer* 1995;72:164-169
- 9 Nakopoulou L, Stefanaki K, Vourlakou C, Manolaki N, Gakiopoulou H, Michalopoulos G. Bcl-2 protein expression in acute and chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract* 1999;195:19-24
- 10 Singh BB, Chandler FW Jr, Whitaker SB, Forbes-Nelson AE. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 oncogene in oral dysplasia and carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998;85:692-698
- 11 郭琳琅, 曹长安, 郭颖. 肝硬变和肝癌组织 bcl-2 及相关蛋白 bax 的表达及意义. 实用癌症杂志 1999;13:204-205
- 12 Fiorentino M, D'Errico A, Altimari A, Barozzi C, Grigioni WF. High levels of BCL-2 messenger RNA detected by in situ hybridization in human hepatocellular and cholangiocellular carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 1999;8:189-194
- 13 张建中, 桂开林, 周金莲, 张卫国. 凋亡调控基因 Mcl-1 和 bcl-2 在反应性及肿瘤性淋巴组织中的表达及其意义. 肿瘤防治杂志 2002;9:22-24,29
- 14 於亮亮, 于皆平, 冉宗学, 于红刚. 核因子 - kappaB 与大肠肿瘤细胞凋亡及增生的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:309-312
- 15 杨仕明, 房殿春, 杨金亮, 罗元辉, 鲁荣, 刘为纹. hTRT 反义基因对胃癌细胞端粒酶及凋亡相关基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:149-152
- 16 王剑明, 邹声泉. 甘氨鹅脱氧胆酸钠致阻塞性黄疸大鼠肝细胞凋亡中 bcl-2 mRNA 的表达意义. 世界华人消化杂志 2002;10:324-327
- 17 王剑明, 邹倩, 邹声泉. 阻塞性黄疸大鼠肝组织 Bcl-2 及 Bax 的表达与细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2001;9:911-914
- 18 杨柳明, 吴志荣, 赵延龙, 陈杜芳, 伍桂荣. 青年乙型肝炎患者肝组织 Bcl-2, Bax 蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2001;9:966-967
- 19 Li HL, Chen DD, Li XH, Zhang HW, Lu YQ, Ye CL, Ren XD. Changes of NF-kB, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol* 2002;8:431-435
- 20 Cui RT, Cai G, Yin ZB, Cheng Y, Yang QH, Tian T. Transretinoic acid inhibits rats gastric epithelial dysplasia induced by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine: influences on cell apoptosis and expression of its regulatory genes. *World J Gastroenterol* 2001;7:394-398
- 21 Chiu CT, Yeh TS, Hsu JC, Chen MF. Expression of Bcl-2 family modulated through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2003;48:670-676
- 22 Edmondson HA, Steiner PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954;7:462-503
- 23 Anthony PP, Vogel CL, Barker LF. Liver cell dysplasia: a premalignant condition. *J Clin Pathol* 1973;26:217-223
- 24 Watanabe S, Okita K, Harada T, Kodama T, Numa Y, Takemoto T, Takahashi T. Morphologic studies of the liver cell dysplasia. *Cancer* 1983;51:2197-2205
- 25 Berney CR, Downing SR, Yang JL, Russell PJ, Crowe PJ. Evidence for post-transcriptional down-regulation of the apoptosis-related gene bcl-2 in human colorectal cancer. *J Pathol* 2000;191:15-20
- 26 周金莲, 梁英锐, 冯德云, 程瑞雪, 沈明. 肝癌及癌旁组织中 HBV-DNA 原位杂交 HBsAg 免疫组织化学双标记研究. 中华病理学杂志 1995;24:18-20
- 27 周金莲, 梁英锐. 肝癌及癌旁组织中 HBsAg 表达的研究. 中国肿瘤临床 1996;23:6-9
- 28 Lee RG, Tsamandas AC, Demetris AJ. Large cell change (liver cell dysplasia) and hepatocellular carcinoma in cirrhosis: matched case-control study, pathological analysis, and pathogenetic hypothesis. *Hepatology* 1997;26:1415-1422
- 29 Szczepanski W. Liver cell dysplasia in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Pol J Pathol* 1997;48:147-157
- 30 Marchio A, Terris B, Meddeb M, Pineau P, Duverger A, Tiollais P, Bernheim A, Dejean A. Chromosomal abnormalities in liver cell dysplasia detected by comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol* 2001;54:270-274

甲胎蛋白阳性人肝细胞的定量形态学图像分析

章宗籍, 申丽娟, 张华献, 黄 润

章宗籍, 申丽娟, 张华献, 黄润, 昆明医学院病理学教研室
云南省昆明市 650031
章宗籍, 男, 1962-10-19 生, 云南省昆明市人, 汉族, 1988 年上海医科大学
硕士, 教授, 主要从事慢性肝病及肝癌的病理学研究。
云南省自然科学基金资助, No. 92C051
项目负责人: 章宗籍, 650031, 云南省昆明市人民西路 191 号, 昆明医学院
病理学教研室. zhzji@sina.com
电话: 0871-5332427 传真: 0871-5332390
收稿日期: 2003-01-09 接受日期: 2004-03-18

Morphometric image analysis of human α -fetoprotein positive hepatocytes

Zong-Ji Zhang, Li-Juan Shen, Hua-Xian Zhang, Run Huang

Zong-Ji Zhang, Li-Juan Shen, Hua-Xian Zhang, Run Huang, Department of Pathology, Kunming Medical College, Kunming 650031, Yunnan Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Yunnan Province, No. 92C051

Correspondence to: Zong-Ji Zhang, Department of Pathology, Kunming Medical College, 191 Western Renming Road, Kunming 650031, Yunnan Province, China. zhzji@sina.com

Received: 2004-01-09 Accepted: 2004-03-18

Abstract

AIM: To determine the morphometric characteristics of α -fetoprotein (AFP) positive hepatocytes which appeared in precursor lesions, and to explore the mechanism of carcinogenesis and the early diagnostic method of hepatocellular carcinoma.

METHODS: The expression of AFP was investigated by immunohistochemical SP method in 114 cases of normal liver, chronic hepatitis/cirrhosis, pericancerous cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). 11 morphometric parameters of AFP-positive and negative hepatocytes including nuclear area, nuclear volume, nuclear equivalent diameter, nuclear long diameter/short diameter ratio, nuclear form factor, nuclear irregular index, cell area, cell volume, cell equivalent diameter, cell long diameter/short diameter ratio and nucleus-cytoplasm ratio were measured by using an automated image analyser.

RESULTS: The expression of AFP was negative in normal liver and chronic hepatitis/cirrhosis, positive 37% (10/27) in pericancerous cirrhosis and 45% (17/38) in HCC. Morphometric study on the positive and negative hepatocytes in pericancerous cirrhosis showed that the difference was statistically significant between the groups of 10 AFP-positive and 17 AFP-negative on the parameters of cell long diameter/short diameter ratio, nuclear form factor and nuclear irregular index. However, the investigation of positive and negative hepatocytes in same AFP-positive case showed that several parameters in positive cells were significantly different from those in negative cells in 4 cases. This AFP-

positive cells changed their features as enlarged nuclear and nucleus to cytoplasm ratio, and more irregular nucleus.

CONCLUSION: The pericancerous cirrhosis is different essentially from the liver cirrhosis without tumor, and more closely linked with HCC. The AFP expression of hepatocytes may occur earlier than its morphologic change in hepatocarcinogenesis. These AFP-positive and morphologic changed hepatocytes may be the precursor of HCC.

Zhang ZJ, Shen LJ, Zhang HX, Huang R. Morphometric image analysis of human α -fetoprotein positive hepatocytes. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1284-1287

摘要

目的: 为阐明肝细胞性肝癌癌变前期 AFP 阳性表达肝细胞的形态特征, 以进一步探讨肝癌癌变规律并以此寻求能够早期诊断肝癌的方法。

方法: SP 法对正常肝组织, 慢性肝炎肝硬化, 癌周肝硬化和肝细胞癌共 114 例进行甲胎蛋白(AFP)的检测, 并对 AFP 阳性肝细胞及 AFP 阴性肝细胞进行了核面积、核平均体积、核等效直径、核长轴/短轴比、核形状因子、核异型指数、细胞面积、细胞等效直径、细胞平均体积、细胞长轴/短轴比、核质比等 11 项参数的形态定量测定和对比分析。

结果: 正常肝组织和慢性肝炎肝硬化 AFP 不表达; 癌周肝硬化 AFP 阳性率为 37%(10/27); 肝细胞癌 AFP 阳性率为 45% (17/38)。对癌周肝硬化 AFP 阳性和阴性肝细胞形态定量分析, 10 例 AFP 阳性组的阳性表达肝细胞与其余 17 例阴性组的肝细胞在细胞长轴/短轴比、核形状因子和核异型指数 3 项参数间有显著差异($P < 0.05$); 进一步对 AFP 阳性组同片阳性肝细胞和阴性肝细胞比较分析, 有 4 例在 11 项形态参数中存在不同程度的差别, 其中可见 AFP 阳性肝细胞较 AFP 阴性细胞小, 核不同程度增大, 核质比例增大, 以及在反映核不规则程度的核长轴/短轴比、核形状因子和核异型指数等参数上有明显变化。

结论: 癌周肝硬化不同于不伴肝癌的肝硬化而更具癌前病变性质; 在与肝癌发生相关的病变中, AFP 的表达早于细胞形态学的改变; 随着 AFP 的表达, 部分 AFP 阳性肝细胞发生的形态学改变已具备癌前病变的性质, 其可能是肝细胞癌变的基础。

章宗籍, 申丽娟, 张华献, 黄润. 甲胎蛋白阳性人肝细胞的定量形态学图像分析. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1284-1287
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1284.asp>

0 引言

肝癌前期细胞特征的阐明对探讨肝癌的发生及早期诊断肝癌有重要的意义。AFP 阳性表达是肝细胞癌变的特征之一，在动物诱癌早期及人肝癌旁肝组织的肝细胞中均可见 AFP 及 AFP mRNA 的表达^[1-2]，但 AFP 阳性表达肝细胞的形态特征尤其是定量形态特征并未得到深入研究。我们通过检测肝细胞癌(HCC)及相关慢性肝病的 AFP 表达，对 AFP 阳性肝细胞进行形态定量测定，以阐明肝癌癌前病变的形态定量特征，并探讨其与 HCC 发生的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 本院 1995-2002 年手术切除、肝脏穿刺和尸体解剖病理档案石蜡标本共 114 例，其中正常肝组织 9 例，慢性肝炎和肝硬化 40 例，癌周肝硬化 27 例，HCC 38 例。所有标本的诊断均经两位病理医师反复确诊。

1.2 方法 免疫组织化学染色采用链霉菌素 - 生物素(S-P)法。鼠抗人 AFP(克隆号 C3)和 S-P 试剂盒均购自福州迈新生物技术开发公司(美国 Maxim 和 Zymed 公司产品)，按试剂盒说明操作。每次实验均用已知阳性切片作阳性对照，用 PBS 代替一抗作阴性对照。图像分析采用 HPIAS-1000 图像分析系统(同济医科大学千屏影像工程公司)。AFP 免疫组化染色切片置显微镜下，放大 100 倍，分别对 AFP 阳性肝细胞和 AFP 阴性肝细胞的核面积(A_N)、核平均体积(V_N)、核等效直径(D_N)、核长轴 / 短轴比(N_{ab})、核形状因子(F_N)、核异型指数(IS_N)、细胞面积(Ac)、细胞等效直径(Dc)、细胞平均体积(V_c)、细胞长轴 / 短轴比(C_{ab})、核质比(R_{NC})等 11 项参数进行自动测量。

统计学处理 采用 χ^2 和 t 检验。

2 结果

2.1 AFP 的表达 AFP 在正常肝细胞、慢性肝炎和肝硬

化均不表达，HCC 和癌周肝硬化部分表达，阳性颗粒分布于细胞质(图 1A, B)，阳性率分别是 45%(17/38)和 37%(10/27)，差异无显著性($\chi^2=0.68$, $P > 0.05$)，而癌周肝硬化与不伴癌的肝硬化差异具有高度显著性($\chi^2=10.80$, $P < 0.01$)。癌周 AFP 阳性肝细胞孤立散在于肝细胞索中，不形成细胞团(图 1C)。

2.2 图像分析 根据 AFP 免疫组化染色结果，分别对癌周肝硬化 17 例阴性组(I)、10 例 AFP 阳性组(II)及同片 AFP 阴性的肝细胞(III)进行 11 项参数的定量测定。

表 1 AFP 阳性肝细胞形态定量(mean±SD)

| 参数 | I (n : 17) | II (n : 10) | III (n : 10) |
|----------------------------------|-------------|--------------------------|--------------|
| Ac/ μm^2 | 126 ± 487 | 121 ± 782 | 147 ± 682 |
| Dc/ μm | 12.6 ± 1.3 | 12.3 ± 2.0 | 13.6 ± 1.4 |
| Vc/ $\mu\text{m}^3 \times 10^3$ | 1.1 ± 79.0 | 1.0 ± 130.0 | 1.4 ± 140.0 |
| C _{ab} /% | 1.40 ± 0.01 | 1.32 ± 0.01 ^a | 1.34 ± 0.00 |
| A _N / μm^2 | 36.5 ± 28.6 | 36.3 ± 91.1 | 40.1 ± 91.9 |
| D _N / μm | 6.7 ± 0.3 | 6.7 ± 0.8 | 7.1 ± 0.7 |
| V _N / μm^3 | 171 ± 1 297 | 172 ± 4 694 | 199 ± 4 953 |
| N _{ab} /% | 1.2 ± 0.0 | 1.2 ± 0.0 | 1.2 ± 0.0 |
| F _N | 1.1 ± 0.0 | 1.1 ± 0.0 ^a | 1.1 ± 0.0 |
| IS _N | 3.7 ± 0.0 | 3.8 ± 0.0 ^a | 3.7 ± 0.0 |
| R _{NC} /% | 42.7 ± 0.2 | 43.8 ± 0.1 | 38.6 ± 0.5 |

^aP < 0.05, vs I 组。

表 1 除了 I 组与 II 组间在细胞长轴 / 短轴比、核形状因子和核异型指数 3 项参数间有显著差异($P < 0.05$)外，其余各参数在各组间差异无显著性。

与此同时，对 10 例 AFP 阳性表达的癌周肝硬化分别进行了同片阳性肝细胞和阴性肝细胞的对照检测。结果 10 例病例中有 6 例同片的 AFP 阳性肝细胞和阴性肝细胞间无明显差别，而其余 4 例在 11 项形态参数中则

表 2 4 例 AFP 阳性肝细胞和其同片阴性肝细胞的形态定量结果(mean±SD)

| 参数 | 病例 A | | 病例 B | | 病例 C | | 病例 D | |
|--|--------------------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------------------|-------------|--------------------------|-------------|
| | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 | 阳性 | 阴性 |
| Ac/ μm^2 | 100 ± 243 | 119 ± 63 | 149 ± 317 | 166 ± 68 | 126 ± 229 | 134 ± 191 | 80 ± 48 ^b | 117 ± 90 |
| Dc/ μm | 11.2 ± 0.7 | 12.3 ± 0.2 | 13.7 ± 0.8 | 14.5 ± 0.2 | 12.6 ± 0.6 | 13.0 ± 0.5 | 10.0 ± 0.2 ^b | 12.2 ± 0.2 |
| Vc/ $\mu\text{m}^3 \times 10^3$ | 0.8 ± 32.0 | 1.0 ± 90.0 | 1.4 ± 54.0 | 1.6 ± 12.0 | 1.1 ± 36.0 | 1.2 ± 33.0 | 0.5 ± 51.0 ^b | 1.0 ± 135.0 |
| C _{ab} /% | 1.26 ± 0.00 ^a | 1.33 ± 0.00 | 1.35 ± 0.03 | 1.35 ± 0.00 | 1.24 ± 0.00 | 1.31 ± 0.00 | 1.31 ± 0.00 | 1.33 ± 0.01 |
| A _N / μm^2 | 31.3 ± 26.9 | 35.0 ± 3.5 | 47.7 ± 35.8 | 47.1 ± 3.9 | 36.1 ± 3.1 ^b | 29.3 ± 1.7 | 23.3 ± 4.0 | 24.2 ± 2.7 |
| D _N / μm | 6.3 ± 0.3 | 6.7 ± 0.0 | 7.7 ± 0.3 | 7.7 ± 0.0 | 6.8 ± 0.0 ^b | 6.1 ± 0.0 | 5.4 ± 0.1 | 5.5 ± 0.0 |
| V _N / $\mu\text{m}^3 \times 10^2$ | 1.3 ± 11.0 | 1.6 ± 2.0 | 2.5 ± 20.0 | 2.5 ± 2.0 | 1.6 ± 1.3 ^b | 1.2 ± 0.6 | 0.9 ± 1.4 | 0.9 ± 1.0 |
| N _{ab} /% | 1.23 ± 0.00 ^b | 1.14 ± 0.00 | 1.38 ± 0.03 | 1.27 ± 0.01 | 1.16 ± 0.00 | 1.18 ± 0.00 | 1.27 ± 0.00 ^a | 1.18 ± 0.00 |
| F _N | 1.15 ± 0.00 ^b | 1.06 ± 0.00 | 1.17 ± 0.00 | 1.10 ± 0.00 | 1.19 ± 0.01 | 1.07 ± 0.00 | 1.13 ± 0.00 | 1.11 ± 0.00 |
| IS _N | 3.80 ± 0.00 ^b | 3.65 ± 0.00 | 3.83 ± 0.01 | 3.72 ± 0.00 | 3.85 ± 0.03 | 3.67 ± 0.00 | 3.76 ± 0.01 | 3.73 ± 0.00 |
| R _{NC} /% | 46.2 ± 0.1 | 42.5 ± 0.1 | 47.9 ± 0.1 ^a | 40.3 ± 0.1 | 41.7 ± 0.5 ^a | 28.8 ± 0.00 | 42.2 ± 0.2 ^b | 26.5 ± 0.0 |

^aP < 0.05, ^bP < 0.01, vs 同片阴性组。

有不同程度的差别(表2). 其中可见 AFP 阳性肝细胞较 AFP 阴性细胞小, 核不同程度增大, 核质比例增大, 病例 A 在反映核不规则程度的核长轴 / 短轴比(N_{ab})、核形状因子(F_N)、核异型指数(IS_N)等参数上有明显变化.

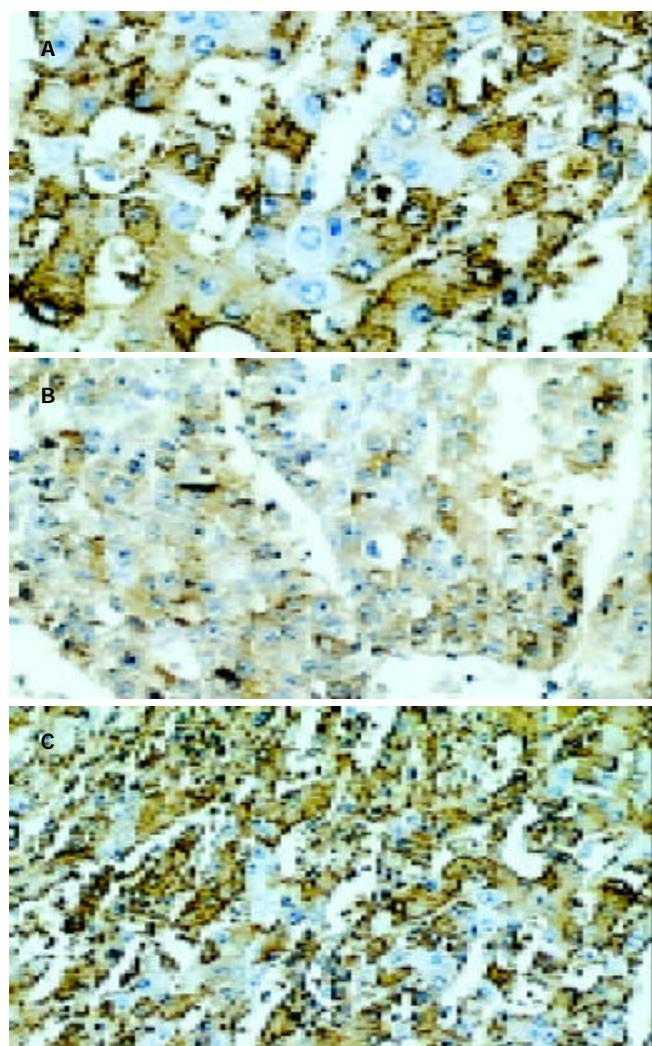


图1 肝细胞质内 AFP 阳性 SP 法. A: 癌周肝硬化 $\times 100$; B: 肝细胞癌 $\times 100$; C: 癌周肝硬化肝细胞散在分布 $\times 50$.

3 讨论

AFP 作为 HCC 的肿瘤标志物, 广泛应用于肝癌的诊断^[3-4]. 但 AFP 阳性肝细胞的细胞定量形态学特征却鲜有研究报道. 本结果表明, AFP 在正常肝细胞, 慢性肝炎和肝硬化均不表达, 而 37% 癌周肝硬化和 45%HCC 有表达, 癌周肝硬化明显不同于不伴癌的肝硬化($P < 0.05$). 对 10 例 AFP 阳性表达 17 例阴性表达的癌周肝硬化进行了形态特征参数的定量检测, 显示 AFP 阳性肝细胞在细胞长轴 / 短轴比、核形状因子和核异型指数方面与不表达 AFP 病例的肝细胞已有了的差别. 进一步对每例 AFP 阳性病例的同片阳性和阴性肝细胞的比较, 6 例无显著差异, 但有 4 例在反映细胞异型的参数如核大小、核质比例以及核长轴 / 短轴比、核形状因子、核异型指数等方面表现出明显的差异, 也即这些 AFP 阳性肝细胞大小与阴性肝细胞相差不大或偏小, 但细胞核增大且

不太规则, 核质比例增大. 以上结果提示肝细胞 AFP 的异常表达明显早于细胞形态的改变, AFP 阳性的肝细胞并不一定会发生细胞形态的改变, 但形态改变且 AFP 阳性的肝细胞显然很趋向于癌前病变了. 此外, Zhai et al^[1] 已注意到 AFP 在肝硬化中为核表达, 而 HCC 中为胞质表达. 我们也观察到 AFP 在癌周肝硬化和 HCC 的表达均为胞质型, AFP 表达的定位从胞核到胞质的转变有何意义尚不清楚, 其与肝细胞恶性转化的关系有待进一步研究.

自 Anthony 提出肝细胞不典型增生以来, 不典型增生肝细胞被认为是肝癌的癌前期病变, 之后又将不典型增生肝细胞分为大细胞性不典型增生和小细胞性不典型增生^[5-9], 小细胞性不典型增生肝细胞比正常细胞小, 胞质更富嗜碱性, 但无明显的核异型及核增大, 常呈片块状而不是孤立的单细胞排列. 大细胞性不典型增生则细胞大, 常有不规则核及核仁, 核质比例正常, 其细胞常孤立地分散于硬化的组织中. 然而对不典型增生肝细胞是否为真性癌前病变尚有争议, 因此 1995 年国际工作协会曾建议将大细胞性或小细胞性不典型增生命名为大细胞性改变(large-cell change, LCC)和小细胞性改变(small-cell change, SCC). 近年来, 通过细胞 PCNA^[5]、及比较基因组杂交^[9]等研究均表明 SCC 可能是肝癌癌前病变, 而 LCC 与肝癌无明显相关性. 本研究中所见有形态改变的 AFP 阳性肝细胞很像 SCC, 细胞不大而核增大且不太规则, 核质比例增大, 但与既往常呈片块状或存在于增生结节中的 SCC 不同, 这些 AFP 阳性细胞散在于肝细胞索中, 是否属于另外一种存在形式的 SCC、或是 SCC 的前期病变、值得进一步深入研究.

癌周肝硬化在光镜形态上与一般肝硬化无明显的区别, 但研究表明癌周肝硬化的肝细胞无论在癌基因, 还是肿瘤标志物的表达等方面均具备了癌前病变的特征^[11-13]; 应用图像分析定量方法也已发现癌周肝硬化的肝细胞细胞核的大小、核质比例等形态特征参数与一般肝硬化明显不同而介于肝细胞性肝癌(HCC)与肝脏良性病变之间^[11, 14]. 因此, 我们曾提出了癌周肝硬化可能是癌前肝硬化在癌周残留的推论^[11-14]. 尽管已知的癌前病变如交界性增生结节或 SCC 与肝癌的关系更为密切, 但这些病变较为局限且发生率较低, 很难通过穿刺活检或影像学检查得以及时发现^[15]. 因此, 那些弥漫分布的 AFP 阳性且有形态改变的肝细胞若能进一步证实为一种癌前病变, 则为肝穿刺活检发现肝癌高危人群以及早期诊断肝癌提供了一个重要的途径.

4 参考文献

- Zhai SH, Liu JB, Liu YM, Zhang LL, Du ZP. Expression of HBsAg, HCV-Ag and AFP in liver cirrhosis and hepatocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:524-527
- 杨业发, 吴孟超, 陈汉, 杨广顺, 郁庆明. 肝癌组织及非癌肝组织中 AFP mRNA 的定量分析. *中华肝脏病杂志* 2001;9:6

- 3 Li J, Huang Y, Lin M. Clinical evaluation of several tumor markers in the diagnosis of primary hepatic cancer. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):39
- 4 Jiang YF, Yang ZH, Hu JQ. Recurrence or metastasis of HCC: predictors, early detection and experimental antiangiogenic therapy. *World J Gastroenterol* 2000;6:61-65
- 5 Makino Y, Shiraki K, Sugimoto K, Ito T, Yamanaka T, Fujikawa K, Takase K, Nakano T. Histological features of cirrhosis with hepatitis C virus for prediction of hepatocellular carcinoma development: a prospective study. *Anticancer Res* 2000;20:3709-3715
- 6 Kojiro M. Premalignant lesions of hepatocellular carcinoma: pathologic viewpoint. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000;7: 535-541
- 7 Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. The immunohistochemical phenotype of dysplastic foci in human liver: correlation with putative progenitor cells. *J Hepatol* 2000; 33:76-84
- 8 Wittekind C. The new WHO classification of liver tumors-what is really new? *Verh Dtsch Ges Pathol* 2001;85:212-218
- 9 Marchio A, Terris B, Meddeb M, Pineau P, Duverger A, Tiollais P, Bernheim A, Dejean A. Chromosomal abnormalities in liver cell dysplasia detected by comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol* 2001;54:270-274
- 10 Su Q, Bannasch P. Relevance of hepatic preneoplasia for human hepatocarcinogenesis. *Toxicol Pathol* 2003;31:126-133
- 11 Shen LJ, Zhang ZJ, Ou YM, Zhang HX, Huang R, He Y, Wang MJ, Xu GS. Computed morphometric analysis and expression of alpha fetoprotein in hepatocellular carcinoma and its related lesion. *World J Gastroenterol* 2000;6:415-416
- 12 Shen LJ, Zhang ZJ, Zhang HX, Yang WB, Huang R. Expression of GST- π and HBV infection in hepatocellular carcinoma. *Ai Zheng* 2002;21:29-32
- 13 Shen LJ, Zhang HX, Zhang ZJ, Li JY, Chen MQ, Yang WB, Huang R. Detection of HBV, PCNA and GST-PI in hepatocellular carcinoma and chronic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2003;9:459-462
- 14 章宗籍, 申丽娟, 欧阳明. 人体肝癌病理形态发生和预测诊断价值的图象分析研究. 中国体视学与图像分析 2000;5:230-234
- 15 Hsu CY, Chu CH, Lin SC, Yang FS, Yang TL, Chang KM. Concomitant hepatocellular adenoma and adenomatous hyperplasia in a patient without cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:627-630

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

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 发行

《World Journal of Gastroenterology, WJG》2003 年印刷版共发行 973 份, 其中国内邮局征订 168 份, 分布在 27 个省市自治区; 国外发行 105 份, 分布在 56 个国家和地区; 向承担国家 973 和 863 及国家自然科学基金项目负责人赠送 700 份。让更多的国际胃肠病学和肝病学专家阅读和使用 WJG 发表的具有我国特色及国际先进水平的学术论文, WJG 向美国胃肠病学会会员, 美国肝病学会会员, 美国癌症研究会会员免费提供每期的全文电子版, 目前每期电子版的发行量已达 21200 份。

World Journal of Gastroenterology 影响因子

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

双介入联合CIK细胞治疗中晚期肝细胞肝癌

徐永茂, 张南征, 张国龙, 马文青, 高从敬, 徐卫东, 陈复兴

徐永茂, 张南征, 张国龙, 马文青, 中国人民解放军97医院消化肿瘤科
江苏省徐州市 221004
高从敬, 中国人民解放军97医院放射科 江苏省徐州市 221004
徐卫东, 中国人民解放军97医院特诊科 江苏省徐州市 221004
陈复兴, 中国人民解放军97医院实验科 江苏省徐州市 221004
徐永茂, 男, 1969-11-27生, 江苏射阳县人, 汉族, 1992年第二军医大学学士, 主要从事肿瘤内科临床专业。
项目负责人: 徐永茂, 221004, 江苏省徐州市铜山路226号, 中国人民解放军97医院消化肿瘤科。
电话: 0516-3561494
收稿日期: 2004-01-09 接受日期: 2004-02-26

Transcatheter hepatic arterial chemoembolization and percutaneous ethanol injection combined with cytokine-induced killer cells in treatment of advanced hepatocellular carcinoma

Yong-Mao Xu, Nan-Zen Zhang, Guo-Long Zhang, Wen-Qing Ma, Cong-Jing Gao, Wei-Dong Xu, Fu-Xin Chen

Yong-Mao Xu, Nan-Zen Zhang, Guo-Long Zhang, Wen-Qing Ma, Department of Digestive Oncology, 97 Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China
Cong-Jing Gao, Department of Radiology, 97 Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China
Wei-Dong Xu, Department of Special Examination, 97 Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China
Fu-Xin Chen, Department of Central Laboratory, 97 Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China
Correspondence to: Dr Yong-Mao Xu, Department of Digestive Oncology, 97 Hospital of Chinese PLA, Xuzhou 221004, Jiangsu Province, China.

Received: 2004-01-09 Accepted: 2004-02-26

Abstract

AIM: To evaluate the clinical effects of double intervention combined with the adoptive immunotherapy with cytokine-induced killer (CIK) cells on advanced hepatocellular carcinoma (HCC).

METHODS: A total of 128 patients with advanced HCC were treated by transcatheter hepatic arterial chemoembolization (TACE) and/or percutaneous ethanol injection (PEI) and/or CIK cells. Another 36 patients with HCC were treated by TACE and PEI combined with CIK cells (study group). They were compared with either 62 patients with HCC treated by TACE and PEI (double intervention group) or 30 patients with HCC treated by TACE (simple group).

RESULTS: The effective rate of the study group, double intervention group and simple group were 91.6%, 75.8% and 43.3% respectively. The immune function, the Karnofsky's grade, 1 year survival in the study group were significantly higher than those in the double intervention

group and simple group. But serum AFP in the study group was lower than that in the others ($P < 0.05$).

CONCLUSION: TACE and PEI combined with CIK cells enhances the anti-cancer effect, improve the survival quantity and prolong survival period of the patients.

Xu YM, Zhang NZ, Zhang GL, Ma WQ, Gao CJ, Xu WD, Chen FX. Transcatheter hepatic arterial chemoembolization and percutaneous ethanol injection combined with cytokine-induced killer cells in treatment of advanced hepatocellular carcinoma. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1288-1291

摘要

目的: 评估双介入联合细胞因子诱导的杀伤细胞(CIK细胞)过继免疫治疗中晚期肝细胞肝癌的临床疗效。

方法: 采用经皮肝动脉栓塞化疗术(TACE)、经皮肝瘤体内注入无水乙醇术(PEI)、CIK细胞回输3种方法治疗中晚期肝细胞肝癌共128例, 其中在TACE、PEI双介入的基础上, 采用CIK细胞静脉回输与瘤体内注射相结合治疗中晚期肝细胞肝癌36例(研究组), 并与同期病情相当的中晚期肝细胞肝癌双介入治疗62例(双介入组)和单纯的TACE30例(单纯组)相比较。

结果: 研究组、双介入组、单纯组有效率分别为91.6%、75.8%和43.3%, 研究组的AFP下降、细胞免疫功能、卡氏评分升高均优于双介入组和单纯组, 研究组的1a生存也得到显著的延长($P < 0.05$)。

结论: 双介入治疗联合CIK细胞可以弥补单一治疗方法的不足, 增强了抗癌效果, 改善了患者的生存质量, 延长了患者的生存期。

徐永茂, 张南征, 张国龙, 马文青, 高从敬, 徐卫东, 陈复兴. 双介入联合CIK细胞治疗中晚期肝细胞肝癌. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1288-1291
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1288.asp>

0 引言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)我国最常见的恶性肿瘤之一^[1-2], 病程发展快, 患者就诊时往往已属中晚期, 绝大多数已失去手术机会^[3], 是最近20a来影响我国人民健康的第二位恶性肿瘤^[4]. 随着肿瘤的介入治疗、免疫治疗等非手术治疗方法用于临床, 对于延长患者的生存期、改善患者的生存质量取得一定的效果^[2,5-6]. 1997-05/2003-05我科采用经皮肝动脉栓塞化疗术(transcatheter hepatic arterial chemoembolization,

TACE)、经皮肝瘤体内注入无水乙醇术(percuteaneous ethanol injection, PEI)、细胞因子诱导的杀伤细胞(Cytokine-induced killer cells, CIK 细胞)治疗中晚期肝细胞肝癌, 将疗效分析报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 可评价中晚期 HCC 共 128 例, 随访资料完整。男 96 例, 女 32 例, 年龄 33-66(平均 45.5)岁。均符合《中国常见恶性肿瘤诊治规范》中 HCC 的诊断标准。制备 CIK 细胞的方法^[7]。抽患者外周血 200 mL, 分离血浆备用, 再吸出富含白细胞层的细胞约 10 mL, 悬浮于等量患者自身的血浆中, 淋巴细胞分离液分离收集单个核细胞。PBS 洗涤, 将细胞按 $2 \times 10^9/L$ 数量悬浮于 RPMI1640 完全培养基中, 加至经抗 CD₃ 单核包被的 6 孔细胞培养板, 每孔 6 mL, 加入终含量为 50 KU/L rIL-2 和 500 KU/L IFN-γ, 置于 37°C 50 mL/L 的 CO₂ 条件下培养, 培养 7 d 后, 经细菌和霉菌培养阴性后再收集细胞, 无菌生理盐水洗 3 次, 将细胞悬浮于自身血浆中, 加入 5×10^4 U rIL-2, 终细胞数 1.3×10^9 - 1.5×10^9 。静脉回输时配制成 150 mL 的细胞悬液, 用输血器 2 h 内输入, 用于瘤体内注射时浓缩细胞悬液至 10-15 mL。

1.2 方法 单纯组(TACE)30 例, 常规股动脉穿刺用 Seldinger 法将 6F 多功能导管置于腹腔动脉或肝总动脉, 酌情作肠系膜上动脉或膈动脉造影, 以寻找肝癌其他供血动脉, 明确肿瘤数目、位置、类型、大小, 供养血管以及动静脉瘘等情况, 有动静脉瘘, 先行明胶海绵栓塞, 在肝动脉注入 5-FU+ADM+MMC+DDP/HCPT 行灌注化疗, 然后将导管尽量超选至肝动脉对肿瘤的供血分支, 根据血供来源情况, 确定碘油用量, 将 ADM10 mg 与碘化油 10-30 mL 充分乳化后, 在电视荧光屏监视下缓慢注入, 以防止栓塞剂反流造成其他脏器栓塞。TACE 一般间隔 4 wk 进行 1 次。2 次后评价疗效。双介入组(TACE+PEI)62 例, 在 TACE(方法同单纯 TACE)治疗后 5-7 d 后行 PEI, 2 次/wk, 连续 4-6 次, 每次用量依据肿瘤体积大小, 尽量采取多点注射, 用量 5-30 mL。归纳双介入组的方法为: TACE 间隔 4 周进行 1 次, 期间行 PEI 治疗, 2 次/wk, 连续 4-6 次。2 周期后评价疗效。研究组(TACE+PEI+CIK 细胞)36 例, TACE 治疗前抽外周血制备 CIK 细胞以备回输, 每周抽外周血 2 次, 200 mL/ 次, 培养的细胞数 1.3×10^9 - 1.5×10^9 , 抽外周血培养在 8-12 次, 在行 TACE 治疗后 5-7 d 先行 PEI, 2 次/wk, 连续 4-6 次, 每次用量依据肿瘤体积大小, 尽量采取多点注射, 用量 5-25 mL; 期间回输培养的 CIK 细胞悬液, 2 次/wk, 回输 4-6 次后改为 CIK 细胞瘤体内注射, 将 CIK 细胞悬液浓缩成 10-15 mL, 经 B 超引导下经皮肝穿刺瘤内注入, 尽量采取多点注射, 2 次/wk, 连续 4-6 次。休息 1-2 wk 后行下一个周期, 2 周期后评价疗效。主要观察治疗前后的肿瘤大小变化、甲胎蛋白(AFP)、T 细胞亚群、

Karnofsky 评分变化、不良反应及生存期随访。疗效按 WHO 对于实体瘤疗效判定标准分为^[8]: 完全缓解(CR), 所见肿瘤病变完全消失并至少维持 4 wk 以上; 部分缓解(PR), 肿瘤病灶的最大径及其最大垂直径(两径)的乘积减少 50% 以上并维持 4 wk 以上, 无新的病变出现; 无变化(NC), 肿瘤病灶的两径乘积缩小 50% 以下或增大 25% 以下, 无新的病灶出现; 进展(PD), 肿瘤病灶的两径乘积增大 25% 以上或出现新病灶。

统计学处理 各组数据以平均数±标准差(mean±SD); 采用 χ^2 检验, 行显著性比较。

2 结果

2.1 近期疗效 单纯组中 30 例肝区疼痛消失 24 例, 饮食增加 26 例, 1 例腹水消失。双介入组中 62 例肝区疼痛消失 60 例, 58 例饮食增加, 2 例腹水消失; 研究组 36 例肝区疼痛均消失, 饮食均增加。单纯组中血清 AFP 下降者 16 例(41/30, 46.7%), 均未降至正常; 双介入组中血清 AFP 下降者 30 例(30/62, 48.4%), 其中降至正常 9 例; 研究组中血清 AFP 下降者 25 例(25/36, 69.4%), 其中降至正常 12 例。双介入组的 AFP 下降率(48.4%)高于单纯组(46.7%), 但无显著性差异, 研究组的 AFP 下降率(69.4%)则显著高于单纯组(46.7%, P < 0.05, $\chi^2=3.86$)和双介入组(48.4%, P < 0.05, $\chi^2=4.10$)。研究组和双介入组的近期有效率均显著高于单纯组(P < 0.01), 而研究组的近期有效率又显著高于双介入组(P < 0.05), (表 1)患者有恶心, 呕吐等消化道反应; 15 例患者出现畏寒、发热, 对症处理后 24 h 内可恢复正常。研究组和双介入组治疗后的 Karnofsky 评分均显著高于单纯组(P < 0.01, P < 0.05); 而研究组治疗后的 Karnofsky 评分又高于双介入组(P < 0.05), (表 2) 单纯组及双介入组治疗后, CD3 较治疗前升高显著(P < 0.05), 而 CD4 升高、CD8 下降不明显。研究组治疗后除 CD3 较治疗前显著升高(P < 0.01)外, CD4 亦升高(P < 0.05), 另外 CD8 下降明显(P < 0.05), (表 3)。

表 1 双介入并 CIK 细胞治疗 HCC 近期疗效 (n)

| 分组 | n | CR | PR | NC | PD | RR(%) |
|------|----|----|----|----|----|-------------------------|
| 单纯组 | 30 | 0 | 13 | 11 | 6 | 13 (43.3) |
| 双介入组 | 62 | 2 | 45 | 10 | 5 | 47 (75.8) ^{ab} |
| 研究组 | 36 | 5 | 28 | 3 | 0 | 33 (91.6) ^b |

^aP < 0.01, vs 单纯组; ^bP < 0.05, vs 双介入组。

表 2 双介入并 CIK 细胞治疗 HCC 后 Karnofsky 评分变化 (n)

| 分组 | n | +20 分 | +10 分 | 不变 | 下降 | 升高合计(%) |
|------|----|-------|-------|----|----|------------------------|
| 单纯组 | 30 | 5 | 11 | 9 | 5 | 16 (53.3) |
| 双介入组 | 62 | 21 | 25 | 13 | 3 | 46 (74.2) ^a |
| 研究组 | 36 | 18 | 14 | 4 | 0 | 32 (88.9) ^b |

^aP < 0.05, vs 单纯组和研究组; ^bP < 0.01, vs 单纯组。

表3 双介入并CIK细胞治疗HCC后的T细胞亚群变化 (mean±SD)

| 分组 | n | CD ₃ | CD ₄ | CD ₈ | CD ₄ /CD ₈ |
|------|------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------------|
| 单纯组 | 前 30 | 0.50±0.05 | 0.30±0.04 | 0.31±0.03 | 0.93±0.56 |
| | 后 30 | 0.62±0.06 ^a | 0.36±0.06 | 0.28±0.04 ^a | 1.12±0.64 |
| 双介入组 | 前 62 | 0.51±0.05 | 0.30±0.05 | 0.32±0.04 | 0.93±0.56 |
| | 后 62 | 0.67±0.07 ^a | 0.39±0.06 | 0.28±0.04 | 1.40±0.45 |
| 研究组 | 前 36 | 0.52±0.05 | 0.31±0.05 | 0.32±0.03 | 0.92±0.53 |
| | 后 36 | 0.72±0.05 ^b | 0.41±0.06 ^a | 0.27±0.03 ^a | 1.72±0.34 |

^aP < 0.05, ^bP < 0.01, vs 治疗前.

2.2 远期疗效 半年生存率: 研究组和双介入组均显著高于单纯组(P<0.01), 研究组高于双介入组, 但无显著性差异; 1 a生存率: 研究组和双介入组均显著高于单纯组(P <0.01), 研究组显著高于双介入组(P <0.05); 2 a 生存率 3 组间无显著性差异,(表4).

表4 双介入并CIK细胞治疗HCC后6 mo、1、2 a生存率(%)

| 分组 | n | 6 mo 生存率 | 1 a 生存率 | 2 a 生存率 |
|------|----|---------------------------|----------------------------|-------------|
| 单纯组 | 30 | 60.0%(18/30) | 23.3%(7/30) | 3.33%(1/30) |
| 双介入组 | 62 | 88.7%(55/62) ^b | 56.4%(35/62) ^b | 9.6%(6/62) |
| 研究组 | 36 | 97.2%(35/36) ^b | 77.8%(28/36) ^{ba} | 16.7%(6/36) |

^aP < 0.05, vs 双介入组 ^bP < 0.01, vs 单纯组.

3 讨论

HCC 恶性程度高, 预后差, 自然生存期短, 就诊时大部分已失去手术机会, 为了改善中晚期HCC患者的预后, 延长生存期, 改善患者的生存质量, 我们在总结以往的治疗手段的基础上, 采用TACE、PEI双介入联合过继免疫细胞治疗进行临床研究.TACE是不能手术切除的中晚期HCC的首选治疗方法, 主要适用于瘤体较大、结节较多或不能切除的病例, 有效率在30.0-70.0%. HCC肿瘤的边缘部有门静脉供血, 随着肿瘤的增大, 门静脉供血增多, 在直径大于5 cm者几乎都存在双重供血^[9-10], 其中部分晚期HCC的供血尚有变异血管及寄生性血管的参与^[11-13], 以及肿瘤边缘的侧支循环^[14-15], 是肿瘤继续生长或复发的主要原因^[16], 致使TACE难以达到预期的效果, 限制了TACE的远期疗效. 我们在TACE治疗过程中先行腹主动脉造影, 再行肝动脉造影, 必要时行肠系膜上动脉造影, 逐步了解肿瘤血供情况, 有无侧支循环、动静脉瘘及门静脉癌栓. 尽量超选到达肿瘤供血动脉, 存在动静脉瘘时, 先用明胶海绵堵塞. 依据肿瘤体积的大小、肝功能Child分级, 根据碘油沉积情况, 决定碘油用量, 在电视监视下碘油的用量应加至动脉血流明显减慢或瘤旁门静脉分支出现显影为止. 门静脉分支出现显影, 表明肝动脉达到充分栓塞, 是碘油通过肝血窦从肝动脉向门静脉分支分流所致, 门静脉分支显影率与碘油的用量相关, 碘油用量越大, 门静脉显示率越高^[17]. 加大碘油用量, 不但

可以充分填塞肿瘤血管床, 还可能达到肝动脉和门静脉的双重栓塞, 从而提高栓塞的效果.

PEI是利用无水乙醇具有对局部瘤组织细胞杀伤力强, 使肝瘤细胞脱水固定, 蛋白质凝固变性, 使肿瘤内及周边营养血管变性, 血管内皮细胞破坏, 血栓形成导致血供障碍, 可使注射周围至少3 cm内肿瘤细胞坏死^[18]; 主要适应证是直径小于3 cm的单个结节或数量小于3个、最大直径小于3 cm的多个结节小HCC, 治疗后可使肿瘤的坏死率达70%以上^[9]; 随着瘤体的增大, 肿瘤间质中的纤维结构分隔瘤灶, 无法注入足量乙醇以破坏所有的癌细胞^[19-20], 另外大HCC多富于血供, 注入的无水乙醇易被血流冲走而作用下降, 单独PEI治疗大HCC疗效并不明显. PEI与TACE相结合, PEI可以弥补TACE不足^[21], 产生协同效应:(1)TACE后继以PEI有利于进一步杀死TACE后残余癌细胞^[22], (2)病理研究^[22]证实TACE治疗后使大量的肿瘤细胞液化坏死, 肿瘤内的纤维间隔崩解, 有利于无水乙醇的弥散, 扩大作用范围, 同时动脉栓塞使肝癌内血运受阻, 乙醇不易被血流冲走, 其细胞毒效应相应增强,(3)无水乙醇可以破坏肿瘤血管并使之闭塞, 使TACE治疗中缺漏的部分癌灶中残存的癌细胞坏死, 减少复发与转移的发生率^[22]. 已有较多的研究表明TACE联合PEI可明显提高疗效^[19-24], 可以取得比单纯的TACE或PEI更好的远期疗效, 病变坏死率可达86.4%^[9]. 本研究中双介入组有效率75.2%显著高于单纯组43.3% (P < 0.01).

生物治疗正在成为肿瘤治疗的一种重要手段, 其中过继免疫治疗是临床应用较多的一种治疗方法.近几年开展的过继免疫治疗如TIL细胞、CD3AK细胞等已经用于肿瘤术后、与化疗相结合, 对于减少肿瘤的术后复发, 提高患者化疗后免疫功能已经显示独特的作用. HCC患者自身免疫机制紊乱, 存在细胞免疫抑制, CD₃、CD₄较正常低, CD₈细胞水平明显提高且与肝癌的临床分期相关^[25], 栓塞化疗后又进一步加重了患者原有的免疫抑制. CIK是患者外周血单个核细胞体外经过多种细胞因子共同诱导而获得的一群以CD₃⁺CD₈⁺CTL和CD₃⁺CD₅₆⁺为主的异质细胞群^[7], 兼具有T淋巴细胞强大的抗肿瘤活性和NK非MHC限制性杀瘤细胞, 且体内外增生能力强^[26-28], 是一类杀瘤活性和杀瘤谱更强的一类新型抗肿瘤效应细胞.

我们首先应用双介入联合CIK细胞治疗HCC, 在TACE治疗后回输自身的CIK细胞, 可以通过直接的靶向肿瘤细胞进行杀伤或诱导其凋亡, 也可以其分泌的细胞因子增强机体化疗后减退的免疫功能; 瘤体内注入CIK细胞, 可使肿瘤局部的CIK细胞数量显著提高, 进一步杀灭TACE与PEI治疗后残余的癌细胞. 总结3种方法联合治疗(研究组)的有效率91.6%显著高于双介入组的有效率75.8%(P < 0.05); 患者的免疫功能, 研究组中的CD₃、CD₄细胞显著提高(P < 0.01), CD₈细胞下降明显(P < 0.05), 双介入治疗组与单纯组仅有CD₃升高明显(P < 0.05); 患者生存质量的Karnofsky评分, 研究组

升高 88.9%, 显著高于双介入治疗组的 74.2% 和单纯组的 53.3% ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 生存期随访中, 研究组的 1 a 生存率(77.8%)显著高于双介入组(56.4%)和单纯组(23.3%)($P < 0.05$, $P < 0.01$); 研究组的最长生存 48 mo, 双介入治疗组最长生存 30 mo(图 1~4). 对于不宜手术的中晚期 HCC, 根据患者个体情况, 采用 TACE、PEI 及 CIK 细胞过继免疫治疗, 可以弥补单一治疗方法的不足, 增强了抗癌效果, 有助于提高疗效, 可以提高患者的免疫功能及生存质量, 延缓患者的生存期.



图 1 治疗前病灶位于肝右叶($7.5\text{cm} \times 7.6\text{cm}$).

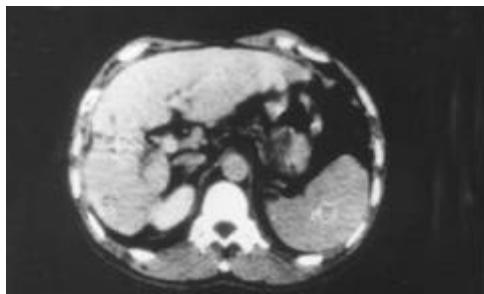


图 2 联合治疗 3 个周期后病灶变为条索状瘢痕.

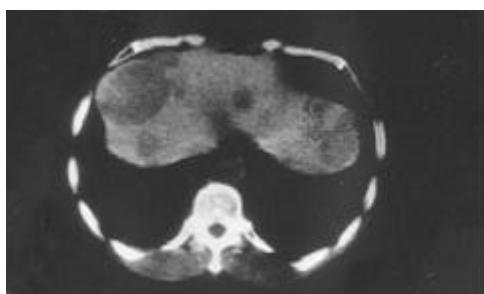


图 3 治疗前肝左右叶多发性病灶.

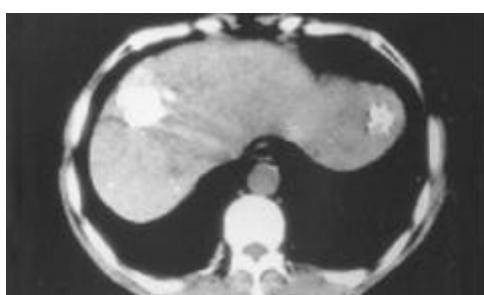


图 4 双介入治疗 2 个周期后病灶明显缩小, 碘油沉积.

4 参考文献

- 1 杨秉辉. 原发性肝癌的诊疗进展. 中国临床医学 2002;9:201-202
- 2 陈震, 宋明志, 刘鲁明, 于尔辛. 中晚期肝癌综合治疗进展. 医师进修杂志 2002;25:12-14
- 3 黄赞松. 原发性肝癌的非手术治疗进展. 中国综合临床 2002;18:966-967
- 4 吴孟超. 原发性肝癌治疗的进展及展望. 第二军医大学学报 2002;23:1-4
- 5 赵剑波, 李彦豪, 陈勇, 曾庆乐, 何晓峰, 魏朝晖, 罗鹏飞, 单鸿, 周谷生, 李晓晖. 原发性肝癌患者介入治疗期间生命质量评价的应用. 中华放射学杂志 2002;36:873-876
- 6 黄平, 王雅青, 薛世文, 唐志全, 李祥兴, 杨国璘. 肝动脉化疗栓塞术后原发性中晚期肝癌的生存分析. 中华内科杂志 1997;36:472-473
- 7 陈复兴, 刘军权, 张南征, 巩新建, 张国龙, 徐永茂, 周忠海, 王涛, 黄健. 自身细胞因子诱导的杀伤细胞过继性免疫治疗恶性肿瘤的临床观察. 癌症 2002;21:797-801
- 8 汤钊猷. 现代肿瘤学. 第 2 版. 上海: 上海医科大学出版社, 2000:611
- 9 孔庆珍, 夏建军, 李小丘. 肝细胞癌治疗方法的选择. 中国肿瘤临床 2001;28:795-798
- 10 郭亮, 丁乙, 陈学仁, 刘一之, 高亚枫, 钱海鑫, 田力平, 刑春根. 碘化油在肝癌治疗中若干问题的探讨(附 117 例分析). 现代医用影像学 1996;5:120-122
- 11 马广勤, 高从敬, 万向荣, 陈才保. 晚期肝癌变异性、寄生性供血的基础研究. 介入放射学杂志 1998;7:95-98
- 12 高从敬, 万向荣, 陈才保, 马广勤, 史跃, 郭文源. 晚期肝癌肝动脉变异的 X 线解剖及临床意义. 介入放射学杂志 1997;6:139-141
- 13 吴心愿, 张祥福, 殷凤崎, 冯玉满, 杨维竹. 肝癌治疗中肝动脉变异的诊断及其临床意义. 中国肿瘤临床 1995;22:749-750
- 14 刘福全, 岳振东, 徐建国, 漆德芳, 蔺武, 杜伟生. 超常规剂量碘油超选择栓塞肝动脉治疗原发性肝癌. 中国肿瘤临床 2001;28:276-278
- 15 史光军, 李占武, 胡义利. 影响中晚期肝癌化疗栓塞疗效的因素分析. 中国现代医学杂志 2001;11:40-41
- 16 刘福全, 封国生, 岳振东, 冯铁虹, 徐建国, 漆德芳, 蔺武, 杜伟生. 超常规剂量碘油超选择 TAE 与常规 TAE 后 II 期肝癌切除 -27 例手术病理及随访研究. 中国肿瘤临床与康复 2001;8:9-12
- 17 陈敏山, 李锦清, 张亚奇, 卢丽霞, 张伟章, 元云飞, 郭荣平, 林小军. 大剂量碘油肝动脉栓塞化疗治疗巨块型肝癌. 中华肿瘤杂志 2001;23:165-167
- 18 侯守玺, 魏法才, 王力, 李学华, 姜桂生, 常爱林. 联合介入治疗中晚期原发性肝癌. 中华外科杂志 1998;36:575
- 19 Tanaka K, Nakamura S, Numata K, Kondo M, Morita K, Kitamura T, Saito S, Kiba T, Okazaki H, Sekihara H. The long term efficacy of combined transcatheter arterial embolization and percutaneous ethanol injection in the treatment of patients with large hepatocellular carcinoma and cirrhosis. Cancer 1998;82:78-85
- 20 李忱瑞, 史仲华, 郝玉芝, 刘德忠, 郭彦君, 曾辉英, 姜文浩, 李槐, 周纯武. 经皮肝穿刺注射无水乙醇配合肝动脉化疗栓塞治疗原发性肝癌. 中华肿瘤杂志 2001;23:490-492
- 21 徐永茂, 张南征, 张国龙, 徐卫东, 史跃. 经皮肝瘤内注入无水乙醇结合 TACE 治疗中晚期原发性肝癌的疗效观察. 中国肿瘤临床与康复 2002;9:78-80
- 22 黄兢姚, 杨维竹, 江娜, 郑曲彬, 杨升, 黄宁. 经皮肝穿刺注射无水乙醇结合肝动脉化疗栓塞治疗原发性肝癌. 中国癌症杂志 2000;10:71-72
- 23 Tanaka K, Nakamura S, Numata K, Okazaki H, Endo O, Inoue S, Takamura Y, Sugiyama M, Ohaki Y. Hepatocellular carcinoma: treatment with percutaneous ethanol injection and transcatheter arterial embolization. Radiology 1992;185:457-460
- 24 郭伟剑, 于尔辛. 原发性肝癌的综合治疗研究进展. 中国癌症杂志 2000;10:275-277
- 25 陈伟强, 张世能. 肝癌患者治疗前后 T 细胞亚群和 sIL-2R 水平的变化. 上海免疫学杂志 1998;18:238-240
- 26 杜清友, 刘明旭, 王福生, 雷周云, 孙文兵, 陈菊梅, 吴祖泽. CIK 细胞体内外抗肝癌细胞作用. 中国癌症杂志 2001;11:325-327
- 27 张有顺, 黄玲, 杨红玲, 郝金波, 王波, 戴宗晴. 肝癌患者 CIK 细胞的诱导及对肝癌细胞毒作用的研究. 上海免疫学杂志 2003;23:201-203
- 28 施明, 雷周云, 王福生, 张冰, 黎文亮, 刘敬波. CIK 细胞对裸鼠肝癌移植瘤生长的抑制作用. 中国肿瘤生物治疗杂志 2002;9:179-182

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

复方肝癌宁抗乙型肝炎病毒的体外实验研究

袁冬生, 王新华, 李常青, 肖会泉

袁冬生, 广州中医药大学职业技术学院 广东省广州市 510405
王新华, 广州中医药大学国际学院 广东省广州市 510405
李常青, 广州中医药大学热带医学研究所 广东省广州市 510405
肖会泉, 广州中医药大学第一附属医院 广东省广州市 510405
袁冬生, 男, 1964-10-02 生, 江西省乐安县人, 汉族, 副教授。
项目负责人: 袁冬生, 510405, 广东省广州市, 广州中医药大学职业技术学院。ydshy@21cn.com
电话: 020-36585519 传真: 020-36585521
收稿日期: 2003-12-29 接受日期: 2004-02-18

Anti-HBV effect of compound Ganaining *in vitro*

Dong-Sheng Yuan, Xin-Hua Wang, Chang-Qing Li, Hui-Quan Xiao

Dong-Sheng Yuan, Professional Technology College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Xin-Hua Wang, International College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Chang-Qing Li, Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Hui-Quan Xiao, First Affiliated Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Correspondence to: Dong-Sheng Yuan, Professional Technology College, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. ydshy@21cn.com

Received: 2003-12-29 Accepted: 2004-02-18

Abstract

AIM: To study the anti-HBV effect of compound Ganaining *in vitro*.

METHODS: The 2.2.15 cell line was cultured *in vitro* to observe the inhibitory effect of compound Ganaining on secretion of HBsAg and HBeAg, and its toxicity on 2.2.15 cell line was also studied.

RESULTS: After the addition of compound Ganaining in 2.2.15 cell line for eight days, it showed that median toxic concentration (TC_{50}) of compound Ganaining was more than 10 g/L. IC_{50} of compound Ganaining on HBsAg and HBeAg was 0.67 g/L, and 0.13 g/L, respectively; its treatment index (TI) value on HBsAg and HBeAg was 93.46 and 2.17, respectively.

CONCLUSION: Compound Ganaining has a strong inhibitory action on secretion of HBsAg and HBeAg, and shows good effect of anti-HBV in 2.2.15 cell line.

Yuan DS, Wang XH, Li CQ, Xiao HQ. Anti-HBV effect of compound Ganaining *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1292-1294

摘要

目的: 探讨复方肝癌宁体外抗乙肝病毒(HBV)作用。

方法: 通过复方肝癌宁作用于体外培养的 2.2.15 细胞, 观察复方肝癌宁对 2.2.15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 的影响及药物的细胞毒性作用。

结果: 复方肝癌宁作用于 2.2.15 细胞 8 d 后, 对细胞的半数毒性浓度(TC_{50})为大于 10 g/L, 对 HBsAg 和 HBeAg 抑制的半数有效浓度(IC_{50})分别为 0.67 g/L 和 0.13 g/L, 复方肝癌宁对 HBsAg 和 HBeAg 的治疗指数(TI)分别为 14.93 和 76.92.

结论: 复方肝癌宁在体外细胞培养中对HBsAg和HBeAg的分泌有较好的抑制作用, 有显著的抗 HBV 作用。

袁冬生, 王新华, 李常青, 肖会泉. 复方肝癌宁抗乙型肝炎病毒的体外实验研究. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1292-1294
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1292.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染会导致急慢性乙型肝炎的发生, 而且与原发性肝癌关系密切. 近十多年来抗 HBV 的药物研究虽然取得了一定的进展, 但目前仍缺乏比较理想的治疗药物, 因此寻找新的有效药物显得尤为必要. 2.2.15 细胞株是用共转染法将克隆的 HBV-DNA 和抗 G418 质粒同时转入人肝癌细胞株 HepG₂ 而建立, 能长期稳定地分泌 HBsAg、HBeAg 和完整的 Dane 颗粒, 是目前体外抗 HBV 药物筛选和评价较好的细胞模型^[1-6]. 本实验研究以 2.2.15 细胞株为模型, 研究证实了复方肝癌宁的体外抗 HBV 作用.

1 材料和方法

2.2.15 细胞(自 HepG₂ 细胞转染而来, 分泌 HBsAg, HBeAg): 引自广州空军医院病毒室, 用 DMEM 培养液(GIBCO), 培养液加 10% 胎牛血清(天津血液所), 100 mg/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素, G418 380 mg/L (GIBCO), 0.3 g/L 谷氨酰胺, 用 2.38 g/L Hepes 调 pH 至 6.8. 用 0.6 g/L 胰蛋白酶将 2.2.15 细胞分散成 3×10^7 /L, 每孔 0.1 mL/于 96 孔板, 2 d 后换用含药培养液, 每个浓度加 4 孔, 复方肝癌宁用细胞维持液稀释成(10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156, 0.078 g/L), 与细胞作用 8 d 后, 吸上清用 ELISA 法测定 HBsAg, HBeAg, 余下细胞用甲基噻唑基四唑(MTT)法测定药物细胞毒性, 向细胞加入 400 mg/L MTT 0.1 mL/孔(Sigma), 37 °C、50 mL/L CO₂ 培养箱孵育 4 h 后, 可见黄黑色甲瓒颗粒, 轻轻弃去 MTT 液, 加入 1 kg/L DMSO 0.1 mL/孔,

37 °C、50 mL/L CO₂培养箱内孵育, 待甲瓒颗粒完全溶解(约10 min)后, 用紫外分光光度计570 nm波长测定吸光度A值, 空白对照加4孔1 kg/L DMSO 0.1 mL/孔。按下式计算细胞破坏百分率(%)=[(细胞对照A值-药物实验组A值)/(细胞对照A值-空白对照组A值)]×100%; 半数毒性浓度(TC₅₀)TC₅₀=Antilog[B+(50-<50%破坏百分率)×C/(>50%破坏百分率-<50%破坏百分率)]^[7-8]; A=log>50%药物浓度; B=log<50%药物浓度; C=A-B。HBsAg、HBeAg的检测采用华美公司ELISA测定盒检测。用酶标仪450/630nm双波长测定每孔A值, 并计算药物的半数有效浓度(IC₅₀)。细胞抑制百分率(%)=[(细胞对照A值-药物实验组A值)/(细胞对照A值-空白对照组A值)]×100%; IC₅₀=Antilog[B+(50-<50%抑制百分率)×C/(>50%抑制百分率-<50%抑制百分率)]^[7-8]; A=log>50%药物浓度; B=log<50%药物浓度; C=A-B。

药物对HBsAg、HBeAg的抑制作用, 本实验选择HBsAg、HBeAg作为药物效果的筛选指标, 通过MTT法测定药物的细胞半数毒性浓度(TC₅₀), 并相应计算出治疗指数(TI)=TC₅₀/IC₅₀^[8]来评价药物临床应用前景, 其中TI>2为有效低毒, 1<TI<2为低效有毒, TI<1为毒性作用。

2 结果

MTT法测得复方肝癌宁在2.2.15细胞上半数毒性浓度(TC₅₀)为>10 g/L。复方肝癌宁在各个稀释浓度下对2.2.15细胞形态均有轻微的损坏, 个别细胞有破坏情况(最低浓度除外), 但细胞破坏率大小与细胞形态变化无明显直接关系, 且其数值均不超过46%, 即都在复方肝癌宁的半数毒性浓度以下(表1)。

表1 复方肝癌宁对2.2.15细胞的毒性作用(mean±SD)

| 分组 | 剂量(g/L) | A值(mean ± SD) | 破坏率(%) |
|-------|---------|---------------|--------|
| 空白对照 | 0.0 | 0.01 | 0 |
| 细胞对照 | 0.0 | 1.82 ± 0.17 | 0 |
| 复方肝癌宁 | 10.0 | 1.22 ± 0.04 | 34.68 |
| | 5.0 | 1.03 ± 0.11 | 45.66 |
| | 2.5 | 1.22 ± 0.08 | 34.68 |
| | 1.25 | 1.30 ± 0.08 | 30.06 |
| | 0.625 | 1.04 ± 0.01 | 45.09 |
| | 0.3 125 | 1.15 ± 0.11 | 38.73 |
| | 0.156 | 1.196 ± 0.07 | 36.07 |
| | 0.078 | 1.78 ± 0.19 | 2.31 |

复方肝癌宁抑制2.2.15细胞分泌HBsAg的半数有效浓度(IC₅₀)为0.67 g/L, 即复方肝癌宁在本实验中浓度为0.625 g/L以上抑制效果明显, 低于此浓度抑制效果不明显; 抑制2.2.15细胞分泌HBeAg的半数有效浓度(IC₅₀)为0.13 g/L, 即复方肝癌宁在本实验中浓度为0.156 g/L以上抑制效果明显, 低于此浓度抑制效果不

明显(表2)。

表2 复方肝癌宁对2.2.15细胞分泌HBsAg、HBeAg的抑制作用

| 分组 | 剂量(g/L) | HBsAg | | HBeAg | |
|-------|---------|-------------|--------|-------------|--------|
| | | A值(mean±SD) | 抑制率(%) | A值(mean±SD) | 抑制率(%) |
| 空白对照 | 0.0 | 0.039 | - | 0.01 | |
| 细胞对照 | 0.0 | 0.59 ± 0.12 | | 1.71 ± 0.56 | |
| 复方肝癌宁 | 10.0 | 0.26 ± 0.04 | 55.9 | 1.06 ± 0.20 | 38.0 |
| | 5.0 | 0.19 ± 0.04 | 67.8 | 0.57 ± 0.12 | 66.7 |
| | 2.5 | 0.23 ± 0.05 | 61.0 | 0.60 ± 0.12 | 64.9 |
| | 1.25 | 0.25 ± 0.03 | 57.6 | 0.67 ± 0.09 | 60.8 |
| | 0.625 | 0.30 ± 0.06 | 49.2 | 0.77 ± 0.15 | 55.0 |
| | 0.3 125 | 0.28 ± 0.08 | 52.5 | 0.80 ± 0.19 | 53.2 |
| | 0.156 | 0.33 ± 0.05 | 44.1 | 0.81 ± 0.23 | 52.6 |
| | 0.078 | 0.44 ± 0.05 | 25.4 | 0.98 ± 0.20 | 42.7 |

复方肝癌宁对2.2.15细胞分泌HBsAg、HBeAg的治疗指数分别为14.93, 76.92, 远大于2, 具有较强的体外抑制2.2.15细胞表达乙肝病毒抗原的作用, 提示复方肝癌宁在体外实验中有很好的抗HBV作用。

3 讨论

2.2.15细胞株的建立, 为体外筛选抗病毒药物提供了较好的细胞模型。抗病毒治疗的目的是持续抑制病毒复制, HBsAg和HBeAg为2.2.15细胞分泌至上清液中的可溶性蛋白质, 间接地反映了病毒复制状况, 因检测简便、经济和快速, 可作为抗HBV筛选的可靠指标。MTT比色法主要原理在于检测细胞内线粒体琥珀酸脱氢酶的活力, 活细胞线粒体的琥珀酸脱氢酶能使外源性的MTT还原为蓝紫色结晶物并沉积在细胞中, 而死亡细胞无此功能, 他在一定程度上反映了细胞的生存活力, 以此数据换算得出TC₅₀, 比传统方法在肉眼镜下观察和判断细胞破坏程度更客观、可信。

复方肝癌宁为纯中药复方制剂, 由叶下珠、青蒿、云芝、广豆根、莪术、菟丝子等组成。研究表明该复方药物叶下珠^[9-11]、青蒿^[12-14]、广豆根^[15-17]、莪术^[18-20]均有较好的抗肝癌作用; 叶下珠^[21-24]、广豆根^[25-30]、云芝^[31]有较好的抗乙肝病毒作用; 云芝^[32-33]、广豆根^[34]、青蒿^[35]具有免疫调节作用。本实验研究结果显示复方肝癌宁对2.2.15细胞的毒性较小, 细胞半数毒性浓度(TC₅₀)为>10 g/L, 对HBsAg和HBeAg抑制的半数有效浓度(IC₅₀)分别为0.67 g/L和0.13 g/L, 其对HBsAg和HBeAg的抑制作用, 与药物浓度呈正相关。复方肝癌宁对HBsAg和HBeAg的治疗指数分别为14.93, 76.92, 均大于2, 提示复方肝癌宁为低毒有效的药物制剂。

2.2.15细胞培养具有易于控制实验条件及均衡性好等特点, 但体外实验研究结果不能反映体内所特有的免疫调节和体内代谢对药物效果的影响, 因此, 本实验研究虽然显示复方肝癌宁有较好的抑制HBsAg、HBeAg

分泌作用，但进一步证实其抗病毒作用还须结合体内实验来确定，其作用机制也有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 王九平, 白雪帆, 张三奇, 李谨革, 张颖, 张岩, 薛克昌, 顾宜, 王平忠, 骆抗先. 肝靶向十六酸拉咪呋啶酯固体脂质纳米粒抗乙肝病毒的研究. 世界华人消化杂志 2003;11:191-194
- 2 Ding J, Liu J, Xue CF, Gong WD, Li YH, Zhao Y. Anti-HBV effect of TAT-HBV targeted ribonuclease. *World J Gastroenterol* 2003;9:1525-1528
- 3 高萍, 谢朝良. 体外抗乙肝病毒研究进展. 中西医结合肝病杂志 2003;13:60-62
- 4 曹鸿鹏, 陶佩珍, 拉米夫定等六种药物的体外抗乙型肝炎病毒作用. 中华医学杂志 2001;8:1004-1007
- 5 吴赤红, 曾争, 王勤环, 于敏. 双靶区反义 RNA 抗乙型肝炎病毒的实验研究. 中华医学杂志 2001;81:605-608
- 6 杨湛, 邓学龙, 张奉学, 吴婉芬, 雷春亮, 朱宇同. 减毒水痘病毒对乙型肝炎病毒复制的影响. 中华肝脏病杂志 2001;9:28-30
- 7 Su HB, Wang HF, Ji W, Zhao YL, Cai GM. In vitro evaluation on the effects of combined lamivudine (3TC) and Ara-AMP against hepatitis B virus. *Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2002;16:16-19
- 8 范涛, 傅希贤, 张国庆, 张乃临. 中草药抗乙型肝炎病毒活性及其作用机制体外实验研究. 中华实验和临床病毒学杂志 1996;10:27
- 9 纪徐准, 秦一中, 汪伟业, 朱建英, 许国铭. rhIFN- α b 和苦味叶下珠提取物对人肝癌细胞株 PLC/PRF/5 产生 HBsAg 的影响. 新消化病学杂志 1995;3:136-138
- 10 王昌俊, 袁德培, 陈伟, 毛大钧. 叶下珠对人肝癌细胞的影响. 时珍国药研究 1997;8:499-500
- 11 杨书兰, 邝幸华, 朱宇同. 叶下珠复方制剂对小鼠肝癌的抑制作用的实验研究. 癌症 2000;19:837-838
- 12 王勤, 吴理茂, 赵一, 张锡流, 王乃平. 青蒿琥酯抗肿瘤作用的机制研究. 药学学报 2002;37:477-478
- 13 王勤, 吴理茂, 李爱媛, 赵一, 王乃平. 青蒿琥酯抗肝癌作用的实验研究. 中国中药杂志 2001;26:707-708
- 14 陈征途, 黄真炎, 吴玲霓, 曾庆平. 青蒿素介导肝癌细胞凋亡的实验研究. 中西医结合肝病杂志 2000;10:23-25
- 15 司维柯, 潘静, 陆华, 李招权. 苦参碱抑制 HepG2 细胞增生及其剂量与抑制方式关系的研究. 世界华人消化杂志 2001;9:185-189
- 16 陈伟忠, 林勇, 谢渭芬, 张俊平, 张新, 程志红. 苦参碱对肝癌细胞端粒酶活性调控及细胞周期的影响. 第二军医大学学报 2002;23:498-450
- 17 罗明, 贺平, 吴孟超, 崔贞福, 李琳芳, 郭亚军. 苦参碱和氧化苦参碱对二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌的预防阻断作用. 肿瘤防治杂志 2000;7:561-563
- 18 吴万垠, 郭伟剑, 常钢. 药术油微球释放莪术油对人肝癌 SMMC-7721 细胞的作用. 世界华人消化杂志 2003;11:260-263
- 19 谭敏, 宾晓农, 吴万垠, 汪波, 张维彬, 肖楚梅. 莪术油对小鼠肝癌细胞原位凋亡的影响. 中西医结合肝病杂志 2002;12:290-291
- 20 石灵春, 汪波, 吴万垠, 肖楚梅, 何青莲. 莪术油对小鼠肝癌细胞抑制作用的分子机理. 中药药理与临床 2002;18:6-7
- 21 刘庄, 傅希贤, 张乃临, 张国庆, 刘丹. 中草药叶下珠不同品种和制剂体外抗乙型肝炎病毒的实验研究. 中华实验和临床病毒学杂志 1997;11:282-285
- 22 李常青, 王新华, 李广谦, 方宏勋. 叶下珠复方治疗慢性乙型肝炎的临床观察. 新中医 1998;30:45-46
- 23 仲英, 左春旭, 李风琴, 丁杏苞, 姚庆强, 吴克霞, 张琴冈, 王志玉, 周玲, 王菊, 兰静, 王晓静. 叶下珠化学成分及其抗乙肝病毒活性的研究. 中国中药杂志 1998;23:363-364
- 24 陈压西, 郭树华, 齐珍元, 张定凤. 广西叶下珠抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究. 重庆医科大学学报 2000;25:39-40
- 25 徐文胜, 王国俊, 缪晓辉, 蔡雄. 氧化苦参碱对 HepG2. 2. 15 细胞中乙型肝炎病毒 DNA 表达量的影响. 第二军医大学学报 2002;23:72-73
- 26 陈燕熙, 茅佰元, 江建华, 施建华, 李继强. 氧化苦参碱治疗慢性乙型病毒性肝炎疗效及其与 HBV 负荷的关系探讨. 中国中西医结合杂志 2002;22:335-336
- 27 李常青, 刘妮, 李小翠, 程怡, 张奉学, 张冬青, 朱宇同. 苦参碱脂质体抗乙型肝炎病毒的体外实验研究. 热带医学杂志 2003;3:19-21
- 28 李常青, 张冬青, 李小翠, 张奉学, 周红燕, 程怡, 李向阳. 苦参碱脂质体抗鸭乙型肝炎病毒的体内实验研究. 新中医 2003;35:77-78
- 29 Chen XS, Wang GJ, Cai X, Yu HY, Hu YP. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2001;7:49-52
- 30 陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 邱德凯, 沈朝晖, 宋育林, 曹爱平. 氧化苦参碱对 HBV 转基因鼠 HBV 抗原表达的抑制作用. 世界华人消化杂志 2004;12:89-92
- 31 徐德先. 云芝多糖胶囊治疗乙型肝炎 108 例. 中西医结合肝病杂志 1999;9:36-37
- 32 唐庆九, 张劲松, 潘迎捷, Reutter W, 樊华. 几种药用真菌粗提物免疫调节和肿瘤抑制作用的筛选. 食用菌学报 2003;10:1-6
- 33 庞战军, 陈瑗, 周玫. 云芝多糖增强巨噬细胞 M-CSF 的表达与分泌. 免疫学杂志 1989;15:245-248
- 34 王会贤, 章灵华, 黄艺, 钱玉昆. 氧化苦参碱对 LAK 细胞活性的影响. 免疫学杂志 1994;10:17-19
- 35 杨四旬, 谢蜀生, 马大龙, 高汉林, 龙振洲. 二氢青蒿素促进 IL-2 产生及 mRNA 表达. 中国药理学报 1994;15:515

Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 收录 World Journal of Gastroenterology

本刊讯 在 2004 年 11 月, Nature Publishing Group 将会出版一系列杂志, 题为自然临床实践, 包括肿瘤、心血管、泌尿、胃肠病学和肝脏病学, 这些文章会应用于临床患者和医生. Nature Publishing Group 收录非常有影响的杂志, *World Journal of Gastroenterology* 也被收录。Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 为非常繁忙的胃肠病学家和肝脏病学家提供其专业的概况和其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为他们的患者提供进一步的帮助. Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology 提供电子和印刷版, 其主编为 Stephen Hanauer. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

HBV感染患儿外周血T淋巴细胞亚群的分析与临床意义

杨斌, 张鸿飞, 范振平, 王福生

杨斌, 张鸿飞, 范振平, 王福生, 中国人民解放军第302医院传染病研究所生物治疗研究中心 北京市 100039
杨斌, 男 1973-05-30 生, 北京市人, 汉族. 2001年解放军军医进修学院传染病学硕士生, 医师.
国家自然科学基金资助, No. 30271230
项目负责人: 王福生, 100039, 北京市西四环中路100号, 中国人民解放军第302医院传染病研究所生物治疗研究中心. fswang@public.bta.net.cn
电话: 010-66933332 传真: 010-63831870
收稿日期: 2004-04-19 接受日期: 2004-05-13

Peripheral T cell subsets in pediatric subjects with chronic HBV infection

Bin Yang, Hong-Fei Zhang, Zhen-Ping Fang, Fu-Sheng Wang

Bin Yang, Hong-Fei Zhang, Zhen-Ping Fang, Fu-Sheng Wang, Research Center of Biological Therapy, Beijing Institute of Infectious Diseases, Beijing 302 Hospital, Beijing 100039, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30271230

Correspondence to: Dr. Fu-Sheng Wang, Research Center of Biological Therapy, Beijing Institute of Infectious Diseases, Beijing 302 Hospital, Beijing 100039, China. fswang@public.bta.net.cn

Received: 2004-04-19 Accepted: 2004-05-13

Abstract

AIM: To investigate the characteristics of T-lymphocytic subsets in HBV infected pediatric subjects for evaluation of their clinical implication.

METHODS: Fresh peripheral blood samples were obtained from 29 HBV-infected pediatric cases and 15 healthy counterparts. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subsets including the naive (CD45RA⁺), memory (CD45RO⁺), functional (CD28⁺), activated (HLA-DR⁺CD25⁺) and apoptosis (CD95⁺) T lymphocytes, respectively, were analyzed by flow cytometry. The clinical data such as serum ALT level, HBV viral load and the number of peripheral lymphocytes were simultaneously recorded from each HBV carrier.

RESULTS: HBV-infected children had an obviously increasing percentage of CD8⁺CD28⁺ T cells (72±11%), CD8⁺CD38⁺ (85±6%) and CD8⁺CD95⁺ (19±12%) T-lymphocytes, and there were significant differences between the children with chronic B hepatitis and the healthy children ($P < 0.05$). As compared to the absolute number of CD8⁺CD28⁺ (0.62±0.2 5×10⁹/L), CD8⁺CD38⁺ (0.74±0.3 1×10⁹/L) and CD8⁺CD95⁺ (0.16±0.1 3×10⁹/L) T-lymphocytes, the patients had higher numbers than the healthy children ($P < 0.05$). The increase of numbers of circulating CD8⁺CD38⁺, CD8⁺CD95⁺ and CD8⁺CD28⁺ T-lymphocytes was significant. Furthermore, the association was not found between serum HBV viral load level and the T-lymphocyte subsets.

CONCLUSION: Our data may provide valuable information for evaluation of disease progression of HBV infected children

Yang B, Zhang HF, Fang ZP, Wang FS. Peripheral T cell subsets in pediatric subjects with chronic HBV infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1295-1298

摘要

目的: 探讨CHB患儿外周血淋巴细胞各亚群的特点及与肝病病情的关系.

方法: 采用流式细胞术对CHB患儿29例、正常儿童15例的外周血纯真T细胞亚群、功能T细胞亚群、激活T细胞亚群及凋亡T细胞亚群进行检测,并结合血清转氨酶(ALT)和病毒载量水平进行统计学分析.

结果: CHB患儿外周血CD4⁺CD45RA⁺T, CD4⁺CD45RO⁺T, CD4⁺CD28⁺T, CD4⁺HLA-DR⁺T, CD4⁺CD25⁺T, CD4⁺CD95⁺T, CD8⁺HLA-DR⁺T, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺T, CD3⁺CD8⁺T, CD4⁺CD8⁺与正常儿童相应的细胞亚群比较, 无统计学差异($P > 0.05$), 但CD8⁺CD28⁺T(0.62±0.2 5×10⁹/L), CD8⁺CD38⁺T(0.74±0.3 1×10⁹/L), CD8⁺CD95⁺T(0.16±0.1 3×10⁹/L)细胞亚群的绝对数与正常对照组CD8⁺CD28⁺T(0.44±0.15×10⁹/L), CD8⁺CD38⁺T(0.57±0.1 6×10⁹/L), CD8⁺CD95⁺T(0.03±0.01×10⁹/L)比较, 有统计学差异($P < 0.05$), CD8⁺CD28⁺T, CD8⁺CD38⁺T及CD8⁺CD95⁺T的构成比同样高于健康的儿童.

结论: CHB患儿外周血CD4⁺T细胞亚群数量上改变不明显, 主要是CD8⁺T淋巴细胞亚群的异常, 其中CD8⁺CD38⁺T, CD8⁺CD95⁺T, CD8⁺CD28⁺T细胞亚群细胞绝对数较正常儿童明显升高.

杨斌, 张鸿飞, 范振平, 王福生. HBV感染患儿外周血T淋巴细胞亚群的分析与临床意义. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1295-1298

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1295.asp>

0 引言

乙型肝炎是HBV感染引起的免疫病理损害, 肝细胞损害主要是由细胞介导的免疫损伤造成^[1]. 机体感染HBV后, 体内各淋巴细胞亚群间的正常平衡被打破, 表现为外周血淋巴细胞亚群构成比、绝对数和功能改变, 这些变化可反映机体细胞免疫的状况, 此外HBV可以通过活化诱导机制导致外周血淋巴细胞凋亡^[2-4], 促使淋巴细胞亚群绝对数减少. 迄今, 已经报道的HBV感染引起T细胞亚群的改变主要是成人的结果^[5], 而儿童方面的研究未见报道. 值得重视的是儿童感染HBV以

后，容易发生免疫耐受和慢性化，是否与儿童外周血T淋巴细胞具有自身特点有关尚不清楚。因此我们在对CHB成人外周血淋巴细胞亚群与病程相关性研究的基础上^[5]，进一步对HBV感染的慢性患儿及健康儿童外周血T淋巴细胞亚群的构成比和绝对数进行观察，以了解CHB患儿外周血T淋巴细胞的特点，为CHB患儿的临床诊治及疗效评估提供一定的参考。

1 材料和方法

1.1 材料 新入院CHB患儿29例符合中华医学会传染病与寄生虫病学会(西安)2000年修订的标准。男23例，女6例，年龄6-14(平均9.4±3.0)岁，母婴垂直传播感染者11例，密切接触感染者6例，其他途径者12例，其中HBsAg，HBeAg，抗HBc阳性25例；HBsAg，抗HBe，抗HBc阳性4例，病毒载量 1.31×10^7 - 4.1×10^{12} 拷贝/L，ALT波动于167-677 nkat/L。对照组为年龄、性别一致的健康儿童15例。全部病例及健康儿童对照组均经ELISA法检测HBsAg，抗HBs，HBeAg，抗HBe和抗HBc，并除外合并其他疾病，同时进行血常规、肝功能和HBV-DNA定量检测。Simultest TM IMK-lymphocyte免疫荧光试剂盒购自美国Becton Dickinson公司；单克隆抗体组合为PE-CD45RA/FITC-CD4(A液)，PE-CD45RO/FITC-CD4(B液)，PE-CD28/FITC-CD4(C液)，PE-HLA-DR/FITC-CD4(D液)，PE-CD25/FITC-CD4(E液)，FITC-CD28/PE-CD8/PerCP-CD3(F液)，FITC-CD95/PE-CD4(G液)，PE-HLA-DR/FITC-CD8/PerCP-CD3(H液)，FITC-CD8/PE-CD38/PerCP-CD3(I液)，FITC-CD95/PE-CD8/PerCP-CD3(J液)，FITC-CD4/PE-CD8/PerCP-CD3(K液)。FACScalibur流式细胞仪

(美国BD公司)，HBV-DNA定量检测(美国GeneAMPsystem9600检测仪)。抽取抗凝血2.8 mL，一部分通过全自动血液分析仪进行白细胞计数和白细胞分类计数；另一部分通过流式细胞仪进行淋巴细胞亚群检测。

1.2 方法 外周血淋巴细胞亚群的检测 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K样品测定管中各加入抗凝血标本50 μL，然后每管中各相应加入A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K液10 μL，振荡混匀，室温避光孵育20 min，加入溶血素1 mL，振荡混匀，室温避光放置10 min，1200 r/min离心5 min弃上清液，加入PBS 1 mL，1200 r/min离心5 min弃上清液，加入PBS 400 μL，混匀后上机检测，采用SimulSET软件获取分析。T4, T8细胞绝对数是通过全自动血液分析仪进行白细胞计数和白细胞分类所得的淋巴细胞数分别与T4, T8细胞构成比的乘积，T4, T8细胞中各亚群的绝对数为各自的构成比与T4, T8细胞绝对数的乘积。

统计学处理 采用SPSS10.0软件进行统计学分析，淋巴细胞亚群的百分比和绝对数以mean±SD表示，组间均数比较采用t检验。

2 结果

2.1 CHB患儿外周血淋巴细胞亚群特点 患儿外周血CD4⁺CD45RA⁺T, CD4⁺CD45RO⁺T, CD4⁺CD28⁺T, CD4⁺HLA-DR⁺T, CD4⁺CD25⁺T, CD4⁺CD95⁺T, CD8⁺HLA-DR⁺T, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺T, CD3⁺CD8⁺T, CD4⁺/CD8⁺比与正常儿童相比较，无统计学显著性差异P>0.05，而CD8⁺CD28⁺T(72±11%)，CD8⁺CD38⁺T(85±6%)，CD8⁺CD95⁺T(19±12%)细胞亚群的构成比较大正常对照组有所升高P<0.05(表1)。CHB患儿外周血

表1 患儿外周血T淋巴细胞亚群特点

| 淋巴细胞亚群 | 慢性肝炎(n=29) | | 正常儿童(n=15) | | P值 |
|--------------------------------------|------------|-------------------------|------------|-------------------------|-------|
| | 构成比 | 绝对数(10 ⁹ /L) | 构成比 | 绝对数(10 ⁹ /L) | |
| CD3 ⁺ | 0.68±0.07 | 1.98±0.72 | 0.69±0.07 | 1.78±0.47 | 0.44 |
| CD3 ⁺ CD4 ⁺ | 0.33±0.07 | 0.98±0.42 | 0.33±0.05 | 0.86±0.32 | 0.97 |
| CD3 ⁺ CD8 ⁺ | 0.30±0.07 | 0.87±0.33 | 0.30±0.05 | 0.76±0.20 | 0.89 |
| CD4 ⁺ CD45RA ⁺ | 0.59±0.10 | 0.60±0.33 | 0.63±0.05 | 0.55±0.23 | 0.14 |
| CD4 ⁺ CD45RO ⁺ | 0.41±0.10 | 0.39±0.15 | 0.36±0.05 | 0.31±0.10 | 0.09 |
| CD4 ⁺ CD28 ⁺ | 0.94±0.07 | 0.93±0.413 | 0.94±0.03 | 0.82±0.31 | 0.48 |
| CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ | 0.16±0.07 | 0.15±0.06 | 0.15±0.05 | 0.13±0.06 | 0.54 |
| CD4 ⁺ CD25 ⁺ | 0.23±0.07 | 0.09±0.23 | 0.23±0.04 | 0.19±0.08 | 0.73 |
| CD4 ⁺ CD95 ⁺ | 0.39±0.12 | 0.36±0.15 | 0.35±0.08 | 0.29±0.10 | 0.22 |
| CD8 ⁺ CD28 ⁺ | 0.72±0.11 | 0.62±0.25 | 0.59±0.12 | 0.44±0.15 | 0.000 |
| CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ | 0.21±0.09 | 0.17±0.09 | 0.20±0.08 | 0.15±0.07 | 0.95 |
| CD8 ⁺ CD38 ⁺ | 0.85±0.06 | 0.74±0.31 | 0.76±0.09 | 0.57±0.16 | 0.00 |
| CD8 ⁺ CD95 ⁺ | 0.19±0.11 | 0.16±0.13 | 0.03±0.01 | 0.03±0.01 | 0.00 |
| CD4 ⁺ /CD8 ⁺ | 1.16±0.44 | | 1.16±0.25 | | 0.99 |
| 白细胞 | | 6.57±1.653 | | 6.633±1.81 | 0.90 |
| 淋巴细胞 | | 2.90±0.962 | | 2.581±0.69 | 0.26 |

白细胞及淋巴细胞绝对数与正常儿童比较无统计学差异，同时 CD3⁺、CD4⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺ 绝对数也无统计学差异；但患儿外周血 CD8⁺T 有一定的改变，如 CD8⁺CD28⁺T ($0.62 \pm 0.25 \times 10^9/L$)，CD8⁺CD38⁺T ($0.74 \pm 0.31 \times 10^9/L$)，CD8⁺CD95⁺T ($0.16 \pm 0.13 \times 10^9/L$) 较健康儿童高 $P < 0.05$ ，与 CHB 患儿外周血淋巴细胞亚群百分比变化特点相一致(表 1)。

2.2 CHB 患儿 CD8⁺T 与 HBV 病毒载量和 ALT CHB 患儿病毒载量 $1.31 \times 10^7 - 4.1 \times 10^{12}$ 拷贝/L. CD8⁺CD28⁺T 细胞亚群绝对数与病毒载量对数值呈正相关倾向($r = 0.092$, $P = 0.635$)，但无统计学意义，CD8⁺CD38⁺T 细胞亚群绝对数与病毒载量对数值，呈正相关倾向($r = 0.171$, $P = 0.375$)，同样无统计学意义，CD8⁺CD95⁺T 细胞亚群绝对数与病毒载量对数值，呈负相关倾向($r = -0.011$, $P = 0.954$)，也无统计学意义(图 1A, 1B, 1C). CD8⁺CD28⁺T 绝对数与 ALT 呈负相关倾向($r = -0.0011$, $P = 0.955$)，无统计学意义，CD8⁺CD38⁺T 细胞亚群绝对数与 ALT 呈正相关倾向($r = 0.073$, $P = 0.707$)，同样无统计学意义，CD8⁺CD95⁺T 绝对数与 ALT 呈正相关倾向($r = 0.121$, $P = 0.532$)，也无统计学意义(图 2A、2B、2C).

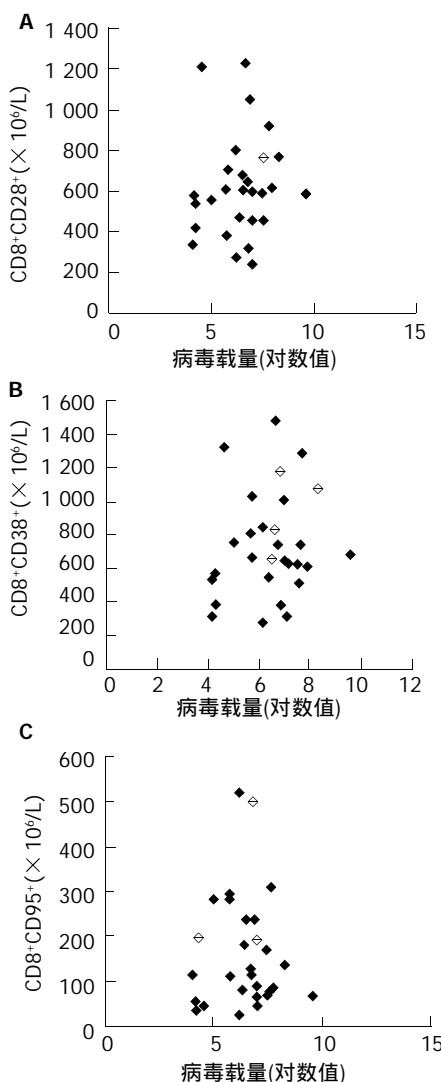


图 1 患儿外周血 T 淋巴细胞亚群与病毒载量.

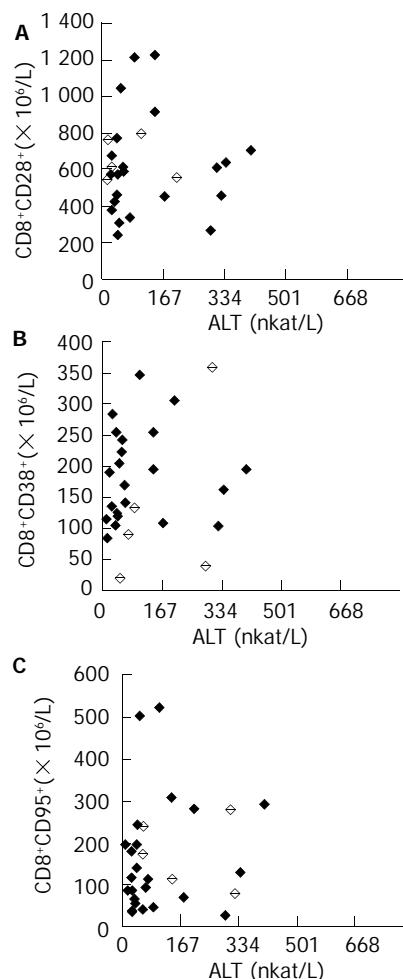


图 2 患儿外周血 T 淋巴细胞亚群血清 ALT 之间的关系.

3 讨论

机体感染 HBV 后，体内抗病毒的免疫反应主要是细胞免疫，是由各种 T 淋巴细胞共同参与下进行的。T4 细胞未接触其特异性抗原刺激之前，以纯真细胞(CD4⁺CD45RA⁺)的形式存在，主要参与机体对未接触过的抗原起免疫应答，是机体细胞免疫的后备力量。受特异性抗原刺激后，T4 纯真细胞(CD4⁺CD45RA⁺)转变为记忆性 T4 (CD4⁺CD45RO⁺)，并发生克隆扩增，成为抗原特异性淋巴细胞，主要参与对已接触过的抗原发生迅速而有效的免疫反应^[6-7]。本研究显示，CHB 患儿外周血 CD3⁺ 淋巴细胞、T4、T8、T4 纯真细胞、T4 记忆亚群构成比及绝对数与正常儿童相比较，其差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，提示在 CHB 患儿，HBV 没有显著影响到其外周血中淋巴细胞数量，也没有影响到 T4 纯真细胞亚群和 T4 记忆亚群的数量及其比例，同时没有影响 T4 纯真细胞亚群和 T4 记忆亚群之间的动态平衡，但是其功能如何有待进一步研究。CD28 分子是 T 细胞正常激活所必须的第二信号，它与抗原呈递细胞上相应的配体 B7.1/2 结合后，诱导 T 淋巴细胞表达白介素-2(IL-2)，促进 T 淋巴细胞增生，不表达 CD28 分子的 T4 或 T8 细胞接受抗原刺激后，无法正常激活，通常表现为无应答状态，或

者发生细胞凋亡^[8]。我们发现：T4功能亚群(CD4⁺CD28⁺)构成比及绝对数较正常儿童无明显变化(P >0.05)，但CD8⁺CD28⁺T却明显升高，具有统计学意义(P <0.05)，这提示：CD8⁺CD28⁺T可能在CHB患儿T淋巴细胞增生中起重要作用，但与CHB病程的关系，则需动态观察。T淋巴细胞激活后，其细胞表面通常表达相应的激活分子标志物，如CD25分子是IL-2的α受体，与细胞早期激活相关。HLA-DR分子和CD38分子则是通过对激活信号的转导，诱导产生特定的细胞因子，促进T细胞的激活^[9-10]。CD4+CD25+T具有自身免疫防御作用，在自然条件下处于无能状态，同时CD4⁺CD25⁺T细胞亚群在外周耐受机制方面起着重要作用^[1, 11-15]，具有抑制其他CD4⁺T和CD8⁺T细胞的活性，其抑制作用是抗原非特异性的。他对于刺激表现为无能状态，当发挥免疫调节功能时，需要通过TCR的刺激；当发挥抑制功能时，不依赖于细胞因子而依赖于细胞间的接触^[15-16]。CD4⁺CD25⁺T细胞可能通过抑制靶细胞IL-2的合成及下调抗原呈递细胞上CD80和CD86的表达而发挥作用，也可能通过膜型TGF-B发挥抑制功能^[17]。我们发现CD4⁺CD25⁺及CD4⁺HLA-DR⁺T构成比及绝对数与正常对照组比较无明显差异，因此推测在CHB患儿外周血中，CD4⁺CD25⁺T很可能没有抑制T4和T8细胞对HBV的活性反应，但未检测T淋巴细胞亚群功能，故其在CHB中的作用应在检测其功能后才能下结论。此外CHB患儿外周血中T8激活亚群以CD8⁺CD38⁺T淋巴细胞为主，提示CD8⁺CD38⁺T在促进CHB患儿外周血T细胞的激活中可能起重要作用。

Schulze-Osthoff et al^[18]研究证实：HBV⁺患者外周血淋巴细胞凋亡率均明显高于正常对照组，刘征波 et al^[19]也发现CHB患者外周血淋巴细胞在PHA活化后存在凋亡紊乱现象，其TCR诱导的凋亡发生率在CHB患者明显增高。本结果表明与健康儿童相比较，CHB患儿外周血CD4⁺CD95⁺T，CD3⁺T，CD3⁺CD4⁺T，CD3⁺CD8⁺T细胞亚群的构成比、绝对数及CD4⁺/CD8⁺比无明显变化，而CD8⁺CD95⁺T淋巴细胞亚群百分比及绝对数则明显升高，差异具有统计学意义，提示HBV通过细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的旁分泌或自分泌作用于细胞，上调CD8⁺T细胞亚群Fas及FasL基因的表达，促进细胞凋亡，并且通过Fas/FasL系统，使表达FasL的CD8⁺T淋巴细胞杀死表达Fas的受感染肝细胞来达到清除HBV的目的^[20]，由此导致肝组织的免疫病理损伤引发肝炎有待于进一步研究。

关于HBV病毒载量对淋巴细胞亚群的影响方面：Boni et al^[21-22]研究发现，在拉米夫定治疗后，随着患者体内病毒载量下降，人体的免疫功能包括辅助性T细胞和细胞毒性T的功能有所恢复，说明病毒载量对人体免疫功能有抑制作用。但是在此次试验中并未发现病毒载量与CD8⁺CD28⁺T，CD8⁺CD38⁺T，CD8⁺CD95⁺T细胞数量之间有明显的相互关系，其原因可能与患儿

遗传和免疫背景有关，也可能与感染不同病毒基因型或者基因变异有关。目前我们正在动态观察患儿HBV病毒载量和CD8⁺CD28⁺T，CD8⁺CD38⁺T，CD8⁺CD95⁺T细胞亚群同时进行T淋巴细胞的功能及病毒基因型的分析，有可能希望对CHB患儿病程和发病机制有更全面和深刻的认识。

4 参考文献

- 孙世杰, 刘丹, 于春雷, 松本, 李一. NF-κB 诱导激酶基因突变对CD4⁺CD25⁺调节性T细胞产生的影响. 中国免疫学杂志 2003; 19:305-308
- Nakamura K, Yuh K, Sugyo S, Shijo H, Kimura N, Okumura M. Apoptosis observed in peripheral T lymphocytes from patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 1996;111: 156-164
- Saha K, Yuen PH, Wong PK. Murine retrovirus-induced depletion of T cells is mediated through activation-induced death by apoptosis. *J Virol* 1994;68:2735-2740
- 季伟, 王慧芬, 冯传前, 鞠连才, 赵敏, 貌盼勇. 慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞凋亡的检测及临床意义. 中华肝脏病杂志 1999; 7:77-79
- 王敏, 王福生, 刘敬超. 慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞亚群与病程相关性的研究. 肝脏 2003;6:18-20
- Croft M, Bradley LM, Swain SL. Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells. *J Immunol* 1994;152:2675-2685
- Farber DL. Differential TCR signaling and generation of memory T cells. *J Immunol* 1998;160:535-539
- June CH, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994;15:321-331
- Funaro A, Spagnoli GC, Ausiello CM, Alessio M, Roggero S, Delia D, Zaccolo M, Malavasi F. Involvement of the multilineage CD38 molecule in a unique pathway of cell activation and proliferation. *J Immunol* 1990;145:2390-2396
- Shevach EM. Regulatory T cell in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2000;18:423-449
- Seddon B, Mason D. The third function of the thymus. *Immunol Today* 2000;21:95-99
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4⁺ CD25⁺ T cell with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 2001; 193:1303-1310
- Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cell suppress poly clonal T cell activation in vitro by inhibiting inter leukins-2 production. *J Exp Med* 1998;188:287-296
- Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4⁺CD25⁺regulatory T cell down regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 2000;30:1538-1540
- Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺immunoregulatory T cell is antigen nonspecific. *J Immunol* 2000;164:183-190
- Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol* 1998;160:1212-1218
- Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface bound transforming growth factor β. *J Exp Med* 2001;194:629-644
- Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis Signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998; 254:439-439
- 刘征波, 胡国龄, 范学工, 李宁. FasL、TRAIL在慢性乙型肝炎患者外周血淋巴AIKD中的作用. 中国免疫学杂志 2003;19:135-137
- Higaki K, Yano H, Kojiro M. Fas antigen expression and its relationship with apoptosis in human hepatocellular carcinoma and noncancerous tissues. *Am J Pathol* 1996;149:429-437
- Boni C, Bertolletti A, Penna A, Cavalli A, Pilli M, Urbani S, Scognamiglio P, Boehme R, Panebianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1998;102:968-975

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

输血后HCV感染血清病毒含量及基因型与临床转归的关系

陈红梅, 万 华, 于 敏, 田秀兰, 魏 来, 徐小元

陈红梅, 西藏大学医学院传染病教研室 西藏拉萨市 850000
万华, 于敏, 田秀兰, 许小元, 北京大学第一医院感染疾病科 北京市 100034
魏来, 北京大学第二医院肝病研究所 北京市 100038
陈红梅, 女, 1969-11-14生, 河南省开封市人, 汉族。1992年西藏民族学院医学系本科毕业, 2003年北京大学医学部硕士研究生毕业, 讲师。主要从事传染病的临床研究。
国家“十五”攻关课题资助, No.2001BA705B06
项目负责人: 许小元, 100034, 北京市, 北京大学第一医院感染疾病科。
收稿日期: 2003-08-23 接受日期: 2003-12-16

Relationship between HCV RNA quantities and HCV genotypes and the outcome of patients with posttransfusion hepatitis C virus infection

Hong-Mei Chen, Hua Wan, Min Yu, Xiu-Lan Tian, Lai Wei, Xiao-Yuan Xu

Hong-Mei Chen, Department of Infectious Diseases, Medical College of Tibet University, Lhasa 850000, Tibet, China
Hua Wan, Min Yu, Xiu-Lan Tian, Xiao-Yuan Xu, Department of Infectious Diseases, Beijing University First Hospital, Beijing 100034, China
Lai Wei, Hepatological Research Institution, Beijing University Second Hospital, Beijing 100038, China
Supported by National Tackling Item in the National Tenth Five-Year-Plan No.2001BA705B06
Correspondence to: Dr. Xiao-Yuan Xu, Department of Infectious Diseases, Beijing University First Hospital, Beijing 100034, China.
Received: 2003-08-23 Accepted: 2003-12-16

Abstract

AIM: To investigate the relationship between HCV RNA quantities and HCV genotypes and the outcome of patients with posttransfusion HCV infection in China.

METHODS: A total of 314 cases infected with HCV in Hebei province were enrolled. Their clinical manifestations were recorded and sera detected for liver enzymes, as well as virus markers. The B-type ultrasound was performed for examination of liver, spleen and gall bladder. In virus markers, HCV RNA was detected with fluorescence-quantitative polymerase-chain-reaction, HCV genotypes were determined by RFLP method.

RESULTS: After HCV infection, 132 (57.6%) of the 229 cases that were detected for HCV RNA still had detectable HCV RNA in their blood and the infection had cleared spontaneously in 97 cases (42.4%). None of 314 cases complained of any sign at present, and abnormal ALT was observed in 40.2%. Positive relation was observed between HCV RNA load and ALT ($r=0.346, P<0.001$). The serum HCV RNA load and ALT in patients with HCV-II infection was significantly higher than that in patients with HCV-III infection ($P<0.001$).

Male gender had higher chronic infection rate than female (infection rate at present, 66.7% vs 50.4%).

CONCLUSION: Higher spontaneous HCV clear rate after infection is observed. The clinical course of chronic HCV infection seems obscure and is often accompanied with mild to moderate elevated ALT/AST. The serum HCV RNA load and ALT in patients with HCV-II infection is significantly higher than that in patients with HCV-III infection. Male gender may have worse clinical outcomes.

Chen HM, Wan H, Yu M, Tian XL, Wei L, Xu XY. Relationship between HCV RNA quantities and HCV genotypes and the outcome of patients with posttransfusion hepatitis C virus infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1299-1302

摘要

目的: 了解我国输血后HCV感染病毒含量及基因型与疾病转归的关系。

方法: 对河北省某农村314例单采浆献血员HCV感染后的现状调查, 包括临床表现、血清肝酶、病毒学标志检测以及B型超声检查, 其中, HCV RNA的测定采用荧光定量PCR方法, HCV基因分型采用5'端非编码区限制性酶切长度多态性分析。

结果: 本调查组HCV感染的慢性化率为57.6%, 自然阴转率为42.4%。314例感染者目前几乎均无症状, 总的ALT的异常率为40.2%。HCV RNA含量变化与ALT水平高低呈正相关性($r=0.346, P<0.001$)。HCV基因II型感染者HCV RNA含量和血清ALT均显著高于HCV基因III型感染者($P<0.001$)。男性感染者的慢性化率高于女性感染者(66.7% vs 50.4%)。

结论: 本组输血后HCV感染自然阴转率较高, 慢性HCV感染表现隐匿, 肝酶学检查指标大多轻度到中度异常。HCV基因II型感染者HCV RNA含量和血清ALT均显著高于HCV基因III型感染者。男性感染者的慢性化率高于女性感染者。

陈红梅, 万华, 于敏, 田秀兰, 魏来, 徐小元. 输血后HCV感染血清病毒含量及基因型与临床转归的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1299-1302
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1299.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染在我国常见^[1-12], 常引起急慢

性肝炎和肝硬化^[10-14], 甚或诱发癌变^[15-18]. HCV 基因型的分布随地区而异, 且有重要临床意义. 有报道 HCV 基因型与疾病严重性、治疗应答、感染转归等有关^[1-3]. 不同的 HCV 基因型所致疾病的严重程度不同, 某些基因型可能会引起较严重的肝细胞损伤^[4]. 我们应用限制性内切酶技术对河北省 A 县和 B 县 314 例输血后丙型肝炎感染者进行 HCV 基因分型, 观察其与病毒含量及临床转归的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 河北省 A 县 1977/1990 年和 B 县 1974/1995 年在单采血浆还输血细胞的献浆员(简称单采浆献血员)中发生非甲非乙型肝炎, 确认为 HCV 感染 137 例和 177 例. 男 62 vs 83 例, 女 75 vs 94 例; 年龄 46.4 ± 8.3 vs 46.1 ± 11.5 岁; 平均感染时间 18.2 ± 3.8 vs 14.6 ± 3.8 a. 基因分型引物合成: 北京赛百盛生物工程公司. 外引物: 上游引物: (OS) 5' -CTG TGA GGA ACT ACT GTC TT-3'; 下游引物: (OA) 5' -AAC ACT ACT CGG CTA GCA GT-3'. 内引物: 上游引物: (IS) 5' -TTC ACG CAG AAA GCG TCT AG-3'; 下游引物: (IA) 5' -GTT GAT CCA AGA AAG GAC CC-3'. Hae III: 华美生物工程公司.

1.2 方法 采用个案问卷调查方法. 根据 A 县 1991 年和 B 县 1992/1993 年调查中文字记载的 HCV 感染者名单, 与 A 县 137 例和 B 县 177 例 HCV 感染者签署知情同意书, 均由 3 名调查员对感染者逐一询问调查, 调查内容包括开始参加单采浆时间、发现感染的时间、临床症状和体征等, 对其中 A 县 123 例 HCV 感染者由 2 名专科医师进行肝、胆、脾和胰等 B 型超声波检查和诊断. 其后采集其外周静脉血 5 mL, 分离血清测定各种生物化学指标, 部分置 -80°C 保存, 统一测定 HCV RNA 和 αFP . 病毒性肝炎以及 B 型超声波诊断分度, 均参照中华医学会肝病学分会, 病毒性肝炎和肝病学术会议于 2000-09 联合修订的“病毒性肝炎防治方案”^[19]. 血清 HCV RNA 定量采用中山医科大学达安生物工程公司生产的逆转录 - 实时定量 PCR 检测试剂盒, 取 PCR 反应管加入处理后样品 2 μl , 6 000 rpm/min 离心数秒, 按下列条件扩增: $93^{\circ}\text{C} \rightarrow 2\text{ min}$ 预变性, 然后按 93°C 30 s $\rightarrow 55^{\circ}\text{C}$ 60 s, 反应 10 个循环, 93°C 30 s $\rightarrow 55^{\circ}\text{C}$ 45 s 扩增 30 个循环, 结果判定参考说明书. 采用酚氯仿提取法提取血清 RNA. 然后逆转录产物进行 PCR: 第 1 次 PCR: 采用外引物的上下游引物. 反应条件: 94°C 2 min, 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环, 72°C 7 min. 第 1 次 PCR 产物为 221 bp. 第 2 次 PCR: 采用内引物的上下游引物. 反应条件: 94°C 2 min, 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s, 30 个循环, 72°C 7 min. 第 2 次 PCR 产物为 145 bp. 再酶切分型: 37°C 2 h. 最后进行电泳: 20 g/L 琼脂糖电泳, 凝胶成像仪分析电泳条带, 大于 100 bp 为 II /1b 型, 小于 100 bp 为 III /2a 型. 基因分型采用 HCV 5' 端非编码区限制性酶切长度多

态性分析^[5], 对其中 A 县 86 例和 B 县 46 例 HCV RNA 阳性者进行了基因分型(图 1). HCV RNA 定量检测及基因分型均无内参照, 也无阴性对照.

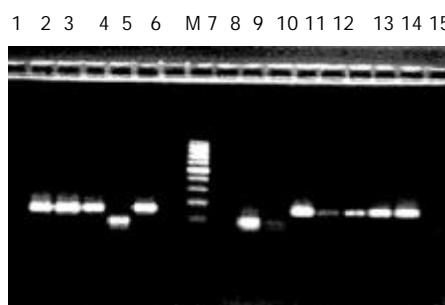


图 1 HCV 基因分型. Marker: 100 ladder DNA Marker, 由小到大依次为 100、200、300、400、500、600 bp; 1, 2, 3, 5, 10, 11, 12, 13, 14 为 II 型; 4, 8, 9, 15 为 III 型; 6, 7 未分出型; M 为 100 bp 梯度 Marker(其中最亮的条带为 500 bp).

统计学处理 mean \pm SD 和 t 检验用于 HCV RNA 含量变化与 ALT 异常关系的比较、HCV 基因型与血清 HCV RNA 含量及血清 ALT 的关系的比较; spearman 相关分析用于 HCV RNA 含量变化与血清 ALT 水平高低的相关性检验, 均采用 SPSS10 软件处理.

2 结果

2.1 HCV 感染规律 追踪 A 县 12-25 a 和 B 县 8-28 a 慢性肝炎的现患率. A 县 137 例中有 127 例和 B 县 177 例中有 102 例测定了 HCV RNA, 其中 A 县阳性者 86 例、B 县阳性者 46 例, 阳性率分别为 67.7%(86/127) 和 45.1% (46/102). 因此, 这两组人群感染 HCV 后 12-25 a 和 8-28 a 时 HCV 感染的慢性化率分别为 67.7% 和 45.1%, 而两组人群的自然阴转率分别为 32.3%(41/127) 和 54.9% (56/102), 两组人群合并后总的 HCV RNA 自然阴转率为 42.4%. 另将 HCV RNA 含量变化与 ALT 异常的关系做比较, 结果随着血清 HCV RNA 滴度的增高, ALT 的异常率及平均值也随之增加(表 1). 在此调查中, 分别

表 1 A、B 县 HCV RNA 含量变化与 ALT 异常的关系

| HCV RNA(拷贝/L) | n | ALT 异常 | | |
|--------------------|----|--------|-------|-------------|
| | | n | % | 平均值(nkat/L) |
| < 10^7 | 27 | 6 | 22.22 | 491 |
| $10^7\text{-}10^9$ | 63 | 24 | 38.10 | 818 |
| $>10^9$ | 42 | 23 | 54.76 | 840 |

对 A 县、B 县组及两组人群共同 HCV RNA 含量变化与 ALT 水平高低比较, 结果显示, A 县组 HCV RNA 含量变化与 ALT 水平高低呈正相关($r = 0.390$, $P < 0.001$); B 县组 HCV RNA 含量变化与 ALT 水平高低无明显相关性($r = 0.096$, $P = 0.542$), 此结果可能因 B 县组 HCV RNA $>10^9$ 人数仅 5 人, 人数太少的缘故; 而两组人群合并后的 HCV RNA 含量变化与 ALT 水平高低呈正相关性

($r = 0.346$, $P < 0.001$). 结果提示, 血清 HCV RNA 含量变化与 ALT 水平的高低呈正相关性, 即随着血清 HCV RNA 含量的增高, ALT 水平也随之增高.

2.2 HCV 基因型与血清 HCV RNA 含量的关系 A 县 86 例 HCV RNA 阳性患者中血清 HCV 基因 II 型感染者为 76.7% (66/86); 血清 HCV 基因 III 型感染者为 5.8% (5/86); 血清 HCV 基因未分型感染者为 17.4% (15/86). 将不同基因型感染者的血清 HCV RNA 含量(拷贝/L)进行比较, 显示 HCV 基因 II 型感染者 HCV RNA 含量 108.79 ± 0.95 显著高于 HCV 基因 III 型感染者 107.08 ± 1.02 ($P < 0.01$). B 县 46 例 HCV RNA 阳性患者中血清 HCV 基因 II 型感染者为 54.4% (25/46); 血清 HCV 基因 III 型感染者为 37.0% (17/46); 血清 HCV 基因未分型感染者为 8.7% (4/46). 将不同基因型感染者的血清 HCV RNA 含量(拷贝/L)进行比较, 显示 HCV 基因 II 型感染者 HCV RNA 含量 108.14 ± 0.82 显著高于 HCV 基因 III 型感染者 108.01 ± 1.12 ($P < 0.01$). A 县 86 例和 B 县 46 例 HCV RNA 阳性患者中血清 HCV 基因 II 型感染者为 68.9% (91/132); 血清 HCV 基因 III 型感染者为 16.7% (22/132); 血清 HCV 基因未分型感染者为 14.4% (19/132). 将不同基因型感染者的血清 HCV RNA 含量(拷贝/L)进行比较, 显示 HCV 基因 II 型感染者 HCV RNA 含量 108.61 ± 0.96 显著高于 HCV 基因 III 型感染者 107.80 ± 1.14 ($P < 0.001$).

2.3 HCV 基因型与血清 ALT 的关系 A 县 86 例 HCV RNA 阳性患者中 HCV 基因 II 型感染者与 HCV 基因 III 型感染者进行血清 ALT(nkat/L)比较, 显示 HCV 基因 II 型感染者血清 ALT(893 ± 728)显著高于 HCV 基因 III 型感染者(813 ± 709) ($P < 0.01$). B 县 46 例 HCV RNA 阳性患者中 HCV 基因 II 型感染者与 HCV 基因 III 型感染者进行血清 ALT 比较, 显示 HCV 基因 II 型感染者血清 ALT 与 HCV 基因 III 型感染者无显著性差异 ($P > 0.05$). 此与 B 县组 HCV 基因 II 型感染者与 HCV 基因 III 型感染者分布比例无明显差异有关. A 县 86 例和 B 县 46 例 HCV RNA 阳性患者中 HCV 基因 II 型感染者与 HCV 基因 III 型感染者进行血清 ALT(nkat/L)比较, 显示 HCV 基因 II 型感染者血清 ALT 显著高于 HCV 基因 III 型感染者 855 ± 681 vs 744 ± 973 nkat/L ($P < 0.01$).

3 讨论

本次调查选择河北省 A 县和 B 县 HCV 感染后未经抗病毒治疗的人群, 部分反映我国人群 HCV 感染后的自然演变规律. HCV RNA 在感染人群血中含量较低^[6]. 日本丙型肝炎患者血清中 HCV RNA 含量在 1×10^7 - $1 \times 10^{12.5}$ 拷贝/L^[7], 而国内在 1×10^8 - $1 \times 10^{12.2}$ 拷贝/L、 1×10^7 - 1×10^{10} 拷贝/L 不等^[8-9], 本组为 1×10^5 - 1×10^{11} 拷贝/L, 略低于文献报道. 河北省两县结果提示, 随着血清 HCV RNA 滴度的增高, ALT 的异常率及平均值也随之增加. 血清 HCV RNA 含量与 ALT 水平呈正相关 ($r = 0.346$, $P < 0.001$). 此与多数文献报道一致^[20-23].

HCV 基因型与疾病的严重性、治疗应答、感染转归等有关^[1-3]. 河北省两县 HCV RNA 阳性感染者 132 例中, 血清 HCV 基因 II 型感染者为 68.9% (91/132); 血清 HCV 基因 III 型感染者为 16.7% (22/132); 血清 HCV 基因未分型感染者为 14.4% (19/132). 将不同基因型感染者的血清 HCV RNA 含量进行比较, 显示 HCV 基因 II 型感染者 HCV RNA 含量显著高于 HCV 基因 III 型感染者 ($P < 0.001$). 此结果与文献[1-3, 24-25]报道一致. 故检测 HCV 感染者的基因型可预测 HCV RNA 水平及病情的预后. HCV 基因 II 型感染者 HCV RNA 含量较高可能是影响干扰素疗效的原因之一. A 县 86 例和两县合并后 132 例 HCV RNA 阳性患者中 HCV 基因 II 型感染者血清 ALT 显著高于 HCV 基因 III 型感染者 ($P < 0.01$). 此结果与文献[26-27]报道一致. 而 B 县组 HCV 基因 II 型感染者血清 ALT 与 HCV 基因 III 型感染者无显著性差异, 此与 B 县组 HCV 基因 II 型感染者与 HCV 基因 III 型感染者分布比例无明显差异有关. A 县 127 例 HCV 感染者在感染 12-25 a 后, 有 32.3% 发生自发性 HCV RNA 阴转, 而 B 县 102 例 HCV 感染者在感染 8-28 a 后, 有 54.9% 发生自发性 HCV RNA 阴转, 两组人群合并后的自发性 HCV RNA 阴转率为 42.4%, 阴转率均高于瑞典、美国、法国分别报道的 21%, 26% 和 15-20%^[10-12], 表明本次调查两组人群 HCV 感染后的自发性清除率较高. 其中, A 县组女性感染者的自发性清除率为 39.4% (26/66), B 县组女性感染者的自发性清除率为 60.7% (37/61), 两组人群合并后的女性感染者的自发性清除率为 49.6%, 均高于男性感染者^[13-14]. HCV 感染后 17-26 a 间肝硬化的发生率为 0.3-55%^[14-17], 本次 A 县组中有 5 例 B 型超声波检查表现为重度, 尽管被调查者拒绝行肝活组织检查, 实际上超声波下表现为肝包膜不平、门静脉或/和脾静脉增宽, 符合肝硬化的表现, 其中时间最短者仅在感染后 13 a. 提示该组人群中少数感染者在感染 12-25 a 已经发生肝硬化, 发生率约为 4.07% (5/123). 以上结果提示, HCV 感染表现隐匿, 对出现乏力者应当引起重视. HCV 感染慢性化以后的表现与慢性乙型肝炎病毒感染不同, 症状轻, 演变过程可能比感染初期更加隐匿^[28-32].

在 HCV 感染 1-24(平均 9.7) a 后, 可能有 6% 的感染者进展至失代偿性肝硬化, 或在肝硬化出现后 3.3-5.1 a 发生失代偿^[18, 33-34]. HCV 感染相关肝癌的发生从感染 17 a 后的 0 例^[13-14]、7.6 a 后的 15.6%^[35] 到 14-28 a 后的 51%^[36]. 可见, 因 HCV 感染致肝癌可能是一个相当长的过程. HCV 感染后肝病相关的死亡率报道不一, 有报道在 1-24(平均 9.7 a) 后 6% 死于肝相关疾病^[18], 也有报告经 45 a 随访, 5.9% 死于肝疾病, 仅略高于对照组的 1.4%^[37-38].

本组病例中 B 型超声波检查为重度者是否会在近年内发生失代偿还需要进一步追踪观察. 血清 α FP 与 B 型超声波检查, 未发现肝癌, 也有待进一步跟踪观察.

4 参考文献

- 1 Dusheiko G, Schmilovitz-Weiss H, Brown D, McOmish F, Yap PL, Sherlock S, McIntyre N, Simmonds P. Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 1994;19:13-18
- 2 Mahaney K, Tedeschi V, Maertens G, Di Bisceglie AM, Vergalla J, Hoofnagle JH, Sallie R. Genotypic analysis of hepatitis C virus in American patients. *Hepatology* 1994;20:1405-1411
- 3 Kobayashi M, Tanaka E, Sodeyama T, Urushihara A, Matsumoto A, Kiyosawa K. The natural course of chronic hepatitis C: a comparison between patients with genotypes 1 and 2 hepatitis C viruses. *Hepatology* 1996;23:695-699
- 4 Nakao T, Enomoto N, Takada N, Takada A, Date T. Typing of hepatitis C virus genomes by restriction fragment length polymorphism. *J Gen Virol* 1991;72:2105
- 5 杜绍财, 陶其敏, 朱凌, 刘金祥, 王豪, 孙炎. 丙型肝炎病毒基因5' - 末端非编码区酶切分型研究. 中华医学杂志 1993;73:7-9
- 6 李伯安, 马洪滨, 薛净, 乔小红, 程云. 定量聚合酶链反应在检测丙型肝炎病毒感染血清中的应用. 中华传染病杂志 1998;16:35-36
- 7 Hagiwara H, Mayashi N, Mita E, Naito M, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Quantitation of HCV RNA in serum of asymptomatic blood donors and patients with types C chronic liver disease [J]. *Hepatology* 1993;17:545-550
- 8 Zhang FC, Cai XL, Huang JS, Xi C, Wu WF. Study on the relationship of HCV-RNA between serum and liver tissue of hepatitis C [J]. *Zhonghua Chuanranbing Zazhi* 1999;17:15-17
- 9 Zhang LX, Ma HB, Li BA, Guo RF, Hu JH, Qiao LL, Cheng Y. The clinical significance of quantitative polymerase chain reaction for HCV-RNA in patients with hepatitis C [J]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 1998;6:227-228
- 10 Mattsson L, Sonnerborg A, Weiland O. Outcome of acute symptomatic non-A, non-B hepatitis: a 13-year follow-up study of hepatitis C virus markers[J]. *Liver* 1993;13:274-278
- 11 Seeff LB, Hollinger FB, Alter HJ. Long-term morbidity of transfusion-associated hepatitis (TAH) C[J]. *Hepatology* 1998;28 (Pt 2):407A
- 12 Hue S, Cacoub P, Renou C, Halfon P, Thibault V, Charlotte F, Picon M, Rifflet H, Piette JC, Pol S, Caillat-Zucman S. Human leukocyte antigen class II alleles may contribute to the severity of hepatitis C virus-related liver disease[J]. *J Infect Dis* 2002;186:106-109
- 13 Kenny-walsh E. Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin [J]. *N Engl J Med* 1999;340:1228-1233
- 14 Vogt M, Lang T, Frosner G, Klingler C, Sendl AF, Zeller A, Wiebecke B, Langer B, Meisner H, Hess J. Prevalence and clinical outcome of hepatitis C infection in children who underwent cardiac surgery before the implementation of blood-donor screening [J]. *N Engl Med* 1999;341:866-870
- 15 Gordon SC, Elloway RS, Long JC, Dmochowski CF. The pathology of hepatitis C as a function of mode of transmission. Blood transfusion versus intravenous drug use [J]. *Hepatology* 1993;18:1338-1343
- 16 Yano M, Kumada H, Kage M, Ikeda K, Shimamatsu K, Inoue O, Hashimoto E, Lefkowitch JH, Ludwig J, Okuda K. The long-term pathological evolution of chronic hepatitis C[J]. *Hepatology* 1996;23:1334-1340
- 17 Yoneyama K, Yamaguchi M, Kiuchi Y, Morizane T, Shibata M, Mitamura K. Analysis of background factors influencing long-term prognosis of patients with chronic hepatitis C treated with interferon [J]. *Intervirology* 2002;45:11-19
- 18 Di Bisceglie AM, Goodman ZD, Ishak KG, Hoofnagle JH, Melpolder JJ, Alter HJ. Long-term clinical and histopathological follow-up of chronic posttransfusion hepatitis[J]. *Hepatology* 1991;14:969-974
- 19 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订 2000-09 西安. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001;19: 56-62
- 20 Kurosaki M, Enomoto N, Sato C, Sakamoto N, Hoshino Y, Haritani H, Marumo F. Correlation of plasma hepatitis C virus RNA levels with serum alanine aminotransferase in non-A, non-B chronic liver disease. *J Med Virol* 1993;39:246-250
- 21 Adinolfi LE, Utili R, Andreana A, Tripodi MF, Marraccino M, Gambardella M, Giordano M, Ruggiero G. Serum HCV RNA levels correlate with histological liver damage and concur with steatosis in progression of chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci* 2001;46:1677-1683
- 22 Wang ZM, Tan FM, Chen WH, Li MS, Guo SP. Quantitative study of hepatitis C virus RNA in sera of patients with posttransfusion hepatitis C virus infection. *Zhonghua Chuanranbing Zazhi* 2000; 18:37-39
- 23 Ghany MG, Chan TM, Sanchez-Pescador R, Urdea M, Lok AS. Correlation between serum HCV RNA and aminotransferase level in patient with chronic HCV infection. *Dig Dis Sci* 1996; 41:2213-2218
- 24 Raghuraman S, Shaji RV, Sridharan G, Radhakrishnan S, Chandy G, Ramakrishna BS, Abraham P. Distribution of the different genotypes of HCV among patients attending a tertiary care hospital in south India. *J Clin Virol* 2003;26:61-69
- 25 Yoshioka K, Kakumu S, Wakita T, Ishikawa T, Itoh Y, Takayanagi M, Higashi Y, Shibata M, Morishima T. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon-alpha therapy: relationship to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 1992;16:293-299
- 26 Prince AM, Brotman B, Huima T, Pascual D, Jaffery M, Inchauspe G. Immunity in hepatitis C infection. *J Infect Dis* 1992;165:438-443
- 27 Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, Mushahwar IK, Desai SM, Miller RH, Ogata N, Robert H. Purcell. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 1992;258:135-140
- 28 Alter HJ, Seef LB. Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome [J]. *Sem Liver Disease* 2000;20:17-35
- 29 Roffi L, Redaelli A, Colloredo G, Minola E, Donada C, Picciotto A, Riboli P, DelPoggio P, Rinaldi G, Paris B, Fornaciari G, Giusti M, Marin R, Morales R, Sangiovanni A, Belloni G, Pozzi M, Poli G, Mascoli N, Corradi C, Pioltelli P, Scalori A, Mancia G. Outcome of liver disease in a large cohort of histologically proven chronic hepatitis C: influence of HCV genotype. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:501-506
- 30 Hwang SJ, Lee SD, Lu RH, Chu CW, Wu JC, Lai ST, Chang FY. Hepatitis C viral genotype influences the clinical outcome of patients with acute posttransfusion hepatitis C. *J Med Virol* 2001;65:505-509
- 31 Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH, Myers RP, Muntenau M, Ratziu V, Manns M, Vogel A, Capron F, Chedid A, Bedossa P. A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2003; 38:257-265
- 32 Marcellin P, Asselah T, Boyer N. Fibrosis and disease progression in hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(5 Suppl 1): S47-56
- 33 Fattovich G, Giustina G, Degos F, Tremolada F, Diodati G, Almasio P, Nevens F, Solinas A, Mura D, Brouwer JT, Thomas H, Njapoum C, Casarin C, Bonetti P, Fuschi P, Basho J, Tocco A, Bhalla A, Galassini R, Noventa F, Schalm SW, Realdi G. Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients[J]. *Gastroenterology* 1997; 112:463-472
- 34 Serfaty L, Aumaitre H, Chazouilleres O, Bonnand AM, Rosmorduc O, Poupon RE, Poupon R. Determinants of outcome of compensated hepatitis C virus-related cirrhosis[J]. *Hepatology* 1998;27:1435-1440
- 35 Tremolada F, Casarin C, Alberti A, Drago C, Tagger A, Ribero ML, Realdi G. Long-term follow-up of non-A, non-B (type C) posttransfusion hepatitis[J]. *J Hepatol* 1992;16:273-281
- 36 Tong MJ, el-Farra NS, Reikes AR, Co RL. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C[J]. *N Engl J Med* 1995; 332:1463-1466
- 37 Seeff LB, Miller RN, Rabkin CS, Buskell-Bales Z, Straley-Eason KD, Smoak BL, Johnson LD, Lee SR, Kaplan EL. 45-year follow-up of hepatitis C virus infection in healthy young adults [J]. *Ann Intern Med* 2000;132:105-111
- 38 Niederau C, Lange S, Heintges T, Erhardt A, Buschkamp M, Hurter D, Nawrocki M, Kruska L, Hensel F, Petry W, Haussinger D. Prognosis of chronic hepatitis C: results of a large, prospective cohort study[J]. *Hepatology* 1998;28:1687-1695

• 病毒性肝炎 VIRAL HEPATITIS •

TNF- α 影响肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的表达

宋红丽, 吕飒, 马力, 李颖, 刘沛

宋红丽, 吕飒, 马力, 李颖, 刘沛, 中国医科大学附属第二医院感染科
辽宁省沈阳市 110004

宋红丽, 女, 1963-11-27生, 辽宁省大连市人, 汉族, 主任医师。1998年大
连医科大学硕士研究生, 2002年中国医科大学博士生, 主要从事感染病的临
床和科研工作, 发表论文10篇。

卫生部临床重点项目, No. 97100252

项目负责人: 刘沛, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属
第二医院感染科。syliupei2003@yahoo.com.cn

电话: 024-83956962 传真: 024-83956451

收稿日期: 2004-02-27 接受日期: 2004-03-16

Effect of TNF- α on tight junctions between the epithelial cells of intestinal mucosal barrier

Hong-Li Song, Sa Lu, Li Ma, Ying Li, Pei Liu

Hong-Li Song, Sa Lu, Li Ma, Ying Li, Pei Liu, Department of Infectious
Diseases, The Second Affiliated Hospital of China Medical University,
Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Supported by the Research Foundation of the Ministry of Public Health
of the People's Republic of China, No. 97100252

Correspondence to: Pei Liu, Department of Infectious Diseases, The
Second Affiliated Hospital of China Medical University, No. 36 Sanhao
Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. syliupei2003@ya
hoo.com.cn

Received: 2004-02-27 Accepted: 2004-03-16

Abstract

AIM: To investigate the effect of TNF- α on tight junctions
between the epithelial cells of the intestinal mucosal barrier.

METHODS: Colon cancer cell line (CaCo-2) was cultured.
The localizations of zonula occluden-1 (ZO-1) in CaCo-2
epithelial cells were detected by immunofluorescence after
exposure to TNF- α (0, 50, 100 and 200 μ g/L) for 24 h and
the TNF- α treatment with 100 μ g/L for 0, 4, 8 and 24 h.
The expression level of ZO-1 was analyzed by semi-quantitative
reverse transcriptase-PCR after exposure to TNF- α
with the above time and concentration.

RESULTS: Different expression levels of ZO-1 depended
on different time and concentration of TNF- α treated on
CaCo-2 epithelial cells. The integrity of tight junctions was
disrupted and the expression level of ZO-1 decreased af-
ter treatment with TNF- α . The intensity of the immunofluorescent
signal was less intensive after exposure to TNF- α 100 and 200 μ g/L than that to 0 and 50 μ g/L. The intensity
of the immunofluorescent signal was less intensive after
exposure to TNF- α 100 μ g/L for 24 hours than those for 0 h,
4 h and 8 h. The RT-PCR results showed that after CaCo-2
cells were treated for 24h with the indicated concentra-
tions (0, 50, 100 and 200 μ g/L) of TNF- α and the TNF- α
treatment with 100 μ g/L for 0 h, 4 h, 8 h and 24 h, the
expression levels of ZO-1 mRNA in CaCo-2 cells were de-
creased by TNF- α with 100 μ g/L for 24 h, as compared
with control ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Tight junctions between the epithelial cells
of the intestinal mucosal barrier can be destroyed by TNF- α ,
and decreased expression level of ZO-1 induced by TNF- α is
one of the most important molecular mechanisms.

Song HL, Lu S, Ma L, Li Y, Liu P. Effect of TNF- α on tight junctions
between the epithelial cells of intestinal mucosal barrier. Shijie Huaren
Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1303-1306

摘要

目的: 探讨肿瘤坏死因子(TNF- α)对肠黏膜上皮细胞间紧密
连接的影响。

方法: 应用免疫荧光方法检测在肿瘤坏死因子(TNF- α) 0,
50, 100 和 200 μ g/L 作用下, 与结肠癌上皮细胞株(CaCo-
2 细胞株)共同培养 24 h, 以及用 TNF- α 100 μ g/L 与 CaCo-
2 细胞共同培养 0, 4, 8 和 24 h, 观察 TNF- α 对紧密
连接蛋白(zonula occluden 1, ZO-1)表达的影响。并应用
半定量 RT-PCR 方法检测 TNF- α 用上述相应的时间和浓度
作用后对肠黏膜上皮细胞 ZO-1 mRNA 表达的影响。

结果: 用 TNF- α 100 和 200 μ g/L 作用 24 h 后 ZO-1 的免疫
荧光明显减少, 并呈剂量依赖性; 用 TNF- α 100 μ g/L 作
用 24 h 时 ZO-1 免疫荧光明显减少, 并呈时间依赖性。应
用半定量 RT-PCR 的方法检测结果: TNF- α 作用 24 h 时,
ZO-1 mRNA 从 TNF- α 0 μ g/L 的 1.1926 降至 100 μ g/L 的
0.7834 和 200 μ g/L 的 0.7081; TNF- α 100 μ g/L 作用 4 h,
ZO-1 mRNA 为 (95.5 ± 5.5%); 8 h 为 (82.0 ± 5.4%); 24 h
降至最低为 (67.7 ± 5.7%), 与对照组相比 $P < 0.01$ 。

结论: TNF- α 是通过抑制肠上皮细胞间紧密连接蛋白 ZO-1
表达引起肠黏膜上皮细胞间紧密连接破坏。并且是通过抑制
ZO-1 mRNA 引起肠上皮细胞 ZO-1 蛋白表达降低。

宋红丽, 吕飒, 马力, 李颖, 刘沛. TNF- α 影响肠黏膜上皮细胞间紧密连接蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1303-1306

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1303.asp>

0 引言

自发性腹膜炎(spontaneous bacterial peritonitis, SBP)是
重症肝炎常见的并发症, 是引起重症肝炎死亡的重要
原因^[1-3]。近年来, 对重症肝炎并发 SBP 的发生机制有
了一定的认识。肠通透性改变和细菌易位与 SBP 发生密
切相关^[4-7], 而重症肝炎异常增高的细胞因子如肿瘤坏
死因子(TNF)、 γ -干扰素(IFN- γ)、白介素(IL)等与 SBP
发生亦有关^[8-9]。我们观察在 TNF- α 作用下, 体外培养

的肠黏膜上皮细胞紧密连接蛋白(zonula occluden 1, ZO-1)表达状态, 探讨 TNF- α 在重症肝炎并发 SBP 的发生中所起到的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 主要试剂与仪器细胞培养液 DMEM 高糖培养基、胎牛血清、谷氨酰胺均购于 Gibco 公司; 非必须氨基酸购于 Hyclone 公司; 胰蛋白酶, TNF- α 购于 Sigma 公司; ZO-1 兔抗鼠抗体购于 SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY; FITC 标记山羊抗兔 IgG 抗体购于 Jackson 公司; CaCo-2 细胞株购自美国 ATCC(American Type Culture Collection). 1.2 方法 CaCo-2 细胞培养按照文献[PMID:1590354], 应用含有 200 mL/L 胎牛血清、10 g/L 非必须氨基酸、10 g/L 谷氨酰胺和青霉素 - 链霉素双抗液的 DMEM 培养液将 CaCo-2 细胞在 37 °C, 50 mL/L CO₂ 条件下进行培养, 每 7 d 按 1:2 的比例传代, 传代后 7 d 左右细胞生长达到融合. 每次实验分为对照组(TNF- α 非添加组)和实验组(TNF- α 添加组). 实验时取 3 组非同代 7 d 左右生长达到融合的细胞, 添加 0 μg/L, 50 μg/L, 100 μg/L 和 200 μg/L 浓度的 TNF- α 继续培养 24 h 后, 进行免疫荧光检测, 并收集 CaCo-2 细胞提取总 RNA, 置 -130 °C 保存待用. 另外, 将 CaCo-2 细胞与 TNF- α 100 μg/L 共同培养 0, 4, 8 和 24 h, 进行免疫荧光检测, 并收集 CaCo-2 细胞提取总 RNA.

1.2.1 免疫荧光检测 参照 Heinaz Schmitz [PMID:11193576] 方法取同代细胞接种于盖玻片上, 待细胞生长融合 70% 左右用 TNF- α 处理, 取出盖玻片 PBS 漂洗 3 次(每次 10 min)后, 用 37 g/L 甲醛固定 15 min, PBS 漂洗, 加入 0.5% Triton X-100 处理 10 min, PBS 漂洗, 100 mL/L 小牛血清白蛋白封闭 1 h, 加入浓度为 1:50 的 ZO-1 抗体, 4 °C 过夜, PBS 漂洗后加入用 FITC 标记的免疫荧光抗体 37 °C 1 h, 再用 PBS 漂洗, 蒸馏水洗后用甘油封片.

1.2.2 半定量 RT-PCR 用 TRIZOL 裂解准备好的 CaCo-2 细胞, 用酚 - 氯仿抽提总 RNA, 分别取 2 μL 总 RNA 加入终浓度为 0.6, 0.1 μmol/L 的 ZO-1 特异引物与 β -肌动蛋白内参引物进行共扩增 RT-PCR 反应, 反应体系总体积 30 μL. ZO-1 正义引物序列为^[10]: 5' -CGGTC CTCTGAGCCTGTAAG-3'; 反义序列为 5' -GGATCT ACATGCGACGACAA-3', 扩增长度为 371 bp. β -肌动蛋白正义引物序列为: 5' -GTGGGGCGCCCCAGGCA CCA-3'; 反义序列为 5' -CTTCCTTAATGTCACGCA CGATTTC-3', 扩增长度为 540 bp (以上引物均由 Takara Biotechnology 公司合成). 反应条件为: 50 °C 逆转录 30 min, 95 °C 变性 15 min, 然后进行 PCR 反应 30 次循环: 94 °C 变性 45 s, 56 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 最后行 72 °C 延伸 10 min. 取 PCR 反应产物 10 μL 加入 2 g/L 琼脂糖凝胶后电泳. 应用天能 GIS 凝胶图像处理软件, 对扫描获得的 RT-PCR 扩增产物进行量化,

然后用质控内参排除操作误差, 进行样本标准化处理. 计算方法如下: 标准化的样本数值 = 样本量化数值 / 同一样本内参的量化数值.

统计学处理 应用 SPSS 软件(10.0 版本)进行统计学分析, 各组标准化的样本数值用 mean±SEM 表示. 对各组间数据进行方差分析, 当 P <0.05 时有显著性差异.

2 结果

2.1 TNF- α 对 CaCo-2 细胞 ZO-1 蛋白表达的影响 用 TNF- α 0 μg/L, 50 μg/L, 100 μg/L 和 200 μg/L 与 CaCo-2 细胞共同培养 24 h, 应用免疫荧光检测 CaCo-2 细胞 ZO-1 蛋白表达, 发现 100 μg/L 和 200 μg/L 组 ZO-1 免疫荧光明显减少或断裂(图 1). 用 TNF- α 100 μg/L 与 CaCo-2 细胞共同培养, 分别在 0, 4, 8 和 24 h 时, 应用免疫荧光检测 CaCo-2 细胞 ZO-1 蛋白, 结果 24 h 时 ZO-1 免疫荧光明显减少(图 2).

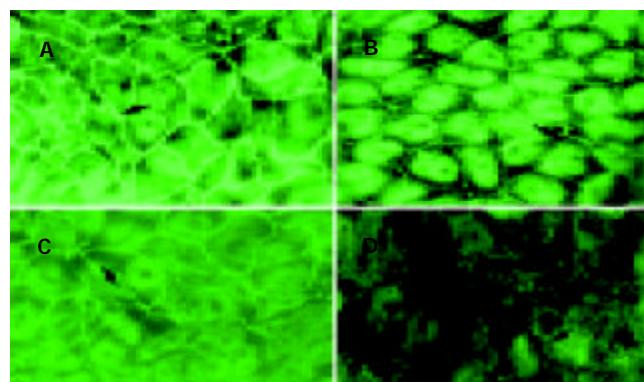


图 1 TNF- α 作用 24 h 对 CaCo-2 细胞 ZO-1 蛋白表达. A: 0 μg/L; B: 50 μg/L; C: 100 μg/L; D: 200 μg/L.

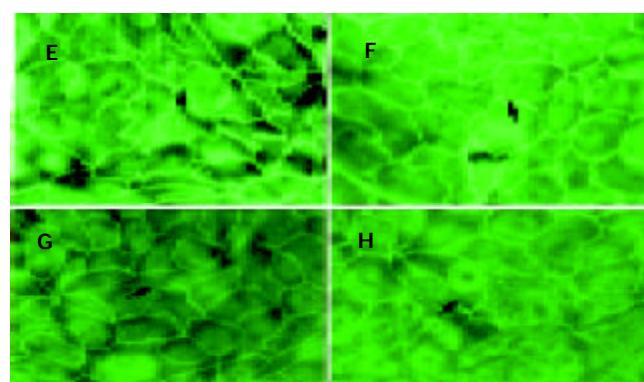


图 2 TNF- α 100 μg/L 处理 CaCo-2 细胞 ZO-1 蛋白表达. E: 0 h; F: 4 h; G: 8 h; H: 24 h.

2.2 TNF- α 对 CaCo-2 细胞 ZO-1 mRNA 表达的影响 从浓度依赖角度, 取同代 7 d 左右生长达到融合的细胞, 分别添加 TNF- α 0 μg/L, 50 μg/L, 100 μg/L 和 200 μg/L 与 CaCo-2 细胞共同培养, 结果 24 h 时, TNF- α 100 μg/L 组, ZO-1 mRNA 明显降低, 从 0 μg/L 的 1.1926 降至 100 μg/L 的 0.7834 和 200 μg/L 的 0.7081. 从时间依赖角度, 取 3 代细胞, 加入 TNF- α (100 μg/L)

后, ZO-1 的 mRNA 表达的时间曲线如图 3 所示。培养 4 h ZO-1 的 mRNA 为(95.5 ± 5.5%); 8h 为(82.0 ± 5.4%); 24 h 降至最低为(67.7 ± 5.7%), 与对照组相比 P < 0.01。

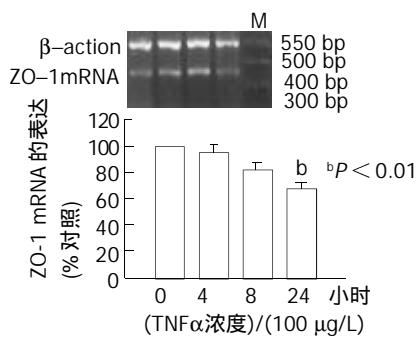


图 3 TNF- α 对 CaCo-2 细胞紧密连接蛋白 ZO-1 表达的影响。

3 讨论

重症肝炎并发自发性腹膜炎的发病机制尚不十分清楚。以往学者认为: 自发性腹膜炎形成是细菌通过菌血症定植(colonization)在腹水中或肠道细菌穿过肠壁进入腹膜腔。因肠道不仅是消化和吸收营养物质的重要脏器, 而且肠道的其他特殊功能如免疫调节、内分泌功能、黏膜屏障功能在防御细菌侵入作用受到学者们的高度重视^[11]。肠道屏障是存在于肠道内的具有高效选择性功能的屏障系统, 肠黏膜屏障在保护机体免受食物抗原、微生物及其产生的有害代谢产物的损害, 保持机体内环境的稳定方面起重要作用^[12-13]。在正常情况下, 肠黏膜具有完善的机械屏障, 以抵御较强的刺激和正常菌群的侵犯。这种肠黏膜屏障由肠表面黏液、微绒毛、肠黏膜上皮细胞及其间的紧密连接以及黏膜的特殊结构组成^[14]。近年来, 对细胞间连接的研究受到极大重视, 肠上皮细胞间连接和大多数细胞的连接方式一样, 由紧密连接(TJ)、黏附连接(AJ)、缝隙连接(Gap junction)等构成。构成肠上皮细胞间连接的蛋白主要有 ZO-1、occludin、cadherin、claudin 和 β -catenin 等^[15]。一旦某种组成成分发生变化, 即可导致屏障功能发生异常。

1988 年 Yasutoshi et al 人首次发表肝衰竭与 TNF- α 相关, 随后相继发现重症肝炎时许多细胞因子包括 IFN- γ 、IL-1、IL-6 等明显增加^[16-18]。TNF- α 是一种具有广谱生理和病理效应的细胞因子, 主要由单核和巨噬细胞分泌。TNF- α 在重症肝炎、感染性休克以及炎症性肠病的发生中起着重要的作用^[19-20]。他可诱导肠上皮细胞凋亡^[21-23]和细胞间紧密连接蛋白装配功能改变^[24], 导致肠上皮通透性增加^[25-27]。另有研究认为, 肠上皮通透性增加的原因大约一半是由凋亡引起^[28]。为了研究其他引起肠上皮通透性增加原因是否与上皮细胞间紧密连接的完整性破坏有关? 有学者证实, 溃疡性结肠炎时肠黏膜屏障受损是由于紧密连接结构改变所致^[29], TNF- α 和 INF- γ 等炎性细胞因子之间有协同作用能下调跨膜紧密连接纤维蛋白的 occludin 启动子的表达, 并且导致肠电生理功能紊乱^[30]。同时 TNF- α 有细胞毒作用,

可直接引起组织水肿和破坏。

1986 年确定 ZO-1 为第一个紧密连接相关蛋白^[31], 属于跨膜蛋白, 可以起连接跨膜蛋白 occludin 和肌动蛋白细胞骨架的作用, 是构成肠黏膜上皮紧密连接的重要成分之一^[32]。Caco-2 细胞来源于人体结肠癌细胞株, 在生长至融合后有柱状凸起, 类似于小肠微绒毛, 向培养液一侧形成刷状缘并有分化良好的紧密连接, 是目前很好的体外肠屏障模型^[33], 特别是在紧密连接蛋白表达研究中得到广泛应用^[34-36]。为了探讨 TNF- α 对肠黏膜屏障上皮细胞间紧密连接的影响, 我们采用 TNF- α 与 Caco-2 细胞共同培养, 测定 ZO-1 表达。结果发现 TNF- α 可直接抑制肠黏膜屏障上皮细胞间 ZO-1 的表达; 随着浓度增加和时间延长, ZO-1 表达明显减少。我们应用 mRNA 的半定量方法测 TNF- α 作用后 ZO-1 mRNA, 发现高浓度的 TNF- α 作用 Caco-2 细胞时间越长, 其 ZO-1 mRNA 表达减少越明显, 并呈时间依赖关系。故推测: TNF- α 可能是通过抑制 ZO-1 mRNA 而降低 Caco-2 细胞 ZO-1 蛋白的表达, 从而影响肠黏膜上皮细胞间紧密连接的完整性。

本结果提示: 在重症肝炎患者并发 SBP 时, 高水平的 TNF- α 作用肠黏膜引起肠黏膜屏障改变可能是通过抑制 ZO-1 mRNA 而降低 ZO-1 蛋白表达。由此可见: TNF- α 不仅在重症肝炎肝细胞损伤的发病中起作用, 而且在其并发症 - 自发性腹膜炎的发生上也起一定作用。进一步深入研究 TNF- α 对肠黏膜屏障上皮细胞间紧密连接的影响及其分子机制的影响有助于我们进一步了解重症肝炎并发自发性腹膜炎的发病机制、提高重症肝炎并发自发性腹膜炎、肝硬化腹水等的治疗水平、改善其预后并减少并发症的产生。

4 参考文献

- Poddar U, Thapa BR, Prasad A, Sharma AK, Singh K. Natural history and risk factors in fulminant hepatic failure. *Arch Dis Child* 2002;87:54-56
- Thanopoulou AC, Koskinas JS, Hadziyannis SJ. Spontaneous bacterial peritonitis (SBP): clinical, laboratory, and prognostic features. A single-center experience. *Eur J Intern Med* 2002; 13:194-198
- Franca AV, De Souza JB, Silva CM, Soares EC. Long-term prognosis of cirrhosis after spontaneous bacterial peritonitis treated with ceftriaxone. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:295-298
- Such J, Frances R, Munoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, Rodriguez-Valera F, Pascual S, Sola-Vera J, Carnicer F, Uceda F, Palazon JM, Perez-Mateo M. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002;36: 135-141
- Chang CS, Yang SS, Kao CH, Yeh HZ, Chen GH. Small intestinal bacterial overgrowth versus antimicrobial capacity in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:92-96
- Chiva M, Guarner C, Peralta C, Llovet T, Gomez G, Soriano G, Balanzo J. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15:145-150
- Sola R, Soriano G. Why do bacteria reach ascitic fluid? *Eur J*

- 8 *Gastroenterol Hepatol* 2002;14:351-354
- 9 Rodriguez-Ramos C, Galan F, Diaz F, Elvira J, Martin-Herrera L, Giron-Gonzalez JA. Expression of proinflammatory cytokines and their inhibitors during the course of spontaneous bacterial peritonitis. *Dig Dis Sci* 2001;46:1668-1676
- 10 Viallon A, Zeni F, Pouzet V, Lambert C, Quenet S, Aubert G, Guyomarch S, Tardy B, Bertrand JC. Serum and ascitic procalcitonin levels in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis: diagnostic value and relationship to proinflammatory cytokines. *Intensive Care Med* 2000;26:1082-1088
- 11 Youakim A, Ahdieh M. Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin. *Am J Physiol* 1999;276(5 Pt 1):G1279-88
- 12 武金宝, 王继德, 张亚历. 肠黏膜屏障研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:619-623
- 13 Harari Y, Weisbrodt NW, Moody FG. Ileal mucosal response to bacterial toxin challenge. *J Trauma* 2000;49:306-313
- 14 Kiyono H, Kweon MN, Hiroi T, Takahashi I. The mucosal immune system: from specialized immune defense to inflammation and allergy. *Acta Odontol Scand* 2001;59:145-153
- 15 岳茂兴. 胃肠道功能障碍及衰竭的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2002;10:3-6
- 16 Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A, Alexander GJ, Eddleston AL, Williams R. Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1988;2:72-74
- 17 Souza MH, Cunha FQ, Martinelli AL. Interleukin 6 concentration in ascitic fluid of cirrhotic patients: relationship with previous episodes of spontaneous bacterial peritonitis. *J Gastroenterol* 2003;38:149-152
- 18 Yumoto E, Higashi T, Nouso K, Nakatsukasa H, Fujiwara K, Hanafusa T, Yumoto Y, Tanimoto T, Kurimoto M, Tanaka N, Tsuji T. Serum gamma-interferon-inducing factor (IL-18) and IL-10 levels in patients with acute hepatitis and fulminant hepatic failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:285-294
- 19 Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Shimada N, Ebihara I, Suzuki M, Takahashi T, Koide H. Effect of plasma exchange on serum tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and cytokine concentrations in patients with fulminant hepatitis. *Blood Purif* 2000;18:50-54
- 20 Corredor J, Yan F, Shen CC, Tong W, John SK, Wilson G, Whitehead R, Polk DB. Tumor necrosis factor regulates intestinal epithelial cell migration by receptor-dependent mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C953-961
- 21 Kanzler S, Galle PR. Apoptosis and the liver. *Semin Cancer Biol* 2000;10:173-184
- 22 Pinkoski MJ, Droin NM, Green DR. Tumor necrosis factor alpha up-regulates non-lymphoid Fas-ligand following superantigen-induced peripheral lymphocyte activation. *J Biol Chem* 2002;277:42380-42385
- 23 Bojarski C, Bendfeldt K, Gitter AH, Mankertz J, Fromm M, Wagner S, Riecken EO, Schulzke JD. Apoptosis and intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 2000;915:270-274
- 24 Bruewer M, Luegering A, Kucharzik T, Parkos CA, Madara JL, Hopkins AM, Nusrat A. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol* 2003;171:6164-6172
- 25 Poritz LS, Garver KI, Tilberg AF, Koltun WA. Tumor necrosis factor alpha disrupts tight junction assembly. *J Surg Res* 2004;116:14-18
- 26 Schmitz H, Fromm M, Bentzel CJ, Scholz P, Detjen K, Mankertz J, Bode H, Epple HJ, Riecken EO, Schulzke JD. Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6. *J Cell Sci* 1999;112(Pt 1):137-146
- 27 Coyne CB, Vanhook MK, Gambling TM, Carson JL, Boucher RC, Johnson LG. Regulation of airway tight junctions by proinflammatory cytokines. *Mol Biol Cell* 2002;13:3218-3234
- 28 Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G367-376
- 29 Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M. Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and TNF-alpha-induced single-cell apoptosis. *FASEB J* 2000;14:1749-1753
- 30 Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1999;116:301-309
- 31 Mankertz J, Tavalali S, Schmitz H, Mankertz A, Riecken EO, Fromm M, Schulzke JD. Expression from the human occludin promoter is affected by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 11):2085-2090
- 32 Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 1986;103:755-766
- 33 Fanning AS, Jameson BJ, Jesaitis LA, Anderson JM. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998;273:29745-29753
- 34 Cruz N, Qi L, Alvarez X, Berg RD, Deitch EA. The Caco-2 cell monolayer system as an in vitro model for studying bacterial-enterocyte interactions and bacterial translocation. *J Burn Care Rehabil* 1994;15:207-212
- 35 Sappington PL, Han X, Yang R, Delude RL, Fink MP. Ethyl pyruvate ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction in endotoxemic mice and immunostimulated caco-2 enterocytic monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304:464-476
- 36 Raschperger E, Engstrom U, Pettersson RF, Fuxre J. CLMP, a novel member of the CTX family and a new component of epithelial tight junctions. *J Biol Chem* 2004;279:796-804
- 37 Neunlist M, Toumi F, Oreschkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisson CL, Galmiche JP, Jarry A. Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;285:G1028-1036

• 幽门螺杆菌 *H pylori* •

幽门螺杆菌 cagA 基因及蛋白序列多态性分析

周军, 曾浔, 尹焱, 郭欣, 张建中

周军, 曾浔, 尹焱, 张建中, 中国疾病预防与控制中心传染病预防与控制所传染病诊断室 北京市 102206
郭欣, 中国疾病预防与控制中心传染病预防与控制所中国现场流行病学培训项目 北京市 100050
周军, 男, 1974-04-17 生, 内蒙古赤峰人, 蒙古族。1998年北京医科大学学士, 实习研究员, 主要从事幽门螺杆菌的基础研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30370078
项目负责人: 张建中, 102206, 北京昌平流字5号, 中国疾病预防与控制中心传染病预防与控制所传染病诊断室。helico@public.bta.net.cn
电话: 010-61739456 传真: 010-61739456
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-03-06

Sequence diversity analysis of CagA gene and corresponding protein in *Helicobacter pylori*

Jun Zhou, Xun Zeng, Yan Yin, Xin Guo, Jian-Zhong Zhang

Jun Zhou, Xun Zeng, Yan Yin, Jian-Zhong Zhang, Department of Diagnosis, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Xin Guo, China Field Epidemiology Training Program, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30370078

Correspondence to: Dr. Jian-Zhong Zhang, Department of Diagnosis, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, PO Box 5, Beijing 102206, China. helico@public.bta.net.cn

Received: 2004-02-14 Accepted: 2004-03-06

Abstract

AIM: To find the structural characteristics and correlation with region and the clinical outcomes by analyzing nucleotide and amino acid sequences of CagA, our research results and data of CagA sequences deposited in NCBI database.

METHODS: The characteristics of CagA sequences were analyzed, and a phylogenetic tree was constructed by using Vector NTI Suite 9.0, ClastalX (version 1.8), Phylipl (version 3.5) and Treeview (version 1.61).

RESULTS: Through searching NCBI nucleotide and protein database, we obtained 44 complete and 560 partial CagA sequences. Aligning these sequences, analyzing similarity and constructing phylogenetic tree, we found CagA sequences could be classified into two types: western type and eastern type. Analyzing the CagA C terminal of 44 complete and 266 partial sequences, we classified the repeat sequence of CagA C terminal into two types: type I was discontinuous repeat sequence, common among all the strains, and type II was continuous repeat sequence, found in some individual strains. The type II repeat sequence was

found in 31% (12/39) of strains from gastric cancer patients, compared with 13% (9/71) of strains from non-cancer patients ($P = 0.021 < 0.05$). Strains with the type II repeat sequence were associated with gastric cancer.

CONCLUSION: There is a high diversity of CagA nucleotide and amino acid sequences among *H pylori* strains, showing a distinct geographic character as western and eastern region collection. The repeat sequence of CagA C terminal can be classified into two types, and strains with the type II repeat sequence containing EPIYA motif exhibits a stronger pathogenecity.

Zhou J, Zeng X, Yin Y, Guo X, Zhang JZ. Sequence diversity analysis of CagA gene and corresponding protein in *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1307-1312

摘要

目的: 结合本实验室研究成果, 充分利用 NCBI 的核酸和蛋白数据库中检索到的 CagA 基因碱基和蛋白质氨基酸序列, 分析其序列特征以及与地域和疾病的相关性。

方法: 利用 Vector NTI Suite 9.0, ClastalX(version 1.8), Phylipl (version 3.5) 和 Treeview (version 1.61) 软件对检索到的幽门螺杆菌 CagA 基因碱基和蛋白质氨基酸序列进行多序列比较和系统发育分析。

结果: 检索到可以利用的全序列 44 条, 部分序列 560 条。通过 44 条全序列比对, 相似性分析和构建系统进化树, 发现 CagA 基因碱基和蛋白质氨基酸序列可分为具有明显地域特征的东西方两类。通过 44 条 CagA 全序列和 266 条 C 端部分序列分析, 发现 C 端相对多变区的重复序列可分为两类: 第一类为菌株共有的不连续重复序列, 第二类为个别菌株特有的连续重复序列, 此类重复序列包含 EPIYA 模体的重复。序列特征与疾病的关系分析表明, 非胃癌株中包含第二类重复序列的菌株占 13% (9/71), 胃癌株中包含第二类重复序列的菌株占 31% (12/39), χ^2 检验 $P = 0.021 < 0.05$, 故可以认为胃癌株中包含第二类重复序列出现率高于非胃癌株, 可以认为包含第二类重复序列的菌株与胃癌有关。

结论: 幽门螺杆菌 CagA 基因及蛋白序列多态性明显, 具有东西方两个地域聚类特征, 重复序列可分为两类。第二类重复序列中包含 EPIYA 模体的重复可能导致菌株致病性增强。

周军, 曾浔, 尹焱, 郭欣, 张建中. 幽门螺杆菌 CagA 基因及蛋白序列多态性分析. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1307-1312

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1307.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, 简称 *H pylori*)是慢性胃炎及消化性溃疡的重要致病因子^[1-5], 与胃腺癌和MALT淋巴瘤的发生密切相关^[6-17], 目前世界范围内成人 *Hp* 感染率达 50-80%, 但 *Hp* 感染人群症状多种多样, 主要是由于感染菌株的毒力、宿主基因型和环境因素不同所致。细胞毒素相关基因A(the cytotoxin-associated gene A, 简称 CagA)编码的细胞毒相关蛋白(the cytotoxin-associated gene A Protein, 简称 CagA)作为 *H pylori* 毒力因子之一, 具有强免疫原性, CagA 可通过IV型分泌系统进入胃上皮细胞, 并且发生磷酸化, CagA 蛋白可能与胃炎和胃癌的发生有关^[18-20]。欧美国家的研究表明^[21-22], CagA 基因存在于约 50-70% 的 *H pylori* 菌株, 并认为 CagA 基因阳性菌株比 CagA 基因阴性菌株可引起更严重的组织炎症和损伤, 因而增加消化性溃疡和胃腺癌形成的危险性。但是中国、日本和韩国的研究发现^[23-24], CagA 阳性菌株在这些地区的检出率很高, 达 90% 以上, 并认为 CagA 不能作为这些地区 *H pylori* 高毒力的标志。不同菌株的 CagA 间又存在一些差异, 如其内部存在数个碱基重复序列被认为是产生 CagA 基因多样性的原因之一, 但其实际差异要复杂的多。基因序列多态性往往与功能及其致病性相关, 对于 CagA 全长基因(包括重复序列)多样性的分析, 对深入研究 *H pylori* 致病机制有重要意义。我们曾对 4 株幽门螺杆菌, 动物实验用菌株悉尼株(Sydney strain, SS1)、胃癌分离株 CAPM N62 和 CAPM N111, 以及十二指肠溃疡分离株 CAPM N93 的 CagA 基因全序列测定, 并已提交 GenBank。GenBank 中收录了大量序列信息, 本研究的目的是结合我们的测序结果, 充分利用可检索到的全部 CagA 基因序列和蛋白质氨基酸序列, 试图分析其可能存在的结构特征, 以及是否存在与地域分布和疾病发生的相关性等重要问题。

1 材料和方法

1.1 材料 序列的来源:以“*Helicobacter pylori* AND CagA [Gene Name]”为关键词, 检索 NCBI 的核酸和蛋白数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide> 和 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Protein>)。

1.2 方法 序列的选择标准是重复提交菌株序列经比对后选择其中一条, 排除重复提交和存在提交错误的序列。利用 Vector NTI Suite 9.0 软件对 GenBank 检索到的 CagA 核苷酸序列和 CagA 氨基酸序列进行序列比较和相似性分析。44 条全序列用 ClastalX(version 1.8)进行序列比对, 并保存为 Phylip 格式文件, 然后用 J. Felsenstein 的 Phylip (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) 程序构建系统进化树, 最后采用 Treeview (version 1.61) (<http://www.taxonomy.zool-ogy.gla.ac.uk/rod/rod.html>) 软件对系统进化树进行编辑和比较分析。560 条部分序

列通过序列比对后, 分为 266 条 CagA 3' 端序列和 294 条 CagA 5' 端序列, 分别进行序列特征分析。

统计学处理 对含第二类重复序列菌株以及不含第二类重复序列菌株与胃癌的关系进行 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 序列检索结果 共检索到全序列 49 条其中 J99 提交了 3 次(GenBank 接受号 AE001439, AE001483, NC_000921).ATCC 43526(GenBank 接受号 AB015413, AF0-01357, AB003397)其中 AF001357 和 AB003397 序列完全一样, 为同一作者重复提交, AB015413 为另一作者提交, 序列与另外两条有 26 个碱基不同, NCTC11637 检索到三条序列(GenBank 接受号 AB015416 和 AF202973)其中 AB015416 序列与 NCTC11638 序列完全相同, 可能是提交时菌株号写错。排除重复提交和错误序列, 共有 44 株全序列用于分析(其中 4 株菌株的 CagA 基因全序列为本实验室提交)。检索到部分序列 560 株, 其中 3' 端序列 266 株, 5' 端序列 294 株。

核酸序列 GenBank 接受号:

AF043487-AF043490 AJ239683-AJ239737 AJ252963-AJ252986 AF367251 U80065 AJ269852-AJ269897 AF222807-AF222809 AF202219-AF202225 AB090129 U80066 AF198468-AF198486 AF289399-AF289464 AJ315050 AJ313504-AJ313505 AF479032 AB056898-AB057105 AF427098-AF427100 AB089318 AB090090 AB090099 AB090102 AB090106 AB090114 AB090091-AB090098 AB090100-AB090101 AB090103-AB090105 AY176129 AB090107-AB090113 AB090115 AB090117-AB090127 AB090132-AB090154 AY169292-AY169299 AB110957-AB110974 AY162446-AY162453 AB090116 AB090128 AB116733-AB116768 AB003397 AF001357 AF083352 AF202972 AF202973 AF247651 AF249275 AF367250 AB015404-AB015416 AB017921-AB017923 AY121840 AB090140 AB090076-AB090078 AB090082-AB090084 AB090086 AB090073-AB090075 AB090079-AB090081 AB090085 AB090087-AB090089 AB090130 AB090131。

蛋白序列 GenBank 接受号:

AAC02082-AAC02085 AAD06073 AAD27691 CAB37794-CAB37829 CAB55439-CAB55462 CAB56425-CAB56446 CAB56485 CAB56487-CAB56489 CAB56495 CAB56447-CAB56449 CAB56496 CAB56450 CAB56490 CAB56497 CAB56451 CAB56486 CAB56494 CAB56493 CAB56452-CAB56456 AAF17598 AAF63759 AAF35340-AAF35342 AAF42821-AAF42827 AAF43608-AAF43626 AAF82477 AAC44706 AAG09848-AAG09913 AAK54719 AAK54720 BAB20914-BAB20929 BAB87265-BAB87369 BAB87370-BAB87472 BAC10431 Q9ZLT1 AAL28091-

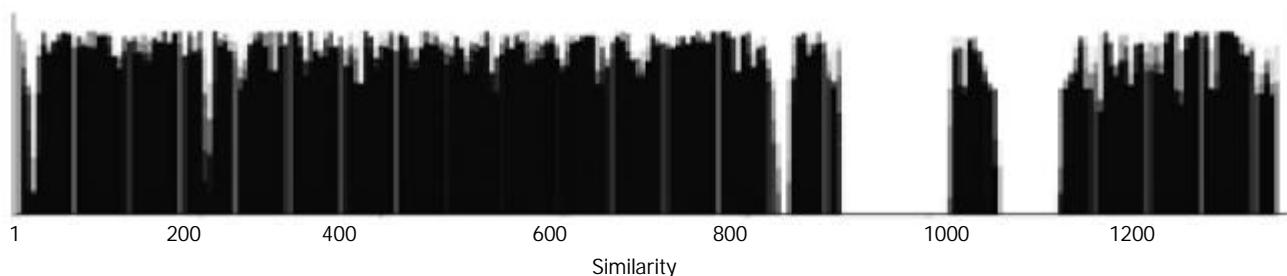


图 1 44 株 CagA 全长氨基酸序列的相似性比较结果. 比值在 0.5-1.0 之间表明序列相似, 比值小于 0.2 表明相似性很弱.

AAL28093 AAM88613 BAC07548 BAC10433-BAC10435
BAC10437-BAC10444 BAC10446 BAC10447 BAC10449-
BAC10451 BAC10453-BAC10459 BAC10461 P55746
BAC10463-BAC10473 BAC10475 BAC10478-BAC10485
BAC10487-BAC10500 P80200 AAO11686-AAO11693
BAC77000-BAC77017 AAN86014-AAN86021 AAF17597
P55980 BAC81787-BAC81822 BAA19853 AAB58747
AAB81560 AAB81561 AAC32880 CAB56492 CAB56491
CAB56457 AAL86902 CAC42220 CAC44458 CAC44467
BAC10432 BAC10436 BAC10445 BAC10448 BAC10452
BAC10460 BAC10462 BAC10474 BAC10476 BAC10477
BAC10486 BAC10425 BAC10422-BAC10424 BAC10428-
BAC10430 BAC10419-BAC10421 AAO39035 BAC10427
NP_223213.

2.2 氨基酸序列的相似性比较分析 从 CagA44 条全长序列、294 条 5' 端序列和 266 条 3' 端部分序列比对结果(因图形太大未附)来看, 序列内存在大量的碱基的插入、缺失、替换和重复. 5' 端序列相对保守, 差别是由于替换、缺失和小的插入造成. 3' 端序列由于个别菌株存在连续的大片段重复序列, 序列差异更加明显. 44 株 CagA 全长序列碱基范围在 3 444-3 828 bp 之间, 最长与最短之间相差 376 bp. 相应氨基酸残基范围在 1 147-1 275 aa, 最长与最短之间相差 128 aa, 分子质量范围在 128-142 ku 之间. 3' 端多变区位于 2 610-3 090 bp 之间; 从蛋白质氨基酸序列分析来看, 多变区位于 870-1 030 aa 之间. 从长度上来分大多数氨基酸序列在 1 147-1 186 aa 之间, 其差别是由于替换、缺失和小的插入造成, 大于 1 186 aa 是由于个别菌株内部连续的重复序列造成的. 从 44 株 CagA 全长序列推测的氨基酸序列的相似性比较结果(图 1), 可见, 序列相似性比值大多数部位在 0.5-1.0 之间, 是由于序列之间存在大量的碱基的插入, 缺失和替换. 有五个区间相似形小于 0.2. 序列比对结果可见, 前三个是由个别菌株短序列插入或缺失造成的, 后两个是由个别菌株的重复序列造成的. 依据 44 株 CagA 全长核苷酸序列和推定氨基酸序列比对结果, 绘制出的上述 44 株菌 CagA 基因及 CagA 蛋白质的系统进化树(图 2, 3). 可见, 无论从 CagA 基因核苷酸序列, 还是推定 CagA 氨基酸序列, 东方菌株包括中国、韩国、日本、香港台湾菌株聚类关系较近, 而西方菌株包括澳大利亚、英国、

美国等聚类关系较近. 从序列的相似性比较及进化分析来看, 菌株可分为东西方两类, 其中西方菌株中包含 3 株日本菌株(F79, F80 和 OK107), 但其序列与西方菌株非常相似, 菌株 F80 含有部分东方菌株序列替换.

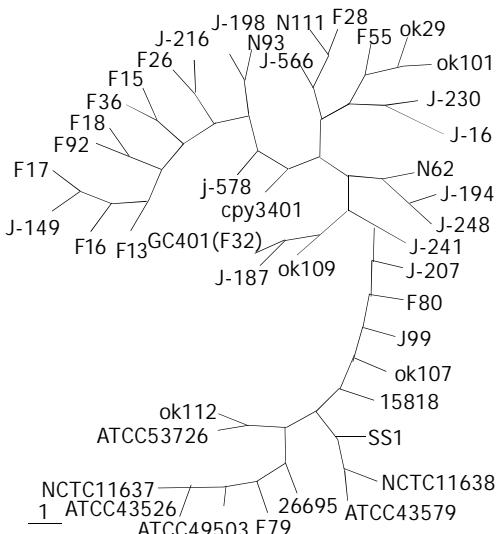


图 2 44 株 CagA 全长碱基酸序列进化树结果. 其中 26695, J99, SS1, ok112, ATCC5 - 3726, NCTC11637, ATCC43526, ATCC49503, ATCC43579, NCTC11638, 15818 为西方菌株, 其他为东方菌株.

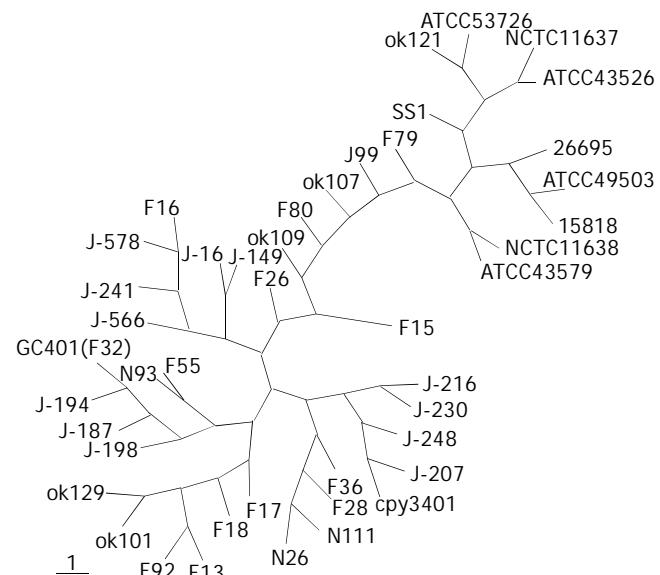


图 3 44 株 CagA 全长氨基酸序列进化树结果. 其中 26695, J99, SS1, ok112, ATCC - 53726, NCTC11637, ATCC43526, ATCC49503, ATCC43579, NCTC11638, 15818 为西方菌株, 其他为东方菌株.

| | [701] | 701 | 710 | 720 | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 |
|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|---------------------------|---|----------------------------|----------------------|-----|------|------|
| 26695 (697) | KD | I | KD FSKS FDE FKNG KMKDFSKA | EETLKA LKG SVKD LGINPEWISKVEN LNAALNE FKNG KMKDFSKWTQA | | | | | |
| J99 (696) | KD | I | KD FSKS FDE FKNG KMKDFSKA | EETLKA LKG SVKD LGINPEWISKVEN LNAALNE FKNG KMKDFSKWTQA | | | | | |
| NCTC11638 (692) | KN | I | KD FSKS FDE FKNG KMKDFSKA | EETLKA LKG SVKD LGINPEWISKVEN LNAALNE FKNG KMKDFSKWTQA | | | | | |
| SS1 (692) | KN | I | KD FSKS FDE FKNG KMKDFSKA | EETLTLK LKG SVKD LGINPEWISKVEN LNAALNE FKNG KMKDFSKWTQA | | | | | |
| NCTC11637 (692) | KD | I | KD FSKS FDE FKNG KMKDFSKA | EETLKA LKG SVKD LGINPEWISKVEN LNAALNE FKNG KMKDFSKWTQA | | | | | |
| Colombia145 | | | | | | | | | |
| OK107 (695) | KN | I | KD FDGS FDE FKNG KNNDFSK | TEETLKA LKD SVKD LGINPEWISKVEN LNTALNE FKNG KNNDFSKWTQA | | | | | |
| F79 (692) | KD | I | KD FSKS FDE FKNG KNNDFSK | AEETLKA LKG SVKD LGINPEWISKVEN LNAALNE FKNG KNNDFSKWTQA | | | | | |
| F80 (692) | KN | I | KD FGKS FDE LKNG KNNDFSK | AEETLKV LKD SVKD LAINPEWISKEN LNAALND FKNG KNNDFSKWTQA | | | | | |
| CAPM N111 (693) | KN | LKD FGKS FDE I | KNG KNNDFSK | AEETLKA LKD SVKD LGINPEWISKEN LNAALND FKNG KNNDFSKWTQA | | | | | |
| GC401(F32) (693) | KN | LKD FGKS FDE I | KSG KNNDFSK | AEETLKA LKD SVKD LGINPEWISKEN LNAALND FKNG KNNDFSKWTQA | | | | | |
| F17 (697) | KN | LKD FGKS FDE I | KNG KNNDFSK | AEETLKA LKD SVKD LGINPEWISKEN LNAALND FKNG KNNDFSKWTQA | | | | | |
| F26 (697) | KN | LKD FGKS FDE I | KNG KNNDFSK | AEETLKA LKD SVKD LAINPEWISKEN LNAALND FKNG KNNDFSKWTQA | | | | | |
| F18 (697) | KN | LKD FGKS FDE I | KNG KNNDFSK | AEETLKA LKD SVKD LGINPEWISKEN LNAALND FKNG KNNDFSKWTQA | | | | | |
| F28 (697) | KN | LKD FGKS FDE I | KNG KNNDFSK | AEETLKA LKD LVKD LAINPEWISKEN LNAALND FKNG KNNDFSKWIQA | | | | | |
| | (873) | 873 | 880 | 890 | 900 | 910 | 920 | 930 | 940 |
| 26695 (869) | NFSDIKKELNEKFKNFNNN--NNNGLKNST | E | PIYA KVVKKKTGQVASPEEPIYT | QVAKKVNAKIDRLNQIASG | | | | | |
| J99 (868) | NFSDIKKELNAKLGNFNNN--NNNGLENST | - | - | - | EPIYT | QVAKKVAKAKIDRLDQIASG | | | |
| NCTC11638 (864) | NFSDIKKELNAKLGNFNNN--NNNGLKN- | E | PIYA KVVKKKTGQASLEEPPIYA | QVAKKVNAKIDRLNQIASG | | | | | |
| SS1 (864) | NFSDIKKELNAKLGNFNNN--NNNGLKN-- | E | PIYA QVVKKAGQVVSPEEPIYA | QVAKKVNAKIDQLNQASG | | | | | |
| NCTC11637 (864) | NFSDIKKELNEKFKNFNNN--NNNGLEN- | E | PIYA KVVKKKTGQVASPEEPIYT | QVAKKVNAKIDRLNQASG | | | | | |
| Colombia145 (59) | NFSDIKKELNAKLGNFNNN--NNNGLKNST | E | PIYA KVVKKKTGQASPEEPIYT | QVAKKVNAKIDRLNQIASG | | | | | |
| OK107 (867) | NFSDIKKELNEKFKNFNNN--NNNGLKN-- | E | PIYA EVNKKKTGQVASPEEPIYT | QVAKKVAKAKIDRLDQIASG | | | | | |
| F79 (864) | NFSDIKKELNEKLFGN SNN--NNNGLKNST | E | PIYA KVVKKKTGQASHPEEPIYT | QVAKKVNAKIDRLNQIASG | | | | | |
| F80 (864) | NFSDIKKELNAKLFGN FNNNNNNGLKNST | E | PIYA KVVKKKTGQVASPEEPIYT | QVAKKVVTQKIDQLNQASG | | | | | |
| CAPM N111 (851) | NFSDIRKELNEKLFGN SNNNNNNGLKNNE | E | PIYA QVVKKKTGQVASPEEPIYA | QVAKKVSAKIDQLNEATSA | | | | | |
| GC401(F32) (852) | NFSDIRKELNEKLFGN SNN--NNNGLKNNE | E | PIYA QVVKKKTGQATSPEEPIYA | QVAKKVSAKIDQLNEATSA | | | | | |
| F17 (856) | NFSDIRKELNEKLFGN SNN--NNNGLKNST | - | - | - | EPIYA QVAKKVSAKIDQLNEATSA | | | | |
| NFSDIRKELNEKLFGN SNN--NNNGLKNNE | E | PIYA KVVKKKTGQVASPEEPIYA | QVAKKVSAKIDQLNEATSA | | | | | | |
| F26 (856) | NFSDIRKELNEKLFGN SNN--NNNGLKNNE | E | PIYA QVVKKKTGQATSPEEPIYA | QVAKKVSAKIDQLNEATSA | | | | | |
| NFSDIRKELNEKLFGN SNN--NNNGLKNNE | E | PIYA KVVKKKTGQATSPEEPIYA | QVAKKVSAKIDQLNEATSA | | | | | | |
| F18 (856) | NFSDIRKELNEKLFGN SNN--NNNGLKNNE | E | PIYA QVVKKKTGQAVANPEEPIYA | QVAKKVSAKIDQLNEATSA | | | | | |
| NFSDIRKELNEKLFGN SNN--NNNGLKNNE | E | PIYA QVVKKKTGQAVANPEEPIYA | QVAKKVSAKIDQLNEATSA | | | | | | |
| F28 (863) | NFSDIRKELNEKLFGN SNN--NNNGLKNNE | E | PIYA QVVKKKTGQASPEEPIYA | QVARKVSAKIDQLNEATSA | | | | | |
| | | | | | EPIYA QVARKVSAKIDQLNEATSA | | | | |
| | (945) | 945 | 950 | 960 | 970 | 980 | 990 | 1000 | 1010 |
| 26695 (939) | LGGVGQAAGFPLKRHDKVDDLSKVGLSASP | E | PIYA TIDDLGGP | --FPLKRHDKVDDLSKVGRSPNQEL | | | | | |
| J99 (920) | LGDVGQAASFLLKRHDKVDDLSKVGLSANHEPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKRHDKVDDLSKVGLSREQKL | | | | | | |
| NCTC11638 (933) | LGVVGQAAG | - | - | - | FPLKRHDKVDDLSKVGLSRNQEL | | | | |
| SS1 (933) | LGGVGQ-AF | FPLKRHDKVDDLSKVGRSVP | EPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKKHAKVEDLSKVGLSREQEL | | | | |
| NCTC11637 (933) | LGGVGQ-AF | FPLKRHDKVDDLSKVGRSVP | EPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKRHDKVDDLSKVGLSREQEL | | | | |
| Colombia145 | LGVVGQAAGFPLKRHDKVDDLSKVGRSVP | EPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKRHDKVDDLSKVGLSRNQEL | | | | | |
| OK107 (936) | LGGVGQ-AF | FSLKGHTKVDDLSKVGLSANHEPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKRHDKVDDLSKVGLSRNQEL | | | | | |
| | | FPLKKHHTKVDDLSKVGLSANHEPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKRHDKVDDLSKVGLSRNQEL | | | | | |
| | | FPLKKHHTKVDDLSKVGLSANHEPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKRHDKVDDLSKVGLSRNQEL | | | | | |
| F79 (935) | LGGVGQAAG | FPLKRHDKVDDLSKVGRSASP | EPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKKHDKVGDL SKVGLSREQEL | | | | |
| | | FPLKRHDKVDDLSKVGRSASP | EPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKRHDKVDDLSKVGLSRQEL | | | | |
| F80 (936) | LGGVGQAGFPLKRHTKVDDLSKVGLSASP | EPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKRHDKVDDLSKVGLSRQEL | | | | | |
| | | SKVGLSASP EPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKRHDKVDDLSKVGLSRQEL | | | | | |
| | | SKVGLSASP EPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKRHDKVDDLSKVGLSRQEL | | | | | |
| | | SKVGLSASP EPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKRHDKVDDLSKVGLSRQEL | | | | | |
| | | SKVGLSASP EPIYAT | TIDDLGGP | --FPLKRHDKVDDLSKVGLSRQEL | | | | | |
| CAPM N111 (923) | INRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAGQSASP | EPIYAT | TIDFDEANQAGFPLRRSAAVNNI | LSKVGLSREQEL | | | | | |
| GC401(F32) (923) | INRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAGRSASP | EPIYAT | TIDFDEANQAGFPLRRSAAVNNI | LSKVGLSREQEL | | | | | |
| F17 (908) | INRKIDRINKIASV | EPIYAT | TIDFDEANQAGFPLRRSTGVND | LSKVGLSREQEL | | | | | |
| | | INRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAGRSASP | EPIYAT | TIDFDEANQAGFPLRRSAAVNNI | LSKVGLSREQEL | | | | |
| F26 (927) | INRKIDRI | EPIYAT | TIDFDEANQAGFPLRRSAAVNNI | LSKVGLSREQEL | | | | | |
| | | INRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAGRSASP | EPIYAT | TIDFDEANQAGFPLRRSAAVNNI | LSKVGLSREQEL | | | | |
| F18 (912) | INRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAGRSASP | EPIYAT | TIDFDEANQAGFPLRRSAAVNNI | LSKVGLSREQEL | | | | | |
| | | INRKIDRINKIASAGKGVGGFSGAGRSASP | EPIYAT | TIDFDEANQAGFPLRRSAAVNNI | LSKVGLSREQEL | | | | |
| F28 (934) | INRKIDRINKIASAGKGVGGFSGARQSAASP | EPIYAT | TIDFDDANQAGFPLRISAAVND | LSKVGLSREQEL | | | | | |
| | | INRKIDRINKIASAGKGVGGFSGARQSAASP | EPIYAT | TIDFDDANQAGFPLRISAAVND | LSKVGLSREQEL | | | | |

图4 部分代表性菌株 CagA 序列 C 端多变区重复序列比对结果.第1类菌株间共有不连续的重复序列用方框标记, 第2类个别菌株特有的连续的重复序列重叠部位叠加后用阴影标记.

2.3 C 端重复序列分析 根据 44 条 CagA 全长序列和 266 条部分序列 C 端多变区重复序列代表菌株比对结果(图 4), 重复序列可分两类: 第 1 类为菌株间共有不连续的重复序列. 所有菌株共有重复序列 EPIYA 重复 3 次, 西方菌株共有的重复序列 EFKNGKNKDFSK 重复 2 次, 发现了一个新重复序列 KDFSK 重复 3 次, 其中两个拷贝在重复序列 EFKNGKNKDFSK 内部, FPLKRHDKVDDLSKVR/LS 重复两次, 东方菌株共有的重复序列 KNGK NKDFSK 重复两次. 第 2 类为个别菌株特有的连续的重复序列, 这种重复区起始位点和长度不一, 但都位于 EPIYA 重复序列附近, 重复序列内大部分都包含 EPIYA 序列, 东方菌株重复区多在前两个 EPIYA 序列附近, 并且包含前两个 EPIYA 序列中的 1 个或 2 个. 西方菌株重复序列多在第 3 个 EPIYA 序列附近, 并且包含第 3 个 EPIYA 序列. 个别菌株重复序列包含多个 EPIYA 序列(最多可达 6 个). 在 44 条 CagA 全长序列和 266 条部分序列中已知疾病背景菌株共 110 株, 其中胃癌株 39 株, 非胃癌株 71 株, 序列特征与疾病的关系见(表 1), 非胃癌株中包含第 2 类重复序列的菌株占 13% (9/71), 胃癌株中包含第 2 类重复序列的菌株占 31% (12/39), χ^2 检验 $\chi^2=5.335$, $P=0.021<0.05$, 故可以认为胃癌株中包含第 2 类重复序列出现率高于非胃癌株, $OR=3.062$, 95%CI (1.180-7.947), 即与非胃癌株相比, 感染含第 2 类重复序列的菌株的人患胃癌的危险性高于不含第 2 类重复序列的菌株的人, 可以认为包含第 2 类重复序列的菌株与胃癌有关.

表 1 序列特征与疾病相关性分析

| 序列特征 | 疾病分类 | | 合计 (n=100) |
|-------------|------------|-----------|------------|
| | 非胃癌株(n=71) | 胃癌株(n=39) | |
| 含第 2 类重复序列 | 9 (13) | 12 (31) | 21 (19) |
| 不含第 2 类重复序列 | 62 (87) | 27 (69) | 89 (81) |

括号内数据为不同序列特征百分率.

3 讨论

现在, 许多公用序列数据库收录了大量世界各地的序列信息, 为进行不同地区和疾病背景菌株序列分析提供了便利的条件. 我们检索到 H pylori CagA 全序列 49 条, 部分序列 560 条, 但序列中存在一定的错误率, 有许多序列疾病背景不清楚, 在今后利用和提交序列时应注意. 通过分析 44 株 CagA 全长序列和 560 株部分序列发现幽门螺杆菌 CagA 基因及蛋白序列多态性明显, 序列之间存在大量的碱基插入、缺失、替换和重复, 尤其是个别菌株 3' 端多变区存在大片段连续重复序列, 这种个别菌株内部的重复序列是导致不同菌株 CagA 分子质量差异的主要原因. 结果表明 CagA 序列间存在高度的多态性, 远比以往认识的差别要复杂的多.

有研究发现 H pylori CagA 序列有明显的地域聚类关系^[25-27], 我们通过分析和比较多个地区的 H pylori CagA 序列特征和系统进化关系, 发现 H pylori CagA 序列可明显的分为东西方两类, 有 3 株日本菌株序列与西方菌株一致, 并且有一株序列包含一小段东方菌株序列的插入. Yamaoka et al^[28]也发现了一株韩国菌株有一小段西方菌株序列插入. 可能是由于随着人类交往的频繁, 存在着东西方菌株的交叉和混合感染, 并且发生菌株间序列交换.

CagA 蛋白的多态性主要由 CagA 的 C 端多变区的重复序列造成, Covacci et al^[29]通过 CCUG17874 和 G39 菌株测序分析比较, 发现 CCUG17874 包含 EFKNGKNKDFSK 和 EPIYA 重复序列, G39 包含 2 个拷贝的 102 bp 重复序列, 相应氨基酸序列为 D1(P E P I Y A)、D2(D D L)、D3(FPLKRHDKVDDLSKV). Dong et al^[30]测序分析 12 株爱尔兰菌株, 提出了一个新的重复序列 β (EPIYTQVAKKVNAKIDRLNQASGLLGGVGQAAG). Evans et al^[31]测序分析了 13 株菌包括 CagA3' 端可变区在内的 1059NT 核苷酸序列, 发现除 102 bp 重复序列外, 还含有 12-99 bp 不等的重复序列, 相应氨基酸序列为 D1a(EPIYA), D1b(PEEPIYA), D2(TIDDLGG), D3(FPLKRHDKVDDLSKV), D4(GRSVSP), D5(KIDQ/RLN-Q or KIDNLN/SQ), D6(D6=D3-D4-D1a-D2). Yamaoka et al^[28]分析 7 株日本菌株和 4 株西方菌株提出了 3 个重复序列 R1(EPIYA), R2(QVNKKKTGQ-ATSPE), R3(QVARKVSAKIDQLNEATSAINRKIDRINKI ASAGKGVGGFSGAGRSANP). 我们的分析结果表明重复序列可分为两类, 这两类重复序列是截然不同的, 第 2 类重复序列(个别菌株特有的连续重复序列)是导致不同菌株 CagA 序列多态性的主要原因, 但其起始位点和长度不一, 无法用共有序列来概括. 以前的分析因其选用的菌株少, 没有分清两类菌株和两类重复序列的差异, 虽然提出了很多重复序列, 但不能很好的描述重复序列的特点. 我们根据序列特点对菌株和重复序列进行了分类, 更好的描述了重复序列的特点. 对于理解 CagA 序列多态性特点和序列重复的机制有很大帮助. 第 2 类重复序列与疾病的关系分析发现, 胃癌株中包含第 2 类重复序列出现率高于非胃癌株, 统计分析表明含第 2 类重复序列的菌株与胃癌有关. 而在第 2 类重复中都包含 EPIYA 模体的重复, 许多研究通过质谱和突变证实 CagA 的磷酸化位点都是 EPIYA 模体内的酪氨酸^[32-34], 是否第 2 类重复序列包含更多酪氨酸磷酸化模体, 导致菌株致病性增强, 还有待于实验证明.

H pylori 菌株间的多态性表明, H pylori 是目前多态性最高的细菌菌株, 充分认识 H pylori 多态性与地域和疾病相关性, 有助于了解菌株与宿主的相互作用, 以及何种菌株具有致病性, 何种菌株导致胃癌等严重胃肠道疾病, 对于 H pylori 感染的防治有重要意义. 我们分析了 44 株 CagA 全长序列和 560 株部分序列特征以及

多变区重复序列特征与疾病的关系，根据序列特点对菌株和重复序列进行了分类，发现第2类重复序列中包含EPIYA模体的重复可能导致菌株致病性增强，但是，CagA蛋白的磷酸化以及功能的实现，除了蛋白质的结构以外，还有赖于CagA蛋白质的表达和完整的IV型分泌系统对CagA蛋白的转运。Mimurod et al^[35]最近研究发现H pylori感染引起的细胞蜂鸟样改变并不需要CagA蛋白的磷酸化。另外，H pylori感染是胃癌发生多因素、多步骤过程中一个因素，影响其中一个步骤或多个步骤，还有其他许多因素影响H pylori感染后致病的最终结果。尽管CagA蛋白的多态性与疾病的关系还有待于进一步的明确，但可以肯定的说，利用国际范围内的共享资源进行全面分析，将越来越受到重视，其分析结果对H pylori及其相关疾病的研究也将会起到重要推动作用。

4 参考文献

- 1 Hobson M, Tovey FI. *Helicobacter pylori*: the primary cause of duodenal ulceration or a secondary infection? *World J Gastroenterol* 2001;7:149-151
- 2 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 高晋华, 王振华. 幽门螺杆菌诱导胃黏膜上皮细胞凋亡和增生与p53基因表达. 世界华人消化杂志 2001;9:1265-1268
- 3 王承党, 黄海辉, 陈玉丽. 幽门螺杆菌感染对消化性溃疡患者胃G, D细胞的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:847-850
- 4 彭仲生, 梁湛聪, 刘幕端, 欧阳能太. 幽门螺杆菌相关胃溃疡的细胞增生与凋亡研究. 世界华人消化杂志 1999;7:218-219
- 5 Vandeplassche Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000;6:20-31
- 6 张建中. 幽门螺杆菌与胃癌相关研究. 中华流行病学杂志 2003;6:437-438
- 7 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 根除幽门螺杆菌对胃癌前病变组织中bax蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:22-24
- 8 顾金柱, 侯天文, 王晓熙. 幽门螺杆菌致胃黏膜癌前期病变的横断研究. 世界华人消化杂志 2001;9:111
- 9 陈世耀, 王吉耀, 纪元, 张希德, 朱畴文. 幽门螺杆菌与蛋白激酶C在胃癌及癌前病变基因突变中的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:302-307
- 10 王普选, 张晓茹, 尹艳芬, 万东君. 中国西部少数民族幽门螺杆菌感染与胃癌发病的流行病学关系. 世界华人消化杂志 2000;8:1444
- 11 何兴祥, 王家马龙, 吴捷莉, 袁顺玉, 艾莉. 胃黏膜癌变过程中幽门螺杆菌感染与端粒酶活性的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:505-508
- 12 全俊, 范学工. 幽门螺杆菌感染与胃癌发生的实验研究进展. 世界华人消化杂志 1999;7:1068-1069
- 13 华杰松. 幽门螺杆菌:细胞增生和细胞凋亡在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 1999;9:647-648
- 14 胡品津. 幽门螺杆菌与胃癌:研究面临的挑战. 世界华人消化杂志 1999;7:1-2
- 15 Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, Lu XZ, Zhang XY, Zhao ZQ. Multiple genetic alterations and behavior of cellular biology in gastric cancer and other gastric mucosal lesions: *H pylori* infection, histological types and staging. *World J Gastroenterol* 2000;6:848-854
- 16 庄小强, 林三仁. 幽门螺杆菌与胃癌的研究进展. 世界华人消化杂志 2000;8:206-207
- 17 姚永莉, 张万岱. 幽门螺杆菌与胃癌的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:1045-1049
- 18 Odenbreit S, Puls J, Sedlmaier B, Gerland E, Fischer W, Haas R. Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. *Science* 2000;287:1497-1500
- 19 Asahi M, Azuma T, Ito S, Ito Y, Suto H, Nagai Y, Tsubokawa M, Tohyama Y, Maeda S, Omata M, Suzuki T, Sasakawa C. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. *J Exp Med* 2000;191:593-602
- 20 Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M, Hatakeyama M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002;295:683-686
- 21 Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Ann Intern Med* 1994;120:977-981
- 22 Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991;325:1132-1136
- 23 Pan ZJ, van der Hulst RW, Feller M, Xiao SD, Tytgat GN, Dankert J, van der Ende A. Equally high prevalences of infection with CagA-positive *Helicobacter pylori* in Chinese patients with peptic ulcer disease and those with chronic gastritis-associated dyspepsia. *J Clin Microbiol* 1997;35:1344-1347
- 24 Shimoyama T, Fukuda S, Tanaka M, Mikami T, Saito Y, Munakata A. High prevalence of the CagA-positive *Helicobacter pylori* strains in Japanese asymptomatic patients and gastric cancer patients. *Scand J Gastroenterol* 1997;32:465-468
- 25 Rahman M, Mukhopadhyay AK, Nahar S, Datta S, Ahmad MM, Sarker S, Masud IM, Engstrand L, Albert MJ, Nair GB, Berg DE. DNA-level characterization of *Helicobacter pylori* strains from patients with overt disease and with benign infections in Bangladesh. *J Clin Microbiol* 2003;41:2008-2014
- 26 van der Ende A, Pan ZJ, Bart A, van der Hulst RW, Feller M, Xiao SD, Tytgat GN, Dankert J. CagA-positive *Helicobacter pylori* populations in China and The Netherlands are distinct. *Infect Immun* 1998;66:1822-1826
- 27 Hoshino FB, Katayama K, Watanabe K, Takahashi S, Uchimura H, Ando T. Heterogeneity found in the CagA gene of *Helicobacter pylori* from Japanese and non-Japanese isolates. *J Gastroenterol* 2000;35:890-897
- 28 Yamaoka Y, El-Zimaity HM, Gutierrez O, Figura N, Kim JG, Kodama T, Kashima K, Graham DY, Kim JK. Relationship between the CagA 3 repeat region of *Helicobacter pylori*, gastric histology, and susceptibility to low pH. *Gastroenterology* 1999;117:342-349
- 29 Covacci A, Censini S, Bugnoli M, Petracca R, Burroni D, Macchia G, Massone A, Papini E, Xiang Z, Figura N. Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:5791-5795
- 30 Dong Q, O'Sullivan M, Hall W, Herra C, Kean C, O'Morain C, Buckley M. Identification of a new segment involved in CagA 3 region variation of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;33:51-55
- 31 Evans DJ Jr, Queiroz DM, Mendes EN, Evans DG. Diversity in the variable region of *Helicobacter pylori* CagA gene involves more than simple repetition of a 102-nucleotide sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:780-784
- 32 Stein M, Bagnoli F, Halenbeck R, Rappuoli R, Fanti WI, Covacci A. c-Src/Lyn kinases activate *Helicobacter pylori* CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs. *Mol Microbiol* 2002;43:971-980
- 33 Asahi M, Tanaka Y, Izumi T, Ito Y, Naiki H, Kersulyte D, Tsujikawa K, Saito M, Sada K, Yanagi S, Fujikawa A, Noda M, Itokawa Y. *Helicobacter pylori* CagA containing ITAM-like sequences localized to lipid rafts negatively regulates VacA-induced signaling *in vivo*. *Helicobacter* 2003;8:1-14
- 34 Backert S, Moese S, Selbach M, Brinkmann V, Meyer TF. Phosphorylation of tyrosine 972 of the *Helicobacter pylori* CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells. *Mol Microbiol* 2001;42:631-644
- 35 Mimuro H, Suzuki T, Tanaka J, Asahi M, Haas R, Sasakawa C. Grb2 is a key mediator of *Helicobacter pylori* CagA protein activities. *Mol Cell* 2002;10:745-755

• 幽门螺杆菌 *H pylori* •

C₅₇BL/6小鼠幽门螺杆菌感染动物模型的建立

田雪飞, 范学工, 张艳, 黄燕

田雪飞, 范学工, 张艳, 黄燕, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008
田雪飞, 男, 1973-01-26 生, 湖南省桑植县人, 土家族, 2001 年湖南中医学院博士, 2002 年中南大学湘雅医院博士后流动站, 主要从事幽门螺杆菌方面的研究.

国家自然科学基金资助项目, No. 30271171
国家教育部骨干教师基金资助项目, No. 教技司 2000-65
湖南省自然科学基金资助项目, No.01jjy2114
湖南省卫生厅科研基金资助项目, No. 00022
项目负责人: 范学工, 410008, 湖南省长沙市湘雅路 87 号, 中南大学湘雅医院传染科. xgf@hotmai.com
电话: 0731-4327392 传真: 0731-4327332
收稿日期: 2004-02-11 接受日期: 2004-02-24

Establishment of a mouse model colonized by *Helicobacter pylori*

Xue-Fei Tian, Xue-Gong Fan, Yan Zhang, Yan Huang

Xue-Fei Tian, Xue-Gong Fan, Yan Zhang, Yan Huang, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30271171, Teacher Foundation of the National Ministry of Education, No.2000-65, Nature Scientific Foundation of Hunan Province, No. 01jjy2114 and the Scientific Research Foundation of Health Bureau of Hunan Province No. 00022.

Correspondence to: Dr. Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. xgf@hotmai.com

Received: 2004-02-11 Accepted: 2004-02-24

Abstract

AIM: To establish a mouse model of *H pylori* infection.

METHODS: C57BL/6 strain mouse, used as an experiment animal, was inoculated orally *H pylori* SS1 strain and fed in laminar flow cabinet. Inoculated mouse examined by HE stain, carbolic acid- basic fuchsin stain, immunohistochemical stain, urease test and bacteria cultivation. Both bacteria DNA from gastric tissue and *H pylori* isolated from stomach were analyzed by PCR and gene sequencing.

RESULTS: The bacteria isolated from stomach had the identical shape and character compared with inoculated bacteria. Bacteria colonizing in antrum crypt and infiltration of inflammatory cells in gastric submucosa were observed. *H pylori* 16SrRNA and cagA gene were amplificated successfully from gastric tissue DNA, gene sequencing results showed the complete concordance.

CONCLUSION: After inoculated into C57BL/6 mouse 2 months, *H pylori* SS1 can colonize successfully the mouse stomach and cause chronic gastritis.

Tian XF, Fan XG, Zhang Y, Huang Y. Establishment of a mouse model colonized by *Helicobacter pylori*. Shijie Huaren Zazhi 2004;12 (6):1313-1316

摘要

目的: 建立幽门螺杆菌(*H pylori*)小鼠感染模型.

方法: 以 C₅₇BL/6 小鼠为实验动物, 经口感染接种 *H pylori* 悉尼株(SS1), 置层流柜中饲养. 用 HE 染色、石碳酸 - 碱性品红染色、免疫组织化学染色、尿素酶实验、细菌培养等方法检测接种小鼠, 并用 PCR、基因测序方法对胃组织细菌、胃组织分离培养细菌 DNA 进行分析.

结果: 小鼠胃组织分离培养的细菌与接种细菌形态及特性相同. 胃窦隐窝可观察到细菌定植, 胃黏膜下层可见炎症细胞浸润. 胃组织 DNA 中成功扩增出 *H pylori* 16SrRNA 及 cagA 基因的目的片段, 基因测序结果显示与接种菌株序列完全一致.

结论: *H pylori* SS1 经口接种 C₅₇BL/6 小鼠 2 mo 后可成功在胃内定植并导致成慢性胃炎.

田雪飞, 范学工, 张艳, 黄燕. C₅₇BL/6 小鼠幽门螺杆菌感染动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1313-1316
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1313.asp>

0 引言

研究者一直在探索与人类病理变化类似的幽门螺杆菌(*H pylori*)感染动物模型, 1987 年首次用限菌小猪建立实验性 *H pylori* 感染模型以来, 已有猕猴、小鼠、蒙古沙鼠、大鼠、猪、犬、猫等多种动物应用于模型^[1-9]. 虽然与人类感染 *H pylori* 的病理变化有一定差距, 但在 *H pylori* 致病机制、疫苗筛选、新药疗效考察等研究中, 动物模型仍发挥了重要作用. 目前国内应用较多的模型为沙土鼠感染模型, 而小鼠动物模型尚不成熟, 为此, 我们采用 C₅₇BL/6 小鼠为研究对象进行了 *H pylori* 的感染模型制作.

1 材料和方法

1.1 材料 14 只 C₅₇BL/6 小鼠(SPF), 6-8 周龄, ♂, 体质 25-30 g. *H pylori* 使用悉尼株(SS1). 兔抗 *H pylori* 多克隆抗体购自丹麦 Dako 公司, SABC 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, 蛋白酶 K 购自德国 Merck 公司, PCR 相关试剂为大连宝生物工程有限公司产品. PCR 以接种的 *H pylori* 悉尼株为阳性对照细菌, 阴性对照细菌为购自中国预防医学科学院流行病学微生物研究所的空肠弯曲菌(Lior₄₈87519), 阴性对照为灭菌双蒸水.

1.2 方法 *H pylori* 培养按我研究组建立的 *H pylori* 培养方法进行^[10]. 造模方法参照 Lee et al^[11]方法: 将 C₅₇BL/6 小鼠完全随机分为模型组与正常对照组, 接种前禁食 24 h. *H pylori* 培养 72 h 收获, 刮取菌落, 灭菌 0.01 mmol/L PBS 混悬, 浓度 3×10^8 CFU/L, 0.5 mL/ 只灌胃接种, 隔日 1 次, 共 3 次. 对照组给予等量灭菌 PBS. 接种后将动物置层流柜中饲养, 2 mo 后处死. 样本获取及检测方法: 取全胃沿胃大弯剪开, 生理盐水漂洗去除胃内容物, 一半胃组织 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋切片, 病理切片包括 HE 染色, 免疫组织化学染色及石碳酸 - 碱性品红染色^[12]. *H pylori* 的定植水平等级评分标准参照迟晶方法制订^[13]. 免疫组织化学染色一抗采用兔抗 *H pylori* 多克隆抗体, SABC 法, DAB 显色, 苏木素轻度复染. 一半胃组织用于细菌培养以及 PCR 检测, 组织及细菌 DNA 提取参照彭小宁等方法^[14]. PCR 引物设计^[15]: 16SrRNA 基因上游引物 5' -GTC ATG ACG GGT ATC C-3', 下游引物: 5' -GAT TTT ACC CCT ACA CCA-3', 扩增出 400 bp 片段, 55 °C 退火 1 min 30 s, 72 °C 延伸 2 min; cagA 基因上游引物 5' -ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCG A-3', 下游引物: 5' -TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATC ACG CCA T-3', 扩增出 297 bp 片段, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 90 s; 16SrRNA, cagA PCR 产物纯化后基因测序, 大连宝生物工程技术有限公司完成.

2 结果

2.1 胃黏膜细菌培养 从胃黏膜分离培养的 *H pylori* 在培养平板上可见清晰的针尖样菌落, 尿素酶试纸检测呈强阳性, 革兰染色阴性, 形态与原始接种细菌无差别, 光镜下均为弯曲杆状(图 1A), 免疫组织化学染色结果菌体为棕黄色(图 1B).

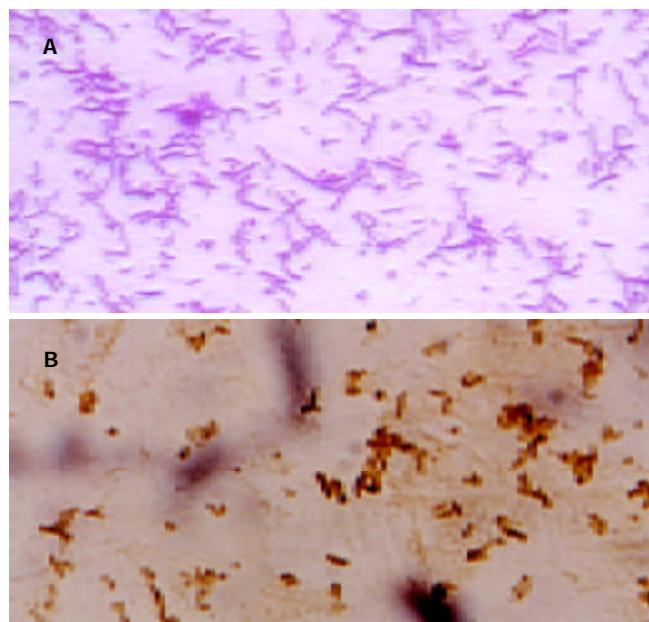


图 1 小鼠胃黏膜分离培养 *H pylori* $\times 1500$, A: 红色弯曲杆状(Gram); B: 深棕色呈弯曲杆状(SABC).

2.2 定植与分布 在 8 wk *H pylori* 胃贲门部(1.17 ± 0.41), 胃体部(0.17 ± 0.41)及胃窦部位(2.33 ± 0.52)都可观察到细菌的定植, 以胃窦部位的黏膜腺体观察到的定植细菌最多($P < 0.05$), 大量细菌分布于胃窦隐窝, 胃体部相对少, 仅见少量细菌散在分布, 有的动物甚至未观察到. 在胃腺体表面及上层黏液中可见大量细菌(图 2A), 油镜下观察呈清晰的 S 状或螺旋状(图 2B), 与人类感染类似, 光镜下可见一些细菌紧密黏附于小鼠胃上皮细胞. 细菌免疫组织化学结果进一步证实了定植细菌为 *H pylori*, 菌体染色为棕黄色或深棕色(图 2C).

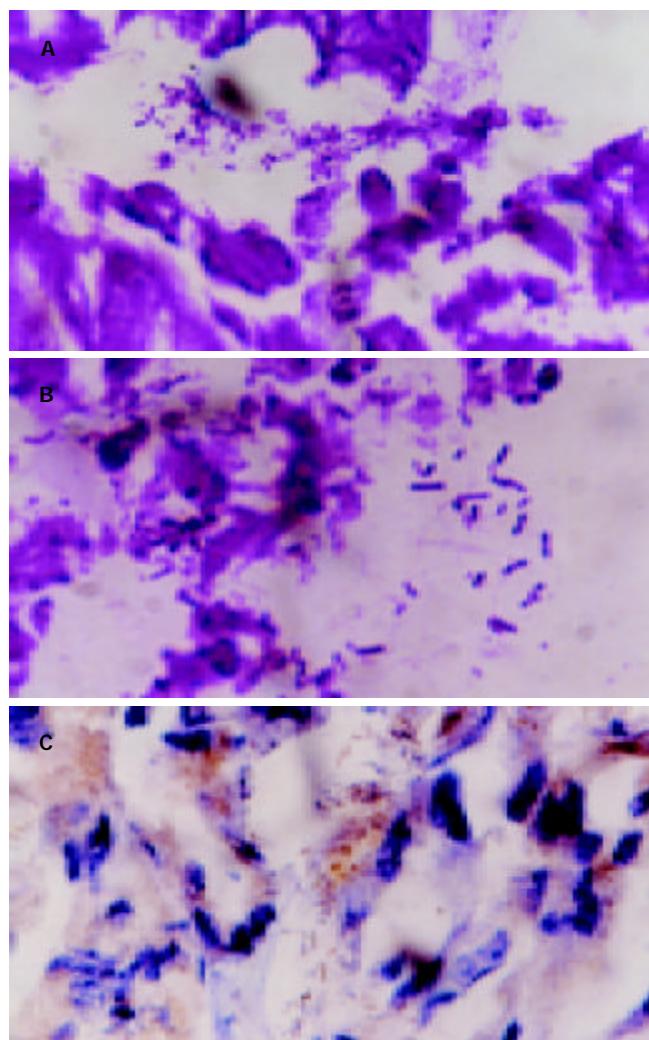


图 2 胃黏膜上可见大量 *H pylori*. A: 石炭酸 - 碱性品红染色 $\times 600$; B: S 形或螺旋形, 石炭酸 - 碱性品红染色 $\times 1500$; C: SABC $\times 600$.

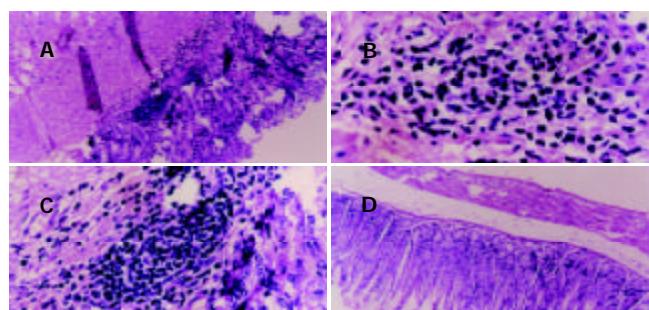


图 3 小鼠胃黏膜(HE). A: 连续性破坏 $\times 300$; B: 黏膜下层出现淋巴细胞浸润为主的炎症反应 $\times 600$; C: 出现淋巴滤泡 $\times 600$; D: 正常 $\times 300$.

2.3 胃黏膜病理改变 小鼠经过细菌接种2 mo后均出现与人类类似的慢性活动性胃炎的病理改变, 出现炎症细胞浸润。胃黏膜的完整性与连续性受到破坏, 黏膜下层可见大量淋巴细胞浸润并形成淋巴滤泡, 中间夹杂少量中性粒细胞浸润(图3A-D)。

2.4 PCR 及测序结果 在7例感染小鼠胃组织DNA标本中全部扩增出400 bp (16S rRNA)与297 bp (cagA)目的片段, 对照细菌及阴性对照未扩增出条带。取2个阳性标本与接种H pylori SS1株的PCR产物进行序列分析, 用16SrRNA、cagA引物进行正向及反向测序, 结果与接种H pylori SS1株进行比较, 发现具有100%的同源性, 证实成功定植的细菌与原始接种的H pylori SS1属于同一株细菌(图4, 5)。

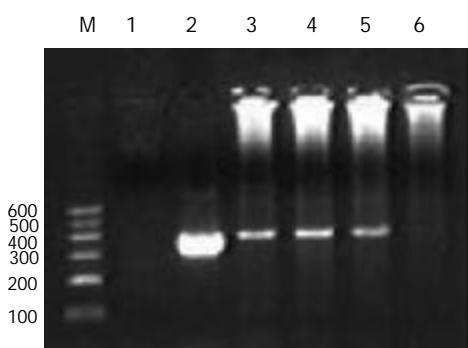


图4 PCR 扩增H pylori 16SrRNA 基因. M: M_r标准; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照细菌(SS1); 3, 4, 5: 阳性组织; 6: 阴性对照细菌(Lior₄₈ 87519).

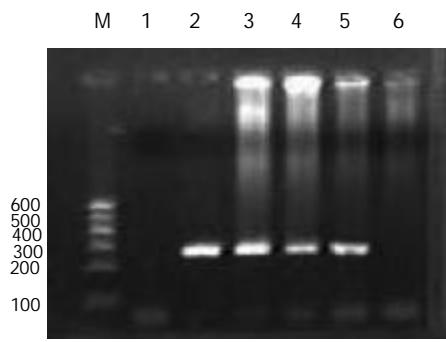


图5 PCR 扩增H pylori cagA 基因. M: M_r标准; 1: 阳性对照; 2: 阳性对照细菌(SS1); 3, 4, 5: 阳性组织; 6: 阴性对照细菌(Lior₄₈ 87519).

3 讨论

迄今已有许多动物被用来接种H pylori期望制作出类似于人类细菌感染的动物模型。1997年Lee et al^[11]鉴定的H pylori 悉尼株(SS1)目前已被认为是理想的动物模型接种菌株, 经口接种沙土鼠后, 8 mo可出现炎症细胞浸润、黏膜腺体的异型性增生、肠上皮化生、黏膜萎缩等病理改变^[16]。我们也采用SS1株经口接种, 结果表明C₅₇BL/6小鼠的易感性好, 成功率高, 在小鼠胃内定植具有部位选择性, 以胃窦部最多, 这与人类H pylori感染胃内定植部位类似。与人类感染相同, 细菌分布在胃黏膜上皮细胞表层黏液及腺窝内, 甚至侵入上皮细胞间或黏膜固有层内。此前, 我们曾以临床分离株及

SS1株接种过中国昆明种小白鼠, 因定植效果太差而放弃。小鼠接种2 mo后虽然未出现溃疡及萎缩性病理改变, 但出现以淋巴细胞浸润为主的慢性炎症反应, 且出现淋巴滤泡, 而淋巴滤泡是MALT淋巴瘤的重要病理学改变之一^[17-21]。已有研究表明, 人MALT淋巴瘤的发生与H pylori感染具有相关性^[22-27], 增多的淋巴细胞以B淋巴细胞为主, 这与H pylori感染后T淋巴细胞活化引起B淋巴细胞增生有关^[28-30]。为了确证定植细菌来源于经口接种而非外源污染所致, 我们将小鼠胃组织内成功定植的细菌与接种细菌DNA进行PCR扩增并行测序对比分析, 结果显示成功定植的细菌来源于原始接种菌株, 表明了模型的可靠性。该动物模型与其他模型相比较, 定植成功率更高, 并且价格便宜, 容易饲养, 具有良好的推广应用前景。

4 参考文献

- Nozaki K, Shimizu N, Tatematsu M. Eradication model employing Mongolian gerbils treated with chemical carcinogen and infected with *Helicobacter pylori*-implications for human cancer prevention. *Nippon Rinsho* 2000;58:1927-1934
- Guo BP, Mekalanos JJ. Rapid genetic analysis of *Helicobacter pylori* gastric mucosal colonization in suckling mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8354-8359
- Wang X, Willen R, Andersson C, Wadstrom T. Development of high-grade lymphoma in *Helicobacter pylori*-infected C57BL/6 mice. *APMIS* 2000;108:503-508
- Solnick JV, Hansen LM, Canfield DR, Parsonnet J. Determination of the infectious dose of *Helicobacter pylori* during primary and secondary infection in rhesus monkeys (Macaca mulatta). *Infect Immun* 2001;69:6887-6892
- Simpson KW, Strauss-Ayali D, Straubinger RK, Scanziani E, McDonough PL, Straubinger AF, Chang YF, Esteves MI, Fox JG, Domeneghini C, Arebi N, Calam J. *Helicobacter pylori* infection in the cat: evaluation of gastric colonization, inflammation and function. *Helicobacter* 2001;6:1-14
- Rossi G, Fortuna D, Pancotto L, Renzoni G, Taccini E, Ghiara P, Rappuoli R, Del Giudice G. Immunohistochemical study of lymphocyte populations infiltrating the gastric mucosa of beagle dogs experimentally infected with *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2000;68:4769-4772
- Li H, Andersson EM, Helander HF. Reactions from rat gastric mucosa during one year of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Dis Sci* 1999;44:116-124
- Oda T, Murakami K, Nishizono A, Kodama M, Nasu M, Fujioka T. Long-term *Helicobacter pylori* infection in Japanese monkeys induces atrophic gastritis and accumulation of mutations in the p53 tumor suppressor gene. *Helicobacter* 2002;7:143-151
- Poutahidis T, Tsangaris T, Kanakoudis G, Vlemmas I, Iliadis N, Sofianou D. *Helicobacter pylori*-induced gastritis in experimentally infected conventional piglets. *Vet Pathol* 2001;38:667-678
- Fan XG, Peng XN, Huang Y, Yakoob J, Wang ZM, Chen YP. *Helicobacter* species ribosomal DNA recovered from the liver tissue of Chinese patients with primary hepatocellular carcinoma. *Clin Infect Dis* 2002;35:1555-1557
- Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection:introducing the sydney strain. *Gastroenterology* 1997;112:1386-1397
- 颜亚辉, 沈明, 蔡长美. 石碳酸-碱性品红法检测胃幽门螺杆菌. 临床与实验病理学杂志 1996;12:345
- 迟晶, 傅宝玉, 九岛亮治, 中岛滋美, 服部隆则. 沙土鼠幽门螺杆菌感染胃炎、胃溃疡动物模型的建立及除菌治疗前后炎症和细胞增生的变化. 世界华人消化杂志 1999;7:557-560

- 14 彭小宁, 范学工, 黄燕, 王志明, 陈永平. 螺杆菌感染与肝癌关系的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:902-906
- 15 黄燕, 范学工, 陈永平, 李宁, 汤立军. 肝癌组织中螺杆菌16S rRNA基因的检测. 世界华人消化杂志 2002;10:877-882
- 16 迟晶, 傅宝玉, 宋敏, 展广智, 吴利波, 服部隆则. 砂土鼠胃黏膜幽门螺杆菌长期感染的病理改变. 世界华人消化杂志 2002;10:415-417
- 17 Zucca E, Bertoni F, Cavalli F. Pathogenesis and treatment of extranodal lymphomas: the fascinating model of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Haematologica* 2003; 8:841-844
- 18 Fukui T, Okazaki K, Tamaki H, Kawasaki K, Matsuura M, Asada M, Nishi T, Uchida K, Iwano M, Ohana M, Hiai H, Chiba T. Immunogenetic analysis of gastric MALT lymphoma-like lesions induced by *Helicobacter pylori* infection in neonatally thymectomized mice. *Lab Invest* 2004;84:485-492
- 19 Ohkura Y, Furihata T, Kawamata H, Tabuchi M, Kubota K, Terano A, Sakai T, Fujimori T. Evaluation of cell proliferation and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis using an image analysis processor. *Gastric Cancer* 2003;6:49-54
- 20 Sepulveda A, Peterson LE, Shelton J, Gutierrez O, Graham DY. Histological patterns of gastritis in *H pylori*-infected individuals with a family history of gastric cancer. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1365-1370
- 21 Konturek JW. Discovery by Jaworski of *Helicobacter pylori* and its pathogenetic role in peptic ulcer, gastritis and gastric cancer. *J Physiol Pharmacol* 2003;54:23-41
- 22 Lee SK, Lee YC, Chung JB, Chon CY, Moon YM, Kang JK, Park IS, Suh CO, Yang WI. Low grade gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphoma: Treatment strategies based on 10 year follow-up. *World J Gastroenterol* 2004;10:223-226
- 23 Al-Akwaa AM, Siddiqui N, Al-Mofleh IA. Primary gastric lymphoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:5-11
- 24 Perng CL, Lin HJ, Lo WC, Tseng GY, Sun IC, Ou YH. Genotypes of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer bleeding. *World J Gastroenterol* 2004;10:602-605
- 25 Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, Yuan Y. Association of cyclooxygenase-2 expression with *Hp*-cagA infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:246-249
- 26 Morgner A, Miehlke S, Stolte M, Neubauer A, Alpen B, Thiede C, Klann H, Hierlmeier FX, Ell C, Ehninger G, Bayerdorffer E. Development of early gastric cancer 4 and 5 years after complete remission of *Helicobacter pylori* associated gastric low grade marginal zone B cell lymphoma of MALT type. *World J Gastroenterol* 2001;7:248-253
- 27 Makinen JM, Niemela S, Kerola T, Lehtola J, Karttunen TJ. Epithelial cell proliferation and glandular atrophy in lymphocytic gastritis: Effect of *H pylori* treatment. *World J Gastroenterol* 2003;9:2706-2710
- 28 Umehara S, Higashi H, Ohnishi N, Asaka M, Hatakeyama M. Effects of *Helicobacter pylori* CagA protein on the growth and survival of B lymphocytes, the origin of MALT lymphoma. *Oncogene* 2003;51:8337-8342
- 29 Iyengar P, Deodhare S. Primary extranodal marginal zone B-cell lymphoma of MALT type of the endometrium. *Gynecol Oncol* 2004;93:238-241
- 30 Tiemann M, Haring S, Heidemann M, Reichelt J, Claviez A. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in the conjunctiva of a child. *Virchows Arch* 2004;444:198-201

World Journal of Gastroenterology 审稿要点

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

• 幽门螺杆菌 *H pylori* •

携带幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白活减毒鼠伤寒沙门菌口服重组DNA疫苗株的构建

孙 波, 何 苗, 杨 骥, 金 晶, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 杜奕奇, 李兆申

孙波, 杨骅, 金晶, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 杜奕奇, 李兆申, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 上海市 200433
何苗, 中国人民解放军第二军医大学医技检验专升本26队 上海市 200433
孙波, 男, 1972-04-29生, 山东省平度市人, 汉族。1999年第二军医大学毕业, 博士生, 主治医师, 讲师。主要从事幽门螺杆菌疫苗防治研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30170427
项目负责人: 杜奕奇, 200433, 上海市长海路174号, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院消化内科 duyiqi@hotmail.com
电话: 021-25070552 传真: 021-25070552
收稿日期: 2003-12-17 接受日期: 2004-02-09

Construction of an oral recombinant DNA vaccine strain of live attenuated *Salmonella typhimurium* carrying *H pylori* neutrophil activating protein

Bo Sun, Miao He, Hua Yang, Jing Jin, Xiao-Hua Man, Yan-Fang Gong, Zhen-Xing Tu, Yi-Qi Du, Zhao-Shen Li

Bo Sun, Hua Yang, Jing Jin, Xiao-Hua Man, Yan-Fang Gong, Zhen-Xing Tu, Yi-Qi Du, Zhao-Shen Li, Department of Gastroenterology, Shanghai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Miao He, Division of, Medical Technology and Laboratory (Brigade 26), Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Supported by the Natural Science Foundation of the Ministry of Health of China, No. 30170427
Correspondence to: Yi-Qi Du, Department of Gastroenterology, Shanghai Hospital, Second Military Medical University, 174 Shanghai Road, Shanghai 200433, China. duyiqi@hotmail.com
Received: 2003-12-17 Accepted: 2004-08-16

Abstract

AIM: To construct a live attenuated *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) strain carrying *H pylori*-neutrophil activating protein (HP-NAP) gene as an oral recombinant DNA vaccine.

METHODS: By genetic engineering method, a 435 bp *napA* gene (encoding HP-NAP) was subcloned into an eukaryotic expression vector pIRES. After sequencing and BLAST analysis, the identified recombinant plasmid was then transformed into a live attenuated *S. typhimurium* strain SL7207.

RESULTS: By using polymerase chain reaction (PCR) and restriction enzyme digestion, a recombinant eukaryotic expression plasmid pIRES-*napA* containing *napA* gene of *H pylori* was constructed, and the recombinant plasmid was transformed successfully into the live attenuated *S. typhimurium* strain SL7207. Most of the *H pylori*-*napA* sequences in recombinant plasmid pIRES-*napA* were homologized with that of SS1 strain reported by GenBank, and the homology of nucleotide and protein was 98%, respectively.

CONCLUSION: A recombinant live attenuated *S. typhimurium*

strain carrying HP-NAP gene as DNA vaccine is successfully constructed. The results lay the foundation for developing multivalent oral DNA vaccine against *H pylori* infection.

Sun B, He M, Yang H, Jin J, Man XH, Gong YF, Tu ZX, Du YQ, Li ZS. Construction of an oral recombinant DNA vaccine strain of live attenuated *Salmonella typhimurium* carrying *H pylori* neutrophil activating protein. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1317-1320

摘要

目的: 构建携带人幽门螺杆菌(*H pylori*)中性粒细胞激活蛋白(HP-NAP)基因(*napA*)的重组活减毒鼠伤寒沙门菌口服DNA疫苗。

方法: 应用基因工程技术扩增全长*napA*, 测序并同源性分析后, 将其亚克隆入真核表达载体pIRES, 鉴定正确后将重组质粒转化活减毒鼠伤寒沙门菌。

结果: 重组质粒经PCR及双酶切, 证实成功构建了携带HP-NAP基因的重组真核表达质粒pIRES-*napA*, 后者成功转化活减毒鼠伤寒沙门菌SL7207。所克隆435bp *napA*与GenBank中SS1-*napA*核苷酸和蛋白质的同源性均为98%。

结论: 成功构建并鉴定了携带HP-NAP基因的重组活减毒鼠伤寒沙门菌口服DNA疫苗, 为多价抗*H pylori*口服DNA疫苗的研制奠定了基础。

孙波, 何苗, 杨骅, 金晶, 满晓华, 龚燕芳, 屠振兴, 杜奕奇, 李兆申. 携带幽门螺杆菌中性粒细胞激活蛋白活减毒鼠伤寒沙门菌口服重组DNA疫苗株的构建. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1317-1320

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1317.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染为慢性活动性胃炎和消化性溃疡的主要病因^[1-8], 与肠型胃癌和胃黏膜相关淋巴样组织淋巴瘤的发生密切相关^[9-16]。以抗生素为基础的药物治疗为*H pylori*感染的主要治疗方案, 但随着细菌耐药、药物不良反应及药效经济学等问题的突出, 迫切需要其他方法以防治*H pylori*感染, 其一便是研制有效的黏膜疫苗。中性粒细胞激活蛋白(neutrophil activating protein, HP-NAP)为新近发现的*H pylori*主要毒力因子之一^[17]。目前对HP-NAP的免疫原性及保护性研究尚处于起步阶段, 国内尚未见报道。我们将HP-NAP基因亚克隆入真核表达载体pIRES, 并

成功将重组质粒导入活减毒鼠伤寒沙门菌 SL7207, 为进一步研究多价抗 *H pylori* 口服 DNA 疫苗奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* 标准株 CCUG 17874 (即 NCTC 11638) 由意大利 IRIS 研究中心提供, 以弯曲菌选择培养基 (Merck 公司)37 °C 微需氧培养. 大肠杆菌 DH 5 α 及活减毒鼠伤寒沙门菌 LB 5000, SL 7207 为本室保存. 胰蛋白胨及酵母提取物购自 Oxoid 公司. 克隆载体 pBT 为上海生工生物工程技术服务有限公司产品, 真核表达载体 pIRES 购自 Clontech 公司. EX Taq™ 限制性内切酶 Xho I, Mlu I 购自 TaKaRa 公司. 小量细菌基因组 DNA 及质粒抽提、纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司. DNA Ligation Kit Ver.2 及 DNA Marker 购自 TaKaRa 公司. 氨苄青霉素(Amp)、IPTG 及 X-gal 为 Amresco 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 重组真核表达质粒 pIRES-napA 的构建及鉴定 根据 GenBank 中 *H pylori*-napA 序列, 设计上游引物 P1: 5' -GTC CTC GAG ATG AAA ACA TTT GAA ATT TTA AAA CAT TTG CAA GCG-3', 含 Xho I 酶切位点; 下游引物 P2: 5' -GTC ACG CGT TTA AGC CAA ATG GGC TTG CAA CAT CC-3', 含 Mlu I 酶切位点, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 确保克隆基因开放读码框正确. CTAB 法^[18] 小量抽提 *H pylori* 基因组 DNA 为模板, 热循环仪行 PCR: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 60 s, 60 °C 复性 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 30 循环后再延伸 10 min. 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果. 将纯化 PCR 产物 TA 克隆入载体 pBT(pBT-napA), 转化受体菌 DH 5 α 感受态细胞(氯化钙法^[18]), 蓝白斑筛选并扩增 Amp 抗性克隆, 碱裂解法^[18] 小量抽提质粒, 测序鉴定. pBT-napA 经 Xho I 及 Mlu I 消化后切胶回收 napA, 将其亚克隆入 pIRES 之相同双酶切片段(pIRES-napA), 挑取阳性克隆, 抽提质粒行 PCR 及双酶切鉴定.

1.2.2 测序及生物信息学分析 重组质粒 pBT-napA 由上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定. 测序结果与 GenBank 中 *H pylori*-napA 核苷酸和蛋白质序列进行 BLAST 分析. Antheprot V5.0 软件分析其生物学特性.

1.2.3 口服DNA疫苗株的构建及鉴定 将重组质粒 pIRES-napA 转化 LB 5000 进行修饰, 挑取阳性菌落, 提取质粒进一步电击转化(25 μ F, 2.5 kV, 200 Ω , 5 ms)^[18] 终宿主菌 SL 7207, 挑取阳性菌落于含 100 mg/L Amp LB 培养液扩增 60 代, 抽提质粒行 PCR 及双酶切鉴定.

2 结果

2.1 *H pylori*-napA 基因的扩增 PCR 自 *H pylori* 基因组 DNA 中扩增出一 435 bp 条带, 与预计相符(图 1 泳道 2).

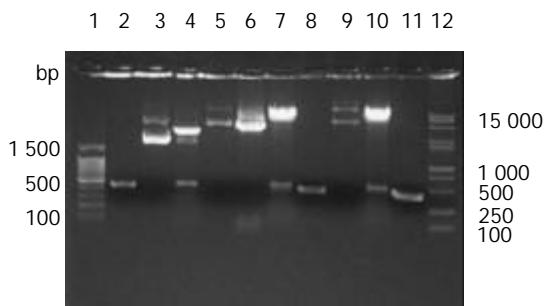


图 1 重组质粒 pBT-napA 及 pIRES-napA 鉴定图谱. 1: 100 bp DNA Ladder marker; 2: PCR amplified product of HP-NAP; 3: Recombinant plasmid pBT-napA; 4: pBT-napA/Xho I + Mlu I; 5: Plasmid pIRES; 6: Recombinant vector pIRES-napA; 7: pIRES-napA/Xho I + Mlu I; 8: PCR amplified product of pIRES-napA; 9: Plasmid SL 7207/pIRES-napA extracted from ending-host SL 7207; 10: SL 7207/pIRES-napA/Xho I + Mlu I; 11: PCR amplified product of SL 7207/pIRES-napA; 12: DNA marker DL 2000 + 15 000.

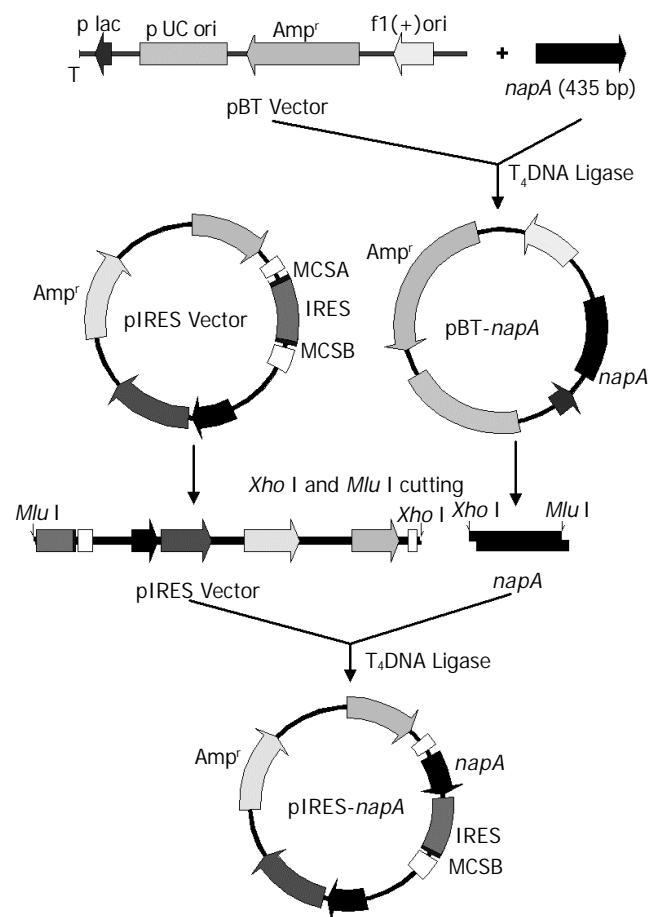


图 2 重组质粒 pBT-napA 及 pIRES-napA 构建示意图.

2.2 重组质粒的鉴定 重组质粒分别命名为 pBT-napA 及 pIRES-napA(图 2). 经双酶切和 PCR 鉴定, pBT-napA 及 pIRES-napA 均含有 435 bp 的目的片段(图 1), 表明重组质粒构建成功.

2.3 目的片段序列测定及生物信息学分析 将测序结果与 GenBank 中 *H pylori*-napA 核苷酸和蛋白质序列进行 BLAST 分析, 结果显示我们所克隆之 *H pylori*-napA 与 GenBank 中 *H pylori* SS1 株 napA 基因的同源性为 98% (427/435), 其中 C → T 置换 3 个, A → G 置换 4 个(图 3). 与其他常见 *H pylori* 菌株, 如 5D, 5A, 2B, 2A,

RHP901 α , DB2, 1811 α 等同源性均为 97% (426/435, 425/435)。克隆序列的碱基置换多数未改变氨基酸的编码, 与GenBank中SS1株的蛋白质同源性为98%(142/144), 与其他常见 *H pylori* 菌株的同源性均为 97%。Antheprot 软件显示其蛋白质抗原性较 SS1 株无明显改变(图 4)。

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| atg | aaa | aca | ttt | gaa | att | tta | aaa | cat | ttg | caa | gcg | gat | gcg | atc | gtg | tta | ttt | atg | aaa |
| M | K | T | F | E | I | L | K | H | L | Q | A | D | A | I | V | L | F | M | K |
| gtg | cat | aac | ttc | cat | tgg | aat | gtg | aaa | ggc | acc | gat | ttt | ttc | aat | gtg | cat | aaa | gcc | act |
| V | H | N | F | H | W | N | V | K | G | T | D | F | F | N | V | H | K | A | T |
| gaa | gaa | att | tat | gaa | gaa | ttt | gcg | gac | atg | ttt | gat | gat | ctc | gct | gaa | aga | atc | gct | c a a |
| E | E | I | Y | E | E | F | A | D | M | F | D | D | L | A | E | * | I | A | Q |
| tta | gga | cac | cac | ccc | tta | gtc | act | tta | tcc | gaa | gcg | ctc | aaa | ctc | act | cgt | gtt | aaa | gaa |
| L | G | H | H | P | L | V | T | L | S | E | A | L | K | L | T | R | V | K | E |
| gaa | act | aaa | acg | agc | ttc | cac | tct | aaa | gac | atc | ttt | aaa | gaa | att | cta | ggc | gat | tac | aaa |
| E | T | K | T | S | F | H | S | K | D | I | F | K | E | I | L | G | D | Y | K |
| cac | cta | gaa | aaa | gaa | ttt | aaa | gag | ctt | tct | aac | acc | gct | gaa | aaa | gaa | ggc | gat | aaa | g t t |
| H | L | E | K | E | F | K | E | L | S | N | T | A | E | K | E | G | D | K | V |
| acc | gta | act | tat | gcg | gac | gat | caa | ttg | gcc | aag | ttg | caa | aaa | tcc | att | tgg | atg | ttg | caa |
| T | V | T | Y | A | D | D | Q | L | A | K | L | Q | K | S | I | W | M | L | Q |
| gcc | cat | ttg | gct | taa | | | | | | | | | | | | | | | |
| A | H | L | A | | | | | | | | | | | | | | | | |

图 3 *H pylori*-napA 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列。

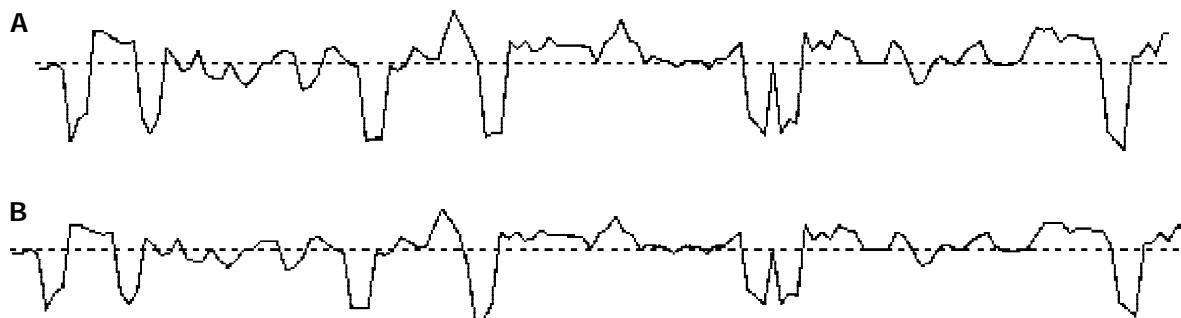


图 4 HP-NAP 抗原性分析(Welling 法). A: *H pylori* SS1 HP-NAP; B: 目的序列。

3 讨论

胃黏膜感染 *H pylori* 以中性粒细胞和单核细胞浸润为特征, 其损害程度与中性粒细胞浸润密切相关^[19]. *H pylori* 水提取物150 ku蛋白有促进中性粒细胞黏附内皮细胞及诱导中性粒细胞产生反应性氧自由基的作用, 命名为中性粒细胞激活蛋白(HP-NAP)^[20]. HP-NAP位于 *H pylori* 菌体内, 通过自溶释放后, 结合于细菌表面, 于此起到黏附素的作用, 介导与粘蛋白的结合^[21], 或者与多形核白细胞神经鞘磷脂结合^[22]. 纯化的重组 HP-NAP 不含大肠杆菌脂多糖, 对人类中性粒细胞和单核细胞具有化学趋化作用^[17], 并诱导内皮细胞移行所必需的 β_2 整合素的表达^[20], 提示 HP-NAP 具有使上述细胞积聚于 *H pylori* 感染部位的作用. HP-NAP 为反应性氧自由基的强刺激剂, 其与特异受体结合, 级联激活细胞内事件, 胞质 Ca^{2+} 浓度及蛋白质磷酸化增加, 进而通过 PTX 敏感

2.4 口服DNA疫苗稳定性及鉴定 携带重组质粒pIRES-napA之 SL 7207 扩增60代后未见明显质粒丢失. 以抽提质粒为模板, P1, P2 为引物, PCR 扩增出约 435 bp 目的基因; Xho I /Mlu I 双酶切亦可见线性化载体片段和目的基因(图 1 泳道 10, 11).

途径(包括 ERK 和 p38-MAPK), 导致中性粒细胞表面功能性 NADPH 氧化酶的富集^[23]. 细胞因子 TNF 和 IFN- γ 可增强 HP-NAP 诱导的活性氧产生, 加重胃黏膜的损伤^[24]. HP-NAP 可促进纤维蛋白沉积和由 *H pylori* 引起的胃黏膜炎症反应^[25]. HP-NAP 亦可穿过上皮单层, 序贯激活肥大细胞脱颗粒和释放前炎症细胞因子 IL-6^[26]. 此外通过促进中性粒细胞和单核细胞募集和激活而直接作用于二者.

HP-NAP 高度保守, 60% 的 *H pylori* 感染患者体内存在 HP-NAP 特异抗体. Satin et al^[17] 以纯化重组 HP-NAP 口服免疫 10 只小鼠, 结果 80% 个体获得保护性免疫, 高于 CagA(70%), 低于 *H pylori* 超声裂解物(90%). 提示 HP-NAP 为 *H pylori* 主要的毒力因子, 可作为有效的保护性抗原用于 *H pylori* 感染的疫苗防治.

DNA 疫苗因可诱导全面的免疫应答、提供同种异

株交叉保护作用、易于制备多价疫苗、兼有预防和治疗作用等特点在多种疾病的防治中显示出巨大的应用潜力。而与传统疫苗相比，活减毒鼠伤寒沙门菌这一新型口服疫苗载体释放系统亦具有无需纯化抗原，无需佐剂，可避免抗原在胃内降解和变性等优点^[27-29]。我们将HP-NAP基因亚克隆入真核表达载体pIRES，以其转化活减毒鼠伤寒沙门菌SL 7207，经PCR和双酶切鉴定，成功构建了HP-NAP活减毒鼠伤寒沙门菌口服DNA疫苗；所克隆HP-NAP全长DNA序列经BLAST分析与GenBank中相关序列具有高度同源性，生物信息学分析显示其具有良好抗原性。为多价基因工程疫苗的后继研究奠定了重要的实验基础。

4 ■ 参考文献

- 1 Blaser MJ, Atherton JC. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J Clin Invest* 2004;113:321-333
- 2 Sanders MK, Peura DA. *Helicobacter pylori*-Associated Diseases. *Curr Gastroenterol Rep* 2002;4:448-454
- 3 Zhang J, Chen XL, Wang KM, Guo XD, Zuo AL, Gong J. Relationship of gastric *Helicobacter pylori* infection to Barrett's esophagus and gastro-esophageal reflux disease in Chinese. *World J Gastroenterol* 2004;10:672-675
- 4 Mao YF, Yan J. Construction of prokaryotic expression system of ureB gene from a clinical *Helicobacter pylori* strain and identification of the recombinant protein immunity. *World J Gastroenterol* 2004;10:977-984
- 5 Bai Y, Li LR, Wang JD, Chen Y, Jin JF, Zhang ZS, Zhou DY, Zhang YL. Expression of *Helicobacter pylori* Hsp60 protein and its immunogenicity. *World J Gastroenterol* 2003;9:2711-2714
- 6 Qiao W, Hu JL, Xiao B, Wu KC, Peng DR, Atherton JC, Xue H. cagA and vacA genotype of *Helicobacter pylori* associated with gastric diseases in Xi'an area. *World J Gastroenterol* 2003;9:1762-1766
- 7 Jiang Z, Huang AL, Tao XH, Wang PL. Construction and characterization of bivalent vaccine candidate expressing HspA and M(r)18,000 OMP from *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2003;9:1756-1761
- 8 Lai YC, Wang TH, Huang SH, Yang SS, Wu CH, Chen TK, Lee CL. Density of *Helicobacter pylori* may affect the efficacy of eradication therapy and ulcer healing in patients with active duodenal ulcers. *World J Gastroenterol* 2003;9:1537-1540
- 9 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S. *H pylori* infection and the development of gastric cancer. *Keio J Med* 2002;51(Suppl 2):63-68
- 10 Lee SK, Lee YC, Chung JB, Chon CY, Moon YM, Kang JK, Park IS, Suh CO, Yang WI. Low grade gastric mucosa associated lymphoid tissue lymphoma: treatment strategies based on 10 year follow-up. *World J Gastroenterol* 2004;10:223-226
- 11 Al-Akwaa AM, Siddiqui N, Al-Mofleh IA. Primary gastric lymphoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:5-11
- 12 Wang KX, Wang XF, Peng JL, Cui YB, Wang J, Li CP. Detection of serum anti-*Helicobacter pylori* immunoglobulin G in patients with different digestive malignant tumors. *World J Gastroenterol* 2003;9:2501-2504
- 13 Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003;9:54-58
- 14 Wang RT, Wang T, Chen K, Wang JY, Zhang JP, Lin SR, Zhu YM, Zhang WM, Cao YX, Zhu CW, Yu H, Cong YJ, Zheng S, Wu BQ. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: evidence from a retrospective cohort study and nested case-control study in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:1103-1107
- 15 Guo DL, Dong M, Wang L, Sun LP, Yuan Y. Expression of gastric cancer-associated MG7 antigen in gastric cancer, precancerous lesions and *H pylori*-associated gastric diseases. *World J Gastroenterol* 2002;8:1009-1013
- 16 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- 17 Satin B, Del Giudice G, Della Bianca V, Dusi S, Laudanna C, Tonello F, Kelleher D, Rappuoli R, Montecucco C, Rossi F. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a protective antigen and a major virulence factor. *J Exp Med* 2000;191:1467-1476
- 18 Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- 19 Bayerdorffer E, Lehn N, Hatz R, Mannes GA, Oertel H, Sauerbruch T, Stolte M. Difference in expression of *Helicobacter pylori* gastritis in antrum and body. *Gastroenterology* 1992;102:1575-1582
- 20 Evans DJ Jr, Evans DG, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham DY, Granger DN, Kvietys PR. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. *Infect Immun* 1995;63:2213-2220
- 21 Namavar F, Sparrius M, Veerman EC, Appelmelk BJ, Vandebroucke-Grauls CM. Neutrophil-activating protein mediates adhesion of *Helicobacter pylori* to sulfated carbohydrates on high-molecular-weight salivary mucin. *Infect Immun* 1998;66:444-447
- 22 Teneberg S, Miller-Podraza H, Lampert HC, Evans DJ Jr, Evans DG, Danielsson D, Karlsson KA. Carbohydrate binding specificity of the neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem* 1997;272:19067-19071
- 23 Nishioka H, Baesso I, Semenzato G, Trentin L, Rappuoli R, Del Giudice G, Montecucco C. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* (HP-NAP) activates the MAPK pathway in human neutrophils. *Eur J Immunol* 2003;33:840-849
- 24 Dundon WG, Nishioka H, Polenghi A, Papinutto E, Zanotti G, Montemurro P, Del GG, Rappuoli R, Montecucco C. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. *Int J Med Microbiol* 2002;291:545-550
- 25 Montemurro P, Barbuti G, Dundon WG, Del Giudice G, Rappuoli R, Colucci M, De Rinaldis P, Montecucco C, Semeraro N, Papini E. *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein stimulates tissue factor and plasminogen activator inhibitor-2 production by human blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 2001;183:1055-1062
- 26 Montemurro P, Nishioka H, Dundon WG, de Bernard M, Del Giudice G, Rappuoli R, Montecucco C. The neutrophil-activating protein (HP-NAP) of *Helicobacter pylori* is a potent stimulant of mast cells. *Eur J Immunol* 2002;32:671-676
- 27 Gentschov I, Dietrich G, Spreng S, Kolb-Maurer A, Brinkmann V, Grode L, Hess J, Kaufmann SH, Goebel W. Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunit vaccines. *Vaccine* 2001;19:2621-2628
- 28 Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, Montecucco C, Rappuoli R. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. *Annu Rev Immunol* 2001;19:523-563
- 29 Dietrich G, Kolb-Maurer A, Spreng S, Schartl M, Goebel W, Gentschov I. Gram-positive and Gram-negative bacteria as carrier systems for DNA vaccines. *Vaccine* 2001;19:2506-2512

• 幽门螺杆菌 *H pylori* •

幽门螺杆菌感染者的生存竞争优势

张卫民, 赖卓胜, 周殿元

张卫民, 赖卓胜, 周殿元, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化病研究所 广东省广州市 510515

张卫民, 男, 湖北省荆州市人, 满族。1986年第四军医大学学士, 1994年第一军医大学硕士, 副主任医师。主要从事消化系统疾病的微生态及肿瘤应用基础研究。

项目负责人: 张卫民, 510515, 广东省广州市同和, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化病研究所. weigert@163.com

电话: 020-61641536 传真: 020-61647788

收稿日期: 2003-06-06 接受日期: 2003-08-25

Survival advantage in hosts with *H pylori* infection

Wei-Min Zhang, Zou-Shen Lai, Dian-Yuan Zhou

Wei-Min Zhang, Zou-Shen Lai, Dian-Yuan Zhou. Institute for Digestive Disease, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Correspondence to: Wei-Min Zhang. Chinese PLA Institute for Digestive Disease, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China.

Received: 2003-06-06 Accepted: 2003-08-25

Abstract

AIM: To study the *in vitro* killing effects of cecropin-like antibacterial peptide from *H pylori* Hp (2-20) on the gastrointestinal bacterial pathogens and to explore the survival advantage to the host of infection with *H pylori*.

METHODS: The inhibition zone assay was used to determine anti-bacterial activity and lethal concentrations of *H pylori* antibacterial peptide Hp (2-20) on the gastrointestinal bacterial pathogens. The rate of killing of *E.coli*K₁₂D₃₁ (standard strain) by Hp (2-20) was estimated by counting viable bacteria based on counting of colonies grown in Luria-Bertani plate. The cytotoxicity of the Hp (2-20) peptides on human gastric epithelial cell line was measured by trypan blue exclusion test.

RESULTS: *In vitro* studies, the Hp (2-20) destroyed the gastrointestinal bacterial pathogens such as *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* and enteropathogenic *E.coli*. The lethal concentrations (LC) were 65-197 μmol/L. The viable bacterial count dropped to zero after 12 min incubation with Hp (2-20) concentration closed to the LC value. The Hp (2-20) was inactive against the strains of *Yersinia enterocolitica* and *Staphylococcus aureus* and had much higher LC (over 1 014 μmol/L). The killing effects of Cecropin B were more pronounced than Helicobacter peptide Hp (2-20). The synthetic peptide Hp(2-20) showed no lytic or toxic activity against the human gastric epithelial cell line GES-1.

CONCLUSION: The cecropin-like antibacterial peptide from *H pylori* Hp (2-20) is active against faster-growing gastrointestinal bacterial pathogens. There is no effect on the human gastric epithelial cells. *H pylori* may actually have beneficial effects on infected carriers who are heavily ex-

posed to other gastrointestinal pathogens.

Zhang WM, Lai ZS, Zhou DY. Survival advantage in hosts with *H pylori* infection. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1321-1324

摘要

目的: 幽门螺杆菌(*H pylori*)可产生*H pylori*源杀菌肽样抗菌肽, 这种多肽与昆虫杀菌肽cecropins的结构和功能类似. 我们研究*H pylori*源杀菌肽样抗菌肽Hp (2-20)对消化道常见致病菌的杀伤作用, 探讨*H pylori*感染者的生存竞争优势.

方法: 采用琼脂扩散法检测Hp (2-20)对消化道常见致病菌的抗菌活性及致死浓度, 平板菌落计数法检测Hp (2-20)的抑菌率. 采用染料排斥试验测定Hp (2-20)对胃黏膜上皮细胞生长的影响.

结果: Hp (2-20)对消化道常见致病菌福氏志贺菌、伤寒、副伤寒沙门菌和致病性大肠杆菌具有杀伤作用, 致死浓度为 65-197 μmol/L, 并可在 12 min 内完全抑制细菌生长. 但小肠结肠炎耶氏杆菌及金黄色葡萄球菌对Hp (2-20)不敏感, 致死浓度>1 014 μmol/L. Hp (2-20)的杀菌作用明显低于Cecropin B, 对胃黏膜上皮细胞无裂解.

结论: *H pylori*源杀菌肽样抗菌肽 Hp (2-20)可抑制胃肠道内快速繁殖的致病菌的生长, 对胃黏膜上皮细胞无影响. 感染Hp 的宿主可能拥有生存竞争优势.

张卫民, 赖卓胜, 周殿元. 幽门螺杆菌感染者的生存竞争优势. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1321-1324

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1321.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)感染在世界范围普遍存在, 估计约有半数以上的人口胃内有*H pylori*定居. *H pylori*感染是慢性胃炎和消化性溃疡的重要病因, 与胃癌和胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的发生也密切相关^[1-4]. 但仍有感染的正常人存在, *H pylori*的致病机制也不清楚. 1999年, Putsep et al 发现^[1]: *H pylori*可产生杀菌肽样抗菌多肽(cecropin-like antibacterial peptide). 这种来源于*H pylori*核糖体蛋白L1 (ribosomal protein L1, rpL1)的N- 端肽, 在结构与功能的许多方面与杀菌肽(cecropins)相似. 如*H pylori*源抗菌肽具有较强的抗菌作用, 但抗菌活性明显低于cecropin A 及猪小肠抗菌肽 cecropin P1. *H pylori*源抗菌肽 Hp (2-20)对包括白色念珠菌(*Candida albicans*)在内的多种真菌具有强烈

的杀伤作用。*H pylori* 源抗菌肽的作用机制与杀菌肽相似，可能是通过破坏细胞的膜性结构发挥作用。*H pylori* 源杀菌肽样抗菌肽与杀菌肽类似，不裂解真核细胞。此外，*H pylori* 自身可耐受 *H pylori* 源抗菌肽及天然抗菌肽 cecropins 而不被杀灭。我们研究 *H pylori* 源杀菌肽样抗菌肽 Hp (2-20) 对消化道常见致病菌的杀伤作用，探讨 *H pylori* 产生抗菌肽的临床及流行病学意义及 *H pylori* 感染者的生存竞争优势。

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* 源杀菌肽样抗菌肽 Hp (2-20) 为来源于 *H pylori* RpL1N- 端第 2-20 位多肽，由美联(西安)生物科技有限公司合成并提供质谱图，纯度为 95%。RpL1 及 Hp (2-20) 的一级结构参考(FEBS Lett 1999; 451:249-52) 及 GenBank, Swiss-Prot。胃黏膜上皮细胞株 GES-1 由北京市肿瘤防治研究所细胞遗传室提供。实验所用致病菌标准株来自第一军医大学热卫系。抗菌肽活性测定标准菌 *E.coli* K12D31 由华南农业大学蚕桑系黄自然教授惠赠。杀菌肽 B(cecropin B)、胰化蛋白胨、酵母提取物购自 Sigma 公司。其他试剂为国产分析纯试剂。胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司(批号: 20011212)。Petri 平皿为康宁(Coning)公司产品。

1.2 方法 实验菌株均培养于 LB(Luria-Bertani)液体或琼脂培养基。细菌计数采用平板菌落计数法。小肠结肠炎耶氏杆菌于 28 °C，其余菌株于 37 °C 振摇 3-5 h 至对数生长期，使活菌数达 10¹¹/L。抗菌肽活性及致死浓度测定采用琼脂扩散法(EMBO J 1983; 2:571-576. Eur J Biochem 1982; 127:207-217)。抗菌肽活性测定标准菌 *E.coli* K12D31 培养于 LB(Luria-Bertani)液体培养基，于 37 °C 振摇 3-5 h 至对数生长期，使活菌数达 10¹¹/L 备用。在直径 8.65 cm (内径) Petri 平皿中，将标准菌株 *E.coli* K12D31 均匀混入 10 mL 45-50 °C LB 琼脂培养基，使活菌数最终达 10⁹/L，凝固后打出 2.7 mm 直径孔穴。将待测抗菌肽倍比稀释成不同剂量后(n)，按 6 μL/ 孔加入孔穴，培养 12 h 后测定抑菌圈直径。阳性对照采用杀菌肽 B(cecropin B)。根据文献(EMBO J 1983;2:571-576) 抑菌圈直径的平方(d²，单位为 cm)与孔穴中的样品量的对数(log n，n 的单位为 nmol)呈线性关系。采用 SPSS 10.0 统计软件，根据 d² 与 log n 的线性关系，取得线性回归方程及斜率(K)和截率(L)。根据文献(Eur J Biochem 1982;127:207-17) 将 α(琼脂培养基的厚度，单位为 cm)、截率 L 和斜率 K 代入下列方程: C_L=2.93/(αk 10^{L/K})，C_L 为致死浓度(lethal concentration，单位为 μmol/L)。

抗菌肽活性测定标准菌 *E.coli* K12D31 于 LB 液体培养基中培养至对数生长期。调整细菌数至约 10⁸/L，加入 Hp (2-20) 使终浓度为 60 μmol/L，间隔 2 min 吸取菌液 20 μL，混入约 10 mL 45-50 °C LB 琼脂培养基。阳性对照中加入 cecropin B 终浓度为 0.35 μmol/L，阴性对照中未加入任何多肽。存活细菌数采用平板菌落计

数法计数。胃黏膜上皮细胞株 GES-1 细胞 37 °C 50 mL/L CO₂ 饱和湿度培养于 RPMI 1640 培养基(内含灭活胎牛血清及抗生素)，取对数生长期细胞备用。按每孔 0.9 mL 含细胞数 1.5 × 10⁵，将 GES-1 细胞接种于 96 孔细胞培养板，每孔加 0.1 mL 含 Hp (2-20) 及杀菌肽 cecropin B 的培养液，使终浓度分别为 200 μL 和 20 μmol/L。对照组(Control)，加 0.1 mL RPMI 1640 培养基。培养 2 及 24 h 后，4 g/L 酚酚蓝染色、计数活细胞(染料排斥试验)。

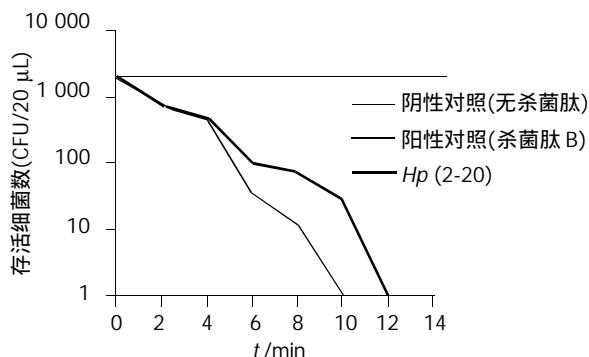
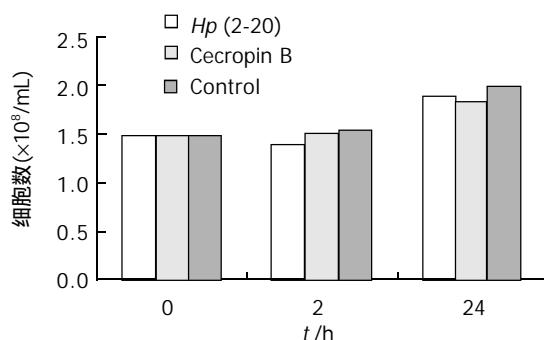
2 结果

2.1 *H pylori*-CABP 对消化道常见菌的抗菌活性 以 cecropin B 对大肠杆菌 *E.coli* K12D31 的作用为例，介绍致死浓度(LC)的计算过程。cecropin B 的 M_r 为 3 835.7。经回归分析(regression)得直线方程如下: Y = 1.447 + 0.88X。其中 Y: d²，X: Log n，斜率 k = 0.88，截率 l = 1.447，a = 0.17 cm，代入方程 C_L = 2.93/(a k 10^{L/K}) 得: cecropin B 对大肠杆菌 *E.coli* K12D31 的 LC 为 0.437 μmol/L。同理推算对其他致病菌的 LC(表 1)。*H pylori* 源杀菌肽样抗菌肽 Hp (2-20) 的杀菌作用明显低于杀菌肽 B。但 Hp (2-20) 对消化道常见致病菌如福氏志贺菌(即痢疾杆菌)、伤寒、副伤寒沙门菌和致病性大肠杆菌均有杀伤作用，LC 为 65-197 μmol/L。而小肠结肠炎耶氏杆菌及金黄色葡萄球菌对 Hp (2-20) 不敏感，LC > 1 014 μmol/L，Hp (2-20) 浓度增加仍未见杀伤作用。在大肠杆菌 *E.coli* K12D31(标准菌)培养物中，加入 Hp (2-20) 及杀菌肽 B 使终浓度接近致死浓度(分别为 60 和 0.35 μmol/L)，分别在 10 min 和 8 min 内大肠杆菌 *E.coli* K12D31 的活菌数降至 0(图 1)。

2.2 *H pylori*-CLAP 对胃黏膜上皮细胞 GES-1 的影响 Hp (2-20) 终浓度为 200 μmol/L、cecropin B 的终浓度 20 μmol/L。细胞培养 24 h，Hp (2-20) 和 cecropin B 组细胞的生长与未加任何多肽的对照组生长基本一致，无细胞生长抑制(图 2)。

表 1 *H pylori*-CABP 和 cecropin B 对消化道常见致病菌的致死浓度(μmol/L)

| 实验菌株 | Hp (2-20) | Cecropin B |
|----------------------|-----------|------------|
| <i>E.coli</i> K12D31 | 65 | 0.4 |
| 肠致病性 <i>E.coli</i> | 137 | 0.2 |
| 福氏志贺菌 | 122 | 0.2 |
| 伤寒沙门菌“O” | 128 | 0.3 |
| 伤寒沙门菌“H” | 99 | 0.8 |
| 甲型副伤寒沙门菌 | 197 | 0.4 |
| 乙型副伤寒沙门菌 | 184 | 2.1 |
| 小肠结肠炎耶氏杆菌 | >1 014 | > 9.6 |
| 金黄色葡萄球菌 | >1 014 | > 9.6 |
| 金黄色葡萄球菌 | >1 014 | > 9.6 |

图1 *H pylori* - CLAP, cecropin B对大肠杆菌 *E.coli* K12D31 的杀菌率.图2 *Hp* (2-20)对胃黏膜上皮细胞 GES - 1 生长的影响.

3 讨论

幽门螺杆菌(*H pylori*)感染在世界范围普遍存在, 估计约有半数以上的人口胃内有*H pylori*定居^[5-6]. *H pylori*感染是慢性胃炎和消化性溃疡的重要病因, 与胃癌和胃黏膜相关性淋巴组织淋巴瘤的发生也密切相关^[7]. 但*H pylori*感染的临床和流行病学意义复杂, 其结局取决于*H pylori*菌株的变异、环境共同致病因素和感染者的个体差异^[8-11]. 作为一种共生菌, *H pylori*与其人类宿主可能是互惠的, 或者至少人类可耐受*H pylori*的定殖^[12]. 研究表明, 无*H pylori*感染的个体患胃食管反流疾病、Barrett 食管和食管腺癌的危险性较大; *H pylori*感染对婴儿腹泻也有保护作用; 但对大多数个体, *H pylori*感染对发病率和死亡率无影响^[13-14]. *H pylori*产生抗菌肽(antibacterial peptides)是对*H pylori*感染者有益的证据之一. 抗菌肽是天然免疫的主要效应分子^[15-16], 是有生物活性的小分子活性多肽, 具有强碱性、热稳定性以及广谱抗微生物作用等特点. 分子质量2-7 kDa, 具有抗细菌、病毒、真菌等几乎所有种类微生物的作用, 还具有抗寄生虫、杀伤肿瘤细胞等功能, 又称为“antimicrobial peptides”、“peptide antibiotics”. 但抗菌肽已在国内被广泛采用, 并且习惯上不包括那些在代谢过程中通过酶促反应合成的多肽性质的抗生素, 如杆菌肽、多粘菌素E、短杆菌肽S等, 而特指由基因编码在核糖体上合成的具有生物活性的多肽.

基因编码的抗菌肽不仅在动物、植物中存在, 同样在细菌中也被发现. *H pylori*可产生杀菌肽样抗菌多肽(cecropin-like antibacterial peptide). 这种基因编码的来

源于*H pylori*核糖体蛋白L1(ribosomal protein L1, rpL1)的N-端肽, 在结构与功能的许多方面与杀菌肽(Cecropins)相似. 天然杀菌肽可杀灭大多数致病菌, 同时对正常细胞无裂解. *H pylori*抗菌肽与其相似, cecropin B对肿瘤细胞的IC₅₀(半效抑制浓度)多在8-18 μmol/L间^[9], 本研究显示*Hp*(2-20)浓度为200 μmol/L仍未见胃黏膜上皮细胞GES-1细胞裂解, 肠道内G⁺杆菌致病菌如痢疾杆菌、伤寒杆菌较G⁺菌如葡萄球菌、小肠结肠炎耶氏杆菌对*H pylori*抗菌肽敏感. 而文献报道*H pylori*抗菌肽对*H pylori*本身也无裂解^[11]. 可能的原因是, cecropins是通过与细菌细胞壁LPS(脂多糖)的二磷酰基脂质A结合发挥杀伤作用, 而*H pylori*及G⁺菌的细胞壁脂质A磷酸盐含量低, 因此可抵抗杀菌肽的作用^[11]. *H pylori*抗菌肽对痢疾杆菌、伤寒杆菌等胃肠道常见致病菌较葡萄球菌这类非常见的胃肠道致病菌敏感, 对*H pylori*同时对*H pylori*宿主本身均有意义. 大多数细菌约20 min即可繁殖一代, 而*H pylori*源抗菌肽可在细菌的倍增时间内杀灭该菌. 表明*H pylori*释放的杀菌肽样抗菌肽可抑制胃肠道内快速繁殖的有害微生物. 已有研究证实, *H pylori*在体内存在“自我裂解(autolysis)”现象^[17]. *H pylori*采取“利他性裂解”, 即一些胃腔内的*H pylori*的裂解释放抗菌肽, 有利于胃腔内其他*H pylori*的生存. 同时对胃肠道内其他病原菌的严重感染发挥有益作用. 因此, 感染*H pylori*的宿主可能拥有生存竞争优势. 目前, 已有在进行*H pylori*根除治疗时发生难辨梭菌感染导致伪膜肠炎的报道. *H pylori*的抗生素根除疗法导致的一些病变可能直接或间接与胃肠道内的正常微生物区系(包括*H pylori*)被改变有关^[18]. 但*H pylori*感染可降低胃的泌酸能力, 这将削弱抵御其他病原菌感染的天然屏障而增加感染的机会. 深入研究*H pylori*与宿主及其与其他致病菌的相互关系^[19], 有助于解释这些相互矛盾的结果.

4 参考文献

- 张万岱, 徐智民. 幽门螺杆菌研究现状及共识. 世界华人消化杂志 2000;8:1084-1088
- 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 胡品津, 徐智民. 幽门螺杆菌若干问题的共识意见. 世界华人消化杂志 2000;8:219-220
- 全俊, 范学工. 幽门螺杆菌感染与胃癌发生的实验研究进展. 世界华人消化杂志 1999;7:1068-1069
- Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. World J Gastroenterol 2001;7:801-804
- 徐智民, 张万岱, 周殿元. 幽门螺杆菌的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11:635-639
- 刘海峰, 刘为纹, 房殿春, 王国安, 滕小春. 幽门螺杆菌感染与胃癌前病变演化的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:912-915
- Wang RT, Wang T, Chen K, Wang JY, Zhang JP, Lin SR, Zhu YM, Zhang WM, Cao YX, Zhu CW, Yu H, Cong YJ, Zheng S, Wu BQ. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer: evidence from a retrospective cohort study and nested case-control study in China. World J Gastroenterol 2002;8:1103-1107
- Pena A. Genetic factors determining the host response to *Helicobacter pylori*. World J Gastroenterol 2000;6:624-625
- Wang KX, Li CP, Cui YB, Tian Y, Yang QG. L-forms of *H pylori*. World J Gastroenterol 2003;9:525-528
- Serin E, Yilmaz U, Künefeci G, Özer B, Gümürdülu Y, Guçlu M, Kayaselcuk F, Boyaciödö S. Serum positive cagA in patients

- with non-ulcer dyspepsia and peptic ulcer disease from two centers in different regions of Turkey. *World J Gastroenterol* 2003;9:833-835
- 11 Guo XL, Wang LE, Du SY, Fan CL, Li L, Wang P, Yuan Y. Association of cyclooxygenase-2 expression with *Hp*-cagA infection in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:246-249
- 12 Hou P, Tu ZX, Xu GM, Gong YF, Ji XH, Li ZS. *Helicobacter pylori* vacA genotypes and cagA status and their relationship to associated diseases. *World J Gastroenterol* 2000;6:605-607
- 13 Blaser MJ, Berg DE. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. *J Clin Invest* 2001; 107:767-773
- 14 Rothenbacher D, Blaser MJ, Bode G, Brenner H. An inverse relationship between gastric colonization by *Helicobacter pylori* and diarrheal illnesses in children: results of a population-based cross-sectional study. *J Infect Dis* 2000;182:1446-1449
- 15 Boman HG. Innate immunity and the normal microflora. *Immunol Rev* 2000;173:5-16
- 16 Hancock RE. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* 2001;1:156-164
- 17 Couper RT, Huynh H, Butler RN. Gene encoded antibacterial activity in *Helicobacter pylori*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31:327-328
- 18 Vandeplassche Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000;6:20-31
- 19 王承党, 李劲松, 陈玉丽. CagA 和 VacA 不能作为幽门螺杆菌相关性疾病的预测因子. 世界华人消化杂志 2002;10:533-535

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

• 消息 •

World Journal of Gastroenterology 编辑

经《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》编委审稿后, 非常优秀的论文可直接录用, 通知作者按照编委审稿意见及本刊的书写格式进行修改, 符合本刊要求的论文经第一和第二编辑语言处理后方可进行排版。排版后校样由责任编辑审读全文, 无语法及拼写错误方可付印。WJG 为了确保其出版的每篇论文的编辑质量, 特制定了编辑要点。

1 题名

应简明扼要有特色, 突出主题, 不宜过长; 应直入主题, 避免使用“探讨、研究、分析、观察、调查、探索”等词语; 不用定冠词 The, 一般不使用缩写字(常用缩写字例外)。具体写作的要求见《科技论文英文题名的撰写》 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/26.asp>.

2 摘要

采用结构式摘要。目的部分应直入主题, 如 To investigate the, 可简要交代背景或该课题目前开展情况; 方法(包括材料)和结果(包括重要数据)部分使用过去时, 结论部分使用一般现在时。人称和语态使用应自然, 避免使用“悬垂分词”。摘要的第一句不要重复文章题名, 应增加变化, 补充一些细节。具体写作要求见《科技论文英文摘要的撰写》 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/25.asp>.

3 正文

(1) 短句子: 提倡使用短句子, 尽量避免一个句子使用多个从句。拼写正确, 时态一致、准确。方法及结果部分一般使用过去时。讨论部分, 引用文献叙述一般使用过去时, 结论性语言使用一般现在时。要注意主句和从句的时态呼应及文中上下文含意的呼应; 应尽量对照其中文稿以求如实表达其原意; 使用分词短语作状语和定语时, 一定要注意其语态的正确使用, 以求其前后呼应; 应注意用词的对照一致及词语的固定搭配等; 在编辑过程中, 一定要核对各基本数据及其百分比。此外, 还应注意标点符号的正确使用与拉丁语名词的单复数。(2) 数字: 出现在句首的数字应写为: Sixteen cases...或 A total number of 16 cases 而不能写为: 16 cases, 100 patients, 等。(3) 缩略词: 首次使用词语时, 应先写出全称然后在括号内写出其缩写词。(4) 斜体: 细菌、病毒、动植物的拉丁学名、统计学符号、基因符号、内切酶(前3个字符)、量符号、拉丁词如 *in vivo*, *in situ*, *et al* 等及参考文献中的刊名应使用斜体。(5) 图表: 不要重复使用, 已用图表示的内容不再使用表格。表和图题的说明应与正文的文题一样, 文内图表的标注使用句子表示时应使用一般现在时而不使用过去时, 如 The data are shown in Table 1. 图表置正文内, 图表内注解首字母大写, 其余小写。

4 参考文献

应按先后顺序在正文内标出。参考文献全体作者是否与首页一致, 题名与首页是否一致, 刊名与首页是否一致, 年与首页是否一致, 卷号与首页是否一致, 起页-止页与首页是否一致, PMID号是否与首页一致。

5 其他 (1) 注意字符间空格, 文稿要隔行打印。(2) 使用正式文体, 不用口语体和非规范缩写词。如 isn't, aren't, hasn't, hadn't, haven't, don't, can't, wouldn't, a lot of, a bit, too (also), thru (through), exam (examination), lab (laboratory) 等。(3) 要客观地叙述方法和结果, 用词要质朴无华, 避免使用带感情色彩或广告式宣传的词语。(4) 可用动词时应尽量避免使用动词的名词形式。(5) 正确使用冠词, 对可数词应尽量使用复数形式。(6) 应多用前置短语分开或用连字符断开名词词组, 避免使用长系列形容词或名词修饰名词。(7) 尽量应用重要的事实开头, 避免短语或从句开头。(8) 涉及他人的工作或研究成果时, 尽量列出其姓名, 两名以上的作者一定要用“*et al*”。具体写作要求见《科技论文的写作要点》 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/31.asp>.

• 幽门螺杆菌 *H pylori* •

幽门螺杆菌对人肝细胞系 HepG2 细胞蛋白质组的影响

张艳, 范学工, 陈仁, 刘健平, 李宁

张艳, 范学工, 陈仁, 李宁, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008
刘健平, 中南大学湘雅医学院分析测试中心 湖南省长沙市 410078
张艳, 女, 1969-08-18 生, 湖南省衡阳市人, 汉族。1999年南华大学医学微生物学硕士, 现为湘雅医院传染病学2001级博士, 副教授。主要从事幽门螺杆菌方面的研究。

项目负责人: 范学工, 410008, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅医院传染科.
xgfan@hotmail.com
电话: 0731-4327392 传真: 0731-4327332
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-03-04

Effect of *Helicobacter pylori* on HepG2 proteome

Yan Zhang, Xue-Gong Fan, Ren Chen, Jian-Ping Liu, Ning Li

Yan Zhang, Xue-Gong Fan, Ren Chen, Ning Li, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Jian-Ping Liu, Analytical Testing Center, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China
Correspondence to: Xue-Gong Fan, Department of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China. xgfan@hotmail.com

Received: 2004-01-15 Accepted: 2004-03-04

Abstract

AIM: To further explore the pathological effect mechanism of *H pylori* on human hepatoma cells, and to analyze the differences on the protein expression in HepG2 induced by *H pylori* preliminarily.

METHODS: *H pylori* was co-cultured with HepG2 for 6 h. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-DE) was used to screen protein patterns of control and *H pylori*-treated HepG2 for quantitative and qualitative analyses in protein expression.

RESULTS: 988 ± 94 spots were detected in control HepG2 cells and 996 ± 68 spots were detected in *H pylori*-treated HepG2 cells. A match rate 86.4% was achieved. The results also showed that 18 proteins spots displayed quantitative changes in expression after *H pylori* treatment ($P < 0.05$), of which, 10 (M_r/pI : 91 326/6.21, 90 640/6.68, 87 833/5.65, 81 139 /6.55, 63 805/6.24, 60 445/7.38, 47 592/5.28, 46 293/7.21, 43 415/7.64, 21 704/5.66) were enhanced in abundance and 8 (M_r/pI : 70 839/7.02, 56 403/6.58, 44 076/6.86, 43 744/7.21, 42 497/6.64, 37 567/7.17, 22 342/7.49, 21 112/5.63) showed lower expression.

CONCLUSION: There is a significant difference at protein level between control and *H pylori*-treated HepG2. These proteins may be involved in the pathological process of *H pylori* on HepG2. It suggests that the differential expression analysis of proteomes may be useful to further study of the relation of *H pylori* and human liver diseases.

Zhang Y, Fan XG, Chen R, Liu JP, Li N. Effect of *Helicobacter pylori* on HepG2 proteome. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1325-1328

摘要

目的: 初步观察 *H pylori* 对人肝细胞系 HepG2 蛋白质的差异表达, 为进一步探讨 *H pylori* 对肝细胞的病理作用机制奠定基础。

方法: 将 *H pylori* 与 HepG2 共同培养 6 h, 采用双向电泳技术, 对 *H pylori* 处理和未处理 HepG2 细胞蛋白质进行分离和比较分析。

结果: 图像分析探测到 *H pylori* 处理前后 HepG2 2-DE 图谱的平均蛋白质点数分别为 988 ± 94 个、 996 ± 68 个, 蛋白质点的匹配率为 86.4%。发现对照和 *H pylori* 处理 HepG2 蛋白表达有明显差异, 主要是蛋白表达量的增加和减少, 其中在 *H pylori* 处理后有 10 种蛋白(M_r/pI : 91 326/6.21, 90 640/6.68, 87 833/5.65, 81 139 /6.55, 63 805/6.24, 60 445/7.38, 47 592/5.28, 46 293/7.21, 43 415/7.64, 21 704/5.66)表达增强, 8 种蛋白(M_r/pI : 70 839/7.02, 56 403/6.58, 44 076/6.86, 43 744/7.21, 42 497/6.64, 37 567/7.17, 22 342/7.49, 21 112/5.63)表达降低。

结论: *H pylori* 处理前后 HepG2 的蛋白质组具有差异, 这些差异表达的蛋白质可能参与了 *H pylori* 对肝细胞的病理作用过程, 这种蛋白质组的差异分析有助于进一步研究 *H pylori* 与人类肝脏疾病的关系。

张艳, 范学工, 陈仁, 刘健平, 李宁. 幽门螺杆菌对人肝细胞系 HepG2 细胞蛋白质组的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1325-1328

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1325.asp>

0 引言

近年的许多研究表明, 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)除引起胃肠疾病外, 还与人类某些肝脏疾病的发生相关^[1-22]。本课题组前期的研究工作证实, 肝癌患者肝组织存在螺杆菌感染, 通过测序表明, 该螺杆菌 16S rDNA 与 *H pylori* 16S rDNA 具有 99% 的同源性^[23-25]。我们近期的研究结果亦表明, *cagA*⁺*H pylori* 与体外肝细胞共培养时可引起肝细胞系 HepG2 细胞周期素 D1 (cyclin D1)、增生细胞核抗原(PCNA)和 c-fos 原癌基因的表达增加。为了进一步探讨 *H pylori* 对肝细胞的病理作用, 我们应用高信息量、高分辨率的蛋白质组学技术, 观察 *H pylori* 处理后 HepG2 细胞蛋白质表达谱的

变化，通过对差异表达蛋白质的分析，为进一步阐明 *H pylori* 在肝脏疾病发生、发展中的可能作用提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝细胞系 HepG2 购自上海细胞生物研究所，*H pylori* 标准株 ATCC49503(cagA⁺)为本室保存^[26]。固相 pH 梯度干胶条(IPGstrip pH3-10L, 18 cm)、IPG 缓冲液(pH3-10L)、覆盖液均为 Pharmacia 公司产品；二硫苏糖醇(DTT)、巯脲、碘乙酰胺均为 Sigma 公司产品；丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、甘氨酸、Tris、CHAPS、SDS、硝酸银、硫代硫酸钠均为 Amresco 公司产品；低M_r标准蛋白质购自上海伯奥生物制品公司。所有溶液均用双蒸水配制。IPGphor 等电聚焦仪(Pharmacia 公司)；ProTEAN II 垂直电泳槽、MODEL 1000/5000 电泳仪、GelDoc2000 凝胶扫描仪(Bio-Rad 公司)；ImageMaster 2D Elite(3.01 版)分析软件(Pharmacia 公司)。

1.2 方法 HepG2 细胞采用含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C, 50 mL/L CO₂ 温箱传代培养，取对数生长期细胞进行实验。*H pylori* 菌株按我室建立的方法进行培养^[27]。3 d 后收集细菌，用 0.01 mol/L PBS 洗下菌落，4 000 r/min × 10 min 离心沉淀，沉淀重悬于含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基(不加双抗)，调 *H pylori* 终浓度为 1×10^{11} CFU/L。*H pylori* (2×10^8 CFU)加入细胞(2×10^6)中，使细菌与细胞数之比为 100 : 1。空白对照孔不加细菌，只加含 100 mL/L 胎牛血清的 DMEM，共培养 6 h 后用胰酶消化收集细胞。细胞沉淀中加入 200 μL 细胞裂解液(8 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 40 g/L CHAPS, 40 mmol/L Tris, 65 mmol/L DTT, 5 mmol/L PMSF)，静置 30 min, 15 000 r/min 4 °C 离心 30 min，上清液即为细胞总蛋白。取少量上清液用 Bradford 法测定总蛋白质浓度，其余样品冻存于 -80 °C 备用。IPG-DALT 主要按 Gorg et al^[28] 的方法和 IPGphor 等电聚焦系统指南进行。细胞总蛋白提取物(300 μg)与水化液(8 mol/L urea, 20 g/L CHAPS, 18 mmol/L DTT, 5 mL/L IPG 缓冲液 pH3-10 L, 痕量溴酚蓝)充分混合，总体积 350 μL 吸入 IPGstrip 持胶槽，加入 IPG 干胶条，覆盖一层矿物油以防样品液蒸发，水化和等电聚焦在 20 °C 自动进行，总电压时间积为 41 920 Vh。等电聚焦结束后，IPG 胶条在平衡液 A(50 mmol/L Tris-HCl pH8.8, 6 mol/L urea, 300 mL/L 甘油, 20 g/L SDS, 2 g/L DTT, 痕量溴酚蓝)中平衡 15 min，后于平衡液 B(以 30 g/L 碘乙酰胺替换 2 g/L DTT)中平衡 15 min。平衡好的胶条转移至 0.75 mm 厚的 125 g/L 的 SDS-PAGE 均匀分离胶顶端，排除气泡后用 10 g/L 琼脂糖封固，15 °C 循环水冷却，先以 20 mA/2 块胶恒流电泳，20 min 后换用 40 mA/2 块胶恒流电泳，溴酚蓝到达距胶底边 1 cm 处停止电泳。银染按蛋白质银染操作手册进行^[29]。银染显色的凝胶通过 GelDoc 2000 凝胶成像系统获取图像，用 ImageMaster 2D

Elite(3.01 版)分析软件对图像进行消减、斑点检测、匹配、量化、获取斑点位置坐标等分析。斑点位置的重复性按 Corbett et al^[30] 的方法进行计算。

统计学处理 所有数据的统计分析在 SPSS for Windows 10.0 软件和 Excel 上进行。

2 结果

2.1 双向电泳图谱及分辨率 3 次重复结果统计显示，对照可分辨蛋白质点为 988 ± 94 个(图 1A)，*H pylori* 处理组可分辨蛋白质点为 996 ± 68 个(图 1B)。这些蛋白质等电点和 M_r 分布范围较广，但主要分布在等电点为 4-8，M_r 为 31 000-97 000 道尔顿(Da)的范围。以 A 胶为参考胶，B 胶与之匹配，其匹配率为 86.4%，图 2 为 A, B 胶的匹配图。任意选取 20 个在对照和 *H pylori* 处理组凝胶图谱中相互匹配、分辨清楚的蛋白质点进行位置重复性分析，发现 IEF 方向的平均偏差为 (2.82 ± 0.13) mm，SDS-PAGE 方向的平均偏差为 (2.97 ± 0.34) mm，表明蛋白质点在位置上具有较好的重复性。以上条件能满足两组细胞间的差异蛋白质分析。

2.2 蛋白质组的表达变化 通过 ImageMaster2D Elite 软件匹配分析，发现 10 种蛋白在 *H pylori* 处理后表达水平明显升高(图 1A 中标号为 1-10 的蛋白质点)，8 种蛋白在 *H pylori* 处理后表达水平明显下降(图 1A 中标号为 A-H 的蛋白质点)，部分差异蛋白点的放大图谱如图 3；差异蛋白点的等电点、M_r 和蛋白增减量详见表 1, 2。

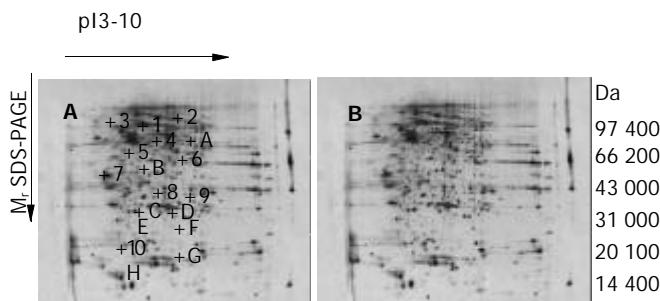


图 1 对照 HepG2. A: 与 *H pylori* 处理 HepG2; B: 蛋白双向电泳图。

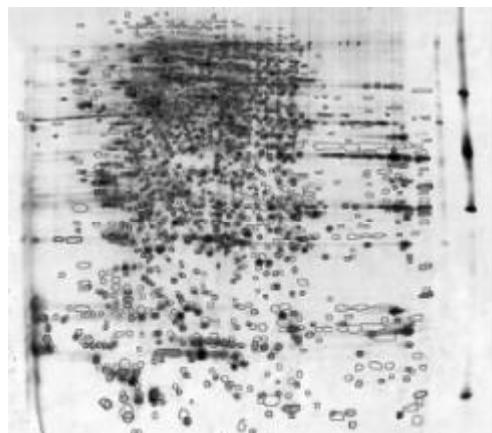


图 2 A, B 胶匹配图(红色和蓝色圆圈分别代表图 1A 和图 1B 上的蛋白质点)。

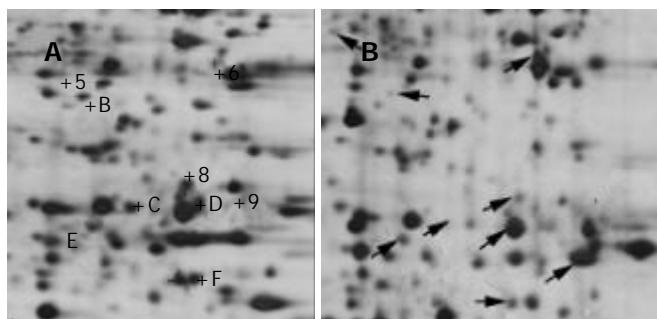


图3 部分差异蛋白质点的放大图谱. A: 对照 HepG2; B: H pylori 处理 HepG2(箭头所示为与 A 图中相对应的蛋白质点).

表1 H pylori 处理后表达增强的蛋白质点

| 点号 | 等电点(pI) | 分子量(M./Da) | 增加量(%) |
|----|---------|------------|----------|
| 1 | 6.21 | 91 326 | 158.42 |
| 2 | 6.68 | 90 640 | 437.10 |
| 3 | 5.65 | 87 833 | 211.37 |
| 4 | 6.55 | 81 139 | 30.62 |
| 5 | 6.24 | 63 805 | 161.79 |
| 6 | 7.38 | 60 445 | 720.60 |
| 7 | 5.28 | 47 592 | 135.66 |
| 8 | 7.21 | 46 293 | 136.23 |
| 9 | 7.64 | 43 415 | 1 177.77 |
| 10 | 5.66 | 21 704 | 209.68 |

表2 H pylori 处理后表达减弱的蛋白质点

| 点号 | 等电点(pI) | 分子量(M./Da) | 减少量(%) |
|----|---------|------------|--------|
| A | 7.02 | 70 839 | 86.15 |
| B | 6.58 | 56 403 | 90.31 |
| C | 6.86 | 44 076 | 77.92 |
| D | 7.21 | 43 744 | 70.37 |
| E | 6.64 | 42 497 | 70.95 |
| F | 7.17 | 37 567 | 74.19 |
| G | 7.49 | 22 342 | 70.23 |
| H | 5.63 | 21 112 | 83.56 |

3 讨论

HepG2 细胞来源于人肝胚胎瘤细胞, 具备人肝细胞绝大多数的生物学功能和生化功能特征. 与人肝细胞相比, HepG2 细胞更容易获得, 并能传代培养, 因此常用其替代肝细胞作相关研究^[31].

近年来蛋白质组学技术飞速发展, 高通量、高灵敏性和高分辨率的分离与分离后鉴定技术, 加之准确而全面的数据库, 使蛋白质组学技术在生物医学的研究中发挥着十分重要的作用^[32]. 运用蛋白质组的研究手段, 通过比较正常、病理状态下和给予药物后组织或细胞中蛋白质在表达数量、表达位置和修饰状态上的差异, 则可发现与这种病理状态相关的蛋白质、疾病的

特异蛋白质, 探索药物作用的蛋白靶点^[33-37].

当今用于蛋白质组研究的主要技术是固相 pH 梯度等电聚焦双向凝胶电泳技术^[28, 38]. 重复性问题是双向凝胶电泳中的关键问题, 从细胞培养、样品制备、双向电泳到染色显影, 其中任何一个环节都有可能造成蛋白斑点的量及其在胶中位置的变化, 从而可能造成一些蛋白斑点的不匹配, 因而在这些过程中应尽量保持其同一性. 我们通过反复实践与摸索, 已成功地建立了分辨率高、重复性好的固相 pH 梯度双向凝胶电泳方法^[39], 为本实验进行 H pylori 处理 HepG2 与对照 HepG2 细胞间的蛋白质组差异分析提供了有利的条件. 通过对银染图像严格的图像分析及处理(图像获取、背景消减、斑点识别及斑点匹配等), ImageMaster2D Elite 软件匹配分析显示, 两组细胞的蛋白质谱中大部分的蛋白质表达无明显差异, 其匹配率平均为 86.4%, 尚有 14% 左右的点不能匹配. 我们发现 HepG2 细胞在用 H pylori 处理后其蛋白表达有不少差异点出现, 其中至少有 18 种蛋白质发生了明显和稳定的量的改变($P < 0.05$). 这些差异蛋白可能参与了 H pylori 对肝细胞的病理作用过程. 这些蛋白的 M_r 和等电点已经初步确定, 但他们是已知结构蛋白还是尚未发现的新蛋白, 还需进行进一步地识别和确认, 包括质谱鉴定、氨基酸序列分析以及上网数据库查询等.

我们前期的研究表明, cagA⁺ H pylori 可以引起 HepG2 细胞细胞周期素 D1(cyclin D1)、增生细胞核抗原(PCNA)和原癌基因 c-fos 的表达异常, 此项实验中所呈现的差异蛋白是否为上述与细胞周期、细胞增生以及细胞癌变有关的蛋白, 以及 H pylori 作用于细胞后怎样导致这些蛋白质的改变尚有待进一步研究.

4 参考文献

- Solnick JV, Schauer DB. Emergence of diverse Helicobacter species in the pathogenesis of gastric and enteric diseases. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:59-97
- Nilsson HO, Taneera J, Castedal M, Glatz E, Olsson R, Wadstrom T. Identification of *Helicobacter pylori* and other *Helicobacter* species by PCR, hybridization, and partial DNA sequencing in human liver samples from patients with primary sclerosing cholangitis or primary biliary cirrhosis. *J Clin Microbiol* 2000;38:1072-1076
- Avenaud P, Marais A, Monteiro L, Le Bail B, Bioulac Sage P, Balabaud C, Megraud F. Detection of *Helicobacter* species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. *Cancer* 2000;89:1431-1439
- Ponzetto A, Pellicano R, Leone N, Cutufia MA, Turrini F, Grigioni WF, D'Errico A, Mortimer P, Rizzetto M, Silengo L. *Helicobacter* infection and cirrhosis in hepatitis C virus carriage: is it an innocent bystander or a troublemaker? *Med Hypotheses* 2000;54:275-277
- Nilsson HO, Mulchandani R, Tranberg KG, Wadstrom T. *Helicobacter* species identified in liver from patients with cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2001;120:323-324
- Fox JG, Dewhurst FE, Shen Z, Feng Y, Taylor NS, Paster BJ, Ericson RL, Lau CN, Correa P, Araya JC, Roa I. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterology* 1998;114:755-763

- 7 Wadstrom T. Helicobacter in extragastric intestinal and liver disease. *Acta Gastroenterol Belg* 2000;63:393-394
- 8 Fallon CA, Tran S, Semret M, Discepola F, Behr M, Barkun AN. Helicobacter DNA in bile: correlation with hepato-biliary diseases. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:453-458
- 9 de Magalhaes Queiroz DM, Santos A. Isolation of a Helicobacter strain from the human liver. *Gastroenterology* 2001;121:1023-1024
- 10 Wang X, Willen R, Svensson M, Ljungh A, Wadstrom T. Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *APMIS* 2003;111:514-522
- 11 Nilsson HO, Castedal M, Olsson R, Wadstrom T. Detection of Helicobacter in the liver of patients with chronic cholestatic liver diseases. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:875-882
- 12 Ponzetto A, Pellicano R, Leone N, Berruti M, Turrini F, Rizzetto M. *Helicobacter pylori* seroprevalence in cirrhotic patients with hepatitis B virus infection. *Neth J Med* 2000;56:206-210
- 13 Dore MP, Realdi G, Mura D, Graham DY, Sepulveda AR. Helicobacter infection in patients with HCV-related chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2002;47:1638-1643
- 14 Fan XG, Zou YY, Wu AH, Li TG, Hu GL, Zhang Z. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with hepatitis B. *Br J Biomed Sci* 1998;55:176-178
- 15 Wadstrom T, Ljungh A, Willen R. Primary biliary cirrhosis and primary sclerosing cholangitis are of infectious origin. *Gut* 2001;49:454
- 16 Lin TT, Yeh CT, Wu CS, Liaw YF. Detection and partial sequence analysis of *Helicobacter pylori* DNA in the bile samples. *Dig Dis Sci* 1995;40:2214-2219
- 17 Kawaguchi M, Saito T, Ohno H, Midorikawa S, Sanji T, Handa Y, Morita S, Yoshida H, Tsurui M, Misaka R, Hirota T, Saito M, Minami K. Bacteria closely resembling *Helicobacter pylori* detected immunohistologically and genetically in resected gallbladder mucosa. *J Gastroenterol* 1996;31:294-298
- 18 Myung SJ, Kim MH, Shim KN, Kim YS, Kim EO, Kim HJ, Park ET, Yoo KS, Lim BC, Seo DW, Lee SK, Min YI, Kim JY. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in human biliary tree and its association with hepatolithiasis. *Dig Dis Sci* 2000;45:1405-1412
- 19 Pellicano R, Mazzaferro V, Grigioni WF, Cutufia MA, Fagoonee S, Silengo L, Rizzetto M, Ponzetto A. Helicobacter species sequences in liver samples from patients with and without hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:598-601
- 20 Ito K, Nakamura M, Toda G, Negishi M, Torii A, Ohno T. Potential role of *Helicobacter pylori* in hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Med* 2004;13:221-227
- 21 Chen W, Li D, Cannan RJ, Stubbs RS. Common presence of Helicobacter DNA in the gallbladder of patients with gallstone diseases and controls. *Dig Liver Dis* 2003;35:237-243
- 22 Silva CP, Pereira-Lima JC, Oliveira AG, Guerra JB, Marques DL, Sarmanho L, Cabral MM, Queiroz DM. Association of the presence of Helicobacter in gallbladder tissue with cholelithiasis and cholecystitis. *J Clin Microbiol* 2003;41:5615-5618
- 23 Fan XG, Peng XN, Huang Y, Yakoob J, Wang ZM, Chen YP. Helicobacter species ribosomal DNA recovered from the liver tissue of Chinese patients with primary hepatocellular carcinoma. *Clin Infect Dis* 2002;35:1555-1557
- 24 彭小宁, 范学工, 黄燕, 王志明, 陈永平. 螺杆菌感染与肝癌关系的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:902-906
- 25 黄燕, 范学工, 陈永平, 李宁, 汤立军. 肝癌组织中螺杆菌16SrRNA基因的检测. 世界华人消化杂志 2002;10:877-882
- 26 陈仁, 范学工, 李宁, 黄燕, 陈朝晖. CagA(+)幽门螺杆菌体外诱导肝细胞凋亡的观察. 中国人兽共患病杂志 2003;19:69-71
- 27 Fan XG, Chua A, Li TG, Zeng QS. Survival of *Helicobacter pylori* in milk and tap water. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:1096-1098
- 28 Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 2000;21:1037-1053
- 29 陈主任, 梁宋平. 肿瘤蛋白质组学. 2002年9月第1版. 湖南: 湖南科学技术出版社, 2002:33-34
- 30 Corbett JM, Dunn MJ, Posch A, Gorg A. Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison. *Electrophoresis* 1994;15:1205-1211
- 31 Uhl M, Helma C, Knasmuller S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. *Mutat Res* 2000;468:213-225
- 32 Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000;405:837-846
- 33 Dean PM, Zanders ED. The use of chemical design tools to transform proteomics data into drug candidates. *Biotechniques* 2002;(Suppl):28-33
- 34 Helfrich JP. Raw data to knowledge warehouse in proteomic-based drug discovery: a scientific data management issue. *Biotechniques* 2002;(Suppl):48-50
- 35 Kim HJ, Song EJ, Lee KJ. Proteomic analysis of protein phosphorylations in heat shock response and thermotolerance. *J Biol Chem* 2002;277:23193-23207
- 36 Smith RD, Anderson GA, Lipton MS, Masselon C, Pasa-Tolic L, Shen Y, Udseth HR. The use of accurate mass tags for high-throughput microbial proteomics. *OMICS* 2002;6:61-90
- 37 Blackstock WP, Weir MP. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol* 1999;17:121-127
- 38 Hanash SM. Biomedical applications of two-dimensional electrophoresis using immobilized pH gradients: current status. *Electrophoresis* 2000;21:1202-1209
- 39 龙云铸, 范学工, 李宁, 黄宇琨. 应用双向电泳对HBV相关性肝细胞癌肝组织蛋白质组的初步研究. 中国医师杂志 2003;5:731-732

烧伤延迟复苏加重肠黏膜屏障功能损害的机制研究

张家平, 黄跃生, 杨宗城

张家平, 黄跃生, 杨宗城, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室 重庆市 400038
张家平, 男, 1972-12-20 生, 湖南醴陵人, 汉族。1996年重庆第三军医大学本科毕业, 2003年重庆第三军医大学博士毕业, 主治医师。主要从事烧伤后脏器功能障碍的研究, 发表论文6篇。

国家重点基础研究发展计划项目, No.G1999054202

国家杰出青年科学基金, No.30125040

全军医药卫生科研基金课题, No. 01L066

高等学校骨干教师资助计划项目基金, No.

项目负责人: 黄跃生, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤、复合伤国家重点实验室。

yshuang@public.cta.cq.cn

电话: 023-68754173 传真: 023-65427364

收稿日期: 2003-03-06 接受日期: 2003-04-03

Mechanism of delayed resuscitation in promoting loss of intestinal mucous membrane barrier function after rats scalding

Jia-Ping Zhang, Yue-Sheng Huang, Zong-Cheng Yang

Jia-Ping Zhang, Yue-Sheng Huang, Zong-Cheng Yang, Institute of Burn Research, State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by the National Key Basic Research Development Program, No. G1999054202; the National Outstanding Youth Scientific Foundation, No. 30125040; the Army Medicine and Sanitation Scientific Research Foundation, No. 01L066; the National High School Skeleton Teacher Supporting Program.

Correspondence to: Dr. Yue-sheng Yuang, Institute of Burn Research, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. yshuang@public.cta.cq.cn

Received: 2003-03-06 Accepted: 2003-04-03

Abstract

AIM: To investigate the effect of delayed resuscitation on intestinal mucous membrane barrier function and its relationship with neutrophil infiltration of local tissue after rats scalding.

METHODS: Rats with 40% full-thickness scald burn were randomly divided into two group: immediately resuscitation group (IR group) and delayed resuscitation group (DR group). The content of D-lactate, diamine oxidase (DAO) in plasma and myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in intestinal mucous tissue were determined at different time points after burn. Apoptosis of mucous epithelial cells were identified by terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) histochemical methods.

RESULTS: The contents of D-lactate in plasma in DR group were much higher than those of IR group ($P < 0.01$ or 0.05), MPO activity in intestinal mucous tissue of DR group were dramatically increased accompanying with decrease of SOD activity and increase of MDA contents. Herein, we

found a close correlation between the contents of D-lactate and activity of MPO. Meanwhile, we also found an increase of the activity of DAO in plasma and number of TUNEL positive staining epithelial cells in DR group.

CONCLUSION: Delayed resuscitation promotes the loss of intestinal mucous membrane barrier function due to the increase of both cell necrosis and cell apoptosis, which may be related to increased neutrophil infiltration in local tissue.

Zhang JP, Huang YS, Yang ZC. Mechanism of delayed resuscitation in promoting loss of intestinal mucous membrane barrier function after rats scalding. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1329-1332

摘要

目的: 研究大鼠严重烧伤后延迟复苏对肠黏膜屏障功能的影响, 探讨中性粒细胞浸润在肠黏膜屏障功能损害中的作用及可能机制。

方法: Wistar 大鼠 40%TBSA III 度烫伤, 分立即复苏组和延迟复苏组, 于伤后不同时相点检测血中 D- 乳酸、二胺氧化酶(DAO)及肠黏膜组织髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量; 肠黏膜组织石蜡切片黏膜上皮细胞凋亡原位检测。

结果: 延迟复苏组各时相点血中D- 乳酸含量明显高于立即复苏组($P < 0.05$), 肠黏膜组织局部 MPO 活性显著升高(与立即复苏组比较, $P < 0.01$)伴 SOD 活性降低和 MDA 含量升高。两组血 DAO 含量以伤后 6 h 最高, 延迟复苏组约为立即复苏组的两倍(1.40 ± 0.20 vs 0.78 ± 0.19 , $P < 0.01$), 伤后 24 h 比较, 二者仍具统计学差异。各时相点两组动物均能检测到 TUNEL 染色阳性肠黏膜上皮细胞, 以伤后 12 h 为凋亡高峰, 延迟复苏组各时相点凋亡率均显著高于立即复苏组。

结论: 烧伤延迟复苏加重肠黏膜屏障功能损害, 黏膜上皮细胞坏死和凋亡共同构成早期屏障功能损害加重的病理学基础, 而组织局部中性粒细胞浸润增强可能在其中起重要作用。

张家平, 黄跃生, 杨宗城. 烧伤延迟复苏加重肠黏膜屏障功能损害的机制研究. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1329 - 1332

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1329.asp>

0 引言

临床观察表明, 严重烧伤延迟复苏患者往往易并发全

身严重感染和多器官功能障碍(MODS). 延迟复苏是一休克-抗休克的过程, 而肠道是休克状态下受累最早、血流灌注恢复最晚的脏器. 近年研究表明, 肠缺血或再灌时肠黏膜屏障功能的损害是肠源性内毒血症、脓毒症发生的重要原因, 进入循环的内毒素成为启动SIRS, MODS的关键因素, 故也有学者认为肠道是MODS的启动器官^[1-9]. 因此, 探讨严重烧伤延迟复苏后肠黏膜屏障功能的改变及其病理学基础和发生机制对于防治、降低MODS的发生有积极的临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar大鼠80只(200-250g雌雄不拘), 随机分成立即复苏组(IR组)和延迟复苏组(DR组). 实验前12h禁食, 异戊巴比妥钠(30mg/kg)麻醉, 背部92°C烫伤18s致40%总体表面积(TBSA)Ⅲ°. 烫伤. IR组伤后立即按Parkland公式补液(4.0mL/kg⁻¹/TBSA⁻¹), DR组伤后6h开始按5.33mL/kg⁻¹/TBSA⁻¹补液. 各组均于伤后8h内补入24h计算补液量的1/2, 余下1/2伤后16h后匀速补入(颈静脉插管, 恒速输液泵补液). 大鼠于伤后6, 8, 12, 18, 24h活杀, 腹主动脉取血, 制备血浆. 同时, 取回盲部小肠黏膜制备组织匀浆, -20°C保存. 另取1cm长度小肠, 40g/L中性甲醛固定, 备作石蜡切片. D-乳酸标准品, D-乳酸脱氢酶(D-LDH)和辣根过氧化物酶均购自美国Sigma公司; MPO, SOD和MDA检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 细胞原位凋亡检测POD试剂盒购自美国罗氏公司.

1.2 方法

1.2.1 血浆D-乳酸含量测定 参照文献[10], 略加修改. 制作标准曲线: 将D-乳酸配成15mg/L、12mg/L、9mg/L、6mg/L、3mg/L系列溶液(125μL), 加375μL尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide-adenine dinucleotide, NAD)缓冲液, 混匀, 按30KU/L加入D-LDH, 25°C水浴90min, 340nm处测A值, 求回归方程. 标本检测: (1)制备去蛋白血浆(PFP): 取400μL血浆, 加入5.8mol/L过氯酸40μL, 振荡混匀20s, 冰浴10min, 4°C5000r/min离心10min. 取200μL上清(PFP), 加11.6mol/LKOH20μL, 振荡混匀20s, 冰浴10min,

4°C5000r/min离心10min, 上清为中和的PFP-NPFP. (2)取125μLNPF, 加375μLNAD缓冲液, 混匀, 按30KU/L浓度加D-LDH, 25°C水浴90min, 测A值. 将值代入标准曲线计算D-乳酸含量.

1.2.2 肠黏膜上皮细胞凋亡检测 TUNEL法, 按操作说明书进行. 石蜡切片常规脱蜡、水化, 蛋白酶K(10mg/L)孵育20min, 30mL/LH₂O₂甲醇封闭和1g/LTriton处理后, 样品加TUNEL反应液50μL, 37°C湿盒孵育60min, PBS轻洗3次, 加Converter-POD50μL, 37°C湿盒孵育30min, PBS轻洗3次, DAB显色, 苏木素复染, 封片, 显微镜下观察照相. 各时相点每张切片随机数5个高倍镜(x400)视野下凋亡的肠黏膜上皮细胞数和肠黏膜上皮细胞总数, 二者比值为凋亡百分率.

1.2.3 肠黏膜组织DAO测定参考文献[20] 肠黏膜组织MPO、SOD及MDA测定按照试剂盒说明书操作.

统计学处理 数据以mean±SD表示, SPSS10.0统计软件行单因素方差分析、χ²检验和相关分析.

2 结果

2.1 血浆D-乳酸及DAO变化 烧伤后大鼠血浆D-乳酸及DAO含量显著增高, 两组均于伤后6h达高峰. 组间比较, DR组各时相点血浆D-乳酸及DAO含量均显著高于IR组(见表1).

2.2 肠黏膜上皮细胞凋亡变化 烧伤6h起, 两组大鼠均检测到TUNEL染色阳性细胞. 阳性细胞表现为核呈棕或棕褐色染色, 核形态一般较完整, 凋亡细胞多分布于黏膜上端或顶端(图A、B). 组间比较, DR组各时相点肠黏膜上皮细胞凋亡率显著高于IR组(见表1).

2.3 肠黏膜组织MPO、SOD活力及MDA含量变化 烧伤后肠黏膜组织MPO活力升高, 伤后8h达高峰. DR组各时相点MPO活力均显著高于IR组($P<0.01$); 烧伤后肠黏膜组织SOD活力下降, IR组伤后18h达低谷, DR组伤后12h达低谷, DR组各时相点SOD活力显著低于IR组($P<0.01$ 和 $P<0.05$); 烧伤后肠黏膜组织MDA含量升高, IR组伤后8h达高峰, DR组伤后6h达高峰. 伤后6-12h, DR组MDA含量显著高于IR组($P<0.01$ 和 $P<0.05$), (见表2).

表1 大鼠延迟复苏血浆D-乳酸、DAO及肠黏膜上皮细胞凋亡变化

| 指标 | 分组 | 正常值 | 伤后时间(h) | | | | |
|------------|-----|-----------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | 6 | 8 | 12 | 18 | 24 |
| D-乳酸(mg/L) | IR组 | 3.2±0.4 | 11.1±3.0 | 8.1±1.7 | 7.7±2.2 | 7.3±1.2 | 7.9±1.5 |
| | DR组 | | 14.8±2.3 ^b | 10.7±1.4 ^b | 10.7±2.5 ^a | 10.4±2.0 ^b | 9.8±2.1 ^a |
| DAO(KU/L) | IR组 | 0.28±0.04 | 0.78±0.19 | 0.66±0.10 | 0.41±0.07 | 0.43±0.06 | 0.41±0.08 |
| | DR组 | | 1.40±0.20 ^b | 1.035±0.15 ^b | 0.69±0.13 ^b | 0.65±0.10 ^a | 0.61±0.06 ^a |
| 细胞凋亡(%) | IR组 | 1.1±0.3 | 3.7±1.6 | 4.2±1.5 | 8.2±2.5 | 6.6±1.7 | 5.2±2.0 |
| | DR组 | | 6.0±1.9 ^b | 7.4±2.7 ^b | 15.3±3.1 ^b | 10.5±2.2 ^b | 11.8±2.4 ^b |

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs IR组

表2 肠黏膜组织MPO, SOD及MDA含量变化

| 伤后(h) | MPO(U/g) | | SOD(KNU/g) | | MDA($\mu\text{mol/L}/\text{g}$) | |
|-------|-----------|----------------------|-------------|---------------------|-----------------------------------|----------------------|
| | IR组 | DR组 | IR组 | DR组 | IR组 | DR组 |
| 正常组 | 1.62±0.21 | | 503.4±118.2 | | 0.3±0.1 | |
| 伤后6 | 5.5±1.0 | 9.4±1.7 ^b | 344±63 | 268±43 ^b | 1.2±0.2 | 2.8±0.7 ^b |
| 伤后8 | 5.7±1.8 | 8.6±2.3 ^b | 281±80 | 146±43 ^b | 1.3±0.2 | 2.5±0.4 ^b |
| 伤后12 | 4.7±0.5 | 7.3±2.0 ^b | 186±51 | 92±25 ^b | 1.1±0.2 | 1.4±0.3 ^a |
| 伤后18 | 3.8±1.1 | 6.3±1.1 ^b | 165±45 | 95±20 ^b | 0.8±0.1 | 1.0±0.2 |
| 伤后24 | 2.2±0.5 | 5.9±1.7 ^b | 174±48 | 137±35 ^a | 0.6±0.1 | 0.7±0.1 |

^aP <0.05, ^bP <0.01 vs IR组.

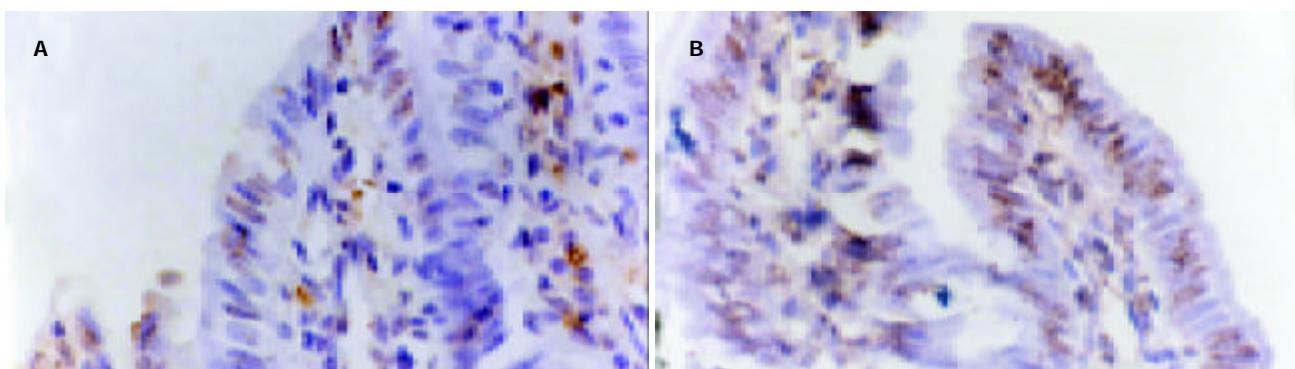


图1 肠黏膜上皮细胞凋亡变化. A: IR组小肠黏膜上皮细胞凋亡(伤后12 h)×400; B: DR组小肠黏膜上皮细胞凋亡(伤后12 h)×400.

3 讨论

肠黏膜屏障功能可通过新的血浆标志物D-乳酸定量评估^[11-14]. D-乳酸是细菌代谢、裂解的产物, 肠道菌群中多种细菌均可产生, 哺乳动物自身既不产生, 也不能或仅能缓慢代谢D-乳酸. 因此, 检测血中D-乳酸的蓄积情况可反映严重创伤、感染或某些胃肠病变时肠黏膜通透性的增高, 且较之传统方法更易于检测^[13-19]. 在本研究中, 伤后两组大鼠血中D-乳酸含量均明显增多, 6 h达高峰, 组间比较, DR组升高更为显著, 表明延迟复苏导致肠黏膜通透性进一步增高, 加剧肠黏膜屏障功能障碍, 类似结果见于孙晓庆和Li et al^[11-12]的研究. 过去有观点认为, 烧伤延迟复苏存在明显的缺血再灌注损伤, 即意味着再灌注后的损伤应比缺血时的损伤重, 对应到本研究, DR组血D-乳酸应该在复苏(伤后6 h)后进一步加重, 但我们并未发现该现象, DR组血D-乳酸含量同IR组一样也于伤后6 h达高峰, 提示延迟复苏后小肠并不存在明显的再灌注损伤, 而仍主要是缺血性损害, 可能的原因有二: (1)烧伤延迟复苏并非经典的缺血/再灌注过程. 烧伤后6 h内尽管未补液, 但肠黏膜并非经典意义上的完全缺血, 因而复苏后未发生明显的再灌注损伤; (2)由于延迟复苏后循环系统中血容量增多, 使D-乳酸浓度稀释, 掩盖了事实上的再灌注损伤.

正常的细胞结构和细胞间连接是构成肠黏膜屏障的主要物质基础, 细胞死亡势必造成屏障功能的破坏. DAO是小肠黏膜上层绒毛中具有高度活性的细胞内

酶, 其他组织或细胞中几乎不存在, 生理状态下血浆中DAO活性很低, 当肠黏膜受损时, 细胞释放的DAO大量入血, 使血中DAO含量升高, 故血中DAO含量可反映黏膜上皮细胞的坏死情况^[20]. 研究发现, 烧伤后两组大鼠血中DAO含量均明显增加, 6 h达高峰, 各时相点DR组均显著高于IR组, 表明延迟复苏加重了肠黏膜上皮细胞损伤. 进一步, 我们检测了细胞另一种死亡方式-凋亡在烧伤延迟复苏小肠黏膜上皮细胞中的变化, 结果显示烧伤后两组大鼠肠黏膜上皮细胞凋亡率显著升高, 12 h达高峰, 其中DR组凋亡率显著高于IR组. 上述结果说明, 烧伤延迟复苏导致肠黏膜上皮细胞的两种死亡(坏死和凋亡)情况均显著加重. 过往研究多只注意单一的细胞死亡方式在烧伤延迟复苏肠黏膜屏障功能中的作用^[21-23], 本研究发现肠黏膜上皮细胞坏死和凋亡共同构成了烧伤延迟复苏肠黏膜屏障功能损害的病理学基础, 且二者的变化规律不一致, 其中, 坏死高峰早于凋亡高峰, 而凋亡的发生似乎更为持久.

在脏器缺血和/或再灌注损伤过程中, 中性粒细胞浸润可能起关键作用^[24-26]. 活化的中性粒细胞(PMN)与血管内皮细胞黏附, 产生多种影响血管舒缩的物质、蛋白酶和自由基等, 导致微血管功能障碍; 白细胞本身在毛细血管中嵌顿亦可导致无复流现象, 加重缺血缺氧性损害; 另外, 活化的粒细胞通过跨膜运动迁移至组织间隙, 通过释放自由基、细胞因子, 或与实质细胞直接黏附进一步导致脏器损伤. 研究表明, 抑制粒细胞浸

润可显著减轻缺血或再灌注引起的肠损伤^[27-29]。在本研究中,DR组肠黏膜组织中MPO(中性粒细胞中特异酶)活力在各时相点均明显高于IR组,相关分析发现,组织MPO活力与血中D-乳酸含量呈显著正相关($P < 0.01$, $r = 0.873$)。此外,DR组组织局部SOD活力显著下降伴MDA含量升高,SOD与MPO二者呈显著负相关($P < 0.05$, $r = -0.541$)。大量研究表明,氧化应激不但可以引起细胞坏死,同时也是诱导细胞凋亡的重要因素^[30-33]。由此,我们认为,局部中性粒细胞浸润增多可能是烧伤延迟复苏加剧肠黏膜屏障功能损害的重要原因,而氧化应激在其中起关键作用。

4 参考文献

- 1 Pierro A, Eaton S. Intestinal ischemia reperfusion injury and multisystem organ failure. *Semin Pediatr Surg* 2004;13:11-17
- 2 Kucukaydin M, Kocaoglu C, Koksal F, Kontas O. Detection of intestinal bacterial translocation in subclinical ischemia-reperfusion using the polymerase chain reaction technique. *J Pediatr Surg* 2000;35:41-43
- 3 Alverdy JC, Laughlin RS, Wu L. Influence of the critically ill state on host-pathogen interactions within the intestine: gut-derived sepsis redefined. *Crit Care Med* 2003;31:598-607
- 4 Tadros T, Traber DL, Heggers JP, Herndon DN. Effects of interleukin-1alpha administration on intestinal ischemia and reperfusion injury, mucosal permeability, and bacterial translocation in burn and sepsis. *Ann Surg* 2003;237:101-109
- 5 Moore FA. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* 1999;178:449-453
- 6 Antequera R, Bretana A, Cirac A, Brito A, Romera MA, Zapata R. Disruption of the intestinal barrier and bacterial translocation in an experimental model of intestinal obstruction. *Acta Cient Venez* 2000;51:18-26
- 7 Belyansky LS, Sayenko VF, Furmanov JA, Churilova TJ. Bacterial translocation as a cause for septic complications in obstructive colonic ileus. *Acta Chir Belg* 2002;102:75-77
- 8 Nakayama M, Yajima M, Hatano S, Yajima T, Kuwata T. Intestinal adherent bacteria and bacterial translocation in breast-fed and formula-fed rats in relation to susceptibility to infection. *Pediatr Res* 2003;54:364-371
- 9 Samel S, Keese M, Kleczka M, Lanig S, Gretz N, Hafner M, Sturm J, Post S. Microscopy of bacterial translocation during small bowel obstruction and ischemia in vivo-a new animal model. *BMC Surg* 2002;2:6
- 10 Caglayan F, Cakmak M, Caglayan O, Cavusoglu T. Plasma D-lactate levels in diagnosis of appendicitis. *J Invest Surg* 2003;16:233-237
- 11 孙晓庆,付小兵,张蓉,吕艺,邓群,张诚,姜小国,盛志勇.创伤后肠道通透性改变血浆标志物D乳酸的实验研究.中国危重病急救医学 2000;12:476-478
- 12 Li JY, Lu Y, Hu S, Sun D, Yao YM. Preventive effect of glutamine on intestinal barrier dysfunction induced by severe trauma. *World J Gastroenterol* 2002;8:168-171
- 13 Fu XB, Yang YH, Sun TZ, Chen W, Li JY, Sheng ZY. Rapid mitogen-activated protein kinase by basic fibroblast growth factor in rat intestine after ischemia/reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 2003;9:1312-1317
- 14 Hu XH, Ge YL, Xin D, Li HB, Zhang HY, Sun YH. Effects of Ulinastatin on the intestinal mucosal barrier of the mini-pigs after severe burn injury. *Zhonghua Shaoshang Zazhi* 2003;19 (Suppl):18-21
- 15 Sun XQ, Fu XB, Zhang R, Lu Y, Deng Q, Jiang XG, Sheng ZY. Relationship between plasma D(-)-lactate and intestinal damage after severe injuries in rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:555-558
- 16 Ruan P, Gong ZJ, Zhang QR. Changes of plasma D(-)-lactate, diamine oxidase and endotoxin in patients with liver cirrhosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2004;3:58-61
- 17 Li ZL, Yang XD, Lu LR, Yu Y, Yang YX, Zhang YD. Early fracture fixation alleviates gut barrier function damage after multiple firearm injuries in pigs. *Zhonghua Waikai Zaishi* 2003;41:620-622
- 18 Li Z, Yan XG, Lu L, Yu Y, Yao Y. Gut barrier function damage following multiple firearm injuries in a porcine model. *Chin Med Sci J* 2001;16:209-213
- 19 Qin HL, Su ZD, Gao Q, Lin QT. Early intrajejunal nutrition: bacterial translocation and gut barrier function of severe acute pancreatitis in dogs. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2002;1:150-154
- 20 闫柏刚,杨宗城,黄跃生,刘志远,黎鳌.延迟快速复苏烧伤犬血浆二胺氧化酶的变化.世界华人消化杂志 2000;8:178-180
- 21 Wang H, Miao YL, Ma KX, Yan G, Ge MX, Jiang H. An experimental study on the apoptosis of rabbit small intestinal cells during early postburn stage. *Zhonghua Shaoshang Zazhi* 2003;19:141-144
- 22 Zhang C, Sheng ZY, Hu S, Gao JC, Yu S, Liu Y. The influence of apoptosis of mucosal epithelial cells on intestinal barrier integrity after scald in rats. *Burns* 2002;28:731-737
- 23 Chen G, Xie W, Jiang H. Clinical observation of the protective effect of oral feeding of glutamine granules on intestinal mucous membrane. *Zhonghua Shaoshang Zazhi* 2001;17:210-211
- 24 Gayle JM, Blikslager AT, Jones SL. Role of neutrophils in intestinal mucosal injury. *J Am Vet Med Assoc* 2000;217:498-500
- 25 Sakamoto N, Sun Z, Brengman ML, Maemura K, Ozaki M, Bulkley GB, Klein AS. Hepatic reticuloendothelial system dysfunction after ischemia-reperfusion:role of P-selectin-mediated neutrophil accumulation. *Liver Transpl* 2003;9:940-948
- 26 Kato A, Gabay C, Okaya T, Lentsch AB. Specific role of interleukin-1 in hepatic neutrophil recruitment after ischemia/reperfusion. *Am J Pathol* 2002;161:1797-1803
- 27 Cuzzocrea S, Costantino G, Mazzon E, Micali A, De Sarro A, Caputi AP. Beneficial effects of melatonin in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. *J Pineal Res* 2000;28:52-63
- 28 Sener G, Akgun U, Satiroglu H, Topaloglu U, Keyer-Uysal M. The effect of pentoxifylline on intestinal ischemia/reperfusion injury. *Fundam Clin Pharmacol* 2001;15:19-22
- 29 Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Handa O, Tomatsuri N, Imamoto E, Kokura S, Ichikawa H, Yoshida N, Yoshikawa T. Suppression of intestinal ischemia reperfusion injury by a specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, pioglitazone, in rats. *Redox Rep* 2002;7:294-299
- 30 Ferrari R, Guardigli G, Mele D, Percoco GF, Ceconi C, Curello S. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Curr Pharm Des* 2004;10:1699-1711
- 31 Shin MH, Jang JH, Surh YJ. Potential roles of NF-kappaB and ERK1/2 in cytoprotection against oxidative cell death induced by tetrahydropapaveroline. *Free Radic Biol Med* 2004;36:1185-1194
- 32 Latham P, Lund EK, Brown JC, Johnson IT. Effects of cellular redox balance on induction of apoptosis by eicosapentaenoic acid in HT29 colorectal adenocarcinoma cells and rat colon in vivo. *Gut* 2001;49:97-105
- 33 Granato A, Gores G, Vilei MT, Tolando R, Ferrarese C, Muraca M. Bilirubin inhibits bile acid induced apoptosis in rat hepatocytes. *Gut* 2003;52:1774-1778

肝移植缺血再灌注后Kupffer细胞CD14的表达机制

彭勇, 龚建平, 刘长安, 李生伟, 刘海忠, 李寿柏

彭勇, 龚建平, 刘长安, 李生伟, 刘海忠, 李寿柏, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 重庆市 400010
彭勇, 男, 1969-07-25 生, 四川省眉山县人, 汉族, 博士, 副教授, 主要从事肝移植相关研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30300337; 30200278; 30170919
项目负责人: 彭勇, 400010, 重庆市渝中区临江路 76 号, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科。pengyong725@sina.com
电话: 023-63784264 传真: 023-63829191
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-02-24

CD14 expression in Kupffer cells of ischemia-reperfusion injury after rat liver transplantation

Yong Peng, Jian-Ping Gong, Chang-An Liu, Sheng-Wei Li, Hai-Zhong Liu, Shou-Bai Li

Yong Peng, Jian-Ping Gong, Chang-An Liu, Sheng-Wei Li, Hai-Zhong Liu, Shou-Bai Li, Department of Hepatobiliary Surgery, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30300337; 30200278; 30170919
Correspondence to: Dr. Yong Peng, Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, 74 Linjiang Road, Chongqing 400010, China. pengyong725@sina.com
Received: 2004-01-15 Accepted: 2004-02-24

Abstract

AIM: To study the expression of lipopolysaccharide receptor CD14 mRNA and protein in Kupffer cells and its role in ischemia-reperfusion injury (IRI) in rat liver graft.

METHODS: The Kupffer cells were isolated and divided into control, ischemia-reperfusion (IR), and anti CD14 antibody groups. The CD14 mRNA, CD14 protein, nuclear factor kappa B (NF- κ B) activity, and TNF- α and IL-1 level in the culture supernatant were measured.

RESULTS: The CD14 mRNA, and protein in IR group were significantly higher than those in control group (mRNA 1.28 ± 0.12 vs 0.42 ± 0.02 , protein 23.7 ± 2.36 vs 6.3 ± 1.27 , $P < 0.01$). The NF- κ B activity, TNF- α and IL-1 level in IR group were significantly higher than those in control group (NF- κ B 2.79 ± 0.48 vs 0.27 ± 0.01 , TNF- α 205.9 ± 12.04 ng/L vs 57.4 ± 4.35 ng/L, IL-1 176.8 ± 8.94 ng/L vs 37.6 ± 3.47 ng/L, $P < 0.01$), and they greatly decreased after anti-CD14 antibody treatment compared with IR group (NF- κ B 1.34 ± 0.24 vs 2.79 ± 0.48 , TNF- α 129.6 ± 6.48 ng/L vs 205.9 ± 12.04 ng/L, IL-1 103.4 ± 5.74 ng/L vs 176.8 ± 8.94 ng/L, $P < 0.05$), but still significantly higher than those in control group (NF- κ B 1.34 ± 0.24 vs 0.27 ± 0.01 , TNF- α 129.6 ± 6.48 ng/L vs 57.4 ± 4.35 ng/L, IL-1 103.4 ± 5.74 ng/L vs 37.6 ± 3.47 ng/L, $P < 0.01$).

CONCLUSION: LPS following IR can up-regulate the ex-

pression of CD14 mRNA and protein in Kupffer cells, and subsequently activate NF- κ B to produce cytokines. But other signal transduction pathways might also participate in the NF- κ B activation and IRI.

Peng Y, Gong JP, Liu CA, Li SW, Liu HZ, Li SB. CD14 expression in Kupffer cells of ischemia-reperfusion injury after rat liver transplantation. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1333-1336

摘要

目的: 研究大鼠肝移植缺血再灌注后Kupffer细胞脂多糖受体CD14表达即其参与缺血再灌注损伤的机制。

方法: 分离培养大鼠Kupffer细胞, 分为正常对照组, 肝移植缺血再灌注组, 抗CD14抗体组, 检测Kupffer细胞CD14mRNA、膜蛋白表达, 核转录因子 κ B活性、以及培养上清TNF- α 、IL-1的分泌量。

结果: 再灌注后Kupffer细胞CD14mRNA和膜蛋白表达明显高于对照组(mRNA 1.28 ± 0.12 vs 0.42 ± 0.02 ; 膜蛋白 23.7 ± 2.36 vs 6.3 ± 1.27 , $P < 0.01$); 再灌注后核转录因子 κ B活性、培养上清TNF- α 、IL-1表达量明显高于对照组(NF- κ B 2.79 ± 0.48 vs 0.27 ± 0.01 ; TNF- α 205.9 ± 12.04 ng/L vs 57.4 ± 4.35 ng/L; IL-1 176.8 ± 8.94 ng/L vs 37.6 ± 3.47 ng/L, $P < 0.01$); 用抗CD14抗体后NF- κ B活性、TNF- α 、IL-1表达量与再灌注相比明显下降(NF- κ B 1.34 ± 0.24 vs 2.79 ± 0.48 ; TNF- α 129.6 ± 6.48 ng/L vs 205.9 ± 12.04 ng/L; IL-1 103.4 ± 5.74 ng/L vs 176.8 ± 8.94 ng/L; $P < 0.05$), 但仍然高于对照组(NF- κ B 1.34 ± 0.24 vs 0.27 ± 0.01 ; TNF- α 129.6 ± 6.48 ng/L vs 57.4 ± 4.35 ng/L; IL-1 103.4 ± 5.74 ng/L vs 37.6 ± 3.47 ng/L, $P < 0.01$)。

结论: 缺血再灌注时LPS能够上调Kupffer细胞CD14表达, 激活NF- κ B, 启动细胞因子的转录和分泌, 但尚存在除CD14以外的其他信号途径参与了NF- κ B的激活和缺血再灌注损伤。

彭勇, 龚建平, 刘长安, 李生伟, 刘海忠, 李寿柏. 肝移植缺血再灌注后Kupffer细胞CD14的表达机制. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1333-1336
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1333.asp>

0 引言

脂多糖(LPS)受体CD14是存在于单核-巨噬细胞表面的一种膜蛋白, 主要功能是识别LPS-LBP(脂多糖结合蛋白)复合物^[1-3]. LPS-LBP与CD14结合后, 促使单核-

巨噬细胞活化并释放多种前炎症因子，在内毒素血症、酒精性肝病、肝硬化等疾病中扮演重要角色^[4-8]。Kupffer 细胞作为肝脏内一种独特的单核-巨噬细胞是否也表达 CD14，CD14 是否参与肝移植缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)，引起 IRI 的细胞因子是否由 CD14 信号传导通路产生，这些问题到目前为止均未得到解决。我们通过分离培养肝移植缺血再灌注(IR)后的 Kupffer 细胞，观察 CD14 mRNA 和蛋白的表达，CD14 胞内信号传导途径中 NF-κB 活性以及细胞因子的产生情况，探讨其引起 IRI 的确切机制。

1 材料和方法

1.1 材料 实验分三组(每组 30 例)，对照组，取正常大鼠 Kupffer 细胞为实验对象；再灌注(IR)组，取再灌注后 1 h Kupffer 细胞为研究对象；抗 CD14 抗体组，取再灌注后 1 h Kupffer 细胞，并在培养液中加入 CD14 抗体 0.2 mL 共同培养 12 h。健康♂ Wistar 大鼠，质量 210-250 g(重庆医科大学实验动物中心提供)。参照 Peng et al^[9] 的改进 Kamada 袖套法，建立大鼠原位肝移植动物模型。供体手术：游离肝周韧带和血管，切取供肝，在水浴中完成门静脉、肝下下腔静脉袖套准备，胆管内支架插管。受体手术：切除原肝，原位植入供肝，先完成肝上下腔静脉连续缝合，门静脉袖套吻合，结束无肝期，以此时作为再灌注开始。完成肝下下腔静脉袖套吻合和胆道重建。再灌注后 1 h，参照 Gong et al 介绍的胶原酶肝脏原位灌注法分离 Kupffer 细胞^[3]。经门静脉插管，50 g/L IV 型胶原酶(Sigma)体外循环灌注消化肝脏，不连续 Percoll (Pharmacia)密度梯度离心分离 Kupffer 细胞，用含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 培养液，37 °C，50 mL/L CO2 培养 6 h 后，洗去未贴壁细胞，重悬贴壁细胞，调整细胞浓度为 1×10^6 待用。测其纯度大于 90%，活力大于 95%。

1.2 方法

1.2.1 Kupffer 细胞 CD14 mRNA 检测 采用 Trizol 试剂盒(life Technologies)提取 Kupffer 细胞总 RNA，取 0.5 mL RNA 产物，用 RT-PCR 试剂盒(Roche)将其逆转录为互补 DNA(cDNA)，-70 °C 保存待用。以 β-actin 作为内参对照进行 PCR 反应(表 1)，CD14 以及 β-actin 引物由上海生工合成。PCR 循环条件为：94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环，72 °C 延长 7 min。用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物，EB 染色，凝胶呈像系统和图像分析系统观察并半定量计算 PCR 产物的相对表达量，结果以 CD14/β-actin 的灰度比值表示。

1.2.2 Kupffer 细胞 CD14 蛋白的检测 采用 Western blot 检测 Kupffer 细胞 CD14 蛋白的表达。Kupffer 细胞蛋白提取物 50 μg 用 100 g/L SDS-PAGE 进行电泳分离，电泳后的蛋白质转移至硝酸纤维膜 4 °C 过夜，20 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h，与抗 CD14 多克隆抗体(一抗，Santa Cruz)反应 2 h，PBST 洗涤 3 次去除封闭液和一抗，与辣根过

氧化酶标记的二抗(生物晶美公司)反应 2 h，PBST 洗涤 3 次去除二抗。最后加入增强化学发光剂自显影，凝胶成像系统进行密度扫描，图像分析软件分析蛋白区带，CD14 蛋白表达量用蛋白区带积分吸光度表示。

表 1 RT-PCR 检测 CD14 引物设计

| | 引物序列 | 长度(bp) |
|---------|-------------------------------------|--------|
| CD14 | 5' CTC AAC CCT AGA GCG TTT CT 3' | 267 |
| | 5' CAG GAT TG TC AGA CAG GT CT 3' | |
| β-actin | 5' ATC ATG TTG AGA CAC CCT CAACA 3' | 300 |
| | 5' CAT CT CTT GCT CGA AGTCCA 3' | |

1.2.3 Kupffer 细胞 NF-κB 活性检测 应用凝胶迁移变动分析(EMSA)检测 Kupffer 细胞 NF-κB 活性。提取 KC 细胞核蛋白，NF-κB 寡核苷酸探针序列为 5' GCC TCC AAT GTT CGC GAA CTT TCG 3'(Santa Cruz 产品)，³²P 标记，进行凝胶阻滞分析，放射自显影，测定每条电泳带后带的吸光度值，所得结果表示 NF-κB 的相对活性。

1.2.4 细胞培养上清液 TNF-α 和 IL-1 检测 采用 ELISA 检测试剂盒(Sigma)测定上清液 TNF-α 和 IL-1(操作步骤参见说明书)。

统计学处理 实验数据以均数±标准差(mean±SD)表示，用 SPSS9.0 进行统计分析，以 P <0.05 为差别有显著性。

2 结果

2.1 Kupffer 细胞 CD14 mRNA 表达 对照组有微量 CD14 mRNA 表达，再灌注后 CD14 mRNA 表达明显升高(CD14/β-actin 1.28±0.12 vs 0.42±0.02, P <0.01)。

2.2 Kupffer 细胞 CD14 蛋白表达 再灌注后 Kupffer 细胞 CD14 蛋白明显表达，而对照组仅有微量的 CD14 蛋白表达(23.7±2.36 vs 6.3±1.27, P <0.01, 图 1)。

2.3 Kupffer 细胞 NF-κB 活性改变 再灌注后 NF-κB 活性明显高于对照组(2.79±0.48 vs 0.27±0.01, P <0.01)，应用抗 CD14 抗体后，NF-κB 活性与 IR 相比显著降低(1.34±0.24 vs 2.79±0.48, P <0.05)，但仍然高于对照组(1.34±0.24 vs 0.27±0.01, P <0.01, 图 2)。

2.4 TNF-α 和 IL-1 表达量 IR 组和抗 CD14 治疗组 TNF-α 和 IL-1 均明显高于对照组(P <0.01)，但抗 CD14 治疗组又明显低于 IR 组(P <0.05, 图 3)。

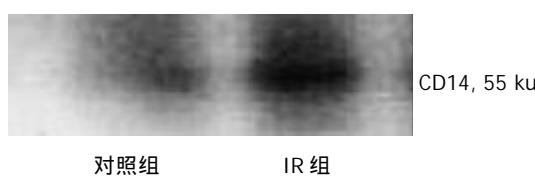


图 1 CD14 蛋白 Western blot 检测结果。

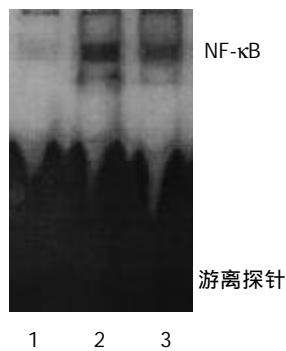


图2 NF-κB EMSA放射自显影图像. 1: 对照组; 2: IR组; 3: 抗CD14组.

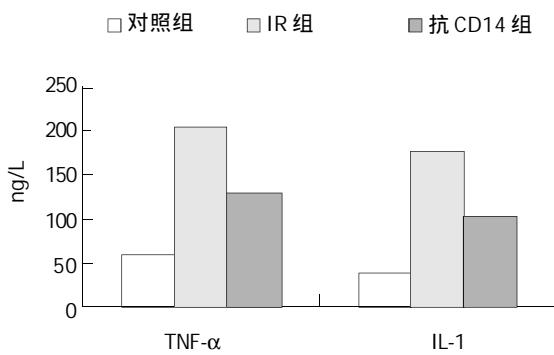


图3 Kupffer细胞培养上清中TNF-α和IL-1分泌量.

3 讨论

CD14在介导内毒素引起的单核巨噬细胞活化过程中起启动作用^[2, 10-12]，Kupffer细胞是肝移植缺血再灌注损伤的主要参与者^[13-16]，因此研究Kupffer细胞上CD14的表达以及其后的胞内信号传导途径，对于阐明肠道内毒素激活Kupffer细胞引起缺血再灌注损伤的机制意义重大^[17-20]。我们发现，正常处于静息状态下的Kupffer细胞有少量的CD14表达，这可能对于维持正常Kupffer细胞功能，使之处于应激状态是必需的^[15, 21-23]。但再灌注后，大量内毒素由门静脉入肝，立即引起CD14mRNA以及蛋白的表达大量增多，启动Kupffer细胞的激活^[24-27]。

缺血再灌注损伤的最终形式表现为大量有害细胞因子(如TNF-α、IL-1等)对移植物的攻击和损伤^[28-31]。Kupffer细胞CD14表达增加是否与细胞因子分泌增多存在因果关系？我们通过研究CD14以后的胞内信号传导途径，特别是处于CD14与细胞因子之间的NF-κB的活性变化，阐明了他们之间的联系。再灌注后NF-κB活性明显高于对照，TNF-α等细胞因子的产生也较对照明显升高。上述一系列连续的变化过程表明，LPS-CD14-NF-κB-细胞因子是存在于再灌注损伤中的一条重要信号传导途径，CD14对其下游的NF-κB活化及细胞因子的产生存在必然关系。但我们同时也发现，CD14并非激活NF-κB惟一上游信号，通过用抗CD14抗体阻断CD14功能后，发现NF-κB活性以及细胞因子的产生有所降低，但仍然高于正常，证明除CD14途径外，尚有其他信号途径可以激活NF-κB。

总之，我们的研究表明Kupffer有CD14基因以及膜蛋白的表达，缺血再灌注后，CD14表达增强，内毒素通过与CD14的结合，启动Kupffer细胞激活的信号传导，信号通过多级酶联反应由胞外传到胞内，激活NF-κB，启动TNF-α等细胞因子的转录和分泌，最终造成对移植物的攻击和损害。但尚需进一步研究CD14至NF-κB之间的准确信号传导过程，以及除CD14以外的其他激活NF-κB的信号途径，才能完整阐明参与缺血再灌注损伤的整个信号传导通路。

致谢：本研究是在重庆市肝胆外科重点实验室完成，在此感谢！

4 参考文献

- Heumann D, Lauener R, Ryffel B. The dual role of LBP and CD14 in response to Gram-negative bacteria or Gram-negative compounds. *J Endotoxin Res* 2003;9:381-384
- Latz E, Visintin A, Lien E, Fitzgerald KA, Espevik T, Golenbock DT. The LPS receptor generates inflammatory signals from the cell surface. *J Endotoxin Res* 2003;9:375-380
- Lin M, Rikihsia Y. *Ehrlichia chaffeensis* downregulates surface Toll-like receptors 2/4, CD14 and transcription factors PU.1 and inhibits lipopolysaccharide activation of NF-kappa B, ERK 1/2 and p38 MAPK in host monocytes. *Cell Microbiol* 2004;6:175-186
- Gong JP, Wu CX, Liu CA, Li SW, Shi YJ, Yang K, Li Y, Li XH. Intestinal damage mediated by Kupffer cells in rats with endotoxemia. *World J Gastroenterol* 2002;8:923-927
- Olszyna DP, Verbon A, Pribble JP, Turner T, Axtelle T, van Deventer SJ, van der Poll T. Effect of IC14, an anti-CD14 antibody, on plasma and cell-associated chemokines during human endotoxemia. *Eur Cytokine Netw* 2003;14:158-162
- Takeda Y, Arii S, Mori A, Imamura M. High expression of the CD14 gene and interleukin-1beta gene in the liver and lungs of cirrhotic rats after partial hepatectomy. *J Surg Res* 2003;115:9-17
- Nagy LE. Recent insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:882-890
- Dai LL, Gong JP, Zuo GQ, Wu CX, Shi YJ, Li XH, Peng Y, Deng W, Li SW, Liu CA. Synthesis of endotoxin receptor CD14 protein in Kupffer cells and its role in alcohol-induced liver disease. *World J Gastroenterol* 2003;9:622-626
- Peng Y, Gong JP, Yan LN, Li SB, Li XH. Improved two-cuff technique for orthotopic liver transplantation in rat. *Hepatobilary Pancreat Dis Int* 2004;3:33-37
- Vives-Pi M, Somoza N, Fernandez-Alvarez J, Vargas F, Caro P, Alba A, Gomis R, Labeta MO, Pujol-Borrell R. Evidence of expression of endotoxin receptors CD14, toll-like receptors TLR4 and TLR2 and associated molecule MD-2 and of sensitivity to endotoxin (LPS) in islet beta cells. *Clin Exp Immunol* 2003;133:208-218
- Opal SM, Palardy JE, Parejo N, Jasman RL. Effect of anti-CD14 monoclonal antibody on clearance of *Escherichia coli* bacteremia and endotoxemia. *Crit Care Med* 2003;31:929-932
- Jiang JX, Chen YH, Xie GQ, Ji SH, Liu DW, Qiu J, Zhu PF, Wang ZG. Intrapulmonary expression of scavenger receptor and CD14 and their relation to local inflammatory responses to endotoxemia in mice. *World J Surg* 2003;27:1-9
- Vajdova K, Heinrich S, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Ischemic preconditioning and intermittent clamping improve murine hepatic microcirculation and Kupffer cell function after ischemic injury. *Liver Transpl* 2004;10:520-528
- Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, Schildberg FW, Messmer K, Bilzer M. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann Surg* 2004;239:220-231

- 15 Cavalieri B, Perrelli MG, Aragno M, Ramadori P, Poli G, Cutrin JC. Ischaemic preconditioning modulates the activity of Kupffer cells during in vivo reperfusion injury of rat liver. *Cell Biochem Funct* 2003;21:299-305
- 16 Giakoustidis DE, Iliadis S, Tsantilas D, Papageorgiou G, Kontos N, Kostopoulou E, Botsoglou NA, Gerasimidis T, Dimitriadou A. Blockade of Kupffer cells by gadolinium chloride reduces lipid peroxidation and protects liver from ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1587-1592
- 17 Tsoulfas G, Takahashi Y, Ganster RW, Yagnik G, Guo Z, Fung JJ, Murase N, Geller DA. Activation of the lipopolysaccharide signaling pathway in hepatic transplantation preservation injury. *Transplantation* 2002;74:7-13
- 18 Manigold T, Bocker U, Hanck C, Gundt J, Traber P, Antoni C, Rossol S. Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in patients with liver cirrhosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:275-282
- 19 Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, Russo MP, Jobin C, Brenner DA. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2003;37:1043-1055
- 20 Su GL, Goyert SM, Fan MH, Aminlari A, Gong KQ, Klein RD, Myc A, Alarcon WH, Steinraesser L, Remick DG, Wang SC. Activation of human and mouse Kupffer cells by lipopolysaccharide is mediated by CD14. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G640-645
- 21 Wheeler MD, Thurman RG. Up-regulation of CD14 in liver caused by acute ethanol involves oxidant-dependent AP-1 pathway. *J Biol Chem* 2003;278:8435-8441
- 22 Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G256-265
- 23 Enomoto N, Takei Y, Hirose M, Ikejima K, Miwa H, Kitamura T, Sato N. Thalidomide prevents alcoholic liver injury in rats through suppression of Kupffer cell sensitization and TNF-alpha production. *Gastroenterology* 2002;123:291-300
- 24 van Oosten M, van Amersfoort ES, van Berkel TJ, Kuiper J. Scavenger receptor-like receptors for the binding of lipopolysaccharide and lipoteichoic acid to liver endothelial and Kupffer cells. *J Endotoxin Res* 2001;7:381-384
- 25 Van Amersfoort ES, Van Berkel TJ, Kuiper J. Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *Clin Microbiol Rev* 2003;16:379-414
- 26 Zipfel A, Schenk M, Metzdorf B, Bode C, Viebahn R. Release of TNF-alpha from lipopolysaccharide (LPS)-stimulated Kupffer cells in serum- and nutrient-free medium. *Inflammation* 2001;25:287-92
- 27 Enomoto N, Schemmer P, Ikejima K, Takei Y, Sato N, Brenner DA, Thurman RG. Long-term alcohol exposure changes sensitivity of rat Kupffer cells to lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:1360-1367
- 28 Kozar RA, Schultz SG, Bick RJ, Poindexter BJ, DeSoignie R, Moore FA. Enteral glutamine but not alanine maintains small bowel barrier function after ischemia/reperfusion injury in rats. *Shock* 2004;21:433-437
- 29 Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock* 2004;21:401-409
- 30 Que X, Debonera F, Xie J, Furth EE, Aldeguer X, Gelman AE, Olthoff KM. Pattern of ischemia reperfusion injury in a mouse orthotopic liver transplant model. *J Surg Res* 2004;116:262-268
- 31 Takeuchi D, Yoshidome H, Kato A, Ito H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Morita Y, Miyazaki M. Interleukin 18 causes hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing anti-inflammatory cytokine expression in mice. *Hepatology* 2004;39:699-710

World Journal of Gastroenterology 排版印刷

《World Journal of Gastroenterology, WJG》全文模板设计从书眉、栏目、题名、作者、作者单位、基金资助、通讯作者、E-mail、电话、传真、收稿日期、接受日期、摘要、文献著录格式、一级标题字体、二级标题字体、图、表、参考文献，均制订了统一的字体及格式要求，每篇文章结束后不再续接其他文章，适用于摘要数据库、ASP、XML、PDF 格式的要求。WJG 使用的排版软件为国际流行的 PageMaker 软件，可自动生成 ASP、XML、PDF，为 WJG 进入电子版格式起到了重要的作用。WJG 出片为进口片，黑白和彩色印刷用海德堡彩色印刷，采用三面刀剪切。北京科信印刷厂承担 WJG 印刷业务，一条龙服务，包括出片、打样、装订前书样，全部送杂志社审核，达到标准后才能印刷和装订。WJG 出版后，赠送给国内外专家，他们认为 WJG 封面、内文印刷和装订可与国际著名期刊相媲美。

永生大鼠肝星状细胞系的建立及鉴定

潘勤, 李定国, 汪余勤, 徐芹芳

潘勤, 李定国, 汪余勤, 徐芹芳, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科 上海市 200092

潘勤, 男, 1971-03-12 生, 上海市人, 汉族。2003年获上海第二医科大学博士学位。主要研究方向为肝纤维化的发生机制及药物防治。

上海市科委基金资助项目, No. 004119047

项目负责人: 潘勤, 200092, 上海市控江路 1665 号, 上海第二医科大学附属新华医院。fangchunhua@online.sh.cn

电话: 021-65790000-5319 传真: 021-55571294

收稿日期: 2003-12-29 接受日期: 2004-02-24

Establishment and identification of a novel immortalized rat hepatic stellate cell line HSC-PQ

Qin Pan, Ding-Guo Li, Yue-Qin Wang, Qin-Fang Xue

Qin Pan, Ding-Guo Li, Yue-Qin Wang, Qin-Fang Xue, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China

Correspondence to: Qin Pan, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, 1665 Kongjiang Road, Shanghai 200092, China. fangchunhu a@online.sh.cn

Received: 2003-12-29 Accepted: 2004-02-24

Abstract

AIM: To establish and identify a novel immortalized rat hepatic stellate cell (HSC) line.

METHODS: Primary HSCs were isolated from the liver of adult male Sprague-Dawley rats by a combination of pronase-collagenase perfusion and density gradient centrifugation. Then a new HSC line, being HSC-PQ, was established, cultured, and passaged by way of cellular clone. Furthermore, cellular dynamics, light microscopy, transmission electron microscopy, and immunocytochemistry were employed to investigate characteristics of the HSC line.

RESULTS: About 2×10^7 HSCs could be harvested from a Sprague-Dawley rat with the live rate over 95% and purity over 90%. Afterwards, HSC-PQ line was obtained on the basis of total activation of primary HSCs. The phenotype of HSC-PQ cells resembled that of fibroblasts. Firstly, the existence of α -SMA as well as desmin in these cells exhibited their HSC-derived-myofibroblast identity clearly. Secondly, both the doubling time of about 75 hours, and the stable expression of extracellular matrixes including collagen type I, collagen type III, fibronectin, laminin, etc. showed the fibroblast-like-characteristics of HSC-PQ line. But collagen IV could not be detected in cytoplasm. In addition, maintaining over one year, 32 passages of the cell line might demonstrate its immortalisation.

CONCLUSION: We have established a new immortalized rat HSC line (HSC-PQ), which shares most of the characteristics with primary activated rat HSCs.

Pan Q, Li DG, Wang YQ, Xue QF. Establishment and identification of a novel immortalized rat hepatic stellate cell line HSC-PQ. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1337-1340

摘要

目的: 建立永生性大鼠肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)系。

方法: 采用改良胶原酶原位灌注法消化肝脏, 经Nycodenz密度梯度离心分离、鉴定成年Sprague-Dawley大鼠的HSC。然后通过细胞克隆建立HSC系(HSC-PQ)并传代培养。结合细胞动力学、光镜、透射电镜及免疫细胞化学技术检测HSC-PQ 系的倍增时间、 α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)及结蛋白表达、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成等表型特征。

结果: 分离获得的HSC 约为 2×10^7 细胞 / 只大鼠, 细胞成活率>95%, 纯度>90%, 培养 2 wk 后几乎所有 HSC 均已活化。在此基础上经细胞克隆所得的HSC-PQ系表型类似成纤维细胞, 倍增时间约 75 h, 可表达结蛋白、 α -SMA 以及除IV型胶原外的多种ECM成分(I型胶原、III型胶原、纤维连接蛋白、层粘连蛋白等), 且传代过程中增生、ECM表达等特性均保持稳定。该细胞系已在体外培养32代(1 a以上), 提示其具有永生性。

结论: 已成功建立永生性大鼠HSC系, 该细胞系的基本特征与活化的原代HSC相似。

潘勤, 李定国, 汪余勤, 徐芹芳. 永生大鼠肝星状细胞系的建立及鉴定. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1337-1340

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1337.asp>

0 引言

目前, 肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)已被公认为肝纤维化形成的关键细胞, HSC 活化是肝纤维化发生的中心事件^[1-19, 21-31]。因而对 HSC 功能及活化机制的研究已成为肝纤维化研究的热点问题。然而, 原代鼠源性 HSC 的分离方法繁琐、产量较低, 人类 HSC 来源困难, 现有 HSC 系的种类有限且不易获得, 这些都给研究工作造成很大困难。为此, 我们尝试建立新的HSC 系以代替原代 HSC, 習以满足科研工作对 HSC 的大量需求。

1 材料和方法

1.1 材料 成年♂ Sprague-Dawley 大鼠 2 只(清洁级), 体

质量400-500 g(中国科学院上海实验动物中心); IV型胶原酶、链酶蛋白酶E和Nycodenz(Sigma), 脱氧核糖核酸酶(华美), DMEM培养基(Gibco), α -SMA多克隆抗体、结蛋白多克隆抗体、I型胶原多克隆抗体、III型胶原多克隆抗体、纤维连接蛋白多克隆抗体和层粘连蛋白多克隆抗体(Boster); HL-3恒流泵(上海沪西仪器厂), CO₂培养箱(Hirasawa Works), H-500型透射电子显微镜(Hitachi)。

1.2 方法 大鼠HSC分离采用改良Friedman法, 即经门静脉依次用无Ca²⁺灌流液、链霉蛋白酶E溶液、IV型胶原酶溶液灌流, 然后剪碎肝脏, 置于含链霉蛋白酶E、IV型胶原酶及脱氧核糖核酸酶的溶液中震荡30 min。细胞悬液离心后洗3次, 再加入Nycodenz离心。吸取表面的HSC, 重悬于DMEM培养液(含200 mL/L小牛血清)中。采用细胞计数板计算细胞得率: 每毫升细胞数 = t × 每大格平均细胞数 × 10⁴ × (1 ÷ 稀释倍数)。采用台盼蓝排斥试验判断细胞成活率; 在波长325-328 nm的紫外线激发下观察有荧光的细胞比率, 以计算HSC纯度。然后, 将HSC悬液接种于培养瓶2 wk, 以使其完全活化。待活化的HSC长满瓶(约80%)时置于紫外灯下照射1 h。处理后的HSC以2.5 g/L胰蛋白酶-0.2 g/L EDTA溶液消化、传代, 并采取逐步稀释的方法接种于96孔培养板(密度依次为4, 2, 1/孔)。最终选取存活并形成克隆的细胞(HSC系)继续培养、传代。同时将所得的HSC系细胞接种于24孔培养板(2 × 10⁵/孔)并培养5 d。期间每隔24 h取3孔, 计数后绘制生长曲线。按下式计算细胞倍增时间(t为培养时间, N₀及N_t分别为接种后及培养t小时后的细胞数): 细胞倍增时间 = t × lg2 ÷ (lgN_t - lgN₀)。另以-20℃丙酮固定HSC系细胞30 min, 再分别滴加 α -SMA、结蛋白、I型胶原、III型胶原、纤维连接蛋白及层粘连蛋白抗体50 μL(稀释倍数1:50-1:200), 置于37℃中孵育60 min, 随后顺序滴加正常兔血清, 生物素化二抗, 并采用DAB显色。此外取1 × 10⁷个HSC系细胞, 以20 g/L 4℃戊二醛固定2 h, 离心后再以10 g/L锇酸固定2 h, 经丙酮、乙醇逐级脱水, 环氧树脂包埋, 醋酸铀及柠檬酸铅染色, 超薄切片, 置于透射电镜下观察细胞超微结构。

统计学处理 均以量mean±SD表示, 采用单因素方差分析检验, 以SPSS软件进行处理。

2 结果

2.1 HSC的分离应用改良Friedman法, HSC得率约为2 × 10⁷细胞/只大鼠。经台盼蓝排斥实验观察, 细胞成活率>95%。新分离的HSC呈圆形, 折光性很强, 绝大多数在激发波长325-328 nm的荧光显微镜下具有蓝绿色荧光, 纯度>90%(图1A)。接种24 h后部分HSC开始贴壁、生长。48 h后细胞伸展已非常显著, 胞体变扁, 直径增加3-5倍, 呈现星形外观, 高倍镜下可见脂滴环绕在细胞核周围, 胞质内出现大量纤维束,

形成明显的细胞骨架。72 h后绝大多数HSC已贴壁, 部分分化为椭圆形、梭形或多边形, 核/浆比例变小, 细胞突起宽而扁。培养至2 wk时几乎全部HSC均分化为星形(图1B)。

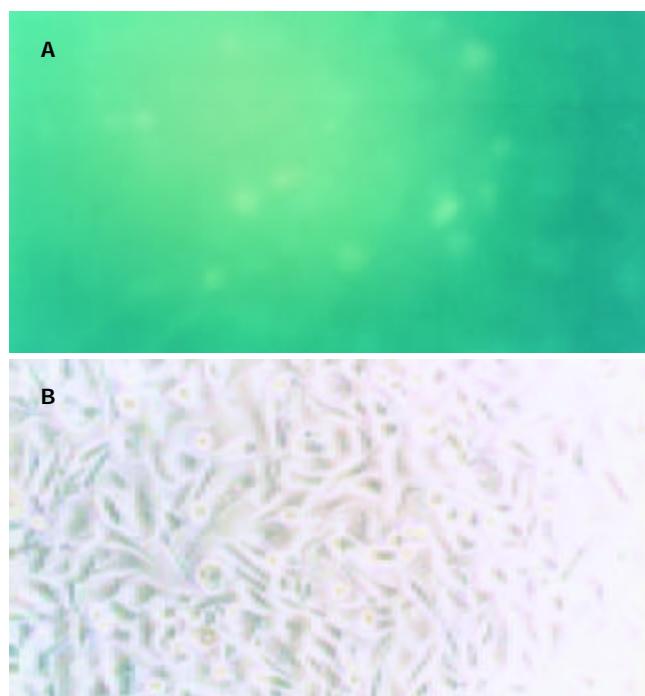


图1 大鼠HSC × 200. A: 自发荧光; B: 培养2 wk.

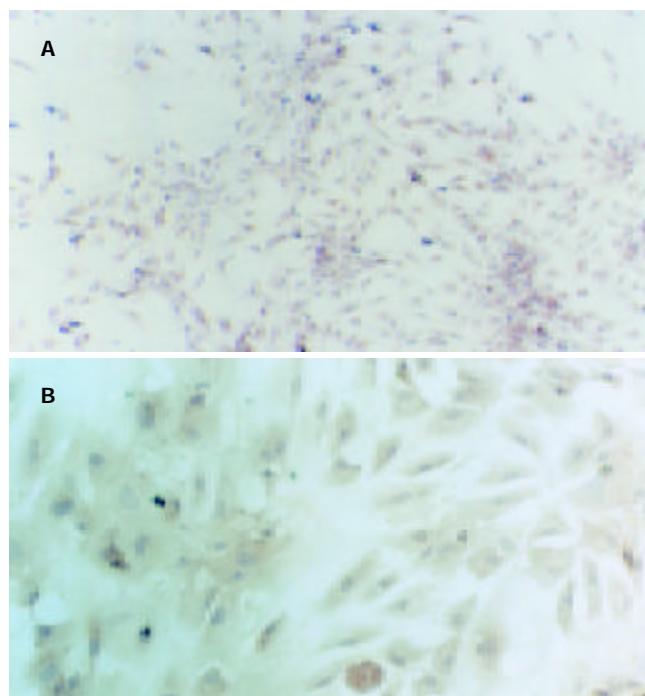


图2 HSC-PQ系细胞免疫细胞化学染色 × 200. A: α -SMA × 100; B: 结蛋白。

2.2 HSC系的鉴定 光镜下观察, HSC-PQ系类似成纤维细胞表型, 呈星形或梭形。波长325-328 nm的紫外光激发下未出现自发荧光。电镜下HSC-PQ系细胞均保持肌成纤维细胞的特征:(1)核/浆比例变小;(2)胞质突起长;

(3)胞质周围出现大量应力纤维; (4)存在一至二个核仁; (5)粗面内质网扩张, 峴的数量增加; (6)出现低密度、分散的核染色质; (7)脂滴消失。免疫细胞化学检测显示, HSC-PQ 系细胞 α -SMA、结蛋白染色均呈阳性(图 2), 且胞质内表达 I 型胶原、III 型胶原、纤维连接蛋白及层粘连蛋白。HSC-PQ 系细胞生长速度较快, 倍增时间约 75 h(图 3)。

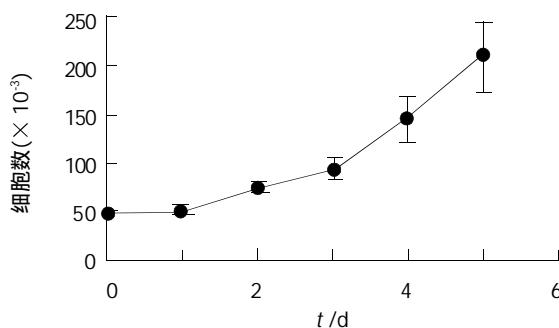


图 3 HSC-PQ 系细胞的生长曲线。

体外培养 32 代(1 a 以上)后, HSC-PQ 系细胞的结蛋白、纤维连接蛋白、层粘连蛋白、I 型及 III 型胶原染色仍为阳性。图像分析表明, 与建系初期相比, 此时 HSC-PQ 系细胞的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)表达水平无显著差异。相应的细胞倍增时间也保持在 73 h 左右。

3 讨论

激活的 HSC 是肝纤维化时产生各种 ECM 成分的主要细胞, 以及门静脉高压形成中的重要效应细胞^[1-14, 16-17, 20], 也是抗纤维化治疗的主要靶细胞^[15, 18-19]。以往实验多将活化的原代 HSC 作为研究对象。然而 HSC 仅占肝脏非实质细胞数的 5-10% 或肝细胞数的 3.6-6%, 因此不管采用何种分离技术, 最终得率仅能达到 1×10^6 - $3 \times 10^6/g$ ^[21-24]。此外, 原代培养的 HSC 不甚稳定, 细胞分离状况及培养条件对实验结果的影响较大。为克服上述缺陷, 目前逐渐倾向以 HSC 系代替原代 HSC 作为研究的靶细胞, 并已建立若干 HSC 系^[21-30]。如来源于大鼠的 HSC 系(NFSC, CFSC), 来源于小鼠的 HSC 系(A640-IS), 来源于人肝脏非实质细胞肿瘤的 HSC 系(L190), 质粒转染人肝脏肌成纤维细胞获得的 HSC 系(GREF-X)等。

不过, HSC 在肝窦周围与其他细胞形成紧密连接, 从完整的肝脏中分离 HSC 并保证其具有足够的数量, 活力及纯度难度较大。另一方面, 在建立 HSC 系尤其是永生性 HSC 系的同时, 保持原代活化 HSC 的主要表型特征在技术上较为复杂。人源性 HSC 也不易获得。因而现有的 HSC 系种类仍然比较有限且不易获得, 有必要建立新的永生性大鼠 HSC 系。为此, 我们首先在经典 HSC 分离方法^[21-22]的基础上, 采取两大步骤获得原代大鼠 HSC: (1)从肝组织中获取非实质细胞, 即采用链霉

蛋白酶和胶原酶合并消化, 链霉蛋白酶能选择性破坏肝细胞, 减少肝细胞对 HSC 的黏附, 从而提高 HSC 的产量; (2)从肝脏非实质细胞中分离出 HSC, 主要采用 Nycomeden 进行不连续密度梯度离心, 因 HSC 富含脂滴, 其平均密度在所有肝脏细胞中最低, 采用合适的密度梯度进行离心, 可使获得的 HSC 纯度达 97% 以上。通过对二步法胶原酶原位灌注, 以及 Nycomeden 密度梯度离心技术的改良和优化, 实验中 HSC 的得率约为 2×10^7 细胞/只大鼠、纯度>90%, 成活率>95%。该结果与以往文献[21-24]报道基本一致, 但操作较为简便可行。

通过连续培养, 原代大鼠 HSC 逐渐分化为星形, 核/浆比例变小, 突起伸长, 出现大量纤维束, 脂滴及维生素 A 荧光强度逐渐降低。免疫细胞化学染色也显示, 胞质中结蛋白表达增加。培养 2 wk 时 α -SMA 表达阳性, 显示此时 HSC 已由静止转为活化状态, 并转化为肌成纤维细胞^[20]。随后以常规传代、紫外线照射、逐步稀释等方法进行细胞克隆, 即获得一个 HSC 系(HSC-PQ)。该细胞系倍增时间约 75 h, 形态类似成纤维细胞, 且在传代过程中均保持肌成纤维细胞的特征: (1)胞质突起长; (2)存在应力纤维; (3)有一至二个核仁; (4)粗面内质网扩张, 峴的数量增加; (5)出现低密度分散的核染色质; (6)脂滴消失; (7)具有收缩性等^[20]。此外, 还可表达 HSC 特异性标志物结蛋白、HSC 激活标志物 α -SMA, 以及除 IV 型胶原外的多种 ECM 成分(I 和 III 型胶原、纤维连接蛋白、层粘连蛋白等)。这表明 HSC-PQ 系细胞具有原代活化 HSC 的主要特性。经体外 32 代(1 a 以上)的培养, HSC-PQ 系的增生、ECM 表达等诸多表型均保持稳定, 提示其已经具有永生性。

由此可见, HSC-PQ 系与活化的原代 HSC 相似, 可用于 HSC 基因表达调控、抗纤维化药物评价及肝纤维化发病机制等领域的研究, 并将对 HSC 的细胞学研究, 特别是针对 HSC 的抗纤维化药物研究产生有力的推动作用。

4 参考文献

- Martucci RB, Ziulkoski AL, Fortuna VA, Guaragna RM, Guma FC, Trugo LC, Borojevic R. beta-Carotene storage, conversion to retinoic acid, and induction of the lipocyte phenotype in hepatic stellate cells. *J Cell Biochem* 2004;92:414-423
- Montiel-Duarte C, Ansorena E, Lopez-Zabalza MJ, Cenarruzabeitia E, Iraburu MJ. Role of reactive oxygen species, glutathione and NF-kappaB in apoptosis induced by 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") on hepatic stellate cells. *Biochem Pharmacol* 2004;67:1025-1033
- Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Severino B, Fiorentina R, Baldoni M, Caliendo G, Santagada V, Morelli A, Cirino G. PAR1 antagonism protects against experimental liver fibrosis. Role of proteinase receptors in stellate cell activation. *Hepatology* 2004;39:365-375
- Sakata R, Ueno T, Nakamura T, Ueno H, Sata M. Mechanical stretch induces TGF-beta synthesis in hepatic stellate cells. *Eur J Clin Invest* 2004;34:129-136
- Cardoso CC, Paviani ER, Cruz LA, Guma FC, Borojevic R, Guaragna RM. Effect of pentoxifylline on arachidonic acid metabolism, neutral lipid synthesis and accumulation during induction of the lipocyte phenotype by retinol in murine he-

- 6 patic stellate cell. *Mol Cell Biochem* 2003;254:37-46
 Sung CK, She H, Xiong S, Tsukamoto H. Tumor necrosis factor-alpha inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity at a posttranslational level in hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G722-G729
- 7 Cao Q, Mak KM, Ren C, Lieber CS. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H₂O₂-dependant MAPK pathways. *J Biol Chem* 2004;279:4292-4304
- 8 Olaso E, Salado C, Egilegor E, Gutierrez V, Santisteban A, Sancho-Bru P, Friedman SL, Vidal-Vanaclocha F. Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology* 2003;37:674-685
- 9 Kitamura Y, Ninomiya H. Smad expression of hepatic stellate cells in liver cirrhosis in vivo and hepatic stellate cell line in vitro. *Pathol Int* 2003;53:18-26
- 10 Chen A. Acetaldehyde stimulates the activation of latent transforming growth factor-beta1 and induces expression of the type II receptor of the cytokine in rat cultured hepatic stellate cells. *Biochem J* 2002;368(Pt 3):683-693
- 11 Uchio K, Tuchweber B, Manabe N, Gabbiani G, Rosenbaum J, Desmouliere A. Cellular retinol-binding protein-1 expression and modulation during in vivo and in vitro myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells and portal fibroblasts. *Lab Invest* 2002;82:619-628
- 12 Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 2002;35:62-73
- 13 Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002;35:49-61
- 14 del Carmen EM, Souza V, Bucio L, Hernandez E, Damian-Matsumura P, Zaga V, Gutierrez-Ruiz MC. Cadmium induces alpha(1)collagen (I) and metallothionein II gene and alters the antioxidant system in rat hepatic stellate cells. *Toxicology* 2002;170:63-73
- 15 Kang LP, Qi LH, Zhang JP, Shi N, Zhang M, Wu TM, Chen J. Effect of genistein and quercetin on proliferation, collagen synthesis, and type I procollagen mRNA levels of rat hepatic stellate cells. *Acta Pharmacol Sin* 2001;22:793-796
- 16 Schwabe RF, Schnabl B, Kweon YO, Brenner DA. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol* 2001;166:6812-6819
- 17 Gandhi CR, Uemura T, Kuddus R. Endotoxin causes up-regulation of endothelin receptors in cultured hepatic stellate cells via nitric oxide-dependent and-independent mechanisms. *Br J Pharmacol* 2000;131:319-327
- 18 Wang LT, Zhang B, Chen JJ. Effect of anti-fibrosis compound on collagen expression of hepatic cells in experimental liver fibrosis of rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:877-880
- 19 潘勤, 李定国, 汪余勤, 徐芹芳. 生长抑素对肝星状细胞的影响机制. 世界华人消化杂志 2002;10:1250-1252
- 20 Isono M, Soda M, Inoue A, Akiyoshi H, Sato K. Reverse transformation of hepatic myofibroblast-like cells by TGFbeta1/LAP. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;311:959-965
- 21 Shibata N, Watanabe T, Okitsu T, Sakaguchi M, Takesue M, Kunieda T, Omoto K, Yamamoto S, Tanaka N, Kobayashi N. Establishment of an immortalized human hepatic stellate cell line to develop antifibrotic therapies. *Cell Transplant* 2003;12:499-507
- 22 Watanabe T, Shibata N, Westerman KA, Okitsu T, Allain JE, Sakaguchi M, Totsugawa T, Maruyama M, Matsumura T, Noguchi H, Yamamoto S, Hikida M, Ohmori A, Reth M, Weber A, Tanaka N, Leboulch P, Kobayashi N. Establishment of immortalized human hepatic stellate scavenger cells to develop bioartificial livers. *Transplantation* 2003;75:1873-1880
- 23 Sauvant P, Sapin V, Abergel A, Schmidt CK, Blanchon L, Alexandre-Gouabau MC, Rosenbaum J, Bommelaer G, Rock E, Dastugue B, Nau H, Azais-Braesco V. PAV-1, a new rat hepatic stellate cell line converts retinol into retinoic acid, a process altered by ethanol. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:1017-1029
- 24 Schnabl B, Choi YH, Olsen JC, Hagedorn CH, Brenner DA. Immortal activated human hepatic stellate cells generated by ectopic telomerase expression. *Lab Invest* 2002;82:323-333
- 25 Sakata R, Ueno T, Nakamura T, Sakamoto M, Torimura T, Sata M. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation of human hepatic stellate cell line LI90. *J Hepatol* 2004;40:52-59
- 26 Kariv R, Enden A, Zvibel I, Rosner G, Brill S, Shafritz DA, Halpern Z, Oren R. Triiodothyronine and interleukin-6 (IL-6) induce expression of HGF in an immortalized rat hepatic stellate cell line. *Liver Int* 2003;23:187-193
- 27 Kariv R, Enden A, Zvibel I, Rosner G, Brill S, Shafritz DA, Halpern Z, Oren R. Triiodothyronine and interleukin-6 (IL-6) induce expression of HGF in an immortalized rat hepatic stellate cell line. *Liver* 2003;23:187-193
- 28 Sauvant P, Abergel A, Partier A, Alexandre-Gouabau MC, Rock E, Sion B, Motta C, Sapin V, Azais-Bresco V. Treatment of the rat hepatic stellate cell line, PAV-1, by retinol and palmitic acid leads to a convenient model to study retinoids metabolism. *Biol Cell* 2002;94:401-408
- 29 Segawa M, Kayano K, Sakaguchi E, Okamoto M, Sakaida I, Okita K. Antioxidant, N-acetyl-L-cysteine inhibits the expression of the collagen alpha2 (I) promoter in the activated human hepatic stellate cell line in the absence as well as the presence of transforming growth factor-beta. *Hepatol Res* 2002;24:305
- 30 Cheng J, Imanishi H, Liu W, Iwasaki A, Ueki N, Nakamura H, Hada T. Inhibition of the expression of alpha-smooth muscle actin in human hepatic stellate cell line, LI90, by a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, NS-398. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:1128-1134
- 31 Horie S, Kitamura Y, Kawasaki H, Terada T. Inhibitory effects of antisense oligonucleotides on the expression of procollagen type III gene in mouse hepatic stellate cells transformed by simian virus 40. *Pathol Int* 2000;50:937-944

中药清胰汤治大鼠重症急性胰腺炎时急性肺损伤的比较

闻庆平, 陈海龙, 关凤林

闻庆平, 陈海龙, 关凤林, 大连医科大学附属第一医院普外科
辽宁省大连市 116011
闻庆平, 男, 1971-01-07 生, 辽宁省大连市人, 汉族, 2001 年大连医科大学
普外科博士生, 主要从事重症急性胰腺炎发病机制和治疗的研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30271667
项目负责人: 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。wqp89@sohu.com
电话: 0411-83635963-3220 传真: 0411-83600680
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-03-06

Effect of Qingyitang on acute lung injury induced by severe acute pancreatitis in rats

Qing-Ping Wen, Hai-Long Chen, Feng-Lin Guan

Qing-Ping Wen, Hai-Long Chen, Feng-Lin Guan, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No 30271667
Correspondence to: Dr. Hai-Long Chen, the First Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning Province, China. wqp89@sohu.com
Received: 2004-02-14 Accepted: 2004-03-06

Abstract

AIM: To compare the treatment of different Chinese medicines in rats with acute lung injury (ALI) induced by severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: 15 g/L sodium deoxycholate was injected inversely into the common biliopancreatic duct in rat to make the model of ALI during SAP. The rats were divided into 6 groups randomly: sham operated controls ($n = 10$), SAP model ($n = 20$), SAP+Sandostatin ($n = 10$), SAP+ Dexamethasone ($n = 10$), SAP + Kefadim ($n = 10$), and SAP + Qingyitang ($n = 10$). All the rats were killed 24 hours after operation and treatment. The levels of TNF, IL-6, MDA, SOD, and NO in serum and pulmonary homogenate were measured.

RESULTS: The levels of ET, TNF, IL-6, SOD, and MDA in serum and pulmonary homogenate in the model group were significantly higher than those of sham operated control group ($P < 0.01$). The indexes of blood gas analysis showed obvious pathological changes in the model group and so did the pathological examination of lung tissue. The indexes of ALI-SAP + Qingyitang group were better than those of the model group ($P < 0.05$). The effect of sandostatin on suppressing serum amylase was most significant. Dexamethasone was effective on the amelioration of blood gas and W/T.

CONCLUSION: ET, TNF, IL-6, and OFR play an important role in ALI caused by SAP. Qingyitang protects lung from injury in many aspects, preserving the gut barrier function, reducing or eliminating endotoxemia derived from the gut, and inhibiting the production and release of TNF, IL-6 and

the translocation of bacteria. Dexamethasone, sandostatin, kefadim have certain effect on reducing the levels of some indexes respectively, but those treatments can not improve the death rate. Qingyitang is superior to other methods.

Wen QP, Chen HL, Guan FL. Effect of Qingyitang on acute lung injury induced by severe acute pancreatitis in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1341-1345

摘要

目的: 探讨中药(清胰汤)、糖皮质激素(地塞米松)、抗生素(凯复定)和生长抑素(善宁)在治疗重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)时急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的作用机制, 为临床用药提供确切的理论依据。

方法: 采用胰管逆行注射 15 g/L 去氧胆酸钠制成大鼠重症急性胰腺炎肺损伤模型。实验选用纯雄性健康Wistar大鼠共 65 只, 质量 220-250 g 之间, 随机分成 6 组: 假手术对照组(SHAM, $n = 10$); SAP 模型组(SAP, $n = 20$); SAP+ 善宁治疗组(SS, $n = 10$); SAP+ 地塞米松治疗组(DEX, $n = 10$); SAP+ 凯复定治疗组(KEF, $n = 10$); SAP+ 清胰汤治疗组(QYT, $n = 10$); 分别于造模后 24 h 活杀, 测定动脉血气, 血清淀粉酶的含量, 血清内毒素及血清和肺组织匀浆中 TNF, IL-6, MDA, SOD 的含量, 肺湿/干系数以及肺组织病理学改变。

结果: SAP 模型组血清内毒素, 血淀粉酶, 血清及肺组织匀浆中 TNF, IL-6, OFR 均较假手术对照组(SHAM)明显升高($P < 0.01$)。动脉血气显示肺损伤严重, 肺湿/干比值较 SHAM 组明显升高, 肺通透性明显升高, 肺病理学形态改变加重。中药治疗组各检测指标均较模型组明显改善, 其中 LPS, TNF, IL-6 下降显著。善宁治疗组在抑酶作用上优于其他治疗组。地塞米松治疗组对改善动脉血气, 肺湿/干比率有明显作用。

结论: 中药清胰汤, 通过保护肠道屏障, 减少了细菌移位, 降低血清中内毒素水平, 防止过氧化损伤, 纠正机体致炎和抗炎系统失衡等多方面机制而对肝脏起到全面保护作用。地塞米松, 善宁, 凯复定在治疗 ALI 过程中均起到一定保护作用, 通常在某个致病因素水平降低较中药显著, 但并未降低整体死亡率, 总体治疗效果较中药组差, 故提倡中西医结合治疗。

闻庆平, 陈海龙, 关凤林. 中药清胰汤治大鼠重症急性胰腺炎时急性肺损伤的比较. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1341-1345
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1341.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(SAP)是外科急危重症之一,他发病急,变化快,并发症多,死亡率高^[1-7].其死亡的发生又常与其并发症密切相关.急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是重症急性胰腺炎最常见的并发症之一.重症急性胰腺炎死亡患者中65%以上与急性呼吸窘迫综合征(ARDS)有关^[8].而ARDS是急性肺损伤的一个终末结局^[9].早期预防和治疗ALI对降低急性胰腺炎的死亡率及改善疾病的预后具有重要意义.中医通里攻下法对急性胰腺炎具有很好的防治作用.但应用通里攻下中药是否因为保护肠道屏障功能而减少了肠源性内毒素产生和吸收,抑制炎性递质对肺的损害而降低了ALI的发生率?我们同时设计4种药物(清胰汤、地塞米松、善宁、凯复定)对SAP进行治疗观察,并通过生化、病生等方法和手段,研究应用不同药物治疗SAP时ALI各种致病因素的变化,探讨各种药物作用机制,为临床治疗提供确切依据和理论基础.

1 材料和方法

1.1 材料 纯♂健康Wistar大鼠65只,质量220-250g.随机分成6组:假手术对照组(SHAM, n=10);SAP模型组(SAP, n=20);SAP+善宁治疗组(SS, n=10);SAP+地塞米松治疗组(DEX, n=10);SAP+凯复定治疗组(KEF, n=10);SAP+清胰汤治疗组(QYT, n=10);采用胰管内逆行注入15g/L去氧胆酸钠建立大鼠SAP时ALI模型.术前动物禁食12h,不禁水.用20g/L ketamin(100mg/kg)ip麻醉.无菌条件下,腹壁正中切口入腹,显露出十二指肠,找到胆胰管十二指肠乳头开口,在十二指肠乳头对侧肠壁插入1mL小注射器针头经胆胰管十二指肠乳头开口入胆胰管,同时在胆管出肝门处用小动脉夹夹闭,逆行注入15g/L去氧胆酸钠(1mL/kg),30s注完.对照组则开腹后翻动胰腺数次,关腹.清胰汤:(茵陈20g,栀子20g,大黄20g,芒硝20g,木香15g,柴胡5g,元胡15g,白芍15g,甘草6g,当归15g,双花20g,连翘20g)由大连医科大学附属第一医院中药制剂科制成浓度为1kg/L,灭菌处理后置瓶装冰箱存放.清胰汤治疗组在造模后立即灌胃给清胰汤,造模后12h再次灌胃1次,剂量:10mL/kg;善宁治疗组:分子造模后立即皮下注射1次及造模后12h再次皮下注射1次,剂量:20μg/kg;地塞米松治疗组造模后立即静脉注射1次及造模后12h再次静脉注射1次,剂量:2mg/kg;凯复定治疗组与上相同时间静脉内给药,剂量:0.2g/kg.造模24h后存活大鼠先经股动脉采血保持气密,冷藏送检动脉血气.从内眦静脉采血0.1mL置于去热源处理后的离心管中,分离血清测定内毒素.继续从内眦静脉采血置于清洁试管,直至动物死亡,标本离心(500r/min×30)后分离血清,分装于小离心管中冷藏备用.取右肺下叶,用冰冷无菌生理盐水洗净表面血迹.加入约为组织质量9倍的冰PBS缓冲液(0.1mol/L, pH=7.4),细细剪

碎,并用匀浆器搅匀,于低温高速离心机(8000r/min×30)分离出上清液于-30℃冰箱保存备用.另取一叶肺组织甲醛固定留做病理切片.

1.2 方法 血清淀粉酶测定采用自动分析法测定淀粉酶活性.动脉血气分析采用血气分析机(瑞士,OMNI Modular system).血清内毒素测定采用鲎试剂偶氮基质显色法定量检测,微量定量试剂检测药盒购于上海伊华临床医学科技公司.批号990501,结果以EU/L表示.血清及肺组织匀浆中TNF测定采用TNF放免分析测定试剂盒,购于北京东亚免疫技术研究所.单位以μg/L和μg/g表示.血清及肺组织匀浆中IL-6测定采用IL-6放免分析测定试剂盒(抗原竞争放免方法),购于北京东亚免疫技术研究所.单位以ng/L和ng/g表示.血清及肺组织匀浆中MDA测定采用硫代巴比妥法测定,试剂盒购于南京建成生物工程研究所.单位以μmol/L和μmol/g表示.血清及肺组织匀浆中SOD测定采用黄嘌呤氧化酶法测定SOD活力,试剂盒购于南京建成生物工程研究所.单位以nkat/L和nkat/g表示.肺组织蛋白定量测定用考马斯亮兰法.肺湿/干比值测定:动物放血致死后取左肺下叶称湿质量,置60℃烤箱连续烘烤24h,去除水分,称肺干质量,计算肺湿/干比值.病理学检查取左肺上叶置于中性10%甲醛固定液中,石蜡包埋切片5μm,HE染色后以Olympus显微镜观察并照相.

统计学处理 所有计量资料以均数±标准差(mean±SD)表示,应用SPSS8.0统计软件分析,组与组间均数比较采用方差分析和q检验.

2 结果

2.1 大鼠死亡率 造模后24h SAP模型组死亡率(55%)与SHAM组比较死亡率明显增加($P < 0.01$),各治疗组动物死亡率均较模型组明显改善,造模后24h各治疗组大鼠死亡率如下:善宁治疗组(40%),地塞米松治疗组(30%),SAP+凯复定治疗组(30%),SAP+清胰汤治疗组(30%)与模型组相比明显降低($P < 0.01$),各治疗组间无明显差异($P < 0.01$). (表1).

2.2 动脉血气的水平 SAP模型组与SHAM组比较PaO₂明显下降($P < 0.05$),PaCO₂明显升高($P < 0.05$),pH显著下降($P < 0.05$),HCO₃⁻明显减少($P < 0.05$),表明SAP组肺功能有明显损伤.各治疗组上述各项指标与模型组相比均有一定改善,其中地塞米松组和清胰汤治疗组对动脉血气改善较显著(表1).

2.3 血清淀粉酶和内毒素水平 SAP模型组血清淀粉酶显著高于SHAM组($P < 0.01$).与模型组相比各治疗组血清淀粉酶含量出现明显下降($P < 0.05$).其中善宁治疗组淀粉酶下降明显(表2).SAP模型组内毒素水平显著高于SHAM组($P < 0.01$),与模型组相比各治疗组内毒素水平明显下降($P < 0.05$).其中清胰汤治疗组尤为显著.提示清胰汤对治疗内毒素血症具有较明显作用(表2).

2.4 肺组织湿/干比值 SAP模型组肺湿/干比值较SHAM

表1 SAP 大鼠动脉血气分析结果(mean±SD)

| 分组 | n | PaO_2 (kPa) | PaCO_2 (kPa) | A-a Do_2 (kPa) | pH | HCO_3 (mmol/L) |
|------|----|----------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
| SHAM | 10 | 15.84 ± 0.28 | 3.66 ± 0.36 | 0.16 ± 0.11 | 7.385 ± 0.011 | 24.0 ± 0.19 |
| SAP | 9 | 10.23 ± 0.42 ^{bc} | 6.50 ± 0.14 ^{bc} | 3.72 ± 0.09 ^{bc} | 7.230 ± 0.025 ^b | 29.3 ± 0.30 ^{bc} |
| SS | 6 | 15.10 ± 0.74 ^{ac} | 4.58 ± 0.22 ^{ab} | 1.69 ± 0.10 ^{ab} | 7.350 ± 0.01 ^{ab} | 26.0 ± 0.17 ^{ab} |
| DEX | 7 | 15.73 ± 0.14 ^{ac} | 4.24 ± 0.13 ^{ab} | 0.39 ± 0.03 ^{abc} | 7.358 ± 0.013 ^{ab} | 24.8 ± 0.23 ^{ac} |
| KEF | 7 | 13.02 ± 0.04 ^{ab} | 4.66 ± 0.11 ^{ab} | 1.66 ± 0.07 ^{ab} | 7.333 ± 0.008 ^{abc} | 26.9 ± 0.20 ^{abc} |
| QYT | 7 | 13.86 ± 0.64 ^{ab} | 4.39 ± 0.10 ^{ab} | 1.52 ± 0.07 ^{ab} | 7.355 ± 0.014 ^{ab} | 26.0 ± 0.20 ^{ab} |

^aP <0.05 vs SAP; ^bP <0.01 vs SHAM; ^cP <0.05 vs QYT.

组有显著升高($P <0.01$). 与模型组相比各治疗组的肺湿/干比值均有明显下降($P <0.05$), 其中地塞米松治疗组对降低肺湿 / 干比值较明显(表 2).

表2 SAP 大鼠血清淀粉酶、内毒素、肺湿 / 干比值变化情况 (mean±SD)

| 分组 | n | 淀粉酶(μkat/L) | 内毒素(EU/L) | 肺湿 / 干比值 |
|------|----|----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| SHAM | 10 | 17.6 ± 3.9 | 44 ± 8 | 4.22 ± 0.19 |
| SAP | 9 | 123.2 ± 17.3 ^{ab} | 208 ± 23 ^{ab} | 7.06 ± 0.26 ^{ab} |
| SS | 6 | 63.6 ± 5.0 ^{bc} | 84 ± 10 ^{abc} | 5.65 ± 0.15 ^{abc} |
| DEX | 7 | 98.4 ± 18.0 ^{bc} | 115 ± 7 ^{abc} | 4.90 ± 0.24 ^{bc} |
| KEF | 7 | 84.5 ± 9.8 ^{bc} | 125 ± 11 ^{abc} | 5.74 ± 0.18 ^{abc} |
| QYT | 7 | 75.4 ± 12.6 ^{bc} | 66 ± 12 ^{bc} | 5.27 ± 0.23 ^{bc} |

^aP <0.05 vs QYT; ^bP <0.01 vs SHAM; ^cP <0.05 vs SAP.

2.5 TNF α , IL-6, SOD, MDA 变化 SAP 模型组血清和肺组织匀浆中 TNF α , IL-6 水平显著高于 SHAM 组($P <0.01$), 与模型组相比各治疗组血清和肺组织匀

浆中 TNF α , IL-6 水平明显下降($P <0.05$). 其中清胰汤治疗组尤为显著. 其他治疗组在某些指标上较清胰汤治疗组改善差($P <0.05$, 表 3). SAP 模型组血清和肺组织匀浆中 MDA 水平显著高于 SHAM 组($P <0.01$), SOD 活性较 SHAM 组明显降低($P <0.01$). 清胰汤治疗组治疗效果最显著, 各项指标均较 SAP 模型组明显好转($P <0.05$). 其他治疗组在某些指标上较清胰汤组改善差($P <0.05$ 表 3).

2.6 肺组织病理学改变 SHAM 组为正常肺组织病理切片(图 1A). SAP 模型组可见肺间质高度充血, 大部肺泡间隔明显增宽, 肺泡腔部分融合成肺大泡, 部分萎缩; 肺间质大量中性粒细胞浸润, 尤以小静脉和小支气管周围多见; 部分小支气管上皮细胞脱落, 腔内有红细胞, 可见微血栓形成(图 1B). 善宁和凯复定治疗组肺组织病理改变基本一致, 病理显示肺轻度淤血, 肺泡隔增宽, 间质可见少量白细胞浸润, 可见少量微血栓, 少数肺泡内壁可见透明膜形成(图 1C). 清胰汤和地塞米松治疗组肺组织在病理上明显改善, 肺组织基本正常, 少数偶有肺间质水肿、出血. 部分小血管内见少许中性粒细胞浸润(图 1D).

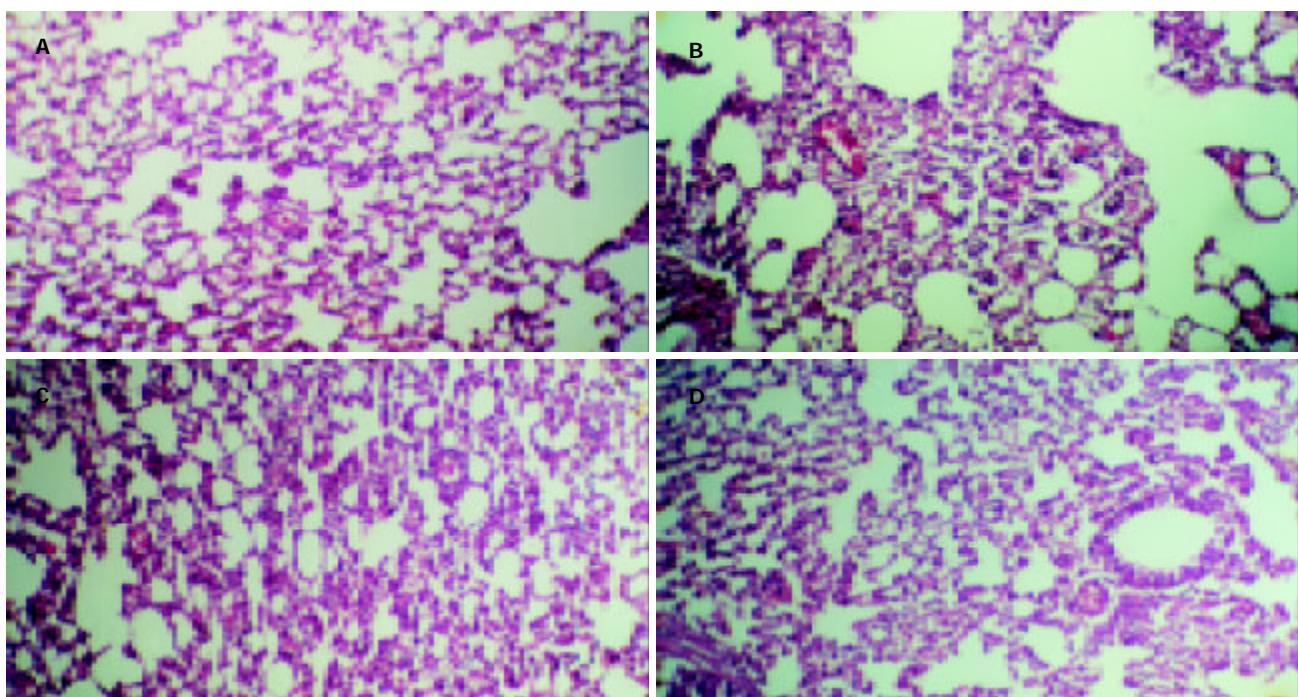


图 1 A: SHAM 组肺组织病理切片. HE 染色 $100 \times$. B: SAP 组肺组织病理切片 HE 染色 $100 \times$; C: 善宁组(SS)和凯复定(KEF)治疗组肺组织病理切片 HE 染色 $100 \times$; D: 清胰汤治疗组(QYT)和地塞米松(DEX)治疗组肺组织病理切片 HE 染色 $100 \times$.

表3 SAP大鼠TNF α , IL-6, MDA, SOD水平变化(mean±SD)

| 分组 | n | TNF α | | IL-6 | | MDA | | SOD | |
|------|----|---------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| | | 血清 (μ g/L) | 肺组织匀浆 (μ g/g) | 血清 (ng/L) | 肺组织匀浆 (ng/g) | 血清 (μ moL/L) | 肺组织匀浆 (μ moL/g) | 血清 (mkat/L) | 肺组织匀浆 (nkat/g) |
| SHAM | 10 | 1.49 ± 0.18 | 132 ± 30 | 9.3 ± 1.6 | 31.0 ± 7.2 | 11.7 ± 0.7 | 6.46 ± 1.02 | 5.8 ± 0.5 | 86.96 ± 11.5 |
| SAP | 9 | 2.64 ± 0.34 ^a | 81 ± 217 ^a | 57.6 ± 16.0 ^a | 124.8 ± 31.2 ^a | 36.9 ± 3.5 ^b | 10.77 ± 1.47 ^b | 136.4 ± 42.0 ^b | 57.6 ± 9.8 ^b |
| SS | 6 | 1.76 ± 0.15 ^{ac} | 350 ± 44 ^{ac} | 17.4 ± 2.5 ^{ac} | 52.2 ± 6.0 ^{ac} | 24.4 ± 2.0 ^{abc} | 8.41 ± 1.07 ^{ab} | 349.1 ± 30.2 ^a | 88.3 ± 3.8 ^{ab} |
| DEX | 7 | 1.86 ± 0.23 ^{ac} | 458 ± 102 ^{ac} | 18.5 ± 4.2 ^{ac} | 55.8 ± 11.3 | 27.5 ± 1.5 ^{abc} | 9.21 ± 0.76 ^{abc} | 369.9 ± 35.6 ^a | 95.3 ± 14.9 ^{ab} |
| KEF | 7 | 2.09 ± 0.69 ^a | 490 ± 144 ^{ac} | 19.3 ± 4.3 ^{ac} | 56.5 ± 8.4 ^{ac} | 25.0 ± 1.9 ^{abc} | 8.74 ± 0.62 ^{abc} | 371.8 ± 35.6 ^{ac} | 92.9 ± 16.4 ^{ab} |
| QYT | 7 | 1.67 ± 0.52 ^c | 167 ± 20 ^c | 13.2 ± 2.8 ^{ac} | 31.0 ± 7.2 ^c | 7.2 ± 1.3 ^{ab} | 7.56 ± 0.08 ^{ab} | 361.6 ± 25.1 ^a | 90.6 ± 15.8 ^a |

^aP <0.05 vs SHAM; ^bP <0.01 vs SHAM; ^cP <0.05 vs SAP; ^dP <0.05 vs QYT.

3 讨论

由于ALI常与感染有关，理论上应用抗生素治疗是成立的^[10]，但目前尚无一种制剂能够明显降低总体死亡率。如果盲目使用广谱抗生素，导致肠道菌群失调，加剧炎症反应导致组织器官的进一步损害，所以并不主张对所有患者常规预防性使用抗生素^[11]。我们也证实抗生素组治疗效果欠佳，但较模型组仍明显好转，因为在大鼠急性重症胰腺炎后期由于肠道屏障破坏，细菌移位导致感染，应用抗生素有利于控制继发感染，对ALI的治疗仍有一定意义。GC治疗组，动物动脉血气和肺湿/干比均较模型组明显改善，但并不能阻止其他脏器衰竭的发生，总体死亡率并无改善。临床研究发现皮质激素对ARDS或脓毒症患者并无益处，他不能阻止ALI的发展，也不能改善预后，但糖皮质激素可能对纤维化期有治疗作用，而ARDS晚期死亡与肺纤维化和由于并发肺炎所致的脓毒症及MOF有关^[12-15]。

善宁(sodostatin)治疗组在抑制胰淀粉酶作用上明显优于其他治疗组，但对降低血液循环内毒素水平，防止过氧化损伤，抑制炎性递质和细胞因子的释放等方面无明显效果；对减轻组织病理损害效果不明显。善宁是一种PAF释放的强抑制剂并能刺激网状内皮系统功能，增强机体对细菌和毒素的清除能力^[16]。但在SAP发病过程中胰蛋白酶原激活后产生的胰蛋白酶对胰腺组织细胞的破坏作用只是一种“扳机”作用。在SAP后期各种细胞因子释放，内毒素血症交互作用，激肽及补体系统的激活，毛细血管内皮细胞的损伤以及其他酶从激活的白细胞释放等一系列病变是SAP病程发展的主要原因，而不是激活的胰蛋白酶自身直接作用造成的。故靠单一使用生长抑素对改善疾病的预后，降低死亡率并无明显作用。

通里攻下法、活血化瘀法、清热解毒法在治疗急性胰腺炎时具有其他方法无法比拟的疗效。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”症情。而清胰汤可泻

下热结，荡涤积滞，通畅腑气。其通腑利肠泻肺实，使肺气得以宣发肃降在治疗肺系感染中有显著疗效。本实验结果显示：中药治疗组在整体疗效上优于其他治疗组，对改善SAP时ALI的各种致病因素均有显著疗效。综合中药在SAP时ALI作用概括如下^[17-29]：(1)通里攻下有利肠麻痹的解除，能促进腹腔内肠腔内血管活性及毒性物质的排除，从而有助顺利度过第一个MODS高峰，为下一步治疗创造条件；(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，从而可减少感染性并发症及缓解第二个MODS高峰；(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子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)某些临床观察还证实，通里攻下药物能够调节在严重腹腔感染时出现的异常免疫反应，使之较快的恢复常态。这些作用对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。因此，清胰汤在SAP情况下对机体的肺组织具有较全面的保护作用。

总之，SAP是一种全身性疾病，SAP导致的ALI具有多方面的发病机制，涉及到内毒素、肠屏障、微循环、炎性递质和细胞因子连锁反应等多个环节。因此治疗上没有一种能解决所有问题的万能钥匙。中医中药具有多方面的综合效应，但仍需与抑酶、抗过氧化损伤和抗炎性递质等疗法在不同时期，不同阶段配合应用，中西医疗法相结合，优势互补，相得益彰。

4 参考文献

- Wu XN. Management of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 1998;4:90-91
- Tiscornia OM, Hamamura S, Lehmann ES, Otero G, Waisman H, Tiscornia-Wasserman P, Bank S. Biliary acute pancreatitis: a review. *World J Gastroenterol* 2000;6:157-168
- Hartwig W, Werner J, Uhl W, Buchler MW. Management of infection in acute pancreatitis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:423-428

- 4 王兴鹏. 中国胰腺疾病研究的现状与展望. 世界华人消化杂志 2000;8:843-846
- 5 Hartwig W, Werner J, Muller CA, Uhl W, Buchler MW. Surgical management of severe pancreatitis including sterile necrosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2002;9:429-435
- 6 Yousaf M, Mc Callion K, Diamond T. Management of severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2003;90:407-420
- 7 Berger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg* 1997;21:130-135
- 8 Trapnell JE. Pathophysiology of acute pancreatitis. *World J Surg* 1981;5:319
- 9 Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, Lamy M, LeGall JR, Morris A, Spragg R. Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The consensus committee. *Intensive Care Med* 1994;20:225-232
- 10 Ziegler EJ, Fisher CJ Jr, Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, Wortel CH, Fink MP, Dellinger RP, Teng NN. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A sepsis study group. *N Engl J Med* 1991;324:429-436
- 11 Kollef MH. The role of selective digestive tract decontamination on mortality and respiratory tract infection: a meta-analysis. *Chest* 1994;105:1101-1108
- 12 Xue QF, Maurer R, Engel G. Selective distribution of beta- and alpha 1-adrenoceptors in rat lung visualized by autoradiography. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1983;266:308-314
- 13 王自法, 徐军, 潘承恩, 刘绍浩, 董瑞. 地塞米松抑制炎性症状改善鼠重症急性胰腺炎的预后. 世界华人消化杂志 2000;8:239
- 14 Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 1987;317:653-658
- 15 Luce JM, Montgomery AB, Marks JD, Turner J, Metz CA, Murray JF. Ineffectiveness of high-dose methylprednisolone in preventing parenchymal lung injury and improving mortality in patients with septic shock. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138:62-68
- 16 Wu XN. The mechanism of actions of Octreotide, Bupleurum-Peony Chengqi decoction and Danshan in severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 1999;5:249-251
- 17 蒋俊明, 张瑞明, 黄宗文. 益活清下法治疗重症胰腺炎. 中国中西医结合外科杂志 1994;1:9-11
- 18 Xia Q, Jiang JM, Gong X, Chen GY, Li L, Huang ZW. Experimental study of "TongXia" purgative method in ameliorating lung injury in acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2000;6:115-118
- 19 Chen HL, Wu XZ, Zheng XL. Oxygen free radicals and acute pancreatitis. *Basic Clin General Surg* 1994;1:51-54
- 20 Chen H, Wu X, Guan F. Protective effects of tongli gongxia herbs on gut barrier in rat with multiple organ dysfunction syndrome. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2000;20:120-122
- 21 Wu C, Li Z, Xiong D. An experimental study on curative effect of Chinese medicine Qingyitang in acute necrotizing pancreatitis. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 1998;18:236-238
- 22 Li ZL, Wu CT, Lu LR, Zhu XF, Xiong DX. Traditional Chinese medicine "Qing Yi Tang" alleviates oxygen free radical injury in acute necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 1998;4: 357-359
- 23 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
- 24 Zhao LG, Wu XX, Zhu ZM, Chen YL, Liu FS, Chen JT. Screening and pharmacologic study of new Chinese medicine treating severe acute pancreatitis. *China Nati J New Gastroenterol* 1996;2:136-138
- 25 么改琦, 吴咸中. 清胰汤治疗重型急性胰腺炎的临床研究. 中国中西医结合外科杂志 1997;3:244-246
- 26 吴承堂, 黎沾良, 黄祥成, 张志凌. 中药清胰汤及双歧杆菌合剂对急性坏死性胰腺炎肠道细菌移位影响的比较研究. 世界华人消化杂志 1999;7:525-528
- 27 Wu XZ. Traditional Chinese therapy of acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:417-418
- 28 Yue MX. Combined treatment of abdominal diseases with MODS by Chinese medicine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002; 10:937-941
- 29 Gloor B, Schmidtmann AB, Worni M, Ahmed Z, Uhl W, Buchler MW. Pancreatitis sepsis: prevention and therapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;16:379-390

World Journal of Gastroenterology 2005年将改为周刊

《*World Journal of Gastroenterology*, WJG》是我国消化病学领域中惟一以全英文发表原创性论文的国际性学术期刊. WJG 创刊于1995年, 原名《*China National Journal of New Gastroenterology*》, 1998年更名为WJG, 由世界胃肠病学杂志社出版. WJG 国际标准刊号 ISSN 1007-9327, 国内统一刊号 CN 14-1219/R, 月刊, 大16开, 256页, 邮发代号 82-261, 北京报刊发行局发行. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 以及日益增多的国际科技交流的需要, 从2005年开始, WJG 将由半月刊改为周刊, 大16开, 160页, 每月7、14、21、28日出版.

急性肝坏死小鼠血脑屏障通透性的改变

吕飒, 宋红丽, 王静艳, 刘沛

吕飒, 宋红丽, 王静艳, 刘沛, 中国医科大学附属第二医院感染科
辽宁省沈阳市 110004
吕飒, 女, 1972-12-04 生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 讲师。1999 年中国医科大学硕士, 博士研究生在读, 主要从事重型肝炎并发症的研究。
卫生部临床重点项目, No. 97100252
项目负责人: 刘沛, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第二医院感染科。 sylupei2003@yahoo.com.cn
电话: 024-83956981 传真: 024-83956451
收稿日期: 2004-02-27 接受日期: 2004-03-16

Blood brain barrier permeability in acute liver necrosis of mice

Sa Lu, Hong-Li Song, Jing-Yan Wang, Pei Liu

Sa Lu, Hong-Li Song, Jing-Yan Wang, Pei Liu, Department of Infectious Diseases, The Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Supported by the Research Funds of the Ministry of Public Health of the People's Republic of China, No. 97100252
Correspondence to: Pei Liu, Department of Infectious Diseases, The Second Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sylupei2003@yahoo.com.cn
Received: 2004-02-27 Accepted: 2004-03-16

Abstract

AIM: To study the permeability of the blood brain barrier (BBB) in a mouse model of acute liver necrosis.

METHODS: Male Balb/c mice were divided into 4 groups. In one group, mice were intraperitoneal of lipopolysaccharide (LPS, 10 µg/kg) with D-galactosamine (GalN, 800 mg/kg) to induce acute liver necrosis. Other groups were controls. Serum levels of alanine transaminase (ALT) were determined and the liver tissues were fixed for histopathological analysis. The permeability of BBB in mice was investigated with Evans blue (EB).

RESULTS: The serum levels of ALT were increased mildly in mice, which were administration of LPS or GalN alone. And no animals died. But the levels of ALT began to increase at 6 hours ($41.89 \pm 14.57 \mu\text{kat/L}$), and reached a maximal level at 12 hours ($170.30 \pm 16.13 \mu\text{kat/L}$) after injection with both LPS and GalN. Mice began to die at 6 hours, and at 9 hours after injection, the rate of lethality reached an extremely high level of 66.6%. The liver became massive or submassive necrosis. The concentration of EB in brain was significantly increased in ALF models compared with other groups.

CONCLUSION: The permeability of BBB is increased in acute liver necrosis model. It may be the mechanism of the brain edema.

Lu S, Song HL, Wang JY, Liu P. Blood brain barrier permeability in acute liver necrosis of mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6): 1346-1348

摘要

目的: 探讨急性肝坏死动物血脑屏障通透性异常改变。

方法: 将 280 只 ♂ Balb/c 小鼠分为 4 组, 应用内毒素(LPS, 10 µg/kg)和 D-氨基半乳糖(GalN, 800 mg/kg)联合 ip, 建立急性肝坏死小鼠模型。并检测血清 ALT, 观察肝脏组织病理学变化, 利用伊文思蓝研究小鼠血脑屏障通透性的改变情况。

结果: 单独应用 LPS 或 GalN 仅使血清 ALT 轻度升高, 动物无死亡。而联合应用后 ALT 则从 6 h 开始明显升高($41.89 \pm 14.57 \mu\text{kat/L}$), 到 12 h 达高峰($170.30 \pm 16.13 \mu\text{kat/L}$), 较其他各组均有显著性差异($P < 0.01$)。动物从 6 h 开始死亡, 9 h 达高峰, 总死亡率达 66.6%。肝脏 HE 染色可见大块或亚大块出血性坏死, 而其他组仅见单个或灶状肝细胞坏死, 部分细胞脂肪变性。并且脑组织 EB 含量在各时间点均较其他组明显升高。

结论: 在急性肝坏死动物中存在血脑屏障通透性异常增加的改变, 可能是引起脑水肿发生的重要机制。

吕飒, 宋红丽, 王静艳, 刘沛. 急性肝坏死小鼠血脑屏障通透性的改变. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1346-1348

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1346.asp>

0 引言

急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)的死亡率很高, 其中 50-80% 的患者死于脑水肿引起的颅高压^[1]。脑水肿包括细胞毒性和血管源性脑水肿, 后者以血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)通透性的改变为主要原因。我们应用伊文思蓝(Evans blue, EB)体内注射后检测急性肝坏死动物脑组织中含量, 观察其血脑屏障通透性改变。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Balb/c 小鼠 280 只, 6-8 周龄, 体质量 18-22 g, 由中国医科大学动物中心提供。D-氨基半乳糖(D-galactosamine, GalN)由北京药物研究所提供, LPS (E.coli O127:B8)购自 Sigma 公司, 伊文思蓝(EB)购自 Fluka 公司, 甲酰胺为分析纯。小鼠随机分为 4 组。1 组(生理盐水对照组)50 只, 2 组(LPS 对照组)50 只, 3 组(GalN 对照组)50 只, 4 组(肝坏死组: GalN+LPS)130 只。各组分 5 个时间点(2, 6, 9, 12, 24 h), 每个时间点

10只小鼠。GaIN 800 mg/kg, LPS 10 μg/kg, 均为ip, 生理盐水为相同体积ip, 20 g/L EB (2 mg/kg)于处死动物前2 h尾静脉注射。每时间点动物中5只检测EB含量, 另5只留血及肝脏组织标本待检。

1.2 方法 血脑屏障通透性的检测首先建立标准曲线。取EB10 mg溶于100 mL生理盐水中, 取0.1 mL加入1.9 mL甲酰胺中, 混匀作为第1管, 从中取0.1 mL加入1.9 mL甲酰胺中混匀作为第2管, 再从中取1 mL加入1 mL甲酰胺中混匀作为第3管, 以此类推共做6管, 其浓度分别为5 mg/L, 0.25 mg/L, 0.125 mg/L, 0.0625 mg/L, 0.0313 mg/L, 0.0156 mg/L, 37 °C水浴48 h, 于紫外分光光度仪上(波长632 nm)进行比色, 蒸馏水作空白对照, 制作出标准曲线。动物注射EB 2 h后, 迅速断头。为清除血液中染料, 向左心室灌注生理盐水, 直至右心室流出透明液体为止。取脑称重, 加入3 mL甲酰胺, 37 °C水浴48 h, 1 500 r/min离心, 取上清于波长632 nm进行比色, 根据标准曲线计算出EB含量, 结果以ng/g表示。每组各时间点另5只小鼠, 摘眼球取血, 分离血清, 立即行血清谷丙转氨酶(ALT)测定。将处死的小鼠肝脏迅速置于40 g/L甲醛中固定, 石蜡包埋, HE染色, 观察肝脏病理形态变化。

统计学处理 ALT, EB含量均以mean±SD表示, 使用SPSS10.0进行方差分析比较。

2 结果

第4组小鼠联合注射后, 逐渐出现懒动, 摄水和觅食动作减少, 皮毛松散, 最后行动减慢, 甚至抽搐, 并于注射后6 h开始死亡(18/120), 到9 h达高峰(72/120), 12 h以后存活下来的小鼠没有再死亡者, 总死亡率可达66.6%(80/120)。而其他3组无动物死亡。因此各实验指标的测定均截止至12 h为止。

2.1 肝脏组织病理形态学 第1组小鼠肝组织呈现清楚的肝小叶结构, 肝小叶以中央静脉为轴, 肝索呈放射状排列, 肝细胞完整, 肝血窦清晰(图1A)。第2组肝脏仅有轻度肝细胞水肿, 或脂肪变性, 无明显肝细胞坏死(图1B)。第3组于9 h可见有单个肝细胞坏死(图1C)。第4组2 h时也无明显变化, 但随时间的延长, 逐渐出现点状坏死或灶状坏死, 6 h时有桥接坏死。到9 h时病变最重, 表现为肉眼可见肝脏体积明显增大, 呈酱紫色, HE染色呈肝细胞大块或亚大块坏死, 肝小叶结构紊乱, 肝索消失, 肝血窦或间质内出血较重(图1D)。

2.2 血清ALT变化 第2组小鼠ALT在各个时间点无明显变化, 第3组ALT仅于9 h有轻度升高($1.84 \pm 0.04 \mu\text{kat/L}$)。第4组小鼠ALT于6 h开始明显升高($41.89 \pm 14.57 \mu\text{kat/L}$), 9 h达($103.94 \pm 15.21 \mu\text{kat/L}$), 于12 h达高峰($170.30 \pm 16.13 \mu\text{kat/L}$)。各时间点较其他各组均有显著性差异($P < 0.01$, 图2)。

2.3 脑组织EB含量 第4组小鼠于注射2 h后, EB含量开始明显增高, 各时间点较其他对照组均有显著性

差异, 组内各时间点之间无显著性差异($P > 0.05$, 表1)。

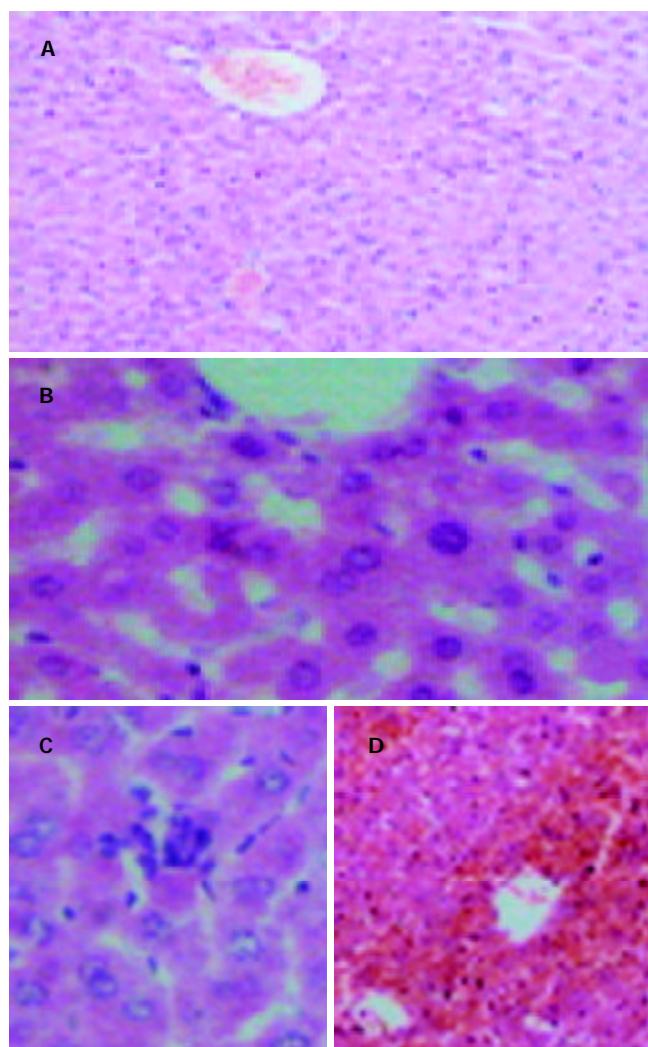


图1 小鼠肝脏病理HE染色。A: 第1组: 肝小叶结构清楚, 肝细胞完整, 肝血窦清晰 $\times 100$; B: 第2组: 肝细胞脂肪变性, 轻度肝细胞水肿 $\times 400$; C: 第3组: 单个肝细胞坏死, 局部炎性细胞浸润 $\times 400$; D: 第4组: 肝细胞大块或亚大块坏死 $\times 100$ 。

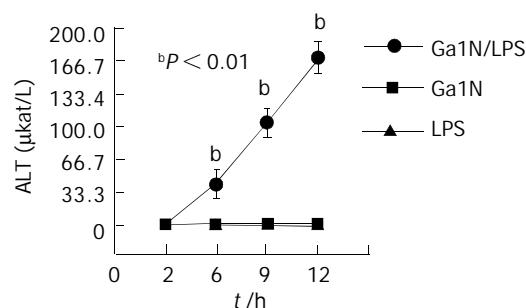


图2 各组小鼠不同时间血清ALT水平。

表1 急性肝坏死小鼠脑组织EB含量(ng/g, mean±SD)

| 分组 | 2 h | 6 h | 9 h | 12 h |
|-----------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1(盐水对照) | 624±227 | 582±217 | 594±284 | 612±325 |
| 2(LPS对照) | 1 168±350 | 1 063±259 | 1 312±125 | 931±317 |
| 3(GaIN对照) | 1 252±136 | 1 113±208 | 870±276 | 1 198±203 |
| 4(肝坏死) | 2 144±207 ^{bde} | 2 064±328 ^{bde} | 2 271±284 ^{bdf} | 1 862±206 ^{bce} |

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 1组, ^cP < 0.05, ^dP < 0.01 vs 2组, ^eP < 0.05, ^fP < 0.01 vs 3组。

3 讨论

脑水肿是ALF的严重并发症和致死原因之一^[1-3],许多研究证实细胞毒性和血管源性脑水肿机制都参与了ALF时脑水肿的形成^[4-5]. BBB是中枢神经系统中重要的解剖结构,他可限制血液循环中某些物质进入,从而维持中枢神经系统内环境的稳定^[6-7]. 我们应用LPS和GaN联合注射建立急性肝坏死动物模型^[8-10],研究BBB异常改变.通过生化检测谷丙转氨酶(ALT),发现6 h ALT出现明显升高,于12 h可达 $170.30 \pm 16.13 \mu\text{kat/L}$,较对照组有显著性差异($P < 0.01$).组织学检查:6 h出现桥接样坏死,9 h出现出血性大片肝坏死,其病理改变类似重型肝炎.而单独使用LPS或GaN仅引起ALT轻度升高,HE染色仅见轻度的肝细胞损伤.这是由于肝细胞在遭受损伤因子的刺激时可产生保护性蛋白,GaN可特异性消耗尿嘧啶核苷,影响肝细胞核酸代谢,从而抑制保护性蛋白的合成,增加肝细胞对LPS的敏感性,二者联合应用造成了已致敏的肝细胞发生大片坏死.

我们利用伊文思蓝(EB)与血清白蛋白有高度亲和力,只有BBB破坏后,才能通过受损的BBB进入脑组织的特点,测定急性肝坏死的小鼠脑组织中EB的含量,以反映BBB开放的程度^[11-12].结果在急性肝坏死组的小鼠脑组织EB含量从2 h开始明显升高,较对照组有显著性差异,表明在实验性急性肝坏死动物模型中确实存在BBB通透性增高.但是,在出现脑组织EB含量明显增加的2 h,急性肝坏死组的小鼠肝脏内未发现大片肝细胞坏死,说明在实验动物发生大片肝细胞坏死前已存在BBB通透性增高,提示引起肝坏死发生的某些因子可能参与BBB通透性增高.

BBB通透性的改变主要是通过内皮细胞的损伤,紧密连接的开放,小泡转运的增强,星形胶质细胞的肿胀来实现的^[13-18]. ALF时机体发生BBB损伤是由多种因素共同作用的结果.目前ALF时BBB改变的机制仍不清楚,其中内毒素和细胞因子与BBB通透性的关系是现在的研究热点.由于肝脏重度损伤,造成(1)肠道内毒素产生和吸收增多;(2)门体循环短路,使血中内毒素逃避肝Kupffer细胞的吞噬与清除,使内毒素血症加重;(3)肝细胞大量坏死,肝Kupffer细胞也严重受损,使其吞噬能力受抑制,导致对内毒素的清除能力下降,因此ALF时常伴有内毒素血症^[19].内毒素诱发肝硬化大鼠发生肝性脑病时BBB超微结构有明显改变^[20].我们LPS单独注射组动物未发现BBB通透性增高现象,提示在我们建立的肝坏死动物模型中存在着LPS诱生的第二因子参与BBB通透性增高的形成.有研究报告LPS可以刺激TNF- α 生成^[21-22],而TNF- α 可以使BBB通透性增加.临床研究也证实重症肝炎患者血中TNF- α 明显增高.因此,TNF- α 可能是急性肝坏死发生BBB通透性异常增高的重要因素.

ALF时机体各系统的变化是复杂的,进一步引起BBB的破坏甚至是脑水肿的机制更是复杂的,其中血

氨水平的变化,缺氧以及各种免疫递质的作用,还有待今后更进一步深入研究.

4 参考文献

- Mukherjee KK, Chhabra R, Khosla VK. Raised intracranial pressure in hepatic encephalopathy. *Indian J Gastroenterol* 2003;22(Suppl 2):S62-65
- Fayzik P, Hetz H, Krenn CG, Baker A, Germann P, Berlakovich G, Steininger R, Steltzer H. Liver support in fulminant liver failure after hemorrhagic shock. *Wien Klin Wochenschr* 2003; 115:595-598
- Gill RQ, Sterling RK. Acute liver failure. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:191-198
- Inamasu J, Nakamura Y, Yamamoto S, Sakamoto N, Saito R, Horiguchi T, Ichikizaki K. Prolonged unilateral vasodilatation and brain edema in fulminant hepatic failure, associated with symptomatic seizure. *Clin Neurol Neurosurg* 2002;104:157-160
- Blei AT. Pathophysiology of brain edema in fulminant hepatic failure, revisited. *Metab Brain Dis* 2001;16:85-94
- Zheng W, Aschner M, Ghersi-Egea JF. Brain barrier systems: a new frontier in metal neurotoxicological research. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;192:1-11
- Chaudhuri JD. Blood brain barrier and infection. *Med Sci Monit* 2000;6:1213-1222
- Nakama T, Hirono S, Moriuchi A, Hasuike S, Nagata K, Hori T, Ido A, Hayashi K, Tsubouchi H. Etoposide prevents apoptosis in mouse liver with D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality. *Hepatology* 2001;33:1441-1450
- Inoue T, Horai H, Aoki C, Kawamura I, Ota M, Mizuhara H, Tomoi M, Mutoh S. Insulin-like growth factor-I prevents lethal acute liver failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in rats. *In Vivo* 2003;17:293-299
- Santos FA, Silva RM, Tome AR, Rao VS, Pompeu MM, Teixeira MI, De Freitas LA, De Souza VL. 1,8-cineole protects against liver failure in an in-vivo murine model of endotoxemic shock. *J Pharm Pharmacol* 2001;53:505-511
- Ovadia H, Abramsky O, Feldman S, Weidenfeld J. Evaluation of the effect of stress on the blood-brain barrier: critical role of the brain perfusion time. *Brain Res* 2001;905:21-25
- Kaya M, Kalayci R, Kucuk M, Arican N, Elmas I, Kudat H, Korkut F. Effect of losartan on the blood-brain barrier permeability in diabetic hypertensive rats. *Life Sci* 2003;73:3235-3244
- Fischer S, Wobben M, Marti HH, Renz D, Schaper W. Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1. *Microvasc Res* 2002;63:70-80
- Krizbai IA, Deli MA. Signalling pathways regulating the tight junction permeability in the blood-brain barrier. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2003;49:23-31
- Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat* 2002;200:629-638
- Fischer S, Wobben M, Kleinstück J, Renz D, Schaper W. Effect of astroglial cells on hypoxia-induced permeability in PBMEC cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C935-44
- Li YQ, Chen P, Haimovitz-Friedman A, Reilly RM, Wong CS. Endothelial apoptosis initiates acute blood-brain barrier disruption after ionizing radiation. *Cancer Res* 2003;63:5950-5956
- Stewart PA. Endothelial vesicles in the blood-brain barrier: are they related to permeability? *Cell Mol Neurobiol* 2000;20:149-163
- Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol* 2002;8:961-965
- 李夏青, 韩德五. 内毒素诱发肝性脑病大鼠脑超微结构观察. 解剖学杂志 2000;23:439-440
- Yarovinsky TO, Powers LS, Butler NS, Bradford MA, Monick MM, Hunninghake GW. Adenoviral infection decreases mortality from lipopolysaccharide-induced liver failure via induction of TNF-alpha tolerance. *J Immunol* 2003;171:2453-2460
- Dominguez Fernandez E, Flohe S, Siemers F, Nau M, Schade FU. Endotoxin tolerance in rats: influence on LPS-induced changes in excretory liver function. *Inflamm Res* 2002;51:500-505

鼠 CD40 配体基因的克隆及表达

蒋永芳, 苏先狮, 龚国忠, 何 艳, 许 允

蒋永芳, 苏先狮, 龚国忠, 何艳, 许允, 中南大学湘雅二医院肝病研究中心 湖南省长沙市 410011

蒋永芳, 男, 1972-10-29, 湖南省衡山县人, 汉族, 1995 年湖南医科大学本科毕业, 2003 年中南大学博士研究生毕业, 主治医师, 主要从事肝癌基因治疗的研究, 发表论文 5 篇。

湖南省卫生厅科研基金资助, No.Y02-42

项目负责人: 蒋永芳, 410011, 湖南省长沙市, 中南大学湘雅二医院肝病研究中心。 jiangyongfang@hotmail.com

电话: 0731-5524222-2263

收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-03-18

Cloning and expression of murine CD40 ligand gene

Yong-Fang Jiang, Xian-Shi Su, Guo-Zhong Gong, Yan He, Yun Xu

Yong-Fang Jiang, Xian-Shi Su, Guo-Zhong Gong, Yan He, Yun Xu, Center for Liver Disease, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Supported by the Public Health Department Foundation of Hunan Province, China, No. Y02-42

Correspondence to: Dr. Yong-Fang Jiang, Center for Liver Disease, Second Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. jiangyongfang@hotmail.com

Received: 2004-03-05 Accepted: 2004-03-18

Abstract

AIM: To study sub-cloning and expression of murine CD40 ligand (mCD40L) gene in eukaryotic cells as a basis for further study.

METHODS: The mCD40L gene fragment was amplified by using RT-PCR and sub-cloned into eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1⁺, then transfected into H22 cell with Lipofectamine. After 2-3 weeks selection with G418, DNA was extracted from infected cells and tested by RT-PCR, indirect immunofluorescence were used to detect the expression of mCD40 L.

RESULTS: The insertion mCD40L gene fragment in the eukaryotic expression plasmid was confirmed by enzyme digestion with EcoR I and Nhe I and sequence analysis. The result RT-PCR showed that mCD40L gene had been integrated into the genome of infected H22 cells. Indirect immunofluorescence analysis showed that mCD40L had been expressed in these cells.

CONCLUSION: The mCD40L gene is integrated into eukaryotic cells with eukaryotic expression plasmid and target gene is expressed efficiently.

Jiang YF, Su XS, Gong GZ, He Y, Xu Y. Cloning and expression of murine CD40 ligand gene. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6): 1349-1352

摘要

目的: 克隆和在真核细胞中表达鼠CD40配体(mCD40L)基因, 为进一步研究打下基础.

方法: 用 RT-PCR 法扩增 mCD40L 基因片段, 定向插入真核表达载体 pcDNA3.1⁺中, 重组质粒用脂质体转染H22 细胞, G418 筛选抗性细胞, 用 RT-PCR 检测目的基因的插入, 间接免疫荧光检测目的基因的表达.

结果: 含 mCD40L 基因重组表达质粒用酶切分析和序列测定进行鉴定后, 转染H22 细胞经G418筛选获得抗性细胞, 经 RT-PCR 鉴定有含目的基因, 间接免疫荧光鉴定有 mCD40L 的表达.

结论: 成功克隆mCD40 L基因并在真核细胞得到有效表达.

蒋永芳, 苏先狮, 龚国忠, 何艳, 许允. 鼠 CD40 配体基因的克隆及表达. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1349 - 1352

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1349.asp>

0 引言

CD40 配体(CD40L)是分子质量为 39 kd 的糖蛋白, 在淋巴细胞和非淋巴细胞表面均有表达, 属肿瘤坏死因子家族中的一员, 可与抗原提呈细胞(APC)上的 CD40 结合. CD40-CD40L 相互作用在激活 APC 及激发细胞免疫和体液免疫方面起重要作用^[1]. 通过转导 CD40L 基因有可能成为治疗恶性肿瘤的一种有效的方法. 我们构建鼠 CD40 配体(mCD40L)基因真核表达载体及其表达, 为进一步研究打下基础.

1 材料和方法

1.1 材料 真核表达载体 pcDNA3.1⁺, 带有强有力的巨细胞病毒 CMV 增强启动子, 能高效表达插入的目的基因, 含 SV40 启动子, 控制 G418 抗性基因的表达, 购于美国 Promega 公司; 大肠杆菌 JM109, 购于美国 Promega 公司; Balb/C 小鼠肝癌细胞株 H22 细胞购自武汉大学典型物保存中心; 修饰酶、连接酶和质粒回收试剂盒购自 Promega 公司; 限制性内切酶 NheI 和 EcoRI 分别购自大连宝生物有限公司和华美生物工程公司; DNA 分子量标准(1 031 bp), MBI 产品; PCR 纯化试剂盒, 美国 QIAGEN 公司产品; RPMI1640 培养基和 G418 购自美国 Gibco 公司; 脂质体转染剂 Lipofectamine Plus™ Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; SABC-FITC 试剂盒购自武汉博士德生

物工程有限公司。根据mCD40L基因序列及载体要求，我们设计扩增的引物序列分别为：5'-GAC GCT AGC ATG ATA GAA ACA TAC AGC CAA CCT-3' 和 5'-GCC GAA TTC TCA GAG TTT GAG TAA GCC AAA AGA-3'，在引物的两端分别含有NheI和EcoRI酶切位点，由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 扩增 mCD40L cDNA 从 Balb/c 小鼠的脾细胞提取细胞总的 RNA 后，以 Oligo(dT)18 合成第一链 cDNA，作为 PCR 模板，用 PCR 法扩增鼠 CD40L 基因，反应条件为：94 °C 5 min, 94 °C 60 s, 60 °C 50 s, 72 °C 90 s 共 35 个循环，72 °C 10 min. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 扩增带，并用 PCR 纯化试剂盒回收特异 PCR 扩增片段。

1.2.2 表达重组体的构建及鉴定 先用 T-A 克隆将 PCR 产物和 pUCm-T 载体连接，构建中间重组体(pUCm-T-mCD40L)，经酶切鉴定和序列分析后。将 pUCm-T-mCD40L 和真核表达载体 pcDNA3.1⁺ 均分别用 NheI 和 EcoRI 酶进行消化，回收目的片段。将含 NheI 和 EcoRI 两粘端的 PCR 产物定向克隆于含与之相匹配两粘端的 pcDNA3.1⁺，构建成真核表达重组体(pcDNA3.1⁺-mCD40L cDNA)。通过 NheI 和 EcoRI 双酶切和序列分析进行鉴定。

1.2.3 质粒转染小鼠肝癌细胞株H22及筛选 常规复苏 H22 细胞，适时传代，细胞增生至足量后按 2.5×10^5 个细胞/孔的浓度接种六孔板中，按脂质体转染 Lipofectamine PlusTM Reagent 试剂盒说明书进行，简述如下，4 μL 脂质体和 4 μg 重组质粒混合，放置 15 min 后加到有 H22 细胞的六孔培养板中，37 °C 50 mL/L CO₂ 的培养箱中孵育 3 h 后，改用 200 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养基继续培养，转染后 4 d 后，细胞 1:20 传代，改用含 G418 的选择培养基进行筛选(G418 浓度前 2 d 为 250 mg/L, 3-4 d 为 500 mg/L, 以后为 800 mg/L)，隔日换液，一共选择培养 18 d，至阴性对照孔细胞全部死亡后恢复普通培养。

1.2.4 mCD40L 在真核细胞中的表达 将抗性 H22 细胞扩增培养后，提取细胞 RNA，按前面的反应体系和反应条件，用 RT-PCR 方法检测目的基因。H22 细胞涂片后，用间接免疫荧光法检测 mCD40L 的表达(按 SABC-FITC 试剂盒操作指南)。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 mCD40L 基因 以总 RNA 作为模板，18 聚 T 寡核苷酸作引物合成 cDNA 第一链，然后用特异引物进行 PCR 扩增，能顺利扩增出大小约 783 bp 的条带(图 1)。

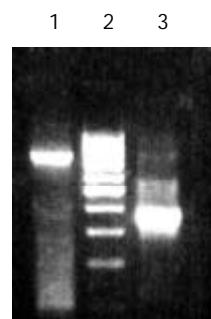


图 1 鼠 CD40 配体 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳。1: 目的产物; 2: DNA 分子量标准(1 031 bp); 3: 阳性对照(β -actin)。

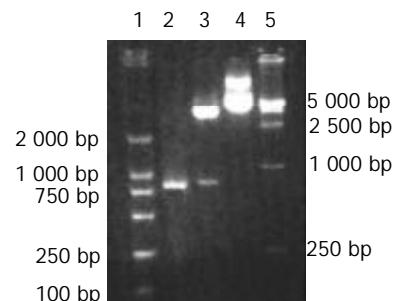


图 2 鼠 CD40 配体真核表达质粒双酶切鉴定结果。1: DNA 分子量标准(2 000 bp); 2: RT-PCR 产物; 3: pcDNA3.1⁺-mCD40L 经 NheI 和 EcoRI 双酶切; 4: pcDNA3.1⁺-mCD40L 未酶切; 5: DNA 分子量标准(10 000 bp)。

2.2 表达重组体的构建及鉴定 中间重组体(pUCm-T-

```

GGAGACCCAAGCTGGCTAGCATGATAGAACATACAGCCACCTCCCCAGATCCGTGGCAACTGGAC
TTCCAGCGAGCATGAAGATTTATGTATTACTTACTGTTCTTATCACCCAAATGATTGGATCTG
TGCTTTTGCTGTATCTTCATAGAAGATTGGATAAGGTCGAAGAGGAAGTAAACCTTCATGAAGATT
TTGTATTCTAAAAAACCTAAAGAGATGCAACAAAGGAGAAGGATCTTATCCTTGCTGAAGTGTGAGG
AGATGAGAAGGCAATTGAAGACCTGTCAAGGATATAACGTTAACAAAGAAGAGAAAAAGAAAACA
GCTTGAATGCAAAGAGGTGATGAGGATCCTCAAATTGCAGCACACGTTGAAGCGAAGCCAACAGTA
ATGCAGCATCCGTTCTACAGTGGCCAAGAAAGGATATTACCATGAAAGCAACTTGGTAATGCTTG
AAAATGGGAAACAGCTGACGGTAAAGAGAGAAGGACTCTATTATGTCTACACTCAAGTCACCTCTGCT
CTAATCGGAGCCTCGAGTCACGCCATTCTACGTTCTGGCTGAGCCAGCAGTGGATCTG
AGAGAATCTTACTCAAGCGGCAAATACCCACAGTTCTCCAGCTTGGAGCAGCAGTGTGACT
TGGCGGAGTGTGTTGAATTACAAGCTGGTCTGTGTTGTCAACGTGACTGAAGCAAGCCAAGTGA
TCCACAGAGTGTGCTCTCATCTTGGCTTACTCAAACCTGTGAGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGT
GGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGT

```

图 3 重组质粒序列测定结果。测序结果表明包括起始密码子和终止密码子在内的完整的 mCD40L 基因插入表达质粒中。

mCD40L) 经酶切鉴定和序列分析证明正确后, 用 NheI 和 EcoRI 酶切将 PCR 产物定向亚克隆于表达质粒 pcDNA3.1⁺ 中, 构建表达重组体(pcDNA3.1⁺-mCD40L), 将 pcDNA3.1⁺-mCD40LcDNA 用 NheI 和 EcoRI 双酶切, 可获得两个片段, 小片段与 PCR 产物一致(图 2). 重组质粒经测序证实有包括起使密码子和终止密码子在内的完整的 mCD40L 基因片段插入 pcDNA3.1⁺ 载体中(图 3).

2.3 目的基因在真核细胞中的表达 逆转录 PCR 检测到 mCD40L 在 H22 细胞中表达(图 4); 用间接免疫荧光法检测到用 pcDNA3.1⁺-mCD40L 转染后的 H22 细胞中荧光染色阳性, 证明有 mCD40L 的表达(图 5).

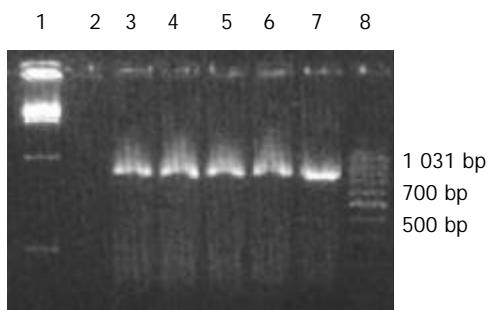


图 4 RT-PCR 检测鼠 CD40 配体基因在 H22 细胞中的表达. 1: 8: DNA 分子量标准(分别为 2 000 bp 和 1 031 bp); 2: 空白载体转染 H22 细胞 RT-PCR 结果; 3-6: 重组质粒转染 H22 细胞 RT-PCR 结果; 7: 鼠脾细胞 RT-PCR 结果.

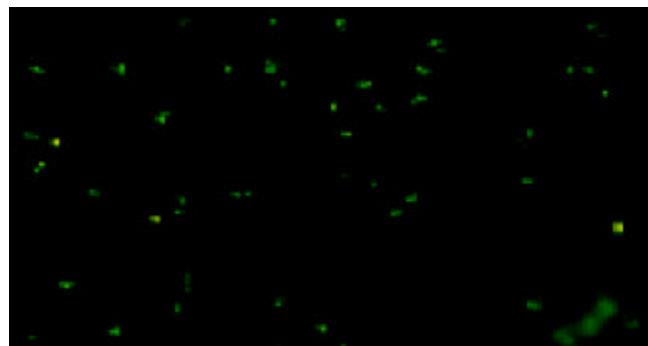


图 5 间接免疫荧光检测 H22 细胞中鼠 CD40 配体的表达. 有鼠 CD40 配体表达的 H22 细胞, 荧光染色呈阳性.

3 讨论

肝细胞癌是我国最常见的恶性肿瘤之一^[2-3], 由于肝细胞癌对于各种治疗方法的疗效均很差, 且易转移, 使之成为治疗上最困难的肿瘤之一^[4]. 所以急需寻找新的治疗方法, 近年来随着分子生物学的飞速发展, 免疫基因治疗被认为是一种很有前途的治疗方法^[5]. 在免疫基因治疗研究方面, 选择有效的目的基因至关重要. CD40 配体(CD40L), 又称作 CD154, 属于肿瘤坏死因子基因超家族中的一员, 在激活的 T 细胞等多种细胞表面均有 CD40L 的表达, 同样包括 B 细胞和多种肿瘤细胞在内细胞表面有 CD40 分子的表达, CD40L 和 CD40 相互作用, 能激活 B 细胞和前凝血质, 促进黏附因子、细胞因子、化学因子和 MMP 的释放^[1]. 其实质是诱发体液免疫

和细胞介导的免疫反应. 正由于 CD40L/CD40 相互作用所具有的多种生物学活性, 将外源目的基因 CD40L 基因导入机体内, 可能产生强烈的抗肿瘤免疫反应, 而将 CD40L 基因联合其他免疫治疗基因(如 IL-12, CD80 等)或肿瘤相关抗原(如 AFP)疗效可能更好^[6]. 利用鼠 CD40L 基因已开展了许多抗肿瘤免疫方面的研究, 治疗策略包括有: 用 CD40L 基因或者联合 IL-12 基因转染白血病细胞, 再把这些细胞注入机体内治疗急性白血病^[7]和慢性 B 淋巴细胞性白血病^[8]等, 能诱导明显的抗白血病免疫反应; 利用一定的载体将鼠 CD40L 基因导入荷瘤动物体内治疗肺癌^[9-10]、结肠癌^[11]、膀胱癌^[12-15]肝癌^[16-17]、胸膜间皮瘤^[18]、胃癌^[19]和黑色素瘤^[20]等, 结果表明鼠 CD40L 基因均能激活 T 细胞、上调 IL-12 等细胞因子水平和增加 NK 细胞活力等保护性免疫反应和增加癌细胞凋亡, 从而使荷瘤鼠的瘤结节退化, 能持久抑制再次注入的癌细胞的生长, 动物存活期延长; 由于 CD40L 转染 DC 细胞后能促进 DC 细胞成熟和分泌 IL-12^[21-22], 所以通过转染 CD40L 基因制备 DC 瘤苗同样可以治疗肿瘤; 自体 T 细胞经巨噬细胞集落刺激因子和 IL-4 刺激后, CD40L 分泌增多, 这样联合 DC 细胞和激活后的自体 T 细胞成为癌症免疫基因治疗的一种新的方法^[23]. CD40L 基因的治疗策略为癌症的基因治疗开辟一条新的途径.

我们以鼠脾细胞总 RNA 为模板, 用 RT-PCR 方法, 成功扩增出了特异的 mCD40L 基因, DNA 序列测定表明, 所扩增的片段的确是 mCD40L 基因片段, 与国外报道的基因序列完全一致. 在此基础上, 成功构建了真核表达重组体 pcDNA3.1⁺-mCD40L, 重组质粒转染真核细胞后, 检测到有 mCD40L 的表达, mCD40L 真核表达载体的构建和有效表达, 为下一步研究其生物学活性和免疫基因治疗肝癌打下了良好的基础.

4 参考文献

- 1 Schonbeck U, Mach F, Libby P. CD154(CD40 ligand). *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:687-693
- 2 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma—cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 3 Zhang G, Long M, Wu ZZ, Yu WQ. Mechanical properties of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:243-246
- 4 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- 5 Roenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 1999;10:281-287
- 6 Afford SC, Yong LS. Gene therapy for hepatocellular carcinoma—teaching old dogs new tricks. *Hepatology* 2001;34:207-209
- 7 Saudemont A, Buffenoir G, Denys A, Desreumaux P, Jouy N, Hetuin D, Banters F, Fenanx P, Quesnel B. Gene transfer of CD154 and IL12 cDNA induces an anti-leukemic immunity in a murine model of acute leukemia. *Leukemia* 2002;16:1637-1644
- 8 Wendtner CM, Kofler DM, Theiss HD, Kurzeder C, Buhmann R, Schweighofer C, Perabo L, Danhanser-Riedl S, Baumert J, Hiddemann W, Hallek M, Bunning H. Efficient gene transfer of CD40 ligand into primary B-CLL cells using recombinant adenovirus (rAAV) vectors. *Blood* 2002;100:1655-1661

- 9 Masahiro N, Kazuyoshi I, Tsutomu K, Wakayama H, Horio Y, Sekido Y, Hara T, Hashimoto N, Takahashi M, Shimokata K, Hasegawa Y. Induction of antitumor immunity by transduction of CD40 ligand gene and interferon-gamma gene into lung cancer. *Cancer Gene Ther* 2001;8:421-429
- 10 Tada Y, O-Wang J, Yu L, Shimozato O, Wang YQ, Takiuchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Takemaga K, Sakiyama S, Tagawa M. T-cell-dependent antitumor effects produced by CD40 ligand expressed on mouse lung carcinoma cells are linked with the maturation of dendritic cells and secretion of a variety of cytokines. *Cancer Gene Ther* 2003;10:451-456
- 11 Sun Y, Peng K, Lecanda J, Schmitz V, Barajas M, Qian C, Prieto J. In vivo gene transfer of CD40 ligand into colon cancer cells induces local production of cytokines and chemokines, tumor eradication and protective antitumor immunity. *Gene Ther* 2000;7:1467-1476
- 12 Loskog A, Totterman TH, Bohle A, Brandau S. In vitro activation of cancer patient-derived dendritic cells by tumor cells genetically modified to express CD154. *Cancer Gene Ther* 2002;9:846-853
- 13 Loskog A, Bjorkland A, Brown MP, Korsgren O, Malmstrom PV, Totterman TH. Potent antitumor effects of CD154 transduced tumor cells in experimental bladder cancer. *J Urol* 2001;166:1093-1097
- 14 Hussain SA, Ganesan R, Hiller L, Murray PG, el-Magraby MM, Young L, James ND. Proapoptotic genes BAX and CD40L are predictors of survival in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Cancer* 2003;88:586-592
- 15 Kimura T, Ohashi T, Kikuchi T, Kiyota H, Eto Y, Ohishi Y. Antitumor immunity against bladder cancer induced by ex vivo expression of CD40 ligand gene using retrovirus vector. *Cancer Gene Ther* 2003;10:833-839
- 16 Schmitz V, Barajas M, Wang L, Peng D, Puarte M, Prieto J, Qian C. Adenovirus-mediated CD40 ligand gene therapy in a rat model of orthotopic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2001;34:72-81
- 17 Yanagi K, Nagayama Y, Nakao K, Saeki A, Matsumoto K, Icshikawa T, Ishikawa H, Hamasaki K, Ishii N, Eguchi K. Immuno-gene therapy with adenoviruses expressing fms-like tyrosine kinase 3 ligand and CD40 ligand for mouse hepatoma cells in vivo. *Int J Oncol* 2003;22:345-351
- 18 Friedlander PL, Delaune CL, Abadie JM, Touos M, La Cour J, Marrero L, Zhong Q, Kolls JK. Efficacy of CD40 ligand gene therapy in malignant mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:321-330
- 19 Yamaguchi H, Tanaka F, Sadanaga N, Ohta M, Tnoue H, Mori M. Stimulation of CD40 inhibits Fas- or chemotherapy-mediated apoptosis and increases cell motility in human gastric carcinoma cells. *Int J Oncol* 2003;23:1697-1702
- 20 Peter I, Nawathe M, Kamarashev J, Odermatt B, Mezzacasa A, Hemini S. Immunotherapy for murine K1735 melanoma: combinatorial use of recombinant adenovirus expressing CD40L and other immunomodulators. *Cancer Gene Ther* 2002;9:597-605
- 21 Machey MF, Wang Z, Eichelberry K, Germain RN. Distinct contributions of different CD40 TRAF binding sites to CD154-induced dendritic cell maturation and IL-12 secretion. *Eur J Immunol* 2003;33:779-789
- 22 Onaitis MW, Kalady MF, Emanis Abdel-Wahab Z, Tyler DS, Pruill SK. CD40 ligand is essential for generation of specific cytotoxic T cell responses in RNA-pulsed dendritic cell immunotherapy. *Surgery* 2003;134:300-305
- 23 Sato T, Terai M, Yasuda R, Watanabe R, Berd D, Mastrangelo MJ, Hasumi K. Combination of monocyte-derived dendritic cells and activated T cells which express CD40 ligand: a new approach to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:53-61

World Journal of Gastroenterology 稿件来源及论文资助情况

随着我国科学整体水平的提高，质量较高的论文逐年增加，来自名牌大学、研究院所，特别是具有良好科学记录的实验室、课题组和科学家的论文增长幅度较大。2003-04-01/2003-10-01以来《*World Journal of Gastroenterology, WJG*》共收到论文618篇，其中国内论文501篇(81.06%)，国际论文117篇(18.93%)。*WJG* 2003年1-10期共发表论文521篇，其中文献综述21篇，食管癌27篇，胃癌54篇，肝癌65篇，大肠癌39篇，病毒性肝炎46篇，幽门螺杆菌20篇，基础研究115篇，临床研究62篇，研究快报62篇，病例报告8篇，读者来信2篇。发表国内论文450篇(86.37%)，发表国际论文71篇(13.62%)。作者共2949人，国际作者占14.41%，国内作者占85.90%。发表论文分布34个国家和地区，包括阿根廷、澳大利亚、巴基斯坦、巴西、比利时、波兰、丹麦、德国、法国、芬兰、韩国、荷兰、加拿大、克罗地亚、美国、南非、南斯拉夫、日本、瑞典、瑞士、沙特阿拉伯、泰国、土耳其、西班牙、希腊、新加坡、匈牙利、伊朗、意大利、印度、英国、中国、中国台湾、中国香港。基金资助论文292篇(56.04%)，各项目基金论文共440篇(84.45%)，其中国际基金论文25篇(4.79%)，国家973、863、国家自然科学基金资助论文180篇(34.54%)，部、省级基金资助论文235篇(45.10%)。*WJG* 2002年共发表论文226篇，分布为26个地区，国内论文占93.36%，国际论文占6.63%，基金论文占60.61%。*WJG* 2001年共发表论文173篇，分布20个地区，112个机构，国际论文占35%，基金论文占55%。*WJG* 2000年共发表论文205篇，基金论文占50%。*WJG* 1999年共发表论文144篇，分布20个地区，100个机构，国际论文占23%，基金论文占50%。*WJG* 1998年共发表论文183篇，11个地区分布，国际论文占9.84%，基金论文占59.56%。

树舌多糖对小鼠 HepA P16 P27 Rb 基因表达的影响

王 玉, 于英君, 徐广有, 王 璐, 周 丽

王玉, 齐齐哈尔医学院生物遗传教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161042
徐广有, 齐齐哈尔医学院微形态教研室 黑龙江省齐齐哈尔市 161042
周丽, 齐齐哈尔医学院中心实验室 黑龙江省齐齐哈尔市 161042
于英君, 黑龙江中医药大学生化教研室 黑龙江省哈尔滨市 150040
王璐, 哈尔滨医科大学国外医学遗传学编辑部 黑龙江省哈尔滨市 150086
王玉, 女, 1970 生, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 汉族, 2001 年黑龙江中医药大学硕士, 副教授, 主要从事肿瘤遗传学研究
黑龙江省教育厅资助课题, No. 10511129
黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助计划, No. 1054G070
项目负责人: 王玉, 161042, 黑龙江省齐齐哈尔市, 齐齐哈尔医学院生物遗传教研室, wyfr@0451.com
电话: 0452-6731171
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-03-18

Influence Of Ganoderma applanatum polysaccharide on tumor suppressor genes P16, P27 and Rb in mice

Yu Wang, Ying-Jun Yu, Gang-You Xu, Lu Wang, Li Zhou

Yu Wang, Gang-You Xu, Li Zhou, Department of Biology and Genetics, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161042, Heilongjiang Province, China
Ying-Yun Yu, Department of Biochemistry, Heilongjiang Traditional Medical University, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China
Lu Wang, Editorial Department of Foreign Medical Sciences in Genetics, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China
Supported by Education Bureau of Heilongjiang Province, No.10511129, and Promoting Project of Excellent Teachers' Innovative Abilities in Colleges and Universities of Heilongjiang Province, No.1054G070
Correspondence to: Yu Wang, Qiqihar Medical College, Qiqihar 161042, Heilongjiang Province, China. wyfr@0451.com
Received: 2004-01-15 Accepted: 2004-03-18

Abstract

AIM: To probe into the underlying mechanism of Ganoderma applanatum polysaccharide against cancer.

METHODS: By immunohistochemistry and ELISA, we detected the expression of tumor suppressor gene P16, P27 and Rb in tumor tissues and blood serum respectively; By electron microscopy, we observed whether the apoptotic body existed or not in the tumor tissues.

RESULTS: After the treatment of Ganoderma applanatum polysaccharide, there was obvious difference in the quantities of P16, P27 and Rb genes expression between the experimental and control groups ($P < 0.01$), and there was a negative correlation of P16 and P27 expression with that of Rb ($r = -0.094$, $r = -0.446$). We observed the existence of apoptotic body in the tumor cells in the experimental group under electron microscope.

CONCLUSION: By activating tumor suppressor gene, Ganoderma applanatum polysaccharide can control the growth of tumor and accelerate the tumor cell apoptosis.

Wang Y, Yu YJ, Xu GY, Wang L, Zhou L. Influence of Ganoderma applanatum polysaccharide on tumor suppressor genes P16, P27 and Rb in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1353-1356

摘要

目的: 探讨树舌多糖抗肿瘤作用的机制。

方法: 通过免疫组化、ELISA 法分别测定瘤体和血清中抑癌基因 P16, P27, Rb 表达蛋白的量; 通过透射电镜观察凋亡小体是否存在。

结果: 树舌多糖作用后 P16, P27, Rb 基因表达蛋白的量与盐水组有差异具有统计学意义, 免疫组化结果: $^bP < 0.01$, $vs (1)(2); ^aP < 0.05$, $vs (2)(3); ^dP < 0.01$, $vs (3)$. ELISA 结果: $^aP < 0.05$, $vs (3)$; $^bP < 0.01$, $^cP < 0.05$, $vs (4)$; $^dP < 0.01$, $vs (3)(4); ^fP < 0.01$, $vs (4); ^gP < 0.05$, $^hP < 0.01$, $vs (3)$. 且 P16, P27 表达的量与 Rb 呈负相关 $r = -0.094$ (1), $r = -0.446$ (1), 再有观察到凋亡小体的存在。

结论: 树舌多糖通过激活抑癌基因, 抑制肿瘤的生长促进肿瘤细胞凋亡。

王玉, 于英君, 徐广有, 王璐, 周丽. 树舌多糖对小鼠 HepA P16 P27 Rb 基因表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1353-1356
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1353.asp>

0 引言

肿瘤细胞增生涉及细胞周期, 抑癌基因的主要机制之一就是使细胞分裂阻滞于细胞周期的某一时相 G₁ 期, 从而抑制细胞的异常增生。树舌多糖抑瘤效果显著^[1], 对小鼠瘤细胞 rDNA^[2] 的表达和骨髓细胞 SCE^[3] 都有影响而且差异显著, 并且树舌多糖不仅对小鼠 HepA 瘤细胞的蛋白质表达, 而且对血清蛋白表达也有影响^[4]。说明树舌多糖抗肿瘤作用是从基因水平发挥作用的。另外, 树舌多糖的抑瘤作用从免疫角度也进行了研究, 促进 HepA 瘤细胞 TNF 的表达, 提高机体的免疫力^[5]。因此, 我们将要探讨树舌多糖作用后抑癌基因的表达及其作用途径。

1 材料和方法

1.1 材料 可移型小鼠腹水型肝癌(HepA), 由黑龙江省肿瘤研究所引进, 于无菌条件下取父带瘤小鼠的肿瘤细胞 $2 \times 10^7/L$, 以 0.2 mL 接种于小鼠右前肢腋窝外皮下, 阳性率 100%。实验选用昆明种小白鼠雄性, 质量 $20 \pm 2 g$ 。将新接种的小白鼠随机分 3 组。接种瘤株 6 h 后用药, 第 1 组 肌肉注射树舌多糖; 第 2 组 肌肉注射猪苓多糖; 第 3 组 肌肉注射盐水, 肌肉注射每天 1 次, 第 4 组 为正常空白对照组。连续给药 7 d, 晚禁食 12 h

后取材. P16, P27, Rb 等 ELISA 试剂盒购于 ABCAM 公司. 包被液: 0.015 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液, 含 0.2 g/L NaN₃, 20 mL/L 的牛血清白蛋白, 4 ℃保存不超过 2 wk. 洗涤缓冲液: 0.01 mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液, 含 0.5 g/L Tween20, 0.2 g/L NaN₃, 4 ℃保存不超过 2 wk. 底物溶液: 0.1 mol/L pH5 磷酸盐 - 柠檬酸缓冲液, 含邻苯二胺 (OPD Sigma 公司) 0.4 g/L, 4 ℃保存不超过 2 wk. 临用前加 300 mL/L H₂O₂ 1.5 mL/L. 终止液: 2 mol/L 硫酸. 酶标仪: 荷兰产 MultiSkan Ascent. 自动洗板机: 荷兰产 Wellwash 4MK2. P16, P27, Rb 等免疫组化试剂盒购于福州迈新试剂公司

1.2 方法 ELISA 法^[6] 采集眼血, 静置 20 min 后离心收集血清. 紫外 96 孔酶标板 距紫外灯高度 10 cm, 时间 20 min, 酶标板处理后, 在室温下冷却并使臭氧散去. 一块板同时作 3 个指标的检测, 向每个孔中分别加抗 P16, 抗 P27, 抗 Rb (1:100) 50 μL 混匀, 加盖封板纸, 4 ℃过夜, 第 2 d 取出, 洗板机自动洗板 5 min × 3 次. 加入血清(1:4) 50 μL 混匀加盖封板纸, 37 ℃培养箱 2 h 取出, 洗板机自动洗板 5 min × 3 次. 加入二抗(1:600) 50 μL 混匀, 加盖封板纸, 37 ℃培养箱 2 h, 洗板机自动洗板 5 min × 3 次. 加入底物溶液 50 μL 混匀加盖封板纸, 室温、暗处放置 20 min 后, 加硫酸终止液 50 μL 终止酶促反应. 酶标板放在酶标仪下 492 nm 波长测定. 另断髓法处死小鼠, 取瘤体一部分做树脂包埋快, 另一部分做石蜡包埋快. 免疫组化采用石蜡切片, 按说明书操作, DAB 显色, 透明封片. 然后利用多媒体图像分析系统进行统计分析. 树脂包埋块, 超薄切片, 铀铅双染色后, 在投射电镜下观察凋亡细胞、凋亡小体.

统计学处理 采用 SPSS 统计学软件分析

2 结果

树舌多糖组与猪苓多糖组无差异, 与盐水组差异显著, 与空白组无差异; 猪苓多糖组与盐水组有差异, 与空白组无差异; 盐水组与空白组差异显著(表 1).

表 1 小鼠 HepA 基因表达 ELISA 实验(mean±SD, n = 7, A)

| 基因 | 树舌多糖组(1) | 猪苓多糖组(2) | 盐水组(3) | 空白组(4) |
|-----|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| P16 | 0.379 ± 0.051 ^{abm} | 0.390 ± 0.067 ^{cb} | 0.305 ± 0.058 ^c | 0.243 ± 0.039 |
| P27 | 0.273 ± 0.010 ^{dn} | 0.254 ± 0.028 ^f | 0.208 ± 0.032 ^f | 0.112 ± 0.007 |
| Rb | 0.251 ± 0.070 ^h | 0.337 ± 0.089 ^g | 0.454 ± 0.107 | 0.269 ± 0.089 ^g |

^aP < 0.05, vs (3); ^bP < 0.01, ^cP < 0.05, vs (4); ^dP < 0.01, vs (3)(4); ^eP < 0.01, vs (4); ^fP < 0.05, ^gP < 0.01, vs (3). ^mr = -0.094(1), ⁿr = -0.446(1), ^or = 0.038(2), ^pr = 0.166(2); ^qr = 0.403(3), ^rr = -0.035(3); ^sr = -0.743, (4)^tr = 0.751(4).

免疫组化显示树舌多糖组与盐水组差异显著, 与猪苓多糖组有差异; 猪苓多糖组与盐水组有差异. 空白组由于这些蛋白的半衰期短没有检测到. 总之树舌多糖组 P16 高表达, P27 高表达, Rb 低表达; 盐水组 P16 低表达, P27 低表达, Rb 高表达(表 2, 图 1, 2).

投射电镜下观察显示膜相结构完整, 可见凋亡小体图 1. 内膜系统结构清楚, 核固缩, 染色质周边凝集现象为凋亡细胞图 2. 盐水组线粒体肿胀图 3.

表 2 小鼠 HepA 基因表达免疫组化结果(mean±SD, n = 6, A)

| 基因 | 树舌多糖组(1) | 猪苓多糖组(2) | 盐水组(3) | 空白组(4) |
|-----|----------------------------|----------------------------|----------------|--------|
| P16 | 10.766 ± 1.591 | 8.090 ± 1.379 ^b | 4.780 ± 1.019 | 无 |
| P27 | 9.133 ± 1.558 ^a | 8.09 ± 1.626 ^d | 4.785 ± 0.962 | 无 |
| Rb | 4.680 ± 0.823 ^d | 6.693 ± 1.384 ^b | 11.928 ± 4.985 | 无 |

^aP < 0.01, vs (1)(2); ^bP < 0.05, vs (2)(3); ^dP < 0.01, vs (3).

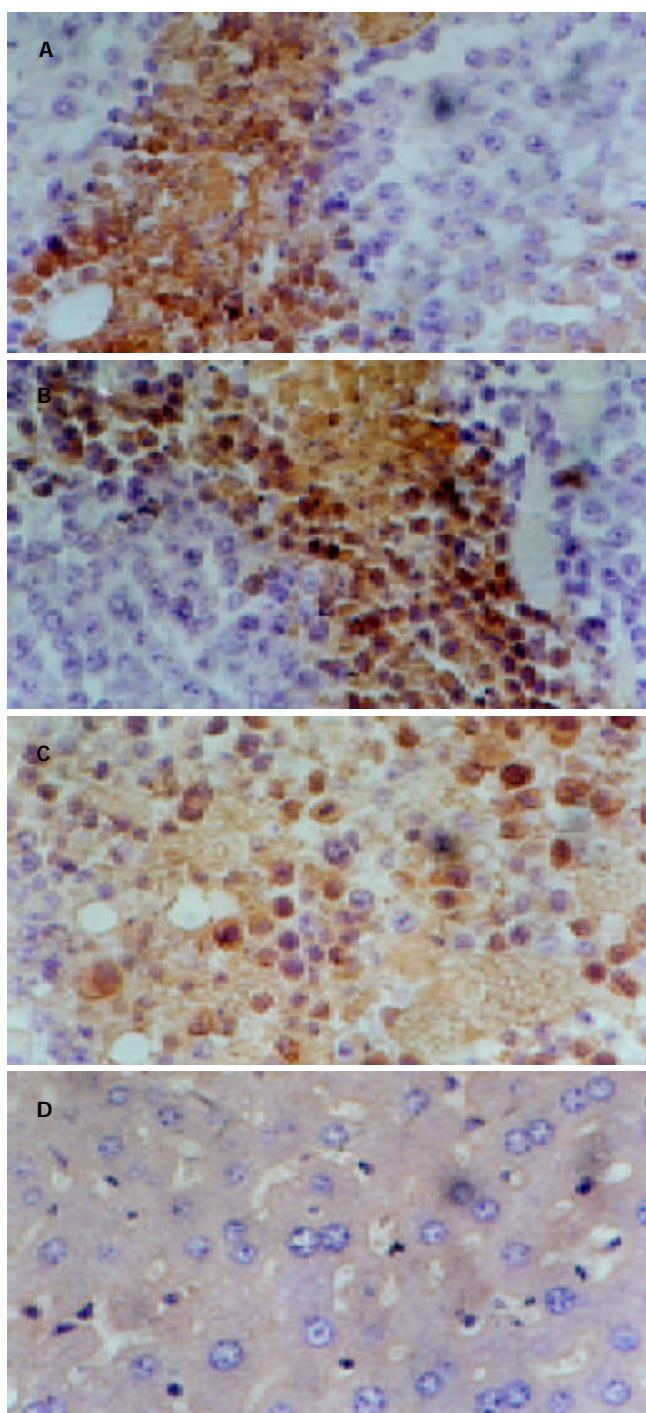


图 1 小鼠 HepA Rb 表达 SABC × 400. A: 树舌多糖组阳性; B: 猪苓多糖组阳性; C: 盐水组阴性; D: 空白组阴性.

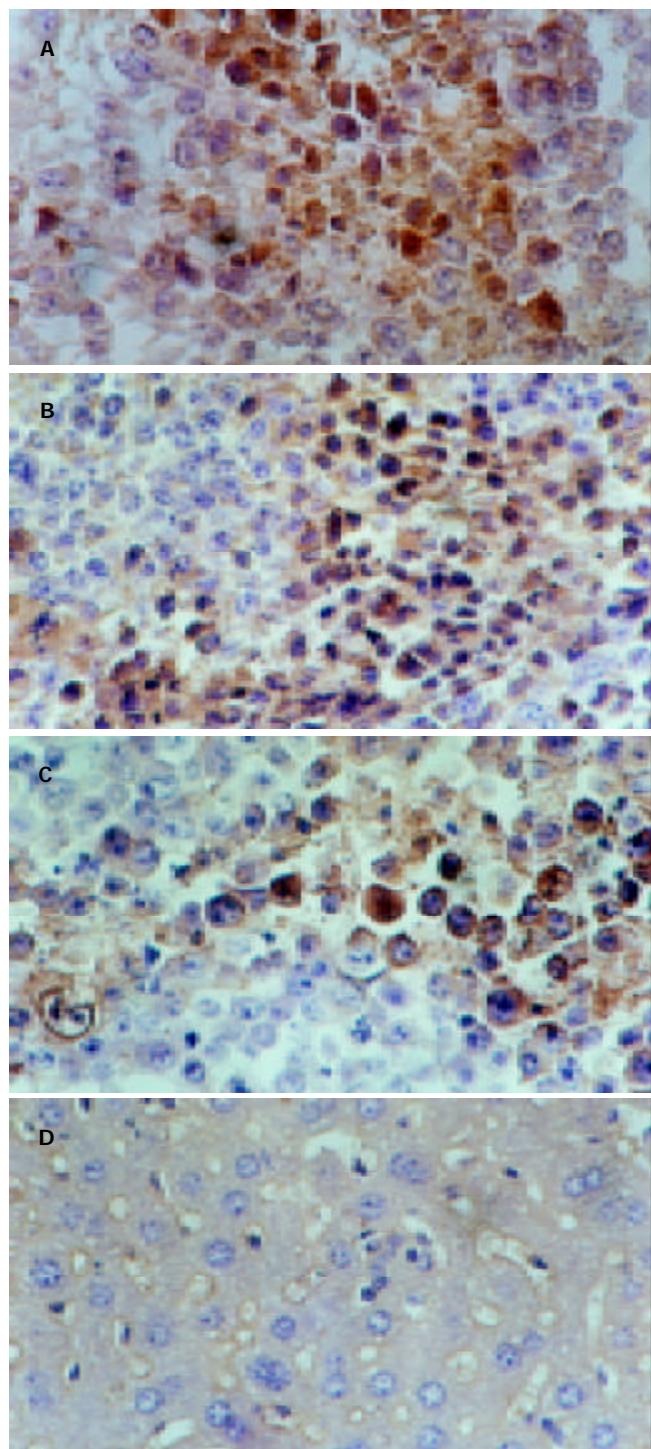


图2 小鼠 HepA P16 表达 SABC \times 400. A: 树舌多糖组阳性; B: 菊粉组阳性; C: 盐水组阳性; D: 空白组阴性.

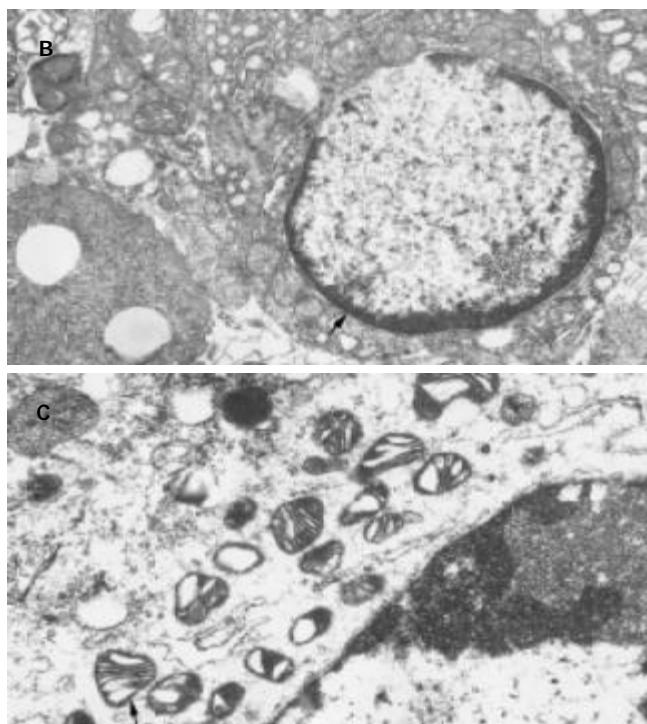


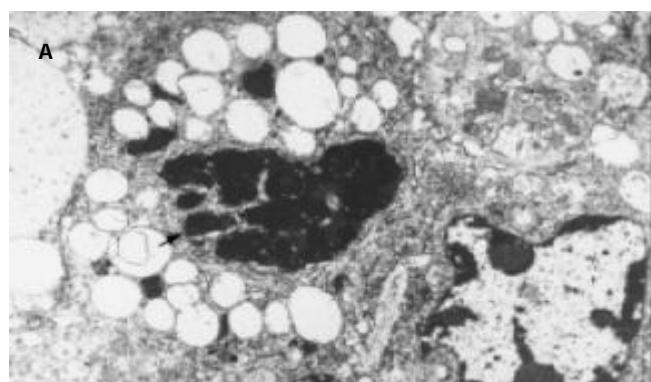
图3 小鼠 HepA 超微结构 EM \times 6 000. A: 树舌多糖组凋亡小体; B: 树舌多糖组凋亡细胞; C: 盐水组线粒体肿胀.

3 讨论

本实验采用 ELISA 法、免疫组化法不同的方法测定树舌多糖作用后瘤细胞及血清中抑癌基因 P16, P27, Rb 表达蛋白的量. 发现树舌多糖的抗肿瘤作用是通过基因水平发挥作用的, 它激活抑癌基因 P16, P27, Rb, 并且 P16, P27 表达的量与 Rb 呈负相关, 这与其他肿瘤的一些报道的相一致^[7]. Rb 在细胞核中以失活的磷酸化或活化的磷酸化形式存在, 活化的 Rb 蛋白对于细胞从 G₀-G₁ 期, 进入 S 期有抑制作用. Rb 基因使肿瘤细胞逆转以及抑制细胞增生的作用机制尚不十分清楚, 但目前认为 Rb 在细胞凋亡中的调节作用可能是其中之一^[8, 15].

P27 作为一种细胞周期抑制因子, 其功能已广为接受, Surendra et al 认为 P27 蛋白定位在细胞核是其抑制肿瘤进展的前提条件, 而出现在细胞质 P27 蛋白表达与患者生存期缩短有关. P27 蛋白水平主要在转录后的蛋白质翻译和降解阶段进行调节. 正常情况下, 当细胞处于 G₀/G₁ 期时, P27 蛋白表达增高, 进入 S 期则下降. P27 的主要功能是抑制细胞的生长, 当 P27 表达下降或缺失时, 可导致基因组的不稳定, 甚至肿瘤的发生^[11].

本实验观察到树舌多糖作用后, 通过 PAGE 电泳不仅在瘤细胞中检测到这些蛋白而且也同时在血清中检测到 P16, P27, Rb 基因表达的蛋白, 通过免疫组化, ELISA 法判断 P16, P27 基因表达蛋白水平增加, 而 Rb 基因表达蛋白水平减少. 由于免疫组化不能客观地反映结果, 它只能从定性角度说明, 而 ELISA 却能从 ng 水平进行定量说明, 能真实的反映结果, 所以我们认为树舌多糖的抗肿瘤作用是从基因水平发挥作用的. 它刺激



抑癌基因P16, P27表达增加, P16是肿瘤抑制基因,与细胞周期密切相关,在他与Rb, Cyclin D₁/CDK₄共同组成的细胞增生调控中, P16作为Cyclin D₁/CDK₄复合物的特异性抑制而发挥作用。Rb作为CDK₄的重要底物之一,是参与细胞周期调控的又一重要因素,在正常细胞中存在一个负反馈网络,即磷酸化的Rb增加时,可引起P16蛋白表达增强,增加的P16与Cyclin D₁竞争结合CDK₄,而抑制CDK₄的活性,防止Rb过度磷酸化,从而阻断Cyclin D₁与Rb介导的转录因子E₂F活化使细胞免于增生周期调节失控,起到抑制瘤细胞生长的作用。由于P16蛋白作用的靶目标过于单调,不可能完全控制肿瘤细胞的增生,而P27的独特功能在于其几乎可以抑制所有的Cyclin-CDK复合物的激酶活性,其中包括Cyclin E2-CDK,而Cyclin E2可能是G₁期的限速因子^[9]。P27可以阻止Rb的磷酸化,使Rb以磷酸化和非磷酸化的形式积累,从而影响周期的进程,同时P27和Rb起协同作用,通过整合调节信号,而抑制肿瘤的发生^[10]。Hoshino et al在研究中发现P27表达上调对于肿瘤细胞外信号调节激酶通路性的特异性阻制是必需的,而该阻制又会导致肿瘤细胞完全生长抑制^[12],所以说树舌多糖的抗肿瘤作用是从基因水平发挥作用的,激活抑癌基因而达到抗肿瘤作用的。

另外树舌多糖的抗肿瘤作用是通过促进肿瘤细胞凋亡来实现的。P16, P27, Rb野生型蛋白量低、半衰期短,用一般的免疫组化法不能检出,应用ELISA法可以检测到。在复杂的人体“基因网络”中, P16基因很可能是与其他基因相互作用,共同参与细胞凋亡调控等其他生命现象。单基因、单作用是不符合大多数生命现象调控本质的,尤其是真核高等生命^[13]。P16诱导肿瘤细胞凋亡的原因可能是P16基因通过调控细胞周期,协同其他凋亡因子共同作用的结果,P16基因G₁期阻断而发挥作用的,P16基因通过降低Rb的表达,使肿瘤细胞增加了对凋亡的敏感性,如再行P53诱导肿瘤细胞可发生凋亡。Masahiro首次在人类肿瘤中证实P27表达与凋亡之间有显著的相关性,他在研究非早期胃癌中肿瘤细胞的P27的表达与细胞凋亡关系时发现P27表达下降,凋亡率也下降,这与本研究相一致,P27表达增加,凋亡细胞增加。P27促进凋亡的功能可能与控制肿瘤的进展相关^[14]。

总之,本实验只是探讨了树舌多糖作用后抑癌基因P16, P27, Rb表达蛋白的量发生了变化,但是通过

什么途径引起的这些变化,基因结构本身有无变化,再有促进肿瘤细胞凋亡的过程中还有哪些基因参与有待进一步研究。所以本课题的下一个研究内容是抑癌基因P16, P27, Rb与MAPK及MAP的关系以及对细胞骨架的影响,再有抑癌基因的调节作用主要是通过转录水平进行的,所以对P16, P27, Rb的启动子等序列的检测也是下一个工作重点。

4 参考文献

- 1 于英君, 杜家忠, 刘丽波, 孙巧红, 齐彦, 刘伟华. 树舌多糖对小鼠HepA癌细胞³H-TdR和[6-³H]-Glucose掺入的影响. 中医药信息 1997;3:46
- 2 王玉, 徐广有, 刘枫, 陈平, 杜维霞. 树舌多糖瘤细胞AgNOR表达的影响. 齐齐哈尔医学院学报 2001;22:1105-1106
- 3 王玉, 潘洪明, 刘枫. 树舌多糖对HepA小鼠骨髓细胞染色体SCE影响的研究. 中国优生与遗传杂志 2002;10:42
- 4 王玉. 树舌多糖对HepA小鼠瘤细胞蛋白质表达影响的研究. 医学研究通讯 2003;32:34-35
- 5 潘洪明, 于英君. 树舌多糖猪苓多糖对小鼠HepA瘤细胞TNF- α 表达的影响. 中国基层医药 2002;9:486-487
- 6 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术. 第2版. 北京: 高等教育出版社, 1997:364-371
- 7 Howard CM, Claudio PP, De Luca A, Stiegler P, Jori FP, Safdar NM, Caputi M, Khalili K, Giordano A. Inducible pRb2/p130 expression and growth-suppressive mechanisms: evidence of a pRb2/p130,p27^{Kip1}, and cyclin e negative feedback regulatory loop. *Cancer Research* 2000;60:2737-2744
- 8 凌治萍. 细胞生物学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:238-241
- 9 Claudio PP, Stiegler P, Howard CM, Bellan C, Minimo C, Tosi GM, Rak J, Kovatich A, De Fazio P, Micheli P, Caputi M, Leoncini L, Kerbel R, Giacomo GG, Giordano A. RB2/P130 Gene-enhanced expression down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in vivo. *Cancer Research* 2001;61:462-468
- 10 Park MS, Rosai J, Nguyen HT, Capodice P, Cordon-Cardo C, Koff A. p27 and Rb are on overlapping pathways suppressing tumorigenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6382-711
- 11 谢启超, 胡义德. P27研究进展. 国外医学肿瘤学分册 2003;30:48-50
- 12 Hoshino R, Tanimura S, Watanabe K, Kataoka T, Kohno M. Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G1 cell cycle arrest and apoptosis in tumor cells in which the pathway is constitutively activated: up-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem* 2001;276:2686-2692
- 13 Van Erk MJ, Teuling E, Staal YC, Huybers S, Van Bladeren PJ, Aarts JM, Van Ommen B. Time- and dose-dependent effects of curcumin on gene expression in human colon cancer cells. *J Carcinog* 2004;3:8
- 14 Ohtani M, Isozaki H, Fujii K, Nomura E, Niki M, Mabuchi H, Nishiguchi K, Toyoda M, Ishibashi T, Tanigawa N. Impact of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 and apoptosis in tumor cells on the overall survival of patients with non-early stage gastric carcinoma. *Cancer* 1999;85:1711-1718
- 15 Cullinan AE, Brandt CR. Cytokine induced apoptosis in human retinoblastoma cells. *Mol Vis* 2004;10:315-22

丹参含药血清对肝星状细胞增生的抑制作用

谈 博, 张奉学, 刘 妮, 郭兴伯

谈博, 张奉学, 刘妮, 郭兴伯, 广州中医药大学热带医学研究所
广东省广州市 510405

谈博, 男, 1974-07-20 生, 湖北省武汉人, 汉族人, 1997 年北京中医药大学
本科毕业, 2002 年广州中医药大学博士毕业, 助理研究员, 主要从事肝炎、
肝纤维化的研究。

广东省自然科学基金资助项目, No. 000347

项目负责人: 张奉学, 510405, 广东省广州市机场路 12 号, 广州中医药大学
热带医学研究所。 doczhang@tom.com

电话: 020-36585461 传真: 020-86373516

收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-02-13

Inhibitory effect of Danshen-containing serum on proliferation of HSC-T6 cells

Bo Tan, Feng-Xue Zhang, Ni Liu, Xin-Bo Guo

Bo Tan, Feng-Xue Zhang, Ni Liu, Xin-Bo Guo, Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Supported by the Guangdong Natural Science Foundation, No. 000347

Correspondence to: Dr. Feng-Xue Zhang, Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 12 Airport Rd., Guangzhou, 510405, Guangdong Province, China. doczhang@tom.com

Received: 2004-02-13 Accepted: 2004-03-04

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of Danshen-containing serum on the proliferation of HSC-T6 cells and to construct anti-hepatitis-fibrosis *in vitro* system for screening potential herbal drugs.

METHODS: The proliferation status of HSC-T6 cells was evaluated by calculating its growth curve and cloning efficiency. HSC-T6 cells were exposed to different volume fractions of Danshen-containing serum, including 80%, 40%, 20%, 10%, and 5% of original serum, and its inhibitory effect and dose-effect relationship were investigated.

RESULTS: The population doubling time of HSC-T6 was 10.57 hours and its cloning efficiency was 82.4%, which showed that this cell line had good capacity of activity and proliferation for tests. Ranging from 5% to 80% of original concentration, Danshen-containing serum had the dose-dependent inhibitory effect on HSC-T6 cell (analysis by linear regression, coefficient of correlation=0.9 487).

CONCLUSION: The Danshen-containing serum has significantly inhibitory effect on proliferation of HSC-T6 cells in a dose-dependent manner.

Tan B, Zhang FX, Liu N, Guo XB. Inhibitory effect of Danshen-containing serum on proliferation of HSC-T6 cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1357-1360

摘要

目的: 研究丹参含药血清对肝星状细胞(HSC)的增生抑制作

用, 并探讨中药抗肝纤维化筛选平台的建立。

方法: 测定HSC-T6细胞的细胞生长曲线和克隆形成率, 观察其细胞增生状况。取原始血清体积分数的 80%, 40%, 20%, 10%, 5% 的丹参含药血清作用于 HSC-T6 细胞, 观察其增生抑制效应及量效关系。

结果: HSC-T6 细胞的细胞群体倍增时间为 10.57 h, 克隆形成率为 82.4%, 说明该转化细胞系的活力较好, 增生能力较强。在 5-80% 浓度范围之内, 丹参含药血清抑制 HSC 细胞增生作用呈剂量依赖性(经直线回归分析, 相关系数 $r = 0.9487$)。

结论: 丹参含药血清能明显抑制 HSC-T6 细胞增生, 呈剂量依赖性。

谈博, 张奉学, 刘妮, 郭兴伯. 丹参含药血清对肝星状细胞增生的抑制作用. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1357-1360

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1357.asp>

0 引言

肝星状细胞的增生是肝纤维化病理发生发展过程中非常重要的关键环节。有体外实验表明^[1-2], 活血化瘀中草复方对于肝星状细胞增生有抑制作用, 这部分说明了其体内抗肝纤维化的作用机制。但是, 由于中药复方组分繁多, 不易分清到底是哪些药物起主导作用。因此, 我们从丹参的单药入手^[3-4], 借助现代血清药理实验方法, 探讨其对肝星状细胞增生的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM 培养基(高糖型)、新生小牛血清、胰蛋白酶及 HEPES 皆购自美国 Gibco 公司; L- 谷氨酰胺及 EDTA, Amresco 进口分装, 上海生工生物工程公司; MTT, 美国 sigma 公司。含药血清制备, 取 SD 大鼠, ♂, 质量 275 ± 15 g, 合格证号: 医实动第 26-2001A003 号, 由广州中医药大学实验动物中心提供。丹参 1 000 g, 购自广州中医药大学第一附属医院, 水煎浓缩成 100% 浓度(即 1 kg/L)。参照临床常用药量, 以 10 g/kg 剂量给大鼠灌药^[5-6], 连续 3 d, 2 次/d; 于第 3 d 给药后 1 h 用 100 mL/L 水合氯醛麻醉动物(剂量为 3.5 mL/kg); 用 750 mL/L 酒精消毒后仰卧位固定, 无菌条件下分离一侧颈总动脉, 注入肝素 50 U/kg, 用 7 号头皮针头插入颈总动脉进行采血, 离心分离血清(3 000 r/min × 20, 4 °C), 经 56 °C, 30 min

灭活后，再以 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 及 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 双层微孔滤膜过滤除菌后 -20°C 保存备用。

1.2 方法^[7] 肝星状细胞HSC-T6细胞株由上海中医药大学肝病研究所徐列明教授惠赠，以DMEM(高糖)培养液(含100 mL/L胎牛血清)培养2-3 d可以传代，中间换液1次。传代时吸出旧培养液，用DMEM(高糖)培养液清洗细胞一遍，加入2.5 g/L胰蛋白酶消化至细胞收缩，立即加入含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液5 mL，终止消化，吹打贴壁细胞，使成细胞悬液，然后按1:2比例接种于培养瓶内，每瓶再加含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液10 mL，置培养瓶于 37°C ，50 mL/L CO₂培养，8 h即可贴壁生长；2-3 d后细胞60-70%铺满瓶底即可再次传代，传至3-4代，细胞生长活跃，增生明显即可用于实验。取待测生长状态良好细胞，增长至接近汇合时，向培养瓶内加1 mL 2.5 g/L胰蛋白酶，温箱 37°C 消化，至细胞接近脱离瓶壁前吸出消化液，加入新的培养液，轻轻吹打制备成细胞悬液，并计数；取24孔培养板，接种等量细胞悬液21孔，分7组，每组3孔；从实验第2 d起，依次计数检测各组的细胞总数，并计算各组的均值，直至第7组结束；根据记录绘制细胞生长曲线，并按下列表公式计算细胞群体倍增时间(DT)= $t/\log_2 \left(\frac{N_t}{N_0} \right)$ 。t代表培养时间，N₀及N_t分别代表接种后及培养t小时后的细胞数。

1.3 克隆形成率(cloning efficiency)的检测^[8] 取80-90%汇合的细胞，用2.5 g/L胰蛋白酶，温箱 37°C 消化，制备成单细胞悬液，并计数；根据细胞计数稀释成2个细胞/cm²(24孔板的底面积为2 cm²)的极低浓度，接种到24孔塑料培养板，置于培养箱培养(37°C ，50 mL/L CO₂)；细胞贴壁后，记录每孔内实际接种的细胞数；隔24 h观察细胞克隆是否形成；待细胞克隆形成，终止培养，镜下计算克隆数。计算克隆形成率：细胞克隆形成率=形成克隆数÷接种细胞数×100%。

1.4 MTT比色法测定HSC-T6细胞增生^[9] 实验分为正常血清对照组，80%给药血清组，40%给药血清组，20%给药血清组，10%给药血清组和5%给药血清组。将细胞以DMEM培养液(含100 mL/L小牛血清)调成 $5\times 10^9/\text{L}$ 的细胞悬液，接种于96孔培养板100 μL/孔。在 37°C ，50 mL/L CO₂条件下培养48 h，更换无血清的DMEM培养液，孵育12 h后，加入100 μL含药血清，每组设6个平行孔，每孔的总体积为200 μL。置 37°C ，50 mL/L CO₂，饱和条件下培养24 h，每孔加入400 mg/L的MTT溶液100 μL，继续培养4 h进行显色反应，可

见紫色甲臜颗粒。弃去MTT液，加1 kg/L DMSO100 μL， 37°C 静置10 min，待孔内甲臜颗粒完全溶解后置酶标仪上测570 nm波长处吸光度(A值)。并根据A值计算药物对细胞增生的抑制率(IE)= $1 - A_i/A_0$ 。其中，IE(inhibitory effect)表示药物对细胞增生抑制率，A_i表示某浓度下的吸光度值，A₀表示对照组细胞的吸光度值。

2 结果

2.1 HSC-T6的细胞生长曲线 HSC-T6细胞经台盼蓝染色计数，95%以上的细胞不着色，说明培养中的HSC-T6细胞成活率较高。细胞生长曲线有明显的增生迟滞期(0-48 h)；在指数增生期(48-72 h)计算细胞群体倍增时间为10.57 h；而且在72 h之后出现平台期，而且由于细胞的老化，甚至细胞数略有减少(84-96 h)。(图1)。

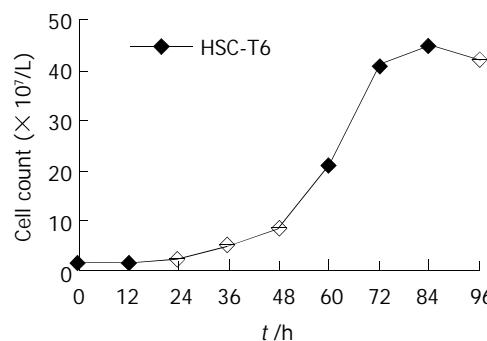


图1 HSC-T6细胞生长曲线。

2.2 克隆形成率 通过综合并计算4个复孔的接种细胞数和形成克隆的细胞数，得到HSC-T6细胞的克隆形成率为 $14/17=82.4\%$ 。说明该转化细胞系的活力较好，增生能力较强。

2.3 丹参含药血清对HSC-T6细胞增生的作用 在5-80%浓度范围之内，经直线回归分析得相关系数 $r=0.9487$ ，说明两个变量之间呈显著性正相关关系。丹参含药血清抑制HSC细胞增生作用呈剂量依赖性。经SPSS 10.0软件进行ANOVA分析，各剂量组的 A_{570} 值与对照组相比，均具有显著性差异($P < 0.05$ ，表1)。在5-80%这个浓度范围之内随着，丹参含药血清浓度的提高，细胞数有降低的趋势，即丹参含药血清抑制细胞增生的作用逐渐加强。若以抑制率(IE)作为纵坐标，以含药血清的对数浓度作为横坐标，作出量效曲线，可以更加清楚地看到其中的规律：丹参含药血清抑制HSC细胞增生活力呈明显剂量依赖性(图2)。

表1 丹参含药血清对HSC-T6细胞增生的影响

| | 培养液中丹参含药血清的体积分数 | | | | | 对照组 |
|------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 80% | 40% | 20% | 10% | 5% | |
| A ₅₇₀ | 0.76 ± 0.01 | 0.88 ± 0.07 | 0.93 ± 0.09 | 1.03 ± 0.02 | 1.13 ± 0.03 | 1.34 ± 0.05 |
| 抑制率 | 45.5% | 34.3% | 30.6% | 23.1% | 15.7% | - |

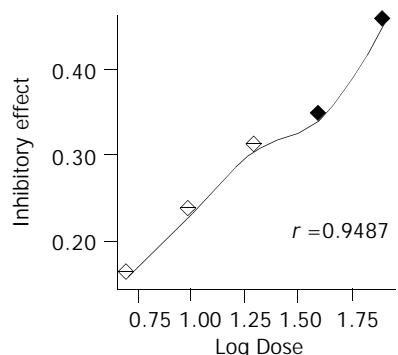


图2 丹参含药血清抑制HSC-T6细胞增生的量效曲线.

3 讨论

胶原代谢的异常和细胞外基质(ECM)构成变化是肝纤维化形成的主要特征，而有充足证据证明肝星状细胞是主要的ECM生成细胞，其激活和分泌活动增加是肝纤维化病理发生机制的重要环节^[10-11]。肝星状细胞的激活表现为复杂多样的表型，包括组织中显著的功能与病理改变，如细胞增生、纤维形成、细胞因子分泌紊乱及ECM降解等。尽管该领域的研究手段与方法已深入到分子生物学层次，但是抗肝纤维化药物对肝星状细胞增生的作用仍然是重点考察靶点之一^[12-13]。

基于中医辨证论治的精神，发挥中医药的传统优势，当前中医药抗肝纤维化的实验研究多采用临床验证有效的复方药物作为考察对象。其中多数复方具有活血化瘀功效：如中药复方丹参的长期治疗能使部分患者降低PⅢP和LN的水平至正常范围^[14]；扶正化瘀方能抑制胶原合成，促进胶原降解，恢复肝脏结构及功能，且抑制大鼠贮脂细胞和肝细胞增生和胶原生成率^[1,2,15]；血府逐瘀汤能抑制I、Ⅲ型胶原^[16]，抗纤方还可抑制HSC-LI90细胞TIMP-1的基因表达，从而促进胶原降解^[17-18]。另外，也有部分复方从清热利湿^[19]和疏肝软坚^[20-21]等多治则结合研究抗肝纤维化中药，如中药抗纤软肝颗粒可抑制PDGF诱导的HSC增生，并可能通过干扰Ras-MEK-MAPK信号通路发挥作用^[22-23]。但是，复方成分比较复杂，不易分清其针对某一特定模型的有效成分。因此，从中药单味药入手研究仍然有其积极意义。

在中药的体外研究引入血清药理学的研究方法，这使得能一定程度上克服了传统的中药体外研究方法中的某些弊病^[24-25]。传统体外研究方法中，将药物提取物直接加入细胞培养液中，并不能反映药物在体内代谢中药物有效成分发生的变化；另外，在体外细胞药理实验中，往往需要使用比色法检测有关药效和毒理学指标，而许多中药制剂中所含色素或多或少地干扰了实验结果，影响了实验的可靠性。由于中药的有效成分可能是中药本身的化学成分，也可能是他在炮制或提取过程中产生的中间产物，还可能是进入体内后的代谢产物，甚至可能是内源性物质的激活物，通过采集药物代谢后的含药血清，血清药理学方法就能够模拟药物成分经代谢转化后再作用于靶细胞的作用模式。同

时，药物血清保持了一般血清的物理性状，适宜细胞培养的环境，能较好地满足比色分析法的实验要求^[26]。

本研究中的丹参具有一系列重要药理作用，如其有效成分丹酚酸B在体外有抗炎、抗氧化和抑制HSC增生与胶原合成的作用^[27-28]，从丹参提取的单体IH764-3可诱导HSC凋亡^[29-30]。

我们以丹参含药血清作为施加因素，以HSC-T6细胞株为受试对象，并以HSC细胞增生作为效应指标。实验表明丹参含药血清能明显抑制HSC的细胞增生；而且这种效应呈剂量依赖性，即随着浓度的增加，其抑制增生的效应也越大。我们认为，以HSC-T6细胞增生作为效应指标和以中药含药血清作为样品所构建的中药抗肝纤维化体外细胞模型(药物筛选平台)具有所需样品量少，实验周期短，并且药物作用靶点(HSC-T6细胞增生)明确等特点。

4 参考文献

- 刘成, 刘成海, 刘平, 徐列明, 胡义扬. 扶正化瘀方抑制大鼠贮脂细胞增生的研究. 中国中医药科技 1997;4:97-101
- 季光, 洪嘉禾, 刘平, 徐列明, 刘成. 扶正化瘀方对原代培养肝细胞增生及胶原生成率影响的血清药理学研究. 中国中医药科技 1997;4:101-103
- 马学惠, 赵元昌, 尹镭, 韩德五. 丹参对肝纤维重吸收的作用. 中西医结合杂志 1988;8:161-163
- 胡义扬, 刘平, 刘成, 顾宏图, 徐列明, 刘成海, 季光. 丹参提取物对CCl₄和DMN诱导的大鼠肝纤维化的影响. 上海中医药杂志 1999;10:7-9
- 王力倩, 李仪奎, 符胜光, 付惠娣. 血清药理学方法研究探索. 中药药理与临床 1997;13:29-31
- 余黎, 王坚, 朱奎. 中药血清药理学研究中血清处理方法的探讨. 南京中医药大学学报(自然科学版) 2002;18:222-223
- Vogel S, Piantedosi R, Frank J, Lazar A, Rockey DC, Friedman SL, Blumer WS. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro. *J Lipid Res* 2000;41:882-893
- 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术. 第1版. 北京: 北京出版社, 1995:156-158
- 程宝鸾. 动物细胞培养技术. 第1版. 广州: 华南理工大学出版社, 2001:131-132
- Eng FJ, Friedman SL. Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G7-G11
- Senoo H. Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 2004;37:3-15
- Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001;5:315-334
- Pinzani M, Rombouts K. Liver fibrosis: from the bench to clinical targets. *Dig Liver Dis* 2004;36:231-242
- 王惠吉, 王宝恩. 中药复方丹参(861冲剂)治疗肝纤维化远期疗效观察. 中西医结合肝病杂志 1995;5:4-5
- 季光, 刘平, 洪嘉禾, 徐列明, 刘成. 扶正化瘀方药物血清对原代培养纤维肝细胞胶原生成及分泌白蛋白功能的影响. 中西医结合肝病杂志 1997;7:25-28
- 宋家武, 李绍白, 张文英. 血府逐瘀汤抗大鼠肝纤维化作用的研究. 中西医结合肝病杂志 1997;7:38-40
- Zhao G, Wang LT, Chen JJ. Effect of anti-fibrosis compound contained serum on procollagen Type I and IV, matrix metalloproteinase and its tissue inhibitor-1 gene expression in HSC-LI90 cell line. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2004;24:47-50
- Wang LT, Zhang B, Chen JJ. Effect of anti-fibrosis compound on collagen expression of hepatic cells in experimental liver fibrosis of rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:877-880
- 于世瀛, 贲长恩, 杨美娟, 赵丽云, 白锦雯. 清热利湿方药抗肝纤维化的形态学和免疫组织化学定量研究. 北京中医药大学学报 1997;20:28-30

- 20 顾立刚,王庆国,于世瀛,庞鹤.柴胡鳖甲汤对大鼠免疫损伤性肝纤维化的治疗作用.上海免疫学杂志 1998;18:25-26
- 21 Zhang G, Zhang FC, Wang TC, Liang KH. The effects of Chinese national medicine of Huoxueruanjian compound on SMAD signal in hepatic stellate cell and its significance. *Zhonghua Ganzhangbing Zaishi* 2004;12:213-215
- 22 周正,张赤志,陈婕,周萍.抗纤软肝冲剂药物血清对肝星状细胞增生的影响. 中药材 2001;24:809-810
- 23 杨玲,朱清静,笪邦红,张赤志.中药抗纤软肝颗粒抑制PDGF诱导的肝星状细胞MEK-1和c-fos表达.世界华人消化杂志 2004;12:347-350
- 24 杨彦芳,王玉芹.中药复方血清药理学方法规范化探讨.中国中西医结合杂志 2000;20:380-382
- 25 李仪奎.中药血清药理学实验方法的若干问题.中药新药与临床药理 1999;10:95-98
- 26 包金风,刘国卿.中药血清药理学的方法学研究概述.药学进展 2000;24:89-92
- 27 Liu P, Liu CH, Wang HN, Hu YY, Liu C. Effect of salvianolic acid B on collagen production and mitogen-activated protein kinase activity in rat hepatic stellate cells. *Acta Pharmacol Sin* 2002;23:733-738
- 28 Liu CH, Liu P, Hu YY, Xu LM, Tan YZ, Wang ZN, Liu C. Effects of salvianolic acid-A on rat hepatic stellate cell proliferation and collagen production in culture. *Acta Pharmacol Sin* 2000;21:721-726
- 29 Zhang XL, Liu L, Jiang HQ. Salvia miltiorrhiza monomer IH764-3 induces hepatic stellate cell apoptosis via caspase-3 activation. *World J Gastroenterol* 2002;8:515-519
- 30 Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan Decoction on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:511-514

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

• 消息 •

中国生物医学基金论文摘要网站免费开通

本刊讯 中国生物医学基金论文摘要是由世界胃肠病学杂志社研制的大型生物医学基金论文摘要数据库。该库收录自1995-2004年,国内生物医学期刊1191种发表的各类基金资助论文摘要155115条,其中国家基金资助的论文为70167条(45.23%),其他基金资助的论文为84948条(54.76%)。

1 本系统的功能

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

2 网址

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

3 论文摘要格式

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

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

鼻咽癌中染色体3p21区域一个表达下调的EST的鉴定

贺修胜,陈主初,田芳,肖志强,贺智敏,关勇军,李峰,何春梅,袁建辉.

湖南 长沙中南大学肿瘤研究所 410078

国家自然科学基金项目(39970287,30000188)

背景与目的:研究显示鼻咽癌细胞3p14-25存在高频率杂合性丢失位点。本研究拟寻找与筛选染色体3p21区域与鼻咽癌相关的表达序列标签(express ed sequence tag,EST),为定位候选克隆鼻咽癌相关新基因奠定基础。方法:充分利用网上的生物信息资源,采用定位查找ESTs,对ESTs进行同源性比较分析、筛选;运用逆转录PCR(reverse transcription-PCR,RT-PCR)方法,检测ESTs在鼻咽癌和正常鼻咽组织中的表达;并用Northern blot杂交方法,检测EST在人其他正常组织及肿瘤细胞系的表达状况。结果:在3p21区域筛选到一个在鼻咽癌中表达下调的EST(N31985),在60.00%(3/5)的鼻咽癌细胞株及47.06%(16/34)的鼻咽癌活检组织检测到有EST(N31985)表达下调,与正常鼻咽上皮组织相比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:染色体3p21区域EST(N31985)在鼻咽癌中表达下调,提示其可能参与鼻咽癌癌变过程。(世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

氯沙坦对肝纤维化鼠 TIMP-1, PAI-1 表达的影响

孟燕妮, 张桂英, 李乾

孟燕妮, 张桂英, 李乾, 中南大学湘雅医院消化内科 湖南省长沙市 410008
孟燕妮, 女, 1978-01-31 生, 湖南株洲人, 汉族。2001 年南华大学本科毕业, 2001 届中南大学消化内科硕士研究生。
湖南省卫生厅资助项目, No. Y02-008
项目负责人: 张桂英, 410008, 湖南省长沙市湘雅路 141 号, 中南大学湘雅医院消化内科。tlh8486@sina.com
电话: 0731-4327106
收稿日期: 2004-03-06 接受日期: 2004-04-13

Effects of losartan on TIMP-1 and PAI-1 expression in rat hepatic fibrosis

Yan-Ni Meng, Gui-Ying Zhang, Qian Li

Yan-Ni Meng, Gui-Ying Zhang, Qian Li, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China

Supported by Hunan Provincial Bureau of Health Program, No.Y02-008
Correspondence to: Dr. Gui-Ying Zhang, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, 141 Xiangya Road, Changsha 410008, Hunan Province, China. tlh8486@sina.com

Received: 2004-03-06 Accepted: 2004-04-13

Abstract

AIM: To investigate the effect of losartan on the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and plasminogen activator inhibition-1 (PAI-1) in the liver of rat with hepatic fibrosis.

METHODS: Forty-eight SD rats were randomly divided into four groups: normal control group, model group, losartan-prevention group, losartan-treatment group. Except rats in control group, all rats were given subcutaneous injection of carbon tetrachloride. Rats in prevention and treatment (from the 5th wk) groups were also given losartan via gavage. At the end of 12 weeks, rats were sacrificed. HE and VG stains were used to evaluate the degree of fibrosis; Immunohistochemistry was used to detect the expression of TIMP-1 and PAI-1 in the liver tissue, respectively.

RESULTS: Losartan could greatly attenuate the degree of liver fibrosis ($P < 0.05$). Intensity score (IS) of TIMP-1 and PAI-1 in prevention ($1.6\ 900 \pm 0.4\ 228$, $1.8\ 900 \pm 0.5\ 127$) and treatment ($1.9\ 000 \pm 0.5\ 925$, $2.0\ 540 \pm 0.4\ 251$) groups was weaker than that in model group ($2.5\ 111 \pm 0.3\ 919$, $2.8\ 500 \pm 0.2\ 013$) ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Losartan can suppress expression of TIMP-1 and PAI-1, which may be related to its anti-hepatic fibrosis activity.

Meng YN, Zhang GY, Li Q. Effects of losartan on TIMP-1 and PAI-1 expression in rat hepatic fibrosis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1361-1364

摘要

目的: 观察氯沙坦对大鼠肝纤维化基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)及纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)表达的影响。从细胞外基质降解的角度探讨氯沙坦的作用机制,为临床用药提供实验依据。

方法: 制备 CCl₄ 大鼠肝纤维化模型, 48 只大鼠随机分为模型、预防、治疗及正常对照组。除正常对照组外, 其余大鼠均皮下注射 CCl₄; 预防及治疗组(第 5 周始)每天予氯沙坦灌胃, 共 12 周, HE、VG 染色观察肝纤维化程度, 免疫组化法检测 TIMP-1、PAI-1 蛋白表达。

结果: 氯沙坦可显著降低预防组和治疗组大鼠肝纤维化程度($P < 0.05$), TIMP-1 和 PAI-1 平均染色强度 IS 在预防 ($1.6\ 900 \pm 0.4\ 228$, $1.8\ 900 \pm 0.5\ 127$) 及治疗 ($1.9\ 000 \pm 0.5\ 925$, $2.0\ 540 \pm 0.4\ 251$) 组均明显低于模型组 ($2.5\ 111 \pm 0.3\ 919$, $2.8\ 500 \pm 0.2\ 013$), 有显著性差异($P < 0.05$)。

结论: 氯沙坦能显著降低 CCl₄ 诱导的大鼠肝纤维化的程度, 降低 TIMP-1 和 PAI-1 表达水平, 对肝纤维化有良好的防治作用。

孟燕妮, 张桂英, 李乾. 氯沙坦对肝纤维化鼠 TIMP-1, PAI-1 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1361-1364
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1361.asp>

0 引言

肝纤维化是以胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成增多, 降解相对不足, 过多沉积在肝内所致。抗肝纤维化包括保护肝细胞、抗氧自由基、促进肝细胞再生、抑制肝脏炎症、免疫调整、抑制肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化及增生、促进 HSC 调亡、调整 ECM 的合成及降解等方面。至今尚无高效、低毒而理想治疗肝纤维化的药物。血管紧张素Ⅱ(ANGⅡ)1型受体拮抗剂是新一类肾素-血管紧张素系统(RAS)抑制剂, 可有效抑制纤维化的发展^[1-5]。我们通过用 CCl₄ 诱导大鼠, 对各组大鼠肝组织中基质金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)及纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibition-1, PAI-1)进行检测, 旨在探讨氯沙坦治疗肝纤维化的作用机制, 如下。

1 材料和方法

1.1 材料 SD大鼠, 雌雄不分, 质量 180 ± 45 g, 购自湘雅实验动物中心; CCl₄为天津市博迪化工有限公司产品, 含量>99.5%; 兔抗大鼠PAI-1, TIMP-1多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; 链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶免疫染色试剂盒(Spkit)购自北京中山生物公司; 氯沙坦为默沙东医药公司产品。

1.2 方法 采用400 mL/L CCl₄(CCl₄:石蜡油为2:3)油剂, 3 mL/kg, 2次/wk造模。48只大鼠随机分为四组, M组(模型组, 13只)按上述方法造模, 4 wk末活杀2只, 切取肝脏, 病理科送检, 对比观察肝纤维化的程度; P组(预防组, 12只)造模的同时给予氯沙坦10 mg/kg灌胃, 1次/d; T组(治疗组, 12只)造模的同时5 wk始给予氯沙坦10 mg/kg灌胃, 1次/d; N组(对照组, 11只)按3 mL/kg石蜡油, 2次/wk, 正常饮食能水, 4 wk末活杀2只, 病理科送检, 以作对比。12 wk末处死所有大鼠。

1.2.1 HE, VG染色 光镜对肝纤维化程度作半定量分析, 根据纤维结缔组织增生程度将其分为0~IV级。0级: 未见纤维组织增生; I级, 纤维组织增生局限于汇管区或有汇管区扩大, 有向小叶发展的倾向; II级纤维结缔组织增生进入肝小叶2/3及有I级同样的改变; III级, 纤维结缔组织进入肝小叶中央静脉周围; IV级, 纤维结缔组织在全小叶呈多处弥漫性增生, 有假小叶形成, 并有III级同样改变。

1.2.2 免疫组织化学染色 肝组织标本用40 g/L甲醛液固定, 石蜡包埋4 μm连续切片, 采用SP法作免疫组化染色。切片; 常规脱蜡至水; 微波抗原修复; 加100 mL/L正常血清封闭30 min; 加TIMP-1或PAI-1多克隆抗体(一抗, 稀释度均为1:100)4 °C过夜; 加生物素二抗37 °C, 恒温30 min; 加亲和素-过氧化酶溶液37 °C, 20 min; 加DAB显色, 镜下控制显色时间; 苏木素复染, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 树胶封片, 镜检, 并照相记录。为保证实验结果的可靠性, 特别是免疫组化的特异性采用省略一抗, 用PBS代替一抗。TIMP-1、PAI-1蛋白均以胞质内出现棕黄色颗粒为阳性反应, 切片在10倍物镜视野下观察, 随机计数5个视野中各染色强度细胞数的百分比。根据细胞染色强度分为四级, 并分别计分: 阴性, 细胞无着色(0分); 弱阳性, 细胞着色为浅黄色(1分); 中度阳性, 细胞着色为棕黄色(2分); 强阳性, 细胞着色为棕褐色(3分), 计算每一强度的视野数, 根据下列公式计算每张切片的平均染色强度: IS(intensity score)= $\sum \{(0 \times F_0)+(1 \times F_1)+(2 \times F_2)+(3 \times F_3)\}$, $F=\% 10 \times$ 视野。

统计学处理 肝纤维化病理等级资料比较采用非参数秩和检验。免疫组化为计量资料结果用mean±SD表示, 经方差齐性检验后, 对数据进行方差分析。使用统计软件SPSS10.0, 取检验水准 $\alpha=0.05$

2 结果

2.1 氯沙坦对大鼠肝纤维化程度的影响 肝组织HE, VG染色结果显示, 第4 wk末模型组大鼠肝组织与正常组相比可见小灶或片状坏死, 脂肪变性, 炎性细胞浸润明显, 胶原纤维沿汇管区或炎症坏死区分布。12 wk末肝组织, 正常大鼠肝小叶结构完整, 中央静脉窦周围肝细胞索放射状排列, 未见肝细胞坏死及炎性细胞浸润, 胶原着色仅见于血管壁。模型组肝组织呈现显著的脂肪变性、肝细胞变性坏死、大量炎性细胞浸润、汇管区扩大、汇管区胶原沉积, 纤维间隔增宽, 部分肝组织有明显的假小叶形成。用药各组炎症程度及空泡变性较模型组均显著减轻, 纤维间隔细少, 汇管区胶原亦减少, 无假小叶形成(表1, 图1)。

表1 实验大鼠肝纤维化的级别分布

| 分组 | n | 肝纤维化分级 | | | | |
|----------------|----|--------|---|----|-----|----|
| | | 0 | I | II | III | IV |
| M | 9 | 0 | 0 | 1 | 6 | 2 |
| P ^a | 10 | 0 | 1 | 6 | 3 | 0 |
| T ^a | 10 | 0 | 0 | 6 | 4 | 0 |
| N | 9 | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 |

^aP <0.05 vs groupM.

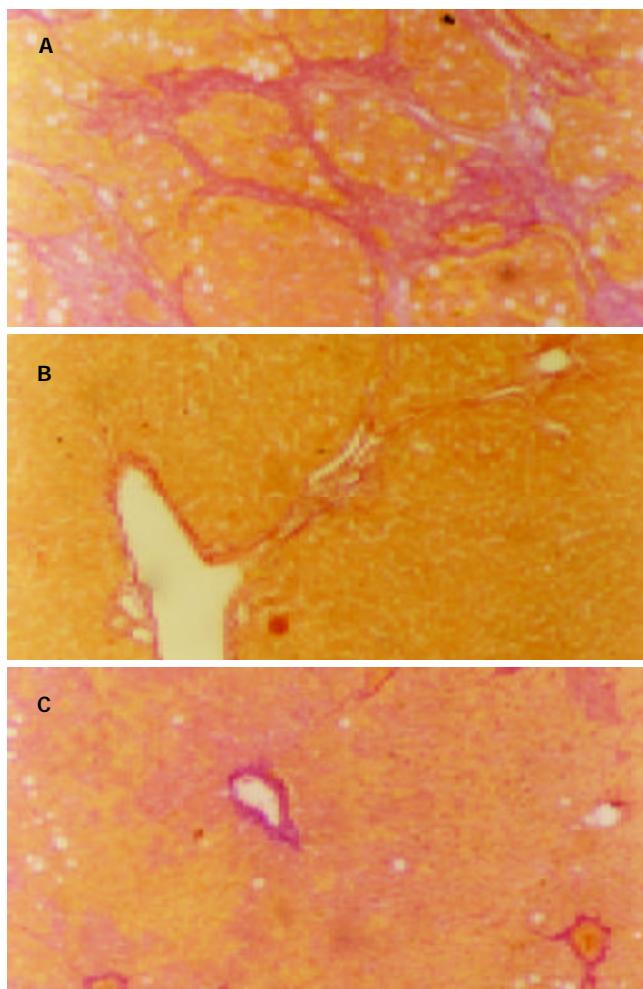


图1 大鼠肝组织VG染色×100。A:模型组VG染色; B:治疗组VG染色; C:预防组VG染色。

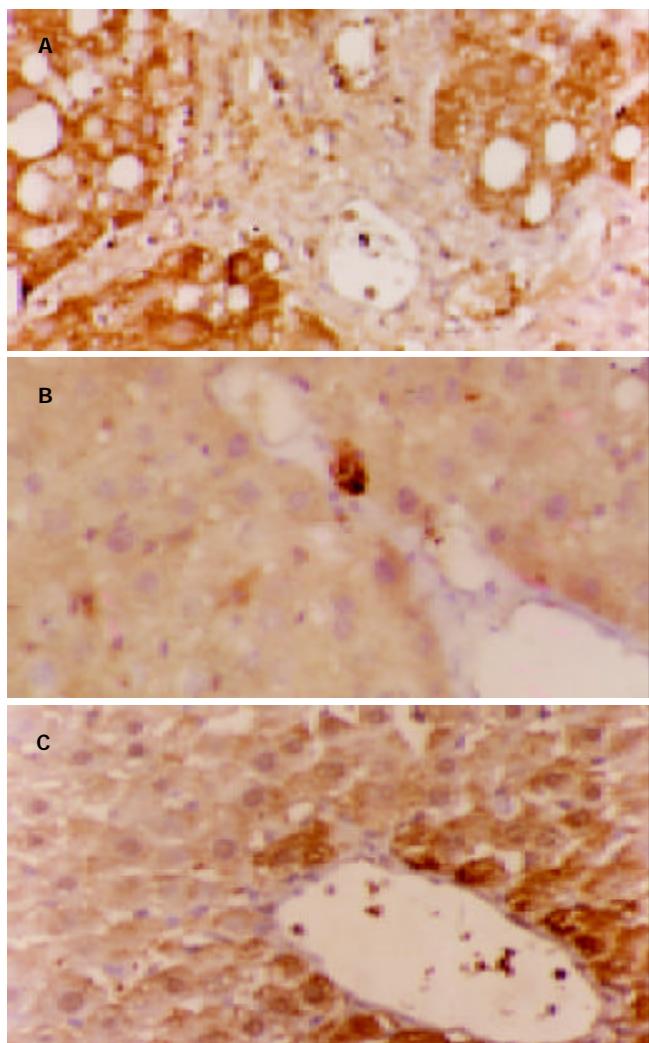


图2 大鼠肝组织TIMP-1免疫组化 $\times 400$. A:模型组TIMP-1; B:治疗组TIMP-1; C:预防组TIMP-1.

2.2 氯沙坦对大鼠肝组织TIMP1、PAI-1表达的影响
TIMP1, PAI-1蛋白阳性表达信号为棕黄色颗粒, 均集中在细胞质。在模型组中, 二者的表达多呈弥漫性分布, 预防及治疗组中, 二者多为局限性阳性, 信号较模型组弱, 少数为弥漫性表达。正常肝组织仅在中央静脉周边及汇管区可见少量弱阳性信号表达。对照实验省略一抗后阳性信号消失, 检测结果为阴性, 实验证实此免疫组化检测结果是特异性(表2, 图2, 3)。

表2 大鼠肝组织TIMP-1, PAI-1蛋白表达强度IS(mean \pm SD)

| 分组 | n | TIMP-1 | PAI-1 |
|-----|----|------------------------------------|------------------------------------|
| 模型组 | 9 | 2.5 111 \pm 0.3 919 | 2.8 500 \pm 0.2 013 |
| 预防组 | 10 | 1.6 900 \pm 0.4 228 ^a | 1.8 900 \pm 0.5 127 ^a |
| 治疗组 | 10 | 1.9 000 \pm 0.5 925 ^a | 2.0 540 \pm 0.4 251 ^a |
| 对照组 | 9 | 0.4 500 \pm 0.1 516 | 0.3 000 \pm 0.1 825 |

^aP < 0.05 vs groupM.

3 讨论

肝纤维化是一切慢性肝病的共同病理学基础, 虽不同

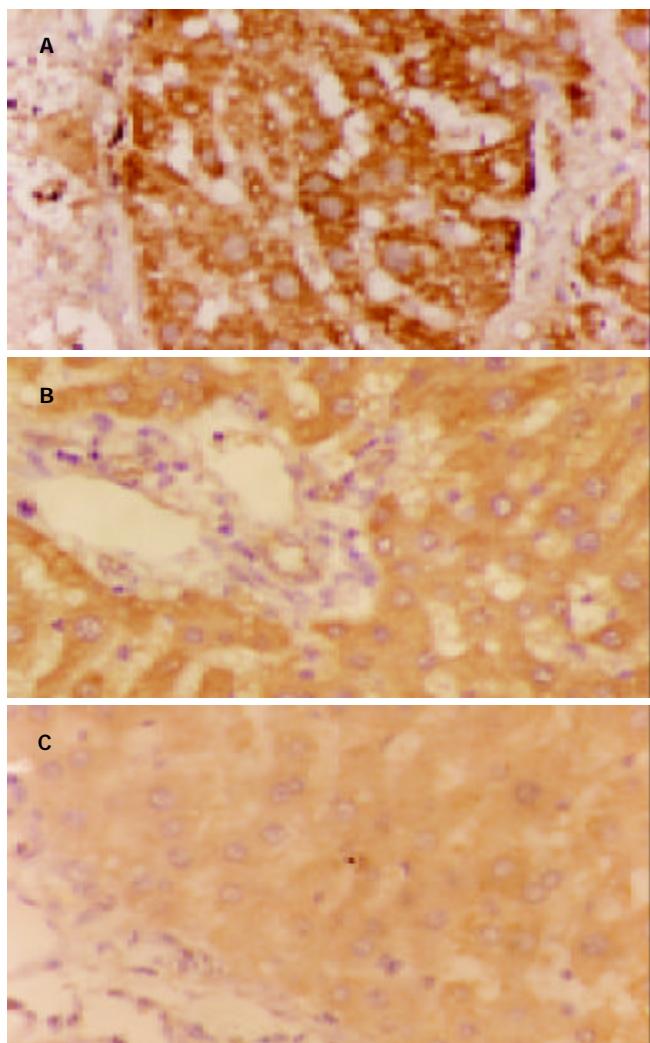


图3 大鼠肝组织PAI-1免疫组化 $\times 400$. A:模型组PAI-1; B:治疗组PAI-1; C:预防组PAI-1.

肝病致病机制不完全相同, 但各种不同病因肝纤维化发生最终共同途径是由细胞因子介导的细胞-细胞相互作用, 以及基质-细胞相互作用引起的HSC的激活, 转化为肌成纤维细胞(myofibroblastic-like cell, MFLC), 表达多种细胞因子及受体, 大量增生, 大量合成肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM), 而ECM的降解降低引起^[6-9]。参与ECM降解过程有基质金属蛋白酶类, 丝氨酸蛋白酶类和半胱氨酸蛋白酶类。基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组锌离子依赖酶, 他通过降低胶原螺旋结构的稳定性, 改变底物的二级结构, 为其他蛋白酶作进一步降解创造条件。而基质金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)是一组具有抑制MMPs功能的活性多肽, 他不但与MMP酶原以1:1形式相结合抑制其活化, 而且能灭活活性酶, 从而使MMPs失去降解功能, 抑制ECM的降解^[10-11]。肝纤维化时TIMP-1大量表达, 使MMPs活性减少, 造成肝损伤后增生的ECM成分尤其是I, III型胶原降解减少, 沉积增多, 而通过抑制TIMP-1的表达, 可有效抑制I, III型胶原的增生^[12-16], 从而延缓纤维化的发展。

纤溶酶原激活物(plasminogen activator, PA)/纤溶酶

系统在丝氨酸蛋白酶类中占据着主导地位。PA 可激活纤溶酶原形成纤溶酶，纤溶酶可直接降解ECM中多种成分(纤维蛋白、纤维连接蛋白、蛋白多糖、板层素等^[17-19]，还能激活基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)，使ECM降解^[20]，PAI-1 (plasminogen activator inhibition-1, PAI-1)是PA快速、专一有效的生理抑制因子，他通过活性中心与tPA形成1:1复合物，使PA失活，从而抑制其后的激活反应。因此PAI-1在组织内水平的升高和(或)活性的增强能有效的抑制纤维蛋白的水解和ECM的降解，继之增加组织内纤维蛋白的沉积和ECM的积聚，从而导致或促进器官的纤维化或硬化^[21-24]。血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)可引起HSC收缩，促进其增生，是HSC的分裂原之一^[25]。AngⅡ是通过其I型受体(ATR1)作用于HSC。同时AngⅡ还能刺激转化生长因子-β1(TGF-β1)的合成和分泌，间接通过TGF-β1刺激HSC分泌细胞外基质^[26]。氯沙坦作为ATR1阻断剂通过阻断上述途径从而延缓纤维化的发展，其在心肌及肾脏方面都有很好的抗纤维化作用。我们发现，预防组、治疗组与模型组比较，TIMP-1，PAI-1蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)，同时发现用药各组大鼠肝组织坏死程度及空泡变性较模型组均有改善，纤维间隔增生受抑($P < 0.05$)。与国外的研究AngⅡ通过上调组织中TIMP-1，PAI-1 mRNA促使纤维化形成这一观点相符。而预防用药与治疗组相比，无显著差异($P > 0.05$)，可能与样本量小有关。本研究结果提示，氯沙坦通过抑制肝纤维化肝组织中TIMP-1，PAI-1蛋白的表达，促进ECM降解，从而延缓纤维化的形成和发展。研究结果为氯沙坦防治肝纤维化提供了一定的实验依据，其更深层的作用机制有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 Otsuka M, Takahashi H, Shiratori M, Chiba H, Abe S. Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by candesartan cilexetil, an angiotensin II type 1 receptor antagonist. *Thorax* 2004;59:31-38
- 2 Tuncer I, Ozbek H, Ugras S, Bayram I. Anti-fibrogenic effects of captopril and candesartan cilexetil on the hepatic fibrosis development in rat. The effect of AT1-R blocker on the hepatic fibrosis. *Exp Toxicol Pathol* 2003;55:159-166
- 3 Leung PS, Suen PM, Ip SP, Yip CK, Chen G, Lai PB. Expression and localization of AT1 receptors in hepatic Kupffer cells: its potential role in regulating a fibrogenic response. *Regul Pept* 2003;116:61-69
- 4 李乾, 张桂英, 李新华, 徐美华. 卡托普利对肝纤维化模型鼠MMP-2, 3 TIMP-2, 3表达的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11:1168-1171
- 5 Boffa JJ, Lu Y, Placier S, Stefanski A, Dussauze JC, Chatziantoniou C. Regression of renal vascular and glomerular fibrosis: role of angiotensin II receptor antagonism and matrix metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1132-1144
- 6 Zhang X, Yu WP, Gao L, Wei KB, Ju JL, Xu JZ. Effects of lipopolysaccharides stimulated Kupffer cells on activation of rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:610-613
- 7 Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus K, Xu L, Eng F, Afshar N, Kalluri R. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology* 2003; 124:147-159
- 8 Chen PS, Zhai WR, Zhou XM, Zhang JS, Zhang YE, Ling YQ, Gu YH. Effects of hypoxia, hyperoxia on the regulation of expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:647-651
- 9 Gaca MD, Zhou X, Issa R, Kiriella K, Iredale JP, Benyon RC. Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells. *Matrix Biol* 2003;22:229-239
- 10 Leroy V, Monier F, Bottari S, Trocme C, Sturm N, Hilleret MN, Morel F, Zarski JP. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 2004;99:271-279
- 11 Johnson TS, Haylor JL, Thomas GL, Fisher M, El Nahas AM. Matrix metalloproteinases and their inhibitions in experimental renal scarring. *Exp Nephrol* 2002;10:182-195
- 12 Nie QH, Duan GR, Luo XD, Xie YM, Luo H, Zhou YX, Pan BR. Expression of TIMP-1 and TIMP-2 in rats with hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2004;10:86-90
- 13 Zhang BB, Cai WM, Weng HL, Hu ZR, Lu J, Zheng M, Liu RH. Diagnostic value of platelet derived growth factor-BB, transforming growth factor-beta1, matrix metalloproteinase-1, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in serum and peripheral blood mononuclear cells for hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2490-2496
- 14 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Namisaki T, Imazu H, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 attenuates spontaneous liver fibrosis resolution in the transgenic mouse. *Hepatology* 2002;36:850-860
- 15 Luo YJ, Yu JP, Shi ZH, Wang L. Ginkgo biloba extract reverses CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10:1037-1042
- 16 Liu WB, Yang CQ, Jiang W, Wang YQ, Guo JS, He BM, Wang JY. Inhibition on the production of collagen type I, III of activated hepatic stellate cells by antisense TIMP-1 recombinant plasmid. *World J Gastroenterol* 2003;9:316-319
- 17 Huang Y, Haraguchi M, Lawrence DA, Border WA, Yu L, Noble NA. A mutant, noninhibitory plasminogen activator inhibitor type 1 decreases matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *J Clin Invest* 2003;112:379-388
- 18 Nezi L, Greco D, Nitsch L, Garbi C. The role of proteases in fibronectin matrix remodeling in thyroid epithelial cell monolayer cultures. *Biol Chem* 2002;383:167-176
- 19 Haraguchi M, Border WA, Huang Y, Noble NA. t-PA promotes glomerular plasmin generation and matrix degradation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 2001;59:2146-2155
- 20 Monea S, Lehti K, Keski-Oja J, Mignatti P. Plasmin activates pro-matrix metalloproteinase-2 with a membrane-type 1 matrix metalloproteinase-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 2002;192:160-170
- 21 Wu XR, Wang Q, Shi SS, Lu MH, Guo WD. The plasma levels of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor and plasminogen activator inhibitor-1 in patients with different stages of liver cirrhosis following chronic hepatitis B. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2004;12:82-84
- 22 Hattori N, Mizuno S, Yoshida Y, Chin K, Mishima M, Sisson TH, Simon RH, Nakamura T, Miyake M. The plasminogen activation system reduces fibrosis in the lung by a hepatocyte growth factor-dependent mechanism. *Am J Pathol* 2004;164:1091-1098
- 23 Takeshita K, Hayashi M, Iino S, Kondo T, Inden Y, Iwase M, Kojima T, Hirai M, Ito M, Loskutoff DJ, Saito H, Murohara T, Yamamoto K. Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cardiomyocytes contributes to cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Am J Pathol* 2004;164:449-456
- 24 Fogo AB. Renal fibrosis: not just PAI-1 in the sky. *J Clin Invest* 2003;112:326-328
- 25 Zhang YJ, Yang XS, Wu PS, Li X, Zhang XF, Chen XQ, Yu ZX. Effects of angiotensin II and losartan on the growth and proliferation of hepatic stellate cells. *Diyi Junyi Daxue Xuebao* 2003;23:219-221
- 26 Tokuda K, Kai H, Kuwahara F, Yasukawa H, Tahara N, Kudo H, Takemoto K, Koga M, Yamamoto T, Imaizumi T. Pressure-independent effects of angiotensin II on hypertensive myocardial fibrosis. *Hypertension* 2004;43:499-503

人 HMGB1 A box 和 B box cDNA 的克隆与表达

张艳, 何凤田, 李蓉芬, 连继勤, 杨朝辉, 高会广

张艳, 何凤田, 李蓉芬, 连继勤, 杨朝辉, 高会广, 中国人民解放军第三军医大学基础部生化与分子生物学教研室 重庆市 400038
张艳, 女, 1978-02-09 生, 重庆市人, 汉族。2002 年中国人民解放军第三军医大学硕士研究生, 主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。
项目负责人: 何凤田, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学基础部生化与分子生物学教研室。tmmubiozy@yahoo.com.cn
电话: 023-68752263 传真: 023-68753462
收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-03-18

Cloning and expression of HMGB1 A box and B box cDNAs

Yan Zhang, Feng-Tian Hen, Rong-Fen Li, Ji-Qin Lian, Zhao-Hui Yang, Hui-Guang Gao

Yan Zhang, Feng-Tian Hen, Rong-Fen Li, Ji-Qin Lian, Zhao-Hui Yang, Hui-Guang Gao, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Correspondence to: Dr. Feng-Tian Hen, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. tmmubiozy@yahoo.com.cn

Received: 2004-03-05 Accepted: 2004-03-18

Abstract

AIM: To clone human HMGB1 A box and B box cDNA, to construct their prokaryotic expression vectors and to express their products for examining their activity.

METHODS: The total RNA was extracted from human tonsil and the human HMGB1 A box and B box cDNA sequence were amplified using RT-PCR, and inserted into pUC19 for sequence analysis. Then the identified cDNAs were inserted into the new type of prokaryotic expression vector pQE-80 L/DHFR. Having induced by IPTG for 4 h, we confirmed the confusion protein by SDS-PAGE, then identified the expressed confusion protein by Western blotting.

RESULTS: The target DNA fragments by RT-PCR were completely same as the sequence reported in GenBank. The recombinant prokaryotic expression vector was constructed and the fusion protein expressed, which was then identified by Western blotting.

CONCLUSION: Cloning of HMGB1 A box and B box cDNA, construction of their prokaryotic expression vectors and expression of fusion protein have provided the fundamental proof for examining their biological activity.

Zhang Y, Hen FT, Li RF, Lian JQ, Yang ZH, Gao HG. Cloning and expression of HMGB1 A box and B box cDNAs. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1365-1368

摘要

目的: 克隆人 HMGB1 中的 A box (1-85 aa) 和 B box (88-162 aa) 的 cDNA, 构建重组原核表达载体并对其诱导表

达, 为检测其生物学活性做准备。

方法: 提取人新鲜扁桃体组织总 RNA, 经 RT-PCR 扩增出人 HMGB1 A box 和 B box 的 cDNA 序列, 并分别克隆至载体 pUC19 进行序列测定, 随后分别构建于高效原核表达载体 pQE-80L/DHFR 中, 经 IPTG 诱导 4 h 后, 可表达 M_r 约 35 000, 34 000 的融合蛋白。Western Blotting 鉴定所表达的目的蛋白。

结果: 经 RT-PCR 扩增得到了 255 bp 和 225 bp 的 DNA 片段, 经序列分析与 GenBank 中报道的已知序列完全一致, 构建了含融合蛋白的重组表达质粒, 诱导表达了目的蛋白, 经 Western Blotting 证实, 在 M_r 分别约为 35 000 和 34 000 处有两条清楚的蛋白带。

结论: HMGB1 A box 和 B box cDNA 的克隆, 原核表达载体的构建及目的蛋白的表达鉴定, 为进一步研究 HMGB1 A box 和 B box 的生物学功能奠定了基础。

张艳, 何凤田, 李蓉芬, 连继勤, 杨朝辉, 高会广. 人 HMGB1 A box 和 B box cDNA 的克隆与表达. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1365-1368
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1365.asp>

0 引言

高迁移率族蛋白 B1 (high-mobility group box-1, HMGB1), 是根据其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中有很高的迁移率而得名。他是一个重要的晚期致炎因子, 与全身性炎症及其并发症毒性综合征(sepsis syndrome)的发生与发展密切相关。巨噬/单核细胞、垂体细胞受内毒素、IL-1 α 、TNF 刺激后均能释放 HMGB1, HMGB1 也可刺激巨噬/单核细胞释放致炎因子, 如 TNF, IL-1 α , IL-1 β 等^[1]。因此, HMGB1 成为抗炎治疗新靶点^[2-4]。目前发现 HMGB1 还与肿瘤的生长和侵袭(如乳腺癌, 胃肠道肿瘤等)^[5-6]以及类风湿关节炎有关^[7]。经结构功能分析 HMGB1 的致炎活性位于 B box, 而另一个结合 DNA 的功能结构域 HMGB1 A box 却能竞争性抑制 HMGB1 的活性, 但其作用机制尚不清楚。因此, 我们以人新鲜扁桃体组织总 RNA 为材料, 经 RT-PCR 扩增出人 HMGB1 A box 和 B box 的 cDNA 序列, 并将其克隆于载体 pUC19 进行测序, 随后构建于高效原核表达载体 pQE-80L/DHFR, 进一步诱导该蛋白的表达, 从而为今后的深入研究其生物学功能及作用机制打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 人新鲜扁桃体组织取自临床手术切除的扁桃体; 质粒 pUC19 购自华美公司; 原核表达载体 pQE-80L/DHFR 由本室保存; 大肠杆菌 JM109、DH5 α 由本室保存; Tripure RNA 提取试剂为 Roche 公司产品; PCR 引物由上海生工公司合成; RT-PCR 及 PCR 纯化试剂盒为 Promega 公司产品; 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司; 小鼠抗人 His 抗体购自德国 Qiagen 公司; HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 购自华美公司; 浓缩 DAB 显色液购自北京中同生物技术有限公司; 硝酸纤维素膜为 Roche 公司产品。

1.2 方法 取人新鲜扁桃体组织, 按 Tripure 试剂盒说明提取细胞总 RNA, 经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性, 经紫外分光光度计测定其浓度。RT-PCR 扩增人 HMGB1 A box 和 B box cDNA。根据 GenBank 中编码人 HMGB1 A box (1-85 aa), HMGB1 B box (88-162 aa) 的 cDNA 序列, 分别设计一对特异性引物。HMGB1 A box 上游引物: 5' - GC GGT ACC ATG GGC AAA GGA GAT CCT A-3'(划线部分为 Kpn I 酶切位点), 下游引物: 5' - GC AAG CTT TCA TGT CTC CCC TTT GGG A-3'(划线部分为 Hind III 酶切位点); HMGB1 B box 上游引物: 5' - CC GGT ACC AAG TTC AAG GAT CCC AAT - 3'(划线部分为 Kpn I 酶切位点); 下游引物: 5' - CC AAG CTT TCA ATA TGC AGC AAT ATC C - 3'(划线部分为 Hind III 酶切位点)。RT-PCR 按试剂盒说明进行: RNA 5 μ L(约 1 μ g), 5 \times 反应 buffer 10 μ L, 上、下游引物各 2 μ L, dNTP 1 μ L, 25 mmol/L MgSO₄ 2 μ L, AMV 反转录酶 1 μ L(5U), Tfl DNA 聚合酶 1 μ L(5U), ddH₂O 26 μ L, 总体积为 50 μ L; 反应程序为 48 $^{\circ}$ C 45 min; 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 然后(94 $^{\circ}$ C 30 s; 60 $^{\circ}$ C 1 min; 68 $^{\circ}$ C 2 min) \times 40 个循环; 最后 68 $^{\circ}$ C 7 min。分别取 5 μ L RT-PCR 产物于 20 g/L 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶扫描仪下观察并记录结果。将 RT-PCR 产物及载体 pUC19 经 Hind III + Kpn I 酶切后, 分别用纯化试剂盒进行回收, 按

人 HMGB1 A box cDNA 序列

```
ATGGGCAAAG GAGATCCTAA GAAGCCGAGA GGCAAAATGT CATCATATGC
ATTTTTGTG CAAACTTGTC GGGAGGAGCA TAAGAAGAAC CACCCAGATG
CTTCAGTCAA CTTCTCAGAG TTTTCTAAGA AGTGTCTAGA GAGGTGGAAG
ACCATGTCTG CTAAAGAGAA AGGAAAATTG GAAGATATGG CAAAAGCGGA
CAAGGCCCGT TATGAAAGAG AAATGAAAAC CTATATCCCT CCCAAAGGGG
AGACA
```

人 HMGB1 B box cDNA 序列

```
AAGTTCAAGG ATCCCAATGC ACCCAAGAGG CCTCCTTCGG CCTTCTTCCT
CTTCTGCTCT GAGTATGCC CAAAAATCAA AGGAGAACAT CCTGGCCTGT
CCATTGGTGA TGTTGCGAAG AACTGGGAG AGATGTGGAA TAACACTGCT
GCAGATGACA AGCAGCCTTA TGAAAAGAAG GCTGCGAAGC TGAAGGAAAA
ATACGAAAAA G GATATTGCTG CATAT
```

常规条件于 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h, 将连接产物转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 经蓝白筛选获得阳性重组子, 提取质粒, 经 Hind III + Kpn I 酶切鉴定获得重组质粒(命名为 pUC19/HMGB1 A box, pUC19/HMGB1 B box)。然后由上海生工公司进行序列测定。行 DNA 测序后, 以 Hind III + Kpn I 酶切 pUC19/HMGB1 A box, pUC19/HMGB1 B box 质粒, 回收目的片段并连接于原核表达载体 pQE-80L/DHFR。将重组原核表达载体转化至大肠杆菌 DH5 α , 经质粒提取和酶切鉴定得到重组原核表达载体 pQE-80L/DHFR/HMGB1 A box, pQE-80L/DHFR/HMGB1 B box。挑取含重组原核表达载体的单个菌落接种于 LB 培养基(含 50 mg/L 氨苄青霉素), 37 $^{\circ}$ C 培养过夜后, 按 10 g/L 接种于新鲜 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养至 $A_{600\text{nm}}$ 约为 0.7, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 诱导 4 h 后, 离心收菌, 行 SDS-PAGE(分离胶 120 g/L, 积层胶 50 g/L), 再经灰度扫描确定菌体总蛋白中目的蛋白的比例。以所表达目的蛋白上的 His 标签肽为标志, 经 Western blot 行进一步鉴定, 其简要步骤是: 将诱导表达的产物先行 SDS-PAGE, 然后以半干法电转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上, 取下 NC 膜短暂漂洗后用丽春红染膜, 待蛋白 marker 条带显色后用滤纸将膜轻轻吸干, 用记号笔标记蛋白 marker 各条带, 继而经漂洗去除用丽春红, 然后依次经 50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 与抗-His 单抗孵育 1 h, 与 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h, 每步完成后均严格洗膜, 最后加 DAB 避光显色。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 HMGB1 A box 和 B box 的 cDNA 扩增产物行电泳后, 可见清晰条带, 片段大小分别约为 255 bp 和 225 bp(图 1)。

2.2 阳性重组子的筛选 阳性重组子 pUC19/HMGB1 A box, pUC19/HMGB1 B box 经酶切后, 分别可见约为 255 bp 和 225 bp 大小的目的片段(图 2)。

2.3 序列测定

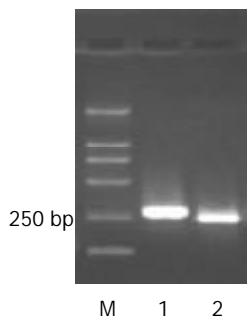


图1 RT-PCR产物的琼脂糖凝胶电泳结果.1: 人HMGB1 A box cDNA; 2: 人HMGB1 B box cDNA.

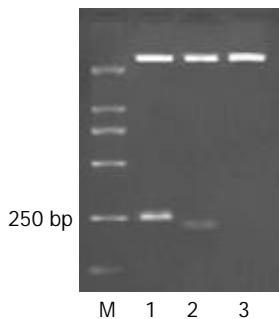


图2 重组质粒的酶切鉴定. 1: pUC19/ HMGB1 A box /Hind III + Kpn I ; 2: pUC19/ HMGB1 B box /Hind III + Kpn I ; 3: pUC19/ Hind III + Kpn I .

2.4 重组原核表达载体的构建 将序列正确的HMGB1 A box, B box cDNA分别克隆于原核表达载体pQE-80L/DHFR得到重组原核表达载体pQE-80L/DHFR/HMGB1A box, pQE-80L/DHFR/HMGB1B box, 经酶切后分别见约为255 bp和225 bp大小的目的片段(图3).

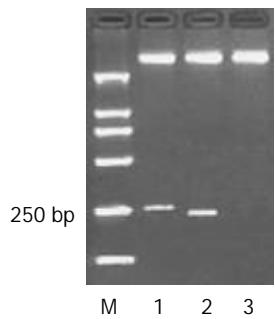


图3 重组原核表达载体的酶切鉴定. 1: pQE -80L/DHFR / HMGB1 A box /Hind III + Kpn I ; 2: pQE -80L/DHFR / HMGB1 B box /Hind III + Kpn I ; 3: pQE -80L/DHFR / Hind III + Kpn I .

2.5 重组蛋白的表达与鉴定 重组原核表达载体转化至大肠杆菌DH5 α 后, 以IPTG诱导表达, 对细胞裂解液进行SDS-PAGE, 结果显示重组目的蛋白在M_r35 000, M_r34 000处分别有一清晰条带, 与预期结果一致, 而含融合蛋白DHFR的空载体pQE-80L/DHFR的菌株在M_r26 000处有一清晰条带(图4). 灰度扫描显示目的蛋白表达量占菌体总蛋白的40%, 这表明目的蛋白在大肠杆菌中获得了高效表达. 以His标签肽为标志的Western blot分析显示, 经IPTG诱导的含重组原核表达载体

pQE-80L/DHFR/HMGB1A box, pQE-80L/DHFR/HMGB1 B box的菌体裂解物能与抗-His单抗特异性反应, 在约M_r35 000与M_r34 000处呈现一条带, 而经同样诱导的含融合蛋白DHFR的空载体pQE-80L/DHFR在约M_r26 000有一清晰条带, 说明所表达的融合蛋白的确是目的蛋白(图5).

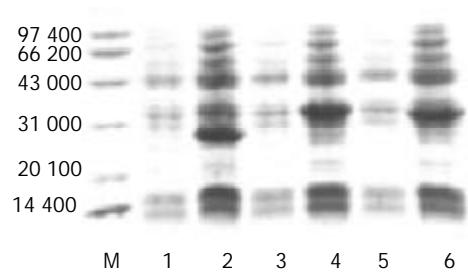


图4 重组蛋白表达的SDS-PAGE分析. 1: 对照质粒pQE -80L/DHFR未经IPTG诱导; 2: 对照质粒pQE -80L/DHFR经IPTG诱导后; 3: 重组质粒pQE -80L/DHFR/HMGB1 A box未经IPTG诱导; 4: 重组质粒pQE -80L/DHFR/HMGB1 A box经IPTG诱导后; 5: 重组质粒pQE -80L/DHFR/HMGB1 B box未经IPTG诱导; 6: 重组质粒pQE -80L/DHFR/HMGB1 B box经IPTG诱导后.

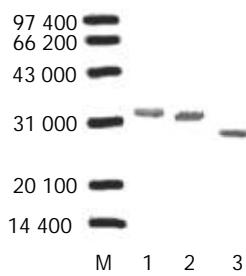


图5 重组蛋白的Western blot鉴定. 1: 重组质粒pQE -80L/DHFR / HMGB1 A box经IPTG诱导后; 2: 重组质粒pQE -80L/DHFR / HMGB1 B box经IPTG诱导后; 3: 对照质粒pQE -80L/DHFR经IPTG诱导后.

3 讨论

HMGB1是高迁移率族蛋白超家族的成员, 根据结构特点高迁移率族蛋白超家族可分为HMGB、HMGN、HMGA三类家族, 而HMGB1属于HMGB家族, 真核细胞染色质中含有丰富的HMGB1, 人HMGB1含215个氨基酸残基, 基因定位于染色体13q12. N端富含赖氨酸, 而氨基酸序列高度保守的C端(又称产酸尾端, “acidic tail”, 富含天冬氨酸和谷氨酸). HMGB1含有2个约80aa组成的“L”型的HMG box, 分别是A box(1-85 aa)和B box(88-162 aa)是结合DNA的功能结构域. 其中B box是HMGB1发挥致炎功能的主要区域^[8], 而A box却能竞争性抑制HMGB1的致炎功能. 膜相关的HMGB1结合的受体是RAGE (receptor for advanced glycation end products). 内皮细胞、血管平滑肌细胞、神经元、单核/巨噬细胞均表达RAGE^[9]. HMGB1与RAGE高亲和力结合, 较其他的RAGE配体高7倍. HMGB1与RAGE结合能诱导大鼠平滑肌细胞的迁移^[10]和促进轴突生长^[11], 而且能抑制肿瘤的生长和转移^[12]. 目前的研究发现细胞表面可能还存在着其他的HMGB1

受体^[13]。

目前,发现HMGB1可作为晚期致炎因子,密切参与炎症的发生发展。动物实验表明,大鼠经致死量脂多糖(LPS)处理后,TNF、IL-1 β 等早期致炎因子一般都在6 h内达到高峰,然后很快回到基础水平,而大鼠仍在攻击后数日内死亡,故提示内毒素血症致死亡的过程中,存在一种迟发递质即HMGB1起着重要的作用。TNF基因敲除小鼠在注射高剂量的内毒素后数小时至数天内也发生死亡。同时,Wang et al用LPS刺激大鼠RAW264.7细胞,并用SDS-PAGE法分析此条件培养基,发现LPS刺激后18 h即可诱发一种M_r30 000的蛋白质出现,而在早期此种蛋白质并不突出,经氨基酸序列分析证实这种迟发递质为大鼠HMGB1。巨噬细胞、单核细胞、垂体细胞受内毒素、IL-1、TNF刺激后在胞内形成富含HMGB1的囊泡,再以胞吐的方式释放HMGB1^[14],同时,HMGB1也可刺激单核细胞、巨噬细胞释放致炎因子,如TNF,IL-1 α ,IL-1 β ,IL-6,IL-8,MIP-1 α ,MIP-1 β 等。因此,我们选用了手术切除的人新鲜扁桃体组织来提取总RNA,最终获得了与已知序列完全一致的目的片段。

由于HMGB1A box、HMGB1B box的分子量分别只有10 000和9 000,难以在细菌体内形成正确的折叠和稳定表达,容易被降解,因此我们从pQE-40L质粒上截取了表达二氢叶酸还原酶(DHFR)的基因片段,与目的基因片断一起连接于表达载体pQE-80L上,从而获得了HMGB1A box、HMGB1B box融合蛋白稳定的表达。另外,我们所采用的原核表达载体pQE-80L是一种高效表达载体,该载体表达的目的蛋白量可达到细胞蛋白总量的50%,表达蛋白的N端带有6×His-tag,便于纯化和检测。

4 参考文献

- 1 Andersson U, Wang H, Palmlad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000;192:565-570
- 2 Czura CJ, Tracey KJ. Targeting high mobility group box 1 as a late-acting mediator of inflammation. *Crit Care Med* 2003;31:S46-50
- 3 Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. HMGB1 as a cytokine and therapeutic target. *J Endotoxin Res* 2002;8:469-472
- 4 Andersson U, Erlandsson-Harris H, Yang H, Tracey KJ. HMGB1 as a DNA-binding cytokine. *J Leukoc Biol* 2002;72:1084-1091
- 5 Lotze MT, DeMarco RA. Dealing with death: HMGB1 as a novel target for cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2003;4:1405-1409
- 6 Palumbo R, Sampaoli M, De Marchis F, Tonlorenzi R, Colombetti S, Mondino A, Cossu G, Bianchi ME. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol* 2004;164:441-449
- 7 Andersson U, Erlandsson-Harris H. HMGB1 is a potent trigger of arthritis. *J Intern Med* 2004;255:344-350
- 8 Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, Yang R, Ochani M, Qiang X, Harris HE, Czura CJ, Wang H, Ulloa L, Wang H, Warren HS, Moldawer LL, Fink MP, Andersson U, Tracey KJ, Yang H. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box-1. *Mol Med* 2003;9:37-45
- 9 Schmidt AM, Stern DM. RAGE: a new target for the prevention and treatment of the vascular and inflammatory complications of diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:368-375
- 10 Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Muller S, Resnati M, Sanvito F, Arrigoni G, Bianchi ME. The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol* 2001;152:1197-1206
- 11 Srikrishna G, Huttunen HJ, Johansson L, Weigle B, Yamaguchi Y, Rauvala H, Freeze HH. N-Glycans on the receptor for advanced glycation end products influence amphotericin binding and neurite outgrowth. *J Neurochem* 2002;80:998-1008
- 12 Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM. Blockade of RAGE-amphotericin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 2000;405:354-360
- 13 Sparatore B, Pedrazzi M, Passalacqua M, Gaggero D, Patronne M, Pontremoli S, Melloni E. Stimulation of erythroleukaemia cell differentiation by extracellular high-mobility group box protein 1 is independent of the receptor for advanced glycation end-products. *Biochem J* 2002;363:529-535
- 14 Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, Rubartelli A. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 2002;3:995-1001

急性胰腺炎大鼠清胰汤治疗的肠动力作用机制

魏睦新, 李建军, 汪幼学, 轩原清史

魏睦新, 李建军, 南京医科大学第一附属医院中医科 江苏省南京市 210029
汪幼学, 日本名古屋大学医学部第II 内科 日本国名古屋市 466
轩原清史, 日本 HIPEP 研究所 日本国 京都 486-46
日本岛津综合科学研究所国际合作基金, No.202JP1998
魏睦新, 男, 1959-12-17 生, 江苏南通人, 汉族. 1986 年南京医科大学硕士
毕业, 教授, 主任医师. 日本国立生理学研究所特别协力研究员. 主要从事消
化系统疾病的中西医结合基础研究.
项目负责人: 魏睦新, 210029, 江苏省南京市广州路 300 号, 南京医科大学
第一附属医院中医科. weimuxin@public1.ptt.js.cn
电话: 025-83718836-6560
收稿日期: 2002-01-16 接受日期: 2002-01-23

Effect of Qingyitang on gastrointestinal motility in rats with acute pancreatitis

Mu-Xin Wei, Jian-Jun Li, You-Xue Wang, Kyoshi Nokihara

Mu-Xin Wei, Jian-Jun Li, Department of TCM, The First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China
You-Xue Wang, Internal Medicine II, Nagoya University School of Medicine, Nagoya 466, Japan
Supported by Kyoshi Nokihara, HIPEP Laboratories, Kyoto 486-46, Japan
Correspondence to: Mu-Xin Wei, Department of TCM, The First Affiliated Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China. weimuxin@public1.ptt.js.cn
Received: 2002-01-16 Accepted: 2002-01-23

Abstract

AIM: To investigate the mechanism of the fluency-based therapy on gastrointestinal motility in rats with acute pancreatitis (AP).

METHODS: AP rats were induced by choledochal retrograde injection of 15 g/L sodium taurocholate 0.5 mL. The treatment group was administered with Qingyitang orally as a representative prescription of the fluency-based therapy and erythromycin given orally as a control group. The gastrointestinal motility, motilin, amylase and related parameters of AP were observed. We introduced the trace multi-channel calorstat from Japan to observe the contraction effect of Qingyitang on colon longitudinal muscle strips with different component of Qingyitang according to the orthogonal designed methods ($L_{12}(2^1)$) *in vitro*.

RESULTS: The drive rate of small intestine on AP group was significantly reduced (0.21 ± 0.08 , $P < 0.01$) with Qingyitang (0.49 ± 0.17) and erythromycin groups (0.30 ± 0.10). The serum concentration of motilin (119 ± 24 pg) in AP group was significantly lower than that of normal control group (169 ± 52 pg, $P < 0.05$). While the concentration of Qingyitang group (206 ± 60 pg) was significantly higher than that of AP group ($P < 0.01$). Besides, the pancreatitis mass edema, inflammatory cell infiltration and serum amylase were significantly decreased. Radix glehnii, Radix aucklandiae, Rhizoma corydalis and Radix et Rhizoma rhei of Qingyitang could increase the tension of the muscle strip *in vitro* ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The obstruction of gastrointestinal motility is an important pathologic process of AP, and Qingyitang as a representative prescription of the fluency-based therapy in traditional Chinese medicine, can improve the gastrointestinal motility in rats with AP.

Wei MX, Li JJ, Wang YX, Nokihara K. Effect of Qingyitang on gastrointestinal motility in rats with acute pancreatitis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1369-1372

摘要

目的: 从急性胰腺炎(AP)大鼠肠动力改变探中医中药急性胰腺炎治疗的以通为用思想的机制.

方法: 由胆总管逆行注射 15 g/L 牛磺胆酸钠 0.5 mL 诱导大鼠 AP, 以红霉素为对照, 并设假手术组空白对照, 给模型大鼠灌喂通下解毒的代表方清胰汤, 分别观察各组小肠动力学、血清胃动素(Mot)、血清淀粉酶(AML)和胰腺组织病理改变指标. 并用正交设计的方法, 观察了清胰汤不同药物对离体豚鼠结肠平滑肌条张力的影响.

结果: 小肠推进比与 AP 组 (0.21 ± 0.08) 相比较, 清胰汤组 (0.49 ± 0.17) 和红霉素组 (0.30 ± 0.10) 明显提高 ($P < 0.01$), AP 组血清 MOT (119 ± 24 pg) 明显低于对照组 (169 ± 52 pg, $P < 0.05$), 清胰汤组 (206 ± 60 pg) 显著高于 AP 组 ($P < 0.01$). 清胰汤组的胰腺组织病理改变和血清 AML 显著改善. 清胰汤各药对平滑肌有兴奋作用, 对肌条张力影响的大小顺序是白芍、木香、延胡索和大黄.

结论: 小肠动力障碍是 AP 发展的重要病理过程, 中医以通为用、通下解毒的清胰汤能改善 AP 大鼠的胃肠动力的同时, 减轻了 AP 的病理损伤.

魏睦新, 李建军, 汪幼学, 轩原清史. 急性胰腺炎大鼠清胰汤治疗的肠动力作用机制. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1369-1372
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1369.asp>

0 引言

急性胰腺炎是一种常见急腹症, 由于中西医结合治疗的开展, 使其死亡率有了大幅度的下降^[1-5]. 多年来以天津南开医院为首的科研团组, 研究出了以清胰汤为首的一系列治疗效方^[1]. 从治法理论来看, 明显地受中医“六腑以通为用”思想的指导. 目前对 AP 研究已开始注意到胃肠动力在整个发病和预后的重要作用^[6-9]. 那么以通下解毒为主的清胰汤, 其治疗胰腺炎的机制, 是否与改善 AP 的肠道动力学有关, 其意义又何在, 我们以

Mot受体激动剂红霉素为对照, 观察了清胰汤对AP大鼠胃肠动力的影响, 并用离体豚鼠肠管对清胰汤的平滑肌活性进行了正交分析。借以从肠动力改变探急性胰腺炎治疗中以通为用思想的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 清胰汤(处方源自南开清胰一号方)由以下中药组成: 柴胡15 g、木香10 g、大黄15 g、白芍15 g、黄芩10 g、胡黄连10 g、芒硝10 g(江苏药材公司)。药物按醇水混合抽提的方法, 制成1 mL相当生药1 g的原液, 冷藏备用。牛磺胆酸钠(Taurocholic acid lot 46 h 0316 Sigma); 胰蛋白酶(Trypsin lot 67 h 7070 Sigma); 红霉素(Erythromycin 生产批号 0307-9713 中国药品生物制品检定所)。健康♂SD大鼠40只, 质量 200 ± 20 g; 豚鼠10只, 质量 400 ± 20 g, 由江苏省实验动物中心提供。

1.2 方法 SD大鼠适应性饲养1 wk后, 随机分为对照组、AP组、红霉素组、清胰汤组, 每组10只。实验前禁食自由饮水24 h。按照文献[10]方法, 各组动物均在乙醚麻醉下, 沿腹中线分层打开腹腔, 在十二指肠内侧找到胆总管, 用微型血管夹夹住近肝端, 在十二指肠端用留置针穿刺, 注射15 g/L的牛磺胆酸钠0.5 mL(5 min内匀速完成)。假手术对照组胆总管内注射相同剂量的生理盐水。术后1 h, 清胰汤组以清胰汤(1 mL相当生药1 g), 红霉素组以红霉素(1 g/L), AP组和对照组给予相同剂量的生理盐水灌胃, 每次1.5 mL, 每次间隔1 h, 共3次。术后5 h, 各组以美蓝1.5 mL灌胃, 术后6 h断头取血分离血清置-30 ℃冰箱保存待检测; 打开腹腔记录胰腺大体情况, 取胰腺组织迅速投入40 g/L的甲醛溶液固定送病理检查。测量小肠的总长T(自幽门至回盲部的长度)和染蓝小肠的长度A。组织病理学检查: 将胰腺组织标本固定12 h后取出石蜡包埋, 切片, HE染色, 由同一病理医师单盲检查。按水肿、炎性细胞浸润、出血坏死评分。最重者给4分, 正常者0分来描述结果。计算小肠推进比R根据测定长度按如下公式计算: $R = A/T$ 。血清MOT放免法测定。血清AML用碘-AML法(苏氏法)测定。离体平滑肌实验按文献[11]方法: 豚鼠脱颈处死, 开腹迅速自肛门上1 cm处取长约15 cm结肠, 用台氏(Tyrode's)液轻柔冲洗, 沿肠系膜剪开取肠系膜对侧结肠纵肌肌条(7 mm×1 mm)。肌条两端分别以非弹性细丝结扎成小环, 固定于微量多导离体器官水平浴槽(日本国立医学生理研究所提供)中, 一端用头皮针固定于浴槽底部, 另一端与肌肉张力换能器相连, 持续灌流台氏液(3 mL/min)并通95% O₂加5% CO₂, 施加1 g负荷张力, 以Doctor-95 Super Lab系统实时记录, 平衡约1 h。平衡后按正交表顺序加药, 100 μL/次, 最后滴Atropine和Ach(1.0×10^{-5} mol/L)各40 μL。每个药品滴加2-3次, 取均值。充分反应后, 匀速(8 mL/min)洗脱, 平衡30 min后加药。实验结果以平滑肌收缩曲线下面积

(积分)表示。

统计学处理 生物学实验数据以mean±SD表示, 组间显著性差异检验作F检验。中药正交实验设计因素水平的确定, 以清胰汤中的8味中药为研究因素, 每个因素有两个水平: 即水平1(给药), 水平2(不给药)。正交设计的选择: 本实验重点在于探讨各因素之间的差异, 每个因素只取两个水平, 不考虑交互作用, 选择L₁₂(2¹¹)正交表, 实验误差由空列和重复数据获得。以Ach效应指标为100%, 标化各组数据, 作F检验。

2 结果

小肠推进比AP组(0.21 ± 0.08)较假手术对照(0.36 ± 0.17)组显降低($P < 0.05$), 与AP组相比较, 清胰汤组(0.49 ± 0.17)和红霉素组(0.30 ± 0.10)明显提高($P < 0.01$), 清胰汤组优于红霉素组($P < 0.05$, 表1)。AP组血清MOT明显低于对照组($P < 0.05$), 清胰汤组显著高于AP组($P < 0.01$ 表1)。AP组血清AML比假手术对照组显著增高, 约为正常大鼠的20倍, 清胰汤组比AP组显著降低, 红霉素组与AP组无显著性差异(表1)。

表1 急性胰腺炎大鼠小肠推进比、血清Mot和AML(mean±SD)

| 组别 | n | 小肠推进比 | MOT(pg) | AML(U/L ⁻¹) |
|------|----|-------------------|----------------|-------------------------|
| 清胰汤组 | 10 | 0.49 ± 0.17^b | 206 ± 60^b | 4721 ± 963^b |
| 红霉素组 | 10 | 0.3 ± 0.10^a | 164 ± 28^a | 6015 ± 872 |
| 胰腺炎组 | 10 | 0.21 ± 0.08 | 119 ± 24 | 6478 ± 1212 |
| 对照组 | 10 | 0.36 ± 0.17^b | 169 ± 52^b | 1202 ± 1145^b |

^aP < 0.5, ^bP < 0.01 vs AP.

组织病理学结果: 假手术对照组胰腺组织腺泡完整, 个别有轻度水肿, 和少量炎性细胞浸润, 无间质充血, 无出血和坏死; AP组腺泡欠完整, 间质充血, 水肿大量中性粒细胞及单核细胞等炎性细胞浸润, 出血, 部分小叶坏死为明显的坏死性胰腺炎。清胰汤组的腺泡虽然也有破坏但各项病理指标的程度都较AP减轻($P < 0.01$)。红霉素组与AP组相似, 水肿程度较轻($P < 0.01$, 图1)。

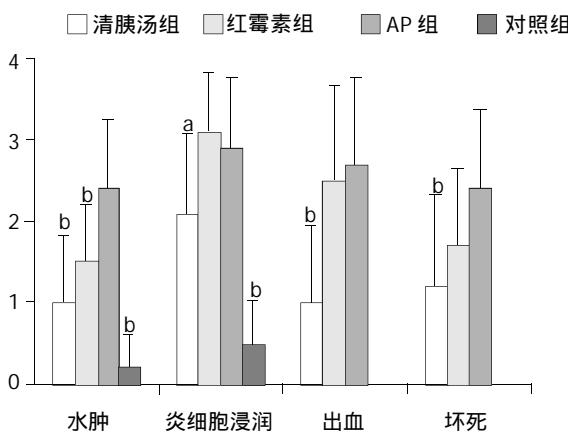


图1 胰腺组织损伤程度。^aP < 0.5, ^bP < 0.01 vs AP (n=10)。

表2 清胰汤离体实验正交设计方案及结果

| 实验号 | 肌张力计 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------|---|-----|---|----|---|----|---|----|---|----|------|------|------|------|--|----|----|----|------------|
| | 柴胡 | | 胡黄连 | | 黄芩 | | 白芍 | | 木香 | | 元胡 | | 大黄 | | 芒硝 | | X1 | X2 | X3 | Σx |
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | | | | | | | | | |
| 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.17 | 0.38 | 0.54 | 1.09 | | | | | |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 0.12 | 0.23 | 0.15 | 0.5 | | | | | |
| 3 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 0.05 | 0.03 | 0.2 | 0.28 | | | | | |
| 4 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 0.2 | 0.09 | 0.1 | 0.39 | | | | | |
| 5 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0.18 | 0.29 | 0.32 | 0.79 | | | | | |
| 6 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0.06 | 0.24 | 0.15 | 0.45 | | | | | |
| 7 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 0.18 | 0.26 | 0.51 | 0.95 | | | | | |
| 8 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 0.07 | 0.52 | 0.17 | 0.76 | | | | | |
| 9 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 0.08 | 0.37 | 0.1 | 0.55 | | | | | |
| 10 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 0.16 | 0.64 | 0.66 | 1.46 | | | | | |
| 11 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 0.03 | 0.32 | 0.12 | 0.47 | | | | | |
| 12 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 0.12 | 0.44 | 0.15 | 0.71 | | | | | |

清胰汤正交设计方法观察不同药物对离体豚鼠结肠平滑肌条张力的影响结果参见表2。计算极差R值: 各药对肌条张力影响的大小顺序是 D>E>A>F>C >H=I>B, 结合 K 值可以看出 D 、 E 、 F 和 G 即白芍、木香、延胡索和大黄对平滑肌有兴奋作用($P <0.05$, 表 3)。

表3 清胰汤离体实验结果方差分析表

| 方差来源 | L | V | MS | F | 显著性 |
|------|----------|----|----------|------------------|-----|
| A | 0.05 444 | 1 | 0.05 444 | 2.21 106 | |
| B | 0.00 054 | 1 | 0.00 054 | 0.02 211 | |
| C | 0.02 668 | 1 | 0.02 668 | 1.08 342 | |
| D | 0.1 369 | 1 | 0.1 369 | 5.55 968 P <0.05 | |
| E | 0.0 576 | 1 | 0.0 576 | 2.33 921 | |
| F | 0.05 138 | 1 | 0.05 138 | 2.08 652 | |
| G | 0.02 151 | 1 | 0.02 151 | 0.87 359 | |
| H | 0.02 151 | 1 | 0.02 151 | 0.87 359 | |
| 误差 | 0.66 484 | 27 | 0.02 462 | | |

3 讨论

AP 尤其是重症急性胰腺炎(SAP)为高危急腹症, 其死亡率高者可达 40%。因其发病机制未能完全阐明^[12-13], 治疗对策仍有许多争议。近年来, 随着“白细胞过度激活, 多种细胞因子和严整递质级联反应学说”, “胰腺微循环障碍学说”, “肠道细菌移居-胰腺组织继发感染学说”的提出, 以及影像学、监测手段、抗生素和抑酶药物的发展, 使 SAP 的治疗有了概念上的更新。中西医结合治疗是比较公认的疗法。从中医观点来看, AP 属于脾胃肝胆之病。多因暴饮暴食, 克伤脾胃, 或情志刺激, 暴怒伤肝, 横逆脾胃, 或蛔虫上扰, 肝胆气机逆乱等。其关键病理是肝胆气滞血瘀, 脾胃运化失司, 湿蕴热蒸,

腑气不通。治疗时, 虽然强调辨证论治, 可以分为肝气郁滞, 脾胃实热, 脾胃湿热和蛔虫上扰等不同证型, 处方用药也有所不同。但实践证明, 通腑之法, 为各型必用。充分体现了中医六腑以通为用的思想。然而从治法角度寻找AP的治疗规律, 探究通腑之法现代机制和意义, 研究还不多。近年来胃肠生理学的研究表明, 肠道除了消化吸收营养的功能外, 还是一个作用独特的免疫器官。为适应吸收功能的需要, 肠道具有人体最大的膜结构。肠道凭这一层薄的柱状上皮将其腔内存在的大量细菌及毒素和体内环境隔开。这种功能除了肠道具有丰富的分泌型 IgA、淋巴组织和细胞等特异性免疫功能外, 更由于肠道具有一套特殊的非免疫防御机制, 包括蠕动的驱除作用以及黏液和黏膜的机械屏蔽作用。在这些因素中, 肠蠕动看来起着某种中心的作用。他以自身的节律通过肠内神经丛传递而形成肠道的规律性的方向性的运动, 不仅传递食糜, 也是驱动肠内细菌及其产物排泄, 起到清道夫的作用。AP 时, 由于应激反应, 腹腔神经丛受刺激和渗液直接作用于肠管, 可导致不同程度的肠运动抑制, 肠运动抑制将导致肠内容物停滞, 菌群失调和细菌上移, 并利于细菌黏附在肠上皮表面进而穿透上皮进入体内。肠内容物推进停止和细菌发酵产气可增加肠内压力增加, 导致黏膜血流减少和黏膜破损, 最终破坏黏膜的屏障功能^[14]。本文结果表明, 在 AP 发生早期(6 h 内)即出现小肠推进比明显低于对照组($P <0.05$), 提示胃肠动力的改变是 AP 发病过程中的早期事件, 应早期干预。

中药清胰汤以清热解毒、疏肝理气、活血化瘀和通里攻下为治法, 药理研究证明其有抑菌、抗炎、利胆的作用。吴承堂 et al 报道具有减轻 AP 后肠黏膜损害, 调节肠道菌群微生态平衡、保护肠屏障功能, 从而减少 BT 致肠源性感染的作用^[14-16]。本文结果表明, 清胰汤

能提高血清 Mot 水平和降低 AML 活性，明显减轻 AP 时胰腺病理损害。提示其对肠黏膜屏障的保护效应，还能显著改善胃肠动力。推测可能是通过促进肠蠕动这个核心环节，达到排泄毒素，调整肠道微生态平衡，减轻内毒素和各种细胞因子的损伤来实现的。这种机制有利于全面维护肠黏膜屏障功能，减少肠道细菌移位和感染的发生机会，从而降低死亡率。这从侧面印证了中医六腑以通为用的治疗思想。红霉素作为一种 Mot 激动剂，在研究中证实也能改善胃肠动力，但对胰腺病理改善却没有帮助。可以看出清胰汤的通里攻下作用包含了肠动力剂的作用，但是其作用范围又不局限于此。应该是多层次多靶点的综合作用。

清胰汤的正交研究发现方中白芍、木香、延胡索和大黄对结肠平滑肌有直接兴奋作用，其中白芍最为显著。提示对结肠的直接作用可能是清胰汤改善肠道动力的机制之一。

总之，肠道动力异常，在 AP 的发展病理过程中，既是果又是因，对于归转和预后有很大的影响^[7]。中医六腑以通为用的观念，在 AP 的辨证治疗中，有重要的指导意义和深刻的科学内涵。多层次多靶点地开展治则治法研究，将有助于 AP 疗效的进一步提高。

4 参考文献

- 1 吴咸中. 急性胰腺炎的中西医结合治疗. 世界华人消化杂志 2001; 9:417-418

- 2 陈保华, 高毅, 杨继震. 重症急性胰腺炎的现代治疗. 世界华人消化杂志 2001;9:336-337
- 3 薛承锐, 齐清会. 急性胰腺炎的预后与评估. 世界华人消化杂志 2001;9:413-414
- 4 邹式炉, 杨炎辉, 华木旺, 陈文伟. 中西医结合治疗重症急性胰腺炎. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):33
- 5 赵宏耀. 中西医结合治疗急性胰腺炎 30 例. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊 8):69
- 6 郭萍, 张朋彬, 赵晓晏, 李宜辉. 急性胰腺炎患者胃泌素及胃动素水平的变化. 世界华人消化杂志 2001;9:600-601
- 7 潘定宇, 孙来宝, 贺银成, 曹军, 陈纪伟, 史海安. 重症急性胰腺炎并发胃排空障碍的临床研究. 世界华人消化杂志 2002;10:601-602
- 8 Van Felius ID, Akkermans LM, Bosscha K, Verheem A, Harmsen W, Visser MR, Gooszen HG. Interdigestive small bowel motility and duodenal bacterial overgrowth in experimental acute pancreatitis. *Neurogastroenterol Motil* 2003;15: 267-276
- 9 Wang X, Gong Z, Wu K, Wang B, Yuang Y. Gastrointestinal dysmotility in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:57-62
- 10 Nakae Y, Naruse S, Kitagawa M, Hirao S, Yamamoto R, Hayakawa T. Activation of trypsinogen in experimental models of acute pancreatitis in rats. *Pancreas* 1995;10:306-313
- 11 魏睦新, Naruse S, 尾崎毅, 轩原清史, 安藤英治, Wray V. PACAP 对豚鼠离体胆囊平滑肌的作用. 新消化病学杂志 1996;4:243-244
- 12 王兴鹏. 中国胰腺疾病研究的现状与展望. 世界华人消化杂志 2000;8:843-846
- 13 吴伟康. 急性胰腺炎的病因、病理. 世界华人消化杂志 2001;9: 410-411
- 14 吴承堂, 黎沾良, 黄祥成, 张志凌. 中药清胰汤及双歧杆菌合剂对急性坏死性胰腺炎肠道细菌移位影响的比较研究. 世界华人消化杂志 1999;7:525-528
- 15 姜玉峰, 岳茂兴. 解毒固本冲剂治疗腹腔感染合并全身炎性反应综合征的临床研究. 世界华人消化杂志 2003;11:1657-1659
- 16 袁耀宗, 楼恺娴, 龚自华, 涂水平, 翟祖康, 徐家裕. 大黄素治疗急性胰腺炎胰腺 EGF 基因的变化. 世界华人消化杂志 2001;9:127-130

World Journal of Gastroenterology 出版周期

《World Journal of Gastroenterology, WJG》将从 2004 年起由月刊改为半月刊，以期在不增加出版篇幅的前提下进一步缩短出版周期，力爭论文的投稿时滞控制在 1-4 个月内出版，并进入 Science Citation Index – Expanded 及 Index Medicus /MEDLINE 等国际著名检索系统，以展示我国消化病学者在该领域的国际领先地位。例如，2003 年第 10 期刊出的浙江大学医学院附属第二医院普外科彭淑牖教授等撰写的“采用 PMOD 和刮吸术通过不同途径进行肝尾叶切除术：76 例”，是一篇具有国际领先水平的论文，该文从收稿至出版仅用 45 天。

大鼠非酒精性脂肪肝中L-FABP的动态表达

冯爱娟, 陈东风

冯爱娟, 陈东风, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科 重庆市 400042
冯爱娟, 女, 河北安国人, 汉族, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科在读硕士研究生, 主要从事脂肪肝发病机制的研究。
项目负责人: 冯爱娟, 400042, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科。1972570060@sina.com
电话: 023-68757342
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-03-12

Expression of liver fatty acid binding protein in rat nonalcoholic fatty liver

Ai-Juan Feng, Dong-Feng Chen

Ai-Juan Feng, Dong-Feng Chen, Department of Gastroenterology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China
Correspondence to: Ai-Juan Feng, Department of Gastroenterology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China. 1972570060@sina.com
Received: 2004-01-15 Accepted: 2004-03-12

Abstract

AIM: To study the effect of liver fatty acid binding protein (L-FABP) in a model of rat nonalcoholic fatty liver.

METHODS: Expression of L-FABP gene was examined in fatty liver rats by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification and Western blot.

RESULTS: In high-fat diet group, mRNA and protein expression of L-FABP increased at 2 wk, and elevated remarkably at 12 wk (1.42 ± 0.034 vs 0.90 ± 0.04 ; 13372.00 ± 23.86 vs 6857.33 ± 32.96 637; $P < 0.05$).

CONCLUSION: Enhanced expressin of L-FABP at early staage is adapative reaction. With the advanced expression, disturbance of fatty acid metabolism may lead to nonalcoholic fatty liver.

Feng AJ, Chen DF. Expression of liver fatty acid binding protein in rat nonalcoholic fatty liver. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1373-1375

摘要

目的: 研究 L-FABP(liver fatty acid binding protein)在大鼠非酒精性脂肪肝形成中的作用。

方法: 建立高脂饮食脂肪肝模型, 用半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)与聚丙烯凝胶蛋白电泳(Western Blot)方法测定脂肪肝组织中L-FABP表达变化。

结果: 高脂饮食脂肪肝大鼠肝脏中 L-FABP 于 2 wk 时其 mRNA 及蛋白表达增强, 于 12 wk 时表达最为明显, 与正常组比较相差显著(1.42 ± 0.034 vs 0.90 ± 0.04 ; $13372.00 \pm$

23.86 vs 6857.33 ± 32.96 637; $P < 0.05$).

结论: 高脂饮食引起 L-FABP 表达增强, 最初是一种适应性反应, 随着 L-FABP 表达进一步增强, 导致脂肪酸代谢失衡, 引起脂肪肝的发生。

冯爱娟, 陈东风. 大鼠非酒精性脂肪肝中 L-FABP 的动态表达. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1373 - 1375

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1373.asp>

0 引言

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver, NAFL)是一种无过量饮酒史的肝实质细胞脂肪变性和脂肪贮积为特征的临床病理综合征^[1], 其发病机制至今尚未完全明确。目前研究显示, 多种因素参与了非酒精性脂肪肝的发病过程, 其中脂质代谢异常被认为是最关键和基础的环节之一^[2]。大量研究证实肝脏脂肪酸结合蛋白(liver fatty acid binding protein L-FABP)参与脂肪酸的摄取与转运, 在脂质代谢中起重要作用。为探讨 L-FABP 与非酒精性脂肪肝的关系, 我们观察其在高脂饮食脂肪肝大鼠模型中的表达。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 成年 ♂ 大鼠 40 只, 体重 176-188 (平均 182 g), 随机分为对照组与高脂饮食组, 各 20 只, 各组又随机分为 2、4、8、12 wk 4 个时相组, 每组各 5 只。对照组给予基础饲料(实验动物中心提供), 高脂饮食组给予高脂饲料(基础饲料 780 g/kg, 猪油 200 g/kg, 胆固醇 20 g/kg), 分别于 2、4、8、12 wk 时收集肝脏标本。以速眠新 1 mL/kg 麻醉大鼠, 股动脉抽血, 送检血清 ALT。然后阻断肝动脉与肝静脉, 留取肝组织标本, 肝脏甘油三酯(TG)检测采用甘油三脂检测试剂盒, 按照说明书进行操作。每块肝组织 0.8cm×0.4 cm, 约 100 mg, 加入 RIPA 裂解液 1 mL(裂解液组成: 1.5 mol/L NaCl 1 mL + 100 mmol/L 5 mL Tris-HCl 5 mL (pH7.4) + 100 g/L SDS 100 μL + 500 mmol/L DTT 100 μL + NP-40 100 μL + Complete Mini 1 片 + 三蒸水补足容量至 10 mL), 冰上裂解 1 h, 移入 1.5 mL 的 EP 管中离心, 取上清液, 用 Folin 酚法测定蛋白浓度。

1.2 方法

1.2.1 肝组织 L-FABP 表达采用 Western blot 法检测 取各组肝组织总蛋白 100 μg 上样进行聚丙烯凝胶电泳, 采用 80 g/L 的分离胶, 50 g/L 的积层胶, 上样后 60 V

恒压电泳约50 min，待溴酚蓝至积层胶与分离胶交界处，换恒压80 V电泳2 h，使溴酚蓝全部电泳出分离胶底部。电转法将分离胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上(20 V, 17 h)。膜用50 g/L脱脂奶粉+10 g/L BSA的1×TBS溶液封闭12 h，再用一抗(L-FABP 1:200)4℃下孵育12 h，二抗室温孵育60 min。用发光试剂检测结合的辣根过氧化物酶标记的二抗，X线片显影。

1.2.2 肝组织L-FABP mRNA表达采用RT-PCR检测总RNA提取采用宝灵曼公司的Tripure试剂提取组织总RNA，按试剂盒说明操作，最后加入灭活RNA酶去离子水10 μL重新溶解RNA待用。引物采用Primer design软件设计，由上海生物工程公司合成。L-FABP-upper: gcc, taa, tca, ttc, ata, gct, tcc, cta; L-FABP-lower: tac, caa, ctg, agc, tac, att, ctc, agc；扩增片段长度209 bp。内参照28 s rRNA-upper: 5' ac, cct, act, gat, gat, gtg, ttg, ttg3'; 28 s rRNA-lower: 5' ggt, tta, gcg, cca, ggt, tcc3' 扩增片段长度416 bp。反转录合成cDNA：反应体系总体积40 μL。在0.5 mL薄壁管中加入样品总RNA 4.0 μg, RNasin 1.33 μL (40U)，加DEPC-去离子水至20 μL；70℃变性10 min，然后冰上放置2 min以上；加入逆转录5×反应缓冲液8 μL, oligo(dT)₁₈ 2 μL(0.2 μg), 10 mmol/L dNTP 4 μL，加入M-MuLV逆转录酶2 μL(400 U), 25 mmol/L MgCl₂

表1 40只大鼠高脂组与正常组血清ALT的变化(n=40, mean±SD)

| 指标 | 分组 | 2 wk | 4 wk | 8 wk | 12 wk |
|-------------|--------|---------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| ALT(nkat/L) | 对照组(C) | 643.5 ± 31.3 | 660.1 ± 35.2 | 696.8 ± 42.5 | 820.1 ± 27.0 |
| | 高脂组(H) | 701.81 ± 24.0 | 880.2 ± 88.2 ^a | 975.2 ± 91.2 ^a | 1 173.6 ± 88.7 ^a |
| TG(mg/g) | 对照组(C) | 22.4 ± 0.6 | 22.5 ± 0.7 | 25.3 ± 0.6 | 24.8 ± 0.6 |
| | 高脂组(H) | 24.8 ± 0.9 | 32.6 ± 1.6 ^a | 43.2 ± 1.4 ^a | 55.7 ± 1.7 ^a |

^aP <0.05 vs 对照组。

表2 脂肪肝大鼠L-FABP mRNA RT-PCR扩增产物电泳和L-FABP蛋白($\text{mean} \pm \text{SD}$ 积分吸光度 A)

| 指标 | 对照组 | 高脂组 | | | |
|-------------|-----------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | | 2 wk | 4 wk | 8 wk | 12 wk |
| L-FABP mRNA | 0.90 ± 0.04 | 0.9218 ± 0.04 | 1.04 ± 0.03 ^a | 1.34 ± 0.37 ^a | 1.42 ± 0.034 ^a |
| L-FABP蛋白 | 6 857.3 ± 32.97 | 6 986.00 ± 41.46 | 10 361.3 ± 20.00 ^a | 12 133.67 ± 8.37 ^a | 13 372.00 ± 23.86 ^a |

^aP <0.05 vs 对照组。

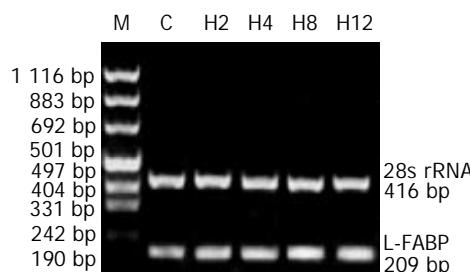


图1 脂肪肝大鼠肝脏L-FABP mRNA RT-PCR扩增产物电泳。

4 μL; 37℃反应60 min; 70℃变性10 min终止反应，-20℃保存备用。同时设立阴性对照，即用DEPC-去离子水代替样品总RNA。L-FABP扩增条件：95℃变性5 min, 95℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 循环32圈；RT-PCR产物的鉴定和产量分析各组的同一目的mRNA以相同的条件同时进行逆转录及PCR扩增，扩增产物在同一张琼脂糖凝胶(10 g/L)上进行电泳。凝胶照相后，于Gel Doc 2000凝胶图像分析系统进行扫描，用BandScan软件分析，测定产物条带的积分吸光度(A)。

统计学处理 实验所得计量资料用采用mean±SD表示，采用SPSS10.0软件单因素方差分析(One way ANOVA)，P <0.05表示差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 高脂组ALT于2 wk时无明显变化，与对照组比较无差异(P >0.05)，4 wk后开始增高，于12 wk时明显增高(P <0.05，见表1)。高脂组肝组织TG于2 wk时无明显变化，与对照组比较无差异(P >0.05)，4 wk后开始增高，于12 wk时明显增高(P <0.05，见表1)。

2.2 肝组织L-FABP mRNA表达 高脂饲料饮食组L-FABP mRNA于2 wk始表达增强，与对照组比较相差不显著，于4 wk后与正常饮食组比较具有显著意义(P <0.05，见图1，表2)。

2.3 肝组织Western blot 高脂饲料饮食组L-FABP表达于2 wk开始表达增强，于12 wk时最为明显，与对照组比较具有显著意义(P <0.05，见图2、表2)。

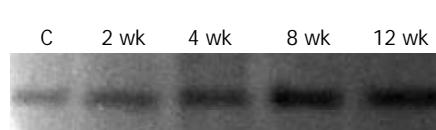


图2 脂肪肝大鼠肝脏L-FABP蛋白表达(Western blot)。

3 讨论

非酒精性脂肪肝是肝脏最常见的疾病之一, 随着人民生活水平的提高及饮食结构的西方化, 脂肪肝的发病率呈逐年上升趋势。研究结果显示^[2-5], 多种因素参与了非酒精性脂肪肝的发病过程, 主要包括: (1)遗传因素; (2)环境因素、饮食、营养状态、食物污染、食物营养素比例失调; (3)脂质代谢异常; (4)氧应激及脂质过氧化损伤; (5)免疫反应损害。脂肪肝的发生最终取决于肝脏对脂肪酸的摄取、氧化、合成、酯化和甘油三脂的转运出肝脏是否能保持动态平衡, 大量研究证实FABP可结合许多配体, 参与脂肪酸的摄取与转运, 在脂质代谢中起重要作用^[6-9]。L-FABP是FABP超家族中的一员, 存在于肝细胞和小肠黏膜细胞胞质, 对软脂酸盐、油酸和硬脂酸盐等长链脂肪酸具有高度亲和力, 从而参与脂肪酸的摄取与转运^[10]。在肝脏, 长链脂肪酸一般通过位于肝细胞膜上的FABP、脂肪酸转运蛋白(fatty acid transport protein FATP)^[11]摄取入胞, 进入细胞内的脂肪酸在L-FABP的辅助下被转入到线粒体、过氧化物酶体、内质网等进行β-氧化、酯化, 从而调控细胞内的脂肪酸代谢, 最终使体内脂肪酸代谢保持相对平衡。目前, 有关L-FABP与脂肪肝形成的关系国内外尚未见报道, 国外文献报道在L-FABP基因敲除的大鼠, 脂肪酸转运明显降低^[12]; 另外大量研究报道其在肥胖、糖尿病的形成过程中具有重要的作用^[13]。本实验结果显示高脂饮食4wk开始出现脂肪变, 随着时间的延长, 肝细胞脂肪变性和炎细胞浸润越为明显, 血清ALT及肝脏内TG明显呈上升趋势, 而肝组织L-FABP mRNA及蛋白表达于2 wk时即开始增高, 与正常对照相差不显著($P > 0.05$), 12 wk时表达最为明显, 与正常对照组相比相差显著($P < 0.05$)。L-FABP的mRNA及蛋白表达先于肝脏组织学改变, 可能为高脂饮食后机体的适应性反应, 随着高

脂饮食摄入的增加, L-FABP表达明显增强, 导致脂肪酸代谢失衡, 引起脂肪肝的发生和发展。

4 参考文献

- 1 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪肝诊断标准(草案). 中华肝脏病杂志 2001;6:325
- 2 Park KS, Lee YS, Park HW, Seo SH, Jang BG, Hwang JY, Cho KB, Hwang JS, Ahn SH, Kang YN, Kim GC. Factors associated or related to with pathological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J Intern Med* 2004;19:19-26
- 3 Sanyal AJ. Insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis: fat or fiction. *Am J Gastroenterol* 2001;96:274-276
- 4 范建高, 曾民德, 王国良. 脂肪肝的发病机制. *世界华人消化杂志* 1999;7:75-76
- 5 Arthur JM. Update on nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 2002;34:255-262
- 6 Storch J, Alfred EA. Thumser, The fatty acid transport function of fatty acid binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1486:28-44
- 7 Stump DD, Fan X, Berk PD. Oleic acid uptake and binding by rat adipocytes define dual pathways for cellular fatty acid uptake. *J Lipid Res* 2001;42:509-520
- 8 Eric D, Claude F. Is there a single mechanism for fatty acid regulation of gene transcription? *Biochemical pharmacol* 2002; 7307:1-9
- 9 Zimmerman AW, Van Moerkerk HT, Veerkamp JH. Ligand specificity and conformational stability of human fatty acid binding proteins. *Int J Biochem Cell Biol* 2001;33:865-876
- 10 Hera GM, Chianga CC, Chenb WY, Wu JL. In vivo studies of liver-type fatty acid binding protein (L-FABP) gene expression in liver of transgenic zebrafish. *Elsevier Science BV* 2003; 13:125-133
- 11 Stahl A, Gimeno RE, Tartaglia LA, Lodish HF. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:266-273
- 12 Newberry EP, Xie Y, Kennedy S, Han X, Buhman KK, Luo J, Gross RW, Davidson NO. Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid binding protein. *J Biol Chem* 2003; 278:51664-51672
- 13 Memon RA, Fuller J, Moser AH, Smith PJ, Grunfeld C, Feingold KR. Regulation of putative fatty acid transporters and acyl-coa synthetase in liver and adipose tissue in ob/ob mice. *Diabetes* 1999;48:121-127

先天性门静脉畸形的彩色多普勒超声诊断

夏建国, 董胜翔, 李凤华, 许桂英, 彭梅

夏建国, 李凤华, 许桂英, 彭梅, 上海第二医科大学附属仁济医院超声科 上海市 200127
董胜翔, 上海第二医科大学附属仁济医院急诊科 上海市 200127
项目负责人: 夏建国, 200127, 上海市东方路 1630 号, 上海第二医科大学附属仁济医院超声科. xiahu@citiz.net
电话: 021-58752345 转 3211
收稿日期: 2004-01-09 接受日期: 2004-03-16

Color Doppler ultrasonic diagnosis of congenital portal vein malformations

Jian-Guo Xia, Sheng-Xiang Dong, Feng-Hua Li, Gui-Ying Xu, Mei Peng

Jian-Guo Xia, Feng-Hua Li, Gui-Ying Xu, Mei Peng, Department of Ultrasonography, Affiliated Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200127, China
Sheng-Xiang Dong, Department of Emergency, Affiliated Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200127, China
Correspondence to: Jian-Guo Xia, Department of Ultrasonography, Affiliated Renji Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200127, China. xiahu@citiz.net
Received: 2004-01-09 Accepted: 2004-03-16

Abstract

AIM: To evaluate the value and clinical significance of the color Doppler ultrasound in the diagnosis of congenital portal vein malformations.

METHODS: The sonographic traits by color Doppler ultrasound in 14 patients with portal malformations were reviewed and analyzed.

RESULTS: The color Doppler ultrasonograms for 7 patients with portal vein cavernous angioma, 2 patients with intrahepatic arterial-portal fistula, 2 patients with intrahepatic portal-vein fistula and 3 patients with portal stenosis were consistent with those of DSA or CT examination. There were 10 patients with liver dysfunction and portal hypertension among them.

CONCLUSION: The color Doppler ultrasound plays an important role in the diagnosis of the congenital port vein malformations.

Xia JG, Dong SQ, Li FH, Xu GY, Peng M. Color Doppler ultrasonic diagnosis of congenital portal vein malformations. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2004;12(6):1376-1379

摘要

目的: 探讨彩色多普勒超声在先天性门静脉畸形中的诊断价值及其临床意义。

方法: 应用彩色多普勒对14例门静脉血管畸形患者的声像图特点进行观察与分析。

结果: 门静脉海绵样变 7 例、肝内肝动脉门静脉瘘 2 例、门静脉狭窄 3 例、肝内门静脉肝静脉瘘 2 例, 彩超结果与血管造影或 CT 相符合.其中有肝功能不全和门静脉高压症 10 例.

结论: 彩色多普勒超声在先天性门静脉血管畸形诊断中具有重要的价值.

夏建国, 董胜翔, 李凤华, 许桂英, 彭梅. 先天性门静脉畸形的彩色多普勒超声诊断. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1376-1379
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1376.asp>

0 引言

先天性门静脉血管畸形虽临床少见,但是病变复杂类型多^[1-18],多数可以引起门静脉高压和肝功能不全,因此临床容易误诊为肝炎后肝硬化门高压.为了提高对该病的认识,我们对近3a经彩色多普勒超声首先发现的门静脉血管畸形14例进行了分析如下.

1 材料和方法

1.1 材料 2000-01/2003-07在常规超声检查时发现的门静脉血管畸形14例.平均年龄41岁,男6例,女8例.其中10例因腹水或消化道出血或脾亢等原因来院检查.无肝脏肿瘤病史,有明确的肝炎病史1例,其余均无.已切除脾2例. A/G 比例下降或倒置10例,肝功能正常4例.在胃镜检查时发现有食管及胃底静脉曲张4例(全部病例经过DSA或CT证实).

1.2 方法 采用HP sonos4500型彩色多普勒超声诊断仪,探头频率3.5 MHz.二维超声观察肝、胆、脾大小及实质回声,肝动脉及肝静脉内径,形态、走向、内部回声及其与周围血管的关系,发现可疑血管畸形部观察血流动力学改变,血流方向和性质,并测量血流参数.观察胃左静脉的血管内径及血流方向.记录以动态或静态图像存入超声工作站.

2 结果

门静脉海绵样变7例.门静脉主干明显增宽,内充满长短不一的蜂窝状分隔光带,光带间为无回声区,并延伸到肝脏内(图1);蜂窝状无回声区内充满彩色血流,并探及正反向的门静脉样的血流频谱.其中1例为门静脉血栓形成后,在门静脉旁形成多条细小的侧支血管,并延伸到肝实质内,原有的肝内门脉结构管腔消失,回声增强(图2),肝脏实质光点增粗,分布不均匀.另

有2例同时伴有门静脉肝静脉瘘，其中的1例门静脉主干在肝门部形成海面样改变，然后经肝脏的前缘进入肝实质，并与肝中、左静脉吻合，吻合口处管腔呈囊状扩张，而正常行走的门静脉在肝实质内表现为回声增强，管腔消失；另1例见增宽扭曲的门静脉左支与增宽的肝左静脉相通。

肝内门静脉肝静脉瘘2例. 瘘口处的两支静脉扭曲、管腔增粗(图3)，流速增加，其中的1例见瘘口呈囊状扩张，内充满彩色血流，肝静脉内的血流频谱类似门静脉频谱。



图1 门静脉主干呈峰窝样改变(MPV)，并向肝内延伸。



图2 显示呈实质改变的门静脉主干(MPV)上方见扩张、扭曲的小血管。



图3 显示肝静脉门静脉瘘时，肝静脉和门静脉的内径明显增宽。

肝内肝动脉门静脉瘘2例. 肝动脉内径明显增宽与门静脉主干接近，2例门静脉主干内径为0.9 cm和1.2 cm，肝动脉内径约0.6 cm和1.1 cm，肝内门静脉的内径明显大于主干，门静脉内可见五彩血流，肝动脉流速增快，阻力指数降低约0.68和0.63。其中1例局限于右前叶肝，门静脉血流向肝，瘘口处肝动脉扩张、扭曲，血管增多，并可见肝动脉的血液经瘘口

流入门静脉；另1例肝实质内肝动脉弥漫性扩张、扭曲，在门静脉矢状段可见瘘口，约2 mm左右，并见动脉血流入静脉内(图4A)，门静脉的血流频谱呈搏动性，血流方向离肝(图4B)，胃左静脉明显扩张扭曲，内可见血栓图像，血流方向离肝，肠系膜上静脉血流方向离肝，肠系膜内可见丰富的血管呈网状分布。

门静脉狭窄3例. 门静脉回声增强，管腔内彩色血流不明显(图5)，肝脏均偏小，脾肿大，脾静脉内径增宽，可见脾肾静脉分流。肝静脉内径变细(表1)。

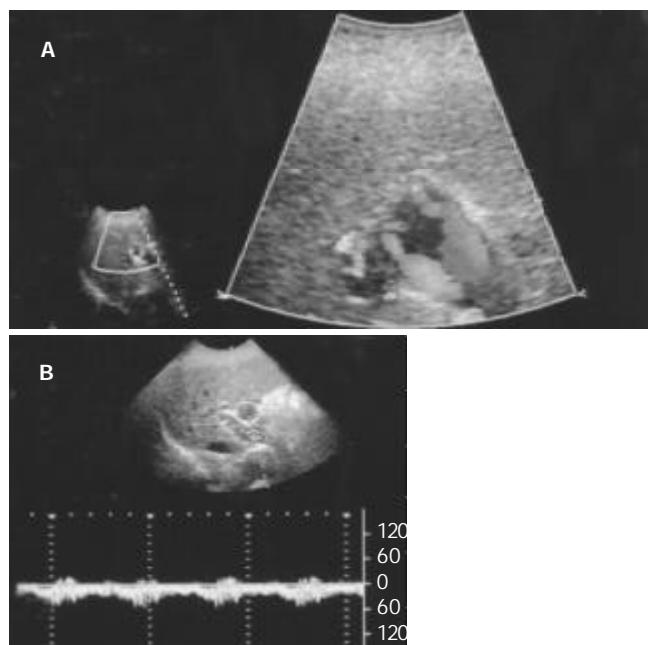


图4 A: 显示肝动脉门静脉瘘时，肝动脉内的血流流入门静脉矢状段内(LPV)，B: 肝动脉门静脉瘘时，门静脉主干内的反向、搏动性的血流频谱。

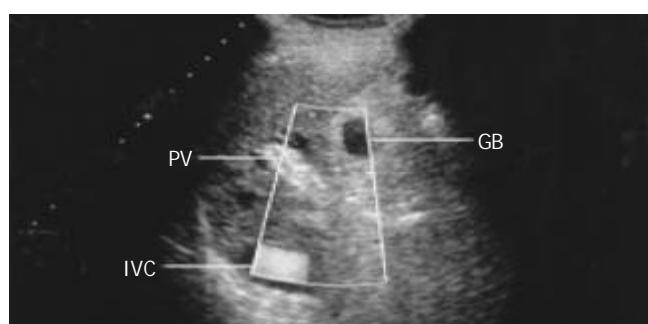


图5 显示门静脉纤维化时，门静脉回声增强(PV)、管腔消失，内无彩色血流。

表1 先天性门静脉血管畸形的并发症

| 疾病分类 | n | 肝脏 | 肝实质 | 胃左静 | 脾大 | 腹水 |
|-----------|----|----|------|-----|----|----|
| | | 缩小 | 回声正常 | 脉反流 | | |
| 门静脉海绵样变 | 7 | 1 | 5 | 6 | 5 | 2 |
| 肝内门静脉肝静脉瘘 | 2 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| 肝内肝动脉门静脉瘘 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| 门静脉狭窄 | 3 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 |
| 总计 | 14 | 5 | 11 | 10 | 8 | 6 |

3 讨论

先天性门静脉血管畸形的发生率至今不明确。国内外的文献也有少量的报道，其中以肝门静脉海绵样血管瘤或称海绵样变为多见，其次为肝动脉门静脉瘘^[1-18]。正常门静脉的解剖是通过肝十二指肠韧带上升到达肝门而分为右、左侧门静脉，并分别入肝右叶和肝左叶。在肝内反复分支，最后汇入肝血窦，与相伴随的肝固有动脉分支流入的肝血窦的血，共同经肝细胞代谢后汇入小叶间静脉，然后汇集成肝静脉注入下腔静脉。门静脉狭窄可发生于门静脉的任何部位，多数发生在门静脉的主干，本组3例均发生在门静脉主干及左右分支，其狭窄机制可能与出生后早期循环状态的改变有关。出生前，脐静脉供血经门静脉进入下腔静脉。出生后，脐静脉闭塞且进行纤维化，形成韧带。如纤维化过度延伸至门静脉及其分支，即可导致门静脉狭窄，甚至闭塞。先天性门静脉狭窄在儿童肝前门静脉高压中具有重要意义^[3,4,11]。

彩色多普勒超声诊断门静脉海绵样变的正确性已毋庸置疑，门静脉海绵样变的病因可分为原发性和继发性^[12-15]。原发性指门静脉结构先天性发育异常，门脉管腔缺失、狭窄或闭锁、或脐肠系膜和肝静脉之间的静脉丛异常增生而来。继发性指原有正常门脉系统的管腔结构，而由于门静脉癌栓和血栓形成或门静脉内膜炎导致门静脉纤维化，继之门静脉管腔海绵样变或管腔旁侧支血管形成^[12-15]。本组1例脾切除术后出现门静脉海绵样变，其原因是脾切除后血小板急剧上升和门静脉系统血流动力学突然改变致门静脉内血栓形成，最终导致海绵样变。由于门静脉海绵样变本身无临床症状，治疗主要是对症处理，也可在内窥镜下注射硬化剂和行静脉分流术，但效果尚不确定。

肝动脉-门静脉瘘可分为先天性和后天性两种。后天性常见，多有外伤和肿瘤等引起。先天性系由肝脏血管先天性发育异常所致，虽然少见，但是并发症严重，愈后差，治疗困难^[19-32]。本组1例先天性肝动脉-门静脉瘘肝动脉及其分支血管增粗，增多，远端与门静脉有广泛交通，大量肝动脉血流经瘘口流入门静脉，引起门静脉高压，肝功能不全。先天性肝动脉-门静脉瘘的声像图具有特征性：门静脉血流呈反向流动，血流频谱为反向“动脉样”形态；肝脏内的门静脉周围有异常增多、增宽、扭曲的肝动脉血管，彩色血流信号异常丰富。肝动脉频谱呈“高速低阻型”，这种频谱是判断肝动脉-门静脉瘘的重要依据。本组2例肝动脉门静脉瘘的病例中，同时发现了瘘口，并测及明显的瘘口处异常血流信号。

门静脉肝静脉瘘的病因可以为先天性，也可以为外伤性^[22]，还可以与其他肝脏血管畸形并存^[7, 24]，受累的肝静脉和门静脉内径明显增宽，可见小的瘘口，或瘘口呈囊样扩张。这类门静脉畸形对肝功能的影响较小，肝脏的大小，内部回声，肝功能均在正常范围。但是容

易引起肝性脑病。

门静脉畸形患者部分是由于肝功能不全，门静脉高压消化道出血来院就诊，因此临床往往诊断为肝硬化引起的门高压；也有部分患者是在常规肝脏超声的检查中发现的。本组发现的病例中，80%的患者肝脏实质回声正常，部分患者因缺血而肝脏缩小，另一些患者因门静脉狭窄，而形成脾肾静脉瘘。对有门静脉畸形引起的门高压，彩色多普勒血流显像可明确其病因，并对治疗方案的选择至关重要，一方面有助于发现潜在的原发性疾病，指导手术治疗；另一方面超声能正确判断门静脉阻塞的原因和程度，有否门静脉高压以及高压程度，有助于临床治疗措施的选择。彩色多普勒超声以其首选、无创、可重复性强，且诊断率高的优势，在临床诊治方面发挥极大的作用，可以直接观察病变部位及其周围有关血管、血流动力学的改变。

4 参考文献

- 朱建平, 姚俊华, 洪峻峰. 彩色多普勒诊断先天性门静脉血管畸形. 中国超声医学杂志 2002;18:132-134
- Lu DS, Lin J, Kadell BM. Congenital or idiopathic hepatic vascular malformations: CT findings. Am J Roentgenol 1996; 167:1155-1157
- 张永生, 李晓燕. 成人先天性门静脉闭锁性门静脉高压症1例. 中华实用医学 2002;4:75
- Altavilla G, Cusatelli P. Ultrastructural analysis of the liver with portal vein agenesis: a case report. Ultrastruct Pathol 1998;22:477-483
- Paley MR, Farrant P, Kane P, Heaton ND, Howard ER, Karani JB. Developmental intrahepatic shunts of childhood: radiological features and management. Eur Radiol 1997;7: 1377-1382
- Tashiro H, Itamoto T, Nakahara H, Ohdan H, Kobayashi T, Asahara T. Resection of hepatocellular carcinoma in a patient with congenital anomaly of the portal system. Dig Surg 2003; 20:163-165
- Hashimoto M, Tate E, Nishii T, Watarai J, Shioya T, White RI. Angiography of hepatic vascular malformations associated with hereditary hemorrhagic telangiectasia. Cardiovasc Interv Radiol 2003;26:177-180
- Bodner G, Peer S, Karner M, Perkmann R, Neuhauser B, Vogel W, Jaschke W. Nontumorous vascular malformations in the liver: color Doppler ultrasonographic findings. J Ultrasound Med 2002;21:187-197
- Wachsberg RH, Bahramipour P, Sofocleous CT, Barone A. Hepatofugal flow in the portal venous system: pathophysiology, imaging findings, and diagnostic pitfalls. Radiographics 2002; 22:123-140
- Bodner G, Gluck A, Springer P, Konig P, Perkmann R. Aneurysmal portosystemic venous shunt: a case report. Ultraschall Med 1999;20:215-217
- Boon LM, Burrows PE, Paltiel HJ, Lund DP, Ezekowitz RA, Folkman J, Mulliken JB. Hepatic vascular anomalies in infancy: a twenty-seven-year experience. J Pediatr 1996; 129:346-354
- Perisic M, Djulafic DJ, Sagic D, Grbic R. Doppler-duplex ultrasonography in the diagnosis of cavernous portal vein. Srpsk Arh Celok Lek 1998;126:368-373
- 赵修义, 张雪林, 魏斌, 郑卫权, 王劲. 门静脉海绵样变性的CT诊断及临床意义. 实用放射学杂志 2000;16:351-354
- 李燕, 王汛, 陶溢潮, 刘继章, 胡剑侠. 二维及彩色多普勒超声对原发性肝癌合并门静脉癌栓同时合并门静脉海绵样变性的诊断. 中国医学影像技术 2002;18:1055-1056
- 王炳煌. 门静脉海绵状血管瘤样变的诊断和治疗. 外科理论与实践 2002;7:231-232
- Kumar N, de Goyet Jde V, Sharif K, McKiernan P, John P.

- Congenital, solitary, large, intrahepatic arterioportal fistula in a child: management and review of the literature. *Pediatr Radiol* 2003;33:20-23
- Quiroga S, Sebastia MC, Moreiras M, Pallisa E, Rius JM, Alvarez-Castells A. Intrahepatic arterioportal shunt: helical CT findings. *Eur Radiol* 1999;9:1126-1130
- 吴风林, 戴琳. 彩色多普勒超声诊断先天性肝动脉-门静脉瘘. 中国医学影像学杂志 2002;10:295
- Balci NC, Semelka RC, Sandhu JS. Intrahepatic arterioportal fistula: gadolinium-enhanced 3D magnetic resonance angiography findings and angiographic embolization with steel coils. *Magn Reson Imaging* 1999;17:475-478
- Yu JS, Kim KW, Sung KB, Lee JT, Yoo HS. Small arterial-portal venous shunts: a cause of pseudolesions at hepatic imaging. *Radiology* 1997;203:737-742
- Buscarini E, Buscarini L, Civardi G, Arruzzoli S, Bossalini G, Piantanida M. Hepatic vascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia: imaging findings. *Am J Roentgenol* 1994;163:1105-1110
- Grunert D, Stier B, Schoning M. Control of surgical portosystemic shunt in children using computerized duplex sonography. *Ultraschall Med* 1989;10:295-302
- Routh WD, Keller FS, Cain WS, Royal SA. Transcatheter embolization of a high-flow congenital intrahepatic arterial-portal venous malformation in an infant. *J Pediatr Surg* 1992;27:511-514
- Chae EJ, Goo HW, Kim SC, Yoon CH. Congenital intrahepatic arterioportal and portosystemic venous fistulae with jejunal arteriovenous malformation depicted on multislice spiral CT. *Pediatr Radiol* 2003; 17 [Epub ahead of print]
- Peng YF, Chen LK, Chou YH, Chang FC, Hwang SJ. Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Zhonghua Yixue Zazhi (Taipei)* 2002;65:614-618
- Mieles LA, Waldman D, Orloff MS. Arterioportal fistulae following segmental liver transplantation in a child. *Pediatr Transplant* 2002;6:419-422
- Lin WD, Wu JY, Hsu HB, Tsai FJ, Lee CC, Tsai CH. Mutation analysis of a family with hereditary hemorrhagic telangiectasia associated with hepatic arteriovenous malformation. *J Formos Med Assoc* 2001;100:817-819
- Schaeffer IG, Kirpenstein J, Wolvekamp WT, Van den Ingh TS, Rothuizen J. Hepatic arteriovenous fistulae and portal vein hypoplasia in a Labrador retriever. *J Small Anim Pract* 2001;42:146-150
- Tseng JJ, Chou MM, Lee YH, Ho ES. Prenatal diagnosis of intrahepatic arteriovenous shunts. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000;15:441-444
- Bolognesi M, Sacerdoti D, Bombonato G, Chiesura-Corona M, Merkel C, Gatta A. Arterioportal fistulas in patients with liver cirrhosis: usefulness of color Doppler US for screening. *Radiology* 2000;216:738-743
- Caselitz M, Wagner S, Chavan A, Gebel M, Bleck JS, Wu A, Schlitt HJ, Galanski M, Manns MP. Clinical outcome of transfemoral embolisation in patients with arteriovenous malformations of the liver in hereditary haemorrhagic telangiectasia (Weber-Rendu-Osler disease). *Gut* 1998;42:123-126
- Vauthey JN, Tomczak RJ, Helmberger T, Gertsch P, Forsmark C, Caridi J, Reed A, Langham MR Jr, Lauwers GY, Goffette P, Lerut J. The arterioportal fistula syndrome: clinicopathologic features, diagnosis, and therapy. *Gastroenterology* 1997;113:1390-1401

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

• 消息 •

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

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

• 文献综述 •

Runx3与胃癌关系的研究进展

毛晓韵, 辛 彦

毛晓韵, 辛彦, 中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所第四研究室
辽宁省沈阳市 110001
项目负责人: 辛彦, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号, 中国医
科大学附属第一医院肿瘤研究所第四研究室. yxin@mail.cmu.edu.cn
电话: 024-23256666-6351 传真: 024-22703576
收稿日期: 2004-03-21 接受日期: 2004-04-20

摘要

Runx3 基因是近年来发现的一个新的肿瘤抑制基因, 是 Runx 转录因子家族成员. 因其在小鼠胚胎发育过程及人类多种恶性肿瘤尤其是在胃癌的发生过程中起重要作用而倍受关注. 现介绍 Runx3 的结构功能、传导通路、编码蛋白的结构及分子生物学特征, 重点对 Runx3 基因与胃癌发生的关系及其分子机制的研究进展作一综述.

毛晓韵, 辛彦. Runx3 与胃癌关系的研究进展. 世界华人消化杂志 2004;12 (6):1380-1383
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1380.asp>

0 引言

胃癌是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一^[1-5]. 研究表明胃癌是由于端粒酶激活、抑癌基因失活和癌基因激活等^[6-10]引发的多因素、多阶段及多基因变异的综合病变过程. 因此, 从分子生物学及遗传学的角度上可看作是一类多基因疾病. 目前普遍认为, 尽管癌基因的存在是促进癌症发生所需要的, 但抑癌基因的失活在肿瘤的发生发展中所起的作用可能比癌基因的活化更常见、更重要. Runx3 (PEBP2αC/CBFA3/AML2)基因是近年新发现的一个肿瘤抑制基因, 因其在小鼠胚胎发育过程及人类多种恶性肿瘤的发生发展过程中起重要作用而倍受关注^[11-17]. 现将对 Runx3 的结构功能、传导通路及目前 Runx3 在胃癌发生中的作用和致病机制等方面的研究现状作一综述.

1 Runx3 基因及其蛋白结构

1.1 Runx3 基因结构 人类 Runx3 (runt-related transcription factor 3 gene)基因位于染色体 1p36.1^[18], 基因全长约 67 kb, 含有 P1 和 P2 两个启动子, 6 个外显子和 1 290 bp 的开放阅读框, 内含子 1 跨越了整条基因全长的一半(35 kb). 两个启动子都没有 TATA 盒而有 CCAAT 盒并且富含 GC, 两个启动子区域均含数个分离的转录起始点, Runx3 mRNA 主要来自于 P2 启动子的转录^[17-18]. 两个启动子的 GC 含量不同, P2 启动子 GC 含量高(64%), 理论上启动子 P2 发生甲基化的机率高

于 P1^[18-19]. P2 含有 CCAAT 盒、E 盒以及 SP1 和 Egr-1 的结合位点; P1 也含有一个 E 盒并有大量的 T 细胞和 B 细胞特异的转录因子 Ikaros, Ets, CREB/ATF 结合位点. P1 和 P2 转录成 mRNA 时分别产生含 373 bp 的 5' - 非编码区(5' -UTR)和含有 2 554 bp 的 3' - 非编码区(3' -UTR), 3' -UTR 缺多聚 A 尾^[18]. 鼠的 Runx3 基因有两个大的 CpG 岛, 围绕着外显子 2(相当于启动子 P2 的位置)和外显子 6 的起始部位. 在人类 Runx3 基因除了有两个与鼠相同的 CpG 岛外, 在近外显子 2 的部位还有一个明显的 CpG 岛, 这个区域缺乏 SP1 位, 由一个多态小卫星 DNA 构成, 有 25 bp 单位的 29 个拷贝^[18].

1.2 Runx3 蛋白结构 人类 Runx3 蛋白由 415 个氨基酸残基构成, 是转录因子 Runx 家族的成员, 目前已证明该基因家族在哺乳动物有三个成员 Runx1, Runx2 和 Runx3. 他们都是由 α 亚单位和 β 亚单位构成异二聚体. α 亚单位含有一个 128 个氨基酸组成的 RD(Runt domain)保守域. RD 位于 Runx 的氨基末端, 包含一个 S 型免疫球蛋白折叠, 介导 Runx 蛋白与 DNA 结合以及蛋白之间的相互作用^[20-21]. α 亚单位介导 RD 与靶 DNA 基序 PyGPYGGT 的结合, β 亚单位能增强 RD 与靶 DNA 的结合力^[22]. Runx 蛋白的羧基端富含脯氨酸和丝氨酸, 在转录调控方面起重要作用^[22-23]. Runx 与 DNA 偶联位点位于几个造血和骨形成相关基因的启动子调节域^[24], 并调控这些基因的表达. 尽管 Runx 家族的基因产物有许多结构上的共性, 但各自有不同的生物学功能^[20, 24]. Runx1 与造血功能有关, 30% 的人类急性白血病伴有 Runx1 基因的改变^[25]. Runx2 是重要的骨生成调节因子, 他的突变与人类锁骨颅骨发育不良等骨疾病有关^[26-27]. Runx3 对脊神经节的神经发育及胃黏膜上皮细胞的增生有调节作用^[12-13].

2 Runx3 畸变与胃黏膜癌变

2.1 Runx3 敲除促进胃黏膜上皮增生 正常鼠的胃肠道和线虫的肠管内都表达 Runx3, 表明 Runx3 的功能在生物进化过程中比较保守^[28]. 动物实验研究发现, Runx3 敲除的小鼠(Runx3^{-/-})的胃黏膜上皮较未敲除小鼠(Runx3^{+/+} 小鼠)相比, 呈明显的过度增生^[13]. 进一步研究表明, Runx3 敲除的小鼠胃黏膜上皮细胞对 TGF-β 诱导的凋亡产生抵抗作用, 而未敲除鼠胃黏膜上皮细胞的生长很明显地被 TGF-β 抑制. 提示胃黏膜过度增生是由于黏膜上皮细胞凋亡受到抑制引起的, 并且发现 Runx3 选择性的表达在凋亡最常见的胃黏膜上皮细胞,

而在胃增生活跃的干细胞带没有观察到 Runx3 的表达, 提示 Runx3 可能参与凋亡的过程。肿瘤细胞的一个特性就是不能适时凋亡^[29], 基于上述动物实验的结果, Runx3 的表达改变很可能与人类胃癌的发生有关系, 有必要对胃癌 Runx3 表达进行检测。

2.2 胃癌 Runx3 表达降低 / 缺失

2.2.1 Runx3 杂合性丢失与表达 Li et al^[13]应用荧光原位杂交法(fluorescence in situ hybridization, FISH)对 15 例胃癌细胞系和 46 例手术切除的临床胃癌组织 Runx3 的 DNA 倍体进行分析, 发现 Runx3 大多是异倍体, 3/15 株(20%)胃癌细胞系和 14/46 例(30%)胃癌组织存在 Runx3 杂合性缺失, 杂合性丢失率随肿瘤的演进逐渐增高($P < 0.01$)。进一步用 RT-PCR、Northern 杂交和原位杂交方法对胃癌细胞系和胃癌组织标本的 Runx3 mRNA 表达进行检测, 发现 Runx3 在 6/15 株(40%)胃癌细胞系无或低表达(包括 Runx3 杂合性缺失的 3 个细胞系); 28/46 例(60.9%)胃癌组织 Runx3 无或低表达, 其中 9/22 例(41%)I 期胃癌无 Runx3 表达, 1/2 例(50%)II 期、11/14 例(79%)III 期、7/8 例(88%)IV 期存在 Runx3 表达下调, 其下调的比例随肿瘤的演进而上升($P < 0.01$)。并且在这 28 例胃癌中, 其中 13 例检测出有 Runx3 杂合性丢失。检测到杂合性丢失的 14 例胃癌组织中, 除 1 例外, 其余 13 例的胃癌组织都显示 Runx3 表达缺失, 检测到杂合性丢失的 3 株细胞系全有 Runx3 表达缺失, 表明了 Runx3 杂合性丢失与 Runx3 表达下调有关($P < 0.05$)。Runx3 的杂合性丢失是造成在胃癌中检测不到 Runx3 的表达的原因之一。

2.2.2 Runx3 甲基化与 Runx3 表达 启动子区 CpG 岛的甲基化与编码区的突变在肿瘤抑制基因失活方面有着同样的作用^[30]。Runx3 启动子 P2 区域有一个典型 CpG 岛, Li et al^[13]用甲基化敏感酶和不敏感酶消化从 15 个胃癌细胞系分离出来的基因组 DNA, 以检测他们的甲基化状态, 结果显示在 Runx3 低表达或不表达与 Runx3 启动子 P2 区域的甲基化有关($P < 0.05$)。又用甲基化特异性 PCR(MSP)检测了 6 株代表性胃癌细胞系(3 株表达 Runx3, 3 株不表达 Runx3)及 3 例胃癌组织标本和配对癌旁正常胃黏膜标本的甲基化状态。在 3 株不表达 Runx3 的细胞系(SNU1, MKN28, MKN74)中, Runx3 的 P2 启动子区 CpG 二核苷酸序列的 C 残基完全甲基化, 而在表达 Runx3 的细胞系中(MKN1, RF1, RF48)却没有被甲基化。同样, 3 例 Runx3 表达阴性的胃癌组织标本, P2 区域 CpG 岛 C 残基甲基化, 3 例 Runx3 表达阳性的配对正常胃黏膜组织没有被甲基化, 提示 P2 启动子区甲基化是胃癌细胞不表达 Runx3 的可能原因。过甲基化所致的基因表达沉默是由于甲基化 DNA 的组蛋白去乙酰转移酶的恢复引起的^[30]。5' - 氮唑 2' - 脱氧胞苷(deoxycytidine, AZA)是 DNA 甲基化转移酶的抑制剂, 能在离体情况下逆转启动子甲基化^[31], 曲古抑菌素(trichostatin, TSA)是组蛋白去乙酰酶抑制剂, 如果 CpG 岛的过甲基化是基因

表达下调的原因, 他们便能使甲基化失活的基因重新被激活从而得到表达^[32]。为了验证这一点, Li et al^[13]培养了在 AZA 或 TSA 或二者共存条件下的 NUGC3, MKN28, MKN74 细胞系。所有的三种细胞中的 Runx3 表达都被重新激活, 这进一步证实 Runx3 P2 区域 CpG 岛过甲基化导致了 Runx3 表达下调。Waki et al^[33-34]检测了 10 株胃癌细胞系和 93 例胃癌病例癌组织及相应正常组织 Runx3 的甲基化, 在 7 株(70%)胃癌细胞系, 42 例(45%)胃癌组织和 7 例(8%)相应正常胃黏膜组织检测出 Runx3 的甲基化。他们还尸检了正常人胃组织 Runx3 甲基化状态, 发现在高龄(≥ 77 岁)死者胃黏膜中有 Runx3 的甲基化, 提示除外年龄非常大的患者(≥ 77 岁), Runx3 甲基化几乎是癌特异性的, 有望成为胃癌早期诊断的分子标志物。Guo et al^[35]用 N- 甲基-N- 亚硝基脲诱导 C3H 鼠胃癌, 从中建立 4 株胃癌细胞系: MGT-40E16 (E16), MGT-40E25 (E25) 和 MGT-93 (93U), 他们的共同特性是无 Runx3 的表达, 继而用 MSP 方法发现 Runx3 启动子两个区域(-2 312, -2 028)和(-312, +12)存在甲基化, 并且利用 AZA 和 TSA 共同作用可以逆转 Runx3 的表达。这提示我们可以探索以 Runx3 为治疗的靶点, 用诱导沉默 Runx3 基因重新表达的方法对胃癌进行基因治疗。

2.3 Runx3 转染抑制胃癌细胞生长 Guo et al^[35]研究了外源性 Runx 基因的导入后胃癌细胞的生长曲线, 选择了 MGT-40E1 胃癌细胞系(E1 Runx3^{-/-})作为感受态细胞, 分别转染克隆体 C1(Runx3 高表达), C2(Runx3 低表达)和 C3(Runx3 低表达), 并以空载体导入组和无转染的 E1 Runx3^{-/-} 作为对照组。结果显示, C1 克隆组抑制 E1 细胞的生长最明显, C2, C3 其次, 空载体组胃癌细胞生长曲线与 E1 Runx3^{-/-} 无明显差别。结果证明, Runx3 外源性基因的导入可以抑制胃癌细胞的生长, 并呈现剂量依赖性, Runx3 的表达量与胃癌细胞的生长曲线成负相关。

2.4 Runx3 突变与胃癌 Li et al^[13]用 PCR-SSCP 分析方法检测胃癌组织和胃癌细胞系中 Runx3 表达下调是否是由于 Runx3 编码区域突变所致。结果仅发现 1/118 例胃癌组织存在 Runx3 突变, 突变位点在 Runx 保守区 np373 C-T 的转换所致的第 122 位点精氨酸转变成半胱氨酸(R122C), 但未做其正常配对研究^[13]。Guo et al^[35]为证实 R122C 突变的意义, 分别将野生型和突变型 Runx3 基因(R122C)转染至 MKN74(Runx3^{-/-}), 用克隆形成法评价细胞的生存率。结果发现 Runx3 野生型转染组可以明显抑制细胞克隆的形成, 而 Runx3 R122C 转染组与单纯转染空载体组相似, 不能抑制 MKN74 细胞的克隆性增生, 提示突变型 Runx3(R122C)使 Runx3 的活性降低/失活。但基于目前所发现的胃癌 Runx3 突变的频率很低, 因此突变与胃癌的关系还很难评价, 有待于进一步研究。

3 Runx3的抑癌机制

Runx3^{-/-}裸鼠胃黏膜上皮细胞的增生可能是由于生长抑制和凋亡诱导因子TGF-β活性降低所引起^[13]。TGF-β是多种细胞的生长抑制因子，TGF-β信号通路的紊乱可以导致各种不同肿瘤的发生发展。活性TGF-β可以通过与有丝氨酸/苏氨酸活性激酶的跨膜受体TGF-β受体I和II(TβR I和TβR II)结合，诱导这两种受体产生活性的异四聚体复合物(TβRC)，从而产生细胞内生物效应^[26]。这其中Smad蛋白发挥着重要的作用，与TGF-β信号通路相关的Smad蛋白包括Smad2、Smad3、Smad4和Smad7。Smad蛋白按功能可以分为3型：受体调控型(R-Smads)，辅助型Smad(Co-Smads)和抑制型Smad(I-Smads)，R-Smad包括Smad2和Smad3，Co-Smad包括Smad4，I-Smad包括Smad7。R-Smad可以被Smad锚定受体激活物(Smad anchor for receptor activator, SARA)固定在细胞膜上，并被活性TβRC复合物磷酸化激活，并与Co-Smad结合转移到细胞核内，与Runx3转录因子相互作用共同调控靶基因的转录^[17, 36-37]。Runx3蛋白与特异的基序PyGPyGGT结合，并同其他辅助激活因子(co-activator)如YAP、P300/CBP和ALY等，或辅助抑制因子(co-repressor)如mSIN 3A、TLE和Ear2等共同作用激活或抑制Runx特异性靶基因的转录^[38]。总之，Runx蛋白是TGF-β信号途径中一个非常重要的角色，他与TGF-β超家族成员共同介导一些重要的生物学效应^[35-36]，Runx3功能的改变可以影响TGF-β信号的活性，进而在胃癌的发生过程中起着重要的作用^[35-36]。

总之，Runx3作为一个新发现的抑癌基因，调控细胞的生长发育和细胞的凋亡，对细胞的信号转导和其他生物学效应有着重要而复杂的转录调节作用。Runx3的缺失或失活可以导致胃黏膜上皮细胞增生和分化的平衡失调，导致胃黏膜上皮细胞的过度增生和分化异常^[39]，进而参与胃癌的发生过程。Runx3有望成为一个胃癌发生的生物学标记和肿瘤基因治疗的靶点(如野生型Runx3基因的导入治疗等)，为胃癌的诊断和治疗提供新的途径。但是Runx3基因的结构和功能、表达的调节机制、Runx3作用的下游靶基因以及Runx3调控网络在胃癌的发生过程中的作用机制等仍不十分清楚，尚需进一步研究。

4 参考文献

- 1 Yu Y, Zhang YC, Zhang WZ, Shen LS, Hertzog P, Wilson TJ, Xu DK. Ets1 as a marker of malignant potential in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2154-2159
- 2 Zhang CP, Tian ZB, Zhao QX, Wu J, Liang YX. Relation between CD44v9, MMP-2 and tumor invasion and metastasis in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:1531-1534
- 3 Fu YG, Qu YJ, Wu KC, Zhai HH, Liu ZG, Fan DM. Apoptosis-inducing effect of recombinant Caspase-3 expressed by constructed eukaryotic vector on gastric cancer cell line SGC7901. *World J Gastroenterol* 2003;9:1935-1939
- 4 Zhao XH, Gu SZ, Liu SX, Pan BR. Expression of estrogen receptor and estrogen receptor messenger RNA in gastric carcinoma tissues. *World J Gastroenterol* 2003;9:665-669
- 5 Li HX, Chang XM, Song ZJ, He SX. Correlation between expression of cyclooxygenase-2 and angiogenesis in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:674-677
- 6 Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003;9:54-58
- 7 Xin Y, Li XL, Wang YP, Zhang SM, Zheng HC, Wu DY, Zhang YC. Relationship between phenotypes of cell-function differentiation and pathobiological behavior of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001;7:53-59
- 8 Han CB, Li F, Zhao YJ, Ma JM, Wu DY, Zhang YK, Xin Y. Variations of mitochondrial D-loop region plus downstream gene 1 2S rRNA-tRNAs and gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2003;9:1925-1929
- 9 Lan J, Xiong YY, Lin YX, Wang BC, Gong LL, Xu HS, Guo GS. *Helicobacter pylori* infection generated gastric cancer through p53-Rb tumor-suppressor system mutation and telomerase reactivation. *World J Gastroenterol* 2003;9:54-58
- 10 Han CB, Li F, Yang XF, Mao XY, Wu DY, Xin Y. Alterations of mtDNA copy number in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12:258-261
- 11 Kim TY, Lee HJ, Hwang KS, Lee M, Kim JW, Bang YJ, Kang GH. Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma. *Lab Invest* 2004;84:479-484
- 12 Levanon D, Bettoun D, Harris-Cerruti C, Woolf E, Negreanu V, Eilam R, Bernstein Y, Goldenberg D, Xiao C, Fliegauf M, Kremer E, Otto F, Brenner O, Lev-Tov A, Groner Y. The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *EMBO J* 2002;21:3454-3463
- 13 Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002;109:113-124
- 14 Wada M, Yazumi S, Takaishi S, Hasegawa K, Sawada M, Tanaka H, Ida H, Sakakura C, Ito K, Ito Y, Chiba T. Frequent loss of RUNX3 gene expression in human bile duct and pancreatic cancer cell lines. *Oncogene* 2004;23:2401-2407
- 15 Li QL, Kim HR, Kim WJ, Choi JK, Lee YH, Kim HM, Li LS, Kim H, Chang J, Ito Y, Youl Lee K, Bae SC. Transcriptional silencing of the RUNX3 gene by CpG hypermethylation is associated with lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:223-228
- 16 Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Pathol* 2004;202:233-240
- 17 Kato N, Tamura G, Fukase M, Shibuya H, Motoyama T. Hypermethylation of the RUNX3 gene promoter in testicular yolk sac tumor of infants. *Am J Pathol* 2003;163:387-391
- 18 Bangsow C, Rubins N, Glusman G, Bernstein Y, Negreanu V, Goldenberg D, Lotem J, Ben-Asher E, Lancet D, Levanon D, Groner Y. The RUNX3 gene-sequence, structure and regulated expression. *Gene* 2001;279:221-232
- 19 O' Riordan M, Grosschedl R. Transcriptional regulation of early B-lymphocyte differentiation. *Immunol Rev* 2000;175:94-103
- 20 Coffman JA. Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation. *Cell Biol Int* 2003;27:315-324
- 21 Tang YY, Shi J, Zhang L, Davis A, Bravo J, Warren AJ, Speck NA, Bushweller JH. Energetic and functional contribution of residues in the core binding factor beta (CBFbeta) subunit to heterodimerization with CBFalpha. *J Biol Chem* 2000;275:39579-39588
- 22 Yang N, Zhang L, Zhang Y, Kazazian HH Jr. An important role for RUNX3 in human L1 transcription and retrotransposition. *Nucleic Acids Res* 2003;31:4929-4940

- 23 Ito Y. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes Cells* 1999;4:685-696
- 24 Lund AH, van Lohuizen M. RUNX: a trilogy of cancer genes. *Cancer Cell* 2002;1:213-215
- 25 Hug BA, Ahmed N, Robbins JA, Lazar MA. A chromatin immunoprecipitation screen reveals protein kinase C β as a direct RUNX1 target gene. *J Biol Chem* 2004;279:825-830
- 26 Ito Y, Miyazono K. RUNX transcription factors as key targets of TGF- β superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13:43-47
- 27 Zhang YW, Yasui N, Ito K, Huang G, Fujii M, Hanai J, Nogami H, Ochi T, Miyazono K, Ito Y. A RUNX2/PEBP2alpha A/CBFA1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:10549-10554
- 28 Nam S, Jin YH, Li QL, Lee KY, Jeong GB, Ito Y, Lee J, Bae SC. Expression pattern, regulation, and biological role of runt domain transcription factor, run, in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* 2002;22:547-554
- 29 Schulze-Bergkamen H, Krammer PH. Apoptosis in cancer—implications for therapy. *Semin Oncol* 2004;31:90-119
- 30 Baylin SB, Belinsky SA, Herman JG. Aberrant methylation of gene promoters in cancer-concepts, misconcepts, and promise. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1460-1461
- 31 Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002;21:5483-5495
- 32 Vanommeslaeghe K, Van Alsenoy C, De Proft F, Martins JC, Tourwe D, Geerlings P. Ab initio study of the binding of Trichostatin A (TSA) in the active site of histone deacetylase like protein (HDLP). *Org Biomol Chem* 2003;1:2951-2957
- 33 Waki T, Tamura G, Sato M, Terashima M, Nishizuka S, Motoyama T. Promoter methylation status of DAP-kinase and RUNX3 genes in neoplastic and non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci* 2003;94:360-364
- 34 Waki T, Tamura G, Sato M, Motoyama T. Age-related methylation of tumor suppressor and tumor-related genes: an analysis of autopsy samples. *Oncogene* 2003;22:4128-4133
- 35 Guo WH, Weng LQ, Ito K, Chen LF, Nakanishi H, Tatematsu M, Ito Y. Inhibition of growth of mouse gastric cancer cells by Runx3, a novel tumor suppressor. *Oncogene* 2002;21:8351-8355
- 36 Miyazono K, Suzuki H, Imamura T. Regulation of TGF- β signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci* 2003;94:230-234
- 37 Otto F, Lubbert M, Stock M. Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *J Cell Biochem* 2003;89:9-18
- 38 Levanon D, Brenner O, Otto F, Groner Y. Runx3 knockouts and stomach cancer. *EMBO Rep* 2003;4:560-564
- 39 Cameron ER, Blyth K, Hanlon L, Kilbey A, Mackay N, Stewart M, Terry A, Vaillant F, Wotton S, Neil JC. The Runx genes as dominant oncogenes. *Blood Cells Mol Dis* 2003;30:194-200

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

• 消息 •

欢迎征订《英语科技论文撰写与投稿》

本书是英语科技论文写作与投稿的指南读物, 可作为理工科研究生的教学用书或自学教材, 也可供科研人员和科技编辑的案头查阅和浏览。

书中全方位地分析和展示了科技写作的技巧与诀窍, 介绍了当前国际主流科技期刊对稿件的基本要求。从论文选题、投稿期刊的选择及作者署名与分工等方面阐述了科技论文写作前的准备工作, 通过大量实例分析介绍了英文题名和摘要撰写中应遵循的基本原则——准确(Accuracy)、简洁(Brevity)和清楚(Clarity), 分别从写作技巧、时态和语态的使用等方面介绍了科技论文正文各部分(引言、材料与方法、研究结果、讨论、结论)的撰写, 举例说明了致谢的写作要点及图表制作的注意事项, 总结了各主要参考文献体例的特点、格式及相关著录规范。

本书还较为全面地介绍了国际单位制(SI)及其使用中应注意的问题, 结合实例举证, 从选词、重要语法和文体等方面系统阐述了科技英语写作的文法与表达, 较为详尽地总结了英文标点符号的使用, 从稿件录排、投稿信写作、校样改正等方面阐述了如何投稿及与编辑联系, 综述了作者、编辑和审稿人在同行评议过程中的交流与互动。

本书论述缜密、案例丰富, 为方便读者进一步追溯和研读相关资料, 书中按章节形式标引了参考文献约 220 篇(次)。

编著: 任胜利, 理学博士,《自然科学进展》责任编辑, 1998 年以来先后在 Science, Nature, Scientometrics, Learned Publishing,《科学通报》、《编辑学报》、《中国科技期刊研究》等期刊上发表文献计量学、科技编辑与写作方面的论文 30 余篇。出版:科学出版社。定价: 28 元 +2 元(邮费)。邮购地址: 100085, 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社办公室, 北京市海淀区双清路 83 号。联系人: 刘俐, 程宇。联系电话: 010-62327204; 传真: 010-62326921。开户银行: 中国工商银行北京北太平庄支行 开户名: 国家自然科学基金委员会科学基金杂志社, 帐号: 0200010009200062483。(国家自然科学基金委员会科学基金杂志社 2004-05-20)

• 文献综述 •

错配修复缺陷，微卫星不稳定与胃癌

赵成海

赵成海, 中国医科大学病理生理教研室 辽宁省沈阳市 110001
项目负责人: 赵成海, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学病理生理教研室.
电话: 024-81032908
收稿日期: 2004-04-04 接受日期: 2004-04-29

摘要

人类错配修复系统可以识别并纠正DNA复制过程中出现的错误。错配修复系统缺陷使这些错误往往无法消除, 导致恶性肿瘤的发生。患者经常表现出微卫星不稳定性。目前发现与人类恶性肿瘤发病有关的错配修复基因包括hMSH2、hMSH3、hMSH6、hMLH1及hMLH3。这些基因的突变在遗传性非息肉病性结直肠癌中的作用已得到广泛证实。临幊上很大一部分胃癌患者表现出微卫星不稳定性, 提示错配修复缺陷在胃癌的发病中亦起到重要作用。众多的研究发现错配修复基因的突变在胃癌中并不常见, 而由于hMLH1启动子甲基化及失活所引起的错配修复缺陷成为胃癌发病机制中一条重要途径。这些患者常具有微卫星不稳定性及独特的临床特征。

赵成海. 错配修复缺陷, 微卫星不稳定与胃癌. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1384-1388
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1384.asp>

0 引言

近 10 a 来, 错配修复基因缺陷及由此导致的微卫星不稳定与肿瘤的关系, 特别是其在遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC)中的作用, 临幊上进行了广泛的研究。同时许多研究显示, 错配修复系统缺陷在胃癌发病中也起到了一定作用, 现就这方面的相关研究做一简要综述。

1 错配修复系统

DNA复制发生在细胞进行有丝分裂的准备期间。由于发生复制错误再所难免, 因此机体进化出一些特异的修复系统以避免基因组中这些有害突变大量积聚。DNA错配修复系统作为一个重要的“基因看管者”(caretaker gene)^[1]能够识别并及时纠正错配的DNA碱基对, 确保复制过程的保真性(fidelity)。一般而言, DNA复制错误主要发生在链伸长阶段, 最常见的错误为在DNA聚合酶作用下单一的碱基不正确地配对。这样的错配几率大约每 $10^3\text{-}10^4$ 碱基对发生一次。由于修复机制的存在, 实际发生错误的几率远远低于这一数值。DNA复制过程中还可能出现另外一种错误。由于DNA聚合酶复合物在复制微卫星DNA序列发生滑脱(slippage), 因此导致子链上这些微卫星序列长度延长或缩短。在错配修复系统出现缺陷的情

况下, 这些错误可能无法得到纠正, 这种现象即被称为微卫星不稳定(MSI)。不过需要指出, DNA聚合酶复合物本身也具有防止出现复制错误的功能。该复合体中一种内源性酶的亚单位具有核酸外切酶的活性, 他能够及时发现错配的碱基对并将其切除。同时在DNA聚合酶作用下合成正确的核苷酸。但其机制目前仍不是十分清楚。

目前已发现的人类错配修复基因包括来自MutS家族的hMSH2、hMSH3和hMSH6及来自MutL家族的hMLH1、hPMS1、hPMS2和最新被鉴定出来的hMLH3。DNA错配修复机制需要这些基因互相合作完成。简单而言, hMSH2能够识别错配的DNA序列并直接与其结合^[2]。如果是单个碱基错配, 他将和hMSH6形成异二聚体。而如果是2-8个碱基丢失或插入, 他将和hMSH3形成异二聚体。但有研究显示, 在hMSH6缺失的情况下, hMSH2/hMSH3也可以替代hMSH2/hMSH6发挥作用。显然在这一过程中hMSH2是必需的, 而hMSH6和hMSH3则表现出功能剩余^[3]。此后hMLH1和hPMS2形成另外一个异二聚体复合物与相关的DNA聚合酶配合将错配的碱基切除并修复。另外hMLH1和hPMS1及hMLH1和hMLH3均能形成异二聚体, 但其机制目前仍不清楚。

hMLH3是2000年克隆并定性的一种错配修复基因, 定位于14q24.3, 编码全区长4.3 kb, 由12个外显子组成^[4]。由于其存在与hMLH1相互作用的区域, 且与酵母的MLH3极为相似^[4], 因而可能替代hPMS2与hMLH1形成复合物, 是另一个与人类恶性肿瘤有关的错配修复备选基因。如同hMSH3和hMSH6, hMLH3和hPMS2可能也具有类似的功能剩余。目前临幊上对hMLH3的研究并不多, 关于其在肿瘤发病中的作用仍有待于进一步的探讨。

2 错配修复缺陷与 MSI

如前文所述, 错配修复缺陷将使由于DNA聚合酶复合物“滑脱”而引起的DNA序列微卫星长度变化无法得到修复, 导致微卫星及整个基因组的不稳定。因此以错配修复缺陷为特征的肿瘤常常显示出微卫星不稳定这一表型改变。1997年, 国际统一确定5个标准位点(marker)来鉴定MSI^[5], 规定有两个或两个以上位点不稳定为高微卫星不稳定(MSI-H), 而只有一个位点和没有位点不稳定分别为MSI-L和MSS。MSI-H型肿瘤常常与另外两种类型的肿瘤具有不同的临幊病理表现。由于错配修复基因的单纯失活被认为无法直接引起细胞恶变, 因此在此过程中需要有其他基因参与。目前发现这些基因中的大多数都含有编码重复序列, 这些编码重

复序列在 MSI-H 肿瘤中特别容易出现改变, 故他们也被称为MSI-H肿瘤的靶基因。第一个被报道的靶基因为 TGF β -R II^[6], 在 MSI-H 结直肠癌中发现其移码突变。且在随后的功能研究中发现, 这种移码突变导致了 TGF β -R II 肿瘤抑制功能的丧失。接下来众多的靶基因不断的被报道出来, 其中最广泛的为 BAX, hMSH3, hMSH6 和 IGF II R^[7-9]。

3 错配修复缺陷与肿瘤

目前广泛认为肿瘤的发生是一个复杂生物学过程, 其中有众多基因的参与。这些基因分别调节细胞生长及死亡, 细胞外基质重塑, 基因组的稳定性及 DNA 修复。错配修复基因的缺陷将使 DNA 复制过程中出现的错误无法及时纠正, 使得基因突变事件不断放大积累, 使大量错误信息遍布整个基因组, 最终导致肿瘤的发生。具体而言, 错配修复基因缺陷可能通过以下几个途径促进肿瘤的发生:(1)增加癌基因和抑癌基因的突变频率。(2)使另外一些重要的基因发生遗传的不稳定性。(3)通过一些化学物质对细胞的损伤导致肿瘤发生。

目前已发现错配修复缺陷与人类多个部位的肿瘤发生有关^[10-12], 其中与 HNPCC 关系的研究最为广泛^[13-15]。90% 以上的 HNPCC 家系可以检测到 hMLH1 和 hMSH2 的生殖系突变(<http://www.nfdht.nl>)。hMSH6 的生殖系突变在部分家系中起作用^[16]。而支持 hPMS1 和 hPMS2 在 HNPCC 起作用的证据则比较少^[17]。另外部分学者已在 HNPCC 家系中检测到 hMLH3 的移码突变和错义突变^[18-19]。但对 hMLH3 突变在 HNPCC 中的作用仍处于探索阶段。

4 错配修复缺陷与胃癌

4.1 hMLH1 和 hMSH2 突变 由于 HNPCC 患者广泛存在 hMLH1 和 hMSH2 的生殖系突变, 因此家族性胃癌中是否存在这种突变引起了许多学者的兴趣。然而迄今为止却鲜有证据支持这一设想。Keller et al^[20]在家族性胃癌研究中对 10 例 MSI 阳性患者进行鉴定, 结果仅发现 1 例 hMLH1 生殖系错义突变。Yanagisawa et al^[21]在对家族性胃癌患者检测中未发现 hMLH1 和 hMSH2 生殖系突变的存在。另外 Semba et al^[22] 及 Bevilacqua et al^[23] 在对散发性胃癌的研究中亦未发现生殖系突变。但部分研究人员检测出一些 hMLH1 或 hMSH2 的体细胞突变, 如 Wu et al^[24] 在对 12 例 MSI 阳性胃癌患者检测中发现 1 例 hMSH2 错义突变。Semba et al^[22] 在年轻胃癌研究中发现 3 例体细胞突变。Fang et al^[25] 在 68 例胃癌患者中亦发现 3 例体细胞突变。综上所述, 由于 hMLH1 和 hMSH2 突变在胃癌患者中出现的频率较低, 说明其在胃癌的发病机制中并不象在 HNPCC 那样占有重要地位。

4.2 hMSH3、hMSH6 及 hMLH3 突变 hMSH3 和 hMSH6 突变在 HNPCC 中较为常见。由于他们本身含有单核苷酸重复序列, 因此他们同时也是 MSI 的靶基因。即如同其他基因一样, 他们也可能由于其他的错配修复缺陷而

出现变异。有许多学者检测到 hMSH6 和 / 或 hMSH3 突变^[26-30]。Menoyo et al^[30] 在研究中检测到的 hMSH6 和 hMSH3 移码突变更是高达 43% 和 56%。尽管有的学者在研究中未检测到 hMSH6 或 hMLH3 突变的存在^[31], 但作为 MSI 的靶基因, 在 MSI 阳性的胃癌患者中, hMSH6 及 hMSH3 的突变仍然是一种较为常见的现象。hMLH3 作为一种新近被定性的错配修复基因, 目前的相关报道并不多。其在 HNPCC 中的作用目前仍存在较多的争议。其在胃癌发病中是否起作用更是不得而知。目前仅有 Menoyo et al^[30] 在胃癌患者中对其进行了研究。结果没有发现移码突变的存在。由于在 HNPCC 中研究人员发现的更多的是错义突变^[18-19], 因此胃癌中是否存在 hMLH3 的错义突变有待于更多的研究。

4.3 hMLH1 甲基化及表达改变 尽管错配修复基因突变在胃癌中并不是一种常见的现象, 其在胃癌的发病机制中也不起重要作用。但由于相当一部分胃癌患者存在 MSI, 显示出错配修复缺陷仍是胃癌发病机制中一个重要途径。1999 年 Leung et al^[32] 在对 35 例胃癌患者中的 11 例 MSI-H 分析中发现 10 例存在 hMLH1 启动子甲基化, 同时发现 hMLH1 表达消失。结果显示 MSI-H 与 hMLH1 启动子甲基化及其表达失活具有相关性, 也提示 hMLH1 启动子甲基化导致该基因表遗传性(epigenetic)改变, 即基因失活及表达改变, 在部分胃癌的发病中可能起到一定作用。此后又有众多学者^[21, 23, 25, 29, 33-36]发现胃癌患者中存在 hMLH1 启动子甲基化及其表达改变。大多数研究显示 MSI-H 与 hMLH1 启动子甲基化相关, 而 MSI-L 和 MSS 患者几乎不存在这种情况。这一情况显示 hMLH1 启动子甲基化可导致 MSI-H。然而 hMLH1 启动子甲基化胃癌并不肯定出现 MSI, 而 MSI-H 胃癌患者也并不是全部存在 hMLH1 启动子甲基化^[29, 32]。Kang et al^[37] 研究发现 hMLH1 启动子只有特定的位置发生甲基化, 才能导致其表达的改变。而最近的一项研究^[38]进一步证实启动子近端的甲基化与 MSI 相关。另外有一些研究发现其他一些基因的甲基化也似乎参与了胃癌的发病过程。Bae et al^[39] 及 Tsujimoto et al^[40] 分别发现 MGMT 和 P¹⁴ARF 甲基化与 MSI 相关。Chan et al^[41] 研究发现 hMLH1 启动子甲基化与 ID4 甲基化具有相关性。Carvalho et al^[36] 在 MSI-H 胃癌中发现 hMLH1 与 CDH1、MGMT 及 COX2 存在同时甲基化现象。其各自的甲基化发生频率更是高达 37%、51%、61% 及 29%。Kang et al^[42] 发现胃癌患者中 hMLH1 等 10 种基因存在甲基化情况, 其中 hMLH1 启动子甲基化频率为 20%。以上的这些研究显示, hMLH1 启动子只有特定位置发生甲基化才能导致其表达改变及 MSI。同时其他基因的甲基化或其他基因与 hMLH1 同时的甲基化也参与了胃癌的发病过程。

4.4 hMSH2 表达情况 由于部分胃癌患者存在 hMLH1 启动子甲基化及其表达消失, 一些学者也对 hMSH2 的表达情况进行了检测。Leung et al^[32] 在对 MSI-H 胃癌患者研究中发现 hMLH1 表达消失, 而 hMSH2 的表达却正常。

Halling et al^[33]在MSI胃癌中却观察到hMSH2表达消失。Zhang et al^[43]发现hMSH2 mRNA表达减少。Grogg et al^[44]在对17例MSI检测中却发现hMSH2均正常表达。鉴于这方面的研究报道并不多，显然无法就其得出一个明确的结论。由于hMSH2并不象hMLH1那样存在甲基化而失活，同时其发生突变的频率也很低，故其表达消失的机制仍有待于进一步探讨。

总之，在错配修复缺陷所致胃癌中，错配修复基因突变似乎并不起主要作用，更多的是由于hMLH1甲基化而致表达改变所引起。作为MSI的靶基因，hMSH6和hMSH3的突变在MSI阳性的胃癌中较为常见。hMLH3在胃癌中所起的作用，有待于进一步探讨。

5 MSI与胃癌

5.1 MSI阳性率 散发性胃癌MSI阳性率大约在10-48%之间。不同的研究结果存在较大差异跟以下几个因素有关：首先位点选择存在明显的差异。尽管1997年国际统一规定了检测MSI的5个标准位点，但实际许多研究中采用的位点往往超过5个。多数研究的位点在5-12个之间^[20, 24, 28, 45-53]，Wang et al^[54]在研究中采用位点高达29个，其所检测出的MSI阳性率也达到34.1%。由于位点选择的数量不同，导致在MSI-H的定义上也存在明显的差异。多数研究规定超过检测位点总数30%的位点出现变异即为MSI-H。在众多候选位点中，BAT-26被认为比其他位点更具有敏感性^[55-56]，即大多数MSI阳性的胃癌存在BAT-26变异。其次胃癌样本差异较大。样本的差异一方面体现在数量上，较小的样本得出的结果往往不够准确。另一方面，样本的组成也存在很大的差异。不同组织类型或不同发展时期的胃癌MSI的阳性率往往不同。此外有研究显示不同地区胃癌患者中MSI阳性率也存在差异。Hayden et al^[52]发现胃癌低发区英国胃癌MSI阳性率明显低于同处欧洲胃癌相对高发的葡萄牙。Sepulveda et al^[50]在对照研究中发现韩国胃癌MSI阳性率明显高于美国及哥伦比亚等地区。Chetty et al^[57]在对胃癌低发区南非患者检测中未发现有MSI-H存在，显示南非也是MSI阳性率较低的地区。以上这几项研究显示胃癌高发区中胃癌患者中存在较高的MSI阳性率。

5.2 MSI靶基因 胃癌中MSI的靶基因包括TGF β -R II、BAX、hMSH3、hMSH6和IGF II等。其中最常见为TGF β -R II^[26, 28-29, 45, 48, 53, 58-62]。这些靶基因均含有单核苷酸重复序列。在MSI阳性特别是MSI-H胃癌中常常出现这些序列的改变。

5.3 MSI与临床 MSI阳性特别是MSI-H胃癌与其他胃癌相比具有明显不同的临床特征。许多研究显示组织类型为肠型的胃癌更易出现MSI^[29, 43-44, 46, 48, 60, 63-65]。Fang et al^[51]及Leung et al^[66]发现肠化生组织中MSI阳性率亦高于周围组织。同时有研究显示MSI阳性与分化程度正相关^[43, 64, 67]。在胃癌发展的各个时期，多数研究显示MSI与进展期具有相关性^[24, 46, 48, 51, 68]。另外MSI-H还与胃窦部发病^[33, 46, 48-67]、

低淋巴结转移^[29, 48]、家族史^[20-21, 46, 49]、高淋巴细胞浸润^[33-44]、晚发^[44, 69]具有相关性。Wu et al^[48]发现MSI与幽门螺旋菌感染具有相关性，Kim et al^[70]在实验中发现螺旋菌可影响错配修复系统的稳定性。

5.4 MSI与预后 MSI与预后之间是否具有关联目前仍存在较多争议。一些研究发现MSI阳性胃癌患者预后要明显好于MSI阴性患者^[29, 71]。但另外一些研究则未发现二者之间具有相关性^[46, 48]。Suzuki et al^[72]在最近的研究中发现患者预后与MSI没有相关性，而与整个基因组损害比例相关。Bataille et al^[68]及Ott et al^[73]对MSI阳性与胃癌化疗预后进行研究，也发现二者之间不存在相关性。

总之，错配修复基因的突变在胃癌中并不是一种常见的现象，而多数具有微卫星不稳定的胃癌患者存在hMLH1启动子甲基化及失活。因而由hMLH1甲基化所引起的错配修复缺陷成为胃癌发病机制中一条重要途径。这些患者常具有微卫星不稳定性及独特的临床特征。

6 参考文献

- 1 Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 1997;386:761
- 2 Jiricny J. Mediating mismatch repair. *Nat Genet* 2000;24:6-8
- 3 Umar A, Risinger JI, Glaab WE, Tindall KR, Barrett JC, Kunkel TA. Functional overlap in mismatch repair by human MSH3 and MSH6. *Genetics* 1998;148:1637-1646
- 4 Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Lynch HT, Elliott RM, Collins FS. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet* 2000;24:27-35
- 5 Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava SA. National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-5257
- 6 Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995;268:1336-1338
- 7 Wang S, Souza RF, Kong D, Yin J, Smolinski KN, Zou TT, Frank T, Young J, Flanders KC, Sugimura H, Abraham JM, Meltzer SJ. Deficient transforming growth factor-beta1 activation and excessive insulin-like growth factor II (IGFII) expression in IGFII receptor-mutant tumors. *Cancer Res* 1997;57:2543-2546
- 8 Yin J, Kong D, Wang S, Zou TT, Souza RF, Smolinski KN, Lynch PM, Hamilton SR, Sugimura H, Powell SM, Young J, Abraham JM, Meltzer SJ. Mutation of hMSH3 and hMSH6 mismatch repair genes in genetically unstable human colorectal and gastric carcinomas. *Hum Mutat* 1997;10:474-478
- 9 Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997;275:967-969
- 10 Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:2642-2649
- 11 Geisler JP, Goodheart MJ, Sood AK, Holmes RJ, Hatterman-Zogg MA, Buller RE. Mismatch repair gene expression defects contribute to microsatellite instability in ovarian carcinoma. *Cancer* 2003;98:2199-2206
- 12 Tomaszewska R, Okon K, Stachura J. Expression of the DNA mismatch repair proteins (hMLH1 and hMSH2) in infiltrating pancreatic cancer and its relation to some phenotypic features. *Pol J Pathol* 2003;54:31-37
- 13 Ponz De Leon M, Benatti P, Di Gregorio C, Pedroni M, Losi L,

- Genuardi M, Viel A, Fornasarig M, Lucci-Cordisco E, Anti M, Ponti G, Borghi F, Lamberti I, Roncucci L. Genetic testing among high-risk individuals in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004;90:882-887
- Cui L, Jin HY, Cheng HY, Yan YD, Meng RG, Yu DH. Genetic detection of Chinese hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004;10:209-213
- Zhao B, Wang ZJ, Xu YF, Wan YL, Li P, Huang YT. Report of 16 kindreds and one kindred with hMLH1 germline mutation. *World J Gastroenterol* 2002;8:263-266
- Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, Wahlberg S, Fox EA, Peel D, Ziogas A, Garber JE, Syngal S, Anton-Culver H, Li FP. Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* 1999;59:5068-5074
- Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994;371:75-80
- Wu Y, Berends MJ, Sijmons RH, Mensink RG, Verlind E, Kooi KA, van der Sluis T, Kempinga C, van dDer Zee AG, Hollema H, Buys CH, Kleibeuker JH, Hofstra RM. A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 2001;29:137-138
- Liu HX, Zhou XL, Liu T, Werelius B, Lindmark G, Dahl N, Lindblom A. The role of hMLH3 in familial colorectal cancer. *Cancer Res* 2003;63:1894-1899
- Keller G, Grimm V, Vogelsang H, Bischoff P, Mueller J, Siewert JR, Hofler H. Analysis for microsatellite instability and mutations of the DNA mismatch repair gene hMLH1 in familial gastric cancer. *Int J Cancer* 1996;68:571-576
- Yanagisawa Y, Akiyama Y, Iida S, Ito E, Nomizu T, Sugihara K, Yuasa Y, Maruyama K. Methylation of the hMLH1 promoter in familial gastric cancer with microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000;85:50-53
- Semba S, Yokozaki H, Yasui W, Tahara E. Frequent microsatellite instability and loss of heterozygosity in the region including BRCA1 (17q21) in young patients with gastric cancer. *Int J Oncol* 1998;12:1245-1251
- Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer* 2000;87:200-203
- Wu MS, Sheu JC, Shun CT, Lee WJ, Wang JT, Wang TH, Cheng AL, Lin JT. Infrequent hMSH2 mutations in sporadic gastric adenocarcinoma with microsatellite instability. *Cancer Lett* 1997;112:161-166
- Fang DC, Wang RQ, Yang SM, Yang JM, Liu HF, Peng GY, Xiao TL, Luo YH. Mutation and methylation of hMLH1 in gastric carcinomas with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2003;9:655-659
- Ottini L, Falchetti M, D' Amico C, Amorosi A, Saieva C, Masala G, Frati L, Cama A, Palli D, Mariani-Costantini R. Mutations at coding mononucleotide repeats in gastric cancer with the microsatellite mutator phenotype. *Oncogene* 1998;16:2767-2772
- Imai Y, Inoue T, Ishikawa T. Mutations of the human MUT S homologue 6 gene in ampullary carcinoma and gastric cancer. *Int J Cancer* 1998;78:576-580
- Wang Y, Shinmura K, Guo RJ, Isogaki J, Wang DY, Kino I, Sugimura H. Mutational analyses of multiple target genes in histologically heterogeneous gastric cancer with microsatellite instability. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:1284-1291
- Wu MS, Lee CW, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Chang MC, Sheu JC, Lin JT. Distinct clinicopathologic and genetic profiles in sporadic gastric cancer with different mutator phenotypes. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;27:403-411
- Menoyo A, Alazzouzi H, Espin E, Armengol M, Yamamoto H, Schwartz S Jr. Somatic mutations in the DNA damage-response genes ATR and CHK1 in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. *Cancer Res* 2001;61:7727-7730
- Ogata S, Tamura G, Endoh Y, Sakata K, Ohmura K, Motoyama T. Microsatellite alterations and target gene mutations in the early stages of multiple gastric cancer. *J Pathol* 2001;194:334-340
- Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999;59:159-164
- Halling KC, Harper J, Moskaluk CA, Thibodeau SN, Petroni GR, Yustein AS, Tosi P, Minacci C, Roviello F, Piva P, Hamilton SR, Jackson CE, Powell SM. Origin of microsatellite instability in gastric cancer. *Am J Pathol* 1999;155:205-211
- Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Hinoda Y, Imai K. Distinct methylation pattern and microsatellite instability in sporadic gastric cancer. *Int J Cancer* 1999;83:309-313
- Guo RJ, Arai H, Kitayama Y, Igarashi H, Hemmi H, Arai T, Hanai H, Sugimura H. Microsatellite instability of papillary subtype of human gastric adenocarcinoma and hMLH1 promoter hypermethylation in the surrounding mucosa. *Pathol Int* 2001;51:240-247
- Carvalho B, Pinto M, Cirnes L, Oliveira C, Machado JC, Suriano G, Hamelin R, Carneiro F, Seruca R. Concurrent hypermethylation of gene promoters is associated with a MSI-H phenotype and diploidy in gastric carcinomas. *Eur J Cancer* 2003;39:1222-1227
- Kang YH, Bae SI, Kim WH. Comprehensive analysis of promoter methylation and altered expression of hMLH1 in gastric cancer cell lines with microsatellite instability. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:119-124
- Ishiguro K, Kawakami K, Maeda K, Ishida Y, Omura K, Watanabe G. Microsatellite instability in gastric cancer is closely associated with hMLH1 hypermethylation at the proximal region of the promoter. *Int J Mol Med* 2003;12:603-608
- Bae SI, Lee HS, Kim SH, Kim WH. Inactivation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter CpG island hypermethylation in gastric cancers. *Br J Cancer* 2002;86:1888-1892
- Tsujimoto H, Hagiwara A, Sugihara H, Hattori T, Yamagishi H. Promoter methylations of p16INK4a and p14ARF genes in early and advanced gastric cancer. Correlations of the modes of their occurrence with histologic type. *Pathol Res Pract* 2002;198:785-794
- Chan AS, Tsui WY, Chen X, Chu KM, Chan TL, Chan AS, Li R, So S, Yuen ST, Leung SY. Downregulation of ID4 by promoter hypermethylation in gastric adenocarcinoma. *Oncogene* 2003;22:6946-6953
- Kang GH, Lee S, Kim JS, Jung HY. Profile of aberrant CpG island methylation along the multistep pathway of gastric carcinogenesis. *Lab Invest* 2003;83:635-641
- Zhang QX, Ding Y, Le XP, Du P. Studies on microsatellite instability in p16 gene and expression of hMSH2 mRNA in human gastric cancer tissues. *World J Gastroenterol* 2003;9:437-441
- Grogg KL, Lohse CM, Pankratz VS, Halling KC, Smyrk TC. Lymphocyte-rich gastric cancer: associations with Epstein-Barr virus, microsatellite instability, histology, and survival. *Mod Pathol* 2003;16:641-651
- Renault B, Calistri D, Buonsanti G, Nanni O, Amadori D, Ranzani GN. Microsatellite instability and mutations of p53 and TGF-beta RII genes in gastric cancer. *Hum Genet* 1996;98:601-607
- Ottini L, Palli D, Falchetti M, D' Amico C, Amorosi A, Saieva C, Calzolari A, Cimoli F, Tatarelli C, De Marchis L, Masala G, Mariani-Costantini R, Cama A. Microsatellite instability in gastric cancer is associated with tumor location and family history in a high-risk population from Tuscany. *Cancer Res* 1997;57:4523-4529
- Hamamoto T, Yokozaki H, Semba S, Yasui W, Yunotani S, Miyazaki K, Tahara E. Altered microsatellites in incompletely type intestinal metaplasia adjacent to primary gastric cancers. *J Clin Pathol* 1997;50:841-846
- Wu MS, Lee CW, Shun CT, Wang HP, Lee WJ, Sheu JC, Lin JT. Clinicopathological significance of altered loci of replication error and microsatellite instability-associated mutations in gastric cancer. *Cancer Res* 1998;58:1494-1497
- Keller G, Rudelius M, Vogelsang H, Grimm V, Wilhelm MG, Mueller J, Siewert JR, Hofler H. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in gastric carcinoma in comparison to family history. *Am J Pathol* 1998;152:1281-1289
- Sepulveda AR, Santos AC, Yamaoka Y, Wu L, Gutierrez O, Kim JG, Graham DY. Marked differences in the frequency of

- microsatellite instability in gastric cancer from different countries. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3034-3038
- 51 Fang DC, Jass JR, Wang DX, Zhou XD, Luo YH, Young J. Infrequent loss of heterozygosity of APC/MCC and DCC genes in gastric cancer showing DNA microsatellite instability. *J Clin Pathol* 1999;52:504-508
- 52 Hayden JD, Cawkwell L, Dixon MF, Pardal F, Murgatroyd H, Gray S, Quirke P, Martin IG. A comparison of microsatellite instability in early onset gastric carcinomas from relatively low and high incidence European populations. *Int J Cancer* 2000;85:189-191
- 53 Schneider BG, Bravo JC, Roa JC, Roa I, Kim MC, Lee KM, Plaisance KT Jr, McBride CM, Mera R. Microsatellite instability, prognosis and metastasis in gastric cancers from a low-risk population. *Int J Cancer* 2000;89:444-452
- 54 Wang Y, Ke Y, Ning T, Feng L, Lu G, Liu W, E Z. Studies of microsatellite instability in Chinese gastric cancer tissues. *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 1998;15:155-157
- 55 Jin Z, Tamura G, Satoh M, Meguro T, Miura T, Hayashi M, Osakabe M, Ohmura K, Ogata S, Endoh Y, Motoyama T. Absence of BAT-26 instability in gastric intestinal metaplasia. *Pathol Int* 2001;51:473-475
- 56 Wu MS, Lee CW, Sheu JC, Shun CT, Wang HP, Hong RL, Lee WJ, Lin JT. Alterations of BAT-26 identify a subset of gastric cancer with distinct clinicopathologic features and better post-operative prognosis. *Hepatogastroenterology* 2002;49:285-289
- 57 Chetty R, Naidoo R, Tarin M, Sitti C. Chromosome 2p, 3p, 5q and 18q status in sporadic gastric cancer. *Pathology* 2002;34:275-281
- 58 Ohue M, Tomita N, Monden T, Miyoshi Y, Ohnishi T, Izawa H, Kawabata Y, Sasaki M, Sekimoto M, Nishisho I, Shiozaki H, Monden M. Mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene and microsatellite instability in gastric cancer. *Int J Cancer* 1996;68:203-206
- 59 Guo RJ, Wang Y, Kaneko E, Wang DY, Arai H, Hanai H, Takenoshita S, Hagiwara K, Harris CC, Sugimura H. Analyses of mutation and loss of heterozygosity of coding sequences of the entire transforming growth factor beta type II receptor gene in sporadic human gastric cancer. *Carcinogenesis* 1998;19:1539-1544
- 60 Chung YJ, Kim KM, Choi JR, Choi SW, Rhyu MG. Relationship between intratumor histological heterogeneity and genetic abnormalities in gastric carcinoma with microsatellite instability. *Int J Cancer* 1999;82:782-788
- 61 Kobayashi K, Okamoto T, Takayama S, Akiyama M, Ohno T, Yamada H. Genetic instability in intestinal metaplasia is a frequent event leading to well-differentiated early adenocarcinoma of the stomach. *Eur J Cancer* 2000;36:1113-1119
- 62 Takeno S, Wirtz HC, Lickvers K, Noguchi T, Scheven M, Willers R, Gabbert HE, Mueller W. Transforming growth factor beta type II receptor expression in gastric cancer: evidence for two independent subgroups. *Anticancer Res* 2002;22:2247-2252
- 63 Luinetti O, Fiocca R, Villani L, Alberizzi P, Ranzani GN, Solcia E. Genetic pattern, histological structure, and cellular phenotype in early and advanced gastric cancers: evidence for structure-related genetic subsets and for loss of glandular structure during progression of some tumors. *Hum Pathol* 1998;29:702-709
- 64 Zhou X, Fang D, Luo Y. Microsatellite instability in gastric carcinoma and intestinal metaplasia. *Zhonghua Binglixue Zazhi* 1998;27:356-358
- 65 Fang DC, Luo YH, Yang SM, Li XA, Ling XL, Fang L. Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2002;8:787-791
- 66 Leung WK, Kim JJ, Kim JG, Graham DY, Sepulveda AR. Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol* 2000;156:537-543
- 67 Yamamoto H, Itoh F, Fukushima H, Adachi Y, Itoh H, Hinoda Y, Imai K. Frequent Bax frameshift mutations in gastric cancer with high but not low microsatellite instability. *J Exp Clin Cancer Res* 1999;18:103-106
- 68 Bataille F, Rummele P, Dietmaier W, Gaag D, Klebl F, Reichle A, Wild P, Hofstatter F, Hartmann A. Alterations in p53 predict response to preoperative high dose chemotherapy in patients with gastric cancer. *Mol Pathol* 2003;56:286-292
- 69 Kim KM, Kwon MS, Hong SJ, Min KO, Seo EJ, Lee KY, Choi SW, Rhyu MG. Genetic classification of intestinal-type and diffuse-type gastric cancers based on chromosomal loss and microsatellite instability. *Virchows Arch* 2003;443:491-500
- 70 Kim JJ, Tao H, Carloni E, Leung WK, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 2002;123:542-553
- 71 de Manzoni G, Tomezzoli A, Di Leo A, Moore PS, Talamini G, Scarpa A. Clinical significance of mutator phenotype and chromosome 17p and 18q allelic loss in gastric cancer. *Br J Surg* 2001;88:419-425
- 72 Suzuki K, Ohnami S, Tanabe C, Sasaki H, Yasuda J, Katai H, Yoshimura K, Terada M, Peruco M, Yoshida T. The genomic damage estimated by arbitrarily primed PCR DNA fingerprinting is useful for the prognosis of gastric cancer. *Gastroenterology* 2003;125:1330-1340
- 73 Ott K, Vogelsang H, Mueller J, Becker K, Muller M, Fink U, Siewert JR, Hofler H, Keller G. Chromosomal instability rather than p53 mutation is associated with response to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:2307-2315

• 文献综述 •

消化系统水通道蛋白的生理学进展

张彦亮, 倪海滨

张彦亮, 倪海滨, 南京医科大学附属南京第一医院普内科
江苏省南京市 210006
项目负责人: 张彦亮, 210006, 江苏省南京市, 南京医科大学附属南京第一
医院普内科。
电话: 025-86641593-8247
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2004-01-12

摘要

水通道蛋白在消化系统分布广泛, 从唾液腺到结肠, 其可谓无处不在。在生理上这些蛋白质与水的分泌和吸收过程密切相关, 本文就这一方面的研究进展作一综述。

张彦亮, 倪海滨. 消化系统水通道蛋白的生理学进展. 世界华人消化杂志 2004;
12(5):1389-1392
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1389.asp>

0 引言

早期认为在各种组织细胞中, 水的转运均是通过简单扩散的方式完成的。但有部分细胞如肾近曲小管上皮细胞、红细胞对水的通透性明显高于其他组织, 一直难以解释这种现象。1984年Dibas et al首先从牛眼晶状体中分离出一种非选择性的水通道蛋白(Aquaporins, AQP)。1992年又进一步分离出选择性的水通道蛋白-AQP1, 这种疑问方才有了满意的答案。之后的10a又陆续在各种组织中分离发现了10种AQP, 由于这些蛋白质相互之间具有较高的同源性, II级结构也相类似, 且均能够介导水的快速跨膜运动, 因此被归属为细胞膜整合蛋白亚家族, 称作水通道蛋白家族^[1]。

1 AQP家族的结构与特点(表1)

表1 AQP家族的结构与特点^[1-2]

| AQPs类型 | 氨基酸数目 | 分子量 | 可转运物质 | 对水相对通透性 | 汞抑制作用 | 染色体定位 |
|--------|---------|----------|---------------|---------|-------|----------|
| AQP0 | 263 | 26 kD | 水、蔗糖、氯化钾、维生素C | 0.04 | - | 12q13 |
| AQP1 | 269 | 28 kD | 水、 | 1.00 | + | 7q14 |
| AQP2 | 271 | 29 kD | 水、氢离子 | 0.55 | + | 12q13 |
| AQP3 | 292 | 29 kD | 水、甘油、尿素 | 0.35 | + | 9q12 |
| AQP4 | 301/323 | 34 kD | 水、甘油、尿素 | 3.00 | - | 18q11-12 |
| AQP5 | 265 | 27 kD | 水 | 0.80 | + | 12q13 |
| AQP6 | 282 | 30 kD | 水、阴离子 | 0.06 | + | 12q13 |
| AQP7 | 269 | 26 kD | 水、甘油、尿素 | 1.00 | - | 9p13 |
| AQP8 | 263 | 28 kD | 水、尿素 | 1.35 | + | 16p12 |
| AQP9 | 295 | 28-33 kD | 水、尿素、甘油 | 1.00 | + | 15q22 |
| AQP10 | 264 | | 水 | ? | - | ? |

没有表达,一系列实验结果提示AQP3直接参与了人类唾液的分泌过程。虽然AQP4定位于唾液腺分泌管腔细胞膜的顶侧膜上,但以毛果芸香碱刺激AQP4基因敲除小鼠时,其分泌的唾液在构成与数量上都没有改变,因此AQP4似乎并没有参与唾液的分泌过程^[5]。

表2 AQP在消化系统的分布情况^[2,3]

| 消化器官 | 物种 | AQP类型 | 细胞分布 | 亚细胞分布 |
|------|----|-------|------------|-------------|
| 唾液腺 | 人 | AQP1 | 内皮细胞、肌上皮细胞 | |
| | | AQP3 | 腺泡细胞 | BLPM |
| | | AQP5 | 腺泡细胞 | APM |
| | 大鼠 | AQP1 | 内皮细胞 | APM、BLPM |
| | | AQP4 | 管上皮细胞 | BLPM |
| | | AQP5 | 腺泡、管上皮细胞 | APM、IC |
| | | AQP8 | 腺泡细胞 | BLPM |
| 食管 | 小鼠 | AQP1 | 内皮细胞 | |
| | | AQP5 | 腺泡细胞 | APM |
| | 大鼠 | AQP1 | 淋巴管内皮细胞 | |
| | | AQP3 | 鳞状内皮细胞 | |
| 胃 | 人 | AQP4 | 壁细胞和主细胞 | BLPM |
| | | AQP3 | 贲门腺细胞 | BLPM |
| | 大鼠 | AQP4 | 壁细胞 | BLPM |
| | | AQP4 | 壁细胞 | BLPM |
| 肝 | 小鼠 | AQP4 | 壁细胞 | BLPM |
| | | AQP1 | 内皮细胞 | APM、BLPM |
| | 大鼠 | AQP0 | 肝细胞、胆管细胞 | |
| | | AQP1 | 内皮细胞 | BLPM |
| | | AQP4 | 胆管细胞 | APM、BLPM、IC |
| | | AQP5 | 胆管细胞 | |
| | | AQP8 | 肝细胞 | APM、IC |
| | | AQP9 | 胆管细胞 | BLPM |
| | | AQP9 | 肝细胞 | BLPM |
| 胆囊 | 小鼠 | AQP1 | 胆管细胞 | |
| | | AQP1 | 胆囊颈上皮细胞 | APM、BLPM |
| | 人 | AQP1 | 微血管 | |
| 胰腺 | 人 | AQP1 | 腺泡细胞 | APM、BLPM |
| | | AQP1 | 内皮细胞 | |
| | 大鼠 | AQP8 | 腺泡细胞 | APM、IC |
| | | AQP1 | 小叶间脉管 | |
| 小肠 | 人 | AQP10 | 空肠上皮细胞 | |
| | | AQP1 | 内皮细胞 | |
| | 大鼠 | AQP3 | 绒毛上皮细胞 | BLPM |
| | | AQP4 | 隐窝上皮细胞 | BLPM |
| | | AQP8 | 隐窝上皮细胞 | IC |
| | | AQP3 | 绒毛上皮细胞 | |
| 结肠 | 人 | AQP1 | 内皮细胞 | |
| | | AQP2 | 表面吸收上皮细胞 | BLPM |
| | 大鼠 | AQP3 | 表面吸收上皮细胞 | BLPM |
| | | AQP4 | 表面吸收上皮细胞 | BLPM |
| | 人 | AQP8 | 表面吸收上皮细胞 | IC |
| | | AQP4 | 表面吸收上皮细胞 | BLPM |
| | | AQP8 | 表面吸收上皮细胞 | |

BLPM:细胞膜顶膜;APM:细胞膜基侧膜;IC:细胞内分布。

相比其他几种AQPs,在唾液分泌和重吸收的过程中AQP5的作用研究的更为深入。AQP5在人类、大鼠和小鼠腺泡细胞顶膜均存在表达,认为其参与了唾液的分泌过程。有研究将AQP5全长cDNA以腺病毒转染唾液腺上皮细胞,结果发现细胞AQP5的表达增加且出现与渗透梯度有关的水分泌现象。此外以毛果芸香碱刺激AQP5基因敲除小鼠唾液的分泌,与野生型相比较,分泌量尚不足后者的40%。且基因敲除小鼠的唾液为高渗性,渗透压达420 mOsm,显示出水转运功能的不全,在这种小鼠的腮腺细胞和舌下腺细胞也有同样情况发生^[6]。最近还有研究显示细胞顶膜AQP5表达数量的增加与唾液腺分泌过程中水转运的调控有直接关系。

3.2 食管 迄今为止尚未发现食管具有水分泌和吸收的功能,然而在食管淋巴管内皮细胞以及食管上皮细胞却分离发现了AQP1和AQP3。尤其是存在于上皮细胞的AQP3,显示其可能与食管腔表面湿润度的维持有关^[2]。

3.3 胃 胃液的等渗性也显示出胃壁细胞盐酸分泌的同时也伴随着水通过上皮细胞膜的转运过程,然而这种机制目前仍不明确。因为以往的研究显示壁细胞顶膜对水的通透性较低,而AQPs也并没有直接参与胃酸的分泌过程,因此细胞旁路可能是胃液产生水转运的主要途径。目前已发现AQP3和AQP4在胃有表达,但他们在胃液分泌过程中的作用仍不清楚。AQP3主要表达在贲门腺细胞基侧膜和大鼠胃的非腺体区,所以推测AQP3可能与胃酸分泌时水的旁路转运有关^[7]。而AQP4则选择性表达在大鼠和小鼠胃壁细胞基底膜,在人胃的主细胞和壁细胞则均有表达。但在H⁺/K⁺ATP酶所在的细胞顶膜和管状囊泡膜均没有发现AQP4的表达,所以认为他与水从壁细胞进入胃腔的过程并无直接关系^[8]。

Wang et al^[9]观察了AQP4基因敲除小鼠的胃酸分泌情况,结果与野生型对照并没有明显差异,也证实了以上的推断。但他们也同时注意到由于盐酸分泌过程中水的丢失会导致壁细胞内环境渗透压的增加,而AQP4则能够同时介导组织间隙水向细胞内的转运,以维持细胞内环境的稳定,所以AQP4的这种稳态维持作用对于酸分泌过程是相当重要的。其他类型的AQPs如AQP8在胃上虽也有发现,但仅限于mRNA水平,作用也不明确,尚待进一步研究。

3.4 肝胆 在肝脏内水的转运必须通过2个上皮细胞层(肝细胞和胆管细胞)方能完成。肝细胞至少能够表达3种AQPs,AQP0、AQP8和AQP9。AQP8主要定位于肝细胞的囊泡内,而在细胞膜基底部则很少表达,提示其与细胞膜水通透性之间的关系似乎并不大。但当双丁酰环磷腺苷刺激时,胞内的AQP8则出现再分布向细胞膜表面转移现象,细胞顶膜水的通透性也明显增加。根据这样的结果,认为肝细胞水的转运为简单扩散和AQPs双路径介导,基础状态下主要受前者调控,受刺激状态下则后者起主要作用^[10]。AQP0和AQP9在肝细胞水转运中的作用目前尚没有这方面报道。

胆管细胞占肝脏细胞总数的3-5%, 然而他们却产生了近40%的胆汁。胆管细胞表达的AQPs最为丰富, 包括了AQP0、AQP1、AQP4、AQP5、AQP8和AQP9等, 其中以AQP1和AQP4研究最多。AQP1主要定位于胆管细胞膜顶膜、基侧膜以及胞内囊泡。AQP1在基侧膜的密度一般较低, 而AQP4在这个区域则有高表达。已经有研究发现AQP4能够维持胆管细胞顶膜区和基侧膜区之间水通透性的平衡, 其主要调控基侧膜水的通透性, 而AQP1则在顶膜起决定作用。AQP1在胆管周围血管内皮细胞也有高表达, 显示其可能与水通过胆管细胞从血管向胆管的转运过程有关。同时AQP1在小鼠胆管内皮渗透性水转运过程中也发挥着关键作用。AQP1基因缺失小鼠独立的肝内胆管单位(IBMUs)与野生型相比, 水通透性仅为后者的40%^[11]。肝内胆管不仅有分泌功能而且也能够吸收水分, Gong et al^[12]将IBMUs置于高渗性缓冲液中, 结果发现管腔迅速缩小, 显示出水分的吸收。除此之外葡萄糖灌注大鼠IBMUs也出现类似现象, 而这些模型中胆管上皮水的吸收又均具有汞敏感性, 提示有AQPs参与其中。在胆管上皮细胞之间的紧密连接之间是否有AQPs呢? 通过对IBMUs的研究发现, 渗透性跨膜水转运能够被HgCl₂所抑制而鱼精蛋白(旁路水转运调节剂)则没有抑制作用, 提示AQPs介导了胆管上皮跨膜水转运, 而细胞旁路则没有参与其中。AQP5、AQP8和AQP9在胆管细胞的亚细胞定位目前仍不清楚, 有待研究。虽然已经发现AQP1定位于胆囊上皮细胞顶膜和基侧膜, 但其在胆囊上皮细胞水跨膜转运过程中的作用, 目前尚不清楚。

3.5 胰腺 胰液的外分泌部主要由腺泡和导管组成, 每天能够分泌2.5 L的胰液进入十二指肠。研究显示AQP1和AQP8在胰腺表达, 这些蛋白质可能与胰液的分泌有关。免疫组化显示AQP1位于人类胰腺腺泡细胞的基侧膜和顶膜。在大鼠AQP1则位于微脉管系统。通过免疫电镜观察发现AQP8在大鼠胰腺位于腺泡细胞顶膜, 亚细胞结构胞内的囊泡内也有相当多的表达, 这种现象提示AQP8可能在2个不同部位存在反复的循环。Hurley et al^[13]采用分离的腺泡细胞研究水转运功能, 结果发现腺泡细胞在高渗透压下, 氯化汞能够抑制细胞膜对水的通透性, 仅仅在顶膜很小的区域给予氯化汞, 就能够使膜水通透性降低90%, 从这个结果也能推测到在基侧膜也可能有未知的水通道存在。Cho et al^[14]研究发现GTP诱导酶原颗粒在Gαi3蛋白介导下发生肿胀, 而AQP1则在胰腺外分泌酶原颗粒膜表达并参与了GTP诱导的水转运和细胞肿胀的过程。AQP3在胰腺细胞的定位目前仍不知道, 也没有研究显示胰腺上皮细胞存在AQPs。

3.6 肠道 在小肠发现的水通道蛋白目前有6种: AQP1、AQP3、AQP4、AQP5、AQP8和AQP10, 均在大鼠的小肠内发现的。AQP3和AQP4在小肠上皮表达, AQP8 mRNA的表达则局限于空肠, 显示出小肠水的转

运可能选择性发生在部分肠管。AQP3 mRNA水平随着肠管长度的增加而增加的事实也支持这种假设^[15]。AQP10则是新分离出的一种水通道蛋白, RNA分析和Northern blot分析发现其在十二指肠和空肠均有表达, 原位杂交结果则显示AQP10定位于分泌性空肠上皮细胞^[16]。然而至今仍没有直接的证据证明AQPs介导了小肠水的转运, 因此细胞旁路仍被视作小肠水吸收的主要途径。

与其他分泌功能内皮细胞类似, 结肠绒毛上皮细胞水的分泌也是通过细胞旁路机制完成。目前已经知道结肠细胞表达AQP1、AQP2、AQP3、AQP4和AQP8。研究证实AQP2主要表达在远端结肠黏膜上皮细胞。在肠道水吸收过程中, AQP2在细胞顶膜的表达明显增加, 同时发现这种吸收作用能够被汞制剂PCMBS所抑制, 但Na⁺吸收却没有受影响, 显示了抗利尿激素调控水通道-AQP2参与了调控肠道上皮细胞的水吸收过程^[17]。但研究显示AQP4与结肠水分泌的过程并没有关系。Wang et al^[18]通过茶碱诱导AQP4基因敲除小鼠结肠分泌, 显示结肠分泌功能并没有损害。但最近又有人研究了YY蛋白静脉注射能够诱导小鼠结肠水分吸收增加, 而在AQP4敲除小鼠吸收则显著降低, 显示AQP4可能参与了结肠的水吸收过程。其他几种AQPs在结肠水转运过程的作用, 目前也还没有相应的研究。但令人振奋的是最近有研究发现AQP8基因在结肠腺瘤和结肠癌细胞表达缺失或仅微量表达, 而在正常的结肠黏膜细胞则有较高水平的表达, 这种表达的差异显示出AQP8有可能成为新的结肠肿瘤预测标志物^[19]。

总之, 消化系统水通道蛋白的研究仍处于起步阶段, 虽然对于他们在水转运生理过程中的作用我们有了一定的认识, 但许多的问题并没有解决。他们具体的作用机制, 他们相互之间的关系, 他们的病理生理意义等等, 都将是今后的研究方向。

4 参考文献

- Ma T, Verkman AS. Aquaporin water channels in gastrointestinal physiology. *J Physiol* 1999;517(Pt 2):317-326
- Masyuk AI, Marinelli RA, LaRusso NF. Water transport by epithelia of the digestive tract. *Gastroenterology* 2002;122:545-562
- Morinaga T, Nakakoshi M, Hirao A, Imai M, Ishibashi K. Mouse aquaporin 10 gene (AQP10) is a pseudogene. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;294:630-634
- Song Y, Verkman AS. Aquaporin-5 dependent fluid secretion in airway submucosal glands. *J Biol Chem* 2001;276:41288-41292
- Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem* 1999;274:20071-20074
- Krane CM, Melvin JE, Nguyen HV, Richardson L, Towne JE, Doetschman T, Menon AG. Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. *J Biol Chem* 2001;276:23413-23420
- Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, Nihei K, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K, Kihara I. Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 1999;276:C621-C627
- Tola VB, Van Hoek AN, Brown D. Mmuno fluorescence mapping of aquaporin-1 and -4 in gastric mucosa: colocalization with H⁺/K⁺-ATPase. *Gastroenterology* 1999;116:A939

- 9 Wang KS, Komar AR, Ma T, Filiz F, McLeroy J, Hoda K, Verkman AS, Bastidas JA. Gastric acid secretion in aquaporin-4 knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279:G448-453
- 10 Garcia F, Kierbel A, Larocca MC, Gradilone SA, Splinter P, LaRusso NF, Marinelli RA. The water channel aquaporin-8 is mainly intracellular in rat hepatocytes, and its plasma membrane insertion is stimulated by cyclic AMP. *J Biol Chem* 2001; 15:12147-12152
- 11 Mennone A, Verkman AS, Boyer JL. Unimpaired osmotic water permeability and fluid secretion in bile duct epithelia of AQP1 null mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283:G739-746
- 12 Gong AY, Masyuk AI, Splinter PL, Huebert RC, Tietz PS, LaRusso NF. Channel-mediated water movement across enclosed or perfused mouse intrahepatic bile duct units. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C338-346
- 13 Hurley PT, Ferguson CJ, Kwon TH, Andersen ML, Norman AG, Steward MC, Nielsen S, Case RM. Expression and immunolocalization of aquaporin water channels in rat exocrine pancreas. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280:G701-G709
- 14 Cho SJ, Sattar AK, Jeong EH, Satchi M, Cho JA, Dash S, Mayes MS, Stromer MH, Jena BP. Aquaporin 1 regulates GTP-induced rapid gating of water in secretory vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:4720-4724
- 15 Purdy MJ, Cima RR, Doble MA, Klein MA, Zinner MJ, Soybel DI. Selective decreases in levels of mRNA encoding a water channel (AQP3) in ileal mucosa after ileostomy in the rat. *J Gastrointest Surg* 1999;3:54-60
- 16 Yaoita E, Suda T, Hatakeyama K. Cloning of a new aquaporin (AQP10) abundantly expressed in duodenum and jejunum. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287:814-819
- 17 Gallardo P, Cid LP, Vio CP, Sepulveda FV. Aquaporin-2, a regulated water channel, is expressed in apical membranes of rat distal colon epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G856-863
- 18 Wang KS, Komar AR, Ma T, Filiz F, McLeroy J, Hoda K, Verkman AS, Bastidas JA. Gastric acid secretion in aquaporin-4 knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279:G448-453
- 19 Fischer H, Stenling R, Rubio C, Lindblom A. Differential expression of Aquaporin 8 in human colonic epithelial cells and colorectal tumors. *BMC Physiol* 2001;1:1

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

• 消息 •

世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》 2004年版内科学类的核心期刊

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

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

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

• 文献综述 •

放大电子内镜检查在消化道疾病中的诊断价值

徐雷鸣, 李定国

徐雷鸣, 李定国, 上海第二医科大学附属新华医院消化内科 上海市 200092
项目负责人: 徐雷鸣, 200092, 上海市控江路 1665 号, 上海第二医科大学附
属新华医院消化内科 . xlma@shtel.net.cn
电话: 021-6579000
收稿日期: 2004-02-11 接受日期: 2004-03-18

摘要

继电子内镜广泛应用临床后, 各种类型的放大电子内镜相继问世, 并用于临床; 由于后者具有高像素和高分辨率特点, 在检查消化道疾病时, 可使肉眼直观所见到的黏膜组织被不同程度放大, 如Olympus GIF-Q240Z放大电子内镜配备20寸显示器时, 可使上消化道黏膜组织被放大115倍; 再如 Olympus CF-240Z 配备 20 寸显示器时, 可使结肠黏膜组织被放大120倍。因此在放大电子内镜下, 正常黏膜组织及病变部位都十分清楚, 有利于观察微细结构变化, 发现早癌以及对良、恶性病变进行较准确鉴别^[1], 故在消化道疾病检查诊断中, 放大电子内镜是一先进重要手段。

徐雷鸣, 李定国. 放大电子内镜检查在消化道疾病中的诊断价值. 世界华人消
化杂志 2004;12(6):1393-1396

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1393.asp>

0 引言

我国是食管癌及胃癌高发区, 到目前为止其发病率仍居高不下, 早期癌的检出率低、死亡率高; 而结肠癌发病率也有逐渐增高趋势, 同样发现早期癌少、死亡率高。近年来, 国内开始使用放大电子内镜, 上述情况有所改观; 为了在使用放大电子内镜时更好地观察黏膜微细结构及区别良恶性病变, 更准确的提高早癌检出率, 为镜下治疗提供充分依据, 更正确认识和诊断消化道中一些其他病变, 现将近年来国外一些学者使用放大电子内镜结合镜下染色诊断消化道疾病的经验证做一综述介绍。

1 食管疾病

1.1 Barrett 食管炎 Endo et al^[2]用放大电子内镜观察 30 例经亚甲兰染色的 Barrett 食管炎黏膜, 对活检标本进行组织学、粘蛋白免疫组化及细胞增生检测。放大电子内镜将小凹分型(pit pattern)分成 5 型, 即管状和绒毛状小凹型: 不仅有特殊的柱状上皮及亚甲兰的吸收, 而且具有高标记的小肠粘蛋白表型; 圆点和直型小凹型: 无特殊的柱状上皮, 归类为胃表型; 长卵圆型小凹型: 介于胃表型和肠型的中间型。结果发现, 放大电子内镜对 Barrett 食管炎黏膜形状的分类不仅能反映组织学形态而且能反映粘蛋白表型。Yagi et al^[3]报道: 用放大电子内

镜结合亚甲兰染色观察 30 例非幽门螺杆菌感染的 Barrett 食管炎黏膜的肠腺化生患者, 其中男 21 例, 女 9 例, 年龄 33-79(平均 61 岁), 结果发现 Barrett 食管炎黏膜的肠腺化生呈管状、多孔状、椭圆状的小凹型。肠腺化的敏感性为 84.4%、特异性为 91.7%。Sharma et al^[4]观察了 80 例平均年龄 62.7 岁、疑为 Barrett 食管炎的患者(即柱状上皮覆盖的远端食管), 其柱状黏膜的平均长度 3.7 cm. 由于 Barrett 食管炎中出现肠化生(intestinal metaplasia, IM)和低度异型增生(low grade dysplasia, LGD)和高度异型增生(high grade dysplasia, HGD)时, 具有癌变的危险, 但这种病理变化在食管壁常呈斑驳状及马赛克状分布, 故黏膜随机活检往往无法准确检到发生病变的部位, 但在喷洒靛青-洋红及使用放大电子内镜后, 可发现柱状上皮黏膜有 3 种类型, 即嵴/绒毛状型、环型以及不规则/扭转型; 本组患者根据上述黏膜类型靶向活检, IM 的检出率则较高: 嵴/绒毛状型为 97%(57/62)、环型为 17%(2/12)、其余 6 例不规则/扭转型患者活检提示 100%(6/6)则为 HGD. 另外全组患者中有 18 例为嵴/绒毛状型者在靶向活检中均有 LGD, 因此, 作者认为: 根据放大电子内镜结合染色所见黏膜病变分型做靶向活检与随机活检相比, 提高肠化生和异型增生的检出率。

1.2 表浅性食管癌 Miwako et al^[5]用放大电子内镜观察食管上皮, 发现碘染色的正常食管黏膜是由一组组白点规则排列而成, 并可见到上皮乳头层毛细血管。他将上皮乳头层毛细血管分成 4 型, 即细直型(1 型)、螺旋型(2 型)、不规则型(3 型)及复杂型(4 型), 与病理学检查对照发现: 1 型为组织学正常, 2 型为常见炎症性改变, 3 型中 m₁ 和 m₂ 型黏膜癌检出率较高, 4 型中 m₃ 型-sm 黏膜下癌检出率较高。Kumagai et al^[6]用放大电子内镜观察 82 例表浅性食管癌患者, 按浸润深度分成 4 组, 即 m₁-m₃(黏膜癌)、sm(黏膜下癌); 结果还发现: 表浅性食管癌的浸润深度与放大电子内镜观察到的表面毛细血管环(intrapapillary capillary loops, IPCL)结构改变相关, m₁ 型为 IPCL 口径扩大, m₂ 型为 IPCL 口径扩大及血管延长, m₃ 型为混合有 IPCL 和肿瘤血管, sm 型为完全性肿瘤血管; 组织学浸润深度与放大电子内镜观察的一致性为 83.3%, 组织学观察显示: m₁ 型 IPCL 的口径为 $12.9 \pm 3.9 \mu\text{m}$, 正常食管黏膜 IPCL 的口径为 $6.9 \pm 31.5 \mu\text{m}$ ($P < 0.0001$), 作者认为观察表浅性食管癌的微血管结构对判断肿瘤的浸润深度是非常有帮助的。

2 胃部疾病

2.1 慢性胃炎 Yagi et al^[7]用放大电子内镜观察297例患者的胃黏膜,比较H pylori感染性胃炎与无H pylori感染正常胃黏膜的内镜下表现。其中72例为非H pylori感染正常胃黏膜,225例为H pylori感染性胃炎;作者将放大电子内镜图像分成4型:1型可见形成网状的集合静脉和真毛细管,以及胃小凹类似针孔状($n=80$),2型可见不规则的真毛细管,未见集合静脉($n=36$),3型可见白色的胃小凹和小沟,未见形成网状的集合静脉和真毛细管($n=110$),4型可见周围红色扩大的胃小凹($n=71$);非H pylori感染正常胃黏膜均为1型,根据放大电子内镜图像可清楚地鉴别H pylori相关性胃炎。此外,Yagi et al^[8]还用放大电子内镜观察557例患者的胃黏膜,发现无H pylori感染正常胃黏膜内镜下可见规则排列的集合静脉(regular arrangement of collecting venules, RAC),在158例无Hp感染正常胃黏膜中151例有RAC,RAC出现的敏感性和特异性分别为93.8%和96.2%,RAC的出现是无H pylori感染正常胃黏膜的特征性表现。另外,Nakagawa et al^[9]用放大电子内镜观察胃黏膜内集合静脉,分成3个类型:规则型、不规则型和模糊型,结果显示:规则型为无H pylori感染,不规则型中腺体萎缩明显高于模糊型。

2.2 门脉高压性胃病 Cales et al^[10]用放大电子内镜和普通电子内镜双盲比较观察39例肝硬化患者和正常对照者的胃黏膜,结果发现:肝硬化患者的胃黏膜放大电子内镜图像常常表现为花斑样型、白点状和红色征,放大电子内镜常常比普通电子内镜对胃黏膜形态能提供更多的描述,但是对于肝硬化诊断的精确性二者无明显差别;对于通过放大电子内镜观察门脉高压胃黏膜病变的图像来预测门脉高压性胃病出血,目前尚无文献报道。

2.3 胃癌 Tajiri et al^[11]用放大电子内镜结合染色和普通电子内镜比较观察232例病变,结果发现,(1)隆起性病灶:增生性息肉放大电子内镜图像为带红色、粗糙的类型,腺瘤性息肉为带白色、细小、规则的类型,隆起性早期管状腺癌为不规则的黏膜类型,可见不规则和相对粗短状毛细血管,隆起性早期乳头状腺癌为不规则凸起、粗糙的黏膜类型,有长弯曲状毛细血管;(2)凹陷性病灶:各种类型良性溃疡和糜烂愈合过程中,往往为膜样、梭样、栅栏样或圆石样的黏膜类型,呈规则排列,尽管有毛细血管密度增加,但无扩张或者弯曲的改变,几乎所有的凹陷性早期胃癌均有不规则的管状结构及异常的毛细血管,呈网状或螺旋状改变;(3)放大电子内镜结合染色和普通电子内镜比较:当隆起性病灶 $\leq 1\text{ cm}$ 时,普通电子内镜的诊断准确率为63.6%、放大电子内镜为100%,当隆起性病灶 $>1\text{ cm}$ 时,普通电子内镜为90.0%、放大电子内镜为100%,当凹陷性病灶 $\leq 1\text{ cm}$ 时,普通电子内镜的诊断准确率为68.0%、放大电子内镜为88.0%,当凹陷性病灶 $>1\text{ cm}$ 时,普通

电子内镜为97.0%、放大电子内镜为100%;对早期胃癌,普通电子内镜的总诊断准确率为66.7%、放大电子内镜为91.7%($P < 0.01$)。结果提示:放大电子内镜对于微小病变的诊断准确率优于普通电子内镜。Yao et al^[12]用放大电子内镜观察27例非溃疡型的黏膜内早期胃癌,按组织学分类分成:分化型(18例)和未分化型(9例);结果发现:在非癌黏膜内见有规则上皮下毛细血管网和不同组织学分类的早期胃癌放大电子内镜下表现有明显区别,即所有的分化型早期胃癌有明确的界限区域,规则上皮下毛细血管网消失和不规则的毛细血管增生,未分化型无明确的界限区域或其非癌黏膜内毛细血管密度减少。

3 结肠疾病

3.1 炎症性肠病 Fujimura et al^[13]用放大电子内镜、电子显微镜及免疫组化方法研究Crohn病阿弗他溃疡形成的机制。其中用放大电子内镜结合染色后可清楚地将阿弗他溃疡病变分成3个类型,1型:黏膜类型消失但表面可见明显沟槽、圆形扩大中央凹陷型。2型:小中央凹陷和周围红晕型,3型:小溃疡或糜烂表面有圆形或不规则型白色覆盖物、周围黏膜中可见扩张毛细血管;结果提示:病变程度与分型密切相关,严重程度从重到轻,依次为3型→2型→1型;预后从好到差,依次为1型→2型→3型;放大电子内镜检查对病变程度的判断及预后有帮助。Matsumoto et al^[14]用放大电子内镜观察41例溃疡性结肠炎患者直肠部位黏膜。结果显示,41例溃疡性结肠炎患者有37%无网状结构(network pattern, NWP),24%无腺管开口(cryptal opening, CO);作者根据NWP和CO将患者分成3组:NWP(-)/CO(+)($n=15$)、NWP(+)/CO(-)($n=10$)及NWP(+)/CO(+)($n=16$),并与临床症状、组织学做比较后认为:黏膜同时有NWP(+)/CO(+)的患者,临床症状较轻、组织学炎症反应较低、溃疡性结肠炎活动指数(ulcerative colitis activity index, UCAI)为: 119 ± 33 ,NWP(+)/CO(-)组的UCAI为: 173 ± 44 ($P = 0.0016$);NWP(-)/CO(+)组的UCAI为: 167 ± 46 ($P = 0.0024$)。因而作者认为放大电子内镜可以评价疾病的严重程度。另外,Fujiya et al^[15]用放大电子内镜检查61例溃疡性结肠炎患者,并将病变分成5个类型:(1)规则排列的腺管开口,(2)绒毛样,(3)上皮微小缺陷,(4)小淡黄色点,(5)珊瑚色礁样表现,并将此5个类型与组织病理学做了比较:上皮微小缺陷类型常提示溃疡性结肠炎可复发,故作者们认为放大电子内镜分型对溃疡性结肠炎活动性的评价及病情的缓解预测是非常有用的。

3.2 结肠息肉病 Konishi et al^[16]将660例结肠息肉患者随机分成两组,每组330例分别使用放大电子内镜和普通电子内镜进行检查,共发现息肉812个,息肉直径 $\leq 10\text{ mm}$,同时证明:肿瘤性病变与非肿瘤性病变诊断的准确率是:放大电子内镜为92%(372/405),普通电子内

镜为: 68%(278/407), 说明放大电子内镜在鉴别良、恶性病变方面明显优于普通内镜。Togashi et al^[17]用放大电子内镜检查1 280例患者, 共发现923枚息肉, 经染色放大按腺管开口分成6型: I型为中圆形, II型为星样形, III型为椭圆形, IV型为小圆形, V型为脑回状形及VI型为无明显结构表现型; 与组织学对照可见: I、II型为腺瘤腺管开口类型, III、IV、V、VI型为肿瘤腺管开口类型; 放大电子内镜对肿瘤性病变诊断的准确率为92%, 对非肿瘤性病变诊断的准确率为73.3%, 其中23个肿瘤性病变被误判为非肿瘤性的中度不典型增生; 对直径≤5 mm的准确率为85.6%, 直径6~10 mm的准确率为94.8%, 直径≤11 mm的准确率为90.6%。而Liu et al^[18]用放大电子内镜检查发现954枚息肉, 经染色后诊断肿瘤性病变的敏感性为90.8%, 特异性为72.7%。Tamura et al^[19]用放大电子内镜观察结肠黏膜并将腺管开口分成5型: I型中圆形为正常黏膜, II型星样形为增生性息肉, III_L型椭圆形、III_S型小圆形均为腺瘤, IV型脑回状形为腺瘤或癌及V型明显结构表现型为浸润癌, 这与6型分类方法基本相同; 作者还发现: 单一腺体腺瘤家族腺瘤性息肉病的表面小凹结构常呈III_L型腺管开口类型, 组织病理学显示定位在黏膜的上层, 因此, 可以根据内镜下crypt pattern诊断为单一腺体腺瘤息肉病。还有, 用放大电子内镜可以明确诊断罕见的帽状息肉病(Cap polyposis)、Cronkhite-Canada综合征、Cowden病以及Peutz-Jeghers综合征等^[20~23]; 因此, 利用放大电子内镜检查可提高上述特殊疾病的诊断率。

3.3 结肠癌 Kudo et al^[24~25]将大肠黏膜腺管开口分为5型: (1)I型: 为圆形, 镜下为正常黏膜, 由于黏膜下肿瘤起源于黏膜下层或肌层, 所以通常腺管开口为I型, 故对于黏膜下肿瘤的诊断具有重要意义; (2)II型: 星芒状或乳头状, 开口较正常腺管开口大, 为增生性病变; (3)III_L型和III_S型: 前者为腺管开口呈管状或类圆形, 较正常腺管开口大, 为腺瘤, 多为隆起性病变, 后者为腺管开口呈管状或类圆形, 较正常腺管开口小, 为腺瘤或早期结肠癌(多为II_C型早期结肠癌); (4)IV型: 腺管开口呈分支状、脑回状或沟回状, 为绒毛状腺瘤; (5)V_A型和V_N型: 前者为腺管开口排列不规则, 开口大小不均, 大多为早期结肠癌, 后者为腺管开口消失或无结构, 该型皆为浸润癌。Nagata et al^[26]用放大电子内镜检查75例早期结肠癌患者, 根据pit pattern将V型分成V_A型和V_N型(再分成A, B, C亚型), 其中37例为V_A型, 8例为V_N-A型, 16例为V_N-B型, 14例为V_N-C型, 结果发现: 肿瘤黏膜下浸润的发生率(sm₂-sm₃), V_A型为14%(5/37), V_N-A型为38%(3/8), V_N-B型为96%(15/16), V_N-C型为100%(14/14); 纤维成形性反应阳性及pit结构紊乱或消失发生率, V_N-B型和V_N-C型显著高于V_A型($P < 0.01$), 表明pit pattern V型的亚型分类对早期结肠癌浸润深度的判断有非

常重要意义。Hart et al^[27]研究显示, 内镜下大多数结肠病变为隆起性病变, 可达85%, 而平坦性病变为少数, 但与结肠癌的发生密切相关, 普通电子内镜往往会遗漏这些病变, 用放大电子内镜结合染色观察结肠黏膜腺管开口的分型, 可明确诊断。Tanaka et al^[28]用放大电子内镜观察5 590个腺瘤和癌, 结果发现: 凹陷性病变比隆起性病变有明显癌变及黏膜下浸润的趋势; 以往结肠癌的分期多在术后进行, 普通电子内镜检查及钡剂灌肠无法判断肿瘤浸润深度及有无周围淋巴结转移, 对于凹陷性病变, 即II_C型早期结肠癌, 与增生性病变和炎性病变用普通电子内镜观察常难以鉴别, 而放大电子内镜通过观察结肠黏膜的crypt pattern进行定点靶向活检, 以判断癌前病变/癌, 并且结合超声内镜检查, 可提高早期结肠癌的确诊率^[29, 30]。此外, Kudo et al^[31]用放大电子内镜观察平坦性病变及凹陷性病变的pit pattern, 为内镜下黏膜切除(endoscopic mucosal resection, EMR)提供依据, 对侵及黏膜下层而无血管浸润的病变(sm_{1a}和sm_{1b})可行内镜下黏膜切除, 对于pit pattern VN病变, 则需行外科手术。

总之, 放大电子内镜检查对于消化道疾病的诊断具有重要的价值, 尤其对于早期肿瘤的发现、内镜下治疗及确定是否进行术后随访明显优于一般电子内镜, 如放大电子内镜和镜下黏膜染色相结合用于消化道疾病诊断, 则更加准确。

4 参考文献

- 1 Peitz U, Malfertheiner P. Chromoendoscopy: from a research tool to clinical progress. *Dig Dis* 2002;20:111~119
- 2 Endo T, Awakawa T, Takahashi H, Arimura Y, Itoh F, Yamashita K, Sasaki S, Yamamoto H, Tang X, Imai K. Classification of Barrett's epithelium by magnifying endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2002;55:641~647
- 3 Yagi K, Nakamura A, Sekine A. Accuracy of magnifying endoscopy with methylene blue the diagnosis of specialized intestinal metaplasia and short-segment Barrett's esophagus in Japanese patients without *Helicobacter pylori* infection. *Gastrointest Endosc* 2003;58:189~195
- 4 Sharma P, Weston AP, Topalovski M, Cherian R, Bhattacharyya A, Sampliner RE. Magnification chromoendoscopy for the detection of intestinal metaplasia and dysplasia in Barrett's oesophagus. *Gut* 2003;52:24~27
- 5 Miwako A. 放大电子内镜诊断食管浅表性病变. 胃肠病学 2001; 6(Supple):A138.
- 6 Kumagai Y, Inoue H, Nagai K, Kawano T, Iwai T. Magnifying endoscopy, stereoscopic microscopy, and the microvascular architecture of superficial esophageal carcinoma. *Endoscopy* 2002;34:369~375
- 7 Yagi K, Nakamura A, Sekine A. Comparison between magnifying endoscopy and histological, culture and urease test findings form the gastric mucosa of the corpus. *Endoscopy* 2002; 34:376~381
- 8 Yagi K, Nakamura A, Sekine A. Characteristic endoscopic and magnified endoscopic findings in the normal stomach without *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:39~45
- 9 Nakagawa S, Kato M, Shimizu Y, Nakagawa M, Yamamoto J, Luis PA, Kodaira J, Kawarasaki M, Takeda H, Sugiyama T, Asaka M. Relationship between histopathologic gastritis and mucosal microvasularity: observations with magnifying endoscopy. *Gastrointest Endosc* 2003;58:71~75

- 10 Cales P, Oberti F, Delmotte JS, Basle M, Casa C, Arnaud JP. Gastric mucosal surface in cirrhosis evaluated by magnifying endoscopy and scanning electronic microscopy. *Endoscopy* 2000;32:614-623
- 11 Tajiri H, Doi T, Endo H, Nishina T, Terao T, Hyodo I, Matsuda K, Yagi K. Routine endoscopy using a magnifying endoscope for gastric cancer diagnosis. *Endoscopy* 2002;34:772-777
- 12 Yao K, Oishi T, Matsui T, Yao T, Iwashita A. Novel magnified endoscopic findings of microvascular architecture in intramucosal gastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2002;56:279-284
- 13 Fujimura Y, Kamoi R, Iida M. Pathogenesis of aphthoid ulcers in Crohn's disease: correlative findings by magnifying colonoscopy, electron microscopy, and immunohistochemistry. *Gut* 1996;38:724-732
- 14 Matsumoto T, Kuroki F, Mizuno M, Nakamura S, Iida M. Application of magnifying chromoscopy for the assessment of severity in patients with mild to moderate ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc* 1997;46:400-405
- 15 Fujiya M, Saitoh Y, Nomura M, Maemoto A, Fujiya K, Watari J, Ashida T, Ayabe T, Obara T, Kohgo Y. Minute findings by magnifying colonoscopy are useful for the evaluation of ulcerative colitis. *Gastrointest Endosc* 2002;56:535-542
- 16 Konishi K, Kaneko K, Kurahashi T, Yamamoto T, Kushima M, Kanda A, Tajiri H, Mitamura K. A comparison of magnifying and nonmagnifying colonoscopy for diagnosis of colorectal polyps: A prospective study. *Gastrointest Endosc* 2003;57:48-53
- 17 Togashi K, Konishi F, Ishizuka T, Sato T, Senba S, Kanazawa K. Efficacy of magnifying endoscopy in the differential diagnosis of neoplastic and non-neoplastic polyps of the large bowel. *Dis Colon Rectum* 1999;42:1602-1608
- 18 Liu HH, Kudo SE, Juch JP. Pit pattern analysis by magnifying chromoendoscopy for the diagnosis of colorectal polyps. *J Formos Med Assoc* 2003;102:178-182
- 19 Tamura S, Nakajo K, Kitamura M, Kamiji I, Onishi S. Surface structure of single-gland adenoma in familial adenomatous polyposis. *Dig Dis Sci* 2002;47:2271-2274
- 20 Kajihara H, Uno Y, Ying H, Tanaka M, Munakata A. Features of cap polyposis by magnifying colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 2000;52:775-777
- 21 Mizuno M, Matsumoto T, Iida M, Shimizu M. Magnifying colonoscopic features in non-neoplastic polyps of the colorectum. *Gastrointest Endosc* 1997;46:537-541
- 22 Suzuki Y, Kobayashi M, Ishizuka K, Honma T, Hayashi S, Narisawa R, Asakura H. Inverted hyperplastic polyp diagnosed accurately by magnifying colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 2000;50:115-118
- 23 Morita T, Tamura S, Miyazaki J, Higashidani Y, Onishi S. Evaluation of endoscopic and histopathological feature of serrated adenoma of the colon. *Endoscopy* 2001;33:761-765
- 24 Kudo S, Kashida H, Tamura S, Nakajima T. The problem of "Flat" colonic adenoma. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1997;7:87-98
- 25 Kudo S, Tamura S, Nakajima T, Yamano H, Kusaka H, Watanabe H. Diagnosis of colorectal tumorous lesions by magnifying endoscopy. *Gastrointest Endosc* 1996;44:8-14
- 26 Nagata S, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F. Pit pattern diagnosis of early colorectal carcinoma by magnifying colonoscopy: clinical and histological implications. *Int J Oncol* 2002;16:927-934
- 27 Hart AR, Kudo S, Mackay EH, Mayberry JF, Atkin WS. Flat adenomas exits in asymptomatic people: important implications for colorectal cancer screening programmes. *Gut* 1998;39:229-231
- 28 Tanaka S, Haruma K, Ito M, Nagata S, Oh-e H, Hirota Y, Kunihiro M, Kitadai Y, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G. Detailed colonoscopy for detecting early superficial carcinoma: recent developments. *J Gastroenterol* 2000;35(suppl):121-125
- 29 Tung SY, Wu CS, Su MY. Magnifying colonoscopy in differentiating neoplastic from nonneoplastic colorectal lesions. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2628-2632
- 30 Matsumoto T, Hizawa K, Esaki M, Kurahara K, Mizuno M, Hirakawa K, Yao T, Iida M. Comparison of EUS and magnifying colonoscopy for assessment of small colorectal cancers. *Gastrointest Endosc* 2002;56:354-360
- 31 Kudo S, Tamegai Y, Yamano H, Imai Y, Kogure E, Kashida H. Endoscopic mucosal resection of the colon: the Japanese technique. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 2001;11:519-535

World Journal of Gastroenterology 以国际最优秀的期刊为目标

《World Journal of Gastroenterology, WJG》将完全按照国际标准办刊，从收稿到出版的管理，已完全实现市场化，以质量为本。从收稿到出版或退稿，以公正科学的态度处理每一份稿件。在学术水平和编辑质量方面以国际最优秀的期刊为目标。WJG 争取在国家、作者、读者，全体编委和社会的大力支持下，办成一份国际本专业具有突出影响的学术期刊。

• 文献综述 •

胃黏膜壁细胞研究进展

徐远溪, 王志荣, 陈锡美

徐远溪, 王志荣, 陈锡美, 同济大学附属同济医院消化内科 上海市 200065
项目负责人: 徐远溪, 200065, 上海市, 同济大学附属同济医院消化内科.
yuanxixu@hotmail.com
电话: 021-56051080-2102
收稿日期: 2003-12-23 接受日期: 2004-02-26

摘要

胃黏膜壁细胞是胃腺内一种重要的分泌细胞, 具有泌酸、产生内因子及调节胃内酸碱水平等作用, 其中尤以泌酸功能最为重要: 一方面, 组胺、乙酰胆碱(Ach)和胃泌素等促分泌因子可通过各种途径调节盐酸分泌; 另一方面, 壁细胞泌酸也与其特征性的形态学改变相关联。近年来, 又发现壁细胞还参与调控胃黏膜细胞的增生和分化。目前, 对胃壁细胞酸分泌的调节机制及其影响因素、在泌酸过程中的结构变化乃至其超微结构、电生理和对胃黏膜上皮分化调控等方面的研究均取得长足进步。

徐远溪, 王志荣, 陈锡美. 胃黏膜壁细胞研究进展. 世界华人消化杂志 2004; 12(6):1397-1401
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1397.asp>

0 引言

胃黏膜壁细胞, 亦称泌酸细胞, 位于胃腺颈部, 占胃上皮细胞总数的 30%。其主要功能为分泌盐酸, 对胃内酸碱平衡的维持有重要作用。胃壁细胞有逆 250 万倍梯度浓度分泌 H⁺ 的能力, 这是 H⁺-K⁺-ATP 酶(质子泵)作用的结果, 又与壁细胞特征性形态学改变相关联。组胺、Ach 等促分泌因子通过神经、旁分泌和内分泌途径, 介导调节盐酸的分泌, 除通过激活环腺苷酸(cAMP), 增加 Ca²⁺ 内流来刺激泌酸外, 还伴有离子通道的调节^[1-6]。随着细胞生物学、分子生物学和各种显微技术的完善, 壁细胞对胃黏膜增生分化的直接或间接调控作用日显重要。对壁细胞上述功能特点的研究, 既有助于壁细胞的体外分离和培养, 又有助于阐明消化性溃疡、胃酸缺乏症等疾病的发病机制及相关药物的研发。

1 壁细胞的分离培养及其分子生物学结构特征

1.1 壁细胞的分离和培养 胃壁细胞属高度特异的终末分化细胞, 不能进行传代培养, 且在整个生长过程中, 每日死亡率达 5-10%。因此, 建立体外培养壁细胞的方法十分必要。

陈蕾 et al^[6-7]选用♂ SD 大鼠, 剖腹取胃后, 在胃底作一 1.0 cm 小切口。将胃翻转, 使胃黏膜面朝外而浆膜面向内, 在胃幽门部结扎, 并经胃底部切口用注射

器将链霉蛋白(Pronase)注入胃袋, 注满为止。待充分水浴消化后, 离心、洗涤沉淀并制成细胞悬液, 将该悬液置于离心管最上层再次离心, 所得上悬液层即为壁细胞。分离后的壁细胞用 PBS 液制备成细胞悬液后接种到培养液中, 放入培养箱 30 min 以去除成纤维细胞, 最后把提纯的壁细胞接种至鼠尾胶原包被的盖玻片上。这种方法不但能使 Pronase 局限于浆膜层, 减轻对壁细胞的损伤, 而且黏膜面朝向浴液, 供氧充分, 无刮取黏膜时对细胞造成的机械损伤, 利于细胞的成活。经上述方法培养, 壁细胞纯度可达 80%, 成活率高达 95% 以上。

鉴于壁细胞无法传代且分离过程繁琐, Carmosino et al^[8]培养的人胃壁细胞 HGT-1 弥补了以上不足。HGT-1 具有和体内壁细胞类似的生理学特征: 能够在组胺刺激下分泌 H⁺; 用 100 μmol/L 奥美拉唑(Omeprazole)处理后能够抑制组胺诱导的胞膜顶端泌酸作用; 在 HGT-1 中检测到组胺和 Na⁺/H⁺ 交换器, 这与在胃上皮细胞和原代培养的壁细胞中发现的 NHE4 的功能性表达相一致。因此, HGT-1 细胞系或许能作为研究壁细胞泌酸调节的替代模型。

1.2 壁细胞的分子生物学特征

1.2.1 rab 家族 rabGTP 酶是 GTP 结合蛋白超家族中的一种, 已被证明与壁细胞胞内动力学和泡囊膜运输有关。壁细胞内有一系列 rabGTP 酶, 分子量 20-25 kD, 含有保守性鸟嘌呤核苷酸序列和疏水性基元。某些特殊的 rab 还与胞内分泌结构有关, 并是膜动力学的重要调节器, 其中以 rab11 较为特殊^[9-15]。

rab11 在壁细胞中大量表达^[16-19]。在兔胃壁细胞微粒体中 rab11 的主要存在形式是 rab11a, 与 H⁺-K⁺-ATP 酶共存于管状泡囊膜上, 用化学计量法推算每六个质子泵含有一个 rab11a。在壁细胞受刺激时, rab11a 和质子泵一起重分布, 即从管状泡囊移至分泌膜, 对质子泵 - 膜补充过程有一定作用。腺病毒感染细胞后产生的 rab11a 隐性突变型 rab11N124I 则起相反作用: 在未受感染的细胞中, 质子泵在胞质内大范围分布, 在受刺激时质子泵从胞质中被清除并向顶端膜迁移; 而在表达 rab11N124I 的细胞, 质子泵在受刺激时仍保持其在静息状态时的位置, 这种现象在用四环素后会被遏制, 阻止了 rab11 突变型的表达。由此, Duman et al^[20-21]证实了对 rab11 的干扰与壁细胞泌酸调控存在联系。

1.2.2 包涵素家族 包涵素(Clathrin)是泡囊外衣蛋白中最具特征的一个家族, 存在于富含质子泵的管状泡囊

上，他在壁细胞中的主要作用有：对胞内物质加以选择，使其聚集，并作为将选择后物质运送至邻近泡囊的途径；聚集其他各类蛋白质，使胞膜变形成为运输泡囊或管道。上述作用表明包涵素可能与质子泵在分泌膜的恢复以及管状泡囊的生物起源和持续再构建有关^[22-30]。

1.3 壁细胞的结构特征

1.3.1 壁细胞超微结构分析 Sawaguchi et al^[31-32]设计的高压冷冻保存原代培养细胞可观察到极佳的壁细胞超微结构。将分离的壁细胞在覆盖有 Matrigel 胶的铝盘上培养，随后进行高压冷冻保存。细胞的超微结构如高尔基体、微粒体等与传统化学固定法相比保存得更好，微绒毛和胞质中的肌纤维细丝也能清晰显示。运用上述方法，可探讨壁细胞在消化性溃疡发病机制中的形态学改变。经胃镜取材组织病理学确诊的消化性溃疡患者和正常人选择同一地区、组织作对照研究^[33-35]。经体视学分析及超微结构观察，结果发现两组间壁细胞平均剖面直径、平均剖面积、平均体积、体积密度和数量均无显著差异。电镜下胃溃疡患者壁细胞内微管泡系统少且散乱，线粒体稀疏；十二指肠溃疡患者胞内则有大量微管泡系统，线粒体增多明显；对照组微管泡系统丰富，线粒体嵴呈板状。由此可见，十二指肠溃疡患者的高胃酸状态实与壁细胞泌酸功能的增强有关，而非壁细胞总数增加；与正常人相比胃溃疡患者则无明显变化。

1.3.2 壁细胞氯离子通道研究 研究表明，壁细胞氯离子通道有三种重要生理学特点：(1)在控制膜电位过程中的管家作用；(2)NO/cGMP蛋白激酶途径介导的氯离子通道的开放能防御乙醇诱导的损伤；(3)可被GTP结合蛋白介导的产生于胞内的超氧阴离子所抑制^[36-40]。

壁细胞共有两种氯离子通道，即分泌膜氯离子通道和基底膜氯离子通道。通常采用细胞贴附式即膜内面向外式和全细胞记录法来研究这两种通道。前者在给予组胺 10^{-4} mol/L 后，可记录到一种电压依赖性氯离子电流。该通道随刺激电压绝对值增加开放频率亦增高，其改变呈不对称抛物线型，该通道还参与胃酸分泌，对 Na^+ 、 K^+ 通透性极低。全细胞记录法则用来观察基底膜氯离子通道，其电流-电压曲线为过原点的直线，在细胞内外等氯离子浓度时无整流特性，基底膜电位在维持膜稳定中起重要作用。由于细胞外液酸化可抑制氯电流，而具细胞保护作用的 PGE₂ 可增强该电流，提示此通道与细胞保护机制有关。

2 壁细胞泌酸功能

2.1 壁细胞泌酸调节机制

2.1.1 受体机制 已知壁细胞底侧膜上有胃泌素、Ach 和组胺三种激动型受体，他们与配体结合后，能激活胞内第二信使，使后者浓度发生改变，进而激活蛋白激酶；同时胞内 Ca^{2+} 亦增加，最终经放大效应促进胃酸分泌。

胃泌素和Ach受体引起泌酸的机制与受体后信号传递有关，即当胃泌素和Ach与各自受体结合后导致膜内

分子水平变化。胃泌素使壁细胞膜磷脂水解，由磷脂酰二磷酸肌醇(PIP₂)分解成三磷酸肌醇(IP₃)和二酰甘油(DG)。IP₃分1、2、3三种亚型，广泛分布于胞液和管状泡囊的微粒体中，他通过促进胞内钙库释放 Ca^{2+} ，增加胞内游离 Ca^{2+} 浓度。在 IP₃ 诱导 Ca^{2+} 由胞外入胞的同时，胃泌素又能刺激 IP₃，使其含量迅速上升且持续增加，故具有双相动力学效应^[41]。DG 是钙离子依赖蛋白激酶(PKC)特异性激动剂，使 PKC 从胞质移至质膜，Ach 也能使 PKC 活化，诱导胞内 Ca^{2+} 浓度升高^[42-43]。不管何种受体途径，最终均启动 Ca^{2+} 信号系统即 Ca^{2+} -磷脂依赖性激酶途径，激活质子泵促进酸分泌^[44]。

组胺受体与其配体结合后，通过 cAMP-PKA 途径起作用。组胺和胆碱能受体 M₃ 亚型结合后，使 AMP 在酰胺环化酶(AC)的作用下变为 cAMP，cAMP 进而发挥两大作用：活化钙泵，即使在 cAMP 信号减弱时壁细胞基底膜仍可有 Ca^{2+} 浓度升高，而期间产生的能量为质子泵泌 H^+ 提供动力；活化 cAMP 依赖蛋白激酶(PKA)，后者进而促使碳酸酐酶活化，形成碳酸并离解 H^+ 或使蛋白磷酸化，直接激活质子泵促进酸分泌^[45]。

2.1.2 生理学机制 壁细胞泌酸通过含质子泵的泡囊运动来控制，而泡囊之所以能膨胀收缩自如，主要依赖于壁细胞内的肌动蛋白(actin)。壁细胞中 90% 的肌动蛋白是 F- 肌动蛋白。在静息态壁细胞中，F- 肌动蛋白和 G- 肌动蛋白保持稳定的 F/G 比例关系，该比例不因壁细胞被激活而发生改变。F- 肌动蛋白聚合成多聚体后，形成细肌丝主干，从而影响和控制蛋白质间的相互作用，控制壁细胞顶端膜微绒毛的伸缩，达到控制泡囊运动、使质子泵迁移的目的。有学者从红海海绵中提取毒素 LatA(Latrunculins A)，他可以抑制上述作用，但并不直接抑制 F- 肌动蛋白的聚合，而主要针对游离肌动蛋白单体，将其从多聚化位点分隔开或与 G- 肌动蛋白按 1:1 比例结合成复合体阻止肌丝形成，但不影响肌动蛋白更新速率^[46-50]。

2.1.3 膜运输机制 壁细胞受促分泌因素刺激时会发生形态学上的变化，以及酶的位置、活性和离子通道都会发生改变。原来萎缩的分泌小管发生膨胀，同时含质子泵的管状泡囊消失，微绒毛内的肌动蛋白细丝介导分泌小管和管状泡囊的融合，质子泵被转移至膜顶端， H^+ 泵出和 K^+ 交换，从而达到分泌盐酸的目的，这就是经典的膜运输(循环)学说。

所谓膜运输学说，其本质是壁细胞酸分泌过程中分泌膜上受促分泌因素调节的质子泵的再循环。在泌酸过程中质子泵的运输及分泌膜的重塑与泡囊转运机制和细胞骨架的协调作用有关。壁细胞被激活时，分泌膜对 K^+ 有高通透性，使 K^+ 能经分泌膜再循环，同时也为 $\text{H}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶提供胞外 K^+ ；在未激活或静息态壁细胞中，质子泵滞留在胞液内的管状泡囊膜上，该膜对 K^+ 通透性较低，这可避免静息态时产生多余的酸。在受刺

激后, 壁细胞分泌膜表面积扩大 5~10 倍, 而扩大的面积在数量上相当于胞液中管状泡囊缩小时的面积。Hirst et al^[51~53]发现壁细胞内盐酸积聚后, 萎陷或卷曲的管状泡囊会被吞噬, 从而使分泌膜面积相应增长, 被内吞的管状泡囊上富含的质子泵会融入分泌膜, 泌 H⁺后又离开分泌膜, 回到胞质中转归为静息态。近来对壁细胞的分离培养为泌酸的再循环理论和渗透性膨胀提供了解释。在培养基中, 壁细胞丧失或改变其极性, 分泌膜被内吞形成一系列包涵体(VACs), 而底侧膜则成为环绕于胞质的膜。在非分泌壁细胞中, F-肌动蛋白位于 VACs 和底侧膜上, 而质子泵遍布于胞质内的管状泡囊上。受刺激时, 质子泵同 F-肌动蛋白一起定居于 VACs 上。即便这种渗透性吞饮作用为质子泵阻滞剂(PPI)所阻断, 壁细胞仍然会出现胞内质子泵的清除并向 VACs 移动。以上表明在泌酸的膜运输理论中, 富含质子泵的管状泡囊迁移并播散至分泌膜, 而非后者向胞质内的延伸^[54~55]。

3 壁细胞和胃黏膜细胞增生分化调控的关系

3.1 细胞因子和壁细胞增生 Neu et al^[56~59]发现在幽门螺旋杆菌(Hp)引起的慢性胃炎过程中, 以 TNF- α 为主的细胞因子与壁细胞的程序化死亡有关。在大鼠壁细胞的培养液中, 加入 10 ng/mL 浓度的 TNF- α 可诱导大鼠胃壁细胞的凋亡, 且凋亡速度增加 2.6 倍。TNF- α 的促凋亡作用可为各类 NF- κ B 抑制剂、NOS 抑制剂所终止。对凋亡细胞下游信号传导通路的检测发现 TNF- α 能介导诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达, TNF- α 对壁细胞的作用是导致 Hp 感染后慢性胃黏膜萎缩和胃酸缺乏的原因之一。与之相反, 间叶转录因子 Fkh6 则是壁细胞衍变分化所必需的, 含此因子的壁细胞具有分化良好的胞内管道和线粒体, 对泌酸刺激不敏感。Fkh6 在壁细胞通过上皮-间叶交互作用而分化的过程中起重要作用^[60~61]。

3.2 壁细胞对胃黏膜细胞增生分化的调控 胃黏膜泌酸的结构功能单位为胃小凹或胃陷窝(pit region), 内含壁细胞、主细胞、内分泌细胞和隐窝细胞等。各类细胞更新速率长短不一, 如壁细胞 2 mo, 主细胞为 200 d。以壁细胞为调控因素, 观察其他各类细胞的更新代谢情况, 已成为新的研究方向。

加工前体蛋白质的费林蛋白酶(furin)位于陷窝区的上皮细胞, 他能将多种生长和分化相关蛋白转化成活性形式。Kamimura et al^[62~65]用免疫染色的方法检测鼠胃黏膜细胞, 发现陷窝区内的壁细胞 furin 呈阳性表达, 无转化生长因子 α (TGF- α)着色, 但为 TGF- α^+ 的表面黏膜细胞(GSM)包围。TGF- α 以旁分泌形式从壁细胞分泌, 当 GSM 接触壁细胞时, 二者会通过细胞间相互作用交换重要信号, 前者可出现 DNA 合成, 表明 TGF- α 从 GSM 传导至壁细胞后, 再刺激 GSM 生长。壁细胞在维持黏膜增生中起轴心作用, 在将壁细胞剔除后鼠

黏膜有萎缩性胃炎的表现。总之, 壁细胞通过 furin 介导, 以 TGF- α 和 EGFR 作用于黏膜上皮细胞, 促其更新, 从而维持隐窝区的细胞结构层次。

Stewart et al^[66]在壁细胞 H⁺-K⁺-ATP 酶 β 亚单位调控序列的控制下, 对携带有温度敏感突变型 SV40 T 抗原(SV40tsA58)的转基因小鼠进行传代, 建立了三种 H⁺-K⁺-ATP 酶 β -tsA58 系小鼠: 218、224 和 228。三系小鼠均出现胃黏膜肥厚, 上皮细胞增生, 并在 37 °C SV40 T 抗原部分被激活。免疫荧光及电镜显示在 218、224 两系中成熟壁细胞和酶原细胞均缺失, 胃腺中一种小型未分化细胞是主要细胞类型; 而在 228 系中可见部分成熟壁细胞、比例不断增长的未分化细胞和很少见的前壁细胞, 33 °C 为最适培养温度。SV40T 抗原基因转染的胃上皮细胞也能在培养基中存活 6 wk 以上, 并且当温度升至 39 °C 时, 会出现类似干细胞的分化特性, 有转化为各类胃黏膜细胞的倾向。因此, 该品系小鼠的建立提示壁细胞携带的 SV40tsA58 具有诱导自身和上皮细胞分化的作用。

H⁺-K⁺-ATP 酶是壁细胞正常生长所必需的, 在壁细胞参与胃黏膜细胞生长调控方面也起重要作用。缺乏 H⁺-K⁺-ATP 酶 β 亚单位的小鼠, 胃泌素过量产生, 每个胃小区未成熟细胞数增长 3.1 倍, 胃黏膜上皮增生肥厚, 壁细胞分泌膜出现异常而持续泌酸^[67], 而且在最适培养温度下壁细胞会有 H⁺-K⁺-ATP 酶 β 亚单位急剧增加并出现分化趋势。这些证据表明 H⁺-K⁺-ATP 酶的存在保证了内环境的稳定, 限制了未成熟细胞向终末态上皮细胞转化的数量, 并可使二者间比例关系保持恒定。

总之, 胃壁细胞作为胃内泌酸的关键细胞, 与胃内酸碱度的维持、离子通道研究及神经体液的相互调节都密切相关。在泌酸过程中, 壁细胞通过其表面的各类受体及胞内一系列形态学改变来完成。离体壁细胞培养成功, 对于其超微结构的深入研究, 有益于阐明其与消化疾病发病机制的关系。同时, 壁细胞调控胃上皮细胞增生分化为胃黏膜干细胞研究提供了思路, 如肠型早期胃癌中的局灶性壁细胞分化等^[68]。当然, 有关壁细胞的起源, 即壁细胞是否源于 H⁺-K⁺-ATP 酶基因从远古微生物向高等生物的衍变^[69~70]; 泌酸时壁细胞胞质中线粒体构成网状组织, 该组织对线粒体功能有何意义等问题仍亟待解决。

4 参考文献

- Chen D, Zhao CM, Hakanson R, Samuelson LC, Rehfeld JF, Friis-Hansen L. Altered control of gastric acid secretion in gastrin-cholecystokinin double mutant mice. *Gastroenterology* 2004;126:476~487
- Okabe S, Fujishita T, Jinbo K. New target for the inhibitors of gastric acid secretion. Inhibition of myosin and actin activities via the apical membrane of parietal cells in dogs. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2003;122(Suppl):74P~77P
- Sawaguchi A, McDonald KL, Forte JG. High-pressure freezing of isolated gastric glands provides new insight into the

- 4 fine structure and subcellular localization of H⁺/K⁺-ATPase
in gastric parietal cells. *J Histochem Cytochem* 2004;52:77-86
- 5 Malinowska DH, Sherry AM, Tewari KP, Cappoletti J. Gastric parietal cell secretory membrane contains PKA- and acid-activated Kir2.1 K⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;
286:C495-506
- 6 Sachs G. Physiology of the parietal cell and therapeutic implications. *Pharmacotherapy* 2003;23(10 Pt 2):68S-73S
陈蕾, 黄威权, 孙德德, 吕宝真, 蒲若蕾. 大鼠胃壁细胞的分离及培养. 第四军医大学学报 2002;23:769-771
- 7 李晓波, 钱家鸣, 陈原稼, 陈元方. 兰索拉唑对离体壁细胞酸分泌的影响. 中华消化杂志 2001;21:209-211
- 8 Carmosino M, Procino G, Casavola V, Svelto M, Valenti G. The cultured human gastric cells HGT-1 express the principal transporters involved in acid secretion. *Pflugers Arch* 2000;
440:871-880
- 9 Goldenring JR, Tang LH, Modlin IM. Small GTP-binding proteins in parietal cells: candidate modulators of parietal cell membrane dynamics. *Yale J Biol Med* 1992;65:597-605
- 10 Theriault C, Rochdi MD, Parent JL. Role of the Rab11-Associated Intracellular Pool of Receptors Formed by Constitutive Endocytosis of the beta Isoform of the Thromboxane A₂ Receptor (TPbeta). *Biochemistry* 2004;43:5600-5607
- 11 Fan GH, Lapierre LA, Goldenring JR, Sai J, Richmond A. Rab11-family interacting protein 2 and myosin Vb are required for CXCR2 recycling and receptor-mediated chemotaxis. *Mol Biol Cell* 2004;15:2456-2469
- 12 Bartz R, Benzing C, Ullrich O. Reconstitution of vesicular transport to Rab11-positive recycling endosomes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312:663-669
- 13 Pelissier A, Chauvin JP, Lecuit T. Trafficking through Rab11 endosomes is required for cellularization during Drosophila embryogenesis. *Curr Biol* 2003;13:1848-1857
- 14 McGugan GC Jr, Temesvari LA. Characterization of a Rab11-like GTPase, EhRab11, of Entamoeba histolytica. *Mol Biochem Parasitol* 2003;129:137-146
- 15 Wallace DM, Lindsay AJ, Hendrick AG, McCaffrey MW. Rab11-FIP4 interacts with Rab11 in a GTP-dependent manner and its overexpression condenses the Rab11 positive compartment in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299:770-779
- 16 Calhoun BC, Goldenring JR. Rab proteins in gastric parietal cells: evidence for the membrane recycling hypothesis. *Yale J Biol Med* 1996;69:1-8
- 17 Meyers JM, Prekeris R. Formation of mutually exclusive Rab11 complexes with members of the family of Rab11-interacting proteins regulates Rab11 endocytic targeting and function. *J Biol Chem* 2002;277:49003-49010
- 18 Lindsay AJ, Hendrick AG, Cantalupo G, Senic-Matuglia F, Goud B, Bucci C, McCaffrey MW. Rab coupling protein (RCP), a novel Rab4 and Rab11 effector protein. *J Biol Chem* 2002;277:12190-12199
- 19 Pasqualato S, Senic-Matuglia F, Renault L, Goud B, Salamero J, Cherfils J. The structural GDP/GTP cycle of Rab11 reveals a novel interface involved in the dynamics of recycling endosomes. *J Biol Chem* 2004;279:11480-11488
- 20 Duman JG, Tyagarajan K, Kolsi MS, Moore HP, Forte JG. Expression of rab11a N124I in gastric parietal cells inhibits stimulatory recruitment of the H⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol* 1999;277(3Pt1):C361-372
- 21 Agnew BJ, Duman JG, Watson CL, Coling DE, Forte JG. Cytological transformations associated with parietal cell stimulation: critical steps in the activation cascade. *J Cell Sci* 1999;112(Pt16):2639-2646
- 22 Okamoto CT, Jeng YY. An immunologically distinct beta-adaptin on tubulovesicles of gastric oxytic cells. *Am J Physiol* 1998;275(5Pt1):C1323-1329
- 23 Bennett EM, Chen CY, Engqvist-Goldstein AE, Drubin DG, Brodsky FM. Clathrin hub expression dissociates the actin-binding protein Hip1R from coated pits and disrupts their alignment with the actin cytoskeleton. *Traffic* 2001;2:851-858
- 24 Okamoto CT, Karam SM, Jeng YY, Forte JG, Goldenring JR. Identification of clathrin and clathrin adaptors on tubulovesicles of gastric acid secretory (oxytic) cells. *Am J Physiol* 1998;274(4Pt1):C1017-1029
- 25 Baig AH, Swords FM, Szaszak M, King PJ, Hunyady L, Clark AJ. Agonist activated adrenocorticotropin receptor internalizes via a clathrin-mediated G protein receptor kinase dependent mechanism. *Endocr Res* 2002;28:281-289
- 26 Kalthoff C, Groos S, Kohl R, Mahrhold S, Ungewickell EJ. Clint: a novel clathrin-binding ENTH-domain protein at the Golgi. *Mol Biol Cell* 2002;13:4060-4073
- 27 Chen CY, Reese ML, Hwang PK, Ota N, Agard D, Brodsky FM. Clathrin light and heavy chain interface: alpha-helix binding superhelix loops via critical tryptophans. *EMBO J* 2002; 21:6072-6082
- 28 Blanpied TA, Scott DB, Ehlers MD. Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron* 2002;36:435-449
- 29 Gall WE, Geething NC, Hua Z, Ingram MF, Liu K, Chen SI, Graham TR. Drs2p-dependent formation of exocytic clathrin-coated vesicles in vivo. *Curr Biol* 2002;12:1623-1627
- 30 Rodionov DG, Honing S, Silye A, Kongsvik TL, von Figura K, Bakke O. Structural requirements for interactions between leucine-sorting signals and clathrin-associated adaptor protein complex AP3. *J Biol Chem* 2002;277:47436-47443
- 31 Sawaguchi A, McDonald KL, Karvar S, Forte JG. A new approach for high-pressure freezing of primary culture cells: the fine structure and stimulation-associated transformation of cultured rabbit gastric parietal cells. *J Microsc* 2002;208(Pt 3):158-166
- 32 Sawaguchi A, McDonald KL, Forte JG. High-pressure freezing of isolated gastric glands provides new insight into the fine structure and subcellular localization of H⁺/K⁺-ATPase in gastric parietal cells. *J Histochem Cytochem* 2004;52:77-86
- 33 杨守亭, 李敬山, 马景, 刘德俊, 马骥. 消化性溃疡胃粘膜壁细胞体视学研究及超微结构分析. 医师进修杂志 1998;21:251-252
- 34 李兆申, 潘先保, 崔忠敏, 段义民, 许国铭. 应激对胃粘膜表面上皮层抗酸形态屏障及壁细胞超微结构的影响. 解放军医学杂志 1999;24:401-403
- 35 李玉梅, 邹晓平, 李兆申, 彭贵勇, 潘先保, 屠振兴, 房殿春, 许国铭. 应激性溃疡时大鼠胃壁细胞功能及超微结构的动态变化. 中国病理生理杂志 2003;19:1058-1061
- 36 Sakai H. A cytoprotective chloride channel in gastric parietal cells. *Yakugaku Zasshi* 1999;119:584-596
- 37 Coelho RR, Souza EP, Soares PM, Meireles AV, Santos GC, Scarparo HC, Assreuy AM, Criddle DN. Effects of chloride channel blockers on hypotonicity-induced contractions of the rat trachea. *Br J Pharmacol* 2004;141:367-373
- 38 Gong X, Linsdell P. Mutation-induced blocker permeability and multiton block of the CFTR chloride channel pore. *J Gen Physiol* 2003;122:673-687
- 39 Steendahl J, Holstein-Rathlou NH, Sorensen CM, Salomonsson M. Effects of chloride channel blockers on rat renal vascular responses to angiotensin II and norepinephrine. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F323-330
- 40 Bernucci L, Umana F, Llanos P, Riquelme G. Large chloride channel from pre-eclamptic human placenta. *Placenta* 2003; 24:895-903
- 41 Muto Y, Nagao T, Yamada M, Mikoshiba K, Urushidani T. A proposed mechanism for the potentiation of cAMP-mediated acid secretion by carbachol. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280:C155-165
- 42 Pan QS, Fang ZP, Huang FJ. Identification, localization and morphology of APUD cells in gastroenteropancreatic system of stomach-containing teleosts. *World J Gastroenterol* 2000;6: 842-847
- 43 Faber ES, Sah P. Calcium-activated potassium channels: multiple contributions to neuronal function. *Neuroscientist* 2003; 9:181-194
- 44 Zeng N, Athmann C, Kang T, Lyu RM, Walsh JH, Ohning GV, Sachs G, Pisegna JR. PACAP type I receptor activation regulates ECL cells and gastric acid secretion. *J Clin Invest* 1999; 104:1383-1391
- 45 Athmann C, Zeng N, Scott DR, Sachs G. Regulation of parietal cell calcium signaling in gastric glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G1048-1058
- 46 Ammar DA, Nguyen PN, Forte JG. Functionally distinct pools

- of actin in secretory cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;281:C407-417
- 47 Li C, Cheng Y, Gutmann DA, Mangoura D. Differential localization of the neurofibromatosis 1 (NF1) gene product, neurofibromin, with the F-actin or microtubule cytoskeleton during differentiation of telencephalic neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 2001;130:231-248
- 48 Cintio O, Adami R, Choquet D, Grazi E. On the elastic properties of tetramethylrhodamine F-actin. *Biophys Chem* 2001;92:201-207
- 49 Orlova A, Galkin VE, VanLoock MS, Kim E, Shvetsov A, Reisler E, Egelman EH. Probing the structure of F-actin: cross-links constrain atomic models and modify actin dynamics. *J Mol Biol* 2001;312:95-106
- 50 Jahraus A, Egeberg M, Hinner B, Habermann A, Sackman E, Pralle A, Faulstich H, Rybin V, Defacque H, Griffiths G. ATP-dependent membrane assembly of F-actin facilitates membrane fusion. *Mol Biol Cell* 2001;12:155-170
- 51 Hirst BH. Parietal cell membrane trafficking. Focus on "Expression of rab11a N124I in gastric parietal cells inhibits stimulatory recruitment of the H⁺-K⁺-ATPase". *Am J Physiol* 1999;277(3 Pt 1):C359-360
- 52 Watson RT, Kanzaki M, Pessin JE. Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr Rev* 2004;25:177-204
- 53 Strickland LI, Burgess DR. Pathways for membrane trafficking during cytokinesis. *Trends Cell Biol* 2004;14:115-118
- 54 Okamoto CT, Forte JG. Vesicular trafficking machinery, the actin cytoskeleton, and H⁺-K⁺-ATPase recycling in the gastric parietal cell. *J Physiol* 2001;532(Pt 2):287-296
- 55 Okamoto CT, Li R, Zhang Z, Jeng YY, Chew CS. Regulation of protein and vesicle trafficking at the apical membrane of epithelial cells. *J Control Release* 2002;78:35-41
- 56 Neu B, Puschmann AJ, Mayerhofer A, Hutzler P, Grossmann J, Lippl F, Scheppe W, Prinz C. TNF-alpha induces apoptosis of parietal cells. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1755-1760
- 57 Sakumoto R, Shibaya M, Okuda K. Tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) inhibits progesterone and estradiol-17beta production from cultured granulosa cells: presence of TNFalpha receptors in bovine granulosa and theca cells. *J Reprod Dev* 2003;49:441-449
- 58 Satici A, Guzey M, Dogan Z, Kilic A. Relationship between Tear TNF-alpha, TGF-beta1, and EGF levels and severity of conjunctival cicatrization in patients with inactive trachoma. *Ophthalmic Res* 2003;35:301-305
- 59 Azzolina A, Bongiovanni A, Lampiasi N. Substance P induces TNF-alpha and IL-6 production through NF kappa B in peritoneal mast cells. *Biochim Biophys Acta* 2003;1643:75-83
- 60 Fukamachi H, Fukuda K, Suzuki M, Furumoto T, Ichinose M, Shimizu S, Tsuchiya S, Horie S, Suzuki Y, Saito Y, Watanabe K, Taniguchi M, Koseki H. Mesenchymal transcription factor Fkh6 is essential for the development and differentiation of parietal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:1069-1076
- 61 Kaestner KH, Silberg DG, Traber PG, Schutz G. The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation. *Genes Dev* 1997;11:1583-1595
- 62 Kamimura H, Konda Y, Yokota H, Takenoshita S, Nagamachi Y, Kuwano H, Takeuchi T. Kex2 family endoprotease furin is expressed specifically in pit-region parietal cells of the rat gastric mucosa. *Am J Physiol* 1999;277(1Pt1):G183-190
- 63 Henrich S, Cameron A, Bourenkov GP, Kiefersauer R, Huber R, Lindberg I, Bode W, Than ME. The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol* 2003;10:520-526
- 64 Wu C, Wu F, Pan J, Morser J, Wu Q. Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide. *J Biol Chem* 2003;278:25847-25852
- 65 Mayer G, Boileau G, Bendayan M. Furin interacts with proMT1-MMP and integrin alphaV at specialized domains of renal cell plasma membrane. *J Cell Sci* 2003;116(Pt9):1763-1773
- 66 Stewart LA, van Driel IR, Gleeson PA. Perturbation of gastric mucosa in mice expressing the temperature-sensitive mutant of SV40 large T antigen. Potential for establishment of an immortalised parietal cell line. *Eur J Cell Biol* 2002;81:281-293
- 67 Franic TV, Judd LM, Robinson D, Barrett SP, Scarff KL, Gleeson PA, Samuelson LC, Van Driel IR. Regulation of gastric epithelial cell development revealed in H(+)/K(+)-ATPase beta-subunit- and gastrin-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G1502-1511
- 68 Caruso RA, Fabiano V, Rigoli L, Inferrera A. Focal parietal cell differentiation in a well-differentiated (intestinal-type) early gastric cancer. *Ultrastruct Pathol* 2000;24:417-422
- 69 Okabe S. Hypothesis—origin of parietal cells: transfer of the H⁺K⁺-ATPase gene from parasitic microorganisms to Cnidaria? *Chin J Physiol* 1999;42:121-128
- 70 Armando Sanchez J, Lasker HR, Taylor DJ. Phylogenetic analyses among octocorals (Cnidaria): mitochondrial and nuclear DNA sequences (lsu-rRNA, 16S and ssu-rRNA, 18S) support two convergent clades of branching gorgonians. *Mol Phylogenet Evol* 2003;29:31-42

• 文献综述 •

食管胸内吻合口瘘及处理方法

刘 源, 官泳松

刘 源, 官泳松, 四川大学华西医院放射科 四川省成都市 610041
项目负责人: 官泳松, 610041, 四川省成都市国学巷, 四川大学华西医院放射科. yongsongguan@yahoo.com
电话: 028-85421008 传真: 028-85421008
收稿日期: 2004-02-11 接受日期: 2004-03-13

摘要

食管吻合口瘘的发生率、死亡率较高, 分别为 3.5-27% 和 28.5-71%。吻合口瘘形成后, 腐蚀性液体经瘘口进入纵隔或胸腔, 造成腐蚀性损伤和严重感染, 并出现全身症状, 甚至多器官功能衰竭。食管的解剖特点、手术操作不当、患者自身不利因素等原因常妨碍吻合口愈合。可采用包括改进吻合技术等措施降低瘘的发生。术后 3-8 d 应常规用水溶性造影剂或硫酸钡行吻合口造影, 以早期发现吻合口瘘。尚无统一的治疗方案处理食管吻合口瘘。一般认为再手术适用于技术失误造成的早期瘘, 而包括引流在内的保守治疗对于症状轻微或感染广泛的瘘均有较好的效果。此外, 金属内支架、内镜也得到较多应用, 收到很好效果。期待今后进一步研究, 以提高食管吻合口瘘的治疗效果, 降低并发症的发生。

刘源, 官泳松. 食管胸内吻合口瘘及处理方法. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1402-1404
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1402.asp>

0 引言

因恶性肿瘤行食管、胃切除术后发生的食管吻合口瘘(esophageal anastomotic leak, EAL)是术后严重的并发症, 也是患者术后死亡和影响患者生存质量的主要原因之一^[1-2]。国外文献[2-3]报道 EAL 的发生率为 3.5-27%, 死亡率达 60% 左右^[4-5], 国内资料显示 EAL 的发生率和死亡率分别为 2.1-11.6% 和 28.5-71%^[6]。由于其发生率、死亡率较高, 长期以来, 一直受到国内外学者重视, 有关 EAL 的影响因素、处理方法也一直在探讨之中。

1 食管吻合口瘘的病理、影响因素

1.1 食管吻合口瘘的病理 恶性肿瘤切除后, 残余的肿瘤组织复发, 侵犯食管壁全层, 造成组织坏死、破溃并形成瘘道, 可继发感染; 吻合口组织也可由于食管游离范围过大等原因, 出现吻合口缺血坏死, 表现为瘘道、炎症、肉芽组织形成^[7]。出现吻合口瘘后, 来自口腔含厌氧菌的唾液, 酸度很高的胃液及胃内容物在胸膜腔负压作用下, 较易经瘘道进入纵隔, 致纵隔感染和腐蚀性损伤; 若穿破纵隔胸膜进入胸腔, 则引起胸腔内广泛化脓性炎症、胸腔脓肿。这些炎症迅速引起机体反应,

表现为体温升高, 心率增快, 甚至出现中毒性休克和多器官功能衰竭^[4]。

1.2 影响吻合口愈合的因素 食管壁无浆膜层而不同于消化道的其他部位, 因此缺少浆膜层中的弹性纤维、胶原纤维的保护, 容易损伤。在后纵隔中, 食管上段偏左, 中段偏右, 下段又偏左, 因而中段仅被右侧胸膜覆盖, 下段被左侧胸膜覆盖, 周围没有软组织支持, 加上正常胸膜腔内压为负值, 这些也是食管易于损伤的因素^[8]。手术过程中吻合技术运用不当、吻合端游离范围过大、吻合口缺血是吻合口瘘的主要原因^[8]。另外, 术前控制、预防感染, 纠正营养不良, 避免放化疗影响和其他围手术期不利因素, 均有利于吻合口愈合^[8]。术前低蛋白血症($P = 0.005$)、术中采用连续缝合($P = 0.029$)、术中大量失血($P = 0.038$)、术后胃排空延迟($P = 0.045$)均不利于吻合口愈合^[9]。Isomura et al^[10]报道经导管栓塞 34 例患者的胃左、胃右、脾动脉, 仅由胃网膜右动脉单独供血, 使胃的血供重新分配, 术前胃组织血供(tissue blood flow, TBF)仅降低 27.5%, 显著低于未栓塞患者(68.9%)($P < 0.005$), 有助于防止术后出现食管胃吻合口瘘。机械吻合较手工吻合发生瘘的机率小, 用移植大网膜包裹吻合口能有效预防食管主动脉瘘的出现^[11]。Dan et al^[8]介绍的一种新型的三层漏斗状吻合技术(three-layer-funnel-shaped esophagogastric anastomosis, TLFEA), 能保证吻合口组织血供, 术后仅 1.7%(1/58)出现瘘, 显著降低了吻合口瘘的发生。

2 食管吻合口瘘的诊断方法

术后患者出现体温升高、脉搏增快、胸痛、呼吸困难等中毒症状, 胸片和/或 CT 提示液气胸和/或吻合口周围脓肿征象, 胸腔穿刺抽出浑浊臭味液体、食物碎渣或经口注入的美蓝, 可明确诊断。

由于存在术后无临床症状瘘以及经口进食加重瘘的发展, 通常术后早期(3-8 d)在进食流质以前, 所有患者应常规行水溶性造影剂造影^[11], 以便早期发现吻合口瘘, 使患者有再次手术修补的机会, 并避免恢复进食后加重吻合口瘘。如果水溶性造影剂未能发现瘘, 应行钡剂造影。因为较浓稠的钡剂能清楚显示吻合口区域, 容易发现微小的吻合口瘘。Tanomkiat et al^[12]用水溶性造影剂对 114 例食管吻合口进行造影, 然后用钡剂对造影为阴性的患者(91 例)再次造影, 发现 15.3%(14/91)患者造影阳性, 外漏造影剂体积在 0.06-0.53 cm³ 间(平均 0.18 cm³)。这 14 例中, 仅有 3 例出现瘘的临床症状。在

随后的 6 mo 的观察中, 以及在 Gollub et al^[13]的 12 例钡剂造影的平均 226 d (7-448 d) 观察中, 无纵隔炎、残留钡剂影响诊治等异常出现。

3 食管吻合口瘘的处理方法

由于已有文献报道的病例数量小, 吻合口瘘的情况各不相同, 各种处理方法的效果报道不一, 难以进行统计学上的横向比较, 因而对食管胸内吻合口瘘的处理没有统一认识^[11, 14-15]。治疗方法包括再手术、保守治疗、内镜、支架等。治愈标准应包括脓毒血症消退、胸腔引流量下降、食管造影检查证实瘘口愈合^[15-16]。

通常, 一般术后早期由吻合技术原因造成的、不伴管壁坏死的瘘, 是再手术较好的适应证^[11]。其手术方法包括单纯修补、带蒂的肌瓣或网膜修补、切除吻合口再次行吻合术等。如果由于管壁坏死而致瘘并有广泛纵隔感染, 再手术涉及改善引流, 拆开吻合口, 行胃造口术和颈段食管造口术^[11]。由于手术复杂, 增加了后期重建的风险, 这种情况下手术与否存在分歧。有学者认为只要瘘的后果不严重, 应行保守治疗, 除非出现多器官功能衰竭而急需手术^[11, 17]。另有学者主张再手术^[18], 但尽管积极手术, 死亡率仍很高(90%)^[16]。因而, 当患者情况危重, 无法承受再手术治疗, 可运用充分引流脓胸和/或纵隔脓肿、静脉或胃肠道高营养、大剂量抗生素、加强呼吸道护理、预防肺部感染等保守治疗措施, 以促进吻合口瘘愈合。利用介入方法能准确穿刺引流吻合口瘘和纵隔脓肿, 有助于控制败血症和防止导致严重后果的心包、主动脉、气管、肺内管道瘘的出现^[16]。同样, 保守治疗也广泛用于微小的或无症状瘘^[4, 19]。Sauvanet et al^[11]的 38 例瘘中 37 例接受保守治疗, 37 例中 4 例后期接受手术治疗。无症状的 11 例瘘全部封堵, 有症状的 27 例中的 9 例死亡, 取得较好效果。Lang et al^[20]报道分别对 83 例食管小肠吻合口瘘患者中的 25 例行再次手术治疗(包括吻合口再缝合和脓肿引流), 其余 58 例行保守治疗, 结果再手术治疗患者中 64%(16/25)死亡, 而行保守治疗患者中 19%(11/58)死亡, 认为采用保守治疗较为现实, 再手术有较高死亡率, 应在保守治疗无效后考虑。

自 1990 年代初, Song et al^[21]将自膨式金属内支架(self-expandable metallic stent, SEMS) 应用于食管疾病以来, 带膜支架在治疗食管吻合口瘘方面有了较多应用, 有助于降低死亡率, 利于瘘口愈合, 减少费用和住院时间, 不失为积极有效的治疗措施^[15]。当支架在透视或内镜引导下置入管腔预定位置释放后, 张开的带膜支架撑住管壁, 封堵瘘口, 阻断了腐蚀性液体的外漏通道; 即使支架与管壁贴附不紧密, 由于支架的存在, 也可引导流经的液体经支架通过吻合口远端, 避免经吻合口外漏, 从而促使吻合口愈合^[15]。Roy-Choudhury et al^[15]对 14 例有症状的恶性食管胃吻合口瘘患者放置了支架, 技术上全部获得成功, 术后加以静脉和/或胃肠道

高营养。术后瘘口封堵率 100%, 92.8%(13/14)患者瘘口在平均 6 d 中临床治愈, 1 例于术后 135 d 死亡, 14 例患者平均生存期 11 mo, 并发症包括 5 人次食物堵塞需内镜取出, 1 例出现支架所致的上消化道出血。Doniec et al^[22]用内镜在透视引导下放置支架, 21 例患者全部获得成功而无任何并发症, 80.1%(17/21)患者瘘口完全封堵, 平均住院时间 67 d (14-158 d), 并认为带膜支架降低与瘘有关的死亡率、并发症率, 是一个合理的治疗选择。

在食管吻合口瘘处理上, 内镜也得到较多应用, 收到较好效果。其治疗通常包括内镜灌洗、引流、纤维蛋白胶(fibrin glue)封堵。Groitl et al^[23]早在 1985 年就开始应用内镜治疗吻合口瘘: 当吻合口瘘确诊后, 用 X 线造影剂确定吻合口瘘的大小、形态, 然后经内镜每日用生理盐水冲洗(相当于腔内引流的作用), 直到创面变清洁, 此时用纤维蛋白胶覆盖增生的肉芽组织和已变清洁的创面, 使其收缩, 封堵瘘口。在过去的 9 a 中, 用该法处理了 46 例吻合口瘘和 9 例穿孔(半数患者早期有败血症), 平均内镜治疗次数 4 次(1-19 次), 纤维蛋白胶平均用量 8 mL (1-81 mL), 近 80% 患者瘘口治愈, 仅有 14% 患者出现食管狭窄而需球囊扩张。认为该法对食管病变治疗有很大帮助, 尤其是全身情况差、手术风险大的患者。随后 Pross et al^[24-25]分别在 1999 年、2000 年报道对 2 例、7 例食管吻合口瘘患者行上述治疗, 两组患者各有 2 例试用一种新的 Vicryl 柱(Vicryl-cylinder)堵瘘, 全部患者均获成功, 认为内镜治疗是一种相对安全、侵袭性小的方法。Infante et al^[26]尝试用内镜将引流管沿导丝经吻合口瘘的腔面插入纵隔或胸膜腔引流脓肿, 加以抗生素、全胃肠外营养, 取得很好效果。

de Lange et al^[27]考虑到由术后管壁水肿、肉芽组织增生所致的吻合口狭窄促进管腔内液体经瘘口外漏并使吻合口瘘不易愈合, 采用 15 或 20 mm 直径的球囊对吻合口进行扩张, 不管有无狭窄存在。在他的 16 例患者中, 10 例在扩张术前平均吻合口瘘持续 6 d, 术后引流管的引流即刻停止; 5 例术前吻合口瘘平均持续 13 d, 对扩张治疗的反应较慢, 术后平均 5 d 引流停止; 1 例经二次球囊扩张后, 引流仍未停止。无 1 例发生相关并发症。并认为早期球囊扩张效果较好。

总之, 上述方法对于食管吻合口瘘的闭合、减轻症状、减少因瘘的死亡率均有积极作用。由于缺乏大样本的比较研究, 何种方案最佳尚无定论^[11, 14]。目前倾向于根据个体情况选择方案, 加以全身对症支持治疗。似乎支架、内镜治疗效果更为确切, 但提高治疗的远期效果和降低相应并发症仍是亟待解决的问题。

4 参考文献

- 1 Swisher SG, Hunt KK, Holmes EC, Zinner MJ, McFadden DW. Changes in the surgical management of esophageal cancer from 1970 to 1993. *Am J Surg* 1995;169:609-614

- 2 Whooley BP, Law S, Alexandrou A, Murthy SC, Wong J. Critical appraisal of the significance of intrathoracic anastomotic leakage after esophagectomy for cancer. *Am J Surg* 2001;181:198-203
- 3 Lee Y, Fujita H, Yamana H, Kakegawa T. Factors affecting leakage following esophageal anastomosis. *Surg Today* 1994; 24:24-29
- 4 Urschel JD. Esophagogastrostomy anastomotic leaks complicating esophagectomy: a review. *Am J Surg* 1995;169:634-640
- 5 Fahn HJ, Wang LS, Huang MS, Huang BS, Hsu WH, Huang MH. Leakage of intrathoracic oesophagovisceral anastomoses in adenocarcinoma of the gastric cardia: changes in serial APACHE II scores and their prognostic significance. *Eur J Surg* 1997;163:345-350
- 6 孙衍庆. 现代胸心外科学. 第1版. 北京:人民军医出版社, 2000: 505-884
- 7 李麟荪, 贺能树. 介入放射学—非血管性. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:118
- 8 Dan HL, Bai Y, Meng H, Song CL, Zhang J, Zhang Y, Wan LC, Zhang YL, Zhang ZS, Zhou DY. A new three-layer-funnel-shaped esophagogastric anastomosis for surgical treatment of esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:22-25
- 9 Dewar L, Gelfand G, Finley RJ, Evans K, Inculet R, Nelems B. Factors affecting cervical anastomotic leak and stricture formation following esophagogastrectomy and gastric tube interposition. *Am J Surg* 1992;163:484-489
- 10 Isomura T, Itoh S, Endo T, Akiyama S, Maruyama K, Ishiguchi T, Ishigaki T, Takagi H. Efficacy of gastric blood supply redistribution by transarterial embolization: preoperative procedure to prevent postoperative anastomotic leaks following esophagoplasty for esophageal carcinoma. *Cardiovasc Intervent Radiol* 1999;22:119-123
- 11 Sauvanet A, Baltar J, Le Mee J, Belghiti J. Diagnosis and conservative management of intrathoracic leakage after oesophagectomy. *Br J Surg* 1998;85:1446-1449
- 12 Tanomkiet W, Galassi W. Barium sulfate as contrast medium for evaluation of postoperative anastomotic leaks. *Acta Radiol* 2000;41:482-485
- 13 Gollub MJ, Bains MS. Barium sulfate: a new (old) contrast agent for diagnosis of postoperative esophageal leaks. *Radiology* 1997; 202:360-362
- 14 Anbari MM, Levine MS, Cohen RB, Rubesin SE, Laufer I, Rosato EF. Delayed leaks and fistulas after esophagogastrectomy: radiologic evaluation. *Am J Roentgenol* 1993;160:1217-1220
- 15 Roy-Choudhury SH, Nicholson AA, Wedgwood KR, Mannion RA, Sedman PC, Royston CM, Breen DJ. Symptomatic malignant gastroesophageal anastomotic leak: management with covered metallic esophageal stents. *Am J Roentgenol* 2001; 176:161-165
- 16 Maher MM, Lucey BC, Boland G, Gervais DA, Mueller PR. The role of interventional radiology in the treatment of mediastinal collections caused by esophageal anastomotic leaks. *Am J Roentgenol* 2002;178:649-653
- 17 Lozac'h P, Topart P, Volant A, Perrament M, Gouerou H, Charles JF. Ivor Lewis' operation for epidermoid cancer of the esophagus. Immediate and late results. Apropos of 168 cases. *Ann Chir* 1992;46:912-918
- 18 Lam TC, Fok M, Cheng SW, Wong J. Anastomotic complications after esophagectomy for cancer. A comparison of neck and chest anastomoses. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;104: 395-400
- 19 Paterson IM, Wong J. Anastomotic leakage: an avoidable complication of Lewis-Tanner oesophagectomy. *Br J Surg* 1989; 76:127-129
- 20 Lang H, Piso P, Stukenborg C, Raab R, Jahne J. Management and results of proximal anastomotic leaks in a series of 1114 total gastrectomies for gastric carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 2000;26:168-171
- 21 Song HY, Choi KC, Cho BH, Ahn DS, Kim KS. Esophagogastric neoplasms: palliation with a modified gianturco stent. *Radiology* 1991;180:349-354
- 22 Doniec JM, Schniewind B, Kahlke V, Kremer B, Grimm H. Therapy of anastomotic leaks by means of covered self-expanding metallic stents after esophagogastrectomy. *Endoscopy* 2003;35:652-658
- 23 Groitl H, Horbach T. Endoscopic treatment of anastomosis insufficiency and perforation in the esophagus with fibrin glue. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1996;113:753-754
- 24 Pross M, Manger T, Mirow I, Lippert H. Therapy options for postoperative fistulas of the upper gastrointestinal tract. *Zentralbl Chir* 1999;124(Suppl 2):45-46
- 25 Pross M, Manger T, Reinheckel T, Mirow L, Kunz D, Lippert H. Endoscopic treatment of clinically symptomatic leaks of thoracic esophageal anastomoses. *Gastrointest Endosc* 2000;51:73-76
- 26 Infante M, Valente M, Andreani S, Catanese C, Dal Fante M, Pizzetti P, Giudice G, Basilico M, Spinelli P, Ravasi G. Conservative management of esophageal leaks by transluminal endoscopic drainage of the mediastinum or pleural space. *Surgery* 1996;119:46-50
- 27 de Lange EE, Shaffer HA Jr, Holt PD. Esophagoenteric anastomotic leaks: treatment with fluoroscopically guided balloon dilatation. *Am J Roentgenol* 1994;162:51-54

• 文献综述 •

肠缺血的临床与影像学进展

尚克中, 程英升

尚克中, 程英升, 上海交通大学附属第六人民医院放射科 上海市 200233
项目负责人: 程英升, 200233, 上海市宜山路 600 号, 上海交通大学附属第六人民
医院放射科. chengys@sh163.net
电话: 021-64368920 传真: 021-64701361
收稿日期: 2004-02-25 接受日期: 2004-03-24

摘要

近年来, 随着对肠缺血的临床和影像学深入研究, 特别是肠缺血CT、血管造影诊断技术的应用, 肠缺血介入治疗取得了令人瞩目的成绩, 本文就近年来肠缺血的临床和影像学的进展及今后努力的方向作一综述。

尚克中, 程英升. 肠缺血的临床与影像学进展. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1405-1412
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1405.asp>

0 引言

肠缺血并非少见疾病。据报道, 缺血性结肠炎为 50 岁以上老年人各型结肠炎中最常见的类型, 但多为非穿壁性而大都可以自愈; 很多医师未想到, 患者也不知道自己曾患此病。因急性肠梗塞所致的急腹症约占全部急腹症的 1%, 死亡率达 50-90% (因病因和肠道缺血的范围和程度而有较大差异), 其年死亡率甚至较结肠癌的死亡率更高^[1-3]。

由于人口的老龄化和其他各种因素的影响, 内脏血管常发生某些病变如(粥样硬化等)而致供血障碍, 使靶脏器缺血。脑卒中(主要为脑缺血)、冠心病(心肌缺血)是常见的器官缺血疾病。胃肠缺血亦非少见, Marshall JC, Criston et al 认为胃肠缺血是多器官功能衰竭的始动因素。但因本病常继发于其他重危疾病(如休克、其他系统性疾病)、临床医师缺乏对本病的认识和经验、多数患者缺乏特殊症状、有重要诊断价值的检查(如肠系膜动脉造影、CT)应用较少等原因, 致多数患者失去治疗机会而死亡。少数急性肠缺血患者经一般支持治疗后症状缓解或转为慢性, 甚至终身未能查出此病。

肠缺血影响肠管的范围可有很大差别, 既可以仅影响肠管的某一段或几段, 也可以呈弥漫性; 既可发生于小肠, 也可发生于大肠; 既可以累及肠壁的全层, 称穿壁性(transmural)缺血或肠梗塞(infarction), 也可以仅累及肠壁的某些层(主要为黏膜层和黏膜下层)。按照肠缺血起病和病变发展的时间可分为急性、亚急性和慢性肠缺血^[4-9]。

肠缺血的诊断手段自 1960 年代应用血管造影技术以来, 有了惊人的提高。而近 10 多年来数字减影血管造影(DSA)、计算机体层摄影(CT)、磁共振成像(MRI)、

超声成像(US)、介入性诊疗等影像技术的飞速发展更为肠缺血的诊疗提供了更加方便, 更加明确, 更加有效的途径。影像学检查对本病有重要的诊断价值, 而且可在血管造影检查明确诊断的同时向病变血管灌注药物或作其他介入治疗, 取得良好疗效。

但实际上, 由于临床对此病有关问题未予充分重视, 使患者未能得到早期诊断, 延误治疗时机者仍多, 应予关注。

急性肠缺血确定诊断之后需要积极治疗, 延误治疗则可能危及生命。常用的治疗措施有外科手术、动脉内药物灌注及非动脉灌注途径给予扩张血管药物和支持治疗等。影像学检查发现有肠梗塞和 / 或肠穿孔征象时、或临床检查发现有腹膜刺激征象时均应尽快进行手术, 切除梗塞的肠段或取出血管内造成缺血的栓子。无上述紧急指征时可择期进行相应的肠管切除、血管栓子取出、血管成型等手术。

急性肠缺血的放射学血管内介入治疗效果良好。一般程序为经股动脉将导管选择性插入至腹腔动脉或肠系膜上动脉, 向动脉内灌注溶栓剂或血管扩张剂。常用的溶栓剂有链激酶、尿激酶、组织纤维蛋白溶解酶原激活物(tissue plasminogen activator)等。常用的血管扩张剂有罂粟碱(papaverine)。动脉介入灌注药物后多数患者可在 12 h 内症状缓解或消失^[10-14]。

1 临床分类

为了便于临床的区别和诊疗的需要, 常将肠缺血分为急性和慢性两大类。急性肠系膜缺血(acute mesenteric ischemia)亦称急性肠缺血指肠系膜上动脉的全部或主要分支急性缺血。50 岁以上患者多见, 常伴有心脏瓣膜病、心力衰竭、心率紊乱、近期心肌梗塞等; 亦可由于烧伤、大出血、急性胰腺炎等血容量不足所致。主要表现为腹痛、腹泻及便血。急性肠缺血包括肠系膜上动脉栓塞, 肠系膜上动脉血栓形成, 非闭塞性肠系膜缺血, 急性肠系膜静脉血栓形成, 局灶性小肠缺血, 结肠缺血等六种。慢性肠缺血, 包括缺血性肠绞痛和腹腔动脉压迫综合征两种^[4-8]。现分别简述如下。

1.1 肠系膜上动脉栓塞

1.1.1 病因病理 肠系膜上动脉栓塞(superior mesenteric arteriol embolization)占急性肠缺血的 25-30%、90-95% 的栓子来自心脏的附壁血栓或心房血栓脱落。肠系膜上动脉自腹主动脉分出, 起源处与腹主动脉成锐角, 管腔较粗, 体循环的栓子极易在此处进入, 引起栓塞。而肠系

膜下动脉的管腔较细，栓子不易进入，故栓塞少见。

有学者将肠系膜上动脉分为起始、上干、下干和下干后4个节段。结肠中动脉开口于邻近下干段的上干段内，此两段内发生栓子的机会较多。发生栓塞后出现小肠缺血性痉挛，1-2 min后出现水肿，由黏膜层扩展到浆膜层。随后肠管静脉也发生栓塞，肠壁毛细血管充血、破裂、出血、继而发生溃疡、坏死，最终形成肠壁全层坏死，广泛出血，肠壁与腹腔内大量渗出，常伴发细菌感染，并致循环血量下降。

1.1.2 临床表现 患者常有心率紊乱、近期心肌梗塞史；伴有其他脏器栓塞史的老年患者占25-40%。多有突然发作的剧烈腹痛，位于脐周围或上腹或右上腹，开始时为阵发性，渐变为持续性并扩散至全腹部，少数腹痛较轻。发生肠绞窄时，梗阻的体征明显。常有呕吐，呕吐物多为血性。也可腹泻，便血或大便隐血。本病的早期体征不明显，出现肠梗塞时腹部即出现压痛、肌卫、包块，膨胀、发热直至休克。

化验检查：早期白细胞升高。肠梗塞时可有代谢性酸中毒及血浓缩。血清淀粉酶、谷草转氨酶等均可升高，勿据此误诊为胰腺炎、心肌梗塞等病。血清二胺氧化酶对肠黏膜缺血较敏感，可作为早期肠缺血诊断的指标。

1.1.3 诊断要点 腹部平片：应常规摄取腹部平片，可能所见参见下节。

动脉造影：动脉造影，包括DSA，有决定性的诊断价值。当导管经股动脉插入腹主动脉至第一腰椎平面时即可注入造影剂，观察肠系膜上动脉内腔情况，栓子多阻塞肠系膜上动脉第二、三段，可见圆形、边缘锐利的充盈缺损。

CT检查：下节叙述。

鉴别诊断，见(表1)。

1.1.4 治疗原则 除采用支持疗法、纠正电解质平衡、

抗感染治疗外，应尽快进行介入性动脉内灌注，通过留置在缺血动脉内的导管直接注入血管扩张药，常用罂粟碱，每小时滴注30-60 mg，可多次或连续应用；也可应用胰高血糖素、前列腺素等；近来有用卡托普利者，亦有效果，因肠系膜血管阻力亦受肾素-血管紧张素系统的影响，该药可消除后者的作用。

本病晚期已形成肠梗塞后须尽快施行手术治疗，包括栓子切除术或肠段切除术。须注意，因患者原有的心力衰竭等疾病，即使手术成功，患者的死亡率仍高达60-90%，手术后发生再栓塞的发生率为10-15%。

1.2 肠系膜上动脉血栓形成

1.2.1 病因病理 肠系膜上动脉血栓形成(superior mesenteric arteriol thrombosis)大多在动脉粥样硬化基础上发生，约占急性肠系膜缺血的10-15%。血栓形成主要发生在肠系膜上动脉第一段。

1.2.2 临床表现 发作前数周或数月内常有反复发作腹痛史，起病较隐袭，发生肠梗塞时与肠系膜上动脉栓塞相仿。治疗原则同栓塞。预后亦不良。

1.2.3 诊断要点 腹部平片早期无异常发现。动脉造影可明确诊断。病变常见于肠系膜上动脉第一段，闭塞的近侧或远侧均可显示局部性和弥漫性血管痉挛。

1.3 非闭塞性肠系膜缺血

1.3.1 病因病理 非闭塞性肠系膜缺血(non-occlusive mesenteric ischemia)指经血管造影显示肠系膜血管有不同程度的收缩，但无闭塞，现已被视为一种独立的疾病。本病的发生率占急性肠系膜缺血的10-49%。常在心功能不全、脑外伤、败血症、应用洋地黄、血管加压素、麦角碱等情况下发生。当心脏排出量减少时可引起反射性肠系膜血管痉挛，使血流量减少，小肠黏膜呈局限性或弥漫性缺血。

1.3.2 诊疗要点 动脉造影检查可显示肠系膜上动脉分

表1 急性肠系膜缺血的鉴别

| | 临床情况 | 症状 | 体征 | 化验 | 确诊依据 |
|--------|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|-----------------|
| 动脉栓子 | 心房纤颤、近期心肌梗塞 | 突然发生腹部剧痛，阵发或持续，短暂恶性、呕吐、腹泻 | 早期腹软，肠鸣音亢进，或有便血 | 早期血细胞正常，晚期白细胞升高，酸中毒 | 血管造影，剖腹探查 |
| | 动脉硬化性心脏病，肠缺血史，脱水，慢性心衰 | 血样便伴腹痛，恶心、呕吐 | 全身情况多稳定，晚期有腹肌紧张，肠鸣音消失，脓毒血症，血压下降，心率增快 | 血液浓缩，碱性磷酸酶增高 | |
| 非闭塞性缺血 | 休克，脓毒血症，呼吸衰竭，慢性心衰 | 感觉迟钝者可无症状，一般有弥漫性持续性腹痛、腹胀、恶心、食欲差或肠梗阻 | 早期无体征，晚期有急腹症体征，脓毒血症 | 早期白细胞无变化，晚期白细胞升高，酸中毒，碱性磷酸酶升高 | 血管造影，考虑剖腹探查(晚期) |
| | 脱水，慢性心衰，红细胞增多症，血栓性静脉炎史 | 亚急性痛，有腹胀、脱水、短暂腹泻、血便 | 早期腹部膨胀、脱水，晚期有急腹症、脓毒血症 | 早期有血浓缩，晚期白细胞升高、酸中毒，碱性磷酸酶升高 | 血管造影，剖腹探查(晚期) |

支有多处或弥漫性的非闭塞性狭窄。诊断确定后即应经动脉内导管直接灌注血管扩张剂, 为治疗本病最直接有效的方法。本病属应激性反应, 治疗的原则为补充液体、纠正酸中毒、应用抗感染药物、增加心肌收缩力药物、增加心搏量的药物, 及治疗原有疾病, 但不宜使用洋地黄。

1.4 急性肠系膜静脉血栓形成

1.4.1 病因病理 急性肠系膜静脉血栓形成(acute mesenteric venous thrombosis)较少见, 占急性肠缺血的10%。本病的病理改变与肠系膜动脉栓塞相似, 包括肠黏膜坏死、出血、水肿。如静脉血栓累及肠管边缘静脉弓与其垂直的血管时, 可造成肠管坏死。本病可分原发性和继发性两种。原发者常发生于靠近肠管的小静脉, 多能形成侧支循环可以代偿闭塞的血管。肠管在愈合过程中可有瘢痕形成。静脉血栓可以自行机化, 也可能发生再通。原发性者原因不明, 多有深部静脉血栓形成或移行性血栓形成史。继发性的原因有: 血液病与高凝状态, 如镰状红细胞性贫血、真性红细胞增多症、血小板增多症、胰腺癌、结肠癌等; 局限性静脉淤血与淤积, 如肝硬化、充血性脾肿大、肿瘤压迫门静脉根部等; 腹腔炎症与脓毒血症, 如胆囊炎、阑尾炎、憩室炎、腹膜炎等; 手术后和外伤, 如脾切除术后发生的血小板增多症等; 口服避孕药。

1.4.2 临床表现 原发性肠系膜静脉血栓形成多有前驱症状, 在数日至数周前即有腹部不适、纳差、大便习惯改变等, 以后腹痛逐渐加重, 伴有恶心呕吐、中度发热; 如发生肠血管梗塞, 即进入循环衰竭状态。

继发性肠系膜血栓形成发病较突然, 出现上腹部或脐周围痉挛性疼痛, 伴有恶心、呕吐、肠鸣音减弱或消失、腹肌紧张、压痛和反跳痛, 进入循环衰竭状态。

腹部平片有小肠梗阻表现。血管造影可见: 造影剂反流入主动脉, 肠系膜上动脉及其分支痉挛, 动脉相延长, 肠壁增厚。

1.4.3 治疗 内科治疗原则同肠系膜动脉栓塞。外科取出栓子不易成功。肠切除12~24 h内开始抗凝治疗。应用肝素、双香豆素等, 但停药后有复发可能。

本病预后较好, 死亡率为40~50%。

1.5 局灶性小肠缺血

1.5.1 病因病理 局灶性小肠缺血(focal intestine ischemia)又称局灶性节段性小肠缺血, 指肠缺血的范围较小, 邻近血管可以形成侧支循环, 使肠壁不致发生穿壁性梗塞坏死。由于肠黏膜的抗感染屏障能力受到缺血损害, 故常发生非穿壁性的感染性梗塞; 少量组织坏死可完全愈合, 缺血坏死累及固有层时可发生纤维化, 造成肠管狭窄或肠梗阻。当严重缺血时可有穿壁性坏死, 更可发生肠穿孔或腹膜炎。

引起本病的有关疾病有胶原病、感染性脉管炎(可发生于结核、伤寒等病时)、血管痉挛(可发生于高血

压危象、嗜铬细胞瘤等时)、动脉硬化病、糖尿病, 某些药物(如避孕药、肠衣钾片)和腹部外伤等。

1.5.2 临床表现 本病多表现为亚急性肠梗阻, 在饭后2 h后发生腹部绞痛, 伴有恶心、呕吐、腹泻、腹胀等。病程持续数周至数月后, 症状渐轻, 但常再次发作。

1.5.3 诊断 本病的临床和影像学表现缺乏特异性, 手术前常难明确诊断。本病常是在临床发现有肠穿孔或肠梗阻而进行手术和病理检查时才得以证实。

早期腹部平片无异常, 本病在严重发作时有时可在积气肠曲的衬托下看到拇指印征。小肠灌肠或结肠灌肠检查有时可见到拇指印、痉挛、狭窄、溃疡等肠缺血征象。

1.6 结肠缺血

1.6.1 病因病理 结肠缺血(colonic ischemia)或缺血性结肠炎(ischemic colitis)是50岁以上人群中最常见的肠道缺血性疾病, 无明显性别差异。多伴有各种原因引起的周围动脉供血不足。本病可见于大肠任何部位, 以降结肠和乙状结肠最多见。其次为结肠脾曲、横结肠和直肠。缺血致肠黏膜充血、水肿、坏死、弥漫性出血和纵行浅表性溃疡, 严重者向肌层和浆膜层发展, 也可发生穿壁性溃疡和穿孔。慢性者可有黏膜萎缩伴纤维组织和肉芽组织增生。

本病可由于肠系膜下动脉栓塞或血栓形成、心率紊乱、心力衰竭等多种因素造成, 但多数患者无特异性病因, 可能与低血容量或小血管病有关。

临床表现分类: 1、结肠坏疽, 又称缺血性小肠结肠炎。2、缺血性狭窄, 又称局灶性结肠炎, 为肠壁非穿壁性缺血未累及肌层, 愈合后纤维瘢痕形成所致。3、暂时性缺血性结肠炎。

1.6.2 临床表现 脐周围或全腹部绞窄性疼痛, 部位和程度不定, 逐渐固定于左下腹部, 进食后疼痛加重, 伴恶心呕吐和/或腹泻、里急后重感以及黏液血便, 中度或轻度发热。实验室检查: 血白细胞增高、大便常规可见大量红、白细胞, 隐血试验阳性。

1.6.3 诊断要点 见(表2, 表3)。

1.6.4 影像学检查 腹部平片或双对比钡剂灌肠(注意避免注气过速, 压力过高以免引起穿孔)可能见到有特征性的拇指印征。此征可持续48 h至数周。拇指印征消失后, 结肠黏膜可形成溃疡, 愈合后可致黏膜表面异常, 也可形成狭窄或恢复正常。如有条件应早期进行血管造影, 有助诊断, 但较难显示病变血管。本病的鉴别诊断见(表3)。

缺血性结肠炎的诊断主要依赖临床表现, 在影像学检查中阳性发现较少。CT检查可发现缺血性结肠炎时的结肠壁增厚。肠系膜血管造影因其分支众多及互相通连的拱形分支而难以发现狭窄或闭塞的血管^[16]。

1.7 缺血性肠绞痛 缺血性肠绞痛(intestinal angina)是由于肠道缺血引起的以腹痛为主的综合征, 属于慢性肠缺血。主要由于动脉粥样硬化等原因引起肠道三支主要

表2 结肠缺血与急性肠系膜缺血的鉴别

| | 结肠缺血 | 急性肠系膜缺血 |
|---------|--------------|--------------------|
| 年龄、促发因素 | 90%在60岁以上、少见 | 较年轻、心力衰竭、心率紊乱、低血压等 |
| 与之有关的疾病 | 结肠的癌肿、狭窄、憩室炎 | 不常见，动脉硬化除外 |
| 腹痛 | 轻度腹痛、压痛、反跳痛 | 严重，早期发现少，继而明显，重病表现 |
| 直肠出血 | 轻度或血性腹泻 | 不多见 |
| 检查方法 | 首选钡灌肠 | 首选血管造影 |
| 预后 | 良好 | 险恶 |

表3 结肠缺血的鉴别

| | 结肠缺血 | 溃疡性结肠炎 | Crohn病 |
|--------|-------------------------|------------------|---------------------------------|
| 起病 | 快，急性常见 | 缓慢 | 缓慢 |
| 50岁以上 | 80% | <10% | <5% |
| 直肠出血 | 一次，量多 | 每次便血 | 少见 |
| 狭窄形成 | 常见 | 罕见 | 常见 |
| 原有血管病 | 常有 | 罕有 | 罕有 |
| 疾病进展 | 急，变化快 | 慢性 | 慢性 |
| 节段性受累 | 常见 | 罕见 | 常见 |
| 最常累及部位 | 脾曲及其相邻的横、降结肠，直肠很少，肛门不发生 | 左侧结肠或全部结肠，常犯及直肠 | 回肠末段，结肠任何部位，肛门常发生 |
| 钡灌肠 | 可有狭窄 | 缩短，溃疡，巨结肠 | 线样征，跳跃征，阻塞病变 |
| 拇指印征 | 常见 | 罕见 | 不常见 |
| 病理学 | 纤维增生，含铁血黄素沉着 | 黏膜缺损，隐窝脓肿 | 瘘管、肉芽肿、淋巴结病 |
| 相关疾病 | 跛行，绞痛，中风 | 虹膜炎、关节炎、皮肤化脓、恶性变 | 肠瘘、肛门受累、维生素B ₁₂ 吸收不良 |

动脉中的至少二支闭塞，使肠供血不足所致。此种腹痛常于餐后15-30 min发生，此时进食的食物仍在胃内，小肠的消化功能尚未开始。小肠消化所需的更多的血供尚未发生。现认为此病肠绞痛的症状不是由于小肠消化负荷增加而供血不能相应增加所引起，而是食物入胃后使供应肠道的血液向胃分流，引起小肠缺血，即偷血现象(vascular steal phenomenon)所致。继而发生局部组织酸中毒，引起腹痛。

本病诊断主要依赖血管造影，如发现胃肠道三支主要动脉中有二支狭窄，狭窄程度达50%以上，可以初步诊断为本病，并可作为手术的依据。值得注意的是由于侧支代偿的作用，有些病例的三支主要肠动脉均狭窄甚至完全闭塞但临幊上却可无症状。

1.8 腹腔动脉压迫综合征 腹腔动脉压迫综合征(celiac compression syndrome)是指因腹腔动脉狭窄而出现上腹部疼痛为主要表现的疾病；腹痛的性质和程度可有很大差异。血管造影仅发现腹腔动脉主干狭窄，其他分支无狭窄；手术发现此种狭窄是由于韧带或神经的压迫所致；手术解除压迫后部分患者症状可缓解。本病的界定尚有待继续研究。

2 影像诊断

2.1 概况 摄取腹部X线平片是急性肠缺血最基本的检查。本病的平片可能无明显异常发现，但也可能发现肠内积气分布的异常和单个或多个肠曲段的狭窄和扩张。疾病过程中多次平片检查还可将平片的所见进行比较，判断病变的进展。肠缺血能在平片中显示的最典型的征象是拇指印征(thumbprinting)，代表增厚的肠壁黏膜下的水肿或出血；肠壁内气囊肿或门静脉积气亦可见到，但常在疾病的晚期。腹部平片可发现有无穿孔或梗阻征象，为是否采取外科手术治疗提供依据。此外，须注意，上述阳性征象常在起病12-18 h之后方可出现^[15]。

血管造影检查是肠缺血诊断的黄金标准，应选择性插管至肠系膜上动脉或腹腔动脉或脾动脉进行造影，必要时也可作经皮经肝、或经皮经颈静脉作门脉造影以肯定静脉的血栓形成^[17]，此种检查的缺点是其高侵袭性、潜在的肾脏毒害性和放射线的损害。但此法的一个最大优势是可在作出诊断的同时直接进行血管内的药物灌注治疗和介入治疗。DSA可使血管造影更为便捷，显示更加清晰^[10-14]。

彩色多普勒亦可应用，甚为便捷，费用较低；但以

下因素使其应用受到限制: 肠内气体干扰, 操作者的技术水平, 以及此方法对低流量血管的疾病欠敏感^[16].

CT横断扫描对诊断急性系膜性肠缺血有重要价值. 可看到局灶性或节段性肠壁增厚、黏膜下水肿或出血、肠壁内气囊肿(pneumatosis)、门静脉积气等急性肠缺血的表现^[19]. CT增强扫描对急性肠缺血检出的敏感性达90%. 螺旋CT、快速CT、快速CT血管造影, 特别是近年发展的多排CT可极大限度地消除移动伪影, 提高诊断肠缺血的水平^[17-21].

由于MRI对各种组织的高度区分能力, 对急性肠缺血诊断的敏感性和准确性可能较CT更为优越. 磁共振可以直接进行血管造影, 称MRA. MRA不需进行穿刺和插入导管, 利用流空效应和组织信号的不同, 可以直接显示血管的部位和形态; 由于其非侵入性和无放射性以及其增强对比剂钆较之含碘的CT增强剂远为安全, 可能有更广阔的应用前景. 在肠系膜静脉疾病中MRI可清晰显示脉管的解剖, 了解门静脉的开放程度、血流方向、脾静脉有无血栓形成以及有无门脉高压的改变. 由于钆对比剂增强、三维重建、超快扫描、数字减影血管造影等新技术的应用, 更加提高了MRI在急性肠缺血诊断中的作用. MRI虽然具有上述诸多优点, 但不应用其作为急性肠缺血的首选检查; 主要是因为其对非闭塞性血管中的低流动状态和远侧栓子的分辨有潜在的不足之处^[22-24].

肠缺血是肠血管的疾病, 血管造影是诊断血管疾病最直接、最准确的方法. 我国的CT设备已较普及, 肠缺血性疾病应用CT检查有极重要价值. 这两种方法均已有巨大进展和相当丰富的经验, 应将其作为主要的或首选的检查方法.

2.2 肠缺血的血管造影检查

2.2.1 导言 正常人胃肠道血流占心排出量的15-20%, 其中大部分供应小肠的黏膜和黏膜下层. 肠道的血供主要来自肠系膜上、下动脉及其分支. 腹腔动脉供应胃和十二指肠, 因其侧支循环丰富故罕有发生缺血. 肠系膜上动脉供应全部小肠和右半侧结肠, 肠系膜下动脉供应横结肠中部以下肠道. 肠系膜血供沿小肠管壁形成广泛的弓状吻合, 个别动脉阻塞时通过侧支的代偿, 通常不至引起缺血性病变. 穿入肠壁的动脉终末支, 呈复层动脉网分布于黏膜下层与肌层之间. 当血管发生阻塞或灌注不足使血液供应减少到一定程度时, 该血管所供应的肠道即可发生急性或慢性缺血性损害.

由于肠缺血时肠系膜血管梗阻的部位在临幊上很少有明确的表现, 为了寻找肠系膜梗阻血管的始发部位, 多数作者主张进行肠系膜血管造影时应首先试行主动脉造影以初步观察肠系膜动脉的主干. 主动脉造影时正位摄影常难显示肠系膜动脉的开口, 侧位主动脉摄影能较好地显示出阻塞部位. 多数作者主张对疑有肠缺血的患者应分别作选择性肠系膜上动脉和肠系膜下动脉造影, 因肠系膜上动脉的急性梗阻有单侧发生的

倾向, 可能因该侧未作选择造影而未显示; 分别肠系膜上、下动脉作选择造影还可避免血管互相重叠而难以区别. 质量较好的造影甚至可以显示周围血管的细小栓子. 选择性血管造影有可能看到静脉的回流, 可以发现同时存在的静脉阻塞. 如肠系膜上动脉和静脉均未发现阻塞, 即应立即再施行选择性腹腔动脉造影. 只有在临幊表现提示有其他动脉阻塞的情况下才进行主动脉造影^[10, 13].

Bonakdarpour et al 观察了18只犬肠系膜血管梗阻后的血管造影所见. 自肠系膜动脉在主动脉起始处以下不同距离的多处部位结扎肠系膜动脉的近段分支, 造影时有以下发现: (1)结扎血管内有造影剂滞留, 称滞留征. (2)能看到血管的残端, 称残端征. (3)缺血区域的动脉延迟充盈. (4)缺血肠区的血管减少. 这些发现为肠缺血的血管造影诊断提供了科学依据^[10].

2.2.2 技术要点 按照常规作插管造影术前的准备, 从股动脉进入将造影导管经主动脉插入至腹腔动脉或肠系膜上、下动脉, 可先用单弯导管选插. 如选插失败, 可经导管内插入导引钢丝, 利用导引钢丝尖端无芯的软浮部随血流先进入欲插的动脉, 然后再将造影导管順导引钢丝插入. 通常用速度可控的压力注射器推注造影剂, 常用的造影剂为高浓度(66.8%以上的)泛影酸、异泛影酸、Iohexol、Iopromide等. 非离子型造影剂的副作用少, 但较昂贵. 注射速度为15-25 mL/s, 一次注入造影剂的总量为40-50 mL. 最好能用减影设备(DSA)造影. 还应注意预防造影引起的并发症.

2.2.3 正常肠上系膜动脉造影表现 选择性肠系膜上动脉造影可显示其各个分支, 常可清楚显示到第4-5级分支. 如将导管进一步插入至肠系膜上、下动脉, 则可使6-7级的分支清晰显示, 并可见到浓密的微血管阴影和相应的引流静脉. 在注入造影剂后的连续摄影中, 随着时间的推移可以依次显示血管的动脉期、微血管期和静脉期^[10].

动脉期: 肠系膜上动脉大都在近腰椎平面从主动脉分出, 然后向下、向右走行. 他常有一凸面向左的弯曲, 有时也可较直. 肠系膜上动脉有5个主要分支: (1)胰十二指肠下动脉; (2)中结肠动脉; (3)右结肠动脉; (4)回结肠动脉; (5)空回肠动脉.

微血管期: 此期可见到空肠、回肠和右半结肠的肠壁显影. 随肠壁扩张状态的不同显影肠壁的厚度亦常不同. 肠壁扩张较明显者呈2-3 mm厚的壳状密度增高影; 在结肠, 还能见到结肠袋的形态. 未扩张的肠曲呈球状或分叶状密度增高影, 后者与肿瘤染色不同之处为邻近肠曲无推移和牵拉, 供应血管的形态和粗细均正常, 密度较均匀, 无静脉早期显影.

静脉期: 注入肠系膜上动脉的造影剂超过40 mL以上时常可显示门静脉系统静脉, 有时还可见到显影较淡的肝静脉. 正常情况下门静脉系统一般只能显示肠系膜上静脉及其属支和肝内、外门静脉.

2.2.4 正常肠系膜下动脉造影表现 动脉期: 肠系膜下动

脉从第3腰椎椎体或第3、4椎间隙平面的主动脉分出，向下走行数厘米之后分出分支。其行程较少弯曲，常重叠于脊柱的左半或在脊柱的左旁，在分出乙状结肠动脉之后，其终末支改称直肠上动脉。肠系膜下动脉的主要分支有：(1)左结肠动脉，向下走行短距离后即分为升支和降支2个分支；(2)乙状结肠动脉，供应降结肠下段和乙状结肠；(3)直肠上动脉。

微血管期：肠系膜下动脉的微血管期可见降结肠、乙状结肠和直肠的肠壁显影。肠壁显影所见与肠系膜上动脉造影所见的右半结肠形态相仿。

静脉期：注入的造影剂剂量足够时可见肠系膜下静脉及其属支显影，其口径较肠系膜下动脉为粗，其走行和分布与其伴行的动脉相似，而造影剂流动的方向相反。同一动脉可显示2条伴行静脉。有时可见脾静脉显影。一般不能清楚显示门静脉主干。

2.3 急性肠缺血的CT诊断 CT检查是诊断急性肠缺血可靠而且比较方便的方法。随着快速CT、多排探测器CT的应用，扫描时间已可缩短至1 s以下。CTA技术还可将腹腔动脉和静脉显示为与介入法血管造影所见极为近似的冠状面或矢状面图像。与诊断肠缺血的传统方法—介入性血管造影的“标准”方法比较，由于CT检查无创伤性、方法简便和医师无须在射线下作插入导管等操作，已逐渐有代替前者的趋向，目前已成为诊断本病首选的、主要的检查方法。应用CT检查不仅使许多以前被误诊或漏诊的多数急性肠缺血患者能够得到及时正确的诊断，还使多数患者得到极为宝贵的及时手术治疗的机会，大幅度地降低了本病的死亡率^[17-21]。

2.3.1 诊断价值 应用CT了解肠缺血时肠道的改变以决定是否进行外科手术，开始于1980年代。研究证明，CT对肠缺血诊断有重要价值，其应用渐受重视。CT显示肠缺血的敏感度，与诊断此病的“金标准”血管造影相比较，在过去10 a之内，特别是最近几年之内，已由39%提高到82%^[15,20]。但因有对照组的研究极少，其特异性较难判定。

2.3.2 技术要点 对怀疑患有急性肠缺血或缺血性结肠炎进行CT检查时应注意以下各点^[15,20]：(1)扫描前30-120 min内口服造影剂或清水600-750 mL；亦可经直肠灌入造影剂或清水400-800 mL；务必使肠道充分扩张，以避免因肠道收缩而致的假性肠壁增厚。口服的造影剂为阳性造影剂或阴性造影剂，各有优缺点。比较一致的意见是，阳性造影剂对肠壁的显示更为清楚，特别在低衰减(hypoattenuation)时；而水等阴性造影剂则在肠壁无增厚或增厚很少时有利于显示肠壁增强的异常，特别在CT血管造影(CTA)时有更多的优点。(2)静脉注射造影剂后的增强扫描可发现肠系膜动脉内或静脉内的血栓。应注意有可能被掩盖的血管钙化、高衰减度的血管内血块和/或急性黏膜下或壁内出血。最好能作平扫和增强2种扫描，可以区别由充血和高灌注所致的急性弥漫性壁内

出血和高衰减的肠壁。(3)肠壁增强的类型对肠缺血合并肠梗阻的诊断十分重要。通常增强剂的注入总量为100-150 mL(每mL含碘300-370 mg，注入速度为2-4 mL/s)。以前用单个CT探测器时，因取像时间长，注射开始后60 s时的扫描已出现门脉期，仅能显示一部分动脉期相；现在由于多个探测器和多排探测器的应用，已可在注射开始后25-30 s内扫描全腹部，显示腹部的动脉，并可在后处理时仔细分析。(4)应用三维重建、CT血管造影技术可得到腹部的矢状或冠状图像，可发现肠缺血的部位、水平和原因。(5)单个探测器时常用5-10 mm准直器，1.0-1.5节距；多排探测器时常用1.0-2.5 mm准直器，6节距。扫描层厚度前者用5/5-7/7 mm；后者用1.25/1.0-3.0/1.5 mm。(6)对于病情严重特别是怀疑已有急性肠梗塞的患者，不能口服足够的造影剂。此类患者还常并发肾功能减退和电解质紊乱，不仅不能给予口服造影剂，亦不宜经静脉注射增强剂。在此情况下仍可进行腹部平扫检查，结合临床资料，仍可对急性肠缺血提供若干重要信息。(7)取得肠系膜动脉的动脉期图像对诊断急性肠缺血十分重要；而高质量的门脉期图像对显示肠系膜动脉的闭塞很重要；门脉期还可显示肠系膜静脉、显示肠壁本身的异常、显示有无穿孔、脓疡形成、腹膜炎以及发现急腹症的其他原因。这些信息对急性肠缺血的诊断都有重要作用。

2.3.3 CT表现 急性肠缺血的CT表现有时很明显，有时仅有微小的改变，需要仔细观察，加以辨识。应注意观察以下表现：肠壁有否增厚，肠腔有否扩张，肠壁有无增强，肠壁的增强为均一性或杂异性，肠壁呈低衰减或高衰减，有无系膜的条束状影(stranding)、血管淤血、腹水，有无肠气囊肿(pneumatosis)或门脉积气。在急性肠缺血时，这些表现可能发生在小肠，也可能发生在大肠；可以是弥漫性的，也可以是局限性的、节段性的、局灶性的；可以是表浅性的，也可以是穿壁性(transmural)的。这些表现多数无特异性，也可出现于许多其他肠病。所以，急性肠缺血的CT诊断必须密切结合患者的临床情况，了解肠缺血的病因、病理、疾病的严重程度、部位、范围、分布几率、有无黏膜下或肠壁内出血、有无伴发的感染、有无穿孔等。应了解，大多数CT征象都是非特征性的。以下各项将上述现象中需要特别重视的表现再作说明^[18,20]。

2.3.3.1 肠壁增厚 正常肠壁的厚度为3-5 mm，因肠壁膨胀的程度而不同。在结肠，发生痉挛性收缩时肠壁的厚度可达5 mm以上，而充分扩张时3 mm的厚度也可能已属异常。据报道，急性肠缺血时肠壁增厚的出现率在26-96%之间。肠壁增厚较多见于缺血性结肠炎、结肠梗塞、原发性或继发性肠系膜静脉闭塞，但很少见于急性动脉闭塞性小肠梗塞。后者坏死的小肠还典型地表现为肠壁变薄如纸，肠管扩张并有气-液平。

小肠肠壁发生穿壁性梗塞时，壁内的神经和固有肌层均受破坏，梗塞的肠段无肠壁增厚，因丧失张力

而扩张, 变为极薄的纸样。如无其他肠缺血征象, CT对此种肠壁极薄的情况常难作出诊断, 但应想到穿壁性梗塞的可能。据此, 在急性肠缺血的CT检查中, 肠壁增厚的患者可能较肠壁变薄者的预后好。

不论急性肠缺血或梗塞是血管闭塞性的或是血管未闭塞(non-occlusive)性的, 二者肠壁增厚的表现并无不同。但肠壁增厚的程度, 在肠系膜静脉闭塞时(包括原发性或继发性静脉血栓形成、嵌顿性疝、肠套叠、肠扭转等)常较肠系膜动脉闭塞时更厚, 至少在肠壁内出血和感染发生之前是如此。

是否出现肠壁增厚及增厚的程度与肠缺血的严重程度及肠壁受损的程度无关。与上述的肠壁缺血梗塞时肠壁呈纸样变薄不同, 在可逆性休克所致的肠缺血时小肠壁可呈轻度和弥漫性的增厚。

2.3.3.2 肠管扩张 急性肠缺血梗塞时有肠管扩张并伴有液气平现象者甚为常见, 可达56~91%。此种现象在可逆性肠缺血时及结肠黏膜表面缺血时较少见; 此种情况提示该段结肠缺血程度较轻, 仍有活力并有痉挛性收缩。相反, 肠扩张则是由于肠壁被破坏, 损害了肠管的蠕动。应注意, 见到肠管扩张伴有气液平时并不一定是麻痹性(非动力性)肠梗阻的特征。而急性肠缺血肠段内充满液体, 无气体存在而扩张时,(称为“无气腹腔”[gasless abdomen]), 则急性肠缺血或肠梗塞的可能性更大。

2.3.3.3 条束状影和腹水 肠系膜脂肪呈条束状(stranding)表现及肠系膜积液和/或腹水可因多种原因发生, 并非急性肠系膜缺血的特征。在肠梗阻患者中发生部分性肠壁缺血或穿壁性缺血时, 肠系膜条束状影、肠系膜积液和腹水3个征象在CT检查中的敏感性分别是58%、88%和75%, 特异性为79%、90%和76%^[28]。如3个征象中的任何2个同时出现, 则特异性升高至94%。这些征象对区别缺血为穿壁性或非穿壁性无价值。

2.3.3.4 肠壁的衰减 缺血的肠壁在CT扫描中可表现为低衰减(hypoattenuation)或高衰减(hyperattenuation)。急性肠缺血时肠壁的低衰减呈同质性(homogeneous), 由肠壁水肿造成。低衰减在缺血性结肠炎时的出现率为61%, 常见于以肠壁水肿为典型表现的肠系膜静脉闭塞性急性肠缺血。但因肠壁内出血和出血性梗塞亦可偶尔发生肠壁增厚和高衰减。此种壁内出血可为弥漫性, 也可为局限性, 仅累及黏膜下层, 见于急性动脉闭塞性肠缺血, 也可见于急性非闭塞性肠缺血或梗塞。

2.3.3.5 异常增强 肠壁的充血(hyperemia)和高灌注(hyperperfusion)为急性肠缺血CT增强扫描时肠壁有高增强(hyperenhancement)表现时的2个显示因素。但需以增强扫描前的平扫影像为比较的基础。急性缺血肠段有充血而无高灌注是肠系膜静脉闭塞和相继发生的回流梗阻的典型表现。缺血肠段同时有充血和高灌注时可累及肠壁黏膜和黏膜下层, 也可为弥漫性。前者可表现为典型的靶征(target sign), 靶的外环为肠壁水肿带。但在

“休克肠”(shock bowel)时出现的高增强, 则既不代表充血, 也不代表高灌注, 仅典型地反映肠壁因动脉灌注减少而使增强延长, 动脉灌注减少是因为肠系膜动脉痉挛, 后者为血管增压素Ⅱ等引起; 或因肠系膜静脉收缩, 静脉回流减少引起, 常为应用正肾上腺素等药物所致。

肠壁充血或高灌注在急性肠系膜缺血时出现的敏感性和特异性分别达33%和71%, 代表肠壁仍有活力, 提示预后较好。

2.3.3.6 肠气囊肿和门脉积气 此二征象较少见, 但在急性肠缺血时有较强特征性, 不同报道中的出现率为6~28%和3~14%。肠气囊肿表现为肠壁内存在有小气泡, 或条状积气, 位于一段肠壁的2个层之间。门脉系膜静脉积气表现为少量气体存在于肠系膜静脉或门脉的肝内分支。报道称此2征象在急性肠系膜缺血CT诊断的特异性接近100%。

2.3.4 最易发生漏误诊的情况 CT检查在急性肠系膜缺血诊断方面虽有极重要价值, 但有些情况极易发生漏误诊, 应特别注意^[18,20]。(1)如果结肠缺血仅为节段性的, 而且仅损伤了黏膜表面; 此时可仅出现反射性结肠挛缩; 如无肠周围脂肪条束状影和异常衰减或增强等肠缺血的其他异常表现, 可被误诊为单纯挛缩。解决的方法是结肠内灌入造影剂使之扩张, 或注射解痉剂后再作扫描。肠腔扩张和痉挛消除后的肠壁增厚才是真实病变的增厚。(2)如果灌入的造影剂或气体使结肠过度扩张, 致原来因缺血而增厚的结肠壁的厚度人为地变薄至3~5 mm之内, 可被放射科医师认为属于正常范围而误诊。(3)诊断医师将急性肠缺血时出现的肠曲充气充液扩张及液平误认为是麻痹性肠梗阻或假性肠梗阻。此种情况特别在急性肠缺血无肠壁增厚表现时容易发生。一般放射科医师大都以为急性肠缺血时的肠壁应有增厚。放射医师如将有这种情况的急性肠缺血患者误诊, 就将造成极为严重的后果。因为立即手术是挽救这种急性肠缺血患者的唯一手段, 而麻痹性肠梗阻则一般不考虑手术探察或手术治疗。而且, 在绝大多数医疗单位内, CT检查可能是目前对此病惟一可能应用的方法, 如果CT诊断时未想到急性肠缺血的可能, 则几乎没有其他方法可以另行作出此病的正确诊断。这样, 在很多情况下, CT检查很可能就是诊断本病惟一有决定价值的检查, 会成为肯定和排除本病的最后裁决手段。必须特别强调此点的重要, 这也是放射科医师责任和专业水平的表现。

3 肠缺血疾病的诊断治疗处理程序

随着现代影像技术的发展, 血管造影、CT和MRI已成为诊断和处理肠缺血疾病决定性的、无可代替的依据。根据Sreenarasimhaiah et al 的意见^[25], 将肠缺血疾病的处理程序归纳如下:

3.1 疑似急性肠系膜性肠缺血 对临床疑似急性肠系膜

性肠缺血的患者，首先须注意其有无腹膜刺激征象。如有腹膜刺激征象，应即进行外科手术探查。如无对无腹膜刺激征象，应作CT或CTA扫描或常规血管造影检查。

3.1.1 区分肠缺血类型 根据CT、CTA扫描或常规血管造影检查中诊断的肠缺血不同类型，对以下类型病变继续进行相应的处理和观察：

3.1.2 肠系膜动脉血栓形成 如为肠系膜动脉血栓形成，应予外科探查。如外科手术风险较高，可注射溶栓剂治疗。

3.1.3 非血管闭塞性系膜缺血 如发现为非血管闭塞性系膜缺血，则予动脉内灌注罂粟碱扩张血管；如临床有改善，则继续观察；如临床无改善，亦应作外科手术探查。

3.1.4 肠系膜静脉血栓形成 如为肠系膜静脉血栓形成，应寻找高血凝状态的原因。根据此类患者肠缺血症状的有无，分别作以下处理：对无症状者继续观察(可用或不用抗凝剂)，如出现腹膜刺激症状，即予外科手术探查；对有症状者，观察过程中如出现腹膜刺激征象，亦作外科手术探查。对未出现腹膜刺激征象者用warfarin后立即给予肝素抗凝，如出现腹膜刺激征象，亦作手术探查。

3.2 慢性肠系膜缺血 对临床疑似慢性肠系膜缺血者，作CT血管造影(CTA)或MR血管造影(MRA)检查。根据检查的结果和医师的技术专长和经验，可采用外科手术恢复血供、作介入性血管扩张或置入血管内支架等方法治疗。

4 参考文献

- 1 Greenwald DA, Brandt LJ, Reinus JF. Ischemic bowel disease in the elderly. *Gastroenterol Clin North Am* 2001;30:445-473
- 2 Guttormson NL, Bubrick MP. Mortality from ischemic colitis. *Dis Colon Rectum* 1989;32:469-472
- 3 Greenwald DA, Brandt LJ. Colonic ischemia. *J Clin Gastroenterol* 1998;27:122-128
- 4 Kumar S, Sarr MG, Kamath PS. Mesenteric venous thrombosis. *N Engl J Med* 2001;345:1683-1688
- 5 Abdu RA, Zakhour BJ, Dallis DJ. Mesenteric venous thrombosis—1911 to 1984. *Surgery* 1987;101:383-388
- 6 Moawad J, Gewertz BL. Chronic mesenteric ischemia. Clinical presentation and diagnosis. *Surg Clin North Am* 1997;77:357-369
- 7 Gandhi SK, Hanson MM, Vernava AM, Kaminski DL, Longo WE. Ischemic colitis. *Dis Colon Rectum* 1996;39:88-100
- 8 Reinus JF, Brandt LJ, Boley SJ. Ischemic diseases of the bowel. *Gastroenterol Clin North Am* 1990;19:319-343
- 9 Trompeter M, Brazda T, Remy CT, Vestring T, Reimer P. Non-occlusive mesenteric ischemia: etiology, diagnosis, and interventional therapy. *Eur Radiol* 2002;12:1179-1187
- 10 Rumwell C, McPharlin M. Vascular Technology: An Illustrated Review Davies Inc; 2nd edition, 2000: 113-132
- 11 Loomer DC, Johnson SP, Diffin DC, DeMaioribus CA. Superior mesenteric artery stent placement in a patient with acute mesenteric ischemia. *Vasc Interv Radiol* 1999;10:29-32
- 12 Rivitz SM, Geller SC, Hahn C, Waltman AC. Treatment of acute mesenteric venous thrombosis with transjugular intramesenteric urokinase infusion. *J Vasc Interv Radiol* 1995;6:219-223
- 13 Park WM, Gloviczki P, Cherry KJ Jr, Hallett JW Jr, Bower TC, Panneton JM, Schleck C, Ilstrup D, Harmsen WS, Noel AA. Contemporary management of acute mesenteric ischemia: Factors associated with survival. *J Vasc Surg* 2002;35:445-452
- 14 Simo G, Echenagusia AJ, Camunez F, Turegano F, Cabrera A, Urbano J. Superior mesenteric arterial embolism: local fibrinolytic treatment with urokinase. *Radiology* 1997;204:775-779
- 15 Smerud MJ, Johnson CD, Stephens DH. Diagnosis of bowel infarction: a comparison of plain films and CT scans in 23 cases. *Am J Roentgenol* 1990;154:99-103
- 16 Roabottom CA, Dubbins PA. Significant disease of the celiac and superior mesenteric arteries in asymptomatic patients: predictive value of Doppler sonography. *Am J Roentgenol* 1993;161:985-988
- 17 Yao T, Iwashita A, Hoashi T, Matsui T, Sakurai T, Arima S, Ono H, Schlemper RJ. Phlebosclerotic colitis: value of radiography in diagnosis—report of three cases. *Radiology* 2000;214:188-192
- 18 Bradbury MS, Kavanagh PV, Chen MY, Weber TM, Bechtold RE. Noninvasive assessment of portomesenteric venous thrombosis: current concepts and imaging strategies. *J Comput Assist Tomogr* 2002;26:392-404
- 19 Lefkovitz Z, Cappell MS, Lookstein R, Mitty HA, Gerard PS. Radiologic diagnosis and treatment of gastrointestinal hemorrhage and ischemia. *Med Clin North Am* 2002;86:1357-1399
- 20 Wiesner W, Khurana B, Ji H, Ros PR. CT of acute bowel ischemia. *Radiology* 2003;226:635-650
- 21 Ha HK, Rha SE, Kim AY, Auh YH. CT and MR diagnoses of intestinal ischemia. *Semin Ultrasound CT MR* 2000;21:40-55
- 22 Meaney JF, Prince MR, Nostrant TT, Stanley JC. Gadolinium-enhanced MR angiography of visceral arteries in patients with suspected chronic mesenteric ischemia. *J Magn Reson Imag* 1997;7:171-176
- 23 Laissy JP, Trillaud H, Douek P. MR angiography: noninvasive vascular imaging of the abdomen. *Abdom Imag* 2002;27:488-506
- 24 Gilfeather M, Holland GA, Siegelman ES, Schnall MD, Axel L, Carpenter JP, Golden MA. Gadolinium-enhanced ultrafast three-dimensional spoiled gradient-echo MR imaging of the abdominal aorta and visceral and iliac vessels. *Radiographics* 1997;17:423-432
- 25 Sreenarasimhaiah J. Diagnosis and management of intestinal ischaemic disorders. *BMJ* 2003;326:1372-1376

• 文献综述 •

原发性肝内胆管结石的诊断和外科治疗

巨邦律, 方驰华

巨邦律, 方驰华, 第一军医大学附属珠江医院肝胆外科 广东省广州市 510282
项目负责人: 方驰华, 510282, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学附属珠江医院肝胆外科
电话: 020 - 61643211
收稿日期 2004-03-06 接受日期 2004-03-18

摘要

近年来, 尽管原发性肝内胆管结石的发病率有下降趋势, 治疗方法也有所改进, 但治疗效果并非十分满意。肝内胆管由于解剖部位特殊, 病理改变复杂而且严重, 在临床实践中很难根治, 胆石残留和治疗后复发仍是最大问题。近年来由于技术进步, 新的治疗肝内胆管结石的方法也有报道。现就国内外有关肝内胆管结石外科治疗的现状进行分析评述。

巨邦律, 方驰华. 原发性肝内胆管结石的诊断和外科治疗. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1413-1415
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1413.asp>

0 引言

原发性肝内胆管结石在我国发病率很高, 据国内 1 859 例胆石症的报告, 原发性胆管结石约占 50%, 而约有 30% 的患者并存肝内胆管结石^[1]。由于原发性肝内胆管结石治疗上的难度和肝内胆管与肝实质之间的紧密关系, 使肝脏受到直接而严重的损害, 常常继发肝实质萎缩纤维化, 是良性胆道疾病死亡的重要原因。是当今胆道外科面临的重大难题。

1 原发性肝内胆管结石的诊断

1.1 超声诊断 超声检查敏感、准确, 黄疸和胆道梗阻患者均无限制, 操作简便而经济, 对肝内胆管结石检查的准确率达 95% 以上, Kim et al^[2] 报道 B 超对肝内胆管结石的敏感度为 20%-80%, 特异性为 95%。超声检查多年来已经成为肝内胆管结石病首选的检查手段。Kubo et al^[3] 研究表明, 多普勒彩色超声检查可检测肝脏内血流量异常及肝脏组织有无萎缩, 这对外科治疗肝内胆管结石时是否切除部分肝脏组织是非常有价值的。原发性肝内胆管结石病以色素性肝内胆管结石常见, 色素性结石的形成与吸虫病的关系日益受到重视, 动物试验表明小鼠胆管色素性结石病的发生率随小鼠感染肝吸虫的数量、小鼠质量的增加而增加^[4]。Choi et al^[5] 报道超声波检查诊断肝脏感染华支睾吸虫致肝内胆管扩张的敏感度为 67%, 特异性为 48%。超声诊断不仅仅为临床的诊断提供依据, 而且为早期预防

和术前治疗方案提供了有意义的参考价值。

1.2 影像学诊断 经皮肝穿刺胆道造影(PTC)诊断肝内胆管结石十分可靠, 穿刺针细而软穿刺成功率越高。在没有胆管扩张的患者行经皮胆管穿刺术, 用常规穿刺钢针穿刺往往失败, 采用外径较小的穿刺针穿刺是很有价值的^[6]。原发性肝内胆管结石常伴有梗阻性黄疸、胆管炎和胆管扩张等, 这往往影响了 CT 胆道造影时胆道的显示, 虽然 Kim et al^[2] 报道 CT 对胆管结石的敏感度为 23%-85%, 特异性为 97%。借助旋转数字胆管造影术(RDC)和三维胆管造影术(3DC)可以从多角度了解胆管内胆汁引流的情况, 更好的明确胆管狭窄部位^[7]。但是 CT 三维成像胆管造影术的缺点仍然是造影剂对比依赖性妨碍了在肝内胆管结石时的应用。近年来磁共振胆胰管造影术(MRCP)受到很大关注, 填补了放射线诊断的缺陷, 尤其是在诊断原发性肝内胆管结石病方面的有很大的价值。MRCP 是一种对胆汁输送异常具有高度敏感和特异性的无创性检查手段, 对胆道结石的敏感度达 92%, 特异性达 98%^[8]。与 PTC 比较, MRCP 在肝内胆管结石和肝内胆管狭窄的显影的诊断上更具有优越性^[9]。

2 原发性肝内胆管结石的外科治疗

黄志强^[10] 提出外科治疗肝内胆管结石的方针是“解除梗阻, 去除病灶, 通畅引流”, 到现在仍有重要的指导意义。在外科治疗存在的最大问题仍是术后残石率高, 再次手术率高, 复发率高。我国住院患者大多病史长, 并发症多, 病情复杂, 外科治疗实践中真正达到上述标准有难度。术前虽进行了必要的检查和准备, 但全面了解患者病情, 仍然离不开术中全面探查, 根据探查结果结合术前资料决定合理的手术方法, 以求取得最佳的治疗效果。治疗肝内胆管结石的手术方式种类繁多, 但目前主要为以下几类。

2.1 肝叶(段)切除 肝内胆管结石与胆管癌的关系日益受到学者的关注, 结石长期刺激和炎症反复发作还可以诱发胆管腺瘤样增生和腺癌^[11]。肝内胆管结石合并肝胆管癌的发病率在 0.36%-10% 之间^[12]。国内学者自 1950 年以来在黄志强首先报道用肝叶切除治疗肝胆管结石的经验后, 已从长期实践中对此观点产生了共识, 采用肝叶切除治疗肝内胆管结石已逐渐被人们接受, 并且在肝内胆管结石的外科治疗中起着越来越重要的作用。肝叶切除治疗肝内胆管结石的手术方式, 应根据结石的分布、胆管狭窄的程度、部位和肝脏的继发性病理改变等综合考虑。局限于一侧或一叶的结石或胆管狭窄

伴有肝组织纤维化、萎缩者，可行半肝或肝叶切除。Sun et al^[13]认为左侧肝内胆管结石(ILH)患者采用左肝叶切除术更加有效，切除了所有损伤因素，包括结石，扩张的、狭窄的、及有癌变可能的胆管，这是其他方法所不能达到的。Cheung et al^[14]也提出结石局限在肝脏某一片叶/段，肝脏部分切除术应为首选术式。对局限于肝段内的结石可以行肝段切除，既不过多损失肝组织，又能达到良好的治疗目的。近年来国内外的资料均表明，肝内胆管结石的各种治疗方法中，肝部分切除术的治疗效果最好，近期和远期治疗效果明显优于其他方法，结石复发率、死亡率、继发性胆管硬化和胆管腺癌的发生率等几项指标均明显优于其他治疗方法。

2.2 通畅引流 肝内胆管结石常常并发胆管狭窄，通畅引流的前提就是处理好胆管狭窄，明确狭窄的部位和狭窄程度对选择手术方式至关重要并直接影响治疗结果，现代外科治疗中十分重视胆管狭窄的处理。胆管狭窄是结石和病情反复发作的主要原因^[14]。鉴于原发性肝内胆管结石常常以化脓性胆管炎急诊入院，急诊手术风险大，术后并发症更加多见，很多学者提出先行胆管减压，视效果决定是否行手术治疗的方案。胆管减压的方法很多，经皮经肝胆道引流(PTCD)是继 PTC 后发展起来的一种非外科手术胆道引流法。有学者提出用单壁穿刺针行经皮胆管穿刺引流的效果比用带有套管的穿刺针更好^[15]。经皮经肝胆道镜取石在国外已开展多年，结石取净率达 80%，影响治疗效果的主要因素是严重的胆管狭窄^[16]。经过对行经皮经肝胆道切开取石术(PTCSL)术的 245 例肝内胆管结石患者的长期随访调查表明，PTCSL 是比较安全而有效的治疗肝内胆管结石的方法，术中并发症发生率为 1.6%，肝内胆管狭窄及胆管扩张的患者，结石复发率明显增高^[17]。经 T 管胆道镜放入支架扩张引流联合碎石术治疗复杂肝内胆管结石，有效、安全，肝内胆管结石治疗强调早期取石引流，能有效地预防并发症和死亡率^[18]。

肝门部胆管狭窄切开整形后的胆肠引流以Roux-en-Y 术式为基本术式。绝大多数没有发展为硬化性胆管炎及门脉高压症的良性胆管狭窄患者都可以采用胆管空肠 Roux-en-Y 手术，效果满意^[19]。胆管空肠吻合的术式繁多，为防止胆肠吻合后肠内容物反流，国内外许多学者设计了多抗反流方法。究竟采取何种术式，应根据患者的具体病情，结合手术医生的经验和医院的具体条件决定。合理的手术方式是取得良好治疗效果的保证。行胆管空肠Roux-en-Y手术时必须将胆管肠吻合口建立在肝内胆管狭窄环的上方，而不能建立在下方^[20]。对术中胆囊的去留，目前尚无定论。Tian et al^[21]认为原发性胆管结石外科治疗过程中保留胆囊不会促进胆管结石的形成，手术过程中保留胆囊是保证胆汁正常分泌的最佳术式。

随着腔镜技术的不断发展推动了微创外科跨越式发展，腹腔镜结合胆道镜下胆总管切开取石治疗肝内外胆管结石具有创伤小、结石治疗彻底，无结石残存、

恢复快、缩短住院时间等优点，是一种具有推广价值的新的治疗方法^[22]。在术者有丰富的腔镜手术经验，合适掌握适应证，腹腔镜治疗肝内外胆管结石清除率达 91%，并发症发生率及死亡率分别为 7% 和 0.5%。安全、微创、有效^[23]。Okugawa et al^[24]经口腔应用胆道镜治疗肝内胆管结石，初步治疗结果表明，结石取净率 64%，并发症发生率 2.8%，该方法对不适合手术治疗的患者也是可供选择的有效治疗方法之一。在纤维胆道镜直视下用钬激光碎石治疗肝内胆管结石和胆道术后残余结石，结石清除率可达 82.8%，有效、安全^[25]。

2.3 肝脏移植 对于复杂、弥漫存在的肝内胆管结石，特别是合并了胆汁性肝硬化、门脉高压者，可以考虑行肝移植治疗。Strong et al^[26]对 4 例肝内胆管结石并发病史性肝硬化的患者成功进行肝移植治疗，近期效果良好。严律南 et al^[27]采用肝移植进行治疗，获得了成功。严律南 et al 认为其手术指征是：(1)广泛、弥漫存在的肝内胆管结石，估计通过手术及胆道镜取石难以取尽者；(2)已有多次手术史，估计再次手术无效者；(3)伴肝硬化、黄疸、肝衰者。由于肝移植费用高，手术复杂，供肝贫乏等原因，难以广泛推广。

2.4 残留和复发 在结石没有完全清除和复发肝内胆管结石的患者，反复发作的胆管炎及胆管癌的风险更高^[28]。术后经皮经肝胆管狭窄部扩张术可减轻对肝脏的进一步损伤^[29]。经皮经肝胆道逆行取石术是经皮胆管穿刺球囊导管扩张狭窄胆管，将结石顺胆管推入十二指肠内的一种治疗胆管结石的方法，第一次成功率可达 90.4%，第二次成功率可达 93.0%，肝内胆管残余结石清除率可达 98.6%，有效、安全、同时又可以保持胆道括约肌结构和功能^[30]。对于术后并发胆管狭窄的病例，还可考虑用胆道镜经 T 管放入支架扩张引流，操作简单，安全而有效^[31]。

总之，手术治疗肝内胆管结石目前已达到一个新的水平，特别是随肝脏外科水平及微创手段的发展，已没有手术禁区，结合各种诊断手段，可以大大提高肝内胆管结石治疗水平。但由于胆结石的成因仍未十分明了，肝内胆管结石复杂多发等诸多原因，单纯手术治疗，仍有部分病例难以彻底治愈，必须采用综合治疗方案才能达到理想的治疗效果。相信随着科学技术的发展和对肝内胆管结石研究的深入，肝内胆管结石最终将获得彻底性的治疗。

3 参考文献

- 1 黄志强. 黄志强胆道外科学. 济南: 山东科学技术出版社, 1999: 551-552
- 2 Kim MJ, Mitchell DG, Ito K, Outwater EK. Biliary dilatation: differentiation of benign from malignant causes-value of adding conventional MR imaging to MR cholangiopancreatography. *Radiology* 2000;214:173-181
- 3 Kubo S, Hamba H, Hirohashi K, Tsukamoto T, Kinoshita H. Doppler sonography in hepatolithiasis: a case report. *Hepatogastroenterology* 2000;47:516-518
- 4 Valero MA, Santana M, Morales M, Hernandez JL, Mas-Coma S. Risk of gallstone disease in advanced chronic phase of

- fascioliasis: an experimental study in a rat model. *J Infect Dis* 2003;188:787-793
- 5 Choi D, Hong ST, Lim JH, Cho SY, Rim HJ, Ji Z, Yuan R, Wang S. Sonographic findings of active Clonorchis sinensis infection. *J Clin Ultrasound* 2004;32:17-23
- 6 Cope C. Usefulness of a percutaneous transhepatic coaxial micro-puncture needle technique in patients with nondilated peripheral intrahepatic ducts. *Am J Roentgenol* 2003;181:1017-1020
- 7 Alfke H, El-Sheik M, Kalinowski M, Gurvit O, Heverhagen JT, Wagner HJ. Rotational digital cholangiography (RDC) and 3D-cholangiography (3DC) for guidance of percutaneous biliary drainage procedures. *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahrt* 2002;174:1375-1379
- 8 Romagnuolo J, Bardou M, Rahme E, Joseph L, Reinhold C, Barkun AN. Magnetic resonance cholangiopancreatography: a meta-analysis of test performance in suspected biliary disease. *Ann Intern Med* 2003;139:547-557
- 9 Park do H, Kim MH, Lee SS, Kim SY, Kim JH, Kim HJ, Bae JS, Seo DW, Lee SK, Kim AY, Kim TK, Min YI. Usefulness and limitation of magnetic resonance cholangiopancreatography in patients with hepatolithiasis. *Korean J Gastroenterol* 2003;42:423-430
- 10 黄志强. 肝内胆管结石治疗的现状与展望. 中国普外基础与临床杂志 2001;8:65-66
- 11 Kim YT, Byun JS, Kim J, Jang YH, Lee WJ, Ryu JK, Kim SW, Yoon YB, Kim CY. Factors predicting concurrent cholangiocarcinomas associated with hepatolithiasis. *Hepatogastroenterology* 2003;50:8-12
- 12 陈燕凌, 殷凤峙. 肝胆管结石合并肝胆管癌基础与临床研究的现状. 中华肝胆外科杂志 2001;7:579-580
- 13 Sun WB, Han BL, Cai JX. The surgical treatment of isolated left-sided hepatolithiasis: a 22-year experience. *Surgery* 2000;127:493-497
- 14 Cheung MT, Wai SH, Kwok PC. Percutaneous transhepatic choledochoscopic removal of intrahepatic stones. *Br J Surg* 2003;90:1409-1415
- 15 Lee SH, Hahn ST, Hahn HJ, Cho KJ. Single-wall puncture: a new technique for percutaneous transhepatic biliary drainage. *Am J Roentgenol* 2003;181:717-719
- 16 Lee SK, Seo DW, Myung SJ, Park ET, Lim BC, Kim HJ, Yoo KS, Park HJ, Joo YH, Kim MH, Min YI. Percutaneous transhepatic cholangioscopic treatment for hepatolithiasis: an evaluation of long-term results and risk factors for recurrence. *Gastrointest Endosc* 2001;53:318-323
- 17 Huang MH, Chen CH, Yang JC, Yang CC, Yeh YH, Chou DA, Mo LR, Yueh SK, Nien CK. Long-term outcome of percutaneous transhepatic cholangioscopic lithotomy for hepatolithiasis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2655-2662
- 18 Cheng YF, Lee TY, Sheen-Chen SM, Huang TL, Chen TY. Treatment of complicated hepatolithiasis with intrahepatic biliary stricture by ductal dilatation and stenting: long-term results. *World J Surg* 2000;24:714-716
- 19 Colovic R, Bilanovic D, Jovanovic M, Grubor N. Long-term results of reconstruction of benign stenoses of the bile ducts. *Srp Arh Celok Lek* 2003;131:55-59
- 20 周孝思. 肝内胆管结石防治方法评介. 中华实验外科杂志 2001;18:200
- 21 Tian MG, Shi WI, Wen XY, Yu HW, Huo JS, Zhou DF. Outcome of gallbladder preservation in surgical management of primary bile duct stones. *World J Gastroenterol* 2003;9:1871-1873
- 22 陈德兴, 董加纯, 赵淑清, 刁守志, 梁长禄. 胆管结石的腹腔镜手术治疗. 中国微创外科杂志 2003;3:24-25
- 23 Ebner S, Rechner J, Beller S, Erhart K, Riegler FM, Szinicz G. Laparoscopic management of common bile duct stones. *Surg Endosc* 2004;17 [Epub ahead of print]
- 24 Okugawa T, Tsuyuguchi T, K C S, Ando T, Ishihara T, Yamaguchi T, Yugi H, Saisho H. Peroral cholangioscopic treatment of hepatolithiasis: Long-term results. *Gastrointest Endosc* 2002;56:366-371
- 25 竺来法, 李建平. 钛激光碎石术在胆道结石中的临床应用(附17例报告). 中国微创外科杂志 2003;3:61-62
- 26 Strong RW, Chew SP, Wall DR, Fawcett J, Lynch SV. Liver transplantation for hepatolithiasis. *Asian J Surg* 2002;25:180-183
- 27 严律南, 卢实春, 李波, 金立人, 赵纪春, 曾勇, 程南生, 文天夫, 伍晓汀, 贾乾斌, 周涌, 李宁, 陈晓理, 汪静, 敬静, 邓承琪, 吴言涛. 肝内胆管结石症行肝脏移植(附1例报告). 中国普外基础与临床杂志 2001;8:78-80
- 28 Huang MH, Chen CH, Yang JC, Yang CC, Yeh YH, Chou DA, Mo LR, Yueh SK, Nien CK. Long-term outcome of percutaneous transhepatic cholangioscopic lithotomy for hepatolithiasis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2655-2662
- 29 Cheung MT, Wai SH, Kwok PC. Percutaneous transhepatic choledochoscopic removal of intrahepatic stones. *Br J Surg* 2003;90:1409-1415
- 30 Garcia-Garcia L, Lanciego C. Percutaneous treatment of biliary stones: sphincteroplasty and occlusion balloon for the clearance of bile duct calculi. *Am J Roentgenol* 2004;182:663-670
- 31 Chen MF, Jan YY. Biliary cutaneous stent insertion via T-tube tract by choledochoscopy. *Gastrointest Endosc* 2000;51:577-579

World Journal of Gastroenterology 点击和下载次数

《World Journal of Gastroenterology, WJG》从2003年第4-9期电子版, 实现了动态网页制做, 记录每篇论文的点击和下载次数。4-9期共发表论文322篇, 其中265篇有点击和下载次数的记录, 占82.29%, 无点击和下载次数记录的为57篇(17.70%)。2003-04-15/2003-10-13, 265篇论文的点击次数为35745, 平均每篇论文点击次数为134.89, 最高点击次数为1 918, 最低点击次数为11。其中每篇论文点击次数100次以上为131篇(49.43%); 30-99次为123篇(46.41%); 11-29次为11篇(4.15%)。最高下载次数1 087, 最低下载次数10。例如, 2003年第8期刊出的第四军医大学唐都医院感染科王全楚等撰写的“RNA interference: Antiviral weapon and beyond. World J Gastroenterol 2003;9(8):1657-1661”一文的点击次数为1 918, 下载次数为1 087。

• 文献综述 •

介入放射新技术 - 自膨式金属内支架治疗结肠梗阻

孙 龙, 官泳松

孙龙, 官泳松, 四川大学华西医院放射科 四川省成都市 610041
项目负责人: 官泳松, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院放射科.
yongsongGuan@yahoo.com
电话: 028-85421008 传真: 028-85421008
收稿日期: 2003-06-05 接受日期: 2004-03-06

摘要

金属内支架广泛应用于管腔内治疗血管、胆管、食管、气管、支气管狭窄。随着支架和释放系统设计制作工艺的进步, 及人们对微创治疗的不断追求与探索, 金属内支架又开创性地应用于治疗结肠梗阻。自膨式金属内支架(self-expanding metallic stent, SEMS)置入术能有效解除梗阻, 清洁肠道, 改善患者的全身状况, 缓解结肠梗阻引起的临床症状, 争取手术时机。对已无手术指征或因全身情况太差而难以耐受手术者, 以及因手术造成腹腔广泛粘连等患者, SEMS置入术提供了安全可靠、痛苦小的姑息性疗法。这种微创治疗新技术与外科姑息性肠减压术、分期手术、一期切除术等比较, 主要优点如下: (1)患者痛苦小, 易接受; (2)快速、安全、微创、成功率高; (3)效费比高。

孙龙, 官泳松. 介入放射新技术 - 自膨式金属内支架治疗结肠梗阻. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1416-1418
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1416.asp>

0 引言

结肠癌在发达国家中最常见的恶性肿瘤之一, 发病率居第二位。结肠癌在中国占恶性肿瘤的第三位, 仅次于肺癌及胃癌。全世界每年有 150 000 人死于结肠恶性肿瘤, 其中有 10-30% 的患者并发结肠梗阻。急性结肠梗阻是常见的外科急症, 如不能及时有效解除梗阻, 可出现肠穿孔、水电解质紊乱、肠壁缺血、毒血症等严重并发症^[1-2]。又因结肠恶性梗阻多发生在降结肠、乙状结肠及直肠, 所以结肠癌伴肠梗阻尤其是左半结肠癌伴肠梗阻的治疗最近成为最近临床医生关注的热点。目前外科主要治疗方法有: 姑息性肠减压术, 包括盲肠造瘘术、激光内转流术; 分期手术; 一期切除术, 包括一期切除、近端结肠造口术、一期切除吻合术中结肠灌洗术、结肠次全/全切除术等。在无充分的术前准备及辅助性治疗的情况下行急诊外科手术, 有高达 23% 的死亡率和约 50% 的发病率。并且手术并发症发病率高, 使患者术后长期生存率及生存质量下降^[3-4]。

自膨式金属内支架(self-expanding metallic stent, SEMS)置入术是一种通过 X 线荧光透视和/或纤维内镜的引导, 在引起狭窄的部位放置金属支架, 使狭窄的肠

腔重新扩张以解除梗阻的新技术。此类支架靠自身张力发挥扩张管腔的作用。由于支架本身具有弹性, 释放后在管腔内自行扩张, 当管壁弹力回缩和扩张后内支架的残余弹力达到平衡时, 内支架即可达到其最大管径, 而且扩张后内支架的残余弹力提供一定的摩擦力, 使支架牢固地附着与靶部位。SEMS 置入术与外科手术相比优点如下: (1)患者痛苦小, 易接受; (2)快速、安全、微创、成功率高; (3)效费比高^[5-6]。

1 金属内支架材料、类型和性能

1.1 Gianturco 支架由 0.3-0.5 mm 不锈钢铁丝编制围成 Z 型围成的分节圆柱。支架完全膨胀时直径 18-20 mm。多个支架体相连可使支架增长达 80-140 mm。中间或次节支架装有“倒钩”, 以防滑脱。目前已有多种改进型, 其中以涂硅胶的带膜支架较多见。这类支架张力大, X 线下可视性好, 扩张后长度不发生变化, 易定位。缺点是不适合在管腔走行迂曲的部位留置。

1.2 Wallstent 支架由医用不锈钢丝编制而成, 呈网眼状结构, 完全扩张后直径 14-20 mm, 长 53-104 mm。压缩时内径减小, 长度增加; 膨胀后内径增加, 长度回缩。改进型有哑铃状, 体部涂硅胶的带膜支架, 目的是防止肿瘤向腔内生长。这类支架的柔韧性非常好, 易置于管腔走行迂曲的部位, 但张力较弱, X 线下可视性不强。

1.3 Ultraflex 支架由具有弹性合金线编制成网眼状结构, 可在体温的作用下缓慢扩张。X 线下可视性比其他支架差, 但柔韧性好, 可放置于急剧转角的狭窄部位。完全扩张后直径 18 mm, 可通过外径 24-F 鞘释放。
1.4 Esophacoil 支架由单根钛镍合金钢圈, 可通过外径 32-F 鞘释放系统释^[7-9]。

2 适应证与禁忌证

2.1 适应证 (1) 可切除结肠肿瘤致结肠梗阻, 全身情况太差而难以耐受急症手术者。SEMS 置入术能有效解除梗阻, 清洁肠道, 改善患者的全身状况, 争取手术时机, 并可提高患者术后 5 a 长期生存率。(2) 不可切除结肠肿瘤, 包括恶性结肠肿瘤切除术后复发、结肠肿瘤伴远端转移; 不可切除盆腔肿瘤致结肠梗阻患者, SEMS 置入术能解除梗阻, 长期发挥胃肠减压作用, 改善患者的一般状况, 提高生活质量^[10-11]。(3) 结肠肿瘤切除术后吻合口狭窄、腹部肿瘤放疗后肠腔局部狭窄致结肠梗阻。结肠憩室炎症伴盆腔脓肿或其他结肠良性病变致结肠

梗阻. SEMS 置入术能取代外科手术, 微创、有效解除梗阻, 使患者避免手术痛苦, 节省医疗费用.

2.2 禁忌证 有临床或放射学证据表明有肠穿孔存在. 受肿瘤累及的肠腔过长或梗阻位置太高, 或结肠梗阻伴有严重肠粘连使邻近肠腔急剧扭转导丝无法穿过等^[12-14].

3 操作技术与方法

3.1 术前准备 通过术前检查或活检明确诊断. 灌肠了解梗阻位置、长度, 选择合适的支架和明确有无肠穿孔.

3.2 操作技术 在 X 线监视下经肛门通过结肠镜或递送导管将超滑导丝插送通过狭窄、梗阻段, 并使之深入梗阻上端肠腔; 保留超滑导丝退出递送导管, 经导丝引入长交换导管, 并尽可能深入(使用结肠镜推送导丝时则经结肠镜送入交换导管); 经交换导管将软头硬导丝插入梗阻段以上肠腔; 经硬导丝引入双腔导管或球囊导管行狭窄段造影观察狭窄段情况, 并选择定位标记; 退出双腔管, 选择合适支架置入推送器内外导管之间, 涂上石蜡油, 将推送器内管回抽使其前端导引软头护住支架前端; 由超硬导丝引入附支架之推送器并使其中支架前端(透视下可见)过狭窄端 30 mm; 固定推送器内管及推送管, 将外套管缓慢后撤, 使支架逐步释放. 同时调整推送器位置, 使支架置入狭窄段合适部位. 退出输送器保留硬导丝, 再引入双腔管用造影剂观察肠腔通畅情况, 需要时再用球囊导管调整支架位置.

3.3 术后处理 (1)术后观察 4-6 h, 注意生命体征, 了解有无直肠出血; (2)术后 24、48、72 h 观察肠梗阻改善情况及有无并发症发生^[15-16].

4 并发症及其防治

SEMS 置入术可有并发症, 部分研究认为早期的并发症多为轻度的腹痛不适、少量的直肠出血、轻度的肛门疼痛. 粪块造成的假性梗阻不常见, 可通过清洁灌肠解除. 这些早期并发症多不需特殊的处理. 需特殊处理的常见并发症有穿孔、支架移位、再狭窄. 在所有报道中结肠穿孔占 0-16%, 术中操作大都使用了球囊扩张. 由于自膨式金属内支架的广泛应用, 已不在推荐使用球囊扩张. SEMS 置入术结肠穿孔发生率低于 5%. 在术中或术后主述腹痛难忍的病例要高度怀疑有结肠穿孔, 明确诊断后, 需急症外科手术^[16]. 支架移位为最常见的并发症, SEMS 置入术后 1 wk 腹部平片复查有 40% 的病例发生支架移位. 需在结肠镜引导下行支架复位术或置入新支架. 支架移位多由所选用支架直径、长度与其置入狭窄段不合适而造成. 再狭窄发生率为 25%, 主要是因为肿瘤长入肠腔造成. 对于可切除结肠肿瘤致结肠梗阻, 接受 SEMS 置入术作为外科手术术前准备的患者, 这种再狭窄临床意义不大. 对于不可切除恶性肿瘤患者, 发生再狭窄后多需再置入支架. 带膜支架可减少再狭窄的发生率, 但这种支架柔韧性减低, 支架移位的发生率

较高. 因此, 新支架设计应尽量解决再狭窄和支架移位之间的矛盾关系^[17-18].

5 临床应用与评价

SEMS 置入术的优点操作简单, 容易留置, 且释放后内径较大、可保持位置固定不变. 国外报道关于 SEMS 治疗结肠肿瘤所致的急性结肠梗阻的非随机、回顾性疗效分析, 对患者进行长期随访显示了良好的支架开通率, 并使患者的长期生存率、生存质量均相对提高. X 线荧光透视和/或结肠镜引导下 SEMS 置入术均获成功, 操作成功率 80-100%. 临床梗阻缓解率为 80-92%. 梗阻位置越靠近远端结肠, 操作成功率越高.

自从 Karne et al^[19]尝试应用 SEMS 置入术治疗结肠梗阻以来, 许多医生陆续开展该项治疗. Desroches et al^[20]对 8 例患者放置内支架行术前减压, 患者平均年龄 71 岁, 均为急性左半结肠癌性梗阻. 无 1 例死亡, 仅 1 例发生并发症, 6 例肠道准备满意^[19-20]. Mainar et al^[21]在 71 例结肠恶性梗阻接受 SEMS 置入术的报道中, 成功释放支架有 64 例(90%), 有两例因无法穿过梗阻段而失败, 5 例支架位置不佳, 其中需置入新支架者 3 例. 96 h 内临床一般情况好转和腹部平片提示梗阻缓解 66 例(93%). 9 例有轻微并发症(13%), 1 例患者结肠穿孔需急诊手术. 支架放置与择期手术间隔日期是 6-16 d, 平均 8.6 d. 手术过程中支架容易辨认, 受肿瘤累及肠段顺利切除, 支架本身并没有给手术带来困难, 而且无证据表明肿瘤长入支架腔内. 58 例患者术后未发生并发症, 于术后第 8 d 出院, 其余 12 位患者术后第 12 d 出院, 术后平均住院时间为 10.3 d. 在接受 SEMS 置入术作为外科切除术前准备的结肠恶性梗阻患者中, 包括手术费用、重症监护室监护费用、住院费用、支架置入术费用的总的医疗费用与对照组比较降低了 28.8%, 费用降低的主要原因是住院时间缩短, 并发症发生率减少^[22].

Camunez et al^[23]对 80 例结、直肠癌致肠梗阻的患者放置 SEMS, 放置成功 70 例, 解除梗阻 67 例(96%). 仅 2 例发生结肠穿孔, 其中 1 例死亡. 33 例 7 d 左右行择期手术, 另 35 例仅行支架放置术. 缓解组 3 mo 生存率为 55%, 6 mo 为 44%, 9 mo 为 25%. 作者认为对于结直肠癌梗阻的治疗应用内支架为有效和安全的. 该法能有效解除梗阻, 为外科手术切除术前准备创造时间. 对那些已无手术指征或因全身情况太差而难以耐受手术者, 以及因多次腹部手术造成腹腔广泛粘连者, 内支架放置术提供了安全可靠、痛苦小的姑息性疗法. SEMS 置入术代替外科急诊手术, 使患者的生存质量得到了提高.

SEMS 置入术为微创治疗结肠梗阻开辟了一条新的途径. 但是, 受操作技术、配套器械或其他因素的制约, SEMS 置入术目前国际上主要应用于直肠及乙状结肠. 横结肠离肛门较远, 需经乙状结肠、结肠脾曲等多个小角度弯曲, 而使经肛门 SEMS 置入术有一定的技术难度. 且对支架及投送器材的制作也有特殊的要求. 有关

SEMS置入术的临床应用和疗效还有待大量随机研究和系统分析来进一步证实。SEMS置入术不断改善，特别是支架、释放系统制作工艺的进步及操作经验积累，适应证掌握更加准确。治疗效果将进一步提高，临床应用前景可观。

6 参考文献

- 1 Smothers L, Hynan L, Fleming J, Turnage R, Simmang C, Anthony T. Emergency surgery for colon carcinoma. *Dis Colon Rectum* 2003;46:24-30
- 2 Balogh A, Wittmann T, Varga L, Zollei I, Lazar G, Baradnay G, Rosztoczy A, Molnar T, Tiszlavicz L, Kiss Zsuzsa F, Nagy F. Subtotal colectomy for the treatment of obstructive left colon cancer. *Orv Hetil* 2002;143:1577-1583
- 3 Martinez-Santos C, Lobato RF, Fradejas JM, Pinto I, Ortega-Deballon P, Moreno-Azcoita M. Self-expandable stent before elective surgery vs. emergency surgery for the treatment of malignant colorectal obstructions: comparison of primary anastomosis and morbidity rates. *Dis Colon Rectum* 2002;45: 401-406
- 4 Fazio V, Messina V, Marino A, Di Trapani F, Viola V. Treatment with self-expanding metallic enteral stents in occlusion caused by neoplastic stenosis of the sigmoid and rectum. *Chir Ital* 2002;54:233-239
- 5 Saida Y, Sumiyama Y, Nagao J, Uramatsu M. Long-term prognosis of preoperative "bridge to surgery" expandable metallic stent insertion for obstructive colorectal cancer: comparison with emergency operation. *Dis Colon Rectum* 2003;46 (10 Suppl):S44-S49
- 6 Ely CA, Arregui ME. The use of enteral stents in colonic and gastric outlet obstruction. *Surg Endosc* 2003;17:89-94
- 7 Nevitt AW, Kozarek RA, Kidd R. Expandable esophageal prostheses: recognition, insertion techniques, and positioning. *Am J Roentgenol* 1996;167:1009-1013
- 8 Keymling M. Colorectal stenting. *Endoscopy* 2003;35:234-238
- 9 Maetani I, Ukita T, Inone H, Yoshida M, Igarashi Y, Sakai Y. Knitted nitinol stent insertion for various intestinal stenoses with a modified delivery system. *Gastrointest Endosc* 2001;54: 364-367
- 10 Mauro MA, Koehler RE, Baron TH. Advances in gastrointestinal intervention: the treatment of gastroduodenal and colorectal obstructions with metallic stents. *Radiology* 2000; 215:659-669
- 11 Paul L, Pinto I, Gomez H, Fernandez-Lobato R, Moyano E. Metallic stents in the treatment of benign diseases of the colon: preliminary experience in 10 cases. *Adiology* 2002;223:715-722
- 12 Friedland S, Hallenbeck J, Soetikno RM. Stenting the sigmoid colon in a terminally ill patient with prostate cancer. *J Palliat Med* 2001;4:153-156
- 13 Harris GJ, Senagore AJ, Lavery IC, Fazio VW. The management of neoplastic colorectal obstruction with colonic endolumenal stenting devices. *Am J Surg* 2001;181:499-506
- 14 Law WL, Choi HK, Chu KW, Tung HM. Radiation stricture of rectosigmoid treated with self-expanding metallic stent. *Surg Endosc* 2002;16:1106-1107
- 15 茅爱武, 杨仁杰, 高中度, 江伟骏, 毛耀根, 蒋霆辉, 范红, 范晔. 经肛门放置自膨式金属支架治疗结肠狭窄、梗阻. 世界华人消化杂志 2000;8:604-605
- 16 茅爱武, 高中度, 杨仁杰, 江伟骏, 程英升, 范红, 蒋霆辉. 金属支架治疗消化道恶性梗阻 198例. 世界华人消化杂志 2000;8:369-371
- 17 de Gregorio MA, Mainar A, Tejero E, Tobio R, Alfonso E, Pinto I, Fernandez R, Herrera M, Fernandez JA. Acute colorectal obstruction: stent placement for palliative treatment-results of a multicenter study. *Radiology* 1998;209:117-120
- 18 Wholey MH, Levine EA, Ferral H, Castaneda-Zuniga W. Initial clinical experience with colonic stent placement. *Am J Surg* 1998;175:194-197
- 19 Karnel F, Jantsch H, Niederle B. Implantation of a metal stent in a malignant stenosis in a colon interposition. *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr* 1991;154:120-122
- 20 Desroches E, Faucheron JL, Sengel C, Lachachi F, Risso O, Delannoy P, Arvieux C, Rolachon A, Letoublon C. Self-expandable metal stent in the treatment of obstructive cancer of the left colon. Preliminary results and review of the literature. *Ann Chir* 1999;53:1029-1032
- 21 Mainar A, De Gregorio Ariza MA, Tejero E, Tobio R, Alfonso E, Pinto I, Herrera M, Fernandez JA. Acute colorectal obstruction: treatment with self-expandable metallic stents before scheduled surgery-results of a multicenter study. *Radiology* 1999;210:65-69
- 22 Soonawalla Z, Thakur K, Boorman P, Macfarlane P, Sathananthan N, Parker M. Use of self-expanding metallic stents in the management of obstruction of the sigmoid colon. *Am J Roentgenol* 1998;171:633-636
- 23 Camunez F, Echenagusia A, Simo G, Turegano F, Vazquez J, Barreiro-Meiro I. Malignant colorectal obstruction treated by means of self-expanding metallic stents: effectiveness before surgery and in palliation. *Radiology* 2000;216:492-497

World Journal of Gastroenterology 荣誉

《World Journal of Gastroenterology, WJG》是我国自然科学核心期刊及全国优秀科技期刊，荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊，2001年入选中国期刊方阵“双百”期刊。2002-10-11获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助(项目批准号：30224801)，资助期限2年，资助强度为每年8万元。

• 文献综述 •

整合素与肠上皮细胞凋亡

贾震易, 秦环龙

贾震易, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科 上海市 200233
国家自然科学基金资助课题, No. 30271286
上海市科委启明星跟踪计划基金, No. 02QMB1406
项目负责人: 秦环龙, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民
医院外科. jiaqc@online. sh. cn
电话: 021-64361349
收稿日期: 2004-02-15 接受日期: 2004-03-24

摘要

整合素是一类重要的黏附分子受体。他介导着细胞与细胞外基质以及细胞间的黏附，并参与细胞的多种生理功能和病理变化。近来一些研究显示，整合素与 IEC 凋亡关系密切，但其机制尚不清楚。钙离子、cAMP、Bcl 家族、死亡受体家族及 Caspase 家族可能在整合素介导的肠上皮细胞凋亡中起着重要作用。

贾震易, 秦环龙. 整合素与肠上皮细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2004;12(6): 1419-1421

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1419.asp>

0 引言

整合素是一类重要的黏附分子受体，他广泛分布在各类细胞表面，介导着细胞与细胞外基质、细胞间的黏附。整合素还可作为介导信号传递的膜分子，通过独特的信号转导途径，参与细胞的多种生理功能和病理变化。近来一些研究显示，整合素与肠上皮细胞(IEC)凋亡关系密切，其在肠上皮细胞屏障功能中的作用亦日益受到重视，现就这方面的研究进展综述如下。

1 基本概念

整合素分布在大多数体细胞的表面，是一类重要的黏附分子受体。结构上是由 α 和 β 亚基以非共价键结合而形成的跨膜异二聚体糖蛋白。至今已发现 17 种 α 亚基和 8 种 β 亚基^[1]。 α 亚基与 β 亚基组合可形成 20 种不同的整合素，按 β 亚基不同可将整合素家族成员分为 8 组。所有 α 和 β 亚基均有较长的胞外区、跨膜区和短的胞内区组成(只有 β_4 亚基有较长的胞内区)。 α 亚基胞外区含有几个阳离子结合区，而 β 亚基的胞外区含有几个胱氨酸重复序列，胞内区比 α 亚基稍长，功能上通过结合锚定蛋白把整合素与细胞骨架联系起来^[2]。

整合素的大部分配体是细胞外基质成分，如纤维连接蛋白(Fn)、胶原蛋白(Col)和层粘连蛋白(Ln)等，个别的还能与可溶性配体如纤维蛋白原和一些细胞表面分子结合，从而介导细胞与细胞外基质以及细胞间的黏附，并通过信号传递介导胞内反应。不同的 α 亚基和

β 亚基的组合构成配体结合的特异性，其主要的识别位点是配体的精-甘-天冬氨酸 3 肽(RGD 结构)^[1]。

整合素作为一个信号传递分子介导细胞内外双向的信号传递。由于其 β 链连接于细胞骨架，故被推测为信号传递的关键，而 α 链则负责与基质的特异性黏附。此外整合素还介导细胞间的信号传递。目前认为整合素信号传递有以下几个途径：(1)[Ca²⁺]i 升高及钙激活蛋白酶的作用；(2)影响 cAMP 水平及细胞骨架的改变等；(3)局部黏附激酶(FAK)和其他酪氨酸激酶所致的酪氨酸磷酸化；(4)G- 蛋白途径；(5)影响白介素产物。

2 整合素在肠上皮细胞上的表达及其功能

同大多数体细胞一样，在 IEC 表面也分布着多种整合素受体。主要包括与层粘连蛋白结合的 $\alpha 2\beta 1$ ， $\alpha 3\beta 1$ ， $\alpha 7\beta 1$ ， $\alpha 4\beta 4$ 和 $\alpha 6\beta 4$ ，与纤维连接蛋白结合的 $\alpha 5\beta 1$ 等。不同整合素在 IEC 的分布亦有不同，如 $\alpha 2\beta 1$ 分布于隐窝处， $\alpha 3\beta 1$ 分布于绒毛底部， $\alpha 5\beta 1$ 位于隐窝及绒毛的底部， $\alpha 7\beta 1$ 则局限在隐窝顶部及绒毛底部，而 $\alpha 6\beta 4$ 则均一地分布于整个 IEC 表面^[3-4]。

整合素通过与基质蛋白结合将 IEC 与基底膜黏附在一起，并对 IEC 的生长、增生、分化、迁移等细胞活动产生重要影响。不同的整合素参与细胞活动的调节功能也不尽相同。如 $\alpha 2\beta 1$ 参与调节细胞分化、细胞迁移及肠腺的发生； $\alpha 5\beta 1$ ， $\alpha 9\beta 1$ 参与调节细胞增生；而 $\alpha 3\beta 1$ ， $\alpha 7\beta 1$ 则参与细胞分化的调控。近年来随着研究的深入，人们发现整合素还与 IEC 的凋亡密切相关^[4-5]。

大多数体细胞需要黏附于基质方能生长，称为锚着依赖性细胞，如果这类细胞从其黏附的基质处脱落即会激活细胞的自杀性程序，并可从形态学和生化特征上证实为凋亡。这种由于细胞与基底膜分离引起的凋亡亦称为“anoikis”^[6]。对于 IEC 而言，他也是锚着依赖性细胞，他的存活同样需要依附于基质蛋白。Grossmann et al^[7]研究证实一旦 IEC 与基底膜分离，3 h 后就有 90% 以上的细胞发生凋亡。整合素是介导细胞与基底膜黏附的桥梁，IEC 依靠整合素黏附于基底膜以维持细胞的生存。一旦整合素受体受到封闭或破坏，就可引起 IEC 与基底膜分离，导致细胞凋亡；相反，如果增加 IEC 表面某些整合素受体的表达，却可以提高细胞的抗凋亡能力。如 Strater et al^[8]用结肠上皮细胞株证实抗整合素 $\beta 1$ 的单抗可以阻止细胞与底部基质的黏附，并诱发了细胞凋亡。而 Lee et al^[9]以小鼠小肠细胞为模型，发现增加细胞表面整合素 $\alpha 5\beta 1$ 表达可以提高细胞的抗凋亡能力。由此看来，整合素(可

能只是某些亚型)在 IEC 液亡中起着重要作用.

3 整合素介导肠上皮细胞凋亡的机制

3.1 $\text{Ca}^{2+}/\text{cAMP}$ 离子钙是细胞内重要的第二信使, 参与细胞代谢及功能的调节. 研究表明, 钙与细胞凋亡关系密切, 主要表现为细胞内钙超载可以诱发凋亡, 而阻止细胞内钙离子浓度升高可以抑制凋亡. 这一现象最早在胸腺细胞中被揭示, 随后在淋巴细胞、骨髓细胞、心肌细胞及神经细胞中也得到证实^[10-11]. 细胞内钙超载诱发凋亡的机制尚不完全明确, 现在认为主要有两条途径, 一是通过激活下游钙依赖的凋亡相关激酶(如钙蛋白酶、钙调磷酸酶及核酸内切酶)诱发凋亡; 另一条则是通过改变线粒体膜的通透性来实现的, 胞质 Ca^{2+} 增高可使线粒体通透性转换孔(PTP)开放促使细胞色素C释放, 后者与 Apaf-1 及 caspase9 酶原结合形成凋亡复合体, 从而诱发了细胞凋亡^[12]. 最近, 在我们的一项实验中发现, 钙与 IEC 凋亡也密切相关. 我们取胎鼠的 IEC 作培养, 研究缺氧所致 IEC 凋亡与钙的关系. 发现使用钙通道阻滞剂(维拉帕米)可以降低缺氧所致的 IEC 凋亡比率, 同时还能阻止整合素受体极性分布的改变. 由此提示缺氧后胞内钙超载可能是导致 IEC 凋亡的重要离子信号, 其机制可能与钙超载诱导的整合素受体表达及极性改变有关. cAMP 也是细胞内重要的第二信使, 对调控细胞多种功能和增生有重要作用. 近来 Nishihara et al^[13]一项研究表明 cAMP 有抑制 IEC 凋亡的作用. 其机制主要与增加凋亡抑制蛋白 c-IAP2 的表达有关. 同时还有研究证实整合素 $\beta 1$ 与基底膜黏附后可以刺激 cAMP 的产生^[14]. 因此 cAMP 可能也是整合素介导 IEC 凋亡的机制之一.

3.2 Bcl 家族 Bcl-2 家族基因和蛋白是调控细胞凋亡的重要因子. 他分为抗凋亡和促凋亡两类, 前者有 Bcl-2, Bcl-w, Bcl-X_L 等, 后者包括 Bax, Bak 等. Bcl-2 家族主要通过线粒体途径影响细胞凋亡. 如 Bcl-2 等可以通过维护线粒体膜的稳定, 阻止其释放死亡因子发挥抗凋亡作用, 而 Bax, Bak 等则可使线粒体释放细胞色素 C, Apaf-1, 促进凋亡复合体的形成, 从而导致细胞凋亡^[15]. 有研究表明, 整合素与细胞外基质的结合情况可影响 Bcl-2 家族蛋白的表达及其功能, 并调节细胞凋亡. 如 Matter et al^[16]发现整合素 $\alpha 5\beta 1$ 或 $\alpha v\beta 3$ 与配基结合后可以增加 Bcl-2 的表达; de la Fuente et al^[17]发现整合素 $\alpha 4\beta 1$ 与配基结合也可以增加 Bcl-2 表达, 而 Gilmore et al^[18]将乳腺上皮细胞与基底膜分开, 发现 Bax 从胞质转入线粒体并暴露其 BH3 区域, 促使线粒体释放细胞色素 C, Apaf-1 及 caspase9, 形成凋亡复合体, 诱发凋亡. 已知 IEC 发源于隐窝处的干细胞, 经过细胞增生、分化和不断迁移, 3-5 d 后到达绒毛顶端或肠腔表面, 并在此处脱落、凋亡. 有研究显示, Bcl 家族成员在 IEC 不同部位的表达不尽相同. 抗凋亡蛋白 Bcl-2 在隐窝处含量最多, 越靠近绒毛顶端或肠腔表面, 其含量越少. 而促凋亡蛋白 Bak 却被证实在绒毛顶端含量最丰富^[19-20].

可见, Bcl 家族这种呈梯度分布的特点对保证肠上皮的增生、脱落和凋亡意义重大. 有趣的是, 还有一些研究报道 IEC 与基底膜的黏附能力也呈梯度分布, 即从隐窝底部至绒毛顶端逐渐下降^[21]. 因此可能正是由于整合素受体表达或功能逐渐变化, 形成了 IEC 的黏附力及 Bcl 家族的分布特点, 并最终导致了细胞脱落、凋亡. 此外, Rosen et al^[22]研究发现 IEC 与基底膜分离后还能使 Bcl-X_L 的表达减少, 从而促使细胞发生凋亡. 由此可见, Bcl 家族表达及功能发生变化可能是整合素介导 IEC 凋亡的重要机制.

3.3 PI-3k/Akt 与 Ras/MAPK 通路 Bcl-2 家族蛋白的表达及其功能的调节是通过整合素介导的细胞信号传导实现的. 整合素与基底膜黏附后可以激活粘着斑激酶(FAK), FAK 的激活被认为是各类细胞生存所必需的. 活化的 FAK 不仅协助生长因子受体进行信号传导, 而且可以直接激活丝裂素激活蛋白激酶(Ras/MAPK)通路及磷酸酰肌醇-3(PI-3k)通路. 通过增加细胞内抗凋亡因子表达, 抑制促凋亡因子的作用, 阻止细胞凋亡. 一旦整合素改变导致细胞与基底膜分离, FAK 及下游的信号通路就无法激活, 从而诱发细胞凋亡^[23]. PI-3k 是一种脂类激酶. 他与 FAK 结合后, 在 Ras 的参与下被激活. 活化的 PI-3k 可以进一步激活下游的蛋白激酶 B(即 PKB)成员 Akt. Akt 通过磷酸化 Bad, Bak 抑制其功能, 并通过激活核转录因子(NF_κB)等机制促进 Bcl-2 的表达. 此外还通过激活磷酸化下游的其他一系列底物(包括 caspase9, FKHR 等)和抑制细胞色素 C 释放等途径发挥抗凋亡作用. Lee et al^[9]以小鼠 IEC 为模型研究发现, 使用 PI-3K 及 Akt 抑制剂, 可使整合素 $\alpha 5\beta 1$ 失去抗凋亡作用. 由此说明某些整合素正是通过 PI-3k/Akt 通路实现其抗凋亡能力的. Ras/MAPK 通路的激活可以使下游的 Raf, MEK, ERK 等激酶活化. 他们还可以使 Bax, Bak 磷酸化, 后者一旦离开线粒体并与 14-3-3 蛋白结合就失去活性, 从而抑制了细胞凋亡^[23]. 目前这条通路的作用在 IEC 中也得到证实^[24].

3.4 死亡受体家族 死亡受体家族是从属 TNFR/NGF-R 超家族的一个亚家族. TNFR/NGF-R 超家族都具有特征性的 2-5 个富含半胱氨酸的细胞外重复序列. 死亡受体内具有细胞内死亡域(DD), 这一区域是转导细胞凋亡信号所必需的. 目前已知死亡受体亚家族有 6 个, 其中 Fas 和 TNFR1 是研究较为清楚的两个. 死亡受体通过相对应的天然配体而活化. 这些配体与其受体相对应形成死亡配体系统, 称为 TNF 家族. 死亡受体的配体多为 II 型跨膜蛋白, 对应 Fas 和 TNFR1 的配体分别是死亡受体配基(FasL)和 TNF- α . Aoudjit et al^[25]研究发现在 T 淋巴细胞中整合素 $\alpha 2\beta 1$ 与其配基的结合可以抑制 FasL 的表达. 他们还报道在内皮细胞中整合素与细胞外基质的黏附可以保证细胞骨架的完整, 一旦减少死亡受体(Fas)及其配基(FasL)的表达及活动就可抑制细胞凋亡^[26]. Frisch et al^[27]报道破坏整合素与细胞外基质的黏附, 可以使细胞骨架中的肌动蛋白构型改变, 诱发 Fas 聚集、诱导死亡信

号复合物(DISC)形成, 从而导致细胞凋亡。Rosen et al证实IEC与基底膜的分离也可以导致FasL增加, 触发细胞凋亡, 其机制与P38 MAPK通路的激活及Bcl-X_L的表达下降有关, 但整合素在其中发挥的作用尚不清楚。

3.5 Caspase家族 不论是线粒体介导的凋亡途径还是死亡受体介导的凋亡途径, 都要通过激活Caspase家族产生凋亡效应。Caspase是一个日益增大的半胱氨酸蛋白酶家族。目前已发现14种以上Caspase家族成员, 命名为Caspase1-14。其中大多都参与凋亡有关的生理性或病理性过程。参与诱导细胞凋亡的Caspase可分为两大类, 一类是启动酶, 包括Caspase2, 8, 9, 10; 另一类为效应酶, 包括Caspase3, 6, 7。Caspase通过级联反应依次激活, 一般启动酶在先, 效应酶在后, 但根据不同的凋亡诱因可有不同的激活顺序。效应酶通过降解DNA、裂解抗凋亡蛋白和裂解细胞骨架蛋白等一系列作用诱导细胞凋亡。目前, Caspase家族与整合素介导的IEC凋亡的关系知之甚少。Grossmann et al^[7]的实验发现IEC与基底膜分离后, 15 min内启动酶Caspase2, 9即被激活, 以后效应酶Caspase7, 3, 6依次激活。Caspase8也在大约45-60 min内激活。但该实验未对整合素做进一步研究。最近Levy et al^[32]的一项研究发现丁酸(NaBT)可以使Caco-2细胞表面整合素β1的表达下降, 导致细胞从基底膜脱落并发生凋亡。同时还发现经NaBT处理后90 min, Caco-2细胞内即可检测到Caspase3的活动, 由此提示整合素β1的表达减少可能与Caspase3激活密切相关, 并因此导致了Caco-2细胞凋亡。

总之, IEC凋亡是肠黏膜自我更新所必需的, 他保证了肠道结构和功能的完整。IEC凋亡的研究对肠屏障功能障碍、毒素和细菌易位的治疗均有重要的临床意义。目前整合素受体含量、整合素受体分布与极性变化及整合素其他信号传导途径如钙离子及其通道、cAMP等与IEC凋亡之间的分子机制尚不明确, 还有待更深入的研究。

4 参考文献

- 1 Kumar CC. Signaling by integrin receptors. *Oncogene* 1998; 17:1365-1373
- 2 de Melker AA, Sonnenberg A. Integrin:alternative splicing as a mechanism to regulate ligand binding and integrin signaling events. *Bioessays* 1999;21:499-509
- 3 Beaulieu JF. Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci* 1999; 4:D310-D321
- 4 Beaulieu JF. Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J Cell Sci* 1992;102(Pt 3):427-436
- 5 Basora N, Vachon PH, Herring-Gilliam FE, Perreault N, Beaulieu JF. Relation between integrin alpha7Bbeta1 expression in human intestinal cells and enterocytic differentiation. *Gastroenterology* 1997;113:1510-1521
- 6 Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994;124: 619-626
- 7 Grossmann J, Walther K, Artinger M, Kiessling S, Schölmerich J. Apoptotic signaling during initiation of detachment-induced apoptosis ("Anoikis") of primary human intestinal epithelial cells. *Cell Growth Differ* 2001;12:147-155
- 8 Strater J, Wedding U, Barth TF, Koretz K, Elsing C, Moller P. Rapid onset of apoptosis in vitro follows disruption of beta 1-integrin/matrix interactions in human colonic crypt cells. *Gastroenterology* 1996;110:1776-1784
- 9 Lee JW, Julian RL. alpha5beta1 integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 2000;11:1973-1987
- 10 Manion MK, Su Z, Villain M, Blalock JE. A new type of Ca²⁺ channel blocker that targets Ca²⁺ sensors and prevents Ca²⁺-mediated apoptosis. *FASEB J* 2000;14:1297-1306
- 11 Chen SJ, Bradley ME, Lee TC. Chemical hypoxia triggers apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes: modulation by calcium-regulated proteases and protein kinases. *Mol Cell Biochem* 1998;178:141-149
- 12 Szalai G, Krishnamurthy R, Hajnoczky G. Apoptosis driven by IP3-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J* 1999; 18:6349-6354
- 13 Nishihara H, Kizaka-kondoh S, Insel PA, Eckmann L. Inhibition of apoptosis in normal and transformed intestinal epithelial cells by cAMP through induction of inhibitor of apoptosis protein (IAP)-2. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100:8921-8926
- 14 Whittard JD, Akiyama SK. Positive regulation of cell-cell and cell-substrate adhesion by protein kinase A. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 18):3265-3272
- 15 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-1326
- 16 Matter ML, Ruoslahti E. A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)-beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem* 2001;276:27757-27763
- 17 de la Fuente MT, Casanova B, Garcia-Gila M, Silva A, Garcia-Pardo A. Fibronectin interaction with alpha4beta1 integrin prevents apoptosis in B cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with Bcl-2 and Bax. *Leukemia* 1999;13:266-267
- 18 Gilmore AP, Metcalfe AD, Romer LH, Streuli CH. Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol* 2000 ;149:431-446
- 19 Merritt AJ, Potten CS, Watson AJ, Yoh DY, Nakayama K, Nakayama K, Hickman JA. Differential expression of Bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Sci* 1995;108(Pt 6):2261-2271
- 20 Moss SF, Agarwal B, Arber N, Guan RJ, Krajewska M, Krajewski S, Reed JC, Holt PR. Increased intestinal Bak expression results in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;223:199-203
- 21 Gauthier R, Harnois C, Drolet JF, Reed JF, Vézina A, Vachon PH. Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C1540-C1554
- 22 Rosen K, Coll ML, Li A, Filmus J. Transforming growth Factor-α prevents detachment-induced inhibition of c-Src kinase activity, Bcl-XL Down-regulation, and apoptosis of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2001;276:37273-37279
- 23 Stupack DG, Cheresh DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 19):3729-3738
- 24 Waetzig GH, Seegert D, Rosenstiel P, Nikolaus S, Schreiber S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF alpha-signaling in inflammatory bowel disease. *J Immunol* 2002;168:5342-51
- 25 Aoudjit F, Vuori K. Engagement of the alpha2beta1 integrin inhibits Fas ligand expression and activation-induced cell death in T cells in a focal adhesion kinase-dependent manner. *Blood* 2000;95:2044-2051
- 26 Aoudjit F, Vuori K. Matrix attachment regulates Fas-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-flip and implications for anoikis. *J Cell Biol* 2001;152:633-643
- 27 Frisch SM. Evidence for a function of death-receptor-related, death-domain-contain proteins in anoikis. *Curr Biol* 1999;9: 1047-1049

• 文献综述 •

肝动脉化疗栓塞治疗肝癌

冯 勇, 刘 君

冯勇, 泰山医学院附属医院 山东省泰安市 271000
刘君, 泰安市中心医院 山东省泰安市 271000
项目负责人: 冯勇, 271000, 山东省泰安市泰山大街 706 号, 泰山医学院附属医院肿瘤中心. yahang@sina.com
电话: 0538-8417152 传真: 0538-8420042
收稿日期: 2003-09-15 接受日期: 2004-02-09

摘要

肝动脉化疗栓塞(TACE)是不能手术切除肝癌的首选治疗方法, 该技术诞生 30 a 来不断的完善和提高, 目前已在全球得到广泛应用, 尤其是近年来TACE技术有了长足的发展. 螺旋CT的临床应用为TACE术前病情分析及制定切实可行的方案提供了有力的保障, 同时也为TACE术后疗效判断和进一步治疗提供了理论指导. 在具体操作上, 个体化、大剂量的碘油可明显提高TACE治疗肝癌的疗效, 改善患者的预后. 经过长期的临床观察和经验积累, 大家已经认识到由于肝癌血供丰富, TACE后新生血管的产生, 侧支循环地建立等因素的制约, 单纯的TACE不容易达到理想的治疗效果, 综合治疗才是TACE 技术的发展方向, 例如配合经皮肝穿刺乙醇注射可明显提高治疗效果. 同时基础研究是TACE技术进一步完善的前提, 动物模型地建立为血管生成抑制剂的试用提供了机会, TACE后肝癌特异性蛋白质地检测, 如Bax与Bcl-2、PCNA等, 为临床工作指明了努力的方向. 历史已经证明, 经过大家的不断努力, TACE技术正在逐渐完善和提高.

冯勇, 刘君. 肝动脉化疗栓塞治疗肝癌. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1422-1426
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1422.asp>

0 引言

1974 年 Doyou 首先报道运用肝动脉栓塞术治疗肝癌, 这一技术随着在临床工作中的实际应用, 日趋完善和提高, 已发展成为肝动脉化疗栓塞(transcatheter hepatic arterial chemoembolization, TACE)技术, 并在全球得到了广泛开展和应用, 成为不能手术切除肝癌的首选治疗方法, 同时也取得了较好的疗效^[1-10]. 但是由于各种原因的影响, 如肝癌的多重血供、侧支循环的建立等, TACE 治疗肝癌仍是一种姑息性方法, 远期疗效不理想^[11-20]. 所以 30 a 来大家一直在不断探索, 试图努力完善和提高 TACE 技术. 近年来由于检查手段的提高, 临床经验的积累, 基础研究的深入, 在 TACE 治疗肝癌方面有了长足的发展, 综述如下:

1 螺旋 CT 促进了 TACE 的发展

近几年来螺旋 CT 在临床上的应用为 TACE 治疗肝癌提供了强有力的支持^[21-23]. TACE治疗肝癌的主要机制是通过栓塞剂(如碘油等)来栓塞肿瘤的血管, 使其血液供应障碍, 引起肿瘤缺血、缺氧而坏死. 因此, 肝癌行 TACE治疗前了解和掌握其血液供应情况对制定具体方案非常必要. 此前这一工作均在 TACE 的同时完成, 即肝动脉插管成功后先进行数字减影肝动脉造影(digital subtraction angiography, DSA), 来了解肝癌的血液供应等情况, 也非常直观和实用, 对 TACE 实施有很好的指导意义. 但也存在不足, 肝癌 80% 以上血供来自动脉, 其余来自门静脉, 所以这种检查方法不能反应门静脉参与肿瘤供血的情况, 门静脉供血的存在是 TACE 治疗肝癌坏死不完全的原因之一, 而螺旋 CT 的出现正弥补了这一不足. 运用螺旋 CT 双期扫描技术可分别显示肝癌动脉和门静脉的供血情况, 方法是: 用高压注射器经前臂静脉注入对比剂, 如碘普罗胺 80-100 mL (300 mgI/mL) 等, 注入的速度为 3 mL/s, 而后进行螺旋 CT 双期延迟扫描, 注药后 18-25s 扫描为肝动脉期, 60 s 为门静脉期. 若在门静脉期肿瘤有强化, 即说明该肿瘤存在门静脉供血, 对这样的肝癌行单纯 TACE 治疗效果不理想.

肝癌发生肝动脉- 门静脉分流(arterioportal shunt, APS)的机会很大, 尤其是肿瘤累及门静脉时发生率为 63%. APS 严重影响 TACE 治疗肝癌的效果, 同时其自身也引起严重的门静脉高压症状, 如腹水、上消化道出血等, 直接影响患者的预后. 以往 APS 的诊断主要依靠于 DSA, 虽然其是一种非常有效的检查方法, 但是, 这是一种有创的检查手段, 在一定程度上限制了其临床使用, 使不少肝癌患者失去了治疗机会. 已经证实螺旋 CT 诊断肝癌合并 APS 与 DSA 具有同样理想的效果^[24-26], 甚至优于 DSA, 尤其是对近端的 APS, 敏感度为 100.0%, 准确度达 96.4%, 并且具有方便、快捷、无创的优点, 这对肝癌患者进行 TACE 治疗有很好的指导意义. 对于这样的肝癌患者行 TACE 治疗时, 应首先进行 APS 的栓塞, 栓塞剂可用明胶海绵、弹簧圈等, 而后再行 TACE 灌注化疗药物和碘油, 既能纠正患者门脉高压的症状, 又能起到较好治疗肝癌的作用. 螺旋 CT 检查近端 APS 的直接征象是: 肝动脉期门静脉主干和 / 或第一级分支提早显影, 其门静脉显影密度大于脾静脉或肠系膜上静脉, 甚至接近于主动脉. 间接征象为: 肝动脉期肿瘤所在的非癌肝实质强化, 门静脉期该区域密度与其他部位非癌肝组织一致.

肝癌在TACE之前行螺旋CT双期检查有很好的使用价值,同样肝癌TACE之后行该检查也有非常好的临床意义^[21],对于判断TACE的治疗效果,指导进一步的治疗,估计患者的预后都很有帮助。肝癌经TACE治疗后行螺旋CT肝双期扫描,不但可观察到肿瘤非坏死区域的低密度区,还可观察到该部位的血液供应情况。已证实肝癌TACE后螺旋CT双期扫描发现,残留的非坏死癌组织中94.1%有动脉供血存在,50.0%有门静脉供血。前者我们在分析原因时要想到,可能存在有肿瘤肝外动脉供血的情况^[27-28],且可根据其部位来估计肝外供血的血管,例如肿瘤位于肝脏的右下脏面时要想到胃十二指肠动脉,位于左叶时可能是胃左动脉、左膈动脉等,对以后的TACE具有很好的指导作用,针对性强,可明显提高治疗效果。对残癌中存在有门静脉供血者,可配合其他治疗来提高疗效。

螺旋CT在肝癌的TACE治疗中有很好的指导作用,与DSA相比有方便、快捷、无创的特点,但仍有不足。虽然他能通过对肝脏的双期扫描显示肝癌的动脉供血情况,但是肝癌存在许多肝外动脉供血,螺旋CT不能明确诊断。因此,在螺旋CT肝双期检查的基础上,配合TACE时的DSA检查,对TACE治疗肝癌能起到更好的作用。

2 大剂量碘油能提高TACE的疗效

目前临幊上TACE治疗肝癌主要还是用碘油作为栓塞剂,实践证明是非常有效的,现在看来采用个体化、大剂量的碘油作栓塞剂的治疗效果明显优于常规小剂量^[22, 29-30]。临幊研究已经证实,将不能手术切除的大肝癌患者473例分为两组,A组216例采用大剂量碘油20-53 mL,平均28.3 mL;B组257例采用常规小剂量5-15 mL,平均11.8 mL。结果A组手术切除率和肿瘤完全坏死率均高于B组($P < 0.05$),同时生存率也高于B组($P < 0.01$)。所以,大剂量碘油(20-40 mL)经TACE治疗大肝癌且血管丰富者,与常规小剂量比较其治疗效果是肯定的,但要求患者肝功能Childs A级,或ICG-R<20%,否则会增加TACE后发生肝功能衰竭的危险性。该方法不但可以阻塞肿瘤的动脉供血,同时还阻塞了肿瘤的门静脉供血,起到双重栓塞的作用,引起的肿瘤坏死更完全,相应的治疗效果更好。原理是肝动脉与门静脉存在吻合支,一般情况下动脉压高于门脉压8倍,并在此水平保持平衡,且呈关闭状态,只有当二者任何一方压力升高时该吻合才开放。在行大剂量碘油肝动脉灌注时,可使该吻合开放,碘油就由动脉端进入到对侧的小门静脉,即起到双重栓塞的功效。

TACE大剂量碘油治疗肝癌时一定要个体化,做到因人而异,制定个体化的治疗方案,不能一概而论,判断的依据除根据肿瘤的大小外,还要看肿瘤的血液供应情况。根据肿瘤的血供可将肝癌分为4型^[21],(1)多血供型,螺旋CT肝双期扫描动脉期与门静脉期强化均

明显,示肿瘤的血供丰富;(2)少血供型,表现为双期强化均不明显;(3)混合性血供型,肿瘤内既有多血供区,也有少血供区,二者混合存在;(4)合并有动静脉瘘的肝癌患者。具体操作时,多血供者碘油灌注量为肿瘤最大径的2-3倍,即肿瘤10 cm,碘油用量20-30 mL;少血供型碘油的用量与肿瘤的最大径一致;其他两型都视情况而定。通过这种方法治疗肝癌患者的有效率为84.0%,明显高于对照组(46.0%),多血供型的肝癌占75.0%,这部分患者TACE治疗的预后好^[31]。

自TACE用于肝癌治疗以来,为了提高疗效,栓塞剂的应用也很多,但经得起时间考验的仍是碘油。近来美国学者用聚乙烯乙醇做栓塞剂取得了很好的疗效^[32]。另外,国内有学者用聚乳酸/羟乙酸同样效果不错^[33]。

3 综合治疗是TACE的发展方向

由于肝癌存在肝外动脉、门静脉供血,TACE治疗肝癌仍不能达到根治目的,单纯TACE不能解决这些问题。有不少学者认为TACE配合其他治疗手段^[12, 19, 34-36]具有较好的治疗效果。

TACE配合经皮乙醇注射(percutaneou ethanol injection, PEI)对肝癌的治疗效果明显优于单纯TACE。在这方面,日本学者在小肝癌的研究上做了大量的工作^[37-38]。研究证实,直径小于3 cm的肝癌经TACE+PEI治疗后,残留非坏死癌组织为3.7%,对照组高达34.2%,且3 a后复发率分别是19.3%和80.1%,5 a生存率是50.0%,而单纯TACE组只有24.0%,没有出现严重的并发症。同时我国大陆和台湾的学者也做了类似的研究^[39-40],得到的结果也是一致的,均证实TACE+PEI治疗肝癌比单纯的TACE效果要好,但要注意患者肝功能情况,还提示肿瘤大于5 cm时远期疗效不好。

肝癌存在的门静脉供血是制约TACE疗效提高的重要因素之一,为解决该问题近来有报道,采用B超引导下经皮肝穿刺门静脉栓塞(portal vein embolization, PVE)配合TACE治疗肝癌^[41],较单纯TACE可明显改善肝癌患者的预后。因此,认为TACE+PVE是治疗肝癌的有效方法。

TACE治疗肝癌远期疗效不好,与TACE后侧支循环建立有直接关系,包括肝内侧支循环与肝外侧支循环两部分,TACE配合手术切除是解决这一难题的有效方法。不能手术切除的大肝癌经TACE后肿瘤坏死并缩小,使之得到二期手术切除的机会,为这部分患者的治疗开辟了一条很好的途径^[42-43],同时也有效减少和避免了TACE后的复发和转移。因为TACE往往不能使全部肿瘤坏死,致使残留的癌细胞附着能力下降,并且肿瘤血管结构不完整,易发生转移^[44-45]。同时要注意,对于能手术切除的肝癌要及时进行切除,不可行TACE后再二期手术^[46-47],除了有上述不利因素外,还增加了手术难度。还有文献介绍,包括肝硬化伴小肝癌的患者进行肝移植等外科手术,配合TACE治疗肝癌已在临

床上开展^[48-50],并取得了较好的疗效。

也有资料介绍TACE配合冷冻疗法、经皮微波凝固、放疗等也能改善肝癌患者的预后^[51-54]。因此,我们可推断单纯的TACE治疗肝癌存在有明显不足,配合其他治疗措施是非常必要的。但一定要注意患者肝功能的情况^[55-57]。

4 基础研究促进了TACE的提高

近几年来TACE在基础研究方面取得的成绩,对临幊上应用该技术治疗肝癌起到了很好的指导作用,发现了一些存在的问题,明确了努力的方向。用walker-256肿瘤细胞株建立的Wistar大鼠肝肿瘤模型,与人肝肿瘤生长模式非常接近,血管造影观察到该肿瘤血管丰富,与人类的肝癌一样也是以肝动脉供血为主^[58],这种肝肿瘤的动物模型能够进行TACE的实施,为TACE的基础研究提供了保障。另外,用VX2肿瘤细胞株建立的兔肝肿瘤模型也可进行TACE操作^[59],由于兔相对较大,肝动脉内径比大鼠的要大的多,具体操作起来相对简单。

TACE治疗肝癌继发的新生血管产生,侧支循环的建立是一个非常棘手的问题。血管的增生与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的关系非常密切,而TACE引起肝癌血供障碍、缺氧及肿瘤坏死,同时缺氧和坏死组织均能刺激VEGF的产生,继而促进新生血管的产生^[60-62],这是TACE治疗肝癌不彻底的原因之一。VEGF还有增加血管通透性的作用,再加上肿瘤血管结构不完整等因素,有利于肿瘤细胞进入血液循环发生转移,这与临床观察结果相一致^[63]。血管生成抑制剂TNP-470为这一难题的解决提供了强有力的武器^[64-65],动物试验证明^[58, 66],配合应用血管生成抑制剂TNP-470肝动脉灌注,能有效消除上述不良影响,对试验肿瘤有很好的治疗作用。

细胞凋亡(apoptosis)是细胞接受刺激信号后一种主动的,并由相关基因控制的细胞程序性死亡,其中Bcl-2蛋白是一种公认的细胞凋亡抑制基因^[67-68],而Bax是Bcl-2的同源蛋白,Bcl-2与Bax二者的比率决定着细胞凋亡的速率。有文献^[69]介绍,肝癌经TACE治疗后二期手术切除,用免疫组化技术观察到,肿瘤细胞的凋亡指数(apoptotic index, AI)和Bax表达水平均升高,而Bcl-2,Bcl-2与Bax的比值却有明显的降低,与单存手术切除组有明显差异($P < 0.05$)。所以TACE治疗肝癌有促进肿瘤细胞凋亡的作用。

但是,也有研究观察到TACE有促进肝癌细胞增生的作用。TACE治疗肝癌使肿瘤不同程度的坏死、缩小,这是非常好的一面,可同时也发现残留的癌细胞增生细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达却增强了^[46, 70]。PCNA是一种公认的反映细胞增生状态的指标蛋白,该蛋白量增大,肿瘤发生浸润生长与转移的能力就强。因为PCNA是真核细胞DNA聚合酶的

辅助蛋白,主要存在于S期,在一定程度上PCNA的表达与肝癌的恶性程度密切相关^[71-72],可用来判断肿瘤患者的预后。TACE致使PCNA高表达的原因可能是,肝癌经TACE治疗后肿瘤组织大量坏死,少量残留的癌细胞本能性的代偿性增生,使G0期细胞进入到S期,这些肿瘤细胞增生活跃,也就表现为PCNA的高表达,从一个侧面可解释肝癌患者TACE治疗远期疗效不好的原因。所以TACE后适时的二期手术切除是非常必要的,不能手术切除的大肝癌正是由于TACE治疗,使肿瘤坏死、缩小,纤维组织增生,包膜甚至包囊形成,使二期手术方有机会实施。但是我们也清楚的看到,大肝癌TACE后二期切除的机率还很低,约10%左右,还有待进一步提高。

为了了解TACE治疗肝癌对患者预后的影响,所以就TACE对抑癌基因p53及nm23的表达也进行了研究观察^[46, 70],nm23是一种公认的转移抑制基因,TACE对这两种基因表达没有显著性影响,这可能与TACE后到二期手术切除的时间有关,由于这段时间较长,原来基因的表达物质逐渐被代谢,同时随着时间的推移,该基因的表达又恢复原来的水平,所以会有上述结果。

虽然TACE治疗肝癌还存在不少问题,但仍不失是一种有效的治疗手段,尤其是对不能手术切除的大肝癌更有意义。30年来TACE技术已在全球得到广泛开展应用,我们相信经过大家的不懈努力,TACE技术将发展的更加完善。

5 参考文献

- Yuen MF, Chan AO, Wong BC, Hui CK, Ooi GC, Tso WK, Yuan HJ, Wong DK, Lai CL. Transarterial chemoembolization for inoperable, early stage hepatocellular carcinoma in patients with Child-Pugh grade A and B: results of a comparative study in 96 Chinese patients. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1181-1185
- O'Suilleabhain CB, Poon RT, Yong JL, Ooi GC, Tso WK, Fan ST. Factors predictive of 5-year survival after transarterial chemoembolization for inoperable hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 2003;90:325-331
- Roche A, Girish BV, de Baere T, Baudin E, Boige V, Elias D, Lasser P, Schlumberger M, Ducreux M. Trans-catheter arterial chemoembolization as first-line treatment for hepatic metastases from endocrine tumors. *Eur Radiol* 2003;13:136-140
- Song BC, Suh DJ, Yang SH, Lee HC, Chung YH, Sung KB, Lee YS. Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein as a prognostic marker in patients with hepatocellular carcinoma undergoing transcatheter arterial chemoembolization. *J Clin Gastroenterol* 2002;35:398-402
- Lee HS, Kim KM, Yoon JH, Lee TR, Suh KS, Lee KU, Chung JW, Park JH, Kim CY. Therapeutic efficacy of transcatheter arterial chemoembolization as compared with hepatic resection in hepatocellular carcinoma patients with compensated liver function in a hepatitis B virus-endemic area: a prospective cohort study. *J Clin Oncol* 2002;20:4459-4465
- Lee KH, Sung KB, Lee DY, Park SJ, Kim KW, Yu JS. Transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: anatomic and hemodynamic considerations in the hepatic artery and portal vein. *Radiographics* 2002;22:1077-1091
- Lopez RR Jr, Pan SH, Hoffman AL, Ramirez C, Rojter SE, Ramos H, McMonigle M, Lois J. Comparison of transarterial chemoembolization in patients with unresectable, diffuse vs

- focal hepatocellular carcinoma. *Arch Surg* 2002;137:653-657
- 8 Lee JK, Chung YH, Song BC, Shin JW, Choi WB, Yang SH, Yoon HK, Sung KB, Lee YS, Suh DJ. Recurrences of hepatocellular carcinoma following initial remission by transcatheter arterial chemoembolization. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:52-58
- 9 Poyanli A, Rozanes I, Acunas B, Sencer S. Palliative treatment of hepatocellular carcinoma by chemoembolization. *Acta Radiol* 2001;42:602-607
- 10 Cheng JH, Chang G, Wu WY. A controlled clinical study between hepatic arterial infusion with embolized curcuma aromatic oil and chemical drugs in treating primary liver cancer. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2001;21:165-167
- 11 Saccheri S, Lovaria A, Sangiovanni A, Nicolini A, De Fazio C, Ronchi G, Fasani P, Del Ninno E, Colombo M. Segmental transcatheter arterial chemoembolization treatment in patients with cirrhosis and inoperable hepatocellular carcinomas. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13:995-999
- 12 Achenbach T, Seifert JK, Pitton MB, Schunk K, Junginger T. Chemoembolization for primary liver cancer. *Eur J Surg Oncol* 2002;28:37-41
- 13 Zangos S, Gille T, Eichler K, Engelmann K, Woitaschek D, Balzer JO, Mack MG, Thalhammer A, Vogl TJ. Transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinomas: technique, indications, results. *Radiologe* 2001;41:906-914
- 14 Chan AO, Yuen MF, Hui CK, Tso WK, Lai CL. A prospective study regarding the complications of transcatheter intraarterial lipiodol chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;94:1747-1752
- 15 Loewe C, Cejna M, Schoder M, Thurnher MM, Lammer J, Thurnher SA. Arterial embolization of unresectable hepatocellular carcinoma with use of cyanoacrylate and lipiodol. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13:61-69
- 16 Chan AO, Yuen MF, Hui CK, Tso WK, Lai CL. A prospective study regarding the complications of transcatheter intraarterial lipiodol chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2002;94:1747-1752
- 17 Kim YB, Park YN, Park C. Increased proliferation activities of vascular endothelial cells and tumour cells in residual hepatocellular carcinoma following transcatheter arterial embolization. *Histopathology* 2001;38:160-166
- 18 Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, Fan ST, Wong J. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:1164-1171
- 19 Ramsey DE, Kernagis LY, Soulen MC, Geschwind JF. Chemoembolization of hepatocellular carcinoma. *J Vasc Interv Radiol* 2002;13(9 Pt 2):S211-S221
- 20 Favoulet P, Cercueil JP, Faure P, Osmak L, Isambert N, Beltramo JL, Cognet F, Krause D, Bedenne L, Chauffert B. Increased cytotoxicity and stability of Lipiodol-pirarubicin emulsion compared to classical doxorubicin-Lipiodol: potential advantage for chemoembolization of unresectable hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs* 2001;12:801-806
- 21 Tan LL, Li YB, Chen DJ, Li SX, Jiang JD, Li ZM. Helical dual-phase CT scan in evaluating blood supply of primary hepatocellular carcinoma after transcatheter hepatic artery chemoembolization with lipiodol. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2003;25:82-84
- 22 Cheng HY, Xu AM, Chen D, Jia YC. Adjustment of lipiodol dose according to tumor blood supply during the transcatheter arterial chemoembolization for large hepatic carcinoma by multidetector helical CT. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2003;25:186-189
- 23 Kim HC, Kim AY, Han JK, Chung JW, Lee JY, Park JH, Choi BI. Hepatic arterial and portal venous phase helical CT in patients treated with transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: added value of unenhanced images. *Radiology* 2002;225:773-780
- 24 Kim KW, Kim TK, Han JK, Kim AY, Lee HJ, Choi BI. Hepatic hemangiomas with arterioportal shunt: findings at two-phase CT. *Radiology* 2001;219:707-711
- 25 Chen JH, Huang CL, Hwang JI, Lee SK, Shen WC. Dynamic helical biphasic CT emerges as a potential tool for the diagnosis of proximal arterioportal shunting. *Hepatogastroenterology* 1999;46:1791-1797
- 26 Quiroga S, Sebastia MC, Moreiras M, Pallisa E, Rius JM, Alvarez-Castells A. Intrahepatic arterioportal shunt: helical CT findings. *Eur Radiol* 1999;9:1126-1130
- 27 Li C, Guo Y, Tian G, Shi Z, Liu D, Zeng H, Jiang W, Li H, Zhou C. Extrahepatic arterial blood supply of hepatocellular carcinoma and interventional treatment. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2002;24:163-166
- 28 Park SI, Lee do Y, Won JY, Lee JT. Extrahepatic collateral supply of hepatocellular carcinoma by the intercostal arteries. *J Vasc Interv Radiol* 2003;14:461-468
- 29 Chen MS, Li JQ, Zhang YQ, Lu LX, Zhang WZ, Yuan YF, Guo YP, Lin XJ, Li GH. High-dose iodized oil transcatheter arterial chemoembolization for patients with large hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:74-78
- 30 Chen M, Li J, Zhang Y. Transarterial chemoembolization with high dose iodized oil for the treatment of large hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001;23:165-167
- 31 Katyal S, Oliver JH, Peterson MS, Chang PJ, Baron RL, Carr BI. Prognostic significance of arterial phase CT for prediction of response to transcatheter arterial chemoembolization in unresectable hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis. *Am J Roentgenol* 2000;175:1665-1672
- 32 Geschwind JF, Ramsey DE, Van Der Wal BC, Kobeiter H, Juluru K, Hartnell GG, Choti MA. Transcatheter arterial chemoembolization of liver tumors: effects of embolization protocol on injectable volume of chemotherapy and subsequent arterial patency. *Cardiovasc Interv Radiol* 2003;26:111-117
- 33 Ling CQ, Li Q, Liu XH, Chen QH, Peng YH, Luo RY, Huang XQ. Infusion of Melittin-poly lactic-co-glycolic acid microspheres via hepatic artery for hepatocarcinoma in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:900-903
- 34 Achenbach T, Seifert JK, Pitton MB, Schunk K, Junginger T. Chemoembolization for primary liver cancer. *Eur J Surg Oncol* 2002;28:37-41
- 35 Rui J, Wang S, Chen S. A surgery oriented serial treatments of 191 patients with large primary liver cancer. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001;23:417-419
- 36 Tang Z, Zhou X, Lin Z, Yang B, Ma Z, Ye S, Wu Z, Fan J, Liu Y, Liu K, Qin L, Tian J, Sun H, He B, Xia J, Qiu S, Zhou J. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma and related basic research with special reference to recurrence and metastasis. *Chin Med J (Engl)* 1999;112:887-891
- 37 Kamada K, Kitamoto M, Aikata H, Kawakami Y, Kono H, Imamura M, Nakanishi T, Chayama K. Combination of transcatheter arterial chemoembolization using cisplatin-lipiodol suspension and percutaneous ethanol injection for treatment of advanced small hepatocellular carcinoma. *Am J Surg* 2002;184:284-290
- 38 Koda M, Murawaki Y, Mitsuda A, Oyama K, Okamoto K, Idobe Y, Suou T, Kawasaki H. Combination therapy with transcatheter arterial chemoembolization and percutaneous ethanol injection compared with percutaneous ethanol injection alone for patients with small hepatocellular carcinoma: a randomized control study. *Cancer* 2001;92:1516-1524
- 39 Li C, Shi Z, Hao Y. Combined percutaneous ethanol injection through liver puncture and transcatheter hepatic arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001;23:490-492
- 40 Li YH, Wang CS, Liao LY, Wang CK, Shih LS, Chen RC, Chen PH. Long-term survival of Taiwanese patients with hepatocellular carcinoma after combination therapy with transcatheter arterial chemoembolization and percutaneous ethanol injection. *J Formos Med Assoc* 2003;102:141-146
- 41 Mao G, Yu Z, Zhang Y, Cheng J. Combined transcatheter arterial chemoembolization and beta-ultrasound guided portal

- vein embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2002;24:391-393
- 42 Fan J, Tang ZY, Yu YQ, Wu ZQ, Ma ZC, Zhou XD, Zhou J, Qiu SJ, Lu JZ. Improved survival with resection after transcatheter arterial chemoembolization (TACE) for unresectable hepatocellular carcinoma. *Dig Surg* 1998;15:674-678
- 43 Zhang Z, Wu M, Liu Q. The effect of preoperative transcatheter hepatic arterial chemoembolization on disease-free survival after hepatectomy for hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1999;21:214-216
- 44 Liou TC, Shih SC, Kao CR, Chou SY, Lin SC, Wang HY. Pulmonary metastasis of hepatocellular carcinoma associated with transarterial chemoembolization. *J Hepatol* 1995;23:563-568
- 45 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-Cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 46 Huang J, He X, Lin X, Zhang C, Li J. Effect of preoperative transcatheter arterial chemoembolization on tumor cell activity in hepatocellular carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2000;113:446-448
- 47 Lu CD, Peng SY, Jiang XC, Chiba Y, Tanigawa N. Preoperative transcatheter arterial chemoembolization and prognosis of patients with hepatocellular carcinomas: retrospective analysis of 120 cases. *World J Surg* 1999;23:293-300
- 48 Fisher RA, Maroney TP, Fulcher AS, Maluf D, Clay JA, Wolfe LG, Dawson S 3rd, Cotterell A, Stravitz RT, Luketic VA, Schiffman M, Sterling RK, Posner MP. Hepatocellular carcinoma: strategy for optimizing surgical resection, transplantation and palliation. *Clin Transplant* 2002;17:52-58
- 49 Margarit C, Charco R, Hidalgo E, Allende H, Castells L, Bilbao I. Liver transplantation for malignant diseases: selection and pattern of recurrence. *World J Surg* 2002;26:257-263
- 50 Fan J, Wu ZQ, Tang ZY, Zhou J, Qiu SJ, Ma ZC, Zhou XD, Ye SL. Multimodality treatment in hepatocellular carcinoma patients with tumor thrombi in portal vein. *World J Gastroenterol* 2001;7:28-32
- 51 Clavien PA, Kang KJ, Selzner N, Morse MA, Suhocki PV. Cryosurgery after chemoembolization for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *J Gastrointest Surg* 2002;6:95-101
- 52 Seki T, Tamai T, Nakagawa T, Imamura M, Nishimura A, Yamashiki N, Ikeda K, Inoue K. Combination therapy with transcatheter arterial chemoembolization and percutaneous microwave coagulation therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2000;89:1245-1251
- 53 Guo W, Song M, Yu E. Transcatheter arterial chemoembolization combined with external radiation for primary liver cancer. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1999;21:25-28
- 54 Ishikura S, Ogino T, Furuse J, Satake M, Baba S, Kawashima M, Nihei K, Ito Y, Maru Y, Ikeda H. Radiotherapy after transcatheter arterial chemoembolization for patients with hepatocellular carcinoma and portal vein tumor thrombus. *Am J Clin Oncol* 2002;25:189-193
- 55 Cheng H, Xu A, Chen D. Relation between transcatheter arterial chemoembolization and time of death in patients with hepatic carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001;23:497-499
- 56 Huang YS, Chiang JH, Wu JC, Chang FY, Lee SD. Risk of hepatic failure after transcatheter arterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: predictive value of the monoethylglycinexylidide test. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1223-1227
- 57 Chen XX, Zhang B, Zhang YQ, Hung GX, Chen MS, Guo RP, Lin XJ, Hu PL, Qiu HJ, Xu BP. Treatment of hepatic functional reserve injury after TACE in hepatocellular carcinoma with Chinese herbal medicines. *Ai Zheng* 2002;21:547-549
- 58 Li X, Zheng CS, Feng GS, Zhuo CK, Zhao JG, Liu X. An implantable rat liver tumor model for experimental transarterial chemoembolization therapy and its imaging features. *World J Gastroenterol* 2002;8:1035-1039
- 59 Cao W, Wang ZM, Liang ZH, Zhang HX, Wang YQ, Guan Y, Li WX, Pan PR. Effects of angiogenesis inhibitor TNP-470 with lipiodol in arterial embolization of liver cancer in rabbit model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:629-632
- 60 Hawighorst H, Knapstein PG, Knopp MV, Weikel W, Brix G, Zuna I, Schonberg SO, Essig M, Vaupel P, van Kaick G. Uterine cervical carcinoma: comparison of standard and pharmacokinetic analysis of time-intensity curves for assessment of tumor angiogenesis and patient survival. *Cancer Res* 1998;58:3598-3602
- 61 Ryan HE, Poloni M, McNulty W, Elson D, Gassmann M, Arbeit JM, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 2000;60:4010-4015
- 62 An FQ, Matsuda M, Fujii H, Matsumoto Y. Expression of vascular endothelial growth factor in surgical specimens of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:153-160
- 63 Song BC, Chung YH, Kim JA, Lee HC, Yoon HK, Sung KB, Yang SH, Yoo K, Lee YS, Suh DJ. Association between insulin-like growth factor-2 and metastases after transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Cancer* 2001;91:2386-2393
- 64 Saito N, Mitsuhashi M, Hayashi T, Narumo C, Nagata H, Soyama K, Kameoka S, Harumiya S, Fujimoto D. Inhibition of hepatic metastasis in mice treated with cell-binding domain of human fibronectin and angiogenesis inhibitor TNP-470. *Int J Clin Oncol* 2001;6:215-220
- 65 Sano J, Sugiyama Y, Kunieda K, Sano B, Saji S. Therapeutic effect of TNP-470 on spontaneous liver metastasis of colon tumors in the rabbit. *Surg Today* 2000;30:1100-1106
- 66 Tanaka H, Taniguchi H, Mugitani T, Koishi Y, Masuyama M, Higashida T, Koyama H, Suganuma Y, Miyata K, Takeuchi K. Intra-arterial administration of the angiogenesis inhibitor TNP-470 blocks liver metastasis in a rabbit model. *Br J Cancer* 1995;72:650-653
- 67 Peng ZH, Xing TH, Qiu GQ, Tang HM. Relationship between fas/fasl expression and apoptosis of colon adenocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2001;7:88-92
- 68 Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and c-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001;7:403-406
- 69 Xiao E, Li D, Shen S, Zhou S, Tan L, Wang Y, Luo J, Wu Y, Tan C, Liu H, Zhu H. Effect of preoperative transcatheter arterial chemoembolization on apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Chin Med J (Engl)* 2003;116:203-207
- 70 Feng Y, Zhao L, Zhang AH, Liu KD, Liu LC, Wang YH, Yin JQ, Yang BH. Expression of PCNA and nm23-H1/NDPK in Hepatocellular Carcinoma following transcatheter arterial chemoembolization therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11:912-915
- 71 Hino N, Higashi T, Nouso K, Nakatsukasa H, Tsuji T. Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Liver* 1996;16:123-129
- 72 Hino N, Higashi T, Nouso K, Nakatsukasa H, Urabe Y, Kinugasa N. Proliferating cell nuclear antigen and grade of malignancy in small hepatocellular carcinoma-Evaluation in US-guided specimens. *Heptogastroenterology* 1997;44:245-250

• 文献综述 •

肿瘤患者的免疫状态指标

邱继刚, 邱双健, 吴志全

邱继刚, 邱双健, 吴志全, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所 上海市 200032
项目负责人: 邱双健, 200032, 上海市, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所.
qiusj68@zshospital.com
电话: 021-64041990
收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-03-02

摘要

观察肿瘤患者的免疫状态, 在分析肿瘤发展情况、判断预后和疗效上有重要意义。本文通过介绍肿瘤患者全身和局部免疫状态的部分评价指标, 旨在寻找有效的检测方法, 设计合理的免疫治疗方案, 对有效激发抗瘤免疫、杀灭微小癌灶、防治肿瘤根治术后转移复发具有一定意义。

邱继刚, 邱双健, 吴志全. 肿瘤患者的免疫状态指标. 世界华人消化杂志 2004; 12(6):1427 - 1431
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1427.asp>

0 引言

机体的免疫状态在肿瘤的发生、发展过程中起着十分重要的作用。观察肿瘤患者的免疫状态, 在分析肿瘤发展情况, 判断其预后和疗效上有一定的意义。本文就肿瘤患者免疫状态有关指标的研究概况作一综述。

1 肿瘤患者全身免疫状态

肿瘤患者免疫状态反映了肿瘤与免疫系统的相互作用, 为患者预后评价及治疗选择提供了有益的观察指标。

1.1 细胞免疫的变化 机体免疫系统中各个细胞克隆不是处于孤立状态, 而是通过相互识别、相互制约和相互刺激构成一个动态平衡的网络结构。荷瘤宿主全身免疫功能低下时, 常表现在外周静脉血中各细胞亚群功能、构成上的异常, 因此临幊上常通过对外周血细胞免疫功能的检测来评估患者的免疫状态。

1.1.1 特异性免疫细胞 主要为 T 淋巴细胞亚群。肿瘤患者存在细胞免疫功能紊乱, 表现为 CD4 减少, CD8 增加, CD4/CD8 比值下降。CD4⁺T 辅助细胞(helper T cell, Th)的分化决定了人体的免疫状态。大量体内外实验研究发现肿瘤组织多分泌 Th2 类细胞因子, 机体处于 Th2 细胞因子优势状态是肿瘤免疫逃逸的机制之一。已发现非小细胞肺癌、绒癌、卵巢癌、脑胶质瘤、肾癌、结直肠癌、黑色素瘤、淋巴瘤等多种类型肿瘤患者体内发生 Th2 漂移^[1-2]。调节性 T 细胞(regulatory T cell, Tr)是近几年来提出的概念, 对 CD4⁺CD25⁺Tr 细胞的研究是目前的热点。对胃肠肿瘤患者外周血 Tr 细胞进行研究发现, CD4⁺CD25⁺Tr 的数量与肿瘤预后相关, 其数量越高,

患者预后越差^[3]。已有腹水或腹腔种植的进展期肿瘤患者外周血中 CD4⁺CD25⁺Tr 明显增多。从患者体内分离出的 CD4⁺CD25⁺Tr 细胞只分泌 IL-4 和 IL-10, 而无 IL-2 和 INF-γ。利用外周血 CD4⁺CD25⁺Tr 细胞评价胰腺和乳房肿瘤患者的免疫状况也有相关报道^[4]。检测患者外周血 T 淋巴细胞亚群表达对评估患者的细胞免疫功能及疾病的诊断具有积极的临床意义。

1.1.2 非特异性免疫细胞 包括红细胞(RBC)、自然杀伤细胞(NK)、单核 / 巨噬细胞以及淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)等。其中红细胞是人体数量最多的免疫细胞, 能识别和清除循环免疫复合物(IC), 并参与其他一些免疫调节。1981 年, 美国学者 Siegel 提出“红细胞免疫系统”的概念。红细胞主要通过红细胞膜上补体 1 型受体(CR1)与肿瘤细胞发生免疫黏附, 恶性肿瘤患者红细胞 CR1 减少, 一方面使红细胞对肿瘤细胞的促吞噬作用降低, 另一方面导致 IC 清除障碍。IC 增高加重破坏了宿主抗肿瘤免疫能力, 造成恶性循环, 肿瘤细胞逃逸宿主免疫系统的攻击得以生长繁殖。临幊上, 已发现在乳腺、食管、胃、大肠、肝、卵巢、血液系统等多种肿瘤患者红细胞黏附肿瘤细胞能力降低, 同时还发现在消化道肿瘤患者肿瘤红细胞花环率高低与手术后证实肿瘤发生转移与否有相关性, 手术切除肿瘤可使患者的红细胞免疫功能改善^[5-7]。检测红细胞免疫功能在临幊上具有重要意义。自然杀伤细胞(NK)、单核 / 巨噬细胞以及淋巴因子激活的杀伤细胞(LAK)因在肿瘤局部发挥更强的免疫作用, 将在后文另作介绍。

1.2 体液免疫的变化 众多研究结果表明, 荷瘤动物和癌症患者血清中含有起免疫抑制作用的可溶性物质。这些肿瘤诱导的体液抑制因子主要分为两大类: 一类为封闭因子(blocking factor), 另一类为血清急性期反应蛋白和正常血清免疫抑制因子。

1.2.1 封闭因子 1970 年代初, Hellstrom 提出了封闭因子的概念, 认为某些肿瘤抗血清不仅不能使肿瘤消退, 反而阻断了杀伤细胞对肿瘤细胞的细胞毒作用, 促进了肿瘤的发展。这种作用被称为免疫促进作用(immunologic enhancement)。可溶性白介素 2 受体(sIL-2R)被认为是一种封闭因子, 自 1985 年被发现以来, 国内外学者对其进行了大量的研究。人类恶性肿瘤表达白介素 2 受体(IL-2R)α、β 和 γ 链。β 和 γ 链与 IL-2 呈高亲和状态, 当接受 IL-2 刺激后转导并放大跨膜信号。IL-2Rα 缺乏胞质内结构域, 但对增加 IL-2 与其他受体结合力起重要作用。现已证实^[8] 肿瘤细胞过度表达 IL-2Rα 与肿

瘤进展迅速和患者预后差密切相关。在白血病^[9]、淋巴瘤^[10-11]、胃癌^[12]、结直肠癌^[13]、肺癌^[14]、卵巢癌^[15]以及泌尿系统肿瘤^[16-18]患者，血清中 sIL-2R 水平明显升高，且其水平变化与这些疾病的发展和转归密切相关。激活的 T 细胞在渗透入肿瘤组织发挥抗肿瘤作用的同时，可能释放了大量 IL-2R α 链，是造成肿瘤患者血清 sIL-2R 升高的主要原因^[11]。血清 sIL-2R 在肝癌诊断与预后判断方面的价值尚有争论。Izzo et al^[19]认为与 AFP 相比，血清 sIL-2R 水平在肝细胞性肝癌(HCC)患者中异常增高的情况更频繁，并且是判断 HCC 成功治疗与复发更敏感的指标。而意大利学者 Parasole et al^[20]则认为其在临床实际中并不能成为判断 HCC 预后的指标，sIL-2R 不能提高 CLIP(cancer of the liver Italian program)积分的预测能力。

1.2.2 血清免疫抑制蛋白 血清免疫抑制蛋白是荷瘤动物和癌症患者血清中所含的另一类起免疫抑制作用的血清蛋白，包括急性期反应蛋白和正常免疫抑制血清蛋白。免疫抑制酸蛋白(IAP)是新近发现的一种肿瘤相关标志物，现已证实^[21]，在肿瘤的发生发展过程中，IAP 的含量有显著升高，已成为卵巢癌和肾癌患者诊断和判断预后的有效指标，在胃癌、食管癌、子宫癌和结肠癌患者的血清中，IAP 的含量亦明显高于正常人。Takeuchi et al^[22]对 107 例胃癌术后患者的研究显示，血清 IAP 含量 ≥ 355 或 <355 的患者，其术后 5 a 生存率分别为 77.9% 和 92.1%，提示 IAP 含量与淋巴结转移相关，是临床判断胃癌患者预后的又一相关指标。IAP 水平的改变与原发性肝癌(PHC)发生亦相关^[23]，PHC 患者的血清 IAP 与健康人相比，具有显著意义，PHC 患者本身的 IAP 阳性率也达到 83.3%，表明 IAP 可以为 PHC 患者提供新的血清学诊断方法。由于肿瘤家族成员具有较高的 IAP 阳性率，IAP 检测被应用于肝癌易患个体的筛选和随访，可为肝癌的癌前期监控和预防提供又一个新的途径。

2 肿瘤局部的免疫状态

肿瘤微环境(tumor microenvironment)是近年来深入研究肿瘤局部淋巴细胞与肿瘤细胞的相互作用而提出的新概念。由于肿瘤局部有着和正常组织不同的独特性质，因此把肿瘤局部作为特殊的环境进行研究，有助于更全面地了解肿瘤逃逸免疫监视的机制。

2.1 肿瘤局部的细胞免疫

2.1.1 调节细胞 如同全身免疫一样，肿瘤局部的细胞免疫亦存在着一个复杂的调节网络，T 细胞同样扮演着重要的角色。最近的文献中，将许多具有免疫调节作用的淋巴细胞冠以“Tr 细胞”的称谓。(1) CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Tr 细胞：近年积累的大量实验证据表明，机体主要通过 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Tr 细胞以“主动”的方式维持自身免疫耐受(dominant tolerance)，CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Tr 的主动压抑在参与下调 T 细胞对自身抗原和外来抗原应答中起到关键

作用。小鼠肿瘤模型揭示 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Tr 细胞能抑制肿瘤免疫反应^[24]。Liyanage et al^[4]对胰腺癌和乳腺癌患者肿瘤浸润淋巴细胞和局部淋巴结中 Tr 细胞的研究发现，CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Tr 细胞数量在肿瘤局部显著增多，同时表达 CTLA-4 和 CD45RO，并分泌 TGF- β 和 IL-10，但不表达 INF- γ 。并且当与激活的 CD8 $^{+}$ 细胞和 CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ 细胞共同培养时，Tr 细胞明显抑制其增生和分泌 INF- γ 。肿瘤微环境中的 Tr 细胞减轻了抗肿瘤免疫反应，并能部分解释 T 细胞对肿瘤抗原的弱应答现象。可以肯定地说，CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Tr 细胞作为一个具有独立功能的 T 细胞亚群，在维持自身免疫耐受过程中具有不可替代的作用。然而关于这些细胞的作用机制和免疫生物学特性尚有许多不明之处，能否作为肿瘤患者局部免疫的监测指标有待进一步研究。(2) NKT 细胞：NKT 细胞又名 NK1 $^{+}$ -T 细胞或自然 T 细胞，具有 NK 细胞和 T 细胞的表型特征，同时表达 TCR- $\alpha\beta$ 或 TCR- $\gamma\delta$ 与 NK 细胞受体如 CD16、CD56、CD69、CD161、KIR 受体和或 CD94 等，是表达不同 TCR 和 NK 受体的 T 细胞构成的群体^[25]。NKT 细胞的发育以及活化受 CD1d 限制^[26]，CD1d 限制性 NKT 细胞在多种免疫应答中起到重要的调节作用。现已发现在肺癌、前列腺癌和肝肿瘤患者体内 CD1d 限制性 V α 24 $^{+}$ V β 11 $^{+}$ NKT 细胞数量大大减少，并且分泌 INF- γ 的能力也有所下降。对前列腺肿瘤患者的研究证实了 NKT 与肿瘤进展的关系，PSA 呈进行性升高的患者，其体内 NKT 数明显下降^[27]。CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Tr 细胞对 NKT 细胞的胞间接触(cell-to-cell contact)抑制是导致 NKT 细胞功能下降的原因之一。最近有报道^[28]利用装载 α -半乳糖神经酰胺的 1 型 DC 及 IL-15 刺激 V α 24 $^{+}$ V β 11 $^{+}$ NKT，可使其产生大量 INF- γ 、TNF- α 和 GM-CSF，并引起强烈的细胞毒性反应。更重要的是，他能使 Th2 细胞因子分化向 Th1 细胞因子逆转，预示人类 V α 24 $^{+}$ V β 11 $^{+}$ NKT 细胞群具有可塑性。缺乏肝脏 NKT 细胞的肝癌患者更易于发生转移^[29]。肝癌患者肝脏内的 V α 24 $^{+}$ V β 11 $^{+}$ NKT 数量只有正常人的 1/5，但经 α -半乳糖神经酰胺激活后却能释放和正常肝脏等量的 INF- γ ，其具体机制尚待进一步研究。

2.1.2 树突状细胞(dendritic cell, DC) DC 是目前已知功能最强的专职抗原呈递细胞，广泛分布于外周淋巴组织，决定免疫反应的最终走向，激活免疫或诱导耐受。研究资料表明，绝大多数实体肿瘤及其周围组织中都有 DC 浸润。文献报道肿瘤组织内 DC 的浸润程度与结直肠癌、肺癌、甲状腺癌、胃癌及舌癌的预后有密切关系，DC 高度浸润者伴肿瘤分化程度高，预后好；DC 轻度浸润者则伴肿瘤分化程度低且恶性进展。有关肿瘤局部免疫状态的研究一般以测定 S-100 $^{+}$ 的 DC 的密度作为局部免疫水平的指标。Ishigami et al^[30]用 S-100 蛋白免疫组化法对 203 例食管癌组织切片染色，根据 DC 的数目，将 DC 浸润程度分为两级：低度浸润(0-20 个 DC 细胞 / HPF)和高度浸润(>20 个 DC 细胞 / HPF)，并观察 DC 浸

润程度与患者的预后的关系, 结果发现高度 DC 浸润者与低度浸润者相比, 远处淋巴结转移率及临床分期降低, 肿瘤患者 5 a 生存率延长($P < 0.01$). 肿瘤组织浸润 DC 数量能否作为人类肺癌预后指标尚存在争议^[31]. 此外, 有学者认为 DC 功能缺陷与肿瘤的预后也有关系. 目前有关 HCC 组织内树突状细胞浸润的临床意义尚不清楚, 有结果表明^[32], 肝癌组织内 DC 可能需在淋巴细胞存在的情况下才能提高宿主的免疫状态.

2.1.3 效应细胞 主要有(1) CTL 和 NK 细胞: 肿瘤局部免疫以特异性细胞免疫为主导, 其效应细胞为活化的 CTL 和 NK 细胞, 可通过穿孔素 / 颗粒酶介导的细胞毒途径和 Fas/FasL 介导的细胞凋亡途径发挥作用. 测定 CTL 和 NK 细胞在肿瘤组织内的浸润密度可直接反映其免疫状况. 颗粒酶 B^[33] (Granzyme B, GrB) 是丝氨酸蛋白酶家族中的原型成员, 主要由 CTL 产生, 用于杀伤靶细胞. GrB⁺ 淋巴细胞主要有 CD4⁺CTL、CD8⁺CTL 及 NK 细胞, 其中以 CD8⁺ 和 NK 细胞为主. 因此 GrB⁺ 的 CTL、NK 细胞密度可直接反映肿瘤局部免疫状态, 较外周血免疫指标能更准确地反映宿主的抗肿瘤免疫反应水平. (2) 肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL): 肿瘤增生部位的效应细胞多数为 T 细胞, 即 TIL. 与 LAK 细胞相比, TIL 具有更强的特异性杀伤活性, 其体内抗癌活性是 LAK 细胞的 50-100 倍. 长期以来大多数学者认为, TIL 细胞是 T 淋巴细胞, 并且 T 细胞中以 CD4⁺、CD8⁺ 为主. 但也有不同的报道, Santin et al^[34] 在研究不同来源的 TIL 表型时, 发现来源于肿瘤组织的 TIL, CD3⁺T 细胞占优势, 在外周血中 CD4⁺、CD19⁺ 和 CD56⁺T 细胞比其他来源的组织要高, 而 CD25 在三者中则没有显著差异. Riemann et al^[35] 研究发现 NSCLC-TIL 表型明显高于外周血, 但表型表达对预后无影响. 对肿瘤肝转移患者局部的 TIL 研究发现^[36], 转移灶周围的 TIL 以 CD3⁺CD4⁺ 的 $\alpha\beta$ T 细胞为主, 转移灶周围的免疫反应远远超过肿瘤本身, 并且与原发肿瘤的类型、转移灶的数目和大小无关. 这提示 TIL 部分参与了肝脏与转移肿瘤间相互作用, 免疫反应局限于肿瘤外围可能是由于肿瘤防御机制不足所致.

2.2 肿瘤细胞产物的免疫作用

2.2.1 细胞因子(cytokine, CK) 与肿瘤相关的 CK 种类繁多, 目前的研究主要集中在(1)转化生长因子(transforming growth factor β , TGF- β): TGF- β 是近几年来研究较为深入且颇受人们重视的细胞因子, 与肿瘤的关系目前尚无确切定论. TGF- β 在肿瘤的发生过程中起着双向调节作用^[37], 在肿瘤形成早期, TGF- β 具有明显抑制肿瘤形成作用, 而在肿瘤发生、进展和转移过程中, 则起促进作用. Teraoka et al^[38] 研究表明, 肿瘤患者体内 TGF- β 1 水平明显高于正常对照组, 并与肿瘤的病程有关. Shim et al^[39] 通过对结肠癌患者血浆 TGF- β 1 水平的测定发现, 结肠癌患者 TGF- β 1 水平明显高于正常对照组, 并证实与病程密切相关($P < 0.01$). 对人类其他肿瘤

如卵巢癌、前列腺癌等的研究也有类似结果^[40-41], 这说明 TGF- β 在肿瘤的进展、浸润及转移方面具有重要作用. TGF- β 及其受体可能成为预测肿瘤预后的重要指标, 并可用来检测手术或药物化疗的临床效果. (2) IL-10: IL-10 是一种负性免疫调节细胞因子. 当机体发生肿瘤时, IL-10 的水平异常升高. Th2 细胞是 IL-10 的主要来源, 近年来研究发现^[42], Tr1 也是 IL-10 的重要来源之一. 此外, 肿瘤本身也产生 IL-10, 用 RT-PCR 方法检测 IL-10 mRNA 在组织中的表达, 发现在多种肿瘤组织中均可检测到 IL-10, 包括宫颈癌^[43]、淋巴瘤^[44]和黑色素瘤^[45]等, 而在正常组织中, IL-10 mRNA 不表达或表达量极少. 大量研究表明 IL-10 是肿瘤发生、发展过程中一种重要的免疫抑制因子. 在手术或放化疗后好转的肿瘤患者中, IL-10 水平较治疗前下降. 因此现在有学者提出可以用 IL-10 作为诊断肿瘤和预后的一个指标^[46].

2.2.2 代谢产物及其他 某些肿瘤细胞的代谢产物也具有免疫抑制活性, 他们在肿瘤局部阻止免疫细胞对肿瘤的杀伤起着重要的作用. 一氧化氮(NO) 是生物体内一种结构简单的自由基, 由一氧化氮合酶(NOS) 催化左旋精氨酸(L-Arg)生成, 参与调节人体一系列的生理功能及病理过程. Thomsen et al^[47] 认为, 肿瘤微环境中的细胞因子和化学因子可为巨噬细胞维持低水平的 NO 和活性提供适当的信号, 有利于肿瘤的发展. 在胃癌, 大量研究表明, 胃癌患者血清 NO 水平低下, 这可能与肿瘤大量增生, 产生大量代谢产物以及多量 NOS 抑制因子释放入血有关, 低浓度 NO 可促进肿瘤的发展和转移. 在肝脏, Kupffer 细胞可以合成 NO, NO 与 T 细胞增生功能的抑制、树突状细胞和效应 T 细胞的凋亡有关, 提示 NO 可能在机体自身免疫反应以及移植免疫中发挥调节作用.

以上介绍的只是肿瘤患者免疫状态部分评价指标的研究情况. 癌症患者体内真正的抗癌反应与体外检测到的免疫反应关联较少, 提示对体内肿瘤免疫的真正调控机制了解甚少. 为什么机体不能通过免疫系统有效地清除肿瘤组织(免疫监视), 就像免疫系统对付那些入侵的病原体那样呢? 由于越来越多的研究表明免疫系统对肿瘤具有抑制和选择的双重作用, 故有人主张将“免疫监视”的概念扩展为“免疫编辑(immunoediting)^[48]”. 因此, 深入研究肿瘤局部微环境的变化以及肿瘤对局部和全身免疫反应的双重作用, 设计合理的免疫治疗方案, 对有效激发抗瘤免疫、杀灭微小癌灶、防治肿瘤根治术后转移复发具有重要的意义.

3 参考文献

- Yamazaki K, Yano T, Kameyama T, Suemitsu R, Yoshino I, Sugio K. Clinical significance of serum TH1/TH2 cytokines in patients with pulmonary adenocarcinoma. *Surgery* 2002;131 (Suppl 1): S236-S241
- Tatsumi T, Kierstead LS, Ranieri E, Gesualdo L, Schena FP, Finke JH, Bukowski RM, Mueller-Berghaus J, Kirkwood JM,

- Kwok WW, Storkus WJ. Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses, against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma. *J Exp Med* 2002;196:619-628
- Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 2003;98:1089-1099
- Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002;169:2756-2761
- Junnikkala S, Hakulinen J, Jarva H, Manuelian T, Bjorge L, Butzow R, Zipfel PF, Meri S. Secretion of soluble complement inhibitors factor H and factor H-like protein (FHL-1) by ovarian tumor cells. *Br J Cancer* 2002;87:1119-1127
- Durrant LG, Spendlove I. Immunization against tumor cell surface complement-regulatory proteins. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2:959-966
- 王菊兰, 孙励, 宗媛, 韩洪涛, 刘景田. 恶性肿瘤患者红细胞免疫功能及CR1免疫调节功能的观察. 实用癌症杂志 2001;16:617-618
- Kuhn DJ, Smith DM, Pross S, Whiteside TL, Dou QP. Overexpression of interleukin-2 receptor alpha in a human squamous cell carcinoma of the head and neck cell line is associated with increased proliferation, drug resistance, and transforming ability. *J Cell Biochem* 2003;89:824-836
- Fujiwara H, Arima N, Ohtsubo H, Matsumoto T, Kukita T, Kawada H, Imaizumi R, Ozaki A, Matsushita K, Tei C. Clinical significance of serum neuron-specific enolase in patients with adult T-cell leukemia. *Am J Hematol* 2002;71:80-84
- Matsubayashi H, Takagaki S, Otsubo T, Iiri T, Kobayashi Y, Yokota T, Shichijo K, Iwafuchi M, Kijima H. Pancreatic T-cell lymphoma with high level of soluble interleukin-2 receptor. *J Gastroenterol* 2002;37:863-867
- Wakao D, Murohashi I, Tominaga K, Yoshida K, Kishimoto K, Yagasaki F, Itoh Y, Itoh K, Sakata T, Kawai N, Kayano H, Suzuki T, Matsuda A, Hirashima K, Bessho M. Serum thymidine kinase and soluble interleukin-2 receptor predict recurrence of malignant lymphoma. *Ann Hematol* 2002;81:140-146
- Murakami S, Sakata H, Tsuji Y, Okubo K, Hamada S, Hirayama R. Serum soluble interleukin-2 receptor as a predictor of lymph node metastasis in early gastric cancer. *Dig Surg* 2002;19:9-13
- Sakata H, Murakami S, Hirayama R. Serum soluble interleukin-2 receptor (IL-2R) and immunohistochemical staining of IL-2R/Tac antigen in colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 2002;7:312-317
- Naumann W, Chyczewska E. The clinical significance of serum soluble interleukin 2 receptor (sIL-2R) concentration in lung cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39:185-186
- Sedlaczek P, Frydecka I, Gabrys M, Van Dalen A, Einarsson R, Harlozsinska A. Comparative analysis of CA125, tissue polypeptide specific antigen, and soluble interleukin-2 receptor alpha levels in sera, cyst, and ascitic fluids from patients with ovarian carcinoma. *Cancer* 2002;95:1886-1893
- Shabtai M, Ye H, Frischer Z, Martin J, Waltzer WC, Malinowski K. Increased expression of activation markers in renal cell carcinoma infiltrating lymphocytes. *J Urol* 2002;168:2216-2219
- Magno C, Melloni D, Gali A, Mucciardi G, Nicocia G, Morandi B, Melioli G, Ferlazzo G. The anti-tumor activity of bacillus Calmette-Guerin in bladder cancer is associated with an increase in the circulating level of interleukin-2. *Immunol Lett* 2002;81:235-238
- Kallio JP, Tammela TL, Marttinen AT, Kellokumpu-Lehtinen PL. Soluble immunological parameters and early prognosis of renal cell cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2001;20:523-528
- Izzo F, Cremona F, Delrio P, Leonardi E, Castello G, Pignata S, Daniele B, Curley SA. Soluble interleukin-2 receptor levels in hepatocellular cancer: a more sensitive marker than alfa fetoprotein. *Ann Surg Oncol* 1999;6:178-185
- Parasole R, Izzo F, Perrone F, Pignata S, Galati MG, Leonardi E, Castiglione F, Orlando R, Castello G, Esposito G, Gallo C, Daniele B. Prognostic value of serum biological markers in patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:3504-3509
- Shimada H, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Miyazawa Y, Shihratori T, Hayashi H, Aoki T, Sugaya M, Gunji Y, Kobayashi S, Ochiai T. Prognostic value of preoperative serum immunosuppressive acidic protein in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Dis Esophagus* 2003;16:102-106
- Takeuchi H, Maehara Y, Tokunaga E, Koga T, Kakeji Y, Sugimachi K. Prognostic value of preoperative immunosuppressive acidic protein levels in patients with gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003;50:289-292
- 李明烈. 原发性肝癌患者及其家族成员血清免疫抑制酸性蛋白的分析. 中国医师杂志 2003;5:47-48
- Golgher D, Jones E, Powrie F, Elliott T, Gallimore A. Depletion of CD25+ regulatory cells uncovers immune responses to shared murine tumor rejection antigens. *Eur J Immunol* 2002;32:3267-3275
- Doherty DG, O'Farrelly C. Innate and adaptive lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev* 2000;174:5-20
- Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ, Baxter AG. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 2000;21:573-583
- Schwemmer B. Natural killer T cells in patients with prostatic carcinoma. *Urol Int* 2003;71:146-149
- van der Vliet HJ, Molling JW, Nishi N, Masterson AJ, Kolgen W, Porcelli SA, van den Eertwegh AJ, von Blomberg BM, Pinedo HM, Giaccone G, Schepel RJ. Polarization of Valpha24+ Vbeta11+ natural killer T cells of healthy volunteers and cancer patients using alpha-galactosylceramide-loaded and environmentally instructed dendritic cells. *Cancer Res* 2003;63:4101-4106
- Kenna T, Golden-Mason L, Porcelli SA, Koezuka Y, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG, Mason LG. NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells. *J Immunol* 2003;171:1775-1779
- Ishigami S, Natsugoe S, Matsumoto M, Okumura H, Sakita H, Nakashima S, Takao S, Aikou T. Clinical implications of intratumoral dendritic cell infiltration in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2003;10:1237-1240
- 赵瑞景, 冯惠东, 王秀荣, 胡代伦, 朱铁年. 树突状细胞浸润与肺癌预后相关性研究. 中国肺癌杂志 2002;5:112-114
- 殷晓煜, 吕明德, 梁力建, 赖英荣, 黄洁夫, 李智. 肝癌组织内树突状细胞及淋巴细胞浸润的临床意义. 中华外科杂志 2002;40:336-338
- Hu SX, Wang S, Wang JP, Mills GB, Zhou Y, Xu HJ. Expression of endogenous granzyme B in a subset of human primary breast carcinomas. *Br J Cancer* 2003;89:135-139
- Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Bellone S, Roman JJ, Smith CV, Pecorelli S, Radominska-Pandya A, Cannon MJ, Parham GP. Phenotypic and functional analysis of tumor-infiltrating lymphocytes compared with tumor-associated lymphocytes from ascitic fluid and peripheral blood lymphocytes in patients with advanced ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2001;51:254-256
- Riemann D, Wenzel K, Schulz T, Hofmann S, Neef H, Lautenschlager C, Langner J. Phenotypic analysis of T lymphocytes isolated from non-small cell lung cancer. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;11:215-218
- Kasper HU, Drebber U, Zur Hausen A, Stippel D, Dienes HP, Dries V. Dominance of CD4+ alpha/beta T-cells and inferior role of innate immune reaction in liver metastases. *Anticancer*

- Res* 2003;23:3175-3181
- 37 Lu L, Thomson AW. Manipulation of dendritic cells for tolerance induction in transplantation and autoimmune disease. *Transplantation* 2002;73(Suppl 1):s19-s22
- 38 Teraoka H, Sawada T, Yamashita Y, Nakata B, Ohira M, Ishikawa T, Nishino H, Hirakawa K. TGF-beta1 promotes liver metastasis of pancreatic cancer by modulating the capacity of cellular invasion. *Int J Oncol* 2001;19:709-715
- 39 Shim KS, Kim KH, Han WS, Park EB. Elevated serum levels of transforming growth factor-beta1 in patients with colorectal carcinoma: its association with tumor progression and its significant decrease after curative surgical resection. *Cancer* 1999;85:554-559
- 40 Toomey D, Condron C, Wu QD, Kay E, Harmey J, Broe P, Kelly C, Bouchier-Hayes D. TGF-beta1 is elevated in breast cancer tissue and regulates nitric oxide production from a number of cellular sources during hypoxia re-oxygenation injury. *Br J Biomed Sci* 2001;58:177-183
- 41 Francis-Thickpenny KM, Richardson DM, van Ee CC, Love DR, Winship IM, Baguley BC, Chenevix-Trench G, Shelling AN. Analysis of the TGF beta functional pathway in epithelial ovarian carcinoma. *Br J Cancer* 2001;85:687-691
- 42 Groux H. An overview of regulatory T cells. *Microbes Infect* 2001;3:883-889
- 43 Sheu BC, Lin RH, Lien HC, Ho HN, Hsu SM, Huang SC. Predominant Th2/Tc2 polarity of tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical cancer. *J Immunol* 2001;167:2972-2978
- 44 Urosevic M, Willers J, Mueller B, Kempf W, Burg G, Dummer R. HLA-G protein up-regulation in primary cutaneous lymphomas is associated with interleukin-10 expression in large cell T-cell lymphomas and indolent B-cell lymphomas. *Blood* 2002;99:609-617
- 45 Lauerova L, Dusek L, Simickova M, Kocak I, Vagundova M, Zaloudik J, Kovarik J. Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response. *Neoplasma* 2002;49:159-166
- 46 Naruke M, Abe Y, Hatanaka H, Ohnishi Y, Yamazaki H, Kijima H, Nakamura M, Ueyama Y, Kobayashi K. Interleukin-10 expression is correlated with growth fraction in human non-small cell lung cancer xenografts. *Int J Oncol* 2001;18:1213-1217
- 47 Thomson AW, Lu L. Are dendritic cells the key to liver transplant tolerance? *Immunol Today* 1999;20:27-32
- 48 Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3:991-998

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

• 消息 •

《中国生物学文摘》收录 WJG 和世界华人消化杂志

本刊讯 经专家评估和遴选, *World Journal of Gastroenterology* (WJG) 和世界华人消化杂志被《中国生物学文摘》和中国生物学文献数据库收录。中国生物学文献数据库在期刊的基础上开发建设, 数据量已达 20 万多条, 并形成了期刊、光盘、网络版系列产品。《中国生物学文摘》1998 年获得第六次全国科技期刊文献检索出版物评比一等奖。(世界胃肠病学杂志 2004-05-05)

CAB Abstracts 和 Global Health 收录 World Journal of Gastroenterology

本刊讯 CAB International 对 WJG 仔细评阅, 发现 WJG 报道的范围与 CAB International 兴趣范围一致, 因此 CAB International 将 WJG 收录在 CAB Abstracts 和 Global Health 的索引内。CAB International 是一个非盈利的政府之间的组织, 致力于全球范围传播知识。CAB 覆盖全球的优秀杂志, 全球数据库的用户能够获得全文。(世界胃肠病学杂志 2004-06-15)

• 文献综述 •

MHC - 表位肽四聚体技术在病毒性肝炎研究中的应用

王 洪, 周吉军, 王宇明

王洪, 周吉军, 王宇明, 中国人民解放军第三军医大学第一附属医院感染病分院 重庆市 400038
国家自然科学基金资助课题, No. 30200242
项目负责人: 周吉军, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学第一附属医院感染病分院。
电话: 023-68754289
收稿日期: 2004-01-09 接受日期: 2004-03-24

摘要

可溶性 MHC - 肽四聚体是根据 T 细胞活化的双识别原理, 用生物工程技术将 MHC - I 类分子重链 α 与 $\beta 2$ 微球蛋白在体外组装, 并结合抗原表位肽, 形成一个能够与相应 TCR 特异性结合的单体, 再将 4 个单体组装在一起, 称为四聚体。四聚体用荧光染料标记, 供流式细胞仪检测, 就可以用于具有特定 TCR 的 T 细胞的研究。在病毒性肝炎的研究中, 四聚体技术可以直接检测抗原特异性 CTL 数量, 在感染急性期抗原特异性 CTL 比恢复期高, 肝炎自愈者高于慢性感染, 肝内高于外周血, 但明显低于其他病毒性疾病。四聚体标记联合其他膜表面分子的标记(或细胞内细胞因子染色), 可以评价抗原特异性 CTL 的功能状态, 还可以联合一些特殊的荧光染料, 评价抗原特异性 CTL 的分裂增生能力。

王洪, 周吉军, 王宇明. MHC - 表位肽四聚体技术在病毒性肝炎研究中的应用. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1432-1436
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1432.asp>

0 引言

细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte, CTL)是机体抗肿瘤、抗移植及有效控制各种感染的免疫细胞之一。在乙、丙型肝炎病毒(HBV/HCV)感染时, MHC - I 类分子限制的抗原特异性 CTL 反应是清除病毒、控制病毒复制和播散的主要机制^[1-3]。由于抗原特异性 CTL (antigen-specific CTL) 在控制病毒感染和某些肿瘤具有重要的作用, 因此定量检测抗原特异性 CTL 一直是免疫学界努力的目标之一。1996 年, Altman et al^[4]首次报道将 MHC - I 类分子、抗原肽(peptide)和荧光染料标记连接蛋白组成的单体物, 通过亲和素-链成为四聚体复合物(tetrameric complexes, “Tetramer”)来检测 HIV 特异性 CTL 细胞, 从此这项技术在病毒性疾病^[5-10]包括 SARS 病毒^[11]、肿瘤^[12-14]以及自身免疫性疾病^[15-17]等基础和临床研究中广泛应用。近几年, 四聚体技术在病毒性肝炎领域的研究也取得较大的成绩^[18-19], 本文拟将四聚体技术原理和在病毒性肝炎抗原特异性 CTL 的研究应用介绍如下。

1 可溶性 MHC - 肽四聚体技术作用原理

MHC - I 类分子是由重链 α 与保守的轻链即 $\beta 2$ 微球蛋白组成的异源二聚体, 并形成一个肽结合槽, 具有高度多态性。特异性 CTL 识别的抗原主要是结合 MHC - I 类分子的内源性抗原肽。抗原肽(内源性抗原)是由抗原递呈细胞(antigen present cell, APC)加工合成, 在细胞内质网中结合于由 MHC - I 类分子重链($\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 功能区)构成的肽结合槽内。CTL 通过细胞表面 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)识别并结合那些提呈在靶细胞表面 MHC - I 类分子肽结合槽内的特异性抗原表位(epitope), 在共同刺激信号的协助下活化、增生, 形成表位特异性 T 细胞克隆, 活化的 CTL 细胞再通过相同的机制靶细胞结合而发挥生理效应。

1980 年代后期至 1990 年代, 已有许多学者根据 T 细胞作用的特点, 应用可溶性 MHC - I 类分子来研究 T 淋巴细胞反应^[20-22], 但是结果并不理想。其主要原因是单价 MHC - I 肽复合物(MHC-Peptide Monomers)与 TCR 结合的亲和力较低($\approx 10^{-5}$ μ M), 且解离快, 形成的复合物半衰期不到 1 min^[23-24]。而多价 MHC - 肽复合物能够同时结合多个 TCR, 使其解离速度大大减慢, 从而提高检测的阳性率。有研究发现四价的 MHC - 肽复合物在亲和力、生物效应等多方面作用都是最佳的^[25]。Altman et al^[4]基于这一原理发明了可溶性 MHC - I 肽四聚体复合物(四价 MHC - I 肽复合物), 该方法通过基因工程技术将 BirA 酶底物肽(BSP)的 15 个氨基酸残基的编码基因克隆到质粒中 HLA - A2 重链的羧基端, 表达 HLA-A2 重链 - BSP 融合蛋白。将融合蛋白、 $\beta 2$ 微球蛋白、抗原表位肽(体外合成)折叠复合后与 BirA 酶作用, 产生赖氨酸残基, 再与藻红蛋白(PE)标记的亲合素混合, 形成 HLA-A2 重链 - 藻红蛋白 - 亲合素、 $\beta 2$ 微球蛋白、表位肽组成的复合物。由一个亲合素连接四个藻红蛋白, 从而形成四价的复合体, 因此一个四聚体复合物可以同时与四个 TCR 结合。四聚体复合物是模仿 CTL 识别靶细胞的“双识别”过程, 四聚体复合物与 TCR 相结合, 从而标记该 HLA 型、特定抗原表位的 CTL 细胞。

四聚体中的亲和素由荧光染料(如: PE, FITC 等)进行标记, 可以供流式细胞仪(FACS)检测。因此, 只要人工合成已知抗原多肽, 就能通过此法迅速定量检出该抗原肽特异性 CTL, 如果在体外给予抗原或分裂原的刺激后, 进行细胞因子(如 IFN- γ 、IL-2)^[26-28]、趋化因子(如 MIP-1 α)、细胞毒素(如穿孔素 / 颗粒酶)等^[5, 26, 29-30]的染色, 可以评价特异性 CTL 的功能状态, 而且还可以标

记细胞分选以供体外培养扩增和功能分析用^[31-32].

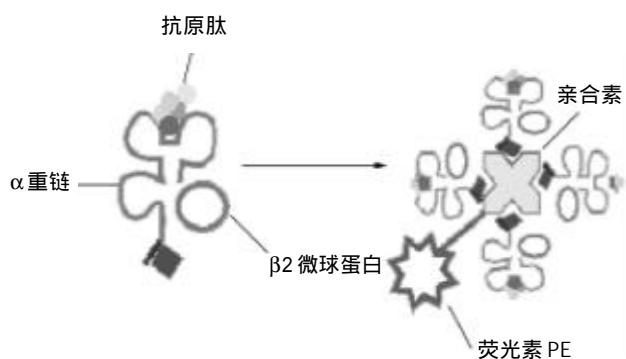


图1 四聚体结构示意图.

2 四聚体检测技术在病毒性肝炎研究中的应用

在病毒性疾病发病机制的研究中发现, 抗原特异性 CTL 与病毒清除和肝脏病理变化有密切相关^[33], 病毒抗原特异性 CTL 的研究是揭示病毒性肝炎免疫发病机制的关键, 了解抗原特异性 CTL 的数量及功能的变化规律有利于阐明病毒性肝炎的发病机制, 也有利于抗病毒治疗过程中机体免疫状态的检测^[34].

2.1 抗原特异性 CTL 细胞数量和功能分析 四聚体技术在病毒性肝炎研究中的应用首先体现在对病毒抗原特异性 CTL 数量的研究^[35-36]. Maini et al^[35]首先将此技术应用于病毒性肝炎的研究, 他们合成了针对核心抗原(C18-27)、衣壳抗原(E335-343)和DNA多聚酶(P575-583)肽段的特异性四聚体用于 HBV 感染患者的检测, 从而开始了病毒性肝炎细胞免疫研究的新天地. 目前研究报道很多, 一般认为慢性 HBV 感染外周血中出现频率大概占总 CD8⁺T 细胞的比较低, 而肝内相对较高, 有研究认为他们之间的比值可达 17.4-150 倍^[37], 而 HBV 感染急性期明显高于慢性感染, 部分患者可以达到 1% 左右. 对 HCV 感染患者外周血中特异性 CTL 数量的研究多家报道差异较大, 在慢性 HCV 感染患者 HCV 表位肽特异性 CTL 占总 CD8⁺T 细胞从 0.05% 到 1.2% 都有报道, 而在急性 HCV 感染, 特异性 CTL 往往很高, 有报道可达 4% 左右^[38]. 总之, 肝炎病毒感染的急性期特异性 CTL 出现频率比慢性感染高出 3-5 倍^[39]. 但与其他病毒(CMV、EBV、流感 A)感染比较^[9, 27, 40], 慢性 HBV、HCV 感染时抗原特异性 CTL 数量非常低, 一般不超过 1%^[33, 35, 41-43, 39]. 因此推测过低的抗原特异性 CTL 反应可能是肝炎病毒感染更容易慢性化的原因之一.

不同的临床表现患者抗原特异性 CTL 数量存在明显差异: 在 HBV 感染时, 特异性 CTL 在感染急性期最高, 其次是感染后自愈者, 最后是慢性感染患者; 在慢性感染患者之间, 低病毒复制、肝损伤轻者比高病毒复制、肝损伤重者高^[44]. 在 HCV 感染时, 特异性 CTL 在感染急性期最高, 其次是慢性感染患者, 最后是感染后自愈者^[39]. 这些发现提示外周血中高抗原特异性 CTL 与病毒清除有关.

研究发现不同抗原肽特异性 CTL 在数量上存在明显的差异; 急性 HBV 感染和感染自愈者, 抗原特异性 CTL 细胞数量从多到少依次为: 核心抗原特异性 CTL 细胞、多聚酶特异性 CTL 细胞、衣壳抗原特异性 CTL 细胞^[35]. 而在慢性 HBV 感染时, 特别是有肝损伤、病毒高复制患者, 衣壳抗原特异性 CTL 数量最高^[44]. 但总体来说, 肝炎病毒感染时, 病毒抗原特异性 CTL 数量很低, 这也给进一步研究带来了困难. 最近有报道^[45], 采用间歇循环刺激法用抗原表位肽体外刺激患者 PBMC, 使特异性 CTL 数量得到增加, 可以提高检出率. 但这样可能会使检测的准确性下降, 有待进一步的研究. 由于肝炎病毒都有多种抗原成分, 而每个抗原成分包含有多个抗原表位, 不同抗原表位肽特异性 CTL 的变化规律以及在免疫发病中的作用的研究还不够. 四聚体技术对特定抗原表位 CTL 细胞进行标记, 可以直接对外周血和肝组织中的特异性 CTL 进行检测. 如果采用多重染色技术, 四聚体联合细胞膜^[46]或细胞内特殊标记的染色, 为特异性 CTL 的研究提供了多种实验参数, 直接或间接的反映特异性 CTL 的功能. 常常使用的细胞膜标记(活化标记、CD 分子、趋化受体)的标记^[47]、T 细胞受体 Vβ 取用(usage)^[48]的标记以及细胞内细胞因子(IFN-γ、IL-2、TNF-α)的标记^[26, 49]. 但由于某些疾病状态时抗原特异性 CTL 数量有限, 这方面的部分研究有很大的难度.

用 HBcAg18-27 表位肽四聚体研究 HBV 感染者抗原特异性 CTL, 发现急性 HBV 感染外周血四聚体阳性细胞胞膜活化标志(HLA-DR)为阳性, 但细胞的增生能力下降. 在 HCV 感染的急性期, 四聚体阳性 CTL 细胞表型为 CD28⁺CD45RA⁻, 但胞质中不含穿孔素, 为记忆型 T 细胞. 有研究认为慢性病毒肝炎患者外周血中, 特异性 CTL 产生细胞因子 IFN-γ 和 TNF-α 的能力下降, 不足以清除病毒. 而另有研究发现^[41, 49], 慢性 HCV 感染患者外周血中特异性 CTL 分泌 IFN-γ 和 TNF-α 的能力存在异质性(heterogeneous), 出现两个明显不同的亚群, 一部分特异性 CTL 接受抗原肽刺激后可以分泌 IFN-γ 并且四聚体染色强度下降, 另一部分不分泌 IFN-γ、四聚体染色不变. 而且在大部分的 HCV 感染者, 特异性 CTL 对抗原肽刺激不产生反应. 这个研究结果提示: 抗原特异性 CTL 是一个不均一的细胞群, 他是由执行不同功能的一群细胞组成.

而最近还有研究显示在急性 HBV 和 HCV 感染患者, 外周血病毒抗原表位肽四聚体染色阳性的 CD8⁺T 细胞都可表现为 CCR7⁻CD45RA⁻^[50], 即效应 - 记忆细胞亚群; 尽管表型相同, 但其功能有明显的差异. HBV 感染者特异性 CD8⁺T 细胞胞质中含有较多的穿孔素, 并且增生比较旺盛、有较强的细胞毒性作用, 体外抗原肽刺激可产生 IFN-γ, 即使在病毒得到控制时, 四聚体阳性的 CD8⁺T 细胞仍可以检测到; 而在急性 HCV 感染者, 抗原特异性 CD8⁺T 细胞功能是处于抑制状态. 不

过，其细胞功能在其自愈过程中可以逐步得到恢复，而在发展为慢性感染的患者，始终处于抑制状态。因此病毒抗原特异性CTL在HBV、HCV感染时功能状态不完全相同，这种功能上的差异可能是HCV感染时更容易慢性化的原因。

2.2 变异抗原在免疫反应中的作用 抗原特异性CTL抗原表位氨基酸变异引起的逃避变异(escape mutation)在病毒性肝炎十分常见。已经证实病毒性肝炎患者CTL识别的抗原表位肽存在变异，并且其变异可以抑制CTL释放INF- γ 和杀伤感染细胞的功能^[51-52]，在慢性化的过程中具有重要的意义。HBV核心抗原18-27(氨基酸FLPSDFFPSV)是T细胞识别的常见表位，该区变异可以抑制T细胞对抗原的识别^[53]。Maini et al^[54]合成了5个各含有1个氨基酸变异的核心抗原18-27多肽(分别为：M19, A21, E22, Y23, Y24)，用变异多肽刺激PBMC，发现变异多肽(A21, E22, Y24)刺激，能够产生INF- γ 的细胞数量不及野生株多肽刺激产生的20%，因此认为核心抗原18-27表位的变异降低了特异性CTL对抗原成分的识别效率。他们还用野生株表位肽四聚体检测不同肽段刺激所产生特异性CTL情况发现，已自愈的急性HBV感染患者PBMC在接受多肽刺激时，多个肽段可以产生四聚体阳性细胞(弱于野生株肽)，而慢性HBV感染时(野生株)，一般只对少数肽段产生反应，并且刺激产生的特异性CTL数量明显比急性肝炎患者少，结合他们同时对四聚体阳性细胞T细胞受体取用研究资料^[54]，他们认为多克隆的针对该抗原表位(18-27)的CTL有利于HBV的清除。另外他们发现1例慢性HBV感染(18-27氨基酸存在T21, Y23变异)患者PBMC接受多肽刺激时，多个变异多肽都能够产生强于野生株肽的刺激效果，他们认为这两个位点的变异尽管还能够刺激机体产生免疫应答，但不能够导致病毒的清除。他们的研究是对病毒变异导致免疫逃避观点的直接证明。

2.3 病毒抗原特异性CTL反应动力学研究 由于四聚体阳性细胞的检测直接使用感染者PBMC，不需要体外扩增，直接进行数量和功能的分析，避免了外来因素的干扰，可以准确反映病毒感染时特异性CTL的变化规律。在急性HBV感染潜伏期(至少在出现临床症状和ALT升高前4 wk)^[55]，HBV特异的CD8⁺T细胞就可以出现，并且逐步升高。Maini et al^[33]发现急性HBV感染时，病毒特异性CTL数量在急性期最高，其高峰与血清ALT升高平行，但细胞功能受到损害；随着病情的恢复，四聚体阳性CD8⁺T细胞数量逐步下降，而细胞功能逐步恢复。在整个恢复期特异性CD8⁺T细胞逐步降低，但临床完全恢复后仍保持低水平的特异性CD8⁺T细胞存在。慢性HBV急性发作(flare, exacerbation)患者^[56]，血清转氨酶(ALT)的升高与核心抗原18-27的特异性CTL(Tc18-27)的增生密切相关，并且在急性发作时Tc18-27细胞表面HLA-DR和CCR5高表达；而在静止期则为低表达。

HCV急性感染早期特异性CTL比例高，自限性感染者特异性CTL出现早、持续时间长，而不能清除病毒者则下降快、持续时间短。特异性CTL的短寿命可能是HCV持续感染的原因之一。因此抗原特异性CTL的动态变化与病毒性肝炎的发展有着密切的关系，更加强烈的支持CTL在病毒性肝炎发病中起关键作用的观点。

2.4 抗原特异性CTL增生能力的研究 T细胞增生是细胞活化的主要结果之一，对抗原特异性CD8细胞增生能力的研究可以更好的理解T细胞反应的动力学变化规律，长期以来，这方面的研究都是依靠³H标记的胸腺嘧啶核苷参入实验来完成。该方法费时、费力，并且有放射性污染的危险，实际应用有很大的局限性。CFSE(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)是一种荧光物质，对细胞无毒性，它可以进入细胞内与蛋白结合，并且随着细胞的分裂而等量分配给子代细胞，已分裂细胞的荧光强度下降，利用CFSE的这个特性，可以研究细胞的增生能力^[57]。有研究者将四聚体技术与CFSE相结合，用于抗原特异性CTL增生能力的研究^[58-59]。Wedemeyer et al^[59]将HCV感染患者PBMC进行CFSE染色后，用CTL识别的HCV表位肽进行体外刺激培养7 d，然后用四聚体进行CFSE和该表位肽四聚体的检测，CFSE荧光强度降低的四聚体阳性细胞就是已经分裂的抗原特异性CTL。他们发现慢性HCV患者抗原特异性CTL的增生能力低下，最高也不超过40%，而HCV感染自愈者抗原特异性CTL的增生旺盛，往往大于80%。如果结合CTL反应动力学研究，更能反映疾病状态下，抗原特异性CTL的变化与疾病转归的规律。

3 讨论

HLA-表位肽四聚体技术可以同时直接对特异性CTL进行定性、定量分析，具有灵敏度高、特异性強，不需要体外增生、对细胞无损伤等优点，他克服了⁵¹Cr释放分析、LDA、PCR等方法的局限性。而且在部分研究中的应用是其他方法所不能够完成的，比如对抗原特异性CTL动力学的研究以及抗原特异性CTL增生能力的研究。然而，四聚体技术也有他自身的局限：(1)他必须具有明确的抗原表位，而且他所使用的抗原表位为单一的表位，难以反映整个抗原的全貌。(2)由于各种疾病状态都有多种抗原成分，并且每个抗原成分又有多个T细胞识别抗原表位，在免疫发病机制的研究中，需要对每个抗原表位进行仔细研究，工作量非常大。(3)四聚体染色是以特定细胞结构为研究对象，客观上还需要对这些细胞进行进一步的分群和功能方面的研究。(4)由于HLA-I类分子的多样性决定一种HLA-表位肽四聚体只能适用于该种HLA型，在研究中需要根据研究对象制备不同HLA亚型的四聚体，使前期工作难度加大。

4 参考文献

- 1 Koziel MJ. The role of immune responses in the pathogenesis

- of hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 1997;4(Suppl 2): 31-41
- 2 Chisari FVFerrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1995;13:29-60
- 3 Cerny AC, Hisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999;30:595-601
- 4 Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996;274: 94-96
- 5 Benito JM, Lopez M, Lozano S, Martinez P, Kuroda M, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. Phenotype and functional characteristics of HIV-specific cytotoxic CD8+ T cells in chronically infected patients: dual effects of highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003;34: 255-266
- 6 Radaelli A, Nacs J, Tsai WP, Edghill-Smith Y, Zanotto C, Elli V, Venzon D, Trynizewska E, Markham P, Mazzara GP, Panicali D, De Giuli MC, Franchini G. Prior DNA immunization enhances immune response to dominant and subdominant viral epitopes induced by a fowlpox-based SIVmac vaccine in long-term slow-progressor macaques infected with SIVmac251. *Virology* 2003;312:181-195
- 7 Hel Z, Nacs J, Kelsall B, Tsai WP, Letvin N, Parks RW, Trynizewska E, Picker L, Lewis MG, Edghill-Smith Y, Moniuszko M, Pal R, Stevceva L, Altman JD, Allen TM, Watkins D, Torres JV, Berzofsky JA, Belyakov IM, Strober W, Franchini G. Impairment of Gag-specific CD8(+) T-cell function in mucosal and systemic compartments of simian immunodeficiency virus ma. *J Virol* 2001;75:11483-11495
- 8 Falco DA, Nepomuceno RR, Krams SM, Lee PP, Davis MM, Salvatierra O, Alexander SR, Esquivel CO, Cox KL, Frankel LR, Martinez OM. Identification of Epstein-Barr virus-specific CD8+ T lymphocytes in the circulation of pediatric transplant recipients. *Transplantation* 2002;74:501-510
- 9 Chen G, Shankar P, Lange C, Valdez H, Skolnik PR, Wu L, Manjunath N, Lieberman J. CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood* 2001;98:156-164
- 10 Shankar P, Russo M, Harnisch B, Patterson M, Skolnik PLieberman J. Impaired function of circulating HIV-specific CD8(+) T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood* 2000;96:3094-3101
- 11 Wang B, Chen H, Jiang X, Zhang M, Wan T, Li N, Zhou X, Wu Y, Yang F, Yu Y, Wang X, Yang R, Cao X. Identification of an HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell epitope SSp-1 of SARS-CoV spike protein. *Blood* 2004;[Epublish ahead of print]
- 12 Vonderheide RH, Domchek SM, Schultze JL, George DJ, Hoar KM, Chen DY, Stephans KF, Masutomi K, Loda M, Xia Z, Anderson KS, Hahn WC, Nadler LM. Vaccination of cancer patients against telomerase induces functional antitumor CD8+ T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2004;10:828-839
- 13 Zerbini A, Pilli M, Soliani P, Ziegler S, Pelosi G, Orlandini A, Cavallo C, Uggeri J, Scandroglio R, Crafa P, Spagnoli GC, Ferrari C, Missale G. Ex vivo characterization of tumor-derived melanoma antigen encoding gene-specific CD8+cells in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2004;40: 102-109
- 14 Echchakir H, Dorothee G, Vergnon I, Menez J, Chouaib S, Mami-Chouaib F. Cytotoxic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen display similar HLA tetramer binding but distinct functional avidity and tissue distribution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:9358-9363
- 15 Wolf M, Schalk S, Hellmich M, Huster KM, Busch DH, Berthold F. Quantitation of MHC tetramer-positive cells from whole blood: evaluation of a single-platform, six-parameter flow cytometric method. *Cytometry* 2004;57A:120-130
- 16 Kosor E, Gagro A, Drazenovic V, Kuzman I, Jeren T, Rakusic S, Rabatic S, Markotic A, Gotovac K, Sabioncello A, Cecuk E, Kerhin-Brkljacic V, Gjenero-Margan I, Kaic B, Mlinaric-Galinovic G, Kastelan A, Dekaris D. MHC tetramers: tracking specific immunity. *Acta Med Croatica* 2003;57:255-259
- 17 Lieberman SM, Evans AM, Han B, Takaki T, Vinnitskaya Y, Caldwell JA, Serreze DV, Shabanowitz J, Hunt DF, Nathenson SG, Santamaria P, DiLorenzo TP. Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8384-8388
- 18 Lopez-Labrador FX, He XS, Berenguer M, Cheung RC, Gonzalez-Candelas F, Wright TL, Greenberg HB. Genetic variability of hepatitis C virus non-structural protein 3 and virus-specific CD8+ response in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 2004;72:575-585
- 19 Nakamoto Y, Kaneko S, Takizawa H, Kikumoto Y, Takano M, Himeda Y, Kobayashi K. Analysis of the CD8-positive T cell response in Japanese patients with chronic hepatitis C using HLA-A*2402 peptide tetramers. *J Med Virol* 2003;70: 51-61
- 20 Sarkar AK, Tortolero-Luna G, Nehete PN, Arlinghaus RB, Mitchell MF, Sastry KJ. Studies on in vivo induction of cytotoxic T lymphocyte responses by synthetic peptides from E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus type 16. *Viral Immunol* 1995;8:165-174
- 21 Delon J, Gregoire C, Malissen B, Darche S, Lemaitre F, Kourilsky P, Abastado JP, Trautmann A. CD8 expression allows T cell signaling by monomeric peptide-MHC complexes. *Immunity* 1998;9:467-473
- 22 Abastado JP, Lone YC, Casrouge A, Boulot G, Kourilsky P. Dimerization of soluble major histocompatibility complex-peptide complexes is sufficient for activation of T cell hybridoma and induction of unresponsiveness. *J Exp Med* 1995; 182:439-447
- 23 Corr M, Slanetz AE, Boyd LF, Jelonek MT, Khilkil S, al Ramadi BK, Kim YS, Maher SE, Bothwell AL, Margulies DH. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science* 1994;265:946-949
- 24 Weber S, Traunecker A, Oliveri F, Gerhard W, Karjalainen K. Specific low-affinity recognition of major histocompatibility complex plus peptide by soluble T-cell receptor. *Nature* 1992; 356:793-796
- 25 Xu XN, Screaton GR. MHC/peptide tetramer-based studies of T cell function. *J Immunol Methods* 2002;268:21-28
- 26 Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. HIV-specific CD8(+) T cells produce anti-viral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000;192:63-75
- 27 Callan MF, Tan L, Annels N, Ogg GS, Wilson JD, O'Callaghan CA, Steven N, McMichael AJ, Rickinson AB. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* 1998; 187:1395-1402
- 28 Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdice DJ, Zajac AJ, Miller JD, Slansky J, Ahmed R. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998;8:177-187
- 29 Haridas V, McCloskey TW, Pahwa R, Pahwa S. Discordant expression of perforin and granzyme A in total and HIV-specific CD8 T lymphocytes of HIV infected children and adolescents. *AIDS* 2003;17:2313-2322
- 30 Marchant A, Appay V, Van Der SM, Dulphy N, Liesnard C, Kidd M, Kaye S, Ojuola O, Gillespie GM, Vargas Cuero AL, Cerundolo V, Callan M, McAdam KP, Rowland-Jones SL, Donner C, McMichael AJ, Whittle H. Mature CD8(+) T lymphocyte response to viral infection during fetal life. *J Clin Invest* 2003;111:1747-1755
- 31 Dunbar PR, Ogg GS, Chen J, Rust N, van der BP, Cerundolo V. Direct isolation, phenotyping and cloning of low-frequency antigen-specific cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood. *Curr Biol* 1998;8:413-416
- 32 Rubio V, Stuge TB, Singh N, Betts MR, Weber JS, Roederer M, Lee PP. Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nat Med* 2003;9:1377-1382

- 33 Maini MK, Boni C, Lee CK, Larrubia JR, Reignat S, Ogg GS, King AS, Herberg J, Gilson R, Alisa A, Williams R, Vergani D, Naoumov NV, Ferrari C, Bertoletti A. The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2000;191:1269-1280
- 34 Boni C, Penna A, Ogg GS, Bertoletti A, Pilli M, Cavallo C, Cavalli A, Urbani S, Boehme R, Panebianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology* 2001;33:963-971
- 35 Maini MK, Boni C, Ogg GS, King AS, Reignat S, Lee CK, Larrubia JR, Webster GJ, McMichael AJ, Ferrari C, Williams R, Vergani D, Bertoletti A. Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* 1999;117:1386-1396
- 36 Wu Y, Zhang J, Chen S, Chen A, Wang L, Li J, Zhao T, Zou L, Tang Y, Tingrong L, Wang F. Frequencies of epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in active chronic viral hepatitis B infection by using MHC class I peptide tetramers. *Immunol Lett* 2004;92:253-258
- 37 Lee CK, Suh JH, Cho YS, Han KH, Chung JB, Chon CY, Moon YM. Direct Analysis of HBV-Specific CD8+ Lymphocyte By Tetrameric HLA-A2/core 18-27 Complex in chronic hepatitis B. *Taehan Kan Hakhoe Chi* 2002;8:139-148
- 38 Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, Cerny A, Phillips R, Ferrari C, Pape GR, Klennerman P. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol* 2000;30:2479-2487
- 39 Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002;169:3447-3458
- 40 Belz GT, Xie W, Doherty PC. Diversity of epitope and cytokine profiles for primary and secondary influenza a virus-specific CD8+ T cell responses. *J Immunol* 2001;166:4627-4633
- 41 He XS, Rehermann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J, Wedemeyer H, Berenguer M, Wright TL, Davis M, McGreenberg HB. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5692-5697
- 42 Lauer GM, Nguyen TN, Day CL, Robbins GK, Flynn T, McGowan K, Rosenberg ES, Lucas M, Klennerman P, Chung RT, Walker BD. Human immunodeficiency virus type 1-hepatitis C virus coinfection: intraindividual comparison of cellular immune responses against two persistent viruses. *J Virol* 2002;76:2817-2826
- 43 Tsai SL, Sheen IS, Chien RN, Chu CM, Huang HC, Chuang YL, Lee TH, Liao SK, Lin CL, Kuo GC, Liaw YF. Activation of Th1 immunity is a common immune mechanism for the successful treatment of hepatitis B and C: tetramer assay and therapeutic implications. *J Biomed Sci* 2003;10:120-135
- 44 Reignat S, Webster GJ, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, Dusheiko G, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2002;195:1089-1101
- 45 Tsai SL, Lee TH, Chien RN, Liao SK, Lin CL, Kuo G, Liaw YF. A method to increase tetramer staining efficiency of CD8+ T cells with MHC-peptide complexes: therapeutic applications in monitoring cytotoxic T lymphocyte activity during hepatitis B and C treatment. *J Immunol Methods* 2004;285:71-87
- 46 Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003;281:65-78
- 47 Grabowska AM, Lechner F, Klennerman P, Tighe PJ, Ryder S, Ball JK, Thomson BJ, Irving WL, Robins RA. Direct ex vivo comparison of the breadth and specificity of the T cells in the liver and peripheral blood of patients with chronic HCV infection. *Eur J Immunol* 2001;31:2388-2394
- 48 Wilson JD, Ogg GS, Allen RL, Goulder PJ, Kelleher A, Sewell AK, O' Callaghan CA, Rowland-Jones SL, Callan MF, McMichael AJ. Oligoclonal expansions of CD8(+) T cells in chronic HIV infection are antigen specific. *J Exp Med* 1998;188:785-790
- 49 He XS, Rehermann B, Boisvert J, Mumm J, Maecker HT, Roederer M, Wright TL, Maino VC, Davis MM, Greenberg HB. Direct functional analysis of epitope-specific CD8+ T cells in peripheral blood. *Viral Immunol* 2001;14:59-69
- 50 Urbani S, Boni C, Missale G, Elia G, Cavallo C, Massari M, Raimondo G, Ferrari C. Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J Virol* 2002;76:12423-12434
- 51 Bertoletti A, Sette A, Chisari FV, Penna A, Leviero M, De Carli M, Fiaccadori F, Ferrari C. Natural variants of cytotoxic epitopes are T-cell receptor antagonists for antiviral cytotoxic T cells. *Nature* 1994;369:407-410
- 52 Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, Elvin JG, Rothbard JA, Bangham CR, Rizza CR. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* 1991;354:453-459
- 53 Bertoletti A, Southwood S, Chesnut R, Sette A, Falco M, Ferrara GB, Penna A, Boni C, Fiaccadori F, Ferrari C. Molecular features of the hepatitis B virus nucleocapsid T-cell epitope 18-27: interaction with HLA and T-cell receptor. *Hepatology* 1997;26:1027-1034
- 54 Maini MK, Reignat S, Boni C, Ogg GS, King AS, Malacarne F, Webster GJ, Bertoletti A. T cell receptor usage of virus-specific CD8 cells and recognition of viral mutations during acute and persistent hepatitis B virus infection. *Eur J Immunol* 2000;30:3067-3078
- 55 Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A, Brown D, Amlot PL, Williams R, Vergani D, Dusheiko GM, Bertoletti A. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000;32:1117-1124
- 56 Shimada N, Yamamoto K, Kuroda MJ, Terada R, Hakoda T, Shimomura H, Hata H, Nakayama E, Shiratori Y. HBcAg-specific CD8 T cells play an important role in virus suppression, and acute flare-up is associated with the expansion of activated memory T cells. *J Clin Immunol* 2003;23:223-232
- 57 Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* 2000;243:147-154
- 58 Turner SJ, Cross R, Xie W, Doherty PC. Concurrent naive and memory CD8(+) T cell responses to an influenza A virus. *J Immunol* 2001;167:2753-2758
- 59 Coles RM, Mueller SN, Heath WR, Carbone FR, Brooks AG. Progression of armed CTL from draining lymph node to spleen shortly after localized infection with herpes simplex virus 1. *J Immunol* 2002;168:834-838

• 文献综述 •

丙型肝炎病毒感染与皮肤病

宋志强, 郝飞, 王宇明

宋志强, 郝飞, 中国人民解放军第三军医大学西南医院皮肤科 重庆市 400038
王宇明, 中国人民解放军第三军医大学全军感染病中心 重庆市 400038
国家自然科学基金资助课题, No. 30200249
项目负责人: 宋志强, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院皮肤科. songzq@mail.tmmu.com.cn
电话: 023-68754493
收稿日期: 2003-08-08 接受日期: 2004-02-03

摘要

丙型肝炎病毒感染不仅可以导致肝脏疾病的病变, 还可引起多种肝外系统损害, 包括皮肤的异常, 如冷球蛋白血症、迟发性皮肤卟啉症、白细胞破碎性血管炎、网状青斑等。免疫机制和HCV在皮肤组织的复制可能为其发病机制。认识HCV感染相关皮肤病, 不仅有助于丙型肝炎的早期诊断, 而且对皮肤病的病因治疗也非常有益。

宋志强, 郝飞, 王宇明. 丙型肝炎病毒感染与皮肤病. 世界华人消化杂志 2004; 12(6):1437-1440
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1437.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是输血后肝炎发生的主要病因, 一旦感染易呈慢性化, 且与肝硬化及原发性肝癌的发生密切相关。自1989年美国Choo et al^[1]首次成功克隆出HCV cDNA以来, 丙型肝炎及其相关性疾病的研究已取得很大进展。丙型肝炎病毒是一单股正链RNA病毒, 全长大约由9 400个核苷酸组成, 其基因结构和人类黄病毒属和动物瘟病毒属中某些病毒如日本脑炎病毒、登革热病毒等基因组有偶学多共同特性。目前认为, HCV主要存在6种基因型别^[2]。HCV在不同性别、不同年龄、不同种族的人群中都可发病; 在传播方式上已明确除经血液传播外, 还存在生活密切接触传播、母婴传播、性传播、经移植物传播等方式。

丙型肝炎的临床表现与乙型肝炎有许多相似之处, 但丙型肝炎症状常较轻微, 临床表现为乏力、纳差、肝区不适等。HCV感染的最大特点是极易慢性化, 部分发展为肝硬化甚至肝细胞癌。目前已建立的实验室方法包括酶联免疫黏附法(ELISA)和重组免疫印迹分析法(RIBA)检测抗HCV抗体及PCR检测HCV-RNA。

近年来, 随着HCV基因的获得和特异性血清学诊断方法的建立, 人们已经注意到HCV感染不仅可以导致肝脏病变, 还可引起多种肝外系统损害, 包括皮肤的异常, 有时皮肤表现甚至可以是HCV隐匿性感染的唯一临床表现^[2-4]。HCV感染相关的皮肤改变可根据关联程度人为分为密切相关疾病、有一定关联疾病、可能有关联

疾病(表1)。了解HCV感染时的皮肤表现及其诱发的皮肤疾病, 不但可以丰富临床医师对丙型肝炎的认识, 而且对丙型肝炎的早期诊断、治疗和预后都有重要意义。

表1 与HCV感染相关的皮肤表现

| 密切相关疾病 | 有一定关联疾病 | 可能相关疾病 |
|-----------|---------|----------------|
| 冷球蛋白血症 | 扁平苔藓 | 结节性红斑 |
| 迟发性皮肤卟啉症 | 干燥综合征 | 多形红斑 |
| 白细胞破碎性血管炎 | 荨麻疹 | 白塞氏病 |
| 网状青斑 | 瘙痒症 | 坏疽性脓皮病 |
| | 结节性多动脉炎 | 白癜风 |
| | | 银屑病 |
| | | 单侧痣样毛细血管扩张 |
| | | Mooren角膜溃疡 |
| | | 环状肉芽肿 |
| | | 播散性浅表性光线性汗孔角化症 |

1 HCV感染相关的皮肤病

1.1 冷球蛋白血症(cryoglobulinemia) 冷球蛋白血症是一种免疫介导的多系统受累疾病, 病因尚不清楚。本病的基本特征是循环免疫复合物在血管和组织中沉积并激活补体引起弥漫性血管炎, 可累及皮肤、肾脏、关节、神经系统等多个脏器和组织, 主要临床表现包括双下肢可触及性紫癜、关节疼痛、雷诺氏现象、肾炎, 甚至神经病变。该症患者存在一种遇冷沉淀、温暖后又溶解的免疫球蛋白, 因此而得名。按免疫球蛋白克隆成分可将冷球蛋白血症分为I、II、III型。I型通常与淋巴细胞异常增生有关, II和III型又称特发性混合性冷球蛋白血症(essential mixed cryoglobulinemia, EMC), 可能继发于某些自身免疫性疾病或与某些病毒感染有关。

有研究显示, 大约40-54%慢性丙肝患者伴有冷球蛋白血症, 而在乙型肝炎中仅15%, 其他原因的肝脏疾病为32%^[5]。慢性持续性HCV感染中, 年长、女性和/或肝硬化患者中混合性冷球蛋白血症的发生率更高, 且多与2a型相关。以往的研究认为, 只有一小部分(约10%)HCV感染相关的冷球蛋白血症患者出现相关的临床症状, 如紫癜、外周神经障碍或雷诺现象。但最近的2个研究报告中, 25-42%的冷球蛋白血症患者可以出现临床症状。

1990年初期曾应用第一代ELISA在EMC患者中检测到高滴度抗HCV(50-100%), 进一步应用特异性较高的RIBA法检测抗HCV同样存在较高的阳性率(42-96%),

从而确立了HCV感染与EMC发生之间的关系。同时，RT-PCR也从81-91%的EMC患者血中检测到HCV-RNA。而在冷球蛋白沉淀可检出比血清中更高滴度(100-1 000倍)的HCV-RNA和抗HCV；类似地，高滴度的HCV-RNA在冷球蛋白血症相关紫癜皮损的检出率也明显比正常皮损高^[6-10]。

应用α干扰素(α-IFN)系统治疗后可使50% HCV相关的EMC患者出现临床症状和生化指标的改善，表现为皮损的减退、血清IgM和丙种球蛋白水平的显著下降^[11]。不过，如果中途停止治疗或治疗后HCV复发，则冷球蛋白血症也会再现。

1.2 迟发性皮肤卟啉症(porphyria cutanea tarda, PCT)又称症状性皮肤卟啉症、获得性卟啉症等，是以皮肤光敏感和脆性增加为特征的卟啉代谢病。他是由肝细胞中尿卟啉原脱羧酶(UROD)活性降低或缺乏所致。本病一般分为2型，I型仅肝细胞中酶的活性低于50%，以散发为主；II型酶的缺乏见于红细胞等其他细胞，较为少见，且有家族史。本病发病前卟啉代谢异常可数年无症状，可由多种原因(包括酒精、病毒、药物、铁负荷过量)导致的肝细胞损伤而诱发。

研究显示，PCT患者中抗HCV抗体阳性或病毒血症的检出率为62-100%，而对照疾病组的抗HCV阳性率不超过5%，支持HCV感染与PCT发生关系密切的观点。进一步的研究发现，伴有肝损害的散发性病例中HCV感染的检出率高，且与肝损害程度密切相关，而无肝损害的PCT和家族性PCT患者无1例检出。Navas et al^[12]对34例散发性PCT患者的肝组织、外周血单核细胞(PBMC)和血清分别检测HCV RNA，发现在所有PCT患者的肝脏和外周血中均有HCV-RNA，而血清中HCV-RNA仅有45%的阳性率，提示仅检测血清中的HCV RNA可能过低地估计PCT患者中的HCV感染状况。作者认为，慢性HCV感染或HCV诱导的肝损害可能是有潜在卟啉代谢异常的易感人群中PCT发生和/或进展的诱发因素。因此，PCT患者应给予最敏感的技术检测潜在的HCV感染；相应地，尽管目前缺乏有关α-IFN在HCV相关的PCT中的作用，对HCV阳性的PCT患者进行系统的抗病毒治疗是可以考虑的。

也有研究认为，HCV感染并不一定是PCT发生的诱发因素，因为其他一些因素如酒精滥用、铁过量、HBV感染常常在PCT中被发现。Stolzel et al^[13]研究发现，100例PCT患者中有6例经RIBA鉴定为抗HCV阳性，且其中仅有3例HCV RNA阳性。他们认为，HCV感染与PCT的发生并不密切相关，有关HCV感染与PCT发生的关系尚需扩大例数作行深入研究。

1.3 皮肤血管炎(cutaneous necrotising vasculitis)与HCV感染相关的皮肤血管炎包括白细胞破碎性血管炎和坏死性血管炎2种，其中后者是以真皮血管的破坏及血管壁或周围嗜中性粒细胞的浸润为特征。血管炎的临床表现为双下肢可触及性紫癜、疼痛性结节、网状青斑等，其

中可触性紫癜为其特征性皮损。Daoud et al^[14]和Karlsberg et al^[15]报道了一些HCV感染伴发皮肤血管炎的病例，大部分患者不但可检测到包括单克隆IgM和多克隆IgG的冷球蛋白，而且可发现类风湿因子增加及总补体和C4水平低下。不过，尽管HCV可在皮肤和角质形成细胞中被检出，坏死性血管炎可能是冷球蛋白沉积的结果，而非HCV在血管壁复制的结果。α-IFN治疗后，有报道可导致紫癜的消失，也有报道导致坏死皮损的加剧^[16]。

1.4 扁平苔藓(lichen planus, LP)扁平苔藓是一种病因不明的慢性或亚急性炎症性皮肤病，其皮损特征常为紫红色多角形扁平丘疹，常伴有口腔损害。他常常与慢性肝病相关。Mokni et al^[17]先后报道数例同时患有LP和HCV的患者。Jubert et al^[18]对6例LP患者进行了抗HCV和RNA的检测，证实他们均存在HCV感染，而其他相关报道中，LP患者中抗HCV阳性率为9.8%-23%。另一方面，Pawlotsky et al^[2]研究显示慢性丙肝患者中发生LP的几率为5%。HCV相关的LP多呈泛发性分布，黏膜受累几率也比较高。

尽管HCV在LP的发展中作用尚不清楚，在LP患者中，尤其是伴有口腔损害和/或皮疹成泛发分布，或有肝脏疾病的患者中，进行系统的HCV检测是值得推荐的。也可尝试系统的α-IFN治疗。但要注意的是，经过系统的α-IFN治疗后，有些患者皮损明显改善，有些则保持不变，有些甚至恶化。有报道一些本来没有LP的慢性丙肝经α-IFN治疗后出现LP的爆发。

1.5 其他皮肤表现在HCV感染患者中也可以出现其他类型的皮肤损害，包括荨麻疹、多形红斑、结节性红斑、白塞氏病等，这些皮肤改变可能是潜在的冷球蛋白血症和血管炎的表现，而有些报道可能是偶然的。

1.5.1 荨麻疹(urticaria)荨麻疹尤其是慢性荨麻疹的诱发因素很难确定。以往有急性HBV感染发生荨麻疹的报道，而无HCV相关报道。Reichel et al^[19]曾报道1例患者，在接受输血后患急性丙型肝炎并伴发急性荨麻疹，作者推测荨麻疹可能与HCV感染有关，但缺乏确切证据。Kanzawa et al^[20]对79例荨麻疹患者进行HCV检测，结果发现19例(24%)抗HCV抗体阳性，17例(22%)HCV-RNA阳性，这些阳性患者的血清转氨酶较高，皮疹持续时间相对较长且消失后往往遗留色素沉着，因此认为HCV感染是荨麻疹的重要原因之一。其机制可能与III型变态反应有关。

1.5.2 瘙痒症(pruitus)瘙痒可有多种因素引起。Fisher et al^[21]报道4例丙型肝炎患者出现全身皮肤瘙痒，体检发现皮肤有结痂、点状表皮剥脱和干燥等非特异性表现，并排除了其他可能引起瘙痒的原因。作者认为，瘙痒可能是HCV感染的皮肤表现；一般肝炎相关的瘙痒常由胆汁淤积引起，而丙型肝炎一般无黄疸，其瘙痒可能与肝细胞膜上的非胆汁性致瘙痒原有关。α-IFN联合口服病毒唑已用于慢性丙肝的治疗，这种疗法也可

引起皮肤瘙痒。不过, 这种副作用通常较轻, 不需终止治疗或减少剂量。

1.5.3 痒疹(prurigo) 有学说认为痒疹与肝炎病毒感染有关。Kanazawa et al 曾对978例皮肤科门诊患者(包括28例痒疹患者^[2], 其中25例为单纯性, 3例为结节性痒疹)用ELISA检测有无HCV感染, 结果在28例痒疹患者中, 11例(39%)有HCV感染; 而另外950例非痒疹患者中, 仅49例(5%)有HCV感染。因此, 作者认为, HCV感染可能是痒疹的发病原因, 其发病机制可能与HCV患者的循环免疫复合物沉积有关。

1.5.4 结节性多动脉炎(polyarteritis nodosa, PAN) PAN是一种少见的、多器官、系统性坏死性血管炎, 多发生于中老年男性, 是小、中动脉炎症和坏死的结果; 仅约25%的患者可出现皮肤症状, 皮损表现为皮下结节, 可形成溃疡。慢性感染、药物反应、链球菌感染被认为与结节性多动脉炎有关。1993年Carson et al^[22]检测了56例PAN中HCV感染的情况, 发现近20%抗HCV阳性, 而且伴有HCV感染的PAN常常出现皮肤损害。HCV在PAN发病中的机制尚不清楚, 二者的关系尚不能确定, 有认为HCV可能引起动脉炎症, 也有人认为HCV改变了内皮细胞功能导致动脉血管壁损伤引起血管炎。

1.5.5 多形红斑(erythema multiforme, EM) EM是一种急性、容易复发的炎症性皮肤病, 皮疹多形, 多伴黏膜损害。Antinori et al^[23]曾于1991年报道1例HCV感染相关EM。此患者在接受输血22 wk发生急性肝炎, 4 wk后出现典型的多形红斑, 此时检测抗HCV阳性。皮损于3 wk内与肝炎症状同时消失, 转氨酶和胆红素也逐渐恢复正常。这个病例可能提示HCV可作为诱发EM的一个因子。

1.5.6 结节性红斑(erythema nodosum, EN) EN的皮损特点是双下肢出现对称性、疼痛性红斑和结节。Domingo et al^[24]曾报道1例青年男性在牙科手术6 wk后双下肢胫前出现对称、压痛的结节和淤点, 抗HCV阳性, 给予对症处理后患者结节消失, 转氨酶恢复正常。作者认为结节性红斑是急性HCV感染的一种皮肤表现。

1.5.7 白塞氏病(behcet's disease) Munke et al^[25]于1995年报道了1例输血感染HCV 5 a后发生白塞氏病, 其出现结膜炎、口腔、生殖器溃疡、毛囊炎、多关节炎和发热等典型症状, 感染8 a后行肝活检提示中度活动性肝炎, 给予干扰素治疗后转氨酶逐渐降低, 白塞氏病的症状逐渐稳定。

1.5.8 其他肝外表现 HCV感染中皮肤的改变也可以是肝外表现的一部分, 包括HCV感染或 α -IFN治疗中引起甲状腺功能失调时的皮肤改变、HCV相关的血小板减少性紫癜(ITP)和抗心磷脂综合征的紫癜皮疹。目前已报道数例在HCV感染患者中伴发ITP。当然一些血小板中度减少的病例可能与门脉高压导致的脾肿大有关, 实际上还是与HCV感染有关。慢性丙肝经 α -IFN治疗后导致的血小板减少也被报道, 可能代表潜在的血小

板异常可被 α -IFN诱发^[26]。

2 治疗

HCV相关的皮肤病对 α -IFN的治疗反应结果往往无法预料。在坏死性血管炎和冷球蛋白血症, 治疗反应常常较好但是暂时的。患者大多数最终恶化, 导致致命并发症。对于HCV相关的LP, α -IFN治疗后恶化和保持不变的比例基本一致, 只有少部分对这种治疗出现积极反应。缺乏有关HCV相关PCT的治疗资料。部分HCV感染相关的肝外表现对干扰素治疗反应(见表2)。

表2 慢性HCV感染 α -IFN治疗对肝外和皮肤表现的效果

| 疾病 | 治疗效果 |
|----------------------|-----------|
| 自身免疫性肝炎 | 恶化 |
| 冷球蛋白血症和血管炎 | 改善或无变化 |
| 肾小球肾炎 | 改善或无变化 |
| 肝脏自身抗体 ANA, SMA, LKM | 改善或无变化或恶化 |
| 潜在的肌肉异常 | 恶化 |
| 扁平苔藓 | 改善或无变化或恶化 |
| Mooren角膜溃疡 | 改善 |
| 非何杰金氏淋巴瘤 | 改善 |
| PCT | 改善或不定 |
| 血小板减少症 | 改善或恶化 |
| 甲状腺功能异常 | 改善或无变化 |

总之, HCV感染可能不但与肝功能改变有关, 还与一系列肝外组织器官功能异常有关, 包括某些皮肤病。免疫机制和HCV在肝外组织的复制可能是其发病机制。本文所提及的皮肤病中, 有些病种与HCV的关系已得到证实, 有些尚需进一步扩大病例进行深入研究。临床医师应当将HCV看作一种可引起机体多器官、系统功能失常的因子, 而非仅限于肝脏。认识HCV感染与相关皮肤病的关系, 不仅有助于丙型肝炎的早期诊断, 而且对皮肤病的病因治疗也非常有益。HCV感染相关皮肤病对干扰素的治疗可能反应良好, 可能保持静止, 可能发生恶化。

3 参考文献

- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244: 359-362
- Pawlotsky JM, Dhumeaux D, Bagot M. Hepatitis C virus in dermatology. A review. *Arch Dermatol* 1995;131:1185-1193
- Jackson JM. Hepatitis C and the skin. *Dermatol Clin* 2002;20: 449-458
- Hadziyannis SJ. Skin diseases associated with hepatitis C virus infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998;10:12-21
- Pawlotsky JM, Ben Yahia M, Andre C, Voisin MC, Intrator L, Roudot-Thoraval F, Deforges L, Duvoux C, Zafrani ES, Duval J. Immunological disorders in C virus chronic active hepatitis: a prospective case-control study. *Hepatology* 1994;9:841-848
- Lunel F, Musset L, Cacoub P, Frangeul L, Cresta P, Perrin M, Gripon P, Hoang C, Valla D, Piette JC. Cryoglobulinemia in

- chronic liver diseases: role of hepatitis C virus and liver damage. *Gastroenterology* 1994;106:1291-1300
- 7 Dupin N, Chosidow O, Lunel F, Cacoub P, Musset L, Cresta P, Frangeul L, Piette JC, Godeau P, Opolon P. Essential mixed cryoglobulinemia. A comparative study of dermatologic manifestations in patients infected or noninfected with hepatitis C virus. *Arch Dermatol* 1995;131:1124-1127
- 8 Cresta P, Musset L, Cacoub P, Frangeul L, Vitour D, Poynard T, Opolon P, Nguyen DT, Golliot F, Piette JC, Huraux JM, Lunel F. Response to interferon alpha treatment and disappearance of cryoglobulinaemia in patients infected by hepatitis C virus. *Gut* 1999;45:122-128
- 9 Misiani R, Bellavita P, Fenili D. Hepatitis C virus and cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 1993;328:1121
- 10 Lunel F, Musset L. Hepatitis C virus infection and cryoglobulinemia. *J Hepatol* 1998;29:848-855
- 11 Misiani R, Bellavita P, Fenili D, Vicari O, Marchesi D, Sironi PL, Zilio P, Vernocchi A, Massazza M, Vendramin G. Interferon alfa-2a therapy in cryoglobulinemia associated with hepatitis C virus. *N Engl J Med* 1994;330:751-756
- 12 Navas S, Bosch O, Castillo I, Marriott E, Carreno V. Porphyria cutanea tarda and hepatitis C and B viruses infection: a retrospective study. *Hepatology* 1995;21:279-284
- 13 Stolzel U, Kostler E, Koszka C, Stoffler-Meilicke M, Schuppan D, Somasundaram R, Doss MO, Habermann KO, Riecken EO. Low prevalence of hepatitis C virus infection in porphyria cutanea tarda in Germany. *Hepatology* 1995;21:1500-1503
- 14 Daoud MS, el-Azhary RA, Gibson LE, Lutz ME, Daoud S. Chronic hepatitis C, cryoglobulinemia, and cutaneous necrotizing vasculitis. Clinical, pathologic, and immunopathologic study of twelve patients. *J Am Acad Dermatol* 1996;34:219-223
- 15 Karlsberg PL, Lee WM, Casey DL, Cockerell CJ, Cruz PD Jr. Cutaneous vasculitis and rheumatoid factor positivity as presenting signs of hepatitis C virus-induced mixed cryoglobulinemia. *Arch Dermatol* 1995;131:1119-1123
- 16 Daoud MS, Gibson LE, Daoud S, el-Azhary RA. Chronic hepatitis C and skin diseases: A review. *Mayo Clinic Proceedings* 1995;70:559-564
- 17 Mokni M, Rybojad M, Puppin D Jr, Catala S, Venezia F, Djian R, Morel P. Lichen planus and hepatitis C virus. *J Am Acad Dermatol* 1991;24:792
- 18 Jubert C, Pawlotsky JM, Pouget F, Andre C, DeForges L, Bretagne S, Mavier JP, Duval J, Revuz J, Dhumeaux D. Lichen planus and hepatitis C virus-related chronic active hepatitis. *Arch Dermatol* 1994;130:73-76
- 19 Reichel M, Mauro TM. Urticaria and hepatitis C. *Lancet* 1990; 336:822-823
- 20 Kanazawa K, Yaoita H, Tsuda F, Okamoto H. Hepatitis C virus infection in patients with urticaria. *J Am Acad Dermatol* 1996;35:195-198
- 21 Fisher DA, Wright TL. Pruritus as a symptom of hepatitis C. *J Am Acad Dermatol* 1994;30:629-630
- 22 Carson CW, Conn DL, Czaja AJ, Wright TL, Brecher ME. Frequency and significance of antibodies to hepatitis C virus in polyarteritis nodosa. *J Rheumatol* 1993;20:304-309
- 23 Antinori S, Esposito R, Aliprandi CA, Tadini G. Erythema multiforme and hepatitis C. *Lancet* 1991;337:428
- 24 Domingo P, Ris J, Martinez E, Casas F. Erythema nodosum and hepatitis C. *Lancet* 1990;336:1377
- 25 Munke H, Stockmann F, Ramadori G. Possible association between Behcet's syndrome and chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1995;332:400-401
- 26 Nagamine T, Ohtuka T, Takehara K, Arai T, Takagi H, Mori M. Thrombocytopenia associated with hepatitis C viral infection. *J Hepatol* 1996;24:135-140

世界华人消化杂志 2005 年由月刊改为半月刊

本刊讯 中国科技期刊引证报告(2003年版):2002年度世界华人消化杂志总被引频次4151,影响因子1.926,即年指标0.424,他引总引比0.45,引用刊数173,扩散因子4.2,被引半衰期2.99,地区分布数26,机构数138,国际论文比0.03,基金论文比0.27。2002年度各学科影响因子较高的3种期刊排名:世界华人消化杂志影响因子1.926,临床医学排名第2位。2002年度总被引频次较高的20种期刊排名:世界华人消化杂志总被引频次4151,排名第1位。世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊,中国科技论文统计源期刊,2001年度第一届中国百种杰出学术期刊。世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,荷兰《医学文摘库/医学文摘》,俄罗斯《文摘杂志》收录。为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展,从2005年开始,世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊,大16开,160页,每月1,15日出版,50元/期,全年24期,邮发代号82-262,北京报刊发行局发行。(世界胃肠病学杂志2004-06-15)

• 文献综述 •

炎症性肠病的免疫治疗进展

程虹, 夏冰

程虹, 夏冰, 武汉大学中南医院药学部内科 湖北省武汉市 430071
湖北省科技攻关项目资助课题, No. 2003AA301C08
项目负责人: 夏冰, 430071, 湖北省武汉市, 武汉大学中南医院药学部内科.
bingxia@public.wh.hb.cn
电话: 027-62510629
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2003-03-02

摘要

传统的免疫抑制剂用于炎症性肠病(IBD)的治疗总体来说是有效的, 但不是对所有 IBD 患者均有作用, 而且并发的不良反应不同程度地影响着患者的生活质量。多项研究显示, 新型免疫抑制剂如环孢素A、他克莫司、霉酚酸酯对IBD 有效, 但其疗效和安全性需进一步评价。肠黏膜免疫系统的分子机制及其在IBD发病过程中的进展, 为新的免疫治疗策略提供了思路, 包括针对各种细胞因子、细胞黏附分子、NF-Kappa B、MAP 激酶等途径。目前只有 infliximab 获美国FDA批准用于克罗恩病的治疗, 其余治疗策略需更多资料证实其疗效。

程虹, 夏冰. 炎症性肠病的免疫治疗进展. 世界华人消化杂志 2004;12(6): 1441-1444
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1441.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括克罗恩病(Crohn's disease, CD)和溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC), 病因迄今未明, 但认为本病主要由环境、遗传、免疫等多种因素相互作用所致。近年来, 随着对该病免疫发病机制研究的进展, 不少新的免疫治疗策略和药物问世。本文在总结传统免疫抑制剂的基础上, 重点阐述近几年临床或实验应用的新型免疫治疗药物疗法。

1 传统免疫抑制剂

用于IBD治疗的传统免疫抑制剂包括糖皮质激素、硫唑嘌呤(azathioprine, AZA)或 6-巯嘌呤(6-mercaptopurine, 6-MP)、氨甲蝶呤(methotrexate, MTX)等。

糖皮质激素用于治疗中至重度活动性 IBD, 可有效控制病情活动。但在治疗过程中约20%患者对激素无反应, 约36%患者在1 a 内形成激素依赖性。对糖皮质激素依赖的患者, 口服新型糖皮质激素布地奈德可保持与传统激素相同的疗效, 副作用减轻, 但长期疗效尚待进一步评估^[1]。

对糖皮质激素无反应或对糖皮质激素依赖的患者,

可用 AZA 或 6-MP. AZA 起效慢, 用药约 3-6 mo 后临床疗效才能显示出来, 具有良好的长期疗效。对 AZA 或 6-MP 无反应或无法耐受的患者, 可选用 MTX. 两组个大型临床对照试验表明, MTX 可有效控制激素无反应性或激素依赖性 CD, 短期和长期疗效均佳。每周肌注 25 mg MTX 显示有效诱导缓解; 每周 1 次肌注 15 mg MTX, 也能有效维持治疗。目前, 三个方面限制了 AZA、6-MP 及 MTX 的广泛应用。第一, 仅 40% 的患者长期治疗有效; 第二, 近期治疗的毒副作用, 以骨髓抑制为主, MTX 还可引起肝毒性、胰腺炎和肺纤维化; 第三, 远期有发生癌症的危险^[2]。

2 新型免疫抑制剂

2.1 环孢素 A(cyclosporin, CsA) 为真菌培养液中分离的环状 11 肽, 通过抑制 Ca^{2+} 依赖性丝氨酸 / 苏氨酸磷酸酶活性, 选择性抑制 T 细胞尤其是 Th 细胞的分化和增生, 以及细胞因子如 IL-2 的表达。多项临床研究表明, CsA 治疗 IBD 特别是难治性 UC 短期效果较好, 可有效控制对激素无反应患者的病情活动性, 但长期疗效不佳, 且易发生严重不良反应, 如肝、肾毒性^[3-4]。CsA 抑制一氧化氮合酶在人结肠上皮细胞和肠微血管内皮细胞中的表达及一氧化氮的产生, 而后者可抑制白细胞的黏附, CsA 长期疗效欠佳可能与此有关^[5-6]。因此, CsA 只能作为长期使用长期免疫调节治疗方案的一种短期辅助药物。

2.2 他克莫司(tacrolimus, FK506) 为 23 元环大环内酯, 从筑波链霉菌的发酵液中分离, 结构不同于 CsA, 但二者免疫抑制作用机制相似。其体内和体外抑制淋巴细胞活性的能力为 CsA 的 10-100 倍, 肝毒性较环孢素小, 但存在一定程度的神经毒性和肾毒性。Fellermann et al^[7]报道, 11 例对激素无反应的 IBD 患者静脉注射他克莫司后, 7 例患者临床症状迅速改善, 2 例症状略有改善, 2 例无效。6 例患者出现震颤、关节痛、糖尿病、鹅口疮和脱发等不良反应, 1 例不能完成治疗^[7]。Sandborn et al^[8]报道了 3 例 Crohn 病患者口服他克莫司($0.15\text{-}0.29 \text{ mg/kg}^{-1}/\text{d}^{-1}$)后吸收良好, 临床症状迅速好转。但目前尚缺乏他克莫司治疗 IBD 的临床对照试验以及长期使用安全性资料。该药用于 IBD 的最佳血药浓度还有待确定, 亦无证据支持他克莫司对 IBD 的疗效优于 CsA。故目前对他克莫司用于 IBD 的治疗仍需谨慎, 同时需密切监控其血药浓度^[9]。

2.3 霉酚酸酯(mycophenolate mofetil, MMF) 为霉酚

酸(MPA)衍生物，吸收后迅速水解为MPA，抑制T、B细胞中嘌呤的经典合成，进而抑制淋巴细胞的增生。不良反应主要有胃肠道反应、白细胞减少及感染等，与AZA比较，严重的骨髓抑制、肝、肾毒性及癌变危险性较小。

一项前瞻性非对照临床试验表明，对慢性活动性IBD患者，给予MMF 2 g/d⁻¹，疗程6 mo，第4 mo起加用强的松5 mg/kg⁻¹，不能诱导和维持病情缓解^[10]。另有报道，MMF(20 mg/kg⁻¹)+强的松治疗慢性活动性UC，4 wk后可使67%患者病情缓解，但其安全性和疗效不及使用AZA(2 mg/kg⁻¹)+强的松。为进一步评价MMF对活动性IBD的疗效，尚需进行安慰剂对照双盲临床试验^[11]。

3 抗TNF策略

现代免疫学研究表明，通过特异性抑制促炎症细胞因子或使用调节性和抗炎症性细胞因子治疗IBD已成为可能，其中最成功的治疗策略是抗TNF。TNF在介导IBD特别是CD的炎症中发挥重要作用，运用抗TNF策略治疗CD包括嵌合性单克隆抗体infliximab，人源性单克隆抗体CDP571，TNF受体融合蛋白etanercept，人可溶性TNFp55受体oncept，人源性单克隆抗体adalimumab(D2E7)，抗人TNF抗体Fab'段聚乙二醇复合物(CDP870)等药物。

3.1 infliximab infliximab是惟一经美国FDA批准用于治疗IBD的免疫调节性药物。他是一种嵌合性单克隆IgG-1类抗体，能与可溶性及膜表面的TNF结合。Infliximab显著的临床效应可能是由于他与膜表面的TNF结合后，介导补体活化以及通过抗体介导的细胞毒性诱导细胞溶解，导致表达TNF的T细胞缺失，而且infliximab通过增加BAX/Bcl-2促进活化T细胞的凋亡，氨甲蝶呤对此有协同作用^[12]。

多组双盲对照临床试验表明，infliximab用于难治性CD，可有效诱导和维持缓解，能迅速控制瘘管。该药起效快，通常在2 wk内发挥作用，单次注射后疗效可持续30 wk，但是大多数患者在抗体从血清中消失，即8-12 wk后复发。每隔8 wk注射 infliximab可以维持疗效并达到1 a缓解^[13-16]。对于难治性隐形瘘管的治疗，infliximab已成为第一线的首选药物，但最好联合应用AZA或6-MP进行维持治疗，以获得良好疗效^[17]。Infliximab对UC的疗效正在观察中。该药的不良反应包括：输液反应、产生人抗嵌合性抗体，迟发性变态反应、形成自身抗体。极少数患者可发生药源性狼疮、严重感染，如结核^[18]。

3.2 CDP571 CDP571是人源性IgG-4单克隆抗体，已有2个双盲对照临床试验证实其可有效治疗活动性及激素无反应性CD^[19-20]。该药还可能有闭合瘘管和维持病情缓解的作用，其不良反应有输液反应、产生异型抗体、形成自身抗体等^[18]。

3.3 沙利度胺 近年发现本品有免疫抑制作用，可抑制Th1细胞因子的产生，同时诱导Th2细胞因子的产生，3项小样本临床试验显示该药对激素无反应性及激素依赖性CD有效^[21-23]。另一项临床试验表明，沙利度胺用于难治性IBD患者，可抑制其结肠黏膜中TNF- α 和IL-12的生成，该机制可能与沙利度胺对CD的疗效有关^[24]。但该药在低剂量即出现周围神经症状和催眠作用，使其大规模应用受到限制。

3.4 其他 etanercept 即TNF受体融合蛋白，是将编码人TNF受体p57可溶段的DNA与编码IgG-1重链C端稳定区的DNA连接起来，经哺乳动物细胞株表达制成，可与细胞表面的TNF受体竞争性结合。尽管一项前瞻性研究显示etanercept对CD有一定疗效^[25]，但随后进行的临床对照试验证实etanercept对CD无效。尽管有关oncept和CNI-1493的前瞻性研究显示他们对CD有效，但仍似证据不足。目前尚无关于adalimumab或CDP870对IBD疗效的资料^[18]。

4 抗黏附分子治疗策略

黏附分子具有调节白细胞附壁、趋化、游走等功能，参与肠黏膜抗原呈递和局部淋巴细胞的活化。IBD中大多数黏附分子上调。目前针对黏附分子的治疗措施包括抗 α 4整合素和抗ICAM-1。natalizumab是以 α 4整合素为靶向的重组人源性单克隆抗体。两项双盲对照临床试验表明，natalizumab用于活动性CD，可有效达到临床缓解，提高生活质量，患者对该药耐受良好^[26-27]。另有一项前瞻性研究报道，活动性UC患者单次注射natalizumab 3 mg/kg⁻¹，2-4 wk后可获得良好的临床反应，生活质量显著提高^[28]。LDP-02为针对 α 4 β 7整合素受体的人源性单克隆抗体，目前正处于用于IBD的III期临床试验阶段^[29]。抗ICAM-1单抗能减轻DSS诱发的大鼠结肠炎症损害^[30]。有报道IBD患者结肠ICAM-1表达增加^[31]，但抗ICAM-1反义寡核苷酸ISIS-2302对激素无反应性CD的临床试验结果存在冲突^[32]。

5 抑制NF-KappaB激活治疗策略

IBD患者肠黏膜免疫反应异常，核因子NF-KappaB是参与调控肠道免疫炎症反应的细胞因子基因表达的关键因子。据报道，DSS诱发结肠炎需NF-KappaB的作用，提示以NF-KappaB为靶目标的途径可用于IBD的治疗。

某些细胞因子(IL-1、IL-6、TNF- α)、氧化刺激、细菌及病毒等可激活NF-KappaB，而某些抑制性细胞因子(IL-10、IL-11)、糖皮质激素、sulphasalazine及美沙拉嗪可抑制NF-KappaB的激活。最近发现，反义p65、proteasome抑制剂和病毒IkappaBalph表达载体可更有效、选择性更高地阻止NF-KappaB在黏膜巨噬细胞和T细胞中的激活^[33]。有报道称，NF-KappaB p65反义寡核苷酸能减轻TNBS或DSS诱发的大鼠结肠炎症反应。最近一项前瞻性临床研究表明NF-KappaB p65对

IBD 治疗有效^[34].

6 抑制 MAP 激酶途径

IBD 炎症过程中的关键调节因子 TNF- α 的调控与 MAP 激酶途径密切相关。TNF- α 由活化的巨噬细胞和 T 细胞分泌, 其中单核 - 巨噬细胞生成 TNF- α 依赖 MAPKp38, 故 MAPKs 在 IBD 的发病过程中起重要作用, 抑制 MAPK 可作为 IBD 的一种新的治疗手段。目前正处于试验阶段的 MAPK 抑制剂有: RWJ67657、CNI-1493、SB203580 等^[35]。

动物实验表明, RWJ67657 既可抑制脂多糖刺激单核细胞释放 TNF- α , 又可抑制葡萄球菌内毒素 B 刺激 T 细胞释放 TNF- α , 该特性提示 RWJ67657 可作为 IBD 的治疗手段之一, 但 RWJ67657 对 IBD 的疗效还未得到证实^[36]。

一组前瞻性临床试验表明, CD 患者结肠中 MAPKp38 活性增高, 应用 CNI-1493 后, TNF- α 生成减少, 临床症状显著改善, 内镜表现好转, 未发现明显的不良反应^[37]。另有报道, SB203580 在实验性结肠炎中起双向作用^[38]。

总之, 尽管 MAP 激酶在 IBD 炎症过程中的作用已十分肯定, 但 MAP 激酶抑制剂对 IBD 的疗效还有待进一步证实。

7 其他细胞因子

7.1 Daclizumab 为人源性抗 IL-2 受体抗体, 一项小样本前瞻性临床研究显示, 10 例难治性 UC 患者静脉应用 daclizumab 1 mg/kg⁻¹, 每 4 wk 1 次, 共 2 次, 治疗结束后临床症状、内镜表现、免疫组化检查及生活质量均大为改善, 且患者对该药耐受良好, 提示 daclizumab 用于 UC 的治疗可能是安全有效的, 但尚需进一步对照试验证实此结论^[39]。

7.2 抗 IL-6 受体抗体 IBD 发病过程中, T 细胞对凋亡抵抗导致 T 细胞过多积累和黏膜慢性炎症加重, 抵抗凋亡的作用与 IL-6 信号转导有关^[40]。通过使用中和性抗 IL-6R 封闭该信号转导途径, 已在多种 CD 的实验动物模型中进行实验, 结果发现抗 IL-6R 可减轻结肠炎症, 有效抑制黏附分子的表达从而阻止白细胞聚集, 促使 T 细胞凋亡, 提示 IL-6R 用于人类 CD 治疗的可能性^[41-42]。

7.3 抗 IL-12 IL-12 在 TNBS 诱发的大鼠结肠炎发病过程中起重要作用^[43], 抗 IL-12 单克隆抗体可减轻 TNBS 诱发的大鼠结肠炎^[44]。有报道, 活动性 UC 和 CD 患者结肠黏膜中 IL-12 表达增加^[45], 但抗 IL-12 对 IBD 的临床疗效还未见报道。

8 参考文献

- 1 Lichtenstein GR. Approach to corticosteroid-dependent and corticosteroid-refractory Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7(Suppl 1):S23-29
- 2 Rutgeerts P. A critical assessment of new therapies in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl): S176-185
- 3 Haslam N, Hearing SD, Probert CS. Audit of cyclosporin use in inflammatory bowel disease: limited benefits, numerous side-effects. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:657-660
- 4 Barabino A, Torrente F, Castellano E, Gandullia P, Calvi A, Cucchiara S, De GL, Fontana M, Lionetti P, De Giacomo C, Gissi A. The use of ciclosporin in paediatric inflammatory bowel disease: an Italian experience. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1503-1507
- 5 Hamalainen M, Lahti A, Moilanen E. Calcineurin inhibitors, cyclosporin A and tacrolimus inhibit expression of inducible nitric oxide synthase in colon epithelial and macrophage cell lines. *Eur J Pharmacol* 2002;448:239-244
- 6 Rafiee P, Johnson CP, Li MS, Ogawa H, Heidemann J, Fisher PJ, Lamirand TH, Otterson MF, Wilson KT, Binion DG. Cyclosporine A enhances leukocyte binding by human intestinal microvascular endothelial cells through inhibition of p38 MAPK and iNOS. Paradoxical proinflammatory effect on the microvascular endothelium. *J Biol Chem* 2002;277:35605-35615
- 7 Fellermann K, Ludwig D, Stahl M, David-Walek T, Stange EF. Steroid-unresponsive acute attacks of inflammatory bowel disease: immunomodulation by tacrolimus (FK506). *Am J Gastroenterol* 1998;93:1860-1866
- 8 Sandborn WJ. Preliminary report on the use of oral tacrolimus (FK506) in the treatment of complicated proximal small bowel and fistulizing Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1997;92:876-879
- 9 Matsuhashi N, Nakajima A, Watanabe K, Komono Y, Suzuki A, Ohnishi S, Omata M, Kondo K, Usui Y, Iwadare JI, Watanabe T, Nagawa H, Muto T. Tacrolimus in corticosteroid-resistant ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 2000;35:635-640
- 10 Fellermann K, Steffen M, Stein J, Raedler A, Hamling J, Ludwig D, Loeschke K, Stange EF. Mycophenolate mofetil: lack of efficacy in chronic active inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:171-176
- 11 Orth T, Peters M, Schlaak JF, Krummenauer F, Wanitschke R, Mayet WJ, Galle PR, Neurath MF. Mycophenolate mofetil versus azathioprine in patients with chronic active ulcerative colitis: a 12-month pilot study. *Am J Gastroenterol* 2000;95: 1201-1207
- 12 van Deventer SJ. Review article: targeting TNF alpha as a key cytokine in the inflammatory processes of Crohn's disease—the mechanisms of action of infliximab. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13(Suppl 4):3-8
- 13 Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Rutgeerts PJ. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997;337:1029-1035
- 14 Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, van Hogezand RA, Podolsky DK, Sands BE, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, van Deventer SJ. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999;340:1398-1405
- 15 Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, Vasiliauskas E, Hanauer SB, Present DH, Mayer L, Van Hogezand RA, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF, Van Deventer SJ. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999;117:761-769
- 16 Sands BE, Tremaine WJ, Sandborn WJ, Rutgeerts PJ, Hanauer SB, Mayer L, Targan SR, Podolsky DK. Infliximab in the treatment of severe, steroid-refractory ulcerative colitis: a pilot study. *Inflamm Bowel Dis* 2001;7:83-88
- 17 Rutgeerts P. Infliximab is the drug we have been waiting for in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:132-136
- 18 Sandborn WJ. Strategies for targeting tumour necrosis factor in IBD. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003;17:105-117
- 19 Sandborn WJ, Feagan BG, Hanauer SB, Present DH, Sutherland LR, Kamm MA, Wolf DC, Baker JP, Hawkey C, Archambault A, Bernstein CN, Novak C, Heath PK, Targan SR. An engineered human antibody to TNF (CDP571) for active Crohn's disease: a randomized double-blind placebo-controlled trial.

- Gastroenterology 2001;120:1330-1338
- 20 Stack WA, Mann SD, Roy AJ, Heath P, Sopwith M, Freeman J, Holmes G, Long R, Forbes A, Kamm MA. Randomised controlled trial of CDP571 antibody to tumour necrosis factor-alpha in Crohn's disease. *Lancet* 1997;349:521-524
- 21 Vasilakas EA, Kam LY, Abreu-Martin MT, Hassard PV, Papadakis KA, Yang H, Zeldis JB, Targan SR. An open-label pilot study of low-dose thalidomide in chronically active, steroid-dependent Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999;117:1278-1287
- 22 Ehrenpreis ED, Kane SV, Cohen LB, Cohen RD, Hanauer SB. Thalidomide therapy for patients with refractory Crohn's disease: an open-label trial. *Gastroenterology* 1999;117:1271-1277
- 23 Facchini S, Candusso M, Martelossi S, Liubich M, Panfili E, Ventura A. Efficacy of long-term treatment with thalidomide in children and young adults with Crohn disease: preliminary results. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;32:178-181
- 24 Bauditz J, Wedel S, Lochs H. Thalidomide reduces tumour necrosis factor alpha and interleukin 12 production in patients with chronic active Crohn's disease. *Gut* 2002;50:196-200
- 25 D'Haens G, Swijnen C, Noman M, Lemmens L, Ceuppens J, Agbabiwe H, Geboes K, Rutgeerts P. Etanercept in the treatment of active refractory Crohn's disease: a single-center pilot trial. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2564-2568
- 26 Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, Malchow HA, Rask-Madsen J, Rutgeerts P, Vyhalek P, Zadorova Z, Palmer T, Donoghue S. Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med* 2003;348:24-32
- 27 Gordon FH, Lai CW, Hamilton MI, Allison MC, Srivastava ED, Fouweather MG, Donoghue S, Greenlees C, Subhani J, Amlot PL, Pounder RE. A randomized placebo-controlled trial of a humanized monoclonal antibody to alpha4 integrin in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001;121:268-274
- 28 Gordon FH, Hamilton MI, Donoghue S, Greenlees C, Palmer T, Rowley-Jones D, Dhillon AP, Amlot PL, Pounder RE. A pilot study of treatment of active ulcerative colitis with natalizumab, a humanized monoclonal antibody to alpha-4 integrin. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:699-705
- 29 Marshall JK. LDP-02 (Millennium). *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2:502-504
- 30 Taniguchi T, Tsukada H, Nakamura H, Kodama M, Fukuda K, Saito T, Miyasaka M, Seino Y. Effects of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody on dextran sodium sulphate-induced colitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:945-949
- 31 Brannigan AE, Watson RW, Beddy D, Hurley H, Fitzpatrick JM, O'Connell PR. Increased adhesion molecule expression in serosal fibroblasts isolated from patients with inflammatory bowel disease is secondary to inflammation. *Ann Surg* 2002;235:507-511
- 32 van Assche G, Rutgeerts P. Antiadhesion molecule therapy in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:291-300
- 33 Dijkstra G, Moshage H, Jansen PL. Blockade of NF-kappaB activation and donation of nitric oxide: new treatment options in inflammatory bowel disease? *Scand J Gastroenterol Suppl* 2002;236:37-41
- 34 Hibi T, Inoue N, Ogata H, Nagayama M. Introduction and overview: recent advances in the immunotherapy of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2003;38(Suppl 15):36-42
- 35 Schafer PH, Wadsworth SA, Wang L, Siekierka JJ. p38 alpha mitogen-activated protein kinase is activated by CD28-mediated signaling and is required for IL-4 production by human CD4+CD45RO+ T cells and Th2 effector cells. *J Immunol* 1999;162:7110-7119
- 36 Wadsworth SA, Cavender DE, Beers SA, Lalan P, Schafer PH, Malloy EA, Wu W, Fahmy B, Olini GC, Davis JE, Pellegrino-Gensey JL, Wachter MP, Siekierka JJ. RWJ 67657, a potent, orally active inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:680-687
- 37 Hommes D, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B, Tytgat G, Peppelenbosch M, Van Deventer S. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122:7-14
- 38 ten Hove T, van den Blink B, Pronk I, Drillenburg P, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Dichotomal role of inhibition of p38 MAPK with SB 203580 in experimental colitis. *Gut* 2002;50:507-512
- 39 Van Assche G, Dalle I, Noman M, Aarden I, Swijnen C, Asnong K, Maes B, Ceuppens J, Geboes K, Rutgeerts P. A pilot study on the use of the humanized anti-interleukin-2 receptor antibody daclizumab in active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2003;98:369-376
- 40 Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR, Strober W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol* 2001;22:21-26
- 41 Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, Schutz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schurmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000;6:583-588
- 42 Petrucci MT, Ricciardi MR, Gregorj C, Ciapponi L, Savino R, Ciliberto G, Tafuri A. Effects of IL-6 variants in multiple myeloma: growth inhibition and induction of apoptosis in primary cells. *Leuk Lymphoma* 2002;43:2369-2375
- 43 Tozawa K, Hanai H, Sugimoto K, Baba S, Sugimura H, Aoshi T, Uchijima M, Nagata T, Koide Y. Evidence for the critical role of interleukin-12 but not interferon-gamma in the pathogenesis of experimental colitis in mice. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:578-587
- 44 Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995;182:1281-1290
- 45 Nielsen OH, Kirman I, Rudiger N, Hendel J, Vainer B. Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2003;38:180-185

大肠癌细胞因子基因治疗的研究现状

王艳, 李岩

王艳, 中国医科大学第二临床学院二部消化内科 辽宁省沈阳市 110021
李岩, 中国医科大学第二临床学院消化内科 辽宁省沈阳市 110004
项目负责人: 李岩, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学第二临床学院消
化内科. 02amy@sina.com
电话: 024-24147472
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-05-09

摘要

大肠癌的免疫基因治疗作为手术和放化疗的辅助治疗手段有重要的意义。选择编码细胞因子或其受体为目的基因导入肿瘤细胞或免疫效应细胞, 在肿瘤局部产生高分泌量的细胞因子, 激活抗肿瘤免疫反应, 使肿瘤的生长受到抑制或坏死消退, 克服了直接给药的严重毒副作用。将肿瘤特异性转录调控序列(如启动子或增强子)与细胞因子基因连接并转染细胞, 驱动的目的基因, 增强基因治疗的靶向性, 做到有的放矢, 可达到特异性治疗的目的。常见用于大肠癌基因治疗的细胞因子基因有IFN(干扰素)基因、TNF(肿瘤坏死因子)基因、IL(白介素)基因家族、CSF(集落刺激因子)基因家族、IGFR(胰岛素样生长因子受体)基因等。将多种基因联合应用, 或细胞因子基因与其他治疗手段相联合可以提高抗肿瘤效应, 减少毒性。

王艳, 李岩. 大肠癌细胞因子基因治疗的研究现状. 世界华人消化杂志 2004;
12(6):1445-1450
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1445.asp>

0 引言

大肠癌是常见的恶性肿瘤, 传统的手术、化疗、放疗等治疗方式已取得很大进展, 但均未能使其疗效得到明显的提高, 术后易复发及肝转移, 5 a生存率<30%。近年来, 随着分子生物学及基因工程的发展, 基因治疗已成为肿瘤治疗的研究重点, 其中细胞因子基因治疗因其简单、安全、有效成为大肠癌的基因治疗中较为常用的, 且具有临床应用潜力的治疗策略。选择编码细胞因子或其受体为目的基因, 将其导入肿瘤细胞或免疫效应细胞, 在肿瘤局部产生高分泌量的细胞因子, 可使肿瘤细胞从无、弱免疫原性变为强免疫原性, 从而激活或增强机体的特异性抗肿瘤免疫反应, 使肿瘤的生长受到抑制或坏死消退, 达到抗肿瘤的目的, 克服了以往细胞因子直接给药及反复、多次应用所产生的严重毒副作用等缺点, 并取得了更明显的治疗效果, 有不少已进入临床试验阶段^[1-2]。本文将就近年来大肠癌细胞因子基因治疗的国内外研究进展做一综述。

细胞因子是指由免疫细胞和非免疫细胞合成和分

泌的一组异质性多态调节因子, 具有广泛的生物学功能, 参与机体的多种生理和病理过程, 在介导机体多种免疫反应, 如肿瘤免疫、自身免疫、移植免疫等过程中发挥重要作用。细胞因子的作用具有多向性、网络性的特点, 他们不仅可以单独发挥生物学作用, 而且不同的细胞之间还可以相互协同或制约。细胞因子的抗癌机制可概括为以下几个方面: (1)直接调节肿瘤细胞的生长和分化; (2)对肿瘤细胞的毒性作用; (3)作用于肿瘤的血管和营养系统的关系来影响宿主/肿瘤的关系; (4)激发宿主对肿瘤的免疫反应, 如 IL-2 可激活 LAK 细胞; (5)刺激造血功能, 促进骨髓恢复^[3]。外源性细胞因子已经广泛应用于肿瘤的临床治疗, 但他存在着大量使用后机体产生发热、过敏等毒副反应及由于机体产生相应抗体而降低其效价等不利因素, 使其大量使用受到限制^[4]。将某些细胞因子(如 IL-2、IL-4、IL-1、IL-6、IL-7、IL-12、INF-γ、TNF-α、G-CSF、GM-CSF 等)的基因转染到肿瘤细胞或免疫细胞(如 TIL、LAK 细胞 及细胞毒淋巴细胞)中, 以提高机体免疫系统对肿瘤细胞的识别和反应能力。

1 目前细胞因子基因治疗主要有以下几种方法:

1.1 细胞因子基因导入免疫效应细胞 将细胞因子基因导入肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)或肿瘤特异性杀伤细胞(如 LAK, CTL, 巨噬细胞等), 再将这些转基因免疫活性细胞回输入荷瘤宿主, 就能选择性聚集在肿瘤组织中, 产生细胞因子, 提高局部细胞因子水平, 使转基因免疫活性细胞发挥较强的抗肿瘤效应。从理论上讲, 该方法是目前最为理想的一种过继性细胞免疫治疗方法。但实践证明, 该方法治疗效果不尽人意, 存在明显的局限性, 主要表现在转基因免疫活性细胞在体内靶向性差, 存活时间短^[5], 目前这种方法很少用于大肠癌的基因治疗。

1.2 细胞因子基因直接体内注射 向肌肉、瘤体内或腹腔内直接注射携带细胞因子的质粒或裸基因, 或体内注射携带细胞因子基因的腺病毒或痘苗病毒等。其中 IL-2 基因腹腔注射治疗结肠癌肝转移的研究较多, 有的学者将 IL-2DNA 直接注入荷瘤小鼠腹腔, 结果发现肿瘤体积缩小, 小鼠存活期延长。

1.3 细胞因子基因导入成纤维细胞或树突状细胞 成纤维细胞易于获取和体外培养, 生命周期较长, 适于基因转移, 移植后可在体内长期存活, 且分泌细胞因子稳定, 临床应用安全可靠。Fakharai et al^[6-7] 将 IL-2 基因

转染成纤维细胞导入鼠结肠癌动物模型 CT-26, 24 h 分泌 IL-2 达 100 u, 能明显抑制结肠癌肝转移, 而且这种作用是由细胞毒性 T 淋巴细胞介导的。树突状细胞 (DC 细胞) 是体内最强的抗原递呈细胞, 具有很强的捕获和加工抗原的能力, 而且含有高水平的 MHC 分子、共刺激分子和黏附分子等。将细胞因子基因导入 DC 细胞制备成 DC 疫苗诱导抗肿瘤免疫引起人们极大的关注, 近年来国内外的研究也较多^[8-9]。

1.4 肿瘤细胞靶向的细胞因子基因治疗 组织特异性基因疗法, 即将肿瘤特异性启动基因与细胞因子基因连接并转染细胞, 这样该系统只在含有必需转录因子的特定肿瘤细胞中表达, 不侵犯正常细胞, 最理想的是将目的基因导入正在分裂的肿瘤细胞, 能准确地杀伤肿瘤细胞, 保护正常组织, 减少毒副作用, 提高靶向性^[10]。近年来, 找到一种更加灵活、更具广泛意义的方法, 即选用肿瘤特异性的调控元件(启动子或增强子)以驱动目的基因表达于特定的靶细胞。常用于胃肠道的特异性调控元件是癌胚抗原启动子(pCEA), 此外还有Vilin、erb-B2 等。其原理是非肿瘤细胞没有特定的转录激活因子, 因而不能转录出特定的 mRNA, 因此就不能表达出相应的蛋白, 而肿瘤细胞则具有该转录因子活性, 能激活特定蛋白的表达, 其转录激活作用又是通过结构基因上游的调控元件(启动子或增强子序列)而起作用的。因此, 在正常细胞和肿瘤细胞都被转染的情况下, 当用该调控元件驱动目的基因时, 肿瘤细胞会特异的表达出目的基因的活性, 而正常细胞则不能。

CEA 在 90% 以上的结肠肿物中均有表达, 利用 CEA 转录调控序列构建肿瘤特异性调控元件(启动子或增强子)驱动的目的基因, 增强基因治疗的靶向性, 做到有的放矢, 从而大大提高肿瘤基因治疗的疗效, 减少治疗的不利因素。CEA 基因启动子调控的大肠癌的自杀因子基因表达质粒转染大肠癌细胞株, 使大肠癌细胞对前药的敏感性提高了 2 000 倍, 显示了 CEA 启动子基因调控在提高大肠癌基因治疗的特异性上的优越性, 这种靶向性化疗是近年来的研究热点^[11-12]。该疗法以主动性免疫治疗为基础, 即将细胞因子基因转染入肿瘤细胞中, 制备出免疫原性更强的新型疫苗, 以激发机体产生显著的抗肿瘤免疫功能从而达到治疗肿瘤的目的。Pervin et al^[13] 报道用 CEA 抗独特型抗体作为疫苗可产生相应的抗体和激发特异的 T 细胞反应。1992 年 Kaufman et al^[14] 自人大肠癌细胞文库中克隆了编码 CEA cDNA 基因, 制成病毒疫苗接种小鼠, 结果可诱导小鼠产生针对 CEA 的体液和细胞免疫反应。Cao et al^[15-18] 克隆了人 CEA 启动子的核心区, CEA 启动子有严格的大肠癌特异性和表达持久性, 活性高于 SV40 启动子。

1.5 细胞因子基因修饰疫苗 研究新型、有效的肿瘤疫苗是近年来肿瘤免疫治疗的热点之一, 将细胞因子基因转导入肿瘤细胞制备成新型肿瘤疫苗是很有前景的课题。但制备自体肿瘤疫苗既昂贵又费时费力, 而且不

是所有的原发肿瘤细胞都能增生至足够的数量以用于制备肿瘤疫苗。一种替代方法是将基因转导的肿瘤细胞系作为疫苗, 患者肿瘤细胞和疫苗细胞系的共同抗原是免疫应答的靶抗原, 肿瘤抗原是由与患者的 MHC 分子相关的 APC 递呈给 T 细胞, 因此, 患者与疫苗之间的 MHC 相容性并非必要。常规的肿瘤疫苗采用灭活的肿瘤细胞, 目前常采用 X 或 γ 射线照射、⁶⁰Co 照射、反复冻融、丝裂霉素等。

近年来关于肿瘤核酸疫苗的研究较为深入, 所谓核酸疫苗, 就是把外源基因连接到真核质粒表达载体上, 然后将重组的质粒 DNA 直接注射到动物体内, 使外源基因在活体内表达, 产生的抗原激活机体的免疫系统引发免疫反应。与传统的基因治疗相比, DNA 疫苗制备简便、安全长效, 可组建多价疫苗并可兼做预防和治疗性疫苗。同时, 由于 DNA 免疫可以打破机体对 CEA 的免疫耐受, 因而可能具有比传统免疫基因治疗更强的肿瘤杀伤作用。现在, 核酸疫苗免疫技术越来越受到人们的重视, 并被看作是继传统疫苗和基因工程亚单位疫苗之后的第 3 代疫苗。研究发现人 CEA-DNA 疫苗可以激发 CEA 特异的体液和细胞免疫反应, 表现为可抵抗同源表达 CEA 结肠癌细胞的再接种^[19-20]。

John Wayne 癌症研究所用另一种方法制备肿瘤疫苗, 即经过照射的肿瘤细胞与卡介苗(BCG)相结合, 卡介苗具有强烈的全身免疫刺激特性。Intracel 公司的结肠癌疫苗 Oncovax 由自身癌细胞与 BCG 融合而成, 已完成 III 期试验, 目前正在美国申请上市。美国免疫应答公司把三个肿瘤细胞系和分泌白介素 2(IL-2)的成纤维细胞相结合以增强免疫应答, 用于治疗结肠癌。另一种增强对肿瘤抗原的免疫应答的方法是把抗原置于病毒中, 采用标准的、高度免疫原性的和容易操作的病毒, 用基因工程方法使它表达特异性肿瘤抗原。Therion 公司还研制了携带癌胚抗原(CEA)的重组病毒用于治疗结肠癌。

目前在实验室研究中已经转染入肿瘤细胞的细胞因子有 IL-2、IL-4、IL-6、B7、IFN-γ、GM-CSF、IL-12、IL-15、IL-18 等^[21-22]。其中 IL-15、IL-18 是近年来才开始研究的细胞因子。据报道, IL-15 转染瘤苗可以提高人类 T 细胞对抗原的反应。IL-18 转染瘤苗可能通过 CD4⁺ T 细胞和 NK 细胞引起潜在抗瘤效应, 并发现此途径不同于 IL-12 和 IFN-γ 的途径。对细胞因子转染瘤苗的众多研究中显示 IL-12 和 IL-2 抑制局部肿瘤形成的作用最强, 而 GM-CSF 是至今为止所评价的 33 个基因产物中效力最强的。(2)增强肿瘤的免疫原性: 通过表达 MHC 分子、转染肿瘤抗原、表达某些肿瘤细胞所缺失的共刺激分子来增强肿瘤的免疫原性。实验证明通过转染 MHC 分子可以增加 MHC 限制性肿瘤特异性抗原的表达, 从而增加 CD4⁺ T 细胞的活化。目前研究表明共转染 B7 和 MHC II 基因可以弥补激活途径中须有 B7 参与的要求, 从而相互协同增强免疫原性和抗瘤能力。B7 基因导入具有肿瘤抗原的肿瘤细胞后还可以

诱导机体打破肿瘤耐受状态，获得针对B7-1的原发肿瘤的抑制作用。并且新近研究还发现INF- α 可以促使瘤细胞表面HLA I类分子的表达显著提高，且其HLA I类分子的专一位点A2表达的增强与HLA I类分子总体增加一致，从而为免疫反应中的监测提供了途径。与肿瘤发生有关的抗原基因的导入也可以增强其免疫原性。目前研究较多的有CEA、AFP、MART-1或gp100。(3)基因产物可以直接杀伤瘤细胞。

2 细胞因子基因治疗的载体系统

基因载体可分为两大类：病毒载体和非病毒载体。病毒作为载体是经过改建的、缺失某些结构蛋白的重组体，即所谓复制缺陷病毒。常用的有逆转录病毒、腺病毒等，转染效率高，可稳定地整合到宿主基因组。非病毒载体有脂质体、多聚阳离子载体等。此外，现在还有很多方法直接导入外源基因，如DNA直接注射法、基因枪、磷酸钙沉淀法等^[23]。比较而言，非病毒载体较为安全，但转染效率较低而且价格昂贵。

3 常见用于大肠癌的细胞因子基因

3.1 IFN(干扰素)基因 IFN可分为 α 、 β 和 γ 。IFN α 、 β 有广谱抗病毒作用，促进多种细胞MHC类分子的表达，提高巨噬细胞、NK细胞、CTL的抗肿瘤作用。IFN- γ 可上调多种细胞MHC I、II类分子表达。IFN可抑制肿瘤细胞增生，协同IL-2增强LAK活性，上调瘤细胞上的MHC I类分子表达，增强瘤细胞对杀伤细胞的敏感性^[24]。Hiroishi et al^[25]联合CD80和IFN- α 基因导入MC-38结肠癌细胞，发现导入CD80和IFN- α 的MC38细胞与野生型MC38(MC38-WT)细胞相比，细胞毒性明显增强，并能诱导鼠脾脏产生针对MC38的特殊的CD8 $+$ CTL细胞。体外MC38-IFN- α 和MC38-CD80较MC38-WT明显诱导CD8 $+$ CTL增生($P < 0.05 = CD8^+ CTL$ 的凋亡下降，并发挥抗肿瘤效应。Sabaawy et al^[26]用逆转录病毒介导IFN- α 基因到结肠癌细胞系COLO201和NIH3T3中，发现肿瘤细胞的增生和分化都被明显抑制，且转导IFN- α 基因的结肠癌细胞对5-FU的敏感性增加，抗药性减低。Qin et al^[27]利用复制缺陷型逆转录病毒载体介导IFN- β 基因转染接种结肠癌细胞的免疫缺陷小鼠体内，发现仅有1%出现肿瘤生长，绝大多数小鼠的肿瘤细胞完全消退。

3.2 TNF(肿瘤坏死因子)基因 TNF- α 又称为恶质素，TNF- β 又称为淋巴毒素。TNF在体内、外均能杀死某些肿瘤细胞，或抑制其增生，激活免疫细胞攻击肿瘤，增强IL-2依赖的胸腺细胞、T细胞的增生能力，促进IL-2、CSF、IFN- γ 等淋巴因子产生，干扰肿瘤血液供应。此外约50%的肿瘤本身可产生TNF，这种内源性TNF可改变肿瘤对外源性TNF的敏感性^[28]。Sato et al^[29]用TNF基因转导自身肿瘤细胞，他们从12例中胃肠道癌肿瘤渗出液中建立起原代培养肿瘤细胞株，使用逆转录病毒载体MFG-TNF把TNF基因转导给肿瘤细胞株，12

例患者中10例TNF量在72 h内每 10^6 个细胞达0.3-3.5 KU/L，另外2个转导细胞株至少有1个TNF基因拷贝。Taniguchi et al^[30]将TNF基因转导结肠癌细胞后产生轻、中度抗肿瘤性，同时静脉给予重组IL-12(rIL-12)则可见明显的疗效，甚至使肿瘤消失。Walther et al^[31]将TNF α 基因转染结肠癌细胞系LoVo(对外源性TNF敏感)和LS-174T(对外源性TNF耐受)，经转导产生TNF的癌细胞与亲本细胞相比具有显著的形态学变化，软琼脂集落形成减少，裸鼠皮下注射 1×10^6 的转导后表达TNF的肿瘤细胞，其成瘤性减弱，肿瘤生长缓慢。结肠癌中TNF受体的表达较低。Isobe et al^[32]将TNF α 受体基因(TNFR-55和TNFR-75基因)插入逆转录病毒载体并转染包装细胞系，产生了高表达TNFR-55和TNFR-75的高滴度的病毒转染产物，这两种受体能与TNF稳定结合，使转染的肿瘤细胞更易于被重组的TNF杀伤。

3.3 IL(白介素)基因家族 目前已发现和命名的IL有20种，其中IL-2、4、6、7、12、15、18在抗肿瘤免疫和辅助肿瘤治疗中具有重要作用。将IL-2基因导入小鼠C-26结肠癌细胞内，发现在导入基因7-10 d后有76%的小鼠其肿瘤完全消退^[33]。Gunji et al^[34]将IL-2基因导入小鼠C-26结肠细胞内发现能明显增加小鼠的存活率。Mendiratta et al^[35]将重组子IL-12基因和PVP(聚乙烯吡咯烷酮)转染结肠癌细胞CT26，并移植裸鼠皮下，发现瘤体和淋巴结中有CD4 $^+$ 、CD8 $^+$ T细胞和NK细胞，并表达MHC I分子，以CD8 $^+$ T细胞为主的细胞参与了主要的抗肿瘤免疫反应。50%的荷瘤鼠转染IL-12/PVP后，肿瘤停止生长，用野生型的CT26细胞再次接种到该鼠身上，未见肿瘤生长。Mazzolini et al^[36]应用CT26结肠癌肝转移裸鼠模型，导入重组免疫缺陷病毒IL-12(ADCMVIL-12)，亦发现以CD8 $^+$ 为主的抗肿瘤免疫反应，肿瘤明显消退。Xiao et al^[37]用逆转录病毒将人IL-6 cDNA导入结肠癌HT-29细胞，癌细胞抑制率达50%，接种HT-29/IL-6细胞的裸鼠瘤体小于对照组，用病毒上清液治疗，可抑制肿瘤的生长。

最新命名的IL-23是IL家族的新成员，Wang et al^[38]将IL-23基因转染结肠癌Colon26细胞，分别接种到裸鼠和免疫力正常的鼠，发现肿瘤的生长明显减弱，甚至消失。进一步研究发现Colon26/IL-23鼠的脾细胞分泌的IFN- γ 明显增加，T细胞介导的抗肿瘤免疫力增强。Satoh K将IL-12基因导入树突状细胞^[39]，对结肠癌肝转移有明显治疗效果。

3.4 CSF(集落刺激因子)基因家族 包括G-CSF(粒细胞集落刺激因子)、M-CSF(巨噬细胞集落刺激因子)、GM-CSF(粒细胞和巨噬细胞集落刺激因子)、multi-CSF(多能细胞集落刺激因子，即IL-3)、EPO(促红细胞生成素)、SCF(干细胞生长因子)、TPO(血小板生成素)。他们主要促进不同类型血细胞的分化、增生。在癌症中主要用于防止和对抗放疗和化疗造成各种血细胞的下降。近期，在体外用GM-CSF与IL-4、TNF- α 协同扩增树突状细胞，富集抗原后作为肿瘤疫苗。GM-CSF多与其他细胞

因子基因或自杀基因联合应用^[40-41].

3.5 IGFR(胰岛素样生长因子受体)基因 胰岛素样生长因子(IGF)是一类具有胰岛素样生长刺激活性的免疫调节作用的多肽分子,主要是由IGF-I和IGF-II两种相关多肽组成. IGFsRNA存在于多种组织中,在许多肿瘤中表达增高,在结肠癌IGF-II的表达增高. 阻断实验表明,异常表达IGF是肿瘤通过自身分泌作用得以不断生长的重要原因之一. 因此,通过反义RNA技术封闭肿瘤的IGF表达可以达到抑制肿瘤生长的目的. IGF可促进血管内皮生长因子(VEGF)表达,进而促进肠癌增生,有人利用其反义RNA可抑制或封闭结直肠癌细胞ICF-II的合成,从而抑制肿瘤生长^[42-45].

4 联合治疗

由于单一细胞因子基因治疗效果的不确定性,以及大量表达对机体的毒副作用,人们试将多种基因联合应用,或细胞因子基因与其他治疗手段相联合以提高抗肿瘤效应,减少毒性.

4.1 多种细胞因子基因联合 如IL-2+IL-12, IL-12+B7, IL-2+TNF, IL-12+IFN, IL-2+TNF+MHC-I等联合治疗肿瘤的报道较多^[46-48]. Lechanteur et al 观察了一个鼠结肠癌腹腔广泛转移的动物模型,将转导了IL-12基因和GM-CSF基因的鼠结肠癌细胞DHD/K12细胞腹腔注射后,腹腔肿瘤的数目明显减少,肿瘤的生长受阻,延缓,甚至停滞,小鼠的生存率提高. 如果将转染后的DHD/K12细胞照射,则不能表达IL-12和GM-CSF,照射后的DHD/K12细胞腹腔注入,其抗肿瘤性消失. 同时发现,转染IL-12基因和GM-CSF基因能唤起其他肿瘤细胞和机体的抗肿瘤免疫反应,这种抗肿瘤的免疫反应是由细胞毒性T淋巴细胞介导的. Stein et al^[49]利用TNF基因联合IL-2基因转导人大肠癌细胞株HCT-15、HCT-16,发现可使大肠癌耐药基因(mdrl基因)的表达明显下降,对化疗药物的敏感性大大提高.

4.2 细胞因子基因与自杀基因联合 自杀基因是编码某些特殊酶的基因,导入肿瘤细胞后可使无毒的前药转变为有活性的毒物,引起靶细胞死亡. 将自杀基因与细胞因子基因联合应用,可以取长补短,提高治疗效果. 一方面,自杀基因的表达可以直接杀伤一部分肿瘤细胞,消除肿瘤负荷; 另一方面,细胞因子基因的表达可以激发机体的抗肿瘤免疫功能^[50-52]. IL-2基因与自杀基因联合治疗大肠癌的报道较多,可协同增强抗肿瘤的效果. Chen et al^[53]对小鼠结肠癌肝转移的模型通过重组腺病毒载体分别转导ADV/RSV-M IL-2基因和ADV-RSV-TK基因,然后给予GCV治疗. 实验证明分别用IL-2基因,TK基因和两者联合治疗的肿瘤面积分别为120 m²、25 m²和5 m²,并发现抗肿瘤效果的提高与IL-2介导的T细胞免疫增强有关. 在此基础上, Chen et al^[54]应用HSV-TK(单纯疱疹病毒胸苷激酶基因)、

IL-2基因和GM-CSF基因联合治疗结肠癌肝转移荷瘤小鼠,结果显示联合自杀基因和两种细胞因子基因治疗优于TK基因和IL-2基因的单独治疗和联合治疗. 将IL-12基因与IFN- α 基因分别导入鼠结肠癌细胞MC38,注射给小鼠,发现MC38/IFN- α 的抗肿瘤作用强于MC38/12,同时应用MC38/IFN- α 和MC38/IL-12则效果比单独应用MC38/IFN- α 效果更好,说明IL-12与IFN基因具有协同抗肿瘤作用. Coll et al^[55]利用HSV-TK-GCV方法联合IL-2基因治疗接种了DHDProB结肠癌细胞的BDIX小鼠,结果有60%的小鼠完全治愈.

4.3 与放、化疗联合 Sabaawy et al^[56]将逆转录病毒介导的IFN- α 基因转导入结肠癌细胞株C201中,同时给予5-FU,结果对5-FU的敏感性增加,抗药性减低,疗效提高1.5-2.1倍. 细胞因子基因治疗的同时给予化疗药物或进行放疗,亦可起到协同作用. 另外,可在细胞因子基因治疗的同时给予外源的重组细胞因子,可减少重组细胞因子的用量及毒副作用.

5 大肠癌基因治疗存在的问题及展望

由于机体的免疫反应是有众多细胞因子参与,经过多种信号识别、传导的复杂应答过程,目前尚难以找到一种或几种细胞因子基因可以全面调动免疫系统并彻底消除肿瘤. 其次,细胞因子存在双重性问题,即有些细胞因子不但不能消除肿瘤,而且能促进肿瘤的生长. 另外,部分细胞因子本身的作用机制尚远未清楚,故细胞因子基因的治疗实验研究还有很多地方还有待于发展和深入.

目前技术上的困难主要有如何提高基因转导进入肿瘤细胞的效率,如何提高基因转导的靶向性,如何为复杂的基因提供容量大且安全、有效、廉价的载体以及载体的制备问题. 大肠癌的细胞因子基因治疗在实验室研究和动物实验中观察到了明显的疗效,但在临床应用的有效性、安全性上还需要深入的研究,在基因导入的载体和靶向性上也需要进一步的完善^[57-60]. 如何使联合基因治疗作到更加稳定、高效、安全,以便进一步应用于临床治疗,还有待于进一步的研究和探讨. 此外,如何解决所导入的细胞因子基因对机体的潜在的毒副作用和损伤,避免外源基因对正常细胞的致突变作用及引起自身免疫反应,也有待于进一步深入细致地总结和摸索.

总之,动物实验及实验室研究证实了细胞因子基因疗法对大肠癌的治疗价值,但是实验研究要过度到临床应用尚有不少问题和困难,相信随着对细胞因子及其基因的研究的不断深入,随着关键技术的逐步解决,大肠癌的基因治疗将不断完善,并早日为临床广大患者服务.

6 参考文献

- 王中川,傅传刚. 大肠癌的生物学治疗现况. 中国肛肠病杂志

- 2002;22:37-39
- 2 范应芳, 黄宗海. 结直肠癌基因治疗研究进展. 世界华人消化杂志 2001;9:427-430
- 3 李刚, 燕建树, 张庆林, 田志刚. 脑胶质瘤的细胞因子及细胞因子基因治疗. 国外医学肿瘤学分册 1998;25:119-121
- 4 周郁, 周仲毅. 肿瘤细胞因子基因治疗的研究现状. 西北国防医学杂志 2001;22:66-67
- 5 程蓓, 谢幸, 叶大风. 卵巢癌细胞因子基因治疗. 浙江医学 2000; 21:699-701
- 6 Fakhrai H, Shawler DL, Gjerset R, Naviaux RK, Koziol J, Royston I, Sobol RE. Cytokine gene therapy with interleukin-2-transduced fibroblasts: effects of IL-2 dose on anti-tumor immunity. *Hum Gene Ther* 1995;6:591-601
- 7 Sobol RE, Shawler DL, Carson C, Van Bevorn C, Mercola D, Fakhrai H, Garrett MA, Barone R, Goldfarb P, Bartholomew RW, Brostoff S, Carlo DJ, Royston I, Gold DP. Interleukin 2 gene therapy of colorectal carcinoma with autologous irradiated tumor cells and genetically engineered fibroblasts: a Phase I study. *Clin Cancer Res* 1999;5:2359-2365
- 8 Morse NA, Nair SK, Nosca PJ, Hobeika AC, Clay TN, Deng Y, Boczkowski D, Proia A, Neidzwiecki D, Clavien PA, Hurwitz HI, Schlom J, Gilboa E, Lyerly HK. Immunotherapy with autologous human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA. *Cancer Invest* 2003;21:341-349
- 9 Tirapu I, Rodriguez-Calvillo M, Qian C, Duarte M, Smerdou C, Palencia B, Mazzolini G, Prieto J, Melero I. Cytokine gene transfer into dendritic cells for cancer treatment. *Curr Gene Ther* 2002;2:79-89
- 10 何艳, 苏先狮. 肿瘤疫苗的研究进展. 国外医学肿瘤学分册 2002; 29:89-92
- 11 戴益民. 鞍向化疗:基因治疗研究的新热点. 世界华人消化杂志 1999;7:469-472
- 12 Ueda K, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Matsuura I, Ojima T, Yamaue H. Improvement of carcinoembryonic antigen-specific prodrug gene therapy for experimental colon cancer. *Surgery* 2003;133:309-317
- 13 Pervin S, Chakraborty M, Bhattacharya-Chatterjee M, Zeytin H, Foon KA, Chatljee SK. Induction of antitumor immunity by an anti-idiotype antibody mimicking carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 1997;57:728-734
- 14 Kaufman H, Schlom J, Kantor J. A recombinant vaccinia virus expressing human carcinoembryonic antigen(CEA). *Int J Cancer* 1991;48:900-907
- 15 Cao GW, Qi ZT, Pan X, Zhang XQ, Miao XH, Feng Y, Lu XH, Kuriya S, Du P. Gene therapy for human colorectal carcinoma using human CEA promoter controed bacterial ADP-ribosylating toxin genes human CEA: PEA and DTA gene transfer. *World J Gastroenterol* 1998;4:388-397
- 16 Cao G, Kuriyama S, Cui L, Nagao S, Pan X, Toyokawa Y, Zhang X, Nishiwaki I, Qi Z. Analysis of the human carcinoembryonic antigen promoter core region in colorectal carcinoma-selective cytosine deaminase gene therapy. *Cancer Gene Ther* 1999;6:572-580
- 17 Cao G, Kuriyama S, Gao J, Kikukawa N, Cui L, Nakatani T, Zhang X, Tsujinoue H, Pan X, Fukui H, Qi Z. Effective and safe gene therapy for colorectal carcinoma using the cytosine deaminase gene directed by the carcinoembryonic antigen promoter. *Gene Therapy* 1999;6:83-90
- 18 Cao G, Kuriyama S, Gao J, Mitoro A, Cui L, Nakatani T, Zhang X, Kikukawa M, Pan X, Fukui H, Qi Z. Comparison of carcinoembryonic antigen promoter regions isolated from human colorectal carcinoma and normal adjacent mucosa to induce strong tumor-selective gene expression. *Int J Cancer* 1998; 78:242-247
- 19 Konishi F, Maeda H, Yamanishi Y, Hiyama K, Ishioka S, Yamakido M. Transcriptionally targeted in vivo gene therapy for carcinoembryonic antigen-producing adenocarcinoma. *Hiroshima J Med Sci* 1999;48:79-89
- 20 Conry RM, LoBuglio AF, Loehel F, Moore SE, Sumerel LA, Barlow DL, Curiel DT. A carcinoembryonic antigen poly-nucleotide vaccine has in vivo antitumor activity. *Gene Ther* 1995;2:59-65
- 21 宋永胜, 杨威, 张学. 联合应用 hIL-2 和 hGM-CSF 基因瘤苗抗肿瘤作用的研究. 中国医科大学学报 2002;31:21-22
- 22 董新干, 陆云飞, 林进令, 邱庆明, 曾健. 肿瘤坏死因子基因转导的肿瘤疫苗对小鼠机体免疫的影响. 广西医科大学学报 2003; 20:58-61
- 23 郑天荣, 郑秋红, 林贤东, 谢云青, 龚福生. 基因枪介导重组 hGM-CSF 转移系统的建立及其在人肿瘤细胞中的稳定表达. 中国肿瘤生物治疗杂志 2002;9:203-206
- 24 吴文溪, 丁强, 沈历宗, 华一兵, 许德华, 刘新垣. IFN- γ 基因转染抗大肠癌细胞的作用机制. 世界华人消化杂志 2003;11:294-297
- 25 Hiroishi K, Tuting T, Lotze MT. IFN- α -expressing tumor cells enhance generation and promote survival of tumor-specific CTLs. *J Immunol* 2000;164:567-572
- 26 Sabaawy HM, Ikebara S, Adachi Y, Quan S, Feldman E, Kancherla R, Abraham NG, Ahmed T. Enhancement of 5-fluorouracil cytotoxicity on human colon cancer cells by retrovirus-mediated interferon-alpha gene transfer. *Int J Oncol* 1999;14: 1143-1151
- 27 Qin XQ, Tao N, Dergay A, Moy P, Fawell S, Davis A, Wilson JM, Barsoum J. Interferon-beta gene therapy inhibits tumor formation and causes regression of established tumors in immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:14411-14416
- 28 Li TT, Li DJ, Tian CF, Liu X. The in-vitro biological characteristics of lung cancer cells infected with recombinant adenovirus expressing hTNF- α . *J Harbin Medical University* 2002;36:186-190
- 29 Sato Y, Koshiba Y, Hirayama M, Matuyama T, Wakimoto H, Hamada H, Nitsu Y. Augmented antitumor effects of killer cells induced by tumor necrosis factor gene-transduced autologous tumor cells from gastrointestinal cancer patients. *Hum Gene Ther* 1996;7:241895-1905
- 30 Taniguchi F, Yamagishi H, Fujiwara H, Ueda Y, Fuji N, Yoshimura T, Oka T. Systemic administration of rIL-12 synergistically enhances the therapeutic effect of a TNF gene-transduced cancer vaccine. *Gene Ther* 1998;5:1677-1684
- 31 Walther W, Fichtner I, Uckert W. Retrovirus-mediated gene transfer of tumor necrosis factor alpha into colon carcinoma cells generates a growth inhibition. *Anticancer Res* 1993;13: 1565-1573
- 32 Isobe K, Fan ZH, Emi N, Nakashima I. Gene transfer of TNF receptor for treatment of cancer by TNF. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202:1538-1542
- 33 Stoppacciaro A, Forni G, Colombo MP. Different tumours, transduced with different cytokine genes as G-CSF and IL-2, show inhibition of tumour take through neutrophil activation but differ in T cell functions. *Folia Biol (Praha)* 1994;40:89-99
- 34 Gunji Y, Tasaki K, Tagawa M, Matsubara H, Takenaga K, Suzuki T, Asano T, Ochiai T, Isono K, Sakiyama S. Inhibition of peritoneal dissemination of murine colon carcinoma cells by administrating retrovirus harboring IL-2 gene. *Cancer Gene Ther* 1998;5:339-343
- 35 Mendiratta SK, Quezada A, Matar M, Wang J, Hebal HL, Long S, Nordstrom JL, Pericle F. Intratumoral delivery of IL-12 gene by polyvinyl Polymeric vector system to murine renal and colon carcinoma results in potent antitumor immunity. *Gene Therapy* 1999;6:833-839
- 36 Mazzolini G, Qian C, Narvaiza I, Barajas N, Borras-Cuesta F, Xie X, Duarte N, Melero I, Prieto J. Adenoviral gene transfer of interleukin 12 into tumors synergizes with adoptive T cell therapy both at the induction and effector level. *Hum Gene Ther* 2000;11:113-125
- 37 Xiao B, Jing B, Zhang YL, Zhou DY, Zhang WD. Tumor growth inhibition effect of hIL-6 on colon cancer cells transfected with the target gene by retroviral vector. *World J Gastroenterol* 2000; 6:89-92
- 38 Wang YQ, Ugai S, Shimozato O, Yu L, Kawamura K, Yamamoto H, Yamaguchi T, Saisho H, Tagawa M. Induction of systemic immunity by expression of interleukin-23 in murine colon carcinoma cells. *Int J Cancer* 2003;105:820-824
- 39 Satoh Y, Esche C, Gambotto A, Shurin GV, Yurkovetsky ZR, Robbins PD, Watkins SC, Todo S, Herberman RB, Lotze MT, Shurin MR. Local administration of IL-12-transfected dendritic cells induces antitumor immune responses to colon adenocarcinoma in the liver in mice. *J Exp Ther Oncol* 2002;2: 337-349
- 40 Lechanteur C, Moutschen M, Princen F, Lopez M, Franzen J, Gielen J, Bouras V, Merville MP. Antitumoral vaccination with

- granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-12-expressing DHD/K12 colon adenocarcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 2000;7:676-682
- 41 Hayashi S, Emi N, Yokoyama I, Namii Y, Uchida K, Takagi H. Inhibition of establishment of hepatic metastasis in mice by combination gene therapy using both herpes simplex virus-thymidine kinase and granulocyte macrophage-colony stimulating factor genes in murine colon cancer. *Cancer Gene Ther* 1997;4:339-344
- 42 Hodzic D, Frey B, Marechal D, Scarcez T, Grootedae M, Winkler R. Cloning of breakpoints in and downstream the IGF2 gene that are associated with overexpression of IGF2 transcripts in colorectal tumours. *Oncogene* 1999;18:4710-4717
- 43 Adachi Y, Lee CT, Coffee K, Yamagata N, Ohm JE, Park KH, Dikov MM, Nadaf SR, Arteaga CL, Carbone DP. Effects of genetic blockade of the insulin-like growth factor receptor in human colon cancer cell lines. *Gastroenterology* 2002;123:1191-1204
- 44 Winkler R, Delacroix L, Bensaboh K, Lambert S, Collette J, Hodzic D. IGF-II in primary human colorectal tumors: peptide level, activated promoters, parental imprinting and gene rearrangement. *Horm Metab Res* 1999;31:148-154
- 45 Lee CT, Park KH, Adachi Y, Seol JY, Yoo CC, Kim YW, Han SK, Shim YS, Coffee K, Dikov MM, Carbone DP. Recombinant adenoviruses expressing dominant-negative insulin-like growth factor-I receptor demonstrate antitumor effects on lung cancer. *Cancer Gene Therapy* 2003;10:57-63
- 46 Lardon F, Snoeck HW, Berneman ZN, Van Tendeloo VF, Nijs G, Lenjou M, Henckaerts E, Boeckxstaens CJ, Vandenabeele P, Kestens LL, Van Bockstaele DR, Vanham GL. Generation of dendritic cells from bone marrow progenitors using GM-CSF, TNF-alpha, and additional cytokines: antagonistic effects of IL-4 and IFN-gamma and selective involvement of TNF-alpha receptor-1. *Immunology* 1997;91:553-559
- 47 Eguchi J, Hiroishi K, Ishii S, Mitamura K. Interferon-alpha and interleukin-12 gene therapy of cancer: interferon-alpha induces tumor-specific immune responses while interleukin-12 stimulates non-specific killing. *Cancer Immunol Immunother* 2003;52:378-386
- 48 Mendiratta SK, Quezada A, Matar M, Thull NM, Bishop JS, Nordstrom JL, Peride F. Combination of interleukin 12 and interferon alpha gene therapy induces a synergistic antitumor response against colon and renal cell carcinoma. *Hum Gene Ther* 2000;11:1851-1862
- 49 Stein U, Walther W, Shoemaker RH. Modulation of mdr1 expression by cytokines in human colon carcinoma cells: an approach for reversal of multidrug resistance. *Br J Cancer* 1996; 74:1384-1391
- 50 梁成金, 马庆久, 赖大年, 鲁建国, 王小军, 王青, 潘伯荣, 武永忠, 李金茂. CD/5-FC 系统对结肠癌细胞的杀伤作用. 世界华人消化杂志 2003;11:535-539
- 51 钱伟峰, 宋惠娟, 黄宗海. 大肠癌的自杀基因治疗. 腹部外科 2000; 13:63-65
- 52 郭善禹, 顾琴龙, 朱正纲, 尹浩然, 林含箴. TK 基因 19 - 丙氧鸟苷联合 mGM - CSF 基因治疗胃癌. 中华实验外科杂志 2000;17: 297-299
- 53 Chen SH, Chen XH, Wang YB, Kosai K, Finegold MJ, Rich SS, Woo SL. Combination gene therapy for live metastasis of colon carcinoma *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 2277-2280
- 54 Chen SH, Kosai KI, Xu B, Pham-Nguyen K, Contant C, Finegold MJ, Woo SL. Combination suiside and cytokine gene therapy for hepatic metastasis of colon carcinoma: Substained antitumor immunity prolongs animal survival. *Cancer Research* 1996; 56:3758-3762
- 55 Coll JL, Mesnil M, Lefebvre MF, Lancon A, Favrot MC. Long-term survival of immunocompetent rats with intraperitoneal colon carcinoma tumors using herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir and IL-2 treatments. *Gene Ther* 1997;4:1160-1166
- 56 Sabaawy HE, Farley T, Ahmed T, Feldman E, Abraham NG. Synergetic effects of retrovirus IFN-alpha gene transfer and 5-FU on apoptosis of colon cancer cells. *Acta Haematol* 1999; 101:82-88
- 57 Palmer DH, Chen MJ, Kerr DJ. Gene therapy for colorectal cancer. *Br Med Bull* 2002;64:201-225
- 58 Chen MJ, Chung-Faye GA, Searle PF, Young LS, Kerr DJ. Gene therapy for colorectal cancer: therapeutic potential. *BioDrugs* 2001;15:357-367
- 59 Chung-Faye GA, Kerr DJ. ABC of colorectal cancer: Innovative treatment for colon cancer. *BMJ* 2000;321:1397-1399
- 60 王正文, 朱明才, 范维柯. 胃癌的基因治疗研究进展. 国外医学·临床生物化学和检验学分册 2003;24:93-95

World Journal of Gastroenterology 栏目设置

《World Journal of Gastroenterology, WJG》主要开设以下栏目。(1)文献综述: 基于作者自己研究为主的综合性论文。(2)特色栏目 如食管癌、胃癌、肝癌、病毒性肝炎、中医中药、中西医结合等, 具有我国特色及国际领先水平的原创性研究论文。(3)基础研究 报道学术价值高、实验数据完整、具有原始性和创新性的研究成果。(4)临床研究 报道安全性和有效性的随机、双盲双模拟、多中心平行对照临床试验的临床研究论文。(5)研究快报 报道具有原始性和创新性的阶段性成果。(6)病例报告: 报道对临床工作者有指导意义的个案。

• 文献综述 •

大肠癌的基因治疗

谭颖, 姚宇亮, 林连捷, 郑长青

谭颖, 姚宇亮, 林连捷, 郑长青, 中国医科大学附属第二医院
辽宁省沈阳市 110004
项目负责人: 郑长青, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第二
医院. zhengchangqing88@163.com
电话: 024 - 83596682
收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-02-24

摘要

大肠癌(colorectal cancer, CRC)是威胁人类生存的恶性肿瘤之一。由于大肠癌比较适于基因治疗,因此他是目前大肠癌研究的热点问题之一。基因治疗主要包括自杀基因治疗,与原癌基因和抑癌基因有关的基因治疗,免疫基因治疗和联合治疗等。有些研究已经进入临床试验阶段。本文介绍了大肠癌的基因治疗研究进展和存在的问题,为今后的医疗科研工作提供新的思路。

谭颖, 姚宇亮, 林连捷, 郑长青. 大肠癌的基因治疗. 世界华人消化杂志 2004;
12(6):1451-1454
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1451.asp>

0 引言

大肠癌是威胁人类生存的恶性肿瘤之一。在西方国家恶性肿瘤的发病率中居第二位,在我国居第四位。目前的治疗以外科手术为主,辅以放疗和细胞毒性药物,但仍有50%的患者死于复发和转移,尤其是肝脏转移极易发生。由于大肠癌的一些特性使其比较适于基因治疗,临床前研究试验已获得的一些资料,证实了其安全性,并且有些基因治疗方案已应用于临床^[1],本文将就大肠癌的基因治疗研究进展作简要综述。

1 大肠癌的基因治疗

1.1.1 自杀基因治疗 自杀基因治疗又名基因介导的酶前药物治疗(gene directed enzyme prodrug therapy, GDEPT),是一种通过目的基因的转导,将外源酶转入肿瘤细胞中,使无毒的前药在肿瘤中代谢为有细胞毒性的药物,从而杀死肿瘤细胞^[2-6]。这种基因转导主要以病毒为载体(virus-directed enzyme prodrug therapy, VDEPT)。这种治疗的优点在于能够使毒性效应局限于肿瘤细胞而不累及正常细胞,如骨髓和胃肠道细胞。但是通过基因转导的途径不能将所有肿瘤细胞均转染上自杀基因,而旁观者效应(bystander effect, BE)可在很大程度上弥补这一不足。BE作用机制主要是毒性代谢产物(或其他来自已死亡的肿瘤细胞的凋亡因子)通过缝隙连接与细胞接触被动扩散到未转染的肿瘤细胞中;也可以

通过免疫反应起作用^[7-9]。目前研究较多的是单纯疱疹病毒胸苷激酶基因 / 更昔洛韦(herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir, HSV-TK/GCV),大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因/5-氟胞嘧啶(cytosine deaminase/5-fluorocytosine, CD/5-FC)和硝基还原酶/CB1954(nitroreductase/CB1954)治疗方法。

1.1.2 HSV-TK/GCV HSV-TK 能够催化 GCV 的磷酸化,产生毒性代谢药物丙氧鸟苷三磷酸(GCV-triphosphate, GCVTP),从而抑制肿瘤细胞 DNA 的合成。其催化效应是人核酸激酶(human nucleoside kinase)的 1 000 倍,这使其成为 GDEPT 的典型实例。

利用 HSV-TK/GCV 系统治疗大肠癌细胞株 HT-290,肿瘤细胞衰退达 80% 以上^[10]。在转导了 HSV-TK 基因的结肠癌细胞系 HCT-116 中观察到 GCV 不仅对转导 TK 基因(TK+)的肿瘤细胞有杀伤作用,对于未转导 TK 基因(TK-)的肿瘤细胞也具有杀伤作用^[11]。在大肠腺癌的同源鼠模型(Syngeneic murine model)上,HSV-TK/GCV 系统可以在只有 9% 细胞表达 TK 基因的基础上使 CT-26 肿瘤细胞完全衰退。由于脂溶性 GCV 代谢产物不能扩散入相邻的细胞,因此可能依靠旁观者效应中的缝隙连接或免疫反应发挥作用^[12]。

动物实验表明,用表达 HSV-TK 逆转录病毒包装细胞和结肠癌细胞接种 M26 小鼠,并且用 GCV 腹腔注射,结果发现有免疫力的小鼠的肿瘤明显消退,而在免疫抑制的无胸腺小鼠中却未发现旁观者效应,证实了在旁观者效应中免疫因素的抗肿瘤的作用^[13]。动物实验表明^[14],HU 和 HSV-TK/GCV 联合应用将会加强对肿瘤 DNA 合成的抑制,减慢肿瘤的生长速度。

癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)在 80% 以上的大肠癌中均有表达。实验结果表明^[15]利用 CEA 基因启动子连接 HSV-TK 基因,HSV-TK 基因可特异性进入分泌 CEA 的人类大肠癌细胞株;将其导入 CB17 SCID 鼠的大肠癌肝转移模型中可发现肝转移肿瘤细胞的衰退。

HSV-TK/GCV 系统已进入 I 期临床试验阶段。在局麻条件下,超声监测下,对 16 例大肠癌肝转移患者经皮下肿瘤内注射表达 HSV-TK 基因的复制缺陷腺病毒载体(Adv. RSV-tk),经过 5 次逐步增量,剂量达到 1×10^{13} 病毒颗粒,同时静脉内注射 GCV(定量)。结果显示肝毒性低,只有 3 例患者有一过性血浆转氨酶升高,其他毒性也都是一过性的:5 例患者出现发热,1 例患者有血小板减少,3 例患者有白细胞减少。试验结果^[16]证明了肿瘤内注射 Adv. RSV-tk 是安全的,为将来的临床

治疗提供了依据。

1.1.3 CD/5-FC CD基因存在于某些细菌和真菌体内，哺乳动物细胞内无此基因，可将毒性极低的抗真菌药物5-氟胞嘧啶(5-FC)代谢成为治疗大肠癌最有效的化疗药物之一—5-氟尿嘧啶(5-FU)。5-FU可抑制DNA合成，阻断核酸代谢途径，从而杀死肿瘤细胞。有研究表明^[17]，利用酵母中提取的胞嘧啶脱氨酶(yestcytosinedeaminase, yCD)将5-FC转变为5-FU的能力比从细菌中提取的胞嘧啶脱氨酶(bacterialcytosinedeaminase, bCD)强20倍以上，从而说明真菌的CD基因疗效强于细菌的CD基因。CD/5-FC系统的局限性在于5-FU的细胞毒性存在细胞周期依赖性。

在仅有2%异体移植细胞表达CD基因时，肿瘤细胞明显消退，提示CD/5-FC系统存在显著的体内旁观者效应^[18]。利用重组腺病毒载体转染CD基因进入BALB-C小鼠和MC38肝转移模型小鼠，结果发现在肿瘤细胞中目的基因的表达水平比其他器官中的表达水平高1 000-10 000倍($n=160$, $P<0.0001$)，给予前药5-FC以后，大肠癌肝转移小鼠的治愈率达30%以上^[19]。

CD与UPRT(uracil phosphoribosyl transferase)联合应用将会加速5-FU转化成为其毒性代谢产物，加强抗肿瘤疗效^[20]。

利用具有免疫能力和缺乏免疫能力(无胸腺)小鼠研究CD/5-FC系统对大肠癌肝转移的治疗作用，实验显示转染CD基因的肿瘤细胞对5-FC的敏感性比未转染的亲代细胞高120倍以上，不到5%的肿瘤细胞转染CD基因并给予5-FC治疗后可使肿瘤细胞显著减少甚至完全消退，并可在肿瘤局部见到大量CD4+、CD8+淋巴细胞和巨噬细胞浸润，这些小鼠对其他的肿瘤的抵抗力也明显增强，而在无胸腺小鼠接种按40:60比例配制的CD阳性和CD阴性肿瘤细胞，尽管给予5-FC治疗，但最终几乎所有的裸鼠均感染上肿瘤，提示免疫因素在基因治疗中的抗肿瘤作用^[9]。

利用CEA基因启动子连接CD基因，使CD基因只能在分泌CEA的靶细胞中表达。Cao et al^[21-22]利用逆转录病毒为载体，分别将CEA基因调控的CD基因和单独的CD基因pCD2转移到接种大肠癌细胞的小鼠体内，结果显示使用pCD2基因注射的小鼠在大肠癌细胞和骨髓细胞内均有CD基因的表达，在给予5-FC治疗后，出现骨髓抑制现象；而接种CEA419/CD基因的小鼠，仅在大肠癌细胞中有CD基因表达，经5-FC治疗后，大肠癌细胞完全消退，且不出现骨髓抑制现象。试验结果表明应用肿瘤选择性启动子进行体内基因治疗可以确保自杀基因治疗的安全性。

CD/5-FC系统已进入I期临床试验阶段。利用逆转录病毒为载体，对大肠癌肝转移患者进行肿瘤内注射大肠杆菌CD基因(Ad-GVCD-10)，同时口服5-FC。剂量上限预计为 2×10^9 病毒颗粒。该试验分为两组：其中一组只给予载体和前药，另一组在治疗后切除肿瘤进

行组织学和分子学研究^[23]。

1.1.4 硝基还原酶/CB1954 硝基还原酶能够使前药CB1954转化为具有高度毒性的两种不同功能的烷基化物，能导致细胞死亡。这种效应具有非细胞周期依赖性，并存在旁观者效应^[24]。

临床I期CB1954的剂量试验已完成，设置了其静脉注射的安全剂量。药代动力学通过对临床前模型的研究表明，充足的剂量对于CB1954的激活有重要临床意义。在这项进行中的I期临床试验中，以E1, E3敲除的腺病毒为载体，将巨细胞病毒启动子调控的硝基还原酶基因对大肠癌肝转移的患者进行超声监控下肿瘤内注射。通过用重组腺病毒转染大肠癌肝转移患者，初步数据表明肿瘤内注射的安全剂量可达到 1×10^{10} 病毒微粒。免疫组化分析表明硝基还原酶的表达与剂量有关。

1.2 与原癌基因和抑癌基因有关的基因治疗 大量实验证明大肠癌的发生与多个癌基因的激活或抑癌基因的失活有关，如原癌基因K-ras, myc，抑癌基因p53, apc, mcc, dcc, p16等。大肠癌相关的癌变异基因校正治疗的关键在于在肿瘤内要存在某种基因的高表达。该治疗目前主要是敲除或校正致病基因和导入正常的抑癌基因。

50%大肠癌患者有p53变异。动物试验表明^[25]在p53变异的大肠癌鼠模型上重新表达野生型p53可以抑制肿瘤生长提高存活率。临床I期试验^[26]证实了经肝动脉或肿瘤内转导腺病毒为载体的p53的安全性和剂量。

对原癌基因的过度表达，可用反义寡核苷酸或核糖酶抑制原癌基因的过度表达。临床前研究^[27]表明K-ras反义疗法是一种安全，相对无毒的治疗方法。Survivin是新近发现的一种抑制细胞凋亡蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族成员，特异性表达于人和鼠的胚胎发育组织以及多数人类肿瘤细胞^[28]。Survivin在结、直肠癌患者总体表达率约为53.2%-63.5%。体外试验^[29]表明，腺病毒介导的survivin途径能够诱导肿瘤细胞凋亡，同时不影响周围正常细胞的增生。其效果优于同等条件下使用阿霉素的结果。

1.3 免疫基因治疗 免疫基因治疗的目的在于激活细胞介导或是抗体依赖的肿瘤特异性免疫反应。针对肿瘤细胞繁殖导致的免疫下调和肿瘤抗原的复杂性^[30-31]，大肠癌的免疫基因治疗主要是输入细胞因子基因及输入肿瘤相关抗原基因重组的病毒基因。

临床前试验^[32-34]已证明包括IL-2, IL-4, IL-12, CM-CSF, IFN-γ在内的一系列细胞因子的免疫增强作用。I期临床试验^[35-36]证实，利用痘病毒为载体的CEA肿瘤内注射3 mo, 9例患者中有7例被激发CEA特异性细胞毒性淋巴细胞反应。

1.4 联合治疗 上述基因疗法虽然对大肠癌有一定疗效，但还不能彻底清除体内瘤细胞。联合治疗是目前基因治疗的发展方向。应用于大肠癌的联合基因治疗主要有：自杀基因与细胞因子基因的联合应用，自杀基因与放疗的联合应用等。动物试验^[37-38]已表明自杀基因与细胞因

子基因的联合应用可避免肿瘤的复发，延长动物的成活时间。目前有学者^[39~40]已证实自杀基因治疗肿瘤可增加肿瘤细胞对放疗的敏感性。

在小鼠结肠癌肝转移的动物模型上，通过重组腺病毒载体分别转导ADV/RSV-MIL-2基因和ADV/RSV-tk基因，然后给予GCV治疗。结果表明分别应用IL-2基因，tk基因和二者联合治疗的肿瘤面积分别为120 mm²，25 mm²和5 mm²，并发现抗肿瘤效果的提高与IL-2介导的T细胞免疫增强有关^[37]。在此基础上，应用HSV-TK基因、IL-2基因和GM-CSF基因联合治疗结肠癌肝转移的荷瘤小鼠，结果显示联合自杀基因和两种细胞因子基因治疗优于tk基因与IL-2基因的联合治疗^[38]。证实了肿瘤细胞内GM-CSF的局部表达及IL-2基因的延长表达可以产生持续的抗肿瘤免疫效应，从而避免了肿瘤的复发，延长动物的成活时间。

利用逆转录病毒为载体转染IFN- α 基因进入大肠癌细胞COLO 201，并与5-FU联合治疗。结果表明可以提高肿瘤细胞的死亡率，诱发肿瘤细胞凋亡^[41]。

有研究^[42]表明，腺病毒介导的UPRT(uracil phosphoribosyltransferase)基因转染、5-FU与放射治疗联合作用于大范围的裸鼠皮下HT29肿瘤取得了良好的疗效。

已有研究在动物实验中证明自杀基因和放疗联合应用有效地治疗结肠癌。将接种Widr细胞的裸鼠分为4组，分别用放射治疗，自杀基因(CD基因)治疗，自杀基因和放疗联合应用，5-FU化疗和放疗联合。结果表明，自杀基因(CD基因)和放射联合治疗的小鼠肿瘤消退最快，并且肿瘤细胞对放疗的敏感性增加^[43]。

2 基因治疗风险和前景

自1990年美国对ADA缺乏病患者首次应用基因治疗以来，以欧美为中心开展了各种基因治疗的临床试验，目前美国食品医药管理局(FDA)所批准实施的基因治疗方案已经超过600种，60%应用于癌症的治疗。3 500例患者接受了基因治疗，其中2 400例是癌症患者。大肠癌的基因治疗已经从理论走向了实践，其有效性已在细胞学和动物模型上得到验证，HSV-TK/GCV，CD/5-FC体系的VDEPT方案，p53抑癌基因治疗以及某些免疫基因已进入Ⅰ期临床试验阶段。这些试验将验证基因治疗的有效性和安全性，并探讨其使用的剂量、途径和疗程等实际问题。但大肠癌基因治疗的临床应用仍存在很多问题，如基因转导的低效性，抗肿瘤效应的低效率，基因表达的安全性，基因转导的靶向性，自体免疫反应，基因载体的安全性，非损伤性基因表达监控等。随着这些问题的解决，大肠癌的基因治疗必将愈加完善，成为人类医治大肠癌的重要手段。

3 参考文献

- 1 Kerr D. Clinical development of gene therapy for colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2003;3:615~622
- 2 Denny WA, Wilson WR. The design of selectively-activated anti-cancer prodrugs for use in antibody-directed and gene-directed enzyme-prodrug therapies. *J Pharm Pharmacol* 1998; 50:387~394
- 3 Friedlos F, Court S, Ford M, Denny WA, Springer C. Gene-directed enzyme prodrug therapy: quantitative bystander cytotoxicity and DNA damage induced by CB1954 in cells expressing bacterial nitroreductase. *Gene Ther* 1998;5:105~112
- 4 Friedlos F, Denny WA, Palmer BD, Springer CJ. Mustard prodrugs for activation by Escherichia coli nitroreductase in gene-directed enzyme prodrug therapy. *J Med Chem* 1997;40: 1270~1275
- 5 Clark AJ, Iwobi M, Cui W, Crompton M, Harold G, Hobbs S, Kamalati T, Knox R, Neil C, Yull F, Gusterson B. Selective cell ablation in transgenic mice expression *E.coli* nitroreductase. *Gene Ther* 1997;4: 101~110
- 6 Moolten FL. Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* 1986;46:5276~5281
- 7 Bi WL, Parysek LM, Warnick R, Stambrook PJ. In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993;4:725~731
- 8 McMasters RA, Saylor RL, Jones KE, Hendrix ME, Moyer MP, Drake RR. Lack of bystander killing in herpes simplex virus thymidine kinase-transduced colon cell lines due to deficient connexin43 gap junction formation. *Hum Gene Ther* 1998;9:2253~2261
- 9 Kuriyama S, Kikukawa M, Masui K, Okuda H, Nakatani T, Sakamoto T, Yoshiji H, Fukui H, Ikenaka K, Mullen CA, Tsujii T. Cytosine deaminase/5-fluorocytosine gene therapy can induce efficient anti-tumor effects and protective immunity in immunocompetent mice but not in athymic nude mice. *Int J Cancer* 1999;81:592~597
- 10 Barnes LD, Garrison PN, Siprashvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingram SW, Croce CM, Ohta M, Huebner K. Flit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5', 5''-P1,P3-triphosphate hydrolase. *Biochemistry* 1996;35: 11529~11535
- 11 Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, Moolten FL, Abraham GN. The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 1993;53:5274~5283
- 12 Link CJ Jr, Levy JP, McCann LZ, Moorman DW. Gene therapy for colon cancer with the herpes simplex thymidine kinase gene. *J Surg Oncol* 1997;64:289~294
- 13 Gagandeep S, Brew R, Green B, Christmas SE, Klatzmann D, Poston GJ, Kinsella AR. Prodrug-activated gene therapy: involvement of an immunological component in the "bystander effect". *Cancer Gene Ther* 1996;3:83~88
- 14 Boucher PD, Ostruszka LJ, Murphy PJ, Shewach DS. Hydroxyurea significantly enhances tumor growth delay in vivo with herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy. *Gene Ther* 2002;9:1023~1030
- 15 Okabe S, Arai T, Yamashita H, Sugihara K. Adenovirus-mediated prodrug-enzyme therapy for CEA-producing colorectal cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:367~373
- 16 Sung MW, Yeh HC, Thung SN, Schwartz ME, Mandeli JP, Chen SH, Woo SL. Intratumoral adenovirus-mediated suicide gene transfer for hepatic metastases from colorectal adenocarcinoma: results of a phase I clinical trial. *Mol Ther* 2001;4:182~191
- 17 Kievit E, Bershad E, Ng E, Sethna P, Dev I, Lawrence TS, Rehemtulla A. Superiority of yeast over bacterial cytosine deaminase for enzyme/prodrug gene therapy in colon cancer xenografts. *Cancer Res* 1999;59:1417~1421
- 18 Huber BE, Austin EA, Richards CA, Davis ST, Good SS. Metabolism of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil in human colorectal tumor cells transduced with the cytosine deaminase gene: significant antitumor effects when only a small percentage of tumor cells express cytosine deaminase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8302~8306
- 19 Block A, Freund CT, Chen SH, Nguyen KP, Finegold M, Windler E, Woo SL. Gene therapy of metastatic colon carcinoma: regression of multiple hepatic metastases by adenoviral ex-

- pression of bacterial cytosine deaminase. *Cancer Gene Ther* 2000;7:438-445
- 20 Chung-Faye GA, Chen MJ, Green NK, Burton A, Anderson D, Mautner V, Searle PF, Kerr DJ. In vivo gene therapy for colon cancer using adenovirus-mediated transfer of the fusion gene cytosine deaminase and uracil phosphoribosyltransferase. *Gene Ther* 2001;8:1547-1554
- 21 Cao G, Kuriyama S, Gao J, Mitoro A, Cui L, Nagao S, Zhang X, Tsujinoue H, Pan X, Fukui H, Qi Z. In vivo gene transfer of a suicide gene under the transcriptional control of the carcinoembryonic antigen promoter results in bone marrow transduction but can avoid bone marrow suppression. *Int J Oncol* 1999;15:107-112
- 22 Cao G, Kuriyama S, Gao J, Kikukawa M, Cui L, Nakatani T, Zhang X, Tsujinoue H, Pan X, Fukui H, Qi Z. Effective and safe gene therapy for colorectal carcinoma using the cytosine deaminase gene directed by the carcinoembryonic antigen promoter. *Gene Ther* 1999;6:83-90
- 23 Crystal RG, Hirschowitz E, Lieberman M, Daly J, Kazam E, Henschke C, Yankelevitz D, Kemeny N, Silverstein R, Ohwada A, Russi T, Mastrangeli A, Sanders A, Cooke J, Harvey BG. Phase I study of direct administration of a replication deficient adenovirus vector containing the *E. coli* cytosine deaminase gene to metastatic colon carcinoma of the liver in association with the oral administration of the pro-drug 5-fluorocytosine. *Hum Gene Ther* 1997;8:985-1001
- 24 Green NK, Youngs DJ, Neoptolemos JP, Friedlos F, Knox RJ, Springer CJ, Anlezark GM, Michael NP, Melton RG, Ford MJ, Young LS, Kerr DJ, Searle PF. Sensitization of colorectal and pancreatic cancer cell lines to the prodrug 5-(aziridin-1-yl)-2, 4-dinitrobenzamide (CB1954) by retroviral transduction and expression of the *E. coli* nitroreductase gene. *Cancer Gene Ther* 1997;4:229-238
- 25 Harris MP, Sutjipto S, Wills KN, Hancock W, Cornell D, Johnson DE, Gregory RJ, Shepard HM, Maneval DC. Adenovirus-mediated p53 gene transfer inhibits growth of human tumor cells expressing mutant p53 protein. *Cancer Gene Ther* 1996;3:121-130
- 26 Cohen AM, Kemeny NE, Kohne CH, Wils J, de Takats PG, Kerr DJ. Is intra-arterial chemotherapy worthwhile in the treatment of patients with unresectable hepatic colorectal cancer metastases? *Eur J Cancer* 1996;32A:2195-2205
- 27 Sakakura C, Hagiwara A, Tsujimoto H, Ozaki K, Sakakibara T, Oyama T, Ogaki M, Imanishi T, Yamazaki J, Takahashi T. Inhibition of colon cancer cell proliferation by antisense oligonucleotides targeting the messenger RNA of the Ki-ras gene. *Anticancer Drugs* 1995;6:553-561
- 28 Adida C, Crotty PL, McGrath J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998;152:43-49
- 29 Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. *J Clin Invest* 2001;108:981-990
- 30 Todryk SM, Chong H, Vile RG, Pandha H, Lemoine NR. Can immunotherapy by gene transfer tip the balance against colorectal cancer? *Gut* 1998;43:445-449
- 31 Bodey B, Bodey B Jr, Siegel SE, Kaiser HE. Failure of cancer vaccines: the significant limitations of this approach to immunotherapy. *Anticancer Res* 2000;20:2665-2676
- 32 Sobol RE, Shawler DL, Carson C, Van Beveren C, Mercola D, Fakhrai H, Garrett MA, Barone R, Goldfarb P, Bartholomew RM, Brostoff S, Carlo DJ, Royston I, Gold DP. Interleukin 2 gene therapy of colorectal carcinoma with autologous irradiated tumor cells and genetically engineered fibroblasts: a Phase I study. *Clin Cancer Res* 1999;5:2359-2365
- 33 Suminami Y, Elder EM, Lotze MT, Whiteside TL. In situ interleukin-4 gene expression in cancer patients treated with genetically modified tumor vaccine. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 1995;17:238-248
- 34 Schmidt-Wolf IG, Finke S, Trojaneck B, Denkena A, Leferova P, Schwella N, Heuft HG, Prange G, Korte M, Takeya M, Dorbic T, Neubauer A, Wittig B, Huhn D. Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transfected with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal cancer, colorectal cancer and lymphoma. *Br J Cancer* 1999;81:1009-1016
- 35 Marshall JL, Hawkins MJ, Tsang KY, Richmond E, Pedicano JE, Zhu MZ, Schlom J. Phase I study in cancer patients of a replication-defective avipox recombinant vaccine that expresses human carcinoembryonic antigen. *J Clin Oncol* 1999;17:332-337
- 36 Zhu MZ, Marshall J, Cole D, Schlom J, Tsang KY. Specific cytolytic T-cell responses to human CEA from patients immunized with recombinant avipox-CEA vaccine. *Clin Cancer Res* 2000;6:24-33
- 37 Chen SH, Chen XH, Wang Y, Kosai K, Finegold MJ, Rich SS, Woo SL. Combination gene therapy for liver metastasis of colon carcinoma in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:2577-2581
- 38 Chen SH, Kosai K, Xu B, Pham-Nguyen K, Contant C, Finegold MJ, Woo SL. Combination suicide and cytokine gene therapy for hepatic metastases of colon carcinoma: sustained antitumor immunity prolongs animal survival. *Cancer Res* 1996;56:3758-3762
- 39 Kim SH, Kim JH, Kolozsvary A, Brown SL, Freytag SO. Preferential radiosensitization of 9L glioma cells transduced with HSV-tk gene by acyclovir. *J Neurooncol* 1997;33:189-194
- 40 Nishihara E, Nagayama Y, Mawatari F, Tanaka K, Namba H, Niwa M, Yamashita S, Sabaawy HE, Farley T, Ahmed T, Feldman E, Abraham NG. Retrovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transduction renders human thyroid carcinoma cell lines sensitive to ganciclovir and radiation in vitro and in vivo. *Endocrinology* 1997;138:4577-4583
- 41 Sabaawy HE, Farley T, Ahmed T, Feldman E, Abraham NG. Synergetic effects of retrovirus IFN-alpha gene transfer and 5-FU on apoptosis of colon cancer cells. *Acta Haematol* 1999;101:82-88
- 42 Koyama F, Fujii H, Mukogawa T, Ueno M, Hamada H, Ishikawa H, Doi S, Nakao T, Matsumoto H, Shimatani H, Takeuchi T, Nakajima Y. Chemo-radio-gene therapy for colorectal cancer cells using *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase gene. *Anticancer Res* 2003;23:1343-1348
- 43 Gabel M, Kim JH, Kolozsvary A, Khil M, Freytag S. Selective in vivo radiosensitization by 5-fluorocytosine of human colorectal carcinoma cells transduced with the *E. coli* cytosine deaminase (CD) gene. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;41:883-887

• 研究快报 •

血管紧张素Ⅱ对肝星状细胞TIMP-1表达的作用

王磊,刘海林

王磊,刘海林,上海第二医科大学附属第九人民医院消化科 上海市 200011
 项目负责人:刘海林,200011,上海市制造局路639号,上海第二医科大学
 附属第九人民医院消化科 liu_hailin@yahoo.com.cn
 电话:021-63138341-5134 传真:021-63136856
 收稿日期:2004-02-06 接受日期:2004-03-02

摘要

目的:研究血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)对肝星状细胞组织基质金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)表达的作用.

方法:体外培养大鼠肝星状细胞株HSC-T6,分别加入不同浓度的AngⅡ(10^{-6} - 10^{-9} mol/L)和AngⅡ 10^{-6} mol/L+Losartan 10^{-6} mol/L,作用48 h后收集细胞,RT-PCR检测各组TIMP-1 mRNA表达水平.

结果: 10^{-6} mol/L AngⅡ和 10^{-7} mol/L AngⅡ作用的HSC-T6细胞TIMP-1 mRNA的表达分别为 0.79 ± 0.04 和 0.83 ± 0.06 ,显著高于空白对照组 0.62 ± 0.08 ($P < 0.05$), 10^{-6} AngⅡ+ 10^{-6} Losartan组TIMP-1 mRNA的表达为 0.64 ± 0.06 ,显著抑制 10^{-6} mol/L AngⅡ的作用($P < 0.05$).

结论: AngⅡ可通过AT1受体促进HSC-T6细胞TIMP-1的表达.

王磊,刘海林. 血管紧张素Ⅱ对肝星状细胞TIMP-1表达的作用. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1455-1456

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1455.asp>

0 引言

最近的研究发现,血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)是一种重要的促肝纤维化因子,AngⅡ可通过1型受体(AT1受体)介导促进肝星状细胞(HSC)增生、 Ca^{2+} 内流和胶原合成^[1].但在肝纤维化形成过程中AngⅡ对细胞外基质(ECM)的代谢是否发挥作用尚不十分清楚.组织基质金属蛋白酶抑制因子-1(TIMP-1)通过抑制ECM降解在肝纤维化过程中发挥重要作用.本研究观察了不同浓度AngⅡ和AT1受体拮抗剂对肝星状细胞株HSC-T6的TIMP-1表达的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肝星状细胞株(HSC-T6),为美国加利福尼亚旧金山总医院肝病中心实验室Friedman教授建立,上海中医药大学肝病研究所徐列明教授惠赠;AngⅡ购自Calbiochem公司;AT1受体拮抗剂Losartan为默沙东公司产品;DMEM培养基、胎牛血清购自Gibco公司;Trizol试剂盒,购自Sigma公司;Takara RT-PCR试

剂盒为Takara公司产品;TIMP-1、 β -actin引物由上海生工公司合成.

1.2 方法 HSC-T6细胞用含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液制备为 1×10^6 /mL的单细胞悬液,接种于培养皿中,置含50 mL/L CO₂、37℃培养箱中培养24 h,细胞贴壁后换含4 mL/L胎牛血清的DMEM培养液,继续培养24 h后,换含终浓度为 10^{-6} - 10^{-9} mol/L AngⅡ及AngⅡ 10^{-6} mol/L+Losartan 10^{-6} mol/L的培养液,并设空白对照组,每组3盘细胞.作用48 h后,每盘细胞加1 mL Trizol,将细胞收集至经DEPC水处理的Eppendorf管中,-80℃保存.按Trizol试剂盒说明书提取总RNA,溶于20 μ L 0.1 g/L DEPC水中,取溶解的RNA 1 μ L,用DEPC水稀释100倍,用紫外分光光度仪检测RNA纯度及浓度.逆转录反应体系:RNA标本2 μ g,逆转录酶1 μ L,dNTP混合物(10 mmol/L)2 μ L,10×PCR缓冲液2 μ L,MgCl₂(25 mmol/L)4 μ L, RNA酶抑制剂0.5 μ L,oligo dt-Adaptor引物1 μ L,其余为无RNA酶水,反应总体积共20 μ L.cDNA合成反应条件:30℃,10 min;42℃,60 min;99℃,5 min;5℃,5 min.PCR反应体系:逆转录cDNA产物2 μ L,TIMP-1或 β -actin上下游引物(表1)各1 μ L,Taq酶(5 U/ μ L)0.25 μ L,dNTP混合物(10 mmol/L)0.5 μ L,10×PCR缓冲液2 μ L,MgCl₂(25 mmol/L)1.2 μ L,其余为无RNA酶水,反应总体积共20 μ L.PCR反应条件:94℃预变性2 min;之后94℃,30 s;56℃,30 s;72℃,1.5 min;共35个循环;最后72℃10 min,终止反应.PCR扩增产物加2 μ L DNA上样液混匀,经15 g/L琼脂糖凝胶(含1 g/L溴化乙啶)电泳后,经GIS-2800凝胶图像处理系统拍照,分析各产物条带平均灰度值,以 β -actin产物条带灰度值为内参照计算mRNA相对表达量.

统计学处理 SAS统计软件包进行配对t检验.

表1 引物序列

| 引物 | 序列 | 扩增长度(bp) | 位点 |
|-------------------|--------------------------------|----------|---------|
| TIMP-1 顺义 | 5' -GACCTGGTCATAAGGGCTAA-3' | 219 | 118-138 |
| 反义 | 5' -GCCCGTGATGAGAACTCTTCACT-3' | 313 | 336 |
| β -actin 顺义 | 5' -GTGGGCCGCTTAGGCACCAA-3' | 540 | 25-45 |
| 反义 | 5' -CTCTTGATGTCACGCACGATTTC-3' | 541 | 564 |

2 结果

10^{-6} mol/L AngⅡ组和 10^{-7} mol/L AngⅡ组作用的HSC-T6细胞TIMP-1 mRNA的表达分别为 0.79 ± 0.04 和 0.83 ± 0.06 ,显著高于空白对照组 0.62 ± 0.08 ($P < 0.05$),

10^{-6} Ang II + 10^{-6} Losartan 组 TIMP-1 mRNA 的表达为 0.64 ± 0.06 , 显著抑制 10^{-6} mol/L Ang II 的作用($P < 0.05$) (表2、图1)。

表2 不同浓度 Ang II 和 Losartan 对 HSC-T6 细胞 TIMP-1 mRNA 表达的作用 (mean \pm SD, n = 3)

| 分组(mol/L) | TIMP-1 mRNA | |
|---------------------------------------|-------------------|----------|
| 10^{-6} Ang II | 0.79 ± 0.04^a | P = 3.29 |
| 10^{-7} Ang II | 0.83 ± 0.06^a | P = 3.64 |
| 10^{-8} Ang II | 0.59 ± 0.05 | P = 0.55 |
| 10^{-9} Ang II | 0.61 ± 0.06 | P = 0.17 |
| 空白对照组 | 0.62 ± 0.08 | |
| 10^{-6} Ang II + 10^{-6} Losartan | 0.64 ± 0.06^b | P = 3.60 |

^aP < 0.05 vs 空白对照组, ^bP < 0.05 vs 10^{-6} Ang II 组。

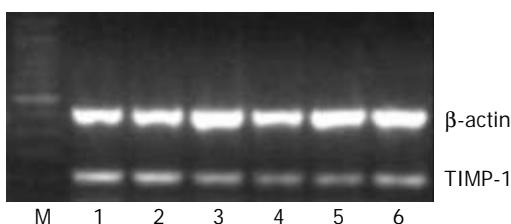


图1 Ang II 10^{-6} mol/L; 2: Ang II 10^{-7} mol/L; 3: Ang II 10^{-8} mol/L; 4: Ang II 10^{-9} mol/L; 5: 空白对照; 6: Ang II 10^{-6} mol/L + Losartan 10^{-6} mol/L; M: 标准DNA标记。Ang II 对 HSC-T6 细胞 TIMP-1 mRNA 表达的 PCR 电泳。

3 讨论

近来研究报道, 肝脏中也存在组织肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统(RAAS)^[2], 作为 RAAS 的重要活性成分, Ang II 在肝纤维化形成中的作用正逐渐引起广泛关注。动物实验表明大鼠分离培养的活化 HSC 和肝星状细胞株 HSC-T6 均可表达 AT1 受体, AT1 受体拮抗剂和 ACEI 对实验性大鼠肝纤维化具有一定的治疗作用^[3-4]。人活化的 HSC 同样存在 AT1 受体表达, Ang II 可以通过与其受体结合, 促进 HSC 增生、胶原合成和 Ca^{2+} 内流^[1]。TIMP-1 是 TIMP 家族的重要成员, 在肝纤维化过程中主要来源于活化的 HSC, 其通过抑制间质金属蛋白酶(MMP)的活性减少细胞外基质的降解, 在肝纤维化的

形成和发展中发挥十分重要的作用^[5]。而目前关于 Ang II 是否可以影响 HSC 的 TIMP-1 表达尚鲜有报道。

HSC-T6 是通过转导 SV40 基因建立的 SD 大鼠 HSC 细胞株, 具有稳定的活化 HSC 的生物学特性^[6]。我们在体外观察了不同浓度(10^{-6} - 10^{-9} mol/L)的 Ang II 对 HSC-T6 细胞的作用。结果提示高浓度的 Ang II 可以促进 HSC-T6 细胞的 TIMP-1 mRNA 的表达, 而且该作用可以被 AT1 受体拮抗剂抑制, 提示 Ang II 可以通过 AT1 受体的介导直接上调 TIMP-1 mRNA 表达, 从而通过抑制 ECM 降解促进肝纤维化的形成。同期国外亦有研究证明, 不同浓度 Ang II 作用于培养的大鼠 HSC 后, TIMP-1 的表达呈浓度和时间依赖性增加。而且此作用可被蛋白激酶 C 抑制剂所阻断, 提示 Ang II 刺激 TIMP-1 生成的机制可能与蛋白激酶 C 介导的 RNA 从头合成途径有关^[7]。

因此, Ang II 可通过上调 HSC 的 TIMP-1 参与抑制细胞外基质的降解, 促进肝纤维化的形成, Ang II 对其他肝纤维化相关 MMP/TIMP 的调节作用如何尚需要深入研究。

4 参考文献

- 1 Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbig MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000;118:1149-1156
- 2 张晶, 宗春华, 李定国, 周仁建, 杜学亮, 周馨, 徐芹芳, 陆汉明. 肝内肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统与大鼠肝纤维化的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:397-400
- 3 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsujinoue H, Fukui H. Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats. *Hepatology* 2001;34(4 Pt 1):745-750
- 4 李乾, 张桂英, 李新华, 徐美华. 卡托普利对肝纤维化模型鼠 MMP-2, 3 TIMP-2, 3 表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11: 1168-1171
- 5 刘海林, 李宣海, 杨少平, 王丹艺. 金属蛋白酶组织抑制因子-1 与肝纤维化. 中华消化杂志 2000;20:127-128
- 6 Vogel S, Piantedosi R, Frank J, Lazar A, Rockey DC, Friedman SL, Blaner WS. An immortalized rat liver stellate cell line (HSC-T6): a new cell model for the study of retinoid metabolism in vitro. *J Lipid Res* 2000;41:882-893
- 7 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Yanase K, Namisaki T, Yamazaki M, Tsujinoue H, Imazu H, Fukui H. Angiotensin-II induces the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 through the protein kinase-C signaling pathway in rat liver fibrosis development. *Hepatol Res* 2003;27:51-56

• 研究快报 •

胃癌中医证型分类的文献研究

许玲, 孙大志, 施俊, 陈亚琳, 魏品康

许玲, 孙大志, 施俊, 陈亚琳, 魏品康, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院中医科 上海市 200003
 国家自然科学基金资助项目, No. 30271626
 项目负责人: 许玲, 200003, 上海市凤阳路 415 号, 中国人民解放军第二军医大学长征医院中医科. czzyk@smmu.edu.cn
 电话: 021-63610109-73406
 收稿日期: 2004-02-06 接受日期: 2004-04-13

摘要

目的: 探讨胃癌中医证型分布的主次, 为制定胃癌辨证分型标准化提供框架结构和依据, 为进一步用循证医学的方法规范胃癌中医证型做基础.

方法: 检索近 15 a 的医学期刊, 收集含辨证分型具体病例资料的论文 49 篇, 总结、比较分析胃癌中医证型的构成比.

结果: 临床胃癌常见中医证型依次是肝胃不和型、瘀毒内阻型、痰湿凝结型、脾胃虚寒型、胃热伤阴型、气血双亏型和痰气凝滞型等 7 种.

结论: 运用循证医学的方法探讨和制定临床实用的胃癌辨证分型应标准化.

许玲, 孙大志, 施俊, 陈亚琳, 魏品康. 胃癌中医证型分类的文献研究. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1457-1459
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1457.asp>

0 引言

我国胃癌死亡率在县城居恶性肿瘤之首, 在城市居第二位, 因此对进展期胃癌患者行规范、合理、积极治疗, 对提高胃癌患者 5 a 生存率有重要意义. 大量研究发现, 胃癌术后辅助化疗疗效尚不确定^[1], 西方国家则不将术后化疗列为常规^[2], 而中医药在提高患者生存率、提高生存质量方面显示出很大优势. 但中医药学临床研究尚欠规范性, 结论的真实性难以得到公认, 难以推广和重复性差. 中医辨证治疗是中医学诊疗的特色, 但目前对胃癌中医证型的论述、分型方法、分型依据等不统一, 这为中医规范化诊疗胃癌带来不便, 为此我们对胃癌中医药治疗涉及到证型的文献进行调查和分析, 旨在为规范胃癌的中医药治疗研究提供依据, 为胃癌的中医药规范化治疗作基础.

1 材料和方法

1.1 材料 检索 1994-05/2002-12 公开发表在国内各种医学期刊上的中医药及中西医结合疗法治疗胃癌全文文献, 1983-01/1994-04 网络检索文摘后, 手检全文. 选择国内外医药界较为权威的中国生物医学文献光盘

数据库(中国医学科学院情报研究所 CBMDisk), 检索词为“胃癌”及二次检索词“辨证论治”、及以“中医药疗法”为检索词检索出的文献中提及辨证治疗者, 剔除有关胃癌癌前病变、一种药物治疗多种癌症(包括胃癌)、个案报道, 剩余明确提出胃癌辨证分型的 49 篇^[3-50](包括研究单一证型者)被纳入最终分析. 其中包括文献种类 30 种, 刊物出版地覆盖 23 个省、市自治区. 文献作者所在地覆盖 29 个省、市、县、自治区. 涉及研究单位属于省市级研究单位者为 42 篇, 县区级单位者 7 篇.

1.2 证型归纳

1.2.1 方法 篇文献共载录提到胃癌证型分类数的提法不统一, 最少的分 3 型, 最多的提到分 7 型; 不同的证型名称多达 87 种, 其中独立证型 77 种、兼夹证型 10 种, 10 种兼夹证型为: 气阴两虚挟湿型, 肝脾不和气虚血瘀型, 脾胃虚寒痰瘀交阻型, 脾胃阴虚痰热瘀毒型, 气虚挟湿(瘀)型, 气阴两虚挟湿(瘀)型, 气滞血瘀腑气不通型, 肝胃不和、气血双亏型, 脾胃虚寒、气血双亏型, 瘀毒内阻、气血双亏型; 将 77 种独立证型按异名同类及主症、次症、苔、脉的描述进行归纳. 具体实施如下: (1)不同提法, 但实质是同一证型的如: 脾胃气虚型、脾胃虚寒型、脾胃虚弱型、胃寒型统一归为脾胃虚寒型; 又如: 气血亏虚型、气血两亏型、气血两虚型、气血双亏型等统一归为气血双亏型. (2)不同证型提法按其所述辨证要点的实质内容, 相同者合并. 如热毒蕴结型与瘀毒内阻型合并, 热毒蕴结型^[3]“症见胃脘不适, 疼痛拒按, 心下痞块, 按之坚硬不移, 或呕血、便血, 舌质紫暗或见瘀斑, 苔薄白或薄黄, 脉沉细或涩”, “气滞血瘀型^[30]: 腹痛如刺, 痛处固定, 坚硬拒按, 食后加重, 呕吐赤豆汁液或紫暗血块, 尿黄, 便黑, 舌质有瘀点或瘀斑, 苔薄黄, 脉细涩或弦.”与 1978 年全国第一届胃癌学术会议北京市胃癌协作组制定的六型分法辨证中提到的瘀毒内阻型“主症为胃脘刺痛, 心下痞硬, 吐血便黑, 皮肤甲错, 舌质暗紫, 脉沉细涩”内容基本一致, 因此将其合并统称为瘀毒内阻型. (3)将笼统的证型提法如: 实证型、虚证型、虚实夹杂型删除, 以执简驭繁, 最后总结出 14 个证型, 其中各个证型及其在 49 篇文章中提到的频次如下表 1-1 所示, 根据频次多少将其划为常见证型与偶见证型两大类. 并且可以认为常见证型有 7 种, 分别为肝胃不和、痰湿凝结、瘀毒内阻、胃热伤阴、脾胃虚寒、气血双亏、痰气凝滞; 少见及偶见证型有 7 个, 分别为肝肾阴虚、寒凝血瘀、寒热错杂、脾胃湿热、心脾两虚、脾虚肝瘀、肾阳虚衰. 进一步观察每一种证型中的病例数, 选出文章中明

确提到的每种证型具体例数，其中一般证型共1527例，将少见证型及偶见证型共173例连同复合证型105例共同并为其他证型(表1,2)。数据用Access数据库管理。

2 结果

文章中提到的前4位依次为脾胃虚寒型，共提到48次，占23.4%；瘀毒内阻型，共提到39次，占19.0%；胃热伤阴型，共提到33次，占16.1%；肝胃不和型，共提到31次，占15.1%(表1)。

表1 证型频次

| 组 | 证型名称 | 文章提到频次 | | 组 | 证型名称 | 文章提到频次 | |
|---|------|--------|-------|----|------|--------|------|
| | | 频次 | 构成比 | | | 频次 | 构成比 |
| 1 | 肝胃不和 | 31 | 15.1% | 8 | 脾胃湿热 | 4 | 2.0% |
| 2 | 痰湿凝结 | 12 | 5.9% | 9 | 寒热错杂 | 3 | 1.5% |
| 3 | 瘀毒内阻 | 39 | 19.0% | 10 | 肝肾阴虚 | 2 | 1.0% |
| 4 | 胃热伤阴 | 33 | 16.1% | 11 | 寒凝血瘀 | 1 | 0.5% |
| 5 | 脾胃虚寒 | 48 | 23.4% | 12 | 心脾两虚 | 1 | 0.5% |
| 6 | 气血双亏 | 22 | 10.7% | 13 | 脾虚肝瘀 | 1 | 0.5% |
| 7 | 痰气凝滞 | 7 | 4.9% | 14 | 肾阳虚衰 | 1 | 0.5% |

在1805例胃癌中，构成比居于前4位、超过10%的依次是脾胃虚寒型、瘀毒内阻型、胃热伤阴型、肝胃不和型；低于前四型构成比的依次为气血双亏型、痰气凝滞型、痰湿凝结型；其他由7种少见、偶见和兼杂证型组合的278例，故不能作为一般证型进行比较(表2)。

表2 证型构成比

| 组号 | 证型 | 例数 | 构成比(%) |
|----|------|---------|--------|
| 1 | 肝胃不和 | 191 | 10.58 |
| 2 | 痰湿凝结 | 47 | 2.60 |
| 3 | 瘀毒内阻 | 319 | 17.67 |
| 4 | 胃热伤阴 | 277 | 15.35 |
| 5 | 脾胃虚寒 | 493 | 27.31 |
| 6 | 气血双亏 | 138 | 7.65 |
| 7 | 痰气凝滞 | 62 | 3.43 |
| 8 | 其他证型 | 173±105 | 15.40 |

3 讨论

从本结果6种常见证型的构成比的角度来看，脾胃虚寒型居首，占23.4%，瘀毒内阻型居于第2，占19.0%，第3位的是胃热伤阴，占16.1%，肝胃不和的占15.1%，居第4位。但不能据此认为胃癌中脾胃虚寒的多，而肝胃不和的较少，因为从临床实际情况看，以嗳气、泛酸、呃逆及胃脘胀痛为主诉者并不少见。肝胃不和的比率为10.58%，占第3位。因原文章中只提到共有病例数，而无法获悉每一证型具体例数的很多，因此不能完全依据以上表中构成比的大小而认为胃癌中某一证型患者多少。上述常见七种证型，相对反映出正气虚损为胃癌

发生的病理变化过程及其机制的基础，从构成比看两表中脾胃虚寒例数均居于首位，文章提到频次23.4%；例数为493例，占27.31%，在脾胃虚弱的基础上，由于饮食、情志、痰湿等致病因素的影响，导致了肝气横逆犯胃，肝胃不和、痰湿凝结、痰气凝滞、气机不畅，瘀毒内阻，久而生热，复又伤阴耗气的病理改变，这一本虚标实而复又伤正的恶性循环，形成了病情的反复迁延，病势缠绵，脾胃愈虚，气血化生不足终致气血双亏。因此本结果提示，临证治疗胃癌，在祛邪辨证治疗的基础上须注重顾护正气，必要时标本兼顾、虚实同治。此外，此7种证型的框架结构为制定新的辨证方案提供了理论基础和依据。通过以上总结来看，临床常见证型为肝胃不和型、痰湿凝结型、瘀毒内阻型、胃热伤阴型、脾胃虚寒型、气血双亏型、痰气凝滞型等。本结果与1978年全国第一届胃癌学术会议北京市胃癌协作组制定的六型分法方案大致相近，仅无痰气凝滞型，从痰气凝滞的辩证要点看最主要的症状是进食梗阻感，而临幊上贲门癌患者多数皆有此症状，而1978年全国第一届胃癌学术会议北京市胃癌协作组制定的六型分法中皆未提及此症状，表明此分型方法尚有不完善之处，有待于进一步修订。我们认为，本研究结果可作为运用循证医学的方法探讨和制定临床实用的胃癌辨证分型的标准化提供了新的框架结构和理论依据。

4 参考文献

- 孙大志,许玲,姜林娣,魏品康.中医药治疗胃癌临床研究文献质量的调查评价.中国临床医学 2003;10:833-835
- Yao JC, Shimada K, Ajani JA. Adjuvant therapy for gastric carcinoma: closing out the century. *Oncology (Huntingt)* 1999; 13:1485-1494
- 陶炼.辨证治疗晚期胃癌40例临床观察.湖南中医杂志 2002; 18:5-6
- 林一帆,周学文,王长洪,胡家露,刘杰,马福茂.胃黏膜异型增生的中医微观辨证分型与MG7抗原表达的关系及临床随访研究.中国中西医结合消化杂志 1999;9:325-327
- 章锐.胃癌中医证型与细胞增生活性及癌基因关系的研究.临床中老年保健 2001;4:159-161
- 吴水生,郑东海,林求诚.胃癌转移状态血液流变学变化与中医证型关系的临床研究.中国中西医结合杂志 2000;20:583-585
- 王安峰,刘斌,赵玉华,孙桂芝.中晚期胃癌中医辨证分型与组织病理学分型的关系及疗效观察.中国中西医结合外科杂志 2000; 6:165-166
- 陈郭君.中医辨证分型治疗胃癌.湖北中医杂志 2000;15:19
- 郭勇.190例癌症患者临床辨证分析的思考.中国中医基础医学杂志 2000;6:44-46
- 李训照.辨证治疗晚期胃癌体会.浙江中医杂志 2000;35:221
- 文明,张永国.胃癌的中医证型与病理诊断关系探讨.现代中西医结合杂志 2000;9:719
- 杨晓慧,陈焕朝.中西医结合治疗晚期胃癌临床观察.肿瘤防治研究 1999;26:426-427
- 王晓.辨证治疗晚期胃癌40例.江西中医药 1999;30:28-29
- 叶丽君.胃癌术后综合征的辨治体会.江苏中医 1998;19:42
- 黄志新,周福生,劳绍贤,黄烈平,吴惠英.经纤维胃镜诊为胃癌的179例临床资料分析.广州中医药大学学报 1998;15:47-49
- 黄兆明,程剑华,张所乐.Ⅱ、Ⅲ期胃癌手术后辨证论治加化疗远期疗效分析.江西中医药 1998;29:25-26
- 张万岱,谢国建,杨海涛,周殿元.胃癌及胃癌前病变患者中医证型与病理及Hp感染的关系.新消化病学杂志 1997;5:564-566
- 吴曙光,吴晓丽.辨治胃癌化疗后血细胞减少116例.安徽医学院学报 1996;15:14-15
- 夏跃胜,王建华,高超光.圣和散联合化疗对胃癌术后复发、转

- 移率的影响. 中国中西医结合外科杂志 1996;2:402-404
- 20 李康. 辨证治疗胃癌68例临床探析. 中医函授通讯 1995;14:48
- 21 郭森仁, 黄皓春, 陈峻伟. 胃镜象与常见上消化道疾病辨证关系初探: 附1000例病例分析. 北京中医 1994;15:22-23
- 22 郭松云. 健脾理气养阴法对24例胃癌术后免疫功能影响的观察. 上海中医药杂志 1994;10:40
- 23 李长生, 周祝谦, 于红. 胃脘痛中医辨证分型的X线征象. 山东中医学院学报 1994;18:30-32
- 24 杨健武. 胃癌的中医病机证治. 云南中医学院学报 1993;3:34-38
- 25 周家明, 韩志文. 中西医配合治疗胃癌81例小结. 实用中医药杂志 1993;1:17-18
- 26 周维顺, 吴良村, 何任. 略论胃癌的诊治原则. 浙江中医学院学报 1993;17:9-10
- 27 张军, 周宝芹, 王挺, 李戈. 中医辨证施治配合六神丸治疗70例胃癌临床观察. 实用肿瘤学杂志 1993;2:73-74
- 28 崔同建, 林求诚, 庄子长, 林欣, 方公贤, 周美秀, 陈禹略. 胃癌本虚标实证型病理学基础探讨. 中国中西医结合杂志 1992;12:151-153
- 29 朱方石. 胃癌的中医药治疗进展. 河南中医 1992;12:197-198
- 30 翟漱芬, 伍海南. 102例胃癌中医辨证分型与临床病理分型的关系探讨. 中西医结合杂志 1989;9:14-15
- 31 胡安黎. 辨证结合辨病治疗39例晚期胃癌疗效分析. 北京中医杂志 1988;5:21-22
- 32 朱云华, 何原思, 王雅和, 王黎, 姚莉, 戴华康, 夏友祥. 中虚气滞证胃癌的病理形态研究. 南京中医学院学报 1986;3:43-44
- 33 郭勇. 中医治疗胃癌的近况. 浙江中医学院学报 1986;4:54-56
- 34 全本娥, 李淑贞. 73例胃癌根治术后胃肠功能紊乱患者的饮食调护. 黑龙江中医药 2000;3:45-45
- 35 戴继红, 王庭明, 陈继斌. 中西医结合治疗胃癌30例. 四川中医 1998;16:22-23
- 36 周爱国, 姚九香, 王明义. 蚊蚣丸加味治疗胃癌13例临床观察. 四川中医 1999;17:10-12
- 37 川中医 1997;15:18
- 37 施俊, 许玲, 秦志丰, 魏品康. 仙人掌口服液治疗中晚期胃癌临床疗效观察. 成都中医药大学学报 2002;25:15-16
- 38 陈乃杰, 金源, 刘燕珠, 陈公莺. 羟基喜树碱配合中药治疗41例晚期胃癌的疗效观察. 福建医药杂志 1997;19:82
- 39 周荣耀, 吴丽英, 倪爱娣, 徐中伟. 抗炎1号静脉注射液治疗24例中晚期胃癌的临床观察. 上海中医药杂志 2000;34:15-16
- 40 徐晓燕, 石怀芝, 孙桂芝. 金龙胶囊合并中药治疗胃癌33例疗效观察. 北京中医 2001;20:61-62
- 41 钱心兰, 钱伯文, 钱力兰. 攻补兼施治疗胃癌113例. 上海中医药杂志 1996;2:7-9
- 42 齐元富, 钱伯文, 陈伟, 张永祥. 41例胃癌兼挟血瘀证的临床研究. 辽宁中医杂志 1995;22:70-71
- 43 朱昌国. 中西医结合治疗晚期胃癌27例小结. 湖南中医杂志 1995;11:6-8
- 44 袁秀英, 范忠泽, 黄秀英. 消癌平注射液治疗14例晚期胃癌的临床观察. 上海医药 1996;6:12-13
- 45 代国平, 杨艳霞. 晚期胃癌的中西医姑息疗法. 黑龙江中医药 2000;5:59
- 46 陈伟, 钱力兰. 钱氏验方加减结合化疗治疗152例胃癌的临床观察. 上海中医药杂志 1995;8:10-12
- 47 黎治平, 罗瀛. 中药治疗晚期胃癌20例临床观察. 江西中医药 1996;27:27
- 48 吴燕波, 蔡明丽, 朱旭东. 中西医结合治疗晚期胃癌5a随访观察. 南京中医药大学学报 1999;15:124
- 49 刘毅, 周洁. 中西医结合治疗晚期胃癌30例. 山东中医杂志 2002;21:164-165
- 50 周维顺, 谢长生, 吴良村, 刘鲁明, 陈培丰, 陈良良, 钱明山, 王小明. 中医中药结合动脉插管化疗治疗晚期胃癌180例临床观察. 中国实验方剂学杂志 1999;5:51-53

肝硬化大鼠肠壁肌间氮能、胆碱能神经的变化

张忠平, 张志坚, 张捷, 王雯, 林克荣, 朱金照

张忠平, 张志坚, 张捷, 王雯, 林克荣, 朱金照, 中国人民解放军第一军医大学福州临床医院, 福州总医院消化科 福建省福州市 350025
项目负责人: 张志坚, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军第一军医大学福州临床医院, 福州总医院消化科. zzp180@163.com
电话: 0591-2859371
收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-02-24

摘要

目的: 探讨肝硬化大鼠肠壁肌间神经丛氮能、胆碱能神经元及神经纤维的变化.

方法: 30只SD大鼠随机分为肝硬化组和正常组, 采用一氧化氮合酶(NOS)及乙酰胆碱酯酶(AchE)组织化学染色技术, 在铺片上观察肝硬化大鼠肠壁肌间氮能、胆碱能神经形态特征并对其分布进行定量研究.

结果: 肝硬化大鼠肠壁肌间NOS阳性神经丛排列杂乱, 染色模糊, 神经元数量减少; Ach阳性神经纤维明显变细. 模型组大鼠肠壁肌间氮能、胆碱能神经分布的密度均显著低于对照组($P < 0.05$).

结论: 肝硬化大鼠肠壁肌间氮能、胆碱能阳性神经受到损伤.

张忠平, 张志坚, 张捷, 王雯, 林克荣, 朱金照. 肝硬化大鼠肠壁肌间氮能、胆碱能神经的变化. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1459-1461
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1459.asp>

0 引言

肝硬化患者常有不同程度的食欲不振、腹胀、恶心、便秘等胃肠道症状. 国内外学者通过一系列实验证实肝硬化患者存在胃肠道动力学障碍. 本文作者通过检测肝硬化大鼠肠壁肌间神经丛神经元及神经纤维分布和变化, 初步探讨肝硬化患者胃肠动力障碍发生与胃肠道神经的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 选用SD♂大鼠, 体质量230-250 g/只. 将30只SD大鼠随机分为正常组10只和肝硬化模型组20只.
1.2 方法

- 移率的影响. 中国中西医结合外科杂志 1996;2:402-404
- 20 李康. 辨证治疗胃癌68例临床探析. 中医函授通讯 1995;14:48
- 21 郭森仁, 黄皓春, 陈峻伟. 胃镜象与常见上消化道疾病辨证关系初探: 附1000例病例分析. 北京中医 1994;15:22-23
- 22 郭松云. 健脾理气养阴法对24例胃癌术后免疫功能影响的观察. 上海中医药杂志 1994;10:40
- 23 李长生, 周祝谦, 于红. 胃脘痛中医辨证分型的X线征象. 山东中医学院学报 1994;18:30-32
- 24 杨健武. 胃癌的中医病机证治. 云南中医学院学报 1993;3:34-38
- 25 周家明, 韩志文. 中西医配合治疗胃癌81例小结. 实用中医药杂志 1993;1:17-18
- 26 周维顺, 吴良村, 何任. 略论胃癌的诊治原则. 浙江中医学院学报 1993;17:9-10
- 27 张军, 周宝芹, 王挺, 李戈. 中医辨证施治配合六神丸治疗70例胃癌临床观察. 实用肿瘤学杂志 1993;2:73-74
- 28 崔同建, 林求诚, 庄子长, 林欣, 方公贤, 周美秀, 陈禹略. 胃癌本虚标实证型病理学基础探讨. 中国中西医结合杂志 1992;12:151-153
- 29 朱方石. 胃癌的中医药治疗进展. 河南中医 1992;12:197-198
- 30 翟漱芬, 伍海南. 102例胃癌中医辨证分型与临床病理分型的关系探讨. 中西医结合杂志 1989;9:14-15
- 31 胡安黎. 辨证结合辨病治疗39例晚期胃癌疗效分析. 北京中医杂志 1988;5:21-22
- 32 朱云华, 何原思, 王雅和, 王黎, 姚莉, 戴华康, 夏友祥. 中虚气滞证胃癌的病理形态研究. 南京中医学院学报 1986;3:43-44
- 33 郭勇. 中医治疗胃癌的近况. 浙江中医学院学报 1986;4:54-56
- 34 全本娥, 李淑贞. 73例胃癌根治术后胃肠功能紊乱患者的饮食调护. 黑龙江中医药 2000;3:45-45
- 35 戴继红, 王庭明, 陈继斌. 中西医结合治疗胃癌30例. 四川中医 1998;16:22-23
- 36 周爱国, 姚九香, 王明义. 蚊蚣丸加味治疗胃癌13例临床观察. 四川中医 1999;17:10-12
- 37 川中医 1997;15:18
- 37 施俊, 许玲, 秦志丰, 魏品康. 仙人掌口服液治疗中晚期胃癌临床疗效观察. 成都中医药大学学报 2002;25:15-16
- 38 陈乃杰, 金源, 刘燕珠, 陈公莺. 羟基喜树碱配合中药治疗41例晚期胃癌的疗效观察. 福建医药杂志 1997;19:82
- 39 周荣耀, 吴丽英, 倪爱娣, 徐中伟. 抗炎1号静脉注射液治疗24例中晚期胃癌的临床观察. 上海中医药杂志 2000;34:15-16
- 40 徐晓燕, 石怀芝, 孙桂芝. 金龙胶囊合并中药治疗胃癌33例疗效观察. 北京中医 2001;20:61-62
- 41 钱心兰, 钱伯文, 钱力兰. 攻补兼施治疗胃癌113例. 上海中医药杂志 1996;2:7-9
- 42 齐元富, 钱伯文, 陈伟, 张永祥. 41例胃癌兼挟血瘀证的临床研究. 辽宁中医杂志 1995;22:70-71
- 43 朱昌国. 中西医结合治疗晚期胃癌27例小结. 湖南中医杂志 1995;11:6-8
- 44 袁秀英, 范忠泽, 黄秀英. 消癌平注射液治疗14例晚期胃癌的临床观察. 上海医药 1996;6:12-13
- 45 代国平, 杨艳霞. 晚期胃癌的中西医姑息疗法. 黑龙江中医药 2000;5:59
- 46 陈伟, 钱力兰. 钱氏验方加减结合化疗治疗152例胃癌的临床观察. 上海中医药杂志 1995;8:10-12
- 47 黎治平, 罗瀛. 中药治疗晚期胃癌20例临床观察. 江西中医药 1996;27:27
- 48 吴燕波, 蔡明丽, 朱旭东. 中西医结合治疗晚期胃癌5a随访观察. 南京中医药大学学报 1999;15:124
- 49 刘毅, 周洁. 中西医结合治疗晚期胃癌30例. 山东中医杂志 2002;21:164-165
- 50 周维顺, 谢长生, 吴良村, 刘鲁明, 陈培丰, 陈良良, 钱明山, 王小明. 中医中药结合动脉插管化疗治疗晚期胃癌180例临床观察. 中国实验方剂学杂志 1999;5:51-53

肝硬化大鼠肠壁肌间氮能、胆碱能神经的变化

张忠平, 张志坚, 张捷, 王雯, 林克荣, 朱金照

张忠平, 张志坚, 张捷, 王雯, 林克荣, 朱金照, 中国人民解放军第一军医大学福州临床医院, 福州总医院消化科 福建省福州市 350025
项目负责人: 张志坚, 350025, 福建省福州市西二环北路156号, 中国人民解放军第一军医大学福州临床医院, 福州总医院消化科. zzp180@163.com
电话: 0591-2859371
收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-02-24

摘要

目的: 探讨肝硬化大鼠肠壁肌间神经丛氮能、胆碱能神经元及神经纤维的变化.

方法: 30只SD大鼠随机分为肝硬化组和正常组, 采用一氧化氮合酶(NOS)及乙酰胆碱酯酶(AchE)组织化学染色技术, 在铺片上观察肝硬化大鼠肠壁肌间氮能、胆碱能神经形态特征并对其分布进行定量研究.

结果: 肝硬化大鼠肠壁肌间NOS阳性神经丛排列杂乱, 染色模糊, 神经元数量减少; Ach阳性神经纤维明显变细. 模型组大鼠肠壁肌间氮能、胆碱能神经分布的密度均显著低于对照组($P < 0.05$).

结论: 肝硬化大鼠肠壁肌间氮能、胆碱能阳性神经受到损伤.

张忠平, 张志坚, 张捷, 王雯, 林克荣, 朱金照. 肝硬化大鼠肠壁肌间氮能、胆碱能神经的变化. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1459-1461
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1459.asp>

0 引言

肝硬化患者常有不同程度的食欲不振、腹胀、恶心、便秘等胃肠道症状. 国内外学者通过一系列实验证实肝硬化患者存在胃肠道动力学障碍. 本文作者通过检测肝硬化大鼠肠壁肌间神经丛神经元及神经纤维分布和变化, 初步探讨肝硬化患者胃肠动力障碍发生与胃肠道神经的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 选用SD♂大鼠, 体质量230-250 g/只. 将30只SD大鼠随机分为正常组10只和肝硬化模型组20只.
1.2 方法

1.2.1 动物造模 肝硬化组大鼠给予500 mL/L 四氯化碳石蜡油溶剂皮下注射, 每次每只0.2 mL/100 g, 2次/wk, 共30次。取中叶肝脏, HE染色, 光镜下检查有无典型假小叶, 以证明肝硬化形成。

1.2.2 制作铺片 取正常组与模型组SD大鼠各10只, 每只取空肠和结肠各约10 cm, 置于40 mL/L多聚甲醛中固定2 h(4 °C)。然后取出肠管用TBS缓冲液冲洗后再置于300 g/L蔗糖溶液24 h, 将肠管剪成约1 cm长小段, 用一玻璃棒伸入肠管使其被动扩张, 然后用镊子在肠系膜附着处沿肠管纵轴划痕, 用镊尖沿划痕剥离纵肌层, 便制成肌间神经丛铺片标本, 将其置于TBS中存放。染色采用Kamovsky-Roots直接法显示肠壁肌间神经丛乙酰胆碱能(AchE)神经; NADPH- α 组化法显示氮能(NOS)神经。

1.2.3 图像分析 采用MAS-5图像分析系统。选取同一染色条件下AchE和NADP组化片, 每张切片于200倍光镜下选取5个视野, 观察肌间神经丛中阳性神经元的染色及分布情况, 将图像扫描入计算机, 通过计算机分析得到阳性表达密度。

统计学处理 数据以mean±SD表示。组间差异采用t检验。

2 结果

NADP阳性产物为蓝色沉淀。肌间神经丛主要由神经节、节间束及一些含膨体的阳性神经纤维纵横交织呈网格状分布。高倍镜下, 阳性神经形态、大小不等, 胞质呈蓝色, 核不着色, 胞体形态多样, 有卵圆形、三角形及不规则形。与对照组(图1)比较, 肝硬化组(图2)肌

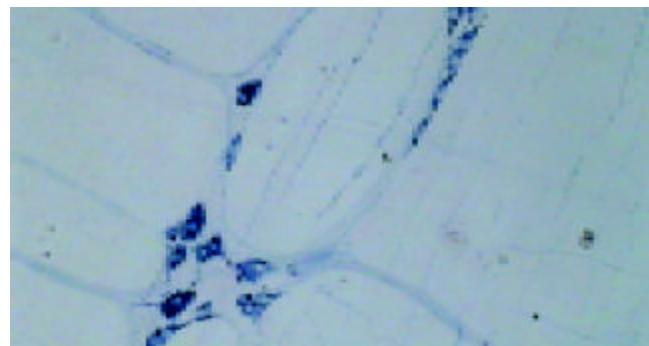


图1 对照组空肠肌间神经丛铺片NOS染色图像, 神经纤维纵横交织呈网格状胞质呈蓝色, 核不着色, $\times 200$ 。

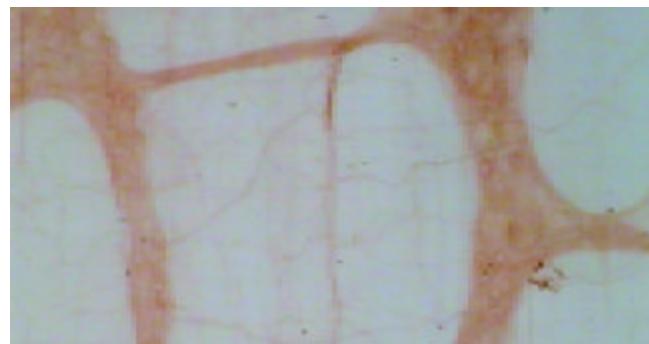


图3 对照组空肠肌间神经丛铺片AchE染色图像, $\times 200$ 。

间NOS阳性神经丛排列杂乱, 染色模糊, 神经元数量减少。AchE阳性神经丛为红棕色沉淀。神经节和神经纤维交织形成网状。与对照组(图3)比较, 肝硬化组(图4)肌间AchE阳性神经纤维明显变细。肠壁肌间神经丛AchE、NOS染色计算机图像分析结果见(表1)。

表1 肠壁肌间神经丛AchE、NOS染色结果($mean \pm SD$, $n=10$)

| 组别 | AchE | NOS |
|-------|---------------------------|--------------------------|
| 对照组空肠 | 11.34 ± 1.42 | 6.51 ± 0.70 |
| 模型组空肠 | 9.62 ± 1.25 ^a | 5.80 ± 0.47 ^b |
| 对照组结肠 | 13.18 ± 2.30 | 8.52 ± 0.64 |
| 模型组结肠 | 10.24 ± 0.97 ^a | 7.71 ± 0.79 ^b |

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 对照组。

3 讨论

国内外学者认为肝硬化患者出现一系列胃肠道症状, 其产生机制主要与以下几方面相关:(1)神经-体液因素: 自主神经; 消化道内源性神经系统; 神经递质与胃肠激素的改变。(2)炎症递质: 白介素-1、干扰素可抑制摄食中枢, 使食欲下降, 反射性引起胃肠运动减弱。(3)肠道菌群失调: 导致胃肠道黏膜病变、内毒素吸收增加、胃肠胀气、消化道出血。(4)内毒素血症: 内毒素能造成复杂的病理生理效应, 能对神经系统、消化系统等产生严重影响。(5)分泌、吸收障碍。(6)一氧化氮(NO)与一氧化氮合酶: NO重要活性之一是抑制平滑肌收缩, 从而使血管扩

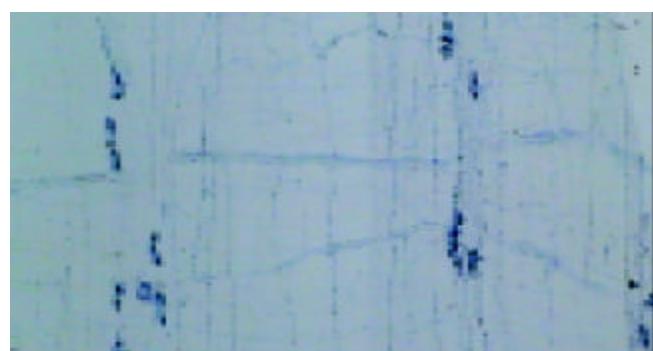


图2 模型组空肠肌间神经丛铺片NOS染色图像, 神经丛排列杂乱, 神经元数量减少, $\times 200$ 。

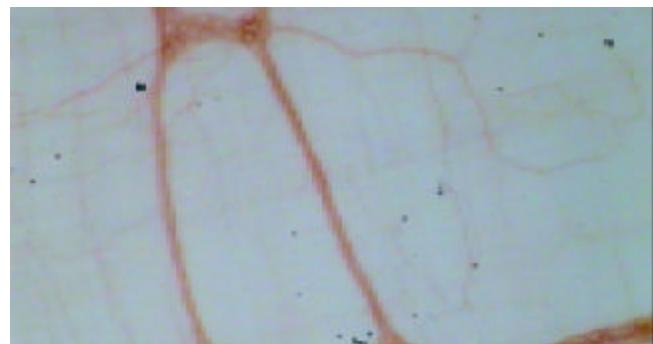


图4 模型组空肠肌间神经丛铺片AchE染色图像, 神经纤维明显变细, $\times 200$ 。

张。且有研究表明，肝衰竭大鼠近端小肠肠腔及血液内NO高于对照，并与胃肠平滑肌运动障碍显著相关^[1]。

有学者将肝硬化大鼠胃肠黏膜制成石蜡及冰冻切片，通过免疫组织化学和一氧化氮组织化学染色等方法进行研究，发现各类NOS(NOS1，神经型、NOS2，诱导型和NOS3，内皮型)在胃肠道黏膜固有层有相似的分布，主要存在于黏膜固有层间质的中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和部分淋巴细胞。另外NOS1还存在于胃肠道壁内肌间神经丛，NOS2存在于黏膜下层血管内皮细胞。肝硬化大鼠胃肠道各段NOS阳性细胞数均明显减少^[2]。

普通切片制作方法只能从某一断面了解肌间神经丛细胞数量的多少，而运用铺片的制作方法却可以显示整个肠道肌间神经丛细胞的数量、形态及神经纤维结构。本文作者将肝硬化大鼠肠壁纵形平滑肌剥离制成铺片，进行NOS和AchE组织化学染色，并将铺片进行计算机图像分析。结果发现肝硬化大鼠肌间神经丛阳性神经元与对照组比较，均出现结构和染色强度的异常。图像分析发现模型组空肠及结肠肌间神经丛一氧化氮合酶、乙酰胆碱酯酶活性均下降，反映所对应神经元功

能受影响。乙酰胆碱是胃肠副交感神经的主要递质，对胃肠道的运动、排空有重要作用。现在发现一氧化氮是广泛存在于人体内的生物递质，对抑制平滑肌收缩，扩张血管、胃肠道平滑肌的正常活动起调节作用^[3-4]。本组实验发现二者在肝硬化胃肠道肌间神经丛的异常，为肝硬化患者出现消化道症状可能与胃肠神经系统受损有关提供了一定的实验证据。

4 参考文献

- Wang X, Zhong YX, Zhang ZY, Lu J, Lan M, Miao JY, Guo XG, Shi YQ, Zhao YQ, Ding J, Wu KC, Pan BR, Fan DM. Effect of L-NAME on nitric oxide and gastrointestinal motility alterations in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:328-332
- 王新, 闻勤生, 黄裕新. L-NAME 对肝硬化大鼠胃肠道中一氧化氮合酶亚型表达的影响. 第四军医大学学报 2001;22:817-820
- Xu L, Carter EP, Ohara M, Martin PY, Rogachev B, Morris K, Cadnapaphornchai M, Knotek M, Schrier RW. Neuronal nitric oxide synthase and systemic vasodilation in rats with cirrhosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F1110-1115
- Yoneda S, Kadokawa M, Kuramoto H, Fukui H, Takaki M. Enhanced colonic peristalsis by impairment of nitroergic enteric neurons in spontaneously diabetic rats. *Auton Neurosci* 2001;92:65-71

BAT-26 预测散发性大肠癌的复制错误

邱福铭, 宋永茂, 黄建, 郑树

邱福铭, 宋永茂, 黄建, 郑树, 浙江大学医学院附属第二医院肿瘤科
浙江省杭州市 310009
国家自然科学基金资助项目, No. 39600055
浙江省教育厅资助项目, No. 20000371
项目负责人: 黄建, 310009, 浙江省杭州市解放路 88 号, 浙江大学医学院附
属第二医院肿瘤科. hrys@zju.edu.cn
电话: 0571-87784556 传真: 0571-87784556
收稿日期: 2004-03-18 接受日期: 2004-04-05

摘要

目的: 微卫星不稳定(microsatellite instability MSI)是DNA复制错误(replication error RER⁺)的标记, BAT-26系位于错配修复基因hMSH2中的单腺苷酸重复序列位点, 曾被报道无需正常对照就可用于预测散发性大肠癌RER状况, 我们选择BAT-26并与其它双核苷酸重复序列位点进行比较加以验证与评价。

方法: 经病理确诊的散发性大肠癌肿瘤组织60例, 常规抽提DNA, 采用PCR-银染法分析6个(CA)n双碱基重复微卫星序列和BAT-26位点, 并用自动荧光DNA序列分析法检测BAT-26; 同时以PCR-SSCP法检测RER⁺病例hMSH2基因5, 7, 8, 12, 13, 15外显子突变; RER⁺判断

依6个(CA)n位点中出现2个或以上MSI为标准。

结果: RER⁺散发性大肠癌占18%(11/60), 6例RER⁺肿瘤检出hMSH2基因突变。含hMSH2基因突变的6例RER⁺病例中有3例BAT-26不稳定(BAT-26⁺), 44例RER⁻散发性大肠癌均为BAT-26⁻。与(CA)n位点结果比较, BAT-26预测RER的阳性符合率为50%, 阴性符合率为100%, BAT-26⁺在预测散发性大肠癌RER⁺特异性为100%, 敏感性为50%。PCR-银染和自动荧光DNA序列分析两种方法检测BAT-26 MSI结果一致。

结论: 单用BAT-26作为预测RER状况的指标尚有缺陷, 需结合其他微卫星位点进行综合分析。

邱福铭, 宋永茂, 黄建, 郑树. BAT-26 预测散发性大肠癌的复制错误. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1461-1463

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1461.asp>

0 引言

微卫星不稳定(MSI)可表现为RER⁺, 约90%以上遗传

张。且有研究表明，肝衰竭大鼠近端小肠肠腔及血液内NO高于对照，并与胃肠平滑肌运动障碍显著相关^[1]。

有学者将肝硬化大鼠胃肠黏膜制成石蜡及冰冻切片，通过免疫组织化学和一氧化氮组织化学染色等方法进行研究，发现各类NOS(NOS1，神经型、NOS2，诱导型和NOS3，内皮型)在胃肠道黏膜固有层有相似的分布，主要存在于黏膜固有层间质的中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞和部分淋巴细胞。另外NOS1还存在于胃肠道壁内肌间神经丛，NOS2存在于黏膜下层血管内皮细胞。肝硬化大鼠胃肠道各段NOS阳性细胞数均明显减少^[2]。

普通切片制作方法只能从某一断面了解肌间神经丛细胞数量的多少，而运用铺片的制作方法却可以显示整个肠道肌间神经丛细胞的数量、形态及神经纤维结构。本文作者将肝硬化大鼠肠壁纵形平滑肌剥离制成铺片，进行NOS和AchE组织化学染色，并将铺片进行计算机图像分析。结果发现肝硬化大鼠肌间神经丛阳性神经元与对照组比较，均出现结构和染色强度的异常。图像分析发现模型组空肠及结肠肌间神经丛一氧化氮合酶、乙酰胆碱酯酶活性均下降，反映所对应神经元功

能受影响。乙酰胆碱是胃肠副交感神经的主要递质，对胃肠道的运动、排空有重要作用。现在发现一氧化氮是广泛存在于人体内的生物递质，对抑制平滑肌收缩，扩张血管、胃肠道平滑肌的正常活动起调节作用^[3-4]。本组实验发现二者在肝硬化胃肠道肌间神经丛的异常，为肝硬化患者出现消化道症状可能与胃肠神经系统受损有关提供了一定的实验证据。

4 参考文献

- Wang X, Zhong YX, Zhang ZY, Lu J, Lan M, Miao JY, Guo XG, Shi YQ, Zhao YQ, Ding J, Wu KC, Pan BR, Fan DM. Effect of L-NAME on nitric oxide and gastrointestinal motility alterations in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:328-332
- 王新, 闻勤生, 黄裕新. L-NAME 对肝硬化大鼠胃肠道中一氧化氮合酶亚型表达的影响. 第四军医大学学报 2001;22:817-820
- Xu L, Carter EP, Ohara M, Martin PY, Rogachev B, Morris K, Cadnapaphornchai M, Knotek M, Schrier RW. Neuronal nitric oxide synthase and systemic vasodilation in rats with cirrhosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279:F1110-1115
- Yoneda S, Kadokawa M, Kuramoto H, Fukui H, Takaki M. Enhanced colonic peristalsis by impairment of nitroergic enteric neurons in spontaneously diabetic rats. *Auton Neurosci* 2001;92:65-71

BAT-26 预测散发性大肠癌的复制错误

邱福铭, 宋永茂, 黄建, 郑树

邱福铭, 宋永茂, 黄建, 郑树, 浙江大学医学院附属第二医院肿瘤科
浙江省杭州市 310009
国家自然科学基金资助项目, No. 39600055
浙江省教育厅资助项目, No. 20000371
项目负责人: 黄建, 310009, 浙江省杭州市解放路 88 号, 浙江大学医学院附
属第二医院肿瘤科. hrys@zju.edu.cn
电话: 0571-87784556 传真: 0571-87784556
收稿日期: 2004-03-18 接受日期: 2004-04-05

摘要

目的: 微卫星不稳定(microsatellite instability MSI)是DNA复制错误(replication error RER⁺)的标记, BAT-26系位于错配修复基因hMSH2中的单腺苷酸重复序列位点, 曾被报道无需正常对照就可用于预测散发性大肠癌RER状况, 我们选择BAT-26并与其它双核苷酸重复序列位点进行比较加以验证与评价。

方法: 经病理确诊的散发性大肠癌肿瘤组织60例, 常规抽提DNA, 采用PCR-银染法分析6个(CA)n双碱基重复微卫星序列和BAT-26位点, 并用自动荧光DNA序列分析法检测BAT-26; 同时以PCR-SSCP法检测RER⁺病例hMSH2基因5, 7, 8, 12, 13, 15外显子突变; RER⁺判断

依6个(CA)n位点中出现2个或以上MSI为标准。

结果: RER⁺散发性大肠癌占18%(11/60), 6例RER⁺肿瘤检出hMSH2基因突变。含hMSH2基因突变的6例RER⁺病例中有3例BAT-26不稳定(BAT-26⁺), 44例RER⁻散发性大肠癌均为BAT-26⁻。与(CA)n位点结果比较, BAT-26预测RER的阳性符合率为50%, 阴性符合率为100%, BAT-26⁺在预测散发性大肠癌RER⁺特异性为100%, 敏感性为50%。PCR-银染和自动荧光DNA序列分析两种方法检测BAT-26 MSI结果一致。

结论: 单用BAT-26作为预测RER状况的指标尚有缺陷, 需结合其他微卫星位点进行综合分析。

邱福铭, 宋永茂, 黄建, 郑树. BAT-26 预测散发性大肠癌的复制错误. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1461-1463

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1461.asp>

0 引言

微卫星不稳定(MSI)可表现为RER⁺, 约90%以上遗传

性非息肉性大肠癌(Hereditary non-polyposis colorectal cancer HNPCC)和约10-15%散发性大肠癌中存在RER⁺^[1]。BAT-26是位于错配修复基因hMSH2第5内含子内的26个腺苷酸重复序列，具有准单态性，有研究表明绝大部分RER⁺原发性大肠癌表现为BAT-26^{+[2]}，我们选择BAT-26并与其它双核苷酸重复序列位点进行比较加以验证与评价。

1 材料和方法

1.1 材料 1996/1997年浙江大学医学院附属第二医院肿瘤科收治的经病理确诊的散发性大肠癌患者60例。由于部分样本DNA用尽，对其中50例样本包括6例RER⁺标本分别用PCR-银染法、自动荧光DNA序列分析法检测BAT-26位点。

1.2 方法 新鲜肿瘤组织和相应正常组织采用酚/氯仿抽提法抽提DNA。PCR-银染法分析6个(CA)_n双碱基重复微卫星序列D2S119, D13S160, D8S282, D3S1293, D2S123, D18S58，各位点引物和反应条件参见文献[3]，如肿瘤组织相对于正常组织出现额外的条带、等位条带产生迁移率的改变就定义为MSI，在6个位点中出现2个或以上MSI即确定为RER⁺。PCR-SSCP检测hMSH2基因外显子5, 7, 8, 12, 13, 15突变，PCR反应体系和PCR反应参数见文献[4]。BAT-26位点PCR引物和反应条件见文献[2]，PCR产物先采用常规的PCR-银染法检测确定MSI，再用全自动测序仪(ABI 3777 DNA Sequencer)分析：TAMARA标记引物，基因扫描分析软件genescan分析，若肿瘤组织出现相应正常组织没有的峰即可确定为MSI。

2 结果

2.1 散发性大肠癌RER状况和hMSH2突变 散发性大肠癌60例，采用6个双核苷酸重复序列(CA)_n位点，检出11例RER⁺病例，阳性率为18%。其中6例RER⁺病例均发现有hMSH2第5外显子突变，其他外显子未检测到突变。

2.2 BAT-26不稳定性 分别采用PCR-银染法和自动荧光全自动测序仪分析50例(6例RER⁺和44例RER⁻)散发性大肠癌BAT-26，均发现仅在相同的3例病例出现BAT-26⁺，且均为RER⁺病例，其余的44例均为BAT-26⁻。图1仅第6号肿瘤出现异常条带(箭头所指)，第6号肿瘤样本自动荧光DNA序列仪分析目的片段长度(113 bp)比正常组织(121.0 bp)缩短了8 bp(图2)。

2.3 散发性大肠癌RER状况 6个(CA)_n双碱基重复微卫星序列和BAT-26对RER⁺状况预测的阳性率(RER⁺病例中各微卫星位点MSI+的比例)和假阳性率(RER⁻病例中各微卫星位点MSI+的比例)进行比较(表1)，阳性率超过50%的微卫星位点有D3S1293, D3S1293, BAT-26，假阳性率为零的微卫星位点有D13S160, D18S58, BAT-26。在有hMSH2基因突变的RER⁺散发性大肠癌仅

有3例BAT-26不稳定(表2)。与(CA)_n位点结果比较，BAT-26预测RER状况的阳性符合率为50%，阴性符合率为100%，BAT-26⁺在预测散发性大肠癌RER⁺特异性为100%，敏感性为50%。

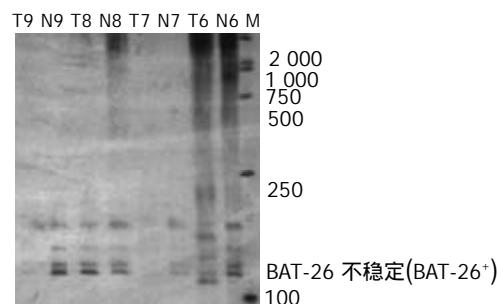
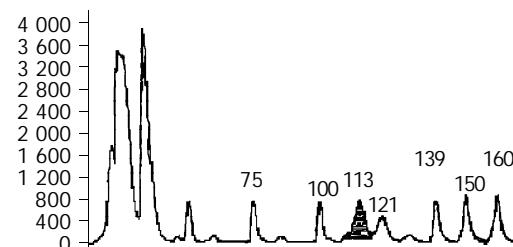


图1 散发性大肠癌BAT-26位点PCR-银染法检测结果：箭头所指第6号肿瘤组织标本BAT-26⁺条带，余均为正常条带。M: DNA标记物；N: 相应正常组织；T: 散发性大肠癌组织。

A



B

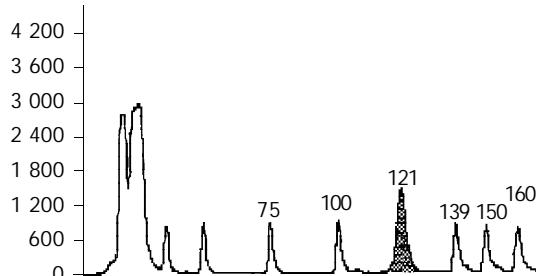


图2 6号标本BAT-26 MSI的基因扫描结果。A: 图为肿瘤组织和；B: 图为相应正常组织，横坐标为片段长度，纵坐标为荧光强度，箭头所指为缩短BAT-26片段。

表1 7个不同微卫星位点阳性率预测散发性大肠癌RER状况比较

| | D2S119 | D13S160 | D8S282 | D3S1293 | D2S123 | D18S58 | BAT26 |
|-------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|----------|---------|
| 阳性率% | 5/11(45) | 4/11(36) | 3/11(27) | 7/11(64) | 6/11(55) | 5/11(45) | 3/6(50) |
| 假阳性率% | 3/49(6.1) | 0/49(0) | 4/49(8.2) | 2/49(4.1) | 1/49(2.0) | 0/49(0) | 0/44(0) |

表2 含hMSH2基因突变的RER⁺散发性大肠癌中BAT-26 MSI状况

| NO. | 基因突变 | BAT-26 |
|-----|------|--------|
| 5 | + | - |
| 6 | + | + |
| 17 | + | - |
| 28 | + | + |
| 29 | + | - |
| 48 | + | + |

3 讨论

大肠癌错配修复途径主要涉及绝大部分遗传性肿瘤和少部分散发性肿瘤，错配修复缺陷即RER⁺大肠癌具有不同于RER⁻肿瘤的诸多临床病理特点，确定大肠癌RER状况对治疗选择和预后判断有一定指导作用。BAT-26具有准单态性，一般在正常细胞内其碱基长度变化不超过2个碱基。在HNPCC相关大肠癌中，Loukola et al^[5]报告BAT-26预测大肠癌的RER阳性率为55%(27/49)；Stone et al^[6]比较单和双核苷酸重复序列位点预测RER状况，发现BAT-25、BAT-26敏感性更高；Hoang et al^[2]研究显示高达97%的RER⁺大肠癌表现为BAT-26⁺(片段大小缩短>2 bp)，提出BAT-26可单独作为预测RER状况的检测指标，不需设正常对照。然而，日本的一项研究发现8例RER⁺大肠癌仅有4例出现BAT-26位点单个碱基的改变，提示单独应用BAT-26预测RER⁺存在缺陷，认为需结合其他微卫星位点进行准确检测^[7]。迄今，有关国人的相关研究尚为数不多，为此我们选择BAT-26并与其他双核苷酸重复序列位点进行比较加以验证与评价。

我们选择了6个(CA)_n双碱基重复微卫星序列D2S119、D13S160、D8S282、D3S1293、D2S123、D18S58测定散发性大肠癌RER状况，有11例大肠癌呈RER⁺，其中6例标本发现有hMSH2基因突变。同时，PCR-SSCP银染和自动荧光DNA序列仪对上述6例标本分析BAT-26位点，均证实相同3例病例为BAT-26⁺，其余无一表现为BAT-26⁺。由于错配修复基因突变是MSI的分子基础，如果将hMSH2基因突变作为RER状况的金标准，BAT-26预测的特异性虽为100%，但敏感性仅有50%，所选的(CA)_n微卫星位点如D13S160、D18S58也有类似的特异性和敏感性；与(CA)_n位点结果比较，BAT-26预测RER状况的阳性符合率为50%，阴性符合率为100%，因此BAT-26单独预测散发性大肠癌RER状况，由于其敏感性较低，可在一定程度上造成RER⁺病例的遗漏，故仍需结合其他位点进行检测来提高准确性。目前国际上推荐五个微卫星位点也就是Bethesda微卫星标记(BAT-25, BAT-26, D5S346, D2S123,

和D17S250)进行检测^[8]。

在BAT-26的MSI检测方面，两种方法检测结果完全符合。但自动荧光DNA序列仪分析法与PCR-SSCP银染法相比较，具有明显的特点：能准确、定量和比较客观地反映MSI，能达到测定单个碱基改变的精确度^[9]；利用不同荧光标记，两个样本可在同一泳道上同时进行电泳，从而避免了不同泳道间细微差异可能造成的误差；此外，如果选用更多的荧光标记，在同一泳道上最多可同时进行3对样本电泳，极大地提高了检测效率。因此，自动荧光DNA序列分析法为准确、快速、高通量检测MSI的有效方法。

4 参考文献

- 1 房殿春, 周晓东. 胃肠道肿瘤微卫星DNA不稳定性研究进展. 华人消化杂志 1998;6(7特刊):66-68
- 2 Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R. BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997; 57: 300-303
- 3 Huang J, Papadopoulos N, McKinley AJ, Farrington SM, Curtis LJ, Wyllie AH, Zheng S, Willson JK, Markowitz SD, Morin P, Kinzler KW, Vogelstein B, Dunlop MG. APC mutation in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9049-9054
- 4 熊斌, 郑树, 蔡心涵. 散发性大肠癌微卫星不稳定及hMSH2基因突变研究. 中华实验外科杂志 1999;16:206-207
- 5 Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, Mecklin JP, Launonen V, Aaltonen LA. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001;61:4545-4549
- 6 Stone JG, Tomlinson IP, Houlston RS. Optimising methods for determining RER status in colorectal cancers. *Cancer Lett* 2000;149:15-20
- 7 Morifuji M, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Sueda T, Yokoyama T. Fluorescent-based BAT-26 analysis for distinct screening of microsatellite instability in colorectal cancers. *Int J Oncol* 2003;22:807-813
- 8 Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-5257
- 9 Toh Y, Oki E, Oda S, Tomoda M, Tomisaki S, Ichiyoshi Y, Ohno S, Sugimachi K. An integrated microsatellite length analysis using an automated fluorescent DNA sequencer. *Cancer Res* 1996;56:2688-2691

• 研究快报 •

实时荧光定量 PCR 检测血清中 HCV-RNA

张淑云, 刘伟, 谷鸿喜, 杜博, 常曼丽

张淑云, 刘伟, 杜博, 常曼丽, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心 黑龙江省哈尔滨市 150086
谷鸿喜, 哈尔滨医科大学微生物学教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086
项目负责人: 张淑云, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路247号, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心。dongguanglu@0451.com
电话: 0451-86605743
收稿日期: 2004-03-05 接受日期: 2004-03-16

摘要

目的: 通过实时荧光定量PCR(FQ-PCR)与逆转录PCR(RT-PCR)两种方法检测血清HCV-RNA的结果比较, 评价FQ-PCR法的临床应用价值。

方法: 样本为经ELISA法筛选抗HCV阳性血清401份, 其中221份采用实时荧光定量PCR法检测, 180份采用RT-PCR法检测。

结果: FQ-PCR法检测HCV-RNA, 阳性率($\geq 10^2$ 拷贝/mL)68.3% (151/221), 定量范围在 $10^2\text{--}10^7$ 拷贝/mL之间, 但 $\leq 10^6$ 拷贝/ml占98.1%(148/151); RT-PCR法检测阳性率为30%(54/180)。

结论: FQ-PCR检测HCV-RNA较RT-PCR是一种省时、简便、敏感、特异和防污染的体外基因扩增与定量检测方法, 其结果对临床诊断和疗效观察有重要的指导意义。

张淑云, 刘伟, 谷鸿喜, 杜博, 常曼丽. 实时荧光定量PCR检测血清中HCV-RNA. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1464-1465
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1464.asp>

0 引言

实时荧光定量PCR(FQ-PCR)技术是近几年发展起来的一种核酸定量检测技术。FQ-PCR以其快速简便、定量和防污染等优点很快被临床应用^[1], 但其检测结果的临床应用价值尚需进一步认识。为了探讨其在检测丙型肝炎病毒核酸(HCV-RNA)中的意义, 我们对180例采用逆转录PCR(RT-PCR)和221例采用FQ-PCR进行HCV-RNA检测的结果进行了分析和比较, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 1999-12/2003-05来我院门诊就诊, 并经ELISA法筛选抗-HCV阳性的患者的血清401份; RT-PCR法是使用北京人民医院肝病研究所提供的HCV RNA检测试剂盒和美国PE公司基因扩增仪(PE480); FQ-PCR是采用深圳匹基生物工程股份有限公司HCV RNA荧光定量检测试剂盒(一步法)和罗氏公司荧光定量PCR仪。
1.2 方法 按就诊时间分两组, 前180份标本采用了

RT-PCR法检测, 后221份采用的是FQ-PCR法检测。实验操作和结果分析均严格按说明书进行。

统计学处理 采用SPSS10.0系统分析软件进行数据处理, 两组率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果 RT-PCR 扩增产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳, 于180 bp处出现特异性核酸条带为HCV RNA阳性(图1)。

2.2 FQ-PCR 结果

2.2.1 FQ-PCR 阳性标准曲线 HCV 定量阳性标准品(HCV-RNA质粒)经FQ-PCR测定, 以起始浓度的对数值为横坐标, 以PCR扩增的循环数(CT)为纵坐标, 可以得到一条直线型标准曲线(图2), 相关系数 $r=-0.998$, 斜率为-3.558。

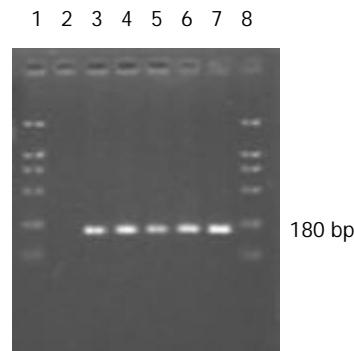


图1 RT-PCR扩增HCV RNA电泳。1, 8为MpUC19DNA/MspI相对分子质量标准; 2为阴性对照; 3, 4, 5, 6为阳性标本。

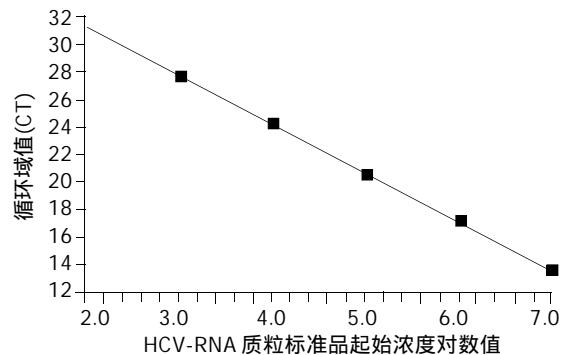


图2 HCV-RNA的FQ-PCR定量标准曲线。

2.2.2 HCV-RNA的定量及其范围 FQ-PCR法检测221份血清, HCV-RNA $\geq 10^2$ 拷贝/mL占68.3%(151/221), 定量范围在 $10^2\text{--}10^7$ 拷贝/mL之间; 阳性分布主要在 10^6 拷贝/mL及其以下, 占98.1%(148/151)(表1)。

2.2.3 FQ-PCR与RT-PCR结果比较 FQ-PCR法检测

血清中HCV-RNA阳性率为68.3%，而常规RT-PCR法阳性率为30%，二者差异显著($\chi^2=58.3$, P <0.01, 表2); FQ-PCR法操作时间(3-4 h)短于RT-PCR法(5-6 h)。

表1 FQ-PCR法检测221份血清中HCV-RNA的含量分布

| HCV-RNA的含量 | n | 百分率(%) |
|-------------------|-----|--------|
| <10 ² | 70 | 31.7 |
| 10 ² - | 21 | 9.5 |
| 10 ³ - | 37 | 16.7 |
| 10 ⁴ - | 26 | 11.8 |
| 10 ⁵ - | 40 | 18.1 |
| 10 ⁶ - | 24 | 10.8 |
| 10 ⁷ - | 3 | 1.4 |
| 合计 | 221 | 100 |

表2 两种不同方法检测血清中HCV-RNA结果比较

| 方法 | n | 阳性份数 | 阳性率(%) |
|--------|-----|------|--------|
| FQ-PCR | 221 | 151 | 68.3 |
| RT-PCR | 180 | 54 | 30 |

$\chi^2=58.3$, P <0.01.

3 讨论

目前抗HCV仍然是临床诊断HCV感染的主要手段，但存在多方面的局限性^[2-3]。常规RT-PCR及其他许多PCR法虽能反映体内病毒存在，也提高了HCV检测的灵敏度和特异性，但不能准确定量及动态观察病毒水平的变化，并有PCR产物污染的可能^[4-6]。

FQ-PCR技术是在PCR过程中引入了特异性荧光探针杂交和光学检测技术，不仅提高了PCR扩增的特异性和检测的灵敏度，而且通过荧光共振能量迁移(FRET)原理、循环域值(CT值)的设定和CT-浓度标准曲线，实现了PCR起始模板的准确定量和在线监测PCR全过程。

本研究用FQ-PCR法检测了血清中HCV-RNA的含量，定量可低至10²和高达10⁷拷贝/mL，阳性率68.3%，显著高于RT-PCR法(30%)，与文献[7-8]报道基本一致，反映了该方法可定量和敏感的特点。测定的HCV-RNA水平98.1%在10⁶拷贝/mL或以下，与乙肝病毒(HBV)在体内的高含量(10⁶-10⁸拷贝/mL)相比相对较低^[9]，进一

步证实了文献报道的HCV在体内的复制水平相对较低的特点^[10-11]。

本检测和程刚 et al^[3]的报道均显示FQ-PCR法检测HCV-RNA的定量范围较宽，HCV-RNA:10²-10⁷拷贝/mL，因而在用药前后及用药过程中采集多份标本进行检测，即动态观察HCV-RNA水平的变化，可以很好地反映药物的疗效。

另外，在FQ-PCR操作中，只需一次加样即可完成HCV-RNA的逆转录、扩增和定量，一次检测只需3-4 h，与RT-PCR相比，具有方便、省时、快捷，有效解决PCR污染问题和自动化程度高等特点。

总之，FQ-PCR法检测HCV-RNA较RT-PCR法敏感，且能定量，能动态观察HCV-RNA水平的变化，可为了解丙型肝炎病毒体内复制情况及诊断、选择治疗方案和评估药物疗效等提供较可靠的依据。但FQ-PCR法也存在所需仪器昂贵、检测费用高等缺点，有待进一步改进。

4 参考文献

- 卢圣栋. 生物技术与疾病诊断 - 兼论人类基因治疗. 第1版. 北京: 化学工业出版社, 2002:88-98
- 赵继义, 刘雪梅, 郭薇媛, 高磊, 钟照华, 谷鸿喜. RT套式PCR检测血浆HCV RNA及与抗HCV检测的比较. 微生物学杂志 2001;21:37-38
- 程刚, 何蕴韶, 周新宇, 李虎. 丙型肝炎病毒(HCV)荧光PCR(F-PCR)试剂盒的研制及与免疫学方法的比较. 中国免疫学杂志 2002;18:464-468
- 宋燕斌, 崔晓红, 潘卫, 王锦红, 戚中田. RT-PCR检测HCV RNA假阳性结果分析. 第二军医大学学报 1996;17:391-392
- 汤伟, 杜绍财, 陶其敏, 朱凌. 抗污染RT-PCR检测HCV RNA的研究. 新消化病学杂志 1997;5:638-639
- 杨才生, 卢桥生. 血清HCV RNA定量检测方法的研究进展. 国外医学病毒学分册 1998;5:57-59
- 李伯安, 马洪滨, 薛净, 乔小红, 程云. 定量聚合酶链反应在检测丙型肝炎病毒感染血清中的应用. 中华传染病杂志 1998;16:35-36
- 潘宁, 张建琼, 李丽, 单祥年. 应用荧光定量PCR检测血清中HCV RNA. 东南大学学报(医学版) 2003;22:16-18
- 张淑云, 杜博, 刘伟, 范业君, 谷鸿喜. 实时荧光定量PCR检测HBV-DNA临床意义的研究. 中华临床医药 2002;3:9-11
- Mayerat C, Burgisser P, Lavanchy D, Mantegani A, Frei PC. Comparison of a competitive combined reverse transcription-PCR assay with a branched-DNA assay for hepatitis C virus RNA quantitation. *J Clin Microbiol* 1996;34:2702-2706
- Gerken G, Rothhaar T, Rumi MG, Soffredini R, Trippler M, Blunk MJ, Butcher A, Soviero S, Colucci G. Performance of the COBAS AMPLICOR HCV MONITOR test, version 2.0, an automated reverse transcription-PCR quantitative system for hepatitis C virus load determination. *J Clin Microbiol* 2000;38:2210-2214

• 研究快报 •

核转录因子 Sp1 在手术创伤后腹膜组织中的表达和意义

张安平, 张连阳, 向德兵

张安平, 张连阳, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科 重庆市 400042
 向德兵, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科 重庆市 400042
 项目负责人: 张安平, 400042, 重庆市大坪长江支路 10 号, 中国人民解放军第三军医大学大坪医院野战外科研究所普通外科. anping_zhang@163.com
 电话: 023-68757248
 收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-03-02

摘要

目的: 探讨人核转录因子Sp1在手术创伤后腹膜组织中的活性改变与腹膜粘连形成之间的关系.

方法: 采用凝胶电泳迁移率改变分析法(EMSA)检测手术创伤后不同时间的人腹膜组织核转录因子Sp1表达水平. Masson染色观察腹膜组织中胶原纤维的变化.

结果: 手术创伤后 30 min 核转录因子 Sp1 被活化, 随着手术时间延长, Sp1 在创伤腹膜组织中的表达水平逐渐升高, 存在差异显著性($P < 0.01$). 随手术时间的延长腹膜组织中胶原纤维增加.

结论: 核转录因子Sp1的活化对于腹膜粘连形成具有一定的作用.

张安平, 张连阳, 向德兵. 核转录因子 Sp1 在手术创伤后腹膜组织中的表达和意义. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1466-1468

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1466.asp>

0 引言

自 1853 年 Virchow 报道腹膜粘连以来, 问题非但未得到解决, 相反随择期手术的增多而日益严重. 腹膜粘连形成是腹部外科手术常见的并发症之一. 常可导致严重并发症, 包括肠梗阻、不孕和疼痛等; 并增加术中并发症和再次手术的难度. 其腹膜粘连形成的分子机制尚不清楚. 核转录因子 Sp1 启动胶原的合成和表达, 在纤维化过程中起重要作用. 我们采用凝胶电泳迁移率改变分析法(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)测定手术创伤后不同时间的人腹膜组织中 Sp1 的表达及水平, 为特异性调控 Sp1 而抑制腹膜粘连形成找到一定的理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 以我科 40 例直肠癌手术患者为对象, 根据不同的分组获取腹膜组织. 开腹后立即自切口左侧 2.0 cm 处锐性切取腹膜组织为正常腹膜组. 手术后分别于 30 min、1、2、3、4 h, 自切口右侧 2.0 cm 处锐性切取腹膜组织为创伤腹膜组. 切除腹膜组织面积大小为 1.5 cm ×

1.5 cm. 获取组织立即液氮保存备用.

1.2 方法

1.2.1 腹膜组织核蛋白的提取和 Sp1 探针的标记 参照 NE-PER™ 核蛋白抽提试剂盒(美国 PIERCE 公司)提供的方法提取各组腹膜组织中的核蛋白, 以 Bradford 法测定核蛋白浓度后分装于 -70 °C 保存备用. 参照 Sp1NUSHIFT 检测试剂盒(加拿大 GENEKA 公司)标记 Sp1 双链寡核苷酸探针, 在 T₄ 多核苷酸激酶作用下, 以 [γ -³²P]ATP 标记其 5' 端, 经 MicroSpin™ G25 分离柱纯化后, 测定探针放射活性.

1.2.2 腹膜组织核转录因子 Sp1 的 DNA 结合活性及特异性检测 参照 Sp1NUSHIFT 检测试剂盒(加拿大 GENEKA 公司), 将下列试剂加入 0.5 mL 的 Eppendorf 管内: DNA 结合缓冲液 4 μ L; 核蛋白提取物 10 μ g; 4 °C 孵育 20 min, 加入已标记寡核苷酸双链探针 1 μ L; 4 °C 继续孵育 20 min, 加入 4 μ L 加样缓冲液, 混匀, 加样. 并进行 Sp1 的特异性竞争抑制实验, 设两组特异性对照检测, 一组加入 50 倍未标记的特异寡核苷酸探针, 另一组加入 50 倍未标记的变异寡核苷酸探针. 在 60 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳 2 h、180 V, 干胶, 放射自显影. 应用 Bandscan 分析软件对电泳条带进行灰度测定, 计算平均光密度(A), 以各条带的 A 值表示核转录因子的活性.

1.2.3 腹膜组织的 Masson 染色 腹膜组织石蜡切片常规脱蜡入水, 用天青石溶液染细胞核 20 min 后水洗, Masson 红染液 10 min 后水洗, 10 mL 醋酸水溶液 1 min, 5 g/L 亮绿, 镜下观察至变绿后快速脱水透明封片.

统计学处理 实验数据均以 mean±SD 表示, SPSS10.0 软件 t 检验.

2 结果

2.1 各组腹膜组织中 Sp1 活性变化 创伤腹膜组的核转录因子 Sp1 活性均明显高于正常腹膜组($P < 0.01$). 随手术创伤时间的延长其活性逐渐升高. 提示手术创伤时间越长, Sp1 激活越明显(表 1, 图 1).

2.2 Sp1 抑制性竞争实验 结果见(图 2), 第 3 泳道采用 50 倍未标记的特异寡核苷酸显示完全被抑制, 条带消失. 第 4 泳道采用 50 倍未标记的变异寡核苷酸显示不被抑制. 与第 1、2 泳道相比, 显示出结合的特异性.

2.3 腹膜组织的胶原纤维变化 随着手术创伤时间的延长, 转录因子 Sp1 被活化, 腹膜组织中的胶原层增厚, 胶原纤维增生, 纤维细胞粗大、排列紊乱, 这种表现在手术后 30 min 则可观察到(图 3: A-D).

表1 腹膜组织Sp1活性变化(mean±SD)

| 组别 | n | 0 h | 30 min | 1 h | 2 h | 3 h | 4 h |
|-------|----|------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 正常腹膜组 | 40 | 31.2 ± 8.3 | | | | | |
| 创伤腹膜组 | 40 | | 61.2 ± 11.6 | 88.4 ± 15.8 | 104.6 ± 15.3 | 122.4 ± 27.1 | 134.6 ± 18.4 |

P <0.01 vs 正常腹膜组.



图1 腹膜组织的Sp1活性(EMSA). 1: 正常腹膜组; 2、3、4、5、6: 创伤腹膜组: 分别为30 min、1、2、3、4 h.

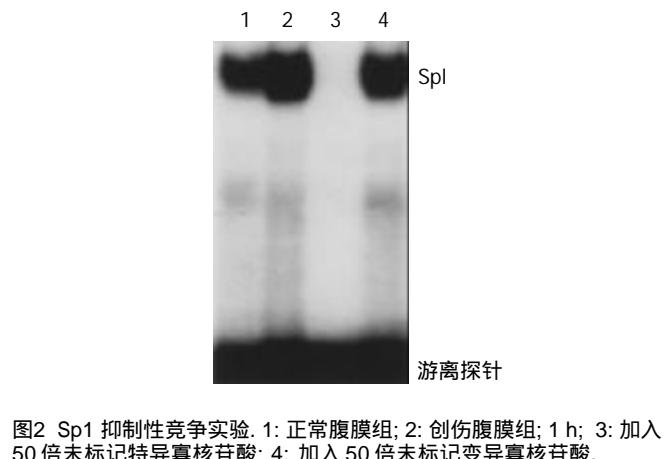


图2 Sp1抑制性竞争实验. 1: 正常腹膜组; 2: 创伤腹膜组; 1 h; 3: 加入50倍未标记特异寡核苷酸; 4: 加入50倍未标记变异寡核苷酸.

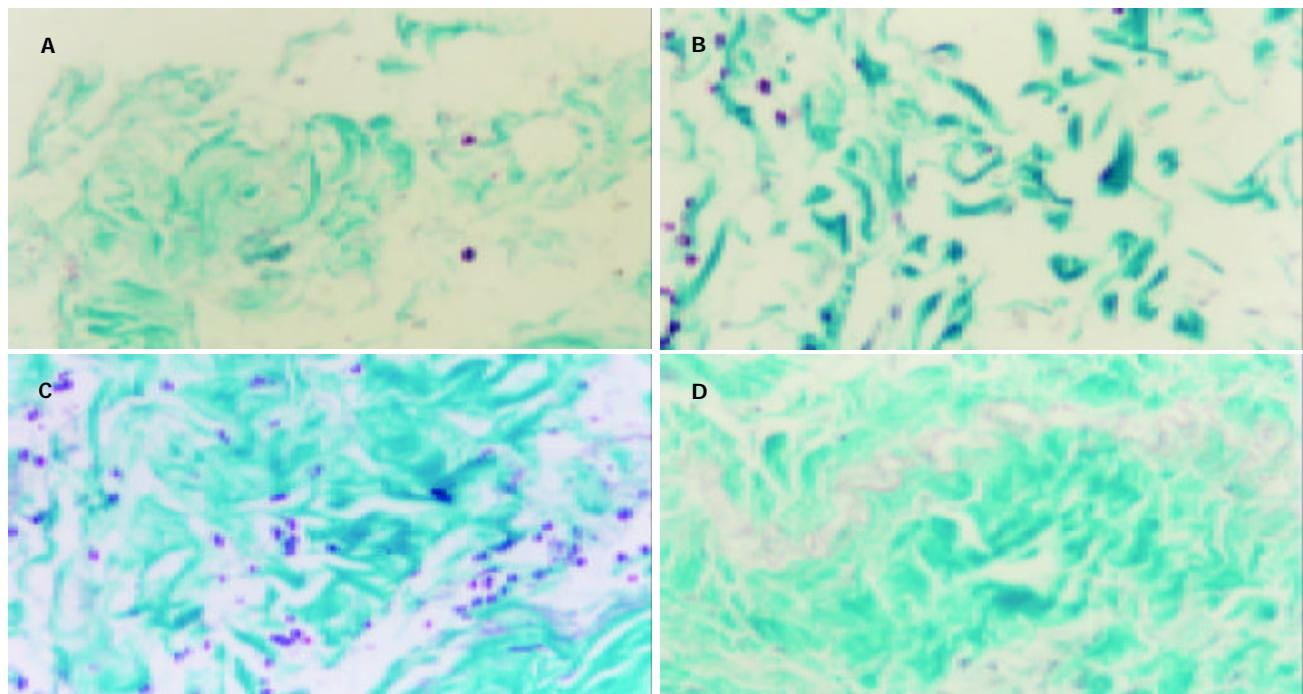


图3 腹膜组织胶原染色 Masson染色×200. A: 正常腹膜组 × 200; B: 30 min 创伤腹膜组 × 200; C: 2 h 创伤腹膜组 × 200; D: 4 h 创伤腹膜组 × 200.

3 讨论

Sp1是Sp/SKLF(specificity protein/Krüppel-like factor, 特异性蛋白 / Krüppel 样因子)转录因子家族中最早被克隆的因子, 由三个保守的Cys2His2锌指特异结合而形成, 三个锌指形成转录因子的DNA连接区域。通常认为Sp1是通过GC或GT盒调节而控制所有基因的转录。Ihn et al^[1]研究表明在硬皮病的纤维母细胞中Sp1的磷酸化增强与I型胶原的表达增高相关, Sp1通过特异的GC盒与I型α2胶原(COL1A2)启动子特异性结合, Sp1激活COL1A2启动子, 促进胶原的表达。Artlett et al^[2]报

道Sp1和近端的COL1A2启动子连接可激活COL1A2的活动。以细胞或信号特异性的方式改变转录因子的相对量或DNA结合活性, 均可控制COL1A2启动子的转录, 说明Sp1在结缔组织生理和病理调节中起重要作用。在表皮伤口愈合过程中如Sp1的过度活化可出现瘢痕疙瘩并转变成恶性胶原肿瘤, 表现为纤维母细胞过度分化、白细胞浸润、胶原合成明显增强^[3]。Haase et al^[4]在研究放射诱导的肺纤维化过程中在早期观察到Sp1短期增加, 此后维持稳定直到放射后1 mo。在放射后2 mo, Sp1 mRNA水平维持稳定。在II型肺细胞、肺泡巨噬细胞中发现Sp1

蛋白,从而导致在肺纤维化过程中纤维母细胞的增生明显增强。Rippe et al^[5]发现在肝纤维化中,Sp1与COL1A2启动子结合增强,促进了Ito细胞的活化,使肝纤维化进一步发生。在肝纤维化实验中可观察到Sp1和NF-1/Sp1开关元件的亲和力增加。实验显示光神霉素阻碍Sp1与该位点的结合,可使人纤维母细胞中细胞外基质(ECM)的形成和降解基因激活之间的平衡发生改变,从而抑制胶原的产生。以上研究说明Sp1在纤维化过程中起重要作用。

腹膜粘连与皮肤瘢痕形成和某些脏器的慢性纤维化类似,均以纤维增生为基础,已发现在角朊细胞的基因中存在功能性Sp1结合位点。我们的研究发现在手术创伤后,人体腹膜组织中的Sp1的活性随着时间的延长而逐渐增强,且腹膜组织在创伤后其胶原纤维增生,胶原的合成增加而分解降低,使人在手术创伤后腹膜粘连形成。因此,Sp1的活化在腹膜粘连形成中具有一定作用,但所依赖的信号通路以及在腹膜组织中的结合位点尚有待进一步研究。

Verrecchia et al^[6]研究发现阻断Sp1可广泛抑制体内和体外ECM基因的表达,Sp1与ECM基因的基础表达

有关,可能在纤维化过程中起重要作用。敲除Sp1可有效抑制ECM基因表达,这为治疗纤维化提供了一个选择治疗的手段。通过调控Sp1的表达可能阻断纤维化进程,从而防止腹膜粘连形成。

4 参考文献

- 1 Ihn H, Ihn Y, Trojanowska M. Sp1 phosphorylation induced by serum stimulates the human alpha2(I) collagen gene expression. *J Invest Dermatol* 2001;117:301-308
- 2 Artlett CM, Chen SJ, Varga J, Jimenez SA. Modulation of basal expression of the human alpha1(I) procollagen gene (COL1A1) by tandem NF-1/Sp1 promoter elements in normal human dermal fibroblasts. *Matrix Biol* 1998;17:425-434
- 3 Nirodi CS, Devalaraja R, Nanney LB, Arrindell S, Russell S, Trupin J, Richmond A. Chemokine and chemokine receptor expression in keloid and normal fibroblasts. *Wound Repair Regen* 2000;8:371-382
- 4 Haase M, Geyer P, Appold S, Schuh D, Kasper M, Muller M. Down-regulation of SP1 DNA binding activity in the process of radiation-induced pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Biol* 2000;76:487-492
- 5 Rippe RA, Almounajed G, Brenner DA. Sp1 binding activity increases in activated Ito cells. *Hepatology* 1995;27:241-251
- 6 Verrecchia F, Rossert J, Mauviel A. Blocking sp1 transcription factor broadly inhibits extracellular matrix gene expression in vitro and in vivo: implications for the treatment of tissue fibrosis. *J Invest Dermatol* 2001;116:755-763

凋亡抑制基因survivin 在食管鳞癌中的表达及其与p53基因表达相关性研究

高思海,赵金平,潘铁成,李军

高思海,赵金平,潘铁成,李军,华中科技大学同济医学院附属同济医院胸心外科 湖北省武汉市 430030
项目负责人:高思海,430030,湖北省武汉市,华中科技大学同济医学院附属同济医院胸心外科。gshai@tjh.tjmu.edu.cn
电话:027-62300305
收稿日期:2004-02-11 接受日期:2004-02-21

摘要

目的:探讨凋亡抑制基因survivin在食管鳞癌组织中的表达,及其与p53表达的相关性。

方法:应用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接法(S-P法),检测survivin和p53基因在12例正常食管组织及90例食管鳞癌组织中的表达。

结果:Survivin基因在正常食管组织中不表达,90例食管鳞癌组织中,64例表达阳性,占71.1%。高分化组(Ⅰ-

Ⅱ级)及临床早期(Ⅰ-Ⅱ期)病例食管癌的survivin基因表达阳性率为61.7%(37/60),低分化组(Ⅲ-Ⅳ级)及临床晚期(Ⅲ-Ⅳ期)病例为83.3%(25/30),二者比较,差异有显著性($P < 0.05$);食管鳞癌组织中p53蛋白表达阳性、阴性者中,survivin基因表达阳性率分别为75.9%(41/54)、22.2%(8/36),二者比较,差异有显著性($P < 0.05$);survivin基因表达阳性率与食管鳞癌的病理分级和临床分期呈正相关,与食管鳞癌组织中p53蛋白表达密切相关。

结论:Survivin基因的异常表达而引起的细胞凋亡抑制,在食管鳞癌的发生中起重要作用,其表达与食管鳞癌组织中p53蛋白的异常表达密切相关。

蛋白,从而导致在肺纤维化过程中纤维母细胞的增生明显增强。Rippe et al^[5]发现在肝纤维化中,Sp1与COL1A2启动子结合增强,促进了Ito细胞的活化,使肝纤维化进一步发生。在肝纤维化实验中可观察到Sp1和NF-1/Sp1开关元件的亲和力增加。实验显示光神霉素阻碍Sp1与该位点的结合,可使人纤维母细胞中细胞外基质(ECM)的形成和降解基因激活之间的平衡发生改变,从而抑制胶原的产生。以上研究说明Sp1在纤维化过程中起重要作用。

腹膜粘连与皮肤瘢痕形成和某些脏器的慢性纤维化类似,均以纤维增生为基础,已发现在角朊细胞的基因中存在功能性Sp1结合位点。我们的研究发现在手术创伤后,人体腹膜组织中的Sp1的活性随着时间的延长而逐渐增强,且腹膜组织在创伤后其胶原纤维增生,胶原的合成增加而分解降低,使人在手术创伤后腹膜粘连形成。因此,Sp1的活化在腹膜粘连形成中具有一定作用,但所依赖的信号通路以及在腹膜组织中的结合位点尚有待进一步研究。

Verrecchia et al^[6]研究发现阻断Sp1可广泛抑制体内和体外ECM基因的表达,Sp1与ECM基因的基础表达

有关,可能在纤维化过程中起重要作用。敲除Sp1可有效抑制ECM基因表达,这为治疗纤维化提供了一个选择治疗的手段。通过调控Sp1的表达可能阻断纤维化进程,从而防止腹膜粘连形成。

4 参考文献

- 1 Ihn H, Ihn Y, Trojanowska M. Sp1 phosphorylation induced by serum stimulates the human alpha2(I) collagen gene expression. *J Invest Dermatol* 2001;117:301-308
- 2 Artlett CM, Chen SJ, Varga J, Jimenez SA. Modulation of basal expression of the human alpha1(I) procollagen gene (COL1A1) by tandem NF-1/Sp1 promoter elements in normal human dermal fibroblasts. *Matrix Biol* 1998;17:425-434
- 3 Nirodi CS, Devalaraja R, Nanney LB, Arrindell S, Russell S, Trupin J, Richmond A. Chemokine and chemokine receptor expression in keloid and normal fibroblasts. *Wound Repair Regen* 2000;8:371-382
- 4 Haase M, Geyer P, Appold S, Schuh D, Kasper M, Muller M. Down-regulation of SP1 DNA binding activity in the process of radiation-induced pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Biol* 2000;76:487-492
- 5 Rippe RA, Almounajed G, Brenner DA. Sp1 binding activity increases in activated Ito cells. *Hepatology* 1995;27:241-251
- 6 Verrecchia F, Rossert J, Mauviel A. Blocking sp1 transcription factor broadly inhibits extracellular matrix gene expression in vitro and in vivo: implications for the treatment of tissue fibrosis. *J Invest Dermatol* 2001;116:755-763

凋亡抑制基因survivin 在食管鳞癌中的表达及其与p53基因表达相关性研究

高思海,赵金平,潘铁成,李军

高思海,赵金平,潘铁成,李军,华中科技大学同济医学院附属同济医院胸心外科 湖北省武汉市 430030
项目负责人:高思海,430030,湖北省武汉市,华中科技大学同济医学院附属同济医院胸心外科。gshai@tjh.tjmu.edu.cn
电话:027-62300305
收稿日期:2004-02-11 接受日期:2004-02-21

摘要

目的:探讨凋亡抑制基因survivin在食管鳞癌组织中的表达,及其与p53表达的相关性。

方法:应用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接法(S-P法),检测survivin和p53基因在12例正常食管组织及90例食管鳞癌组织中的表达。

结果:Survivin基因在正常食管组织中不表达,90例食管鳞癌组织中,64例表达阳性,占71.1%。高分化组(Ⅰ-

Ⅱ级)及临床早期(Ⅰ-Ⅱ期)病例食管癌的survivin基因表达阳性率为61.7%(37/60),低分化组(Ⅲ-Ⅳ级)及临床晚期(Ⅲ-Ⅳ期)病例为83.3%(25/30),二者比较,差异有显著性($P < 0.05$);食管鳞癌组织中p53蛋白表达阳性、阴性者中,survivin基因表达阳性率分别为75.9%(41/54)、22.2%(8/36),二者比较,差异有显著性($P < 0.05$);survivin基因表达阳性率与食管鳞癌的病理分级和临床分期呈正相关,与食管鳞癌组织中p53蛋白表达密切相关。

结论:Survivin基因的异常表达而引起的细胞凋亡抑制,在食管鳞癌的发生中起重要作用,其表达与食管鳞癌组织中p53蛋白的异常表达密切相关。

0 引言

Survivin 基因是近年来分离的哺乳动物凋亡抑制蛋白^[1], 被认为在 bcl-2 的下游阻断了半胱氨酸蛋白酶 caspase-3 和 caspase-7 凋亡调节通路^[2], 与其家族成员不同, survivin 基因选择性在肿瘤组织中表达, 在正常组织中不表达。食管癌是常见的癌之一, 他的发生发展与某些基因的激活和抑癌基因的失活有关^[3-13]. survivin 基因在食管癌中是否表达, 目前报道尚少。本研究旨在探讨细胞凋亡抑制基因 survivin 在食管癌组织中的表达及其与 p53 表达的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 选自我院 1994-2003 年经病理检查证实的食管鳞癌患者 90 例, 其中男 73 例, 女 17 例, 年龄 46-72 岁, 平均 61.3 岁, 所有患者均无糖尿病史, 无术前放化疗史。取其放化疗前的活组织检查标本, 用 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片, 留 1 张行苏木素伊红(H E)染色复诊。TNM 分期: II b 期 41 例, III a 期 16 例, III b 期 14 例。一抗 survivin 羊抗人多克隆抗体、p53 鼠抗人单克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品; SP 试剂盒为美国 Zymed 公司产品, 一抗工作浓度均为 1:30。

1.2 方法 取肿瘤组织时避开坏死出血部位, 切取标本约 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 大小, 另取 12 例正常食管组织作为对照。采用链霉菌抗生素蛋白过氧化酶连接(SP)免疫组织化学方法, 实验步骤按试剂盒说明书进行。将已知的乳腺癌切片作为阳性对照, 用磷酸盐缓冲液代替一抗, 作为阴性对照。p53 阳性定位于胞核, 而 survivin 则以胞质定位为主。在组织切片中不显色为阴性(-), 胞核或胞质显示为淡黄至黄棕色者为阳性细胞标志, 将阳性细胞按其数量及显色强度分为 3 级: 表达弱阳性(+), 即阳性细胞数<10%, 显色强度为淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄色染色; 表达中度阳性(++)+, 即阳性细胞数及显色强度介于弱阳性与强阳性之间。表达强阳性(+++), 即阳性细胞数>60%, 多数细胞呈黄至棕黄色染色。

统计学处理 应用 SPSS10.0 统计分析软件包对数据进行处理, 采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 食管癌组织中 survivin 和 p53 基因的表达 正常食管组织中未见 survivin 基因表达, 而 90 例食管癌中有 64 例 survivin 基因表达阳性, 占 71.1%, 其染色主要定位于胞质中。p53 基因在正常食管组织中低表达, 在食管癌中表达阳性, 其染色主要定位于胞核。二者表达与食管癌病理分级呈正相关($P<0.05$, 表 1)。高分化组(I - II 级)及临床早期(I - II 期)病例食管癌的 survivin 基因表达阳性率为 61.7%(37/60), 低分化组(III - IV 级)及临床晚期(III - IV 期)病例为 83.3%(25/30), 二者比较, 差异有显著性($P<0.05$)。

2.2 食管癌组织中 survivin 基因表达与 p53 基因表达的相关性 食管鳞癌组织中 p53 蛋白表达阳性、阴性者中, survivin 基因表达阳性率分别为 75.9%(41/54)、22.2%(8/36), 二者比较, 差异有显著性($P<0.05$); survivin 基因表达阳性率与食管鳞癌组织中 p53 蛋白表达密切相关。

表 1 survivin 和 p53 表达与食管鳞癌的关系

| 分级 | n | survivin | | | | | p53 | | | | |
|------------|----|----------|---|----|-----|------|-----|---|----|-----|------|
| | | - | + | ++ | +++ | % | - | + | ++ | +++ | % |
| 正常组织 | 12 | 12 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 1 | 2 | 0 | 25 |
| I 级 | 19 | 9 | 2 | 3 | 5 | 52.6 | 13 | 2 | 1 | 3 | 31.5 |
| II 级 | 41 | 16 | 8 | 7 | 12 | 65.9 | 17 | 8 | 5 | 11 | 58.6 |
| III - IV 级 | 30 | 5 | 4 | 6 | 15 | 83.3 | 6 | 4 | 7 | 13 | 80.0 |

I 级与 III - IV 级比较, $P<0.05$; 各级间比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

Survivin 是凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis proteins, IAP)家族的新成员^[1]。1997 年由 Altieri et al 用效应细胞蛋白酶受体-1(effecter cell protease receptor-1, EPR-1) cDNA 在人类基因组库的杂交筛选中首先分离出来。这一蛋白家族抑制细胞凋亡的作用远远大于 bcl-2 家族的作用。近年来研究表明, Survivin 是迄今发现最强的凋亡抑制因子, 其抗凋亡功能在于直接抑制了半胱氨酸蛋白酶 caspase-3 和 caspase-7 的活性。这一功能通过在细胞内与微管的聚合和解聚来实现^[2], survivin 基因的这一特性在所有已知的细胞凋亡调节物中是独一无二的。Survivin 只是在胚胎组织中表达, 成人已分化组织则表达下调或不表达, 其可广泛表达于人类绝大多数肿瘤组织^[14]。我们的研究发现, 食管鳞癌组织有 71.1% 表达阳性, 12 例正常食管组织未表达。结果显示 Survivin 基因可能通过抑制食管鳞癌细胞凋亡参与肿瘤的发生发展, 是一个具有潜在价值的肿瘤标志物。

Survivin 基因由于其独特的亚细胞分布被认为是处于细胞增生与细胞死亡界面的分子, 癌组织中 survivin 基因的异常表达可能直接促进细胞逃离生长监控, 在癌的发病中起重要作用。本研究临床资料分析发现, 分期越晚, 食管鳞癌组织分化恶性度越高, survivin 阳性表达率愈高。

从本实验结果可见, survivin 基因的表达与 p53 蛋白异常表达密切相关。p53 基因是重要的细胞凋亡调控基因, 在转录水平上, 野生型 p53 可下调 bcl-2 基因的表达, 从而诱导细胞凋亡^[15]。survivin 基因所在的 17q25 染色体不稳定, 此位点可能涉及 t(14:18)易位而导致 bcl-2 基因转录激活。bcl-2 基因通过阻止细胞色素 C 从线粒体向胞质释放而对细胞凋亡起调节作用, survivin 基因阻断细胞凋亡的途径是通过直接作用于细胞凋亡途径中的终末效应酶 caspase-3 和 caspase-7。survivin 和 bcl-2 基因通过相似的启动子序列调节, 推

测二者具有调节转录活性的共同机制。p53基因在大多数人类肿瘤中存在高频率突变，而survivin基因也在肿瘤中高表达，可推测这是由于p53基因突变而丧失了对survivin基因表达的下调作用。

Survivin在多种肿瘤表达的普遍性及在正常组织中不表达，使得应用靶向survivin的抗肿瘤治疗成为可能，使得抗survivin疗法具有较好的靶向特异性，对正常组织影响较小。文献[16]报道，表达survivin基因的肿瘤抗细胞凋亡阈值升高，从而抵抗了药物和放射治疗，因此，检测食管鳞癌中survivin的表达，对于临床治疗有一定的指导意义。另外，利用survivin的强大抗凋亡活性，通过基因转染导入骨髓造血组织，进行放化疗对骨髓造血功能保护，将有良好的应用前景。

总之，survivin基因的表达与食管癌的病理分级及临床分期呈正相关，在食管鳞癌的发生中起重要作用，其表达与食管鳞癌组织中p53蛋白的异常表达密切相关。至于其在食管癌预后判断中的价值如何，将在我们随后的临床跟踪实验中进一步探讨。

4 参考文献

- 1 Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, Mignogna MD, Rubini C, Mariggio MA, Procaccini M, Ferrari F, De Rosa G, Altieri DC. Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003;89:2244-2248
- 2 Yang LQ, Fang DC, Wang RQ, Yang SM. Effect of NF-kappaB, survivin, Bcl-2 and Caspase3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand. *World J Gastroenterol* 2004;10:22-25
- 3 Wang LD, Zhou Q, Wei JP, Yang WC, Zhao X, Wang LX, Zou JX, Gao SS, Li YX, Yang C. Apoptosis and its relationship with cell proliferation, p53, Waf1/p21, bcl-2 and c-myc in esophageal carcinogenesis studied with a high-risk population in northern China. *World J Gastroenterol* 1998;4:287-293
- 4 Zhang LJ, Chen KN, Xu GW, Xing HP, Shi XT. Congenital expression of mdr-1 gene in tissues of carcinoma and its relation with pathomorphology and prognosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:53-56
- 5 Lin J, Deng CS, Sun J, Zhou Y, Xiong P, Wang YP. Study on the genetic susceptibility of HLA-DQB1 alleles in esophageal cancer of Hubei Chinese Hans. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:965-968
- 6 Liu J, Chen SL, Zhang W, Su Q. P21^{WAF1} gene expression with P53 mutation in esophageal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1350-1353
- 7 Gu HP, Shang PZ, Su H, Li ZG. Association of CD15 antigen expression with cathepsin D in esophageal carcinoma tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:259-261
- 8 Qin HY, Shu Q, Wang D, Ma QF. Study on genetic polymorphisms of DCC gene VNTR in esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:782-785
- 9 Wu QM, Li SB, Wang Q, Wang DH, Li XB, Liu CZ. The expression of COX-2 in esophageal carcinoma and its relation to clinicopathologic characteristics. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:11-14
- 10 Tan LJ, Jiang W, Zhang NR, Qiu DH. Fas/FasL expression of esophageal squamous cell carcinoma, dysplasia tissues and normal mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:15-19
- 11 周海波, 颜云, 李国庆, 丰义宽, 辛桂霞. 食管癌组织中DPC₄基因的失活. 世界华人消化杂志 2002;10:102-103
- 12 Hao MW, Liang YR, Liu YF, Liu L, Wu MY, Yang HX. Transcription factor EGR-1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cells lines. *World J Gastroenterol* 2002;8:203-207
- 13 Xu M, Jin YL, Fu J, Huang H, Chen SZ, Qu P, Tian HM, Liu ZY, Zhang W. The abnormal expression of retinoic acid receptor-beta, p53 and Ki67 protein in normal, premalignant and malignant esophageal tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:200-202
- 14 Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;22:8581-8589
- 15 Kaur P, Kallakury BS, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Ross JS. Survivin and Bcl-2 expression in prostatic adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:39-43
- 16 Tu SP, Jiang XH, Lin MC, Cui JT, Yang Y, Lum CT, Zou B, Zhu YB, Jiang SH, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Lam SK, Kung HF, Wong BC. Suppression of survivin expression inhibits in vivo tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Res* 2003;63:7724-7732

食管鳞癌FLIP表达与细胞凋亡相关

高思海, 潘铁成, 赵金平, 李军

高思海, 潘铁成, 赵金平, 李军, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胸心外科 湖北省武汉市 430030
项目负责人: 高思海, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胸心外科. gshai@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-62300305
收稿日期: 2004-04-04 接受日期: 2004-04-16

摘要

目的: 探讨凋亡抑制蛋白FLIP在食管鳞癌组织中的表达及其与细胞凋亡的关系。

方法: 应用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接法(S-P法), 检测FLIP在10例正常食管组织及96例食管鳞癌组织中的表达, 并应用TUNEL技术检测96例食管鳞癌的凋亡情况。

结果: FLIP在96例食管鳞癌组织中有72例表达阳性, 占75%。高分化组(I - II级)及临床早期(I - II期)病例食管癌的FLIP表达阳性率为64%(32/50), 低分化组(III - IV级)及

测二者具有调节转录活性的共同机制。p53基因在大多数人类肿瘤中存在高频率突变，而survivin基因也在肿瘤中高表达，可推测这是由于p53基因突变而丧失了对survivin基因表达的下调作用。

Survivin在多种肿瘤表达的普遍性及在正常组织中不表达，使得应用靶向survivin的抗肿瘤治疗成为可能，使得抗survivin疗法具有较好的靶向特异性，对正常组织影响较小。文献[16]报道，表达survivin基因的肿瘤抗细胞凋亡阈值升高，从而抵抗了药物和放射治疗，因此，检测食管鳞癌中survivin的表达，对于临床治疗有一定的指导意义。另外，利用survivin的强大抗凋亡活性，通过基因转染导入骨髓造血组织，进行放化疗对骨髓造血功能保护，将有良好的应用前景。

总之，survivin基因的表达与食管癌的病理分级及临床分期呈正相关，在食管鳞癌的发生中起重要作用，其表达与食管鳞癌组织中p53蛋白的异常表达密切相关。至于其在食管癌预后判断中的价值如何，将在我们随后的临床跟踪实验中进一步探讨。

4 参考文献

- 1 Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, Mignogna MD, Rubini C, Mariggio MA, Procaccini M, Ferrari F, De Rosa G, Altieri DC. Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003;89:2244-2248
- 2 Yang LQ, Fang DC, Wang RQ, Yang SM. Effect of NF-kappaB, survivin, Bcl-2 and Caspase3 on apoptosis of gastric cancer cells induced by tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand. *World J Gastroenterol* 2004;10:22-25
- 3 Wang LD, Zhou Q, Wei JP, Yang WC, Zhao X, Wang LX, Zou JX, Gao SS, Li YX, Yang C. Apoptosis and its relationship with cell proliferation, p53, Waf1/p21, bcl-2 and c-myc in esophageal carcinogenesis studied with a high-risk population in northern China. *World J Gastroenterol* 1998;4:287-293
- 4 Zhang LJ, Chen KN, Xu GW, Xing HP, Shi XT. Congenital expression of mdr-1 gene in tissues of carcinoma and its relation with pathomorphology and prognosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:53-56
- 5 Lin J, Deng CS, Sun J, Zhou Y, Xiong P, Wang YP. Study on the genetic susceptibility of HLA-DQB1 alleles in esophageal cancer of Hubei Chinese Hans. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:965-968
- 6 Liu J, Chen SL, Zhang W, Su Q. P21^{WAF1} gene expression with P53 mutation in esophageal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1350-1353
- 7 Gu HP, Shang PZ, Su H, Li ZG. Association of CD15 antigen expression with cathepsin D in esophageal carcinoma tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:259-261
- 8 Qin HY, Shu Q, Wang D, Ma QF. Study on genetic polymorphisms of DCC gene VNTR in esophageal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:782-785
- 9 Wu QM, Li SB, Wang Q, Wang DH, Li XB, Liu CZ. The expression of COX-2 in esophageal carcinoma and its relation to clinicopathologic characteristics. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:11-14
- 10 Tan LJ, Jiang W, Zhang NR, Qiu DH. Fas/FasL expression of esophageal squamous cell carcinoma, dysplasia tissues and normal mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:15-19
- 11 周海波, 颜云, 李国庆, 丰义宽, 辛桂霞. 食管癌组织中DPC₄基因的失活. 世界华人消化杂志 2002;10:102-103
- 12 Hao MW, Liang YR, Liu YF, Liu L, Wu MY, Yang HX. Transcription factor EGR-1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cells lines. *World J Gastroenterol* 2002;8:203-207
- 13 Xu M, Jin YL, Fu J, Huang H, Chen SZ, Qu P, Tian HM, Liu ZY, Zhang W. The abnormal expression of retinoic acid receptor-beta, p53 and Ki67 protein in normal, premalignant and malignant esophageal tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:200-202
- 14 Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;22:8581-8589
- 15 Kaur P, Kallakury BS, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Ross JS. Survivin and Bcl-2 expression in prostatic adenocarcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:39-43
- 16 Tu SP, Jiang XH, Lin MC, Cui JT, Yang Y, Lum CT, Zou B, Zhu YB, Jiang SH, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Lam SK, Kung HF, Wong BC. Suppression of survivin expression inhibits in vivo tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Res* 2003;63:7724-7732

食管鳞癌FLIP表达与细胞凋亡相关

高思海, 潘铁成, 赵金平, 李军

高思海, 潘铁成, 赵金平, 李军, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胸心外科 湖北省武汉市 430030
项目负责人: 高思海, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院胸心外科. gshai@tjh.tjmu.edu.cn
电话: 027-62300305
收稿日期: 2004-04-04 接受日期: 2004-04-16

摘要

目的: 探讨凋亡抑制蛋白FLIP在食管鳞癌组织中的表达及其与细胞凋亡的关系。

方法: 应用免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接法(S-P法), 检测FLIP在10例正常食管组织及96例食管鳞癌组织中的表达, 并应用TUNEL技术检测96例食管鳞癌的凋亡情况。

结果: FLIP在96例食管鳞癌组织中有72例表达阳性, 占75%。高分化组(I - II级)及临床早期(I - II期)病例食管癌的FLIP表达阳性率为64%(32/50), 低分化组(III - IV级)及

临床晚期(Ⅲ - Ⅳ期)病例食管癌的FLIP表达阳性率为82.6% (38/46), 二者比较, 差异有显著性($P < 0.05$); FLIP表达阳性率与食管鳞癌的病理分级和临床分期呈正相关。FLIP在食管鳞癌组织中的表达水平与癌细胞凋亡指数(AI)有明显相关性($P < 0.05$)。

结论: FLIP的异常表达在食管鳞癌的发生发展中起重要作用, 其表达与食管鳞癌细胞凋亡密切相关。

高思海, 潘铁成, 赵金平, 李军. 食管鳞癌 FLIP 表达与细胞凋亡相关. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1470-1473

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1470.asp>

0 引言

FLIP (FLICE inhibitory protein)是近年来发现的一种新的凋亡抑制蛋白, 在病毒、真核生物、哺乳动物等许多物种中广泛存在。FLIP 在结构与序列上与目前细胞凋亡信号传导的“关键分子” caspase-8有很多相似之处, 且能抑制 caspase-8 结合到死亡诱导信号复合物(DISC)上, 从而阻断 Fas 介导的细胞凋亡信号传导^[1-2]。食管癌是常见的癌之一, 他的发生发展与细胞凋亡及某些基因的激活或失活有关^[3-13]。FLIP在食管癌中是否表达, 目前国内外尚未见报道。我们探讨细胞凋亡抑制蛋白 FLIP 在食管癌组织中的表达及其与细胞凋亡的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 选自我院 1994/2003 年经病理检查证实的食管鳞癌患者 96 例, 男 76 例, 女 20 例, 年龄 46-72 (平均 61.3 岁), 术前放疗。取活组织标本 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 大小, 用 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋, 连续切片, 留 1 张行苏木素伊红(HE)染色复诊。TNM 分期: II b 期 42 例, III a 期 18 例, III b 期 17 例。一抗兔抗人 FLIPS/L 多克隆抗体(H202)为美国 Santa Cruz 公司产品; SP 免疫组化试剂盒为美国 Zymed 公司产品。TUNEL 检测试剂盒购于北京中山生物技术有限公司。另取 10 例正常食管组织作为对照。

1.2 方法 采用链霉菌抗生物素蛋白 - 过氧化酶连接(SP)免疫组织化学方法, 实验步骤按试剂盒说明书进行。将已知的乳腺癌切片作为阳性对照, 用磷酸盐缓冲液代替一抗, 作为阴性对照, FLIP 以胞质定位为主。在组织切片中不显色为阴性(-), 胞核或胞质显示为淡黄至黄棕色者为阳性细胞标志。将阳性细胞按其数量及显色强度分为 3 级: 表达弱阳性(+), 即阳性细胞数<10%, 显色强度为淡黄色或仅个别细胞呈黄至棕黄色染色; 表达中度阳性(++) , 即阳性细胞数及显色强度介于弱阳性与强阳性之间。表达强阳性(+++), 即阳性细胞数>60%, 多数细胞呈黄至棕黄色染色。所有阳性片均置于 10 × 40 倍镜下, 随机选取 5 个视野, 经 HPIAS 1000 图像分析系统分析, 计算出平均阳性单位 pu (positive unit). pu=

(G α -G β)/Gmax × 100, G α 、G β 分别为待测结构 α 和背景 β 的平均灰度。并按下列关系算出各标本阳性染色度=pu × 阳性面积百分比。凋亡指数(apoptosis index, AI)的测定: 以细胞核内出现棕褐色颗粒为阳性染色, 即为凋亡细胞。每张切片计数 500 个癌细胞, 其中凋亡细胞占细胞总数的百分数为 AI 值。

统计学处理 应用 SPSS10.0 统计分析软件包对数据进行处理, 采用 χ^2 检验, 方差分析及 Spearman 等级相关检验。

2 结果

2.1 食管癌组织中 FLIP 的表达 在 96 例食管癌中有 72 例 FLIP 表达阳性, 占 75%, 其染色为棕黄色颗粒, 定位于细胞质内(图 1A), 染色强度与食管癌病理分级呈正相关(图 1B, 表 1, $P < 0.05$)。高分化组(I - II 级)及临床早期(I - II 期)病例食管癌的 FLIP 表达阳性率为 64%(32/50), 低分化组(III - IV 级)及临床晚期(III - IV 期)病例为 82.6% (38/46), 二者比较, 差异有显著性(表 1, $P < 0.05$)。

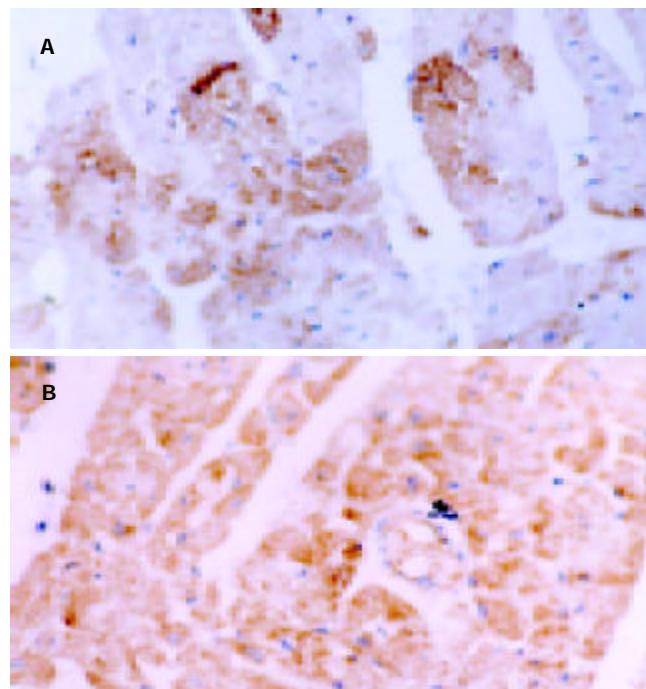


图 1 食管鳞癌细胞质中 FLIP 蛋白表达 SP × 400. A: 病理 II 级; B: 病理 IV 级。

表 1 食管鳞癌 FLIP 表达与病理分级及细胞凋亡指数(AI)的关系

| 分级 | n | FLIP ^a | | | | | AI ^b % |
|------------|----|-------------------|---|----|-----|------|----------------------|
| | | - | + | ++ | +++ | % | |
| 正常组织 | 10 | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19.2 ± 1.7 |
| I 级 | 19 | 9 | 2 | 3 | 5 | 52.6 | 14.5 ± 1.2 |
| II 级 | 31 | 9 | 6 | 7 | 9 | 70.9 | 11.3 ± 1.1 |
| III - IV 级 | 46 | 8 | 9 | 10 | 19 | 82.6 | 9.2 ± 0.8 |

^aP < 0.05, 各级间比较。

2.2 FLIP表达与癌细胞凋亡指数(AI)的关系 随肿瘤病理分级期升高,食管鳞癌组织中FLIP蛋白表达阳性率逐渐升高,AI值逐步降低,采用Spearman等级相关检验,二者呈负相关($P < 0.05$).FLIP表达阳性率与食管鳞癌细胞凋亡密切相关(表1).

3 讨论

FLIP是近年来发现的一类含有死亡效应结构域(death effect domains, DED)的凋亡抑制蛋白,首先在病毒中被发现.这种蛋白在结构上与FLICE(FADD like IL-1 beta converting enzyme, caspase-8)相似,并能抑制FLICE的作用,故他命名为FLIP,因他来源于病毒,所以又称为vFLIP.人类FLIP基因含13个外显子,与caspase-8基因均位于染色体的2q33-34,二者相距约200 bp^[14-17].FLIP蛋白在结构与序列上也与caspase-8有很多相似之处,其N端含有与caspase-8相似的两个相互串联的DED.每个DED含有40个氨基酸,DED与Fas的死亡结构域(death domain, DD)的功能相似,能介导蛋白质之间的相互结合,可竞争性地与caspase-8上的DED结合,阻断死亡信号复合体形成,从而抑制凋亡^[18-20].

FLIP的过量表达在肿瘤的发生中起重要作用.有报道FLIP在胰腺癌^[21]、胃癌^[22]、肾癌^[23]等肿瘤中过量表达.我们发现FLIP过量表达与食管鳞癌的发生有关.这可能是细胞癌变中的重要环节,即细胞内染色体异常改变,使FLIP基因激活并过度转录表达,FLIP蛋白增多则进一步促进细胞恶化.我们进一步检测了FLIP与食管鳞癌临床病理特征的关系,发现FLIP染色强度随食管鳞癌病理分级增高而增高,高分化组(I-II级)及临床早期(I-II期)病例食管癌的FLIP表达阳性率为64%(32/50),低分化组(III-IV级)及临床晚期(III-IV期)病例食管癌的FLIP表达阳性率为82.6%(38/46),二者比较,差异有显著性($P < 0.05$).因而推论FLIP在食管鳞癌进展中也发挥着重要作用.为了进一步研究FLIP在食管鳞癌中的凋亡抑制作用,我们分析了染色强度与凋亡指数之间的相关性,发现二者呈负相关.结果显示FLIP可能通过抑制食管鳞癌细胞凋亡参与食管鳞癌的发生发展.

4 参考文献

- 1 Baumler C, Duan F, Onel K, Rapaport B, Jhanwar S, Offit K, Elkorn KB. Differential recruitment of caspase 8 to cFLIP confers sensitivity or resistance to Fas-mediated apoptosis in a subset of familial lymphoma patients. *Leuk Res* 2003;27:841-851
- 2 Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, de Jong S. Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell Death Differ* 2003;10:808-822
- 3 Buskens CJ, Marsman WA, Wesseling JG, Offerhaus GJ, Yamamoto M, Curiel DT, Bosma PJ, van Lanschot JJ. A genetically retargeted adenoviral vector enhances viral transduction in esophageal carcinoma cell lines and primary cultured esophageal resection specimens. *Ann Surg* 2003;238:815-824
- 4 Shimada H, Matsubara H, Ochiai T. p53 gene therapy for esophageal cancer. *J Gastroenterol* 2002;37(Suppl 14):87-91
- 5 Tsuno H, Komura S, Ohishi N, Yajima H, Akiyama S, Kasai Y, Ito K, Nakao A, Yagi K. Effect of transfection with human interferon-beta gene entrapped in cationic multilamellar liposomes in combination with 5-fluorouracil on the growth of human esophageal cancer cells in vitro. *Anticancer Res* 2002;22:1537-1543
- 6 Gupta VK, Park JO, Jaskowiak NT, Mauceri HJ, Seetharam S, Weichselbaum RR, Posner MC. Combined gene therapy and ionizing radiation is a novel approach to treat human esophageal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2002;9:500-504
- 7 Gu ZP, Wang YJ, Li JG, Zhou YA. VEGF165 antisense RNA suppresses oncogenic properties of human esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:44-48
- 8 Wu MY, Chen MH, Liang YR, Meng GZ, Yang HX, Zhuang CX. Experimental and clinicopathologic study on the relationship between transcription factor Egr-1 and esophageal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:490-495
- 9 Matsubara H, Gunji Y, Maeda T, Tasaki K, Koide Y, Asano T, Ochiai T, Sakiyama S, Tagawa M. Electroporation-mediated transfer of cytokine genes into human esophageal tumors produces anti-tumor effects in mice. *Anticancer Res* 2001;21:2501-2503
- 10 Nakamura H, Sekiguchi H, Akiyama S, Hamada H, Fujiwara M, Kasai Y, Ito K, Nakao A. Adenovirus-mediated transduction of Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene increases the sensitivity of esophageal cancer cells to 5-fluorouracil. *Surg Today* 2001;31:785-790
- 11 Ishii H, Dumon KR, Vecchione A, Trapasso F, Mimori K, Alder H, Mori M, Sozzi G, Baffa R, Huebner K, Croce CM. Effect of adenoviral transduction of the fragile histidine triad gene into esophageal cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:1578-1584
- 12 Hao MW, Liang YR, Liu YF, Liu L, Wu MY, Yang HX. Transcription factor EGR-1 inhibits growth of hepatocellular carcinoma and esophageal carcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2002;8:203-207
- 13 Xu M, Jin YL, Fu J, Huang H, Chen SZ, Qu P, Tian HM, Liu ZY, Zhang W. The abnormal expression of retinoic acid receptor-beta, p53 and Ki67 protein in normal, premalignant and malignant esophageal tissues. *World J Gastroenterol* 2002;8:200-202
- 14 Okano H, Shiraki K, Inoue H, Kawakita T, Yamanaka T, Deguchi M, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Fujikawa K, Murata K, Nakano T. Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest* 2003;83:1033-1043
- 15 Platzbecker U, Ward JL, Deeg HJ. Chelerythrin activates caspase-8, downregulates FLIP long and short, and overcomes resistance to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in KG1a cells. *Br J Haematol* 2003;122:489-497
- 16 Kamarajan P, Sun NK, Chao CC. Up-regulation of FLIP in cisplatin-selected HeLa cells causes cross-resistance to CD95/Fas death signalling. *Biochem J* 2003;376(Pt 1):253-260
- 17 Hotta T, Suzuki H, Nagai S, Yamamoto K, Imakiire A, Takada E, Itoh M, Mizuguchi J. Chemotherapeutic agents sensitize sarcoma cell lines to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced caspase-8 activation, apoptosis and loss of mitochondrial membrane potential. *J Orthop Res* 2003;21:949-957
- 18 Rajashekhar G, Loganath A, Roy AC, Mongelli JM. Resistance to Fas-mediated cell death in BeWo and NJG choriocarcinoma cell lines: implications in immune privilege. *Gynecol Oncol* 2003;91:89-100
- 19 Liu K, McDuffie E, Abrams SI. Exposure of human primary colon carcinoma cells to anti-Fas interactions influences the emergence of pre-existing Fas-resistant metastatic subpopulations. *J Immunol* 2003;171:4164-4174
- 20 Sun Q, Zachariah S, Chaudhary PM. The human herpes virus 8-encoded viral FLICE-inhibitory protein induces cellular transformation via NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2003;278:52437-52445
- 21 Trauzold A, Schmiedel S, Roder C, Tams C, Christgen M, Oestern S, Arlt A, Westphal S, Kapischke M, Ungefroren H, Kalthoff H. Multiple and synergistic deregulations of apoptosis-controlling genes in pancreatic carcinoma cells. *Br J Cancer* 2003;89:1714-1721
- 22 Osaki M, Kase S, Adachi K, Takeda A, Hashimoto K, Ito H.

Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway enhances the sensitivity of Fas-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cell line, MKN-45. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:8-14
23 Qi H, Ohh M. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein

sensitizes renal cell carcinoma cells to tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB-dependent antiapoptotic pathway. *Cancer Res* 2003;63:7076-7080

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

• 研究快报 •

自体胆汁胰管内注射建立急性出血坏死性胰腺炎家兔模型

奚维东, 赵 聪, 袁得强, 郑 敏, 杨秀兰, 璩浙屏

奚维东, 赵聪, 袁得强, 郑敏, 杨秀兰, 璩浙屏, 成都市第三人民医院消化内科 四川省成都市 610031
项目负责人: 赵聪, 610031, 四川省成都市, 成都市第三人民医院消化内科.
czhao0050@sohu.com
电话: 028-86649831-71099
收稿日期: 2003-12-29 接受日期: 2004-03-04

摘要

目的: 我们以胰管内注射自身胆汁诱导和建立了急性出血坏死性胰腺炎家兔模型.

方法: 日本纯种长耳白兔 20 只, 造模组 15 只, 对照组 5 只. 通过抽取自身胆汁从十二指肠乳头处逆行穿刺主胰管注射, 并于术后 24 h 处死动物取出胰腺, 送组织病理学检查分级, 对照组开腹后找到胰腺, 未作处理, 同样于术后 24 h 送组织病理学检查分级.

结果: 模型组动物 15 只病理学诊断均为急性出血坏死性胰腺炎, 水肿、炎症、出血、坏死 4 项指标评分均为 III-IV 级, 造模成功. 对照组只有 1 例为水肿 I 级, 1 例为水肿 II 级, 其余均正常.

结论: 通过兔胰管内逆行注射自身胆汁法诱导的重症胰腺炎模型胆源性胰腺炎病理生理相仿.

奚维东, 赵聪, 袁得强, 郑敏, 杨秀兰, 璩浙屏. 自体胆汁胰管内注射建立急性出血坏死性胰腺炎家兔模型. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1473-1474
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1473.asp>

0 引言

出血坏死性胰腺炎(急性重症胰腺炎)是一种死亡率高的严重危害人类生命健康的临床常见疾病之一, 其发病机制和治疗方法一直是国内外医学研究的重点和热点内容之一. 胰酶的自身消化作用、炎性递质和微循环障碍在该病的发生和进展过程中起重要作用. 近年来的研究表明细胞凋亡参与胰腺炎的病理生理过程, 胰腺炎的严重程度与胰腺细胞凋亡呈负相关关系. 为研究生长抑素对实验性急性出血坏死性胰腺炎中细胞凋亡的影

响, 我们以胰管内注射自身胆汁成功地诱导和建立了急性出血坏死性胰腺炎家兔模型. 现将建模方法报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 日本纯种长耳白兔 20 只, 体质量 1 800-2 400 g (四川大学医学院实验动物中心提供). 其中造模组 15 只, 对照组 5 只.

1.2 方法 取成年日本长耳白兔 15 只, 动物房饲养 24-48 h 后禁食不禁水 12 h. 造模前先用 20 g/L 硫贲妥钠 3-6 mg ip 麻醉后将动物固定于手术台上; 采用上腹正中切口, 分离出胆囊后, 用 5 号针穿刺胆囊取胆汁备用. 仔仔细分离辨认胰腺及胰管与十二指肠交接处, 用 4.5 号针从十二指肠乳头处对侧逆行穿刺进针, 进入主胰管 1-2 mm 后缓慢注入自身胆汁 0.2 mL/kg^[1]; 注射后即见主胰管呈绿黄色, 证实注射成功; 拔针后逐层关腹. 术后继续禁食, 于手术后 24 h 用超量硫贲妥钠处死动物; 随即迅速切开腹腔, 其中 9 只见腹腔有少量血性腹水; 所有动物胰腺体积明显增大, 呈紫色; 仔仔细分离并迅速切除动物胰腺, 将组织固定于 40 g/L 甲醛中送组织病理学检查. 对照组开腹后找到胰腺, 未作处理则关腹, 术后 24 h 处死动物, 见腹腔有少许透明腹水, 胰腺无明显变化. 石蜡包埋后切片, HE 常规染色后显微镜观察. 胰腺组织病理学的标准评分法采用 Schmidt 法^[2]. 水肿、炎症、出血、坏死 4 项指标, 每项指标均分为 I-IV 级, 以 IV 级为最重.

2 结果

造模组动物 15 只组织病理学诊断均为急性出血坏死性胰腺炎, 水肿、炎症、出血、坏死 4 项指标评分均为 III-IV 级, 仅 1 例出血评分为 II 级. 评分较为集中, 13 例为水肿 IV 级(87%), 12 例为炎症 IV 级(80%), 9 例为出血 III 级(60%), 11 例为坏死 III 级(73%). 造模成功. 对照组只有 1 例为水肿 I 级, 1 例为水肿 II 级, 其余均正常.

Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway enhances the sensitivity of Fas-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cell line, MKN-45. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:8-14
23 Qi H, Ohh M. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein

sensitizes renal cell carcinoma cells to tumor necrosis factor-induced cytotoxicity by suppressing the nuclear factor-kappaB-dependent antiapoptotic pathway. *Cancer Res* 2003;63:7076-7080

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

• 研究快报 •

自体胆汁胰管内注射建立急性出血坏死性胰腺炎家兔模型

奚维东, 赵 聪, 袁得强, 郑 敏, 杨秀兰, 璩浙屏

奚维东, 赵聪, 袁得强, 郑敏, 杨秀兰, 璩浙屏, 成都市第三人民医院消化内科 四川省成都市 610031

项目负责人: 赵聪, 610031, 四川省成都市, 成都市第三人民医院消化内科.

czhao0050@sohu.com

电话: 028-86649831-71099

收稿日期: 2003-12-29 接受日期: 2004-03-04

摘要

目的: 我们以胰管内注射自身胆汁诱导和建立了急性出血坏死性胰腺炎家兔模型.

方法: 日本纯种长耳白兔 20 只, 造模组 15 只, 对照组 5 只. 通过抽取自身胆汁从十二指肠乳头处逆行穿刺主胰管注射, 并于术后 24 h 处死动物取出胰腺, 送组织病理学检查分级, 对照组开腹后找到胰腺, 未作处理, 同样于术后 24 h 送组织病理学检查分级.

结果: 模型组动物 15 只病理学诊断均为急性出血坏死性胰腺炎, 水肿、炎症、出血、坏死 4 项指标评分均为 III-IV 级, 造模成功. 对照组只有 1 例为水肿 I 级, 1 例为水肿 II 级, 其余均正常.

结论: 通过兔胰管内逆行注射自身胆汁法诱导的重症胰腺炎模型胆源性胰腺炎病理生理相仿.

奚维东, 赵聪, 袁得强, 郑敏, 杨秀兰, 璩浙屏. 自体胆汁胰管内注射建立急性出血坏死性胰腺炎家兔模型. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1473-1474
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1473.asp>

0 引言

出血坏死性胰腺炎(急性重症胰腺炎)是一种死亡率高的严重危害人类生命健康的临床常见疾病之一, 其发病机制和治疗方法一直是国内外医学研究的重点和热点内容之一. 胰酶的自身消化作用、炎性递质和微循环障碍在该病的发生和进展过程中起重要作用. 近年来的研究表明细胞凋亡参与胰腺炎的病理生理过程, 胰腺炎的严重程度与胰腺细胞凋亡呈负相关关系. 为研究生长抑素对实验性急性出血坏死性胰腺炎中细胞凋亡的影

响, 我们以胰管内注射自身胆汁成功地诱导和建立了急性出血坏死性胰腺炎家兔模型. 现将建模方法报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 日本纯种长耳白兔 20 只, 体质量 1 800-2 400 g (四川大学医学院实验动物中心提供). 其中造模组 15 只, 对照组 5 只.

1.2 方法 取成年日本长耳白兔 15 只, 动物房饲养 24-48 h 后禁食不禁水 12 h. 造模前先用 20 g/L 硫贲妥钠 3-6 mg ip 麻醉后将动物固定于手术台上; 采用上腹正中切口, 分离出胆囊后, 用 5 号针穿刺胆囊取胆汁备用. 仔仔细分离辨认胰腺及胰管与十二指肠交接处, 用 4.5 号针从十二指肠乳头处对侧逆行穿刺进针, 进入主胰管 1-2 mm 后缓慢注入自身胆汁 0.2 mL/kg^[1]; 注射后即见主胰管呈绿黄色, 证实注射成功; 拔针后逐层关腹. 术后继续禁食, 于手术后 24 h 用超量硫贲妥钠处死动物; 随即迅速切开腹腔, 其中 9 只见腹腔有少量血性腹水; 所有动物胰腺体积明显增大, 呈紫色; 仔细分离并迅速切除动物胰腺, 将组织固定于 40 g/L 甲醛中送组织病理学检查. 对照组开腹后找到胰腺, 未作处理则关腹, 术后 24 h 处死动物, 见腹腔有少许透明腹水, 胰腺无明显变化. 石蜡包埋后切片, HE 常规染色后显微镜观察. 胰腺组织病理学的标准评分法采用 Schmidt 法^[2]. 水肿、炎症、出血、坏死 4 项指标, 每项指标均分为 I-IV 级, 以 IV 级为最重.

2 结果

造模组动物 15 只组织病理学诊断均为急性出血坏死性胰腺炎, 水肿、炎症、出血、坏死 4 项指标评分均为 III-IV 级, 仅 1 例出血评分为 II 级. 评分较为集中, 13 例为水肿 IV 级(87%), 12 例为炎症 IV 级(80%), 9 例为出血 III 级(60%), 11 例为坏死 III 级(73%). 造模成功. 对照组只有 1 例为水肿 I 级, 1 例为水肿 II 级, 其余均正常.

3 讨论

急性出血坏死性胰腺炎目前仍是临床常见死亡率较高的疾病，其发病机制未完全明确，且无特效的治疗药物和方法，故仍是临床和基础研究的热点。制备理想的急性出血坏死性胰腺炎模型是研究其发病机制和评价药物疗效的主要手段。造模方法有食物或药物(雨蛙素)诱导法、胰管内注射诱导法、胰管结扎诱导法和十二指肠闭襻法等^[1,3-6]。其中食物或药物诱导法多用于制造水肿型胰腺炎模型，十二指肠闭襻法由于不符合生理条件且存活率较低，不适合进行药物评价尤其是观察胰腺损伤后的恢复情况。胰管内注射诱导法更接近生理条件，多用于制备急性出血坏死性胰腺炎，常用的注射液有30-50 g/L牛磺胆酸钠，糖脱氧胆酸，自身胆汁等^[7-9]，但牛磺胆酸钠，糖脱氧胆酸价格较昂贵，自身胆汁则方便、便宜。常用的造模动物有犬、猪、兔和大鼠等^[10-12]，犬模型操作方便但费用较高，且有品种上的差异；大鼠较便宜但操作困难且不易长期饲养，死亡率高。兔模型则价格相对便宜、易饲养，存活率高。我们通过兔胰管内逆行注射自身胆汁法诱导的重症胰腺炎模型是根据胆汁反流入胰管，激活胰蛋白酶原，引起胰腺自身消化和全身炎症反应，是人类急性胰腺炎常见的发病因素，且与胆源性胰腺炎病理生理相仿^[1]。本模型与对照组比较，胰腺组织均出现典型的急性出血坏死性胰腺炎的病理改变，且比较集中，无明显差异，证明该方法稳定可靠，操作简单，重复性好，费用低，且死亡率低。通过兔急性胰腺炎模型的建立，我们可以进一步观察比较不同药物对重症胰腺炎的作用效果及胰腺的恢复情况，以指导临床用药，降低胰腺炎的死亡率。

4 参考文献

1 沈魁, 钟守先, 张圣道. 胰腺外科. 第1版. 北京: 人民卫生出版社,

- 2000;629-631
 2 Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute Pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215:44-56
 3 Hirano T, Hirano K. Glucagon ameliorates pancreatic subcellular redistribution of lysosomal enzyme in rats with acute pancreatitis of closed duodenal loop. *Dig Surg* 1999; 16:16-21
 4 Eibl G, Forgacs B, Hotz HG, Buhr HJ, Foitzik T. Endothelin A but not endothelin B receptor blockade reduces capillary permeability in severe experimental panreatitis. *Pancreas* 2002; 25:15-20
 5 Urunuela A, Manso MA, de-la-Mano AM, Sevillano S, Orfao A, de-Dios I. Asynchronous impairment of calcium homoeostasis in different acinar cells after pancreatic duct obstruction in rat. *Clin Sci (Lond)* 2002;102:615-622
 6 Cui HF, Bai ZL. Protective effects of transplanted and mobilized bone marrow stem cells on mice with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2274-2277
 7 Foitzik T, Hotz HG, Hotz B, Wittig F, Buhr HJ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 (cox-2) reduces prostaglandin E2 production and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1159-1162
 8 Strate T, Mann O, Kleinhans H, Schneider C, Knoefel WT, Yekebas E, Standl T, Bloechle C, Izicki JR. Systemic intravenous infusion of bovine hemoglobin significantly reduces microcirculatory dysfunction in experimental induced pancreatitis in the rat. *Ann Surg* 2003;238:765-771
 9 Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Takase K, Nishikawa J, Kuroda Y. Splenic atrophy in experimental severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2002;24:365-372
 10 Kinnala PJ, Kuttilla KT, Gronroos JM, Havia TV, Nevalainen TJ, Niinikoski JH. Splanchnic and pancreatic tissue perfusion in experimental acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37:845-849
 11 Qin HL, Su ZD, Hu LG, Ding ZX, Lin QT. Effect of early intrajejunal nutrition on pancreatic pathological features and gut barrier function in dogs with acute pancreatitis. *Clin Nutr* 2002;21:469-473
 12 Kinnala PJ, Gronroos JM, Kuttilla KT, Havia TV, Nevalainen TJ, Peltola O, Niinikoski JH. Catalytic activity of phospholipase A2 in blood plasma and pancreatic tissue perfusion in early experimental acute pancreatitis. *Langenbecks Arch Surg* 2002;386:587-591

椭圆形带膜记忆合金支架动物实验及治疗上段食管气管瘘25例

庞志锋, 庞岩, 汪洋

庞志锋, 庞岩, 濮阳市人民医院消化内科 河南省濮阳市 457000
 汪洋, 天水长控医院内科 甘肃省天水市 741018
 项目负责人: 庞志锋, 457000, 河南省濮阳市人民医院消化内科。
 电话: 0393-4402179
 收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-03-26

摘要

目的: 探索改形带膜记忆合金支架(椭圆形)治疗上段食管气

管瘘的临床可行性。

方法: 在动物实验的基础上对25例手术后、放疗及晚期食管癌导致的上段食管气管瘘患者,采用内镜放置改形特制的椭圆形记忆合金支架进行治疗。

结果: 未见因上段置放支架所引起的移位、穿孔、出血及特殊远期不适,堵漏率100%。治疗稳定期9.1 mo,生存

3 讨论

急性出血坏死性胰腺炎目前仍是临床常见死亡率较高的疾病，其发病机制未完全明确，且无特效的治疗药物和方法，故仍是临床和基础研究的热点。制备理想的急性出血坏死性胰腺炎模型是研究其发病机制和评价药物疗效的主要手段。造模方法有食物或药物(雨蛙素)诱导法、胰管内注射诱导法、胰管结扎诱导法和十二指肠闭襻法等^[1,3-6]。其中食物或药物诱导法多用于制造水肿型胰腺炎模型，十二指肠闭襻法由于不符合生理条件且存活率较低，不适合进行药物评价尤其是观察胰腺损伤后的恢复情况。胰管内注射诱导法更接近生理条件，多用于制备急性出血坏死性胰腺炎，常用的注射液有30-50 g/L牛磺胆酸钠，糖脱氧胆酸，自身胆汁等^[7-9]，但牛磺胆酸钠，糖脱氧胆酸价格较昂贵，自身胆汁则方便、便宜。常用的造模动物有犬、猪、兔和大鼠等^[10-12]，犬模型操作方便但费用较高，且有品种上的差异；大鼠较便宜但操作困难且不易长期饲养，死亡率高。兔模型则价格相对便宜、易饲养，存活率高。我们通过兔胰管内逆行注射自身胆汁法诱导的重症胰腺炎模型是根据胆汁反流入胰管，激活胰蛋白酶原，引起胰腺自身消化和全身炎症反应，是人类急性胰腺炎常见的发病因素，且与胆源性胰腺炎病理生理相仿^[1]。本模型与对照组比较，胰腺组织均出现典型的急性出血坏死性胰腺炎的病理改变，且比较集中，无明显差异，证明该方法稳定可靠，操作简单，重复性好，费用低，且死亡率低。通过兔急性胰腺炎模型的建立，我们可以进一步观察比较不同药物对重症胰腺炎的作用效果及胰腺的恢复情况，以指导临床用药，降低胰腺炎的死亡率。

4 参考文献

1 沈魁, 钟守先, 张圣道. 胰腺外科. 第1版. 北京: 人民卫生出版社,

- 2000;629-631
 2 Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute Pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992; 215:44-56
 3 Hirano T, Hirano K. Glucagon ameliorates pancreatic subcellular redistribution of lysosomal enzyme in rats with acute pancreatitis of closed duodenal loop. *Dig Surg* 1999; 16:16-21
 4 Eibl G, Forgacs B, Hotz HG, Buhr HJ, Foitzik T. Endothelin A but not endothelin B receptor blockade reduces capillary permeability in severe experimental panreatitis. *Pancreas* 2002; 25:15-20
 5 Urunuela A, Manso MA, de-la-Mano AM, Sevillano S, Orfao A, de-Dios I. Asynchronous impairment of calcium homoeostasis in different acinar cells after pancreatic duct obstruction in rat. *Clin Sci (Lond)* 2002;102:615-622
 6 Cui HF, Bai ZL. Protective effects of transplanted and mobilized bone marrow stem cells on mice with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2274-2277
 7 Foitzik T, Hotz HG, Hotz B, Wittig F, Buhr HJ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 (cox-2) reduces prostaglandin E2 production and attenuates systemic disease sequelae in experimental pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1159-1162
 8 Strate T, Mann O, Kleinhans H, Schneider C, Knoefel WT, Yekebas E, Standl T, Bloechle C, Izicki JR. Systemic intravenous infusion of bovine hemoglobin significantly reduces microcirculatory dysfunction in experimental induced pancreatitis in the rat. *Ann Surg* 2003;238:765-771
 9 Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Takase K, Nishikawa J, Kuroda Y. Splenic atrophy in experimental severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2002;24:365-372
 10 Kinnala PJ, Kuttilla KT, Gronroos JM, Havia TV, Nevalainen TJ, Niinikoski JH. Splanchnic and pancreatic tissue perfusion in experimental acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37:845-849
 11 Qin HL, Su ZD, Hu LG, Ding ZX, Lin QT. Effect of early intrajejunal nutrition on pancreatic pathological features and gut barrier function in dogs with acute pancreatitis. *Clin Nutr* 2002;21:469-473
 12 Kinnala PJ, Gronroos JM, Kuttilla KT, Havia TV, Nevalainen TJ, Peltola O, Niinikoski JH. Catalytic activity of phospholipase A2 in blood plasma and pancreatic tissue perfusion in early experimental acute pancreatitis. *Langenbecks Arch Surg* 2002;386:587-591

椭圆形带膜记忆合金支架动物实验及治疗上段食管气管瘘25例

庞志锋, 庞岩, 汪洋

庞志锋, 庞岩, 濮阳市人民医院消化内科 河南省濮阳市 457000
 汪洋, 天水长控医院内科 甘肃省天水市 741018
 项目负责人: 庞志锋, 457000, 河南省濮阳市人民医院消化内科。
 电话: 0393-4402179
 收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-03-26

摘要

目的: 探索改形带膜记忆合金支架(椭圆形)治疗上段食管气

管瘘的临床可行性。

方法: 在动物实验的基础上对25例手术后、放疗及晚期食管癌导致的上段食管气管瘘患者,采用内镜放置改形特制的椭圆形记忆合金支架进行治疗。

结果: 未见因上段置放支架所引起的移位、穿孔、出血及特殊远期不适,堵漏率100%。治疗稳定期9.1 mo,生存

期平均10.4 mo.

结论:符合上段食管生理解剖特点,可避免喇叭口状支架治疗食管疾病只限于中下段才能放置的弊端,证明了他的可行性和安全性。

庞志锋,庞岩,汪洋.椭圆形带膜记忆合金支架动物实验及治疗上段食管气管瘘25例.世界华人消化杂志 2004;12(6):1474-1476

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1474.asp>

0 引言

后天性食管气管瘘最常见的原因多为食管癌术后、放疗及晚期癌肿浸蚀食管所致,带膜记忆合金支架治疗该类疾病虽被国内外学者所公认(以下简称支架),但目前一般仍就认为只适用于食管的中下段病变,为了探索支架是否能应用于食管上段病变及他的可行性,我们和常州智业医疗仪器研究所协作,根据食管上段的解剖生理特点,经反复研究和动物实验,将支架上沿口由原来的喇叭口形改为特制的椭圆形状,从而较好解决了喇叭口形支架不能应用于上段病变置放的弊端。1996-12/2001-08共治疗食管癌上段食管气管瘘患者25例接受了椭圆形支架的治疗,效果较好,报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 胃镜为Pestax电子胃镜EG-290P,扩张器为瑞士产Charrier-Breoa,支架为江苏常州智业医疗仪器研究所生产,将支架口上沿由原喇叭口形状改为椭圆形,椭圆形无膜部由原1cm缩短至0.3cm,下沿呈喇叭口形,直径约2.5cm,支架长度40mm,60mm,100mm,120mm不等,网格呈菱形。术前尽量不采用常规X线吞钡摄片,以防止钡剂漏入气管。实验动物:精选良种健康兔子5只,雌雄不限,体重2.5-3kg。患者25例,男17例,女8例,年龄40-76(平均54.6岁);食管癌放弃手术6例,放疗后8例,手术后11例。瘘口距门齿18cm6例,19cm11例,20cm8例。瘘口直径1.0cm15例,1.2cm6例,1.5cm3例,1例因瘘口小,周围组织增生而偏位,弯曲影响视野,观察不清,故在胃镜直视下经活检孔插管推注碘油依靠X线造影证实。17例入院时有发热,全有消瘦,脱水,13例有咳黄色痰液,胸闷、憋气、肺部湿罗音等感染症状,3例合并口腔、食管霉菌感染,X线胸片示液气胸4例,肺不张1例。

1.2 方法 无菌条件下,麻醉后切开兔子颈部皮肤,游离出食管壁,将选择好的支架在内镜引导下,分别置入距门齿18cm3个,19cm2个,术后2-8d,所有实验兔子均给半流质热饮食,8d后给普食。密切观察实验兔子进食、躁动、体重变化。然后将5只兔子分别在2,4,6wk处死,观察支架局部有无出血、穿孔、移位、梗阻等变化。患者术前肌肉注射杜冷丁50mg,解痉灵20mg,咽部用20g/L利多卡因麻醉,患者左

侧卧位于检查台上,首先在内镜直视下观察瘘口部位,确认瘘口,如辨认困难,应用碘油直接从内镜活检孔插管注入,借助X线造影证实,以确保安全性。首先从内镜活检孔插入导丝,使之通过瘘口及狭窄部,留置导丝,退出内镜,如食管气管瘘同时合并狭窄,应常规扩张使食管直径达13mm,然后就按操作常规放置支架,置入支架时应使支架口上沿的椭圆形部与食管的第一个生理性狭窄部轴位相吻合,重新进镜观察,如置入成功,即让患者饮热水,不出现呛咳一般证明瘘口封闭,然后用热稀钡剂口服造影,在X线下钡剂不漏入支气管内证明手术成功。

2 结果

术后5只实验兔子在上段支架置入后2wk内食量减少,有躁动,3只兔子有间断呕吐,但无哽噎的表现,2-6wk内,饮食基本恢复正常,以上症状减轻或消失,体重无明显变化。置入支架局部表现:术后2wk见局部食管组织中度增生、充血、糜烂、水肿、渗出、浅表性溃疡明显好转,但充血严重,支架仍通畅无移位。患者25例置入带膜椭圆形支架共26个(有1例因在10mo时误入鱼刺致使支架膜破裂重新置放),支架放置成功率100%,堵漏率100%,术后观察,25例支架置入后7d内均有不同程度的胸骨后疼痛,其中有2例在40d时仍有不适感,但均能忍受,未做特殊处理,以后渐好转,余23例均在7-10d内症状消失,25例患者除已完成放疗的8例,不愿意接受放疗的2例外,余15例均行放疗,随访21例,4例失访,超过4mo者8例,12mo者9例,18mo者3例,24mo者1例。平均生存期10.4mo,未接受放疗的2例分别在40,60d时支架边缘长出新生物,经用微波处理后好转,3例在吃肉时引起梗阻,处理后消失,余未见支架移位、穿孔、出血等并发症。

3 讨论

据Venu et al^[1]报道,对恶性狭窄者置入带膜支架,不但具有持续稳定的扩张作用,而且还有防止肿瘤向腔内生长,治疗食管气管瘘,减少肺部并发症等作用,但只能局限于中下段的治疗。我们认为:(1)食管在不注气的自然状态下呈扁狭的管状,在第一个生理性狭窄区更是如此,是各狭窄区中最小部分,内径只有约1.5cm左右,但食管中段以下部分由于充气及进食后形状可改变成近圆筒状态,以利于食物通过,但第一个生理性狭窄区自然形态相对固定,不可能随意改变,将无膜部缩短至0.3cm,形状改成椭圆形,由上固定改成下固定,从而较好解决了无效支架位置升高、固定、通畅的3个功能,是安全有效的;(2)食管上段属横纹肌,如果支架上口呈喇叭口形,在肌肉收缩时,由于二者的形状不能吻合,故磨擦力加大,很可能加重并发症的发生。尽管近年食管上段病变也可放置支架^[2-6],但因以上所

述原因，根据我们的经验，如支架不改形，术后产生的胸骨后疼痛、咽部不适、移位等并发症是无法解决的难题。

本文25例上段食管气管瘘患者，术后经平均近10 mo的观察，证明改形后的支架治疗上段食管气管瘘的疗效是确切的，本组所有患者在完成手术后即让患者饮热水，立即见呛咳消失，17例发热，13例咳黄色痰的患者经同时应用抗生素后均在7-10 d症状消失，11例手术后的食管癌性食管气管瘘患者中有2例带有胸部引流管，支架置放后第3 d因引流管内无分泌物而拔管，因此，可证明该疗法的可行性和安全性。但通过我们的观察有三点还是应引起重视。(1)因癌性瘘口即使放置了支架，但可能随着时间的延长瘘口还会扩大，因瘘口越大，支架膜因依托关系所承受的压力就越大，故手术后仍应注意不能进粗硬带骨性食物，以防支架膜破裂，本组就有1例因进食不慎发生了支架膜破裂；(2)支架膜应选择高分子，透氧不渗液的生物膜，要求生物相溶性好，具有超弹性和抗腐蚀性，以维持其长期疗效；(3)无论何段食管恶性狭窄及食管气管瘘，置放支架治疗均为一种姑息方法，要维持较长时间的疗效，必须配合放疗。上段因位置特殊，不可能象中、下段，一旦复

发，还可重新放置，因此强调上段术后放疗等综合治疗更为重要^[7-10]。

4 参考文献

- 1 Venu RP, Pastika BJ, Kini M, Chua D, Christian R, Schlaes J, Brown RD. Self-expandable metal stents for malignant gastric outlet obstruction: a modified technique. *Endoscopy* 1998;30:553-558
- 2 Bethge N, Vakil N. A prospective trial of a new self-expanding plastic stent for malignant esophageal obstruction. *Gastroenterology* 2001;96:1350-1354
- 3 Conio M, Blanch S, Munizzi F, Giacosa A. Metal stents in the cervical esophagus. *Gastrointestinal Endosc* 2002;55:964-965
- 4 Siersema PD, Schrauwen SL, van Blanckenstein M, Steyerberg EW, van der Gaast A, Tilanus HW, Dees J. Self-expanding metal stents for complicated and recurrent esophagogastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2001;54:579-586
- 5 McManus K, Khan I, McGuigan J. Self-expanding oesophageal stents: strategies for re-intervention. *Endoscopy* 2001;33:601-604
- 6 Lambret R. Treatment of esophagogastric tumors. *Endoscopy* 2000;32:322-330
- 7 傅剑华, 戎铁华, 黄植藩, 杨名添, 吴一龙. 三种类型腔内管置管术姑息治疗晚期食管癌的对照研究. 华人消化杂志 1998;6:984-986
- 8 智发朝, 朱建新, 梁农亮, 张兰军, 周丹, 潘德寿, 万田莫, 周殿元. 食管支架置入术治疗食管贲门癌性狭窄及瘘63例. 世界华人消化杂志 2000;8:947
- 9 李国昌, 袁魁. 小口径镍钛合金支架治疗食管上段癌术后狭窄2例. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊8):95
- 10 王苑东, 余国行, 高发芝. 进展晚期食管贲门癌的内镜治疗. 世界华人消化杂志 1999;7:777-779

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

• 研究快报 •

p53和p16在食管癌中的表达

李小飞, 刘 锰, 程庆书, 王小平, 汪 健, 卢 强, 刘 勇

李小飞, 刘锰, 程庆书, 王小平, 汪健, 卢强, 刘勇, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院胸外科 陕西省西安市 710038
项目负责人: 李小飞, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院胸外科。
电话: 029-83377437 传真: 029-83377436
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

摘要

目的: 研究p53和p16两种抑制基因蛋白在各级食管黏膜病变中的表达,探讨食管癌发生发展过程中分子生物学基础的变化。

方法: 应用ABC免疫组方法对134例食管各级病变组织进行p53和p16蛋白表达研究。

结果: p53蛋白表达随着病变的加重其表达也在不断升高。相反, p16蛋白表达随病变的加重而呈下降趋势, 此外, 二者在60例食管癌组织中的表达显著相关($P < 0.005$), 即p53表达阳性组的p16表达阳性率显著低于p53表达阴性

组的p16阳性率。

结论: 抑癌基因p16的异常表达是食管癌变过程中的早期事件, p53基因的突变可能对p16蛋白的表达起负调节作用。

李小飞, 刘锰, 程庆书, 王小平, 汪健, 卢强, 刘勇. p53和p16在食管癌中的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1476-1478
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1476.asp>

0 引言

在食管癌变过程中, 多种癌基因的激活和抑癌基因的失活发挥着极其重要的作用^[1-2]。本文应用ABC免疫组化技术, 检测了抑癌基因p53及p16在134例食管组织中的表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料 随机选用我科1994年以来食管活检组织134

述原因，根据我们的经验，如支架不改形，术后产生的胸骨后疼痛、咽部不适、移位等并发症是无法解决的难题。

本文25例上段食管气管瘘患者，术后经平均近10 mo的观察，证明改形后的支架治疗上段食管气管瘘的疗效是确切的，本组所有患者在完成手术后即让患者饮热水，立即见呛咳消失，17例发热，13例咳黄色痰的患者经同时应用抗生素后均在7-10 d症状消失，11例手术后的食管癌性食管气管瘘患者中有2例带有胸部引流管，支架置放后第3 d因引流管内无分泌物而拔管，因此，可证明该疗法的可行性和安全性。但通过我们的观察有三点还是应引起重视。(1)因癌性瘘口即使放置了支架，但可能随着时间的延长瘘口还会扩大，因瘘口越大，支架膜因依托关系所承受的压力就越大，故手术后仍应注意不能进粗硬带骨性食物，以防支架膜破裂，本组就有1例因进食不慎发生了支架膜破裂；(2)支架膜应选择高分子，透氧不渗液的生物膜，要求生物相溶性好，具有超弹性和抗腐蚀性，以维持其长期疗效；(3)无论何段食管恶性狭窄及食管气管瘘，置放支架治疗均为一种姑息方法，要维持较长时间的疗效，必须配合放疗。上段因位置特殊，不可能象中、下段，一旦复

发，还可重新放置，因此强调上段术后放疗等综合治疗更为重要^[7-10]。

4 参考文献

- 1 Venu RP, Pastika BJ, Kini M, Chua D, Christian R, Schlaes J, Brown RD. Self-expandable metal stents for malignant gastric outlet obstruction: a modified technique. *Endoscopy* 1998;30:553-558
- 2 Bethge N, Vakil N. A prospective trial of a new self-expanding plastic stent for malignant esophageal obstruction. *Gastroenterology* 2001;96:1350-1354
- 3 Conio M, Blanch S, Munizzi F, Giacosa A. Metal stents in the cervical esophagus. *Gastrointestinal Endosc* 2002;55:964-965
- 4 Siersema PD, Schrauwen SL, van Blanckenstein M, Steyerberg EW, van der Gaast A, Tilanus HW, Dees J. Self-expanding metal stents for complicated and recurrent esophagogastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2001;54:579-586
- 5 McManus K, Khan I, McGuigan J. Self-expanding oesophageal stents: strategies for re-intervention. *Endoscopy* 2001;33:601-604
- 6 Lambret R. Treatment of esophagogastric tumors. *Endoscopy* 2000;32:322-330
- 7 傅剑华, 戎铁华, 黄植藩, 杨名添, 吴一龙. 三种类型腔内管置管术姑息治疗晚期食管癌的对照研究. 华人消化杂志 1998;6:984-986
- 8 智发朝, 朱建新, 梁农亮, 张兰军, 周丹, 潘德寿, 万田莫, 周殿元. 食管支架置入术治疗食管贲门癌性狭窄及瘘63例. 世界华人消化杂志 2000;8:947
- 9 李国昌, 袁魁. 小口径镍钛合金支架治疗食管上段癌术后狭窄2例. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊8):95
- 10 王苑东, 余国行, 高发芝. 进展晚期食管贲门癌的内镜治疗. 世界华人消化杂志 1999;7:777-779

p53 和 p16 在食管癌中的表达

李小飞, 刘 锰, 程庆书, 王小平, 汪 健, 卢 强, 刘 勇

李小飞, 刘锰, 程庆书, 王小平, 汪健, 卢强, 刘勇, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院胸外科 陕西省西安市 710038
项目负责人: 李小飞, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院胸外科。
电话: 029-83377437 传真: 029-83377436
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-01

摘要

目的: 研究 p53 和 p16 两种抑制基因蛋白在各级食管黏膜病变中的表达, 探讨食管癌发生发展过程中分子生物学基础的变化。

方法: 应用 ABC 免疫组方法对 134 例食管各级病变组织进行 p53 和 p16 蛋白表达研究。

结果: p53 蛋白表达随着病变的加重其表达也在不断升高。相反, p16 蛋白表达随病变的加重而呈下降趋势, 此外, 二者在 60 例食管癌组织中的表达显著相关($P < 0.005$), 即 p53 表达阳性组的 p16 表达阳性率显著低于 p53 表达阴性

组的 p16 阳性率。

结论: 抑癌基因 p16 的异常表达是食管癌变过程中的早期事件, p53 基因的突变可能对 p16 蛋白的表达起负调节作用。

李小飞, 刘锰, 程庆书, 王小平, 汪健, 卢强, 刘勇. p53 和 p16 在食管癌中的表达. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1476-1478
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1476.asp>

0 引言

在食管癌变过程中, 多种癌基因的激活和抑癌基因的失活发挥着极其重要的作用^[1-2]。本文应用 ABC 免疫组化技术, 检测了抑癌基因 p53 及 p16 在 134 例食管组织中的表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料 随机选用我科 1994 年以来食管活检组织 134

例(表1)。食管癌60例中均有不同程度胸骨后不适,进食困难、消瘦、贫血等。食管癌上段3例(5.0%),上中段5例(8.3%),中段28例(46.7%),下段24例(40.0%)。p53单克隆抗体DO-7,p16兔多克隆抗体及ABC试剂盒均购于Dako公司。p53单抗稀度为1:100,p16抗体则为1:50,切片封闭前用柠檬酸缓冲液进行抗原修复。

1.2 方法 ABC免疫组化法:石蜡切片常规脱蜡至水,3 g/L过氧化氢-甲醇封闭30 min,漂洗后柠檬酸中加热抗原修复5 min,而后依次加入一抗(p53,p16)4℃过夜,二抗37℃60 min,ABC复合物37℃60 min,DAB显色,苏木素复染,脱水封片。

统计学处理 经ABC免疫组化染色后,阳性细胞呈棕黄色或棕褐色,将所得数据进行 χ^2 检验。

表1 全部病例的基本临床/病理资料

| 病理性分组 | | n | 平均年龄(岁) | 男女比例 (男:女) |
|--------|----|-----------|---------|---------------|
| 食管鳞癌 | 早期 | 4(3.0%) | 49.7 | 3:1 |
| | 中期 | 51(38.1%) | 58.5 | 39:12 |
| | 晚期 | 5(3.7%) | 63.8 | 4:1 |
| 不典型增生 | | 30(22.4%) | 47.8 | 19:11 |
| 慢性炎症 | | 18(13.4%) | 41.3 | 10:8 |
| 正常食管黏膜 | | 26(19.4%) | 35.4 | 14:13 |

2 结果

2.1 p53和p16在各组中表达 经ABC免疫组化染色后,p53阳性表达仅见于细胞核内,在慢性炎症上皮细胞中偶见散在的弱阳性细胞。随着病变的加重,p53蛋白表达也逐渐增高且不典型增生组、鳞癌组与正常组比较有显著差别($P < 0.005$)。p16阳性表达主要位于细胞质中,在正常食管黏膜p16表达可高达85%。随着病变进展,其表达渐降低且以不典型增生幅度明显增大,其中不典型增生组、鳞癌组与正常黏膜组p16表达有显著差别($P < 0.05$,表2)。

表2 p53和p16在各组中表达

| 分组 | n | p53 (%) | p16 (%) |
|-------|----|---------|---------|
| 正常黏膜 | 26 | 0(0%) | 22(85%) |
| 慢性炎症 | 18 | 1(6%) | 14(78%) |
| 不典型增生 | 30 | 30(37%) | 17(57%) |
| 食管鳞癌 | 60 | 38(63%) | 28(47%) |

2.2 p53和p16蛋白在癌组织中表达的相互关系 60例食管鳞癌中p53表达阳性40例,p16表达阳性10例。p53表达阴性的20例中p16阳性占18例。经 χ^2 检验p53表达阳性组p16表达阳性率显著低于p53表达阴性组的p16的阳性率($P < 0.05$,表3)。

表3 p53和p16蛋白在癌组织中表达的相互关系

| n | 分组 | | p16 |
|---|-----|----|-----|
| | p53 | 阳性 | 阴性 |
| | | 10 | 30 |
| | | 18 | 2 |

3 讨论

3.1 p53表达与食管癌变r关系 肿瘤的发生是一个复杂的生物学过程,有许多癌基因和抑癌基因参与了这个过程^[3-4]。p53基因是存在于人体内的一种抑癌基因,他所编码的p53蛋白(野生型)作为细胞生长的监控器,监控着体内基因组的稳定性,若体内DNA发生损伤,他能识别损伤的DNA,让细胞停留于G₁期,通过足够的修理或凋亡,从而消除可能致癌的异常细胞。但是,当p53基因突变以后,其就失去了对细胞的监视作用,突变的p53基因便在细胞恶变中起着癌基因的作用^[5-6]。由于正常人体中野生型p53蛋白半衰期短,代谢不稳定且其含量低,而p53蛋白免疫组化阳性的病例绝大多数暗示p53基因突变的存在。在本实验60例鳞癌中,p53阳性表达率为63%,他与正常组和炎症组比较有显著差别($P < 0.05$)。这表明p53蛋白阳性表达37%,不难看出随着病变的进展,当食管黏膜从慢性炎症发展到不典型增生时,p53蛋白阳性表达也有一个质的飞跃。这一结果与Doak et al^[7]在食管癌及相应癌前病变组织中p53基因的研究一致。这提示p53基因的突变是食管癌发生的早期事件。因而p53基因可作为食管癌早期诊断的分子指标。

3.2 p16表达与食管癌变的关系 p16抑癌基因,又称多重肿瘤抑制基因(multiple tumor suppressor I,MTSI),位于人9号染色体的P21区域,全长8.5 kb,由2个内含子和3个外显子组成,其外显子编码一种细胞周期素依赖酶(CDK)抑制蛋白,分子量为160 000,故称p16蛋白。现认为细胞周期的正常演进依赖于周围蛋白和抑制蛋白的调节而完成^[8-10]。过度的周期蛋白激活或抑制蛋白失活,都会导致CDK的过度作用,从而引起细胞的非正常增生。目前研究表明,p16蛋白作为抑制蛋白,能与细胞周期蛋白激酶4(CDK4)结合,抑制CDK4细胞周期蛋白D复合物的催化活性,从而阻止调节细胞从G₁期进入S期,于是抑制细胞增生和恶性转化。因而,当p16基因失活时必将导致p16蛋白表达缺如,从而抑制肿瘤细胞增生能力降低^[5]。文献[11-13]报道p16基因在多种恶性肿瘤中发生突变且表达水平下降。在本文实验中,p16蛋白水平在正常黏膜中呈高表达(85%),随着病变发展其表达呈下降趋势,这种趋势以不典型增生为最明显的开始(57%),这提示p16蛋白表达可能出现在食管鳞癌发生的早期阶段。

3.3 p53和p16蛋白与食管癌变的关系 食管癌变是一个多阶段进行性发展的过程,在这个过程中,多种癌基因和抑癌基因之间的协同作用是不可少的^[14-16]。在本文

60例食管鳞癌中，40例p53蛋白阳性病例中，p16亦为阳性者10例。20例p53蛋白阴性病例中，p16阳性者18例，p53表达阳性组p16表达明显低于p53阴性组。这说明p53蛋白过度表达和p16蛋白表达缺失是食管癌常见和较早出现的事件。而且，他们的阳性表达有相反趋势^[17-19]。因而，p53可能对p16表达起着负调节作用。p53基因的突变将促使p16基因杂合子丢失而导致细胞增生的调控机制紊乱，使细胞进入恶变的状态^[20-21]。

总之，p53基因的激活和p16的失活均可见于从正常食管上皮-慢性炎症-不典型增生-鳞癌这一系列的组织学变化过程中，且p53基因的突变促使p16基因杂合子丢失，可能是食管鳞癌发生过程中先于组织形态学改变的一个早期分子生物学事件^[22]。

4 参考文献

- 1 Matsumoto T, Fujii H, Arakawa A, Yamasaki S, Sonoue H, Hattori K, Kajiyama Y, Hirose S, Tsurumaru M. Loss of heterozygosity analysis shows monoclonal evolution with frequent genetic progression and divergence in esophageal carcinosarcoma. *Hum Pathol* 2004;35:322-327
- 2 Takeuchi H, Ozawa S, Shih CH, Ando N, Kitagawa Y, Ueda M, Kitajima M. Loss of p16INK4a expression is associated with vascular endothelial growth factor expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer* 2004;109:483-490
- 3 Shen ZY, Xu LY, Li EM, Cai WJ, Shen J, Chen MH, Cen S, Tsao SW, Zeng Y. The multistage process of carcinogenesis in human esophageal epithelial cells induced by human papillomavirus. *Oncol Rep* 2004;11:647-654
- 4 Hu N, Wang C, Su H, Li WJ, Emmert-Buck MR, Li G, Roth MJ, Tang ZZ, Lu N, Giffen C, Albert PS, Taylor PR, Goldstein AM. High frequency of CDKN2A alterations in esophageal squamous cell carcinoma from a high-risk Chinese population. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39:205-216
- 5 Hamada M, Naomoto Y, Shirakawa Y, Yamatsuji T, Noma K, Motoki T, Nobuhisa T, Okawa T, Haisa M, Gunduz M, Matsuoka J, Tanaka N. p53 expression and p21 expression are mutually exclusive in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2004;11:57-63
- 6 Hattori K, Kajiyama Y, Tsurumaru M. Mutation of the p53 gene predicts lymph node metastases in Japanese patients with esophageal carcinoma: DNA and immunohistochemical analyses. *Dis Esophagus* 2003;16:301-306
- 7 Doak SH, Jenkins GJ, Parry EM, Griffiths AP, Shah V, Baxter JN, Parry JM. Characterisation of p53 status at the gene, chromosomal and protein levels in oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2003;89:1729-1735
- 8 Zhang JH, Li Y, Wang R, Wen DG, Wu ML, He M. p53 gene polymorphism with susceptibility to esophageal cancer and lung cancer in Chinese population. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2003;25:365-367
- 9 Xing D, Tan W, Lin D. Genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer among Chinese population. *Oncol Rep* 2003;10:1615-1623
- 10 Ueno H, Hirai T, Nishimoto N, Hihara J, Inoue H, Yoshida K, Yamashita Y, Toge T, Tsubota N. Prediction of lymph node metastasis by p53, p21(Waf1), and PCNA expression in esophageal cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2003;22:239-245
- 11 Xing Y, Ning Y, Ru LQ, Wang LD. Expressions of PCNA, p53, p21(WAF-1) and cell proliferation in fetal esophageal epithelia: comparative study with adult esophageal lesions from subjects at high-incidence area for esophageal cancer in Henan, North China. *World J Gastroenterol* 2003;9:1601-1603
- 12 Rosa AR, Schirmer CC, Gurski RR, Meurer L, Edelweiss MI, Kruel CD. Prognostic value of p53 protein expression and vascular endothelial growth factor expression in resected squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus* 2003;16:112-118
- 13 Wang LD, Liu B, Zheng S. Analysis of p53 mutational spectra of esophageal squamous cell carcinomas from Linzhou, comparison with esophageal and other cancers from other areas. *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* 2003;24:202-205
- 14 Zhang L, Lu W, Miao X, Xing D, Tan W, Lin D. Inactivation of DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relation to p53 mutations in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2003;24:1039-1044
- 15 Casson AG, Evans SC, Gillis A, Porter GA, Veugelers P, Darnton SJ, Guernsey DL, Hainaut P. Clinical implications of p53 tumor suppressor gene mutation and protein expression in esophageal adenocarcinomas: results of a ten-year prospective study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;125:1121-1131
- 16 Sur M, Sur RK, Cooper K, Bizios D. Preliminary report on the effect of brachytherapy on expression of p53, bc1-2 and apoptosis in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *S Afr J Surg* 2003;41:14-20
- 17 Nishikawa T, Salim EI, Morimura K, Kaneko M, Ogawa M, Kinoshita A, Osugi H, Kinoshita H, Fukushima S. High susceptibility of p53 knockout mice to esophageal and urinary bladder carcinogenesis induced by N, N-dibutylnitrosamine. *Cancer Lett* 2003;194:45-54
- 18 Casson AG, Zheng Z, Chiasson D, MacDonald K, Riddell DC, Guernsey JR, Guernsey DL, McLaughlin J. Associations between genetic polymorphisms of Phase I and II metabolizing enzymes, p53 and susceptibility to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Detect Prev* 2003;27:139-146
- 19 Chen H, Wang LD, Guo M, Gao SG, Guo HQ, Fan ZM, Li JL. Alterations of p53 and PCNA in cancer and adjacent tissues from concurrent carcinomas of the esophagus and gastric cardia in the same patient in Linzhou, a high incidence area for esophageal cancer in northern China. *World J Gastroenterol* 2003;9:16-21
- 20 Nakamura T, Ide H, Eguchi R, Hayashi K, Takasaki K. Comitant analysis of p16/INK4, cyclin D1, and retinoblastoma protein expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003;50:1321-1326
- 21 Wu CM, Huang TH, Xie QD, Wu DS, Xu XH. Expression properties of recombinant pEgr-P16 plasmid in esophageal squamous cell carcinoma induced by ionizing irradiation. *World J Gastroenterol* 2003;9:2650-2653
- 22 Matsumoto M, Furihata M, Kurabayashi A, Araki K, Sasaguri S, Ohtsuki Y. Association between inducible nitric oxide synthase expression and p53 status in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2003;64:90-96

• 研究快报 •

肝癌细胞抗原致敏树突状细胞体外诱导特异性细胞毒T淋巴细胞

谢裕安, 罗小玲, 梁安民, 匡志鹏, 吴继宁

谢裕安, 罗小玲, 梁安民, 匡志鹏, 吴继宁, 广西医科大学肿瘤医院
广西壮族自治区南宁市 530021
广西回国基金项目“树突状细胞介导的肿瘤免疫与基因治疗”, No.
桂科回 0009008
项目负责人: 梁安民, 530021, 广西壮族自治区南宁市, 广西医科大学肿瘤
医院. kgzhou@163.com
电话: 0771-5310045 传真: 0771-5312000
收稿日期: 2004-06-27 接受日期: 2004-08-16

摘要

目的: 探讨原发性肝癌患者外周血树突状细胞(DC)体外经自体肝癌细胞抗原致敏后, 对特异性细胞毒T淋巴细胞(CTL)的诱导作用.

方法: 肝癌患者外周血经梯度密度离心法分离, 获得DC前体细胞, 用重组人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)和重组人白介素-4(rhIL-4)联合培养, 诱导扩增DC. 制备自体肝癌细胞抗原, 体外脉冲DC, 检测DC诱导自体T细胞增生能力及特异性CTL在体外对自体肝癌细胞的杀伤活性.

结果: 经自体肝癌细胞抗原致敏的DC能诱导较强的自体T细胞增生, 且能诱导特异性CTL, 该CTL对自体肝癌细胞具有很强的杀伤活性, 杀伤率明显高于DC、未经肝癌细胞抗原致敏的DC激活的CTL及T淋巴细胞的杀伤率, 而对CT26细胞、BEL-7402细胞无明显的杀伤作用.

结论: 肝癌患者外周血DC体外能诱导高效而特异的抗肝癌免疫, 提示DC可能在肿瘤治疗及预防其复发与转移中发挥重要作用.

谢裕安, 罗小玲, 梁安民, 匡志鹏, 吴继宁. 肝癌细胞抗原致敏树突状细胞体外诱导特异性细胞毒T淋巴细胞. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1479-1481
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1479.asp>

0 引言

免疫治疗是现代肿瘤综合治疗的一种重要手段. 随着肿瘤免疫理论的突破和分子生物学技术的发展, 提出了肿瘤疫苗的概念, 其基本策略是通过肿瘤抗原特异性细胞毒性T细胞(CTL)的激活而诱导抗肿瘤的免疫反应. 现已制备了肿瘤细胞疫苗、肿瘤核酸疫苗、肿瘤基因工程疫苗等, 但这些疫苗的一个共同弱点是不能刺激有效的T细胞介导的免疫反应, 这表明抗肿瘤免疫反应不是由肿瘤细胞直接提呈给未致敏的T细胞, 而是先转移肿瘤抗原给抗原提呈细胞(APC), 再由APC激活免疫系统. 树突状细胞(dendritic, DC)是抗原提呈功能最强的APC, 也是目前发现的惟一能激活初始型T细胞增生并建立初级免疫反应的细胞, 在启动抗肿瘤免疫反应

中起关键作用^[1-5]. 我们在原发性肝癌患者外周血DC经自体肝癌细胞抗原激活后, 观察其在体外能否刺激自体T细胞增生和诱导的肿瘤特异性CTL细胞毒活性, 为临床应用DC免疫治疗肝癌提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 rhGM-CSF、rhIL-4、丝裂霉素C购自Sigma公司; 抗人CD83McAb购自PharMingen公司; 淋巴细胞分离液为上海生化试剂二厂产品; RPMI-1640细胞培养基、T细胞尼龙柱购自美国GIBICO公司; ³H-TdR购自北京原子能研究所; 乳酸脱氢酶(LDH)4h释放法杀伤活性测定试剂盒为美国Promega公司生产. CT26人结肠癌细胞、BEL-7402人肝癌细胞由本室传代培养. 临床确诊的原发性肝癌患者10例, 男8例, 女2例, 年龄30-65岁, 平均47.5岁, 均未接受过任何抗肿瘤治疗. 手术当天术前抽取外周静脉血, 用于分离、纯化外周血单个核细胞(PBMC)和T淋巴细胞.

1.2 方法

1.2.1 分离、纯化肝癌患者外周血PBMC和T淋巴细胞 取肝癌患者抗凝外周全血用常规密度梯度离心法分离PBMC, 部分PBMC用于诱导DC; 部分PBMC采用尼龙棉柱分离法分离T细胞, 用台盼蓝染色后在倒置显微镜下计数活细胞数应>95%, 并用培养液配成3×10⁶细胞/mL备用.

1.2.2 肝癌细胞的分离 将手术切取的肝癌组织, 用淋巴细胞分离液, 采用不连续密度梯度离心法分离获得肝癌细胞, 肝癌细胞分2部分, 一部分用于制备肝癌全细胞抗原, 一部分用RPMI-1640常规培养, 用作细胞毒实验的靶细胞.

1.2.3 肝癌全细胞抗原肽的制备 用RPMI-1640调整肝癌细胞浓度至1×10⁷, 反复冻融(-80℃/37℃)4次, 作为肝癌抗原.

1.2.4 DC的体外诱导及肿瘤抗原冲击致敏DC 以含150mL/L FCS的RPMI-1640(完全培养基)调整PBMC浓度至3×10⁶/mL加入6孔板中(3mL/孔), 37℃, 50mL/L CO₂孵箱培养2h, 轻轻吸弃非黏附细胞, 而获得贴壁的单核细胞, 每孔再加入含rhGM-CSF 100ng/mL和rhIL-4 100ng/mL的完全培养基, 常规培养, 每3d换液1次, 换液时加等浓度的rhGM-CSF和rhIL-4. 在培养的第4d将DC和肝癌全细胞抗原共培养, 第6d收集DC, 即为肝癌抗原肽冲击致敏的DC, 以抗CD83McAb特异显示诱导培养后的DC. 冲击后的细胞用培养基洗2遍, 重悬于RPMI-1640细胞培养液中备用.

1.2.5 抗原致敏DC刺激自体T细胞增生能力的检测 收集培养第7d的抗原致敏及未致敏的DC作为刺激细胞, 分别用完全培养基调整细胞浓度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$, 加入丝裂霉素C $25\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$, 37°C 孵育45min, 生理盐水洗涤3次, 完全培养基悬浮, 分别以 $1 \times 10^3/\text{孔}$, $5 \times 10^3/\text{孔}$ 及 $1 \times 10^4/\text{孔}$ 加入96孔圆底培养板, 每组设3个复孔。再每孔加入自体T淋巴细胞 1×10^5 作为反应细胞, 终体积为 $200\text{ }\mu\text{L}$, 置 37°C , 50mL/L CO_2 孵箱培养96h, 于培养结束前16h加 $^3\text{H-TdR}$, $0.5\text{ }\mu\text{ci}/\text{孔}$ 。收集细胞, 液闪计数仪检测CPM值, 结果用3孔均值表示。

1.2.6 抗原致敏的DC刺激自体T细胞增生分化为CTL于多孔反应板中加入自体T淋巴细胞(1×10^5 , 作为反应细胞)、抗原致敏的DC(5×10^3 , 作为诱导细胞), 置 37°C , 50mL/L CO_2 孵箱培养, 于培养的第6d收集活细胞即为抗原致敏DC激活的CTL。同理诱导未经肝癌细胞抗原致敏DC激活的CTL。

1.2.7 细胞毒实验 抗原致敏DC激活的CTL作为效应细胞, 自体肝癌细胞、CT26细胞、BEL-7402细胞为靶细胞, 效靶比为 $50:1$ 。同时设立DC、未经肝癌细胞抗原致敏的DC激活的CTL及T淋巴细胞作为效应细胞的杀伤对照。采用乳酸脱氢酶(LDH)4h释放法检测CTL杀伤活性, 严格按照试剂盒说明书操作。置酶标仪上测 490 nm 的A值, 将A值代入公式中计算各效应细胞的杀伤活性。

$$\text{杀伤活性}(\%) = \frac{(A_{\text{实}} - A_{\text{空}}) - (A_{\text{效}} - A_{\text{空}}) - (A_{\text{靶}} - A_{\text{空}})}{(A_{\text{靶最大释放}} - A_{\text{靶校对}}) - (A_{\text{靶自然释放}} - A_{\text{空}})} \times 100$$

统计学处理 数据用 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 来表示, 采用SPASS统计软件进行计量资料的t检验。

2 结果

2.1 肝癌细胞抗原致敏DC刺激自体T细胞增生的能力 肝癌抗原致敏的DC具有较未经致敏的DC更强的激发T细胞增生的能力, 差异有显著意义($P < 0.01$, 图1)。

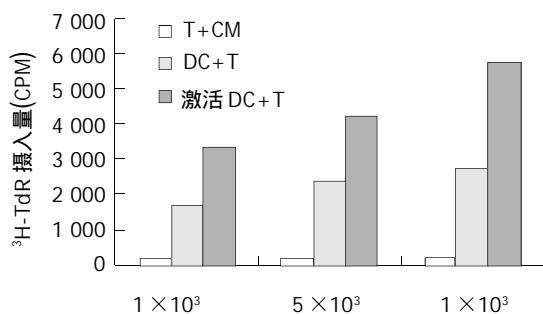


图1 抗原致敏的DC刺激同基因T细胞增生。

2.2 肝癌细胞抗原致敏DC诱导的CTL杀伤活性 肝癌抗原致敏DC诱导的CTL表现出很强的杀伤自体肝癌细胞的细胞毒活性, 杀伤率显著高于DC、未经肝癌细胞

抗原致敏的DC激活的CTL及T淋巴细胞的杀伤率, 而对CT26细胞、BEL-7402细胞无明显的杀伤作用; 未经抗原致敏DC诱导的CTL对自体肝癌细胞也有较强的杀伤作用; DC本身及未经DC激活的T细胞对自体肝癌细胞无杀伤作用。

表1 DC诱导的CTL杀伤活性比较

| 效应细胞 | n | 靶细胞 | 杀伤率(%) |
|-------------|----|------------|-------------------|
| 抗原致敏DC诱导CTL | 10 | 自体肝癌细胞 | 82.5 ± 12.3^a |
| 抗原致敏DC诱导CTL | 10 | CT26细胞 | 10.6 ± 4.5 |
| 抗原致敏DC诱导CTL | 10 | BEL-7402细胞 | 16.5 ± 7.5 |
| 未致敏DC诱导CTL | 10 | 自体肝癌细胞 | 48.8 ± 11.3 |
| DC | 10 | 自体肝癌细胞 | 0 |
| T细胞 | 10 | 自体肝癌细胞 | 0 |

^aP < 0.01 vs 其他组。

3 讨论

DC在免疫应答中起着调控地位:(1)机体的卫士;(2)免疫应答的始动者;(3)T细胞的强刺激者;(4)免疫耐受的诱导者。应用这种体内功能最强的APC即DC作为肿瘤疫苗的载体或称佐剂, 以肿瘤抗原体外冲击使其致敏, 或者说让DC负载着肿瘤抗原, 这样的疫苗进入体内保证肿瘤抗原被有效摄取、提呈, 且通过DC可提供攻击肿瘤细胞所必须的共刺激信号, 因此, DC疫苗是新一代的肿瘤疫苗, 可提供更有效的特异性主动免疫, 显示了比“常规”疫苗更明显的优越性^[6-14]。本实验结果表明, 联合应用rhGM-CSF和rhIL-4可从原发性肝癌患者外周血诱导扩增出大量DC, 该DC经自体肝癌细胞抗原体外脉冲致敏后, 能诱导自体T细胞增生和特异性CTL, 抗原致敏的DC对自体肝癌细胞具有很强的杀伤力, 而对CT26细胞、BEL-7402细胞无明显的杀伤作用, 说明抗原致敏DC诱导的CTL具有高效而特异的抗肿瘤作用。未经抗原致敏DC诱导的CTL对自体肝癌细胞也表现出一定的杀伤力。有关DC诱导的CTL抗肿瘤作用的机制目前尚不清楚, 可能与(1)DC表面有大量的树突状突起, 使之有利于大量接触抗原并提呈给CTL细胞;(2)DC高表达MHC I、II类分子和CD80/CD86等共刺激分子, 为CTL充分活化提供信号刺激;(3)DC分泌IL-12等多种细胞因子, 可维持和增强CTL的活性;(4)DC可通过分泌或外排一种具有抗原提呈能力的exosome小体来诱导免疫反应, 也增强了CTL的抗肿瘤能力;(5)CTL直接杀伤肿瘤细胞或分泌细胞因子诱导肿瘤细胞凋亡及抑制肿瘤细胞增生等机制有关。最近有报道DC可作为一种效应细胞直接杀伤肿瘤细胞^[15-16], 但我们在实验中未发现肝癌患者外周血DC在体外对自体肝癌细胞有直接的杀伤作用, 可能是DC不具备效应细胞功能, 也可能是体内和体外微环境不同造成的。总之, 本实验结果提示, 肿瘤抗原致敏的DC可作为一

种新型抗肿瘤疫苗在肿瘤治疗及预防其复发与转移中发挥重要作用。

4 参考文献

- 1 Austyn JM. Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies of dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(4 Pt 2):S146-150
- 2 Nair SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts. *Int J Cancer* 1997;70:706-715
- 3 Dubois B, Lamy PJ, Chemin K, Lachaux A, Kaiserlian D. Measles virus exploits dendritic cells to suppress CD4+ T-cell proliferation via expression of surface viral glycoproteins independently of T-cell trans-infection. *Cell Immunol* 2001;214: 173-183
- 4 Bedouet L, Bousser MT, Frison N, Boccaccio C, Abastado JP, Marceau P, Mayer R, Monsigny N, Roch AC. Uptake of dimannoside clusters and oligomannosides by human dendritic cells. *Biosci Rep* 2001;21:839-855
- 5 Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, Shalabi A, Shin T, Pardoll DM, Tsuchiya H. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 2001;193:839-846
- 6 Tang ZH, Qiu WH, Wu GS, Yang XP, Zou SQ, Qiu FZ. The immunotherapeutic effect of dendritic cells vaccine modified with interleukin-18 gene and tumor cell lysate on mice with pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:908-912
- 7 Chen Y, Emtage P, Zhu Q, Foley R, Muller W, Hitt M, Gauldie J, Wan Y. Induction of Erbb-2/neu-specific protective and therapeutic antitumor immunity using genetically modified dendritic cells: enhanced efficacy by cotransduction of gene encoding IL-12. *Gene Ther* 2001;8:316-323
- 8 Insug O, Ku G, Ertl HC, Blaszczyk-Thurin M. A dendritic cell vaccine induces protective immunity to intracranial growth of glioma. *Anticancer Res* 2002;22(2A):613-621
- 9 Kalady MF, Onaitis MW, Padilla KM, Emani S, Tyler DS, Pruitt SK. Enhanced dendritic cell antigen presentation in RNA-based immunotherapy. *J Surg Res* 2002;105:17-24
- 10 Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobylawski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Muller GA, Ringert RH. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 2000;6:332-336
- 11 Liu Y, Zhang W, Chan T, Saxena A, Xiang J. Engineered fusion hybrid vaccine of IL-4 gene-modified myeloma and relative mature dendritic cells enhances antitumor immunity. *Leuk Res* 2002;26:757-763
- 12 Kirk CJ, Hartigan-O'Connor D, Nickoloff BJ, Chamberlain JS, Giedlin M, Aukerman L, Mule JJ. T cell-dependent antitumor immunity mediated by secondary lymphoid tissue chemokine: augmentation of dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Res* 2001;61:2062-2070
- 13 Mackensen A, Drager R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000;49:152-156
- 14 Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, Kandemir A, Lee PP, Schuler G, Knop J, Enk AH. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 2001;93:243-251
- 15 Amigorena S. Exosomes derived from dendritic cells. *J Soc Biol* 2001;195:25-27
- 16 Amigorena S. Cancer immunotherapy using dendritic cell-derived exosomes. *Medicina (B Aires)* 2000;60(Suppl 2):51-54

血清、组织E-钙黏附素变化与结直肠癌根治手术的关系

蔡诚忠, 许洪卫, 童晓晨

蔡诚忠, 许洪卫, 童晓晨, 上海同济大学附属铁路医院普通外科
上海市 200072
项目负责人: 许洪卫, 200072, 上海市, 上海同济大学附属铁路医院普通外科。
收稿日期: 2004-02-07 接受日期: 2004-03-24

摘要

目的:通过检测结直肠癌患者血清E-钙黏附素(E-Cd)浓度和组织E-Cd的mRNA水平,探讨E-Cd与结直肠癌浸润和转移的关联性。

方法:应用酶联免疫黏附方法测定28例结直肠癌患者血清可溶性E-Cd浓度;应用点杂交法和计算机灰度扫描分析组织的mRNA灰度均值。

结果:结直肠癌组血清E-Cd浓度显著高于对照组($P < 0.001$),Dukes C组或有淋巴结转移组明显高于Dukes A、B组或无淋巴结转移组(P 均 < 0.05),切除瘤体后上述各组的血清E-Cd

浓度均明显下降($P < 0.01$ - 0.05)。各组的组织E-Cd mRNA均值变化与血清E-Cd浓度的一致,且两指标间具有明显的相关性($P < 0.05$)。

结论:血清、组织E-Cd可能与人结直肠癌的浸润深度和淋巴结转移密切相关。

蔡诚忠, 许洪卫, 童晓晨. 血清、组织E-钙黏附素变化与结直肠癌根治手术的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1481-1483
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1481.asp>

0 引言

E-钙黏附素(epithelial cadherin, E-Cd)又称上皮钙黏附素,属钙黏附素超家族经典亚族成员^[1],他的表达程度与功能活性状态直接影响着肿瘤细胞的脱离和再附着(1)本文通过检测结直肠癌患者血清E-Cd浓度和组织

种新型抗肿瘤疫苗在肿瘤治疗及预防其复发与转移中发挥重要作用。

4 参考文献

- 1 Austyn JM. Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies of dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(4 Pt 2):S146-150
- 2 Nair SK, Snyder D, Rouse BT, Gilboa E. Regression of tumors in mice vaccinated with professional antigen-presenting cells pulsed with tumor extracts. *Int J Cancer* 1997;70:706-715
- 3 Dubois B, Lamy PJ, Chemin K, Lachaux A, Kaiserlian D. Measles virus exploits dendritic cells to suppress CD4+ T-cell proliferation via expression of surface viral glycoproteins independently of T-cell trans-infection. *Cell Immunol* 2001;214: 173-183
- 4 Bedouet L, Bousser MT, Frison N, Boccaccio C, Abastado JP, Marceau P, Mayer R, Monsigny N, Roch AC. Uptake of dimannoside clusters and oligomannosides by human dendritic cells. *Biosci Rep* 2001;21:839-855
- 5 Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, Shalabi A, Shin T, Pardoll DM, Tsuchiya H. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med* 2001;193:839-846
- 6 Tang ZH, Qiu WH, Wu GS, Yang XP, Zou SQ, Qiu FZ. The immunotherapeutic effect of dendritic cells vaccine modified with interleukin-18 gene and tumor cell lysate on mice with pancreatic carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:908-912
- 7 Chen Y, Emtage P, Zhu Q, Foley R, Muller W, Hitt M, Gauldie J, Wan Y. Induction of Erbb-2/neu-specific protective and therapeutic antitumor immunity using genetically modified dendritic cells: enhanced efficacy by cotransduction of gene encoding IL-12. *Gene Ther* 2001;8:316-323
- 8 Insug O, Ku G, Ertl HC, Blaszczyk-Thurin M. A dendritic cell vaccine induces protective immunity to intracranial growth of glioma. *Anticancer Res* 2002;22(2A):613-621
- 9 Kalady MF, Onaitis MW, Padilla KM, Emani S, Tyler DS, Pruitt SK. Enhanced dendritic cell antigen presentation in RNA-based immunotherapy. *J Surg Res* 2002;105:17-24
- 10 Kugler A, Stuhler G, Walden P, Zoller G, Zobylawski A, Brossart P, Trefzer U, Ullrich S, Muller CA, Becker V, Gross AJ, Hemmerlein B, Kanz L, Muller GA, Ringert RH. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* 2000;6:332-336
- 11 Liu Y, Zhang W, Chan T, Saxena A, Xiang J. Engineered fusion hybrid vaccine of IL-4 gene-modified myeloma and relative mature dendritic cells enhances antitumor immunity. *Leuk Res* 2002;26:757-763
- 12 Kirk CJ, Hartigan-O'Connor D, Nickoloff BJ, Chamberlain JS, Giedlin M, Aukerman L, Mule JJ. T cell-dependent antitumor immunity mediated by secondary lymphoid tissue chemokine: augmentation of dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Res* 2001;61:2062-2070
- 13 Mackensen A, Drager R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000;49:152-156
- 14 Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, Kandemir A, Lee PP, Schuler G, Knop J, Enk AH. A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 2001;93:243-251
- 15 Amigorena S. Exosomes derived from dendritic cells. *J Soc Biol* 2001;195:25-27
- 16 Amigorena S. Cancer immunotherapy using dendritic cell-derived exosomes. *Medicina (B Aires)* 2000;60(Suppl 2):51-54

血清、组织E-钙黏附素变化与结直肠癌根治手术的关系

蔡诚忠, 许洪卫, 童晓晨

蔡诚忠, 许洪卫, 童晓晨, 上海同济大学附属铁路医院普通外科
上海市 200072
项目负责人: 许洪卫, 200072, 上海市, 上海同济大学附属铁路医院普通外科。
收稿日期: 2004-02-07 接受日期: 2004-03-24

摘要

目的:通过检测结直肠癌患者血清E-钙黏附素(E-Cd)浓度和组织E-Cd的mRNA水平,探讨E-Cd与结直肠癌浸润和转移的关联性。

方法:应用酶联免疫黏附方法测定28例结直肠癌患者血清可溶性E-Cd浓度;应用点杂交法和计算机灰度扫描分析组织的mRNA灰度均值。

结果:结直肠癌组血清E-Cd浓度显著高于对照组($P < 0.001$),Dukes C组或有淋巴结转移组明显高于Dukes A、B组或无淋巴结转移组(P 均 < 0.05),切除瘤体后上述各组的血清E-Cd

浓度均明显下降($P < 0.01$ - 0.05)。各组的组织E-Cd mRNA均值变化与血清E-Cd浓度的一致,且两指标间具有明显的相关性($P < 0.05$)。

结论:血清、组织E-Cd可能与人结直肠癌的浸润深度和淋巴结转移密切相关。

蔡诚忠, 许洪卫, 童晓晨. 血清、组织E-钙黏附素变化与结直肠癌根治手术的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1481-1483
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1481.asp>

0 引言

E-钙黏附素(epithelial cadherin, E-Cd)又称上皮钙黏附素,属钙黏附素超家族经典亚族成员^[1],他的表达程度与功能活性状态直接影响着肿瘤细胞的脱离和再附着(1)本文通过检测结直肠癌患者血清E-Cd浓度和组织

E-Cd 的 mRNA 水平，旨在探讨结直肠癌侵袭性和根治手术对 E-Cd 水平的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 选择确诊的结直肠癌患者 28 例，据病理报告和手术中探查结果，按 Dukes 分期和淋巴结转移情况分组(见表 1)。所有患者术前检查未发现心、肝、肺、肾等重要脏器的器质性病变，由同一组医师施行结直肠癌根治术。术前和术后 1 wk 未行放疗、化疗或生物治疗。另择 34 名健康献血员作为对照组。所有被检者年龄在 78~31 岁之间，男女比为 2:1，各组间的年龄均数均无显著性差异($P > 0.05$)。结直肠癌组取样时间为术前 1 wk 内、术后 5~7 d。

1.2 方法 取被检者的空腹周边静脉血 3 mL，用酶联免疫黏附法(ELISA)复管测定血清 E-Cd，其检测药盒购自 Sigma 公司，具体方法参见 Chan et al^[2] 报道。取新鲜结直肠癌及距癌边缘 5 cm 以上的非肿瘤组织标本，经液氮速冻后置 -80 °C 保存；异硫氰酸胍一步法抽提组织 RNA，以人类 E-Cd cDNA(地高辛标记)探针作点杂交(dot blot)分析，所得结果经计算机灰度扫描并自动测算出每个斑点的平均灰度均值(反映 mRNA 相对水平)。所有数据以 mean±SD 表示，用 t 检验等进行统计处理。

2 结果

术前结直肠癌组血清 E-Cd 浓度显著高于对照组($P < 0.001$)，Dukes C 组或有淋巴结转移组分别明显高于 Dukes A、B 组或无淋巴结转移组($P < 0.05$)；结直肠癌患者术后各组的血清 E-Cd 浓度均明显低于术前($P < 0.01$ ~ 0.05)，但各组间的差异无显著意义($P > 0.05$)，术后结直肠癌组血清 E-Cd 浓度与对照组亦无明显统计学差异($P > 0.05$)，见(表 1)。

表 1 62 例被检者血清 E-Cd 浓度(mg/L, mean±SD)

| 项目 | n | 术前 | 术后 |
|--------------|----|----------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 34 | 3.73 ± 0.75 | |
| 结直肠癌组 | 28 | 8.91 ± 1.65 $P < 0.01$ | 5.17 ± 1.81 |
| 临床分期 Dukes C | 17 | 9.83 ± 1.37 $P < 0.01$ | 5.69 ± 0.95 $P < 0.05$ |
| Dukes A、B | 11 | 7.49 ± 1.07 $P < 0.05$ | 4.37 ± 0.87 |
| 有淋巴结转移组 | 15 | 10.65 ± 1.48 $P < 0.01$ | 5.38 ± 1.19 $P < 0.05$ |
| 无淋巴结转移组 | 13 | 6.90 ± 1.19 $P < 0.05$ | 4.93 ± 0.79 $P > 0.05$ |

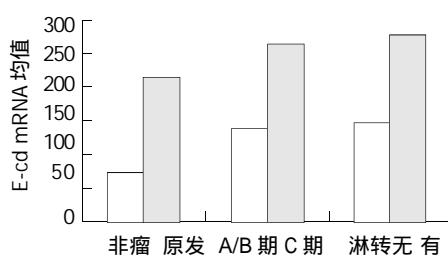


图 1 各组标本 Ecd mRNA 均值比较图。

结直肠癌组(原发灶)的 E-Cd mRNA 灰度均值(215 ± 47)明显高于非肿瘤组织组(71 ± 19 , $n=28$, $P < 0.01$, 后同)，Dukes C 组(265 ± 59)或伴有淋巴结转移组(280 ± 65)分别明显高于 Dukes A、B 组(138 ± 39)或无淋巴结转移组(147 ± 43 , $P < 0.05$)，见(图 1)。结直肠癌组织 E-Cd mRNA 水平与血清 E-Cd 浓度之间具有明显的正相关性($r = 0.782$, $P < 0.05$)。

3 讨论

肿瘤浸润、转移等恶性表型系瘤细胞与细胞外基质相互作用的结果，其关键步骤是瘤细胞脱离原发灶并再附着转移部位。E-Cd 等钙黏附素主要介导正常和肿瘤组织中细胞与细胞间的黏附^[3]。目前对 E-Cd 表达的研究涉及多种人体肿瘤，包括结直肠癌、肝癌、乳腺癌、前列腺癌等^[4]。尤其是国外一些研究小组据业与构建的 E-Cd cDNA 文库，采用先进的分子生物学方法，对结直肠癌等恶性肿瘤所进行的一系列实验和临床研究表明，E-Cd 失活或基因突变与其侵袭性密切相关^[4]。

血清可溶性 E-Cd 系细胞内 E-Cd 的降解物，是一种分子量为 80 kDa 的多肽。他存在于正常人的血液循环中，文献报道其浓度为 2.5~5.6 mg/L 之间；但恶性肿瘤患者中的浓度明显升高，介于 4.7~9.3 mg/L 之间^[2]。有关结直肠癌患者的血清 E-Cd 浓度检测，所见报道不多^[5]。本研究结直肠癌组的 E-Cd 浓度(8.91 ± 1.65 mg/L)显著高于对照组(3.73 ± 0.75 mg/L)，Dukes C 组或有淋巴结转移组血清 E-Cd 浓度明显高于 Dukes A、B 组或无淋巴结转移组，切除原发灶后上述两组的指标均明显下降，提示血清 E-Cd 浓度可能与人结直肠癌的浸润深度和淋巴结转移密切相关。与 Chan et al^[2] 对胃癌的研究结果一致，他们发现胃癌患者血清可溶性 E-Cd 浓度的对数均值显著高于对照组，且该指标的升高与胃癌的生长方式和远处转移密切相关。

一般将原发灶 E-Cd 的表达状况归结为 4 种类型^[4]：(1)全部瘤细胞同质性地显著表达 E-Cd；(2)瘤体内局灶性减低表达使 E-Cd 表达呈异质性分布，或瘤体内均匀性降低；(3)E-Cd 表达完全缺失；(4)瘤细胞虽然能表达 E-Cd 却未能相互黏附。大多数肿瘤属于前两型。本文采用的点杂交法测定组织 E-Cd mRNA 的相对水平，较免疫组化法更能反映 E-Cd 的生物活性。所得结果表明，Dukes C 型或伴有淋巴结转移的原发灶，其 E-Cd mRNA 表达水平分别明显高于 Dukes A、B 型或无淋巴结转移者。提示原发灶 E-Cd 表达水平也影响着结直肠癌的浸润深度和淋巴结转移。与文献[6]报道一致，该文作者们应用免疫组化和原位杂交两种方法，对 30 例散发性结直肠癌标本同时检测后发现，无论是 E-Cd 的蛋白表达还是 mRNA 表达水平，其原发灶均较非肿瘤组织明显升高。但有作者认为，人和鼠结直肠癌组织中经免疫组化检测的 E-Cd 表达明显降低，且与 Dukes 分期无关^[7]；另一组作者则发现，不仅原发灶 E-Cd 表达明显降低，而且转移性淋巴结和肝转移灶中的 E-Cd 表达明显增强^[8]。造成上述相反结论的原因尚不明了，可

能与检测方法不同有关。

鉴于血清 E-Cd 浓度和组织 E-Cd 表达水平与结直肠癌的侵袭性密切相关，并且健康对照者的血清 E-Cd 浓度明显低于结直肠癌患者、以及邻近非肿瘤组织的 E-Cd mRNA 水平显著低于结直肠癌组织。作者认为，全面分析纤维结肠镜活检组织或结直肠癌标本 mRNA 水平，同时结合检测血清 E-Cd 浓度，可能有助于评估结直肠癌的恶性演进状态，对该类患者的早期诊断、综合治疗和预后具有重要的指导意义。但 E-Cd 是否与结直肠癌特异性相关，以及 E-Cd 能否成为特异性肿瘤标记物，尚需从 E-Cd 的分子生物学等多方面作深入的探讨^[7-8]。

4 参考文献

1 许洪卫, 王元和, 高瀚. E-钙粘附素失活及其基因突变对恶性肿瘤侵袭倾向的影响. 癌症杂志 1996;15:70-71

- 2 Chan AO, Lam SK, Chu KM, Lam CM, Kwok E, Leung SY, Yuen ST, Law SY, Hui HM, Lai KC, Wong CY, Hu HC, Lai CL, Wong J. Soluble E-cadherin is a valid prognostic marker in gastric carcinoma. *Gut* 2001;48:808-801
- 3 许洪卫, 王元和, 高瀚. E-钙粘附素基因突变与胃癌恶性表型. 中国病理生理杂志 1997;13:751-755
- 4 许洪卫, 王元和, 高瀚. E-钙粘附素失活及其基因突变与肿瘤细胞黏附和转移的关系. 肿瘤杂志 1998;18:57-66
- 5 Velikova G, Banks RE, Gearing A, Hemingway I, Forbes MA, Preston SR, Hall NR, Jones M, Wyatt J, Miller K, Ward U, Al-Maskatti J, Singh SM, Finan PJ, Ambrose NS, Primrose JN, Selby PJ. Serum concentrations of soluble adhesion molecules in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;77:1857-1863
- 6 El-Bahrawy MA, Poulsom R, Jeffery R, Talbot I, Alison MR. The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:1216-1240
- 7 Sloncova E, Fric P, Kucerova D, Lojda Z, Tuhackova Z, Sovova V. Changes of E-cadherin and beta-catenin in human and mouse intestinal tumours. *Histochem J* 2001;33:13-20
- 8 Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N. Clinical significance of E-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma. *J Surg Oncol* 2001;77:201-208

雷尼替丁加连芪汤根除胃窦癌术后幽门螺杆菌疗效观察

黄力言, 龙家衡

黄力言, 龙家衡, 广东省农垦中心医院消化内科 广东省湛江市 524002
项目负责人: 黄力言, 524002, 广东省湛江市人民大道中2号, 广东省农垦中心医院消化内科。

电话: 0759-2633173 传真: 0759-2633693
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-03-12

摘要

目的: 观察用雷尼替丁加连芪汤根除胃癌胃大部分切除术后残胃幽门螺杆菌(*Helicobacter Pylori*, Hp)感染的疗效及其安全性。

方法: 将胃癌胃大部分切除术后残胃 Hp 感染患者分为两组, 治疗组56例, 用雷尼替丁加连芪汤治疗, 疗程为4 wk; 对照组57例, 用奥美拉唑、克拉霉素、甲硝唑三联治疗, 疗程1 wk。

结果: 两组 Hp 根除率: 治疗组和对照组, 按方案(PP)分析分别为: 81.82%(45/54)、79.25%(42/53), 按意图治疗(ITT)分析分别为 80.36%(45/56)、73.68%(42/57)。两组药物不良反应(ADR)发生率为 9.26%(5/54)、43.40%(23/53), $P < 0.01$ 。

结论: 雷尼替丁加连芪汤与质子泵抑制剂(PPI)为基础的三联疗法根除残胃 Hp 感染均有良好效果, 但雷尼替丁加连芪汤 ADR 更少, 依从性更佳。因此雷尼替丁加连芪汤是根除

残胃 Hp 较好的治疗方法。

黄力言, 龙家衡. 雷尼替丁加连芪汤根除胃窦癌术后幽门螺杆菌疗效观察. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1483-1485
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1483.asp>

0 引言

胃窦癌与幽门螺杆菌(*Helicobacter Pylori*, Hp)感染密切相关^[1], 胃癌患者在胃大部分切除术后根除 Hp 是预防残胃癌的复发、残胃炎、残胃溃疡的重要措施。因此胃癌术后必须作根除 Hp 治疗^[2]。根除 Hp 是否成功与患者的顺应性、抗生素的耐药性、感染 Hp 的疾病体等因素有关。胃大部分切除术后, 其胃肠解剖及生理发生了改变, 影响了胃的分泌、防御功能, 加之不同程度的胆汁反流, 胃内 pH 状态的变化等, 导致临幊上患者常有不同程度的消化功能障碍, 如上腹部痛、反酸、烧心、饱胀、嗳气, 部分患者还有不同程度的营养不良、贫血、消瘦。且胃癌术后患者多经过规范或不规范的抗肿瘤化疗, 药物的不良反应又使上述症状加重。中医辩证此类患者多为脾胃虚弱、气血两亏、湿热内蕴, 对药物的耐受性、顺应性较差, 影响 Hp 的根除效果。我们根据此类患者的特点, 选用雷尼替丁加中药连芪汤作为胃癌术后根除 Hp 的治疗方案, 并与质

能与检测方法不同有关。

鉴于血清 E-Cd 浓度和组织 E-Cd 表达水平与结直肠癌的侵袭性密切相关，并且健康对照者的血清 E-Cd 浓度明显低于结直肠癌患者、以及邻近非肿瘤组织的 E-Cd mRNA 水平显著低于结直肠癌组织。作者认为，全面分析纤维结肠镜活检组织或结直肠癌标本 mRNA 水平，同时结合检测血清 E-Cd 浓度，可能有助于评估结直肠癌的恶性演进状态，对该类患者的早期诊断、综合治疗和预后具有重要的指导意义。但 E-Cd 是否与结直肠癌特异性相关，以及 E-Cd 能否成为特异性肿瘤标记物，尚需从 E-Cd 的分子生物学等多方面作深入的探讨^[7-8]。

4 参考文献

1 许洪卫, 王元和, 高瀚. E-钙粘附素失活及其基因突变对恶性肿瘤侵袭倾向的影响. 癌症杂志 1996;15:70-71

- 2 Chan AO, Lam SK, Chu KM, Lam CM, Kwok E, Leung SY, Yuen ST, Law SY, Hui HM, Lai KC, Wong CY, Hu HC, Lai CL, Wong J. Soluble E-cadherin is a valid prognostic marker in gastric carcinoma. *Gut* 2001;48:808-801
- 3 许洪卫, 王元和, 高瀚. E-钙粘附素基因突变与胃癌恶性表型. 中国病理生理杂志 1997;13:751-755
- 4 许洪卫, 王元和, 高瀚. E-钙粘附素失活及其基因突变与肿瘤细胞黏附和转移的关系. 肿瘤杂志 1998;18:57-66
- 5 Velikova G, Banks RE, Gearing A, Hemingway I, Forbes MA, Preston SR, Hall NR, Jones M, Wyatt J, Miller K, Ward U, Al-Maskatti J, Singh SM, Finan PJ, Ambrose NS, Primrose JN, Selby PJ. Serum concentrations of soluble adhesion molecules in patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 1998;77:1857-1863
- 6 El-Bahrawy MA, Poulsom R, Jeffery R, Talbot I, Alison MR. The expression of E-cadherin and catenins in sporadic colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2001;32:1216-1240
- 7 Sloncova E, Fric P, Kucerova D, Lojda Z, Tuhackova Z, Sovova V. Changes of E-cadherin and beta-catenin in human and mouse intestinal tumours. *Histochem J* 2001;33:13-20
- 8 Ikeguchi M, Makino M, Kaibara N. Clinical significance of E-cadherin-catenin complex expression in metastatic foci of colorectal carcinoma. *J Surg Oncol* 2001;77:201-208

雷尼替丁加连芪汤根除胃窦癌术后幽门螺杆菌疗效观察

黄力言, 龙家衡

黄力言, 龙家衡, 广东省农垦中心医院消化内科 广东省湛江市 524002
项目负责人: 黄力言, 524002, 广东省湛江市人民大道中2号, 广东省农垦中心医院消化内科。
电话: 0759-2633173 传真: 0759-2633693
收稿日期: 2004-01-15 接受日期: 2004-03-12

摘要

目的: 观察用雷尼替丁加连芪汤根除胃癌胃大部分切除术后残胃幽门螺杆菌(*Helicobacter Pylori*, Hp)感染的疗效及其安全性。

方法: 将胃癌胃大部分切除术后残胃 Hp 感染患者分为两组, 治疗组56例, 用雷尼替丁加连芪汤治疗, 疗程为4 wk; 对照组57例, 用奥美拉唑、克拉霉素、甲硝唑三联治疗, 疗程1 wk。

结果: 两组 Hp 根除率: 治疗组和对照组, 按方案(PP)分析分别为: 81.82%(45/54)、79.25%(42/53), 按意图治疗(ITT)分析分别为 80.36%(45/56)、73.68%(42/57)。两组药物不良反应(ADR)发生率为 9.26%(5/54)、43.40%(23/53), $P < 0.01$ 。

结论: 雷尼替丁加连芪汤与质子泵抑制剂(PPI)为基础的三联疗法根除残胃 Hp 感染均有良好效果, 但雷尼替丁加连芪汤 ADR 更少, 依从性更佳。因此雷尼替丁加连芪汤是根除

残胃 Hp 较好的治疗方法。

黄力言, 龙家衡. 雷尼替丁加连芪汤根除胃窦癌术后幽门螺杆菌疗效观察. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1483-1485
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1483.asp>

0 引言

胃窦癌与幽门螺杆菌(*Helicobacter Pylori*, Hp)感染密切相关^[1], 胃癌患者在胃大部分切除术后根除 Hp 是预防残胃癌的复发、残胃炎、残胃溃疡的重要措施。因此胃癌术后必须作根除 Hp 治疗^[2]。根除 Hp 是否成功与患者的顺应性、抗生素的耐药性、感染 Hp 的疾病体等因素有关。胃大部分切除术后, 其胃肠解剖及生理发生了改变, 影响了胃的分泌、防御功能, 加之不同程度的胆汁反流, 胃内 pH 状态的变化等, 导致临幊上患者常有不同程度的消化功能障碍, 如上腹部痛、反酸、烧心、饱胀、嗳气, 部分患者还有不同程度的营养不良、贫血、消瘦。且胃癌术后患者多经过规范或不规范的抗肿瘤化疗, 药物的不良反应又使上述症状加重。中医辩证此类患者多为脾胃虚弱、气血两亏、湿热内蕴, 对药物的耐受性、顺应性较差, 影响 Hp 的根除效果。我们根据此类患者的特点, 选用雷尼替丁加中药连芪汤作为胃癌术后根除 Hp 的治疗方案, 并与质

子泵抑制剂(PPI)奥美拉唑、克拉霉素、甲硝唑三联疗法作比较，观察其根除 Hp 的效果及其安全性。

1 材料和方法

1.1 材料 近 5 a 的门诊或住院患者，均须符合以下条件：(1)诊断为胃窦癌而作胃大部分切除术，无癌肿转移及复发依据。(2)近 1 wk 内经胃镜检查并取胃黏膜活检作快速尿素酶试验(RUT)及¹³C - 尿素呼气酶试验(¹³C-UBT)均为阳性，证实为 Hp 感染。(3)2 wk 内未用过 PPI、铋剂、抗生素、抗肿瘤化疗药等药物。(4)无慢性肝、肾病史。(5)无对 PPI、克拉霉素等药物过敏史。(6)在完全了解治疗目的及治疗用药可能导致的不良反应(ADR)后愿意接受治疗，并接受随访者。按入选时先后顺序随机分为治疗组和对照组，治疗组 56 例，男 41 例，女 15 例；年龄(50 ± 18 岁)。术后完成规范化疗 27 例，曾作不规范化疗 11 例，未作化疗 8 例。胃手术吻合方式：毕氏Ⅱ式 54 例、毕氏Ⅰ式 2 例。胃镜检查：糜烂性残胃炎 50 例，吻合口溃疡 6 例(其中输入襻溃疡 3 例)，胆汁反流 48 例。对照组 57 例，男 45 例，女 12 例；年龄(51 ± 18)岁。完成规范抗肿瘤化疗 30 例，曾作不规范化疗 13 例，未作化疗 14 例。胃手术吻合方式：全部为毕氏Ⅱ式。胃镜检查：糜烂性残胃炎 48 例，吻合口溃疡 9 例(其中输入襻溃疡 2 例)，胆汁反流 51 例。两组间年龄、性别、病情、手术方式无显著性差异，具有可比性。

1.2 方法 两组根除 Hp 方案：(1)治疗组：雷尼替丁 150 mg，2 次/d。中药颗粒连芪汤：黄连 9 g，黄芪 20 g，厚朴 12 g，良姜 10 g，丹参 10 g，白术 10 g(中药颗粒由广东一方制药厂生产)，每日 1 剂，分 2 次冲服，疗程 4 wk。对照组：用奥美拉唑 20 mg、克拉霉素 500 mg、甲硝唑 400 mg，2 次/d，疗程 1 wk。服药时间：中药颗粒冲剂分早晚空腹服。西药在早餐前 30 min 及临睡前各服 1 次，不与食物同服。对照组在疗程结束后上腹部疼痛仍然明显者可继续服奥美拉唑 20 mg，1 次/d，也可用吗丁啉、莫沙比利等药物对症治疗。两组在进入上述方案治疗过程中的第 4、8、14、21、28 d 记录患者的一般情况、症状、体征、ADR；治疗组于第 14、28 d，对照组于第 4、8 d 复查肝、肾功能。两组于抗 Hp 治疗结束后第 3 wk 停用所有药物，第 5 wk 始全部复查胃镜并取胃黏膜活检作 RUT 及¹³C-UBT。统计 Hp 的根除率、溃疡及糜烂的愈合率、药物的不良反应率。

统计学处理 以 Hp 根除率为主要分析指标，分别按方案(PP)和意图治疗(ITT)分析方法，计算和分析两组的根除率，以 χ^2 检验两组治疗方案的根除率及 ADR 的发生率。

2 结果

2.1 Hp 根除标准 抗 Hp 治疗结束后 1 mo，全部复查胃镜并取胃黏膜活检作 RUT 及¹³C-UBT，均为阴性者

判断为 Hp 根除。

2.2 两组糜烂性残胃炎及活动性溃疡转归 两组按治疗方案实施后，上腹部疼痛、饱胀、嗳气、烧心等症状逐渐缓解，复查胃镜示原有活动性溃疡均已愈合(H₂-S₁)；残胃糜烂愈合率：治疗组为 79.63%(43/54)，对照组为 73.58%(39/53)，P > 0.05。

2.3 两组治疗的依从性及 Hp 根除率比较 治疗组失访 2 例，实际完成 54 例，完成率为 96.43%(54/56)，对照组失访 1 例，因 ADR 退出 3 例，实际完成 53 例，完成率为 92.98%(53/57)。两组 Hp 根除率：治疗组与对照组按方案(PP)分析，分别为 83.33%(45/54)、79.25%(42/53)；按意图治疗(ITT)分析分别为 80.36%(45/56)、73.68%(42/57)，P > 0.05。

2.4 两组患者 ADR 发生率比较 部分患者在治疗过程中出现 ADR，表现为恶心、呕吐、腹泻、皮疹、血清 ALT 升高。经统计，治疗组 54 例中有 ADR 者 5 例，其中恶心 3 例，腹泻 2 例，ADR 发生率为 9.26%(5/54)；对照组 53 例中有 ADR 者 23 例，其中恶心 15 例(伴呕吐 7 例)，腹泻 5 例，皮疹 2 例，血清 ALT 升高(76 IU/L)1 例，ADR 发生率为 43.40%(23/53)。治疗组 ADR 明显低于对照组(P < 0.01)。两组在疗程结束后 ADR 经对症治疗逐渐缓解，对照组血清 ALT 升高者经护肝治疗，在疗程结束后第 3 wk 复查肝功能 ALT 已降至正常范围，两组在进入方案治疗后复查肾功能均未见异常。

3 讨论

胃癌术后必须作根除 Hp 治疗，这是国内外专家的共识^[3]。胃癌患者在胃大部分切除术后，胃肠内环境发生了改变，加之抗肿瘤化学药物治疗的毒副反应，致患者免疫功能低下，对有消化道不良反应的药物耐受性、顺应性较差。中医认为，本病的发生多因脾胃气虚，湿热内蕴，升降失调，血络阻滞，证多表现出虚实夹杂，寒热相兼。治疗本病既要注意局部病变的治疗，又要调节整体功能，用药应祛邪补虚兼施，寒热并用。因而我们选用雷尼替丁加具有温中健脾解毒降气作用的中药连芪汤颗粒作为根除 Hp 的方案，中药方中的厚朴，辛开散结，苦以降气；良姜温中祛寒；黄连苦寒泻热解毒；黄芪、白术补气健脾，与丹参并用，起补气养血生肌作用。实验研究证实，厚朴、黄连、良姜、黄芪有较好的抑制 Hp 的作用^[4]，黄芪、白术、丹参具有调节免疫系统功能^[5]，诸药物组合不仅通过局部对 Hp 直接抑杀，更重要的是增强机体的整体的调节作用，改变了 Hp 赖以生存的环境，增强了胃黏膜的防御功能而根除 Hp。雷尼替丁可适当升高残胃内 pH，可能起到增强中药抗 Hp 的作用。此方案与 PPI 三联疗法对照，疗效相仿，差异无显著意义。但本方案治疗，临床症状改善较佳，患者的 ADR 轻，顺应性、依从性更好，是较好的根除残胃 Hp 的治疗方案，其缺点是疗程长，治疗费用偏高。

4 参考文献

- 1 张玉斗,袁霞,长春,幽门螺杆菌与临床相关疾病. 临床消化病杂志 2003;15:44
 2 萧树东,郑青,幽门螺杆菌治疗. 中华消化杂志 2003;23:555
 3 幽门螺杆菌感染处理的新概念 - Maastricht 2-2000 共识报告. 胃

肠病学 2003;8:49

- 4 王绪霖,缴稳玲,吕宗舜,杨恕,陈桂芳. 抑制幽门螺旋菌中药的初步筛选. 中国中西医结合杂志 1994;14:534-536
 5 沈映君. 中药药理学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 669-885

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

• 临床经验 •

2型糖尿病合并脂肪肝患者血清肿瘤坏死因子- α 水平增高与胰岛素抵抗指数相关分析

杨生, 岳桂英

杨生, 岳桂英, 中国医科大学第二临床学院内分泌科 辽宁省沈阳市 110004
 项目负责人: 杨生, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属二院内分泌科. yangsheng@sina.com
 电话: 024-83956986 传真: 024-83956986
 收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-03-02

摘要

目的: 分析2型糖尿病合并脂肪肝患者血清肿瘤坏死因子- α 水平变化及相关因素.

方法: 将33例2型糖尿病合并脂肪肝患者作为观察组计算体重指数, 测定血清TNF- α , 空腹血糖, 空腹胰岛素及血脂水平, 用彩超诊断脂肪肝, 胰岛素抵抗指数用HOMA平衡模法计算. 同时在年龄和性别相匹配的情况下设置30例无脂肪肝的2型糖尿病患者作为对照组.

结果: 观察组和对照组相比, 血清TNF- α 水平明显增高($P < 0.01$), 同时甘油三酯及空腹胰岛素水平亦明显增高($P < 0.01$), 血清TNF- α 水平与胰岛素抵抗指数呈正相关($r = 0.644$, $P < 0.01$).

结论: TNF- α 可导致胰岛素抵抗, 促使2型糖尿病及脂肪肝的形成.

杨生, 岳桂英. 2型糖尿病合并脂肪肝患者血清肿瘤坏死因子- α 水平增高与胰岛素抵抗指数相关分析. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1485-1487
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1485.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)是一种由多种炎性细胞分泌的细胞因子, 与细胞凋亡、免疫调节有关. 近年研究发现, TNF- α 也能由一些非免疫细胞分泌, 如脂肪细胞, 并与葡萄糖代谢, 胰岛素抵抗(insulin resistance, IR), 脂肪肝(fatty liver disease, FLD)密切相关^[1]. 近年来2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)合并FLD的发病率逐年上升. FLD本

身可导致IR, 少数可进展为肝纤维化、肝硬化, 甚至肝功衰竭^[2], 因此, 越来越受到重视. 本文通过对T2DM合并FLD患者血清TNF- α 水平的检测及相关因素的分析, 探讨与T2DM合并FLD的发生和发展有关的影响因素.

1 材料和方法

1.1 材料 我院2002-06/2003-05住院的2型糖尿病患者63例, 均符合1999年WHO糖尿病诊断标准. 其中经彩超诊断合并有脂肪肝者33例, 无脂肪肝者30例, 两组性别、年龄无显著差异, 均口服降糖药治疗, 所有受试对象均除外肝炎, 其他肝病、酗酒及其他急性并发症. 同时选择30名健康体检者为对照者.

1.2 方法 (1)标本采集: 所有受试对象均过夜空腹12 h后抽取肘静脉血待测. (2)采用7600-020全自动生化分析仪(日本日立公司生产)测定空腹血糖(FNS)、空腹胰岛素(FINS)、血甘油三酯(TG)、胆固醇(Ch)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、糖化血红蛋白(HbA1c)采用高压液相法测定(试剂由美国Biorad公司生产). FINS采用IMMULITE型全自动任选式酶放大化学免疫分析系统(美国DPC公司生产)测定. (3)TNF- α 测定: 血样3 mL于室温静置析出血清后离心10 min, 分离血清-70℃保存待测, 采用放免法同批检测, 药盒由解放军总医院放免研究所提供, 操作时严格按照说明书进行. (4)胰岛素抵抗指数(IRI)采用HOMA平衡模式计算: $IRI = FINS/22.5e^{-\log FBS}$ ^[3]. (5)由专业医师操作彩超检验脂肪肝, 诊断标准^[4-5]: 肝脏轻度或中度肿大, 密度增强而远场衰减; 肝前后回声差异, 近场回声; 肝回声强度大于脾、肾回声; 肝内血管不清. (6)其他指标测定: 受试对象便后着内衣脱鞋测量身高、体重, 测量由一名医师完成(精确到0.1 cm和0.1 kg), 体重指数(BMI)=体重(kg)/身高²(m²)

统计学处理 计量材料采用mean±SD表示, 两组间各指标差异用t检验, 两个变量之间的相关性用简单

4 参考文献

- 1 张玉斗, 袁霞, 常春, 幽门螺杆菌与临床相关疾病. 临床消化病杂志 2003;15:44
 2 萧树东, 郑青, 幽门螺杆菌治疗. 中华消化杂志 2003;23:555
 3 幽门螺杆菌感染处理的新概念 - Maastricht 2-2000 共识报告. 胃

肠病学 2003;8:49

- 4 王绪霖, 缪稳玲, 吕宗舜, 杨恕, 陈桂芳. 抑制幽门螺旋菌中药的初步筛选. 中国中西医结合杂志 1994;14:534-536
 5 沈映君. 中药药理学. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 669-885

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

• 临床经验 •

2 型糖尿病合并脂肪肝患者血清肿瘤坏死因子- α 水平增高与胰岛素抵抗指数相关分析

杨生, 岳桂英

杨生, 岳桂英, 中国医科大学第二临床学院内分泌科 辽宁省沈阳市 110004
 项目负责人: 杨生, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号, 中国医科大学附属二院内分泌科. yangsheng@sina.com
 电话: 024-83956986 传真: 024-83956986
 收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-03-02

摘要

目的: 分析2型糖尿病合并脂肪肝患者血清肿瘤坏死因子- α 水平变化及相关因素.

方法: 将33例2型糖尿病合并脂肪肝患者作为观察组计算体重指数, 测定血清 TNF- α , 空腹血糖, 空腹胰岛素及血脂水平, 用彩超诊断脂肪肝, 胰岛素抵抗指数用HOMA平衡模法计算. 同时在年龄和性别相匹配的情况下设置30例无脂肪肝的2型糖尿病患者作为对照组.

结果: 观察组和对照组相比, 血清 TNF- α 水平明显增高 ($P < 0.01$), 同时甘油三酯及空腹胰岛素水平亦明显增高 ($P < 0.01$), 血清 TNF- α 水平与胰岛素抵抗指数呈正相关 ($r = 0.644$, $P < 0.01$).

结论: TNF- α 可导致胰岛素抵抗, 促使2型糖尿病及脂肪肝的形成.

杨生, 岳桂英. 2型糖尿病合并脂肪肝患者血清肿瘤坏死因子- α 水平增高与胰岛素抵抗指数相关分析. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1485-1487
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1485.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 是一种由多种炎性细胞分泌的细胞因子, 与细胞凋亡、免疫调节有关. 近年研究发现, TNF- α 也能由一些非免疫细胞分泌, 如脂肪细胞, 并与葡萄糖代谢, 胰岛素抵抗(insulin resistance, IR), 脂肪肝(fatty liver disease, FLD)密切相关^[1]. 近年来2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)合并 FLD 的发病率逐年上升. FLD 本

身可导致 IR, 少数可进展为肝纤维化、肝硬化, 甚至肝功衰竭^[2], 因此, 越来越受到重视. 本文通过对T2DM 合并 FLD 患者血清 TNF- α 水平的检测及相关因素的分析, 探讨与 T2DM 合并 FLD 的发生和发展有关的影响因素.

1 材料和方法

1.1 材料 我院 2002-06/2003-05 住院的 2 型糖尿病患者 63 例, 均符合 1999 年 WHO 糖尿病诊断标准. 其中经彩超诊断合并有脂肪肝者 33 例, 无脂肪肝者 30 例, 两组性别、年龄无显著差异, 均口服降糖药治疗, 所有受试对象均除外肝炎, 其他肝病、酗酒及其他急性并发症. 同时选择 30 名健康体检者为对照者.

1.2 方法 (1)标本采集: 所有受试对象均过夜空腹 12 h 后抽取肘静脉血待测. (2)采用 7600-020 全自动生化分析仪(日本日立公司生产)测定空腹血糖(FNS)、空腹胰岛素(FINS)、血甘油三酯(TG)、胆固醇(Ch)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、糖化血红蛋白(HbA1c)采用高压液相法测定(试剂由美国 Biomed 公司生产). FINS 采用 IMMULITE 型全自动任选式酶放大化学免疫分析系统(美国 DPC 公司生产)测定. (3)TNF- α 测定: 血样 3 mL 于室温静置析出血清后离心 10 min, 分离血清 -70 °C 保存待测, 采用放免法同批检测, 药盒由解放军总医院放免研究所提供, 操作时严格按照说明书进行. (4)胰岛素抵抗指数(IRI)采用 HOMA 平衡模式计算: $IRI = FINS/22.5e^{-logFBS}$ ^[3]. (5)由专业医师操作彩超检验脂肪肝, 诊断标准^[4-5]: 肝脏轻度或中度肿大, 密度增强而远场衰减; 肝前后回声差异, 近场回声; 肝回声强度大于脾、肾回声; 肝内血管不清. (6)其他指标测定: 受试对象便后着内衣脱鞋测量身高、体重, 测量由一名医师完成(精确到 0.1 cm 和 0.1 kg), 体重指数(BMI)= 体重(kg)/ 身高²(m²)

统计学处理 计量材料采用 $mean \pm SD$ 表示, 两组间各指标差异用 t 检验, 两个变量之间的相关性用简单

相关分析,所有分析用SPSS10.0软件包进行统计检验,P<0.05为显著性差异标准。

2 结果

观察组和对照组在控制饮食、适量运动和口服降糖药等基本相同的情况下,两组FBS、HbA1c差异无显著性(9.87 ± 3.26 vs 9.97 ± 3.72 , P>0.05; 10.51 ± 3.025 vs 11.01 ± 2.97 , P>0.05),而观察组IRI值明显增高。血脂水平观察组血清TG明显高于对照组,HDL-C明显

低于对照组,CH两组间差异无显著性(P>0.05)。观察组BMI明显高于对照组,以BMI $\geq 25\text{ kg/m}^2$ 为界,观察组中肥胖者28例,对照组18例。排除肥胖因素的IRI值,观察组中28例肥胖者与对照组18例相比,其BMI分别为 26.11 ± 2.23 和 25.98 ± 1.87 ,无统计差异(P>0.05),而IRI明显高于对照组(6.93 ± 1.32 vs 4.52 ± 1.41 , P<0.05)。血清TNF- α 水平,观察组明显高于对照组(P<0.01),用简单相关分析法进行分析,结果显示血清TNF- α 水平与IRI呈正相关($r=0.644$, P<0.01)(见表1)。

表1 观察组与对照组各项指标比较(mean \pm SD)

| 组别 | n | 年龄(岁) | CH(mmol/L) | TG(mmol/L) | HDL-c(mmol/L) | BMI(kg/m ²) | IRI | TNF- α (ng/mL) |
|-----|----|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-----------------------|
| 对照组 | 33 | 47.63 ± 7.12 | 5.23 ± 1.12 | 2.13 ± 0.82 | 1.48 ± 0.37 | 23.16 ± 3.67 | 4.27 ± 1.37 | 2.17 ± 0.46 |
| 观察组 | 30 | 48.15 ± 6.92 | 5.31 ± 1.18 | 3.67 ± 0.76 | 1.16 ± 0.37 | 27.36 ± 3.08 | 6.87 ± 1.24 | 3.28 ± 0.51 |
| P | | >0.05 | >0.05 | <0.01 | <0.05 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

3 讨论

FLD是一种十分常见的肝脏疾病^[6-15],在整个人群中的发病率为1-9%^[16]。近年来的一些研究发现,15%的患者可以从单纯的脂肪肝转变为肝纤维化、肝硬化,3%的患者可进展为肝功能衰竭,或需要进行肝移植治疗^[17],因而越来越受重视。FLD主要与糖尿病、高脂血症、肥胖有关^[18]。有研究发现,2-55%的糖尿病患者通过B超可以发现脂肪肝。随着糖尿病发病率的升高,FLD的患者越来越多。James et al^[19]报道美国T2DM患者伴有FLD的发病率在1980年代约30%,而在1990年代上升至40%。

IR与FLD的形成密切相关。本文观察组28例肥胖患者与对照组18例肥胖患者相比,其BMI差别无统计学意义(P>0.05),但IR差别有显著性差异,故排除体重因素亦不能改变结果,说明FLD与IR独立相关。Marchesini对非肥胖非酒精性FLD患者用自身稳态模型研究发现FLD患者较正常人群存在空腹及葡萄糖负荷后高胰岛素血症,IR和高TG血症^[20]。Harper et al^[21]的研究则发现FLD患者血清胰岛素水平与其肝脏脂肪浸润程度呈正相关。本文两组HbA1c、FBS相比无显著性差异,说明两组血糖控制的情况相似,故T2DM观察组与对照组IR的差异只能是FLD引起的。

近年来研究发现,TNF- α 可抑制胰岛素信号以及胰岛素调节下的葡萄糖的摄取,提示IR的发生可以由TNF- α 介导产生^[22]。TNF- α 主要通过细胞膜上的受体发挥生物效应,TNF- α 受体有两类:TNFR-1和TNFR-2。TNFR-1参与几乎所有TNF- α 功能的信号传导,包括细胞的凋亡、分化和增生。TNFR-2主要与胰岛素的信号传导有关。脂肪细胞通过自分泌或旁分泌的形式分泌TNF- α ,并与TNFR-2结合,使胰岛素受体 β 亚单位酪氨酸残基和胰岛素受体底物-1磷酸化下降,从而降低了许多蛋白激酶的活性。此外,TNF- α 还可以降低胰岛素受体的数目及对胰岛素的亲和力,从而导致

IR,葡萄糖及脂肪代谢紊乱,促使FLD的形成。本文观察组TNF- α 水平较对照组明显增高,TNF- α 水平与IRI呈正相关,进一步证实IR与FLD有一定关系。

总之T2DM合并FLD患者血清TNF- α 水平增高与IRI相关,血清中高水平的TNF- α 可能参与了T2DM并FLD发生发展的病理生理过程,可作为临床观察的一项参考指标。

4 参考文献

- Lofgren P, Van Harmelen V, Reynisdottir S, Naslund E, Ryden M, Rossner S, Arner P. Secretion of tumor necrosis factor- α shows a strong relationship to insulin-stimulated glucose transport in human adipose tissue. *Diabetes* 2000;49:688-692
- Marchesini G, Brizi M, Morselli labate AM. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999;107:450-455
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homestasis model assessment; insulin resistance and B-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentration in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419
- 毕素栋,张鲁文.肝静脉超声显象诊断肝病的意义.新消化病学杂志 1997;5:697-698
- 王玉敏.B型超声“明亮肝”100例实验室肝功能检验分析.世界华人消化杂志 2000;8(特刊8):69
- 陈国风,成军,李莉.脂肪肝的诊断研究.世界华人消化杂志 2002;10:1040-1042
- 丁小云,李定国,徐芹芳,陆汉明.辛伐他汀对大鼠实验性脂肪肝的影响.世界华人消化杂志 2002;10:650-653
- 徐正婕,范建高,王国良,丁晓东,田丽艳,郑晓英.高脂饮食致大鼠非酒精性脂肪性肝炎肝纤维化模型.世界华人消化杂志 2002;10:392-396
- 王泓,陈进.南京市干部脂肪肝的流行病学研究.新消化病学杂志 1999;5:100-101
- 高志强,陆付耳.游离脂肪酸、胰岛素抵抗与非酒精性脂肪性肝炎.世界华人消化杂志 2003;11:1043-1045
- 韩萍,成军,李莉.非酒精性脂肪肝的研究.世界华人消化杂志 2002;10:1038-1040
- 李莉,成军,陈国凤.脂肪肝的治疗研究.世界华人消化杂志 2002;10:1042-1044
- 张一瑞.脂肪肝的临床及流行病学特征.华人消化杂志 1998;6(特刊7):442-443
- 全胜麟,张荣芳.老年人脂肪肝与血脂.华人消化杂志 1998;6(特刊7):415-416

- 15 范建高. 中国脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2001;9:6-10
- 16 Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko CP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA* 1999;282:1659-1664
- 17 Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann intern Med* 1997;126:137-145
- 18 Sharabi Y, Eldad A. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with hyperlipidemia and obesity. *Am J Med* 2000;109: 171 -176
- 19 James O, Day C. Nonalcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999;353:1634-1636
- 20 Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough-Arthur J, Forlani G, McIichionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999;107:450-455
- 21 Harper P, Wadstrom C, Backman L, Cederblad G. Increased liver carnitine content in obese women. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:18-25
- 22 Del Aguila LF, Claffey KP, Kirwan JP. TNF- α impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C₂C₁₂ muscle cells. *Am J Physiol* 1999;276:E849-E855

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

• 临床经验 •

肝吸虫性胆管炎的临床特点

汪邵平, 霍枫, 刘波, 彭伟

汪邵平, 霍枫, 广州军区总医院肝胆外科 广东省广州市 510010
 刘波, 中山大学附属第三医院普通外科 广东省广州市 510018
 彭伟, 番禺珠江管理区医院外科 广东省广州市 510032
 项目负责人: 汪邵平, 510010, 广东省广州市流花路111号, 广州军区总医院肝胆外科. victorwsp@163.net
 收稿日期: 2003-09-06 接受日期: 2003-10-27

摘要

目的: 总结肝吸虫性胆管炎的临床特点, 减少对该病的误诊漏诊.

方法: 回顾性分析1996-2002年广州地区三家医院外科107例肝吸虫性胆管炎患者的临床表现和诊治过程.

结果: 本组术前诊断率44.9%. 诊断方法中十二指肠液虫卵检查阳性率高达90.5%(19/21). 驱虫治疗37例, 疗效满意, 手术70例, 发生胆瘘8例. 全部患者中合并肝癌5例.

结论: 肝吸虫性胆管炎易被漏诊, 十二指肠液虫卵检查是简单、可靠的检测手段. 该病手术后易发胆瘘, 长期的肝吸虫病史可导致癌变.

汪邵平, 霍枫, 刘波, 彭伟. 肝吸虫性胆管炎的临床特点. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1487-1489

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1487.asp>

1 临床资料

1996-03/2002-06, 广东沿海地区3家医院外科首诊以“急性胆管炎、胆囊炎”收治的肝吸虫病患者107例, 男71例, 女36例, 年龄17-76(平均47.6岁), 临床表现为纳差、上腹隐痛(93例); 畏寒、轻-中度发热(78例); 轻度或一过性黄疸(44例), 伴发肝内外胆管或胆囊结石者61例.

2 结果

入院患者均常规做大便肝吸虫虫卵检查, 检出率16.8%

(18/107). 21例患者因消化道症状明显、既往有胃病史或考虑肝吸虫病但大便虫卵阴性而行胃镜检查, 19例十二指肠液中检出虫卵, 检出率90.5%. 3例因重症胆管炎、胆总管下段结石嵌顿行治疗性经内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP), 于胆汁引流液中找到虫卵, 诊断率100%(3/3). 我院在25例患者中做了血清肝吸虫抗原抗体检查, 阳性率为64%(16/25). 影像学方面, B超、CT诊断率分别为13.6%(14/103)和23.4%(22/94). 经上述方法共诊断肝吸虫病48例(44.9%), 余为术中发现成虫而获诊断.

患者确诊后都接受了至少一个疗程的驱虫治疗: 吡喹酮12.5 mg/kg, 3次/d, 连用2d. 单纯药物治疗34例, 附加ERCP胆道冲洗引流3例. 胆囊切除、肝内外胆管探查冲洗引流58例, 术后胆瘘6例. 肝叶切除+胆道探查冲洗12例, 胆瘘2例. 胆瘘患者中, 6例经充分引流2-6wk治愈, 其中1例加做了鼻胆管引流. 2例胆囊切除、胆总管探查术后胆瘘患者再次手术, 其中1例术后当天即出现胆瘘急诊手术, 1例经近1mo通畅引流胆瘘量无减少趋势而再次手术. 术中证实均为T管旁瘘, 肝内虫体大量移位堆积于胆总管下段, 改胆肠吻合后治愈. 49例获随访1-5a, 胆管炎复发3例, 再次驱虫治疗后症状消失. 7例患者出现剧烈腹痛、黄疸、高热、休克、神志障碍等重症胆管炎症状, 其中6例存在肝内外胆管结石, 3例经ERCP十二指肠乳头切开取石引流后好转, 4例开腹胆道引流治愈. 因血尿淀粉酶高而诊断急性胰腺炎9例, 均保守治疗, 本组无重症胰腺炎病例. B超、CT或AFP提示肝癌5例, 获手术切除肿瘤4例, 包括肝细胞癌3例, 胆管细胞癌1例.

3 讨论

华支睾吸虫在人体主要寄生于肝内中小胆道, 其次为肝外胆管、胆囊和胰管, 可长达数十年. 广东沿海部

- 15 范建高. 中国脂肪肝的研究. 世界华人消化杂志 2001;9:6-10
- 16 Cortez-Pinto H, Chatham J, Chacko CP, Arnold C, Rashid A, Diehl AM. Alterations in liver ATP homeostasis in human nonalcoholic steatohepatitis: a pilot study. *JAMA* 1999;282:1659-1664
- 17 Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann intern Med* 1997;126:137-145
- 18 Sharabi Y, Eldad A. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with hyperlipidemia and obesity. *Am J Med* 2000;109: 171 -176
- 19 James O, Day C. Nonalcoholic steatohepatitis: another disease of affluence. *Lancet* 1999;353:1634-1636
- 20 Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough-Arthur J, Forlani G, McIichionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med* 1999;107:450-455
- 21 Harper P, Wadstrom C, Backman L, Cederblad G. Increased liver carnitine content in obese women. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:18-25
- 22 Del Aguila LF, Claffey KP, Kirwan JP. TNF- α impairs insulin signaling and insulin stimulation of glucose uptake in C₂C₁₂ muscle cells. *Am J Physiol* 1999;276:E849-E855

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

• 临床经验 •

肝吸虫性胆管炎的临床特点

汪邵平, 霍枫, 刘波, 彭伟

汪邵平, 霍枫, 广州军区总医院肝胆外科 广东省广州市 510010
 刘波, 中山大学附属第三医院普通外科 广东省广州市 510018
 彭伟, 番禺珠江管理区医院外科 广东省广州市 510032
 项目负责人: 汪邵平, 510010, 广东省广州市流花路111号, 广州军区总医院肝胆外科. victorwsp@163.net
 收稿日期: 2003-09-06 接受日期: 2003-10-27

摘要

目的: 总结肝吸虫性胆管炎的临床特点, 减少对该病的误诊漏诊.

方法: 回顾性分析1996-2002年广州地区三家医院外科107例肝吸虫性胆管炎患者的临床表现和诊治过程.

结果: 本组术前诊断率44.9%. 诊断方法中十二指肠液虫卵检查阳性率高达90.5%(19/21). 驱虫治疗37例, 疗效满意, 手术70例, 发生胆瘘8例. 全部患者中合并肝癌5例.

结论: 肝吸虫性胆管炎易被漏诊, 十二指肠液虫卵检查是简单、可靠的检测手段. 该病手术后易发胆瘘, 长期的肝吸虫病史可导致癌变.

汪邵平, 霍枫, 刘波, 彭伟. 肝吸虫性胆管炎的临床特点. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1487-1489

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1487.asp>

1 临床资料

1996-03/2002-06, 广东沿海地区3家医院外科首诊以“急性胆管炎、胆囊炎”收治的肝吸虫病患者107例, 男71例, 女36例, 年龄17-76(平均47.6岁), 临床表现为纳差、上腹隐痛(93例); 畏寒、轻-中度发热(78例); 轻度或一过性黄疸(44例), 伴发肝内外胆管或胆囊结石者61例.

2 结果

入院患者均常规做大便肝吸虫虫卵检查, 检出率16.8%

(18/107). 21例患者因消化道症状明显、既往有胃病史或考虑肝吸虫病但大便虫卵阴性而行胃镜检查, 19例十二指肠液中检出虫卵, 检出率90.5%. 3例因重症胆管炎、胆总管下段结石嵌顿行治疗性经内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP), 于胆汁引流液中找到虫卵, 诊断率100%(3/3). 我院在25例患者中做了血清肝吸虫抗原抗体检查, 阳性率为64%(16/25). 影像学方面, B超、CT诊断率分别为13.6%(14/103)和23.4%(22/94). 经上述方法共诊断肝吸虫病48例(44.9%), 余为术中发现成虫而获诊断.

患者确诊后都接受了至少一个疗程的驱虫治疗: 吡喹酮12.5 mg/kg, 3次/d, 连用2d. 单纯药物治疗34例, 附加ERCP胆道冲洗引流3例. 胆囊切除、肝内外胆管探查冲洗引流58例, 术后胆瘘6例. 肝叶切除+胆道探查冲洗12例, 胆瘘2例. 胆瘘患者中, 6例经充分引流2-6wk治愈, 其中1例加做了鼻胆管引流. 2例胆囊切除、胆总管探查术后胆瘘患者再次手术, 其中1例术后当天即出现胆瘘急诊手术, 1例经近1mo通畅引流胆瘘量无减少趋势而再次手术. 术中证实均为T管旁瘘, 肝内虫体大量移位堆积于胆总管下段, 改胆肠吻合后治愈. 49例获随访1-5a, 胆管炎复发3例, 再次驱虫治疗后症状消失. 7例患者出现剧烈腹痛、黄疸、高热、休克、神志障碍等重症胆管炎症状, 其中6例存在肝内外胆管结石, 3例经ERCP十二指肠乳头切开取石引流后好转, 4例开腹胆道引流治愈. 因血尿淀粉酶高而诊断急性胰腺炎9例, 均保守治疗, 本组无重症胰腺炎病例. B超、CT或AFP提示肝癌5例, 获手术切除肿瘤4例, 包括肝细胞癌3例, 胆管细胞癌1例.

3 讨论

华支睾吸虫在人体主要寄生于肝内中小胆道, 其次为肝外胆管、胆囊和胰管, 可长达数十年. 广东沿海部

分乡镇居民感染率高达 60%^[1]。症状多为上腹隐痛、纳差、腹泻等而被内科收治。肝吸虫刺激胆管壁增生变厚，以虫体为中心形成结石，虫体机械阻塞等导致肝内胆管梗阻扩张，合并感染就发生胆管炎。本组多数患者被诊断为一般性“胆管炎、胆囊炎、胆道结石”，另有 6 例误诊为“胃炎”、“肝炎”、“硬化性胆管炎”而转内科治疗，术前肝吸虫病诊断率仅 44.9%。原因有：(1)外科医生对肝吸虫病重视不够，满足于“胆管炎、胆囊炎、胆道结石”的诊断，放弃对原发病的追查。(2)肝吸虫卵小，易漏检，以及部分检验人员并未认真查找，使大便常规虫卵检出率很低^[2](本组 16.8%)，台湾学者报道一组肝吸虫病患者大便检出率也仅 39%^[3]。

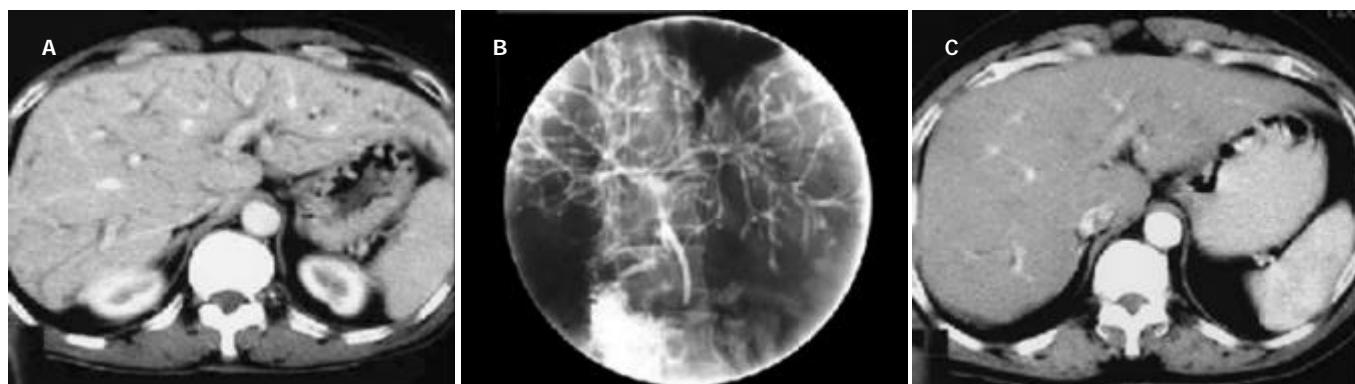


图 1 肝吸虫性胆管炎影像学表现及治疗前后胆管变化。A: CT 显示肝内胆管广泛扩张，以 3-4 级胆管明显；B: 胆道造影所示肝内外胆管广泛扩张表现；C: 驱虫治疗后 1 a 肝内胆管恢复正常形态。



图 2 肝吸虫病并肝癌表现：右肝广泛小胆管扩张及肿瘤(箭头示)。

炎、胆囊炎”反复发作而草率手术，术中发现虫体才获诊断。因此，对来自流行地区的非结石性胆管炎、胆囊炎患者，以及胆管扩张又找不到梗阻原因者，应想到肝吸虫病的可能，以避免不必要的手术。另外，我们发现肝吸虫病患者中 B 超、CT 报告的胆道“云雾状沉积物”或“可疑结石”，多为成团虫体淤积于胆泥中或虫体钙化，亦无须手术。当明确合并结石、肝内占位以及胆管炎保守治疗、ERCP 术疗效欠佳时应考虑手术。对以肝癌或胆囊疾病手术的患者，若术中发现肝吸虫，必须切开胆总管充分冲洗引流。因虫体刺激胆管分泌，部分患者术后有大量胆汁经 T 管排出，甚至达 3000 mL/24 h 以上，应注意维持水、电解质平衡。术后常并发胆

(3)该病典型的 B 超表现为肝内小胆管广泛扩张，胆管壁回声增粗增强，伴液性回声带^[4]。CT 见肝被膜下末梢小胆管广泛呈杵状扩张，肝外胆管扩张较少^[5-6](图 1A)。胆道造影表现为肝内胆管均匀、广泛扩张，3-4 级胆管扩张尤为明显(图 1B)。但多数患者仅有散在的数支肝内小胆管扩张等不典型表现，且缺乏特异性临床症状而被忽视^[7]。十二指肠液虫卵检查是诊断该病的可靠手段，而 ERCP 则不仅可用于诊断，还通过胆道的冲洗引流起到重要的治疗作用^[8-9]。

无结石的肝吸虫性胆管炎症状较轻，抗炎解痉治疗后一般可很快控制症状，但易复发，须加用吡喹酮驱虫后方可获得满意疗效(图 1C)。有 12 例患者因“胆管

瘘，本组 8 例。我们总结以下措施可预防胆瘘：(1)术后经 T 管反复冲洗胆道，防虫体阻塞增加胆道压力；(2)由于肝内小胆管多有扩张，切肝时对肝断面须做严密结扎、缝闭，否则易漏胆；(3)驱虫治疗选在 T 管拔除前，以免大量虫体堆积胆总管再发梗阻；(4)胆总管再发梗阻时，及时行 ERCP 术对胆道冲洗引流。

本组 22 例 CT 显示肝内胆管扩张明显的患者中，5 例发展为重症胆管炎，占全部重症胆管炎患者的 71.4% (5/7)，7 例合并急性胰腺炎，占 77.8%(7/9)，肝癌 5 例(图 2)，占 100%(5/5)，而合并结石仅 13 例，占 21.3% (13/61)。提示该病发展到后期，长期、严重的胆管梗阻可使重症胆管炎、急性胰腺炎和肝癌等并发症的发生率增加，但结石的形成与此无关。本组 B 超或 CT 报告 18 例胆囊壁明显增厚，其中 5 例描述有软组织影，3 例以“胆囊癌”或“肝门部胆管癌”手术，术中证实为增厚的胆囊壁、胆泥淤积或肿大的淋巴结，无一例肿瘤。5 例肝癌共同特点是乙肝二对半阴性，肝内小胆管扩张明显，其中 2 例 AFP 不升高。实验证实：肝吸虫卵长期刺激胆管增生、肝细胞变性、肝硬化形成可导致肝癌^[10]，国外 Koo-J 教授报道 3 例少见的黏液表皮样胆管癌同时存在肝吸虫，指出该类胆管癌的发生可能与肝吸虫病有关，韩国学者 Lee WJ、美国 Thuluvath PJ 教授也研究认为肝吸虫病是胆管癌的重要诱因^[11-13]，国内 2003 年

王友顺 et al 报道肝吸虫病合并胆管癌 29 例, 认为肝吸虫病合并胆管癌发生率明显高于非感染人群, 因此, 积极防治肝吸虫病尤为重要^[14].

4 参考文献

- 1 陈锡祺, 刘瑜卿, 陈祖泽. 广东省华枝睾吸虫流行病学调查. 中华预防医学杂志 1995;19:68-71
- 2 王敏, 王光西. 11 例肝吸虫病的误诊、漏诊分析. 中国人兽共患病杂志 2001;17:85-90
- 3 Chan HH, Lai KH, Lo GH, Cheng JS, Huang JS, Hsu PI, Lin CK, Wang EM. The clinical and cholangiographic picture of hepatic clonorchiasis. *J Clin Gastroenterol* 2002;34:183-186
- 4 黄蔚梅, 温媛, 郭生梅, 林妍雯, 黎宝玲, 陈健雄. 华支睾吸虫病 82 例超声所见. 热带医学杂志 2001;1:152-153
- 5 Lim JH, Ko YH, Lee DH, Kim SY. Clonorchiasis: sonographic findings in 59 proved cases. *Am J Roentgenol* 1989;152:761-764
- 6 谢东, 苏丹柯, 李强, 张昱苹, 黄伟丽, 陈茂安. 肝吸虫病致肝内胆管及肝实质改变的 CT 表现. 实用放射学杂志 2002;18:276-278
- 7 Lim JH. Radiologic findings of clonorchiasis. *Am J Roentgenol* 1990;155:1001-1008
- 8 李晓林, 何佐邦, 梁碧云, 傅苗, 徐唐丽. 治疗性 ERCP 在肝吸虫病梗阻性黄疸的应用价值. 临床消化病杂志 2001;13:272-273
- 9 Choi TK, Wong J. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography and endoscopic papillotomy in recurrent pyogenic cholangitis. *Clin Gastroenterol* 1986;15:393-415
- 10 王磊, 肖锡昌, 唐永煌, 曾子华. 华枝睾吸虫与二甲基亚硝胺诱发动物肝癌的初步实验研究. 中国寄生虫病防治杂志 1994;7:201-203
- 11 Koo J, Ho J, Wong J, Ong GB. Mucoepidermoid carcinoma of the bile duct. *Ann Surg* 1982;196:140-148
- 12 Lee WJ, Lim HK, Jang KM, Kim SH, Lee SJ, Lim JH, Choo IW. Radiologic spectrum of cholangiocarcinoma: emphasis on unusual manifestations and differential diagnoses. *Radiographics* 2001;21:S97-S116
- 13 Thuluvath PJ, Rai R, Venbrux AC, Yeo CJ. Cholangiocarcinoma: a review. *Gastroenterologist* 1997;5:306-315
- 14 王友顺, 陈保华, 余力, 厉周. 肝吸虫病合并胆管癌 29 例报告. 中华肝胆外科杂志 2003;9:611-613

特发性门脉高压症 20 例

张志辉, 杨仕明, 贾树蓉, 陈陵, 房殿春

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

贾树蓉, 中国人民解放军第三军医大学西南医院超声科 重庆市 400038

项目负责人: 杨仕明, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心. shimingyang@yahoo.com

电话: 023-68765688 传真: 023-68754124

收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-02-18

摘要

目的: 探讨特发性门脉高压症(IPH)的临床特征及诊治方法.

方法: 回顾性分析我院收治的20例特发性门脉高压患者的临床资料.

结果: 本组患者中男 11 例, 女 9 例, 发病年龄为 1-65 (15.1 ± 12.6 岁), 病程 27 d-23 a 不等; 临床表现主要为反复呕血、黑便(18/20), 脾大(20/20); HBsAg 阳性 1 例, 所有患者肝功能各项指标基本正常; 电子胃镜/食管吞钡检查食管(胃底)静脉曲张 18 例; 彩超检查发现门静脉结构变化 19 例(其中门静脉及其分支海绵样变 12 例, 门静脉内径狭窄、管壁增厚、正常结构消失 10 例, 门静脉主要分支闭塞或缺如 5 例); 2 例患者行门静脉造影术检查, 均发现门静脉结构变化, 与彩超检查结果吻合; 14 例患者行外科手术治疗,(分流和 / 或断流术 13 例, 肝移植 1 例), 术中发现所有患者肝脏形态、大小基本正常, 14 例病理检查发现所有患者均存在门脉显微结构的改变, 除 1 例有假小叶形成外, 其余均无肝硬化表现. 20 例患者均随访, 回访 15 例, 回访率 75%, 回访结果显示, 手术治疗的 9 例患者

中, 术后再出血 2 例, 再出血率为 22.2%, 保守治疗的 6 例患者, 出院后 5 例再出血, 再出血率为 83.3%, 明显高于手术组($\chi^2 = 6.482$, $P < 0.05$).

结论: 同国外相比, 本组 IPH 患者男性多于女性, 且发病年龄较小; 临幊上凡发现年龄小、以反复呕血、黑便、脾功能亢进、食管胃底静脉曲张, 而肝功能基本正常的原因不明的门脉高压患者, 要高度怀疑本病的可能, 彩超检查对本病的诊断具有重要意义, 针对上消化道出血行胃镜治疗术、门体分流和 / 或断流术可明显降低再出血的机率.

张志辉, 杨仕明, 贾树蓉, 陈陵, 房殿春. 特发性门脉高压症 20 例. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1489-1492

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1489.asp>

0 引言

特发性门脉高压症(idiopathic portal hypertension, IPH)是一种原因不明的、且多不伴有肝硬化的门脉高压性疾病, 主要表现为反复上消化道出血和脾亢. 迄今关于我国 IPH 的发病特点所见报道不多. 因 IPH 在我国目前仍属少见病, 临幊上重视不够且较易误诊, 应该不断提高对该病诊治的认识. 现对我院 1993/2003 年收治的 20 例 IPH 患者特点进行回顾性分析.

1 材料和方法

1.1 材料 1993-05/2003-11 我院 IPH 住院患者 20 例,

王友顺 et al 报道肝吸虫病合并胆管癌 29 例, 认为肝吸虫病合并胆管癌发生率明显高于非感染人群, 因此, 积极防治肝吸虫病尤为重要^[14].

4 参考文献

- 1 陈锡祺, 刘瑜卿, 陈祖泽. 广东省华枝睾吸虫流行病学调查. 中华预防医学杂志 1995;19:68-71
- 2 王敏, 王光西. 11 例肝吸虫病的误诊、漏诊分析. 中国人兽共患病杂志 2001;17:85-90
- 3 Chan HH, Lai KH, Lo GH, Cheng JS, Huang JS, Hsu PI, Lin CK, Wang EM. The clinical and cholangiographic picture of hepatic clonorchiasis. *J Clin Gastroenterol* 2002;34:183-186
- 4 黄蔚梅, 温媛, 郭生梅, 林妍雯, 黎宝玲, 陈健雄. 华支睾吸虫病 82 例超声所见. 热带医学杂志 2001;1:152-153
- 5 Lim JH, Ko YH, Lee DH, Kim SY. Clonorchiasis: sonographic findings in 59 proved cases. *Am J Roentgenol* 1989;152:761-764
- 6 谢东, 苏丹柯, 李强, 张昱苹, 黄伟丽, 陈茂安. 肝吸虫病致肝内胆管及肝实质改变的 CT 表现. 实用放射学杂志 2002;18:276-278
- 7 Lim JH. Radiologic findings of clonorchiasis. *Am J Roentgenol* 1990;155:1001-1008
- 8 李晓林, 何佐邦, 梁碧云, 傅苗, 徐唐丽. 治疗性 ERCP 在肝吸虫病梗阻性黄疸的应用价值. 临床消化病杂志 2001;13:272-273
- 9 Choi TK, Wong J. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography and endoscopic papillotomy in recurrent pyogenic cholangitis. *Clin Gastroenterol* 1986;15:393-415
- 10 王磊, 肖锡昌, 唐永煌, 曾子华. 华枝睾吸虫与二甲基亚硝胺诱发动物肝癌的初步实验研究. 中国寄生虫病防治杂志 1994;7:201-203
- 11 Koo J, Ho J, Wong J, Ong GB. Mucoepidermoid carcinoma of the bile duct. *Ann Surg* 1982;196:140-148
- 12 Lee WJ, Lim HK, Jang KM, Kim SH, Lee SJ, Lim JH, Choo IW. Radiologic spectrum of cholangiocarcinoma: emphasis on unusual manifestations and differential diagnoses. *Radiographics* 2001;21:S97-S116
- 13 Thuluvath PJ, Rai R, Venbrux AC, Yeo CJ. Cholangiocarcinoma: a review. *Gastroenterologist* 1997;5:306-315
- 14 王友顺, 陈保华, 余力, 厉周. 肝吸虫病合并胆管癌 29 例报告. 中华肝胆外科杂志 2003;9:611-613

特发性门脉高压症 20 例

张志辉, 杨仕明, 贾树蓉, 陈陵, 房殿春

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

贾树蓉, 中国人民解放军第三军医大学西南医院超声科 重庆市 400038

项目负责人: 杨仕明, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南医院全军消化专科中心. shimingyang@yahoo.com

电话: 023-68765688 传真: 023-68754124

收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-02-18

摘要

目的: 探讨特发性门脉高压症(IPH)的临床特征及诊治方法.

方法: 回顾性分析我院收治的20例特发性门脉高压患者的临床资料.

结果: 本组患者中男 11 例, 女 9 例, 发病年龄为 1-65 (15.1 ± 12.6 岁), 病程 27 d-23 a 不等; 临床表现主要为反复呕血、黑便(18/20), 脾大(20/20); HBsAg 阳性 1 例, 所有患者肝功能各项指标基本正常; 电子胃镜/食管吞钡检查食管(胃底)静脉曲张 18 例; 彩超检查发现门静脉结构变化 19 例(其中门静脉及其分支海绵样变 12 例, 门静脉内径狭窄、管壁增厚、正常结构消失 10 例, 门静脉主要分支闭塞或缺如 5 例); 2 例患者行门静脉造影术检查, 均发现门静脉结构变化, 与彩超检查结果吻合; 14 例患者行外科手术治疗,(分流和 / 或断流术 13 例, 肝移植 1 例), 术中发现所有患者肝脏形态、大小基本正常, 14 例病理检查发现所有患者均存在门脉显微结构的改变, 除 1 例有假小叶形成外, 其余均无肝硬化表现. 20 例患者均随访, 回访 15 例, 回访率 75%, 回访结果显示, 手术治疗的 9 例患者

中, 术后再出血 2 例, 再出血率为 22.2%, 保守治疗的 6 例患者, 出院后 5 例再出血, 再出血率为 83.3%, 明显高于手术组($\chi^2 = 6.482$, $P < 0.05$).

结论: 同国外相比, 本组 IPH 患者男性多于女性, 且发病年龄较小; 临幊上凡发现年龄小、以反复呕血、黑便、脾功能亢进、食管胃底静脉曲张, 而肝功能基本正常的原因不明的门脉高压患者, 要高度怀疑本病的可能, 彩超检查对本病的诊断具有重要意义, 针对上消化道出血行胃镜治疗术、门体分流和 / 或断流术可明显降低再出血的机率.

张志辉, 杨仕明, 贾树蓉, 陈陵, 房殿春. 特发性门脉高压症 20 例. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1489-1492

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1489.asp>

0 引言

特发性门脉高压症(idiopathic portal hypertension, IPH)是一种原因不明的、且多不伴有肝硬化的门脉高压性疾病, 主要表现为反复上消化道出血和脾亢. 迄今关于我国 IPH 的发病特点所见报道不多. 因 IPH 在我国目前仍属少见病, 临幊上重视不够且较易误诊, 应该不断提高对该病诊治的认识. 现对我院 1993/2003 年收治的 20 例 IPH 患者特点进行回顾性分析.

1 材料和方法

1.1 材料 1993-05/2003-11 我院 IPH 住院患者 20 例,

诊断参考日本卫生福利部IPH研究委员会制订的IPH诊断标准^[1].

1.2 方法 回顾性分析患者的性别、年龄、病程、临床症状、体征、肝功能、肝炎标志物，电子胃镜/食管吞钡、彩超检查结果，术中所见肝脏情况，肝、脾组织活检行病理学检查以及治疗方式等临床资料。

统计学处理 对数据进行 χ^2 检验， $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 一般资料及临床表现 本组20例患者中，男11例，女9例；发病年龄为1-65(15.1 ± 12.6岁)，病程27d-23a不等；90.0%的患者因“反复呕血、黑便”入院。体检均见贫血貌，皮肤、巩膜无黄染，无皮疹、肝掌及蜘蛛痣，无腹壁静脉曲张，无双下肢水肿，肝肋下未及，均有脾肿大，脾肋下4-11(7.3 ± 2.5cm)，质中，无压痛。

2.2 实验室及特殊检查 19例患者肝炎标志物为阴性(95.0%)，1例为乙肝小三阳(5.0%)；肝功能指标ALT、AST、ALP、GGT、PT、APTT、TP、Alb、G基本正常。15/17例电子胃镜检查发现有食管(胃底)静脉曲张(88.2%)，3/3例食管吞钡检查示食管(胃底)静脉曲张(100%)，且均以中重度曲张为主；彩超检查20例均发

现脾大，脾静脉管腔增粗(100%)；肝脏大小及形态正常，其中19例发现门静脉结构变化(95.0%)，12例报告门静脉及其分支海绵样变(63.2%)，10例发现门静脉内径狭窄、管壁增厚、正常结构消失(52.6%)，3例发生门静脉分支闭塞(15.8%)，2例门静脉分支缺如(10.5%)；2例B超发现少量至中量腹水(10.5%)。

2.3 治疗 20例患者中有14例行外科手术治疗(70.0%)，1例术前曾行内镜套扎治疗。其中行脾切加断流术3例、脾切加分流术3例、脾切加分流和断流7例，1例患者单纯脾切后仍反复出血，最终行肝移植治疗，其余6例内科保守治疗。20例患者均随访，回访15例，回访率75%，回访结果显示，手术治疗的9例患者中，术后再出血2例，再出血率为22.2%，保守治疗的6例患者，出院后5例再出血，再出血率为83.3%，明显高于手术组($\chi^2 = 6.482$, $P < 0.05$)。

14例手术患者，术中见肝脏大小、形态、质地及颜色基本正常，表面无纤维化、结节及包块。肝脏病理检查见门静脉主干及其肝内大分支有显著的血管周围纤维化改变，血管内膜增厚，并伴中层平滑肌过度增生，肝窦、肝内门静脉扩张，管壁增厚，除1例有假小叶形成诊断为结节性肝硬化，均无肝硬化表现。脾脏呈慢性淤血性脾肿大。主要指标(见表1)。

表1 20例IPH主要指标

| 序号 | 性别 | 发病 年龄(岁) | 病程 | 上消化 道出血 | 胃镜/食 道吞钡 | 肝脏彩超 | 术中所见肝脏情况 |
|----|----|-------------|-----|------------|-------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| | | | | | | | |
| 1 | 男 | 6 | 5a | 有 | 食管静脉中度曲张 | 门静脉海绵样变,右后支缺如 | 质软,色泽正常,表面无结节样改变 |
| 2 | 男 | 8 | 5a | 有 | 食管静脉中度曲张 | 门静脉海绵样变 | 质地、大小、颜色均正常 |
| 3 | 男 | 2 | 10a | 有 | 食管静脉中度曲张 | 肝门部门静脉海绵样变 | |
| 4 | 男 | 34 | 4a | 有 | 食管、胃底静脉重度曲张 | 门静脉管壁增厚,管腔狭窄,小分支闭塞 | 大小、形态、质地、颜色均正常 |
| 5 | 男 | 5 | 2a | 有 | 食管静脉轻度曲张 | 肝门部门静脉海绵样变 | 质地、大小、颜色均正常 |
| 6 | 男 | 11 | 23a | 有 | 食管静脉中度曲张 | 肝门部及胰头处海绵样变 | 质软,色泽正常,表面无结节样改变 |
| 7 | 男 | 12 | 4a | 有 | 食管静脉曲张破裂出血 | 门静脉海绵样变 | 色泽和大小均正常 |
| 8 | 男 | 6 | 27d | 有 | 食管静脉重度曲张 | 门静脉海绵样变,左、右支二级分支狭窄 | 质软、色红,无结节及硬化 |
| 9 | 男 | 9 | 2a | 有 | 食管静脉曲张,胃体、 胃底黏膜活动性出血 | 门静脉右支及右后支管壁毛糙,管腔闭塞, 左支内“工”字形管腔闭塞 | |
| 10 | 男 | 24 | 1a | 有 | 食管静脉中度曲张 | 肝硬化? | 色泽及质地均未见异常 |
| 11 | 男 | 11 | 1a | 有 | 食管、胃底静脉中度曲张 | 门静脉管壁增厚, 门静脉“工”字形结构消失 | 色泽红,质地软无结节样硬块 |
| 12 | 女 | 16 | 2mo | 有 | 食管静脉中度曲张 | 门静脉管腔狭窄,右后支闭塞 | |
| 13 | 女 | 1 | 11a | 有 | 食管静脉中度曲张 | 肝门部海绵样变 | |
| 14 | 女 | 21 | 1mo | 有 | 食管静脉重度曲张 | 门静脉右支内径变窄,结构紊乱 | 色泽浅红、质韧 |
| 15 | 女 | 3 | 5a | 有 | 食管静脉重度曲张 | 肝门静脉海绵样变,右后支缺如 | |
| 16 | 女 | 23 | 1a | 有 | 食管静脉中度曲张 | 门静脉变细显示不清 | 色泽软,质略硬,但无结节 |
| 17 | 女 | 32 | 12a | 无 | 慢性胃窦炎 | 门静脉海绵样变,内径狭窄 | 质地、大小及颜色均正常 |
| 18 | 女 | 3 | 5a | 有 | 食管下段静脉轻度曲张 | 门静脉海绵样变 | 质地、大小及颜色均正常 |
| 19 | 女 | 45 | 20a | 有 | 食管下段静脉中重度曲张 | 门静脉主干及左右主分支管壁增厚 | 肝表面纤维化,右肝萎缩,左肝增大,质地略硬 |
| 20 | 女 | 30 | 1mo | 无 | 慢性胃窦炎 | 门静脉海绵样变 | |

3 讨论

IPH 的发病与地区经济、卫生事业发展水平联系较紧密, 发展中国家发病率明显高于发达国家, 印度、伊朗较为多见。印度 IPH 男性发病率明显高于女性, 男女之比为 2 : 1 - 4 : 1, 且主要累及青年男性, 发病年龄为 30-35 岁。日本 IPH 患者男女之比为 1 : 3, 平均年龄男性为(44.5 ± 15.8 岁), 女性为(51.8 ± 11.0 岁), 30 岁以下患者仅 52 例(占 7.7%), 男女发病高峰年龄均为(50-69 岁)。美国报道的 19 例女性 IPH 患者的平均年龄为 48.7 岁, 17 例男性患者的平均年龄则为 41.9 岁, 较女性为低^[2-4]。本组研究发现, 我国 IPH 的发病特点为: (1)男性患者居多, 占总发病人数的 55.0%; (2)发病年龄同国外相比明显偏低, 平均为(15.1 ± 12.6 岁)。该特点既不同于印度等发展中国家, 也不同于美国、日本等发达国家。各地 IPH 患者在性别和年龄上的差异目前尚不十分清楚, 可能与社会经济状态、生活卫生条件、寿命长短以及种族不同有关。

传统上认为 IPH 不会发展为肝硬化, 这一点从 IPH 一直沿用下来的定义即可看出。但是 Bernard et al^[5]却在 1995 年报道了 1 例发展为不完全分隔性肝硬化的 IPH 病例, 推测随着肝纤维化的程度进行性加重和肝供血的减少, IPH 最终可导致肝硬化。Ludwig et al^[6]对 26 例日本 IPH 患者的肝脏标本进行组织病理学研究的结果, 也支持 IPH 的终末期可发展为不完全分隔性肝硬化的观点。西班牙的 Ibarrola et al^[7]研究了 9 例非硬化性门静脉高压症患者的肝脏标本, 发现有 1 例出现了不完全性分隔性肝硬化。本组中亦有 1 例男性患者(序号 6)肝脏表面未见硬化结节, 但病理结果提示为不完全性结节状肝硬化, 说明东西方 IPH 患者终末期均有发展为肝硬化的可能。

用于 IPH 诊断的各种辅助检查, 除电子胃镜、核素扫描、CT 血管成像、门静脉造影及测压外, 高分辨率的彩色多普勒不仅能清晰动态地观察门静脉及其分支在形态学上的细小变化, 而且能观察门脉及其侧支的血流动力学情况, 评估门静脉高压的程度, 并与其他疾病所致的门脉高压作出鉴别^[8-13]。本组 20 例患者均经彩超检查, 19 例直接发现门静脉结构改变, 高度提示 IPH 诊断, 其中 14 例进一步经手术证实为 IPH。另有 2 例患者行间接门静脉造影检查, 也支持 IPH 的诊断。我们认为: 彩超检查简单易行, 检出率高, 且具有经济、无创的优点, 临床应用价值大, 较之间接门静脉造影检查术, 具有更好的诊断及应用价值。

IPH 患者的治疗主要是针对反复上消化道出血和脾功能亢进。目前针对出血的治疗首选曲张静脉硬化或套扎, 其有效率可达 90-95%, 再出血率约为 3%, 需行外科分流术者文献报道不足 5%。不适宜行内镜治疗术或治疗失败而需行外科手术者, 以选择性分流术(如远端脾肾分流术)为首选, 可以减少分流术后脑病的发生^[14-17]。对于脾功能亢进的患者, 一般都采取脾切除术

治疗, 疗效确切。本组 IPH 中接受内镜套扎治疗患者仅 1 例, 而施行外科手术者占 70.0%, 手术率高于国外, 与患者就医较晚以及临床医生对本病的认识不足有关。对于部分门脉病变严重闭塞较多的患者, 肝移植也是一种较好的选择^[5, 18]。本组结果显示, 经手术治疗的患者中, 术后再出血率明显低于未手术组, 说明手术治疗对预防再出血率具有重要作用。因肝脏功能基本正常, IPH 患者预后一般较好, 文献报道有效控制出血后 IPH 患者 5 a 生存率可达 95-100%^[19]。

总之, IPH 是一类少见的疾病, 与国外报道相比, 我国本病发病年龄偏低, 临幊上凡反复呕血、黑便、脾大、食管胃底静脉曲张, 而肝功能正常的不明原因的门脉高压患者, 要考虑此病的可能, 彩色多普勒检查对诊断该病具有重要意义, 内镜下套扎、门体分流和/或断流术可明显降低再出血率。

4 参考文献

- 陈陵, 杨仕明, 房殿春, 贾树蓉, 陈飞, 孙浩平. 特发性门脉高压症. 世界华人消化杂志 2004;12:1191-1195
- Dhiman RK, Chawla Y, Vasishta RK, Kakkar N, Dilawari JB, Trehan MS, Puri P, Mitra SK, Suri S. Non-cirrhotic portal fibrosis (idiopathic portal hypertension): experience with 151 patients and a review of the literature. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:6-16
- Okudaira M, Ohbu M, Okuda K. Idiopathic portal hypertension and its pathology. *Semin Liver Dis* 2002;22:59-72
- Poddar U, Thapa BR, Puri P, Girish CS, Vaiphei K, Vasishta RK, Singh K. Non-cirrhotic portal fibrosis in children. *Indian J Gastroenterol* 2000;19:12-13
- Bernard PH, Le-Bail B, Cransac M, Barcina MG, Carles J, Balabaud C, Bioulac-Sage P. Progression from idiopathic portal hypertension to incomplete septal cirrhosis with liver failure requiring liver transplantation. *J Hepatol* 1995;22:495-499
- Ludwig J, Hashimoto E, Obata H, Baldus WP. Idiopathic portal hypertension: a histopathological study of 26 Japanese cases. *Histopathology* 1993;22:227-234
- Ibarrola C, Colina F. Clinicopathological features of nine cases of non-cirrhotic portal hypertension: current definitions and criteria are inadequate. *Histopathology* 2003;42:251-264
- Nishida T, Hayakawa K, Ogasawara H, Katsuma Y. Interesting RI accumulation in hepatic images with Tc-99m GSA SPECT scintigraphy in idiopathic portal hypertension. *Ann Nucl Med* 2001;15:53-55
- Akaki S, Mitsumori A, Kanazawa S, Takeda Y, Joja I, Hiraki Y, Sakaguchi K. Reduced radioactivity in the periphery of the liver in a patient with idiopathic portal hypertension. *Clin Nucl Med* 1997;22:369-371
- Qureshi H, Kamal S, Khan RA, Zuberi SJ, Alam SE. Differentiation of cirrhotic Vs idiopathic portal hypertension using 99mTc-Sn colloid dynamic and static scintigraphy. *J Pak Med Assoc* 1991;41:126-129
- Waguri N, Suda T, Kamura T, Aoyagi Y. Heterogeneous hepatic enhancement on CT angiography in idiopathic portal hypertension. *Liver* 2002;22:276-280
- Arai K, Matsui O, Kadoya M, Yoshikawa J, Gabata T, Takashima T, Kobayashi K, Unoura M. MR imaging in idiopathic portal hypertension. *J Comput Assist Tomogr* 1991;15: 405-408
- Terada T, Minato H, Nakanuma Y, Shinozaki K, Kobayashi S, Matsui O. Ultrasound visualization of hepatic peribiliary cysts: a comparison with morphology. *Am J Gastroenterol* 1992;87: 1499-1502
- Bajaj JS, Bhattacharjee J, Sarin SK. Coagulation profile and platelet function in patients with extrahepatic portal vein obstruction and non-cirrhotic portal fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:641-646

- 15 Kochhar R, Goenka MK, Mehta SK. Outcome of injection sclerotherapy using absolute alcohol in patients with cirrhosis, non-cirrhotic portal fibrosis, and extrahepatic portal venous obstruction. *Gastrointest Endosc* 1991;37:460-464
- 16 Bhargava DK, Dasarathy S, Sundaram KR, Ahuja RK. Efficacy of endoscopic sclerotherapy on long-term management of oesophageal varices: a comparative study of results in patients with cirrhosis of the liver, non-cirrhotic portal fibrosis (NCPF) and extrahepatic portal venous obstruction (EHO). *J Gastroenterol Hepatol* 1991;6:471-475
- 17 Ohta M, Shimada T, Matsufuji H, Yukizane T, Yamada H, Sugimachi K. Surgical treatment of a patient with idiopathic portal hypertension and hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1461-1463
- 18 Dumortier J, Bizollon T, Scoazec JY, Chevallier M, Bancel B, Berger F, Ducerf C, Claudel-Bonvoisin S, Paliard P, Boillot O, Trepo C. Orthotopic liver transplantation for idiopathic portal hypertension: indications and outcome. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:417-422
- 19 Sarin SK, Kapoor D. Non-cirrhotic portal fibrosis: current concepts and management. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:526-534

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

• 临床经验 •

血清-腹水白蛋白梯度与渗漏出液指标对腹水病因诊断价值的比较

廖山婴, 刘思纯, 胡品津

廖山婴, 刘思纯, 胡品津, 中山大学附属第一医院消化内科
广东省广州市 510080
项目负责人: 刘思纯, 510080, 广东省广州市中山二路 58 号, 中山大学附属第一医院消化内科. liaosy@gzsums.edu.cn
电话: 020-87755766-8195 传真: 020-87755766-8172
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-03

摘要

目的: 比较血清-腹水白蛋白梯度(SAAG)在腹水病因诊断时是否优于传统的渗漏出液指标.

方法: 67例腹水患者按最终诊断结果及腹水的发生机制分为门脉高压组和非门脉高压组, 同日内测定血清及腹水中总蛋白、白蛋白, SAAG=当日血清白蛋白-腹水白蛋白. 诊断标准为: 腹水总蛋白(AFTP)≥25 g/L、腹水血清总蛋白比值≥0.5 诊断为渗出性, 反之为漏出性; SAAG≥11 g/L 诊断为门脉高压性, 反之为非门脉高压性.

结果: 门脉高压组的 SAAG、AFTP、腹水血清总蛋白比值分别为 19.67 ± 6.34 g/L、 11.26 ± 8.76 g/L、 0.17 ± 0.14 ; 门脉高压组分别为 9.66 ± 5.01 g/L、 30.87 ± 9.58 g/L、 0.45 ± 0.13 , 两组相比差异均有显著性($P<0.01$). SAAG ≥ 11 g/L 诊断门脉高压性腹水的敏感性为 94%, 特异性为 84%, 阳性预测值为 87%, 阴性预测值为 93%, 准确性为 90%; 以 AFTP<25 g/L 为界值, 分别为 92%、52%、69%、84%、73%; 以腹水血清总蛋白比值<0.5 为界值, 分别为 97%、48%、69%、94%、75%. 部分肝硬化患者治疗前后的 AFTP 及 SAAG 检测显示, 治疗前、后 AFTP 差别有显著性(7.71 ± 3.60 vs 12.65 ± 6.83 g/L, $P < 0.05$), 而 SAAG 之间无显著性差异(22.04 ± 4.43 vs 22.10 ± 5.11 g/L, $P > 0.05$).

结论: SAAG 在腹水病因诊断时优于传统的渗漏出液指标, 具有重要价值. SAAG 受治疗影响较小, 输入白蛋白、使

用利尿剂或治疗性放腹水不影响其水平.

廖山婴, 刘思纯, 胡品津. 血清-腹水白蛋白梯度与渗漏出液指标对腹水病因诊断价值的比较. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1492-1494
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1492.asp>

0 引言

腹水是临床上的常见征象, 其病因多样. 在我国, 失代偿期慢性肝病是其最常见病因, 其他包括腹腔肿瘤、心功能不全、结核性腹膜炎等^[1]. 由于不同病因腹水的治疗及预后不尽相同, 故临幊上鉴别至关重要. 传统的渗漏出液指标腹水总蛋白(AFTP)、腹水血清总蛋白比值等的诊断敏感性及准确性均不甚理想^[1-5]. 近年, 有学者提出血清-腹水白蛋白梯度(SAAG)在腹水病因诊断中具有重要作用. 本研究对 67 例腹水患者测定 SAAG、AFTP、腹水血清总蛋白比值, 探讨其对腹水病因鉴别的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-10/2003-3于我院住院治疗的腹水患者 67 例, 其中男 33 例, 女 34 例, 平均年龄(52.19 ± 14.85 岁). 按其最终诊断结果及腹水的发生机制分为 2 组: 门脉高压组 36 例, 包括肝硬化 22 例(肝炎肝硬化 15 例, 酒精性肝硬化 4 例, 胆汁性肝硬化、肝豆状核变性及隐源性各 1 例), 肝硬化并原发性肝癌 11 例和肝转移瘤 3 例(分别为转移性印戒细胞癌、转移性腺癌、胃窦癌肝转移). 非门脉高压组 31 例, 包括腹膜转移性肿瘤 26 例(子宫内膜癌 7 例, 卵巢癌 6 例, 乳腺癌 2 例, 胃癌 2 例, 直肠癌 2 例, 肺癌、食管癌、结肠类癌、胃非何杰金淋巴瘤各 1 例, 原发灶不明者 3 例)和其他原因腹水者 5 例(结核性腹膜炎 2 例, 系统性红斑狼疮及药物性肝病、胆

- 15 Kochhar R, Goenka MK, Mehta SK. Outcome of injection sclerotherapy using absolute alcohol in patients with cirrhosis, non-cirrhotic portal fibrosis, and extrahepatic portal venous obstruction. *Gastrointest Endosc* 1991;37:460-464
- 16 Bhargava DK, Dasarathy S, Sundaram KR, Ahuja RK. Efficacy of endoscopic sclerotherapy on long-term management of oesophageal varices: a comparative study of results in patients with cirrhosis of the liver, non-cirrhotic portal fibrosis (NCPF) and extrahepatic portal venous obstruction (EHO). *J Gastroenterol Hepatol* 1991;6:471-475
- 17 Ohta M, Shimada T, Matsufuji H, Yukizane T, Yamada H, Sugimachi K. Surgical treatment of a patient with idiopathic portal hypertension and hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1461-1463
- 18 Dumortier J, Bizollon T, Scoazec JY, Chevallier M, Bancel B, Berger F, Ducerf C, Claudel-Bonvoisin S, Paliard P, Boillot O, Trepo C. Orthotopic liver transplantation for idiopathic portal hypertension: indications and outcome. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:417-422
- 19 Sarin SK, Kapoor D. Non-cirrhotic portal fibrosis: current concepts and management. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:526-534

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

• 临床经验 •

血清-腹水白蛋白梯度与渗漏出液指标对腹水病因诊断价值的比较

廖山婴, 刘思纯, 胡品津

廖山婴, 刘思纯, 胡品津, 中山大学附属第一医院消化内科
广东省广州市 510080
项目负责人: 刘思纯, 510080, 广东省广州市中山二路 58 号, 中山大学附属第一医院消化内科. liaosy@gzsums.edu.cn
电话: 020-87755766-8195 传真: 020-87755766-8172
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-03

摘要

目的: 比较血清-腹水白蛋白梯度(SAAG)在腹水病因诊断时是否优于传统的渗漏出液指标.

方法: 67例腹水患者按最终诊断结果及腹水的发生机制分为门脉高压组和非门脉高压组, 同日内测定血清及腹水中总蛋白、白蛋白, SAAG=当日血清白蛋白-腹水白蛋白. 诊断标准为: 腹水总蛋白(AFTP)≥25 g/L、腹水血清总蛋白比值≥0.5 诊断为渗出性, 反之为漏出性; SAAG≥11 g/L 诊断为门脉高压性, 反之为非门脉高压性.

结果: 门脉高压组的 SAAG、AFTP、腹水血清总蛋白比值分别为 19.67 ± 6.34 g/L、 11.26 ± 8.76 g/L、 0.17 ± 0.14 ; 门脉高压组分别为 9.66 ± 5.01 g/L、 30.87 ± 9.58 g/L、 0.45 ± 0.13 , 两组相比差异均有显著性($P<0.01$). SAAG ≥ 11 g/L 诊断门脉高压性腹水的敏感性为 94%, 特异性为 84%, 阳性预测值为 87%, 阴性预测值为 93%, 准确性为 90%; 以 AFTP<25 g/L 为界值, 分别为 92%、52%、69%、84%、73%; 以腹水血清总蛋白比值<0.5 为界值, 分别为 97%、48%、69%、94%、75%. 部分肝硬化患者治疗前后的 AFTP 及 SAAG 检测显示, 治疗前、后 AFTP 差别有显著性(7.71 ± 3.60 vs 12.65 ± 6.83 g/L, $P < 0.05$), 而 SAAG 之间无显著性差异(22.04 ± 4.43 vs 22.10 ± 5.11 g/L, $P > 0.05$).

结论: SAAG 在腹水病因诊断时优于传统的渗漏出液指标, 具有重要价值. SAAG 受治疗影响较小, 输入白蛋白、使

用利尿剂或治疗性放腹水不影响其水平.

廖山婴, 刘思纯, 胡品津. 血清-腹水白蛋白梯度与渗漏出液指标对腹水病因诊断价值的比较. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1492-1494
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1492.asp>

0 引言

腹水是临床上的常见征象, 其病因多样. 在我国, 失代偿期慢性肝病是其最常见病因, 其他包括腹腔肿瘤、心功能不全、结核性腹膜炎等^[1]. 由于不同病因腹水的治疗及预后不尽相同, 故临幊上鉴别至关重要. 传统的渗漏出液指标腹水总蛋白(AFTP)、腹水血清总蛋白比值等的诊断敏感性及准确性均不甚理想^[1-5]. 近年, 有学者提出血清-腹水白蛋白梯度(SAAG)在腹水病因诊断中具有重要作用. 本研究对 67 例腹水患者测定 SAAG、AFTP、腹水血清总蛋白比值, 探讨其对腹水病因鉴别的意义.

1 材料和方法

1.1 材料 2002-10/2003-3于我院住院治疗的腹水患者 67 例, 其中男 33 例, 女 34 例, 平均年龄(52.19 ± 14.85 岁). 按其最终诊断结果及腹水的发生机制分为 2 组: 门脉高压组 36 例, 包括肝硬化 22 例(肝炎肝硬化 15 例, 酒精性肝硬化 4 例, 胆汁性肝硬化、肝豆状核变性及隐源性各 1 例), 肝硬化并原发性肝癌 11 例和肝转移瘤 3 例(分别为转移性印戒细胞癌、转移性腺癌、胃窦癌肝转移). 非门脉高压组 31 例, 包括腹膜转移性肿瘤 26 例(子宫内膜癌 7 例, 卵巢癌 6 例, 乳腺癌 2 例, 胃癌 2 例, 直肠癌 2 例, 肺癌、食管癌、结肠类癌、胃非何杰金淋巴瘤各 1 例, 原发灶不明者 3 例)和其他原因腹水者 5 例(结核性腹膜炎 2 例, 系统性红斑狼疮及药物性肝病、胆

漏各1例).

1.2 方法 所有患者于治疗前行腹腔穿刺术抽取腹水, 同时留取当日空腹静脉血。腹水和血清白蛋白检测采用溴甲酚绿法, 试剂盒由德国 Human 公司生产, 检测仪器为 HITACHI 7170A 自动生化分析仪。SAAG= 当日血清白蛋白 - 腹水白蛋白。本研究旨在比较 SAAG 及传统的渗漏出液指标在 2 组间的差异, 及各指标对腹水病因诊断的价值。采用诊断标准为: AFTP ≥ 25 g/L、腹水血清总蛋白比值 ≥ 0.5 诊断为渗出性, 反之为漏出性; SAAG ≥ 11 g/L 诊断为门脉高压性, 反之为非门脉高压性。

统计学处理 计数数据均以 mean±SD 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件不同组间进行 χ^2 检验和连续型非配对资料的 t 检验, 以 P < 0.05 为具有统计学差异。采用诊断试验四格表分别计算各指标对不同病因腹水的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值和准确性。

2 结果

2.1 两组的 SAAG、AFTP、腹水血清白蛋白比值检测结果 (表 1)

表 1 门脉高压组与非门脉高压组的 SAAG、AFTP、腹水血清总蛋白比值水平

| | 门脉高压组(n = 36) | 非门脉高压组(n = 31) |
|-----------|---------------------------|----------------|
| SAAG(g/L) | 19.67 ± 6.34 ^a | 9.66 ± 5.01 |
| AFTP(g/L) | 11.26 ± 8.76 ^a | 30.87 ± 9.58 |
| 腹水血清总蛋白比值 | 0.17 ± 0.14 ^a | 0.45 ± 0.13 |

^aP < 0.01 vs 非门脉高压组。

2.2 各指标鉴别门脉高压性腹水的价值 (表 2)

表 2 各指标鉴别门脉高压性腹水的价值

| | 门脉高 压组 n = 36 | 非门脉 高压组 n = 31 | 敏感 性(%) | 特异 性(%) | 阳性 预测值 (%) | 阴性 预测值 (%) | 准确 性 (%) |
|-----------------|---------------------|----------------------|------------|-----------------|------------------|------------------|-----------------|
| SAAG ≥ 11 g/L | 34 | 5 | 94 | 84 | 87 | 93 | 90 |
| AFTP < 25 g/L | 33 | 15 | 92 | 52 ^a | 69 ^a | 84 | 73 ^a |
| 腹水血清总蛋白比值 < 0.5 | 35 | 16 | 97 | 48 ^a | 69 ^a | 94 | 75 ^a |

^aP < 0.05 vs SAAG。

2.3 12 例肝硬化患者治疗前后的 SAAG 及 AFTP 检测结果 (表 3)

表 3 12 例肝硬化患者治疗前后的 AFTP 及 SAAG 水平

| | 治疗前 | 治疗后 |
|------------|--------------|---------------------------|
| AFTP (g/L) | 7.71 ± 3.60 | 12.65 ± 6.83 ^a |
| SAAG (g/L) | 22.04 ± 4.43 | 22.10 ± 5.11 |

^aP < 0.05 vs 治疗前。

3 讨论

我们对 67 例腹水患者进行研究, 发现门脉高压组与非门脉高压组的 SAAG、AFTP、腹水血清总蛋白比值差异有显著性。以 SAAG ≥ 11 g/L 为界值, 诊断门脉高压性腹水的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值、准确性分别为 94%、84%、87%、93%、90%, 优于 AFTP、腹水血清总蛋白比值(其准确性分别为 73%、75%), 与以往文献报道相符^[1-3]。

SAAG 是血清白蛋白与同日测得的腹水白蛋白之间的差值, 其用于腹水病因鉴别的理论基础是他可以反映门脉压力。按 Starling 平衡机制, 门脉高压时, 血管内与腹腔流体静压差增大, 驱动液体从毛细血管进入腹腔, 为建立新的平衡, 血浆与腹水胶体渗透压之差增大。由于白蛋白是维持胶体渗透压的主要因素, 故血管内外的白蛋白梯度(SAAG)可以反映静水压差(即门脉压力)^[4]。此后, 许多研究通过直接测定门脉压力的血流动力学指标亦证实了 SAAG 与门脉压力之间呈线性相关^[6-10]。

而 AFTP 受多种因素影响, 是由血清蛋白及门脉压力共同决定的。Hoefs et al^[6] 研究发现, AFTP 与三个互不相关的变量相关: 血清白蛋白($r = 0.67$, $P < 0.0001$)、血清球蛋白($r = 0.44$, $P < 0.001$)、门脉压力($r = -0.48$, $P < 0.0005$), 其中任一因素的变化都可影响 AFTP。因此 AFTP 不能准确反映门脉压力。以上理论可解释为什么在部分漏出性腹水患者中, 如血清白蛋白不低的肝硬化、心功能不全及缩窄性心包炎等会出现相对高的 AFTP; 而渗出性腹水如合并严重的低白蛋白血症, 则会出现相对低的 AFTP^[11]。

此外, 本研究中 12 例肝硬化患者治疗前后的 SAAG、AFTP 结果表明, AFTP 受治疗影响大, 输入白蛋白及使用利尿剂均可使其升高。而同一患者的门脉压力相对稳定, 在患者摄入含盐食物、输入白蛋白及使用利尿剂或治疗性腹腔穿刺前后, SAAG 没有或仅有细微的变化, 与以往文献报道相符^[2, 6]。

总之, SAAG 由于能准确反映门脉压力, 且受治疗影响小, 较传统的渗漏出液指标更具有优越性。以 11 g/L 为界限, SAAG ≥ 11 g/L 提示门脉高压性, 常见于肝硬化、酒精性肝炎、肝广泛性转移癌、Budd-Chiari 综合征、暴发性肝衰竭、门静脉血栓、静脉闭塞性疾病、心源性腹水等^[12-13]。SAAG < 11 g/L 提示非门脉高压性, 常见于腹腔恶性肿瘤、结核性腹膜炎、胰源性腹水、肾病综合征、胆源性腹水、结缔组织疾病所致的浆膜炎等^[1, 14-16]。

因此, 依据 SAAG 将腹水分为高梯度性或低梯度性, 即门脉高压性或非门脉高压性, 对腹水病因鉴别具有重要临床价值。

4 参考文献

- Runyon BA. Care of patients with ascites. *N Engl J Med* 1994; 330:337-341
- Runyon BA, Montano AA, Akriviadis EA, Antillon MR, Irv-

- ing MA, McHutchison JG. The serum-ascites albumin gradient is superior to the exudate-transudate concept in the differential diagnosis of ascites. *Ann Intern Med* 1992;117:215-220
- 3 Alba D, Torres E, Vazquez JJ. Sero-ascitic gradient of albumin: usefulness and diagnostic limitation. *An Med Interna* 1995; 12:404-407
- 4 Akriviadis EA, Kapnias D, Hadjigavriel M, Mitsiou A, Gouli J. Serum/ascites albumin gradient: its value as a rational approach to the differential diagnosis of ascites. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:814-817
- 5 Paramothayan NS, Barron J. New criteria for the differentiation between transudates and exudates. *J Clin Pathol* 2002; 55:69-71
- 6 Hoefs JC. Serum protein concentration and portal pressure determine the ascitic fluid protein concentration in patients with chronic liver disease. *J Lab Clin Med* 1983;102:260-273
- 7 Rector WG Jr, Reynolds TB. Superiority of the serum-ascites albumin difference over the ascites total protein concentration in separation of "transudative" and "exudative" ascites. *Am J Med* 1984;77:83-85
- 8 Kajani MA, Yoo YK, Alexander JA, Gavaler JS, Stauber RE, Dindzans VJ, Van Thiel DH. Serum-ascites albumin gradients in nonalcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 1990;35:33-37
- 9 Dittrich S, Yordi LM, de Mattos AA. The value of serum-ascites albumin gradient for the determination of portal hypertension in the diagnosis of ascites. *Hepatogastroenterology* 2001;48:166-168
- 10 Torres E, Barros P, Calmet F. Correlation between Serum-ascites albumin concentratin gradient and endoscopic parameters of portal hypertension. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2172-2178
- 11 Elis A, Meisel S, Tishler T, Kitai Y, Lishner M. Ascitic fluid to serum bilirubin concentration ratio for the classification of transudates or exudates. *Am J Gastroenterol* 1998;93:401-403
- 12 Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:208-215
- 13 Tahan V, Avsar E, Karaca C, Uslu E, Eren F, Aydin S, Uzun H, Hamzaoglu HO, Besisik F, Kalayci C, Okten A, Tozun N. Adrenomedullin in cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2003;9:2325-2327
- 14 Dong WG, Sun XM, Yu BP, Luo HS, Yu JP. Role of VEGF and CD44v6 in differentiating benign from malignant ascites. *World J Gastroenterol* 2003;9:2596-2600
- 15 Uygur-Bayramicli O, Dabak G, Dabak R. A clinical dilemma: abdominal tuberculosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1098-1101
- 16 Sun B, Li HL, Gao Y, Xu J, Jiang HC. Factors predisposing to severe acute pancreatitis: evaluation and prevention. *World J Gastroenterol* 2003;9:1102-1105

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

• 临床经验 •

腹型过敏性紫癜临床特点及内镜检查结果分析

刘卓刚, 矫德馨

刘卓刚, 矫德馨, 中国医科大学附属二院血液内科 辽宁省沈阳市 110004
 项目负责人: 刘卓刚, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属二院血液内科. liuzg432@sina.com
 电话: 024-83956467 传真: 024-23892617
 收稿日期: 2004-02-23 接受日期: 2004-03-04

摘要

目的: 探索腹型过敏性紫癜的临床表现和内镜特点, 为该病诊治提供参考.

方法: 对腹型过敏性紫癜44例进行回顾分析.

结果: 发病前1-3 wk有呼吸道症状14例(31.8%), 食物过敏2例(4.6%), 药物过敏2例(4.6%). 34例先有紫癜后有腹痛症状, 10例以腹痛起病. 胃肠黏膜紫癜样改变26例, 其中胃黏膜受累22例, 十二指肠受累26例, 回肠末端受累23例, 结肠受累20例, 2例无明显异常.

结论: 腹型过敏性紫癜临幊上易误诊, 结合该病腹部表现及胃镜特点, 可正确诊断, 及时治疗.

刘卓刚, 矫德馨. 腹型过敏性紫癜临幊特点及内镜检查结果分析. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1494-1495

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1494.asp>

0 引言

过敏性紫癜是一种血管变态反应性疾病, 亦称免疫性血管性疾病. 临幊主要有皮肤型、腹型、肾型、关节型及其他类型, 皮肤型多见, 发病人群多为儿童, 腹型少见, 极易误诊. 本文回顾分析我院1996-06/2004-02收治的44例腹型过敏性紫癜患者, 其中内镜检查28例, 以探索腹型过敏性紫癜的临幊表现和内镜特点.

1 材料和方法

1.1 材料 44例腹型过敏性紫癜患者系我院1996-06/2004-02住院病例, 男26例, 女18例, 年龄15-62岁, 平均24岁. 发病至就诊时间为12 h-25 d. 病例符合腹型过敏性紫癜诊断标准^[1].

1.2 方法 28例患者行胃镜检查, 其中25例亦接受结肠镜检查. 采用日本PENTAX公司EG2940电子胃镜, EC3840电子结肠.

2 结果

2.1 临幊特点 44例患者, 发病前1-3 wk有上呼吸道症状14例(31.8%), 食物(鱼、虾等)过敏2例(4.6%), 药物过敏2例(4.6%), 无明显诱因26例(59.1%). 34例皮

- ing MA, McHutchison JG. The serum-ascites albumin gradient is superior to the exudate-transudate concept in the differential diagnosis of ascites. *Ann Intern Med* 1992;117:215-220
- 3 Alba D, Torres E, Vazquez JJ. Sero-ascitic gradient of albumin: usefulness and diagnostic limitation. *An Med Interna* 1995; 12:404-407
- 4 Akriviadis EA, Kapnias D, Hadjigavriel M, Mitsiou A, Gouli J. Serum/ascites albumin gradient: its value as a rational approach to the differential diagnosis of ascites. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:814-817
- 5 Paramothayan NS, Barron J. New criteria for the differentiation between transudates and exudates. *J Clin Pathol* 2002; 55:69-71
- 6 Hoefs JC. Serum protein concentration and portal pressure determine the ascitic fluid protein concentration in patients with chronic liver disease. *J Lab Clin Med* 1983;102:260-273
- 7 Rector WG Jr, Reynolds TB. Superiority of the serum-ascites albumin difference over the ascites total protein concentration in separation of "transudative" and "exudative" ascites. *Am J Med* 1984;77:83-85
- 8 Kajani MA, Yoo YK, Alexander JA, Gavaler JS, Stauber RE, Dindzans VJ, Van Thiel DH. Serum-ascites albumin gradients in nonalcoholic liver disease. *Dig Dis Sci* 1990;35:33-37
- 9 Dittrich S, Yordi LM, de Mattos AA. The value of serum-ascites albumin gradient for the determination of portal hypertension in the diagnosis of ascites. *Hepatogastroenterology* 2001;48:166-168
- 10 Torres E, Barros P, Calmet F. Correlation between Serum-ascites albumin concentratin gradient and endoscopic parameters of portal hypertension. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2172-2178
- 11 Elis A, Meisel S, Tishler T, Kitai Y, Lishner M. Ascitic fluid to serum bilirubin concentration ratio for the classification of transudates or exudates. *Am J Gastroenterol* 1998;93:401-403
- 12 Rabe C, Pilz T, Klostermann C, Berna M, Schild HH, Sauerbruch T, Caselmann WH. Clinical characteristics and outcome of a cohort of 101 patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2001;7:208-215
- 13 Tahan V, Avsar E, Karaca C, Uslu E, Eren F, Aydin S, Uzun H, Hamzaoglu HO, Besisik F, Kalayci C, Okten A, Tozun N. Adrenomedullin in cirrhotic and non-cirrhotic portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2003;9:2325-2327
- 14 Dong WG, Sun XM, Yu BP, Luo HS, Yu JP. Role of VEGF and CD44v6 in differentiating benign from malignant ascites. *World J Gastroenterol* 2003;9:2596-2600
- 15 Uygur-Bayramicli O, Dabak G, Dabak R. A clinical dilemma: abdominal tuberculosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1098-1101
- 16 Sun B, Li HL, Gao Y, Xu J, Jiang HC. Factors predisposing to severe acute pancreatitis: evaluation and prevention. *World J Gastroenterol* 2003;9:1102-1105

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

• 临床经验 •

腹型过敏性紫癜临床特点及内镜检查结果分析

刘卓刚, 矫德馨

刘卓刚, 矫德馨, 中国医科大学附属二院血液内科 辽宁省沈阳市 110004
 项目负责人: 刘卓刚, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属二院血液内科. liuzg432@sina.com
 电话: 024-83956467 传真: 024-23892617
 收稿日期: 2004-02-23 接受日期: 2004-03-04

摘要

目的: 探索腹型过敏性紫癜的临床表现和内镜特点, 为该病诊治提供参考.

方法: 对腹型过敏性紫癜44例进行回顾分析.

结果: 发病前1-3 wk有呼吸道症状14例(31.8%), 食物过敏2例(4.6%), 药物过敏2例(4.6%). 34例先有紫癜后有腹痛症状, 10例以腹痛起病. 胃肠黏膜紫癜样改变26例, 其中胃黏膜受累22例, 十二指肠受累26例, 回肠末端受累23例, 结肠受累20例, 2例无明显异常.

结论: 腹型过敏性紫癜临幊上易误诊, 结合该病腹部表现及胃镜特点, 可正确诊断, 及时治疗.

刘卓刚, 矫德馨. 腹型过敏性紫癜临幊特点及内镜检查结果分析. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1494-1495

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1494.asp>

0 引言

过敏性紫癜是一种血管变态反应性疾病, 亦称免疫性血管性疾病. 临幊主要有皮肤型、腹型、肾型、关节型及其他类型, 皮肤型多见, 发病人群多为儿童, 腹型少见, 极易误诊. 本文回顾分析我院1996-06/2004-02收治的44例腹型过敏性紫癜患者, 其中内镜检查28例, 以探索腹型过敏性紫癜的临幊表现和内镜特点.

1 材料和方法

1.1 材料 44例腹型过敏性紫癜患者系我院1996-06/2004-02住院病例, 男26例, 女18例, 年龄15-62岁, 平均24岁. 发病至就诊时间为12 h-25 d. 病例符合腹型过敏性紫癜诊断标准^[1].

1.2 方法 28例患者行胃镜检查, 其中25例亦接受结肠镜检查. 采用日本PENTAX公司EG2940电子胃镜, EC3840电子结肠.

2 结果

2.1 临幊特点 44例患者, 发病前1-3 wk有上呼吸道症状14例(31.8%), 食物(鱼、虾等)过敏2例(4.6%), 药物过敏2例(4.6%), 无明显诱因26例(59.1%). 34例皮

肤紫癜后出现腹痛症状，10例(22.7%)以腹痛起病，2-10d后出现皮疹，其中误诊为消化道出血6例、急性胰腺炎2例、肠梗阻1例、阑尾炎1例，行阑尾切除术。腹痛为持续性或阵发性加重，表现为脐周痛、部分为上腹痛或全腹痛，无放散。体检示腹部柔软，压痛阳性，无肌紧张及反跳痛。便潜血阳性40例。出凝血时间、血块回缩及骨髓检查正常，束臂试验阳性19例(43.2%)。

2.2 内镜结果 发病2-7d行胃镜检查，胃肠黏膜有紫癜样改变26例(92.9%)，其中胃22例，十二指肠26例。肠镜检查25例，回肠末端有紫癜样改变23例，结肠20例，2例无明显异常。镜下表现为：胃肠黏膜不同程度水肿、出血点，少数融合成片状，多为圆形，有的破溃呈现黏膜表浅糜烂或溃疡。3例患者肠腔内有积血。病变分布：胃、十二指肠、回肠末端病理改变明显，食管未见异常。所有病例进行病理活检，结果显示：上皮细胞肿胀，黏膜下血管壁可有坏死，间质水肿，红细胞外渗，血管细胞有炎症变化，中性粒细胞及淋巴细胞浸润。

3 讨论

通过对44例患者回顾分析，腹型过敏性紫癜临床及内镜检查有如下特点：(1)皮疹出现前有胃肠道症状者占22.7%，与文献[2]报道14-36%相近。(2)以腹痛为主要表现，腹痛部位多变而不固定，自觉症状多为绞痛，剧烈难忍，但腹部体征轻微，有轻微压痛而无肌紧张或固定压痛点，呈症状与体征分离现象。(3)腹痛易反复发作，进食可致腹痛反复或加重，伴随症状以消化道出血多见。(4)本组内镜多见胃、十二指肠、回肠末端受累，少有累及食管，与国外报道^[3]不符。而Gunasekaran et al^[4]报道多见小肠受累。(5)黏膜损害表现为：黏膜下大小不等出血点，重者形成瘀斑和血肿，少数可见糜烂、溃

疡，病变之间黏膜正常。(6)胃肠黏膜改变与皮肤紫癜程度密切相关。本组行内镜检查28例，26例(92.9%)有胃肠黏膜紫癜样改变。国内报道^[5]腹型过敏性紫癜100%有胃肠受累。

皮肤紫癜可出现在腹痛前后，出现在腹痛后者，易造成误诊。本组10例腹痛首发者均误诊，其原因可能为：(1)对该病复杂性认识不足。本组10例患者，皮肤紫癜在腹痛后2-10d出现，误诊为消化道出血、急性胰腺炎、肠梗阻、急性阑尾炎，甚至行阑尾切除术，给患者造成不必要的痛苦。(2)病史采集、查体不仔细。本组14例患者在发病前有上呼吸道感染症状，2例特殊食物过敏，1例药物过敏，而病历中均无记录。(3)诊断思路狭窄。满足于原发病的诊断。本组患者出现腹痛、黑便症状满足于消化道出血或急性胃肠炎诊断，未进一步探究病因。

腹型过敏性紫癜临床以腹痛为特点易造成误诊，而及时的胃肠镜检查可做出正确诊断。当缺乏皮肤特征或关节肿痛时，腹痛应与急腹症区别，行胃镜检查，可确定病变范围、程度，可在临床推广。

4 参考文献

- 张之南. 血液病诊断及疗效标准. 第2版. 北京：科学出版社, 1998: 270-275
- Choong CK, Beasley SW. Intra-abdominal manifestation of Henoch-Schonlein purpura. *J Paediatr Child Health* 1998;34: 405-409
- Deguchi M, Shiraki K, Itoh N, Konishi T, Takase K, Nakano T. Esophageal involvement in adult-onset Schonlein purpura. *Gastrointest Endosc* 2001;53:241-244
- Gunasekaran TS, Bermanan J, Gonzalez M. Duodenitis: Is it idiopathic or is it Henoch-Schonlein purpura with the purpura? *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:22-28
- 任万英, 李华, 赵丽婷. 过敏性紫癜在内镜下的胃、肠黏膜改变. 中华消化杂志 2002;22:250-251

经皮肝穿刺胆道支架置放结合动脉化疗栓塞治疗恶性梗阻性黄疸

刘岩, 杨光, 于友涛, 刘瑞宝, 李任飞, 张同, 申宝忠

刘岩, 杨光, 于友涛, 刘瑞宝, 李任飞, 张同, 申宝忠, 哈尔滨医科大学第三临床医学院放射科 黑龙江省哈尔滨市 150040
项目负责人: 申宝忠, 150040, 黑龙江省哈尔滨市哈平路150号, 哈尔滨医科大学第三临床医学院放射科。bzhshen@hotmail.com
电话: 0451-86623347 传真: 0451-86623347
收稿日期: 2003-12-17 接受日期: 2004-02-18

摘要 ■

目的: 观察胆道支架置放结合动脉化疗栓塞姑息治疗恶性梗阻性黄疸的疗效。

方法: 对17例恶性梗阻性黄疸患者行经皮肝穿刺胆道支架置放结合动脉化疗栓塞治疗。分别观察血清胆红素下降情况、手术并发症，并随访胆道支架维持通畅时间和患者生存期。

结果: 血清胆红素在术后1wk下降最快。并发症有疼痛、出血、局限性腹膜炎。17例患者平均支架维持通畅时间为14.2mo，平均生存期为16.5mo。

肤紫癜后出现腹痛症状，10例(22.7%)以腹痛起病，2-10d后出现皮疹，其中误诊为消化道出血6例、急性胰腺炎2例、肠梗阻1例、阑尾炎1例，行阑尾切除术。腹痛为持续性或阵发性加重，表现为脐周痛、部分为上腹痛或全腹痛，无放散。体检示腹部柔软，压痛阳性，无肌紧张及反跳痛。便潜血阳性40例。出凝血时间、血块回缩及骨髓检查正常，束臂试验阳性19例(43.2%)。

2.2 内镜结果 发病2-7d行胃镜检查，胃肠黏膜有紫癜样改变26例(92.9%)，其中胃22例，十二指肠26例。肠镜检查25例，回肠末端有紫癜样改变23例，结肠20例，2例无明显异常。镜下表现为：胃肠黏膜不同程度水肿、出血点，少数融合成片状，多为圆形，有的破溃呈现黏膜表浅糜烂或溃疡。3例患者肠腔内有积血。病变分布：胃、十二指肠、回肠末端病理改变明显，食管未见异常。所有病例进行病理活检，结果显示：上皮细胞肿胀，黏膜下血管壁可有坏死，间质水肿，红细胞外渗，血管细胞有炎症变化，中性粒细胞及淋巴细胞浸润。

3 讨论

通过对44例患者回顾分析，腹型过敏性紫癜临床及内镜检查有如下特点：(1)皮疹出现前有胃肠道症状者占22.7%，与文献[2]报道14-36%相近。(2)以腹痛为主要表现，腹痛部位多变而不固定，自觉症状多为绞痛，剧烈难忍，但腹部体征轻微，有轻微压痛而无肌紧张或固定压痛点，呈症状与体征分离现象。(3)腹痛易反复发作，进食可致腹痛反复或加重，伴随症状以消化道出血多见。(4)本组内镜多见胃、十二指肠、回肠末端受累，少有累及食管，与国外报道^[3]不符。而Gunasekaran et al^[4]报道多见小肠受累。(5)黏膜损害表现为：黏膜下大小不等出血点，重者形成瘀斑和血肿，少数可见糜烂、溃

疡，病变之间黏膜正常。(6)胃肠黏膜改变与皮肤紫癜程度密切相关。本组行内镜检查28例，26例(92.9%)有胃肠黏膜紫癜样改变。国内报道^[5]腹型过敏性紫癜100%有胃肠受累。

皮肤紫癜可出现在腹痛前后，出现在腹痛后者，易造成误诊。本组10例腹痛首发者均误诊，其原因可能为：(1)对该病复杂性认识不足。本组10例患者，皮肤紫癜在腹痛后2-10d出现，误诊为消化道出血、急性胰腺炎、肠梗阻、急性阑尾炎，甚至行阑尾切除术，给患者造成不必要的痛苦。(2)病史采集、查体不仔细。本组14例患者在发病前有上呼吸道感染症状，2例特殊食物过敏，1例药物过敏，而病历中均无记录。(3)诊断思路狭窄。满足于原发病的诊断。本组患者出现腹痛、黑便症状满足于消化道出血或急性胃肠炎诊断，未进一步探究病因。

腹型过敏性紫癜临床以腹痛为特点易造成误诊，而及时的胃肠镜检查可做出正确诊断。当缺乏皮肤特征或关节肿痛时，腹痛应与急腹症区别，行胃镜检查，可确定病变范围、程度，可在临床推广。

4 参考文献

- 张之南. 血液病诊断及疗效标准. 第2版. 北京：科学出版社, 1998: 270-275
- Choong CK, Beasley SW. Intra-abdominal manifestation of Henoch-Schonlein purpura. *J Paediatr Child Health* 1998;34: 405-409
- Deguchi M, Shiraki K, Itoh N, Konishi T, Takase K, Nakano T. Esophageal involvement in adult-onset Schonlein purpura. *Gastrointest Endosc* 2001;53:241-244
- Gunasekaran TS, Bermanan J, Gonzalez M. Duodenitis: Is it idiopathic or is it Henoch-Schonlein purpura with the purpura? *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:22-28
- 任万英, 李华, 赵丽婷. 过敏性紫癜在内镜下的胃、肠黏膜改变. 中华消化杂志 2002;22:250-251

经皮肝穿刺胆道支架置放结合动脉化疗栓塞治疗恶性梗阻性黄疸

刘岩, 杨光, 于友涛, 刘瑞宝, 李任飞, 张同, 申宝忠

刘岩, 杨光, 于友涛, 刘瑞宝, 李任飞, 张同, 申宝忠, 哈尔滨医科大学第三临床医学院放射科 黑龙江省哈尔滨市 150040
项目负责人: 申宝忠, 150040, 黑龙江省哈尔滨市哈平路150号, 哈尔滨医科大学第三临床医学院放射科。bzhshen@hotmail.com
电话: 0451-86623347 传真: 0451-86623347
收稿日期: 2003-12-17 接受日期: 2004-02-18

摘要 ■

目的: 观察胆道支架置放结合动脉化疗栓塞姑息治疗恶性梗阻性黄疸的疗效。

方法: 对17例恶性梗阻性黄疸患者行经皮肝穿刺胆道支架置放结合动脉化疗栓塞治疗。分别观察血清胆红素下降情况、手术并发症，并随访胆道支架维持通畅时间和患者生存期。

结果: 血清胆红素在术后1wk下降最快。并发症有疼痛、出血、局限性腹膜炎。17例患者平均支架维持通畅时间为14.2mo，平均生存期为16.5mo。

结论：胆道支架置放治疗恶性梗阻性黄疸安全、有效，与动脉化疗栓塞结合可明显延长患者生存期。

刘岩, 杨光, 于友涛, 刘瑞宝, 李任飞, 张同, 申宝忠. 经皮肝穿刺胆道支架置放结合动脉化疗栓塞治疗恶性梗阻性黄疸. 世界华人消化杂志 2004;12(6): 1495-1497

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1495.asp>

0 引言

恶性梗阻性黄疸临床表现多隐匿，出现黄疸时多为晚期，且病情进展迅速，已失去手术机会，或手术难度大，并发症和术后死亡率较高，目前仍是临床治疗中的难题。1999-03/2002-09，共17例恶性梗阻性黄疸患者在我科接受了经皮肝穿刺胆道支架置放术结合经动脉化疗栓塞(TACE)治疗，取得了较好疗效。

1 材料和方法

1.1 材料 本组17例患者中，男13例，女4例，年龄41-75岁(平均54岁)。其中胆管癌8例，胰头癌4例，肝癌2例，壶腹癌2例，肝门淋巴结转移1例。以上诊断均经影像学和血液肿瘤标记物检查或病理学证实。

1.2 方法

1.2.1 支架置入方法 全部病例均于术前行B超或CT、MR检查初步了解胆管梗阻的部位及肝内胆管扩张情况。先行经皮肝穿刺(PTC)，穿刺在B超引导下进行，穿刺点选择在右腋中线第8-10肋间，左肝管狭窄则选择剑突下穿刺入路。所有支架均通过经皮肝穿刺途径置放，其中11例首次手术放置成功，4例伴有胆道感染经过经皮肝穿刺胆道引流(PTCD)及抗炎治疗+胆道冲洗后行二次手术放置成功，2例梗阻严重者经外引流+TACE治疗后二次手术放置成功。其中2例高位梗阻患者系左右肝管起始段梗阻，于左右肝内胆管入路各放置1枚支架，1例因病变长度较长，放置2枚支架，共放置支架20枚。使用的支架有Wallstent和国产镍钛记忆合金支架等。支架长度60-80mm，直径8mm。支架放置时，其两端至少超过病变两端各1cm，对壶腹部病变支架下端进入十二指肠不超过1cm。支架放置后继续外引流3-7d，造影复查见支架开放良好、引流通畅则拔除外引流管。

1.2.2 经动脉化疗栓塞方法 TACE在患者黄疸明显减退及肝功能指标明显好转后进行。TACE术采用Seldinger法经右股动脉穿刺插管，根据血管造影所见将4F导管头端置于肝总动脉或胃十二指肠动脉或肠系膜上动脉，用表阿霉素20-50mg+5-氟尿嘧啶250-1000mg进行化疗灌注；如可以栓塞，将导管头置于肿瘤供血动脉，用丝裂霉素10-20mg与超液化碘油5-20mL混合制成乳剂进行化疗栓塞。胰头癌患者用健择1.0-1.6g+顺铂40-60mg灌注化疗，未栓塞。每个患者行TACE治疗1-3次，术后给予保肝治疗。

1.2.3 观察指标 术后分别观察血清胆红素下降情况、手

术并发症，随访胆道支架维持通畅时间和患者生存期。

2 结果

2.1 血清胆红素下降情况 所有患者行支架置入术或外引流后均表现为皮肤、巩膜黄染及皮肤瘙痒明显减轻。肝功能检查显示血清总胆红素/直接胆红素迅速下降，以术后1wk最为明显，血清总胆红素由术前(182.4±113.2μmol/L降至术后1wk的(84.7±60.5μmol/L，转氨酶水平亦明显降低。

2.2 术中、术后并发症 PTCD，放置胆道内支架术中常见并发症为胆道出血，一般为少量，经止血、抗炎治疗后1-3d后停止。术后表现为右上腹部疼痛，可逐渐缓解。2例出现穿刺点周围局限性腹膜炎，经保守治疗后消失。1例在拔除引流管后出现胆汁性胸膜炎，经胸腔冲洗引流5d后痊愈。1例在TACE术后出现肝功能衰竭，于1mo内死亡。

2.3 生存期 17例患者已有14例死亡，生存期为3-35mo(平均16.5mo)。另外3例仍存活，分别已存活12、18、23mo。

2.4 支架维持通畅时间 支架置放术后黄疸复发的患者中有5例再次入院，出现再次梗阻的时间为2-21mo。PTC术中造影发现支架内有充盈缺损或完全闭塞，重新建立胆道引流，术后血清胆红素均下降。另外12例至今或至死亡时未出现再次血清胆红素升高。至发稿之日，本组病例支架维持通畅2-35mo，平均14.2mo。

3 讨论

恶性胆道狭窄传统采用外科手术治疗，但胆管癌和胰头癌的手术切除率很低^[1-2]。胰头癌多采用胆肠吻合术引流，而对于高位胆管癌多数放弃手术治疗。1974年Molnar和Stocknm首先报道采用PTCD术治疗，为恶性梗阻性黄疸的治疗提供了一种全新的方法。但单纯PTCD术会导致全部或部分胆汁流失，影响消化吸收功能，长期胆汁流失可导致水、电解质代谢紊乱，增加胆道感染的概率。另外，引流管必须定期冲洗，并防止引流管脱落^[3]。支架置入术自1990年代中期引入我国，并以其微创、相对简单有效的特点逐步得以推广应用^[4-7]。目前治疗恶性梗阻性黄疸多主张胆道引流术、TACE、化疗、放疗等疗法的综合治疗^[8-14]。

我们实施PTC均在B超引导下沿穿刺架进行，穿刺肝内胆管的I、II级分支，一次穿刺成功率可达100%，明显优于X线透视下穿刺。该方法尤其适用于低位梗阻性黄疸患者，因多数低位梗阻性黄疸患者就诊时肝内胆管不扩张或仅轻度扩张，而胆囊较大，B超引导下穿刺可明显提高穿刺成功率，并可避免穿破胆囊，同时可避免穿刺肋膈角、肝内大血管等重要结构。

TACE治疗应尽量在胆红素明显下降、肝功能恢复至Child B级以上之后进行，否则有促进肝功能衰竭的危险。本组1例肝癌患者，肿块压迫肝门区，支架置

入后黄疸下降较慢，考虑通过TACE治疗可缩小肿块，在胆红素未明显下降的情况下即行TACE治疗，治疗后肝功损伤未能恢复，于2 mo后死亡。

本组病例发生胆道再次梗阻的原因有：肿瘤压迫支架变窄，沿金属支架网眼向内生长，肿瘤生长超过支架两端，胆道感染，与文献[15-16]报道相似。PTC造影可见胆道内充盈缺损或完全梗阻，通过再次支架置入或PTCD后胆红素均下降。与相关文献报道相比，本组病例支架维持通畅时间较单纯采用胆道支架治疗者明显延长^[15-16]。

4 参考文献

- 1 Shao YF. Treatment of proximal biliary duct carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1992;14:280-283
- 2 Cucchiara G, Gandini G, Simonetti G, Bracci F, Daffina A. Palliative treatment of extrahepatic bile duct tumors. *J Surg Oncol Suppl* 1993;3:154-157
- 3 Lammer J, Neumayer K. Biliary drainage endoprosthesis: experience with 201 placements. *Radiology* 1986;159:625-629
- 4 顾万清, 刘永雄, 聂淑文, 冯玉泉, 郭锦芳. 镍钛记忆合金胆道内支撑管在恶性胆道狭窄中的临床应用. 中华外科杂志 1993;31:260-263
- 5 谢宗贵, 张希全, 李凡东, 金鹏, 易玉海, 张绪平. 胆管支架技术5 a回顾(213例随访报告). 中华肝胆外科杂志 2002;8:595-597
- 6 胡冰, 周岱云, 龚彪, 钱光相, 陈汉, 吴孟超. 可膨式金属胆道支架解除恶性胆管梗阻的临床应用及其疗效分析. 中华外科杂志 1999;37:282-285
- 7 Huang DR, Jin XL. Carcinoma of the extrahepatic bile duct. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1988;10:67-69
- 8 Nagahama T, Maruyama M, Nakamura N, Irie T, Yoshida T, Kure N, Ebuchi M. Intrabiliary administration of doxorubicin for pancreaticobiliary cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1999;26:1849-1852
- 9 Shibata T, Sato T, Kondo H, Ootani I, Suzuki H, Kawada S. Two cases of obstructive jaundice due to extrahepatic carcinoma of the bile duct with marked response to daily oral administration of etoposide. *Gan To Kagaku Ryoho* 1990;17:2429-2432
- 10 Naoi Y, Suzuki F. Biliary intervention for malignant obstructive jaundice. Treatment through PTCD fistula. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 1990;50:1224-1236
- 11 Lameris JS, Hesselink EJ, Van Leeuwen PA, Nijs HG, Meerwaldt JH, Terpstra OT. Ultrasound-guided percutaneous transhepatic cholangiography and drainage in patients with hilar cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 1990;10:121-125
- 12 Schmeck HJ, Bartels E, Viets CH, Arnold W. Intraductal chemotherapy of bile duct cancer with 5-fluorouracil. *Klin Wochenschr* 1986;64:713-716
- 13 Itami J, Saegusa K, Tsuchiya Y, Mamiya T, Miyoshi T, Ohoto M, Arimizu N. Intracavitary high dose rate afterloading irradiation of inoperable malignant bile duct obstruction. *Strahlenther Onkol* 1986;162:105-110
- 14 Mizuno I, Tanada F, Iwai A, Kato F, Yura J. Intrabiliary tract administration of adriamycin in bile duct cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1982;9:681-687
- 15 Schima W, Prokesch R, Osterreicher C, Thurnher S, Fugger R, Schofl R, Havelec L, Lammer J. Biliary wallstent endoprosthesis in malignant hilar obstruction: long-term results with regard to the type of obstruction. *Clin Radiol* 1997;52:213-219
- 16 戴放, 黄信华, 陈勇, 李彦豪, 周杰. 胆道支架置入术姑息治疗恶性梗阻性黄疸临床疗效观察. 实用放射学杂志 2002;18:892-895

不同HBV基因型HBV感染者的自身免疫现象

欧强, 谭德明, 周明欢

欧阳, 谭德明, 中南大学湘雅医院传染病研究所 湖南省长沙市 410008
周明欢, 湘西自治州人民医院消化内科 湖南省吉首市 416000
湖南省湘西州自然科学基金资助项目, No.(2003)39
项目负责人: 周明欢, 410006, 湖南省吉首市, 湘西自治州人民医院消化内科.
电话: 0731-4362620
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-02-25

摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒不同基因型对肝炎病毒引发的机体自身免疫机制的影响。

方法: 选择HBV-DNA阳性HBV感染者87例, 其中无症状病毒携带者20例, 慢性乙肝24例, 慢性重型乙肝34例, 乙肝肝硬化9例。采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)检测HBV-DNA基因型。采用间接免疫荧光法、金标法、放射免疫法、免疫乳胶凝集法分别检测所有研究对象的抗核抗体(ANA)、抗双链DNA抗体

(ds-DNA)、抗甲状腺球蛋白抗体及抗甲状腺微粒体抗体(TGA/TMA)、类风湿因子(RF)。

结果: 87例HBV-DNA阳性HBV感染者中, 基因型B 75例(86.2%), 基因型C 12例(13.8%), 未发现基因型A、D、E、F存在。与正常对照组相比, HBV-DNA阳性HBV感染者自身抗体检出率明显增高, 有显著性差异($P < 0.01$)。75例B型HBV感染者中有51例检出59项次自身抗体, C型HBV感染者中12例有7例检出12项次自身抗体, 两组自身抗体检出率比较无统计学意义($P > 0.05$)。

结论: 本地区存在HBV基因型B和基因型C, 且以B型为优势基因型, 未发现基因型A、D、E、F存在。HBV感染可引发自身免疫性反应, 导致多种自身抗体的产生, 但基因型B和基因型C病毒感染者机体内自身免疫应答过程并无明显差异。

入后黄疸下降较慢，考虑通过TACE治疗可缩小肿块，在胆红素未明显下降的情况下即行TACE治疗，治疗后肝功损伤未能恢复，于2 mo后死亡。

本组病例发生胆道再次梗阻的原因有：肿瘤压迫支架变窄，沿金属支架网眼向内生长，肿瘤生长超过支架两端，胆道感染，与文献[15-16]报道相似。PTC造影可见胆道内充盈缺损或完全梗阻，通过再次支架置入或PTCD后胆红素均下降。与相关文献报道相比，本组病例支架维持通畅时间较单纯采用胆道支架治疗者明显延长^[15-16]。

4 参考文献

- 1 Shao YF. Treatment of proximal biliary duct carcinoma. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1992;14:280-283
- 2 Cucchiara G, Gandini G, Simonetti G, Bracci F, Daffina A. Palliative treatment of extrahepatic bile duct tumors. *J Surg Oncol Suppl* 1993;3:154-157
- 3 Lammer J, Neumayer K. Biliary drainage endoprosthesis: experience with 201 placements. *Radiology* 1986;159:625-629
- 4 顾万清, 刘永雄, 聂淑文, 冯玉泉, 郭锦芳. 镍钛记忆合金胆道内支撑管在恶性胆道狭窄中的临床应用. 中华外科杂志 1993;31:260-263
- 5 谢宗贵, 张希全, 李凡东, 金鹏, 易玉海, 张绪平. 胆管支架技术5 a回顾(213例随访报告). 中华肝胆外科杂志 2002;8:595-597
- 6 胡冰, 周岱云, 龚彪, 钱光相, 陈汉, 吴孟超. 可膨式金属胆道支架解除恶性胆管梗阻的临床应用及其疗效分析. 中华外科杂志 1999;37:282-285
- 7 Huang DR, Jin XL. Carcinoma of the extrahepatic bile duct. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1988;10:67-69
- 8 Nagahama T, Maruyama M, Nakamura N, Irie T, Yoshida T, Kure N, Ebuchi M. Intrabiliary administration of doxorubicin for pancreaticobiliary cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1999;26:1849-1852
- 9 Shibata T, Sato T, Kondo H, Ootani I, Suzuki H, Kawada S. Two cases of obstructive jaundice due to extrahepatic carcinoma of the bile duct with marked response to daily oral administration of etoposide. *Gan To Kagaku Ryoho* 1990;17:2429-2432
- 10 Naoi Y, Suzuki F. Biliary intervention for malignant obstructive jaundice. Treatment through PTCD fistula. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 1990;50:1224-1236
- 11 Lameris JS, Hesselink EJ, Van Leeuwen PA, Nijs HG, Meerwaldt JH, Terpstra OT. Ultrasound-guided percutaneous transhepatic cholangiography and drainage in patients with hilar cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis* 1990;10:121-125
- 12 Schmeck HJ, Bartels E, Viets CH, Arnold W. Intraductal chemotherapy of bile duct cancer with 5-fluorouracil. *Klin Wochenschr* 1986;64:713-716
- 13 Itami J, Saegusa K, Tsuchiya Y, Mamiya T, Miyoshi T, Ohoto M, Arimizu N. Intracavitary high dose rate afterloading irradiation of inoperable malignant bile duct obstruction. *Strahlenther Onkol* 1986;162:105-110
- 14 Mizuno I, Tanada F, Iwai A, Kato F, Yura J. Intrabiliary tract administration of adriamycin in bile duct cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1982;9:681-687
- 15 Schima W, Prokesch R, Osterreicher C, Thurnher S, Fugger R, Schofl R, Havelec L, Lammer J. Biliary wallstent endoprosthesis in malignant hilar obstruction: long-term results with regard to the type of obstruction. *Clin Radiol* 1997;52:213-219
- 16 戴放, 黄信华, 陈勇, 李彦豪, 周杰. 胆道支架置入术姑息治疗恶性梗阻性黄疸临床疗效观察. 实用放射学杂志 2002;18:892-895

不同HBV基因型HBV感染者的自身免疫现象

欧强, 谭德明, 周明欢

欧阳, 谭德明, 中南大学湘雅医院传染病研究所 湖南省长沙市 410008
周明欢, 湘西自治州人民医院消化内科 湖南省吉首市 416000
湖南省湘西州自然科学基金资助项目, No.(2003)39
项目负责人: 周明欢, 410006, 湖南省吉首市, 湘西自治州人民医院消化内科.
电话: 0731-4362620
收稿日期: 2004-02-14 接受日期: 2004-02-25

摘要

目的: 探讨乙型肝炎病毒不同基因型对肝炎病毒引发的机体自身免疫机制的影响。

方法: 选择HBV-DNA阳性HBV感染者87例, 其中无症状病毒携带者20例, 慢性乙肝24例, 慢性重型乙肝34例, 乙肝肝硬化9例。采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)检测HBV-DNA基因型。采用间接免疫荧光法、金标法、放射免疫法、免疫乳胶凝集法分别检测所有研究对象的抗核抗体(ANA)、抗双链DNA抗体

(ds-DNA)、抗甲状腺球蛋白抗体及抗甲状腺微粒体抗体(TGA/TMA)、类风湿因子(RF)。

结果: 87例HBV-DNA阳性HBV感染者中, 基因型B 75例(86.2%), 基因型C 12例(13.8%), 未发现基因型A、D、E、F存在。与正常对照组相比, HBV-DNA阳性HBV感染者自身抗体检出率明显增高, 有显著性差异($P < 0.01$)。75例B型HBV感染者中有51例检出59项次自身抗体, C型HBV感染者中12例有7例检出12项次自身抗体, 两组自身抗体检出率比较无统计学意义($P > 0.05$)。

结论: 本地区存在HBV基因型B和基因型C, 且以B型为优势基因型, 未发现基因型A、D、E、F存在。HBV感染可引发自身免疫性反应, 导致多种自身抗体的产生, 但基因型B和基因型C病毒感染者机体内自身免疫应答过程并无明显差异。

欧强, 谭德明, 周明欢. 不同HBV基因型HBV感染者的自身免疫现象. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1497-1500
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1497.asp>

0 引言

我国是慢性肝病的高发区^[1-2], 病毒性肝炎占大多数^[3-8], 严重威胁着人们的身体健康. 近年来在慢性肝炎患者血清中检测出各种自身抗体的研究报道日趋增多, 证实慢性肝炎患者体内发生了自身免疫反应^[9-17]. 肝炎病毒感染后机体产生的自身免疫紊乱现象正日益受到重视. 目前基于全核苷酸序列比较, 乙型肝炎病毒(HBV)可分A、B、C、D、E、F、G、H8个基因型^[18-19]. 有关在中国人HBV感染者中的不同HBV基因型对机体自身免疫机制影响的研究尚未见报道. 对HBV基因型与机体免疫机制紊乱关系的研究有助于深入探讨乙肝的发病机制, 有助于诊断、指导治疗及判断预后. 本文通过对不同HBV基因型HBV感染者的自身免疫紊乱现象的观察, 旨在探讨HBV基因型对机体免疫机制的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 HBV-DNA阳性HBV感染者87例, 系我科2003-01/08门诊和住院患者, 男52例, 女35例, 年龄13-68岁, 其中无症状病毒携带者20例, 慢性乙肝24例, 慢性重型乙肝34例, 乙肝肝硬化9例, 所有病例均符合2000年全国传染病寄生虫病学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》的诊断分型标准^[20]. 重叠有甲、丙、戊肝病毒感染, 及合并有其他严重疾病的患者均从研究对象中去除. 所有病例近3mo内未使用免疫调节剂. 随机选择健康献血员24名作为正常对照, 均已除外肝炎病毒感染. 清晨采集受检者空腹静脉血4mL, 分离血清, -20℃保存备用.

1.2 方法

1.2.1 HBV标志物的检测 使用ELISA法检测血清HBV标志物(HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HbcAb). 试剂盒购于洛阳华美生物工程公司. 严格按说明书操作, 结果由酶标仪测定.

1.2.2 HBV基因分型 采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)检测HBV-DNA基因型. 试剂盒购于上海申友生物技术有限公司和宝生物工程(大连)有限公司. 设计引物对: YS1(nt203-221:5' GCGG GTTTTCTGTGA3')和YS2(nt788-769: 5' GGACT CAAGATGTTCTACAG3'). PCR扩增HBVS基因长度为585 bp. 方法: 将50 μL浓缩液与50 μL待测血清标本混匀, 8 000 rpm离心10 min, 弃掉上清液留下沉淀, 将10 μL裂解缓冲液与沉淀混匀, 振荡15 min. 开水浴10 min, 14 000 rpm离心15 min, 取上清液2 μL行PCR. PCR在Icyler仪(Bio-Rad, USA)中进行. PCR系统组成为: 待检上清液2 μL、TaKaRa Ex Taq酶(5 U/ μL)0.25 μL、10 × Ex Taq Buffer(Mg plus) 5 μL、dNTP

Mixture 4 μL、引物1、引物2各1 μL、灭菌蒸馏水36.75 μL, 共50 μL反应体积. 扩增条件: 95℃预变性300 s, 94℃变性60 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸60 s, 共扩增35个循环. 扩增的靶基因经琼脂糖凝胶电泳初步鉴定. 选用限制性内切酶Sty I、Bsr I分别消化已鉴定的PCR产物1 μL, 总反应体积为20 μL, 反应条件: Sty I 36℃ 3 h、Bsr I 67℃ 3 h, 取消化产物8 μL于15 g/L琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色后于紫外线下观察, 并根据不同的电泳图谱进行RFLP分析以确定HBV基因型.

1.2.3 自身抗体测定 (1)抗核抗体(ANA)测定采用间接免疫荧光法, 大鼠肝抗原片由本院免疫室制备, 羊抗人IgG荧光抗体购自卫生部上海生物制品研究所. 将待测血清用pH7.2PBS缓冲液按1:40、1:80、1:160、1:320稀释, 分别加入抗原基质片上, 内置37℃水浴箱孵育30 min, 取出放入染色缸中用PBS缓冲液清洗3次, 吸水纸吸干, 加入荧光抗体, 室温孵育30 min, PBS缓冲液洗片3次, 以甘油缓冲液封片, 荧光显微镜下观察. (2)抗双链DNA抗体(Ads-DNA)测定采用金标斑点渗滤法, 试剂购自福建三强生物技术公司. 将反应板回温到35℃, 滴加100 μL试剂B于反应孔中使其完全渗入. 滴加待测血清100 μL于反应孔中待完全渗入后再加入150 μL试剂A, 最后滴加100 μL试剂B于反应孔中, 2 min后观察结果. (3)抗甲状腺球蛋白抗体及抗甲状腺微粒体抗体(TGA/TMA)测定采用放射免疫法, 试剂购自卫生部上海生物制品研究所. 将¹²⁵I-TG和¹²⁵I-TM各100 μL分别加入T管和待测管, 加20 μL待测血清和200 μL缓冲液于待测管中, 然后将两管摇匀, 37℃孵育60 min, 再加入分离试剂TMAB、TGAB, 摆匀, 室温30 min, 3 500 rpm, 离心15 min, 吸上清夜, 测T管和待测管沉淀. (4)类风湿因子(RF)采用免疫乳胶凝集法测定, 试剂购自上海伊华医学科技有限公司. 将待测血清用生理盐水1:20稀释后, 加50 μL于玻璃板上, 滴加一滴胶乳试剂, 充分摇匀, 3 min后观察结果, 凝集为阳性.

统计学处理 计数资料以率表示, 采用χ²检验. 所有数据均在计算机中经SPSS10.0统计软件处理.

2 结果

2.1 HBV-DNA基因型分型标准及检测结果 限制性内切酶Sty I在C型第301位有酶切位点, 可鉴别98%C型, 被切成253 bp和332 bp两个片段; 内切酶Bsr I在B型第174位有酶切位点, 被切成126 bp和459 bp两个片段, 可准确鉴定100%B基因型; 92%A型和100%E型第348位有Bsr I酶切位点, 被切成285 bp及300 bp两个片段; 而C型、F型及95%D型无Bsr I酶切位点. 经PCR检测出87例HBV-DNA阳性患者, 男52例, 女35例; 进一步基因型分析, 发现基因型B75例, 占86.2%, 基因型C12例, 占13.8%. 未发现基因型A、

D、E、F 存在.

2.2 乙肝患者与正常对照组自身抗体检出结果 87例HBV-DNA阳性病毒感染者有58例检出至少一种以上的自身抗体. 按检出例数计算自身抗体总检出率达66.7%, 显著高于正常对照组($P < 0.01$). 检出的自身抗体以ANA、RF多见, 滴度分布以低滴度为主(表1).

表1 HBV-DNA阳性乙肝患者与正常对照组自身抗体检出结果

| 组别 | n | 总阳性率(%) | ANA | Ads-DNA | RF | TGA | TMA |
|---------|----|-----------|-----|---------|----|-----|-----|
| 正常对照组 | 24 | 5 (20.8) | 5 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| HBV 感染者 | 87 | 58 (66.7) | 37 | 1 | 15 | 9 | 9 |

2.3 不同基因型 HBV 感染者自身抗体分布 基因型B组中有51例检出自身抗体(51/75), 基因型C组中有7例检出自身抗体(7/12), 两组自身抗体阳性率相比较无统计学意义($P > 0.05$ 表2).

表2 不同基因型 HBV 感染者自身抗体分布

| 组别 | n | 总阳性率(%) | ANA | Ads-DNA | RF | TGA | TMA |
|----|----|-----------|-----|---------|----|-----|-----|
| B型 | 75 | 51 (68.8) | 32 | 1 | 13 | 7 | 6 |
| C型 | 12 | 7 (58.3) | 5 | 0 | 2 | 2 | 3 |

3 讨论

HBV 感染的致病机制非常复杂. 目前认为 HBV 感染后的肝组织损伤并非 HBV 在肝细胞内复制繁殖直接作用的结果, 而是机体一系列免疫反应造成肝细胞的病理性免疫损害. 这种乙肝免疫损伤包括细胞介导的免疫损伤、免疫复合物引起的免疫损伤及自身免疫反应引起的免疫损伤. 自身免疫是针对自身成分的抗体或细胞性免疫效应的现象, 是机体对自身组织成分的免疫应答过于亢进的表现. 本文研究发现在 HBV 感染者血清中可检出多种自身抗体, 且与正常人比较有显著性差异($P < 0.01$), 结果证实 HBV 感染与自身免疫密切相关.

基于全核苷酸序列比较, 乙型肝炎病毒(HBV)可分为A、B、C、D、E、F、G、H8个基因型. 基因型反映了HBV自然感染过程中的变异特点, 是病毒变异进化的结果. HBV基因分型方法目前有3种:(1)病毒基因组或S基因序列测序^[21]; (2)单克隆酶联抗体免疫黏附法^[22]; (3)聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)^[23-24]. HBV基因型的地理分布有一定的区域性^[25]. 我国HBV基因型南方以B型为主, 北方以C型为主, D型仅见于西部及少数民族地区, 还未发现其他型别. 也有学者研究发现D基因型在我国宁夏地区、广东地区和香港地区约占感染者的15%, 因而HBV基因型在我国的确切分布状况仍不十分清楚^[26]. 本研究采用PCR-RFLP进行HBV基因型鉴定^[27], 在87例HBV-DNA阳性病毒感染者中发现基因型B为优势基因型75例(87.4%), 基因型C12例(12.6%), 未发现基因型A、D、E、F存

在. 结果与文献[28]报道基本一致.

近年有文献[29]报道 HBV 基因型与疾病的活动及病毒复制存在一定关系. 本研究首次检测了我国不同HBV 基因型 HBV 感染者血清中的自身免疫性抗体, 发现基因型B组中有51例检出自身抗体(51/75), 基因型C组中有7例检出自身抗体(7/12), 两组自身抗体阳性率无统计学意义($P > 0.05$). 结果提示感染 HBV 基因型B 和基因型C的患者机体内自身免疫应答过程并无明显差异, 即基因型B和基因型C对HBV感染引发的自身免疫反应并无影响. 本研究的血清标本未发现A、D、F、E基因型, 难以对这几型自身抗体检出率进行比较. HBV 不同基因型对肝炎病毒引发的机体自身免疫机制是否存在一定的影响, 尚有待于进一步积累病例深入研究.

4 参考文献

- 李兰娟, 吴仲文. 重视肠道微生态变化在慢性肝病中作用的研究. 中国微生态学杂志 2002;14:63-64
- 李异玲, 傅宝玉. 慢性肝病的治疗. 辽宁药物与临床 2003;6:113-117
- 金仙玉, 张新宇. 乙型肝炎病毒母婴传播及其预防的研究现状. 中华国产医学杂志 2000;3:258-260
- 姬新颖, 付恩清, 白雪帆, 王海涛, 杨为松. 新型肝炎病毒TTV的研究进展. 微生物学免疫学进展 2000;28:53-59
- 齐名, 熊华, 刘新钰, 吴引伟, 李鹤林, 李保全, 宗永兰, 邵海枫. 不同基因型丙型肝炎病毒感染者的自身免疫表现. 临床检验杂志 2002;20:8-10
- 李健, 倪季军. 乙型肝炎病毒母婴传播问题探讨. 厦门大学学报(自然科学版) 2000;39:869-871
- 陈勇, 洪艳, 杨连华, 倪崖, 陈念良, 凌志强, 愈为群, 毛江森. 中国五省市甲型肝炎病毒基因分型的研究. 病毒学报 2000;16:309-311
- 霍艳英, 徐德忠, 赵小宁, 季如琳, 刘蓬勃, 王全楚, 王歆. 西安和郑州地区丙型肝炎患者的HCV基因分型. 第四军医大学学报 2002;23:749-751
- McMurray RW, Elbourne K. Hepatitis C virus infection and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 1997;26:689-701
- Clifford BD, Donahue D, Smith L, Cable E, Lutting B, Manns M, Bonkovsky HL. High prevalence of serological markers of autoimmunity in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1995;21:613-619
- Unal F, Genel F, Ozgenc F, Aksu G, Aydogdu S, Kutukculer N, Yagci RV. Immune status and autoantibody formation in children with chronic hepatitis B infection. *Panminerva Med* 2002;44:353-357
- 范列英, 仲人前, 孔宪涛, 薛葛, 徐玲玲. 慢性乙型肝炎患者血清中肝特异性自身抗体的检测. 第二军医大学学报 2000;21:309-312
- Jablonska J, Zabek J, Kozlowska J, Cianciara J. Immunological disorders in patients with chronic viral hepatitis type C. *Przegl Epidemiol* 2001;55:459-464
- Kitazawa E, Igarashi T, Kawaguchi N, Matsushima H, Kawashima Y, Hankins RW, Miyakawa H. Differences in anti-LKM-1 autoantibody immunoreactivity to CYP2D6 antigenic sites between hepatitis C virus-negative and -positive patients. *J Autoimmun* 2001;17:243-249
- Squadrito G, Previti M, Lenzi M, Le Rose EP, Caccamo G, Restuccia T, Di Cesare E, Pollicino T, Raimondo G. High prevalence of non-organ-specific autoantibodies in hepatitis C virus-infected cirrhotic patients from southern Italy. *Dig Dis Sci* 2003;48:349-353
- Liu WE, Tan DM, Zhang Z. A study of the autoimmune pathogenesis of chronic HCV infection. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 2000;25:367-370
- 范列英, 仲人前, 赵文静, 夏晴. 原发性慢性肝病及原发性肝癌患者血清抗核抗体检测及其临床意义. 上海免疫学杂志 2000;20:48-49
- Hannoun C, Norder H, Lindh M. An aberrant genotype revealed in recombinant hepatitis B virus strains from Vietnam. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 8):2267-2272

- 19 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B virus genotypes and spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in Taiwanese hepatitis B carriers. *J Med Virol* 2004;72:363-369
- 20 中华医学会传染病与寄生虫学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001;19:56-62
- 21 Norder H, Courouce AM, Magnus LO. Complete genomes phylogenetic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994;198:489-510
- 22 Usuda S, Okamoto H, Iwanari H, Baba K, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *J Virol Methods* 1999;80:97-112
- 23 Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt1858 variants, and geographiorigin of hepatitis B virus-large scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997; 175:1285-1293
- 24 Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *J Virol Methods* 1998;72:163-174
- 25 黄晶, 高志良. 乙型肝炎病毒基因型研究现状. 中华传染病杂志 2002;19:251-253
- 26 阎丽, 侯金林, 郭亚兵. 乙型肝炎病毒基因型 S 基因 PCR - RFLP 分型方法的建立. 中华传染病学杂志 2001;19:224-229
- 27 Yan L, Hou JL, Gou YB, Chen JJ, Wang ZH, Lin YL, Luo KX, Niu ZY. Establish a new method of genotyping of hepatitis b virus by restriction pattern analysis of S amplicon. *Chin J Infect Dis* 2001;19:224-228
- 28 Liu YX, Hu GL, Tan DM. Distribution of hepatitis B virus genotype in Hunan Province and its clinical significance. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 2002;27:29-31
- 29 Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horiike N, Hino K, Okita K, Okanoue T, Iino S, Tanaka E, Suzuki K, Watanabe H, Hige S, Mizokami M. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 2001;34:590-594

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

• 临床经验 •

免疫营养对重症急性胰腺炎患者免疫屏障的影响

赵刚, 王芳, 王春友, 熊炯忻, 陈立波

赵刚, 王春友, 熊炯忻, 陈立波, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心 湖北省武汉市 430022
 王芳, 华中科技大学同济医学院药理系 湖北省武汉市 430030
 项目负责人: 王春友, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心。 cywang52@hotmail.com
 电话: 027-85726273 传真: 027-85726830
 收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-02-18

摘要

目的: 探讨免疫营养对重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)患者免疫屏障功能的影响。

方法: 将 SAP 患者随机分为全胃肠外营养(total parenteral nutrition, TPN)组和免疫营养(immune nutrition, IN)组, 各68例。分别检测两组患者 IgG 水平和 CD4/CD8 比值, 血清内毒素及水平尿 L/M 值, 以及感染及其相关并发症的发生率, 以评估患者血液及肠道免疫屏障功能。

结果: IN 组患者血清内毒素水平和尿 L/M 值明显低于 TPN 组($P < 0.05$), 而 IgG 和 CD4/CD8 比值则高于 TPN 组。TPN 组感染率(42.6%) 明显高于 IN 组 (19.1%, $P < 0.05$)。TPN 组消化道瘘及腹腔出血发生率(25.0%、22.1%) 显著高于 IN 组 (11.8%、8.8%, $P < 0.05$)。

结论: 免疫营养有效维护肠道免疫屏障, 调节血液免疫功能, 从而有效减少感染及相关并发症的发生, 对 SAP 具有积极的治疗作用。

赵刚, 王芳, 王春友, 熊炯忻, 陈立波. 免疫营养对重症急性胰腺炎患者免疫屏障的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1500-1502

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1500.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)时营养支持的作用日益受到关注, 但对于营养支持的方式、时机及营养底物的选择等尚有争议^[1-3]。本研究旨在探讨免疫营养支持的实施方式对 SAP 患者肠道免疫屏障及血液免疫功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-02/2003-10 本院收治 136 例 SAP 患者, 男 72 例, 女 64 例, 平均(40.3±2.2)岁。随机分为全胃肠外营养(total parenteral nutrition, TPN)组 68 例和免疫营养(immune nutrition, IN)组 68 例。136 例患者中, 胆源性胰腺炎 79 例, 酒精性胰腺炎 32 例, 其他原因引起胰腺炎共 25 例。

1.2 方法 (1) TPN 组 经过入院后的体液复苏、抑制胰酶分泌以及维护机体内环境紊乱等常规治疗使急性期反应得到控制后^[4-5], 通过中心静脉穿刺置管行全胃肠外营养。总能量每日 30 kcal/kg, 热氮比为 150:1, 其中胰岛素与糖量比为 4-6:1, 添加电解质、维生素及微量元素。(2) IN 组 采用分阶段实施免疫营养支持方式, 最初 3-5 d 为 PN, 但添加力肽 100 mL/d(含水溶性 L- 谷氨酰胺 13.42 g)。肠麻痹缓解后, 将螺旋鼻肠管置于空肠上段实施 EN。从 200 mL/d (200 kcal/d) 开始, 5-7 d 内增加至 1 800-2 000 kcal/d, 同时静脉营养逐渐减量, 直至过渡到全胃肠营养。肠内营养滴注以水解蛋白为主要氮源的平衡肠内营养制剂, 如百普素, 同时

- 19 Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Hepatitis B virus genotypes and spontaneous hepatitis B e antigen seroconversion in Taiwanese hepatitis B carriers. *J Med Virol* 2004;72:363-369
- 20 中华医学会传染病与寄生虫学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001;19:56-62
- 21 Norder H, Courouce AM, Magnus LO. Complete genomes phylogenetic relatedness and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* 1994;198:489-510
- 22 Usuda S, Okamoto H, Iwanari H, Baba K, Tsuda F, Miyakawa Y, Mayumi M. Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product. *J Virol Methods* 1999;80:97-112
- 23 Lindh M, Andersson AS, Gusdal A. Genotypes, nt1858 variants, and geographiorigin of hepatitis B virus-large scale analysis using a new genotyping method. *J Infect Dis* 1997; 175:1285-1293
- 24 Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *J Virol Methods* 1998;72:163-174
- 25 黄晶, 高志良. 乙型肝炎病毒基因型研究现状. 中华传染病杂志 2002;19:251-253
- 26 阎丽, 侯金林, 郭亚兵. 乙型肝炎病毒基因型 S 基因 PCR - RFLP 分型方法的建立. 中华传染病杂志 2001;19:224-229
- 27 Yan L, Hou JL, Gou YB, Chen JJ, Wang ZH, Lin YL, Luo KX, Niu ZY. Establish a new method of genotyping of hepatitis b virus by restriction pattern analysis of S amplicon. *Chin J Infect Dis* 2001;19:224-228
- 28 Liu YX, Hu GL, Tan DM. Distribution of hepatitis B virus genotype in Hunan Province and its clinical significance. *Hunan Yike Daxue Xuebao* 2002;27:29-31
- 29 Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horiike N, Hino K, Okita K, Okanoue T, Iino S, Tanaka E, Suzuki K, Watanabe H, Hige S, Mizokami M. Geographic distribution of hepatitis B virus (HBV) genotype in patients with chronic HBV infection in Japan. *Hepatology* 2001;34:590-594

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

• 临床经验 •

免疫营养对重症急性胰腺炎患者免疫屏障的影响

赵刚, 王芳, 王春友, 熊炯忻, 陈立波

赵刚, 王春友, 熊炯忻, 陈立波, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心 湖北省武汉市 430022
 王芳, 华中科技大学同济医学院药理系 湖北省武汉市 430030
 项目负责人: 王春友, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心。 cywang52@hotmail.com
 电话: 027-85726273 传真: 027-85726830
 收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-02-18

摘要

目的: 探讨免疫营养对重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)患者免疫屏障功能的影响。

方法: 将 SAP 患者随机分为全胃肠外营养(total parenteral nutrition, TPN)组和免疫营养(immune nutrition, IN)组, 各68例。分别检测两组患者 IgG 水平和 CD4/CD8 比值, 血清内毒素及水平尿 L/M 值, 以及感染及其相关并发症的发生率, 以评估患者血液及肠道免疫屏障功能。

结果: IN 组患者血清内毒素水平和尿 L/M 值明显低于 TPN 组($P < 0.05$), 而 IgG 和 CD4/CD8 比值则高于 TPN 组。TPN 组感染率(42.6%) 明显高于 IN 组 (19.1%, $P < 0.05$)。TPN 组消化道瘘及腹腔出血发生率(25.0%、22.1%) 显著高于 IN 组 (11.8%、8.8%, $P < 0.05$)。

结论: 免疫营养有效维护肠道免疫屏障, 调节血液免疫功能, 从而有效减少感染及相关并发症的发生, 对 SAP 具有积极的治疗作用。

赵刚, 王芳, 王春友, 熊炯忻, 陈立波. 免疫营养对重症急性胰腺炎患者免疫屏障的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1500-1502

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1500.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)时营养支持的作用日益受到关注, 但对于营养支持的方式、时机及营养底物的选择等尚有争议^[1-3]。本研究旨在探讨免疫营养支持的实施方式对 SAP 患者肠道免疫屏障及血液免疫功能的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 2002-02/2003-10 本院收治 136 例 SAP 患者, 男 72 例, 女 64 例, 平均(40.3±2.2)岁。随机分为全胃肠外营养(total parenteral nutrition, TPN)组 68 例和免疫营养(immune nutrition, IN)组 68 例。136 例患者中, 胆源性胰腺炎 79 例, 酒精性胰腺炎 32 例, 其他原因引起胰腺炎共 25 例。

1.2 方法 (1) TPN 组 经过入院后的体液复苏、抑制胰酶分泌以及维护机体内环境紊乱等常规治疗使急性期反应得到控制后^[4-5], 通过中心静脉穿刺置管行全胃肠外营养。总能量每日 30 kcal/kg, 热氮比为 150:1, 其中胰岛素与糖量比为 4-6:1, 添加电解质、维生素及微量元素。(2) IN 组 采用分阶段实施免疫营养支持方式, 最初 3-5 d 为 PN, 但添加力肽 100 mL/d(含水溶性 L- 谷氨酰胺 13.42 g)。肠麻痹缓解后, 将螺旋鼻肠管置于空肠上段实施 EN。从 200 mL/d (200 kcal/d) 开始, 5-7 d 内增加至 1 800-2 000 kcal/d, 同时静脉营养逐渐减量, 直至过渡到全胃肠营养。肠内营养滴注以水解蛋白为主要氮源的平衡肠内营养制剂, 如百普素, 同时

添加谷氨酰胺制剂如谷参长安胶囊。(3) 指标监测 分别在第1、7、14、21 d 取患者血清并冻存，分别检测血清 IgG 和内毒素水平。分离外周血淋巴细胞，用流式细胞仪进行CD4/CD8淋巴细胞分类计数。口服含乳果糖10 g、甘露醇5 g的测试液，用高压液相色谱法测定6 h后尿中乳果糖和甘露醇的浓度^[6]。用ELISA试剂盒检测TNF- α 和IL-8水平。观察感染及其相关并发症如腹腔出血、消化道瘘等的发生。

表1 CD4/CD8 T细胞比值及血清IgG水平的改变

| | 第1 d | | 第7 d | | 第14 d | | 第21 d | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------------|-----------|------------------------|-----------|------------------------|
| | TPN | IN | TPN | IN | TPN | IN | TPN | IN |
| CD4/CD8 | 1.82±0.02 | 1.85±0.04 | 1.54±0.05 | 1.72±0.06 ^a | 1.64±0.07 | 1.82±0.04 ^a | 1.78±0.03 | 1.87±0.05 ^a |
| IgG (g/L) | 12.3±1.7 | 11.8±1.1 | 9.8±0.9 | 11.4±0.7 ^a | 10.8±0.6 | 11.8±0.7 ^a | 11.0±0.5 | 12.2±0.6 ^a |

^aP <0.05 vs TPN组。

表2 尿L/M值及血清内毒素水平改变

| | 第1 d | | 第7 d | | 第14 d | | 第21 d | |
|-----|-------------|-------------|-------------|--------------------------|-------------|--------------------------|-------------|--------------------------|
| | TPN | IN | TPN | IN | TPN | IN | TPN | IN |
| L/M | 0.047±0.019 | 0.052±0.021 | 0.097±0.023 | 0.063±0.011 ^a | 0.143±0.046 | 0.061±0.027 ^a | 0.156±0.032 | 0.057±0.028 ^a |
| 内毒素 | - | - | 5.9±1.1 | 2.4±0.7 ^a | 8.3±3.2 | 1.9±0.8 ^a | 8.4±1.6 | 1.7±0.6 ^a |

^aP <0.05 vs TPN组。

2.2 肠道免疫屏障指标 两组均在第7 d 检测到内毒素，TPN组内毒素水平持续显著高于IN组。TPN组L/M值第7 d 开始明显升高；IN组L/M值第7 d 升高，与同组第1 d 相比无显著差别，但明显低于TPN组(P <0.05) (表2)。

2.3 感染及其相关并发症发生率 血液细菌和真菌培养实验表明，TPN组68例患者中42.6%(29/68)有全身性感染，而IN组患者中全身感染率为19.1%(13/68)，明显低于全胃肠外营养组(P <0.05)。此外，TPN组消化道瘘及腹腔出血的发生率分别为25.0%(17/68)和22.1%(15/68)，均明显高于IN组的发生率11.8%(8/68)和8.8%(6/68) (表3)。

表3 感染及其相关并发症发生率

| | 全身性感染 | 消化道瘘 | 腹腔出血 |
|-----|---------------|---------------|---------------|
| TPN | 42.6% (29/68) | 25.0% (17/68) | 22.1% (15/68) |
| IN | 19.1% (13/68) | 11.8% (8/68) | 8.8% (6/68) |

P <0.05 vs TPN组。

3 讨论

随着对SAP发病机制认识的不断深入以及早期重症监护和多器官功能维护水平的提高，SAP早期死亡率有所下降，但严重的全身性感染及其相关并发症如肠瘘、胰瘘、假性囊肿内出血和腹腔出血使SAP后期死亡率仍

统计学处理 计量资料采用方差分析，计数资料采用 χ^2 分析。P <0.05表示差异有显著性。

2 结果

2.1 血液免疫功能指标 IN组CD4/CD8比值及血清IgG水平在第7 d有所下降，但无显著意义(P >0.05)，很快恢复正常水平。TPN组CD4/CD8比值及血清IgG水平在第7 d明显持续降低，并显著低于处理组(P <0.05) (表1)。

较高^[7]。SAP时微循环障碍和大量炎性递质的释放导致肠黏膜细胞过度凋亡、甚至坏死，肠黏膜通透性增加以及肠道局部淋巴细胞和肝脏枯否细胞的免疫屏障功能减弱，同时肠动力障碍导致细菌过度繁殖，从而发生肠道菌群移位，导致胰腺坏死组织感染或感染相关的器官功能衰竭的发生^[8-9]。因而合理营养支持的目的不仅仅在于改善SAP患者的营养状况，更重要的在于维护肠道黏膜屏障及机体免疫功能，以防止肠道菌群移位感染的发生^[10]。

本研究中IN组采用了分阶段的免疫营养方式，在急性反应期以维持内环境稳定、液体复苏治疗为主，在急性期反应得到缓解后则静脉给予营养素并添加谷氨酰胺，然后逐步过渡到肠内营养给予添加有谷氨酰胺的水解蛋白，充分提供肠道黏膜细胞和免疫细胞的特异营养因子。本研究观察到，由于IN组静脉应用肽并通过空肠内置管给予添加有谷氨酰胺的水解蛋白，黏膜通透性明显低于全胃肠外营养组，且患者细胞及体液免疫功能上调。免疫营养方式充分提供的谷氨酰胺是肠道黏膜细胞特异营养因子，而且是免疫细胞分泌增生和维持功能所必需的，其中纤维素亦为结肠黏膜营养素^[11-12]。此外，肠内营养可促进肠道蠕动，调节胃肠道激素的释放，增加胃肠道血流供应，进一步改善肠黏膜屏障功能，从而减少细菌移位的发生^[13]。研究结果表明，分阶段的免疫营养有效维护了肠道黏膜屏障

功能并增强肠道淋巴结、肝脏枯否细胞及血液淋巴细胞等的免疫功能，防止移位细菌的继发感染。更重要的作用是，阻断了移位细菌来源的内毒素对单核巨噬细胞的刺激，避免或减轻 TNF- α 和 IL-8 等炎性细胞因子的过量释放和瀑布样级联反应(cascade)造成的全身炎性反应综合征(SIRS) 和多器官功能不全(MODS)，从而显著降低重症急性胰腺炎的感染率和死亡率^[14]。

有研究表明，肠道黏膜的营养 30% 来自于动脉血液供应，70% 来自于肠内营养物质^[15]。因而有研究者强调早期肠内营养以改善肠黏膜的屏障功能，但过早肠内营养尤其是胃内营养易导致病情的反复，胰腺分泌增加，不利于胰腺炎症的消退、局部坏死组织和渗液的吸收。因此，本研究中的肠内与肠外营养结合组强调肠内营养开始的时机为：(1) 全身性炎性反应得到控制；(2) 内环境及脏器功能稳定；(3) 胰腺局部坏死及渗液开始局限；(4) 确定营养管已进入空肠，由于胰腺炎患者存在胃肠功能障碍，因此特别强调在内窥镜协助下将营养管推送入空肠上段。

4 参考文献

- 1 Lobo DN, Menton MA, Allison SP, Rowlands BJ. Evolution of nutritional support in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2000;87: 695-707
- 2 Schneider H, Boyle N, McCluckie A, Beal R, Atkinson S. Acute severe pancreatitis and multiple organ failure: total parenteral nutrition is still required in a proportion of patients. *Br J Surg* 2000;87:362-373
- 3 Clancy TE, Ashley SW. Current management of necrotizing pancreatitis. *Adv Surg* 2002;36:103-121
- 4 Mao EQ, Tang YQ, Zhang SD. Effects of time interval for hemofiltration on the prognosis of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:373-376
- 5 Slavin J, Ghaneh P, Sutton R, Hartley M, Rowlands P, Garvey C, Hughes M, Neoptolemos J. Management of necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2001;7:476-481
- 6 Sahin M, Ozer S, Vatansev C, Akoz M, Vatansev H, Aksoy F, Dilsiz A, Yilmaz O, Karademir M, Aktan M. The impact of oral feeding on the severity of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1999;178:394-398
- 7 Ribeiro MD, Paiva JA, Landeiro N, Duarte J. Patients with severe acute pancreatitis should be more often treated in an Intensive Care Department. *Rev Esp Enferm Dig* 2002;94: 523-532
- 8 Rao MP, Mulleage L. Nutritional support in acute pancreatitis: the enteral vs parenteral dilemma. *Hosp Med* 2001;62:580
- 9 Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg* 1997; 21:130-135
- 10 Zhao G, Wang CY, Wang F, Xiong JX. Clinical study on nutrition support in patients with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2105-2108
- 11 Ockenga J, Borchert K, Rifai K, Manns MP, Bischoff SC. Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Clin Nutr* 2002;21:409-416
- 12 Foitzik T, Stufler M, Hotz HG, Klinnert J, Wagner J, Warshaw AL, Schulzke JD, Fromm M, Buhr HJ. Glutamine stabilizes intestinal permeability and reduces pancreatic infection in acute experimental pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 1997;1: 40-47
- 13 Al-Omran M, Groof A, Wilke D. Enteral versus parenteral nutrition for acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;1:002837
- 14 Abou-Assi S, O'Keefe SJ. Nutrition support during acute pancreatitis. *Nutrition* 2002;18:938-943
- 15 Sahin M, Ozer S, Vatansev C, Akoz M, Vatansev H, Aksoy F, Dilsiz A, Yilmaz O, Karademir M, Aktan M. The impact of oral feeding on the severity of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1999;178:394-398

食管运动功能异常与食管黏膜损伤的关系

许军英, 谢小平, 侯晓华

许军英, 谢小平, 侯晓华, 华中科技大学同济医学院协和医院消化内科
湖北省武汉市 430022
项目负责人: 许军英, 430022, 湖北省武汉市解放大道 1277 号, 华中科技大学同济医学院协和医院消化内科。xujunying@medmail.cn.com
收稿日期: 2003-10-10 接受日期: 2003-11-13

摘要

目的: 了解食管运动功能对胃食管反流病患者食管黏膜损伤的影响。

方法: 12 例正常人, 100 例有胃食管反流病典型症状患者, 根据内镜检查结果, 按洛杉矶内镜下食管炎的分级标准分三组: 非糜烂性胃食管反流病(NERD)组 27 例, AB 级食管炎(LA-A、B)组 30 例, CD 级食管炎(LA-C、D)组 43

例, 所有患者均接受食管测压检查, 测定下食管括约肌静息压(LESP), 以湿咽成功率、食管远端收缩波幅和食管蠕动的传导速度作为食管体部运动功能的指标。

结果: 食管黏膜损伤的严重程度与 LESP 低压明显相关, LA-C、D 组的 LESP 明显低于正常组($P < 0.05$), 而其他两组与正常组比较差异无显著性。食管远端收缩波幅及食管蠕动的传导速度 NERD 组, 食管炎组与对照组比较均无显著性差异。LA-A、B 组的湿咽成功率明显低于对照组($P < 0.05$), LA-C、D 组的湿咽成功率与对照组和 NERD 组比较差异均有极显著性($P < 0.001$, $P < 0.005$)。食管黏膜损伤程度愈严重, LESP 异常及食管体部运动异常的发生率愈高, LESP 异常及食管体部运动异常的发生率 NERD 组分别为

功能并增强肠道淋巴结、肝脏枯否细胞及血液淋巴细胞等的免疫功能，防止移位细菌的继发感染。更重要的作用是，阻断了移位细菌来源的内毒素对单核巨噬细胞的刺激，避免或减轻 TNF- α 和 IL-8 等炎性细胞因子的过量释放和瀑布样级联反应(cascade)造成的全身炎性反应综合征(SIRS) 和多器官功能不全(MODS)，从而显著降低重症急性胰腺炎的感染率和死亡率^[14]。

有研究表明，肠道黏膜的营养 30% 来自于动脉血液供应，70% 来自于肠内营养物质^[15]。因而有研究者强调早期肠内营养以改善肠黏膜的屏障功能，但过早肠内营养尤其是胃内营养易导致病情的反复，胰腺分泌增加，不利于胰腺炎症的消退、局部坏死组织和渗液的吸收。因此，本研究中的肠内与肠外营养结合组强调肠内营养开始的时机为：(1) 全身性炎性反应得到控制；(2) 内环境及脏器功能稳定；(3) 胰腺局部坏死及渗液开始局限；(4) 确定营养管已进入空肠，由于胰腺炎患者存在胃肠功能障碍，因此特别强调在内窥镜协助下将营养管推送入空肠上段。

4 参考文献

- 1 Lobo DN, Menton MA, Allison SP, Rowlands BJ. Evolution of nutritional support in acute pancreatitis. *Br J Surg* 2000;87: 695-707
- 2 Schneider H, Boyle N, McCluckie A, Beal R, Atkinson S. Acute severe pancreatitis and multiple organ failure: total parenteral nutrition is still required in a proportion of patients. *Br J Surg* 2000;87:362-373
- 3 Clancy TE, Ashley SW. Current management of necrotizing pancreatitis. *Adv Surg* 2002;36:103-121
- 4 Mao EQ, Tang YQ, Zhang SD. Effects of time interval for hemofiltration on the prognosis of severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:373-376
- 5 Slavin J, Ghaneh P, Sutton R, Hartley M, Rowlands P, Garvey C, Hughes M, Neoptolemos J. Management of necrotizing pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2001;7:476-481
- 6 Sahin M, Ozer S, Vatansev C, Akoz M, Vatansev H, Aksoy F, Dilsiz A, Yilmaz O, Karademir M, Aktan M. The impact of oral feeding on the severity of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1999;178:394-398
- 7 Ribeiro MD, Paiva JA, Landeiro N, Duarte J. Patients with severe acute pancreatitis should be more often treated in an Intensive Care Department. *Rev Esp Enferm Dig* 2002;94: 523-532
- 8 Rao MP, Mulleage L. Nutritional support in acute pancreatitis: the enteral vs parenteral dilemma. *Hosp Med* 2001;62:580
- 9 Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg* 1997; 21:130-135
- 10 Zhao G, Wang CY, Wang F, Xiong JX. Clinical study on nutrition support in patients with severe acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:2105-2108
- 11 Ockenga J, Borchert K, Rifai K, Manns MP, Bischoff SC. Effect of glutamine-enriched total parenteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Clin Nutr* 2002;21:409-416
- 12 Foitzik T, Stufler M, Hotz HG, Klinnert J, Wagner J, Warshaw AL, Schulzke JD, Fromm M, Buhr HJ. Glutamine stabilizes intestinal permeability and reduces pancreatic infection in acute experimental pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 1997;1: 40-47
- 13 Al-Omran M, Groof A, Wilke D. Enteral versus parenteral nutrition for acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;1:002837
- 14 Abou-Assi S, O'Keefe SJ. Nutrition support during acute pancreatitis. *Nutrition* 2002;18:938-943
- 15 Sahin M, Ozer S, Vatansev C, Akoz M, Vatansev H, Aksoy F, Dilsiz A, Yilmaz O, Karademir M, Aktan M. The impact of oral feeding on the severity of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1999;178:394-398

食管运动功能异常与食管黏膜损伤的关系

许军英, 谢小平, 侯晓华

许军英, 谢小平, 侯晓华, 华中科技大学同济医学院协和医院消化内科
湖北省武汉市 430022
项目负责人: 许军英, 430022, 湖北省武汉市解放大道 1277 号, 华中科技大学同济医学院协和医院消化内科。xujunying@medmail.cn.com
收稿日期: 2003-10-10 接受日期: 2003-11-13

摘要

目的: 了解食管运动功能对胃食管反流病患者食管黏膜损伤的影响。

方法: 12 例正常人, 100 例有胃食管反流病典型症状患者, 根据内镜检查结果, 按洛杉矶内镜下食管炎的分级标准分三组: 非糜烂性胃食管反流病(NERD)组 27 例, AB 级食管炎(LA-A、B)组 30 例, CD 级食管炎(LA-C、D)组 43

例, 所有患者均接受食管测压检查, 测定下食管括约肌静息压(LES), 以湿咽成功率、食管远端收缩波幅和食管蠕动的传导速度作为食管体部运动功能的指标。

结果: 食管黏膜损伤的严重程度与 LES 低压明显相关, LA-C、D 组的 LES 明显低于正常组($P < 0.05$), 而其他两组与正常组比较差异无显著性。食管远端收缩波幅及食管蠕动的传导速度 NERD 组, 食管炎组与对照组比较均无显著性差异。LA-A、B 组的湿咽成功率明显低于对照组($P < 0.05$), LA-C、D 组的湿咽成功率与对照组和 NERD 组比较差异均有极显著性($P < 0.001$, $P < 0.005$)。食管黏膜损伤程度愈严重, LES 异常及食管体部运动异常的发生率愈高, LES 异常及食管体部运动异常的发生率 NERD 组分别为

51.8%和25.9%. LA-A、B组为53.3和50%，而LA-C、D组高达76.7%和62.6%. LA-C、D组LESP异常及食管体部运动异常的发生率较对照组比较有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$).

结论:食管运动功能异常在胃食管反流病食管黏膜损伤的发生及严重程度中起重要作用.

许军英, 谢小平, 侯晓华. 食管运动功能异常与食管黏膜损伤的关系. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1502-1504

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1502.asp>

0 引言

众所周知, 下食管括约肌功能障碍是胃食管反流病(GERD)的主要发病机制之一. 然而, 食管体部运动功能在GERD临床症状和黏膜损伤中的作用知之甚少. 生理上, 原发性食管蠕动能清除反流入食管的胃内容物或十二指肠内容物, 防止食管黏膜的损伤^[1]. GERD患者食管体部运动功能障碍亦十分常见^[2]. 本研究旨在了解食管运动功能障碍在食管黏膜损伤中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 正常对照组12例, 男7例, 女5例, 平均年龄42.6岁, 无任何胃食管反流症状, 上消化道内镜检查无异常发现. 2001/2003年间在我院就诊的有典型胃食管反流症状(烧心或反食或二者并存)患者100例, 接受上消化道内镜检查, 根据LA内镜下食管炎的诊断标准, 将其分成三组, 内镜检查无食管炎组(NERD)26例, 其中, 女7例, 男19例, 平均年龄44.3岁(15-65岁); LA-A、B组30例, 女12例, 男16例, 平均年龄45.9岁(16-60岁); LA-C、D组44例, 女12例, 男32例, 平均年龄47.8岁(18-69岁). 所有患者均无胃食管手术史, 均排除消化性溃疡、糖尿病及结缔组织疾病. 检测仪器采用8导液压灌注食管压力检测系统, 为瑞典Medtronic.Synectics公司生产.

1.2 方法 受试者在检查前3d停用所有制酸剂及胃肠动力药物. 检查前一天晚餐后禁食. 经鼻插入导管, 采用定点牵拉法, 分别记录下食管括约肌静息压(LESP)、食管近端及远端蠕动收缩幅度(为10次湿咽后的平均值, 每次咽水5mL, 间隔30s). 并计算湿咽成功率(以湿咽后食管近端压力>15mmHg, 远端压力>20mmHg为湿咽成功指标)及食管体部蠕动的传导速度. 以正常对照组各指标的均值±SD为正常值. LESP<8mmHg定义为LESP低压; 湿咽成功率小于70%, 远端压力小于50mmHg, 传导速度<2cm/s定义为食管体部运动障碍.

统计学处理 各组间数据的比较用t检验和 χ^2 检验. 应用SPSS统计分析软件.

2 结果

2.1 LESP对食管黏膜损伤及其严重程度的影响 随着食

管黏膜损伤的发生及损伤严重程度的增高, LESP进行性降低. LA-C、D组的LESP明显低于对照组, 差异有显著性($P = 0.026$), 但NERD组及LA-A、B组与对照组比较, 差异无显著性($P > 0.05$),(表1). 43例重度反流性食管炎患者有33例LESP降低, 占76.7%. 仅有51.8%的NERD和53.3%的轻度反流性食管炎患者LESP降低.

2.2 食管体部运动功能对食管黏膜损伤及其严重程度的影响 食管收缩波幅及食管蠕动的传导速度与食管黏膜损伤的发生及严重程度无关. 两指标各病变组与对照组比较, 差异均无显著性($P > 0.05$). 湿咽成功率对食管黏膜损伤的发生及其严重程度有较大的影响, 反流性食管炎患者的湿咽成功率明显低于NERD组与对照组, LA-A、B组与对照组比较有显著性差异($P < 0.005$), LA-C、D组与NERD组及对照组比较有极显著性差异($P < 0.005$, $P < 0.001$).

2.3 食管测压结果的比较 食管黏膜损伤的发生及严重程度与食管体部运动功能有明显的相关性. 食管黏膜损伤程度愈严重, 食管体部运动异常的发生率愈高. NERD组食管体部运动异常的发生率为25.9%. LA-A、B组食管体部运动异常的发生率为50%. 而LA-C、D组食管体部运动异常的发生率高达62.8%. LA-C、D组食管体部运动异常的发生率与NERD组比较有显著性差异($P < 0.01$). LA-C、D组LESP异常的发生率为76.7%, 与NERD组51.8%比较有显著性差异($P < 0.05$). (表2).

表1 各组LESP及食管体部运动功能的比较(mean±SD)

| | LESP(mmHg) | 远端压力(mmHg) | 湿咽成功率(%) | 传导速度(cm/s) |
|--------------------|------------------------|------------|-------------------------|------------|
| 对照组($n = 12$) | 9.1 ± 1.2 | 59.8 ± 9.1 | 88 ± 0.04 | 2.8 ± 0.2 |
| NERD($n = 27$) | 7.8 ± 0.9 | 49.6 ± 3.6 | 78 ± 0.06 | 3.2 ± 0.1 |
| LA-A、B($n = 30$) | 6.9 ± 0.8 | 48.8 ± 5.6 | 68 ± 0.06 ^a | 3.1 ± 0.1 |
| LA-C、D($n = 43$) | 5.6 ± 0.7 ^a | 49.0 ± 5.2 | 54 ± 0.05 ^{bc} | 3.1 ± 0.2 |

^aP < 0.05, ^bP < 0.001 vs 对照组; ^cP < 0.05 vs NERD 组.

表2 各组的食管测压结果

| | LESP | | 食管体部运动功能 | |
|--------------------|------|-----------------|----------|-----------------|
| | 正常 | 异常 | 正常 | 异常 |
| NERD($n = 27$) | 13 | 14 | 20 | 7 |
| LA-A、B($n = 30$) | 14 | 16 | 15 | 15 |
| LA-C、D($n = 43$) | 10 | 33 ^a | 16 | 27 ^a |
| 合计($n = 100$) | 27 | 73 | 51 | 49 |

^aP < 0.05 vs NERD 组.

3 讨论

反流性食管炎的发病机制十分复杂, 受多种因素的影响. 酸和食管运动功能异常(下食管括约肌压力降低和食管体部运动功能减弱)是两种主要的因素. 酸对食管黏膜

的破坏作用已得到公认，人们已知反流入食管的胃酸、胃蛋白酶和胆汁可直接损伤食管黏膜，导致严重的食管炎^[3]。GERD亦是一种功能性疾病，LES功能障碍是GERD发病的最重要因素之一。在大多数胃食管反流病患者，反流主要发生在LES一过性不适当的松弛时^[4]。LESP是最主要的抗反流屏障。长期以来，LES静息压力降低被认为是GERD发病的最重要机制。本研究显示，各病变组的LESP均低于对照组，但NERD组及LA-A、B组与对照组比较，无显著性差异($P > 0.05$)，LA-C、D组的LESP降低与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$)，LA-C、D组LESP降低的发生率明显高于NERD组。表明，LESP降低在重度反流性食管炎的发生中具有重要意义。但LESP降低并非反流性食管炎发生的必备因素，即使是重度反流性食管炎患者，LESP也可能正常。

食管体部运动异常在GERD发病中的作用知之甚少，尤其对其在食管黏膜损伤中的作用不甚了解。生理上，原发性食管蠕动可清除和中和(通过吞咽的唾液)反流入食管的胃及十二指肠内容物，减少食管黏膜的酸及胆汁暴露时间，从而防止食管炎的发生。食管体部运动异常在GERD中十分常见，有报道，重度反流性食管炎患者食管体部运动异常的发生率占50%^[2]。我们的研究结果显示，随着食管黏膜损伤的发生和严重程度的增加，食管体部运动异常的发生率呈递增趋势，重度反流性食管炎组食管体部运动异常的发生率高达62.8%，而NERD组食管体部运动异常的发生率仅为25.9%，表明，食管体部运动异常在食管炎的发生和发展中起重

要作用。但在食管体部运动的各项指标中，食管体部的收缩波幅及食管体部蠕动的传导速度在对照组与各病变组之间无显著差异，而湿咽成功率重度反流性食管炎组与对照组及NERD组比较均有显著性差异。表明，食管体部失蠕动可能是食管酸廓清率减低的重要因素，食管体部失蠕动使食管黏膜暴露于反流物的时间延长，造成食管黏膜的损伤。而食管体部的收缩波幅及食管体部蠕动的传导速度可能对食管酸廓清率无影响。

食管体部运动功能减弱是引起食管炎的病因还是食管炎的结果尚存有争议^[5]。有学者认为^[6]，食管体部运动功能减弱是反流性食管炎的病因之一。另有研究报道^[7]抗反流使食管炎愈合后食管体部的运动功能有明显的改善。对此争议我们尚在进行进一步的研究。

4 参考文献

- 1 Diener U, Pattim G, Molena D, Fisichella PM, Way LW. Esophageal dysmotility and gastroesophageal reflux disease. *J Gastrointest Surg* 2001;5:260-265
- 2 Kahrilas PJ, Dodds WJ, Hogan WJ, Kern M, Arndorfer RC. Esophageal peristaltic dysfunction in peptic esophagitis. *Gastroenterology* 1986;91:897-904
- 3 Bremner RM, Crookes PF, DeMeester TR, Peters JH, Stein HJ. Concentration of refluxed acid and esophageal mucosal injury. *Am J Surg* 1992;164:522-527
- 4 Dodds WJ, Dent J, Hogan WJ, Helm JF, Hauser R, Patel GK. Mechanisms of gastroesophageal reflux in patients with reflux esophagitis. *N Engl J Med* 1982;307:1547-1552
- 5 Eckardt VF. Does healing of esophagitis improve esophageal-motor function? *Dig Dis Sci* 1988;33:161-165
- 6 Anggiansah A, Taylor G, Bright N, Owen WA, Rokkas T, Jones AR, Owen WJ. Primary peristalsis is the major acid clearance mechanism in reflux patients. *Gut* 1994; 35:1536-1542
- 7 Deprez P, Fiasse R. Healing of severe esophagitis improves esophageal peristaltic dysfunction. *Dig Dis Sci* 1999;44:125-133

内镜下气囊扩张术治疗食管狭窄32例

张威庆, 邵先玉

张威庆, 东营市胜利石油管理局中心医院 山东省东营市 257034
 邵先玉, 泰山医学院附属医院 山东省泰安市 271000
 项目负责人: 张威庆, 257034, 山东省东营市胜利石油管理局中心医院.
 zwqingnk@slfod.com
 电话: 0546-8770269
 收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-04-05

摘要

目的: 观察气囊扩张术治疗食管狭窄的临床效果及特点。

方法: 内镜下使用气囊扩张器治疗食管狭窄32例，并与以往探条扩张术进行比较。

结果: 气囊扩张术与探条扩张术对食管狭窄的治疗效果相

同，前者创伤小、患者痛苦少，易于接受；后者需依次扩张，患者痛苦较大，安全性较差。

结论: 气囊扩张术对食管狭窄的治疗效果可靠、患者痛苦小，是值得临床推广的方法。

张威庆, 邵先玉. 内镜下气囊扩张术治疗食管狭窄32例. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1504-1505

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1504.asp>

0 引言

我们消化内科开展探条扩张术治疗食管狭窄已有十几

的破坏作用已得到公认，人们已知反流入食管的胃酸、胃蛋白酶和胆汁可直接损伤食管黏膜，导致严重的食管炎^[3]。GERD亦是一种功能性疾病，LES功能障碍是GERD发病的最重要因素之一。在大多数胃食管反流病患者，反流主要发生在LES一过性不适当的松弛时^[4]。LESP是最主要的抗反流屏障。长期以来，LES静息压力降低被认为是GERD发病的最重要机制。本研究显示，各病变组的LESP均低于对照组，但NERD组及LA-A、B组与对照组比较，无显著性差异($P > 0.05$)，LA-C、D组的LESP降低与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$)，LA-C、D组LESP降低的发生率明显高于NERD组。表明，LESP降低在重度反流性食管炎的发生中具有重要意义。但LESP降低并非反流性食管炎发生的必备因素，即使是重度反流性食管炎患者，LESP也可能正常。

食管体部运动异常在GERD发病中的作用知之甚少，尤其对其在食管黏膜损伤中的作用不甚了解。生理上，原发性食管蠕动可清除和中和(通过吞咽的唾液)反流入食管的胃及十二指肠内容物，减少食管黏膜的酸及胆汁暴露时间，从而防止食管炎的发生。食管体部运动异常在GERD中十分常见，有报道，重度反流性食管炎患者食管体部运动异常的发生率占50%^[2]。我们的研究结果显示，随着食管黏膜损伤的发生和严重程度的增加，食管体部运动异常的发生率呈递增趋势，重度反流性食管炎组食管体部运动异常的发生率高达62.8%，而NERD组食管体部运动异常的发生率仅为25.9%，表明，食管体部运动异常在食管炎的发生和发展中起重

要作用。但在食管体部运动的各项指标中，食管体部的收缩波幅及食管体部蠕动的传导速度在对照组与各病变组之间无显著差异，而湿咽成功率重度反流性食管炎组与对照组及NERD组比较均有显著性差异。表明，食管体部失蠕动可能是食管酸廓清率减低的重要因素，食管体部失蠕动使食管黏膜暴露于反流物的时间延长，造成食管黏膜的损伤。而食管体部的收缩波幅及食管体部蠕动的传导速度可能对食管酸廓清率无影响。

食管体部运动功能减弱是引起食管炎的病因还是食管炎的结果尚存有争议^[5]。有学者认为^[6]，食管体部运动功能减弱是反流性食管炎的病因之一。另有研究报道^[7]抗反流使食管炎愈合后食管体部的运动功能有明显的改善。对此争议我们尚在进行进一步的研究。

4 参考文献

- 1 Diener U, Pattim G, Molena D, Fisichella PM, Way LW. Esophageal dysmotility and gastroesophageal reflux disease. *J Gastrointest Surg* 2001;5:260-265
- 2 Kahrilas PJ, Dodds WJ, Hogan WJ, Kern M, Arndorfer RC. Esophageal peristaltic dysfunction in peptic esophagitis. *Gastroenterology* 1986;91:897-904
- 3 Bremner RM, Crookes PF, DeMeester TR, Peters JH, Stein HJ. Concentration of refluxed acid and esophageal mucosal injury. *Am J Surg* 1992;164:522-527
- 4 Dodds WJ, Dent J, Hogan WJ, Helm JF, Hauser R, Patel GK. Mechanisms of gastroesophageal reflux in patients with reflux esophagitis. *N Engl J Med* 1982;307:1547-1552
- 5 Eckardt VF. Does healing of esophagitis improve esophageal-motor function? *Dig Dis Sci* 1988;33:161-165
- 6 Anggiansah A, Taylor G, Bright N, Owen WA, Rokkas T, Jones AR, Owen WJ. Primary peristalsis is the major acid clearance mechanism in reflux patients. *Gut* 1994; 35:1536-1542
- 7 Deprez P, Fiasse R. Healing of severe esophagitis improves esophageal peristaltic dysfunction. *Dig Dis Sci* 1999;44:125-133

内镜下气囊扩张术治疗食管狭窄32例

张威庆, 邵先玉

张威庆, 东营市胜利石油管理局中心医院 山东省东营市 257034
 邵先玉, 泰山医学院附属医院 山东省泰安市 271000
 项目负责人: 张威庆, 257034, 山东省东营市胜利石油管理局中心医院.
 zwqingnk@slfod.com
 电话: 0546-8770269
 收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-04-05

摘要

目的: 观察气囊扩张术治疗食管狭窄的临床效果及特点。

方法: 内镜下使用气囊扩张器治疗食管狭窄32例，并与以往探条扩张术进行比较。

结果: 气囊扩张术与探条扩张术对食管狭窄的治疗效果相

同，前者创伤小、患者痛苦少，易于接受；后者需依次扩张，患者痛苦较大，安全性较差。

结论: 气囊扩张术对食管狭窄的治疗效果可靠、患者痛苦小，是值得临床推广的方法。

张威庆, 邵先玉. 内镜下气囊扩张术治疗食管狭窄32例. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1504-1505

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1504.asp>

0 引言

我们消化内科开展探条扩张术治疗食管狭窄已有十几

年的历史，其疗效可靠，而探条扩张术需依次扩张，患者痛苦较大。为了减少患者的痛苦，2000-05/2003-10，我们对32例食管狭窄患者进行内镜下气囊扩张术，并与探条扩张术进行了对比研究，旨在观察气囊扩张术的临床疗效和特点。

1 材料和方法

1.1 材料 食管狭窄患者32例，男25例，女7例，年龄45-71岁。食管癌18例，贲门癌2例，食管癌术后复发8例，贲门癌术后复发2例，食管癌术后狭窄2例，均经胃镜活检病理证实，无手术适应证或拒绝手术治疗者。其中有肿瘤转移者12例，术后放疗者5例。吞咽困难的程度分为4级，不能进食为0级，仅能进流质为1级，进半流质为2级，进普通饮食为3级。32例食管狭窄中0级7例，1级21例，2级4例。狭窄处直径2-5mm，狭窄长度4-9mm。气囊扩张器分别由佛山市捷港医疗用品有限公司和美国Boston公司生产。Olympus-230和Pentax EPM-3300电子胃镜均由日本生产。

1.2 方法

1.2.1 术前准备 禁食8h以上，术前30min肌注安定和山莨菪碱各10mg。

1.2.2 气囊扩张术 (1)经导丝气囊扩张术(OTW): 经内镜活检管道插入活检钳，夹持导丝的引导线，由内镜导入导丝抵食管狭窄处，由活检钳将导丝引入狭窄口至胃腔内。循导丝插入国产气囊扩张器，注气压力0.1-0.2MPa，持续2-3min，注气加压2-3次，根据患者的耐受性和局部出血情况，选用气囊直径10-18mm扩张器。(2)经内镜气囊扩张术(TTS): 经内镜活检管道插入进口气囊扩张器，在内镜直视下插入狭窄口，注气压力3-6大气压，其他操作步骤同上。如扩张后出血较多，可局部应用去甲肾上腺素等止血药或用气囊压迫止血。为防止狭窄短期复发，如患者同意置入记忆合金支架。

1.2.3 术后处理 术后应用制酸剂和黏膜保护剂。术后8h进食，由流质饮食逐渐改为半流质饮食或普食。

2 结果

中国产气囊扩张26例，进口气囊扩张6例。经气囊扩张后，29例内镜能通过狭窄段，2例内镜未通过(均为术后狭窄患者)，但狭窄处直径由2mm扩至7mm。吞咽困难症状消失，1例导丝未通过狭窄处，扩张有效率96.88%(31/32)。5例扩张后置入金属支架。反复扩张2-3次者7例，共扩张42例次。术后均有胸骨后不适和胸痛，患者可耐受，2-3d消失。扩张后局部均有少量

渗血，其中2例术中用止血药物或气囊压迫止血，未发生大出血和穿孔。术后随访观察21例，1mo出现再狭窄者3例，2mo再狭窄者4例，3-6mo再狭窄者10例。5例支架置入者中1例出现再狭窄(由于肿瘤生长阻塞)。探条扩张术43例，2例导丝未通过狭窄处，扩张有效率95.34%(41/43)。

3 讨论

气囊扩张术和探条扩张术的适应证相同，治疗食管狭窄的疗效相仿^[1]。气囊扩张术分为TTS和OTW两种^[2]。气囊扩张术与探条扩张术相比有如下特点：(1)气囊扩张在内镜直视下操作，直观简便；(2)插入一次胃镜即可完成全部操作，患者痛苦小易于接受，而探条扩张需依次扩张而且需插入2次胃镜，患者痛苦较大；(3)气囊扩张对组织损伤较小，而且可镜下局部应用止血药物或气囊压迫止血，使扩张治疗比较安全；(4)对残胃较小的吻合口狭窄可应用气囊进行有效的扩张。由于探条前段由细到粗的移行段较长，扩张时探条前端已抵残胃壁，吻合口仍未能扩张到理想状态，从而影响扩张效果和损伤残胃黏膜。

内镜下扩张术可缓解吞咽困难，患者一般情况改善，生活质量提高。但易再狭窄，需要反复扩张^[3]，所以，食管癌和术后复发狭窄的患者扩张后尽量置入金属支架，覆膜支架不仅能持续扩张狭窄，并对肿瘤有较强的压迫作用，使肿瘤局部缺血，抑制肿瘤生长^[4]。如配合化疗和放疗，可延长患者生存期^[5]。

扩张术的主要并发症是局部出血和食管穿孔^[6]，本组扩张后局部均有少量出血，未发生大出血和食管穿孔。扩张后均有胸骨后不适或疼痛，使用制酸剂和黏膜保护剂，必要时应用抗生素可减轻扩张后胸痛。应根据食管狭窄的程度和患者的反应情况，决定扩张器的直径和注气压力，操作动作要轻，注气压力要逐渐升高，可减少或避免并发症的发生。

4 参考文献

- 邵先玉, 陈振华, 宁建文. 扩张置管术治疗食管狭窄和瘘. 世界华人消化杂志 2002;10:249-251
- 王苑本, 余国行, 高友芝. 进展晚期食管贲门癌的内镜治疗. 世界华人消化杂志 1999;7:777-779
- 钟捷, 吴云林. 食管金属支架演进及临床应用. 世界华人消化杂志 2001;9:797-800
- 邵先玉, 陈振华, 卜令秀, 王君林. 内镜引导直视置管术治疗食管贲门吻合口狭窄51例. 新消化病学杂志 1997;5:808
- 庞志峰. 良恶性食管狭窄患者放射治疗后致食管支架置放困难及对疗效的影响. 中华消化内镜杂志 1999;16:207-209
- 宋正军, 黎庶熙, 王巧银. 食管狭窄内镜下内支架治疗. 新消化病学杂志 1996;4:562-563

• 临床经验 •

母婴同室新生儿消化系统疾病发生率监测及临床分析

周晓薇, 孙德利, 许巍, 张丽红, 杨志萍

周晓薇, 孙德利, 许巍, 张丽红, 杨志萍, 中国医科大学附属二院儿科
辽宁省沈阳市 110004
项目负责人: 周晓薇, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属二院儿科. fwzx@cmu2h.com
电话: 024-83956386 传真: 024-83955092
收稿日期: 2004-04-15 接受日期: 2004-05-13

摘要

目的: 监测母婴同室新生儿消化系统疾病发生率, 并对疾病进行临床分析, 以建立预防机制、减少疾病的发生。

方法: 对1996-06/2003-10在我院母婴同室新生儿12 811例中消化系统疾病发生率及疾病特点进行回顾性分析。

结果: 在母婴同室12 811例新生儿中发现消化系统疾病82例, 发生率为0.64%。病情出现时间: 92.7%患儿发生在0-72 h内。常见疾病: 吞咽综合征、胃食管反流、消化道畸形及感染性疾病等。82例中67例转入我院新生儿病房, 出院时治愈63例(94.0%); 好转2例(3.0%); 死亡2例(3.0%)。14例转入小儿外科, 1例放弃。

结论: 加强医护人员对母婴同室的巡视, 密切观察新生儿变化, 能早期发现异常情况, 及时采取诊治措施, 可减少疾病发生率及降低死亡率, 提高人口素质。

周晓薇, 孙德利, 许巍, 张丽红, 杨志萍. 母婴同室新生儿消化系统疾病发生率监测及临床分析. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1506-1507
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1506.asp>

0 引言

我院从1996-06/2003-10间母婴同室新生儿总数12 811例, 其中发现消化系统疾病82例, 疾病发生率0.64%。我们对82例母婴同室患病新生儿进行了临床分析, 旨在提高母婴同室的医疗质量, 减少新生儿发病率。

1 材料和方法

1.1 材料 在消化系统疾病82例中男48例, 女34例。孕35-42(平均39.3 wk); 出生体质量2 250-4 400(平均3 480 g)。剖宫产63例, 侧切产16例, 自然产3例。82例均符合我院入母婴同室条件: 生后无窒息, 孕≥35 wk, 出生体质量≥2 250 g, 一般状况佳, 皮肤红润, 哭声响亮, 心肺听诊无异常。母亲情况: 正常者77例, 有妊娠合并症及不良产史者5例。

1.2 方法 对82例患儿的发病时间、发病率、致病因素、临床特点、疾病转归等进行分析。结果应用SPSS11.5 For windows数据分析软件处理。

2 结果

76例发生在生后72 h内, 占92.7%, 其中24 h内49例(59.8%); 24-48 h 22例(26.8%); 48-72 h 9例(10.9%); 72 h以上发病2例(2.5%)。即出生后发病时间越早, 发病率越高。将出生体质量分3组统计其发病率。出生体重≤2 500 g或≥4 000 g的新生儿发病率比2 500-4 000 g者高。发病率分别为2.3%, 0.4%, 1.3%; $r=1.000$, $P<0.01$ 。

临床表现呕吐79例, 其中吐咖啡样物26例; 纳差32例; 腹胀21例; 便血8例; 腹泻6例。其中两种以上症状者79例。诊断与转归(见表1)。

表1 发生消化系统疾病新生儿82例的诊断与转归(n)

| 诊断 | n | % | 治愈 | 好转 | 死亡 | 转儿外 | 放弃 |
|----------|----|------|----|----|----|-----|----|
| 吞咽综合征 | 36 | 43.9 | 36 | | | | |
| 胃食管反流 | 26 | 31.7 | 26 | | | | |
| 十二指肠闭锁 | 4 | 4.9 | | | | 4 | |
| 食管裂孔疝 | 3 | 3.7 | | | | 3 | |
| 肠旋转不良 | 3 | 3.7 | | | | 3 | |
| 消化道病毒感染 | 3 | 3.7 | 1 | 2 | | | |
| 先天性巨结肠 | 2 | 2.4 | | | | 2 | |
| 急性出血性坏死 | 2 | 2.4 | | | | 2 | |
| 性小肠炎 | | | | | | | |
| 食管闭锁(1型) | 1 | 1.2 | | | | | 1 |
| 贲门弛缓 | 1 | 1.2 | | | | | 1 |
| 腹腔肿物 | 1 | 1.2 | | | | | 1 |
| 总计 | 82 | 100 | 63 | 2 | 2 | 14 | 1 |

3 讨论

自从母婴同室开展以来, 绝大多数新生儿均能在母婴同室中顺利地适应外界环境, 母乳喂养, 生长良好。仅有少数患儿发生疾病。我院母婴同室12 811例新生儿中有449例发病, 发病率为3.5%, 其中消化系统疾病82例, 占0.64%。新生儿期是脱离母体逐渐适应外界生活的关键期, 也是患病的多发期。因为出生后短时间内容易尚未稳定, 一些潜在的或不明显的问题可漏诊, 不少高危因素的后果到一段时间后才显现^[1]。本组的82例新生儿生后均符合入母婴同室条件, 入室后陆续发病。特别是生后72 h内发病率高。本文报道显示, 在72 h内出现疾病者占92.7%, 尤其是生后第1个24 h占59.8%。而72 h以上发病者仅占2.5%。由此可见, 新生儿生后发病时间与发病率成正比关系, 即生后发病时间越早, 发病率也越高。这提示我们在新生儿生后24 h内, 特别是最初数小时内, 更应加强对母婴同室的巡

视，密切观察新生儿变化，及时发现问题，尽早处置。将出生体质量分三组统计其发病率，结果出生体质量 $\leq 2500\text{ g}$ 或 $\geq 4000\text{ g}$ 的新生儿发病率比 $2500\text{--}4000\text{ g}$ 之间者高。这是因为低于 2500 g 或高于 4000 g 的新生儿为高危儿，他们存在着严重潜在的或尚未被发现的威胁生命的高危因素与病理和生理基础^[2]，所以更易发病。也提醒我们对这些高危新生儿更应提高警惕，密切观察。

母婴同室新生儿消化系统疾病发病率较高，主要临床表现为：呕吐、纳差、腹胀、腹泻、便血等。呕吐者应注意与颅内出血等疾病相鉴别，腹胀、腹泻应注意排除感染因素，便血者不要忽略有新生儿自然出血症的可能。本组消化系统疾病发生率构成比为：吞咽综合征43.9%；胃食管反流31.7%；消化道畸形18.3%；消化道感染6.1%。吞咽综合征是新生儿生后最常见的一种综合征，以呕吐、吐咖啡样物为主，有的存在陈旧性血便。一般在生后数小时出现，约2-3d恢复正常。胃食管反流也是消化道疾病中发生率较高的一种，他可刺激喉部化学感受器引起呼吸暂停和心动过缓，并易诱发喉痉挛形成上气道阻塞加重缺氧，可以致死^[3]。我们曾在母婴同室巡视中发现2例因胃食管反流造成窒息者，均经过气管插管、抱球呼吸抢救成功。Polberger认为早期新生儿死亡(ENSD)的诊断标准是：出生时健康的足月儿在生后4d内出现威胁生命状态，即患儿酷似睡眠，濒死状态，出现呼吸停止、苍白、发绀、肌肉松弛或僵直，均需进行心肺复苏等急救。死亡则列入ENSD，复苏成功者称为活型ENSD，ENSD发病率为0.12%^[2]。我们抢救的2例胃食管反流窒息患者可列入ENSD和存活

型ENSD。为早期发现胃食管反流患儿，应进行24h食管pH监测及分析^[4-5]，防止黏膜损伤及窒息发生^[6]，降低死亡率。

新生儿猝死的原因以感染居首位。尤其是G-菌感染，极易引起休克^[3]，使血压迅速下降^[7]，心肌抑制^[8-9]，死亡率高。尤其是凌晨发生率较高^[10]。本组82例消化道疾病中，有5例感染，其中2例为急性出血性坏死性小肠炎，均因休克而死亡。从而提示我们对母婴同室环境及器械应严格消毒，医护人员应经常洗手，防止感染的发生。

4 参考文献

- 1 张家骥, 魏克伦, 薛辛东. 新生儿急救学[M]. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2000:111-117
- 2 赤松洋. 新生兒突然死の予防. 周产期医学 1992;22:371-374
- 3 金汉珍, 黄德琨, 官希吉. 实用新生儿学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1997:409-410
- 4 周雪莲, 江米足, 欧弼悠, 陈肖肖, 吴秀英, 陈洁. 小儿胃食管反流病24h食管pH监测1160例体会. 中华儿科杂志 2001;39:111-112
- 5 林金坤, 胡品津, 李初俊, 曾志荣, 张晓光. 原发性胆汁反流性胃炎诊断的探讨. 中华内科杂志 2003;42:81-83
- 6 Nakamura M, Haruma K, Kamada T, Mihara M, Yoshihara M, Imagawa M, Kajiyama G. Duodenogastric reflux is associated with antral metaplastic gastritis. *Gastrointest Endosc* 2001;53:53-59
- 7 Wang Y, Steinsland OS, Nelson SH. A role for nitric oxide in endotoxin-induced depletion of the peripheral catecholamine stores. *Shock* 2000;13:145-151
- 8 Sharma VK, Dellinger RP. Recent developments in the treatment of sepsis. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12:139-152
- 9 Court O, Kumar A, Parrillo JE, Kumar A. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care* 2002;6:500-508
- 10 Burchfield DJ, Rawlings DJ. Sudden deaths and apparent life-threatening events in hospitalized neonates presumed to be healthy. *Am J Dis Child* 1991;145:1319-1320

胰管出血11例

杨艳敏, 王孟春, 王宝胜, 潘作东, 孙琰

杨艳敏, 潘作东, 孙琰, 中国医科大学附属二院内科 辽宁省沈阳市 110004
王孟春, 中国医科大学附属二院内镜中心 辽宁省沈阳市 110004
王宝胜, 中国医科大学附属二院普外科 辽宁省沈阳市 110004
项目负责人: 杨艳敏, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属二院内科。ymm1234@haoyisheng.com.cn
电话: 024-83956368
收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-02-18

摘要

目的: 对经手术证实的胰管出血(HPD)患者11例进行分析, 探讨胰管出血的病因及诊断。

方法: 对HPD患者11例分别进行B超, 逆行性胰胆管造影

(ERCP)、腹腔动脉造影等检查, 最终均以手术及病理证实。

结果: 胰腺假性囊肿5例(占45.5%), 胰腺疾病侵蚀动脉形成假动脉瘤3例(占27.3%)、慢性胰腺炎2例(占18.2%)、出血坏死性胰腺炎1例(占9%)。腹腔动脉造影诊断阳性率为88.9%, 阳性符合率为100%; ERCP诊断阳性率为77.8%, 阳性符合率为85.7%; B超诊断阳性率为90.9%, 阳性符合率为70%。

结论: HPD的主要原因为胰腺假性囊肿及假动脉瘤, B超

视，密切观察新生儿变化，及时发现问题，尽早处置。将出生体质量分三组统计其发病率，结果出生体质量 $\leq 2500\text{ g}$ 或 $\geq 4000\text{ g}$ 的新生儿发病率比 $2500\text{--}4000\text{ g}$ 之间者高。这是因为低于 2500 g 或高于 4000 g 的新生儿为高危儿，他们存在着严重潜在的或尚未被发现的威胁生命的高危因素与病理和生理基础^[2]，所以更易发病。也提醒我们对这些高危新生儿更应提高警惕，密切观察。

母婴同室新生儿消化系统疾病发病率较高，主要临床表现为：呕吐、纳差、腹胀、腹泻、便血等。呕吐者应注意与颅内出血等疾病相鉴别，腹胀、腹泻应注意排除感染因素，便血者不要忽略有新生儿自然出血症的可能。本组消化系统疾病发生率构成比为：吞咽综合征43.9%；胃食管反流31.7%；消化道畸形18.3%；消化道感染6.1%。吞咽综合征是新生儿生后最常见的一种综合征，以呕吐、吐咖啡样物为主，有的存在陈旧性血便。一般在生后数小时出现，约2-3d恢复正常。胃食管反流也是消化道疾病中发生率较高的一种，他可刺激喉部化学感受器引起呼吸暂停和心动过缓，并易诱发喉痉挛形成上气道阻塞加重缺氧，可以致死^[3]。我们曾在母婴同室巡视中发现2例因胃食管反流造成窒息者，均经过气管插管、抱球呼吸抢救成功。Polberger认为早期新生儿死亡(ENSD)的诊断标准是：出生时健康的足月儿在生后4d内出现威胁生命状态，即患儿酷似睡眠，濒死状态，出现呼吸停止、苍白、发绀、肌肉松弛或僵直，均需进行心肺复苏等急救。死亡则列入ENSD，复苏成功者称为活型ENSD，ENSD发病率为0.12%^[2]。我们抢救的2例胃食管反流窒息患者可列入ENSD和存活

型ENSD。为早期发现胃食管反流患儿，应进行24h食管pH监测及分析^[4-5]，防止黏膜损伤及窒息发生^[6]，降低死亡率。

新生儿猝死的原因以感染居首位。尤其是G-菌感染，极易引起休克^[3]，使血压迅速下降^[7]，心肌抑制^[8-9]，死亡率高。尤其是凌晨发生率较高^[10]。本组82例消化道疾病中，有5例感染，其中2例为急性出血性坏死性小肠炎，均因休克而死亡。从而提示我们对母婴同室环境及器械应严格消毒，医护人员应经常洗手，防止感染的发生。

4 参考文献

- 1 张家骥, 魏克伦, 薛辛东. 新生儿急救学[M]. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2000:111-117
- 2 赤松洋. 新生兒突然死の予防. 周产期医学 1992;22:371-374
- 3 金汉珍, 黄德琨, 官希吉. 实用新生儿学. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 1997:409-410
- 4 周雪莲, 江米足, 欧弼悠, 陈肖肖, 吴秀英, 陈洁. 小儿胃食管反流病24h食管pH监测1160例体会. 中华儿科杂志 2001;39:111-112
- 5 林金坤, 胡品津, 李初俊, 曾志荣, 张晓光. 原发性胆汁反流性胃炎诊断的探讨. 中华内科杂志 2003;42:81-83
- 6 Nakamura M, Haruma K, Kamada T, Mihara M, Yoshihara M, Imagawa M, Kajiyama G. Duodenogastric reflux is associated with antral metaplastic gastritis. *Gastrointest Endosc* 2001;53:53-59
- 7 Wang Y, Steinsland OS, Nelson SH. A role for nitric oxide in endotoxin-induced depletion of the peripheral catecholamine stores. *Shock* 2000;13:145-151
- 8 Sharma VK, Dellinger RP. Recent developments in the treatment of sepsis. *Expert Opin Investig Drugs* 2003;12:139-152
- 9 Court O, Kumar A, Parrillo JE, Kumar A. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit Care* 2002;6:500-508
- 10 Burchfield DJ, Rawlings DJ. Sudden deaths and apparent life-threatening events in hospitalized neonates presumed to be healthy. *Am J Dis Child* 1991;145:1319-1320

胰管出血11例

杨艳敏, 王孟春, 王宝胜, 潘作东, 孙琰

杨艳敏, 潘作东, 孙琰, 中国医科大学附属二院内科 辽宁省沈阳市 110004
王孟春, 中国医科大学附属二院内镜中心 辽宁省沈阳市 110004
王宝胜, 中国医科大学附属二院普外科 辽宁省沈阳市 110004
项目负责人: 杨艳敏, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属二院内科。ymm1234@haoyisheng.com.cn
电话: 024-83956368
收稿日期: 2004-02-03 接受日期: 2004-02-18

摘要

目的: 对经手术证实的胰管出血(HPD)患者11例进行分析, 探讨胰管出血的病因及诊断。

方法: 对HPD患者11例分别进行B超, 逆行性胰胆管造影

(ERCP)、腹腔动脉造影等检查, 最终均以手术及病理证实。

结果: 胰腺假性囊肿5例(占45.5%), 胰腺疾病侵蚀动脉形成假动脉瘤3例(占27.3%)、慢性胰腺炎2例(占18.2%)、出血坏死性胰腺炎1例(占9%)。腹腔动脉造影诊断阳性率为88.9%, 阳性符合率为100%; ERCP诊断阳性率为77.8%, 阳性符合率为85.7%; B超诊断阳性率为90.9%, 阳性符合率为70%。

结论: HPD的主要原因为胰腺假性囊肿及假动脉瘤, B超

能提示本病, ERCP 能确诊 HPD 的部位, 腹腔动脉造影可确诊HPD, 恰当的手术治疗可挽救患者生命.

杨艳敏, 王孟春, 王宝胜, 潘作东, 孙琰. 胰管出血 11 例. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1507-1509
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1507.asp>

0 引言

上消化道出血是临床常见的危重症之一, 若不及时处理常可危及生命, 而迅速明确出血原因是治疗成败及降低死亡率的关键. 胰管出血(HPD)是罕见的上消化道出血原因之一, 其误诊率较高. 本文对我院 1983/2002 经手术证实的 HPD 患者 11 例的病因、诊断及治疗分析如下:

1 材料和方法

1.1 材料 HPD 患者 11 例, 男 10 例, 女 1 例, 年龄 21-75 岁(平均 46.2 岁), 病程 6 月-3 年不等, 主要表现为反复间断性大量的胃肠道出血, 且多继发于左上腹绞痛, 甚至出现失血性休克, 其中 10 例有腹部绞痛, 4 例有失血性休克, 1 例为单纯性反复黑便. 主要体征为腹部压痛.

1.2 方法 所有患者均进行多次胃镜、结肠镜检查, 未见上消化道出血及结、直肠病变. 所有患者均进行腹部 B 超检查, 9 例患者行 ERCP 检查, 9 例患者行腹腔动脉造影, 所有患者均进行手术治疗. 手术方法包括: 远端胰切除, 脾切除, 假性囊肿引流术, 动脉栓塞术等. 在紧急或没有手术条件的情况下, 动脉栓塞(如脾动脉栓塞)也有确切的止血疗效.

2 结果

行腹部 B 超检查 11 例, 提示胰腺假性囊肿或假动脉瘤 10 例, 其中 3 例手术证实为胰腺炎. 行 ERCP 检查 9 例, 提示胰管显影不良或不规则 7 例, 其中 1 例诊断为胰腺肿瘤, 手术证实为胰假动脉瘤, 发现 5 例胰腺假性囊肿均与主胰管相通且有囊肿内出血. 行腹腔动脉造影检查 9 例, 提示胰管出血 8 例, 胰腺假性囊肿 5 例, 假动脉瘤 3 例. 本组患者中, 胰腺假性囊肿 5 例, 占 45.5%, 假动脉瘤 3 例, 占 27.3%, 少见的病因为慢性胰腺炎及出血坏死性胰腺炎(见表 1).

表 1 各项检查阳性人数及阳性率

| | B 超 | ERCP | 腹腔动脉造影 |
|---------|-------|-------|--------|
| 受检人数 | 11 | 9 | 9 |
| 阳性人数 | 10 | 7 | 8 |
| 阳性率 % | 90.9% | 77.8% | 88.9% |
| 阳性符合率 % | 70% | 85.7% | 100% |

3 讨论

HPD 是罕见的上消化道出血原因之一, 也被称为 Wir-

sungorrhagies, 其误诊率较高, 曾报道过许多例 HPD 在确诊之前都曾做过不成功的手术. 上消化道出血无论什么年龄男性均明显多于女性, 这可能与男性的许多不良嗜好如吸烟、饮酒、不良饮食习惯等有关^[1], HPD 也多见于男性, 本文提示男性占 90.9%.

HPD 的病因可分为胰腺疾病和血管病变. 胰腺是体内仅次于肝的第二大消化腺及重要的内分泌腺^[2-3], 胰管到达胰头右缘时通常与胆总管汇合于壶腹部而开口于十二指肠大乳头^[4]. 近 10 年, 我国慢性胰腺炎的发病率有上升趋势, 其假性囊肿等并发症也随之增加, 由此导致 HPD 的潜在危险性也有所增长^[5-6]. 本文结果提示, HPD 最常见的病因为胰腺假性囊肿, 其次为胰腺疾病侵蚀动脉形成的假动脉瘤, 再次为慢性胰腺炎, 最少见的为出血坏死性胰腺炎, 该结果与其他文献^[7]报道相似.

HPD 的发生机制为胰腺的炎症或假性囊肿内胰液所含的激活的分解酶, 腐蚀周围动脉形成假动脉瘤, 以脾动脉最常受累, 82% 的脾动脉瘤被腐蚀破裂可致出血, 血液可进入胃肠道、腹腔及胰管, 从而引起 HPD^[8-9].

HPD 的临床特点为多继发于左上腹绞痛后的反复间断性大量胃肠道出血, 重者可出现失血性休克, 一些患者查体时可闻及腹部血管杂音. 出血反复间断发作的机制可解释如下, 当血液进入胰管则产生胰管内高压, 导致疼痛和血液填塞, 因胰管阻塞, 继疼痛之后胰管内将有凝血块形成, 当血液或凝块排出或溶解时, 阻塞消失则重新出现呕血或黑便.

HPD 的确诊较为困难^[10], 主要原因在于常规的胃镜很难发现 HPD 的病因, 临床医生诊断思维偏差, 常首先想到引起消化道出血的常见病而忽略了 HPD. 近 16 年的研究表明, 不明原因的上消化道出血已多达 6.3%^[11], 为此对 HPD 应高度重视. 本文结果提示: 胃镜、结肠镜常不能确诊 HPD, B 超可发现胰腺中的低回声灶及搏动性包块, ERCP 能确认胰腺状态及 HPD 病变部位, 腹腔动脉造影是活动性消化道出血的理想诊断手段, 可确诊 HPD. 本组患者行小肠气钡造影、胰腺 CT 检查例数过少, 故未予分析, 实验室检查意义较小.

对确诊的 HPD 患者行恰当的手术治疗可明显降低 HPD 的死亡率^[12-14]. 本组患者大多数术后随访 2 年, 无黑便.

总之, 我们认为, HPD 极易误诊, 对有间歇性发作左上腹绞痛, 伴痛后间断性反复呕血或黑便的病例, 应考虑到 HPD. B 超能提示本病, 腹腔动脉造影可确诊 HPD, 采取适当的手术治疗可挽救患者生命, 由此可见腹腔动脉造影是诊治 HPD 成败的关键.

4 参考文献

- 黎忠信, 钟华志, 邹雪花, 赵德娥. 1869 例上消化道出血病因及相关因素分析. 中华消化内镜杂志 2001;18:19-21
- Pan QS, Fang ZP, Huang FJ. Identification, localization and morphology of APUC cells in gastroenteropancreatic system of stomach-containing teleosts. World J Gastroenterol 2000;6: 842-847

- 3 石爱荣, 梁文妹, 黄岩. 胃肠胰岛淀粉样多肽的定位和表达. 世界华人消化杂志 2000;8:211-213
- 4 胡建昆, 周总光, 杨开清. 胰腺的应用解剖. 世界华人消化杂志 2001;9:826-829
- 5 王兴鹏. 中国胰腺疾病研究的现状与展望. 世界华人消化杂志 2000;8:843-846
- 6 田素礼, 王震, 谷金宇. 慢性胰腺炎的外科治疗. 世界华人消化杂志 2001;9:1282-1284
- 7 Dinu F, Deviere J, Van Gossum A, Golzarian J, Dussaussois L, Delhay M, Cremer M. The wirsungorrhagies: causes and management in 14 patients. *Endoscopy* 1998;30:595-600
- 8 徐克成. 胰腺疾病所致的上消化道出血. 中国实用内科杂志 1998; 18: 12-13
- 9 许红兵, 董荫祺, 李为民, 李虎城, 杜国盛. 胰腺囊肿手术治疗 10 例. 新消化病杂志 1996;4:655-656
- 10 Chung HJ, Yu MC, Lien JM, Jeng LB, Su MY. Hemosuccus pancreaticus from a traumatic gastroduodenal pseudoaneurysms: an unusual cause of upper gastrointestinal bleeding. *Chang Gung Med J* 2001;24:741-745
- 11 王社论, 岳茂兴. 上消化道出血 827 例结局分析. 世界华人消化杂志 1999;7:928-931
- 12 朱伟. 胰源性门脉高压并发胰管上消化道出血(附二例报告). 腹部外科 2002;15:335
- 13 王震宇, 勾承同, 张晓东. 慢性胰腺炎多重并发症 10 例. 世界华人消化杂志 1999;7:86-87
- 14 Heider R, Behrns KE. Pancreatic pseudocysts complicated by splenic parenchymal involvement: results of operative and percutaneous management. *Pancreas* 2001;23:20-25

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

• 临床经验 •

脾结核的二维及彩色多普勒超声诊断价值

邱 邊, 文晓蓉, 林 玲

邱邊, 文晓蓉, 林玲, 四川大学华西医院超声科 四川省成都市 610041
 项目负责人: 邱邊, 610041, 四川省成都市武侯区国学巷37号, 四川大学华西医院超声科。wsguli@sina.com
 电话: 028-85423053
 收稿日期: 2004-04-06 接受日期: 2004-04-27

摘要

目的: 探讨脾结核的二维及彩色多普勒超声诊断价值。

方法: 对经病理和临床证实的 20 例脾结核的声像图、病理及临床资料进行回顾性对比分析。

结果: 根据声像图表现可分为四型: 弥漫型(9 例), 实性团块型(6 例), 脓肿型(4 例), 钙化型(1 例)。

结论: 弥漫型为粟粒性脾结核, 实性团块型为结核性肉芽肿伴干酪样坏死, 脓肿型为干酪样坏死伴中心液化, 钙化型为干酪样坏死物干燥浓缩并伴钙盐沉着。超声检查结合临床资料对脾结核的定性诊断具有一定价值。

邱邊, 文晓蓉, 林玲. 脾结核的二维及彩色多普勒超声诊断价值. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1509-1511

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1509.asp>

0 引言

脾结核是一种临床较少见的肺外结核, 由于发病率低, 没有引起医生的足够重视, 所以临床与影像学上都常常误诊, 对于脾结核的超声病例报道也较少。近年来由于免疫抑制剂的广泛应用及 AIDS 的出现, 腹腔内结核的发病率有上升的趋势, 引起了人们的关注。脾结核作为腹腔内结核的一种, 同样引起了人们对脾结核诊

断的关注^[1-2]。1990/2003 年我院收治脾结核 20 例, 均作超声检查, 并经手术病理和临床证实, 通过对超声声像图、病理和临床表现回顾性对比分析, 探讨二维超声及彩色多普勒超声在脾结核诊断中的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 脾结核患者 20 例, 男 13 例, 女 7 例, 年龄 15-68(平均 35.9 岁)。临床发热 16 例, 伴盗汗 6 例, 脾肿大 9 例, 左上腹胀痛 3 例, OT 或 PPD 试验阳性 14 例, 体重减轻 8 例。曾有或并发脾外结核的 15 例, 其中多器官结核(大于等于 3 个器官)8 例, 脾外结核分布肝脏 5 例, 肺 5 例, 腹膜及腹膜后淋巴结 4 例, 胸膜 3 例, 骨髓 2 例, 颈部淋巴结 1 例, 腹股沟淋巴结 1 例, 肠道 1 例, 腰椎 1 例。手术病理证实 8 例, 脾脏穿活检证实 3 例, 临床抗结核治疗后病情好转而证实 9 例。

1.2 方法 患者取仰卧位, 使用 GE LOGIQ 500, HP-4500, ATL-3500, ATL-5000 型超声诊断仪, 探头频率 2-5 MHz, 其中 12 例行二维超声检查, 常规观察肝、胆、胰、脾、肾、腹膜后淋巴结, 重点观察脾脏的大小, 实质回声, 有无肿块及其大小、数目、边缘、内部回声、有无液化及钙化等情况, 8 例行二维及彩色多普勒检查, 重点观察脾脏肿块的血流情况。

2 结果

根据脾结核不同的超声表现, 借鉴肝结核的分型, 我们把他分为 4 型^[3]:

2.1 弥漫型 9 例, 其中 8 例为二维超声检查, 1 例为

- 3 石爱荣, 梁文妹, 黄岩. 胃肠胰岛淀粉样多肽的定位和表达. 世界华人消化杂志 2000;8:211-213
- 4 胡建昆, 周总光, 杨开清. 胰腺的应用解剖. 世界华人消化杂志 2001;9:826-829
- 5 王兴鹏. 中国胰腺疾病研究的现状与展望. 世界华人消化杂志 2000;8:843-846
- 6 田素礼, 王震, 谷金宇. 慢性胰腺炎的外科治疗. 世界华人消化杂志 2001;9:1282-1284
- 7 Dinu F, Deviere J, Van Gossum A, Golzarian J, Dussaussois L, Delhay M, Cremer M. The wirsungorrhagies: causes and management in 14 patients. *Endoscopy* 1998;30:595-600
- 8 徐克成. 胰腺疾病所致的上消化道出血. 中国实用内科杂志 1998; 18: 12-13
- 9 许红兵, 董荫祺, 李为民, 李虎城, 杜国盛. 胰腺囊肿手术治疗 10 例. 新消化病杂志 1996;4:655-656
- 10 Chung HJ, Yu MC, Lien JM, Jeng LB, Su MY. Hemosuccus pancreaticus from a traumatic gastroduodenal pseudoaneurysms: an unusual cause of upper gastrointestinal bleeding. *Chang Gung Med J* 2001;24:741-745
- 11 王社论, 岳茂兴. 上消化道出血 827 例结局分析. 世界华人消化杂志 1999;7:928-931
- 12 朱伟. 胰源性门脉高压并发胰管上消化道出血(附二例报告). 腹部外科 2002;15:335
- 13 王震宇, 勾承同, 张晓东. 慢性胰腺炎多重并发症 10 例. 世界华人消化杂志 1999;7:86-87
- 14 Heider R, Behrns KE. Pancreatic pseudocysts complicated by splenic parenchymal involvement: results of operative and percutaneous management. *Pancreas* 2001;23:20-25

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

• 临床经验 •

脾结核的二维及彩色多普勒超声诊断价值

邱 邊, 文晓蓉, 林 玲

邱邊, 文晓蓉, 林玲, 四川大学华西医院超声科 四川省成都市 610041
 项目负责人: 邱邊, 610041, 四川省成都市武侯区国学巷37号, 四川大学华西医院超声科。wsguli@sina.com
 电话: 028-85423053
 收稿日期: 2004-04-06 接受日期: 2004-04-27

摘要

目的: 探讨脾结核的二维及彩色多普勒超声诊断价值。

方法: 对经病理和临床证实的 20 例脾结核的声像图、病理及临床资料进行回顾性对比分析。

结果: 根据声像图表现可分为四型: 弥漫型(9 例), 实性团块型(6 例), 脓肿型(4 例), 钙化型(1 例)。

结论: 弥漫型为粟粒性脾结核, 实性团块型为结核性肉芽肿伴干酪样坏死, 脓肿型为干酪样坏死伴中心液化, 钙化型为干酪样坏死物干燥浓缩并伴钙盐沉着。超声检查结合临床资料对脾结核的定性诊断具有一定价值。

邱邊, 文晓蓉, 林玲. 脾结核的二维及彩色多普勒超声诊断价值. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1509-1511

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1509.asp>

0 引言

脾结核是一种临床较少见的肺外结核, 由于发病率低, 没有引起医生的足够重视, 所以临床与影像学上都常常误诊, 对于脾结核的超声病例报道也较少。近年来由于免疫抑制剂的广泛应用及 AIDS 的出现, 腹腔内结核的发病率有上升的趋势, 引起了人们的关注。脾结核作为腹腔内结核的一种, 同样引起了人们对脾结核诊

断的关注^[1-2]。1990/2003 年我院收治脾结核 20 例, 均作超声检查, 并经手术病理和临床证实, 通过对超声声像图、病理和临床表现回顾性对比分析, 探讨二维超声及彩色多普勒超声在脾结核诊断中的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 脾结核患者 20 例, 男 13 例, 女 7 例, 年龄 15-68(平均 35.9 岁)。临床发热 16 例, 伴盗汗 6 例, 脾肿大 9 例, 左上腹胀痛 3 例, OT 或 PPD 试验阳性 14 例, 体重减轻 8 例。曾有或并发脾外结核的 15 例, 其中多器官结核(大于等于 3 个器官)8 例, 脾外结核分布肝脏 5 例, 肺 5 例, 腹膜及腹膜后淋巴结 4 例, 胸膜 3 例, 骨髓 2 例, 颈部淋巴结 1 例, 腹股沟淋巴结 1 例, 肠道 1 例, 腰椎 1 例。手术病理证实 8 例, 脾脏穿活检证实 3 例, 临床抗结核治疗后病情好转而证实 9 例。

1.2 方法 患者取仰卧位, 使用 GE LOGIQ 500, HP-4500, ATL-3500, ATL-5000 型超声诊断仪, 探头频率 2-5 MHz, 其中 12 例行二维超声检查, 常规观察肝、胆、胰、脾、肾、腹膜后淋巴结, 重点观察脾脏的大小, 实质回声, 有无肿块及其大小、数目、边缘、内部回声、有无液化及钙化等情况, 8 例行二维及彩色多普勒检查, 重点观察脾脏肿块的血流情况。

2 结果

根据脾结核不同的超声表现, 借鉴肝结核的分型, 我们把他分为 4 型^[3]:

2.1 弥漫型 9 例, 其中 8 例为二维超声检查, 1 例为

二维及彩色多普勒超声检查，超声声像图表现为脾脏肿大，1例内部回声呈网状，其余8例内部回声较均匀，彩色血流未见异常。此型病例伴发脾外结核的7例。诊断靠脾穿活检的2例，根据临床抗结核后病情好转的7例，2例脾穿刺活检病理及3例其他器官活检病理结果均为粟粒性结核。

2.2 实性团块型 6例，均为二维及彩色多普勒超声检查，二维超声表现为脾内多发的弱回声团块，大小0.5-4cm，边界清楚，形态规则，内部回声欠均匀，(图1, 2)彩色多普勒超声显示团块内血流信号不丰富。此型病例伴发脾外结核的所有4例。6例均经手术病理证实为结核性肉芽肿伴干酪样坏死。

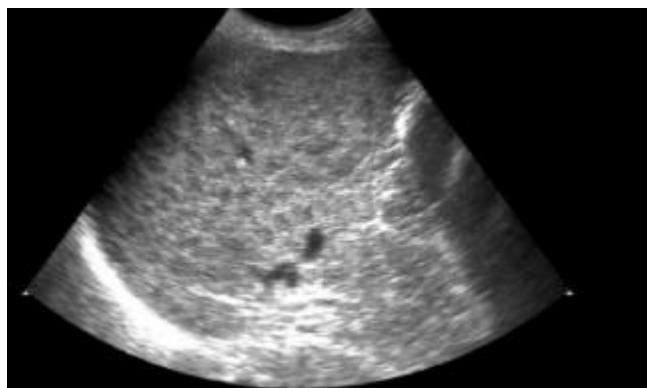


图1 脾脏长大伴多发实质性团块。

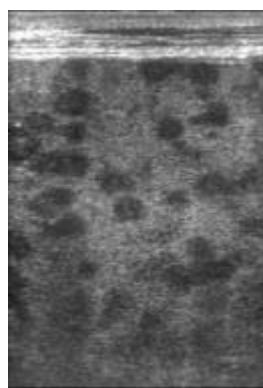


图2 脾脏长大伴多发实质性团块(高频)。

2.3 胀肿型 4例，为二维超声检查，超声显示为肝内弱回声团块，1.5-7.5 cm，团块边界清楚，形态较规则，肿块内见无回声区，无回声区内见细小点状回声，后方可见回声增强，2例脾内还查见多个0.5-2 cm的弱回声结节，边界清楚，形态规则。此型病例伴发脾外结核的3例。4例均作手术，术后病理结果为干酪样坏死伴有中心液化坏死。

2.4 钙化型 1例，为二维及彩色多普勒超声检查，超声表现为脾内多发点片状强回声，彩色血流未见异常(图3)。此例患者同时伴发肝脏及肾脏多发点片状及斑片状强回声(图4)。此病例在外院以肝内胆管结石行手术治疗，术后病理结果为结核性钙化灶。

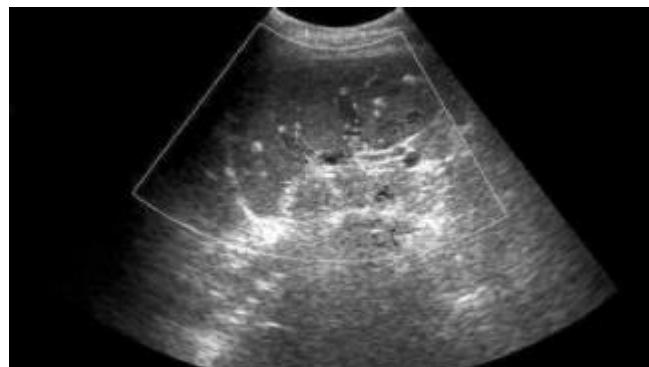


图3 脾脏内多发钙化灶。

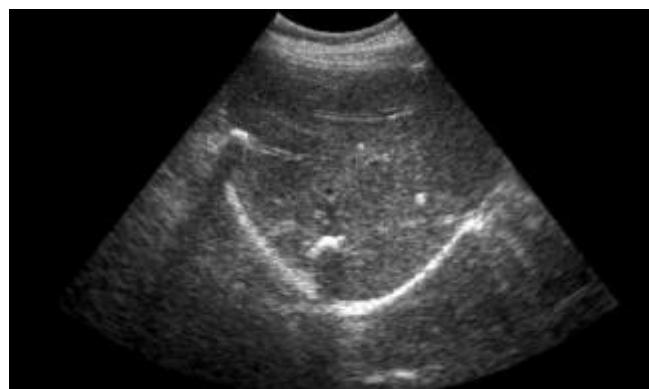


图4 肝脏内多发钙化灶。

3 讨论

脾结核的误诊漏诊较多，主要是由于脾结核的发病率不高，没有引起超声医生的重视，对结核引起的脾损害各病理阶段认识不足，且与脾外器官结核、临床及病史整体联系不够。脾结核在不同的病期，其病理改变可表现为结核性肉芽肿，干酪样坏死，液化坏死，纤维组织增生及钙化等，其超声图像具有一定的特征。

3.1 弥漫型的脾结核，超声表现为脾脏肿大，病理下为脾实质形成散在的、大小约0.5-2.0 mm粟粒样小结节，超声不能显示结节^[3]。此型病例超声缺乏特异性，与单纯性脾脏长大不易区分，如结合患者有脾外结核病史，结核毒血症状，及OT或PPD试验阳性更有助于诊断，确诊需依靠脾穿刺活检。

3.2 实性团块型的脾结核，超声表现为脾内多发的弱回声团块，边界清楚，形态规则，内部回声欠均匀，血流信号不丰富。病理下为结核结节融合形成肉芽肿或干酪样坏死，此型脾结核要注意与脾血管瘤、脾恶性淋巴瘤鉴别，根据我们的经验及文献复习，认为其鉴别要点主要为：脾血管瘤可为单发或多发，但其回声多为强回声，部分较大的血管瘤可为弱回声，其内部回声呈网状，周边回声增强。脾恶性淋巴瘤当表现为脾内多发弱回声结节时与脾结核声像图上鉴别较困难，但结合后者有脾外结核病史、结核毒血症状有助于鉴别，确诊可通过脾穿刺活检或手术后病理。

3.3 胀肿型的脾结核，超声表现与非结核性脾胀肿相

似，均表现为脾内囊实质性占位，声像图同样缺乏特异性，病理上表现为干酪样坏死和肉芽肿中心液化，其鉴别主要依靠脾外结核病史、结核毒血症状及OT或PPD试验阳性，确诊可通过脾穿刺活检或手术后病理。

3.4 钙化型的脾结核，钙化型脾结核是结核病灶愈合过程中纤维化和钙化的结果，超声表现为脾内多发的点片状强回声，部分后方伴声影。与单纯性脾内钙化灶的鉴别要点主要为前者常为多发，并常合并腹腔内其他实质器官多发的钙化灶或有脾外结核的病史，确诊可通过脾穿刺活检^[3-5]。

脾结核主要靠抗结核药物治疗，剖腹探查只起明确诊断的目的，因此术前诊断及其重要，结合临床结核毒血症状、结核病史以及实验室检查进行声像图分析，为脾结核术前诊断的主要途径和首选方法。而超声引导下

脾脏病灶细针穿刺取材组织病理学检查及针吸物细胞学检查是脾结核术前诊断最有价值的手段^[1]。总之，加强超声医生对脾结核的认识，密切结合临床，注意鉴别诊断，可以提高脾结核的术前诊断水平，减少和避免剖腹探查给患者造成的痛苦和负担。

4 参考文献

- 1 Suri R, Gupta S, Gupta SK, Singh K, Suri S. Ultrasound guided fine needle aspiration cytology in abdominal tuberculosis. *British J Radiol* 1998;71:723-727
- 2 方石岗, 杨继震. 肝结核诊治现状. 世界华人消化杂志 1999;7: 412-413
- 3 范晓明, 徐海珊, 范妙英, 寿金朵, 汤富刚, 吕江红, 赵博文. 肝结核的超声表现与分型. 中华超声影像学杂志 2002;11:436-437
- 4 周荣智, 冉崇建, 刘国庆. 脾结核的影像学诊断(附9例报告). 临床放射学杂志 2001;20:365-367
- 5 吴佩, 周洸, 李先斌, 明慧. 孤立性脾脏结核的诊治. 中华结核和呼吸杂志 1989;12:292-293

World Journal of Gastroenterology 1998-2004年的现状

本刊讯 *World Journal of Gastroenterology*® (*World J Gastroenterol*, WJG) 是发表原创性胃肠病学和肝病学论文的国际性学术杂志。WJG 创刊于 1995 年，原名 *China National Journal of New Gastroenterology*，1998 年更名为 WJG，由世界胃肠病学杂志社出版。WJG 国际标准刊号 ISSN 1007-9327，国内统一刊号 CN 14-1219/R，邮发代号 82-261，北京报刊发行局发行。

1 WJG 1998-2004 年自引和他引

WJG 出版的原始创新性的论文被 SCI 收录的 361 种期刊和 589 个机构引用，其中美国期刊占 44.59%，机构占 22.58%，中国期刊占 3.60%，机构占 18.84%。最高影响因子为 28.740 (Nature Medicine)，影响因子 2.0 以上的期刊有 170 种，占 52.95%。WJG 2004 年 1-2 月总引次数 560，自引次数 435 (77.67%)；2003 年总引次数 2736，自引次数 2004 (73.24%)；2002 年总引次数 1486，自引次数 1401 (94.27%)；2001 年总引次数 537，自引次数 499 (92.92%)；2000 年总引次数 238，自引次数 220 (92.43%)；1999 年总引次数 24，自引次数 8 (33.33%)；1998 年无总引次数。WJG 2002 年被他刊引用的篇数和次数分别为 82, 85；2003 年分别为 332, 372；分别上升了 250 (304.87%), 287 (337.64%)。引用作者分布 38 个国家，引用期刊分布 21 个国家。各项国际及国家自然科学基金资助论文 1020 篇，占 57.46%。论文作者分布 40 个国家。2003 年 5-12 期 436 篇论文被下载次数为 53476，最高下载次数为 2255。WJG 2003 年自引次数的百分点由 2002 年 94.27%，下降到 73.24%，他刊引用的篇数和次数分别上升了 250 (304.87%), 287 (337.64%)。2004 年 1-3 月他引用的次数 223，平均 73.3 次。根据以上数字可以看出，从 2003 年开始 WJG 正在快速发展，他刊引用的篇数和次数显著增长。

2 WJG 的具体情况，请阅读以下文章

Articles published in *World Journal of Gastroenterology* are cited by 361 ISI-SCI covered journals during January 1998- February 2004. *World J Gastroenterol* 2004; 10(11):1690-1693. 全文见 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/10/1690.asp>

Ma LS, Pan BR. A total of 484 articles published in *World Journal of Gastroenterology* are cited by 361 ISI-SCI covered journals distributed in 38 countries during 1998-2003. *World J Gastroenterol* 2004; 10(9): 1233-1237. 全文见 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/10/1233.asp>

Ma LS, Pan BR, Ma JY, Xu JY, Wu XN, Wang XL, Lu HM, Xia HHX, Liu HX, Zhang JZ, Su Q, Ren SY, Zhu L, Zhu LH, Lu YY. Towards a higher international standard - *World Journal of Gastroenterology* will be published semimonthly in 2004. *World J Gastroenterol* 2004; 10(1): 1-4. 全文见：<http://www.wjgnet.com/1007-9327/10/1.asp>

马连生, 潘伯荣, 马景云, 徐家裕, 巫协宁, 王先林, 陆汉明, 夏华向, 张建中, 苏勤, 任师颜, 朱立, 朱丽虹, 吕有勇. 创办具有中国特色的国际先进水平的 WJG: 2004 年由月刊改为半月刊. 世界华人消化杂志 2003;11(11):1661-1664. 全文见 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1661.asp>

3 期刊荣誉

ISI JCR 2000-2002 Impact Factor of WJG was 0.993, 1.445 and 2.532 respectively. A total of 687 articles published in WJG were cited by 389 ISI-SCI covered journals distributed in 39 countries during January 1998 - March 2004. The WJG is supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30224801) and holds certificates of the 100 Outstanding Academic Journals of China 2002, National Journal Award, Journal of the Statistic Source of Papers on Science and Technology of China and Key Journals of China Science and Technology, and covered by Index Medicus, MEDLINE, PubMed, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, Abstracts Journals, Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology, CAB Abstracts and Global Health.

总之，为适应胃肠病学和肝病学专业基础与临床研究的快速发展，以及日益增多的国际科技交流的需要，WJG 将从 2005 年开始，由半月刊改为周刊，大 16 开，160 页，每月 7, 14, 21, 28 日出版。WJG 将完全按照国际标准办刊，从收稿到出版的管理，已完全实现市场化，以质量为本。从收稿到出版或退稿，以公正科学的态度处理每一份稿件。在学术水平和编辑质量方面以国际最优秀的期刊为目标。WJG 争取在国家、作者、读者，全体编委和社会的大力支持下，办成一份国际本专业具有突出影响的学术期刊。