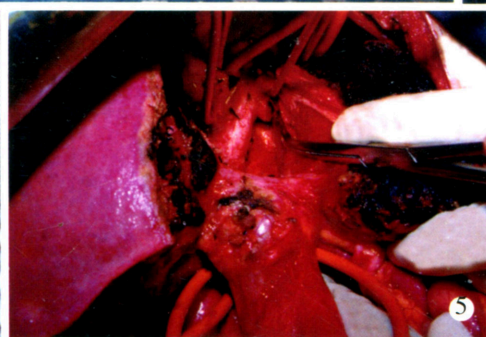
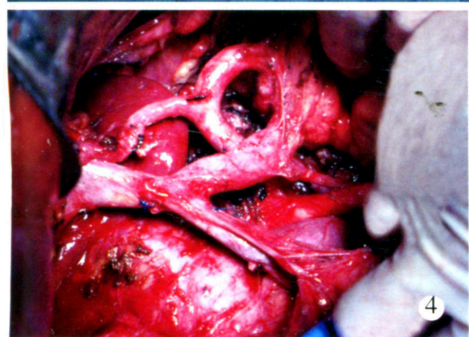


世界华人消化杂志®

WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003年5月15日 第11卷 第5期 (Volume 11 Number 5)



5/2003

ISSN 1009-3079



名誉总编辑
潘伯荣
总编辑
马连生

World Journal of Gastroenterology® 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports® Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001年 JCR® 报告 WJG 影响因子 1.445. 世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录. 2001年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

目次 2003年5月15日 第11卷 第5期(总第109期)

述 评	497 刮吸解剖法在肝门胆管癌手术切除中的应用 彭淑牖,刘颖斌
	499 我国小肠疾病的研究现状 智发朝
	502 2003年度国家自然科学基金医学和生物学项目指南概述 崔慧斐,江学良,马连生
食管癌	508 食管上皮癌变过程中环氧化酶-2表达上调 齐凤英,张林西,韩彩丽,左连富,林培中,郭建文
	512 腺病毒介导的 p27kip1 对食管癌裸鼠模型抑制的作用 张卫国,吴清明,童强,于皆平
	517 腺病毒介导的 cox-2 反义 RNA 对食管癌细胞株 DNA 和蛋白质合成的影响 李胜保,吴清明,王强,王小虎,谢国建
胃 癌	522 胃癌 SMAD4/DPC4 杂合性丢失的研究 朱亚青,尹浩然,朱正纲,刘炳亚,张奕,陈雪华,于颖彦,林言箴
	526 胃癌增生凋亡与调节基因的表达 潘传敬,刘宽宇
	531 慢性萎缩性胃炎胃泌素、生长抑素、表皮生长因子、血管活性肠肽的测定及临床意义 郭昱,郭霞,姚希贤
大 肠 癌	535 CD5-FC系统对结肠癌细胞的杀伤作用 黎成金,马庆久,赖大年,鲁建国,王小军,王青,潘伯荣,武永忠,李金茂
	540 大肠腺癌组织 Survivin 蛋白的表达意义 肖军,邓长生,朱尤庆
幽门螺杆菌	544 胃癌细胞系幽门螺杆菌感染对金属蛋白酶表达的影响 李新华,张桂英,罗非君,徐美华,李乾
	547 表达幽门螺杆菌热休克蛋白 60 克隆的构建 白杨,黄文,林焕健,王继德,陈焯,张兆山,周殿元,张亚历
	551 幽门螺杆菌感染者胃黏膜中内质网分子伴侣 Grp94 的表达 王孟春,方文刚,顾金歌,李岩
	554 幽门螺杆菌 CagA 蛋白与胃癌组织中 Bcl-2、p53 蛋白表达的关系 杜雅菊,赵晶,赵瑞波,李宝杰
	558 根除 <i>H. pylori</i> 后应用灭 <i>Hp</i> 煎剂对慢性胃炎病变的影响 王娜,姚希贤,张琳,白文元,冯丽英
	562 <i>Hp</i> 对慢性萎缩性胃炎内皮素及一氧化氮水平影响的实验与临床研究 郭昱,郭霞,姚希贤
基础 研究	565 大蒜素对大鼠溃疡性结肠炎淋巴细胞凋亡及其调控蛋白的影响 徐细明,于皆平,何小飞,李军华,郑敏,於亮亮
	569 泻剂结肠大鼠结肠中的 mu、kappa 阿片受体变化 刘宝华,莫平,张胜本
	571 香砂平胃散对小鼠胃排空的影响 王学清,王秀杰,李岩
	575 术香冲剂对小鼠胃肠动力的影响 李岩,王学清,张卫卫,王江玥
	578 EGF 对小肠缺血再灌注后磷酸化 p44/42 MAPK 表达的影响 李平,邢峰,付小兵,杨银辉,郭宝琛
焦点论坛	583 吻合方法对防止胰肠吻合口漏的重要性 彭淑牖,刘颖斌
	584 胰十二指肠切除术的适应证 许斌,刘颖斌,王建伟,曹利平,彭淑牖
	587 胰十二指肠切除术的主要并发症及诊断与治疗 邓贵龙,李海军,刘颖斌,牟一平,彭淑牖
	589 胰十二指肠切除术后胰漏的发生机制 王建伟,许斌,蔡秀军,李海军,刘颖斌,彭淑牖
	591 胰肠吻合方法的演进 白明东,刘颖斌,李海军,彭淑牖
	593 彭氏捆绑式胰肠吻合术的临床应用 陈晓鹏,刘颖斌,李海军,许斌,王建伟,李江涛,王新保,吴育连
	595 彭氏型捆绑式胰肠吻合术 史留斌,方河清,刘颖斌,李海军,王建伟,许斌
	596 捆绑式胰肠吻合术防止胰漏的机制 刘颖斌,彭淑牖
文 献 综 述	598 人工肝生物反应器研究进展 向德栋,王英杰,王宇明
	601 肝纤维化治疗的新热点-TIMPs 谢玉梅,聂青和
	606 p63 基因研究进展 司少艳,张建中
	610 老年期消化系疾病的诊疗特点 宋于刚

文献综述	613 胆道系统运动调节及功能性胆道运动异常的诊治 陈仕珠 619 肠黏膜屏障研究进展 武金宝,王继德,张亚历 624 线粒体 DNA 与消化性肿瘤关系的研究进展 韩琤波,李凡,辛彦 628 热休克蛋白在胃溃疡中的表达及意义 向廷秀,王丕龙 632 内镜技术在消化系疾病诊疗中的应用 韩英 635 幽门螺杆菌的研究进展 徐智民,张万岱,周殿元 640 肠镜检查在早期大肠癌诊断中的重要作用 张亚历,周殿元 643 超声内镜检查在胃肠疾病中的临床应用 郭文 646 老年期消化道出血的鉴别诊断与治疗措施 宋卫生,杨希山 649 老年期消化性溃疡临床用药的合理选择 白岚 651 肥大细胞与功能性胃肠疾病 彭丽华,杨云生 654 肝门胆管癌的超声影像学诊断 王彬,陈路增,赵建勋,孙占祺 656 Budd-Chiari 综合征的分型及诊断 许伟华,朱菊人 658 部分脾栓塞术国内应用现状 朱晓玲
研究快报	663 FAK 在大肠癌中的表达及其临床意义 杨红军,丁彦青 665 大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响 董卫东,张胜本,刘宝华,张连阳,黄显凯,高峰 668 胃癌患者血清 TNF- α 的水平及意义 陈剑群,许统俭,安侠,王营,陈玉林
临床经验	670 前列腺素 E ₁ 对急性胰腺炎二十碳烯酸异常代谢调节的临床研究 李庭赞,孙丹莉,孙士其 671 肝硬化腹水并发肝肾综合征及低渗性脑病与限钠治疗关系的研究 刘建军,智红,吴晓英,李楠 673 金属夹联合内镜注射治疗胃肠道出血 王孟春,李立,常桂艳,孙思予,孙素云 675 内镜诊疗实现无痛苦操作的临床评价 游旭东,陈玲玲,郑晓蕾,王鹏,吴永伟,孔晓丽,许元印 677 经皮经肝胆囊引流治疗急性胆囊炎和重症胆管炎的价值 张国梁,朱春兰,任旭 679 进展期胰腺癌 299 例 王成锋,赵平,李文波,宋德余 681 食管、贲门癌染色体异常分析及意义 武珊珊,刘吉福,王明荣 684 空回肠出血 27 例 石力,田伏洲,李旭,周庆贤,赵碧,薛刚 686 食管鳞癌免疫组化彩色图像定量分析 韩永,徐燕杰,李宁,布和,宋晶莹,赵敏
病例报告	662 大肠 3 原癌 1 例 姚红兵,吴爱国,朱卉娟
封面故事	605 浙江大学医学院附属第二医院外科

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(月刊)

创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2003-05-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀	张金哲
黄象谦	张学庸
黄志强	赵东海
黎介寿	周殿元
刘耕陶	社长总编辑 马连生
裘法祖	中文编辑 潘伯荣
汤钊猷	王瑾晖
王宝恩	英文编辑 张建中
危北海	排版 李少华
吴孟超	校对 李天华
吴咸中	

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街 77 号
E-mail: wjcd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wjcd@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
电话 (010)85381892
传真 (010)85381893

印刷 北京科信印刷厂
发行 国内 北京报刊发行局
国外 中国国际图书贸易总公司
(100044, 北京 399 信箱)

订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市 2345 信箱)
电话:(010)85381892
传真:(010)85381893

2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外
检索系统收录
美国《化学文摘(CA)》
荷兰《医学文摘库/医学文摘(EM)》
俄罗斯《文摘杂志()》
中国科技论文统计与分析
中国学术期刊文摘
中国中医药信息服务网
中国生物医学文献光盘数据库
《中文科技资料目录(医药卫生)》
中国生物医学期刊目次数据库
中国医学文摘外科学分册(英文版)
中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明
本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262
国外代号 M 4481

国内定价 每份 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证
1401004000050

COMMENTARY

Application of scraping and suctioning dissection in surgical remove of cholangiocarcinoma in porta hepatis

Peng SY, Liu YB 497

Current status of intestinal diseases in China

Zhi FC 499

Introduction to application directory of National Natural Science Foundation of China (Medicine and Biology, 2003)

Cui HW, Jiang XL, Ma LS 502

ESOPHAGEAL CANCER

Up-regulation of cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of esophageal epithelia

Qi FY, Zhang LX, Han CL, Zuo LF, Lin PZ, Guo JW 508

Inhibitory effect of p27kip1 mediated by adenovirus on model of esophageal carcinoma in nude mice

Zhang WG, Wu QM, Tong Q, Yu JP 512

Effects of adenovirus-mediated human cox-2 antisense RNA on synthesis of DNA and proteins in esophageal carcinoma cell line

Li SB, Wu QM, Wang Q, Wang XH, Xie GJ 517

GASTRIC CANCER

Loss of heterozygosity of SMAD4/DPC4 in gastric carcinoma

Zhu YQ, Yin HR, Zhu ZG, Liu BY, Zhang Y, Chen XH, Yu YY, Lin YZ 522

Proliferation/apoptosis and expression of P53 and Bcl-2 in gastric carcinoma

Pan CJ, Liu KY 526

Changes of gastrointestinal hormones in chronic atrophic gastritis and their clinical significance

Guo Y, Guo X, Yao XX 531

LARGE INTESTINAL CANCER

Killing effect of CD/5-FC system on human colon cancer cell lines SW 480 and LoVo

Li CJ, Ma QJ, Lai DN, Lu JG, Wang XJ, Wang Q, Pan BR, Wu YZ, Li JM 535

Expression of survivin protein in colorectal adenocarcinoma

Xiao J, Deng CS, Zhu YQ 540

H.pylori

Influence of expression of matrix metalloproteinase induced by *H. pylori* infection in gastric cancer cell line

Li XH, Zhang GY, Luo FJ, Xu MH, Li Q 544

Construction of clone expressing adhesin Hsp60 of *Helicobacter pylori*

Bai Y, Huang W, Lin HJ, Wang JD, Chen Y, Zhang ZS, Zhou DY, Zhang YL 547

Expression of glucose-regulation protein 94 in gastric mucosa infected

with *Helicobacter pylori*

Wang MC, Fang WG, Gu JG, Li Y 551

Relationship between expression of Bcl-2 and p53 protein and CagA⁺ *Helicobacter pylori* in gastric cancer

Du YJ, Zhao J, Zhao RB, Li BJ 554

Histologic changes after *H.pylori* eradication with Killing Hp decoction for chronic gastritis

Wang N, Yao XX, Zhang L, Bai WY, Feng LY 558

Changes of nitricoxide and endothelin in *Helicobacter pylori* associated chronic atrophic gastritis before and after eradication: an experimental and clinical study

Guo Y, Guo X, Yao XX 562

BASIC RESEARCH

Effects of allitridi on lymphocyte apoptosis and its regulatory gene expression in rat ulcerative colitis

Xu XM, Yu JP, He XF, Li JH, Zheng M, Yu LL 565

Changes of mu and kappa opioid receptors in cathartic colon of rats

Liu BH, Mo P, Zhang SB 569

Effect of Xiangsha Pingweisan on gastric emptying motility in mice

Wang XQ, Wang XJ, Li Y 571

Effect of Zhuxiang powder on gastric and intestinal motility in mice

Li Y, Wang XQ, Zhang WW, Wang JY 575

Effects of EGF on expression of phosphorylated p44/42 MAPK in rat small intestine after ischemia-reperfusion injury

Li P, Xin F, Fu XB, Yang YH, Guo BC 578

FOCUSED FORUM

The significance of pancreaticojejunostomy method on prevention of pancreatic leakage

Peng SY, Liu YB 583

Diagnosis and treatment of principal complications of pancreaticojejunostomy

Deng GL, Li HJ, Liu YB, Mou YP, Peng SY 587

Mechanisms of pancreatic leakage after pancreaticoduodenectomy

Wang JW, Xu bin, Cai XJ, Li HJ, Liu YB, Peng SY 589

The development of pancreaticojejunostomy methods

Bai MD, Peng CH, Liu YB, Peng SY, Li HJ 591

The clinic application of Peng's binding pancreaticojejunostomy

Cheng XP, Wu YL, Liu YB, Peng SY, Li HJ 593

Type Peng's binding pancreaticojejunostomy

Shi LB, Fang HQ, Liu YB, Li HJ, Wang JW, Xu B 595

Mechanisms of binding pancreaticojejunostomy to prevent pancreatic leakage

Liu YB, Peng SY 596

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi \$

World Chinese Journal of Digestology

Monthly \$ \$

Founded on 15th January, 1993

Renamed on 25th January, 1998

Publication date 15th May, 2003

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

ISSN 1009-3079 **CN** 14-1260/R

Edited by Editorial Board of World Chinese Journal of Digestology
P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

77, Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Overseas Distributor China International Book Trading Corporation
P.O.Box 399, Beijing 100044, China **Code No.**M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

P.O.Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381892

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

Copyright © 2003 by The WJG Press

Indexed/

Abstracted by

Chemical Abstracts

EMBASE/

Excerpta Medica

Abstract Journal

刮吸解剖法在肝门胆管癌手术切除中的应用

彭淑牖,刘颖斌

彭淑牖,刘颖斌,浙江大学医学院附属第二医院外科 浙江省杭州市 310009
彭淑牖,男,1932-11-17生,广东省梅县人,汉族,1955年毕业于浙江医科大学,
教授.主要从事肝、胆、胰外科的临床和基础研究.
项目负责人:彭淑牖,310009,浙江省杭州市解放路88号,浙江大学医学院附属
第二医院外科. sypeng@mail.hz.zj.cn
电话:0571-87783766 传真:0571-87022776
收稿日期:2002-07-23 接受日期:2002-12-18

彭淑牖,刘颖斌. 刮吸解剖法在肝门胆管癌手术切除中的应用. 世界华人消化
杂志 2003;11(5):497-498
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/497.htm>

0 引言

肝门部胆管癌又称上段胆管癌或高位胆管癌,指原发于左右肝管及其汇合部和肝总管的癌肿.占肝外胆管的50-75%.1965年Klatskin报告13例源于肝门肝管分叉部的胆管腺癌的临床病理特征,故肝管分叉部癌常称为Klatskin瘤.现已达成共识凡侵犯肝门肝管分叉部的癌肿,不论其源于肝外胆管或肝内胆管,都归为肝门部胆管癌.

肝门胆管癌的发病率有逐年上升的趋势,近年来已逐渐受到外科界的重视,由于肿瘤位于第一肝门,与门静脉和肝动脉紧密相邻,并且部分掩盖于肝实质中,手术显露比较困难,以致手术切除存在相当的难度和危险,因此国内文献多仅讨论高位胆管癌的姑息性治疗和U管、架桥等.然而积极的手术切除与消极的姑息疗法,二者的治疗效果相差甚远.Pichlmayr et al 报告108例高位胆管癌,为治疗或晚期探查者10例,行各种引流者30例,切除者52例(25例行肝门胆管切除,27例行肝门胆管和部分肝切除),肝移植16例,平均生存时间:仅探查者为1 mo,引流者为5 mo,所有切除者15 mo(其中8例治愈性切除为23 mo).

肝门部胆管癌除了血行转移和淋巴转移外,尚有神经侵犯和跳跃式转移、局部组织侵犯和胆管黏膜下浸润,手术后极易局部复发,因此治愈性切除应达到肿瘤的纵向、横向和前后三个方向5 mm以外的正常组织.尾状叶肝管可汇入左肝管、右肝管或汇合部,因此容易受到肝门部胆管癌的侵犯.根据以上特点,对肝门部胆管癌应争取施行扩大根治术.

1 肝门部解剖特点

熟悉正常肝门解剖及其变异,有助于防止意外损伤.肝门部的解剖结构有如下特点:在肝门左侧,左肝管位于前上方,左肝动脉位于前下方低位,门静脉左干在后方,在肝门右侧,右肝管在前上方,右肝动脉居中,

门静脉右干在后方.此外还有些异常状态.右前、右后肝管合成肝管约占半数,少数右前肝管开口于左肝管或肝总管,还有的左内叶胆管开口于右肝管(即为副肝管).肝总管前方有时有右肝动脉或胆囊动脉经过.当左内叶动脉起自肝门外时,又称为肝中动脉.肝中动脉可起自肝左、右动脉等.门静脉尾叶支分成左右两组,左组起自门静脉左干横部的远侧,很少从横部发出,因此横部被认为是手术中进行游离的安全区,但有人指出,由门静脉左干的起始部位发出右前支和尾叶右组,这些情况在行左内叶肝切除术时应当警惕.

2 传统手术方法在解剖肝门时的困难

肝门部胆管癌早期诊断困难,解剖位置特殊,是手术切除率低的主要原因.充分显露左右肝管及其分支,是切除型和型的先决条件,有些甚至须切除第肝段;传统的切肝法如指折法和钳折法,不能精确地将埋藏于肝内的2级肝管解剖出来,超声吸引器(CUSA)的应用则有利于肝内胆管的显露,其原理是利用超声波把肝组织震碎,同时用水冲洗吸除,从而显露大小管道.管径1 mm以下的可以电灼止血,>1 mm者则需钳夹结扎,我们使用的PMOD的原理有类似CUSA之处,能清楚显露肝内大小管道.不同之处是粉碎肝实质的方式,CUSA是利用超声波性能,而PMOD则是用机械性刮削.显然PMOD优于CUSA,因为CUSA解剖速度很慢又无止血功能,而且有飞沫传播病毒的潜在危险,其价格昂贵也是一个问题.

3 刮吸解剖法和多功能手术解剖器(PMOD)的应用

刮吸手术解剖法是以多功能手术解剖器(PMOD)为主要手术器械来完成传统手术方法中的电切、电凝、钝性分离(推剥、刮碎、刮爬等)等操作,和同步吸引配合,形成一套完整的手术解剖操作系统.该手术操作系统是用PMOD在组织间隙、筋膜层面进行推剥或刮爬等钝性分离,连续同步吸除渗液或出血,随时准确电凝止血.这样,手术清晰,层次分明,能清楚显露管道结构,手术解剖精细而便捷.其结果是:埋藏在实质性脏器内的管道结构能够获得清晰地解剖;采用刮吸手术解剖法以来,我们共施行了103例,切除率达82.5%(85/103)

充分显露左右肝管及其分支,是切除型和型的先决条件,对Bismuth型可不切肝,而第型和第型部分病例须切除第肝段才能充分显露和切除肿瘤.切肝从镰状韧带右缘入手,电刀切开肝包膜然后

用PMOD逐渐刮碎切线上的肝组织.脱落的肝组织碎屑随时被PMOD上的吸管吸除.许多大小管道逐渐一一出现,对直径2 mm以下的肝静脉支和1 mm以下的门脉三联可以电凝切断,较粗的管道则应将其行程解剖出5 mm以上,以便妥善钳夹、切、结扎.进出第肝段的门脉三联(包括胆管、肝动脉和门静脉)可以清楚显露并妥善处理.解剖分离深达肝门之后暂停,而进行第 切口,即从胆囊窝右缘进入,刮、吸、电凝的方法如上述.这个切面上粗大管道较少,所显露的脉管差不多都可以电凝切断,深达肝门后暂停.进而在肝膈面的隆突部横形切开肝包膜,将前述两纵形切口连接起来,在这个切面上可用PMOD解剖出肝中静脉主干及其若干左右侧分支,主干需钳夹切断结扎.分支则可电凝切断.最后在肝门部肝管前面分入.并移除第 b肝段.用PMOD在肝管前面刮下并吸除残余的薄层肝组织后,即能清楚显露1-2级肝管.充分止血后,用白纱布印压肝切面检查有无胆汁渗漏.

提起已在低位切断的胆总管,继续分离其后面,使其与门静脉完全分开,使用PMOD十分有利于此处的解剖分离.根据肿瘤大小、部位及其浸润的范围,将肿瘤完全切除,如肿瘤已侵犯左肝管全程,应将左肝切除.如果尾叶肝管已被侵入,须行尾叶的切除.

肝正中裂的劈开往往能够充分显露高位胆管,使得肿瘤的切除和胆肠吻合更加方便,肝正中裂是从沿肝中静脉主干行径而存在的虚拟分界面.左肝右肝在此互相融合.实际上并无潜在间隙,更无“裂隙”可见.因此,最新的国际命名称之为肝正中界面,其上端起于肝上缘的肝右、肝中静脉陷窝,其下端位于胆囊窝中点.肝中裂的劈开一般从下端开始,切线不要骑跨在肝中静脉上,可略微偏左或偏右,断肝时,电灼肝切线后,即可用PMOD在切线上刮吸分离,在整个界面之中仅有2-3根肝中静脉分枝需要结扎,其余细小脉管都可电灼离断,在刮吸过程中,肝内大小管道都能清晰显露,并予以重点电凝,在不结扎的脉管断端处补充电凝,不会造成术后出血.肝中裂充分分离之后,左右肝就完全分开.在其下端可见左右肝蒂汇合部;在其上端可见肝右静脉和肝中左静脉共干,将

他们分别用软带吊起之后,便能够安全地进行下一步的操作.

根据切断平面的不同,断肝面上可能出现多个肝管开口.相邻的开口可以拼连成一大口,如二者相距较远,不能拼拢则可在二者间,将肝实质刮除一部分成一沟通两管口的凹槽.我们称之为“运河”.如左右肝管开口相距较远难以拼缝,可分别与空肠吻合.如果开口较多,难以一一沟通,而开口又较小,不能一一吻合,则可在其四周刮除部分肝组织,成为一个含有多个肝管开口的凹陷区,我们称之为“肝盆”,空肠即可直接与此肝盆的周边作肝肠吻合.Roux-Y桥袢必须采用某种形式抗返流措施.

为了减少出血,切肝时应当控制肝门,我们原来习惯用选择性入肝血流阻断,自从使用刮吸法切肝之后,我们多采用间隙性肝门阻断,由于间隙期间还可以继续进行刮、吸,并不影响手术过程,每次阻断的时间,我们定为10 min,间歇2 min,确保病肝不致缺氧损害.

4 充分认识骨骼化淋巴清扫在提高肝门胆管癌术后生存率的意义

肝门胆管癌往往很早就可能有肝十二指肠韧带内的淋巴结转移,关于淋巴结清扫的问题,许多学者对清扫的范围存在争议.日本学者强调应行区域性淋巴结清扫,清扫范围应包括上达肝门,下至肠系膜上动脉,右侧起自胰十二指肠外侧,肝后下腔静脉,把腹主动脉旁软组织和血管鞘剥除.欧洲学者认为此类手术创伤大,肥胖患者难以清扫彻底,这是因为传统方法一般多使用血管钳分离、钳夹、结扎等操作,在进行淋巴结清扫时往往显得不够利索,尤其是用血管钳靠近淋巴结穿通组织钳夹切断的过程中,钳夹的组织中可能还存在浸润的癌细胞;使用PMOD进行淋巴结清扫,则在拟定清扫的切线上电凝,随即就能用PMOD将脂肪组织向病灶方向推开,遇到小血管和淋巴管随手电凝,整个过程基本上无须使用血管钳,清扫的切线都经过电凝,消灭可能存在的残留癌细胞.而且脱落游离于腹腔内的癌细胞也随时被吸除.

我国小肠疾病的研究现状

智发朝

智发朝,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

智发朝,男,1962年生,河北省人.第一军医大学南方医院全军消化内科研究所(国家重点学科)副主任,副教授、副主任医师,硕士研究生导师.先后承担全军及广东省基金7项,获全军科技进步二、三等奖四项.近年来在《中华医学杂志》、《中华消化杂志》、《世界华人消化杂志》、《中华消化内镜杂志》等公开发表论文68篇.是中华消化学会胃肠激素学组委员、中国医疗保健国际交流促进会胃病专业委员会常务理事,中华医学会广东省消化内镜专业委员会常务委员,广东省中西医结合学会理事、副秘书长,《消化病诊断和治疗》编委、《中华腹部疾病杂志》常务编委、《中国中西医结合消化杂志》编委、《现代消化病及介入治疗》编委及责任编辑.

项目负责人:智发朝,510515,广东省广州市,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. zfc@fimmu.com

收稿日期:2002-07-23 接受日期:2002-12-18

摘要

近年来,随着检查手段的拓展,对消化系统疾病的诊断有了明显提高,但对于怀疑小肠病变者,尚缺乏切实有效的检查手段.对于小肠血管性病变及小肠憩室,血管造影及ECT阳性率高,而对肠腔内隆起型病变,双对比造影效果较好,空肠上段及回肠末端病变,首选内镜检查.小肠气钡双重造影检查可清楚显示黏膜形态,成为小肠IBD的首要诊断方法,C-反应蛋白及血清 α_1 -糖蛋白能反映疾病的活动,是目前最常用或最敏感的活动性指标.吸收不良综合征病因复杂,国内以感染性慢性腹泻及乳糖吸收不良引起者较为常见,传统实验室检查尚无特异性,有研究认为内窥镜下活检是诊断吸收不良的金标准.治疗上对于小肠出血及肿瘤,目前仍以手术为主,根据病变不同,也可镜下治疗. IBD尚缺乏根治疗法,根据患者具体情况可选取传统药物、手术.值得注意的是生物疗法的开发和应用已取得初步成功,有望成为IBD未来药物治疗的重要武器.

智发朝.我国小肠疾病的研究现状.世界华人消化杂志 2003;11(5):499-501
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/499.htm>

0 引言

近年来,随着内镜和各种影像技术的发展,如选择性动脉造影、同位素扫描、CT、MRI、PET等,使消化系统疾病的诊疗水平有了飞速提高,但由于小肠在解剖和生理上的特点,小肠较长,弯曲多,距消化道两端较远,胃镜和结肠镜检查不能达到,且由于蠕动多,位置不固定等原因,一般检查手段难以发现病灶,使小肠疾病的研究较为缓慢.这里简要介绍我国的研究现状.

1 小肠出血性疾病

所有消化道出血患者中,约0.4-5%^[1]胃肠镜检查不能发现出血部位,这些出血通常在小肠^[2].目前国内外已有大量这方面的研究^[3,4],血管畸形、肿瘤、憩室位于前

三位,但具体比例报道结果差别较大^[5-13].小肠出血的临床特点为反复黑便和贫血,出血常呈间歇性、自限性,出血量多少不一.我国小肠出血多由肿瘤引起^[5,14-17],亦有报道认为感染或血管性病变为首位^[6,7].常规检查如胃镜及结肠镜、全消化道钡餐、气钡双重造影不能确诊的小肠出血,单纯剖腹探查确诊率仅30%^[1].对活动性出血,且出血量>0.5 ml/s的患者,血管造影检出率可达76-80%,一次未检出者可复检,反复多次检查可大大提高阳性率^[1,13,18-20].对血管丰富的平滑肌瘤和平滑肌肉瘤引起的出血,血管造影检查同样具有很高的价值^[21].对于出血患者,ECT是一种敏感、安全、无创伤的检查方法,常在血管造影前进行,目前临床上主要选用放射性核素^{99m}Tc(包括^{99m}Tc-胶体硫和^{99m}Tc-RBC)扫描,扫描可发现出血肠段有同位素聚集,^{99m}Tc-胶体硫扫描能发现出血量在0.05-0.1 ml/m的出血部位,检出率明显高于血管造影,^{99m}Tc-RBC扫描检出率更高,特别对微量慢性出血有其他方法不可替代的作用,但不能用于定性诊断,也难以精确定位,核素浓集区可能是积血部位而非真正的出血部位^[22,23].小肠镜可直接观察Treitz韧带下60-120 cm范围内的黏膜病变^[24],对于不明原因消化道出血,我们的小肠镜检查确诊率可高达48.8%,并可对病变进行活检、染色、或放置钛夹标记病变部位,部份病变还可行镜下治疗^[25].术中内镜可观察全长小肠黏膜,使小肠血管畸形检出率由77-85%提高到93-100%^[26-30].目前各家医院对上述检查各有侧重,检查效果报道也不完全一致.一般来说,对于隆起型病变,双对比造影效果较好^[31-34],而对于血管性病变、炎症性肠病及小肠憩室,血管造影及ECT阳性率高,对于空肠上段及回肠末端病变,首选内镜检查.对急性大出血,出血不能控制,不管是否发现病灶,均可进行剖腹探查,术中内镜可提高诊断率^[35].治疗上对于小肠出血,目前仍以手术为主,根据病变不同,也可应用内镜进行电凝、激光、微波、注射硬化剂及雌激素治疗^[36].胶囊内镜已在我国临床开始应用,对小肠出血性疾病的病因诊断将发挥积极作用.

2 小肠肿瘤

虽然小肠长度占整个消化道长度的75%,黏膜面积占90%,但原发性小肠肿瘤却较少见^[37,38],其发生率仅占消化道肿瘤的1-2%^[39],其中以回肠最多见,空肠次之,十二指肠最少^[40].我国小肠肿瘤以恶性为多,约占3/4,良性肿瘤(以平滑肌瘤多见)约占1/4.无论良

恶性肿瘤,腹痛、腹部肿块、消化道出血、肠梗阻、肠穿孔、食欲不振、体重下降和贫血为本病的主要症状及体征。其中腹痛、腹部肿块及消化道出血最为多见。传统认为十二指肠球部溃疡不会癌变,但近年来陆续有十二指肠溃疡型癌的报道^[2,4,5,41-43],因此对十二指肠巨大溃疡或经久不愈者应高度重视,常规做组织活检^[41]。对小肠肿瘤的检查手段,十二指肠及回肠末端肿瘤主要靠内镜,其次为钡餐检查;对于空肠肿瘤,主要依靠血管造影、ECT、小肠镜。CT及MRI主要用于显示肿瘤与腔外及周围结构的关系和有无转移,对肿瘤分期和治疗方案的选择有重要意义^[44]。腹腔镜可直接观察腹部肿块的位置,尤其对腔外型病变,可进行病理活检,对确诊小肠肿瘤有一定价值,但由于系创伤性检查,有一定并发症,故其应用受到限制。超声内镜很难达到小肠,因此对小肠肿瘤诊断意义不大。PET及消化道复合声学造影对小肠肿瘤的意义,国内已经开始研究,但尚需积累经验,进一步观察效果^[45,46]。本病起病隐匿,早期症状不明显,中晚期症状也无特异性,辅助检查尚无理想的手段,故临床诊断非常困难。文献报道其误诊率高达65-100%。重视本病的一般症状,提高警惕性,进行多种辅助检查提高检查阳性率,必要时剖腹探查。手术是最有用、最可靠的诊断方法。原则上应全长尽早进行,病灶切除仍是目前小肠肿瘤的主要治疗手段。术中难以确定病变性质者应作术中冰冻切片检查,冰冻切片也难以定性时,以恶性对待,作根治性切除。良性肿瘤也可在内镜下行圈套烧灼切除^[47,48]。恶性肿瘤切除率虽不低,但因漏诊率高,诊断明确时往往已属晚期,治疗效果差,预后欠佳。小肠肿瘤对放化疗不敏感,一般不作为首选。

3 炎症性肠病(IBD)

IBD包括溃疡性结肠炎(UC)及克罗恩病(CD),其病因非常复杂^[49]。近年来在我国发病率呈上升趋势,因其临床症状、内镜、X线及组织学检查都缺乏特征性表现,目前尚不能根据单一症状或一项检查作出明确诊断,必须对发病经过及全部资料进行综合分析,并排除症状相似的一些疾病后才能作出正确诊断^[50,51]。对怀疑该病的患者,华西医科大学的经验认为,虽可作B超、CT和MRI,但仍以内镜及X线为主^[52]。对小肠上段病变,可通过小肠镜确诊,但小肠镜操作难度大,耗时长,痛苦多,临床运用受到一定限制^[53,54]。回肠末端病变,结肠镜检查具有肯定价值。传统的口服造影阳性率低,仅为37.5%,故只有梗阻时,才首先考虑^[55]。小肠气钡灌肠可清楚显示黏膜形态,能提高诊断准确性,已成为小肠IBD的首要诊断方法^[56]。反应疾病活动及严重程度指标以血沉、C-反应蛋白最常用,而血清 α_1 -糖蛋白被认为是当前最敏感的活动性指标^[57]。

迄今IBD尚缺乏根治疗法,具体治疗方案取决于病变的部位、范围及炎症程度。一般认为重症UC切除全部结肠或结肠黏膜后可治愈,而CD患者即使切除

所有病变,也不能防止复发,手术只限于穿孔、梗阻性肠段狭窄、消化道大出血以及药物治疗无效者。但有学者认为对于局限于阑尾的克罗恩病,行手术治疗效果佳,很少复发^[58-60]。药物治疗适宜于急性期与缓解期,常用药物有水杨酸偶氮磺胺吡啶和5-氨基水杨酸、肾上腺皮质激素、抗生素、中药及免疫抑制剂。有关免疫抑制剂治疗炎症性肠病是1990年后才为人们所了解,目前免疫抑制剂治疗IBD的临床及实验研究进展较大,多数学者的意见渐趋一致,认为免疫抑制剂对部分患者是有效而安全的^[61]。但临床效果各家报道并不一致。值得注意的是新兴的生物疗法如细胞因子、抗氧化剂、黏附分子抗体、TNF- α 、抗中性粒细胞胞质抗体、树突状细胞等的开发和应用已取得了初步成功,有望成为IBD未来药物治疗的重要武器^[48,62]。

4 吸收不良综合征

是各种原因导致小肠消化、吸收功能减损,以致对营养物质吸收不良而产生的综合征。其病因复杂,国内以感染性慢性腹泻及乳糖吸收不良引起者较为常见^[63]。临床表现主要为腹泻、消瘦,发热、淋巴结肿大、关节痛、乏力及继发营养不良和维生素缺乏等。临床检查包括上消化道X线检查、脂肪平衡试验、¹³¹碘-甘油三酯和¹³¹碘-油酸吸收试验、D-木糖吸收试验、血清胡萝卜素浓度测定、维生素B₁₂吸收试验(Schilling试验)、呼吸试验等^[64]。近年来有研究认为内窥镜检查是诊断吸收不良的金标准^[65],小肠黏膜活检、电镜、酶学检查,对乳糜泻、小肠淋巴瘤、嗜酸性细胞性肠炎、淋巴管扩张、淀粉样变及Whipple病等很有价值^[66]。近年来使用PCR技术能从Whipple患者不同组织标本中扩增Whipple杆菌特有的DNA。对可疑患者,PCR有很高的敏感性与特异性^[67]。吸收不良的治疗原则主要为病因治疗,病因不明者应进行对症治疗,补充各种营养物质及电解质、叶酸、铁、维生素D、钙,给予高热卡、高蛋白和高维生素饮食等是患者恢复所必需的。怀疑感染者可给予抗生素治疗。

5 小肠微生物生态学

目前临床上对小肠微生态的评估仍依靠粪便及小肠抽吸液的培养,研究表明,侵袭性大肠杆菌是慢性腹泻的主要致病菌,与慢性腹泻呈明显相关性,其作用机制可能为细菌黏附于肠细胞表面,并破坏肠道屏障^[68,69]。目前国内对小肠黏膜菌培养及其作用机制的研究尚处于起步阶段,我科潘令嘉教授等通过小肠镜空回肠取材,测定正常人腔菌群和膜菌群,结果显示空肠梭菌、回肠乳杆菌、双歧杆菌的腔菌群与膜菌群有显著差异,并建立了我国正常人空、回肠腔菌群和膜菌群的研究分析方法^[70],但小肠菌群与疾病的相关性及致病机制尚不十分明确。

6 小肠与胃肠激素

近年来国内关于胃肠激素的研究较多,但基本上局限于血浆激素的测定,对于激素及其受体定位研究较少,特别是主要分布于小肠的激素,因取材困难,目前基本处于空白阶段,尚未见相关报道。

7 评述与展望

小肠疾病主要包括出血、肿瘤、炎症性肠病、吸收不良综合征等。长期以来,在我国的临床实践工作中,由于小肠特殊的解剖结构,对小肠疾病研究甚少,重视不够,加上检查操作困难,检查结果敏感性特异性相对较低,该类疾病的漏诊、误诊率相当高,严重影响人民的生活质量。随着内镜和各种影像技术的发展,如选择性动脉造影、同位素扫描、CT、MRI、PET等,使小肠疾病的诊疗水平近年来有了一定提高,小肠镜普及及胶囊内镜和CT或MRI仿真内镜的问世,可望对小肠疾病的诊治带来一次质的飞跃。

8 参考文献

- 周孝增. 小肠出血的诊断技术. 浙江医学 2000;22:84-85
- 陈亮. 42例小肠出血诊断分析. 大连医科大学学报 2001;23:45-46
- 王南下,尹朝礼,王天才,田德安,但自力,梁扩寰. 小肠良性肿瘤临床分析:附70例报告. 中华消化杂志 1997;17:73
- 王崇文. 小肠出血. 中华消化杂志 1997;17:63
- 朱莹,王崇文,徐萍. 手术证实的79例小肠出血诊断分析. 中华消化杂志 1997;17:70-72
- 冉志华,沈谋计,萧树东. 50例小肠出血病因及诊断分析. 中华消化杂志 1996;16:66
- 钱家鸣. 小肠出血的病因与诊断. 临床误诊误治 2001;14:241-243
- 李健,朱洪连,代云龙,杜伟. 肠系膜动脉造影对小肠出血的诊断价值. 医学信息 1996;12:48-49
- 沈泊. 小肠出血诊断的研究. 华人消化杂志 1998;6:767
- 李荣,王淑玲,樊翌明. 隐匿性小肠出血47例分析. 中国实用外科杂志 1996;16:346
- 朱玮. 小肠良性疾病致消化道出血12例诊治分析. 中国实用外科杂志 1994;14:613-614
- 姜法伟,姚林果,王建平. 原发性十二指肠腺癌影像学诊断(附11例分析). 中国医学影像学杂志 1995;11:311-312
- 吴兵,沈季兑,高志昕. 小肠出血42例病因分析. 苏州医学院学报 1998;18:830
- 王颖,何风云,刘述信,张喜梅. 手术证实的39例小肠出血病因和诊断分析. 中国实用内科杂志 1998;18:422
- 鲁臣溪,吴丽萍. 小肠出血33例病因分析. 中国冶金工业医学杂志 1998;15:111
- 范文福,胡宗. 小肠出血25例临床分析. 现代诊断与治疗 1998;9:107
- 吕洁梅. 小肠出血的临床观察与护理. 护士进修杂志 1999;14:55-56
- 张伟. 选择性动脉造影对小肠出血的诊断13例报告. 四川医学 1998;19:136
- 王梅,郑叙锋,刘无非. 选择性肠系膜动脉造影诊断小肠血管畸形出血2例. 中华老年医学杂志 1998;17:5289
- 金慧君,郑恬. 小肠肿瘤并发出血的诊疗体会. 中国综合临床 1998;14:416
- 李建新,董宗俊,张建,薛祥禄. 选择性肠系膜上动脉造影在小肠肿瘤诊断中的作用. 北京医学 1999;21:271-73
- 陈曼,张燕燕.⁹⁹Tc-红细胞核素显像对小肠出血的诊断价值. 中华消化杂志 1997;17:77-78
- 陈黎波,杨梅芳,龙明清,田健.^{99m}Tc显像定位诊断小肠慢性微量出血. 中国医学影像学杂志 1998;6:54
- 姜泊,杨希山. 小肠镜应用进展. 国外医学消化分册 1994;14:4-6
- 智发朝,陈村龙,杨希山,潘德寿,周丹,万田谟,朱建新,周殿元. 小肠镜检查对小肠疾病诊断价值的初步研究. 中华医学杂志 2000;80:296
- 沈安东,马荣康,吕国强,卞晋荣. 小肠出血的临床特点及诊断方法的选择(附15例报告). 急诊医学 1999;8:333-334
- 韩光曙. 小肠镜临床应用价值. 内镜 1995;12:7
- 吴云林,陈全联. 小肠肿瘤的超长型电子小肠镜诊断. 肿瘤 1996;

- 16:18-20
- 杨天赐,孙木泉,施至乾,陈宝英,刘其樱. 术中内镜诊断小肠出血性疾病. 中华消化内镜杂志 1998;15:203
- 李易,韩盛强,张初明. 术中内镜在小肠出血诊断中的作用. 中国内镜杂志 1998;4:70
- 夏志伟. 小肠出血诊断方法评价. 北京医学 1999;21:167-168
- 高鹏,王正娥,司继媛. 32例小肠出血性疾病的诊断分析. 中国医师杂志 1999;1:49-50
- 宋汉明. 内镜引导下的小肠插管钡灌造影的诊断方法研究. 中国内镜杂志 2000;6:17-18
- 凌贞. 十二指肠镜引导下小肠双重造影的临床诊断价值. 中华消化杂志 1998;18:28
- 徐国良,张振书,冯福才,周殿元. 术中内镜对不明原因下消化道出血的应用价值. 胃肠病学和肝病学杂志 1999;8:152-153
- 鲁重美. 小肠血管性病变合并出血的诊断与治疗. 中华消化杂志 1997;17:66-69
- 郭光华,孙淑明,吴名耀,庄清武,荆绪斌,方冰儿. 原发性小肠肿瘤60例. 华人消化杂志 1998;6:734
- 安子元,徐大毅. 原发性小肠肿瘤699例临床分析. 山西医药杂志 1984;13:20-22
- Mitted VK,Becke CD. Primary malignant tumors of the small bowel. *Am J Surg* 1980;140:396-397
- 李继光,滕仁智,沈魁,王宁. 原发性小肠肿瘤8组(277例)摘要报告. 实用外科杂志 1983;5:131-134
- 刘希双,宫尚君,张翠萍,赵清喜. 十二指肠恶性肿瘤的纤维内镜特征. 中华消化杂志 2000;14:155
- 腾天申,陈维维,蒋西华. 原发性十二指肠癌10例报告. 中华消化杂志 1995;15:181
- 张军,贾朝京,葛松华,王金秀. 内镜诊断原发性十二指肠癌12例分析. 实用肿瘤杂志 1996;11:34
- 周连高,沈建中,陈克敏. 小肠影像学检查方法的进展. 实用放射学杂志 2001;17:624-627
- 周兴祥,吕斌,殷军,吴鹏,盛明洪,陈景兰,胡方兰. 消化道复合声学造影诊断小肠疾病的价值. 世界华人消化杂志 1999;7:180-181
- 徐伟宝,陈亚新,陈爱芬,俞远成. 肠系声学造影诊断肠道内外肿块的价值研究. 中华超声影像学杂志 1995;4:157-160
- 张京雨,蹇令国. 原发性小肠肿瘤42例分析. 右江民族医学院学报 2001;23:556
- 张伟,李兆申. 原发性小肠肿瘤24例分析. 上海医药 1998;21:179-180
- 邹江,姚宏昌. 炎症性肠病病因及发病机制. 华人消化杂志 1998;6(特刊):103-105
- 徐昌青. 炎症性肠病. 山东医药 2001;41:51
- 郑家驹. 炎症性肠病诊治进展. 临床消化病杂志 2001;13:136-141
- 欧阳钦. 炎症性肠病的内镜诊断价值及X线诊断. 医学新知杂志 2001;11:63-64
- 陆玮. 小肠出血诊断的进展. 中华消化杂志 1995;15:66
- 夏冰. 炎症性肠病内镜活检诊断问题. 中华消化内镜杂志 1996;13:226-228
- 马桂兰. 小肠克罗恩病的诊断. 中国中西医结合杂志 2000;6:106-107
- 武广利,王津翠. 小肠克罗恩病造影方法分析. 中华消化杂志 1995;15:118-119
- 欧阳钦,应则贵. 提高炎症性肠病的诊治水平. 中华内科杂志 2001;40:3-5
- 陈子清,应则贵. 阑尾切除对回肠克罗恩病的影响. 浙江临床医学 2001;3:172-173
- 吴孟超主编. 腹部外科学. 上海:上海科学技术文献出版社, 1993:134-135
- 石美鑫,熊汝成,李鸿儒,吴肇光主编. 实用外科学. 北京:人民卫生出版社, 1992:646-649
- 李若平,王苑本. 免疫抑制剂治疗炎症性肠病. 华人消化杂志 1998;6:718-719
- 杨熊飞,闫于悌,徐文怀. 炎症性肠病治疗进展. 大肠肛门病杂志 2001;7:61-63
- 姚福宝. 小儿吸收不良综合征. 中国实用儿科杂志 2000;15:141-142
- 李延青. 吸收不良综合征. 山东医药 2001;41:50-51
- 张燕,刘小芳,欧阳钦. 麦胶性肠病实验室诊断的进展. 临床内科杂志 2001;18:18-19
- 谷成明,何绮娜,邓平非,贾太和,王利玲,宋巧云. 吸收不良综合征十二指肠降部黏膜病理及超微结构观察. 中华消化杂志 1996;16:145-147
- 王国品. Whipple病及其进展. 临床荟萃 2001;16:190-191
- 贝濂. 肠道菌群和菌群失调. 中华消化杂志 1997;6:348
- 曾志铭. 临床微生物学及其理论基础. 中国微生物学杂志 1999;11:321-323
- 潘令嘉,苏全冠,周殿元,张秀荣. 正常国人小肠腔菌群及膜菌群的研究. 中华内科杂志 1996;35:686-689

2003 年度国家自然科学基金医学和生物学项目指南概述

崔慧斐,江学良,马连生

崔慧斐,山东大学药学院生化与生物技术药物研究所 山东省济南市 250012
江学良,济南军区总医院消化科 山东省济南市 250031
马连生,世界胃肠病学杂志社 北京市 100023
崔慧斐,女,1968-01-09生,上海市人,汉族,山东大学生命科学院博士,药学院副教授.主要从事生物学和药学研究.
项目负责人:马连生,100023,北京市 2345 信箱,世界胃肠病学杂志社.
wjg@wjgnet.com
电话:010-85381892
收稿日期:2003-01-21 接受日期:2003-03-08

摘要

国家自然科学基金是国家资助基础研究的主要渠道之一.本文对 2003 年度《国家自然科学基金项目指南》医学及生物学项目中重点项目和面上项目作一概述,以期引导广大科技工作者了解自然科学基金委不断发展变化的资助战略思想,正确地选择项目研究领域和资助类别,以申请该基金的资助,开展创新性的工作.

崔慧斐,江学良,马连生. 2003 年度国家自然科学基金医学和生物学项目指南概述. 世界华人消化杂志 2003;11(5):502-507
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/502.htm>

0 引言

国家自然科学基金是国家资助基础研究的主要渠道之一.每年出版的《国家自然科学基金项目指南》旨在引导广大科技工作者了解自然科学基金委不断发展变化的资助战略思想,正确地选择项目研究领域和资助类别,以申请该基金的资助,开展创新性的工作.现就 2003 年度《国家自然科学基金项目指南》医学及生物学项目中重点项目和面上项目指南作一概述.

1 重点项目^[1]

1.1 项目指南

1.1.1 医学 炎症的内源性细胞保护效应机制;肿瘤治疗的新方法研究;创新药物的作用机制.

1.1.2 宏观生物学 极端环境下生物(动物、植物、微生物)的适应机制;物种间的协同进化;受损生态系统的恢复机制.

1.1.3 微观生物学 细胞特定条件下的基因表达谱或蛋白质谱及其生物学功能;神经系统或免疫系统中细胞分化机制的研究.

1.2 申请要求 2003 年重点项目的立项与申请由“定向申请”改为宏观指导下的自由申请.具体申请要求如下:凡是承担基金项目或在其他研究中,取得了创新性重大进展,如有重要科学意义的新发现、新观点、新理论假说、新技术方法等,需要进一步高

度资助继续深入研究,可直接申请重点项目.除填写申请书之外,申请者还需提交 800 字左右的“关于已取得创新性重大进展的情况说明”.

1.3 经费安排 2003 年生命科学部计划安排重点项目经费 9 000 万,计划资助约 73 项,资助强度一般不低于 80 万.其中医学 2 670 万元,约资助 22 项;宏观生物学资助经费安排 1 620 万元,约资助 13 项;微观生物学 2 140 万元,约资助 17 项;机动与学部交叉的重点项目 770 万元,约资助 6 项.2003 年重点项目资助经费不搞“平均”,申请时应突出重点,选择关键科学问题开展研究,研究问题不宜过多.经费预算要求合理,实事求是,否则将不予资助.凡是近几年资助过的重点项目内容,不再重复资助.

2 面上项目

2.1 临床医学基础学科^[2]

2.1.1 项目指南 恶性肿瘤诊疗新方法的基础研究;重大疾病家系的收集、相关基因的克隆和功能研究;创伤与修复的基础研究(包括组织工程学研究);人类生殖、生殖健康的基础研究;人体衰老机制的研究;常见口腔疾病预防、诊断和治疗的基础研究;导致视觉或听觉缺失的常见疾病预防、诊断和治疗的基础研究.本学科拟长期资助的领域:人体衰老及其机制研究.

2.1.2 项目特点和变化 近 3 a 来,临床医学基础学科受理的申请在 1 700-1 800 项左右.2002 年受理面上项目达到 2 256 项,资助 292 项,资助金额为 5 729 万元,是生命科学部中资助项数和金额最多的部分,较 2001 年有较大的增长.2003 年拟资助项目数与 2002 年相当.在全部的申请中,与医学问题密切相关的分子水平和基因功能的研究占了相当比例(约 80%),充分显示了分子生物学向医学各学科广泛渗透的趋势,这与生命科学的发展已全面进入功能基因组及蛋白质组学时代密切相关.但是,在申请的项目中,从宏观层面凝练出基本科学问题而提出独到的、开拓性的原始创新项目不多,所以加强创新意识是提高申请项目水平的关键.基础研究项目要关注国际热点,瞄准基本科学问题,从理论和方法上向更深的层次探索;应用基础研究项目,要突出我国的优势和本学科的特点,将创新性成果向临床实践过渡,以促进有中国特色的临床医学基础研究和应用基础研究.

2.2 中医学与中药学学科^[3]

2.2.1 项目指南 重点支持构建中医临床疗效评价体系的基础研究(近期将开展中医疾病与证候概念与分类的方

法学研究, 建立量表学和循证医学在中医疗效评价中的技术规范、临床效应评价模式及数据挖掘等基础研究; 中医药防治重大疾病和难治性疾病的应用基础研究; 针灸防治疾病的基础与临床疗效评价研究; 中医药防治骨伤疾病的临床基础研究; 中西医结合的基础理论研究; 有毒中药配伍减毒物质基础及毒-效、量-效相关性的研究; 中药和方剂药效物质基础、制剂学和生物效应可控性的基础研究; 中医学、中药学优势领域与生命科学前沿相结合的创新思路研究; 中医学、中药学研究中高新技术与方法学研究. 鼓励运用多学科手段进行跨学科大协作交叉研究, 但必须注意与中医药理论的结合.

中医学和中药学学科 2003 年倾斜经费为 100 万元, 拟资助 3-4 个项目, 其资助方向为中医药基础理论的创新性研究; 临床疗效明确的难治性疾病的基础研究; 中药、方剂的质量控制和制剂创新的方法学研究.

2.2.2 项目特点和变化 2002 年本学科申请总项目数达 1 091 项, 较 2001 年度增加了 28%, 其中资助 125 项, 资助金额为 2 428 万元, 2003 年拟资助项目数与 2002 年相当. 中西医结合基础与应用基础研究和中药药理学研究的申请数仍占居前两位, 达申请总数的 39%, 申请内容涉及到中医药的理、法、方、药多领域的基础研究及从整体到基因水平的实验方法, 但存在片面追求新技术的倾向; 中药药理学研究的申请注重中药及复方的药效作用机制、体内代谢过程、方法学研究, 有些研究已深入到基因组学和蛋白质组学的水平, 但部分项目存在分子生物学指标使用不当的问题; 中医药基础理论方面的创新性研究较少, 特别是研究思路和方法学创新不明显, 应加强这方面的研究; 中医临床基础研究方面, 中医针灸学和中医内科学的申请数较多, 但存在临床疗效不确切带来的可信度差, 结果难以评价的问题; 中药研究相关分支学科是多学科交叉申报的热点, 其中中药资源与质量研究仍为主要关注问题, 研究手段开始注重化学与现代生物学的结合, 转基因和酶学技术的使用, 有些项目存在着抓不住核心科学问题的情况.

2.3 药理学与药理学学科^[4]

2.3.1 项目指南 鼓励多学科合作与学科间交叉性研究, 结合生命科学的重要进展, 以创新性学术思想开展对肿瘤、神经精神和心脑血管疾病、老年性疾病、病毒性疾病、糖尿病等重大疾病的新的药物作用靶点、新型先导化合物、生物技术药物、药物作用机制、新的药物设计思路及新方法研究; 尤其鼓励对机体内生物大分子与生物活性物质和药物的相互作用、天然来源新型生物活性物质的发现及其结构与功能、化学途径与生物途径制备及优化先导化合物、药物安全性评价及所涉及的基础和应用基础科学问题等展开的研究; 加强新型给药系统如纳米粒等的生物药剂学研究 and 创新给药系统的构建研究; 加强具有我国特色的天然药物研究; 在新药创制中应注意 ADME(吸收、分布、代谢、排泄)

的研究; 适当资助有特色的 Me-too 药物研究项目. 为报批新药开展的常规研究和制药工艺研究不属于本基金的资助范围. 新医药、新农药基础研究基金的申请需具备以下基本条件: (1) 已得到属新结构或新药效的活性化合物, 并具权威机构的查新证明或申请专利证明; (2) 活性化合物应具有明确的体内外药效学和初步的毒理学研究结果. 该项基金主要支持对新药前期待解决的关键性基础研究问题如作用机制、结构优化和体内代谢过程等开展研究的申请项目.

2.3.2 项目特点和变化 本学科 2002 年申请项目数仍有增加, 各类申请项目总数为 530 项. 其中资助 79 项, 资助金额为 1 557 万元, 2003 年拟资助项目数与 2002 年相当. 药理学中, 抗肿瘤、心血管和神经精神系统药物药理学申请项目占较大比例, 约 65%. 抗肿瘤药物药理学申请项目近 2 a 虽然增加较多, 但有特色的优秀项目不多; 心脑血管系统药物药理学研究似乎还没有找到新的突破口; 神经精神系统药物药理学申请项目中与阿尔采末病、帕金森症等神经退行性疾病相关药物研究的项目占 50% 以上, 其次是有关镇痛药物及其成瘾机制的研究. 药物学中, 药剂学、天然药物化学、合成药物化学和药物设计学申请项目占绝大部分, 约 84%. 药剂学近几年发展较快, 2002 年申请项目已占药物学中的首位, 其中微粒类给药系统约占药剂学项目的 60%, 但与生命科学研究的交叉不够. 总体上看, 本学科项目跟踪国际前沿的研究占多数, 原创性研究较少.

2.4 预防医学学科^[5]

2.4.1 项目指南 项目的选题要来自预防医学工作实践并为解决实际问题服务. 现场人群研究与实验室研究要相结合; 注意寻找学科新的生长点, 加强源头创新, 开展具有我国特色并能在国际上占有一席之地的前瞻性研究工作; 注重学科交叉渗透研究; 根据我国卫生保健工作的实际需要, 重视开展以人群为基础的流行病学研究, 在研究中合理采用现代分子生物学与免疫学等先进技术; 要开展对重要传染病、寄生虫病、地方病、慢性病、职业病及生活方式相关疾病防治的预防医学基础和应用基础研究、环境、遗传与社会心理因素对重要疾病发生的综合作用及其机制研究、主要化学物质和环境因素对人群健康的影响及其群体易感性和三级预防的基础研究、膳食结构和食物成分以及食品卫生质量与人体健康关系的研究、性传播疾病流行病学及防治研究等.

预防医学学科拟长期资助的领域: 重要传染病、寄生虫病的发病机制及其防治.

2.4.2 项目特点和变化 从对近年来本学科受理和资助项目的分析来看, 基本覆盖了各分支学科领域的研究热点, 反映了我国在相应研究领域的研究现状和发展趋势. 不少研究开始注意到如何突出创新, 学术思想新颖、带有一定风险的探索性研究项目有所增加; 部分

项目体现了我国在相关领域的优势和特色;有些研究在跟踪国际学科发展前沿的基础上有所创新;新技术、新方法的广泛使用使研究有了高水平的保障;申请人和项目承担人年轻化进程加快;许多项目曾连续获得基金资助,形成了一些具有相应领域研究优势和特色的单位群体;国际合作交流项目也在增加. 2001年资助73项,资助金额为1 257万元,2002年资助118项,资助金额为2 316万元,2003年拟资助项目数与2002年相当,反映出随着医学模式的转变,预防医学在由疾病治疗为主向预防为主的转变过程中发挥着越来越重要的作用.

2.5 神经科学学科^[6]

2.5.1 项目指南 重视应用分子生物学的理论和方法,从更深层次上研究神经科学中的各种问题,同时加强对整合性研究的支持力度;重点支持能带动整个神经科学发展的神经系统活动基本过程和神经信息加工过程以及神经系统新功能基因的研究;重视神经科学中的一些重大前沿问题的研究,如神经系统的发育、老化及再生、损伤与修复等;也可结合从我国特有的动植物及矿物质中寻找神经活性物质来进行,以推动这方面工作的开展;对于神经系统疾病的研究,资助的重点将继续放在有创新性的基础研究方面,申请者应将神经科学研究中的新方法、新概念用于解决临床问题的研究;鼓励在各个层面上与数学、物理学、信息科学、认知科学等学科进行跨学科交叉,开展神经信息学的研究.

2.5.2 项目特点和变化 本学科在2002年受理的项目中,基础神经生物学与神经系统疾病方面的项目约各占一半的比例,体现了申请者研究项目对应用前景的关注. 相对来讲,在突触传递机制、受体、离子通道、神经信息编码加工等方面的研究整体水平较高,而神经系统的发育调控、功能基因组虽为国际上的研究热点,在我国的基础较弱,与国际水平相差较大;神经干细胞的研究是近2 a申报项目的热点,但研究思路雷同,多数为构建基因工程神经干细胞移植治疗神经系统的疾病或研究干细胞的定向分化问题. 由于神经干细胞研究潜在的应用前景,在开拓新思路 and 加强相关工作积累的基础上,会继续给予关注;在脑高级功能的研究方面,结合脑功能成像的方法探讨学习、记忆、情绪以及脑功能障碍的神经基础的项目增加明显,但学科交叉方面还需要进一步加强.

2.6 心理学学科^[7]

2.6.1 项目指南 学科将鼓励心理学和神经病学、精神病学、计算科学的合作,采用新的方法和手段,对正常和异常的心理过程的内部机制开展研究. 申请者的合作范围应进一步扩大,不要局限于神经影像学领域,与遗传学家合作开展行为遗传学的研究也是很有潜力的领域之一. 在汉语认知研究领域,除了继续支持语言认知脑机制的研究外,还鼓励认知语言学与计算语言学相结合的研究项目;在发展心理学方面,将鼓励设计

严谨的纵向研究和跨文化研究,对能提供共享资源的资料收集性的研究也将给予关注;在工程心理研究方面,鼓励研究互联网环境中的人际关系和人机交互问题.

长期资助项目领域:儿童认知及社会适应性行为的发展.

2.6.2 项目特点和变化 从2002年受理的项目来看,认知心理学、医学心理学和发展心理学的项目还是占据绝大部分,工程心理学的申请项目还是明显偏少. 除了传统的热点,如中文语言认知和儿童认知发展研究领域外,记忆及其脑机制的研究已成为新的热点. 多学科合作研究是目前的发展趋势,神经影像学方法越来越为我国心理学工作者所重视,用行为学方法结合事件相关电位、功能性核磁共振成像开展认知过程的研究成为流行的研究模式. 在医学心理学研究领域,应激与疾病的关系、心理障碍的干预手段等方面研究较多,而关于心理障碍发生机制的深入的研究较少. 另外,如何利用我国的资源优势开展神经心理学的研究没有得到应有的重视,相关申请书极少.

2.7 生理学学科^[8]

2.7.1 项目指南 在细胞和分子水平上对生理机制进行研究. 对低氧、寒冷适应、年龄生理以及人类生殖机制等结合国情的研究领域和基础薄弱的重要学科前沿,将进一步加大支持力度. 重视从整体、器官、细胞和分子水平开展多层次的整合性综合研究,使人体生理学的研究得到进一步发展. 生理学科2003年拟在心血管研究领域试行长期资助项目(3+3模式).

2.7.2 项目特点和变化 近3 a来,生理学学科受理项目的数量没有大的变化. 心血管、消化、生殖生理等领域在我国有较好的研究基础(如细胞保护、造血调控、胃肠激素及胚泡着床机制等),申请项目相对较多;部分学者将分子生物学与电生理学技术相结合,探讨正常生理功能的作用及其调控机制,使生理学研究得到进一步的深入;低氧、寒冷适应等特殊环境生理逐渐受到重视,特别是低氧适应的研究已初具规模,并逐渐形成具有中国特色和优势的研究领域;呼吸、泌尿及内分泌生理等领域,研究基础相对薄弱,其申请项目也偏少.

2.8 病理学学科^[9]

2.8.1 项目指南 对已有较好基础的肿瘤诱导分化及心血管等重大疾病中尚未解决的一些关键环节的研究,将进一步加强支持力度;重点支持当前学科的一些重大前沿问题的研究,如重大疾病相关的功能基因组学、蛋白质组学、信号转导与疾病、离子通道与疾病、疾病与靶向治疗以及器官、组织、细胞的重塑等基础研究;重视能结合我国国情,发挥资源优势的研究领域. 在加强分子水平研究的同时,不应忽视整体、器官、组织水平上的研究,尤其是整体水平的综合性研究. 学科重视宏观与微观、形态与机能、实验与临床相结合的研究,鼓励跨学科交叉以及环境对人体机能和疾病影

响的研究. 此外, 学科特别鼓励研究人员长期围绕某个科学问题开展系列研究, 并逐步形成自己研究特色的申请. 从以往的申请来看, 一些有较好工作基础的研究者和单位正在或逐步显露出他们在本领域的研究优势和特色, 在申请过程中也显示了他们的竞争优势. 病理学科 2003 年拟在心血管研究领域试行长期资助项目(3+3 模式).

2.8.2 项目特点和变化 近 3 a 病理学学科受理的项目数量不断增加, 项目的质量、水平也有了明显提高, 但整体水平与发达国家相比, 仍存在较大的差距, 引进、移植和跟踪性研究仍然偏多, 而真正具有原始创新的项目较少. 一些国外起步较晚的研究领域, 我国学者的研究起点较高, 相对地与国外的差距较小. 但是由于申请人和课题组缺乏对该领域研究进展和趋势良好的整体把握, 同时缺乏扎实的前期工作基础, 因此, 项目的创新性和技术路线的可行性都存在一定的问題, 使得项目的整体水平受到局限. 从研究领域来看, 心血管和消化系统疾病的研究在我国有较好的基础, 申请项目数较多; 血液系统疾病特别是白血病的基础与临床研究我国具有较好的优势和特色, 因此, 申请的项目水平较高, 与国际先进水平的差距较小; 离子通道与疾病、干细胞的定向诱导分化、疾病的基因治疗、具有调控作用的生物分子的作用机制研究等, 一直是学科的重要前沿热点, 申请呈逐年上升的趋势; 能发挥我国特有的资源优势, 如利用家系寻找疾病相关基因的研究已开始转向探讨基因功能的研究, 与之相关的疾病蛋白质组研究也已初具规模; 一些学科前沿如信号转导、细胞周期调控、受体、细胞凋亡及其细胞异常增生和分化等在疾病发生、发展过程中的作用等研究逐渐受到重视. 但是, 属于原创性思维、具有良好创新特色的学科交叉性的研究仍只有少数申请者问津.

2.9 生物物理学学科^[10]

2.9.1 项目指南 本学科拟继续关注与生物系统(如生物大分子、免疫系统、神经系统等)密切结合的生物信息论、细胞、细胞膜及细胞骨架的生物物理特征, 特别是跨膜转运过程中离子通道、转运蛋白及膜受体等膜蛋白结构和功能、环境物理因素, 如电离辐射、电磁辐射、微重力环境的生物学效应、分子机制及防护、生物物理学研究中显微、时间分辨及无损伤、超灵敏测量等新技术、新方法及其装置的研究.

2.9.2 项目特点和变化 近年来, 生物物理学各分支领域受理申请课题简况为: 除结构生物学课题划到生物化学学科外, 分子生物物理的重要研究内容包含了生物大分子结构、运动及与功能关系、分子内和分子间的相互作用、能量及电子传递等研究, 近 3 a 来申请课题极少; 用生物物理学原理与方法研究生物膜与活细胞, 涉及多学科交叉的感官与神经生物物理、生物控制论与信息论以及理论生物物理学等, 皆是生物物理学比较基础和重要的方面, 可能会对阐述生物学基本问题提供更多的切入点, 对推动生命科学的发展起重要作

用, 是应予以鼓励的研究领域, 但在每年受理的申请中, 有关这方面的课题比例亦较小; 此外, 生物物理技术的发展对研究的推动也是显而易见的. 比如, 生物芯片、单分子操控、近场技术等, 对人类基因组研究、蛋白质生物化学、细胞生物学乃至整个生命科学都会产生很大影响, 但申请项目的数量和质量均不令人满意; 环境物理因素对生物体的作用也越来越受到重视, 每年的申请也比较多. 这方面的研究应强调在细胞及分子水平探索物理因素如电离辐射、电磁辐射、声波等对机体的生物效应及机制; 放射学、核医学、放射肿瘤学和放射医学与防护的项目均在生物物理学学科受理和评审, 前几年申请项目较多, 但优秀的课题较少, 前期工作不足, 平均资助率较低.

2.10 生物医学工程学科^[11]

2.10.1 项目指南 本学科拟继续关注分子、亚细胞和细胞水平的生物力学与流变学, 特别强调力学-生物学(化学)耦合; 与动物实验和临床数据密切结合的生物系统的建模与仿真; 生物材料的表面改性及其结构、物理、化学、生物特性与生物相容性的关系; 生物材料的结构、降解代谢途径及对机体的影响; 功能生物材料和器件; 人体内脏器官的持续支持与替代研究; 生物医学信号中隐含信息的提取与整合, 传感技术的研究; 无创、实时、动态信息检测技术; 创新的生物医学成像技术, 特别是基于 MRI 的脑功能成像、生物量成像、频谱成像、分子成像研究中的新方法.

2.10.2 项目特点和变化 生物医学工程领域近年的申请项目简况如下: 生物力学与流变学在我国有较好的研究工作基础和队伍, 每年的申请项目亦较多. 近年来一些研究已经从纯力学研究转向细胞、亚细胞及分子水平的多学科结合研究, 符合国际发展趋势, 有些工作结合中医药研究, 有我国特色, 这些均得到鼓励和支持; 生物材料、人工器官是偏重医学应用, 涉及医学、材料学(金相、高分子、生物陶瓷等)、生物技术等多学科交叉的领域. 组织工程是近年发展起来的新学科, 应予更多关注并应与生物材料、生物力学方面和分子生物学、细胞生物学等领域相结合, 进行深入研究; 生物医学信号获取与处理、生物医学成像及图像处理技术等方面的申请项目每年也比较多. 申请人及研究队伍背景多为医学电子学领域, 较多注重技术方面问题, 缺乏对生物学、医学前沿问题的思考. 应鼓励为解决重要生物学、医学问题或为解决精密医疗仪器的创新技术问题而提出的申请项目.

2.11 生物化学和分子生物学学科^[12]

2.11.1 项目指南 研究蛋白质等生物大分子具有生物功能的基础以及生物大分子之间相互识别的结构是生物化学学科重要领域; 核酸特别是 non-coding RNA 的基因和功能、酶的催化和调节机制、膜蛋白和膜脂的相互作用、糖蛋白和糖复合物的结构功能等也是生物化学学科所关注的重要课题.

2.11.2 项目特点和变化 本学科的资助日益侧重于蛋白质等生物大分子及其复合物的三维结构与功能研究方面。以蛋白质晶体学和NMR测定为特点的结构生物学,高通量、大规模研究蛋白质结构和功能,如结构基因组学、蛋白质组学等已经成为本学科的重要研究方面。DNA、RNA等作为遗传信息分子,研究其本身的结构及与蛋白质的相互作用是该领域更基础的课题;基因表达调控以及RNA选择性剪接、RNA水平的编辑、特别是non-codingRNA,如snRNA在剪接体功能、snoRNA在细胞核内参与转录调控等方面仍有许多问题值得研究。目前国内RNA的研究队伍偏小,将予以扶植和倾斜。本学科生物膜研究的重点是膜蛋白的结构与功能及膜蛋白与脂质的相互作用。多糖和糖复合物的研究也是当前生物化学与分子生物学研究的热点。近3a来,生物膜及多糖方面的申请课题仅占申请总数的10-15%,将予以扶植和鼓励。本学科鼓励发展和引进新的技术,如新的蛋白质晶体学方法(MAD, SAD等),异核多维NMR、生物质谱、生物信息学方法等用于蛋白质等生物大分子的结构测定和功能研究。

2.12 细胞生物学学科^[13] 细胞的信号转导研究是该领域中研究的一个热点。研究内容包括:信号通路中信号分子的鉴定、信号的转导方向(信号分子的相互作用)、细胞膜对信号的接收、信号的跨膜转导、在胞内的级联放大、信号跨入核膜激活相应基因等等。除从一个基因入手去研究在某一生理过程中的作用这一常规研究方式外,研究某一生理过程中究竟有多少基因的参与,如何发挥其功能等,即基因的表达谱、蛋白质谱研究将会受到重视。对处于不同发育和分化状况下的单个细胞的研究,也开始受到关注。强调选择科学、合理的实验系统(包括实验对象的选择),进行细胞生命活动研究。鼓励与国外同行开展实在的国际合作,也鼓励国内展开合作,特别是交叉领域的合作。

2.13 遗传学学科^[14] 功能基因组学研究将是今后相当长时间内遗传学研究领域中的一个重点。定位并克隆控制生物学性状(质量性状和数量性状)或发挥重要生理作用的基因,并鉴定其功能,仍然是遗传学研究领域的一个重点。因此搜集或创建供研究所用的遗传群体或遗传材料(含疾病家系、隔离人群、突变体库等)是开展这些研究工作的一个重要前提。各种高通量鉴定基因功能的研究手段,如生物芯片、基因敲除(knock out)、转基因(knock in)、RNA干扰(RNAi)以及蛋白质组学研究中的各种技术,将在功能基因组学研究中发挥越来越重要的作用。从研究实验系统看,小鼠、果蝇、斑马鱼、拟南芥、线虫、酵母等几种传统的模式生物依然是研究的主要对象,但随着基因组全序列测定的完成,水稻、人等一些基因组相对较大且较为复杂的生物也成了新的模式生物。

基因的表达调控规律,特别是基因的调控网络机制,已越来越受到重视。一方面要研究顺式作用元件与反式作用因子(转录因子)之间的作用,另一方面也要研

究表观遗传因素(epigenetics)对基因表达调控的影响。对RNA基因的鉴定及调控功能研究也正在受到广泛的注意。

生命体与环境因素(物理环境因子、化学环境因子、生物环境因子)之间的关系向来是遗传学中的重要问题。现在可采用新的手段,如生物信息学、基因组学和蛋白质组学等开展研究。多基因复杂性状最易受到环境影响,许多重要的疾病如肿瘤、高血压、糖尿病、骨质疏松、精神分裂和动植物产量、品质和抗性表型等均属多基因复杂性状,对于这些性状一方面要从理论上展开研究,另一方面要从实验上展开研究。SNP计划实施以来,基因型与表型间的关系研究已引起人们广泛的兴趣,为开展该领域研究打下了基础。我国拥有丰富的遗传资源,具有开展这些研究的基础和优势。

近年来,本学科中还形成了一门基于基因组序列的学科-基因组信息学。如何从基因组中利用并提取具有生物学意义的信息是要面临的一个难题,如基因的预测(含编码蛋白基因和非编码蛋白基因)、遗传信息在染色体上的组成方式、不同物种间基因组的比较、基因的产生与进化等等。

对本学科的项目资助,一方面强调要充分利用我国遗传资源上的优势,分离鉴定更多的具有我国自主知识产权的功能基因,阐明其在生命活动过程中的表达调控规律,另一方面也强调与国际接轨,与国际同行竞争。

2.14 发育生物学学科^[15] 从性细胞的产生、受精卵、胚胎,直至形成一个完整生命个体,每一个过程都是发育生物学研究的重要课题。生命活动在时间和空间上有严格的秩序性,这是基因间相互协调配合的结果。鉴定与发育有关的基因并研究其表达调控规律依然是目前发育生物学领域中的主要研究内容。

该学科资助的另一重点为许多种类型细胞的发育分化,如性细胞、血液细胞、免疫细胞、神经细胞、肌肉细胞等等。还特别强调干细胞(包括胚胎干细胞和成体干细胞)的研究,这是近年来兴起的一个重要研究领域。干细胞成为一种新的研究细胞分裂(包括不对称分裂)、发育与分化实验系统,也为开展细胞疗法带来了希望。对干细胞的基础研究也是今后资助的一个重点。

胚胎发育过程的研究今后仍将会受到重视。体细胞克隆技术近年获得成功,但还有一些基础性问题尚待解决,如核质之间是如何相互作用,等等。胚胎植入的细胞学和分子生物学机制也有待进一步研究。本学科的研究更强调要有合适的模式生物和实验系统,如普遍采用的模式生物实验系统主要有斑马鱼、线虫、小鼠、拟南芥、水稻、酵母等。

2.15 免疫学学科^[16] 从近年免疫学学科受理和资助的项目来看,各分支学科间的项目水平差距较大。细胞免疫学总体水平不高,课题数量少,机制研究缺乏;分子免疫学总体分子水平研究较高,但对机制的探讨不够深入。原因之一是缺乏原创小鼠模型。今后应从分子及细胞学研究带到整体动物水平,以提高研究水平;免疫遗传

学的课题缺乏新意, 但该领域有很大的发展潜力; 神经内分泌免疫学申报的项目不少是我国学者多年研究工作的延续, 研究水平有待进一步提高; 免疫预防学申报项目的研究内容主要以疫苗为主, 筛选优势抗原表位及多表位疫苗研究的申报较多, 但在多表位疫苗的设计中, 应注重从免疫学机制探讨如何设计合理的表位匹配; 免疫诊断学申报项目较少, 理论深度不够; 免疫治疗学的申报项目研究内容包括各种疫苗、治疗性抗体、基因治疗、细胞治疗等, 针对的疾病包括感染、肿瘤、自身免疫病等多种疾病。整体来说, 技术路线和设计方案少见突破; 免疫治疗的细胞及分子基础欠扎实, 治疗靶点选择创新性不够; 某些免疫治疗研究应用前景不明显。建议今后申报的项目应加强免疫治疗的细胞及分子基础的研究, 以基础研究的突破推动免疫治疗的发展和深入; 免疫治疗的靶点选择应加强实用性, 使其应用价值及潜能更明确; 与免疫治疗相关的一些技术平台, 如疫苗表位筛选、人源化抗体制备、载体优化等应加强, 并鼓励多学科合作; 免疫技术学领域绝大部分为跟踪加技术改良性质的项目, 反映我国在这一分支学科比较落后。今后将重视具有原始创新的项目, 和对我国免疫学研究有推动作用的平台技术, 特别强调应能推广应用。免疫性疾病领域标书质量较高, 反应了我国自身免疫性疾病的主要研究方向, 许多单位都有较好的研究基础; 感染与免疫这一领域申报的项目中, 天然免疫在抗感染中的作用及机制研究受到广泛关注, 抗病毒感染免疫仍是申报的重点, 但总体水平不高; 自主发现和鉴定的免疫新分子在抗感染免疫中的作用是本领域的一个亮点。建议今后申报的项目应: (1) 加强原始创新性研究, 尤其是连续的、深入的机制和基于假设的研究有待加强; (2) 加强新技术在本领域的应用; (3) 鼓励除病毒性肝炎以外其他感染性疾病的免疫学问题的研究, 尤其注意与我国卫生水平密切相关的和再现的感染性疾病的研究; (4) 加强与病原生物学和生物学学科的密切合作, 避免在加强宿主免疫状态研究的同时忽略病原本身的研究。免疫病理的项目申请者已经考虑到从动物实验着手与临床结合, 这是较好的发展方向; 生殖免疫申报的项目缺乏基础性研究工作, 研究内容大多属跟踪性工作, 学科今后将加强对基础性研究工作的支持。移植免疫与器官移植分支学科申报项目数呈逐年增多之势, 反映器官移植术在临床医学及基础医学领域的重要性。我国器官移植临床总体水平与国外差距不大, 但基础研究水平差距较大, 主要是缺乏一支基础研究的科研队伍。今后鼓励基础与临床专业人员的

联合申报; 支持以大动物为对象的研究项目; 鼓励有创新性的多途径诱导移植耐受; 结合临床实际需要, 鼓励开展新型免疫抑制剂等研究工作。

免疫学学科今后将进一步鼓励基础研究工作者与临床医生以临床某一疾病为模型联合开展基础研究, 从细胞及分子水平研究疾病的发病机制及免疫治疗手段, 利用我国资源优势, 共同设计、组织并完成有中国特色的研究项目; 鼓励免疫学专家与其他学科的专家积极协作, 以促进学科的交叉和渗透。

总之, 2003 年度国家自然科学基金继续把鼓励创新作为资助的宗旨, 以促进我国科技界创新能力的提高。就消化系统疾病而言, 消化系统肿瘤诊疗新方法的基础研究, 病毒性肝炎发病机制与防治等研究仍将是国家自然科学基金重点资助的领域。已经获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金项目(批准号:30224810)资助的世界胃肠病学杂志英文版(World Journal of Gastroenterology)辟有消化系统肿瘤和病毒性肝炎专栏, 刊登具有中国特色的创新研究论文。

3 参考文献

- 1 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):68-69
- 2 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):32-33
- 3 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):34-35
- 4 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):33
- 5 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):31-32
- 6 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):25
- 7 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):25-26
- 8 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):30
- 9 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):30-31
- 10 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):26
- 11 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):27
- 12 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):20-21
- 13 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):22
- 14 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):21-22
- 15 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):23
- 16 国家自然科学基金委. 2003 年度国家自然科学基金项目指南. 中国科学基金 2002;17(增刊):23-24

食管上皮癌变过程中环氧化酶 - 2 表达上调

齐凤英,张林西,韩彩丽,左连富,林培中,郭建文

齐凤英,张林西,韩彩丽,河北医科大学病理学教研室 河北省石家庄市 050017
左连富,郭建文,河北省肿瘤研究所 河北省石家庄市 050011
林培中,中国医科院肿瘤医院实验病理室 北京市 100021
齐凤英,女,1945-08-22生,河北省昌黎县人,汉族,1974年河北医学院毕业,1991
年天津医科大学获硕士学位,教授,博士生导师,主要从事消化道肿瘤病理研究。
“九五”国家攻关课题, No.96-906-01-02; 河北省自然科学基金课题,
No.301351
项目负责人:齐凤英,050017,河北省石家庄市中山东路 361 号,河北医科大学
病理教研室. qifengying1945@yahoo.com.cn
电话:0311-6265724
收稿日期:2002-06-01 接受日期:2002-12-25

Up-regulation of cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of esophageal epithelia

Feng-Ying Qi, Lin-Xi Zhang, Cai-Li Han, Lian-Fu Zuo, Pei-Zhong Lin, Jian-Wen Guo

Feng-Ying Qi, Lin-Xi Zhang, Cai-Li Han, Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei Province, China
Lian-Fu Zuo, Jian-Wen Guo, Cancer Institute of Hebei Province, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China
Pei-Zhong Lin, Department of Experimental Pathology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China
Supported by The National 9th Five-year Plan Special Research Programs, No. 96-906-01-02 and Natural Science Foundation of Hebei Province, No.301351
Correspondence to: Prof. Feng-Ying Qi, Department of Pathology, Hebei Medical University, 361 Zhongshan Donglu, Shijiazhuang 050017, Hebei Province China. qifengying1945@yahoo.com.cn
Received:2002-06-01 Accepted:2002-12-25

Abstract

AIM: To detect the expression of cyclooxygenase-2 gene and cell cycle related genes in the carcinogenesis of esophageal epithelia, so as to provide theoretical clues to the chemoprevention of esophageal carcinoma.

METHODS: The samples of esophageal epithelial cells were collected from the high incidence area of esophageal carcinoma. Cell smear slides were made for the evaluation of cell differentiation. The expression of COX-2, p53, p21/WAF1 and CDK4 were detected by flow cytometry.

RESULTS: The expression of COX-2 gene increased with the progression of epithelial cells from low grade dysplasia (LGD) to high grade dysplasia (HGD) or carcinoma. The fluorescence index (FI) was 1.54 ± 0.27 in the carcinoma and suspected carcinoma groups, and the positive rate of COX-2 was 100%. The expression of mutant p53 and CDK4 also increased as the epithelial cells progressed toward carcinoma. But the expression of tumor suppressor gene p21/WAF1 was on the opposite, and its expression sharply decreased in the HGD and carcinoma or suspected carcinoma.

CONCLUSION: The expression of COX-2 gene significantly increase in the carcinogenesis of esophageal epithelia, and

it also has the aberrant expression of cell cycle related genes.

Qi FY, Zhang LX, Han CL, Zuo LF, Lin PZ, Guo JW. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in carcinogenesis of esophageal epithelia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):508-511

摘要

目的: 探讨环氧化酶-2基因在食管上皮癌变进程中的作用及细胞周期相关基因表达的改变,为环氧化酶-2抑制剂进行食管癌化学预防提供理论依据。

方法: 自食管癌高发区采集食管脱落上皮细胞,对细胞涂片进行病理诊断,应用流式细胞仪对环氧化酶-2、p53、p21/WAF1及CDK4等基因在食管上皮细胞中的表达进行定量检测。

结果: 环氧化酶-2的表达随食管上皮细胞异型性的增高而逐渐增高,在可疑癌及癌细胞中 $FI=1.54 \pm 0.27$, 100%阳性表达。突变型p53蛋白及CDK4的表达也随细胞异型性的增高而明显增高,而抑癌基因p21/WAF1的表达则相反,其表达在重度增生及可疑癌和癌细胞中明显缺失。

结论: 环氧化酶-2在食管上皮癌变进程中表达升高,并同时伴有细胞周期相关基因表达异常。

齐凤英,张林西,韩彩丽,左连富,林培中,郭建文. 食管上皮癌变过程中环氧化酶-2表达上调. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):508-511
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/508.htm>

0 引言

近来研究发现,环氧化酶-2(Cyclooxygenase-2, COX-2)在结肠癌^[1]、胃癌^[2]等中表达显著增高,并可能与癌变有关。食管癌中COX-2的表达少见报道。我国食管癌前病变中关于COX-2表达的研究还未见报道。COX-2在食管癌变中的作用机制目前还不清楚。为此,我们应用食管拉网法对我省食管癌高发区高危人群进行普查,获取食管上皮细胞标本,并应用流式细胞术对COX-2及细胞周期相关基因的表达进行定量检测,探讨COX-2在早期癌变过程中的表达规律及其可能的作用,为COX-2抑制剂即非类固醇类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)用于高危人群进行化学预防奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 自河北省磁县食管癌高发区现场采集食管上

皮细胞标本 952 例, 其中正常 101 例, 轻度增生 111 例, 重度增生 I 级 569 例, 重度增生 II 级 138 例, 可疑癌 14 例, 癌 19 例. 采用食管拉网法, 将拉网器网球上的脱落上皮细胞部分做细胞涂片, 进行细胞学诊断, 其余洗脱到 20 ml 生理盐水中, 以 260 目筛网过滤, 离心 1 500 转/min, 5 min, 弃去上清后加入 70 % 冷乙醇固定, 放入 4 °C 冰箱中保存, 以备检测. 从中随机抽取 70 份样品进行 COX-2 基因蛋白的检测, 其中正常 5 例, 轻度增生 15 例, 重度增生 46 例, 可疑癌及癌 4 例. 再从中随机抽取 100 例进行 p53 蛋白表达的检测. 其中正常组 10 例, 轻度增生组 24 例, 重度增生组 62 例, 可疑癌及癌 4 例. 另抽取 70 份样品进行 CDK4 和 p21/WAF1 基因蛋白的检测, 其中正常 6 例, 轻度增生 15 例, 重度增生 39 例, 可疑癌及癌 10 例.

1.2 细胞学诊断标准 细胞学涂片经常规巴氏染色, 由二位富有经验的病理医师依据沈琼教授分级诊断标准进行细胞学诊断.

1.3 基因蛋白定量检测的样品制备

1.3.1 试剂 COX-2 为羊抗人多克隆抗体, p53 为小鼠抗人单克隆抗体, CDK4 为小鼠抗人单克隆抗体, p21/WAF1 为小鼠抗人单克隆抗体, 工作液浓度均为 1 : 100, Santa Cruz 公司产品. 第二抗体分别为兔抗羊 FITC-IgG、羊抗鼠 FITC-IgG, 工作液浓度为 1 : 100. Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc 公司产品.

1.3.2 基因蛋白免疫荧光标记方法 采用间接免疫荧光标记方法. 去除样品中的 70 % 乙醇, 用 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗涤 2 次, 将细胞数调整为 1×10^6 /ml, 每份样品加入第一抗体工作液 100 μ L. 在 37 °C 水浴中温浴 30 min. 然后用 PBS 离心洗涤 2 次, 弃上清, 每份样品加入第二抗体工作液 100 μ L, 37 °C 水中温浴 30 min, 再用 PBS 离心洗涤 2 次, 弃上清, 以除去未结合的多余荧光抗体. 上机检测前加入 1.0 ml PBS 缓冲液经 400 目筛网过滤, 即可上机检测. 同时设有 PBS 代替一抗和二抗的阴性对照, 以及只加一抗和二抗的阳性对照.

1.4 流式细胞术检测方法 采用美国 B-D 公司生产的 FACS420 型流式细胞仪, 激发光源为 2W 氩离子激光器, 输出功率 300mW, 激发波长为 488 nm, 分别进行单参数检测. 结果输入 HP-300Consort 30 计算机进行处理. 测定前以鸡血红细胞作为标准样品调整仪器的 CV 值在 5 % 以内.

1.5 COX-2、p53、CDK4 及 p21/WAF1 基因蛋白表达的定量分析 以对数方式采集数据, 并以荧光指数 (fluorescence index, FI) 表示他们的相对含量, 公式为: $FI = (\text{样品基因蛋白荧光强度} - \text{正常样品的平均荧光强度}) / \text{正常样品的平均荧光强度}$. 如果 $FI > 1.0$ 为阳性表达, $FI \leq 1.0$ 为阴性表达.

统计学处理 采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析. 各组间均数比较采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 Scheffe 法. $P < 0.05$ 时差异有显著性.

2 结果

2.1 COX-2 在食管上皮各病变组中的表达 COX-2 在正常上皮细胞有少量阳性表达, 因检测例数较少, 故表现为阳性率较高 (60 %), 但其表达量很低 (1.00 ± 0.09). 随上皮细胞异型性增高, COX-2 表达明显增高 (见图 1). 组间 COX-2 表达的差异具有显著性 ($F=8.146$, $P < 0.01$). 在可疑癌及癌细胞组 COX-2 表达的荧光指数 (FI) 高达 1.54 ± 0.27 , 100 % 阳性表达 (见表 1), 分别与前三组比较差异具有显著性 ($P < 0.05$).

表 1 COX-2 在食管上皮各病变组中的定量表达

细胞学分级	n	FI ($\bar{x} \pm s$)	阳性 n (%)
正常组(1)	5	1.00 \pm 0.09	3(60)
轻增组(2)	15	1.09 \pm 0.10	12(80)
重增组(3)	46	1.24 \pm 0.21	39(84.78)
可疑癌及癌(4)	4	1.54 \pm 0.27	4(100)

2.2 p53 蛋白在食管上皮各病变组中的表达 p53 蛋白表达也随食管上皮细胞异型性的增高而逐渐增高, 尤其是在可疑癌及癌细胞组表现的尤为突出 (见图 1). 其表达的阳性率也是随细胞学分级的增高而逐步上升 (见表 2). 组间比较差异非常显著 ($F=27.285$, $P < 0.01$); 其中主要是正常组与重增、癌组, 轻增与重增、癌组差异有显著性 ($P < 0.05$).

表 2 P53 蛋白在食管上皮细胞各病变组的表达

细胞学分级	n	p53 FI ($\bar{x} \pm s$)	阳性 n (%)
正常组(1)	10	1.00 \pm 0.11	0
轻增组(2)	24	1.10 \pm 0.15	5(20.8)
重增组(3)	62	1.36 \pm 0.32	34(54.8)
可疑癌及癌(4)	4	2.28 \pm 0.20	4(100)

2.3 CDK4 及 p21/WAF1 的表达与细胞学分级的关系 随细胞异型程度的增高 CDK4 蛋白表达含量也明显增多 (见图 2), 在可疑癌及癌细胞组 FI 值达 1.50 ± 0.26 (见表 3); 各组间蛋白表达量差异具有显著性 ($F=5.25$, $P = 0.003$), 主要是正常细胞组与可疑癌及癌细胞组间差异显著 ($P < 0.01$); 而抑癌基因 p21/WAF1 的表达含量随细胞异型性的增高而逐渐降低 (见图 2), 在可疑癌及癌细胞组减少最为明显 ($FI=0.71 \pm 0.08$). 各组间表达量的差异具有显著性 ($F=23.51$, $P < 0.01$). 组间两两比较, 除正常组与轻增组外, 其余各两组间差异具有显著性 ($P < 0.01$).

表 3 CDK4 及 p21/WAF1 在食管上皮各病变组的定量表达

细胞学分级	n	CDK4 FI ($\bar{x} \pm s$)	p 2 1 FI ($\bar{x} \pm s$)
正常组(1)	6	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.09
轻增组(2)	15	1.24 \pm 0.18	0.96 \pm 0.10
重增组(3)	39	1.29 \pm 0.28	0.77 \pm 0.11
可疑癌及癌(4)	10	1.50 \pm 0.26	0.71 \pm 0.08

2.4 CDK4 与 p21/WAF1 基因蛋白表达的相关分析 CDK4 与 p21/WAF1 表达呈显著负相关($r = -0.431$, $P < 0.01$).

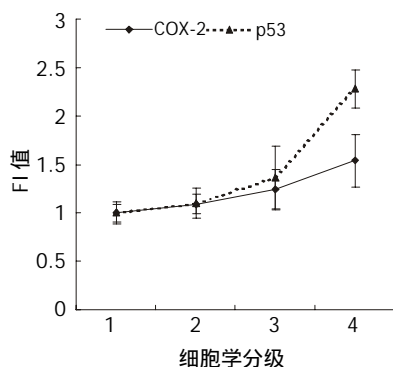


图1 COX-2 及 p53 在食管上皮癌变过程中的表达.

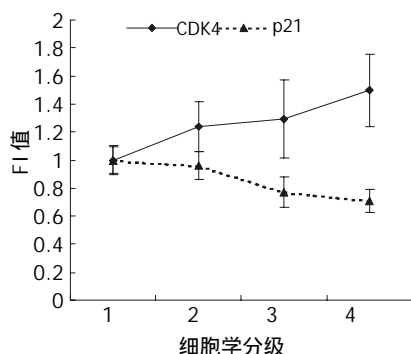


图2 CDK4 及 p21/WAF1 在食管上皮癌变过程中的表达.

3 讨论

近年来流行病学研究发现,长期服用阿司匹林等非类固醇类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)可降低食管、结肠及胃等部位癌的危险性^[3]. Funkhouser et al^[4]通过对美国 1.4 万居民跟踪 12-16 a 流行病学研究发现,经常服用阿司匹林可使形成食管癌的危险性降低 90%. 而阿司匹林、消炎痛等 NSAIDs 正是 COX 的抑制剂. 因此提示 COX 主要是 COX-2 可能在食管上皮细胞癌变中起重要作用. 因中国的食管癌发生具有明显的地域特征^[5], 这也为 NSAIDs 在高发区进行化学预防提供了新思路.

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)又称前列腺素合成酶,是催化前列腺素合成的限速酶. 现知 COX 有两种异构酶: COX-1 和 COX-2, 二者的氨基酸序列有 60% 以上同源性. COX-1 在大多数哺乳动物组织呈常规表达, 执行“看家”功能, 而 COX-2 则呈诱导性表达. 目前, 对食管癌中 COX-2 表达的研究较少. 尤其是中国食管癌中 COX-2 表达的研究鲜见报道. 本研究采用食管拉网法获取食管上皮细胞, 应用流式细胞术对正常及各级病变中 COX-2 的表达进行定量检测. 这是对食管癌前病变中 COX-2 表达定量检测的首次报道. 研究发现在正常细胞组基本无 COX-2 表达, 但随上皮细胞异型性增高, COX-2 表达的荧光指数(FI)迅速增高, 尤其在重增组、可疑癌及癌细胞组表现尤为突出. Shamma et al^[6]对食管癌变过程中各种病变中 COX-2 表

达进行的检测发现, COX-2 表达在重度异型增生上皮中异常增高并认为 COX-2 对重度异型增生是敏感指标. 而另有学者^[7]认为 COX-2 可能在食管下段鳞癌形成中起一定作用. 食管下段更易发生腺癌, 所以又有人认为^[8] COX-2 表达可能与食管腺癌形成有关而与鳞癌无关. 总之, COX-2 在食管癌形成早期过度表达, 提示其过度表达可能参与了食管上皮的早期癌变进程. 但其作用机制目前还不清楚. 其可能的机制为: (1) COX-2 过度表达能促进肿瘤血管生成, 从而促进肿瘤的生长及血道转移^[1]; (2) COX-2 过度表达抑制了细胞凋亡. 因为有学者研究发现^[9,10], 用 COX-2 选择性或非选择性抑制剂可以抑制癌细胞的生长并诱导其发生凋亡. 但也有可能有其他途径存在^[11].

越来越多的资料表明: 食管癌的发生与多种癌基因的激活和/或抑癌基因的失活有关. P53 及 p21/WAF1 都是调节细胞周期中 G1/S 期转变的重要蛋白. 过去对 p53、p21/WAF1 等的研究, 大多集中在实体癌或癌旁组织. 部分研究显示^[12-17], p53 或 p21 在众多癌基因或抑癌基因中是预后标志物. 然而 p53 及 p21 等在癌前病变中的表达情况如何少见报道. 本研究中对食管癌高发区食管上皮细胞中 p53 蛋白的检测发现, 有 45.9% (39/85) 食管癌前病变中有 p53 蛋白的积聚, 且随异型性增高, p53 蛋白积聚也逐渐增多. 在重增组为 54.8% (34/61), 在可疑癌及癌细胞组其 FI=2.28 ± 0.20, 100% 阳性表达. 提示癌形成时 p53 蛋白明显积聚, 基本丧失了对细胞生长的抑制调控. 而抑癌基因 p21/WAF1 表达随上皮细胞异型性增高而显著减少. 这样抑癌基因 p21/WAF1 及 p53 逐渐丧失了对细胞周期的抑制, 尤其是对 CDKs 的抑制. 同时本研究发现, CDK4 表达随细胞异型性增高明显增高, 并且 CDK4 与 p21/WAF1 表达呈显著负相关. 而正常细胞周期的控制需要 CDK4 和抑制蛋白之间的平衡^[18]. 无论是抑制蛋白 p53 的异常积聚或/和 p21/WAF1 的表达减少/缺失, 还是 CDK4 的表达增高, 都最终导致食管上皮细胞的细胞增生周期失控, 从而异常增生发生癌变.

关于 COX-2 表达与细胞周期调控蛋白在食管上皮癌变中的作用国内外还未见报道. 是由于 COX-2 过度表达从而产生多种花生四烯酸代谢产物(如 PGE₂、PGF₂、PGI 等)从而导致的细胞相关基因表达的异常, 还是细胞周期紊乱后相关基因表达异常从而诱导 COX-2 基因过度表达, 目前还不清楚. 本研究发现, 在食管上皮癌变进展中, COX-2 与 p53 表达都明显升高, 说明 COX-2 与 p53 表达可能有一定的相关性. Rajnakova et al^[19]对胃癌中 COX-2 的研究发现, p53 阳性积聚的肿瘤中 COX-2 表达也增强. 并认为 COX-2 过度表达可促进无 p53 功能的肿瘤细胞生长. 但也有相反的报道^[20].

由此可见, 在食管上皮癌变过程中 COX-2 表达上调, 并同时伴有细胞周期相关基因表达异常. COX-2 在食管上皮癌变进程中的表达及其作用机制还有待进

一步研究. 虽然有关研究显示一些非类固醇类抗炎药 (NSAIDs) 可以诱导食管癌细胞的凋亡, NSAIDs 能否应用于食管癌高发区进行预防, 还需要广泛的进一步研究. NSAIDs 应用于实际对高危人群进行化学预防还不成熟.

4 参考文献

- 1 Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruo T, Shibata Y, Nagawa H. Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000;83:324-328
- 2 Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:1276-1280
- 3 Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Aspirin use and risk of fatal cancer. *Cancer Res* 1993;53:1322-1327
- 4 Funkhouser EM, Sharp GB. Aspirin and reduced risk of esophageal carcinoma. *Cancer* 1995;76:1116-1119
- 5 Wang SJ, Wen DG, Zhang J, Man X, Liu H. Intensify standardized therapy for esophageal and stomach cancer in tumor hospitals. *World J Gastroenterol* 2001;7:80-82
- 6 Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, Yano M, Inoue M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2000;6:1229-1238
- 7 Kawabe A, Shimada Y, Uchida S, Maeda M, Sato F, Itami A, Imamura M. Expression of cyclooxygenase-2 is associated with carcinogenesis of the lower part of thoracic esophageal squamous cell carcinoma and p53 expression. *Oncology* 2002;62:46-54
- 8 Wang L, Zhang W, Wang W. A study on cyclooxygenase-2 protein expression in esophageal carcinoma and premalignant lesions. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2001;23:14-16
- 9 Souza RF, Shewmake K, Beer DG, Cryer B, Spechler SJ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2000;60:5767-5772
- 10 Aggarwal S, Taneja N, Lin L, Orringer MB, Rehemtulla A, Beer DG. Indomethacin-induced apoptosis in esophageal adenocarcinoma cells involves upregulation of Bax and translocation of mitochondrial cytochrome C independent of COX-2 expression. *Neoplasia* 2000;2:346-356
- 11 Li M, Wu X, Xu XC. Induction of apoptosis by cyclo-oxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome C-dependent pathway in esophageal cancer cells. *Int J Cancer* 2001;93:218-223
- 12 Natsugoe S, Nakashima S, Matsumoto M, Xiangming C, Okumura H, Kijima F, Ishigami S, Takebayashi Y, Baba M, Takao S, Aikou T. Expression of p21WAF1/Cip1 in the p53-dependent pathway is related to prognosis in patients with advanced esophageal carcinoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:2445-2449
- 13 Nita ME, Nagawa H, Tominaga O, Tsuno N, Hatano K, Kitayama J, Tsuruo T, Domene CE, Muto T. p21/Waf1/Cip1 expression is a prognostic marker in curatively resected esophageal squamous cell carcinoma, but not p27 Kip1, p53, or Rb. *Ann Surg Oncol* 1999;6:481-488
- 14 Kuwahara M, Hirai T, Yoshida K, Yamashita Y, Hihara J, Inoue H, Toge T. p53, p21(Waf/Cip1) and cyclin D1 protein expression and prognosis in esophageal cancer. *Dis Esophagus* 1999;12:116-119
- 15 Kobayashi S, Koide Y, Endo M, Isono K, Ochiai T. The p53 gene mutation is of prognostic value in esophageal squamous cell carcinoma patients in unified stages of curability. *Am J Surg* 1999;177:497-502
- 16 Hirai T, Kuwahara M, Yoshida K, Osaki A, Toge T. The prognostic significance of p53, p21 (Waf1/Cip1), and cyclin D1 protein expression in esophageal cancer patients. *Anticancer Res* 1999;19:4587-4591
- 17 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
- 18 Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993;366:704-707
- 19 Rajnakova A, Mochhala S, Goh PM, Ngoi S. Expression of nitric oxide synthase, cyclooxygenase, and p53 in different stages of human gastric cancer. *Cancer Lett* 2001;172:177-185
- 20 Sakuma K, Fujimori T, Hirabayashi K, Terano A. Cyclooxygenase (COX)-2 immunoreactivity and relationship to p53 and Ki-67 expression in colorectal cancer. *J Gastroenterol* 1999;34:189-194

腺病毒介导的 p27kip1 对食管癌裸鼠模型抑制的作用

张卫国,吴清明,童强,于皆平

张卫国,吴清明,童强,鄖阳医学院附属十堰市太和医院消化内科 湖北省十堰市 442000
于皆平,武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
张卫国,男,1971-10-1生,湖南衡阳人,汉族. 1995年原同济医科大学毕业,现为武汉大学人民医院消化内科硕士研究生,主治医师.
项目负责人:吴清明,442000,湖北省十堰市太和医院消化内科. zwg789@sina.com
电话:0719-8801431
收稿日期:2002-10-17 接受日期:2002-11-16

Inhibitory effect of p27kip1 mediated by adenovirus on model of esophageal carcinoma in nude mice

Wei-Guo Zhang, Qing-Ming Wu, Qiang Tong, Jie-Ping Yu

Wei-Guo Zhang, Qing-Ming Wu, Qiang Tong, Department of Gastroenterology, the Affiliated Taihe Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China
Jie-Ping Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Qing-Ming Wu, Department of Gastroenterology, Taihe Hospital, Shiyan 442000, Hubei Province, China. zwg789@sina.com
Received: 2002-10-17 Accepted: 2002-11-16

Abstract

AIM: To investigate the inhibitory effect of p27kip1 mediated by adenovirus vector on esophageal carcinoma *in vivo*.

METHODS: Eca109 cells were injected into the subcutaneous tissue of nude mice to establish tumors. The transplanted tumors were reproduced among the nude mice continually after original grafts grew well. The model of esophageal carcinoma in nude mice was established by transplanting the tumor tissue mass into the subcutaneous tissue of nude mice. The successful constructed recombinant adenoviral vector carrying p27kip1 gene and LacZ recombinant adenovirus were directly injected into the esophageal tumors in nude mice respectively. Compared with control group, the growth curves of tumor were drawn and the growth inhibition rates of tumor were calculated.

RESULTS: The growth of tumors in gene therapy group with p27kip1 was obviously suppressed, which had a significant difference compared with control group ($P < 0.001$). The growth inhibition rate of tumor reached 64.1%.

CONCLUSION: p27kip1 gene therapy mediated by adenovirus vector has significant inhibitory effect on esophageal carcinoma *in vivo*.

Zhang WG, Wu QM, Tong Q, Yu JP. Inhibitory effect of p27kip1 mediated by adenovirus on model of esophageal carcinoma in nude mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):512-516

摘要

目的:用腺病毒为载体,来研究 p27kip1 基因对食管癌

体内抑制作用。

方法:用人食管癌细胞 Eca109 接种于裸鼠皮下,原代生长后在鼠间传代,再用组织块移植法构建食管癌裸鼠模型,应用直接注射法,将成功构建的携带人 p27kip1 基因的重组腺病毒及 LacZ 重组腺病毒导入裸鼠食管癌瘤体中,与对照组比较,绘制肿瘤生长曲线,并计算肿瘤生长抑制率。

结果:p27kip1 基因治疗组肿瘤生长明显受到抑制,与对照组比较,有显著性差异($P < 0.001$),肿瘤生长抑制率达 64.1%。

结论:腺病毒介导的 p27kip1 基因对食管癌具有较显著的体内抑制作用。

张卫国,吴清明,童强,于皆平. 腺病毒介导的 p27kip1 对食管癌裸鼠模型抑制的作用. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):512-516

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/512.htm>

0 引言

食管癌常见,其发生、发展涉及多个基因及分子水平的变化^[1-12],目前无论是传统的手术、化疗及放疗,还是所进行实验研究的基因治疗,都未能取得满意的疗效,而针对细胞周期调控,这一分子基因水平上癌变过程共同通道的治疗可能是食管癌防治的有效途径. p27kip1 蛋白是新近发现^[13]的一种重要的具有细胞周期负调控的因子,使细胞停滞于 G1 期,不能完成 G1/S 期转换,增生受抑制.我们以腺病毒为载体,将 p27kip1 基因导入人食管癌裸鼠模型瘤体中,来研究以 p27kip1 为目的基因,恢复细胞正常的负性周期调控来治疗食管癌,以探求一种有效的基因治疗新途径.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF 级 Balb/C 裸小鼠、人食管癌细胞株 Eca109 均由中国医学科学院肿瘤医院提供,裸小鼠雌雄兼用,4 周龄. 293 细胞购自中国科学院上海细胞库. pCMV5p27kip1 由北京大学第一医院泌尿外科研究所王刚博士惠赠. pACCMVPLPA 和 PJM17 由军事医学科学院二所吴祖泽院士惠赠. 大肠杆菌 DH5a 由北京大学第一医院心内科彭旭博士惠赠. Ad-LacZ 由我院生命科学研究所提供. p27kip1cDNA 及腺病毒 PCR 引物由赛百胜生物公司设计、合成. 内切酶 Kpn^I, BamH^I 及 T4 DNA ligase 购自华美生物工程公司, Lipofectamine, DMEM 购自 Gibco 公司. CsCl 购自 Sigma 公司. 特级新生

小牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组腺病毒载体的构建及扩增 将 pCMV5p27kip1, pACCMVPLPA 分别用 Kpn^I, BamH^I 双酶切, 获得 p27kip1cDNA 及腺病毒片段, 以定向克隆方式用 T4 DNA ligase 连接, 连接产物为穿梭质粒 pAd-p27kip1, Lipofectamine 介导 pAd-p27kip1 与 PJM17 共转染 293 细胞, 制备出携带 p27kip1 基因的重组腺病毒载体 Ad-p27kip1^[14]。将 Ad-p27kip1 直接感染 293 细胞, 293 细胞为腺病毒 E1 区转化的人胚肾细胞, 培养条件为 100 mL/L 新生小牛血清的 DMEM 培养基, 在 37^oC, 50 mL/L CO₂ 培养箱中培养, 用倒置相差显微镜观察细胞病变, 当 90-100% 细胞出现病变, 10-20% 细胞脱落时, 收集细胞及病毒上清, 将病毒上清反复感染 293 细胞, 收集细胞。取病毒上清 200 μL, 加入等体积裂解液, 混匀, 煮沸 20 min, 加入 10 g/L 蛋白酶 K 10 μL, 37^oC 水浴 3 h, 加等体积酚/氯仿, 彻底混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清, 加 1/10 体积 NH₄AC, 2.5 体积无水乙醇, 等体积异丙醇温放置沉淀 DNA, 12 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 保留沉淀, 加 1 mL 750 mL/L 乙醇洗涤, 12 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 自然干燥, 加入三蒸水 20 μL, 以此为 DNA 模板进行扩增鉴定。p27kip1 引物上游: 5' -CCTAGAGGGCAAGTACGAGTG-3', 下游: 5' -GAAGAATCGTCGGTTCGAGGTCGCT-3'。腺病毒引物上游: 5' -TCGTTTCTCAGCAGCTGTTG-3', 下游: 5' -CATCTGAAC TCAAAGCGTGG-3'。PCR 反应体系: 病毒 DNA 10 μL, 引物各 5 μL, 2 mmol/L dNTP 5 μL, Taq 酶 1 μL, MgCl₂ 2 μL, 10 × PCR buffer 5 μL, 加水至反应终体积为 50 μL, 用矿物油覆盖, 94^oC 变性 5 min, 然后 94^oC 30 s, 56^oC 30 s, 72^oC 60 s, 循环 30 次, 最后 72^oC 延伸 10 min, 在 8 g/L 琼脂糖凝胶中将扩增产物进行电泳, 对病毒进行鉴定。将细胞在 -80^oC 与 37^oC 之间反复冻融 3 次以释放出病毒, 用 CsCl 超速密度梯度离心 2 次提取病毒, 装入透析袋, 置入透析液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L MgCl₂, 100 mL/L 甘油), 应用磁力搅拌器 4^h 透析 2 次进行纯化。对纯化后的重组腺病毒用有限稀释法, 紫外分光光度计测定其滴度。Ad-LacZ 为带有 LacZ 报告基因的重组腺病毒, 其扩增、纯化及滴度测定同上。将含 LacZ 重组腺病毒的上清感染 293 细胞, 48 h 后固定细胞, X-gal 染色, 显微镜下蓝染的细胞, 即 LacZ 基因表达阳性的细胞。

1.2.2 腺病毒介导的 p27kip1 对食管癌裸鼠模型抑制作用 人食管癌裸鼠模型的构建: 取对数生长期的食管癌细胞 Eca109, PBS 清洗后制成每升含 1 × 10¹⁰ 细胞悬液, 每只按 0.1 mL 接种于 4 周龄 Balb/C 裸小鼠皮下, 原代生长后在鼠间传代, 再取出瘤体, 将肿瘤制成 0.3 × 0.3 cm 的小块, 采用组织块移植法置入 4 周龄 Balb/C 裸小鼠右背侧皮下, 共 36 只, 动物饲养于中国医学科学院

实验动物研究所, 清洁级动物室内, 裸鼠所用饲料、水及用具均经灭菌处理。待肿瘤长至 0.7 cm 左右时, 取其中 21 只肿瘤体积较为均一的裸鼠, 随机分为 3 组, 每组 7 只, 采用肿瘤局部直接注射法, 对照组中每只裸鼠瘤体内注射 PBS 0.1 mL, 实验组 1 中每只注射 Ad-LacZ (病毒含量 10¹⁰pfu) 0.1 mL, 实验组 2 中每只注射 Ad-p27kip1 (病毒含量 10¹⁰pfu) 0.1 mL, 隔日注射 1 次, 共 4 次, 连续观察 4 wk。每 3 d 测量各组肿瘤体积 1 次, 绘制肿瘤生长曲线, 肿瘤近似体积按公式 $V = \frac{1}{6} [(A+B)/2]^3$ 计算 (A, B 分别为肿瘤的最长径、最短径)。4 wk 后处死动物, 剥离肿瘤, 称质量, 按公式 肿瘤生长抑制率 (%) = (对照组肿瘤质量 - 实验组肿瘤质量) / 对照组肿瘤质量 × 100%, 求出肿瘤生长抑制率。

统计学处理 采用 t 检验

2 结果

2.1 Ad-p27kip1 及 Ad-LacZ 的扩增 两种重组腺病毒感染 293 细胞后, 显微镜下均可见细胞变圆、聚集成团、呈葡萄串样病变改变 (图 1、2), Ad-p27kip1 PCR 鉴定结果见图 3, 以 pCMV5p27kip1 为模板, 扩增出 275 bp 的 p27kip1cDNA 片段, 以 pACCMVPLPA 为模板, 扩增出 860 bp 的腺病毒基因片段, 以提取的病毒 DNA 为模板, 则同时扩增出 275 bp 的 p27kip1cDNA 片段和 860 bp 的腺病毒基因片段, 阴性对照组无 PCR 产物。Ad-p27kip1 纯化后经测定, 其滴度为 1.60 × 10¹⁵pfu/L, A₂₆₀/A₂₈₀ > 1.3。Ad-LacZ 感染 293 细胞后, 经固定, X-gal 染色, 显微镜下可见较多蓝染的细胞, Ad-LacZ 纯化后经测定, 其滴度为 1.48 × 10¹⁵pfu/L, A₂₆₀/A₂₈₀ > 1.3, 表明两种腺病毒均为实验所需重组腺病毒, 且滴度、纯度较高, 能满足基因治疗的需要。

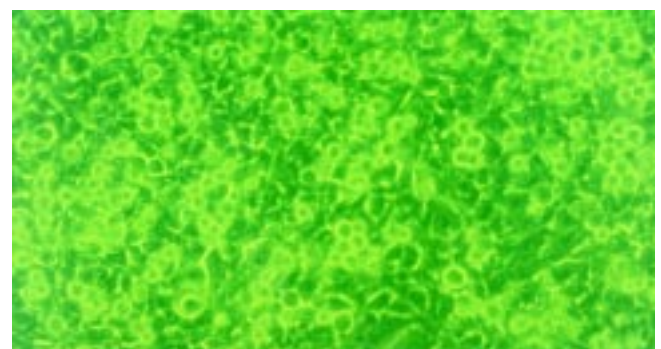


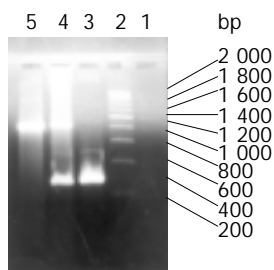
图 1 Ad-p27kip1 感染 293 细胞后细胞病变。

2.2 食管癌裸鼠模型的治疗 采用组织块移植法接种 12 d 后, 裸小鼠右背侧皮下均可见 0.7 cm 左右的肿瘤, 成瘤率达 100%, 且动物生长状态良好。治疗实验裸鼠连续观测 4 wk, 动物生长状态较好, 无死亡。Ad-p27kip1 组肿瘤生长显著慢于对照组, Ad-LacZ 组则与对照组差异不明显 (图 4)。4 wk 后处死动物, 剥离肿瘤, 称质量, Ad-p27kip1 组瘤体质量显著低于对照组 (0.42 ± 0.08 g vs

1.17±0.30 g, P <0.001), 而 Ad-LacZ 组瘤体质量与对照组无明显差异(1.00±0.23 g vs 1.17±0.30 g, P >0.05), 肿瘤生长抑制率达 64.1 % (图 5).



图 2 Ad-LacZ 感染 293 细胞后细胞病变.



1:阴性对照组; 2:200 bp ladder marker; 3:pCMV5p27kip1 为模板, 扩增出 275 bp 基因片段; 4:Ad-p27kip1 为模板, 同时扩增出 275 bp 和 860 bp 两个基因片段; 5:pACCMVPLPA 为模板, 扩增出 860 bp 基因片段. 图 3 琼脂糖凝胶电泳鉴定 Ad-p27kip1 的 PCR 扩增结果.

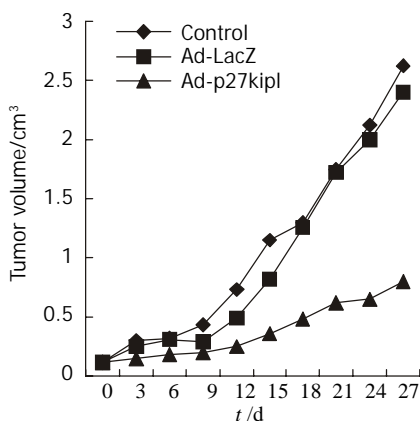


图 4 各组裸鼠肿瘤生长曲线.

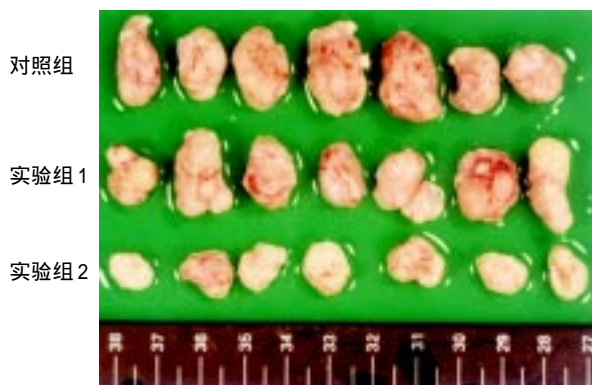


图 5 基因治疗后各组裸鼠肿瘤比较.

3 讨论

近年来, 基因治疗为肿瘤的防治带来了新的契机. p53 基因治疗已从离体细胞实验过度到动物模型基因治疗, 并已步入临床实验阶段, 国内外学者对食管癌的体外、体内基因治疗的实验研究中, 将 p53, p21, p16, Egr-1, FHIT, Cox-2, IL-2, VEGF, E2F-1, N116Y 作为目的基因, 取得了一定的疗效^[15-25], Shimada et al^[26]报道以腺病毒为载体的 p53 治疗 4 例食管癌患者, 尚未发现不良反应. 但总体疗效尚不令人满意, 目前正积极寻求一种或几种能打断细胞癌变共同通道的组织特异性基因作为食管癌基因治疗的突破. p27kip1 是一种抑癌基因, 其编码的蛋白属细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白(cyclin dependent kinase inhibitors, CDKI)Cip/Kip 类, 主要作用于 G1 期, 抑制 cyclin E-CDK2 和 cyclin D-CDK4 等 G1 期激酶复合物, 使细胞不能通过 G1 期. 研究表明在食管癌中 p27kip1 表达下降, 与肿瘤细胞的分化程度正相关, 是食管癌的一个独立预后指标, 并认为 p27 表达下降是食管癌发生的早期事件^[27-31]. 由于 p27kip1 的研究起步较晚, 以其作为目的基因的体外、体内治疗的研究不多见, 用于治疗食管癌几近未见报道, 实验表明以腺病毒为载体将 p27kip1 转染肺癌、肾癌、前列腺癌细胞后, p27kip1 在肿瘤细胞内高表达, 细胞停滞于 G1 期, 凋亡增加, 细胞增生受阻, 导入裸鼠移植瘤内, 瘤体生长明显减慢^[32-36], 其中 Park et al^[34]研究发现经治疗后有 20% 的肺癌裸鼠移植瘤完全消失, 国内学者将外源性 p27kip1 导入肝癌细胞中, 也发现细胞停滞于 G1 期, 生长明显受阻^[37,38], 我们曾研究以腺病毒介导的 p27kip1 转染胃癌细胞株 SGC-7901, 同样表明 p27kip1 能显著抑制细胞增生^[39]. 以上表明 P27kip1 可以作为目的基因用于肿瘤的基因治疗.

我们以 p27kip1 为目的基因, 以腺病毒为载体, 采用直接注射, 体内治疗食管癌. 我们所选用的腺病毒载体缺少基因 E1 区, 而在他们的位置上加入了治疗基因, 由于病毒其他早期基因的表达需要 E1 区基因产物的协助, 所以病毒载体是不能自我复制的, 其装配细胞 293 细胞基因组内嵌有 E1 区基因片段, 并可持续表达 E1 蛋白, 为 E1 区置换的载体提供反式补偿, 这类载体能定位于细胞核 DNA, 高水平表达外源性基因, 且病毒复制缺陷, 不整合入宿主基因组而极少致突变危险, 无野生型病毒污染, 较为安全. 我们的研究表明, 该治疗能有效抑制食管癌肿瘤的生长, 单基因治疗的抑瘤率达 64.1%, 从肿瘤生长曲线上提示, 瘤体的生长后期较前期加快, 可能与 p27kip1 蛋白的本身的生物学特性有关, p27kip1 蛋白被称为“短寿命蛋白”, 其半衰期较短, 而肿瘤细胞中泛素-蛋白酶体活性的增强, 更加速了 p27kip1 蛋白的降解^[40], 另外蛋白激酶 B 在 p27kip1 胞核定位基序 T157 位置使其磷酸化, 使 p27kip1 滞留于胞质, 不能进入胞核而发挥其作用^[41,42], 这些因素加上治疗后基因表达的快速衰退, 使得该治

疗的肿瘤抑制效应受到一定的限制。

本研究表明, 腺病毒介导的 p27kip1 基因对食管癌具有较显著的体内抑制作用, 提示 p27kip1 可能是一种治疗食管癌较特异性的目的基因, 为基因治疗食管癌提供了一个新的方法, 相信随着对 p27kip1 研究的不断深入, p27kip1 的基因治疗特别是联合多项基因治疗有望步入临床, 在食管癌的治疗上成为新的突破口。

致谢 感谢中国医学科学院陈志高、代金文、孙淑华、王艳荣、华克非、方金玉; 军事医学科学院吴祖泽; 北京大学王刚、彭旭的帮助。

4 参考文献

- 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, Waf1p21, bcl-2 and c-myc in esophageal carcinogenesis studied with a high-risk population in northern China. *World J Gastroenterol* 1998;4:287-293
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Tan LJ, Jiang W, Zhang N, Zhang XR, Qiu DH. Fas/FasL expression of esophageal squamous cell carcinoma, dysplasia tissues and normal mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:15-19
- 周海波, 颜云, 李国庆, 丰义宽, 辛桂鑫. 食管癌组织中 DPC₄ 基因的失活. *世界华人消化杂志* 2002;10:102-103
- 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
- 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
- Wang AH, Sun CS, Li LS, Huang JY, Chen QS. Relationship of tobacco smoking CYP1A1 GSTM1 gene polymorphism and esophageal cancer in Xi'an. *World J Gastroenterol* 2002;8:49-53
- Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 1994;8:9-22
- Tong Q, Wu QM, Huang YZ, Wang JN, Wang WM, Yu JP. Construction and assessment of replication deficient adenoviral vector containing the cDNA for human p27kip1. *Med J Wuhan Univer* 2002;23:9-12
- Schrump DS, Chen GA, Consuli U, Jin X, Roth JA. Inhibition of esophageal cancer proliferation by adenovirally mediated delivery of p16INK4. *Cancer Gene Ther* 1996;3:357-364
- Matsubara H, Koide Y, Sugaya M, Gunji Y, Asano T, Ochiai T, Takegana K, Sakiyama S, Tagawa M. Antitumor response of genetically engineered IL-2 expression to human esophageal carcinoma cells in mature T cell-defective condition. *Int J Oncol* 1998;13:1217-1222
- 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
- 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
- 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
- Matsubara H, Maeda T, Gunji Y, Koide Y, Asano T, Ochiai T, Sakiyama S, Tagawa M. Combinatory anti-tumor effects of electroporation-mediated chemotherapy and wild-type p53 gene transfer to human esophageal cancer cells. *Int J Oncol* 2001;18:825-829
- Yang HL, Dong YB, Elliott MJ, Liu TJ, McMasters KM. Caspase activation and changes in Bcl-2 family member protein expression associated with E2F-1-mediated apoptosis in human esophageal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000;6:1579-1589
- Senmaru N, Shichinohe T, Takeuchi M, Miyamoto M, Sazawa A, Ogiso Y, Takahashi T, Okushiba S, Takimoto M, Kato H, Kuzumaki N. Suppression of Erk activation and in vivo growth in esophageal cancer cells by the dominant negative Ras mutant, N116Y. *Int J Cancer* 1998;78:366-371
- Fujii T, Tanaka Y, Tanaka T, Matono S, Sueyoshi S, Fujita H, Shirouzu K, Kato S, Yamana H. Experimental gene therapy using p21/WAF1 gene in esophageal squamous cell carcinoma—adenovirus infection and gene gun technology. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001;28:1651-1654
- Shimada H, Shimizu T, Ochiai T, Liu TL, Sashiyama H, Nakamura A, Matsubara H, Gunji Y, Kobayashi S, Tagawa M, Sakiyama S, Hiwasa T. Preclinical study of adenoviral p53 gene therapy for esophageal cancer. *Surg Today* 2001;31:597-604
- Guo WZ, Ran YL, Liu J, Yu L, Sun LX, Yang ZH. Enhancement by hypoxia of antisense VEGF(165) gene expression in esophageal cancer cells. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2002;34:625-629
- Shimada H, Matsubara H, Ochiai T. Gene therapy for esophageal cancer. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2002;103:371-375
- Singh SP, Lipman J, Goldman H, Ellis FH Jr, Aizenman L, Cangi MG, Signoretti S, Chiaur DS, Pagano M, Loda M. Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998;58:1730-1735
- Yasunaga M, Tabira Y, Nakano K, Iida S, Ichimaru N, Nagamoto N, Sakaguchi T. Accelerated growth signals and low tumor-infiltrating lymphocyte levels predict poor outcome in T4 esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2000;70:1634-1640
- Shamma A, Doki Y, Tsujinaka T, Shiozaki H, Inoue M, Yano M, Kawanishi K, Monden M. Loss of p27(KIP1) expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology* 2000;58:152-158
- Shibata H, Matsubara O, Wakiyama H, Tanaka S. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Pathol Res Pract* 2001;197:157-164
- Taniere P, Martel-Planche G, Saurin JC, Lombard-Bohas C, Berger F, Scoazec JY, Hainaut P. TP53 mutations, amplification of P63 and expression of cell cycle proteins in squamous cell carcinoma of the oesophagus from a low incidence area in western Europe. *Br J Cancer* 2001;85:721-726
- Craig C, Wersto R, Kim M, Ohri E, Li Z, Katayose D, Lee SJ, Trepel J, Cowan K, Seth P. A recombinant adenovirus expressing p27Kip1 induces cell cycle arrest and loss of cyclin-Cdk activity in human breast cancer cells. *Oncogene* 1997;14:2283-2289
- Naruse I, Hoshino H, Dobashi K, Minato K, Saito R, Mori M. Over-expression of p27kip1 induces growth arrest and apoptosis mediated by changes of pRb expression in lung cancer cell lines. *Int J Cancer* 2000;88:377-383
- Park KH, Seol JY, Yoo CG, Kim YW, Han SK, Lee EH, Kim CM, Shim YS, Lee CT. Adenovirus expressing p27(Kip1) induces

- growth arrest of lung cancer cell lines and suppresses the growth of established lung cancer xenografts. *Lung Cancer* 2001;31:149-155
- 35 Katner AL, Gootam P, Hoang QB, Gnarra JR, Rayford W. A recombinant adenovirus expressing p27(Kip1) induces cell cycle arrest and apoptosis in human 786-0 renal carcinoma cells. *J Urol* 2002;168:766-773
- 36 Katner AL, Hoang QB, Gootam P, Jaruga E, Ma Q, Gnarra J, Rayford W. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells by a recombinant adenovirus expressing p27(Kip1). *Prostate* 2002;53:77-78
- 37 Li J, Yang XK, Yu XX, Ge ML, Wang WL, Zhang J, Hou YD. Overexpression of p27 (KIP1) induced cell cycle arrest in G1 phase and subsequent apoptosis in HCC-9204 cell line. *World J Gastroenterol* 2000;6:513-521
- 38 Li J, Wang W, Yu X, Yang X, Hou Y. Overexpression of p27(KIP1) induced by Bak gene leads to the arrest in G(1) phase of HCC-9204 cell line. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2001;9(Suppl):27-29
- 39 Tong Q, Wu QM, Liu CZ, Yu JP. Effect of adenovirus mediated human p27kip1 antioncogene on the proliferation in gastric cancer cell lines SGC-7901. *Zhongliu Fangzhi Yanjiu* 2002;29:96-98
- 40 Lim MS, Adamson A, Lin Z, Perez-Ordonez B, Jordan RC, Tripp S, Perkins SL, Elenitoba-Johnson KS. Expression of Skp2, a p27 (Kip1) ubiquitin ligase, in malignant lymphoma: correlation with p27(Kip1) and proliferation index. *Blood* 2002;100:2950-2956
- 41 Liang J, Zubovitz J, Petrocelli T, Kotchetkov R, Connor MK, Han K, Lee JH, Ciarallo S, Catzavelos C, Beniston R, Franssen E, Slingerland JM. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 2002;8:1153-1160
- 42 Viglietto G, Motti ML, Bruni P, Melillo RM, D'Alessio A, Califano D, Vinci F, Chiappetta G, Tschlis P, Bellacosa A, Fusco A, Santoro M. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 2002;8:1136-1144

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2003 年度 World Journal of Gastroenterology®

本刊讯 美国科学信息研究所 (ISI) 2001 年《期刊引用报告》(Journal Citation Reports, JCR®) 报道我国科技期刊 59 种, 其中包括医学领域 3 种, 分别为世界胃肠病学杂志英文版(WJG)影响因子 1.445, 中国药理学报英文版影响因子 0.631, 中华医学杂志英文版影响因子 0.108. Science Citation Index- Expanded (SCI-E®) 收录世界领先的胃肠病学和肝病学期刊 44 种, 其中包括 WJG. Current Contents/Clinical Medicine®(即时目次 / 临床医学) 收录世界领先的 1130 种期刊和书所登载的文章, 社论, 会议摘要, 评论及其他重要信息的完整的书刊目次信息. 其中收录世界领先的胃肠病学和肝病学期刊 36 种, 其中包括 WJG. Clinical Medicine Citation Index® 收录世界领先的胃肠病学和肝病学期刊 43 种, 其中包括 WJG. WJG 由 122 位胃肠病学学者组成的编委会, 分布在 65 个国家和地区. WJG 被美国《医学索引 (Index Medicus / MEDLINE)》, 美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA), 荷兰《医学文摘库 / 医学文摘 (EMBASE/ Excerpta Medica, EM)》, 俄罗斯《文摘杂志》(Abstract Journal, AJ) 收录. 国内被中国科技论文统计与分析, 世界消化学网数据库收录, 国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊. WJG, 1999 年度, 2000 年度, 2001 年度被评为山西省一级期刊. 中华人民共和国科学技术部, 国科发财字[2001]340 号文件 2001-09-10 关于公布科技期刊方阵名单的通知. 按照期刊方阵入选要求和比例, 经部门推荐、专家评审, 最终从推荐名单中选出科技期刊 716 种进入中国期刊方阵, 其中“双高”期刊 40 种, “双奖”期刊 58 种, “双百”期刊 122 种, “双效”期刊 496 种. WJG 在众多消化类期刊中惟一进入双百期刊行列. 中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告: 2001 年 WJG 总被引频次 1844, 影响因子 2.92, 即年指标 0.694, 他引总引比 0.52, 地区分布数 20, 基金和资助论文比例 0.549, 海外作者论文数 0.353, 指标综合加权评分 57.268. WJG® 2003 年月刊, 大 16 开, 256 页 / 期, 定价 50.00 元 / 期, 邮发代号 82-261. E-mail: wjg@wjgnet.com http://www.wjgnet.com (世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

腺病毒介导的 cox-2 反义 RNA 对食管癌细胞株 DNA 和蛋白质合成的影响

李胜保,吴清明,王强,王小虎,谢国建

李胜保,吴清明,王强,王小虎,谢国建,郟阳医学院附属太和医院消化内科
湖北省十堰市 442000

李胜保,男,1970-09-21生,湖北省郟县人,汉族. 1994年郟阳医学院本科毕业,
2001年武汉大学医学院硕士研究生毕业,主治医师. 主要从事消化道肿瘤的
防治.

项目负责人:李胜保,442000,湖北省十堰市人民南路29号,太和医院消化内
科. libao2000@163.com

电话:0719-8801431

收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-08-23

Effects of adenovirus-mediated human
cox-2 antisense RNA on synthesis of
DNA and proteins in esophageal carcinoma
cell line

Sheng-Bao Li, Qing-Ming Wu, Qiang Wang, Xiao-Hu Wang,
Guo-Jian Xie

Sheng-Bao Li, Qing-Ming Wu, Qiang Wang, Xiao-Hu Wang, Guo-Jian Xie,
Department of Gastroenterology, Taihe affiliated Hospital, Yunyang
Medical college, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Correspondence to: Dr. Sheng-Bao Li, Department of Gastroenterology,
Taihe Affiliated Hospital, Yunyang Medical College, 29 Renmin south
Road, Shiyan 442000, Hubei Province, China. libao2000@163.com

Received: 2002-08-10 Accepted: 2002-08-23

Abstract

AIM: To construct the recombinant adenovirus encoding human cox-2 antisense RNA, and to investigate its effect on synthesis of DNA and proteins in esophageal carcinoma cell line EC9706.

METHODS: The shuttle plasmid encoding antisense cox-2 was constructed by cloning cox-2 cDNA fragment in the reverse direction into the pHCMVSP1A. Then the plasmid pJM17 and the shuttle plasmid were cotransferred into 293 cells with lipofectamine for homologous recombination to acquire recombinant adenovirus confirmed by PCR. The expressions of cox-2 in esophageal carcinoma cell line EC9706 cells were evaluated, and its effects on cell proliferation were determined by cell growth rate, ^3H -TdR and ^3H -Leucine incorporation.

RESULTS: The recombinant adenovirus encoding antisense cox-2 fragment ad-ASHcox-2 was obtained with the titer of 0.86 ± 10^{12} PFU/ml. Ad-ASHcox-2 can reduce the expression of cox-2, and inhibit cell growth rate and cause cellular death. Meanwhile, The efficiency of ^3H -TdR and ^3H -Leucine incorporation was significant lower than that in the control group at 48, 72, 96 hours ($q_{48\text{h}} = 16.36$ vs 16.36 , $q_{72\text{h}} = 39.07$ vs 19.90 , $q_{96\text{h}} = 54.80$ vs 30.33 ; $P < 0.001$).

CONCLUSION: Reducing the expression of cox-2 may inhibit the proliferation of esophageal cancer cells through inhibiting

the synthesis of DNA and protein.

Li SB, Wu QM, Wang Q, Wang XH, Xie GJ. Effects of adenovirus-mediated human cox-2 antisense RNA on synthesis of DNA and proteins in esophageal carcinoma cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):517-521

摘要

目的: 构建表达人 cox-2 反义 RNA 的腺病毒载体, 研究其对食管癌细胞株 DNA 和蛋白质合成的影响。

方法: 把人 cox-2 的 cDNA 片段反向克隆于穿梭质粒 pHCMVSP1A 的 CMV 启动子之下, 获得 pAd-ASHcox-2, 通过脂质体与 pJM17 共转染 293 细胞, 经同源重组产生编码 cox-2 反义 RNA 的重组腺病毒 -- Ad-ASHcox-2. 经 PCR 的方法鉴定为阳性克隆并大量扩增、纯化, 转染食管癌细胞 EC9706, 采用生长细胞计数, 免疫细胞化学、 ^3H -TdR、 ^3H -Leucine 掺入法, 研究对食管癌细胞生长、DNA 及蛋白质合成的影响。

结果: 成功构建并扩增、纯化得到编码 cox-2 反义 RNA 的重组腺病毒 Ad-ASHcox-2, 滴度达 0.86×10^{12} PFU/ml; Ad-ASHcox-2 感染肿瘤细胞后, cox-2 表达水平明显降低, ^3H -TdR、 ^3H -Leucine 掺入量明显减少, 与对照组在 48h、72h、96h 比较有显著性差异 ($q_{48\text{h}} = 16.36$ 及 16.36 , $q_{72\text{h}} = 39.07$ 及 19.90 , $q_{96\text{h}} = 54.80$ 及 30.33 ; $P < 0.001$); 同时发现食管癌细胞的生长明显受抑制。

结论: 表达 cox-2 反义 RNA 重组腺病毒感染人食管癌细胞后可降低 cox-2 表达水平, 使 DNA 合成降低、蛋白质合成减少, 且抑制食管癌细胞生长、增生, 提示抑制 cox-2 的表达可能是治疗食管癌的一种新途径。

李胜保, 吴清明, 王强, 王小虎, 谢国建. 腺病毒介导的 cox-2 反义 RNA 对食管癌细胞株 DNA 和蛋白质合成的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):517-521
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/517.htm>

0 引言

近年来, 流行病学资料研究表明长期坚持服用非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID) 如阿司匹林等可使大肠癌的危险性降低 40-50%^[1,2], 使家族性腺瘤型息肉病(familial adenomatous polyposis, FAP) 的癌变率和死亡率降低, 使息肉数量和体积减小^[3]. NSAID 类药物作用的中心环节是抑制环氧酶(cyclooxygenase,

cox)的活性,而cox是花生四烯酸转化为前列腺素(prostaglandins,PGs)的限速酶,他有两个同工异构体^[4]-cox-1和cox-2,其中cox-1为原生型,在机体大多数组织中都有不同水平的表达,经cox-1途径产生的PGs在机体中主要起生理性保护作用,因此cox-1又称“管家基因”(housekeeping gene);cox-2为诱生型,在机体大多数组织中无表达(平滑肌细胞血管内皮细胞、炎性细胞除外),多因各种生长因子、丝裂原、内毒素、前致癌物等刺激后迅速产生,在许多癌组织中高度表达,可能与癌症的发生、发展有关^[5]。本课题利用基因重组技术构建cox-2的反义RNA重组腺病毒,转染人食管癌细胞株EC9706,研究其对食管癌细胞生长、DNA合成的影响,进一步探讨cox-2的促癌机制。

1 材料和方法

1.1 材料 酶及主要试剂 内切酶BamHI、XbaI、T₄DNA Ligase 购自华美生物工程公司;1640、Lipofectamine 购自GIBCO/BRL公司,低熔点琼脂糖,X-gal 购自Promega公司;CsCl 购自Sigma公司;³H-TDR、³H-Leucine 购自北京原子能研究所;cox-1、cox-2 抗体购自Santa Cruz公司,SP试剂盒购自北京中山生物公司;cox-2cDNA及腺病毒PCR引物由赛百胜生物公司设计、合成。质粒和菌株Ad-LacZ由我分子生物学实验室王家宁博士惠赠,cox-2质粒PCRTM Vector由美国Vanderbilt University 管又飞博士惠赠,pHCMVSP1A和pJM17由军事科学院二所吴祖泽院士惠赠。DH_{5α}由北京医科大学第一医院心内科彭旭博士惠赠。细胞系293细胞为腺病毒E1区基因转化的人胚肾细胞系,培养条件为10%新生小牛血清的高糖DMEM培养液,在37℃、5%CO₂孵箱中培养。食管癌细胞株EC9706由中国医学科学院王明荣教授惠赠,培养条件为3%1640,在37℃、5%CO₂孵箱中培养。仪器高速冷冻离心机(Jouan,意大利),二氧化碳培养箱(sanyD,日本),超高速冷冻离心机(Hitachi,日本),倒置相差显微镜(Olympus IX-70,日本),PCR扩增仪(美国),液体闪烁计数仪(美国Beckman),紫外分光光度计(752型,上海),空气浴、水浴摇床。

1.2 方法 (1)cox-2反义RNA重组腺病毒载体的构建、鉴定、扩增、纯化、滴度测定 质粒pCRTMII-cox-2经XbaI BamHI双酶切获得COX-2 cDNA片段,反向克隆于穿梭质粒pAdHCMV SP1A的XbaI、BamHI两位点上;连接产物为pAd-AShcox-2,后者经转化大肠杆菌DH_{5α}进行质粒扩增,酶切鉴定为阳性质粒后进行大量扩增、纯化。Lipofectamin介导穿梭质粒pAd-AShcox-2与pJM17共转染293细胞,待293细胞出现病变、脱落细胞约20%再收集上清。取病毒上清提取病毒DNA,经PCR鉴定。cox-2上游引物:5'-TTG GCT TCA AGA CTG AGA TA-3',下游引物:5'-

AGC CCA AAT TAT TGG TTC;腺病毒引物上游引物:5'-TCG TTT CTC AGC AGC TGT TG-3',下游引物:5'-CAT CTG AAC TCA AAG CGT GG-3'。PCR反应体系:取病毒DNA 10 μl,20 μmol/L引物各10 μl(腺病毒引物为5 μl),10 × PCR buffer 5 μl,MgCl₂ 2 μl,2 mmol/L dNTP 5 μl,Taq酶1 μl,加水至PCR反应终体积50 μl,用矿物油覆盖,94℃变性5 min,然后94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 60 s,循环30次,最后72℃延伸10 min,在1.0%琼脂糖凝胶中进行电泳,能同时扩增cox-2的cDNA片段和腺病毒片段为阳性重组克隆,不加模板进行PCR扩增作为阴性对照。鉴定为阳性重组腺病毒后反复转染293细胞,收集293细胞,反复冻融碎裂293细胞,用CsCl超速梯度离心2次,收集病毒,经透洗袋纯化病毒,最后用有限稀释法进行病毒滴度测定。(2)病毒感染率测定 用带有LacZ报告基因的重组腺病毒Ad-LacZ按不同的感染倍数(multiplicity of infection,MOI)感染食管癌细胞,48 h后固定细胞,X-gal染色,显微镜下计数被染成蓝色的细胞,即为LacZ基因表达的阳性细胞,确定蓝染百分率。(3)细胞生长曲线 细胞按1 × 10⁴/孔分别接种在24孔培养板中,细胞长至40-50%融合时,按一定的MOI感染癌细胞,定期消化收集细胞,每个时间点设三个平行组,计数取平均值及标准差,连续计数4 d。对照组包括加病毒Ad-LacZ组和不加病毒组。(4)食管癌细胞cox-2的表达的测定 分别取第24、48、72、96小时培养的癌细胞进行消化、收集、离心,PBS漂洗1次,吹散食管癌细胞,作细胞涂片,电吹风吹干后,用4℃冷丙酮固定10 min。此后按SP免疫细胞化学实验方法进行。(5)³H-TdR及³H-Leucine掺入试验 按1 × 10⁴/孔分别接种在24孔培养板中,待细胞长到40-50%融合时,实验组和对照组3%Fcs1640培养3 h后改为无Fcs1640,培养12 h,各组加入1 μCi ³H-TdR或³H-Leucine,分别于24 h,48 h,72 h用PBS漂洗1次,甲醇固定10 min,无水乙醇10 min,最后加0.1 M的NaOH 200 μl,经吹打后各取200 μl入5 ml闪烁液中混匀、过夜,次日测定³H放射强度(CPM);每组设三孔,重复三次。

统计学处理 先F检验,后用q检验。

2 结果

2.1 表达cox-2反义RNA重组腺病毒的构建 将目的基因cox-2 cDNA片段反向克隆到pAdHCMVSP1A上,酶切鉴定挑选表达cox-2反义RNA的重组质粒pAd-AShcox-2(见图1),使其和pJM17共转染293细胞,经同源重组,产生编码cox-2反义RNA的复制缺陷型重组腺病毒Ad-AShcox-2,PCR鉴定结果(见图2),扩增产物为277 bp的cox-2 cDNA片段和860 bp的病毒基因骨架片段;Ad-AShcox-2经扩增、提取、纯化,经测定Ad-AShcox-2滴度达0.86 × 10¹²PFU/ml。

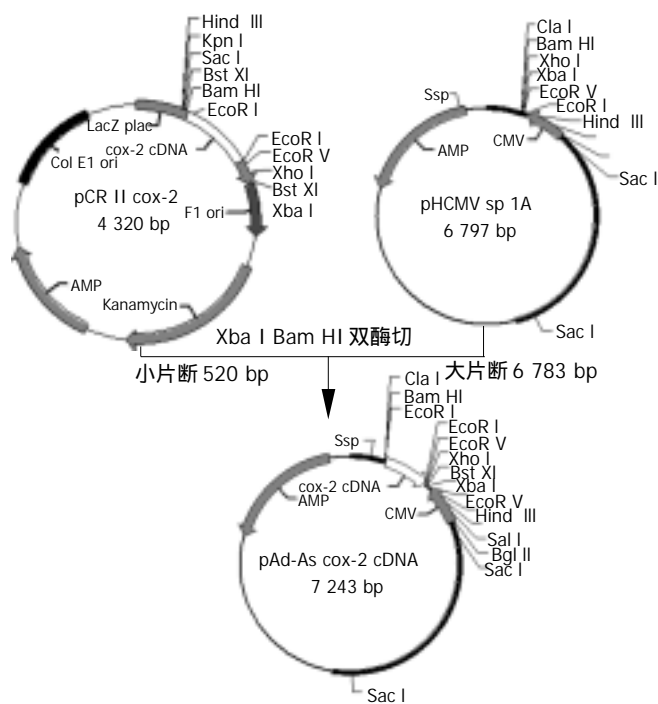


图1 基因重组图谱.

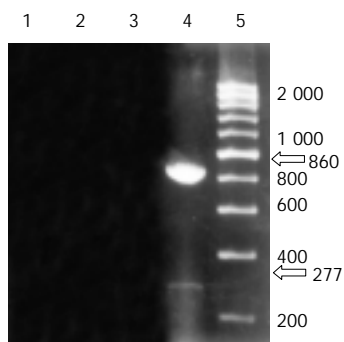


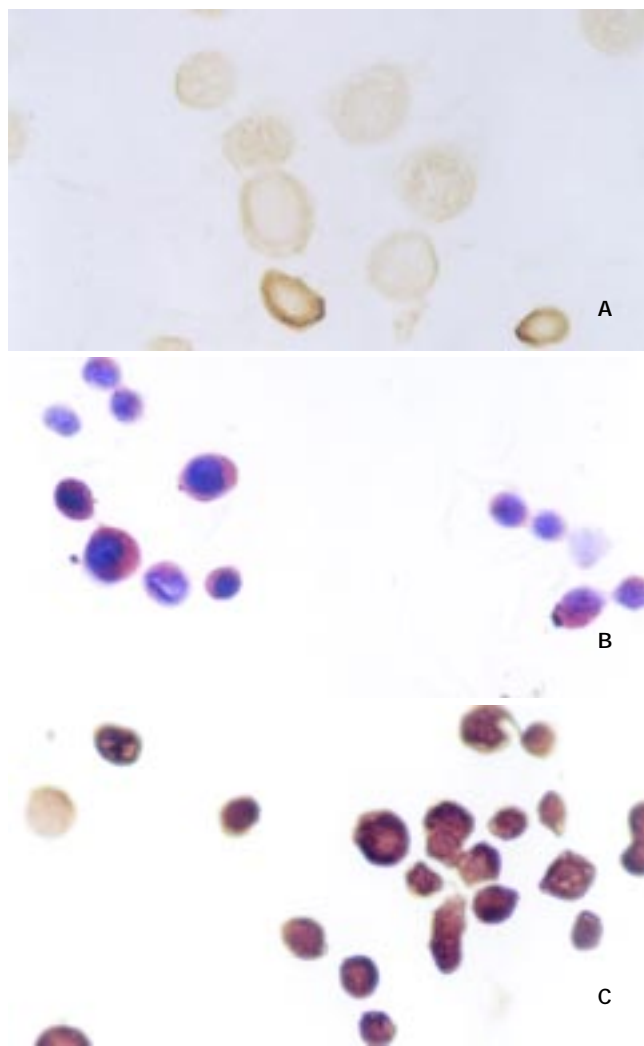
图2 琼脂糖凝胶电泳鉴定 Ad-ASHcox-2 的 PCR 扩增结果. 1:对照组; 2:pHCMVSP1A 组;3:pAd-ASHcox-2 组; 4:Ad-ASHcox-2 组;5: 200 bp Ladder.

2.2 重组腺病毒的转染效率 Ad-LacZ 按 MOI 为 25、50、100、200 的强度分别感染食管癌细胞, 48 h 后进行 X-gal 染色, 显示转染效率分别为 90 %、100 %、100 %、100 %, 表明 MOI >25 时, 90 % 以上的 EC9706 细胞被 Ad-LacZ 感染.

2.3 免疫细胞化学染色 结果显示:实验组 Ad-ASHcox-2 cox-2 表达与对照组 Ad-LacZ 组和空白对照组比较明显减少, 病毒转染第 3 天表达水平最低(见图 3).

2.4 细胞生长曲线 细胞生长曲线显示 Ad-ASHcox-2 组癌细胞计数随时间推移有明显降低的趋势, 第 96 小时细胞计数最少; 而 Ad-LacZ 组和空白对照组癌细胞计数随时间的推移有明显增多的趋势(见图 4).

2.5 Ad-ASHcox-2 对食管癌细胞 ³H-TdR 及 ³H-Leucine 掺入量的影响 Ad-ASHcox-2 组 ³H-TdR 及 ³H-Leucine 掺入量明显低于对照组(P < 0.001), 并随着时间的推移有下降的趋势, 以第 4 天最明显; 而 Ad-LacZ 组和空白对照组 ³H-TdR 及 ³H-Leucine 掺入量均在增加, 二者比较无统计学差异(P > 0.05)(见表 1, 表 2).



A Ad-ASHcox-2 组大部分 EC9706 细胞 Cox-2 表达明显减少. B Ad-LacZ 组 EC97076 细胞 Cox-2 高表达. C 空白对照组 EC9706 细胞 Cox-2 高表达. 图3 实验组 Ad-ASHcox-2、对照组 Ad-LacZ 组和空白对照组 cox-2 表达情况.

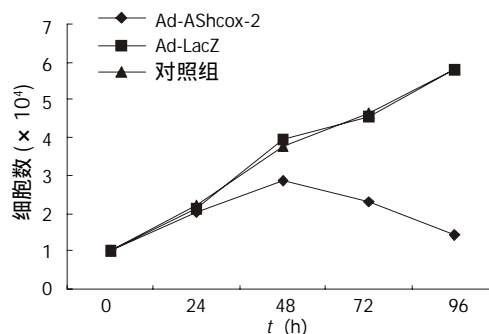


图4 Ad-ASHcox-2 及 Ad-LacZ 对食管癌细胞株 EC9706 生长的影响.

表1 ³H-TdR 掺入量(̄x ± s CPM/Well)

组别	48 h	72 h	96 h
Ad-ASHcox-2	2 504.67 ± 340.74 ^a	2 372.22 ± 115.18 ^b	279.22 ± 45.36 ^b
Ad-LacZ	3 481.78 ± 114.57	3 656.44 ± 82.75	4 424.67 ± 82.75
Control group	3679 ± 99.51	3 750.67 ± 71.77	4 400.44 ± 381.56

三组之间的比较:F_{48h}=76.75,F_{72h}=548.77,F_{96h}=995.80 (P < 0.001);反义基因组与空白对照组的比较:q_{48h}=16.36,q_{72h}=39.07,q_{96h}=54.80 (^bP < 0.001);LacZ基因组与空白对照组的比较:q_{48h}=2.75,q_{72h}=2.87,q_{96h}=0.32(P > 0.05)

表2 ³H-Leucine 掺入量($\bar{x} \pm s$ CPM/Well)

组别	48 h	72 h	96 h
Ad-ASHcox-2	546.22 ± 53.54 ^b	499.22 ± 24.76 ^b	232.44 ± 67.74 ^b
Ad-LacZ	989.33 ± 102.44	1 038.11 ± 83.07	1 024.56 ± 90.45
空白组	959.33 ± 62.11	1 081.567 ± 110.78	1 009.56 ± 70.37

三组之间的比较: $F_{48h}=8.02, F_{72h}=143.59, F_{96h}=312.75(P<0.05)$;反义基因组与空白对照组间的比较: $q_{48h}=16.36, q_{72h}=19.90, q_{96h}=30.33$ ($^bP<0.001$); LacZ基因组与空白对照组间的比较: $q_{48h}=1.18, q_{72h}=1.61, q_{96h}=0.58(P>0.05)$.

3 讨论

食管癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一,死亡率很高,近年来发病率呈上升趋势.对食管癌的治疗传统方法有手术、放疗、化疗和生物治疗^[6-9],但这些方法对中晚期食管癌效果差、并发症多,使临床应用受限;因此,寻求一种新的方法极为迫切.近几十年来,大量研究发现食管癌癌变过程是一个多因素、多阶段、多基因变异的综合过程,尤其基因结构的改变和表达异常是食管癌发生的分子基础.反基因技术就是针对这种机制设计治疗癌症的一种新方法^[10-16].

我们构建表达cox-2反义RNA重组腺病毒就是利用反义核酸技术的原理,能持续表达cox-2的反义RNA,封闭cox-2基因,使之表达减少.本研究结果显示Ad-ASHcox-2感染食管癌细胞株EC9706后,cox-2表达明显减少,这是因为Ad-ASHcox-2能抑制cox-2的转录、翻译,与mRNA结合使mRNA稳定性降低;另外与腺病毒的高效转导有关^[17].

大量的研究报道cox-2在胃癌、肝癌、大肠癌等^[18-21]消化道肿瘤中高度表达,而正常组织不表达或弱表达;我们前期的研究^[22]也证实cox-2在食管癌组织中高度表达,与淋巴转移有关;Tsujii et al^[23]将cox-2基因转染到小鼠肠上皮细胞时发现,cox-2高表达可使上皮细胞异型性增生,出现恶性表型,使抗凋亡基因表达下调;使用cox-2的抑制剂可对抗这种作用^[24-26],说明cox-2在癌症的发生、发展中可能扮演重要角色.本研究结果显示Ad-AScox-2转染食管癌细胞株后,细胞生长曲线呈下降趋势,而对照组呈上升趋势,表明Ad-AScox-2能抑制食管癌细胞的生长增生.吴汉平 et al^[27]也发现cox-2反义核酸转染胃癌细胞时癌细胞生长受限,提示cox-2可能成为癌症基因治疗的一个靶位. Ad-LacZ组与空白对照组食管癌细胞生长曲线几乎重叠,表明腺病毒对食管癌细胞无毒害作用.

细胞³H-TdR掺入量的多少是细胞DNA合成快慢的标志^[28],³H-Leucine掺入量可以反映蛋白质合成的快慢^[29],本研究发现Ad-ASHcox-2组与对照组比较,³H-TdR及³H-Leucine掺入量均明显减少($P<0.001$),说明Ad-ASHcox-2使cox-2表达降低后,可抑制肿瘤细胞DNA和蛋白质的合成,使EC9706细胞有丝分裂所需原料合成减少,从而发挥抑癌作用.

另外,我们实验中还发现Ad-ASHcox-2转染癌细胞后,有大量癌细胞脱落、坏死、呈葡萄状改变,说明Ad-ASHcox-2对癌细胞有直接杀死作用,可能与诱导细胞凋亡作用有关^[30].

本研究结果显示表达cox-2反义RNA重组腺病毒感染人食管癌细胞后可降低cox-2表达水平,使DNA和蛋白质合成降低,且抑制食管癌细胞生长、增生,进一步说明cox-2与食管癌的发生发展有关;抑制cox-2的表达可能是治疗食管癌的一种新途径.

4 参考文献

- Williams CS, Smalley W, DuBois RN. Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention. *J Clin Invest* 1997; 100:1325-1329
- Wang Q, Fan LY, He J, Wang YH. Inhibitory effect of sulindac against chemically-induced primary colonic tumors by N-methyl-N-nitrosourea in mice. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:16-18
- Giardiello FM, Spannhake EW, DuBois RN, Hyland LM, Robinson CR, Hubbard WC, Hamilton SR, Yang VW. Prostaglandin levels in human colorectal mucosa: effects of sulindac in patients with familial adenomatous polyposis. *Dig Dis Sci* 1998;43:311-316
- Williams CS, DuBois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 1996;270(3 Pt 1):G393-400
- Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 2000;105:1511-1513
- 李方儒. 食管癌的放射治疗和化学治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:1024-1026
- 王苑本, 余国行, 高友芝. 食管癌的治疗方法和实施原则. 世界华人消化杂志 2000;8:1021-1023
- 刘心娟, 王帮茂. 食管癌的生物治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:1027-1029
- 陈克能, 徐光炜. 食管癌的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:196-202
- Tang YC, Li Y, Qian GX. Reduction of tumorigenicity of SMMC-7721 hepatoma cells by vascular endothelial growth factor antisense gene therapy. *World J Gastroenterol* 2001;7:22-27
- 范应方, 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
- 冷建军, 陈玉强, 冷希圣. 胰腺癌的基因治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:916-918
- Chen JP, Lin C, Xu CP, Zhang XY, Wu M. The therapeutic effects of recombinant adenovirus RA538 on human gastric carcinoma cells in vitro and in vivo. *World J Gastroenterol* 2000;6:855-860
- 何兴祥, 王家马龙. 肝癌基因治疗的现状与展望. 华人消化杂志 1998;6:158-159
- Cao GW, Qi ZT, Pan X, Zhang XQ, Miao XH, Feng Y, Lu XH, Kuriyama S, Du P. Gene therapy for human colorectal carcinoma using human CEA promoter controlled bacterial ADP-ribosylating toxin genes human CEA: PEA & DTA gene transfer. *World J Gastroenterol* 1998;4:388-391
- Zhang XY. Some recent works on diagnosis and treatment of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 1999;5:1-3
- Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene Expression. The role of the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 2000;275:11750-11757
- Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:1276-1280
- Shiota G, Okubo M, Noumi T, Noguchi N, Oyama K, Takano Y, Yashima K, Kishimoto Y, Kawasaki H. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999;46:407-412
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107:1183-1188
- 郜恒骏, 于连珍, 孙亮, 缪琨, 白剑峰, 张小勇, 吕秀珍, 赵志泉. 胃癌及癌旁

- 组织中cox-2基因蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:578-579
- 22 吴清明,李胜保,王强,王德华,李晓斌,刘重贞. 食管癌cox-2高表达与临床病理特征的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:11-14
- 23 Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 1995;83:493-501
- 24 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of sulindac on human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 25 Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 26 Meyer-Siegler K. COX-2 specific inhibitor, NS-398, increases macrophage migration inhibitory factor expression and induces neuroendocrine differentiation in C4-2b prostate cancer cells. *Mol Med* 2001;7:850-860
- 27 吴汉平,吴开春,李玲,么立萍,兰梅,王新,樊代明. 人环氧合酶-2(hcox-2)编码基因的克隆及其反义核酸转染胃癌细胞的初步研究. 世界华人消化病杂志 2000;8:1211-1217
- 28 Lavezzi AM, Biondo B, Repetti ML, Varesi C, Masini B, Matturri L. Prognostic implications of the proliferation index (3H-TdR-labeling index) and ploidy in neuroectodermal tumors (astrocytomas and glioblastomas). *Minerva Med* 1992;83:115-119
- 29 Rabinovitz YM, Pinus HA, Kotelnikova AV. A study of dependence of protein synthesis in mitochondria on the transmembrane potential. *Mol Cell Biochem* 1977;14:109-113
- 30 Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 1998;58:362-366

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版目次

2003 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2003.htm> 2002 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2002.htm> 2001 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2001.htm> 2000 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/2000.htm> 1999 世界华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1999.htm> 1998 华人消化杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1998.htm> 1997 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1997.htm> 1996 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1996.htm> 1995 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1995.htm> 1994 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1994.htm> 1993 新消化病学杂志电子版 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/contents/1993.htm>

2003 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2003.htm> 2002 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2002.htm> 2001 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2001.htm> 2000 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/2000.htm> 1999 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1999.htm> 1998 World J Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1998.htm> 1997 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1997.htm> 1996 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1996.htm> 1995 China Natl J New Gastroenterol 电子版 <http://www.wjgnet.com/1007-9327/contents/1995.htm>

以上电子版如您需要请 E-mail 回复, 免费提供您使用. E-mail 地址: wjg@wjgnet.com. 以后将新出版的世界华人消化杂志和 World J Gastroenterol 电子版用 E-mail 发给您收. 希望您推荐 10 位消化专业工作者的 E-mail 地址, 让您的朋友也能获得电子版.
(世界胃肠病学杂志社 2003-01-15)

胃癌 SMAD4/DPC4 杂合性丢失的研究

朱亚青, 尹浩然, 朱正纲, 刘炳亚, 张奕, 陈雪华, 于颖彦, 林言箴

朱亚青, 尹浩然, 朱正纲, 刘炳亚, 张奕, 陈雪华, 于颖彦, 林言箴, 上海第二医科大学附属瑞金医院外科 上海消化外科研究所 上海市 200025
朱亚青, 男, 1971-08-27生, 江苏省如皋市人, 汉族. 1994年南京医科大学本科毕业, 2000年上海第二医科大学在读博士研究生, 主治医师. 主要从事胃肠道肿瘤的基础和临床研究.

项目负责人: 尹浩然, 200025, 上海市瑞金二路 197 号, 上海第二医科大学附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所. yqzhu@hotmail.com
电话: 021-64370045

收稿日期: 2002-08-24 接受日期: 2002-10-18

Loss of heterozygosity of SMAD4/DPC4 in gastric carcinoma

Ya-Qing Zhu, Hao-Ran Yin, Zheng-Gang Zhu, Bing-Ya Liu, Yi Zhang, Xue-Hua Chen, Ying-Yan Yu, Yan-Zhen Lin

Ya-Qing Zhu, Hao-Ran Yin, Zheng-Gang Zhu, Bing-Ya Liu, Yi Zhang, Xue-Hua Chen, Ying-Yan Yu, Yan-Zhen Lin, Department of Surgery, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China

Correspondence to: Hao-Ran Yin, Department of Surgery, Shanghai Institute of Digestive Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China. yqzhu@hotmail.com

Received: 2002-08-24 Accepted: 2002-10-18

Abstract

AIM: To investigate the role of loss of heterozygosity (LOH) of SMAD4/DPC4 and the relationship between the LOH and other clinicopathological factors in gastric carcinoma.

METHODS: Total 50 cases of gastric carcinoma were monitored with PCR-SSCP and silver staining was performed to detect LOH of SMAD4/DPC4.

RESULTS: The incidence of LOH was found in 36.2 % (17/47) of D18S46, 39.1 % (18/46) of D18S474 and 59.2 % (29/49) of SMAD4/DPC4, respectively. The prevalence of SMAD4/DPC4 LOH increased progressively from intromucosal to advanced deeply invasive cancers ($P < 0.05$). The frequency of SMAD4/DPC4 LOH was significantly higher in TNM and stage than those in TNM and stages ($P < 0.05$). SMAD4/DPC4 LOH was statistically significant association with tumor size ($P < 0.05$). And a strong correlation between SMAD4/DPC4 LOH and Borrmann classification was observed ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The SMAD4/DPC4 LOH may promote the progression of gastric carcinoma and is an important molecular event in the development of the tumor at advanced stage.

Zhu YQ, Yin HR, Zhu ZG, Liu BY, Zhang Y, Chen XH, Yu YY, Lin YZ. Loss of heterozygosity of SMAD4/DPC4 in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):522-525

摘要

目的: 探讨胃癌中 SMAD4/DPC4 杂合性丢失 (loss of heterozygosity, LOH) 与胃癌临床病理的关系。

方法: 用多聚酶链反应 - 单链构相多态性 (PCR-SSCP) 银染法分析 50 例原发性胃癌 SMAD4/DPC4 的杂合性丢失。

结果: D18S46 LOH 为 36.2 % (17/47), D18S474 LOH 为 39.1 % (18/46), DPC4 LOH 为 59.2 % (29/49)。SMAD4/DPC4 LOH 的发生率随着胃壁浸润深度的加深而增高, 随着 TNM 分期的增加而增高 ($P < 0.05$)。胃癌直径 ≥ 5 cm 时, SMAD4/DPC4 LOH 要明显高于胃癌 < 5 cm 时 ($P < 0.05$)。SMAD4/DPC4 LOH 在 Borrmann 分型中有显著性差异 ($P < 0.05$)。

结论: SMAD4/DPC4 的杂合性丢失可能在胃癌的发展中起重要作用, 是胃癌发展后期的重要分子事件。

朱亚青, 尹浩然, 朱正纲, 刘炳亚, 张奕, 陈雪华, 于颖彦, 林言箴. 胃癌 SMAD4/DPC4 杂合性丢失的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):522-525

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/522.htm>

0 引言

胃癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 18 号染色体长臂 (18q) 上遗传物质的丢失在许多肿瘤中是一种常见现象^[1-8], 特别在胰腺癌和结肠癌中^[9-12], 而其在胃癌中的作用还不明确。我们分析了胃癌标本中位于 18q21 位点上的 SMAD4/DPC4 抑癌基因的杂合性丢失, 并探讨其与胃癌临床病理学之间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 瑞金医院 2001-2002 年手术切除胃癌标本 50 例, 男 29 例, 女 21 例, 年龄 59 ± 14 岁; 术前未经任何化放疗 (表 1)。肿瘤根据 UICC 规定 (Sobin L, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. 5th Ed. 1997: 59-62) 分型。新鲜的肿瘤和正常胃组织手术切除后立即用液氮速冻, 并保存在 -80 直至 DNA 抽提。

1.2.1 方法 所有癌组织均经冰冻切片, HE 染色。连续切 $10 \mu\text{m}$ 厚的冰冻切片 10-20 张, 对癌细胞比例在 70 % 以下的标本行显微切割。显微切割参照 Lo et al^[13] 的方法, 稍作修改。参照相对应的 HE 染色切片, 在 40 倍显微镜下用 5 号无菌注射器将肿瘤细胞与正常组织切割开来, 将其转入 1.5 mL 的 eppendorf 管。用组织裂解液和蛋白酶 K 消化, 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。标准的酚/氯仿/异戊醇法抽提基因组 DNA。用 SMAD4/DPC4 侧翼的两个紧密连锁的微卫星位点 D18S46 和 D18S474 来分析 LOH, 其引物序列见表 2 (参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap>)。引

物由上海博亚生物技术有限公司合成. 50 μ L PCR 反应体系含 10 mmol/L Tris-HCl(pH9.0), 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂, 200 μ mol/L dNTP, 1 U TaqDNA 聚合酶(Promega 公司), 引物各 10 pmol. 各反应液中加入 150 ng 基因组 DNA.PCR 反应条件如下: 96 预变性 10 min, 95 变性 30 s, 56-60 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 循环 30 次, 72 延伸 5 min. PCR 产物加 1:1 的加样缓冲液(980 g/L 去离子甲酰胺, 25 mg/L 二甲苯青, 25 mg/L 溴酚蓝, 10 mmol/L EDTA), 95 变性 6 min, 立即置于冰中. 然后加样于 100 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 80V, 4-5 h. 凝胶经固定(100 ml/L 乙醇 + 10 ml/L 硝酸 10 min), 染色(0.012 mol/L 硝酸银 20-30 min), 显色(0.28 mol/L 碳酸钠 + 19 mg/L 甲醛)至带型清晰, 干胶仪(Bio-Rad 公司)干燥, 用 Flour-STM 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)扫描, Quantity-one 图像分析软件分析图像. 判断标准:参照 Tomlinson et al [14], 当扩增产物为 2 条分开的主要条带时, 说明此位点为杂合性, 判断为信息个体. 如肿瘤条带中的一条的信号强度与其正常对照组织相应产物比较, 减弱 50% 以上或消失, 判断为杂合性丢失(loss of heterozygosity, LOH); 与正常对照相比, 如出现异常条带, 则判断为微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI); 当正常对照组织的扩增产物仅为一条时, 称为非信息个体, 不能用来判断 LOH. 两个位点中至少有一个位点发生 LOH, 则判断为 SMAD4/DPC4 杂合性丢失.

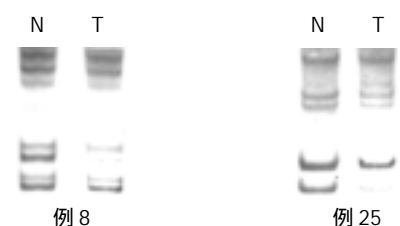
统计学处理 应用 SPSS(10.0 版本)统计学软件对结果进行分析. 计数资料用 χ^2 检验 $>1/5$ 理论频数 <5 时, 采用确切概率法, 对等级分组资料用 Kruskal-Wallis 检验, 以 $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 胃癌 DPC4/SMAD4 杂合性丢失 胃癌 50 例中, D18S46 位点发生杂合性丢失的频率为 36.1%, D18S474 为 39.1%, SMAD4/DPC4 发生杂合性丢失的频率为 59.2% (图 1, 2).



N: 非肿瘤组织; T: 胃癌组织; : 杂合性丢失.
图 1 D18S46 杂合性丢失非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图.



N: 非肿瘤组织; T: 胃癌组织; : 杂合性丢失.
图 2 D18S474 杂合性丢失非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳图.

2.2 DPC4/SMAD4 LOH 与临床病理的关系 随着胃壁浸润深度的加深, SMAD4/DPC4 LOH 的发生率从 20.0% 递升至 37.5%, 64.5% 和 100.0% ($P < 0.05$); TNM 期和 期 SMAD4/DPC4 LOH 为 44.0%, 而 TNM 期和 期则升至 75.0%, 两组有显著性差异 ($P < 0.05$). 胃癌直径 ≤ 5 cm 时, SMAD4/DPC4 LOH 要明显高于胃癌 > 5 cm 时(77.8% 88.4%, $P < 0.05$). 在 Borrmann 分型中, 从隆起型到溃疡型、浸润型, SMAD4/DPC4 LOH 也逐渐增高(33.3% 57.6% 100.0%, $P < 0.05$). SMAD4/DPC4 LOH 与患者的性别、年龄、肿瘤发生部位、组织学分级、Lauren 分型及淋巴结是否发生转移均无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1).

表 1 18q21LOH 与胃癌临床指标的关系

临床指标	n	信息个体数	LOH(%)
男	29	28	17(60.7)
女	21	21	12(57.1)
40 岁	4	4	2(50.0)
> 40 岁	46	45	27(60.0)
贲门	4	4	2(50)
胃体	18	18	10(55.6)
幽门	28	27	17(63.0)
肿瘤 < 5 cm	31	31	15(48.4) ^a
5 cm	19	18	14(77.8)
高分化	1	1	1(100)
中分化	19	19	10(52.6)
低分化	30	29	18(62.1)
Lauren 分型肠型	19	19	10(52.6)
浸润型	26	25	14(56.0)
混合型	5	5	5(100.0)
Borrmann 分型隆起型	3	3	1(33.3) ^b
溃疡型	34	33	19(57.6)
弥漫型	8	8	8(100.0)
浸润 T1	5	5	1(20.0) ^c
T2	8	8	3(37.5)
T3	32	31	20(64.5)
T4	5	5	5(100.0)
淋巴结转移	24	24	12(50.0)
无转移	26	25	17(68.0)
TNM 分期 +	25	25	11(44.0) ^d
+	25	24	18(75.0)
早期胃癌	5	5	1(20.0)
进展期胃癌	45	44	28(63.6)

^a $P < 0.05$ vs ≤ 5 cm 组, ^b $P < 0.05$ Borrmann 分型组间比较, ^c $P < 0.05$ 浸润深度组间比较, ^d $P < 0.05$ vs TNM 分期 + 期.

表2 微卫星位点序列

微卫星位点	序列	退火温度()
D18S46	F 5' -GAATAGCAGGACCTATCAAAGAGC-3' R 5' -CAGATTAAGTAAAAACAGCATATGTG-3'	60
D18S474	F 5' -TGGGGTGTTTACCAGCATC-3' R 5' -TGGCTTTCAATGTCAGAAGG-3'	56

3 讨论

肿瘤的发生和发展是一多步骤参与的过程,有癌基因的活化和抑癌基因的失活^[15-24].根据 Knudson “二次打击学说”^[25],许多抑癌基因的失活是在一对等位基因中,一个突变,另一个丢失,或者两个均丢失.通过杂合性丢失可判断染色体某一位点的一对等位基因有无丢失,有助于定位及发现抑癌基因.已有报道应用 LOH 分析胃癌中 APC, MCC 和 DCC 的 LOH,发现部分胃癌可能通过 LOH 病理途径发生^[26].染色体 18q LOH 多见于进展期和远处转移的肿瘤,且预后差^[9,11].在 18q21 上存在着多种抑癌基因,如 SMAD4/DPC4, SMAD2 和 DCC.胰腺癌中 80% 可见 18q21 的丢失,结直肠癌中 60% 有 18q21 的丢失,约 1/3 者有 SMAD4/DPC4 的突变^[27].晚期和转移性结直肠癌中, SMAD4/DPC4 的丢失很常见^[11,28,29]. SMAD4/DPC4 表达水平与一些恶性肿瘤发生发展、生物学行为及其预后密切相关,与阴性表达者比较,阳性表达者肿瘤多分化好、生长速度慢、侵袭和转移能力弱,预后较好^[30-33].我们用与 SMAD4 紧密连锁的两个微卫星位点 D18S46 和 D18S474 分析原发性胃癌,发现 SMAD4/DPC4 LOH 为 59.2%. Powell et al^[34] 用与 SMAD4 邻近的两个微卫星位点分析 35 例胃腺癌,发现 SMAD4/DPC4 LOH 为 56%, 与我们的结果很接近. Yustein et al^[35] 用胃腺癌的异种移植植物分析 18q21 的 LOH, D18S474 的 LOH 为 58%, D18S46 LOH 为 53%, 18q21 LOH 为 61%, 结果较我们为高,这可能与他们用的标本是胃癌的移植植物,肿瘤细胞纯度高,掺杂的正常细胞少有关.

我们结果显示 SMAD4/DPC4 LOH 与胃癌的胃壁浸润深度有关,随着浸润深度的加深, LOH 从 T1 20.0%, T2 37.5%, 增高至 T3 64.5% 和 T4 100.0%. Candusso et al^[36] 发现在肠型和混合型胃癌中, 18q21 LOH 随着胃壁浸润深度的加深而增高. 我们结果还显示 SMAD4/DPC4 LOH 与胃癌的病理分期有关, TNM 期和 期的 LOH 明显低于 TNM 期和 期 (44.0% 75.0%, $P < 0.05$). 早期胃癌与进展期胃癌比较, 尽管无统计学意义, 但还是可看到他们的差异 (20% 63.6%, $P = 0.083$), 这可能与我们早期胃癌样本数量少有关. Manzoni et al^[37] 发现 17p 和 18q21 同时存在的杂合性丢失, 多见于 期和 期的进展期胃癌, 且预后差. Maitra et al^[11] 分析了结直肠肿瘤, 发现有远处转移的肿瘤, SMAD4/DPC4 的丢失和突变明显增高, 而表达

却明显降低, 认为 DPC4 的改变多见于进展期肿瘤. 在 Borrmann 分型中, 从隆起型到溃疡型、浸润型, SMAD4/DPC4 LOH 也逐渐增高 ($P < 0.05$). 我们认为 SMAD4/DPC4 的杂合性丢失是胃癌发展的后期事件, 由于 SMAD4/DPC4 表达的降低, TGF- β 信号通路被破坏, 肿瘤细胞从而逃逸 TGF- β 介导的细胞生长抑制和凋亡作用, 促进了胃癌的发生和发展.

胃癌多发生 50 岁以上患者, 少见 40 岁以下患者, 发生 40 岁以下者不足 10%. 有研究提示, 青年人胃癌比老年人胃癌更可能有其分子生物学背景^[38]. 本组 <40 岁组占 8%, 未发现年龄 > 40 岁和 40 岁两胃癌组 SMAD4/DPC4 LOH 检出率有显著差异. 我们研究表明, SMAD4/DPC4 与胃癌的 TNM 分期和胃壁浸润深度有关, 且肿瘤直径 > 5 cm 的胃癌和浸润型胃癌易发生丢失, 其可能在胃癌的发展中起重要作用.

4 参考文献

- 1 Takebayashi S, Ogawa T, Jung KY, Muallem A, Mineta H, Fisher SG, Grenman R, Carey TE. Identification of new minimally lost regions on 18q in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60:3397-3403
- 2 Fung LF, Wong N, Tang N, Lau A, Wong V, Pang CP, Suen M, King W, Johnson PJ. Genetic imbalances in pT2 breast cancers of southern Chinese women. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;124:56-61
- 3 Aoyagi Y, Yokose T, Minami Y, Ochiai A, Iijima T, Morishita Y, Oda T, Fukao K, Noguchi M. Accumulation of losses of heterozygosity and multistep carcinogenesis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res* 2001;61:7950-7954
- 4 Buschges R, Bostrom J, Wolter M, Blaschke B, Weber RG, Lichter P, Collins VP, Reifenberger G. Analysis of human meningiomas for aberrations of the MADH2, MADH4, APM-1 and DCC tumor suppressor genes on the long arm of chromosome 18. *Int J Cancer* 2001;92:551-554
- 5 Blaker H, von Herbay A, Penzel R, Gross S, Otto HF. Genetics of adenocarcinomas of the small intestine: frequent deletions at chromosome 18q and mutations of the SMAD4 gene. *Oncogene* 2002;21:158-164
- 6 Wistuba II, Tang M, Maitra A, Alvarez H, Troncoso P, Pimentel F, Gazdar AF. Genome-wide allelotyping analysis reveals multiple sites of allelic loss in gallbladder carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:3795-3800
- 7 Yin Z, Babiain RJ, Troncoso P, Strom SS, Spitz MR, Caudell JJ, Stein JD, Kagan J. Limiting the location of putative human prostate cancer tumor suppressor genes on chromosome 18q. *Oncogene* 2001;20:2273-2280
- 8 Lollgen RM, Hessman O, Szabo E, Westin G, Akerstrom G. Chromosome 18 deletions are common events in classical midgut carcinoid tumors. *Int J Cancer* 2001;92:812-815
- 9 Biankin AV, Biankin SA, Kench JG, Morey AL, Lee CS, Head DR, Eckstein RP, Hugh TB, Henshall SM, Sutherland RL. Aberrant p16(INK4A) and DPC4/Smad4 expression in intraductal papillary mucinous tumours of the pancreas is associated with invasive ductal adenocarcinoma. *Gut* 2002;50:861-868
- 10 Tarafa G, Villanueva A, Farre L, Rodriguez J, Musulen E, Reyes G, Seminago R, Olmedo E, Paules AB, Peinado MA, Bachs O, Capella G. DCC and SMAD4 alterations in human colorectal and pancreatic tumor dissemination. *Oncogene* 2000;19:546-555
- 11 Maitra A, Molberg K, Albores-Saavedra J, Lindberg G. Loss of Dpc4 expression in colonic adenocarcinomas correlates with the presence of metastatic disease. *Am J Pathol* 2000; 157:1105-1111
- 12 Had ija MP, Kapitanovic S, Radošević S, Cacev T, Mirt M, Kovacevic D, Cacev T, Hadzija M, Spaventi R, Pavelic K. Loss of heterozygosity of DPC4 tumor suppressor gene in human sporadic colon cancer. *J Mol Med* 2001;79:128-132

- 13 Lo KW, Teo PM, Hui AB, To KF, Tsang YS, Chan SY, Mak KF, Lee JC, Huang DP. High resolution allelotyping of microdissected primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 3348-3353
- 14 Tomlinson IP, Lambros MB, Roylance RR. Loss of heterozygosity analysis: practically and conceptually flawed. *Gene Chromosomes Cancer* 2002; 34: 349-353
- 15 Werner M, Becker KF, Keller G, Hofler H. Gastric adenocarcinoma: pathomorphology and molecular pathology. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001; 127:207-216
- 16 庄则豪, 陈玉丽, 王承党, 陈奕贵. TGF- β 1 及 TGF- β 1 受体在胃癌及癌前病变中的表达. *世界华人消化杂志* 1999; 7:507-509
- 17 张方信, 邓芝云, 张学庸, 康生朝, 汪泳, 余西林, 王宏, 卞晓红. 胃癌患者术后端粒长度变化与预后观察. *世界华人消化杂志* 2000; 8:153-155
- 18 张庆, 刘杰, 张力, 李青, 李勤, 吴汉平, 潘伯荣, 樊代明. 蛋白翻译起始因子 C2 在胃癌组织和细胞系中表达的意义. *世界华人消化杂志* 2001; 9:1157-1161
- 19 张林, 付红梅, 金树珍, 黄润, 周成刚. P53 过度表达及细胞外基质与胃癌分化、浸润和转移的关系. *世界华人消化杂志* 2001; 9:992-996
- 20 万顺梅, 孙少华, 邓明德, 葛勤利, 杨玉捷. 胃癌组织中转化生长因子和血小板源生长因子表达的意义. *世界华人消化杂志* 2002; 10:36-39
- 21 郑志红, 孙秀菊, 邱广蓉, 刘言厚, 王梅先, 孙开来. 胃癌癌前和发展阶段中 E-cadherin 基因的突变. *世界华人消化杂志* 2002; 10:153-156
- 22 王维, 罗和生, 余保平. 胃癌及癌前病变中 hTERT 基因和 c-myc 蛋白的表达意义. *世界华人消化杂志* 2002; 10:258-261
- 23 杨琳, 王艳萍, 吴东瑛, 张素敏, 李锦毅, 张荫昌, 辛彦. 胃印戒细胞癌与黏液腺癌生物学特征及分子病理学机制的比较研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10:516-524
- 24 张燕敏, 邓长生, 朱尤庆, 毛永荣, 张可, 杨院平. 胃腺癌中缺氧诱导因子-1 α mRNA 表达和血管生成的关系. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 633-637
- 25 Knudson AG Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 1985; 45:1437-1443
- 26 房殿春, 周晓东, 罗元辉, 王东旭, 鲁荣, 杨仕明, 刘为纹. 胃癌微卫星不稳定性及抑癌基因杂合缺失. *世界华人消化杂志* 1999; 7:479-481
- 27 Woodford-Richens KL, Rowan AJ, Gorman P, Halford S, Bicknell DC, Wasan HS, Roylance RR, Bodmer WF, Tomlinson IP. SMAD4 mutations in colorectal cancer probably occur before chromosomal instability, but after divergence of the microsatellite instability pathway. *PNAS* 2001; 98:9719-9723
- 28 Salovaara R, Roth S, Loukola A, Launonen V, Sistonen P, Avizienyte E, Kristo P, Jarvinen H, Souchelnytskyi S, Sarlomo-Rikala M, Aaltonen LA. Frequent loss of SMAD4/DPC4 protein in colorectal cancers. *Gut* 2002; 51:56-59
- 29 Ohtaki N, Yamaguchi A, Goi T, Fukaya T, Takeuchi K, Katayama K, Hirose K, Urano T. Somatic alterations of the DPC4 and Madr2 genes in colorectal cancers and relationship to metastasis. *Int J Oncol* 2001; 18:265-270
- 30 Argani P, Shaikat A, Kaushal M, Wilentz RE, Su GH, Sohn TA, Yeo CJ, Cameron JL, Kern SE, Hruban RH. Differing rates of loss of DPC4 expression and of p53 overexpression among carcinomas of the proximal and distal bile ducts. *Cancer* 2001; 91:1332-1341
- 31 Zondervan PE, Wink J, Alers JC, IJzermans JN, Schalm SW, de Man RA, van Dekken H. Molecular cytogenetic evaluation of virus-associated and non-viral hepatocellular carcinoma: analysis of 26 carcinomas and 12 concurrent dysplasias. *J Pathol* 2000; 192:207-215
- 32 Yatsuoka T, Sunamura M, Furukawa T, Fukushige S, Yokoyama T, Inoue H, Shibuya K, Takeda K, Matsuno S, Horii A. Association of poor prognosis with loss of 12q, 17p, and 18q, and concordant loss of 6q/17p and 12q/18q in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:2080-2085
- 33 Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, McCarthy DM, Parsons JL, Yeo CJ, Kern SE, Hruban RH. Loss of expression of Dpc4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression. *Cancer Res* 2000; 60:2002-2006
- 34 Powell SM, Harper JC, Hamilton SR, Robinson CR, Cummings OW. Inactivation of smad4 in gastric carcinomas. *Cancer Res* 1997; 57:4221-4224
- 35 Yustein AS, Harper JC, Petroni GR, Cummings OW, Moskaluk CA, Powell SM. Allelotyping of gastric adenocarcinoma. *Cancer Res* 1999; 59:1437-1441
- 36 Candusso ME, Luinetti O, Villani L, Alberizzi P, Klersy C, Fiocca R, Ranzani GN, Solcia E. Loss of heterozygosity at 18q21 region in gastric cancer involves a number of cancer-related genes and correlates with stage and histology, but lacks independent prognostic value. *J Pathol* 2002; 197:44-50
- 37 Manzoni G, Tomezzoli A, DiLeo AD, 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
- 38 Ruge M, Shiao YH, Busatto G, Cassaro M, Strobbe C, Russo VM, Leo G, Parenti AR, Scapinello A, Arslan P, Egarter-Vigl E. The p53 gene in patients under the age of 40 with gastric cancer: mutation rates are low but are associated with a cardiac location. *Mol Pathol* 2000; 53:207-210

胃癌增生凋亡与调节基因的表达

潘传敬,刘宽宇

潘传敬,刘宽宇,中国人民解放军成都军区总医院病理科 四川省成都市 610083
潘传敬,男,1945-12-18生,四川省达州市人,汉族. 1970年华西医科大学医学系本科毕业,1982年第三军医大学硕士,主任医师,主要从事肿瘤的病理诊断和癌前病变的研究,发表论文 58 篇.

项目负责人:潘传敬,610083,四川省成都市,中国人民解放军成都军区总医院病理科. kent120@etang.com.

电话:028-86570457 传真:028-86570480

收稿日期:2002-07-16 接受日期:2002-07-31

Proliferation/apoptosis and expression of P53 and Bcl-2 in gastric carcinoma

Chuan-Jing Pan, Kuan-Yu Liu

Chuan-Jing Pan, Kuan-Yu Liu, Department of Pathology, Chinese PLA General Hospital of Chengdu Command Area, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Correspondence to: Chuan-Jing Pan, Department of Pathology, Chinese PLA General Hospital of Chengdu Command Area, Chengdu 610083, Sichuan Province, China. kent120@etang.com.

Received:2002-07-16 Accepted:2002-07-31

Abstract

AIM:To study proliferation and apoptosis in gastric carcinoma (GC) and precancerous lesions and expression of their regulating genes.

METHODS:Total 24 cases of GC, 14 dysplasia (DP), 24 chronic gastritis (10 superficial gastritis, SG, 14 atrophic gastritis, AG) and 32 intestinal metaplasia (IM) were studied by histopathological, immunohistochemical techniques with Ki67, P53 and Bcl-2 antibodies, and by TUNEL for apoptosis. Proliferation index (PI), apoptosis index (AI), apoptosis/proliferation ratio, apoptosis degree and positive percent of P53 and Bcl-2 were counted.

RESULTS:The PI of GC, DP, IM, AG were $12.4 \pm 6.8\%$, $6.4 \pm 4.2\%$, $6.6 \pm 3.4\%$, $3.8 \pm 2.9\%$ respectively. There was a significant difference between SG and GC, DP, IM, and AG ($P < 0.01$). The AI of GC, DP, IM, and AG was $2.4 \pm 1.4\%$, $2.6 \pm 1.6\%$, $3.1 \pm 1.2\%$ and $3.8 \pm 2.0\%$ respectively. The apoptosis degree of AG was the highest, and significantly higher than that of GC, DP, and IM ($P < 0.01$). There was no significantly different among GC, moderate and severe DP ($P > 0.05$). Mucosa in AG showed excessive apoptosis, however the apoptosis degree in severe DP and early gastric carcinoma was about 1/3 of SG, and in advanced GC was its 1/5. The positive percentages of P53 in GC, DP, IM and AG were 25.0%, 14.3%, 3.1% and 0% respectively. The positive rate of Bcl-2 was 58.3%, 42.8%, 9.4% and 7.1% respectively. There was a significant correlation between P53 and Bcl-2.

CONCLUSION:Mutated P53 gene and Bcl-2 apoptosis regulating gene not only express in GC, also partly express in DP, IM, and in those precancerous lesions in which gastric carcinogenesis may have been initialized. The imbalance

between proliferation and apoptosis is manifestation of the gene mutations on the cytodynamics. The DP and IM may be the different stages in gastric carcinogenesis.

Pan CJ, Liu KY. Proliferation/apoptosis and expression of P53 and Bcl-2 in gastric carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):526-530

摘要

目的:研究胃癌、癌前病变(异型增生、肠化生、萎缩性胃炎)细胞增生凋亡及其调节基因表达,探讨胃癌多阶段发生.

方法:采用病理组织学对 24 例胃癌、14 例癌旁异型增生、24 例远离癌灶的慢性胃炎和 32 例肠化生胃黏膜进行分类、分期、分度, Ki67, P53 及 Bcl-2 免疫组化染色, TUNEL(ISEL)技术检测细胞凋亡. 计算各种病变的 Ki67 增生指数和凋亡指数、凋亡增生比、凋亡强度, 和 P53, Bcl-2 的阳性例数和百分比.

结果:胃癌、异型增生、肠化生和萎缩性胃炎的增生指数分别是 $12.4 \pm 6.8\%$, $6.4 \pm 4.2\%$, $6.6 \pm 3.4\%$ 和 $3.8 \pm 2.9\%$, 浅表性胃炎与各组均有非常显著差异($P < 0.01$). 凋亡指数分别是 $2.4 \pm 1.4\%$, $2.6 \pm 1.6\%$, $3.1 \pm 1.2\%$ 和 $3.8 \pm 2.0\%$; 凋亡强度分别是 0.3, 0.6, 0.79 和 1.3. 以萎缩性胃炎最高, 与其他各组间均有非常显著差异($P < 0.01$), 中、重度异型增生和胃癌相互间无显著性差异($P > 0.05$). 重度异型增生和早期胃癌的凋亡强度是浅表性胃炎的 1/3, 进展期胃癌仅为其 1/5. P53 蛋白在胃癌、异型增生、肠化生、萎缩性胃炎分别是 25.0%, 14.3%, 3.1% 和 0%. Bcl-2 的表达分别是 58.3%, 42.8%, 9.4% 和 7.1%, 在胃癌和异型增生 P53 蛋白和 Bcl-2 表达相互间存在显著相关性($P < 0.05$).

结论:P53 和 Bcl-2 基因不仅在胃癌表达, 在癌前病变异型增生、肠化生也有部分表达, 萎缩性胃炎不具有上述特点.

潘传敬,刘宽宇. 胃癌增生凋亡与调节基因的表达. *世界华人消化杂志* 2003; 11(5):526-530

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/526.htm>

0 引言

胃癌的发生发展是一个多基因突变累积, 逐渐演变多步骤发生的复杂过程^[1-13]. 萎缩性胃炎、肠化生和异型增生等癌前病变与胃癌的发生关系密切^[14-40]. 肠化生微卫星不稳定性的阳性率和分布、细胞凋亡障碍等都与

胃癌的表现相似, 显示肠化生等癌前病变在细胞动力学和癌发生早期分子生物学与胃癌有内在关系^[16-22]. 为此, 我们观察了胃癌、癌旁异型增生、肠化生、萎缩性胃炎等癌前病变的细胞增生与凋亡改变, 以及他们对抑癌基因 P53 和凋亡调节基因 Bcl-2 表达, 探讨他们的内在关系.

1 材料和方法

1.1 材料 本院 2000-04/2001-09 手术切除胃癌 24 例, 男 17 例, 女 7 例, 年龄 35-76(平均 49)岁, 每例在胃癌、癌旁和远离癌灶的胃黏膜组织各取 3 块. 另选同期胃镜活检病理诊断为肠化生的 32 例, 男 24 例, 女 8 例, 年龄 31-72(平均 45)岁, 每例在胃窦钳取 3-4 块黏膜组织. 胃癌中早期胃癌 5 例, 进展期 19 例, 其中 11 例有淋巴结转移. 癌旁胃黏膜中有 14 例不同程度的异型增生, 其中轻度 3 例, 中度 6 例, 重度 5 例, 10 例伴有肠化生. 远离癌灶的胃黏膜呈慢性胃炎改变, 浅表性 10 例, 萎缩性 14 例. 32 例肠化生均在中度以上广泛肠化.

1.2 方法 所有组织用中性甲醛固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 制备 5 μm 连续切片 6 张, 分别作 HE 染色组织学诊断, 作 Ki67、P53 蛋白、Bcl-2 免疫组织化学染色. TUNEL(ISEL)技术检测细胞凋亡. ISEL 技术用 Boehringer 产品, 为石蜡切片脱蜡至水干燥; 10 mg/L 蛋白酶 K(Gibco)消化, 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h, 漂洗 2 次, 擦干组织周围水分, 用 DAKO 笔划圈; 末端标记: 10 mmol/L Tris 盐酸缓冲液(PH7.63)内含 50 mmol/L 氯化镁 10 mmol/L

- 巯基嘌呤醇, 0.5 g/L 血清清蛋白及 20 ku/L DNA 多聚酶 0.01 mmol/L dATP, dCTP, dGTP 和 0.01 mmol/L 地高辛标记的 dUTP, 每片切片滴标记混合液 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 h, 漂洗 3 次, 滴碱性磷酸酶标记的羊抗地高辛多克隆抗体 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$, 30 min, NBT/BCIP 显色, 室温 10 min, 流水洗, 用 20 g/L 甲基绿复染, 加拿大胶封片观察. ISEL 标记细胞凋亡阳性清晰地显示在洁净的背景上, 核呈兰黑色, 轮廓清楚, 致密成团块状, 有的呈新月形, 有空晕, 阴性胞核作淡绿色(图 1). Ki67 免疫组化染色阳性集中在核呈棕黄色, 致密均匀一致(图 2). P53 染色阳性分布于胞核呈棕黄色至深棕黄色(图 3). Bcl-2 染色阳性分布于胞质, 呈棕黄色颗粒状(图 4). 对 Ki67 染色和 ISEL 进行定量计数, 选染色典型的连续 5 个高倍视野计数 1 000 个胃癌细胞或黏膜上皮细胞和其中的阳性细胞. 计算每 100 个细胞中的阳性数, 所得 Ki67 参数为增生指数 (PI), ISEL 参数为凋亡指数 (AI). 用各组 PI, AI 求凋亡增生比; 以浅表性胃炎为基数 1, 求各组的凋亡强度. P53 和 Bcl-2 的阳性细胞数在 10% 以上者为阳性例数, 按例计数. 对各组检测数据进行统计学处理, 进行显著性检验.

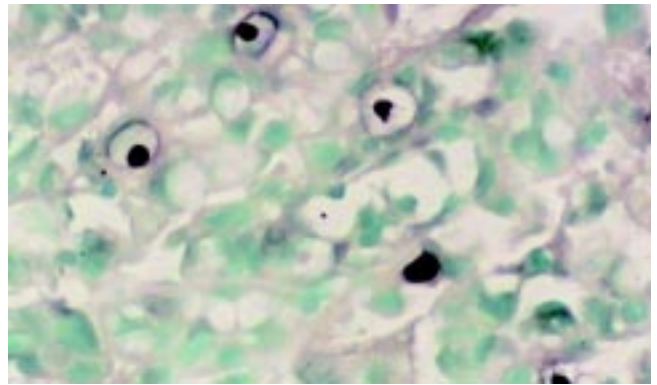


图1 胃癌凋亡细胞稀少,核呈兰黑色、轮廓清楚的致密团块状,有新月形空晕,阴性胞核作淡绿色(ISEL \times 400).

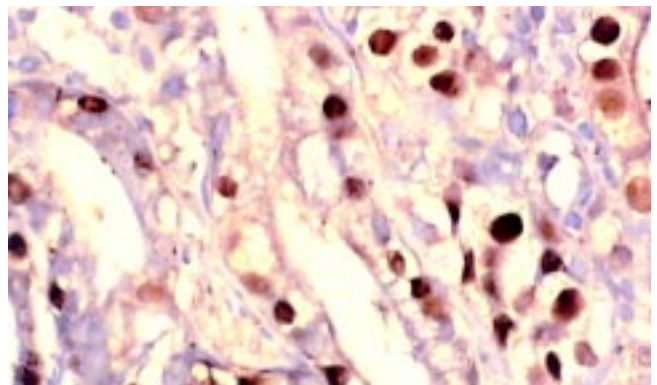


图2 重度异型增生Ki67免疫组化染色阳性细胞核呈棕黄色,致密均匀一致(SP \times 400).

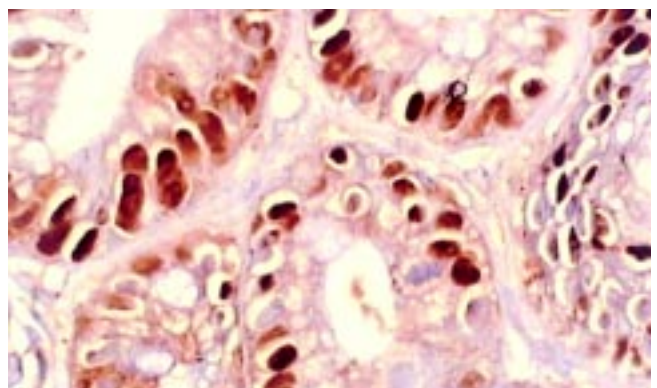


图3 肠化生伴中度异型增生 P53 蛋白免疫组化染色阳性细胞核呈棕黄色至深棕黄色(SP \times 400).

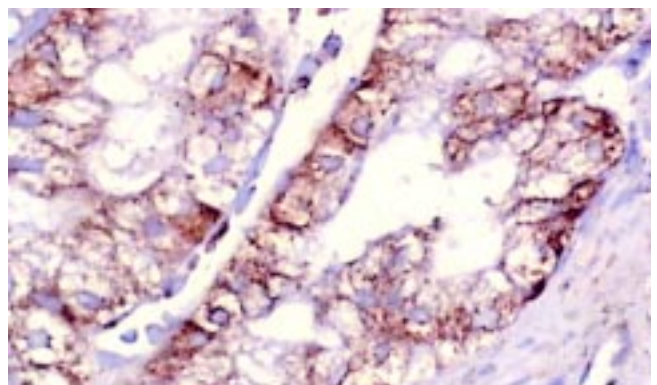


图4 中度异型增生 Bcl-2 免疫组化染色阳性位于胞质,呈黄色细颗粒状 (SP \times 400).

2 结果

2.1 胃癌增生和凋亡 依浅表性胃炎、萎缩性胃炎、肠化生、异型增生、胃癌的顺序随疾病的进展, Ki67 检测的增生指数逐渐升高. 以进展期胃癌为最高, 达 $13.0 \pm 7.4\%$, 浅表性胃炎与萎缩性胃炎、肠化生、异型增生、胃癌均有非常显著的差异($P < 0.01$), 他们的细胞增生显著加速. 凋亡指数以萎缩性胃炎为最高 $3.8 \pm 2.0\%$, 与各组均有非常显著差异($P < 0.01$), 其余各组凋亡指数均较低, 中、重度异型增生和胃癌相互间无显著性差异($P > 0.05$, 表 1). 凋亡增生比和凋亡强度以萎缩性胃炎凋亡强度最大, 是浅表性胃炎的 1.34 倍; 其余肠化生、异型增生和胃癌均比浅表性胃炎低. 重度异型增生和早期胃癌是浅表性胃炎的 1/3; 进展期胃癌仅为其 1/5. 胃癌和癌前病变都出现明显的凋亡障碍(表 1).

表 1 胃癌癌前病变增生和凋亡参数(% , $\bar{x} \pm s$)

病变类型	n	增生指数	凋亡指数	AI/AP	凋亡强度
胃癌	24	12.4 ± 6.8^b	2.4 ± 1.4^a	0.2	0.3
早期	5	11.9 ± 6.1	2.8 ± 0.9	0.2	0.3
进展期	19	13.0 ± 7.4	2.1 ± 1.7	0.2	0.2
异型增生	14	6.4 ± 4.3^b	2.6 ± 1.6^a	0.4	0.6
轻度	3	4.7 ± 2.0	2.9 ± 1.2	0.6	0.9
中度	6	5.7 ± 3.2	2.8 ± 1.1	0.5	0.7
重度	5	9.5 ± 5.0	2.1 ± 0.9	0.2	0.3
肠化生	32	6.6 ± 3.4^b	3.1 ± 1.2^a	0.5	0.7
慢性胃炎	24	3.8 ± 2.9	3.4 ± 1.3	0.9	1.2
浅表性	10	2.3 ± 1.5	1.6 ± 0.7	0.7	1.0
萎缩性	14	4.1 ± 2.8	3.8 ± 2.0	0.9	1.3

^a $P < 0.01$ vs 浅表性胃炎, ^b $P < 0.05$ vs 萎缩性胃炎.

2.2 胃癌 P53 和 Bcl-2 表达 P53 蛋白在胃癌、异型增生、肠化生和萎缩性胃炎中表达率分别是 25.0%, 14.3%, 3.1% 和 0%. 肠化生与异型增生、胃癌之间有非常显著差异($P < 0.01$), 异型增生和胃癌之间有显著性差异($P < 0.05$). Bcl-2 在胃癌、异型增生、肠化生和萎缩性胃炎中的表达分别是 58.3%, 42.8%, 9.4% 和 7.1%. 肠化生与异型增生、胃癌之间均有非常显著差异($P < 0.01$), 异型增生与胃癌之间有显著性差异($P < 0.05$, 表 2).

表 2 胃癌癌前病变 P53 Bcl-2 染色结果 n (%)

病变类型	n	P53	Bcl-2
胃癌	24	6(25.0)	14(58.3)
异型增生	14	2(14.3) ^b	6(42.8) ^a
肠化生	32	1(3.1) ^b	3(9.4)
萎缩性胃炎	14	0(0)	1(7.1)

^a $P < 0.05$ vs 胃癌, ^b $P < 0.01$ vs 胃癌.

3 讨论

胃癌是严重危害人类健康最常见的癌症之一^[1], 占我国癌发病和死亡率之首^[4]. 且有逐年上升趋势. 对他的研究已深入到多种基因突变和蛋白分子表达^[1,4-7,9-13,16]. 有的通过反义基因治疗达到抑制肿瘤增生生长的作用^[1,3,8]. 利用胃癌和癌前病变细胞动力学和细胞生物学表现规律^[15,17,18], 探讨及早发现病理组织学的微小变化, 是胃癌早防早治的关键, 也是科学研究和临床诊治的良好结合点. 我们将二者结合对照分析, 发现浅表性胃炎、萎缩性胃炎、肠化生、异型增生随病变加重, 细胞增生指数逐渐升高. 在发展的不同阶段, 细胞增生指数有显著差异. 胃癌的增生指数最高. 细胞凋亡指数显示: 除萎缩性胃炎凋亡明显增加外, 肠化生、异型增生凋亡指数较低, 有的与胃癌相近. 出现较高水平的增生和低水平的凋亡. 特别是他们的凋亡增生比和凋亡强度更清楚地显示增生和凋亡已明显失去平衡. 这大大增加了病变细胞的不稳定性, 促进病变细胞基因突变, 导致胃癌发生发展. 在癌前病变出现过高水平的增生和凋亡障碍会引起细胞聚积, 可能是形成微小胃癌和早期胃癌的重要细胞动力学基础. 本组 5 例早期胃癌, 有 3 例都在肠化生、异型增生背景下出现多灶性微小癌, 而主要癌灶出现黏膜内浸润. 这是对胃癌早期发生细胞动力学的佐证. 进展期胃癌过度的细胞增生和严重的凋亡障碍是肿瘤迅速生长和广泛扩散的病理学基础. 表现为细胞核分裂、增生极为活跃和去分化、异质性分化、出现异型核、巨核癌细胞等中晚期癌的鲜明特征.

免疫组化染色检出的 P53 蛋白异常表达常代表突变型 P53 基因, 已丧失了抑制肿瘤生长, 反而具有致癌作用, 成为癌基因. 最常见于胃癌^[1,11,19,20,29,32]. 我们发现 P53 蛋白不仅表达在胃癌(25.0%), 癌前病变也有部分表达. 除萎缩性胃炎无表达外, 肠化生表达 3.1%, 异型增生 14.3%. 提示肠化生、异型增生有抑癌基因突变存在, 可能是引起他们增生加快和凋亡受阻的重要原因之一. Bcl-2 基因抑制细胞凋亡, 延长细胞寿命, 促进肿瘤的发生、发展. 我们发现除胃癌 Bcl-2 有高达 58.3% 外, 萎缩性胃炎、肠化生、异型增生也有不同程度表达, 异型增生达 42.8%, 提示 Bcl-2 表达与胃癌的发生密切相关, 在癌前病变即有 Bcl-2 基因的广泛参与. 在这个过程中由于凋亡抑制基因的多重作用, 少数永生细胞已经产生, 他们实际上是一种癌前细胞. 检测同时发现 P53 蛋白表达和 Bcl-2 蛋白表达之间存在显著相关性($P < 0.05$). 与以往研究结果一致^[11,20,22,26,32], 在胃癌发生过程中 P53 基因突变, 其蛋白产物增加, 细胞增生加快, 凋亡受阻, 使高度增生的幼稚细胞聚积. 相应凋亡抑制基因 Bcl-2 表达也增加, 又使增生的幼稚细胞生存延长, 处于不稳定状态, 还可致该细胞群 P53 基因突变加剧, 引起细胞恶性增生、癌形成. 二者之间存在着既独立、又协同促进胃癌发生发展的

作用. 胃癌很高的增生和严重的凋亡受阻, 导致分化幼稚不成熟的肿瘤性细胞聚积, 成为病理组织学诊断胃癌的形态依据, 相应得到 P53 基因突变和 Bcl-2 凋亡抑制基因表达一致的佐证和支持. P53 基因突变和 Bcl-2 凋亡抑制基因表达在癌前病变肠化生和异型增生也有部分表达. 这些病变已有少数永生生化细胞产生. 从基因水平分析这些病变癌发生的过程已经启动, 细胞增生和凋亡的严重失衡是其细胞动力学上的表现. 随着癌发生过程的进展, 病变程度加重其基因表达和细胞动力学失衡越明显. 永生化的癌前细胞演变成癌细胞, 相应病理形态上也出现早期癌特征^[1,14,15]. 提示肠化生、异型增生的不同程度可能是胃癌发生多步骤中不同阶段的表现. 萎缩性胃炎与肠化生、异型增生有所不同, 虽有较高水平的细胞增生, 也伴有高水平的凋亡, 其结果是黏膜上皮细胞减少^[14,15], 不存在凋亡障碍和幼稚细胞聚积, 更重要的是无明显基因突变表达, 缺乏癌发生发展的基础, 不具有癌前病变的特点. 因此萎缩性胃炎不伴有广泛肠化生或异型增生者, 不宜归于癌前病变的范围.

4 参考文献

- 1 Wang GT. Progress in studies of mechanism of gastric precancerous lesions, carcinogenesis and their reversion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1-4
- 2 Wang RQ, Fang DC, Liu WW. MUC 2 gene expression in gastric cancer and preneoplastic lesion tissues. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:285-288
- 3 Du JJ, Dou KF, Cao YX, Wang ZH, Wang WZ, Gao ZQ. CAll, a down-regulated gene in gastric cancer: a functional study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:525-529
- 4 Zhang YM, Deng CS, Zhu YQ, Mao YR, Zhang K, Yang YP. Correlation between expression of hypoxia-inducible factor-1 α mRNA and angiogenesis in gastric adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:633-637
- 5 He XX, Wang JL, Wu JL, Yuan SY, Ai L. Telomerase expression, *Hp* infection and gastric mucosal carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:505-508
- 6 He XX, Wang JL, Wu JL, Yuan SY, Ai L. Telomere, cellular DNA content and gastric mucosal carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:509-512
- 7 Wang W, Luo HS, Yu BP. Expression of human telomerase reverse transcriptase gene and *c-myc* protein in gastric carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:258-261
- 8 Yang SM, Fang DC, Yang JL, Luo YH, Lu R, Liu WW. Effect of antisense gene to human telomerase reverse transcriptase on telomerase activity and expression of apoptosis-associated gene. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:149-152
- 9 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Yang SM, Wang RQ. Bax gene expression and its relationship with apoptosis in human gastric carcinoma and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:665-668
- 10 Zheng ZH, Sun XJ, Qiu GR, Liu YH, Wang MX, Sun KL. E-cadherin gene mutation in precancerous condition early and advanced stages of gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:153-156
- 11 Wang DX, Fang DC, Liu WW. Study on alteration of multiple genes in intestinal metaplasia, atypical hyperplasia and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:855-859
- 12 Luo ZB, Luo YH, Lu R, Jin HY, Zhang PB, Xu CP. Immunohistochemical study on dendritic cells in gastric mucosa of patients with gastric cancer and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:400-402
- 13 Guo YQ, Zhu ZH, Li JF. Flow cytometric analysis of apoptosis and proliferation in gastric cancer and precancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:983-987
- 14 Pan CJ, Zhong P, Huang XR, Liu KY, Wang SX. Study on the correlation between proliferation and apoptosis in atrophy and intestinal metaplasia of gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:143-146
- 15 Lu SY, Pan XZ, Peng XW, Shi ZL, Lin L, Chen MH. Effect of *Hp* infection on gastric epithelial cell kinetics in stomach diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:386-388
- 16 Fang DC, Zhou XD, Luo YH, Wang DX, Lu R, Yang SM, Liu WW. Microsatellite instability and loss of heterozygosity of suppressor gene in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:479-481
- 17 Mi JQ, Zhang ZH, Shen MC. Significance of CD_{44v6} protein expression in gastric carcinoma and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:156-158
- 18 Liang WJ, Ma YJ, Zhang WD, Chen YP. Relationship between classification of spleen syndromes of patients with chronic gastric diseases and gastric carcinoma and cyclin E expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:513-515
- 19 Wang DX, Fang DC, Li W, Du QX, Liu WW. A study on relationship between infection of *Helicobacter pylori* and inactivation of antionogenes in cancer and pre-cancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:984-987
- 20 Cheng SY, Wang JY, Ji Y, Zhang XD, Zhu CW. Effects of *Helicobacter pylori* and protein kinase C on gene mutation in gastric cancer and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:302-307
- 21 Bajtai A, Hidvegi J. The role of gastric mucosal dysplasia in the development of gastric carcinoma. *Pathol Oncol Res* 1998;4:297-300
- 22 Leung WK, Kim JJ, Ki JG, Graham DR, Sepulveda AY. Microsatellite instability in gastric intestinal metaplasia in patients with and without gastric cancer. *Am J Pathol* 2000;156:537-542
- 23 Kim YH, Kim NG, Lim JG, Park C, Kim H. Chromosomal alterations in paired gastric adenomas and carcinomas. *Am J Pathol* 2001;158:655-662
- 24 Ruol A, Parenti A, Zaninotto G, Merigliano S, Costantini M, Cagol M, Alfieri R, Bonavina L, Peracchia A, Ancona E. Intestinal metaplasia is the probable common precursor of adenocarcinoma in Barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *Cancer* 2000;88:2520-2528
- 25 Liu HF, Liu WW, Fang DC. Study of the relationship between apoptosis and proliferation in gastric carcinoma and its precancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:649-651
- 26 Zhou Y, Gao SS, Li YX, Fan ZM, Zhao X, Qi YI, Wei JP, Zou JX, Liu G, Jiao LH, Bai YM, Wang LD. Tumor suppressor gene P16 and Rb expression in gastric cardia precancerous lesions from subjects at a high incidence area in northern China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;8:423-425
- 27 Lin CK, Lai KH, Lo GH, Cheng JS, Hsu PI, Mok KT, Tseng HH. Cathepsin E and subtypes of intestinal metaplasia in carcinogenesis of the human stomach. *Zhonghua Yixue Zazhi (Taipei)* 2001;64:331-336
- 28 Yang SM, Fang DC, Luo YH, Lu R, Battle PD, Liu WW. Alterations of telomerase activity and terminal restriction fragment in gastric cancer and its premalignant lesions. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:876-882
- 29 Xu A, Li S, Liu J. Correlation between apoptosis and proliferation in gastric pre-carcinoma. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1999;79:185-186
- 30 Mingchao, Devereux TR, Stockton P, Sun K, Sills RC, Clayton N, Portier M, Flake G. Loss of E-cadherin expression in gastric intestinal metaplasia and later stage p53 altered expression in gastric carcinogenesis. *Exp Toxicol Pathol* 2001;53:237-246
- 31 Wang D, Fang D, Liu W. Induction of intestinal metaplasia in stomach of dogs and expression of tumor-related proteins in animal gastric mucosa lesions. *Chin Med J* 2000;113:336-339
- 32 Lu W, Chen L, Dong H. *Helicobacter pylori* infection and expression of PCNA, p53, c-erbB-2 in carcinoma and precancerous lesions of the stomach. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 1999;21:125-127
- 33 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:7-13
- 34 Conchillo JM, Houben G, de Bruine A, Stockbrugger R. Is type III intestinal metaplasia an obligatory precancerous lesion in intestinal-type gastric carcinoma? *Eur J Cancer Prev* 2001;10:307-312

- 35 Lu SY, Pan XZ, Pen XW, Shi ZL. Effect of *Hp* infection on gastric epithelial cell kinetics in stomach diseases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:760-762
- 36 Ushijima T, Yamamoto M, Suzui M, Kuramoto T, Yoshida Y, Nomoto T, Tatematsu M, Sugimura T, Nagao M. Chromosomal mapping of genes controlling development, histological grade, depth of invasion, and size of rat stomach carcinomas. *Cancer Res* 2000;60:1092-1096
- 37 Ge CQ, Wang YP, Liu GY, Ma SW, Ding G, Li JC. Study on *Helicobacter pylori* infection and p53, c-erbB-2 gene expression in carcinogenesis of gastric mucosa. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:313-315
- 38 Qing LJ. In situ hybridization of p53 tumor suppressor gene in human gastric precancerous lesions and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:494-497
- 39 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Men YP, Wang ZH. Apoptosis and its relationship with Fas ligand expression in gastric carcinoma and its precancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:561-563
- 40 Yang L, Wang YP, Wu DY, Zhang SM, Li JY, Zhang YC, Xin Y. Pathological behaviors and molecular mechanisms of signet-ring cell carcinoma and mucinous adenocarcinoma of stomach: a comparative study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:516-524
- 41 Deng DJ, Z E. Overview on recent studies of gastric carcinogenesis :human exposure of N-nitrosamides. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:250-252

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2003 年度世界华人消化杂志®

本刊讯 世界华人消化杂志®被美国《化学文摘》(Chemical Abstracts,CA),荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica,EM)》,俄罗斯《文摘杂志》收录.国内被以下检索系统收录,分别为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊之一),中国学术期刊文摘,中国生物医学文献光盘数据库,中文科技资料目录医药卫生,解放军医学图书馆CMCC系统,世界消化学网数据库,中国医学文摘外科学分册(英文版),中国医学文摘内科学分册(英文版),国家级火炬计划项目中国学术期刊综合评价数据库来源期刊.世界华人消化杂志®(原刊名新消化病学杂志)1995年度,1998年度,1999年度,2000年度2001年度,分别被评为山西省一级期刊.中国科技信息研究所信息分析研究中心期刊检索报告:2001年度世界华人消化杂志®总被引频次6468,影响因子3.733,即年指标0.747,他引总比0.2,海外作者论文比0.012,地区分布数29,基金和资助论文比例0.176,指标综合加权评分76.96.世界华人消化杂志®大16开,200页,月刊,定价24.00元/期,邮发代号82-262.E-mail:wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com

(世界胃肠病学杂志社 2002-11-08)

慢性萎缩性胃炎胃泌素、生长抑素、表皮生长因子、血管活性肠肽的测定及临床意义

郭昱,郭霞,姚希贤

郭昱,姚希贤,河北医科大学第二医院 河北省石家庄市 050000
郭霞,河北医科大学第四医院 河北省石家庄市 050011
郭昱,女,1972-05-16生,河北省深县人,汉族。1995年河北医科大学本科毕业,1999年河北医科大学硕士研究生毕业,主治医师。主要从事消化系统疾病的研究。
项目负责人:姚希贤,050000,河北省石家庄市,河北医科大学第二医院。
电话:0311-7046901-6511
收稿日期:2002-07-26 接受日期:2002-09-12

Changes of gastrointestinal hormones in chronic atrophic gastritis and their clinical significance

Yu Guo, Xia Guo, Xi-Xian Yao

Yu Guo, Xi-Xian Yao, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Xia Guo, Forth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China
Correspondence to: Dr. Xi-Xian Yao, Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China.
Received: 2002-07-26 Accepted: 2002-09-12

Abstract

AIM: To investigate the changes of gastrin, epidermal growth factor (EGF), vasoactive intestinal polypeptide (VIP), somatostatin (SS) and their clinical significance in chronic atrophic gastritis (CAG), and meanwhile to supply theoretical and experimental basis for the endocrinal therapy of CAG.

METHODS: The serum levels of gastrin, EGF, VIP and SS were measured in 67 cases of CAG patients, 18 gastric cancers and 15 normal controls by radioimmunoassay.

RESULTS: The serum levels gastrin and EGF were obviously higher in CAG patients $[(115.23 \pm 60.23) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}, (152.60 \pm 82.93) \text{ ng/ml}]$ than those in normal persons $[(64.19 \pm 35.34) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}, (1.76 \pm 0.35) \text{ ng/ml}]$ ($P < 0.01$), but significantly lower than those in gastric cancer $[(152.60 \pm 72.93) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}, (2.86 \pm 1.23) \text{ ng/ml}]$ ($P < 0.01$). There was an increasing tendency in the content of gastrin and EGF with the development of atrophy, which was close to the level of gastric cancer in CAG patients accompanied by intestinal metaplasia $[(137.20 \pm 60.23) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}, (2.71 \pm 1.02) \text{ ng/ml}]$ ($P < 0.05$). The serum levels of SS and VIP were obviously lower in CAG $[(61.90 \pm 28.36) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}, (9.42 \pm 2.34) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}]$ than those in normal persons $[(96.28 \pm 35.18) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}, (16.34 \pm 8.18) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}]$. The more serious atrophy was accompanied with lower level of SS and VIP. Furthermore, the serum level of SS was lower in CAG than those in gastric cancer $[(114.96 \pm 47.12) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}]$, but the serum level of VIP was higher than the latter $[(6.98 \pm 2.13) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}]$.

CONCLUSION: CAG is accompanied with the increasing of gastrin, EGF and the decreasing of SS and VIP, which may change the physiological functions and biological behaviors of the gastric mucosa and lead CAG to gastric cancer. If properly using these gastrointestinal hormones or their blocker, it may block the development of CAG.

Guo Y, Guo X, Yao XX. Changes of gastrointestinal hormones in chronic atrophic gastritis and their clinical significance. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):531-534

摘要

目的:通过对慢性萎缩性胃炎(CAG)及胃癌患者胃泌素、生长抑素(SS)、表皮生长因子(EGF)和血管活性肠肽(VIP)水平,探讨上述胃肠激素在CAG的临床意义,为CAG的内分泌治疗提供理论与实验依据。

方法:应用放射法检测经胃镜及病理证实的67例CAG患者,18例胃癌患者,15例正常人血中胃泌素、EGF、VIP和SS水平。

结果:与正常人血清胃泌素、EGF含量 $[(64.19 \pm 35.34) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}, (1.76 \pm 0.35) \text{ ng/ml}]$ 相比,CAG患者血清内这两种物质含量均明显升高 $[(115.23 \pm 60.62) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}, (152.60 \pm 82.93) \text{ ng/ml}]$, $P < 0.01$,且随萎缩病变加重呈上升趋势,伴肠化生者 $[(137.20 \pm 60.23) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}, (2.71 \pm 1.02) \text{ ng/ml}]$ 升高最为显著,接近胃癌水平 $[(152.60 \pm 72.93) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}, (2.86 \pm 1.23) \text{ ng/ml}]$, $P > 0.05$ 。CAG患者VIP含量 $(9.42 \pm 2.34) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}$ 显著低于正常水平 $(16.34 \pm 8.18) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}$, $P < 0.01$,但较胃癌患者 $(6.98 \pm 2.13) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}$ 显著增高, $P < 0.01$ 。且随萎缩病变加重呈下降趋势,伴肠化生时 $(7.68 \pm 2.96) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}$ 仅略高于胃癌。血浆SS含量以CAG患者为最低 $(61.90 \pm 28.36) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}$ 显著低于正常人 $(96.28 \pm 35.18) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}$, $P < 0.01$ 及胃癌患者 $(114.96 \pm 47.12) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}$ 且随萎缩病变加重呈下降趋势,伴肠化生时最低 $(40.17 \pm 20.34) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}$ 。

结论:CAG存在胃泌素,EGF水平的增高及SS、VIP水平的减低,使胃黏膜的生理功能、生物学行为发生改变,致CAG沿着肠化生-不典型增生癌变发展,适当应用上述胃肠激素或其拮抗剂可能阻止CAG的发展,并使之逆转。

郭昱,郭霞,姚希贤. 慢性萎缩性胃炎胃泌素、生长抑素、表皮生长因子、血管活性肠肽的测定及临床意义. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):531-534
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/531.htm>

0 引言

胃肠道是体内最复杂的内分泌器官,能分泌数十种胃肠激素.这些胃肠激素参与胃肠道多种生理功能的调节,如分泌、运动、消化系血流等.研究表明许多消化系统疾病如消化性溃疡(PU)、胃癌等的发生、发展都有胃肠激素的参与^[1-3],但慢性萎缩性胃炎(CAG)胃肠激素的改变及其意义尚乏研究.为此,我们对照检测了CAG、胃癌患者胃泌素、生长抑素(SS)、表皮生长因子(EGF)及血管活性肠肽(VIP)的水平,发现CAG存在胃泌素、EGF水平的增高,SS、VIP水平的减低,进而使胃黏膜的生理功能、生物学行为发生改变、致CAG沿着肠化生-不典型增生癌变发展,提示适当应用上述激素或其拮抗剂可能阻止CAG的发展,并使之逆转.

1 材料和方法

1.1 材料 (1)CAG组:选择年龄在18-65岁,经胃镜及病理组织活检证实的CAG患者67例,男56例,女11例,平均年龄(52.9 ± 9.8岁).其中轻度CAG患者38例,中、重度患者29例,CAG伴肠化生13例.(2)对照组:胃镜检查示大致正常胃黏膜,病理检查黏膜层有少量淋巴细胞浸润,共15例,男10例,女5例,平均年龄(36.9 ± 22.3岁).(3)胃癌组:胃镜及病理组织活检确诊共18例,男13例,女5例,平均年龄(55.6 ± 10.9岁).以上研究对象均为2 wk内未服用过一切胃药,并排除合并心、肺、肝、脑等严重疾病.

1.2 方法 (1)试剂:SS、VIP放免药盒由北京海科锐生物技术中心提供,EGF、ET、胃泌素放免药盒由北京北方免疫试剂研究所提供,操作时均严格按照说明书进行.(2)标本采集:所有研究对象均空腹抽取肘静脉血8 ml,分离血清、血浆备用.(3)血清胃泌素、EGF的测定:血样4 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.(4)血浆VIP、SS测定:血6 ml,置于4℃预冷装有10% EDTA 90 ul、

抑肽酶3 000 u的试管中,4℃离心,15 min,取上清液,-70℃保存待测.

统计学处理 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数比较采用秩和检验,当 $P < 0.05$ 差异有显著性.

2 结果

研究表明,与正常人血清胃泌素、EGF含量[(64.19 ± 35.34) × 10⁻³ ng/ml、(1.76 ± 0.35) ng/ml]相比,CAG患者均明显升高[(115.23 ± 60.62) × 10⁻³ ng/ml、(152.60 ± 82.93) × 10⁻³ ng/ml], $P < 0.01$,且随萎缩病变程度加重呈上升趋势轻度[(105.12 ± 38.92) × 10⁻³ ng/ml (2.12 ± 0.62) ng/ml] VS 中重度[(128.19 ± 67.28) × 10⁻³ ng/ml (2.58 ± 0.89) ng/ml]伴肠化生者[(137.20 ± 60.23) × 10⁻³ ng/ml (2.71 ± 1.02) ng/ml]升高尤为显著,接近胃癌水平[(152.60 ± 72.93) × 10⁻³ ng/ml (2.86 ± 1.23) ng/ml], $P > 0.05$.

CAG患者VIP含量(9.42 ± 2.34) × 10⁻³ ng/ml显著低于正常水平(16.34 ± 8.18) × 10⁻³ ng/ml, $P < 0.01$,但较胃癌(6.98 ± 2.13) × 10⁻³ ng/ml显著为高, $P < 0.01$.且随萎缩病变加重呈下降趋势,伴肠化生时(7.68 ± 2.96) × 10⁻³ ng/ml,仅略高于胃癌.

血浆SS含量以CAG患者为最低(61.90 ± 28.36) × 10⁻³ ng/ml,显著低于正常人(96.28 ± 35.18) × 10⁻³ ng/ml, $P < 0.01$ 及胃癌患者(114.96 ± 47.12) × 10⁻³ ng/ml,且随萎缩病变加重下降趋势,伴肠化生时最低(40.17 ± 20.34)(表1,2).

3 讨论

CAG伴有严重不典型增生或b型肠化生时被认为是癌前病变,目前对其致病机制尚不十分清楚,亦缺乏理想治疗方法.胃泌素、SS、VIP等胃肠激素可以调节细胞生长、胃肠血流及运动等生理功能^[4].在PU、CAG、胃癌等疾病存在多种胃肠激素分泌功能紊乱^[5-9],胃肠激素可能参与了上述疾病的病理生理过程.有报道

表1 CAG、胃癌患者血浆胃泌素、EGF、SS、VIP水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胃泌素 × 10 ⁻³ ng/ml	EGFng/ml	SS × 10 ⁻³ ng/ml	VIP × 10 ⁻³ ng/ml
CAG	67	115.23 ± 60.62 ^{bc}	2.32 ± 0.60 ^{bd}	61.90 ± 28.36 ^{bc}	9.42 ± 2.34 ^{bc}
胃癌	18	152.60 ± 72.93 ^b	2.86 ± 1.23 ^b	114.96 ± 47.02 ^b	6.98 ± 2.13 ^b
正常人	15	64.19 ± 35.34	1.76 ± 0.35	96.28 ± 35.18	16.34 ± 8.18

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 正常; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, vs 比CAG与胃癌.

表2 不同程度CAG血浆胃泌素、EGF、SS及VIP水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	胃泌素 × 10 ⁻³ ng/ml	EGFng/ml	SS × 10 ⁻³ ng/ml	VIP × 10 ⁻³ ng/ml
轻度CAG	38	105.12 ± 38.92	2.12 ± 0.62	76.94 ± 30.28	10.64 ± 3.08
中重度CAG	29	128.19 ± 67.28 ^a	2.58 ± 0.89 ^a	42.19 ± 18.92 ^b	7.82 ± 2.56 ^b
CAG伴肠化生	13	137.20 ± 60.23 ^a	2.71 ± 1.02 ^b	40.17 ± 20.34 ^b	7.68 ± 2.96 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 轻度CAG.

试用胃肠激素对上述疾病进行干预治疗, 取得了较好的效果^[10,11]. 但当前对 CAG 研究较少, 为此本研究对 CAG 患者胃泌素、EGF、SS 及 VIP 水平进行了检测, 为胃肠激素应用于 CAG 治疗提供理论与实验依据.

胃泌素是由 G 细胞合成、分泌的, 能促进胃酸分泌, 对胃黏膜具有营养作用. 以往普遍认为 CAG 时胃泌素升高, 并将其归因于黏膜萎缩, 胃酸分泌减少, 反馈作用于 G 细胞, 刺激胃泌素释放, 并不断有人用人工合成的胃泌素用于 CAG 的治疗, 希望通过其黏膜营养作用促进萎缩黏膜恢复. 并发现对轻度 CAG 患者应用小剂量胃泌素可能有利于萎缩黏膜的修复, 但对重度 CAG, 尤其伴肠化生时胃腺生发中心严重受损, 应用胃泌素可能不仅不利于胃黏膜修复, 反有促使癌变可能. 李哲夫 et al^[12]报道 22 例胃癌患者血清胃泌素含量为 $(344 \pm 5.2) \times 10^{-3}$ ng/ml, 是正常 $(92 \pm 9) \times 10^{-3}$ ng/ml 的 3.5 倍. 体外观察发现, 胃泌素对人胃腺癌 BGC-823 细胞系的生长, 具有显著促进作用, 而这种作用可被其受体拮抗剂丙谷胺和 L-365 260 所抑制^[13-15]. 本研究发现, CAG 患者血清胃泌素含量 (115.23 ± 60.62) pg/ml 较正常人 (64.19 ± 35.24) pg/ml 显著为高, 且随萎缩病变的加重而升高, 伴肠化生时已接近胃癌水平 $(137.20 \pm 69.23) \times 10^{-3}$ ng/ml vs $(152.60 \pm 72.93) \times 10^{-3}$ ng/ml, $P > 0.05$. 推测 CAG 的癌变可能受胃泌素高水平所诱导, 因而临床上将胃泌素用于 CAG 治疗应持慎重态度.

EGF 来自唾液腺和十二指肠 Brunner 腺, 能诱导 DNA、RNA 及蛋白质合成, 促进细胞有丝分裂和增生, 增加胃黏膜血流(GMBF), 是强效细胞保护因子, 如硫糖铝等胃黏膜保护剂, 其黏膜保护作用部分系通过增加 EGF 来实现. 研究证明 EGF 能促进 PUDE 的愈合, 临床应用也取得较好效果^[10,11,16], 但 EGF 升高, 会使胃黏膜过度增生, 与癌变可能有关^[17,18]. 曹京旭 et al^[19]报道 CAG 患者血清 EGF 含量显著高于正常人 $[(3.54 \pm 1.47) \text{ ug/L vs } (1.77 \pm 0.60) \text{ ug/L}]$, 与胃癌十分接近 $(3.72 \pm 1.83) \text{ ug/L}$, 并伴有 EGFR 表达增加, 在伴 II 型肠化生时更为明显我们取得了与之相似的结果. 提示检测 CAG 患者 EGF 水平对判断病情严重程度有一定帮助. 有研究表明 CAG 患者胃黏膜处于高增生状态, 在增生区发现有 EGF 及其受体表达, 给予小鼠致癌物 MNNG 加 EGF 后可使单用 MNNG 不发生肿瘤的小鼠发生腺癌、类癌, 临床观察也发现胃癌组织 EGF 及其受体表达明显增强^[20-23], 提示 CAG 患者 EGF 表达增强, 后者可诱导原癌基因 c-fos、c-myc 活化, 细胞恶性增生, 导致 CAG 癌变, 因此 CAG 患者增高的 EGF 可能并不具有细胞保护作用. Olsen et al^[24]发现 EGF 的胃黏膜保护作用与其剂量有关, 不同剂量的 EGF 作用不同, 切除颌下腺大鼠, 给予外源性 EGF 30 ug/kg·d 显示出对胃黏膜具有明显保护作用, 减轻半胱胺引起的黏膜损害, 且呈量效关系, 但将 EGF 的用量增至 60 ug/kg·d 时其对胃黏膜保护作用反而消失, 原因尚不清楚, 是

否 CAG 患者升高的 EGF 超出了发挥保护作用的有效剂量范围? 上述研究似可提示治疗 CAG 是否不应使用 EGF, 而应当应用 EGFR 拮抗剂?

SS 是一种抑制性胃肠激素, 能抑制胃泌素、EGF 的释放, 与胃泌素组成胃泌素 - SS - 胃酸分泌轴, 维持胃酸分泌稳定^[25]. 关于其对细胞生长的作用报道不一^[26-28]. 有研究发现, SS 或其类似物 RC - 160 能抑制人胃癌细胞生长, 认为 SS 对肿瘤细胞的生长抑制作用可能是通过增强细胞内酪氨酸激酶活性, 使酪氨酸去磷酸化, 或通过抑制某些生长因子(EGF、胃泌素)的释放, 或通过对 EGFR 的下调作用. 赵荣华 et al^[29]观察 SS 的长效类似物 SMS201 - 995 对体外培养大肠癌细胞系 SW1116 生长的影响, 发现 SS 低浓度时 $(5 \times 10E - 10) \text{ mol/L}$ 可促进细胞增生, 而高浓度 $(5.5 \times 10E - 10) \text{ mol/L}$ 则对之具有抑制作用, 细胞增生率与药用浓度对数呈负相关. 另有报道对 MNNG 引起的大鼠胃癌 SS 能提高细胞增生. 周殿元从基因水平观察发现胃癌组织 SS 呈过度表达, 支持 SS 刺激肿瘤生长的观点^[30]. 目前 SS 生长调节作用的研究多集中于体外细胞培养. 本研究结果表明, CAG 患者血浆 SS 含量 $(61.90 \pm 28.36) \times 10^{-3}$ ng/ml 明显低于正常人 $(96.28 \pm 35.18) \times 10^{-3}$ ng/ml, 更低于胃癌患者 $(114.96 \pm 47.12) \times 10^{-3}$ ng/ml, 随萎缩病变的加重 SS 呈下降趋势, 伴肠化生时尤为明显 $(40.17 \pm 20.34) \times 10^{-3}$ ng/ml, 推测 CAG 时 SS 的减低有利于胃泌素、EGF 营养作用的发挥, 可能是机体的一种代偿反应, 但 SS 过度减低, 胃黏膜可能发生过度增生, 不典型增生? 胃癌时 SS 呈显著升高, 此系因肿瘤组织自身合成释放, 还是机体籍以抑制肿瘤生长的一种防御反应? 无论何种情况, CAG 患者 SS 水平骤然升高, 应警惕癌变的发生.

VIP 是胃肠运动的主要抑制性递质, 还能扩张胃肠血管, 增加 GMBF, 近年来认为 VIP 还是一种生长因子. 其作用于胃肠壁的 VIP 受体, 主要通过第一信使或直接激活腺苷酸环化酶, 提高 cAMP 而发挥生物效应. 顾宇春 et al^[31]报道慢性胃炎患者血浆 VIP 含量显著降低, 认为 VIP 的减低, 可使 GMBF 减少, 黏膜缺血、缺氧, 不利于黏膜生长. 但未分析其对胃黏膜细胞生长的直接调控作用. 本研究发现 CAG 患者血浆 VIP 含量明显低于正常人 $[(9.42 \pm 2.34) \times 10^{-3} \text{ ng/ml vs } (16.34 \pm 8.18) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}]$, $P < 0.01$, 中重度 CAG 患者 VIP 含量低于轻度 CAG 患者 $[(7.82 \pm 3.27) \times 10^{-3} \text{ ng/ml vs } (10.64 \pm 3.86) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}]$, 伴肠化生时水平更低 $(7.68 \pm 2.96) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}$, 接近胃癌水平 $(6.98 \pm 2.13) \times 10^{-3} \text{ ng/ml}$, $P > 0.05$. 认为 CAG 患者 VIP 的减低除引起 GMBF 减少, 胃肠动力失调外, 更为重要者可能是使胃黏膜细胞内 cAMP 减低. 因之细胞正常代谢受到干扰, 细胞分化受到抑制, 细胞分裂加速, 使一些非分裂周期的细胞进入分裂期, 干扰了通过蛋白激酶对基因调节的过程, 以致改变了细胞遗传. 张健报道胃良性病

变、肠化生、不典型增生及癌变细胞 cAMP 浓度依次减低,支持 cAMP 在 VIP 减低致 CAG 胃黏膜出现高代谢过程中发挥中介作用。

4 参考文献

- 1 朱日林,张一楚,王瑞平,龚圣济,王建军. C-erbB-2 和 EGFR 在胃癌中表达的研究. 中国肿瘤临床杂志 1996;23:855-859
- 2 赵宝民,许才斌,黄裕新,张少玲,王庆莉,穆琳. 胃癌患者血浆及胃液中表皮生长因子和胃泌素含量. 第四军医大学学报 1996;17:392-393
- 3 杨春敏,陈寿坡. 表皮生长因子对十二指肠溃疡发病的影响. 中华内科杂志 1996;35:148
- 4 华山组. 胃肠道激素分子生物学的进展. 国外医学外科学分册 1994;21:79-80
- 5 Ohmura E, Emoto N, Tsushima T, Watanabe S, Takeuchi T, Kawamura M, Shigemoto M, Shizume K. Salivary immunoreactive human epidermal growth factor (IR-bEGF) in patients with peptic ulcer disease. *Hepatogastroenterology* 1987;34:160-163
- 6 Hirasawa Y, Asaki S, Hongo M, Ohara S, Shibuya D, Yamaguchi N, Matsuda K, Toyota T. Salivary epidermal growth factor in patients with peptic ulcer. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1991;88:1043-1050
- 7 潘小炎,周喜汉,黄东宁,方文珠,卢运龙. 幽门螺杆菌感染与胃液表皮生长因子关系的探讨. 世界华人消化杂志 2000;8:599-600
- 8 黄象谦. 幽门螺杆菌感染与胃肠激素的联系. 世界华人消化杂志 2000;8:1079-1083
- 9 袁红霞,杨曼. 胃二号方对 CAG 模型大鼠胃肠道激素的作用. 世界华人消化杂志 2000;8:1424-1426
- 10 Haedo W, Gonzalez T, Mas JA, Franco S, Gra B, Soto G, Alonso A, Lopez-Saura P. Oral human recombinant epidermal growth factor in the treatment of patients with duodenal ulcer. *Rev Esp Enferm Dig* 1996;88:409-418
- 11 曲伸,谢延侠,迟凤香. 奥美拉唑羟苄青霉素表皮生长因子联合治疗十二指肠球部溃疡. 中华消化内镜杂志 1996;13:29-30
- 12 李哲夫,王德昭,乐竹琴. 胃泌素与胃癌. 国外医学消化系疾病分册 1993;15:69-72
- 13 王俊平,黄乃霞,黄象谦,吴琳. 胃泌素及其受体拮抗剂对 BGC-823 细胞系生长的调节. 胃肠病学和肝病学杂志 1996;5:276-279
- 14 李哲夫,王德昭,乐竹琴,余枫. 胃泌素受体拮抗剂对胃癌细胞株生长的抑制作用. 中华实验外科杂志 1995;12:81-82
- 15 许志华,吕惠政,邓俊涛,于万娜,周建春,周忠春. 局部注射细胞生长肽并口服法莫替丁治疗消化性溃疡. 世界华人消化杂志 1999;7:85-86
- 16 曲伸,谢延侠,梁秋红,赵丽荣,刘英. 表皮生长因子口服液治疗十二指肠球部溃疡 64 例疗效观察. 中国实用内科杂志 1995;15:428
- 17 欧阳春,莫剑忠,江绍基. 表皮生长因子及其受体与肿瘤. 国外医学消化系疾病分册 1994;14:157-160
- 18 栾复新,王孟薇,尤经纬,祝庆孚. 转化生长因子- α . 表皮生长因子受体与胃癌发生的关系及其与增生细胞核抗原的相关性分析. 中华病理学杂志 1997;26:31-34
- 19 曹京旭,刘兴国,孔可,苏久莲. 胃癌患者血清 hEGF 含量测定及临床意义. 新消化病学杂志 1997;5:379-380
- 20 王洪涛,陈宝雯,贾博琦. 表皮生长因子及其受体与胃癌. 新消化病学杂志 1997;5:393-394
- 21 何双梧,郭连营,李家琪. 胃癌组织中表皮生长因子及其受体的测定. 中华医学杂志 1994;74:413-415
- 22 王盛乾,刘思齐,李福沛. 人表皮生长因子在胃癌中表达的意义研究. 中华病理学杂志 1994;23:46
- 23 米建强,沈铭昌. 表皮生长因子受体在胃癌及癌前病变组织中的表达. 中华肿瘤杂志 1993;15:192-194
- 24 Olsen PS, Poulsen SS, Kirkegaard P, Nexø E. Role of submandibular saliva and epidermal growth factor in gastric cytoprotection. *Gastroenterology* 1984;87:103-108
- 25 吕宗舜,黄象谦,杜宝恒,黄道侠,吴琳. 慢性胃炎中幽门螺杆菌与生长抑素、胃泌素含量及 D、G 细胞密度的关系. 天津医药杂志 1993;8:480-482
- 26 李济宇,乐竹琴. 生长抑素受体在人体胃胰腺肿瘤中的表达. 国外医学外科学分册 1997;24:137-139
- 27 罗文茵,袁世珍. 生长抑素在消化系统疾病治疗方面的应用. 国外医学内科学分册 1997;24:211-214
- 28 黄广建,乐竹琴. 生长抑素在肿瘤诊治中的作用. 国外医学外科学分册 1996;23:84-86
- 29 赵荣华,王元和,李莉,施靖华,高瀚. 胃泌素及生长抑素对人大肠癌细胞的调节. 新消化病学杂志 1996;4:306-308
- 30 乔华,王瑞林,王萍,张钦宪,李继昌,陈伟喻,张圣明. 胃癌生长抑素、胃泌素和 5-羟色胺基因的转录、表达及意义. 中华消化杂志 1997;17:53-54
- 31 顾宇春,陈德珍. 中药复方慎柔养真汤中血管活性肠肽影响的探讨. 新消化病学杂志 1997;5:158-159

CD/5-FC 系统对结肠癌细胞的杀伤作用

黎成金,马庆久,赖大年,鲁建国,王小军,王青,潘伯荣,武永忠,李金茂

黎成金,马庆久,赖大年,鲁建国,王小军,王青,武永忠,李金茂,中国人民解放军第四军医大学唐都医院普通外科 陕西省西安市 710038
潘伯荣,中国人民解放军第四军医大学学报编辑部 陕西省西安市 710032
黎成金,男,汉,广西人,博士在读,主治医师,研究方向:大肠癌的基因诊断和治疗。
项目负责人:潘伯荣,710032,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学西京医院肿瘤科。
收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-11-25

Killing effect of CD/5-FC system on human colon cancer cell lines SW 480 and LoVo

Cheng-Jin Li, Qing-Jiu Ma, Da-Nian Lai, Jiang-Guo Lu, Xiao-Jun Wang, Qing Wang, Bo-Rong Pan, Yong-Zhong Wu, Jin-Mao Li

Cheng-Jin Li, Qing-Jiu Ma, Da-Nian Lai, Jian-Guo Lu, Xiao-Jun Wang, Qing Wang, Yong-Zhong Wu, Jin-Mao Li, Department of General Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Bo-Rong Pan, Department of Oncology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Prof. Bo-Rong Pan, Department of Oncology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China.
Received:2002-10-07 Accepted:2002-11-25

Abstract

AIM: To investigate the killing effect of carcinoembryonic antigen (CEA) and tissue-specific cytosine deaminase (CD)/5-fluorocytosine (5-FC) system on human colorectal carcinoma cell lines LoVo and SW480 *in vitro*.

METHODS: Recombinant retroviral vector G1CEACDNa was constructed, in which the CD gene was controlled under the CEA promoter, and retroviral vector pCD2 were introduced through liposome technique respectively to the human colorectal carcinoma cell lines LoVo and SW480. Expression of CEA was high and low in both the cell lines respectively. The cells were selectively cultured in G418. The proliferative colonies were treated with 5-FC.

RESULTS: After the transfection, LoVo-CEACD cells and LoVo-CD cells were more sensitive to 5-FC than their parental cells ($P < 0.01$, $t = 5.688$, $n = 9$; $P < 0.01$, $t = 3.136$, $n = 9$), and SW480-CEACD cells and SW480-CD cells were more sensitive than their parental cells as well ($P < 0.01$, $t = 3.437$, $n = 9$; $P < 0.01$, $t = 3.516$, $n = 9$). Furthermore, the LoVo-CEACD cells were more sensitive to 5-FC than the LoVo-CD cells ($P < 0.05$, $t = 2.183$, $n = 9$) while the SW480-CEACD cells were less sensitive than SW480-CD cells. The LoVo-CEACD cells displayed a higher anti-tumor effect than SW480-CEACD cells *in vitro*. The bystander effect in all cells transfected with CD gene were observed in this study.

CONCLUSION: The CEA tissue-specific CD/5-FC system

displays an obvious targeting anti-tumor effect on human colorectal carcinoma cell lines LoVo and SW480, but the killing effect on the LoVo-CEACD cells is higher than that on the SW480-CEACD cells *in vitro*.

Li CJ, Ma QJ, Lai DN, Lu JG, Wang XJ, Wang Q, Pan BR, Wu YZ, Li JM. Killing effect of CD/5-FC system on human colon cancer cell lines SW 480 and LoVo. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):535-539

摘要

目的:探讨组织特异性胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)/5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine, 5-FC)系统对不同分泌癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)的大肠癌细胞 LoVo 和 SW480 的靶向杀伤作用。

方法:脂质体法将 CEA 基因顺式转录调控序列(TRS)驱动 CD 基因的组织特异性逆转录病毒载体 G1CEACDNa 及非组织特异性逆转录病毒载体 pCD2 分别转入大肠癌细胞 LoVo 和 SW480, 以 G418 筛选阳性克隆扩增后给予前药 5-FC 进行敏感试验。

结果:LoVo-CEACD 及 LoVo-CD 比 LoVo 对 5-FC 的敏感性明显提高($P < 0.01$, $t = 5.688$, $n = 9$; $P < 0.01$, $t = 3.136$, $n = 9$), SW480-CEACD 及 SW480-CD 比 SW480 对 5-FC 的敏感性明显提高($P < 0.01$, $t = 3.437$, $n = 9$; $P < 0.01$, $t = 3.516$, $n = 9$), LoVo-CEACD 比 LoVo-CD 对 5-FC 的敏感性明显增强($P < 0.05$, $t = 2.183$, $n = 9$), 而 SW480-CEACD 对 5-FC 的敏感性小于 SW480-CD, SW480-CEACD 对前药 5-FC 的敏感性低于 LoVo-CEACD ($P < 0.05$, $t = 2.504$, $n = 9$), 转 CD 基因之 LoVo 和 SW480 细胞体外实验均可观察到明显的旁观者效应。

结论:组织特异性 CD/5-FC 系统对 LoVo 和 SW480 细胞均有明显的靶向杀伤效果,但对 SW480 细胞的杀伤作用小于 LoVo 细胞。

黎成金,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(5):535-539
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/535.htm>

0 引言

CD/5-FC 系统作为前药转换基因系统之一,近年来对其在肿瘤治疗中的作用进行了广泛研究^[1-4],已进行了少量期临床实验^[1,5-8]。研究表明^[9],癌胚抗原(CEA)转录调控序列可控制 CD 基因在 CEA 阳性的大肠癌组织中高效表达,在前药 5-FC 作用下,产生选择性杀伤

肿瘤细胞的作用.然而,CEA启动子控制的CD基因对低表达CEA的大肠癌细胞是否具有靶向性杀伤作用?为此,我们进行了初步研究.

1 材料和方法

1.1 材料 含CD基因逆转录病毒载体pCD2由美国Anderson癌症研究中心的Mullen博士惠赠;CEA启动子调控CD基因表达的逆转录病毒载体G1CEACDNa由第二军医大学长海医院崔龙教授惠赠;大肠癌LoVo细胞株由上海医科大学瑞金消化外科研究所提供;大肠癌SW480细胞株由第四军医大学动物研究所提供;感受态菌由第四军医大学遗传与发育教研室制备;脂质体lipofectamine™ 2 000 (LF 2 000)为Invitrogen公司产品;G 418, DMEM为Gibco公司产品;5-FC, MTT为Sigma公司产品;RPMI 1640培养基,胎牛血清, BamH 酶, EcoR 酶, Sal 酶为Promega公司产品;大量柱离心式质粒抽提纯化试剂盒及小量柱离心式组织和细胞基因组DNA抽提试剂盒为上海华舜公司产品;PCR扩增Premix Taq™ 酶为Biotech公司产品,CD基因引物由Biotech公司合成,引物序列(扩增产物1.5 kb)为:正义链5' -ATAGAATTCAGGCTAACAA TGTCGAATTAACGCTT-3',反义链5' -TATGGATC CTCAACGTTTGTAAATCCATGGCTT-3'.

1.2 方法

1.2.1 质粒扩增和酶切鉴定 将质粒pCD2, G1CEACDNa在感受态中大量扩增后,按质粒抽提试剂盒说明书提取并纯化质粒,主要步骤:在细菌沉淀中加入P1液3.5 mL,振荡后加入P2液3.5 mL并混匀,室温静置4 min,加入PN液5 mL并混匀,12 000 g离心30 min,将上清液移入黏附柱,离心2 min,加入W1液12 mL,静置1 min,离心2 min,在黏附膜中央加入T1液500 μL,室温静置2 min后,离心5 min.质粒pCD2用BamH及EcoR 酶切鉴定,质粒G1CEACDNa用Sal 酶切鉴定,用20 g/L琼脂糖凝胶电泳.

1.2.2 大肠癌细胞的转染 在24孔培养板中分别接种 3×10^5 个SW480、LoVo细胞,待细胞生长至95%融合时,用无血清RPMI 1640培养基轻洗细胞并用之置换加宁L(含1 μg质粒DNA和2.5 μL LF 2 000)培养24 h,以含400 mg/L G 418及100 mL/L胎牛血清的RPMI 1 640培养基传代培养转染细胞,选择培养14 d,其中原传代2次,筛选抗性克隆并扩增.

1.2.3 细胞基因组DNA的提取及PCR检测 按细胞DNA提取试剂盒说明书操作,主要步骤如下:将 10^7 细胞移入离心管中,10 000 g离心10 s,弃上清,加入RNase A 20 μL和DT液200 μL,混匀,65 °C温浴5 min,加入DL液400 μL和Proteinase K 25 μL并混匀后65 °C温浴20 min,离心5 min,将上清液移入另一离心管中,加入异丙醇200 μL混匀后,取样品液至黏附柱中,离心30 s,加入W1液500 μL,静置1 min,离

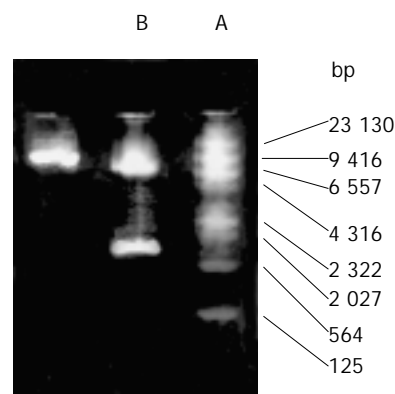
心30 s,加入W1液500 μL,离心30 s,在黏附柱中央加入T1液100 μL,65 °C静置5 min,离心1 min, -20 °C保存.PCR用50 μL反应体系,反应条件:94 °C, 3 min, 94 °C, 30 s, 60 °C, 30 s, 72 °C, 40 s, 72 °C, 10 min, 40个循环,PCR产物用20 g/L琼脂糖凝胶电泳.

1.2.4 前药5-FC对转基因大肠癌细胞的杀伤作用 将转染G1CEACDNa、pCD2之LoVo、SW480细胞(分别命名为:LoVo-CEACD, LoVo-CD, SW480-CEACD, SW480-CD)及未转基因之LoVo、SW480细胞以 5×10^4 个/孔接种到96孔细胞培养板中,接种同时加入含各种梯度浓度的前药5-FC,每种浓度设3个复孔,同时设置对照孔及调零孔.在37 °C、50 mL/L CO₂ 孵箱中培养,每2 d换液1次,第8天去除培养液,以MTT法测定活细胞比率并计算杀伤率:加入MTT 20 μL(5g/L), 37 °C孵育4 h后弃上清加入二甲基亚砷(Sigma) 150 μL, 10 min后振荡,以490 nm为测定波长,上酶标仪测定吸光度值(A).根据下列公式计算细胞存活率:存活率 = 实验组A值 / 对照组A值 × 100%.将转CD基因SW480, LoVo细胞与未转基因之SW480、LoVo细胞分别以100, 80, 50, 30, 20, 10, 0之比率(%)混合接种至24孔板中,每种混合细胞设3个复孔,同时设置对照孔及调零孔,以含2.0 mmol/L 5-FC的RPMI 1 640完全培养基中培养8 d后,以MTT法检测活细胞比率并计算旁观者效应杀伤率.

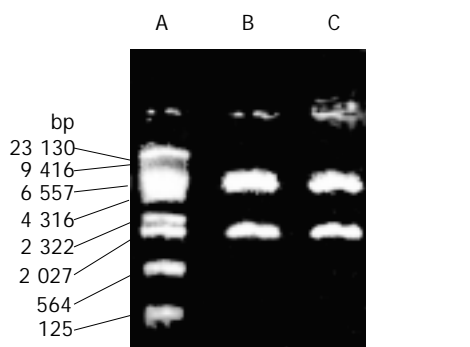
统计学处理 在SPLM软件中输入药敏实验中各浓度前药下每组细胞生存率,作线图并计算IC₅₀,采用未配对计量资料的t检验进行统计学处理.

2 结果

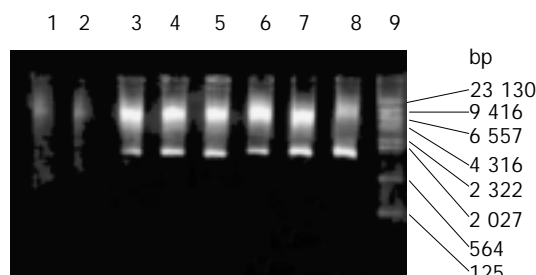
2.1 目的基因整合到靶细胞中 质粒pCD2用BamH 及EcoR 酶切可见1.5 kb酶切片段(图1),质粒G1CEACDNa用Sal 酶切可见1.9 kb酶切片段(图2).转pCD2及G1CEACDNa之SW480、LoVo细胞PCR产物电泳均可见1.5 kb片段(图3).



A. λ DNA Hind III Marker; B. pCD2 plasmid.
图1 pCD2质粒酶切鉴定.



A. λ DNA Hind III Marker; B,C: G1CEACDNa plasmid.
图2 G1CEACDNa 质粒酶切鉴定.



1: SW480; 2: LoVo; 3: SW480-CEACD; 4: SW480-CD; 5: LoVo-CD
6: LoVo-CEACD; 7,8: LoVo-CEACD; 9: λ DNA Hind III Marker.
图3 PCR 验证 CD 基因转染 LoVo 和 SW480 细胞.

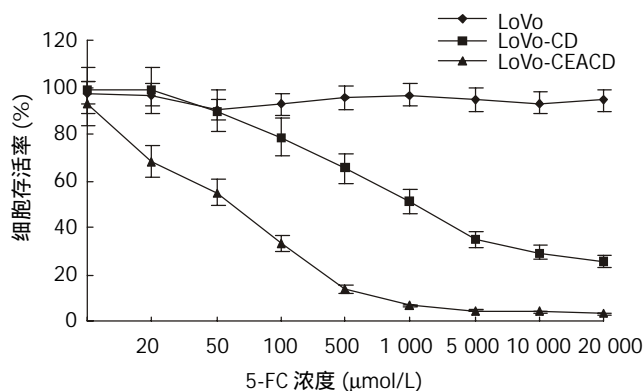


图4 前药 5-FC 对转 CD 基因的 LoVo 细胞的杀伤作用.

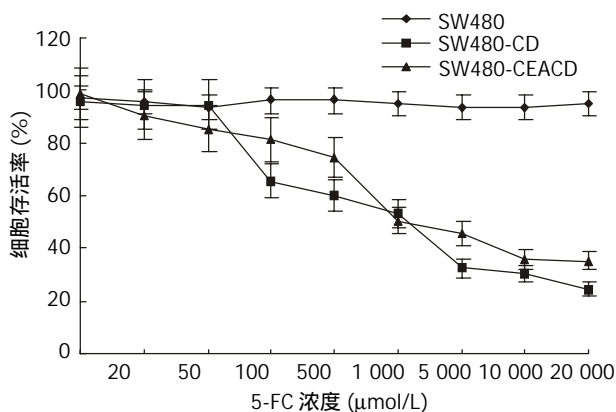


图5 前药 5-FC 对转 CD 基因的 SW480 细胞的杀伤作用.

2.2 前药 5-FC 对转基因大肠癌细胞 LoVo、SW480 的杀伤作用 LF2 000 转染 pCD2、G1CEACDNa, 以含 400 mg/L G418 的 1 640 培养基选择培养 14 d, 对照组细胞在 6 d 后

全部死亡. 5-FC 对转基因大肠癌细胞 LoVo, SW480 有杀伤作用(图 4, 5), 转 CD 基因之 LoVo, SW480 细胞对 5-FC 的敏感性明显提高, 转 G1CEACDNa 之 LoVo 细胞较转 pCD2 之 LoVo 细胞对 5-FC 的敏感性明显增强, 其 IC_{50} 分别为 0.1 mmol / L 和 0.8 mmol / L, 而转 G1CEACDNa 之 SW480 细胞对 5-FC 的敏感性小于转 pCD2 之 SW480 细胞, 其 IC_{50} 分别为 1.0 mmol / L 和 0.8 mmol / L. 细胞的杀伤率与转基因细胞的比例并不一致, 当转基因细胞达到 30 % 时, 对混合细胞的杀伤作用就与 100% 转基因细胞的杀伤作用相似(旁观者效应, 表1).

表1 旁观者效应细胞杀伤率 (%), $\bar{x} \pm s$ n=3)

细胞	转基因细胞比率						
	0	10	20	30	50	80	100
LoVo-CD	0	31.5	44.5	58.2	61.3	63.6	71.5
LoVo-CEACD	0	45.6	79.4	88.5	91.3	92.8	96.5
SW480-CD	0	32.5	41.3	53.5	60.2	61.2	63.2
SW480-CEACD	0	33.3	41.3	52.0	53.6	55.5	59.3

3 讨论

胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase, CD)基因是来源于某些细菌和真菌的一种自杀基因, 其编码的 CD 酶能将对真核细胞相对无毒的 5- 氟胞嘧啶(5-FC)转换成细胞毒性化疗药 5- 氟尿嘧啶(5-FU), 抑制细胞 RNA 和 DNA 的合成而致细胞死亡^[10]. 5-FU 作为结肠癌的一线化疗药物, 对机体正常组织的毒副作用限制了其在结肠癌化疗的临床应用^[11-13], 靶向基因治疗可将治疗基因在肿瘤组织中特异地表达, 使正常组织免受损害. CEA 基因属于组织特异性表达基因, 利用 CEA 基因的转录调控序列来调控 CD 基因的表达, 可特异性杀死 CEA 阳性分泌的大肠癌细胞^[14-16], 对结肠癌肝转移也有特异性治疗作用及旁杀伤效应^[17-21], 对结肠癌的腹膜转移亦能进行有效治疗^[22]. 临床资料显示, 虽然 CEA 作为结肠癌疗效及转移的监测指标有其特异性^[23], 但在大肠癌患者中, 近 2/3 血清 CEA 正常^[24], Dukes A 期患者血清 CEA 水平仅 $5.3 \pm 1.8 \mu\text{g/L}$ ^[25], 表明临床有相当一部分大肠癌患者其 CEA 表达水平较低. 我们所采用的 LoVo 和 SW480 分别是高表达 CEA 和低表达 CEA 的人大肠癌细胞株, CEA 分泌水平分别为 49 fg/cell 和 3.1 fg/cell.

本研究用逆转录病毒载体 G1CEACDNa 及 pCD2 分别转染 LoVo 细胞和 SW480 细胞, G1CEACDNa 由组织特异性 CEA 基因顺式转录调控序列(TRS)调控 CD 基因的表达, pCD2 为非组织特异性 CD 基因逆转录病毒载体, 我们用脂质体 LF2000 直接转染大肠癌细胞, 经 G418 选择培养 14 d 后, 用前药 5-FC 进行实验. 结果显示, 目的基因均成功整合到靶细胞中, LoVo-CEACD 及 LoVo-CD 细胞比未转基因之 LoVo 细胞对 5-FC 的敏

感性明显提高($P < 0.01$, $t = 5.688$, $n = 9$; $P < 0.01$, $t = 3.136$, $n = 9$), SW480-CEACD及SW480-CD细胞比未转基因之SW480细胞对5-FC的敏感性明显提高($P < 0.01$, $t = 3.437$, $n = 9$; $P < 0.01$, $t = 3.516$, $n = 9$), LoVo-CEACD较LoVo-CD细胞对5-FC的敏感性明显增强($P < 0.05$, $t = 2.183$, $n = 9$), 其 IC_{50} 提高了8倍, 而SW480-CEACD细胞对5-FC的敏感性小于SW480-CD细胞, 后者的 IC_{50} 是前者的1.25倍; 转染CEA组织特异性CD基因后, 低表达CEA的大肠癌细胞SW480对前药5-FC的敏感性低于高表达CEA的人大肠癌细胞LoVo ($P < 0.05$, $t = 2.504$, $n = 9$), 后者 IC_{50} 是前者的10倍; 转G1CEACDNa及pCD2之LoVo和SW480细胞均可观察到明显的旁观者效应. 我们的实验结果表明, 用组织特异性CEA启动子调控CD基因的表达, 对高表达CEA的大肠癌细胞LoVo和低表达CEA的大肠癌细胞SW480均有明显的靶向杀伤作用, 提高了细胞对前药5-FC的敏感性, 但对SW480的杀伤作用不如对LoVo细胞的杀伤作用理想, 甚至低于普通型CD基因, 分析可能是由于肿瘤细胞CEA的低表达导致CEA启动子调控的CD基因的低表达所致, 其机制有待进一步实验证实.

靶向性和有效性是基因治疗的两大瓶颈, 前者可使正常组织细胞免受损害, 后者保证了治疗的效率. 我们的实验提示, CEA组织特异性CD/5FC系统对低表达CEA大肠癌的治疗效率将受到影响, 有研究表明, 用CEA启动子和增强子共同调节CD基因的表达, 能明显提高肿瘤细胞CD基因的表达^[26], 放疗、免疫因子与CD/5FC系统的联合应用、双自杀基因的共同转导^[27-38]等都能提高CD/5FC系统的治疗效果, 这样可以在保证治疗靶向性的前提下提高治疗效率.

4 参考文献

- Greco O, Dachs GU. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future prospectives. *J Cell Physiol* 2001;187:22-36
- Sandalon Z, Fusenig NE, McCutcheon J, Taichman LB, Garlick JA. Suicide gene therapy for premalignant disease: a new strategy for the treatment of intraepithelial neoplasia. *Gene Ther* 2001; 8:232-238
- Dilber MS, Gahrton G. Suicide gene therapy: possible applications in haematopoietic disorders. *J Intern Med* 2001;249:359-367
- Beltinger C, Uckert W, Debatin KM. Suicide gene therapy for pediatric tumors. *J Mol Med* 2001;78:598-612
- Harvey BG, Maroni J, O'Donoghue KA, Chu KW, Muscat JC, Pippo AL, Wright CE, Hollmann C, Wisnivesky JP, Kessler PD, Rasmussen HS, Rosengart TK, Crystal RG. Safety of local delivery of low- and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of morbid conditions. *Hum Gene Ther* 2002; 13:15-63
- Crystal RG, Harvey BG, Wisnivesky JP, O'Donoghue KA, Chu KW, Maroni J, Muscat JC, Pippo AL, Wright CE, Kaner RJ, Leopold PL, Kessler PD, Rasmussen HS, Rosengart TK, Hollmann C. Analysis of risk factors for local delivery of low- and intermediate-dose adenovirus gene transfer vectors to individuals with a spectrum of comorbid conditions. *Hum Gene Ther* 2002;13:65-100
- Harvey BG, Worgall S, Ely S, Leopold PL, Crystal RG. Cellular immune responses of healthy individuals to intradermal administration of an E1-E3- adenovirus gene transfer vector. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2823-2837
- Spencer DM. Developments in suicide genes for preclinical and clinical applications. *Curr Opin Mol Ther* 2000 ;2:433-440
- Cui L, Lin YZ, Zhu ZG, Chen XH, Gu QL, Liu BY, Yu BM. Killing effect of 5-FC/CD system on nude mice bearing human colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:473-475
- Nakamura H, Mullen JT, Chandrasekhar S, Pawlik TM, Yoon SS, Tanabe KK. Multimodality therapy with a replication-conditional herpes simplex virus 1 mutant that expresses yeast cytosine deaminase for intratumoral conversion of 5-fluorocytosine to 5-fluorouracil. *Cancer Res* 2001;61:5447-5452
- Gennatas C, Mouratidou D, Androulakis G, Georgoulis V, Tsavaris N, Philippakis M, Michailakis E, Kalofonos C, Mpesmpeas S, Katsos J, Tsitoura M, Retalis G, Mallas E, Voros D, Andreadis C, Hatzistylianos G, Pisiotis C, Kamilarios D, Kakoliris S, Komporozos V, Kannas D, Legakis N, Mpatakis T, Ntamtsios J, Papaevangelou E, Peros G, Photopoulos A, Pouli A, Prigouris S, Samanidis L, Sakellariou V, Smyrniotis V, Polymeneas G, Vasiliou J, Athanasiou A, Papadimitriou J. Adjuvant systemic therapy protocol for Dukes' B2 and C resectable colon carcinoma. *Tumori* 2002;88:32-36
- Ravaoli A, Marangolo M, Pasquini E, Rossi A, Amadori D, Cruciani G, Tassinari D, Oliverio G, Giovanis P, Turci D, Zumaglini F, Nicolini M, Panzini I. Bolus fluorouracil and leucovorin with oxaliplatin as first-line treatment in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:2545-2550
- Baars A, Claessen AM, Wagstaff J, Giaccone G, Scheper RJ, Meijer S, Schakel MJ, Gall HE, Meijer CJ, Vermorken JB, Pinedo HM, van den Eertwegh AJ. A phase II study of active specific immunotherapy and 5-FU/Leucovorin as adjuvant therapy for stage III colon carcinoma. *Br J Cancer* 2002;86:1230-1234
- Shen LZ, Wu WX, Xu DH, Zheng ZC, Liu XY, Ding Q, Hua YB, Yao K. Specific CEA-producing colorectal carcinoma cell killing with recombinant adenoviral vector containing cytosine deaminase gene. *World J Gastroenterol* 2002;8: 270-275
- 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
- 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
- Humphreys MJ, Ghaneh P, Greenhalf W, Campbell F, Clayton TM, Everett P, Huber BE, Richards CA, Ford MJ, Neoptolemos JP. Hepatic intra-arterial delivery of a retroviral vector expressing the cytosine deaminase gene, controlled by the CEA promoter and intraperitoneal treatment with 5-fluorocytosine suppresses growth of colorectal liver metastases. *Gene Ther* 2001;8: 1241-1247
- 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 expression of bacterial cytosine deaminase. *Cancer Gene Ther* 2000;7:438-445
- Pierrefite-Carle V, Baque P, Gavelli A, Benchimol D, Bourgeon A, Milano G, Saint-Paul MC, Rossi B. Regression of experimental liver tumor after distant intra-hepatic injection of cytosine deaminase-expressing tumor cells and 5-fluorocytosine treatment. *Int J Mol Med* 2000;5:275-278
- Nyati MK, Symon Z, Kievit E, Dornfeld KJ, Rynkiewicz SD, Ross BD, Rehemtulla A, Lawrence TS. The potential of 5-fluorocytosine/cytosine deaminase enzyme prodrug gene therapy in an intrahepatic colon cancer model. *Gene Ther* 2002;9:844-849
- Baque P, Pierrefite-Carle V, Gavelli A, Brossette N, Benchimol D, Bourgeon A, Staccini P, Saint-Paul MC, Rossi B. Naked DNA injection for liver metastases treatment in rats. *Hepatology* 2002;35: 1144-1152
- Bentires AM, Hellin AC, Lechanteur C, Princen F, Lopez M, Fillet G, Gielen J, Merville MP, Bours V. Cytosine deaminase suicide gene therapy for peritoneal carcinomatosis. *Cancer Gene Ther* 2000;7: 20-26
- Wang WS, Lin JK, Lin TC, Chiou TJ, Liu JH, Yen CC, Chen WS, Jiang JK, Yang SH, Wang HS, Chen PM. Tumor marker CEA in monitoring of response to tegafur-uracil and folic acid in patients with metastatic colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*

- 2002; 49: 388-392
- 24 Perez CA, Ravindranath MH, Gupta RK, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Wood TF, Soh D, Morton DL, Bilchik AJ. Serum total gangliosides and TA90-IC levels: novel immunologic markers in colorectal cancer. *Cancer J* 2002;8:55-61
- 25 Wichmann MW, Muller C, Hornung HM, Lau-Werner U, Schildberg FW. Results of long-term follow-up after curative resection of dukes a colorectal cancer. *World J Surg* 2002; 26:732-736
- 26 Nyati MK, Sreekumar A, Li S, Zhang M, Rynkiewicz SD, Chinnaiyan AM, Rehemtullaalawrence TS. High and selective expression of yeast cytosine deaminase under a carcinoembryonic antigen promoter-enhancer. *Cancer Res* 2002;62:2337-2342
- 27 Ueno M, Koyama F, Yamada Y, Fujimoto H, Takayama T, Kamada K, Naito A, Hirao S, Mukogawa T, Hamada H, Nakajima Y. Tumor-specific chemo-radio-gene therapy for colorectal cancer cells using adenovirus vector expressing the cytosine deaminase gene. *Anticancer Res* 2001; 21: 2601-2608
- 28 Sun W, Tang Z, Wei D, Tang Y, Chen S. Combined gene therapy for murine liver cancer with interleukin-18 and cytosine deaminase genes. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2001; 9: 300-302
- 29 Cao X, Huang X, Ju DW, Zhang W, Hamada H, Wang J. Enhanced antitumoral effect of adenovirus-mediated cytosine deaminase gene therapy by induction of antigen-presenting cells through stem cell factor/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene transfer. *Cancer Gene Ther* 2000; 7:177-186
- 30 Lee YJ, Lee H, Borrelli MJ. Gene transfer into human prostate adenocarcinoma cells with an adenoviral vector: Hyperthermia enhances a double suicide gene expression, cytotoxicity and radiotoxicity. *Cancer Gene Ther* 2002; 9: 267-274
- 31 Ueda K, Iwahashi M, Nakamori M, Nakamura M, Matsuura I, Yamaue H, Tanimura H. Carcinoembryonic antigen-specific suicide gene therapy of cytosine deaminase/5-fluorocytosine enhanced by the cre/loxP system in the orthotopic gastric carcinoma model. *Cancer Res* 2001;61:6158-6162
- 32 Kievit E, Nyati MK, Ng E, Stegman LD, Parsels J, Ross BD, Rehemtulla A, Lawrence TS. Yeast cytosine deaminase improves radiosensitization and bystander effect by 5-fluorocytosine of human colorectal cancer xenografts. *Cancer Res* 2000;60:6649-6655
- 33 Ju DW, Yang Y, Tao Q, Song WG, He L, Chen G, Gu S, Ting CC, Cao X. Interleukin-18 gene transfer increases antitumor effects of suicide gene therapy through efficient induction of antitumor immunity. *Gene Ther* 2000;7:1672-1679
- 34 Koyama F, Sawada H, Hirao T, Fujii H, Hamada H, Nakano H. Combined suicide gene therapy for human colon cancer cells using adenovirus-mediated transfer of escherichia coli cytosine deaminase gene and Escherichia coli uracil phosphoribosyltransferase gene with 5-fluorocytosine. *Cancer Gene Ther* 2000;7:1015-1022
- 35 Stackhouse MA, Pederson LC, Grizzle WE, Curiel DT, Gebert J, Haack K, Vickers SM, Mayo MS, Buchsbaum DJ. Fractionated radiation therapy in combination with adenoviral delivery of the cytosine deaminase gene and 5-fluorocytosine enhances cytotoxic and antitumor effects in human colorectal and cholangiocarcinoma models. *Gene Ther* 2000;7:1019-1026
- 36 Rogulski KR, Wing MS, Paielli DL, Gilbert JD, Kim JH, Freytag SO. Double suicide gene therapy augments the antitumor activity of a replication-competent lytic adenovirus through enhanced cytotoxicity and radiosensitization. *Hum Gene Ther* 2000 ;11:67-76
- 37 Moriuchi S, Wolfe D, Tamura M, Yoshimine T, Miura F, Cohen JB, Glorioso JC. Double suicide gene therapy using a replication defective herpes simplex virus vector reveals reciprocal interference in a malignant glioma model. *Gene Ther* 2002;9:584-591
- 38 Chen G, Li S, Yu B, An P, Cai H, Guo W. X-ray combined with cytosine deaminase suicide gene therapy enhances killing of colorectal carcinoma cells *in vitro*. *Zhonghua Waike Zazhi* 2002;40:136-138

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志和 WJG 获得商标注册

本刊讯 世界华人消化杂志和 World Journal of Gastroenterology 经中华人民共和国国家工商行政管理总局商标局核定使用商品 (第 16 类), 获得商标注册。

世界华人消化杂志® 注册有效期限自公元 2002-11-14 至 2012-11-13 止. 商标注册证第 2001071 号.

World Journal of Gastroenterology® 注册有效期限自 2002-11-14 至 2012-11-13 止. 商标注册证第 2001158 号.

(世界胃肠病学杂志社 2002-12-18)

大肠腺癌组织 Survivin 蛋白的表达意义

肖军,邓长生,朱尤庆

肖军,邓长生,朱尤庆,武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071
肖军,男,1973-09-15生,汉族,1995年湖北医科大学毕业,现为武汉大学中南医院消化内科硕士研究生。

项目负责人:邓长生,430071,湖北省武汉市东湖路39号,武汉大学中南医院消化内科。 xiaojun101010100@sina.com

电话:027-87317915

收稿日期:2002-08-10 接受日期:2002-08-29

Expression of survivin protein in colorectal adenocarcinoma

Jun Xiao, Chang-Sheng Deng, You-Qing Zhu

Jun Xiao, Chang-Sheng Deng, You-Qing Zhu, Digestive Department, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 39 Dong-hu Road, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Prof. Chang-Sheng Deng, Digestive Department, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 39 Donghu Road, Wuhan 430071, Hubei Province, China. xiaojun101010100@sina.com

Received: 2002-08-10 Accepted: 2002-08-29

Abstract

AIM: To investigate the expression of survivin and its relationship with proliferation and apoptosis in colorectal adenoma and adenocarcinoma.

METHODS: Using terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and immunohistochemistry S-P method, the authors examined the expression of survivin, Ki-67 and apoptotic cell in situ in 60 cases of colorectal adenocarcinoma, 35 adenoma and 20 normal colonic mucosa.

RESULTS: Survivin expression was observed in 36 of 60 (60.0%) cases of colorectal adenocarcinoma and in 6 of 35 (17.1%) cases of adenoma. In contrast, normal colonic mucosa did not express survivin. Overexpression of survivin was related to the differentiation grade of colorectal adenocarcinoma, however there was no correlation with Dukes's stage of lymph node metastasis. Ki-67 labeling index (LI) was higher in colorectal adenocarcinoma than that in adenoma ($39.1 \pm 10.4\%$ versus $22.3 \pm 6.2\%$, $P < 0.01$). The apoptosis index (AI) of colorectal adenocarcinoma and adenoma was significantly higher than that of normal tissues ($P < 0.01$). More apoptotic cells were noticed in well and moderate differentiated adenocarcinoma than those in poorly differentiated adenocarcinoma ($P < 0.05$). Survivin positive adenoma and adenocarcinoma had significantly lower values for AI than survivin negative tumors ($P < 0.01$), and the Ki-67 LI in survivin positive adenoma and adenocarcinoma were higher than that in survivin negative tumors ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Up-regulation of survivin expression in adenocarcinoma suggests that survivin may play an important role in human colorectal tumorigenesis through the inhibition of apoptosis and acceleration of proliferative activity. Survivin

may be a new prognostic implication in colorectal adenocarcinoma and serve as a widely applicable target for anticancer gene therapy.

Xiao J, Deng CS, Zhu YQ. Expression of survivin protein in colorectal adenocarcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):540-543

摘要

目的:检测凋亡抑制蛋白 Survivin 在大肠腺瘤、腺癌组织中的表达,观察其与细胞增生、凋亡的关系,探讨 Survivin 基因表达在大肠癌发生、发展过程中的作用。

方法:应用 DNA 缺口末端标记技术和免疫组织化学 S-P 法,原位观察 20 例正常大肠黏膜组织、35 例大肠腺瘤和 60 例大肠腺癌组织中的凋亡细胞和 Survivin、Ki-67 蛋白阳性表达。

结果:Survivin 蛋白在正常大肠黏膜组织中不表达,在大肠腺癌和腺瘤中阳性表达率分别为 60.0% 和 17.1%,二者比较差异有显著性($P < 0.01$)。Survivin 蛋白表达与大肠腺癌分化程度呈负相关,与 Dukes' 分期和淋巴结转移无明显相关。大肠腺癌 Ki-67 标记指数(labeling index, LI)为 $39.1 \pm 10.4\%$,较腺瘤 $22.3 \pm 6.2\%$ 显著增高($P < 0.01$),大肠腺癌 Survivin 阳性组 Ki-67 LI $25.1 \pm 7.6\%$ 与 Survivin 阴性组 $19.7 \pm 5.8\%$ 比较差异有显著性($P < 0.01$)。大肠腺瘤和腺癌细胞凋亡指数(AI)显著高于正常大肠黏膜($P < 0.01$),高分化癌凋亡指数显著高于低分化癌($P < 0.05$),大肠腺癌 Survivin 阳性组凋亡指数 $0.85 \pm 0.52\%$ 与 Survivin 阴性组 $1.25 \pm 0.58\%$ 比较差异有显著性($P < 0.01$)。

结论:Survivin 基因在大肠腺癌组织中表达上调,通过促进肿瘤细胞增生和抑制凋亡参与大肠癌的发生、发展过程。检测大肠组织 Survivin 蛋白表达,对预测癌变及判断预后具有重要意义。Survivin 基因为肿瘤的基因治疗提供一理想靶点。

肖军,邓长生,朱尤庆. 大肠腺癌组织 Survivin 蛋白的表达意义. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):540-543

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/540.htm>

0 引言

大肠癌是世界上高发恶性肿瘤之一,在我国为 4-6 位^[1,2]。细胞凋亡调节紊乱是大肠癌的重要机制之一^[3-13]。Survivin 是新近发现的凋亡抑制蛋白(inhibition apoptosis protein, IAP),在正常成熟组织中不表达,在人类各

种肿瘤组织广泛表达^[14-20], 其独特的结构和生物学功能在肿瘤分子生物学研究中日益受到重视. 本研究通过检测 Survivin 蛋白在大肠腺癌和腺瘤中的表达, 观察其与细胞增生、凋亡的关系, 探讨 Survivin 基因表达在大肠癌发生、发展过程中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 大肠腺癌 60 例、大肠腺瘤 35 例和正常大肠黏膜 20 例均取自武汉大学中南医院、湖北省肿瘤医院 1999-2001 年经病理证实的手术切除标本和活检组织, 40 g/L 甲醛固定, 石蜡包埋 4 μ m 连续切片, HE 染色复诊. 所有标本均选自术前未经放、化疗且无坏死的组织. 60 例大肠腺癌中, 按癌组织分化程度分为高分化 11 例, 中分化 23 例, 低分化 26 例, 男 34 例, 女 26 例, 年龄 26-75 岁, 平均 52.6 岁. Dukes' A 期 10 例, B 期 32 例, C 期 18 例. 35 例大肠腺瘤中, 男 17 例, 女 13 例, 年龄 21-70 岁, 平均 49.5 岁, 其中管状腺瘤 21 例, 绒毛状腺瘤 6 例, 管状绒毛状腺瘤 8 例. 按不典型增生程度分为轻度不典型增生 13 例, 中度不典型增生 16 例, 重度不典型增生 6 例. Survivin 兔抗人多克隆抗体(RB-1629)为美国 Neomarkers 公司产品(购自晶美公司), Ki-67 鼠抗人单克隆抗体(即用型)、S-P 试剂盒均购自福州迈新公司, TUNEL 试剂盒购自德国宝灵曼公司.

1.2 方法 组织切片常规脱蜡至水, 微波抗原修复, S-P 法操作, DAB 显色, 苏木精复染. Survivin 工作浓度为 1:1000. 将已知的大肠癌切片作阳性对照, 用磷酸盐缓冲溶液(PBS)代替一抗作阴性对照. 采用 DNA 末端标记方法检测组织中凋亡的细胞, 染色方法按原位凋亡细胞检测试剂盒说明书进行, 以已知大肠癌阳性片作阳性对照, 以 PBS 代替 TDT 工作液作阴性对照. 凋亡细胞的判断根据细胞核呈棕黄色染色并在形态学上符合凋亡细胞特征, 在高倍镜($\times 400$)下计数 1000 个细胞中的阳性细胞, 以百分数表示, 计数结果作为凋亡指数(apoptosis index, AI). Ki-67 抗原以细胞核出现浅至深棕黄色颗粒作为阳性, 在高倍镜($\times 400$)视野中计数 1000 个细胞中阳性细胞的百分比作为 Ki-67 标记指数(Ki-67 labeling index). Survivin 阳性判定参考

Kawasaki et al^[21]报道的方法: 计数 5 个高倍视野, 将平均阳性细胞数分为 5 类. 0 < 5%; 1, 5-25%; 2, 25-50%; 3, 50-75%; 4 > 75%. 根据染色程度将阳性信号分为 3 类. 染色强度弱, 1+; 中等染色强度, 2+; 染色强度高, 3+. 染色强度 \times 阳性细胞百分数为每个病例染色的综合记分, 综合记分 < 1 为表达阴性, 反之判定为阳性.

统计学处理 所取数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用方差分析或 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 Survivin, Ki-67 表达和细胞凋亡 Survivin 蛋白阳性反应物主要位于细胞质中, 为棕黄色颗粒(图 1), 正常大肠黏膜组织中未见 Survivin 蛋白表达(图 2). 大肠腺癌、腺瘤中 Survivin 蛋白阳性表达率分别为 60.0%(36/60), 17.1%(6/35), 二者比较差异有显著性($P < 0.01$). Ki-67 阳性反应产物主要位于细胞核内, 呈浅至深黄色颗粒(图 3), 正常大肠黏膜基底层细胞有 Ki-67 的表达, 大肠腺癌 Ki-67 标记指数 $39.1 \pm 10.4\%$, 显著高于腺瘤 $22.3 \pm 6.2\%$, 具有较高的增生活性($P < 0.05$). 凋亡阳性细胞在组织中为单个散在或小簇状分布, 核物质呈棕黄色, 大肠正常黏膜凋亡阳性细胞数量很少, 多位于表层上皮中, 腺瘤和腺癌组织检测到较多的凋亡的细胞(图 4), 大肠腺癌、腺瘤凋亡指数分别为 $0.75 \pm 0.44\%$ 、 $1.64 \pm 1.15\%$, 二者比较差异有显著性($P < 0.01$).

2.2 Survivin 表达与大肠腺癌临床病理的关系 Survivin 蛋白表达与大肠腺癌组织分化程度相关, 低分化组的 Survivin 蛋白阳性表达率(19/26, 73.1%)显著高于中分化组(12/23, 52.2%)和高分化组(5/11, 45.5%, $P < 0.05$), 而与大肠腺癌 Dukes' 分期(50.0%, 65.6%, 55.6%)和淋巴结转移(64.0% vs 57.1%)无明显相关($P > 0.05$).

2.3 Survivin 表达与凋亡指数, Ki-67 标记指数的相关性 比较大肠腺癌、腺瘤 Survivin 阳性表达组与阴性组中凋亡指数、Ki-67 标记指数, 发现凋亡指数阳性组低于阴性组($P < 0.01$), Ki-67 标记指数阳性组高于阴性组($P < 0.01$, 见表 1).

表 1 大肠腺癌和腺瘤中 Survivin 蛋白表达与凋亡指数、Ki-67 标记指数关系($\bar{x} \pm s$)

诊断	n	凋亡指数		Ki-67 标记指数				
		阳性(%)	n	阴性(%)	n	阳性(%)	n	阴性(%)
大肠腺癌	6	1.15 \pm 0.47	29	1.78 \pm 1.12 ^a	6	25.1 \pm 7.6	29	19.7 \pm 5.8 ^a
大肠腺瘤	36	0.85 \pm 0.52	24	1.25 \pm 0.58 ^a	36	47.5 \pm 11.3	24	34.4 \pm 8.5 ^a

^a $P < 0.01$, vs 阳性.

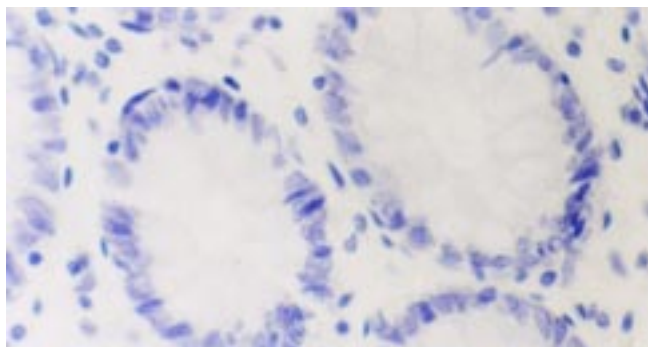


图1 Survivin 在正常大肠黏膜组织表达 S-P 法 × 400.

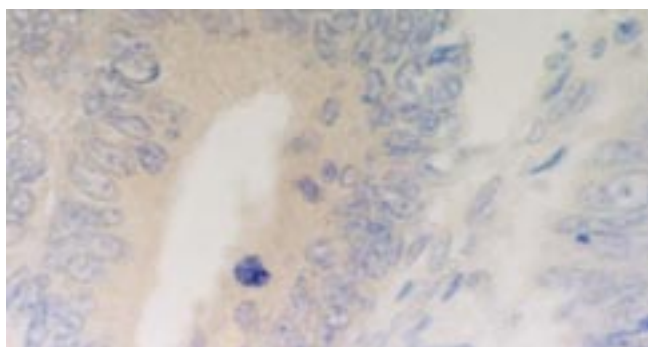


图2 Survivin 在 腺癌组织表达 S-P 法 × 400

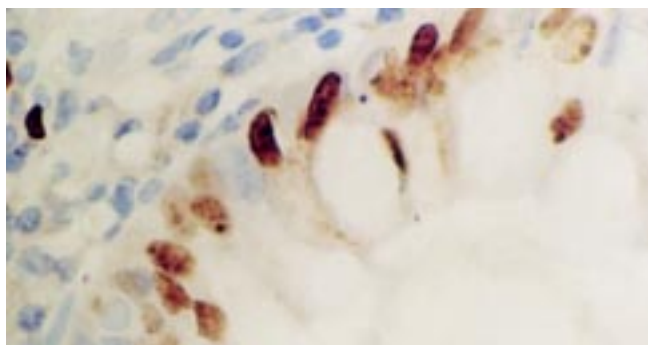


图3 Ki-67 在 腺癌组织表达 S-P 法 × 400

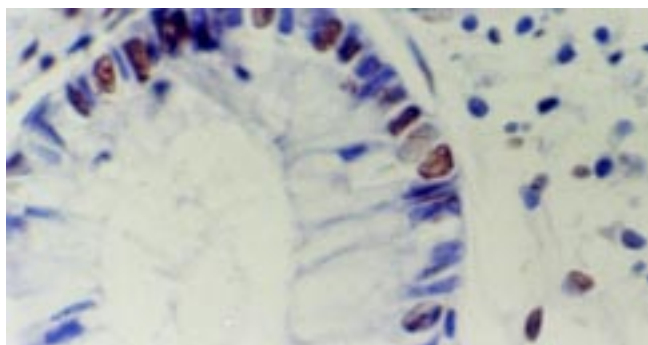


图4 高分化腺癌组织中凋亡细胞 TUNEL 法 × 400

3 讨论

调节细胞凋亡的基因参与了肿瘤的发生发展过程，主要与三个基因家族即 bcl-2 家族、Caspase 家族和 IAP 家族关系密切^[22,23]。Survivin 是 IAP 家族的新成员，结构独特，仅含有一个杆状病毒凋亡抑制蛋白重复序列 (BIR) 分子，作用于各种凋亡通路末端效应分子，是迄

今发现的最强的凋亡抑制因子之一。实验研究证实，Survivin 能抑制 Fas, Caspase, Bax 及某些化疗药物诱导的凋亡^[24-26]。我们运用免疫组化方法显示 Survivin 蛋白在正常大肠黏膜中不表达，在腺瘤、腺癌组织中总表达率分别为 17.1 % 和 60.0 %，提示 Survivin 蛋白过度表达是大肠肿瘤发生的早期事件，且具有促进腺瘤向腺癌转化作用，与 Kawasaki et al^[27] 报道结果一致。Survivin 作为广泛的肿瘤抗原，在抗肿瘤免疫治疗中有广阔前景^[28,29]。Ki-67 是非组蛋白成分的 DNA 结合蛋白，其表达程度可以反映细胞的增殖活性。我们发现在大肠腺癌中 Ki-67 标记指数高于腺瘤，Survivin 阳性组高于阴性组，而凋亡指数阴性组高于阳性组 ($P < 0.01$)，进一步表明 Survivin 基因主要经过调控细胞凋亡和增生，参与大肠癌的发生和发展。基础实验表明凋亡调控多数发生在 G2/M 期，Survivin-RNA 在 G2/M 细胞表达上调 40 倍^[30]。Survivin 在细胞分裂过程中与细胞分裂微管结合控制其稳定性和有丝分裂纺锤体的聚集^[31]。因此，肿瘤组织可能通过对 Survivin 过量表达上调他们在有丝分裂中抗凋亡作用，保持肿瘤的增生和生长。Survivin 基因有望成为治疗大肠癌一个较为理想的潜在靶点。

本研究显示 Survivin 蛋白在大肠腺癌高、中、低分化组中的表达率分别为 45.5 %，52.2 % 和 73.1 %，3 组间差异有显著性 ($P < 0.05$)，提示 Survivin 蛋白的表达在一定程度上反映了腺癌的恶性程度，可以作为预后不良参数指标。Rodel et al^[32] 报道直肠癌高 Survivin 表达的患者 5 a 生存率明显低于低 Survivin 表达者 (18 % vs 77 %)，肿瘤转移前者是后者的 4 倍 (78 % vs 18 %)，认为 Survivin 阳性表达是直肠癌转移的高危因素。亦有文献报道 Survivin 检测能预测 期结肠癌的发生，因而我们认为检测 Survivin 对预测肿瘤的发生，发展和预后提供了一新的指标。我们还发现尽管 Survivin 在大肠腺癌中有过表达，但与 Dukes' 分期和淋巴结转移无明显关系，与国内学者在肺癌、子宫颈癌等研究结果一致^[33,34]。这提示在大肠癌进展过程中还受其他癌基因的调控，是多基因参与，多因素共同作用的结果^[35,36]，Survivin 基因与其他癌基因关系有待进一步研究。

4 参考文献

- Zhang ZS, Zhang YL. Progress in research of colorectal cancer in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:489-494
- Li SR. Early diagnosis of colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:780-782
- Liu LN. Cell apoptosis and colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:422-423
- Song JD, Gao F, Jiang LY, Zhao X, Chen YH, Wang YQ. Molecular mechanism of cell apoptosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002; 10:429-431
- Huang PL, Zhu SN, Lu SL, Dai SZ, Jin YL. Inhibitor of fatty acid synthase induced apoptosis in human colonic cancer cells. *World J Gastroenterol* 2000;6:295-297
- 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
- Zhang GY, Yuan WJ, He CM. Study of inhibit the proliferation and induce apoptosis of human colon adenocarcinoma cell line

- HCT116. *World J Gastroenterol* 2000;6:85
- 8 Hu JY, Wang S, Zhu JG, Zhou GH, Sun QB. Expression of B7 costimulation molecules by colorectal cancer cells reduces tumorigenicity and induces anti-tumor immunity. *World J Gastroenterol* 1999;5:147-151
- 9 Qian WF, Huang ZH, Chi DB. Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir system combined with 5-FU for the treatment of experimental colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:190-193
- 10 Huang ZH, Qian WF, Chi DB, Jiang ZS. Apoptosis in human colorectal cancer LoVo cells induced by HSVtk/GCV system in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:194-197
- 11 Lu XP, Li BJ, Chen SL, Lu B, Jiang NY. Effect of chemotherapy or targeting chemotherapy on apoptosis of colorectal carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:332-334
- 12 Wang LS, Pan LJ, Chen CL, Li MS, Shun Y, Zhang YL, Zhou DY. Effect of Bifidobacterium on proliferation and apoptosis of experimental large bowel carcinoma in situ. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:429-431
- 13 Yu LL, Yu JP, Ran ZX, Yu HG. Relationship between nuclear factor-kappa B, apoptosis and proliferation in colorectal neoplasia. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:309-312
- 14 Ikeguchi M, Ueta T, Yamane Y, Hirooka Y, Kaibara N. Inducible nitric oxide synthase and survivin messenger RNA expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002;8:3131-3136
- 15 Ikeguchi M, Kaibara N. Survivin messenger RNA expression is a good prognostic biomarker for oesophageal carcinoma. *Br J Cancer* 2002;87:883-887
- 16 Nasu S, Yagihashi A, Izawa A, Saito K, Asanuma K, Nakamura M, Kobayashi D, Okazaki M, Watanabe N. Survivin mRNA expression in patients with breast cancer. *Anticancer Res* 2002;22:1839-1843
- 17 Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol* 2002;21:315-320
- 18 Das A, Tan WL, Teo J, Smith DR. Expression of survivin in primary glioblastomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:302-306
- 19 Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, Hirooka Y, Kaibara N. Expression of survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2002;11:33-40
- 20 Yu J, Leung WK, Ebert MP, Ng EK, Go MY, Wang HB, Chung SC, Malfertheiner P, Sung JJ. Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *Br J Cancer* 2002;87:91-97
- 21 Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5071-5074
- 22 Altieri DC. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* 2001;7:542-547
- 23 Conway EM, Pollefeyt S, Steiner-Mosonyi M, Luo W, Devriese A, Lupu F, Bono F, Leducq N, Dol F, Schaeffer P, Collen D, Herbert JM. Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced apoptosis via mitochondrial pathways. *Gastroenterology* 2002;123:619-631
- 24 Azuhata T, Scott D, Takamizawa S, Wen J, Davidoff A, Fukuzawa M, Sandler A. The inhibitor of apoptosis protein survivin is associated with high-risk behavior of neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2001;36:1785-1791
- 25 Lin M, Meng X, Cai Z, Ye X. Expression and clinical significance of anti-apoptosis gene, survivin, in acute leukemia. *Zhonghua Xue Yexue Zazhi* 2002;23:251-253
- 26 Ikeguchi M, Liu J, Kaibara N. Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment. *Apoptosis* 2002;7:23-29
- 27 Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, Tanaka K, Tenjo T, Tanigawa N. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 2001;91:2026-2032
- 28 Andersen MH, Thor SP. Survivin-a universal tumor antigen. *Histol Histopathol* 2002;17:669-675
- 29 Andersen MH, Pedersen LO, Capeller B, Brocker EB, Becker JC, Thor Straten P. Spontaneous cytotoxic T-cell responses against survivin-derived MHC class I-restricted T-cell epitopes in situ as well as ex vivo in cancer patients. *Cancer Res* 2001;61:5964-5968
- 30 Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, Altieri DC. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;396:580-584
- 31 Giodini A, Kallio MJ, Wall NR, Gorbisky GJ, Tognin S, Marchisio PC, Symons M, Altieri DC. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin. *Cancer Res* 2002;62:2462-2467
- 32 Rodel F, Hoffmann J, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Weiss C, Gunther K, Schick C, Sauer R, Rodel C. High survivin expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection. *Strahlenther Onkol* 2002;178:426-435
- 33 Wang X, Chen S, Zhang Z. Expression of surviving gene and its relationship with expression of P53, c-myc, k-ras proteins in non-small-cell lung cancer. *Zhonghua Jiehe He Huxi Zazhi* 2001;24:371-374
- 34 Wang M, Wang B, Wang X. A novel antiapoptosis gene, survivin, bcl-2, p53 expression in cervical carcinomas. *Zhonghua Fuchan ke Zazhi* 2001;36:546-548
- 35 Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, Wen SF, Wang L, Kirschmeier P, Bishop WR, Nielsen LL, Pickett CB, Liu S. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2002;21:2613-2622
- 36 Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ, Boman BM. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res* 2001;61:8664-8667

胃癌细胞系幽门螺杆菌感染对金属蛋白酶表达的影响

李新华,张桂英,罗非君,徐美华,李 乾

李新华,张桂英,徐美华,李乾,中南大学湘雅医院消化内科
湖南省长沙市 410008
罗非君,中南大学湘雅医学院肿瘤所 湖南省长沙市 410078
李新华,女,1969-10-19生,湖南省邵东县人,汉族,1993年湖南医科大学本科
毕业,2001年中南大学湘雅医学院硕士研究生毕业,主要从事消化系统肿瘤的分子
机制研究。
湖南省科技厅资助项目, No.01SSY2008-9 ;
湖南省卫生厅资助项目, No.2001-Y23/1.0
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。
电话:0731-4327249
收稿日期:2002-07-23 接受日期:2002-08-02

Influence of expression of matrix metalloproteinase induced by *H. pylori* infection in gastric cancer cell line

Xin-Hua Li, Gui-Ying Zhang, Fei-Jun Luo, Mei-Hua Xu, Qian Li

Xin-Hua Li,Gui-Ying Zhang,Mei-Hua Xu,Qian Li,Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China
Fei-Jun Luo, Cancer Research Institute, Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China
Supported by the Natural Scientific Foundation of Hunan Province, No.01SSY2008-9, and the Foundation of Hunan Province, No. 2001-Y23/1.0
Correspondence to: Prof. Gui-Ying Zhang, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, Hunan Province, China.
Received:2002-07-23 Accepted:2002-08-02

Abstract

AIM:To establish an animal model to study the effect of *H. pylori* on metastasis, and to explore the possible mechanism and the relationship between *H. pylori* and gastric cancer metastasis.

METHODS:Using BGC-823 cell cocultured with *H. pylori*, the growth of tumors and metastasis were observed in 8-week nude mice after the first intra-tumoral injection of the group of *H. pylori* infection and the group of no infection. The expression of MMP-2, MMP-3, TIMP-2 and TIMP-3 were investigated by immunohistochemical staining.

RESULTS:There was a significant difference in the weight of tumors between the group of *H. pylori* infection and the group without *H. pylori* infection in 8-week nude mice after the first intratumoral injection ($P < 0.05$). There were two lung metastases in group of *H. pylori* infection. The positive rates of MMP-2, MMP-3, TIMP-2 and TIMP-3 in the group of *H. pylori* infection by immunohistochemical staining were 77.8±9.6%, 64.5±6.9%, 57.6±12.2% and 40.0±9.2%, and 61.2±9.7%, 53.1±5.8%, 54.3±10.9% and 53.0±6.6% in the group without *H. pylori* infection, respectively. The expression of MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 were significantly higher in the group of *H. pylori* infection than those in the group without *H. pylori* infection ($P < 0.05$), but the expression of

TIMP-3 has no significantly change.

CONCLUSION:*H. pylori* infection can accelerate the tumor growth in nude mouse and lung metastasis. The expression of MMP-2 and MMP-3 increases and TIMP-2 decreases in *H. pylori* infection, suggesting *H. pylori* may enhance gastric cancer metastasis by regulating the expression of metastasis-correlated factors.

Li XH, Zhang GY, Luo FJ, Xu MH, Li Q. Influence of expression of matrix metalloproteinase induced by *H. pylori* infection in gastric cancer cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):544-546

摘要

目的:建立胃癌细胞系H.pylori感染动物转移体外模型,初步探讨H.pylori感染在胃癌转移过程中的可能作用及其机制。

方法:将H.pylori活菌与胃癌细胞系BGC-823低转移细胞株C8细胞共培养后,行裸鼠接种,观察H.pylori感染组与未感染组移植瘤生长情况及裸鼠肝、肺转移情况,免疫组化检测两组移植瘤中MMP-2, MMP-3, TIMP-2及TIMP-3蛋白的表达。

结果:H.pylori感染组移植瘤重量与未感染组比较有差异($P < 0.05$),病理检查示感染组2个肺转移,而未感染组无转移。免疫组化结果示感染组MMP-2, MMP-3, TIMP-2, TIMP-3蛋白的表达阳性率分别为:77.8±9.6%, 64.5±6.9%, 57.6±12.2%, 40.0±9.2%;而未感染组分别为61.2±9.7%, 53.1±5.8%, 54.3±10.9%, 53.0±6.6%,二者比较除TIMP-3蛋白的表达无显著性差异外,MMP-2、MMP-3、TIMP-2蛋白的表达均有显著性差异($P < 0.05$)。

结论:H.pylori感染能促使裸鼠移植瘤的生长及肺转移,建立了H.pylori感染与胃癌的动物转移体外模型;H.pylori感染可能通过促使转移正相关因子MMP-2、MMP-3表达增高,转移负相关因子TIMP-2蛋白表达降低,而在胃癌转移过程中发挥重要作用。

李新华,张桂英,罗非君,徐美华,李乾. 胃癌细胞系幽门螺杆菌感染对金属蛋白酶表达的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(5):544-546

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/544.htm>

0 引言

幽门螺杆菌(*H. pylori*)感染是胃癌发生的重要环境因素^[1-11],可能参与胃癌的转移过程^[12]。细胞外基质成分的降解对于肿瘤细胞侵犯周围组织和向远处转移是必不可少

的, 而基底膜基质的降解与 MMPs(matrix metalloproteinase, MMPs)和 TIMP(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP)的活性紧密相关^[13]. 为此, 我们用 H.pylori 与细胞体外共培养技术, 建立动物转移实验体外模型, 观察 H.pylori 感染组与未感染组的裸鼠移植瘤生长情况及裸鼠肝、肺转移情况, 确定 H.pylori 感染能否促进人胃癌细胞的转移潜能. 利用裸鼠移植瘤标本, 采取免疫组织化学 SABC 法检测在 H.pylori 感染和无 H.pylori 感染时的裸鼠移植瘤中, 转移相关因子 MMP-2, MMP-3, TIMP-2 及 TIMP-3 蛋白表达的差异. 从而对 H.pylori 感染在胃癌转移过程中的作用及机制作一初步探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 空肠弯曲菌选择性培养基(上海市疾病预防控制中心); 羊血(湖南临检中心及益阳生化试剂厂); RPMI 1640(Gibco); 免疫组化主要试剂: 兔抗鼠 MMP-2, MMP-3, TIMP-2, TIMP-3, 生物素化羊抗兔 IgG; SABC 试剂盒; DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司). H.pylori 标准株 ATCC49503, 由中南大学湘雅医院范学工教授馈赠; 人胃癌细胞系 BGC-823 低转移单克隆株 C8(以下简称 BGC-823), 购自北京肿瘤研究所遗传室. BALB/c 裸鼠由北京军事医学科学院提供, 3-4 周龄, 雌雄各半. 置中南大学湘雅医学院动物学部 SPF 环境中饲养.

1.2 方法 H.pylori 与细胞的共同孵育 参照文献^[14]方法. 取对数生长期的 BGC-823 细胞用含 0.2 g/LEDTA 和 1.5 g/L 胰蛋白酶消化后计数, 接种于培养瓶或培养板中, 在 37℃, 50 mL/L CO₂ 培养箱培养 24 h 后, 弃去原有细胞培养液, 加入用含 40 mL/L 小牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释的不同浓度的 H.pylori 活菌菌液后继续置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养. 收集处于对数生长期的 BGC-823 细胞, 以每只裸鼠 2 × 10⁶ 个/只接种于裸鼠右腋皮下, 每组 5, 6 只, 雌雄各半. 8 wk 后处死裸鼠, 剥离肿瘤称重, 并对肿瘤组织学进行检查, 同时, 取小鼠的肝、肺进行病理切片分析, 寻找微转移灶. 免疫组化检测裸鼠移植瘤中 MMP-2, MMP-3, TIMP-2 及 TIMP-3 蛋白的表达. 采用链亲和素-生物素-过氧化氢酶法(SABC 法)稍加修改, 用冰冷切片取代石蜡切片染色. 用 PBS 代替一抗作阴性对照, 结果判定: 光学显微镜下观察组织切片的显色反应. 阳性产物主要位于胞质, 阳性判断标准为细胞质内出现了明确的棕黄色颗粒. 免疫组化评分标准: 每张切片在光学显微镜下取 5 个高倍视野, 各计数 200 个细胞, 计算阳性细胞百分比, 得阳性表达率;

统计学处理 采用统计学软件 SPSS10.0, 计量资料采用 t 检验或单因素方差分析(one-way ANOVA), 计数资料采用 χ^2 检验或 Fisher 精确分析. P < 0.05 有统计学意义.

2 结果

H.pylori 活菌与 BGC-823 C₈ 细胞共同培养后, 接种裸鼠, 结果发现所有均能致瘤, 实验组与对照组的瘤体重量有显著性差异(6.9±1.7 vs 4.9±0.8 g, P < 0.05), 实验组瘤体有大量坏死. 大体上可见与接种原发瘤包膜完全分开或转移生长于颈部、腹股沟等处的转移瘤, 实验组: 对照组为 4/6 2/5, 分别取两组肝、肺切片, 发现实验组有 2 个肺转移, 而对照组未发现. 免疫组化结果显示, H.pylori 感染组 MMP-2, MMP-3, TIMP-2, TIMP-3 蛋白的表达阳性率分别为: 77.8±9.6%, 64.5±6.9%, 57.6±12.2%, 40.0±9.2%, 而未感染组分别为 61.2±9.7%, 53.1±5.8%, 54.3±10.9%, 53.0±6.6%, 二者比较除 TIMP-3 蛋白的表达无显著性差异外, MMP-2、MMP-3、TIMP-2 蛋白的表达均有显著性差异(P < 0.05).

3 讨论

近年来随着 H.pylori 感染与胃癌的关系的研究深入, 发现 H.pylori 感染使与转移相关的 C-Ha-ras 基因发生突变、IL-8、钙连接素及 TNF 等表达增加^[15,16], 将 H.pylori 与 AGS 细胞一起培养后, 可引起 AGS 细胞分泌 MMP-3、TIMP-3 增加^[17], 推测 H.pylori 感染可能通过引起 MMPs、TIMP 表达的改变而参与胃癌的转移过程. 因此推测 H.pylori 感染与胃癌转移过程有关. H.pylori 感染不仅能诱导胃癌细胞凋亡, 而且能促进胃癌细胞增生^[18-30]. H.pylori 低浓度能促进细胞增生的作用, 为动物转移试验提供了基础. 本实验用低转移的胃癌细胞株与 H.pylori 共同培养后接种裸鼠, 结果显示, 低浓度 H.pylori 感染胃癌细胞后可能引起胃癌细胞生长转移能力的增强, 成瘤大小与对照组相比有差异, 且大体转移数及肺转移亦增多, 为进一步的致癌机制研究提供了很好的体外模型.

为进一步研究 H.pylori 促胃癌转移的机制, 本研究用免疫组织化学的方法检测了 H.pylori 感染组和未感染组裸鼠移植瘤中转移相关因子 MMP-2、MMP-3、TIMP-2 及 TIMP-3 蛋白的表达. 结果显示: H.pylori 感染组 MMP-2、MMP-3 蛋白表达增高、TIMP-2 蛋白表达降低, 与未感染组相比有显著性差异(P < 0.05). 因 TIMP-2 除了能选择性地与 MMP-2 形成复合物外, 还可抑制金属蛋白酶家族所有成员的水解活性, 故可出现 MMP-2、MMP-3 蛋白表达均增高, 而只有 TIMP-2 蛋白表达降低的趋势. 已有研究发现, MMP-2 的激活与胃癌进展密切相关, 可作为胃癌的预后因素; H.pylori 感染可引起胃癌细胞 MMP-3 的分泌增加及活性增强^[17]. 而 TIMP-2 过度表达, 能抑制转移性 ras 转化小鼠胚胎成纤维细胞裸鼠静脉注射后肺转移灶的形成, 以及体内肿瘤的生长速度和癌细胞的浸润特性^[31]. 用 TIMP-2 基因转染胃癌细胞系 SGC-7901, 可减弱肿瘤细胞的侵袭^[32]. 临床研究亦证实 MMP-2、MMP-3 表达增加、TIMP-2 表达降低与胃癌的转移及预后密切相关,

MMP-2、MMP-3 和 TIMP-2 在胃癌中的负相关作用作为整体调节胃癌细胞的浸润转移，可能具有重要的预后意义^[33,34]。本结果提示：H.pylori 感染与胃癌的转移有关，H.pylori 感染时通过调节 MMPs 及 TIMP 的表达，可能是其参与胃癌转移过程的机制之一。

4 参考文献

- Zhuang XQ, Lin SR. Progress in research on the relations between *H.pylori* and stomach cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:206-207
- Kohda K, Tanaka K, Aiba Y, Yasuda M, Miwa T, Koga Y. Role of apoptosis induced by *Helicobacter pylori* infection in the development of duodenal ulcer. *Gut* 1999; 44:456-462
- Zhuang XQ, Lin SR. Research of *Helicobacter pylori* infection in precancerous gastric lesions. *World J Gastroenterol* 2000;6:428-429
- Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. *Helicobacter pylori* infection and risk of gastric cancer in changle county, Fujian Province, China. *World J Gastroenterol* 2000;6:374-376
- Zhang L, Yan XJ, Zhang LX, Han FC, Zhang NX, Hou Y, Liu YG. Seroepidemiological study of *H.pylori* and CagA+*H.pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:389-392
- Brenner H, Bode G, Boeing H. *Helicobacter pylori* infection among offspring of patients with stomach cancer. *Gastroenterology* 2000; 118:31-35
- El-Omar EM, Oien K, Murray LS, El-Nujumi A, Wirz A, Gillen D, Williams C, Fullarton G, McColl KE. Increased prevalence of precancerous changes in relatives of gastric cancer patients: critical role of *H.pylori*. *Gastroenterology* 2000;118:22-30
- Wang DX, Fang DC, Liu WW. Study on alteration of multiple genes in intestinal metaplasia, atypical hyperplasia and gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:855-859
- Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000;6:20-31
- Peña AS. Genetic factors determining the host response to *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2000;6:624-625
- Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, Lü 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
- Shun CT, Wu MS, Lin MT, Chang MC, Lin JT, Chuang SM. Immunohistochemical evaluation of cadherin and catenin expression in early gastric carcinomas: correlation with clinicopathologic characteristics and *Helicobacter pylori* infection. *Oncology* 2001;60:339-345
- Matsui H, Kubochi K, Shimada A, Hasumi A. Desmoplastic response in scirrhous gastric carcinoma: imbalance between collagen synthesis and degradation. *Anticancer Res* 2000;20:4733-4738
- Li XH, Luo FJ, Zhang GY, Li Q, Shu MH. Experimental studies on gastric cancer metastasis induced by *Helicobacter pylori* infection. *China J Mod Med* 2002;12:34-37
- Chan AO, Luk JM, Hui WM, Lam SK. Molecular biology of gastric carcinoma: from laboratory to bedside. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:1150-1160
- 陆和平, 郑银宝. 肠化生、胃癌组织中幽门螺杆菌感染与 ras 基因表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:218-219
- Gooz M, Gooz P, Smolka AJ. Epithelial and bacterial metalloproteinases and their inhibitors in *H. pylori* infection of human gastric cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281:G823-832
- Coyle WJ, Sedlack RE, Nemecek R, Peterson R, Duntemann T, Murphy M, Lawson JM. Eradication of *Helicobacter pylori* normalizes elevated mucosal levels of epidermal growth factor and its receptor. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2885-2889
- Smoot DT, Wynn Z, Elliott TB, Allen CR, Mekasha G, Naab T, Ashktorab H. Effect of *Helicobacter pylori* on proliferation of gastric epithelial cells in vitro. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1508-1511
- Smoot DT, Elliott TB, Verspaget HW, Jones D, Allen CR, Vernon KG, Bremner T, Kidd LC, Kim KS, Groupman JD, Ashktorab H. Influence of *Helicobacter pylori* on reactive oxygen-induced gastric epithelial cell injury. *Carcinogenesis* 2000;21:2091-2095
- Domek MJ, Netzer P, Prins B, Nguyen T, Liang D, Wyle FA, Warner A. *Helicobacter pylori* induces apoptosis in human epithelial gastric cells by stress activated protein kinase pathway. *Helicobacter* 2001;6:110-115
- Hua JS. Effect of *H.pylori*: cell proliferation and apoptosis on stomach cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:647-648
- Yang Y, Deng CS, Yao XJ, Liu HY, Chen M. Effect of *Helicobacter pylori* on morphology and growth of gastric epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:500-504
- Nardone G, Staibano S, Rocco A, Mezza E, D'armiento FP, Insabato L, Coppola A, Salvatore G, Lucariello A, Figura N, DeRosa G, Budillon G. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut* 1999;44:789-799
- Lu W, Chen LY, Gong HS. PCNA and c-erbB-2 expression in gastric mucosal intestinal metaplasia with *Helicobacter pylori* infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:111-113
- He XX, Wang JL, Wu JL, Yuan SY, Ai L. Telomerase expression, *H.pylori* infection and gastric mucosal carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:505-508
- Liu HF, Liu WW, Fang DC, Yang SM, Zhao L. Gastric epithelial apoptosis induced by *Helicobacter pylori* and its relationship with Bax protein expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:860-862
- Wang DX, Fang DC, Li W, Du QX, Liu WW. A study on relationship between infection of *Helicobacter pylori* and inactivation of antioncogenes in cancer and pre-cancerous lesion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:984-987
- Chen SY, Wang JY, Ji Y, Zhang XD, Zhu CW. Effects of *Helicobacter pylori* and protein kinase C on gene mutation in gastric cancer and precancerous lesions. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:302-307
- Rigg AS, Lemoine NR. Adenoviral delivery of TIMP1 or TIMP2 can modify the invasive behavior of pancreatic cancer and can have a significant antitumor effect in vivo. *Cancer Gene Ther* 2001; 8:869-878
- 张莉, 秦北宁, 任爱琴, 张志明, 古彩喆, 耿洪刚. 大肠癌患者基质分解素-1 基因表达增强. *世界华人消化杂志* 2001;9:1210-1212
- 朱人敏, 汪芳裕, 王琳. 型胶原酶及 TIMP-2 在人胃癌中表达及其意义. *中华消化杂志* 1999;19:129-130
- 冀明, 李龙霞, 于中麟. 胃癌患者明胶酶 A 基因表达的研究. *中华内科杂志* 2001;40:336-337
- Spina D, Vindigni C, Presenti L, Schurfeld K, Stumpo M, Tosi P. Cell proliferation, cell death, E-cadherin, metalloproteinase expression and angiogenesis in gastric cancer precursors and early cancer of the intestinal type. *Int J Oncol* 2001;18:1251-1258

表达幽门螺杆菌热休克蛋白 60 克隆的构建

白杨, 黄文, 林焕健, 王继德, 陈焯, 张兆山, 周殿元, 张亚历

白杨, 黄文, 林焕健, 王继德, 陈焯, 周殿元, 张亚历, 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
张兆山, 军事医学科学院生物工程研究所 北京市 100071
“863”计划专题 102-07-03-06、国家自然科学基金, No. 30170890, 30270078, 军队“十五”医药卫生科研课题(OIMA-132)资助项目
项目负责人: 张亚历, 100071, 广东省广州市广州大道北路1838号, 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。
电话: 020-61641531
收稿日期: 2002-09-13 接受日期: 2002-10-12

Construction of clone expressing adhesin Hsp60 of *Helicobacter pylori*

Yang Bai, Wen Huang, Huan-Jian Lin, Ji-De Wang, Ye Chen, Zhao-San Zhang, Dian-Yuan Zhou, Ya-Li Zhang

Yang Bai, Wen Huang, Huan-Jian Lin, Ji-De Wang, Ye Chen, Dian-Yuan Zhou, Ya-Li Zhang, PLA Institute for Digestive Medicine, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Zhao-San Zhang, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China
Supported by grants from the State 863 High Technology R & D Project of China (102-07-03-06), The National Natural Sciences Foundation of China (30170890, 30270078) and Military ‘Ten-Five’ Commanding Project.
Correspondence to: Dr Ya-Li Zhang, PLA Institute for Digestive Medicine, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China.
Received: 2002-09-13 Accepted: 2002-10-12

Abstract

AIM: To construct a recombinant vector containing gene encoding Hsp60 gene of *Helicobacter pylori* and to express the vector in *E. coli* BL21.

METHODS: The Hsp60 gene was amplified from *H. pylori* chromosome by PCR and inserted into the prokaryotic expression vector pET-22b (+). The recombinant vector was transformed and expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Recombinant Hsp60 protein immunogenicity was studied by Western blot.

RESULTS: The 1.6 kb Hsp60 gene was successfully isolated. Recombinant *E. coli* strains expressed Hsp60 were obtained, the expression protein amounted to 27.2 % of the total bacterial protein after induced with IPTG for 3 h at 37 °C, which included inclusion body and soluble protein. Inclusion body was the major pattern of the expression that amounted to 76.6 % of the insoluble protein. Western blot analysis of rHsp60 confirmed that it could be specially recognized by serum from *Hp* infected patients.

CONCLUSION: The gene coding for *Hp* Hsp60 is cloned and expressed successfully. The results obtained lay the foundation for constructing the *H. pylori* vaccine.

Bai Y, Huang W, Lin HJ, Wang JD, Chen Y, Zhang ZS, Zhou DY, Zhang YL. Construction of clone expressing adhesin Hsp60 of *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):547-550

摘要

目的: 构建含 Hp 热休克蛋白 60 (Hsp60) 基因的重载体并在大肠杆菌 BL21(DE3) 中表达, 为进一步研究 Hsp60 的佐剂功能和免疫原性奠定基础。

方法: 提取 Hp 染色体基因, 用 PCR 方法扩增 Hsp60 基因, 将其克隆至表达载体 pET-22b(+), 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达并通过免疫印迹实验研究其免疫原性。

结果: 分离得到了 1.6 kb 的 Hsp60 基因片段, 并在大肠杆菌中实现了该基因的高效表达, 在 37 °C 诱导表达 3 h 后, 表达产物占细菌总蛋白的 27.2 %。表达以可溶性蛋白和包涵体两种形式存在, 其中主要是包涵体的形式, 目的蛋白占不溶性蛋白的 76.6 %。经免疫印迹证实该重组蛋白可以被 Hp 感染患者血清所识别。

结论: 成功地克隆并表达 Hp Hsp60 基因, 为 Hp 疫苗的研究打下了基础。

白杨, 黄文, 林焕健, 王继德, 陈焯, 张兆山, 周殿元, 张亚历. 表达幽门螺杆菌热休克蛋白 60 克隆的构建. 世界华人消化杂志 2003;11(5):547-550
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/547.htm>

0 引言

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 已被确认是慢性胃病 (包括胃炎和消化性溃疡) 的主要病原因子^[1-7], 同时与胃癌、胃黏膜相关淋巴组织淋巴瘤的发生亦密切相关^[8-20]。WHO 已将其列为胃癌等肿瘤发生的相关致病菌^[21]。此外, 血清流行病学研究表明 Hp 感染与循环、呼吸以及自身免疫疾病的发生也有关^[22-24]。我国是 Hp 高感染率国家, 并仍以每年 1-2 % 的速度增加^[25]。目前临床根除 Hp 的主要手段是抗菌疗法, 但有相当的局限性。根除某种感染性疾病最有效的方法是疫苗接种, 故 Hp 疫苗的研制是目前的热点^[26-29]。已知在小鼠和人类的分枝杆菌感染模型中, Hsp60 的免疫应答处于优先地位, HpHsp60 也许是防治 Hp 的疫苗候选成分。据此, 我们对 HpHsp60 基因进行了克隆和表达, 为构建 Hp 基因工程疫苗打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 菌株大肠杆菌 BL21(DE3)、质粒 pET-22b(+) 及 HpSS1 为本所保存。限制性内切酶 Not I, Nco I 及 T4DNA 聚合酶、Vent DNA 聚合酶购自 New England

Biolabs 公司, Taq DNA 聚合酶、DNA 分子质量标准 DNA/EcoR I +Hind 购自华美生物工程公司, 琼脂糖、dNTPs、DNA 快速纯化试剂盒购自 Promega 公司, 测序质粒纯化试剂盒购自德国 Qiagen 公司, Hp 感染患者血清来自本院内镜中心, 其他试剂为国产分析纯.

1.2 方法 收集 Hp 菌液 1 ml 或刮取数环菌落, TE(pH8.0) 洗涤后重悬, 加 SDS 至终浓度为 10 g/L, 蛋白酶 K 至终浓度 0.1 g/L, 55-60 °C 水浴 30 min, 分别用等体积酚 氯仿 异戊醇(25:24:1)、氯仿 异戊醇(24:1)各抽提 1 次, 上层水相加 2.5 倍预冷的无水乙醇, 1/10 体积 3 mol/L 乙酸钠沉淀, 700 mL/L 乙醇洗 2 次, 抽干后溶于 dd H₂O 或 TE 中. 根据文献[30]设计引物, 在其 5' 端加上合适的限制性酶切位点, 由博亚公司合成. 序列如下: Hsp601:5' -TG GCC ATG GAT GGG CCA AGA GGC AGG AAT-3'; Hsp602:5' -AG TGC GGC CGC CAT CAT GCC GCC CAT G-3'. 热启动法进行 PCR, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环后再延伸 10 min. 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果.

1.2.1 重组质粒构建、酶切鉴定及序列 采用碱变性法制备质粒 pET-22b(+). 目的基因与载体的连接:反应体系 20 μL 中依次加入 10 × Not I 缓冲液, Not I 和 Nco I 各 10 U, 目的 DNA 片段 2 μL 或 pET-22b(+)-1 μg, 补足水至 20 μL, 37 °C 水浴 2 h. 采用冻融法回收及纯化酶切产物. 在连接反应体积 10 μL 中加入目的 DNA 与载体 DNA 的浓度约为 2:1, 10 × 连接缓冲液 1 μL, T4 DNA 连接酶 1 U, 16 °C 水浴 4-12 h. BL21(DE3)感受态细胞的制备:从 LB 平板上挑取 BL21(DE3)单菌落接种于 LB 液体培养基 5 mL 中, 37 °C 培养过夜, 将上述菌液以 1% 接种量转接于 5 mL LB 液体培养基, 37 °C, 150 r/min 振荡 1.5-2 h, 至 A₆₀₀ 约为 0.3-0.4; 培养物冰浴 10 min, 4 000 g 离心 10 min, 菌体悬浮于冰预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 2.5 mL 中, 混匀, 冰浴 30 min, 离心后用冰预冷的 CaCl₂ 0.3 mL 重悬菌体, 分装 0.15 mL/管备用. 转化:取连接产物 8-10 μL 加入感受态细菌 150 μL 中, 冰浴 30 min, 42 °C 热休克 2 min 后置冰上 2 min, 加入 LB 液体培养基 800 μL, 37 °C 摇床复苏 45 min. 取菌液 200 μL, 在含氨苄青霉素的 LB 平板上涂布均匀, 37 °C 培养 12-16 h. 次日挑选单个菌落, 提取质粒进行酶切鉴定. 对酶切鉴定后重组自采用 373A DNA 自动分析仪进行全自动测序.

1.2.2 重组子的诱导表达及表达产物的定位分析 不同条件下的诱导表达:经测序鉴定正确的重组子转化 BL21 (DE3), 以 10 g/L 的过夜培养物接种 LB 液体培养基, 在不同的诱导前菌浓度(A₆₀₀ 分别为 0.1, 0.3, 0.45, 0.6, 0.8, 1.0)下, 以不同的 IPTG 浓度(0.1, 0.5, 1.0, 2.0 mmol/L)诱导不同的时间(2 h, 3 h, 4 h, 5 h), 分别收集菌液 1 mL 进行电泳, 测定不同条件下重组蛋白的表达量. 表达产物的定位:外周质部分在 4 °C, 12 000 g 离

心 1 min 收集 IPTG 诱导培养物, 将细菌沉淀悬于 30 mmol/L Tris-Cl(pH8.0), 1 mmol/L EDTA(pH8.0), 200 g/L 蔗糖中, 冰浴 10 min, 12 000 g 离心 10 min, 上清为外周质部分; 胞内可溶和包涵体部分同上收集 IPTG 诱导培养物, 弃上清, 重悬沉淀于 1/10 培养物体积的 50 mmol/L Tris-Cl(pH8.0)、2 mmol/L EDTA 和 0.1 mg/ml 溶菌酶中, 并加 TritonX-100 至终浓度 10 g/L, 30 °C 放置 20 min 后冰浴下超声破碎至溶液较清亮, 12 000 g, 4 °C 离心 15 min, 上清为可溶性部分, 沉淀为包涵体. 取全菌及其周质的渗透休克液、菌体超声后的上清以及沉淀进行 100 g/L SDS-PAGE 电泳分析, 上样前加适量双蒸水复悬菌体后加入等体积 2 × 凝胶上样缓冲液(40 g/L SDS、2 g/L 溴酚兰、200 mL/L 甘油、100 mmol/L Tris-Cl pH6.8、100 g/L β- 巯基乙醇), 混匀, 100 °C 水浴 10 min, 冷却后取 8-10 μL 上样, 180 V 恒压电泳至溴酚兰到达凝胶底部, 取下凝胶置于考马斯亮兰(R250)染色液(45% 甲醇、45% 水、10% 冰乙酸、0.25% 考马斯亮兰 R250)中染色 1-2 h.

1.2.3 免疫印迹分析 SDS-PAGE 电泳结束后将凝胶用转移缓冲液(39 mmol/L 甘氨酸, 48 mmol/L Tris-Cl, 0.37 g/L SDS, 150 g/L 甲醇)漂洗, 同时剪取与凝胶大小一致的滤纸和 PVDF 膜, PVDF 膜在甲醇中浸泡 1 min 后与滤纸一起放入转移缓冲液中平衡 15 min; 将 3 张滤纸、凝胶、PVDF 膜、另 3 张滤纸逐层放入凝胶夹夹紧, 置转移槽中 30 V, 150 mA 转移约 1.5 h; 取出 PVDF 膜, 50 g/L 脱脂奶封闭过夜, TBST 缓冲液(100 mmol/L Tris-Cl, 9 g/L NaCl, 5 g/L Tween 20)室温下漂洗 3 次, 每次 10 min; 用 Hp 感染血清(封闭液 1:50 稀释)为一抗, 室温孵育 2 h; 羊抗人 IgG-HRP (封闭液 1:200 稀释)为二抗, 室温孵育 1 h, 漂洗后加入底物溶液(0.05 mmol/L Tris-Cl pH7.4, 0.5 mol/L NaCl, 0.6 g/L DAB、2 mL/L H₂O₂)室温下显色, 待显色适度时以 2 mol/L H₂SO₄ 终止, 水漂洗后晾干.

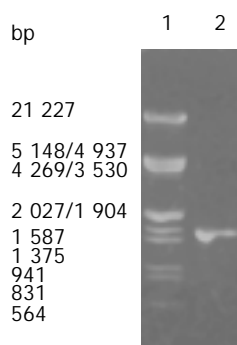
2 结果

2.1 hsp60 基因的扩增、克隆与测序 两条 PCR 引物合成时 5' 端分别加上 Not I 和 Nco I 酶切位点以方便操作. 为提高 PCR 的特异性, 扩增时采用了热启动法, 并以具 3' 5' 修复作用的 Vent 酶代替常规使用的 Taq 酶. PCR 结果电泳分析发现在 1 600 bp 左右有一条带, 大小与预计相符(图 1). 将 PCR 产物经 Not I 和 Nco I 双酶切后, 定向插入经同样双酶切的 pET-22b(+)载体中, 获得重组质粒命名为 pET-22b(+)/Hsp60. 重组质粒 pET-22b(+)/Hsp60 经 Not I、Nco I 双酶切鉴定结果与预计相符. 直接以重组质粒 pET-22b(+)/Hsp60 为模板进行测序, 得到了克隆片段的 DNA 序列, 与基因库公布的一致.

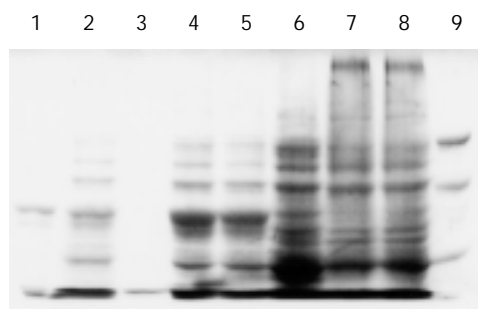
2.2 Hsp60 基因在大肠杆菌中的表达及定位 将鉴定正确的阳性克隆株在 LB 培养液(含 100 mg/L 氨苄青霉素)中 37 °C 培养过夜, 然后按 1% 转接至含氨苄青霉素

的 LB 培养液中, 其后在不同条件下进行诱导表达. 取全菌及其周质的渗透休克液和菌体超声后的沉淀和上清进行 100 g/LSDS-PAGE 电泳分析(图 2). 结果发现, 经诱导后高效表达 Mr 60 000 的外源蛋白, 与预期分子大小一致. 凝胶自动扫描分析, 在 A_{600} 值为 0.6, IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L, 诱导表达 3 h 时 Hsp60 表达量有明显提高, 占菌体总蛋白的 27.2%, 其中可溶性表达占上清的 14.7%, 包涵体部分占沉淀的 76.6%.

2.3 Hsp60 表达蛋白的免疫印迹分析 用 Hp 阳性患者血清作为一抗, 正常人血清作为对照, 在 Mr60 000 处出现 1 条阳性反应带; 而正常人血清对照未见任何条带.



1. PCR marker; 2. PCR product.
图 1 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物.



1. Inclusion body of BL21(pET-Hsp60) after 3 h induction with IPTG; 2. Sonicate supernatant of BL21(pET-Hsp60) after 3 h induction with IPTG; 3. BL21(pET-Hsp60) periplasm protein after 3 h induction with IPTG; 4. BL21(pET-Hsp60) after 5 h induction with IPTG; 5. BL21(pET-Hsp60) after 3 h induction with IPTG; 6. BL21(pET-Hsp60) before induction; 7. Control strain BL21(pET) after 3 h induction with IPTG; 8. Control strain BL21(pET) before induction; 9. Molecular mass marker (43, 67, 94)×10³.
图 2 Hsp60 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析.

3 讨论

在 Hp 疫苗的研制中, 已经采用的基因重组抗原包括尿素酶、细胞空泡毒素、过氧化氢酶等, 尽管获得了不同程度的保护作用^[31-36], 但仍不理想. 特别是尿素酶作为 Hp 最有希望的一种保护性抗原, 虽然在动物模型中已取得理想的效果, 但在作为 Hp 自然宿主的人体上的免疫保护效果尚不令人满意^[37,38]. 这一方面是由于作为黏膜佐剂的 CT 或 LT 存在毒副作用, 影响了他在人体中的应用, 另一方面也可能是由于尿素酶单一抗原尚不能起到全面保护的效果. 未来的方向应该考虑采用更多的保护性抗原, 同时找到更有效和安全的

刺激机体产生黏膜免疫应答的方法. 近来研究表明, 当人或动物受到细菌和寄生虫感染时, 病原体来源的 Hsp 是一种非常重要的保护性抗原, 到目前为止, 已经报道了 20 多种传染病的保护性免疫应答是针对 Hsp 的, 如结核、麻风等, 其中对 Hsp60 的免疫应答最多. 尤其是在感染结核的小鼠实验模型中, Hsp60 的特异性抗体可与原核细胞的 Hsp60 相应物产生交叉反应, 而不与小鼠自身的 Hsp60 相应物反应, 这解决了长期以来困扰人们的 Hsp60 作为疫苗成分由于其高度保守性所引起的自身免疫问题. 此外, 在小鼠和猴疟疾模型中, 与 Hsp60 交联的多肽诱导的抗疟疾特异性免疫应答并不依赖于佐剂, 显示了 Hsp60 具有类似佐剂的作用. 由此将 Hp Hsp60 纳入 Hp 疫苗成分, 有可能解决尿素酶在人体实验中出现的, 即作为佐剂解决了 CT 或 LT 作为佐剂价格昂贵和具有潜在毒性的缺点, 作为抗原解决单一尿素酶保护效果不理想的问题. 因此, 我们克隆了该基因, 并使该基因在大肠杆菌中获得了高效表达, 其表达量超过了菌体总蛋白的 1/4. 在此基础上, 本研究还对重组 Hsp60 蛋白的表达进行了定位分析, 为大规模工业生产奠定了基础. 为了便于纯化, 我们采用了带有 6 个组氨酸的融合表达载体 pET-22b(+), 外源氨基酸仅占重组蛋白的 1%, 通常不影响重组蛋白的免疫原性, 免疫印迹实验表明其能够与 Hp 感染患者血清发生特异性反应, 进一步证明了重组 Hsp60 蛋白氮端融合的 6 个组氨酸并不影响其抗原性. 总之, 本研究为 Hp 基因工程亚单位疫苗和多价疫苗的研制打下了基础.

4 参考文献

- 1 萧树东, 刘文忠. 幽门螺杆菌感染的治疗现状. 世界华人消化杂志 1999;7:3-4
- 2 Meyer JM, Silliman NP, Dixon CA, Siepmann NY, Sugg JE, Hopkins RJ. *Helicobacter pylori* and early duodenal ulcer status post-treatment: a review. *Helicobacter* 2001;6:84-92
- 3 Xia HX, Fan XG, Talley J. Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and its clinical relevance. *World J Gastroenterol* 1999;5:263-266
- 4 彭仲生, 梁湛聪, 刘慕嫻, 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 Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000;6:20-31
- 6 Casella G, Buda CA, Maisano R, Schiavo M, Perego D, Baldini V. Complete regression of primary gastric MALT-lymphoma after double eradication *Helicobacter pylori* therapy: role and importance of endoscopic ultrasonography. *Anticancer Res* 2001; 21:1499-1502
- 7 Kate V, Ananthakrishnan N, Badrinath S. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on the ulcer recurrence rate after simple closure of perforated duodenal ulcer: retrospective and prospective randomized controlled studies. *Br J Surg* 2001;88:1054-1058
- 8 郭长青, 王玉萍, 刘国永, 马社旺, 丁贯一, 李继昌. 胃黏膜癌变过程中幽门螺杆菌感染与 P53、c-erbB-2 基因表达的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:313-315
- 9 Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, Kamada T, Tanaka S, Uemura N, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component. *J Gastroenterol*

- Hepatol* 2001;16:734-739
- 10 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
- 11 Delchier JC, Lamarque D, Levy M, Tkoub EM, Copie-Bergman C, Deforges L, Chaumette MT, Haioun C. *Helicobacter pylori* and gastric lymphoma: high seroprevalence of CagA in diffuse large B-cell lymphoma but not in low-grade lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2324-2328
- 12 Morgner A, Miehle S, Fischbach W, Schmitt W, Muller-Hermelink H, Greiner A, Thiede C, Schetelig J, Neubauer A, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. Complete remission of primary high-grade B-cell gastric lymphoma after cure of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Oncol* 2001;19:2041-2048
- 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;7:647-648
- 14 Nakamura S, Matsumoto T, Suekane H, Takeshita M, Hizawa K, Kawasaki M, Yao T, Tsuneyoshi M, Iida M, Fujishima M. Predictive value of endoscopic ultrasonography for regression of gastric low grade and high grade MALT lymphomas after eradication of *Helicobacter pylori*. *Gut* 2001;48:454-460
- 15 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784-789
- 16 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
- 17 Kate V, Ananthakrishnan N, Badrinath S. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on the ulcer recurrence rate after simple closure of perforated duodenal ulcer: retrospective and prospective randomized controlled studies. *Br J Surg* 2001;88:1054-1058
- 18 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
- 19 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
- 20 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
- 21 Suganuma M, Kurusu M, Okabe S, Sueoka N, Yoshida M, Wakatsuki Y, Fujiki H. *Helicobacter pylori* membrane protein 1: a new carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*. *Cancer Res* 2001;61: 6356-6359
- 22 Gocyk W, Niklinski T, Olechnowicz H. *Helicobacter pylori*, gastrin and cyclooxygenase-2 in lung cancer. *Med Sci Monit* 2000;6: 1085-1092
- 23 Tsai CJ, Huang TY. Relation of *Helicobacter pylori* infection and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:1227-1232
- 24 Dauden E, Jimenez AI, Garcia DA. *Helicobacter pylori* and idiopathic chronic urticaria. *Int J Dermatol* 2000;39:446-452
- 25 盛涛, 张建中. 幽门螺杆菌尿素酶研究现状. 世界华人消化杂志 1999; 7:881-884
- 26 Lee MH, Roussel Y, Wilks M, Tabaqchali S. Expression of *Helicobacter pylori* urease subunit B gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and its use as a vaccine delivery system against *H. pylori* infection in mice. *Vaccine* 2001;19:3927-3935
- 27 Kleanthous H, Tibbitts TJ, Gray HL, Myers GA, Lee CK, Ermak TH, Monath TP. Sterilizing immunity against experimental *Helicobacter pylori* infection is challenge-strain dependent. *Vaccine* 2001;19:4883-4895
- 28 姜政, 黄爱龙, 汪志群, 陶小红, 王丕龙, 蒲丹. 幽门螺杆菌 18 000 u 外膜蛋白编码基因的克隆及表达. 世界华人消化杂志 2002;10:266-270
- 29 Koesling J, Lucas B, Develioglu L, Aebischer T, Meyer TF. Vaccination of mice with live recombinant salmonella typhimurium ar0a against *H. pylori*: parameters associated with prophylactic and therapeutic vaccine efficacy. *Vaccine* 2001;20:413-420
- 30 Yamaguchi H, Osaki T, Kai M. Immune response against a cross-reactive epitope on the heat shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2000;68:3448-3454
- 31 白杨, 张亚历, 王继德, 施理, 张振书, 周殿元. 幽门螺杆菌过氧化氢酶基因的克隆、表达及活性评价. 中华消化杂志 2002;22:203-205
- 32 Keenan J, Oliaro J, Domigan N, Potter H, Aitken G, Allardyce R, Roake J. Immune response to an 18-kilodalton outer membrane antigen identifies Lipoprotein 20 as a *Helicobacter pylori* vaccine candidate. *Infect Immun* 2000;68:3337-3343
- 33 Ikewaki J, Nishizono A, Goto T, Fujioka T, Mifune K. Therapeutic oral vaccination induces mucosal immune response sufficient to eliminate long-term *Helicobacter pylori* infection. *Microbiol Immunol* 2000;44:29-39
- 34 Jiang Z, Tao XH, Huang AL, Wang PL. A study of recombinant protective *H. pylori* antigens. *World J Gastroenterol* 2002;8:308-311
- 35 李明峰, 凌贞, 马爱英, 赵建华, 孙建新, 于声芝, 吴祥甫. 幽门螺杆菌尿素酶 B 基因的克隆、表达及免疫原性研究. 世界华人消化杂志 1999; 7:596-600
- 36 钟平, 吴昆详, 徐帆洪, 许春娣, 徐家裕. 中国幽门螺杆菌 cag - A 克隆和基因序列分析. 世界华人消化杂志 1999;7:669-672
- 37 Kotloff KL, Sztein MB, Wasserman SS, Losonsky GA, Di-Lorenzo SC, Walker RI. Safety and immunogenicity of oral inactivated whole-cell *Helicobacter pylori* vaccine with adjuvant among volunteers with or without subclinical infection. *Infect Immun* 2001; 69:3581-3590
- 38 Michetti P, Kreiss C, Kotloff K, Porta N, Blanco JL, Bachmann D, Herranz M, Saldinger P, Corthesy-Theulaz I, Losonsky G, Nichols R, Simon J, Stolte M, Ackerman S, Monath TP, Blum AL. Oral immunization with urease and escherichia coli heat-labile enterotoxin is safe and immunogenic in *Helicobacter pylori*-infected adults. *Gastroenterology* 1999;116:804-812

幽门螺杆菌 CagA 蛋白与胃癌组织中 Bcl-2、p53 蛋白表达的关系

杜雅菊,赵 晶,赵瑞波,李宝杰

杜雅菊,赵晶,李宝杰,哈尔滨医科大学附属第二临床医学院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150086

赵瑞波,哈尔滨医科大学基础医学院病理教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086

杜雅菊,女,1964-09-25生,黑龙江省哈尔滨市人,汉族,1987年哈尔滨医科大学本科毕业,1993年哈尔滨医科大学硕士研究生毕业,副教授,副主任医师,主要从事消化系统疾病的肿瘤临床研究。

项目负责人:杜雅菊,150086,黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号,哈尔滨医科大学附属第二临床医学院消化内科. duyajuhydeyxh@hotmail.com

电话:0451-6605143

收稿日期:2002-09-13 接受日期:2002-10-03

Relationship between expression of Bcl-2 and p53 protein and CagA⁺ *Helicobacter pylori* in gastric cancer

Ya-Ju Du, Jing Zhao, Rui-Bo Zhao, Bao-Jie Li

Ya-Ju Du, Jing Zhao, Bao-Jie Li, Department of Digestive Disease, The Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China
Rui-Bo Zhao, Department of Pathology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Correspondence to: Dr. Ya-Ju Du, Department of Digestive Disease, The Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, 246 Xuefulu, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. duyajuhydeyxh@hotmail.com
Received: 2002-09-13 Accepted: 2002-10-03

Abstract

AIM: The relationship between cytotoxin-associated protein (CagA)⁺ *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) infection and gastric cancer in China was reported inconsistently. Using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect serum anti-CagA antibody and ABC immunohistochemical staining to detect the expression of Bcl-2 and p53 proteins, this study is to explore the relationship between CagA *H.pylori* infection and expressions of p53 and Bcl-2 proteins in gastric cancer and chronic gastric diseases.

METHODS: Seventy-nine patients (50 with gastric cancer, 17 with chronic atrophic gastritis, 5 with gastric ulcer and 7 with chronic superficial gastritis) were diagnosed by endoscopy and biopsied under endoscopy for detection of *H.pylori* infection, and confirmed by pathological examination. Expression of Bcl-2 and p53 proteins was detected by immunohistochemistry. Rapid urease test and serum *H.pylori* antibodies with ELISA or Warthin-Starry silver stains were used for *H.pylori* diagnosis. *H.pylori* was defined as positive when 2 or 3 of these tests were positive. ELISA was used for the detection of serum anti-CagA antibody.

RESULTS: Anti-CagA antibody was present in 43/50 (86 %) gastric cancer and in 13/29 (41 %) chronic gastric disease, CagA⁺ *H.pylori* rate in gastric cancer was higher than those in chronic gastric diseases ($P < 0.01$). The positive rate of Bcl-2 expression in gastric cancer was higher than that in

chronic gastric diseases (62 % vs 41 %, $P > 0.05$). In CagA⁺ gastric cancer it was higher than that in CagA⁻ one (65 % vs 43 %, $P > 0.05$), and in CagA⁺ chronic gastric diseases it was higher than that in CagA⁻ one (77 % vs 12 %, $P < 0.01$). The positive rate of mutant p53 expression in gastric cancer was higher than that in chronic gastric diseases (54 % vs 28 %, $P < 0.05$), in CagA⁺ gastric cancer it was significantly higher than that in CagA⁻ one (60 % vs 14 %, $P < 0.05$), and in CagA⁺ chronic gastric diseases it was significantly higher than that in CagA⁻ ones (46 % vs 12 %, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Expression of anti-CagA antibody is present in a significantly higher percentage of gastric cancer subjects than that in chronic gastric diseases. It is suggested that CagA⁺ *H.pylori* infection may increase the risk of gastric cancer. The CagA factor may be involved in the development of gastric cancer through influencing the expression of Bcl-2 gene and mutant p53 gene.

Du YJ, Zhao J, Zhao RB, Li BJ. Relationship between expression of Bcl-2 and p53 protein and CagA⁺ *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):554-557

摘要

目的: CagA⁺ *H.pylori* 感染与胃癌的相关性在我国报道不一,且致癌机制不祥。本研究应用 ELISA 法检测 *H.pylori* 相关胃癌和慢性胃病血清中抗 CagA 抗体和免疫组化方法检测全部组织标本中 Bcl-2、p53 蛋白的表达,研究 *H.pylori* CagA 阳性株感染与胃癌、慢性胃病的相关性及与胃黏膜组织中 Bcl-2、p53 蛋白表达的相互关系,探讨 *H.pylori* 的致癌机制。

方法: 79 例患者(胃癌 50 例、萎缩性胃炎 17 例、胃溃疡伴不典型增生 5 例、浅表性胃炎 7 例)胃镜诊断明确后取胃窦或病变部位活检,用于 *H.pylori* 的诊断、病理诊断及免疫组化检测 Bcl-2、p53 蛋白的表达。*H.pylori* 的诊断采用快速尿素酶试验和 ELISA 法血清 *H.pylori* 抗体或病理 Warthin-Starry 银染色,两项阳性诊断为 *H.pylori* 阳性。用 ELISA 法检测患者血清 CagA-*H.pylori* 抗体,用免疫组化方法检测全部组织标本中 Bcl-2、p53 蛋白的表达。

结果: 胃癌组 CagA⁺ *H.pylori* 感染阳性率 86%(43/50)高于慢性胃病组 45%(13/29)($P < 0.01$),有显著性差异。Bcl-2 蛋白表达:胃癌组高于慢性胃病组(62 % vs 41 % ; $P > 0.05$),胃癌 CagA⁺ 组高于 CagA⁻ 组(65 % vs 43 % ; $P > 0.05$),慢性胃病 CagA⁺ 组显著高于 CagA⁻ 组(77 % vs 12 % ; $P < 0.01$)。p53 蛋白表达:胃癌组显著高于慢性胃病组(54 % vs 28 % ;

$P < 0.05$), 胃癌 CagA⁺ 组显著高于 CagA⁻ 组(60% vs 14%; $P < 0.05$), 慢性胃病 CagA⁺ 组显著高于 CagA⁻ 组(46% vs 12%; $P < 0.05$).

结论:胃癌患者 CagA⁺ H.pylori 感染明显高于慢性胃病患者, CagA⁺ H.pylori 感染与胃癌发生明显相关, 而 H.pylori 的 CagA 可使癌前疾病组织中出现 Bcl-2 蛋白表达, 且随着 Bcl-2 蛋白表达增加疾病的严重程度也增加, 即在细胞恶性转化的早期阶段就发挥作用, 并逐渐增强, 导致胃上皮细胞增生增加, 凋亡减少. 增生的过程中继而出现 p53 基因的突变, 即突变型 p53 蛋白表达增强, 诱导凋亡作用减弱.

杜雅菊, 赵晶, 赵瑞波, 李宝杰. 幽门螺杆菌 CagA 蛋白与胃癌组织中 Bcl-2、p53 蛋白表达的关系. 世界华人消化杂志 2003;11(5):554-557
http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/554.htm

0 引言

大量临床研究已证明幽门螺杆菌(H.pylori)感染与慢性胃炎、消化性溃疡、胃癌以及胃 MALT 淋巴瘤等胃部疾病的发生有关^[1-12], 尤其在胃癌发病中的作用越来越受到人们的重视^[13-19]. 细胞毒素相关蛋白 A(cytotoxin-associated protein, CagA)是由 H.pylori 相应的 CagA 基因编码产生的一种外膜蛋白, 是 H.pylori 的重要致病因子^[20-25]. 在感染 H.pylori CagA⁺ 株患者的血清中可监测到抗 CagA 抗体^[26,27]. 胃癌的形成是一个多因素、多阶段、长期相互作用的正常细胞恶性转化的过程. 细胞增生和凋亡的失衡与肿瘤的发生发展有密切关系. H.pylori 亦可能通过其毒力因子使癌基因活化或肿瘤抑制基因失活导致胃黏膜上皮细胞增生和凋亡之间失衡, 最终导致胃癌的发生. 本文将通过检测 H.pylori 阳性胃癌与慢性胃病患者血清中 CagA-H.pylori 抗体和组织细胞中癌基因 Bcl-2 和抑癌基因 p53 蛋白表达, 进一步探讨 H.pylori CagA 与胃癌的相关性及致胃癌的可能分子机制.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-02/10 我院就诊胃镜下诊断为胃癌、萎缩性胃炎、胃溃疡、浅表性胃炎, 距幽门 5 cm 以内钳取胃黏膜组织作快速尿素酶试纸测定, 阳性者为研究对象, 并钳取病变组织 2 块保存于 40 g/L 甲醛溶液中. 同时抽取患者静脉血 2 ml 静置 4 h, 离心后取血清置于 -40℃ 保存. ELISA 法血清 H.pylori 抗体或病理 Warthin-Starry 银染色, 两项阳性为 H.pylori 感染, 入选本实验胃癌组 50 例:男 40 例, 女 10 例;慢性胃病组 29 例:其中萎缩性胃炎 17 例, 胃溃疡 5 例, 浅表性胃炎 7 例, 男 18 例, 女 11 例.

1.2 方法 CagA 蛋白的检测试剂盒购自上海晶莹生物技术有限公司. 其抗体采用基因工程表达 CagA 抗原并经纯化而成. 首先将待测血清及试剂盒平衡至室温, 血清样品作 1:21 倍稀释后, 将阳性对照液、阴性

对照液及血清稀释标本各 100 μL 依次加入包被小孔中, A1 孔作空白对照. 37℃ 保温 30 min. 洗涤后各孔加入酶标应用液 100 μL, 37℃ 保温 30 min. 洗涤后加入底物 A 液、底物 B 液各 50 μL, 37℃ 保温 15 min. 各孔加入终止液 50 μL, 在 450nm 处读取 A 值. 免疫组化方法测定 Bcl-2 和 p53 蛋白的表达. 将标本用石蜡包埋后切成 4 μm 的切片, 其中一张切片进行常规 HE 染色作组织学诊断, 另外的切片保存作免疫组化 ABC 法染色检测, Bcl-2、p53 单克隆抗体被用作第一抗体. 用缓冲盐液做阴性对照. 每个组织切片于高倍镜下计数 1 000 个细胞以评价阳性细胞的百分数, <5% 为阴性, >5% 为阳性.

统计学处理 感染率和基因蛋白表达率用百分数表示, 比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有显著性差异.

2 结果

2.1 CagA⁺ H.pylori 感染 胃癌组 CagA⁺ 株感染阳性率 86%(43/50)高于慢性胃病组 45%(13/29), 有显著性差异($P < 0.01$). CagA⁺ H.pylori 感染与胃癌明显相关.

2.2 Bcl-2 和 p53 蛋白表达 Bcl-2 蛋白表达:胃癌组高于慢性胃病组(62% vs 41%; $P > 0.05$), 胃癌 CagA⁺ 组高于 CagA⁻ 组(65% vs 43%; $P > 0.05$), 慢性胃病 CagA⁺ 组显著高于 CagA⁻ 组(77% vs 12%; $P < 0.01$). p53 蛋白表达:胃癌组显著高于慢性胃病组(54% vs 28%; $P < 0.05$), 胃癌 CagA⁺ 组显著高于 CagA⁻ 组(60% vs 14%; $P < 0.05$), 慢性胃病 CagA⁺ 组显著高于 CagA⁻ 组(46% vs 12%; $P < 0.05$).

3 讨论

H.pylori 感染的结局不同是由其基因多态性决定的, 只有 60% 的 H.pylori 有 CagA 基因. CagA 进入细胞后, 被细胞内特定的激酶磷酸化, 从而引起细胞骨架的重排以及细胞内信号传导系统的变化, 最终导致更严重的炎症及免疫反应, 而长期的慢性炎症易导致胃黏膜萎缩, 并发展成为慢性萎缩性胃炎, 甚至胃癌^[28]. Blaser et al^[20]比较了 H.pylori 感染的 103 例胃癌患者和 103 例非胃癌患者, 在长达 23 a 时间内经血清学检查发现 CagA 抗体阳性者胃癌发生率比 CagA 阴性者危险性增加 2 倍, 尤其对发展为肠型胃癌的患者更显著. Parsonnet et al^[24]研究发现 H.pylori 感染的胃癌患者 CagA 抗体阳性为 77.8%, 感染 CagA⁺ H.pylori 的患者发生胃癌的危险性是对照组的 5.8 倍, 认为 CagA⁺ H.pylori 与胃癌明显相关. 我国学者^[25]在胃癌高发区福州对 CagA 蛋白与胃腺癌关系的研究也证实了上述观点, 认为 CagA⁺ H.pylori 的感染在胃癌发生的起始阶段起了“启动子”的作用. Crabtree et al^[29]研究了 55 例 H.pylori 感染的胃癌患者, 其中 50 例(91%)血清抗 CagA 阳性, 明显高于 H.pylori 感染的非溃疡性消化不良患者(72%), 二者有显著的统计学差异. 本结果显示, 胃癌组中 CagA⁺

H.pylori 的感染率明显高于慢性胃病组(86% vs 45%), 萎缩性胃炎和胃溃疡 CagA⁺ *H.pylori* 的感染率(12/22, 54.6%)明显高于浅表性胃炎者(1/7, 14.3%), 认为 CagA⁺ *H.pylori* 的感染在胃癌发生的起始阶段起作用, 与上述研究结果相似。

胃癌的发生与细胞增生和凋亡的不平衡有关, 如果细胞凋亡活跃, 而增生减少, 可导致胃黏膜萎缩, 形成萎缩性胃炎; 如果细胞凋亡减少, 而增生活跃, 增加了自发性 DNA 复制错误的产生机率, 同时增加了内外源性致癌因子致 DNA 突变的机会, 导致肿瘤的发生。*H.pylori* 的感染, 特别是 CagA⁺ *H.pylori* 感染的慢性浅表性胃炎其胃上皮细胞凋亡与增生均明显增加, 二者呈正相关, CagA⁺ *H.pylori* 感染的萎缩性胃炎、不典型增生、胃癌, 细胞凋亡逐渐减少, 在胃癌时低于正常胃黏膜, 但细胞增生指数在萎缩性胃炎、不典型增生时减少, 在胃癌时明显增加^[22-25]。

Bcl-2 基因是发现的第一个抑制细胞凋亡的基因, 是通过抵抗细胞凋亡、延长细胞的生命、促进细胞生存, 从而使肿瘤发生发展。Bcl-2 表达可增加细胞对多种促凋亡因素的抵抗性, 在细胞的程序化死亡中起着非常重要的作用。野生型 p53 蛋白正常情况下是一种不稳定的调节蛋白, 其半衰期仅有 15-30 min。因此在正常细胞中几乎测不到, 故对细胞的生长无抑制作用。当细胞中的 DNA 受到损伤后, p53 蛋白出现积聚现象, 并诱导细胞凋亡。p53 基因突变型蛋白表达增加, 但失去了诱导凋亡的作用, 细胞聚集增加, 最终导致癌变形成。野生型 p53 基因缺陷细胞中 Bcl-2 的表达水平升高^[27-30]。

王思平 et al^[31] 的实验中显示胃癌 CagA⁺ 株感染病例 p53、bcl-2 的阳性率(前者为 57.4%, 后者为 61.8%)均显著高于 CagA⁻ 患者(0%)。所以推测其可能机制为 *H.pylori* 及其 CagA 蛋白可通过促进 Bax、bcl-2、p16、p21 的表达, 从而影响胃黏膜的增生和凋亡, 增加了 DNA 损伤的可能性, DNA 的损伤又可引起 p53 的高表达又进一步促进了 Bax、p16、p21 的表达。随着 DNA 的损伤、基因突变的累积, p53 亦可能随之突变, 引起细胞增生与凋亡的失衡, 进而发生胃癌。本研究结果提示, Bcl-2 和 p53 蛋白表达在 CagA⁺ *H.pylori* 感染者均高于 CagA⁻ *H.pylori* 感染者(胃癌组和慢性胃病组), 说明 CagA⁺ *H.pylori* 可能导致 Bcl-2 蛋白表达增强和 p53 基因突变, 细胞凋亡抑制, 使慢性炎症导致的细胞增生无法控制, 促进胃癌的发生。7 例浅表性胃炎 CagA⁺ *H.pylori* 感染仅 1 例, 且组织中 Bcl-2 和 p53 的表达均阴性。17 例萎缩性胃炎和 5 例胃溃疡 CagA⁺ *H.pylori* 感染 12 例, Bcl-2 的表达率最高, 为 83%, 且 Bcl-2 在 CagA⁺ 组中表达率显著高于 CagA⁻ 组, 说明 Bcl-2 蛋白在癌前疾病阶段已开始发挥作用, 且与 CagA 相关, 与其他研究结果相似^[32-34]。这提示我们, CagA⁺ *H.pylori* 作为高毒株能够引起胃黏膜严重而持续的炎

症, 导致胃上皮细胞 Bcl-2 的表达增强, 抑制细胞凋亡, 继而反应性增生增加^[34]。增生和凋亡的失衡增加了 DNA 损伤的可能性^[35], 导致 p53 基因突变^[32-34]。但确切机制有待于进一步的研究。

因此, 我们可以认为 CagA⁺ *H.pylori* 是 *H.pylori* 的高毒株, *H.pylori* 的 CagA 是与胃癌形成密切相关的原因之一, 可能通过 Bcl-2 和 p53 蛋白表达增强使细胞增生与凋亡失衡, 导致细胞恶变。

4 参考文献

- 1 姚永莉, 张万岱. 幽门螺杆菌致病因子研究进展. 世界华人消化杂志 2002;10:455-458
- 2 叶桂安, 张万岱, 刘利民, 施理, 徐智民, 陈焯, 周殿元. 幽门螺杆菌 vacA 基因和多态性与慢性胃病. 世界华人消化杂志 2001;9:593-594
- 3 Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogene expressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002;47:107-113
- 4 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
- 5 Gao HJ, Yu LZ, Bai JF, Peng YS, Sun G, Zhao HL, Miu K, Lü 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
- 6 Ohashi S, Segawa K, Okamura S, Urano H, Kanamori S, Ishikawa H, Hara K, Hikutomi Peek RM Jr, Miller GG, Tham A, Shirai K, Maeda M. A clinicopathologic study of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Cancer* 2000;88:2210-2219
- 7 Yamaoka Y, Kodama T, Kita M, Imanishi J, Kashima K, Graham DY. Relation between cytokines and *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Helicobacter* 2001;6:116-124
- 8 Graham DY. *Helicobacter pylori* infection is the primary cause of gastric cancer. *J Gastroenterol* 2000;35(Suppl):90-97
- 9 Jung HC, Kim JM, Song IS, Kim CY. Increased motility of *Helicobacter pylori* by methylcellulose could upregulate the expression of proinflammatory cytokines in human gastric epithelial cells. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57:263-270
- 10 于君, 沈祖尧. 幽门螺杆菌感染所致胃黏膜分子生物学行为改变在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:499-502
- 11 郝恒骏, 白剑峰, 彭延申, 孙谷, 赵翰林, 缪锜, 吕秀珍, 赵志泉, 萧树东. 幽门螺杆菌感染胃黏膜病变基因表达和细胞生物学行为. 中华消化杂志 2001;21:18-21
- 12 Nardone G, Staibano S, Rocco A, Mezza E, D'armiento FP, Insabato L, Coppola A, Salvatore G, Lucariello A, Figura N, De Rosa G, Budillon G. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut* 1999;44:789-799
- 13 萧树东. 幽门螺杆菌与胃癌. 世界华人消化杂志 1998;6:4
- 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 全俊, 范学工. 幽门螺杆菌与胃癌发生的实验研究进展. 世界华人消化杂志 1999;7:1068-1069
- 16 庄小强, 林三仁. 胃癌及癌前病变中幽门螺杆菌分布的感染研究. 世界华人消化杂志 2000;8:710-711
- 17 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;9:206-207
- 18 姚永莉, 张万岱. 幽门螺杆菌与胃癌关系. 世界华人消化杂志 2001;9:1045-1049
- 19 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
- 20 Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleantous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an

- increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 1995;55:2111-2115
- 21 张玲霞,张沥,刘永国,张宁霞,阎小君,韩峰产,侯瑜. 幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白A与胃十二指肠溃疡关系的病例对照研究. 世界华人消化杂志 2000;8:733-736
- 22 张沥,张玲霞,张宁霞,刘永国,阎小君,韩峰产,侯瑜. 幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白A与胃癌关系的病例对照研究. 世界华人消化杂志 2002;10:593-594
- 23 Perez-Perez GI, Peek RM, Legath AJ, Heine PR, Graff LB. The role of CagA status in gastric and extragastric complications of *Helicobacter pylori*. *J Physiol Pharmacol* 1999;50:833-845
- 24 Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 1997;40:297-301
- 25 陈奕贵,陈玉丽,吴婷,王承党,刘豫瑞,庄则豪,潘玉凤. 幽门螺杆菌及其CagA因子对胃黏膜中原癌基因蛋白表达的影响. 癌症 2000;19:419-422
- 26 李娟君,阎小君,刘智广,苏成芝. 幽门螺杆菌细胞毒素相关抗原A的表达纯化及其临床研究. 世界华人消化杂志 2002;10:271-274
- 27 Cover TL, Glupczynski Y, Lage AP, Burette A, Tummuru MK, Perez-Perez GI, Blaser MJ. Serologic detection of infection with cagA⁺ *Helicobacter pylori* strains. *J Clin Microbiol* 1995;33:1496-1500
- 28 Konturek PC, Konturek SJ, Bielanski W, Karczewska E, Pierzchalski P, Duda A, Starzynska T, Marlicz K, Popiela T, Hartwich A, Hahn EG. Role of gastrin in gastric cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected humans. *J Physiol Pharmacol* 1999; 50:857-873
- 29 Crabtree JE, Wyatt JJ, Sobala GM, Miller G, Tompkins DS, Primrose JN, Morgan AG. Systemic and mucosal humoral responses to *Helicobacter pylori* in gastric cancer. *Gut* 1993;34:1339-1343
- 30 Konturek PC, Konturek SJ, Pierzchalski P, Bielanski W, Duda A, Marlicz K, Starzynska T, Hahn EG. Cancerogenesis in *Helicobacter pylori* infected stomach-role of growth factors, apoptosis and cyclooxygenases. *Med Sci Monit* 2001;7:1092-1107
- 31 王思平,王孟薇,尤纬纬,刘爱军,邵勇,吴本伊. 幽门螺杆菌CagA基因株与胃癌p53、bcl-2表达的研究. 中华老年医学杂志 1999;18:302-305
- 32 Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994;9:1799-1805
- 33 Konturek PC, Konturek SJ, Sulekova Z, Meixner H, Bielanski W, Starzynska T, Karczewska E, Marlicz K, Stachura J, Hahn EG. Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, apoptosis related proteins Bax and Bcl-2, and gastrin in human gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:989-999
- 34 梁玮,卢世云,蔡鹏威,李乐,何利平,彭孝伟,潘秀珍. CagA基因对胃黏膜上皮细胞增生的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:856-857
- 35 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

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志获得 2001 年度百种中国杰出学术期刊

本刊讯 期刊的学术质量是一个综合指标, 1999 年中国科技信息所研制了中国科技期刊综合指标评价体系, 该指标体系已应用于中国科协一年一度的期刊择优资助工作中. 综合指标评价体系是根据期刊的多项重要指标, 如被引总频次、影响因子、即年指标、基金论文比、他引总引比、扩散因子等对期刊分学科进行综合打分. 通过对中国科技论文与引文数据库收录的科技期刊进行综合评定, 今年中国科学技术信息研究所首次评出了中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志荣获 2001 年度百种中国杰出学术期刊称号. (世界胃肠病学杂志 2002-12-18)

根除 *H.pylori* 后应用灭 Hp 煎剂对慢性胃炎病变的影响

王娜, 姚希贤, 张琳, 白文元, 冯丽英

王娜, 姚希贤, 张琳, 白文元, 冯丽英, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000

王娜, 女, 1975-02-12 生, 河北省辛集市人, 汉族, 1999 年河北医科大学本科毕业, 2002 年河北医科大学硕士研究生毕业, 医师。

项目负责人: 姚希贤, 050000, 河北省石家庄市和平西路 215 号, 河北医科大学第二医院消化内科. yaioxian@263.net

电话: 0311-7046901-8631

收稿日期: 2002-07-01 接受日期: 2002-07-25

Histologic changes after *H.pylori* eradication with Killing Hp decoction for chronic gastritis

Na Wang, Xi-Xian Yao, Lin Zhang, Wen-Yuan Bai, Li-Ying Feng

Na wang, Xi-Xian Yao, Lin Zhang, Wen-Yuan Bai, Li-Ying Feng, The 2nd Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Dr. Xi-Xian Yao, The 2nd Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping Xi Lu, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. yaioxian@263.net

Received: 2002-07-01 Accepted: 2002-07-25

Abstract

AIM: To study the histologic changes after *H.pylori* eradication with Killing Hp decoction for chronic gastritis.

METHODS: Total 81 cases of chronic gastritis with *H.pylori* infection were prospectively studied. After a 7-day triple therapy (bismuth potassium citrate, clarithromycin and tinidazole), the patients were divided randomly into 3 groups. Group A ($n=23$): Killing Hp decoction, 1# Bid; Group B ($n=15$): marzulene-s-granules, 1# Tid; Group C ($n=15$): aluminium hydroxide compound, 3-5# Bid; An endoscopy was performed at the first and third months. Histological changes of gastric mucosa were compared before and after the treatment according to Sydney classification. COX-2 (cyclooxygenase-2) protein was detected by immunohistochemical method, and the computer image processing system was used. For the patients of no eradication after one course therapy, anti-*H.pylori* treatment continued.

RESULTS: *H.pylori* eradication got a very good curative effect in 81.9% of the patients. A favourable histologic change of acute inflammatory infiltration was found (average values from 0.79 ± 0.78 to 0.042 ± 0.14) ($P < 0.001$). The mean percentage of COX-2 positive cells significantly decreased after *H.pylori* eradication [$(43.5 \pm 12.3)\%$, $(32.3 \pm 8.3)\%$, $P < 0.001$]. No chronic inflammation was observed after one month therapy (1.90 ± 0.68 , 1.67 ± 0.76 , $P > 0.05$). Compared to the controls, after Killing Hp decoction treatment for three months, the score corresponding to chronic gastritis declined progressively (average values from 2.9 ± 0.6 to 1.30 ± 0.60 , $P < 0.001$), and the mean percentage of COX-2 positive cells staining got further decreased and reached a statistically significant difference, compared with the results obtained

at the first month. [$(31.6 \pm 5.9)\%$, $(27.09 \pm 5.16)\%$, $P < 0.05$]. Gastric atrophic lesions were improved after "Killing Hp decoction" for three-month treatment.

CONCLUSION: *H.pylori* related gastritis should be treated further with Killing Hp decoction after *H.pylori* eradication.

Wang N, Yao XX, Zhang L, Bai WY, Feng LY. Histologic changes after *H.pylori* eradication with Killing Hp decoction for chronic gastritis. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(5):558-561

摘要

目的: 观察 *H.pylori* 根除后应用灭 Hp 浓缩袋装煎剂(灭 Hp 煎剂)对慢性胃炎慢性病变(包括肠化、不典型增生等萎缩性病变)的影响。

方法: *H.pylori* 阳性慢性胃炎患者 81 例用丽珠胃三联(铋剂 0.22 g, 2 次/d+替硝唑 0.5 g, 2 次/d+克拉霉素 0.25 g, 2 次/d) 治疗 7 d. 停药 1 mo 复查 *H.pylori*, 对 *H.pylori* 根除者随机分成 ABC 三组. A 组(23 例), 采用灭 Hp 煎剂 1 袋, 2 次/d; B 组阳性对照组(15 例), 采用麦滋林-S 1 袋, 3 次/d; C 组阴性对照组(15 例), 采用胃舒平 3-5 片, 2 次/d; 3 mo 后复查内镜, 采用悉尼系统比较治疗前后胃黏膜组织学变化, 采用免疫组化技术测定 COX-2 蛋白表达, 计算机图像处理系统分析结果; 对未根治者换药继续进行 *H.pylori* 根除, 直到复查 *H.pylori* 转阴为止。

结果: 丽珠胃三联根除率为 81.9%。单纯 *H.pylori* 根除者 80.0% 急性炎症细胞明显消退(0.79 ± 0.78 , 0.042 ± 0.14 , $P < 0.001$), 胃窦黏膜 COX-2 蛋白表达亦明显下降 [$(43.5 \pm 12.3)\%$, $(32.3 \pm 8.3)\%$, $P < 0.001$]; 而对胃炎慢性病变并无明显影响 (1.90 ± 0.68 , 1.67 ± 0.76 , $P > 0.05$); 灭 Hp 煎剂治疗 3 mo 后, 78.3% 慢性病变显著好转, 慢性炎症细胞平均积分从治疗前 2.09 ± 0.58 下降到 1.30 ± 0.60 ($P < 0.001$), 对胃黏膜 COX-2 蛋白表达也有进一步抑制作用 [$(31.6 \pm 5.9)\%$, $(27.1 \pm 5.2)\%$, $P < 0.05$], 明显优于上述阳性对照组 ($P < 0.05$); 对肠化、不典型增生等萎缩性病变也表现为治疗后退级或减轻。

结论: Hp 相关性慢性活动性胃炎首先应进行 *H.pylori* 根除, 并应对其慢性病变继续进行灭 Hp 煎剂治疗有良好治疗作用。

王娜, 姚希贤, 张琳, 白文元, 冯丽英. 根除 *H.pylori* 后应用灭 Hp 煎剂对慢性胃炎病变的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(5):558-561

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/558.htm>

0 引言

慢性胃炎为临床常见病, 多数学者认为 H.pylori 感染是慢性胃炎常见病因^[1]. 根除 H.pylori 可消除急性活动性炎症, 但对根除 H.pylori 后慢性胃炎病变能否恢复, 需否治疗, 以及如何治疗尚乏明确结论^[2-14]. 胃肠黏膜损伤时 COX-2 表达增高^[15,16], 与 H.pylori 阴性者相比, H.pylori 感染者胃黏膜中 COX-2 mRNA 和蛋白表达明显增强, 与慢性炎症程度密切相关^[17-20]. 为此, 我们研究了 H.pylori 根除后应用灭 Hp 煎剂^[21,22]对慢性胃炎慢性病变(包括肠化、不典型增生等萎缩性病变)的治疗作用.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-02/11 河北医科大学第二医院门诊 H.pylori 阳性慢性胃炎 123 例, 经内镜活检病理证实为慢性浅表性胃炎(CSG)104 例和慢性萎缩性胃炎(CAG)19 例, 伴溃疡者不限, 除外了肝胆系统及胰腺等疾病, 近 15 d 内未服铋剂、质子泵抑制剂及抗生素. 完成 H.pylori 治疗及随访者 81 例; 完成 3 mo 治疗及随访并经胃镜复查者 53 例, 男 33 例, 女 20 例, 病程 3mo-12 a, 年龄 19-69(平均 41 ± 11) 岁. COX-2 多克隆抗体购自美国 Stanta Cruz 公司, SP 免疫染色试剂盒购自北京中山生物技术公司.

1.2 方法 对 H.pylori 阳性慢性胃炎患者均用丽珠胃三联(铋剂 0.22 g, 2 次/d+替硝唑 0.5 g, 2 次/d+克拉霉素 0.25 g, 2 次/d, 由丽珠集团珠海丽珠制药厂生产)进行治疗, 连服 7 d. 于停药后 1 mo 检测 H.pylori, 对未根除者换药继续进行 H.pylori 根除, 直到复查 H.pylori 转阴为止. 对 H.pylori 根除者随机分成 ABC 三组. A 组: 采用灭 Hp 煎剂: 1 袋, 2 次/d;(由党参, 白术, 丹参, 当归, 川朴, 白芍, 乌梅等组成, 由河北省消化病研究所采用韩国中药煎药包装机制备.) B 组: 阳性对照组, 采用麦滋林-S: 1 袋, 3 次/d;(由日本寿制药株式会社生产.) C 组: 阴性对照组(可视为单纯 H.pylori 根除), 采用胃舒平: 3-5[#], 2 次/d.(为上海天平胃舒平制药厂生产.) 各组均继续用药 3 mo 后复查内镜观察组织形态学变化, 同时应用免疫组化技术测定胃窦黏膜治疗前后 COX-2 表达. 各组在性别、年龄、病程分布、炎症程度分布等方面均无显著性差异, 具可比性. 行内镜检查时, 胃窦 3 块取于距幽门口 2-3 cm 的大弯, 小弯和前壁, 胃体 2 块取于距贲门 8 cm 的大弯和小弯(约距胃角近侧 4 cm)共活检 5 块, 采用(1)选择性培养基微氧培养 5-7 d; (2)快速尿素酶试验或 C¹³ 尿素呼吸实验; (3)黏膜组织匀浆涂片 Gram 染色; (4)H.pylori-DNA PCR 若(1)为阳性即为 H.pylori 阳性; 若(1)为阴性, 则(2)(3)(4)任两项阳性方可定为 H.pylori 阳性, 抗 H.pylori 治疗停药后 4 wk 复查(2)(3)均阴性者为 H.pylori 根治^[24,25]. 痊愈: 上腹痛、胃胀满、食欲不振消失; 显效: 症状基本消失; 有效: 症状减少或减轻; 无效: 症状无变化或加重.

组织标本中性甲醛固定, 常规石蜡切片, HE 染色. 参照悉尼分类标准^[23,24], 将慢性炎症、活动性、萎缩、肠化、不典型增生分别分成无、轻、中、重度, 计分为 0, 1, 2, 3 分. 分别由 2 位病理专业医师盲法进行判定, 最后取其平均分. 取胃窦部的活检标本进行 COX-2 免疫组化染色^[25,26], 采用链霉卵白素蛋白-过氧化物酶联结法(streptavidin-peroxidase conjugated method). 石蜡切片(3-5 um)常规脱蜡、剃度水化后, 切片置 30 ml/L 过氧化氢孵育 5-10 min 清除内源性过氧化物酶活性. 蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min. 置电炉煮沸进行抗原修复 15-20 min. 冷却室温后滴加封闭用血清 15 min, 倾去血清, 滴加 1:100 稀释 COX-2 多克隆抗体, 4 过夜; PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 滴加生物素化二抗, 37^o 孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 滴加辣根酶标记链霉卵白素, 37^o 孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, DAB 显色 5 min, 自来水充分冲洗, 苏木精复染, 中性树脂封片. 阴性对照一抗用 0.01 mol/L PBS 代替, 已知强阳性的结肠癌切片作为阳性对照. 染色后光镜下作定性观察, 在图像分析系统上应用免疫组化计算面积软件作定量分析^[27], 取 200 倍高倍视野下 COX-2 显色最强一个视野, 通过显微摄影系统摄取图像, 取每帧图像上随机个细胞的平均阳性细胞率.

统计学处理 计数资料采用 χ^2 检验, 计量资料采用 T 检验. 各组间分析用单因素随机区组方差分析, 相关分析检验. 数据用计算机处理.

2 结果

进入本研究患者 123 例, 完成 H.pylori 治疗及随访者 81 例; 中途退出 6 例(C 组治疗无效 2 例, B 组药物副作用 3 例, A 组自动停药 1 例), 最后完成 3 mo 治疗随访并经胃镜复查者 53 例. 123 例患者 H.pylori 未根除者 22 例, 丽珠胃三联根除率为 81.9%. A 组灭 Hp 煎剂 23 例患者治疗后有 21 例症状缓解(91.3%), 与 B 组麦滋林-S、C 组胃舒平相比差异显著.(80%, 46.7%, $P < 0.05$, 表 1)单纯 H.pylori 根除组 80% 根除者有急性炎症明显消退, 炎性细胞浸润较之未根除者明显减少, 炎症细胞平均积分从治疗前 0.79 ± 0.78 下降到 0.042 ± 0.14 ($P < 0.001$), 而对慢性淋巴细胞浸润根除前后并无显著改变, 仅有 29.2% 患者慢性炎症细胞浸润较治疗前降低, 治疗前后炎症细胞平均积分亦无明显改变(1.90 ± 0.68 , 1.67 ± 0.76 , $P > 0.05$). H.pylori 未根除者无论急性还是慢性炎症浸润程度治疗前后均无明显变化. (0.63 ± 0.76 , 0.34 ± 0.51 , $P > 0.05$, 表 2)但于改换用药, H.pylori 根除后 83.3%(10/12)急性炎症消退(0.032 ± 0.15 , $P < 0.05$). 灭 Hp 煎剂治疗 3 mo 90% 急性炎症细胞浸润减少($P < 0.05$), 但与单纯根除 H.pylori (80%) 时无统计学差异(0.042 ± 0.14 , 0.076 ± 0.27 , $P > 0.05$); 但对其慢性病变具有明显疗效, 治疗后 78.3% 慢性炎症细胞浸润程度明显减低, 炎症细胞平均积分从治疗前 2.09 ± 0.58 下降到 1.30 ± 0.60

($P < 0.001$), 麦滋林 -S 阳性对照组对慢性炎症虽也有所缓解($1.93 \pm 0.70, 1.40 \pm 0.81, P < 0.05$), 但仅 66.7% 慢性炎症细胞浸润程度缓解, 较灭 Hp 煎剂疗效(78.3%) 为低($P < 0.05$), 胃舒平阴性对照组治疗前后对慢性病变无明显作用($1.97 \pm 0.58, 2.30 \pm 0.59, P > 0.05$). CAG 患者 19 例 (A 组灭 Hp 煎剂组 10 例, B 组对照组 9 例) 灭 Hp 煎剂组 3 例轻度萎缩, 2 例重度, 1 例中度肠化, 1 例轻度, 1 例中度异型增生性病变于治疗 3 mo 后退级或减轻. 对照组则仅有 1 例轻度萎缩, 1 例中度肠化, 1 例轻度异型增生性病变缓解. 灭 Hp 煎剂组对肠化和不典型增生等萎缩性病变有一定治疗作用.

表 1 灭 Hp 煎剂治疗 3 mo 后临床疗效

	<i>n</i>	痊愈或显效(%)	有效(%)	无效(%)
灭 Hp 煎剂(治疗组)	23	47.8 ^a	43.5 ^a	8.7
麦滋林 -S(阳性对照)	15	33.3	46.7	20
胃舒平 (阴性对照)	15	13.3	33.3	53.3

^a $P < 0.05$ vs 阴性对照组相比.

表 2 单纯 H.pylori 根除对胃黏膜病变影响

	胃窦部		胃体部	
	活动炎症	慢性炎症	活动炎症	慢性炎症
	0	0	0	0
根治组 <i>n</i> =24				
根除前	9 9 1 5	0 4 11 9	12 8 4 0	1 11 7 5
根除后	20 3 0 1	0 9 7 8	23 1 0 0	3 10 6 5
未根治组 <i>n</i> =16				
根除前	10 0 4 2	0 1 5 10	14 2 0 0	1 4 6 5
根除后	8 6 2 0	0 5 4 7	13 3 0 0	1 3 6 6

表 3 灭 Hp 煎剂治疗 3 mo 后各组胃黏膜病变情况

	胃窦部		胃体部	
	活动性炎症	慢性炎症	活动性炎症	慢性炎症
	0	0	0	0
A 组 <i>n</i> =23				
治疗前	13 7 1 2	0 3 9 11	17 4 2 0	0 9 9 5
治疗后	23 0 0 0	2 9 5 7	23 0 0 0	3 14 6 0
B 组 <i>n</i> =15				
治疗前	8 4 0 3	0 2 8 5	11 4 0 0	0 7 4 4
治疗后	15 0 0 0	2 5 3 5	15 0 0 0	3 6 4 2
C 组 <i>n</i> =15				
治疗前	8 0 2 5	0 1 10 4	7 7 1 0	2 3 8 2
治疗后	12 1 1 1	0 2 7 5	13 1 0 0	1 2 6 6

单纯根除 H.pylori (24 例) 后胃黏膜 COX-2 蛋白表达明显下降, COX-2 平均阳性细胞率从(43.5 ± 12.3)% 下降至(32.3 ± 8.3)% ($P < 0.001$); 而 H.pylori 未根除者(16 例) 的胃黏膜 COX-2 平均阳性细胞率为(39.6 ± 11.1)%, 与治疗前(40.6 ± 10.8)% 相比无显著性差异($P > 0.05$); 直到

H.pylori 根除后 COX-2 平均阳性细胞率下降到(32.3 ± 8.8)%, ($P < 0.05$). 灭 Hp 煎剂治疗 3 mo 对胃黏膜 COX-2 蛋白表达有进一步抑制作用, COX-2 平均阳性细胞率从单纯 H.pylori 根除后的(31.6 ± 5.9)% 下降到(27.1 ± 5.2)% ($P < 0.05$); 而麦滋林 -S 组($33.6 \pm 6.4\%$, $30.6 \pm 6.6\%$, $P > 0.05$) 和胃舒平组对 COX-2 蛋白表达无明显抑制作用 ($32.7 \pm 5.2\%$, $33.3 \pm 5.6\%$, $P > 0.05$). COX-2 蛋白表达强度与胃黏膜慢性炎症细胞浸润程度密切相关($r = 0.3$, $P < 0.01$), 而且分别与急、慢性炎症细胞浸润程度相关($r = 0.343, 0.260, P < 0.05$).

表 4 灭 Hp 煎剂治疗 3mo 后对萎缩性病变更影响

	萎缩			肠化			异型增生							
	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
A 组 治疗前	4	6	0	0	7	0	1	2	0	8	1	1	0	0
<i>n</i> =10 治疗后	7	3	0	0	7	3	0	0	0	10	0	0	0	0
B 组 治疗前	6	3	0	0	4	2	2	1	0	8	1	0	0	0
<i>n</i> =9 治疗后	7	2	0	0	4	2	1	2	0	9	0	0	0	0

3 讨论

我们对 81 例 Hp 相关性慢性胃炎患者进行了前瞻性研究. 应用丽珠胃三联对 H.pylori 根除率为 81.9%. 多数学者认为单纯 H.pylori 根除对急性活动性炎症有明显疗效, 但对 H.pylori 根除后的慢性胃炎病变能否恢复尚乏明确结论^[2-14]. 我们发现单纯 H.pylori 根除患者 80.0% 急性炎症细胞明显消退, 急性炎症细胞浸润较未根除者明显减少, 炎症细胞积分从治疗前 0.79 ± 0.78 下降到 0.042 ± 0.14 , ($P < 0.001$). COX-2 作为一种炎症酶, 在 H.pylori 感染者胃黏膜中 COX-2 mRNA 和蛋白表达明显增强, 其表达情况与慢性炎症程度密切相关^[17-20], 我们证实 H.pylori 根除后胃窦黏膜 COX-2 蛋白表达亦明显下降. 一般认为, 单纯 H.pylori 根除对慢性病变无明显影响. 本研究也表明, 单纯 H.pylori 根除对胃炎慢性病变无明显影响, 仅有 29.2% 患者慢性炎症细胞浸润较治疗前降低, 治疗前后炎症细胞平均积分亦无明显改变. 因此, 单纯 H.pylori 根除对急性活动性炎症具有确切疗效, 但对其所致慢性病变, 虽经 3 mo 观察并无明显影响, 所以, 对 Hp 相关性慢性活动性胃炎首先应进行 H.pylori 根除, 并应对其慢性病变继续进行治疗.

既往研究表明, H.pylori 根除后对胃炎慢性病变并无明显作用, 亦不能逆转萎缩、肠化、不典型增生性病变^[28-30]. 为了研究对 H.pylori 根除慢性病变进行何种治疗为好的问题, 危北海 et al^[31]报道采用中药胃安素治疗 CAG 60 例对胃黏膜萎缩、肠化、不典型增生等病变均取得良好疗效; 王汝俊 et al^[32]采用中药胃炎消对实验性大鼠慢性萎缩性胃炎进行治疗, 取得了明显增加胃窦部黏膜厚度的疗效; 说明中医中药对治疗萎缩性胃炎有一定优势. 本研究中灭 Hp 煎剂组 3 例轻度萎

缩, 2 例重度, 1 例中度肠化, 1 例轻度, 1 例中度异型增生性病变均于治疗 3 mo 后退级或减轻. 对照组则仅有 1 例轻度萎缩, 1 例中度肠化, 1 例轻度异型增生性病变缓解. 所以灭 Hp 煎剂对肠化和不典型增生等萎缩性病变有一定治疗作用. 但由于萎缩性胃炎例数较少, 尚需大样本进一步研究. 我们采用随机、对照、盲法的原则观察了中药灭 Hp 煎剂^[22, 33]对胃炎慢性病变的疗效, 结果表明灭 Hp 煎剂治疗 3 mo 后慢性病变显著好转, 78.3% 慢性炎症细胞浸润明显降低, COX-2 平均阳性细胞率从 *H.pylori* 根除后的 $(31.6 \pm 5.9)\%$ 下降到 $(27.2 \pm 5.2)\%$ ($P < 0.05$); 麦滋林-S 组虽对慢性炎症有所缓解, 但仅 66.7% 慢性炎症细胞浸润程度缓解, 较灭 Hp 煎剂疗效 (78.3%) 为低 ($P < 0.05$), 对 COX-2 蛋白表达亦无进一步抑制作用. 胃舒平组 (用作阴性对照) 对慢性病变及 COX-2 蛋白表达均无明显作用. 因此, 灭 Hp 煎剂对 Hp 相关性胃炎慢性病变具有良好治疗作用, 对萎缩性病变获得可喜治疗苗头, 具有良好开发前景.

4 参考文献

- 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染基础与临床. 第 1 版: 中国科学技术出版社, 2002:147-148
- Chen XY, van der Hulst RW, Bruno MJ, van der Ende A, Xiao SD, Tytgat GN, Ten Kate FJ. Interobserver variation in the histopathological scoring of *H.pylori* related gastritis. *J Clin Pathol* 1999; 52:612-616
- Savarino V, Mela GS, Zentilin P, Lapertosa G, Bisso G, Mele MR, Pivari M, Mansi C, Vigneri S, Celle G. Histological and functional recovery in patients with multifocal atrophic gastritis after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999;31:4-8
- Correa P, Fontham ET, Bravo JC, Bravo LE, Ruiz B, Zarama G, Realpe JL, Malcom GT, Li D, Johnson WD, Mera R. Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1881-1888
- Sung JJ, Lin SR, Ching JY, Zhou LY, To KF, Wang RT, Leung WK, Ng EK, Lau JY, Lee YT, Yeung CK, Chao W, Chung SC. Atrophy and intestinal metaplasia one year after cure of *H. pylori* infection: a prospective, randomized study. *Gastroenterology* 2000; 119:7-14
- Schenk BE, Kuipers EJ, Nelis GF, Bloemena E, Thijs JC, Snel P, Luckers AE, Klinkenberg-Knol EC, Festen HP, Viergever PP, Lindeman J, Meuwissen SG. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on chronic gastritis during omeprazole therapy. *Gut* 2000; 46:615-621
- Gisbert JP, Blanco M, Pajares JM. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on histological lesions of gastric mucosa. An 18-month follow-up study. *Rev Clin Esp* 2000;200:480-484
- Basso D, Gallo N, Zambon CF, Baron M, Navaglia F, Stockreiter E, Di Mario F, Ruge M, Plebani M. Antigastric autoantibodies in *Helicobacter pylori* infection: role in gastric mucosal inflammation. *Int J Clin Lab Res* 2000;30:173-178
- Ruiz B, Garay J, Correa P, Fontham ET, Bravo JC, Bravo LE, Realpe JL, Mera R. Morphometric evaluation of gastric antral atrophy: improvement after cure of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3281-3287
- Mones J, Rodrigo L, Sancho F, Martin L, Boixeda D, Artes MT, Garcia-Cases C. Club Espanol para el Estudio del *Helicobacter pylori*. *Helicobacter pylori* eradication versus one-year maintenance therapy: effect on relapse and gastritis outcome. *Rev Esp Enferm Dig* 2001;93:372-389
- Tepes B, Kavcic B, Zaletel LK, Gubina M, Ihan A, Poljak M, Krizman I. Two- to four-year histological follow-up of gastric mucosa after *Helicobacter pylori* eradication. *J Pathol* 1999;188:24-29
- Zerbib F, Lenk C, Sawan B, Cayla R, Broutet N, Carles B, de Mascarel A, Megraud F, Lamouliatte H. Long-term effects of *Helicobacter pylori* eradication on gastric antral mucosa in duodenal ulcer patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:719-725
- Annibale B, Aprile MR, D'ambra G, Caruana P, Bordi C, Delle Fave G. Cure of *Helicobacter pylori* infection in atrophic body gastritis patients does not improve mucosal atrophy but reduces hypergastrinemia and its related effects on body ECL-cell hyperplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:625-634
- Ohkusa T, Fujiki K, Takashimizu I, Kumagai J, Tanizawa T, Eishi Y, Yokoyama T, Watanabe M. Improvement in atrophic gastritis and intestinal metaplasia in patients in whom *Helicobacter pylori* was eradicated. *Ann Intern Med* 2001;134:380-386
- Chan FK, To KF, Ng YP, Lee TL, Cheng AS, Leung WK, Sung JJ. Expression and cellular localization of COX-1 and COX-2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:187-193
- Sung JJ, Leung WK, Go MY, To KF, Cheng AS, Ng EK, Chan FK. Cyclooxygenase-2 expression in *Helicobacter pylori*-associated premalignant and malignant gastric lesions. *Am J Pathol* 2000;157:729-735
- Fu S, Ramanujam KS, Wong A, Fantry GT, Drachenberg CB, James SP, Meltzer SJ, Wilson KT. Increased expression and cellular localization of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2 in *Helicobacter pylori* gastritis. *Gastroenterology* 1999;116:1319-1329
- Zarrilli R, Tuccillo C, Santangelo M, Nardone G, Romano M. Increased COX-2, but not COX-1, mRNA expression in *Helicobacter pylori* gastritis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3376-3378
- Kimura A, Tsuji S, Tsujii M, Sawaoka H, Iijima H, Kawai N, Yasumaru M, Kakiuchi Y, Okuda Y, Ali Z, Nishimura Y, Sasaki Y, Kawano S, Hori M. Expression of cyclooxygenase-2 and nitrotyrosine in human gastric mucosa before and after *H.pylori* eradication. *Prostagl Leukot Essent Fatty Acids* 2000;63:315-322
- McCarthy CJ, Crofford LJ, Greenson J, Scheiman JM. Cyclooxygenase-2 expression in gastric antral mucosa before and after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1218-1223
- 姚希贤, 冯丽英, 白文元, 王丽华, 张辉, 齐富存. 灭 Hp 胶囊多联治疗 Hp 阳性消化性溃疡. 世界华人消化杂志 1999;7:766-769
- 姚希贤, 姚金锋, 崔东来, 郭显, 白文元. 根除 Hp 与疗胃煎剂对 HP 相关 CAG 治疗作用. 世界华人消化杂志 2000;8:741-745
- 全国第一次 *H.pylori* 专家共识会议. 幽门螺杆菌若干问题的共识意见. 中华消化杂志 2000;20:117-118
- 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
- 路红, 陈晓宇, 刘文忠, 彭延申, 萧树东. 幽门螺杆菌感染对胃黏膜环氧合酶-2 表达的影响. 中华消化杂志 2001;21:287-289
- 罗玉琴, 吴开春, 孙安华, 潘伯荣, 张学庸, 樊代明. 浅表性胃炎、胃黏膜不典型增生及胃癌组织中 COX-1、COX-2、iNOS 表达的意义. 中华消化杂志 2000;20:223-226
- 伟玲, 陈正堂. 脂多糖刺激肺血管内巨噬细胞环氧合酶-2 表达的意义. 中华创伤杂志 2000;16:21-24
- 蒋树林, 姚希贤, 张辉. 低剂量标准三联疗法根除 Hp 及对胃黏膜病变的治疗作用. 世界华人消化杂志 1998;6:418-420
- 姚希贤, 姚金锋. "疗胃煎剂" 胃黏膜保护作用实验研究. 中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:330-333
- Yao XX, Feng LY. Clinical and experiment at study of killing effect on *H.pylori*. *Chine J Biochemical Eng* 1997;5:121-124
- 危北海, 张占海, 杨丽彩, 刘晋生, 赵敏, 赵荣来, 李乾构. 胃安素治疗慢性萎缩性胃炎的临床与实验研究. 世界华人消化杂志 1998;6:114-117
- 王汝俊, 杜群, 邵庭荫, 钟廷机, 巫燕莉, 王建华. 中药胃炎消治疗大鼠慢性萎缩性胃炎的病理研究. 世界华人消化杂志 2000;8:382-385
- 冯丽英, 宫心鹏, 郝书亭, 姚希贤. 灭 Hp 胶囊四联治疗消化性溃疡疗效及愈合质量的双盲对照研究. 世界华人消化杂志 2000;8: 678-680

Hp对慢性萎缩性胃炎内皮素及一氧化氮水平影响的实验与临床研究

郭昱,郭霞,姚希贤

郭昱,姚希贤,河北医科大学第二医院 河北省石家庄市 050000
郭霞,河北医科大学第四医院 河北省石家庄市 050011
郭昱,女,1972-05-16生,河北省深县人,汉族. 1995年河北医科大学本科毕业,1999年河北医科大学硕士研究生毕业,主治医师. 主要从事消化系统疾病的研究. 项目负责人:姚希贤,050000,河北省石家庄市,河北医科大学第二医院.
电话:0311-7046901-6511
收稿日期:2002-07-26 接受日期:2002-09-12

Changes of nitric oxide and endothelin in *Helicobacter pylori* associated chronic atrophic gastritis before and after eradication: an experimental and clinical study

Yu Guo, Xia Guo, Xi-Xian Yao

Yu Guo, Xi-Xian Yao, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Xia Guo, Forth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China
Correspondence to: Dr. Xi-Xian Yao, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China.
Received: 2002-07-26 Accepted: 2002-09-12

Abstract

AIM: To investigate the changes of nitric oxide (NO) and endothelin (ET) in rats and patients with *Helicobacter pylori* associated chronic atrophic gastritis (CAG) before and after eradication, and to explore the possible mechanism of *Helicobacter pylori* associated CAG.

METHODS: *Helicobacter pylori* associated CAG Wistar rat model was induced with sodium, eoxycholate, sodium salicylate, ethanol and culture broth of *H.pylori* which were orally administered. Model rats were randomly divided into three groups: Group A: *Helicobacter pylori* eradication with standard triple therapy for two weeks (Amoxicilline + Timidazole + Denol); Group B: naturally restoring group, only given distilled water as placebo; Group C: the normal control. 3 months after treatment, all the rats were killed. The blood level of NO and ET was measured. 42 cases of *Helicobacter pylori* infected CAG patients, 25 *Helicobacter pylori* uninfected CAG patients, and 21 *Helicobacter pylori* infected chronic superficial gastritis (CSG) patients were included in this study. The blood level of NO and ET was measured.

RESULTS: The blood level of NO and ET was lower in *Helicobacter pylori* eradication group [(3 672 ± 1 845) ng/ml, (181.14 ± 22.5) × 10⁻³ ng/ml] than those in naturally restoring group [(887 ± 1 896) ng/ml, (211.67 ± 34.36) × 10⁻³ ng/ml], *P* < 0.01. The blood level of NO and ET was higher in *Hp* infected CAG [(5 834 ± 1 896) ng/ml, (91.18 ± 34.19) × 10⁻³ ng/ml] than those in *Hp* uninfected CAG [(2 773 ± 1 896) ng/ml,

(68.37 ± 14.24) × 10⁻³ ng/ml] and infected CSG patients [(3 420 ± 1 024) ng/ml, (68.90 ± 19.47) × 10⁻³ ng/ml] (*P* < 0.01).

CONCLUSION: *Helicobacter pylori* associated CAG is accompanied by an enhanced serum NO and plasma ET. This may be one of the pathogenic mechanisms of *Helicobacter pylori* associated CAG.

Guo Y, Guo X, Yao XX. Changes of nitric oxide and endothelin in *Helicobacter pylori* associated chronic atrophic gastritis before and after eradication: an experimental and clinical study. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):562-564

摘要

目的: 试图通过实验与临床研究观察Hp根除前后慢性萎缩性胃炎(CAG)NO和ET水平的改变,从这一角度出发探讨Hp相关CAG的发病机制。

方法: (1)实验研究:采用SS1 Hp菌株,3%水杨酸钠、5%乙醇,5 mmol/L去氧胆酸钠灌胃,加以饥饱失常,制作Hp相关CAG大鼠模型.模型大鼠随机分成3组:(a)Hp根除组:根除Hp三联(德诺、阿莫西林、甲硝唑)治疗2 wk。(b)模型自然恢复组:采用蒸馏水灌胃。(c)正常对照组:正常大鼠.治疗结束后3 mo处死全部大鼠,进行Hp、病理组织学检查及血清一氧化氮(NO)、内皮素(ET)含量测定。(2)临床研究:选择Hp阳性CAG患者42例,Hp阴性CAG患者25例,Hp阳性慢性浅表胃炎(CSG)21例,分别进行Hp、病理组织学检查及血中NO和ET测定。

结果: 实验CAG模型中,Hp根除组血清NO、ET含量[(3 672 ± 1 845) ng/ml, (181.14 ± 22.5) × 10⁻³ ng/ml]较模型自然恢复[(5 887 ± 1 896) ng/ml, (211.67 ± 34.36) × 10⁻³ ng/ml]显著减低,*P* < 0.01,但仍未达正常水平[(2 461 ± 949) ng/ml, (135.42 ± 27.46) × 10⁻³ ng/ml]。临床研究Hp阳性CAG患者,血清NO[(5 834 ± 1 896) ng/ml, (91.18 ± 34.19) × 10⁻³ ng/ml]明显高于Hp阴性CAG[(2 773 ± 1 896) ng/ml, (68.37 ± 14.24) × 10⁻³ ng/ml], *P* < 0.01,也高于Hp阳性CSG患者[(3 420 ± 1 024) ng/ml, (68.90 ± 19.47) × 10⁻³ ng/ml], *P* < 0.01。

结论: Hp相关CAG血中NO和ET水平显著升高,二者呈正相关,根除Hp后,NO和ET水平显著降低。

郭昱,郭霞,姚希贤. Hp对慢性萎缩性胃炎内皮素及一氧化氮水平影响的实验与临床研究. 世界华人消化杂志 2003;11(5):562-564
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/562.htm>

0 引言

研究表明 Hp 与慢性萎缩性胃炎(CAG)的发生、发展密切相关,但其致病机制目前尚不十分明了.以往研究多从 Hp 细菌毒素及其诱发的自身免疫反应探讨 Hp 相关 CAG 的致病机制,我们试图通过实验与临床研究,观察 Hp 根除前后 CAG 内皮素(ET)、一氧化氮(NO)的水平,拟从这一角度出发探讨 Hp 相关 CAG 的发病机制.

1 实验研究

1.1 材料和方法 二级、Wister 大鼠,体重 90-110 g.购自北京协和医科大学实验动物部,分笼喂养,每笼 4-6 只.ET 放免药盒由北京北方免疫试剂研究所提供, Hput 试剂由福建三强生物化工有限公司提供,美国 Waters 公司产阴离子分析柱(IC-Pak Anion, 4.6 × 5 cm)、810 高压液相仪及 486 紫外检测器.

1.2 方法 (1)Hp 相关 CAG 大鼠模型制作:根据文献[1-7]报道加以改进,制作 Hp 相关 CAG 大鼠模型. (a) SS1Hp 菌株(布氏肉汤洗脱菌落)CFU 10^9 /ml 灌胃, 1.5 ml/只,共 5 次, 1 wk 内完成. (b)胃黏膜损伤因子:水杨酸钠用蒸馏水制成 3% 溶液,灌胃 3 ml/只, 1 次/d,灌胃前后禁食水 1 h; 5% 乙醇与 5 ml/L 去氧胆酸钠溶液(蒸馏水配制)作为饮料隔日交替自由饮用. (c) 饥饿失常: 2 d 饱食, 1 d 禁食. 于 Hp 菌株末次接种 12 wk 后分别处死模型组大鼠 10 只,正常大鼠 8 只,观察病变形成情况.结果模型大鼠全部感染 Hp (10/10 只),黏膜固有层变薄可见明显炎症细胞浸润,壁细胞减少.此模型符合人类 CAG 病因及病理变化,可作为 Hp 相关 CAG 发病机制研究的较为理想的动物模型. (2)动物分组:模型大鼠 20 只,随机分成以下各组:(a)Hp 根除组:标准三联(德诺 40 ml/Kg/d,阿莫西林 166.7 mg/Kg/d,甲硝唑 66.7 mg/Kg/d)灌胃 2 wk;(b)模型自然恢复组:等量蒸馏水灌胃. (c)正常对照组:正常大鼠 10 只作为正常对照. (3)标本留取:全部大鼠于停药 3 mo 后,禁食 20 h,乙醚麻醉,取血,分离血清、血浆,处死动物取出胃,沿胃大弯方向剪开,分别于胃大、小弯及前后壁取黏膜组织各 1 块,进行 Hp 检测. (4)Hp 检测方法:(a)细菌培养. (b)胃黏膜涂片 Gram 染色. (c)尿素酶实验. (d)组织切片改良 Gimesa 染色, Hp 阳性制定标准为四项中任何两项阳性; Hp 根除标准为停药 1 mo 以上上述四项检查皆阴性. (5)血浆 ET 测定:采用放免法同批检测,操作步骤严格按照说明书进行. (6)血清 NO 测定:血样 2 ml,室温静置析出血清后,离心 10 min,分离血清, - 70 °C 保存待测,采用高效液相法同批检测,以血浆中 NO $_2^-$ / NO $_3^-$ 总量间接显示体内 NO 的生成量.

统计学处理 全部计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本

均数比较采用 t 检验,多组均数比较采用方差分析,当 $P < 0.05$ 差异有显著性.

1.3 结果 本研究结果表明, Hp 根除组血清 ET 及 NO 含量 $[(181.14 \pm 22.5) \times 10^{-3}$ ng/ml、 $(3\ 672 \pm 1\ 845)$ ng/ml]较模型自然恢复组 $[(211.67 \pm 34.36) \times 10^{-3}$ ng/ml、 $(5\ 887 \pm 1\ 896)$ ng/ml]明显降低,均 $P < 0.01$.(表 1)

表 1 大鼠各实验组 NO、ET 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ET × 10 ⁻³ ng/ml	NO ng/ml
根除 Hp 组	10	181.14 ± 12.57 ^{ab}	3 552 ± 1 038 ^{ab}
模型自然恢复组	9	211.67 ± 34.36 ^a	6 787 ± 1 396 ^a
正常组	10	135.42 ± 27.46	2 461 ± 949

^a $P < 0.01$, vs 正常组 ^b $P < 0.01$, vs 模型自然恢复组.

2 临床研究

2.1 材料和方法 (1)患者情况:选择年龄在 18-65 岁经胃镜检查、胃黏膜活检确诊的 CAG 患者 67 例,男 31 例,女 11 例,平均年龄 (52.94 ± 9.8) 岁,其中 Hp 阳性 42 例,男 35 例,女 7 例,平均年龄 (49.74 ± 5.8) 岁, Hp 阴性 25 例,男 21 例,女 4 例,平均年龄 (55.79 ± 10.26) 岁, Hp 阳性 CSG 患者 22 例,男 13 例,女 9 例,平均年龄 (49.25 ± 6.93) 岁,以上对象均 2 wk 内未接受过铋剂,质子泵抑制剂和抗生素,并除外消化溃疡、胃癌及严重心、肺、肝、肾功能损害. (2)方法:(a)标本留取:所有病例均于做胃镜时自距幽门口 2-3 cm 取胃黏膜组织 6 块,分别进行 Hp 检测,病理组织学检查,取空腹静脉血 4 ml,分离血清血浆,备用. (b)Hp 检测:检测方法,判定标准同实验研究. (c)NO、ET 的检测:检测方法同实验研究.

2.2 结果 (1)CAG 患者 Hp 阳性与阴性者之间 NO、ET 水平比较: Hp 阳性 CAG 患者 NO $(5\ 834 \pm 1\ 896)$ ng/ml、ET $(91.18 \pm 34.19) \times 10^{-3}$ ng/ml 明显高于 Hp 阴性者 $(2\ 773 \pm 1\ 896)$ ng/ml、 $(68.37 \pm 14.24) \times 10^{-3}$ ng/ml, $P < 0.01$.(表 2). (2)Hp 阳性 CAG 与 CSG 患者之间 NO、ET 水平比较: Hp 阳性 CAG 患者血清 NO、ET 含量明显高于 Hp 阳性 CSG $[(3\ 420 \pm 1\ 024)$ ng/ml、 $(68.90 \pm 19.47) \times 10^{-3}$ ng/ml]患者,均 $P < 0.01$.(表 3).

表 2 Hp 阳性、阴性 CAG 患者 NO、ET 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ET × 10 ⁻³ ng/ml	NO ng/ml
Hp 阳性 CAG	42	91.18 ± 34.19 ^a	5 834 ± 1 896 ^a
Hp 阴性 CAG	25	68.37 ± 14.24	2 773 ± 823

^a $P < 0.01$.

表 3 Hp 阳性 CAG、CSG 患者 NO、ET 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ET × 10 ⁻³ ng/ml	NO ng/ml
CAG	42	91.18 ± 34.19 ^b	5 834 ± 1 896 ^b
CSG	22	68.90 ± 19.47	3 420 ± 1 024

^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$.

3 讨论

ET是由21个氨基酸残基组成的生物活性多肽,可引起血管痉挛和组织器官功能损伤,是目前已知的缩血管活性最强的多肽物质.除血管内皮细胞外许多组织器官均能产生ET,大鼠胃窦及胃体均证明有ET免疫活性物质存在,内毒素、缺氧、TNF等能促进ET合成,NO、PGI等则抑制ET的产生.有报道ET是强烈的致溃疡因子^[6],但ET在CAG,尤其是在Hp相关CAG中有何作用,尚有待进一步研究.李雅君 et al^[9]报道CAG患者GMBF减低,ET与GMBF呈负相关, $r = -0.625$, $P < 0.001$.另外Koath的动物实验发现ET引起胃黏膜损害是以毛细血管充血和GMBF减少为特征.本研究发现Hp根除组大鼠血浆ET含量 $(181.14 \pm 22.56) \times 10^{-3} \text{ng/ml}$ 明显低于模型自然恢复组 $(211.67 \pm 34.36) \times 10^{-3} \text{ng/ml}$, $P < 0.01$ 仍未恢复到正常水平 $(135.42 \pm 27.46) \times 10^{-3} \text{ng/ml}$, $P < 0.01$.Hp阳性CAG患者血浆ET含量高于Hp阴性者,也高于Hp阳性CSG[分别为 $(91.18 \pm 34.19) \times 10^{-3} \text{ng/ml}$, $(68.37 \pm 14.24) \times 10^{-3} \text{ng/ml}$ $(68.90 \pm 13.47) \times 10^{-3} \text{ng/ml}$,均 $P < 0.01$],表明Hp相关CAG血浆ET明显增高,提示ET在Hp相关CAG中的作用机制可能与Hp感染损伤血管内皮及胃黏膜组织,致ET大量释放,从而引起血管收缩,GMBF减少,导致黏膜缺血缺氧有关.

NO是一种神经递质和信使分子,由NO合成酶(NOS)催化底物左旋精氨酸产生.NOS主要有两种异构体即原生型(CNOS)和诱生型NOS(iNOS).CNOS主要存在于神经元和血管内皮细胞内,合成NO的量极少,iNOS几乎分布于所有组织中,一般情况下不表达,在受到内毒素或各种细胞因子刺激后被激活,可生成大量NO.NO的作用因剂量、作用时间的不同而有很大差异.早期、小剂量NO可以抑制ET产生,增加GMBF,具有细胞保护作用^[10-14].如事先给予小剂量NO供体以提供外源性NO,可以减轻或预防许多实验性急性胃黏膜病变;抑制内源性NO生成将使病变加重,若同时应用NO的前体物质左旋精氨酸则可逆转这种作用^[15].当iNOS被激活释放大量NO时,此过量生成的NO一方面将发挥其自由基(或继发生成的高活性羟自由基)性质的细胞毒作用,直接损害胃黏膜血管内皮细胞,刺激NO更多释放,形成恶性循环.另一方面失去对ET的抑制,GMBF减少^[16].本研究结果显示Hp感染CAG的NO水平显著升高,且与ET呈正相关,Hp感染CAG大鼠根除Hp后NO水平显著降低,推测可能是Hp内毒素或Hp感染时IL-1、IL-8、TNF等细胞因子促使血管内皮细胞释放大量NO^[17,18].此外,研究表明NO的代谢产物NO₂⁻质

子化形成N₂O₃,N₂O₃一旦形成,可通过其芳香基重氮化,从而造成碱基误配,细胞突变^[19,20].另有研究表明高浓度NO或细胞长时间接触NO时,由于NO与细胞色素氧化酶结合后难以解离而使ATP生成减少,因此发生细胞凋亡,亦参与了Hp相关CAG的发病过程^[21-24].

4 参考文献

- 1 曾志荣,胡品津,陈昱湖,于丰彦,陈为,彭晓忠.幽门螺杆菌长期感染鼠腺胃模型的研究.中华医学杂志 1998;78:494-497
- 2 李兆申,全山丛,许国铭,王世祥.综合法制作大鼠萎缩性胃炎模型的实验研究.中华医学杂志 1992;72:81-83
- 3 范英昌,张斌,胡利明,徐东琴,高金亮.大鼠脾气虚型慢性萎缩性胃炎动物模型的实验研究-胃黏膜病理形态及超微结构改变的研究.天津医药杂志 1994;22:86-88
- 4 张沂,张玲霞,徐俊荣,曹广周,江梅,张宁霞,贾长河.热盐水致大鼠萎缩性胃炎动物模型建立.世界华人消化杂志 2002;10:571-575
- 5 袁红霞,杨曼.胃二号方对CAG模型大鼠胃肠道激素的作用.世界华人消化杂志 2000;8:1424-1426
- 6 姒建敏,吴加国,曹倩,项尊,姜玲玲,吕文,黄怀德.鼠慢性萎缩性胃炎模型的建立及致萎缩因素探讨.中华消化杂志 2001;21:75-79
- 7 姚金锋,姚希贤.慢性萎缩性胃炎与幽门螺杆菌感染的关系.世界华人消化杂志 2000;8:1042-1046
- 8 Konturek PC, Konturek SJ, Bobrzynski A, Kwieciën N, Obtulowicz W, Stachura J, Hahn EG, Rembierz K. *Helicobacter pylori* and impaired gastric secretory functions associated with duodenal ulcer and atrophic gastritis. *J Physiol Pharmacol* 1997;930:365-373
- 9 李雅君,张泰昌,朱美中,杨莉.老年慢性胃炎和溃疡病黏膜血流测定及其与内皮素的关系.中华消化杂志 1996;16:185
- 10 闫长栋,李平,祁友健.大鼠胃扩张致胃酸分泌中NO对胃黏膜血流量的影响.世界华人消化杂志 2000;8:1067-1069
- 11 曾锦章,张万岱,刘晓霞,张振书,张亚历,周殿元.蛋白酪氨酸激酶与一氧化氮合酶活性的变化在胃黏膜损伤修复中的作用和意义.世界华人消化杂志 2000;8:354-355
- 12 张辉,任锡玲,姚希贤.慢性胃病T细胞亚群、一氧化氮、氨基己糖含量与HP感染的研究.世界华人消化杂志 1999;7:127-129
- 13 严海密,李运科.慢性胃病中一氧化氮的研究进展.世界华人消化杂志 1999;7:355-356
- 14 余贤恩,罗绮凝.外源性一氧化氮对豚鼠酸化乙醇性胃黏膜损伤的保护作用.世界华人消化杂志 2000;8:224
- 15 张在兴,才文彦,祝学光.一氧化氮与急性胃黏膜病变.国外医学生理、病理科学与临床分册 1997;17:61-63
- 16 徐章,王子强,卞旭鹏,张兵,李毅,张洁琴.慢性胃炎消化性溃疡患者血ET₁,CGRP,NO的变化.世界华人消化杂志 1999;7:448-449
- 17 徐克强,张万岱,王继德,李子旭,周殿元,张亚历,黄文峰,姜泊,孙勇.幽门螺杆菌细胞毒素促进胃黏膜分泌白介素8作用.世界华人消化杂志 2002;10:907-911
- 18 黄海力,吴本俨. H.pylori感染与细胞因子.世界华人消化杂志 2002;10:86-89
- 19 沈靖,王润田,徐希平. NO,iNOS与胃癌关系的研究进展.世界华人消化杂志 2000;8:320-322
- 20 史树贵,邵淑琴.一氧化氮与细胞凋亡.国外医学生理、病理科学与临床分册 1997;17:267-270
- 21 焦鸿丽,杨和平,杨永宗.一氧化氮介导的细胞凋亡.国外医学生理、病理科学与临床分册 1997;17:134-136
- 22 晏楠,吕农华.幽门螺杆菌感染及其代谢产物一氧化氮对胃上皮细胞凋亡的影响.中华消化杂志 2000;20:45-49
- 23 胡品津,曾志荣,林汉良,陈昱湖,陈为,彭晓忠.幽门螺杆菌的根除与萎缩性胃炎形成和逆转的动物实验研究.中华消化杂志 2000;20:155-158
- 24 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;10:912-916

大蒜素对大鼠溃疡性结肠炎淋巴细胞凋亡及其调控蛋白的影响

徐细明,于皆平,何小飞,李军华,郑敏,於亮亮

徐细明,于皆平,李军华,於亮亮,武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
何小飞,咸宁医学院附属医院消化内科 湖北省咸宁市 437100
郑敏,咸宁医学院中心实验室 湖北省咸宁市 437100
徐细明,男,1976-08-06生,湖北省武汉市人,汉族,武汉大学人民医院消化内科
硕士研究生,主要从事溃疡性结肠炎的基础与临床研究。
湖北省教育厅基金资助课题, No.2002A04006
项目负责人:何小飞,437100,湖北省咸宁市,咸宁医学院附属医院消化内科。
doctorhe120@hotmail.com
电话:0715-8255334-2201
收稿日期:2002-10-09 接受日期:2002-10-22

Effects of allitridi on lymphocyte apoptosis and its regulatory gene expression in rat ulcerative colitis

Xi-Ming Xu, Jie-Ping Yu, Xiao-Fei He, Jun-Hua Li, Min Zheng, Liang-Liang Yu

Xi-Ming Xu, Jie-Ping Yu, Jun-Hua Li, Liang-Liang Yu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Xiao-Fei He, Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Xianning Medical College, Xianning 437100, Hubei Province, China
Min Zheng, The Center for Laboratory Medicine, Xianning Medical College, Xianning 437100, Hubei Province, China
Supported by the Educational Foundation of Hubei Province, No.2002A04006
Correspondence to: Dr. Xiao-Fei He, Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Xianning Medical College, Xianning 437100, Hubei Province, China. doctorhe120@hotmail.com
Received: 2002-10-09 Accepted: 2002-10-22

Abstract

AIM: To investigate the effects of Allitridi on lymphocyte apoptosis and its regulatory gene expression in rat ulcerative colitis.

METHODS: Rat colitis model was induced by 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). The apoptotic cells were visualized by TUNEL. Bcl-2 and Bax protein expression in colon tissue was examined by immunohistochemistry. Biochemistry was used to detect the nitrogen monoxide (NO) activity in the mucosa. At the same time, the macroscopical and histological changes of the colon were evaluated.

RESULTS: In TNBS group, the content of nitrogen monoxide, the positive cell quantity of expression of Bcl-2 and the apoptotic cell quantity were higher than those in both normal group and TNBS+ALT group ($P < 0.01$), but Bax positive cell quantity was lower than that in normal group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: Allitridi has protective effects on ulcerative colitis of rat by promoting apoptosis of lymphocytes in lamina propria and cleaning NO free radical.

Xu XM, Yu JP, He XF, Li JH, Zheng M, Yu LL. Effects of allitridi on lymphocyte apoptosis and its regulatory gene expression in rat ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):565-568

摘要

目的:通过观察大鼠溃疡性结肠炎淋巴细胞凋亡及其调控蛋白Bcl-2和Bax的表达及大蒜素对其的影响,探讨大蒜素(Allitridi, Alt)对溃疡性结肠炎肠黏膜的保护作用及其机制。

方法:用三硝基苯磺酸(TNBS)建立大鼠溃疡性结肠炎模型。将动物随机分为空白对照组(Normal group)、三硝基苯磺酸组(TNBS group)、三硝基苯磺酸+生理盐水组(TNBS+NS group)、三硝基苯磺酸+大蒜素组(TNBS+ALT group)四组。利用DNA缺口末端标记技术(TUNEL法)和Bcl-2、Bax蛋白免疫组化染色,分别检测溃疡性结肠炎大鼠肠组织中的淋巴细胞凋亡和淋巴细胞Bcl-2和Bax的表达,生化检测一氧化氮(NO)含量,并观察肠道大体形态和组织学改变。

结果:和三硝基苯磺酸组相比,三硝基苯磺酸+大蒜素组中淋巴细胞凋亡增加(2.1 ± 1.0 vs 5.9 ± 2.0 , $P < 0.01$), Bcl-2表达阳性淋巴细胞减少及一氧化氮(NO)含量下降(10.0 ± 2.5 vs 31.0 ± 6.0 , 197 ± 11 vs 523 ± 40 , $P < 0.01$)。损伤指数明显下降(1.6 ± 0.5 vs 5.8 ± 0.7 , 2.1 ± 0.6 vs 6.1 ± 0.6 , $P < 0.01$)。

结论:大蒜素可以通过促进淋巴细胞凋亡和清除NO自由基而对TNBS诱导的溃疡性结肠炎肠黏膜有保护作用。

徐细明,于皆平,何小飞,李军华,郑敏,於亮亮. 大蒜素对大鼠溃疡性结肠炎淋巴细胞凋亡及其调控蛋白的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):565-568
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/565.htm>

0 引言

溃疡性结肠炎(UC)为肠道的慢性非特异性炎症性疾病,其发病与感染、遗传、免疫异常等相关^[1-8]。细胞凋亡参与了UC的发病^[9-14],其中,肠上皮细胞的凋亡加速和炎性细胞的凋亡减慢是UC炎症持续的主要因素。炎性细胞中淋巴细胞的凋亡减慢和UC的发生关系密切^[16-18]。大蒜素(Alt)具有抗炎、抗真菌、抗氧化、抗肿瘤等多种生物学活性。有可能对UC大鼠肠黏膜有一定的保护作用,我们观察大蒜素对大鼠UC肠组织中淋巴细胞凋亡及其调控蛋白的影响,探讨大蒜素对UC肠黏膜的保护作用及其可能的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级健康成年SD大鼠48只,雌雄各半,

质量 150-200 g, 由湖北省医学科学院实验动物中心提供。2、4、6-三硝基苯磺酸(TNBS)(Sigma);大蒜素, 湖北五三制药厂生产, Bcl-2和Bax单抗(即用型), 武汉博士德公司; 细胞凋亡检测试剂盒和SP试剂盒为北京中山公司产品; NO检测试剂盒为南京建成生物工程研究所产品。

1.2 方法 将48只动物随机分为空白对照组(Normal group)、三硝基苯磺酸组(TNBS group)、三硝基苯磺酸+生理盐水组(TNBS+NS group)、三硝基苯磺酸+大蒜素组(Alt group)4组。所有用药组大鼠术前禁食24 h, 自由饮水。造模时用乙醚麻醉大鼠后, 用一直径2.0 mm, 长约12 cm的硅胶管由肛门轻缓插入深约8 cm, 三硝基苯磺酸组以含150 mg/kg TNBS的500 mL/L乙醇溶液0.85 mL缓缓推入大鼠结肠, 诱导UC形成^[19]。三硝基苯磺酸+生理盐水组大鼠以及三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠在灌肠2 d开始每天分别以4 mL的生理盐水和30 mg/kg的大蒜素对其进行灌胃, 1次/d, 至3 wk后处死动物, 取肛门至盲肠段结肠(约8 cm), 沿肠系膜纵轴剪开, 冷生理盐水冲洗干净, 肉眼进行大体形态评分。肠组织一部分以40 g/L的多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 4 μ m连续切片, HE染色镜下评价炎症和溃疡, 另一部分-20 $^{\circ}$ C冻存, 用以NO检测(采用酶标法测定, 具体操作按照试剂盒说明书进行)。大体形态损伤评分指标包括粘连、局部充血、溃疡及炎症。粘连及充血按有无及轻重分别计0、1、2分, 出现炎症、溃疡数目增加1个、溃疡面积>2 cm时范围每增加1 cm计分均加1。组织学指标包括溃疡、炎症、肉芽肿、纤维化及病变深度, 按有无及轻重分别计0、1、2分, 病变深度达黏膜下层、肌层、浆膜层分别计1、2、3分, 各项相加得总分。

1.2.1 TUNEL染色 切片脱蜡入水 蛋白酶K(20 mg/L)消化15 min 新鲜配制10 mL/L H₂O₂/甲醇溶液封闭内源性过氧化物酶(POD)5 min 加TdT反应混合液含TdT酶和带地高辛的标记液, 37 $^{\circ}$ C湿盒孵育1 h PBS(pH=7.2)漂洗, 3 min \times 3次 加POD转换液37 $^{\circ}$ C 30 min PBS漂洗3 min \times 3次 二氨基联苯胺染色(DAB)显色 苏木素复染 光镜观察。上述步骤中不加TdT酶作为阴性对照, 并同时取另一张切片作HE染色以定位判断。光镜下正常淋巴细胞核呈蓝色, 凋亡细胞核为深浅不一的棕褐色(图1)。

1.2.2 肠组织淋巴细胞Bcl-2和Bax表达 采用免疫组织化学SP法, 取石蜡切片(4 μ m)常规二甲苯脱蜡, 下行梯度酒精水化, 置0.05 mol/L柠檬酸缓冲液中进行微波抗原修复, 凉至室温; 30 mL/L H₂O₂孵育10 min以消除内源性过氧化物酶活性, 滴加100 mL/L正常血清封闭非特异性抗原; 倾去血清, 滴加Bcl-2和Bax抗体(即用型), 4 $^{\circ}$ C放置过夜, PBS冲洗3 \times 5 min, 滴加生物素化二抗, 37 $^{\circ}$ C孵育10 min, PBS冲洗3 \times 5 min; 滴加辣根过氧化物酶标记的卵白素工作液, 37 $^{\circ}$ C孵育

15 min; DAB显色, 苏木素复染, 中性树脂封片。阳性对照为已知的Bcl-2和Bax蛋白, 以PBS代替一抗作阴性对照。每张切片随机选取5个高倍视野, 计数1000个细胞, 计算阳性细胞百分比; 以16D目镜测微网(面积为0.1024 mm²)在400倍放大下计数阳性细胞数。

统计学处理 所有实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析处理, 以P<0.01为有统计学意义。

2 结果

各用药组大鼠在灌肠后24 h有腹泻, 黏液水便或血性腹泻现象出现。3 wk后, 三硝基苯磺酸组和三硝基苯磺酸+生理盐水组大鼠结肠肉眼观可见近端肠腔扩张, 结肠组织与周围粘连, 黏膜水肿、溃疡, 有少量点状和片状出血。光镜下, 可见溃疡和炎性渗出物, 炎症累及肠壁全层, 腺体排列不齐, 杯状细胞减少甚至消失。固有层有大量中性粒细胞浸润。可见数量不等的单核细胞和嗜酸性粒细胞, 也可见增生的纤维母细胞, 损伤指数比空白对照组和三硝基苯磺酸+大蒜素组显著增高(P<0.01, 表1)。三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠结肠肉眼观黏膜水肿较轻, 溃疡和炎性渗出物较少见, 光镜下结肠结构基本正常, 黏膜上皮为单层柱状上皮, 由杯状细胞组成, 固有层中腺体呈管状, 可见少量淋巴细胞和中性粒细胞, 黏膜肌层、黏膜下层结构清晰, 损伤指数显著降低, 对照组无腹泻, 黏膜光滑、腺体排列整齐、结构清晰。

2.1 一氧化氮含量 在三硝基苯磺酸组大鼠肠组织中, 一氧化氮含量较空白对照组显著增高(P<0.01)。而三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠肠组织中, 一氧化氮含量较三硝基苯磺酸组明显下降(P<0.01, 表1)。三硝基苯磺酸组与三硝基苯磺酸+生理盐水组相比, 大鼠肠组织中一氧化氮含量无明显改变。

2.2 Bcl-2和Bax表达 阳性细胞表现为胞质呈棕褐色(图1, 2)。正常大鼠肠黏膜固有层中Bcl-2表达阳性淋巴细胞较少(9.8 \pm 1.4%), 在三硝基苯磺酸组大鼠肠黏膜固有层中, Bcl-2表达阳性淋巴细胞数(31.0 \pm 6.0%)明显增加(P<0.01)。而三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠肠黏膜固有层中, Bcl-2表达阳性淋巴细胞数(10.1 \pm 2.5%)较三硝基苯磺酸组大鼠明显减少(P<0.01)。空白对照组大鼠肠黏膜固有层中较多见Bax表达阳性淋巴细胞(30.1 \pm 9.7%)。三硝基苯磺酸组大鼠肠黏膜固有层中则较少见(P<0.01)。和三硝基苯磺酸组相比, 三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠肠黏膜固有层中, Bax表达阳性淋巴细胞数未见明显改变(表2)。

2.3 TUNEL表达 正常大肠组织仅可见表皮有阳性表达。三硝基苯磺酸组大鼠肠黏膜固有层中可见少量淋巴细胞和其他炎性细胞有阳性表达。在三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠肠黏膜固有层中, TUNEL染色阳性淋巴细胞数量较三硝基苯磺酸组大鼠明显增加(P<0.01, 表2, 图3, 4)。

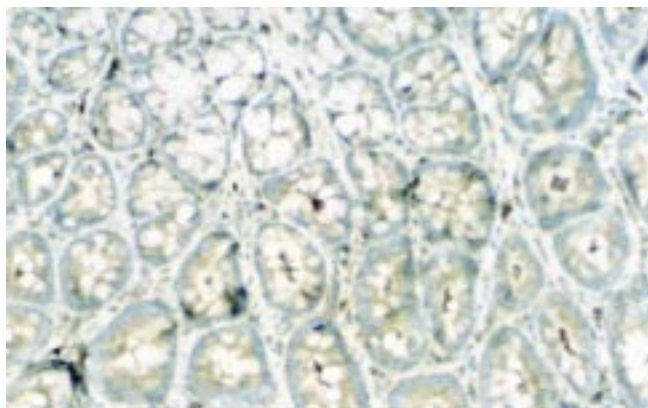


图1 淋巴细胞中 Bcl-2 的表达(TNBS+Alt 组,×200).

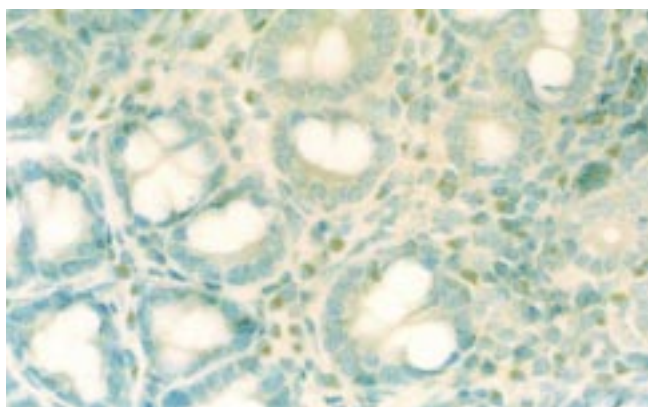


图2 淋巴细胞中 Bcl-2 的表达(TNBS 组,×400).

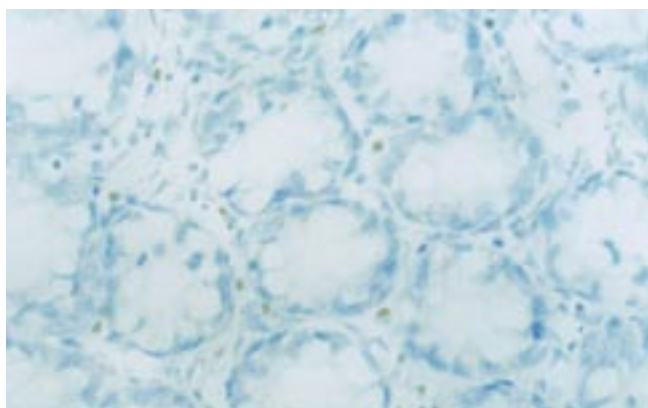


图3 淋巴细胞中 TUNEL 阳性表达(TNBS+Alt 组,×400).

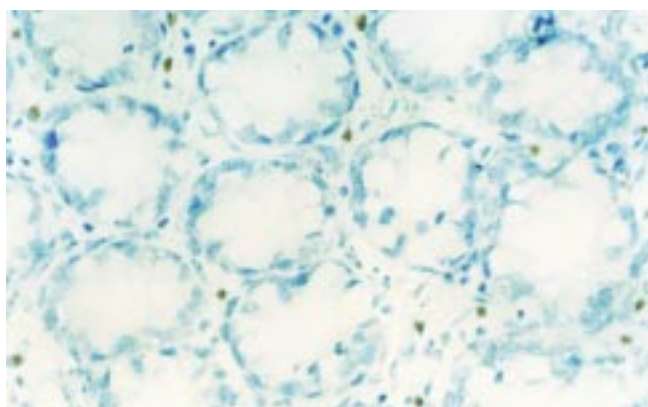


图4 淋巴细胞中 TUNEL 阳性表达(TNBS 组,×400).

表1 各组中组织损伤评分及肠组织中NO浓度($\mu\text{mol/g}$)改变的比较($\bar{x} \pm s$)

分组	大体形态	组织学	NO($\mu\text{mol/g}$)
Normal 组	1.4 \pm 0.5	1.6 \pm 0.7	189 \pm 18
TNBS 组	5.8 \pm 0.7 ^b	6.1 \pm 0.6 ^b	523 \pm 40 ^b
TNBS+NS 组	5.6 \pm 0.5 ^b	5.5 \pm 0.9 ^b	518 \pm 42 ^b
TNBS+Alt 组	1.6 \pm 0.5 ^{df}	2.1 \pm 0.6 ^{df}	197 \pm 11 ^{df}

^bP < 0.01, vs Normal ^dP < 0.01, vs TNBS ^fP < 0.01, vs TNBS+NS.

表2 各组中 Bcl-2、Bax、TUNEL 阳性细胞数比较($\bar{x} \pm s$)

	Bcl-2 阳性 细胞数 %	Bax 阳性 细胞数 %	TUNEL 阳性 细胞数 %
Normal 组	9.8 \pm 1.4	30.1 \pm 9.7	1.8 \pm 0.7
TNBS 组	31.0 \pm 6.0 ^b	9.9 \pm 4.8 ^b	5.9 \pm 2.0 ^b
TNBS+NS 组	32.4 \pm 7.7 ^b	9.6 \pm 4.6 ^b	6.4 \pm 1.3 ^b
TNBS+Alt 组	10.0 \pm 2.5 ^{df}	13.1 \pm 2.5	2.1 \pm 1.0 ^{df}

^bP < 0.01, vs Normal ^dP < 0.01, vs TNBS ^fP < 0.01, vs TNBS+NS.

3 讨论

细胞凋亡(Apoptosis)是细胞接受刺激信号后一种主动的,由凋亡相关基因控制的细胞程序性死亡方式.细胞凋亡与UC的关系近年来已经成为UC研究的又一热点^[15-18,20-22]. Bcl-2 蛋白是一个公认的细胞凋亡抑制基因, Bax 是 Bcl-2 的同源蛋白, Bcl-2/Bax 的比率可以调节细胞凋亡的速率^[18]. UC中肠道局部炎性损伤是其重要病理改变,大量炎性细胞浸润肠壁和持续活化是其重要特征.在UC中,淋巴细胞的凋亡与UC的发生、发展关系密切,肠黏膜固有层淋巴细胞的凋亡延迟是UC肠黏膜炎症持续和进展的主要原因之一^[11,15].淋巴细胞中 Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白的表达强弱可以调节淋巴细胞的凋亡,从而使UC肠黏膜炎症好转或加重. UC肠组织中淋巴细胞的凋亡延迟, Bcl-2 阳性细胞的表达增多, Bax 阳性细胞的表达则较少见^[10],本实验也证实了这一结果.而且本实验中 TNBS+Alt 组淋巴细胞的凋亡增多, Bcl-2 表达阳性淋巴细胞数减少, Bax 阳性细胞数未见明显改变.说明大蒜素可以通过减少 Bcl-2 蛋白的表达加快肠黏膜固有层淋巴细胞的凋亡,而对UC有预防和治疗作用.

NO 是一种广泛存在与机体的生物活性物质,参与机体的炎症反应. NO 是调节胃肠道血流、胃肠道分泌和胃肠道运动的一种重要化学物质.大量的资料证实, NO 在UC的发病中有重要作用^[23-31]. 一氧化氮对UC肠黏膜的作用是双重的,在UC早期, NO 通过增加靶细胞内 5-环磷酸鸟苷(5-cGMP)浓度及抑制 P-选择素基因表达,维持微循环的完整性,抑制血小板、白细胞在内皮细胞表面的黏附,积聚,防止血栓形成和内皮细胞与中性粒细胞、单核细胞的相互作用,而对肠黏膜起保护作用.另一方面,在UC中晚期,随着

NO产生增多和积聚,他很容易在O⁻存在时转变为氧化亚硝酸,进一步分解为OH⁻和NO,通过自由基链式反应导致含巯基蛋白和脂质过氧化,从而促进肠黏膜的细胞损伤.另外,NO还可以调节多种细胞因子的表达,促进细胞凋亡的发生. UC病变黏膜中NO浓度的增加与炎症程度呈平行关系,说明NO参与UC的病理生理过程.本实验的研究结果也证实了这一点,和三硝基苯磺酸组大鼠相比,三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠肠组织中NO浓度明显下降,说明减少肠组织中NO的生成也是大蒜素对UC肠黏膜起保护作用的机制之一.

本实验通过在建立大鼠UC模型的同时用大蒜素灌胃进行保护,结果三硝基苯磺酸+大蒜素组大鼠肠黏膜的大体形态和组织学损伤评分指数明显低于单纯三硝基苯磺酸组,表明大蒜素对大鼠UC有防治作用.实验结果同时表明大蒜素治疗组大鼠肠组织中NO浓度下降,并且淋巴细胞的凋亡增加.提示大蒜素对大鼠UC的治疗作用可能与其清除NO自由基、诱导淋巴细胞凋亡有关.

4 参考文献

- 1 Wu HG, Lu HB, Zhao C, Shi Z, Liu HR, Chen HP. The mechanism of iNOS gene modulation on acupuncture and moxibustion treatment for ulcerative colitis in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):64
- 2 Xia B, Guo HJ, Crusius JBA, Deng CS, Meuwissen SGM, Pena AS. In vitro production of TNF α , IL-6 and sIL-2R in Chinese patients with ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 1998;4:252-255
- 3 Xu CT, Pan BR. Current medical therapy for ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 1999;5:64-72
- 4 Wu HG, Zhou LB, Pan YY, Huang C, Chen HP, Shi Z, Hua XG. Study of the mechanisms of acupuncture and moxibustion treatment for ulcerative colitis rats in view of the gene expression of cytokines. *World J Gastroenterol* 1999;5:515-517
- 5 Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:158-161
- 6 Geng X, Taniguchi M, Dai HH, Lin JJC, Lin J, Das KM. Autoimmunity in ulcerative colitis: humoral and cellular immune response by tropomyosin in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):9
- 7 Xu G, Tian KL, Liu GP, Zhong XJ, Tang SL, Sun YP. Clinical significance of plasma D-dimer and von Willebrand factor levels in patients with ulcer colitis. *World J Gastroenterol* 2002;8:575-576
- 8 Jiang XL, Quan QZ, Liu T, Dong XC. Recent advances in research of ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:216-218
- 9 Brannigan AE, O'Connell PR, Hurley H, O'Neill A, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RW. Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease. *Shock* 2000;13:361-366
- 10 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
- 11 Suzuki A, Sugimura K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Suzuki K, Ishizuka K, Mochizuki T, Honma T, Narisawa R, Asakura H. Fas/Fas ligand expression and characteristics of primed CD45RO⁺ T cells in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1278-1283
- 12 Iimura M, Nakamura T, Shinozaki S, Iizuka B, Inoue Y, Suzuki S, Hayashi N. Bax is downregulated in inflamed colonic mucosa of ulcerative colitis. *Gut* 2000;47:228-235
- 13 Mallolas J, Esteve M, Rius E, Cabre E, Gassull MA. Antineutrophil antibodies associated with ulcerative colitis interact with the antigen(s) during the process of apoptosis. *Gut* 2000;47:74-78
- 14 Jiang XL, Quan QZ, Cheng GR, Sun ZQ, Wang YJ, Wang YP. Expression of apoptosis on biopsy tissue in patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:107-108
- 15 Yeung MM, Melgar S, Baranov V, Oberg A, Danielsson A, Hammarstrom S, Hammarstrom ML. Characterisation of mucosal lymphoid aggregates in ulcerative colitis: immune cell phenotype and TcR-gammadelta expression. *Gut* 2000;47:215-227
- 16 Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann 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
- 17 Jiang XL, Quan QZ, Sun ZQ, Wang YJ, Qi F, Wang D, Zhang XL. Expression of lymphocyte apoptosis in patients with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:903-904
- 18 Ueyama H, Kiyohara T, Sawada N, Isozaki K, Kitamura S, Kondo S, Miyagawa J, Kanayama S, Shinomura Y, Ishikawa H, Ohtani T, Nezu R, Nagata S, Matsuzawa Y. High Fas ligand expression on lymphocytes in lesions of ulcerative colitis. *Gut* 1998;43:48-55
- 19 Zheng L, Gao ZQ, Wang SX. A chronic ulcerative colitis model in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:150-152
- 20 Hagiwara C, Tanaka M, Kudo H. Increase in colorectal epithelial apoptotic cells in patients with ulcerative colitis ultimately requiring surgery. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:758-764
- 21 Yukawa M, Iizuka M, Horie Y, Yoneyama K, Shirasaka T, Itou H, Komatsu M, Fukushima T, Watanabe S. Systemic and local evidence of increased Fas-mediated apoptosis in ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:70-76
- 22 Bregenholt S, Petersen TR, Claesson MH. The majority of lamina propria CD4(+) T-cells from scid mice with colitis undergo Fas-mediated apoptosis in vivo. *Immunol Lett* 2001;78:7-12
- 23 Wen B, Ma GF. Determination of plasma nitric oxide, molitin and their significances in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol* 1998;4(Suppl 2):69
- 24 Ariake K, Ohkusa T, Sakurazawa T, Kumagai J, Eishi Y, Hoshi S, Yajima T. Roles of mucosal bacteria and succinic acid in colitis caused by dextran sulfate sodium in mice. *J Med Dent Sci* 2000;47:233-241
- 25 Koek GH, Verleden GM, Evenepoel P, Rutgeerts P. Activity related increase of exhaled nitric oxide in Crohn's disease and ulcerative colitis: a manifestation of systemic involvement? *Respir Med* 2002;96:530-535
- 26 Yamaguchi O, Sugimura K, Ishizuka K, Suzuki K, Hasegawa K, Ohtsuka K, Honma T, Asakura H. Correlation between serum phospholipase A(2) IIA levels and histological activity in patients with ulcerative colitis. *Int J Colorectal Dis* 2002;17:311-316
- 27 Chen W, Li D, Wilson I, Chadwick VS. Detection of Chlamydia pneumoniae by polymerase chain reaction-enzyme immunoassay in intestinal mucosal biopsies from patients with inflammatory bowel disease and controls. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:987-993
- 28 Gan H, Ouyang Q, Jia D, Xia Q. Activation of nuclear factor-kappaB and its relationship with cytokine gene expression in colonic mucosa of ulcerative colitis patients. *Zhonghua Nei Ke Zazhi* 2002;41:252-255
- 29 Sjoqvist U, Hertvig E, Nilsson A, Duan RD, Ost A, Tribukait B, Lofberg R. Chronic colitis is associated with a reduction of mucosal alkaline sphingomyelinase activity. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:258-263
- 30 Selby WS, Griffin S, Abraham N, Solomon MJ. Appendectomy protects against the development of ulcerative colitis but does not affect its course. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2834-2838
- 31 Koek GH, Verleden GM, Evenepoel P, Rutgeerts P. Activity related increase of exhaled nitric oxide in Crohn's disease and ulcerative colitis: a manifestation of systemic involvement? *Respir Med* 2002;96:530-535

泻剂结肠大鼠结肠中的 mu、kappa 阿片受体变化

刘宝华,莫平,张胜本

刘宝华,莫平,张胜本,中国人民解放军第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所普通外科 重庆市 400042

刘宝华,男,山东省单县人,汉族. 1983年第三军医大学本科毕业,1995年第三军医大学博士研究生毕业,教授、主任医师,博士研究生导师,科主任. 主要从事肛肠疾病的研究.

项目负责人:刘宝华,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附属大坪医院野战外科研究所普通外科. lbh57268@163.com
电话:023-68757268

收稿日期:2002-04-01 接受日期:2002-06-14

Changes of mu and kappa opioid receptors in cathartic colon of rats

Bao-Hua Liu, Ping Mo, Sheng-Ben Zhang

Bao-Hua Liu, Ping Mo, Sheng-Ben Zhang, Department of General Surgery, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China.

Correspondence to: Dr Bao-Hua Liu, Department of General Surgery, Daping Hospital, Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical University, 10 Daping Changjiang Zilu, Chongqing 400042, China. lbh57268@163.com

Received:2002-04-01 Accepted:2002-06-14

Abstract

AIM:To study the changes of mu and kappa opioid receptors in cathartic colon of rats.

METHODS:An experimental rat model of cathartic colon was reconstructed by contact laxatives mixed with the feed. The activity of mu, kappa opioid receptors in cathartic colon of rats was determined.

RESULTS:The maximal binding capacity (Bmax) and affinity (Kd) of mu opioid receptor in cathartic colon of rats were significantly increased as compared with the control group (207.00 ± 22.9 vs 82.00 ± 14.23 fmol/mg-p, $P < 0.01$; 3.30 ± 0.45 vs 2.40 ± 0.57 mmol/L, $P < 0.05$). As compared with the control group, the maximal binding capacity of kappa opioid receptor was significantly increased (957.00 ± 102.41 vs 459.00 ± 52.41 fmol/mg-p, $P < 0.01$), and no remarkable change of affinity was found in cathartic colon of rats.

CONCLUSION:The data indicates that mu and kappa opioid receptors may be involved in the disorder of cathartic colon, but the mu opioid receptor may be more important.

Liu BH, Mo P, Zhang SB. Changes of mu and kappa opioid receptors in cathartic colon of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):569-570

摘要

目的:探讨 mu、kappa 阿片受体在泻剂结肠大鼠结肠中的变化.

方法:以泻剂复制大鼠泻剂结肠模型,观察泻剂结肠的 mu、kappa 阿片受体活性.

结果:泻剂结肠的 mu 阿片受体的最大结合数和解离常数明显高于对照组(207.00 ± 22.9 vs 82.00 ± 4.23 fmol/mg.p, $P < 0.01$; 3.30 ± 0.45 vs 2.40 ± 0.57 mmol/L, $P < 0.05$). 与对照组相比,泻剂结肠的 kappa 阿片受体最大结合数明显增高(957.00 ± 102.41 vs 459.00 ± 52.41 fmol/mg.p, $P < 0.01$),解离常数无明显的差异.

结论:mu, kappa 阿片受体可能参与了泻剂结肠的功能紊乱, mu 阿片受体较重要.

刘宝华,莫平,张胜本. 泻剂结肠大鼠结肠中的 mu、kappa 阿片受体变化. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):569-570

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/569.htm>

0 引言

慢传输性便秘(slow transit constipation, STC)是一类以结肠传输减慢为特点的顽固性便秘,病因不明^[1]. 以往发现长期接触性泻剂,并导致结肠形态学发生明显的改变^[2],结肠肌间神经丛有明显的病理学改变^[3];复制出的泻剂结肠的病理改变与慢传输便秘结肠壁相似. 我们采用泻剂结肠模型,探讨 mu、kappa 阿片受体在大鼠泻剂结肠的变化,以便明确内源性阿片肽在慢传输便秘发生中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 大黄粉由重庆市中药厂提供.埃托啡(etoprihine)、mu 阿片受体拮抗剂 DHE、激动剂 Damgo; kappa 阿片受体拮抗剂 Norbni、激动剂 U50488H 购自美国 Sigma 公司. mu 阿片受体拮抗剂 ³H-DHE、kappa 阿片受体拮抗剂 ³H-Norbni 由中国北京原子能研究所标记. Wistar 大鼠 20 只,雌雄各半,体质量 230 ± 70 g. 分为对照组和泻剂结肠组,泻剂结肠组为服用接触性泻剂大黄组. 对照组和“泻剂结肠”组各 10 只,雌雄各半,分组后各组间体质量无显著性差异.

1.2 方法^[3,4] 各组的雌雄大鼠分笼饲养,饲养环境温度 18-28℃,相对湿度 40-80%. 对照组饲以普通软饲料. 泻剂结肠组添加大黄粉,起始剂量每日 200 mg/Kg,递增至每日 1 000 mg/Kg 时约半数动物出现稀便. 维持此剂量直到稀便消失,再按每日 200 mg/Kg 递增,如此保持半数动物有下泻作用饲养 3 mo. 大黄的终剂量为每日 2 400 mg/Kg. 动物饲养 3 mo 后约 40% 出现脱肛、血便. 动物停药 5 d,禁食 24 h,自由饮水. 分为正常对照组和泻剂结肠组,每组 6 只动物. 大鼠击头处死,

取距回盲部5 cm的结肠, 放于冰冷的0.05 mol/L的Tris缓冲溶液中, 用Tris缓冲溶液冲洗掉肠内容物, 然后将肠管套在一玻璃棒上, 用湿棉球沿肠管纵轴擦破浆膜, 用湿棉球轻轻向两侧剥离, 将分离得到的肠肌条, 用滤纸吸干、称重, 加10倍量冰冷的0.05 mol/L Tris缓冲溶液匀浆, 4℃, 1 000 g离心10 min, 取上清液以20 000 g离心20 min, 0.05 mol/L Tris缓冲液冲洗一遍后, 第2次离心, 取第2次离心的沉淀悬于0.05 mol/L Tris缓冲液中, 用双缩脲法测定蛋白的含量, 再以该缓冲液稀释至5 g/L, -20℃储存备用. 每管含肌蛋白5 mg, 于肌蛋白中加入不同浓度的放射性配体, 放射性配体用0.01 mol/L HCl配制, μ 阿片受体加 ^3H -DHE (比放1 739 TBq/mol), κ 阿片受体加 ^3H -NORBNI (比放888 TBq/mol), 浓度均为0.5-13 nmol/L. 并于非特异管中加入埃托啡1 mmol(etoprihine), 各管以缓冲液补足至总体积500 μl , 摇匀、温浴30 min, 立即置于冰浴中终止反应. 用49号玻璃纤维滤膜真空抽滤, 用冷缓冲液冲洗3次, 滤膜自然干后置于二甲苯闪烁液(5 g/L PPO, 3 g/L POPOP, 二甲苯)中, 测定放射性计数. 统计学处理根据Scatchard作图, 利用直线回归方程, 求出每克肌匀浆受体的最大结合数(Bmax)和反映受体的亲和力的解离常数(Kd).

统计学处理 所有的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用Student's t检验统计分析.

2 结果

2.1 泻剂结肠大鼠结肠 μ 阿片受体的变化 根据Scatchard作图, 正常大鼠结肠 μ 阿片受体的最大结合数(Bmax)为 82.00 ± 14.23 fmol/mg.p, 解离常数(Kd)为 2.40 ± 0.57 nmol/L. 泻剂结肠的 μ 阿片受体的Bmax为 207.00 ± 22.9 fmol/mg.p, Kd值为 3.30 ± 0.45 nmol/L(图1). 与对照组相比, 泻剂结肠组大鼠结肠 μ 阿片受体的最大结合数增加2.5倍, 亲和力增加1.4倍, 二者均明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$).

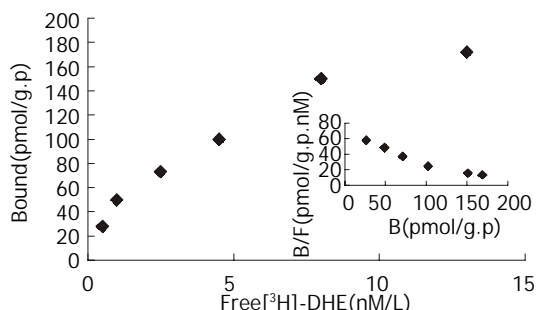


图1 “泻剂结肠”大鼠结肠阿片受体与 ^3H -DHE特异结合的饱和曲线和Scatchard作图 Kd=3.30nM/L, Bmax=207.00pmol/g.p

2.2 泻剂结肠大鼠结肠 κ 阿片受体的变化 根据Scatchard作图, 正常大鼠结肠 κ 阿片受体的Bmax为 459.00 ± 52.41 pmol/g.p, Kd值为 3.10 ± 0.12 nmol/L. 泻剂结肠的 κ 阿片受体的Bmax为 957.00 ± 102.53 pmol/g.p, Kd值为 2.70 ± 0.54 nmol/L(图2). 泻剂结肠组大鼠结肠

κ 阿片受体的最大结合数比对照组增加2.0倍, 差异非常显著($P < 0.01$); 与对照组相比, κ 阿片受体的亲和力无明显的变化.

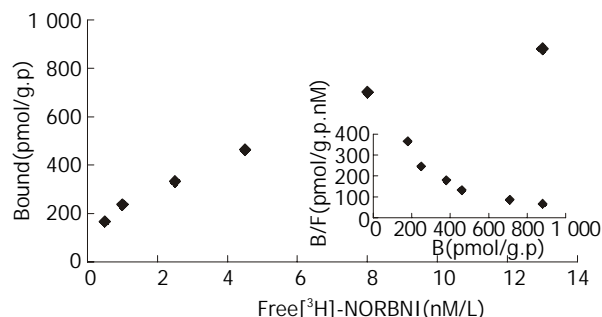


图2 “泻剂结肠”大鼠结肠阿片受体与 ^3H -NORBNI特异结合的饱和曲线和Scatchard作图 Kd=2.70nM/L, Bmax=957.00pmol/g.p.

3 讨论

机体内源性阿片物质, 如脑肠肽、 β -内啡肽和强啡肽等, 主要分布在肠系膜神经丛、肠肌层神经纤维及肠黏膜内分泌细胞. 此外大量分布在中枢神经系统中. 目前研究表明, 阿片肽对胃肠动力的影响主要通过 μ , κ , δ 受体发挥作用. 目前研究的证据有: 胃肠道含有 μ , κ , δ 受体; 内源性阿片肽能抑制电场刺激引起的结肠肌条的收缩; 外周注射阿片肽受体激动剂抑制胃肠推动性, 降低结肠蠕动的频率; Su et al^[6]报道阿片肽受体激动剂能使支配结肠的盆神经传入纤维对热和机械性刺激的敏感性降低. 阿片肽可能介导参与了抑制性非肾上腺能非胆碱能神经纤维递质的释放调控.

本结果表明, 与正常组相比, 泻剂结肠大鼠结肠的 μ , κ 阿片受体最大结合数分别增加了2.5和2.0倍; μ 阿片受体的亲和力也增加了1.4倍. 说明内源性阿片肽与 μ , κ 阿片受体结合的位点增多, μ 亲和力增强. 结果导致内源性阿片肽对胆碱能神经、非肾上腺能非胆碱能神经产生抑制, 抑制结肠的神经肌肉的传动推动性蠕动减弱, 引起便秘. 阿片肽活性的变化是慢传输便秘的发病的一个重要因素, Kreek等用 μ 阿片受体拮抗剂纳洛酮治疗2例慢传输性便秘获得成功. 本结果也说明用阿片受体拮抗剂是治疗慢传输性便秘的新途径. 进一步研究阿片受体的亚型、结合位点和全面的临床研究, 有可能突破慢传输便秘的难治性, 也可能较全面的阐明慢传输便秘的发病机制.

4 参考文献

- 1 刘宝华主编. 便秘的诊断及治疗. 北京: 军事医学科学院出版社, 2002:165-181
- 2 Joo JS, Ehrenpreis ED, Gonzalez L, Kaye M, Breno S, Wexner SD, Zaitman D, Secrest K. Alterations in colonic anatomy induced by chronic stimulant laxatives: the cathartic colon revisited. *J Clin Gastroenterol* 1998;26:283-286
- 3 高峰, 李发智, 李文惠, 张胜本, 张连阳, 童卫东, 黄显凯. 慢传输型便秘结肠肌间神经丛形态学改变及其临床意义. *大肠肛门病外科杂志* 1998;4:4-6
- 4 Liu BH, Chen HS, Zhou JH, Xiao N. Effects of endotoxin on endothelin receptor in hepatic and intestinal tissues after endotoxemia in rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:298-300
- 5 Su X, Julia V, Gebhart GF. Effects of intracolonic opioid receptor agonists on polymodal pelvic nerve afferent fibers in the rat. *J Neurophysiol* 2000;83:963-970

香砂平胃散对小鼠胃排空的影响

王学清,王秀杰,李 岩

王学清,李岩,中国医科大学附属二院消化内科 辽宁省沈阳市 110004
王秀杰,沈阳市第五医院内科 辽宁省沈阳市 110023
项目负责人:王学清,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消化内科.
收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-18

Effect of Xiangsha Pingweisan on gastric emptying motility in mice

Xue-Qing Wang, Xiu-Jie Wang, Yan Li

Xue-Qing Wang, Yan Li, Department of Digestive Diseases, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Xiu-Jie Wang, Department of Digestive Diseases, Fifth Hospital of Shenyang City, Shenyang 110023, Liaoning Province, China
Correspondence to: Xue-Qing Wang, Department of Digestive Diseases, Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China.
Received: 2002-10-07 Accepted: 2002-10-18

Abstract

AIM: To evaluate the effects of Chinese herbs Xiangsha Pingweisan (XSPWS) decoction and its component on gastric emptying in healthy mice.

METHODS: Mice were randomly divided into control group, cisapride group and XSPWS group. The effects of XSPWS on gastric emptying were investigated in vivo by measuring gastric remainder rates of Blue Dextran (BD) 2000. Additionally, the effect of each component herb in XSPWS recipe was evaluated in the same way according to orthogonal design.

RESULTS: Compared with control group [(100.0 ± 24.2) %], the rates of gastric remainder in XSPWS group [(39.5 ± 18.3) %] and cisapride group [(36.9 ± 16.4) %] were all significantly decreased ($P < 0.05$). There were no significant difference between XSPWS group and cisapride group ($P > 0.05$). Except radix glycyrrhizae preparta group, the gastric emptying rates of other component herbal groups were significantly higher than that of control group ($P < 0.01$). Based on the analysis of orthogonal design, there were wide-ranging first-grade mutual roles within the six component herbs.

CONCLUSION: XSPWS and its some component herbs can accelerate the gastric emptying in mice in vivo significantly. There are wide-ranging first-grade mutual roles within the six component herbs.

Wang XQ, Wang XJ, Li Y. Effect of Xiangsha Pingweisan on gastric emptying motility in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):571-574

摘要

目的: 研究香砂平胃散及其组成药物对胃排空功能的影响。

方法: 以葡聚糖蓝(BD)2 000 为标记物, 观察小鼠的胃内色素残留量。

结果: 香砂平胃散组[(39.5 ± 18.3) %]及西沙必利组[(36.97 ± 16.4) %]的胃残留率与对照组[(100.0 ± 24.2) %]比较差异有显著性($P < 0.05$), 两组之间无显著性差异($P > 0.05$)。正交分析表明苍术、陈皮、木香、砂仁有促进胃排空作用, 各味药物之间存在广泛的协同作用。厚朴、木香和砂仁的促胃排空作用与香砂平胃散无显著性差异($P > 0.05$)。

结论: 香砂平胃散及其部分组成药物有促胃排空作用, 苍术、木香、砂仁、陈皮起主要作用, 各组成药物之间存在着广泛的一级交互作用。

王学清,王秀杰,李岩. 香砂平胃散对小鼠胃排空的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):571-574

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/571.htm>

0 引言

胃动力障碍等因素在功能性消化不良中起重要作用^[1-12]。在我国传统医学中, 许多中药通过调理脾胃等作用, 在治疗功能性消化不良方面取得了很好的疗效^[13-24]。香砂平胃散是由平胃散加木香、砂仁而成, 临床上常用于治疗慢性胃炎、慢性肠炎等。但就香砂平胃散对胃排空的影响的系统研究尚未见报道。我们以葡聚糖蓝(BD) 2 000 为标记物, 以胃内色素残留量为实验指标, 采用正交设计方法, 研究香砂平胃散及其组成药物对胃排空功能的影响, 探讨各药在该方剂中的作用大小及其交互作用。

1 材料和方法

1.1 材料 昆明小鼠, 5 周龄, 18-22 g, 360 只。选用苍术(河北)12 g, 厚朴(四川)9 g, 木香(云南)9 g, 陈皮(四川)9 g, 砂仁(广东)6 g, 甘草(内蒙古)6 g(购于沈阳市药材采购供应站), 将其混合即香砂平胃散组方。制成浓度为 360 g/L 的煎剂(各单味药浓度分别为 120 g/L, 90 g/L, 90 g/L, 90 g/L, 60 g/L, 60 g/L)。葡聚糖蓝 2 000 (Blue Dextran 2 000, BD 2 000)(瑞典 Pharmacia 公司生产), 以蒸馏水配成 20 g/L BD 2 000 溶液。西沙必利片剂[西安杨森制药有限公司生产, 批号(96)卫药准字 -J-16(1)号], 以蒸馏水配置为 0.15 g/L 的溶液。751G 型紫外分光光度计(上海分析仪器厂生产)。

1.2 方法 将小鼠随机分为正常对照组、西沙必利组、

香砂平胃散组，每组20只，各组每日分别给予蒸馏水、西沙必利溶液、香砂平胃散煎剂0.4 mL灌胃(按公斤体重剂量折算系数换算用药量^[25])，共喂养2 wk，第14天禁食1 d，不禁水、药。第15天禁水2 h后，用20 g/L BD2 000溶液0.4 mL灌胃，各组分别于灌胃后20 min处死，剖腹取全胃切开，置于装有蒸馏水2 mL四氯化碳1.5 mL，无水乙醇0.5 mL的试管中震荡，使胃内残留色素充分溶解在混合溶液中，以3 000 r/min离心30 min，取其上清用紫外分光光度计于波长620 nm处测定其胃内色素残留量。以正常对照组的胃内色素残留量为基准值(100%)，计算胃残留率:胃残留率 = 残留值 / 基准值 × 100%。

按正交设计表L₁₆(2¹⁵)的各实验组安排，将小鼠分16次进行实验，每组10只，用药量及喂养同前，于第15天进行以同法测量胃残留量。每味药为1个因子，共6个因子，均取“不给药”和“给全药量”两个水平，随机确定各药的代号，但水平号未随机化(表1)。采用主效应不与交互作用混杂的正交表L₁₆(2¹⁵)设计，即进行16组实验，2个水平，15个因子(6个主效应列，7个两两混杂交互作用列，2个空白列)。A与B交互作用表示

为A*B，C与D交互作用表示为C*D，见表2。根据正交表中主效应列的水平配成16种不同组合的配方。如1组6个主效应列均为1水平，配成不含药物的溶剂；16组6个主效应列均为2水平，配成含6种药物的全方剂。不管各组用药的成分有何不同，某一成分的用量固定不变，而投药的容量也固定不变。为了证实上述正交设计分析方法获得结果的可靠性，将小鼠随机分为对照组、香砂平胃散组、苍术组、厚朴组、陈皮组、甘草组、木香组、砂仁组，每组20只，分别用香砂平胃散及单味药进行实验，所用剂量仍为各药在复方药中的含量，给药容量仍为0.4 mL。

统计学处理 各组实验数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，正交实验采用直观分析和方差分析法，其余实验数据分析用两样本均数t检验。

表1 因子、代号及水平

水平	A 苍术	B 厚朴	C 陈皮	D 甘草	E 木香	F 砂仁
1	0	0	0	0	0	0
2	12 g	9 g	9 g	6 g	9 g	6 g

表2 正交设计和效应计算表

实验号	列号															胃残留量
	1 A	2 B	3 A*B D*E	4 C	5 A*C D*F	6 B*C E*F	7	8 D	9 A*D B*E C*F	10 B*D A*E	11 E	12 C*D A*F	13 F	14	15 B*F C*E	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.37
2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	0.18
3	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	0.21
4	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0.19
5	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	0.24
6	1	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	0.38
7	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	0.096
8	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	0.34
9	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	0.16
10	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	0.17
11	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	0.22
12	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	0.076
13	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	0.13
14	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	0.20
15	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	2	0.18
16	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1	0.13
I	2.01	1.59	1.61	1.84	1.78	1.64	1.61	1.62	1.50	2.02	1.88	1.64	1.92	1.67	1.70	
	1.28	1.70	1.68	1.45	1.51	1.67	1.68	1.67	1.79	1.27	1.42	1.65	1.37	1.62	1.59	
8R	-0.73	0.12	0.07	-0.39	-0.27	0.02	0.06	0.07	0.28	-0.75	-0.46	0.01	-0.55	-0.05	-0.11	

2 结果

2.1 香砂平胃散对小鼠的胃排空的影响 香砂平胃散组[(39.5 ± 18.3) %]及西沙必利组[(36.9 ± 16.4) %]的胃残留率显著低于正常对照组[(100.0 ± 24.2) %]($P < 0.05$), 两组之间无显著性差异($P > 0.05$).

表3 香砂平胃散对胃排空作用方差分析表

列号	因子	SS	MS	F	
10	B*D,A*E	0.03 500	1	0.03 500	257.9 ^a
1	A	0.03 332	1	0.03 332	245.5 ^a
13	F	0.01 859	1	0.01 859	137.0 ^a
11	E	0.01 316	1	0.01 316	97.00 ^a
4	C	0.009 726	1	0.009 726	71.69 ^a
9	A*D,B*E,C*F	0.005 073	1	0.005 073	37.39 ^a
5	A*C,D*F	0.004 634	1	0.004 634	34.15 ^a
2	B	0.000 851	1	0.000 851	6.27
15	C*E,B*F	0.000 828	1	0.000 828	6.10
3	A*B,D*C	0.000 325	1	0.00 325	2.39
7	空列	0.000 249	5	0.000 136	
8	D	0.000 212			
14	空列	0.000 183			
6	B*C,E*F	2.84*10 ⁻⁵			
12	C*D,A*F	5.88*10 ⁻⁶			

^a $P < 0.01$ $F_{0.05}(1,5)=6.61$, $F_{0.01}(1,5)=16.3$

2.2 各味药物对小鼠胃排空功能的影响 各组测定的胃残留量列于表2右侧纵列. 表2下栏为计算出的I, 和8R值. I和 分别表示1水平下和2水平下实验数据之和. R为极差, 其值表示各因子效应的大小. 如本实验 $R = (I_1 - I_2) / 8$, 用8R表示给药与不给药的效应差别. 负值大, 表示给药使胃排空增加的效应大, 正值大则相反. 从表2下栏可见, 各单味药增加胃排空效应的大小为: 苍术>砂仁>木香>陈皮, 厚朴和甘草则作用相反. 正交表交互作用有7列, 其中6列分别有2个交互作用, 1列有3个交互作用. 其中第5、9、10列交互作用较大, 分别为-0.27, 0.28和-0.75. 其他列的交互作用与第5, 9, 10列相差较大, 认为其交互作用较小, 进一步作方差分析. 在正交表中安排两个空列, 其离差平方和为0.000 249和0.000 183, 将离差平方和小于空白列的另3列与空白列一起合并为误差估计, 用来计算各因子的F比值(表3). 按F比值查表判断其显著性, 结果可见, 苍术、陈皮、木香、砂仁对胃排空有促进作用, 厚朴、甘草作用不明显. 交互作用列中, 第5、9、10列作用显著, 同直观分析一致, 但第9列的交互作用为负效应.

2.3 各单味药对小鼠胃排空功能的影响 除甘草组外, 其余各组的胃残留率均明显低于对照组($P < 0.01$). 厚朴组、木香组和砂仁组的胃残留率与香砂平胃散组比较无显著差异($P > 0.05$)(表4).

表4 各单味药对小鼠胃排空作用的影响

组别	胃残留率(%)
对照组	100.0 ± 20.3
香砂平胃散组	35.0 ± 21.5 ^b
苍术组	75.8 ± 23.0 ^{ab}
厚朴组	41.8 ± 16.7 ^b
陈皮组	64.1 ± 27.2 ^{ab}
甘草组	102.3 ± 23.7 ^a
木香组	42.6 ± 20.3 ^b
砂仁组	31.0 ± 28.3 ^b

^a $P < 0.05$, vs 香砂平胃散组; ^b $P < 0.01$, vs 对照组.

3 讨论

香砂平胃散是由平胃散加木香、砂仁而成, 临床上常用于治疗各种胃肠道疾患. 平胃散是《太平惠民和剂局方》中一传统方剂, 它具有燥湿健脾, 行气和胃导滞的功效. 方中苍术苦温辛燥除湿健脾, 厚朴燥湿顺气降逆, 陈皮辛香行气, 甘草甘缓和中, 木香辛苦温, 和胃健脾, 芳香化湿, 砂仁化湿健脾理气. 对单味中药的研究表明, 木香能促进内源性胃动素的释放, 升高血中胃动素而加速胃排空^[26], 并可使整体动物胃肠血管舒张, 改善胃肠血液供应, 有助于协调胃肠运动^[27]; 使离体胃底纵行肌张力升高, 对胃头区呈兴奋效应, 而对胃尾区呈抑制效应, 有利于胃排空^[28]. 砂仁有明显的促胃排空作用, 且与西沙必利具有一定的可比性^[26]. 陈皮芳香健脾, 其所含的挥发油有利于胃肠积气的排泄, 同时其含的橙皮甙能调节胃肠功能. 苍术增加大鼠胃黏膜血流量及血清促胃液素含量, 促进胃排空^[29]. 但是也有研究发现陈皮、砂仁对离体胃各部位平滑肌均呈抑制效应^[27,30]. 就香砂平胃散对胃排空的作用及方中各组成药味之间交互作用的研究尚未见报道, 该方各味药在方剂中的主次及配伍规律尚不清楚.

本实验以大分子色素葡聚糖蓝(BD) 2 000为标记物, 以胃内色素残留量为实验指标, 观察了香砂平胃散对小鼠胃排空功能的影响, 结果提示该方有明显的促进胃排空作用, 其作用与西沙必利具有可比性. 正交分析表明, 在该方剂中, 对于促进胃排空, 6味药物的作用有主有次, 强弱不等. 苍术、木香、砂仁、陈皮对促进胃排空起主要作用, 厚朴、甘草次之. 各单味药之间存在较广泛的一级交互作用, 厚朴与甘草、苍术与木香、苍术与陈皮、甘草与砂仁均有显著的协同作用, 苍术与甘草、厚朴与木香、陈皮与砂仁的交互作用为负效应. 在单味药中, 除甘草外, 苍术、厚朴、陈皮、木香和砂仁均可显著促进胃排空的作用, 其中厚朴、木香、砂仁与香砂平胃散的胃排空作用具有可比性.

本研究提示香砂平胃散及其部分组成药物有显著促进小鼠胃排空功能的作用, 如进一步加以研究, 可

能对一些胃肠道运动功能障碍性疾病的治疗有一定的意义,进而开发出新的促进胃肠动力药物。

4 参考文献

- Holtmann G, Gschossman J, Neufang-Hüber J, Gerken G, Talley NJ. Differences in gastric mechanosensory function after repeated ramp distensions in non-consulters with dyspepsia and healthy controls. *Gut* 2000;47:332-336
- Lin ZY, Eaker EY, Sarosiek I, McCallum RW. Gastric myoelectrical activity and gastric emptying in patients with functional dyspepsia. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2384-2389
- 李涯松,朱人敏.功能性消化不良发病机制的研究. *华人消化杂志* 1998;6:439-440
- 窦艳玲,柯美云.功能性消化不良. *华人消化杂志* 1998;6:165-167
- 张昆和,祝金泉,王崇文,谢勇,黄德强,黄缘.胃电图与功能性消化不良症状分型的关系. *华人消化杂志* 1998;6:391
- 赵文健,周娅.功能性消化不良患者焦虑、抑郁性心理障碍45例. *世界华人消化杂志* 2000;8:596-597
- 刘维新,洪光,傅宝玉,姜若兰,刘峥艳.功能性消化不良患者消化间期血浆胃动素水平及胃十二指肠动力的改变. *世界华人消化杂志* 2001;9:722-724
- 唐红卫,黄裕新,高巍.功能性消化不良胃动力异常与胃肠激素的关系. *世界华人消化杂志* 2001;9:694-697
- 彭丽华,梁浩.抑郁症与消化道功能性疾病. *世界华人消化杂志* 1999;7:601-602
- 杨敏,房殿春,龙庆林,隋建峰,李前伟,孙念绪.胃起搏对胃动力紊乱犬胃电活动的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:1152-1156
- 田丰,沈静雪,李岩,王伟.运动障碍样功能性消化不良患者症状、胃排空、胃电间相关性的研究. *世界华人消化杂志* 2002;10:739-741
- 王虹,顾清,高建萍,顾而立,周磊,孙一俊,张悦.胃起搏治疗胃肠动力紊乱患者12例. *世界华人消化杂志* 2002;10:244-245
- 赵荣莱.功能性消化不良的治疗进展. *华人消化杂志* 1998;6:340-341
- 朱金照.促胃肠动力药物的研究现状. *世界华人消化杂志* 2001;9:1439-1444
- 孙思予,李岩,周卓,金治.和胃冲剂促进运动障碍样功能性消化不良患者胃排空. *世界华人消化杂志* 2000;8:810-812
- 庞龙,周德端.中药对胃肠运动的调节作用. *华人消化杂志* 1998;6:535-536
- 朱金照,杨国汉,冷恩仁,陈东风.中药的促胃肠动力作用. *世界华人消化杂志* 1999;7:689-690
- 王磊,侯家玉.力胃颗粒对胃肠动力的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:377-381
- 张航向,任平,黄熙,李源.中药对胃肠激素及胃肠运动的调节作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:1141-1144
- Lin J, Cai G, Xu JY. A comparison between Zhishi Xiaopiwan and cisapride in treatment of functional dyspepsia. *World J Gastroenterol* 1998;4:544-547
- 吴灵飞,郑宗茂,李国平,王炳周,詹海勇,曾哲,周泽清.胃舒散对功能性消化不良的疗效与幽门螺杆菌的关系. *世界华人消化杂志* 2002;10:275-278
- 戈焰,崔景朝,周瑞玲,陈玉兴,孙兰,凌方明,陈璐琳.健胃舒颗粒分煎与合煎的临床观察及实验研究. *中国中西医结合杂志* 2002;22:420-423
- 张子理,居海宁,郭顺林,雷力民.胃动灵治疗非溃疡性消化不良的临床研究. *中医杂志* 1999;40:479-481
- 刘群.中医治疗功能性消化不良的进展. *中成药* 2002;24:541-543
- 苗明三主编.《实验动物和动物实验技术》.北京:中国中医药出版社,1997:142-145
- 朱金照,冷恩仁,陈东风,史洪涛,桂先勇.15味中药促胃肠动力作用的筛选研究. *第三军医大学学报* 2000;22:436-438
- 郑天珍,李伟,翟颂义,邱小青,田治锋,丁永辉,卫玉玲.理气类中药对大鼠离体胃平滑肌条的作用. *兰州医学院学报* 1998;24:1-3
- 郑天珍,李伟,翟颂义,何地英,丁永辉,卫玉玲.补气类中药对大鼠离体胃平滑肌条的作用. *兰州医学院学报* 1998;24:3-5
- 邱赛红,陈立峰,柳克玲,应玲珍,侯雅明.芳香化湿药开胃作用机制的实验研究. *中药药理与临床* 1995;4:24-26
- 李伟,郑天珍,翟颂义,张英福,邱小青,丁永辉,卫玉玲.芳香化湿类中药对大鼠离体胃平滑肌运动的影响. *兰州医学院学报* 1998;24:6-8

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

美国国立医学图书馆2002年度收录中国医学期刊名单

(2002-07-19)

本刊讯 美国《医学索引(Index Medicus /MEDLINE, IM)是世界上公认的重要的医学检索工具,由世界上最大的医学信息中心-美国国立医学图书馆(National Library of Medicine, NLM)编辑出版.2002年度美国国立医学图书馆收录我国医学期刊58种,分别为法医学杂志(中),湖南医科大学学报(中),华西口腔医学杂志(中),华西医科大学学报(中)环境科学(中),临床耳鼻咽喉科杂志(中),色谱(中),生理科学进展(中),生理学报(中)生物工程学报(中),生物化学与生物物理杂志(中),生物医学工程学报(中)实验生物学报(中),**世界胃肠病学杂志(英)**,同济医科大学学报(英),微生物学报(中)卫生研究(中),细胞研究(英),香港医学杂志(英)亚洲男科学杂志(英文版),亚洲太平洋公共健康杂志(英),眼科学报(中),药学学报(中),遗传学报(中),应用生态学报(中)中国寄生虫学与寄生虫病杂志(中),中国科学(C辑)(英),中国修复重建外科杂志(中)中国药理学报(英),中国医疗器械杂志(中),中国医学科学院学报(英),中国医学科学院学报(中),中国应用生理学杂志(中),中国中西医结合杂志(中),中国中药杂志(中)中华病理学杂志(中),中华创伤杂志(英),中华妇产科杂志(中),中华肝脏病杂志(中)中华结核和呼吸杂志(中),中华口腔医学杂志(中),中华内科杂志(中),中华烧伤杂志(中),中华实验和临床病毒学杂志(中),中华外科杂志(中),中华血液学杂志(中),中华眼科学杂志(中),中华医学遗传学杂志(中),中华医学杂志(英),中华医学杂志(中),中华预防医学杂志(中),中华整形烧伤外科杂志(中),中药材(中),中医杂志(英).

(世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

幽门螺杆菌感染者胃黏膜中内质网分子伴侣Grp94的表达

王孟春, 方文刚, 顾金歌, 李 岩

王孟春, 中国医科大学附属二院内镜中心 辽宁省沈阳市 110004
方文刚, 中国医科大学发育生物学研究室 辽宁省沈阳市 110001
顾金歌, 沈阳市红十字会医院消化内科 辽宁省沈阳市 110014
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
王孟春, 女, 1965-04-06生, 辽宁省沈阳市人, 汉族. 1989年毕业于中国医科大学日文医学专业, 1997年获医学硕士学位, 2002年获医学博士学位, 主要从事消化内镜及幽门螺杆菌相关胃病的研究, 发表论文 10 篇.
项目负责人: 王孟春, 110004, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学第二临床学院内镜中心. mengchunwang@hotmail.com
电话: 024-83956947
收稿日期: 2002-10-07 接受日期: 2002-10-18

Expression of glucose-regulation protein 94 in gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*

Meng-Chun Wang, Wen-Gang Fang, Jin-Ge Gu, Yan Li

Meng-Chun Wang, Center of Endoscopy, the Second Clinical Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Wen-Gang Fang, Department of Development Biology, China Medical University, Shenyang 110002, Liaoning Province, China
Jin-Ge Gu, Department of Gastroenterology, the Third Hospital of Shenyang, Shenyang 110014, Liaoning Province, China
Yan Li, Department of Gastroenterology, the Second Clinical Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Meng-Chun Wang, Department of Gastroenterology, the Second Clinical Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. mengchunwang@hotmail.com
Received: 2002-10-07 Accepted: 2002-10-18

Abstract

AIM: To study the expression of glucose regulation protein 94 in gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*.

METHODS: Semi-quantitative RT-PCR method was used to demonstrate mRNA expression of Grp94 in *H.pylori* (*Hp*) infected and non-infected gastric mucosa. Western blot was used to detect the expression level of Grp94 protein in the tissues.

RESULTS: *Hp* negative group had 28 cases, and the expression amount of Grp94 mRNA was 0.424 ± 0.055 . *Hp* infected group had 32 cases and the expression amount of Grp94 mRNA was 0.882 ± 0.082 . The expression amounts of Grp94 protein were 0.427 ± 0.036 , 0.671 ± 0.072 respectively in *Hp*-negative and positive groups. The expression amounts of Grp94 mRNA and Grp94 protein in infected group showed a significant increase ($P < 0.01$) respectively.

CONCLUSION: *H.pylori* infection may increase the expression of Grp94 at mRNA level in gastric mucosa. Meanwhile, it also increases synthesis of the protein.

Wang MC, Fang WG, Gu JG, Li Y. Expression of glucose-regulation protein 94 in gastric mucosa infected with *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):551-553

摘要

目的: 探讨幽门螺杆菌感染对胃黏膜组织中内质网分子伴侣 Grp94mRNA 及蛋白水平表达的影响及意义。

方法: 应用半定量 RT-PCR 方法及 Western blot 方法检测感染与未感染幽门螺杆菌的胃黏膜组织中 Grp94 mRNA 及蛋白的表达情况。

结果: 未感染组 28 例, Grp94 mRNA 表达量为 0.424 ± 0.055 , 感染组 32 例, Grp94mRNA 表达量为 0.882 ± 0.082 . 两组相比感染组 Grp94mRNA 的表达量明显高于未感染组 ($P < 0.01$); 未感染组 Grp94 蛋白表达量为 0.427 ± 0.036 , 感染组 Grp94 蛋白表达量为 0.671 ± 0.072 , 两组相比感染组 Grp94 蛋白表达量明显高于未感染组 ($P < 0.01$).

结论: 幽门螺杆菌感染可使胃黏膜增加 Grp94mRNA 的表达及蛋白的合成, 这可能有利于胃黏膜的自身保护作用。

王孟春, 方文刚, 顾金歌, 李岩. 幽门螺杆菌感染者胃黏膜中内质网分子伴侣 Grp94 的表达. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):551-553
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/551.htm>

0 引言

研究表明幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)的热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一种致病因子, 而人胃黏膜又是热休克反应的重要部位, 感染 Hp 后可产生一些热休克蛋白, 如 HSP70, HSP72, HSP60 等, 这些热休克蛋白的产生可能与胃黏膜自身保护作用有关. 热休克蛋白通常不参与靶蛋白的组成, 因此又被认为是一种分子伴侣(molecular chaperon), HSP 作为分子伴侣可促进细胞内蛋白质的合成、折叠、装配, 与类固醇、干扰素、癌基因、细胞因子等重要生物活性物质有着密切关系, 控制着细胞的生长、发育和调节过程. Grp94(glucose regulation protein) 是内质网分子伴侣家族重要成员, 参与蛋白质的折叠, 装配和转运, 主要是在新生肽链合成的早期阶段, Grp94 与之形成稳定的复合物协助其折叠和装配, 他也能与尚未装配或错误折叠的蛋白质形成复合物, 同时在肿瘤细胞中具有抗原提呈作用. 但是幽门螺杆菌感染后人胃黏膜 Grp94 的表达及作用尚不清楚. 我们以 RT-PCR 及 Western blot 方法分别检测 Grp94mRNA 及蛋白水平的表达情况。

1 材料和方法

1.1 材料 胃镜检查时将除外心脑血管、肝肾疾病, 检

查前2 wk未用抗生素及铋剂的患者列入本实验。于胃镜检查时取胃窦黏膜6块,分别用于快速尿素酶试验、Giemsa染色、RNA提取、蛋白提取。快速尿素酶试验、Giemsa染色同时阳性为Hp感染组,共32例,其中浅表胃炎12例,胃溃疡10例,十二指肠溃疡10例。两项检测同时阴性为Hp未感染组,共28例,基本正常胃黏膜10例,浅表性胃炎8例,胃溃疡5例,十二指肠溃疡5例。TRIzol试剂, Gibco BRL; AMV逆转录酶, 5 × buffer、RNAsin, Promega; Taq酶、dNTP、10 × buffer、MgCl, Takara公司; 50 × TAE琼脂糖上海生工生物制品公司; ECL试剂盒, Amerham Pharmacia; 羊抗人Grp94多克隆抗体, Santa Cruz; HRP标记马抗羊二抗, 中山公司

1.2 方法

1.2.1 Grp94 mRNA 表达的检测 胃镜下于胃窦大弯、小弯各取黏膜1块,置于预冷的装有Trizol 200 μl的EP管中,按Trizol试剂盒提取总RNA,用紫外分光光度计测定RNA的纯度及浓度,两步法RT-PCR扩增,Grp94引物参照文献[1]设计,为校正逆转录效率及不同样品间的差异,以β-actin为内部参照物,在同一反应体系中与Grp94同时扩增,以定量Grp94mRNA的表达量,与β-actin的比值作为校正后的Grp94mRNA表达量。反应条件:94 10 min后,94 变性1 min、58 复性45 s、72 延伸45 s,进行30循环后,72 进行10 min延伸反应。20 g/L琼脂糖凝胶电泳后,

在紫外灯下确认电泳带,Grp94为270 bp,β-actin为535 bp。在凝胶成像系统分别扫描Grp94与β-actin电泳带密度,求出二者比值,即为Grp94mRNA表达的相对水平。

1.2.2 Grp94 蛋白表达的检测 胃镜检查时于胃窦大弯、小弯各取黏膜1块,裂解液中匀浆、低温离心,考马斯亮蓝法定量。含15 μg蛋白的样品在80 g/L DS-PAGE进行电泳,半干转印仪至PVDF膜,将PVDF膜浸入封闭液中室温过夜,加入用杂交液按1 1 000稀释的一抗,摇床上室温杂交30 min-2 h或过夜。加入用杂交液按1 5 000稀释的二抗,摇床杂交30 min。将ECL试剂盒内的detection reagent 1与detection reagent 2等体积混合后,均匀滴在PVDF膜上,固定于暗盒中,曝光、洗片。电脑扫描,Kodak1D软件系统计算Grp94的密度值及β-actin的密度值,二者的比值作为该样品Grp94蛋白的表达量。

统计学处理 数据经Excel软件t检验处理,以均数 ± 标准差表示,P < 0.05为有显著差异。

2 结果

2.1 Grp94 mRNA 和蛋白表达量见表,从表中可以看出Hp阳性组不同病变胃黏膜Grp94 mRNA和蛋白表达量无差异,Hp阴性组不同病变胃黏膜Grp94 mRNA和蛋白表达量无差异;Hp阳性组胃黏膜Grp94 mRNA和蛋白表达量明显高于Hp阴性组(P < 0.01),表1。

表1 Hp对不同胃黏膜组织Grp94 mRNA和蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Hp 阳性		n	Hp 阴性	
		Grp94 mRNA	Grp94 蛋白		Grp94 mRNA	Grp94 蛋白
基本正常胃黏膜				10	0.430 ± 0.032	0.414 ± 0.0124
浅表胃炎(中-重度)	12	0.870 ± 0.066	0.685 ± 0.090	8	0.421 ± 0.067	0.445 ± 0.041
胃溃疡	10	0.892 ± 0.115	0.659 ± 0.072	5	0.403 ± 0.072	0.127 ± 0.047
十二指肠溃疡	10	0.887 ± 0.050	0.667 ± 0.342	5	0.436 ± 0.044	0.429 ± 0.036
合计	32	0.882 ± 0.082	0.671 ± 0.072	28	0.424 ± 0.055	0.427 ± 0.036

3 讨论

Hp本身含有HSP,可能作为致病因子在Hp感染时发挥作用[2-9];而且Hp感染尚可刺激胃黏膜细胞产生不同的HSP,在Hp相关性胃疾病中发挥不同的作用[10-17]。Grp94属于HSP90家族,具有50%的同源性,因此享有HSP90家族的一些特性,是内质网标志分子伴侣,也具有多种重要的生物学功能[18,19],如分子伴侣特性、维持体内Ca²⁺的平衡,Mg²⁺依赖性的ATPase活性、Ca²⁺、Mg²⁺依赖性自身磷酸化作用以及Mg²⁺依赖性的丝氨酸激酶活性等。

我们从mRNA水平及蛋白水平分别检测了感染Hp后胃黏膜组织中Grp94的表达,结果表明,Grp94在胃黏膜有基础表达,Hp感染组Grp94 mRNA及蛋白的表达均明显高于Hp未感染组,Hp感染组与未感染组

不同胃黏膜病变中的表达无差异性,提示胃黏膜Grp94表达的增加可能与Hp感染有关,而与胃黏膜的炎症程度无关。我们推测,胃黏膜感染Hp后,在Hp各种致病因子的作用下,胃黏膜上皮细胞的微环境发生一系列的变化(如局部pH值的改变、细胞内蛋白质构型的改变等),从而启动了胃黏膜的应激反应,激活热休克基因,编码Grp94,增加了内质网合成Grp94。Grp94作为内质网标志分子伴侣主要参与蛋白质的折叠,装配和转运[20-23],是在新生肽链合成的早期阶段,Grp94与新生肽链形成稳定的复合物协助其折叠和装配,并可与尚未装配或错误折叠的蛋白质形成复合物,从而避免错误折叠的蛋白质的合成。Hp感染胃黏膜后,胃黏膜上皮细胞内可能出现大量变性和错误折叠的蛋白质,而增加了的Grp94可能协助这些变性

的、错误折叠的蛋白质恢复正常的折叠和装配, 从而减少黏膜细胞的进一步损伤。但 Hp 感染后胃黏膜上皮细胞内哪些蛋白发生了错误折叠、Grp94 的靶蛋白又是哪些有待于今后深入研究, 这些研究结果将对 Hp 感染的预防和治疗有重要意义。

4 参考文献

- 1 Maki RG, Eddy RL Jr, Byers M, Shows TB, Srivastava PK. Mapping of the genes for human endoplasmic reticular heat shock protein gp96/Grp94. *Somat Cell Mol Genet* 1993;19:73-81
- 2 Ferrero RL, Thiberge JM, Kansau I, Wuscher N, Huerre M, Labigne A. The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against mucosal infection in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:6499-6503
- 3 Kansau I, Guillain F, Thiberge JM, Labigne A. Nickel binding and immunological properties of the C-terminal domain of the *Helicobacter pylori* GroES homologue (HspA). *Molec Micro* 1996;22:1013-1023
- 4 李明峰, 凌贞, 张迎春, 马爱英, 孙建新, 施惠娟, 吴祥甫. 幽门螺杆菌热休克蛋白 A 基因的克隆、表达及免疫原性研究. *生物化学与生物物理学报* 1999;31:264-268
- 5 Evans DJ Jr, Evans DG, Engstrand L, Graham DY. Urease-associated heat shock protein of *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1992;60:2125-2127
- 6 Suerbaum S, Thiberge JM, Kansau I, Ferrero RL, Labigne A. *Helicobacter pylori* hspA-hspB heat-shock gene cluster: nucleotide sequence, expression, putative function and immunogenicity. *Molec Micro* 1994;14:959-974
- 7 Yamaguchi H, Osaki T, Taguchi H, Hanawa T, Yamamoto T, Kamiya S. Relationship between expression of HSP60, urease activity, production of vacuolating toxin, and adherence activity of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 1998;33(suppl):6-9
- 8 Kamiya S, Yamaguchi H, Osaki T, Taguchi H. A virulence factor of *Helicobacter pylori*: role of heat shock protein in mucosal inflammation after *H. pylori* infection. *J Clin Gastroenterol* 1998;27(Suppl):S35-39
- 9 Todoroki I, Joh T, Watanabe K, Miyashita M, Seno K, Nomura T, Ohara H, Yokoyama Y, Tochikubo K, Itoh M. Suppressive effects of DNA vaccines encoding heat shock protein on *Helicobacter pylori*-induced gastritis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:159-163
- 10 Rokutan K. Molecular stress response in the stomach. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1999;114:265-272
- 11 Rokutan K, Hirakawa T, Teshima S, Honda S, Kishi K. Glutathione depletion impairs transcriptional activation of heat shock genes in primary cultures of guinea pig gastric mucosal cells. *Clin Invest* 1996;97:2242-2250
- 12 Rokutan K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15 (Suppl):D12-19
- 13 Nakamura K, Rokutan K, Marui N, Aoike A, Kawai K. Induction of heat shock proteins and their implication in protection against ethanol-induced damage in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Gastroenterology* 1991;101:161-166
- 14 Jin M, Otaka M, Okuyama A, Itoh S, Otani S, Odashima M, Iwabuchi A, Konishi N, Wada I, Pacheco I, Itoh H, Tashima Y, Masamune O, Watanabe S. Association of 72-kDa heat shock protein expression with adaptation to aspirin in rat gastric mucosa. *Dig Dis Sci* 1999;44:1401-1407
- 15 易屏, 李国成, 刘胜洪, 罗树星, 陶秀良. HSP72、HSP B 在幽门螺杆菌感染的十二指肠球部溃疡患者胃黏膜中的表达. *中国中西医结合脾胃杂志* 2001;8:336-338
- 16 任宏宇, 易粹琼, 张锦坤. 幽门螺杆菌感染胃黏膜的 PCNA 和 HSP70 表达. *同济医科大学学报* 1999;28:135-137
- 17 Leri O, Teichner A, Sinopoli MT, Abolito MR, Pustorino R, Nicosia R, Paparo Barbaro S. Heat-shock-proteins-antibodies in patients with *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 1996;18:45-47
- 18 Melnick J, Dul JL, Argon Y. Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* 1994;370:373-375
- 19 Singh-Jasuja H, Scherer HU, Hilf N, Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol* 2000;30:2211-2215
- 20 Ramakrishnan M, Tugizov S, Pereira L, Lee AS. Conformation-defective herpes simplex virus 1 glycoprotein B activates the promoter of the grp94 gene that codes for the 94kD stress protein in the endoplasmic reticulum. *DNA Cell Biol* 1995;14:373-384
- 21 Reed RC, Zheng T, Nicchitta CV. GRP94-associated enzymatic activities. Resolution by chromatographic fractionation. *J Biol Chem* 2002;277:25082-25089
- 22 Roher N, Miro F, Boldyreff B, Llorens F, Plana M, Issinger OG, Itarte E. The C-terminal domain of human grp94 protects the catalytic subunit of protein kinase CK2(CK2alpha) against thermal aggregation. Role of disulfide bonds. *Eur J Biochem* 2001;268:429-436
- 23 Nganga A, Bruneau N, Sbarra V, Lombardo D, Le Petit-Thevenin J. Control of pancreatic bile-salt-dependent-lipase secretion by the glucose-regulated protein of 94 kDa(Grp94). *Biochem J* 2000;352 (Pt 3):865-874

术香冲剂对小鼠胃肠动力的影响

李岩,王学清,张卫卫,王江玥

李岩,王学清,张卫卫,王江玥,中国医科大学附属第二医院消化内科
辽宁省沈阳市 110004
李岩,男,1956-02-27生,沈阳市人,汉族,1982年中国医科大学医疗系日语医学班毕业,消化内科主任,医学博士,主任医师,教授,博士生导师,主要从事中药对胃肠动力影响的研究,发表论文47篇。
辽宁省自然科学基金项目, No.619029
项目负责人:李岩,110004,辽宁省沈阳市和平区三好街36号,中国医科大学附属第二医院消化内科. yanLi227@hotmail.com
收稿日期:2002-10-18 接受日期:2002-11-18

Effect of Zhuxiang powder on gastric and intestinal motility in mice

Yan Li, Xue-Qing Wang, Wei-Wei Zhang, Jiang-Yue Wang

Yan Li, Xue-Qing Wang, Wei-Wei Zhang, Jiang-Yue Wang, Department of Digestive Diseases, Second Clinical College, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Correspondence to: Yan Li, Department of Digestive Diseases, Second Clinical College, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. yanLi227@hotmail.com
Received:2002-10-18 Accepted:2002-11-18

Abstract

AIM: To study the prokinetic effect of Chinese herbs Zhuxiang powder (ZXP) on gastrointestinal motility mice and its mechanism.

METHODS: The effects of ZXP on gastric emptying and intestinal propulsion were investigated in vivo by measuring gastric remainder rates and intestinal propulsion rates of Blue Dextran (BD) 2000. Based on the level of main effect of the orthogonal design list $L_{16}(2^{15})$, the authors explored the mechanism of ZXP on gastric emptying by administering atropine intraperitoneally to mice 20 minutes prior to meal

RESULTS: Compared with control group, the rates of gastric emptying and intestinal propulsion rates increased significantly in ZXP group ($72.0 \pm 12.4\%$ vs $63.7 \pm 13.1\%$, $P < 0.01$; $58.7 \pm 10.9\%$ vs $51.1 \pm 8.7\%$, $P < 0.05$). According to the analysis of orthogonal design, the sequence of prompting gastrointestinal motility were: Radix Aucklandiae > Fructus Amomi > Rhizoma, Atractylodis Macrocephalae. There were first-grade mutual roles within Rhizoma, Atractylodis Macrocephalae and Radix Aucklandiae. The prokinetic effect of Chinese herbs Zhu Xiang Powder (ZXP) on gastrointestinal motility mice could be inhibited partially by atropine, especially on gastric emptying.

CONCLUSION: ZXP can accelerate the gastric emptying and intestinal propulsion in mice significantly. The main herbs in ZXP are radix Aucklandiae and Fructus Amomi. The mechanism of ZXP promoting gastrointestinal motility is related partially to the cholinergic nerve function.

Li Y, Wang XQ, Zhang WW, Wang JY. Effect of Zhuxiang powder on gastric and intestinal motility in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003; 11(5):575-577

摘要

目的:观察术香冲剂对小鼠胃肠运动功能的影响,探讨其作用机制。

方法:以葡聚糖蓝 2 000 为标记物,观察服术香冲剂前后小鼠胃排空率及小肠推进比的变化。采用正交设计,探讨了各药味在方中对胃排空的影响。以阿托品阻断 M 受体,探讨其作用机制。

结果:术香冲剂的胃排空率($72.0 \pm 12.4\%$ vs $63.7 \pm 13.1\%$, $P < 0.01$)和小肠推进比($58.7 \pm 10.9\%$ vs $51.1 \pm 8.7\%$, $P < 0.05$)均明显高于对照组。方中组成药味胃排空率为木香>砂仁>白术>鸡内金,白术与木香有交互作用。术香冲剂的促动力作用能够部分被阿托品阻断,尤以促胃动力作用为著。

结论:术香冲剂对小鼠胃肠运动有促进作用,方中促胃排空作用的主药为木香、砂仁。其促动力作用机制部分与激动 M 受体有关。

李岩,王学清,张卫卫,王江玥. 术香冲剂对小鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(5):575-577

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/575.htm>

0 引言

功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)是一种常见的临床综合征。在我国传统医学中,有许多中药具有消除胃肠运动障碍的功能^[1-10]。我们采用科学方法对白术、木香、砂仁、鸡内金冲剂促胃肠动力的作用进行基础研究。旨在开发一种新的促动力药物。

1 材料和方法

1.1 材料 昆明小白鼠, 5 周龄, 质量 18-20 kg, 440 只, 购自中国医科大学动物部。实验前 12 h 开始禁食, 2 h 开始禁水。中药选用白术、木香、砂仁、鸡内金饮片, 清洗, 依各实验组安排方剂组成, 配伍比例为 15 g 15 g 10 g 10 g。取饮片分别以蒸馏水浸泡后煎煮, 过滤后取滤液, 两次滤液合并后浓缩, 干燥后粉碎过筛, 制成冲剂。实验时以蒸馏水配制为浓度 500 g/L 的溶液。西沙比利片剂(西安杨森制药有限公司, 批号(96)卫药准字 -J-16(1)号)以蒸馏水配制成 5×10^{-3} g/L 的溶液, 硫酸阿托品(上海禾风有限公司生产, 批号: 960101)稀释为 1×10^{-3} g/L。葡聚糖蓝(BD)2000(瑞典 Pharmacia 公司), 加蒸馏水制成 20 g/L BD 2 000 溶液。751G 型紫外分光光度计(上海分析仪器厂)

1.2 方法

1.2.1 术香冲剂对胃排空及小肠推进功能影响 小鼠 60 只,随机分对照组、西沙必利组和术香冲剂组,每组 20 只,分别灌服蒸馏水、西沙必利和术香冲剂各 0.3 mL。20 min 后,各灌服 20 g/L BD 2 000 0.4 mL, 15 min 后颈椎脱臼处死,迅速剖取胃,将胃内容物溶于 2 mL 蒸馏水中,离心 30 min,取上清,以紫外分光光度计 620 nm 测胃内残留色素吸光度。另取一试管,同样浓度色素 0.4 mL,同样条件下离心,测得吸光度值,作为标准管,并以下式求出胃内色素排空率 $= (1 - \text{胃内残留色素吸光度} / \text{标准管胃内色素吸光度}) \times 100\%$ 。同时迅速取出小鼠幽门括约肌至回肠末端全部小肠,自然拉直。量取幽门括约肌至色素最前端及至回盲部的距离,二者之比为小肠推进比。

1.2.2 各中药对小鼠胃排空的影响 每味药为一个因子, A 白术 3 g/kg, B 木香 3 g/kg, C 砂仁 2 g/kg, D 鸡内金 2 g/kg, 共 6 个因子。每味药均取“不给药”和“给全药量”两个水平。随机确定各药的代号,但水平号未随机化。本实验采用正交表 $L_{16}(2^{15})$, 采用主效应不与交互作用混杂的正交表设计,即进行 16 组实验,2 个水平,15 个因子(4 个因子为主效应列,6 个两两混杂交互作用列,5 个空白列)。A 与 B 交互作用,表示为 AB, C 与 D 交互作用表示为 CD, 根据正交表中主效应列的水平配成 16 种不同组合的配方。如 1 组 4 个主效应列均为 1 水平,配成含 4 药物的全方剂溶剂;16 组 4 个主效应列均为 2 水平,配成不含药物的。不论各组用药的成分有何不同,某一成分的用量固定不变,而投药的容量也固定不变。

1.2.3 阿托品对术香冲剂促胃肠动力的影响 小鼠 60 只,随机分阿托品组、术香冲剂组及术香冲剂 + 阿托品组,每组 20 只,阿托品组及术香冲剂 + 阿托品组分别于灌胃前 15 min 腹腔注射硫酸阿托品 0.02 mg/kg, 然后灌服蒸馏水和术香冲剂,术香冲剂组腹腔注射等容积蒸馏水,后灌服等量冲剂。余实验方法同前。计算胃内色素排空率及小肠推进比。

统计学处理 各组数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,统计分析采用两样本均数 t 检验,正交设计采用直观分析和方差分析。

2 结果

2.1 术香冲剂对胃排空及小肠推进功能影响(见表 1) 术香冲剂组和西沙比利组平均胃内色素排空率及小肠推进比与对照组比较均明显增加($P < 0.05$ 或 0.01),二者之间无显著性差异。

2.2 各中药对小鼠胃排空的影响 各药效应大小排列顺序为:木香 > 砂仁 > 白术 > 鸡内金。因 $F_B = 21.29 > F_{0.01}$, $F_C = 20.48 > F_{0.01}$, 表明 B、C 作用非常显著; $F_A = 13.08 > F_{0.05}$, $F_{AB} = 12.00 > F_{0.05}$, 表明 AB 交互作用显著,即木香和砂仁作用非常显著;白术作用显著;鸡内金无明显作

用。与直观分析法所得结果相符(见表 2)。

表 1 术香冲剂对胃排空和小肠推进功能的影响

分组	胃内色素排空率 %	小肠推进比 %
对照组	63.7 \pm 13.1	51.1 \pm 8.7
西沙必利组	70.6 \pm 9.3 ^b	63.9 \pm 9.1 ^b
术香冲剂组	72.0 \pm 12.4 ^b	58.7 \pm 10.9 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 对照组。

表 2 方差分析结果

方差来源	偏差平方和	自由度	均方	F 值	显著性
B	22.02	1	22.02	21.29	$P < 0.01$
C	21.18	1	21.18	20.48	$P < 0.01$
A	13.52	1	13.52	13.08	$P < 0.05$
AB	12.41	1	12.41	12.00	$P < 0.05$
AD	1.03	1	1.03	0.99	
CD	0.29	1	0.29	0.28	
D	0.16	1	0.16	0.16	
BC	0.14	1	0.14	0.13	
AC	0.79	1	0.79	0.76	
BD	0.0 023	1	0.0 023	0.0 022	
e	1.03	5			

$F_{0.05}(1, 5) = 6.61$, $F_{0.01}(1, 5) = 16.26$ 。

2.3 阿托品对术香冲剂促胃肠动力影响 注射阿托品后,术香冲剂促胃排空作用明显减低($P < 0.01$),但仍较阿托品组作用增强($P < 0.05$);小肠推进作用明显减低,术香冲剂组略强于阿托品组(见表 3)。

表 3 阿托品对术香冲剂促胃肠动力作用的影响

组别	胃内色素排空率 %	平均小肠推进比 %
术香冲剂组	71.45 \pm 7.8	57.28 \pm 4.4
阿托品组	16.0 \pm 10.6	33.5 \pm 5.9
阿托品 + 术香冲剂组	30.9 \pm 13.0 ^{bd}	35.3 \pm 7.4 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 术香冲剂组, ^d $P < 0.01$ vs 阿托品组。

3 讨论

功能性消化不良的发病机制可能与胃肠运动功能异常等因素有关^[1-7]。目前临床上常采用胃复安、多潘立酮、西沙比利等促动力剂进行治疗,取得一定疗效^[8,9]。祖国传统医学认为“痞满”“胃脘痛”等症与现代医学上胃肠动力功能异常改变有关,多与脾胃功能失调,脾胃虚弱有关。脾主运化,喜燥恶湿,脾虚则运化无力,湿浊内停于胃,阻碍气机,故出现消化不良症状。通过调理脾胃,对功能性消化不良有一定的治疗作用^[10-26]。木香、白术为菊科草本植物,砂仁为姜科草本植物,鸡内金则为雉科鸡的沙囊角质内壁。木香辛、苦、温,归

脾、胃经,可行气止痛,并善理脾胃气滞,故为主药;砂仁辛,温,可化湿行气,温脾和胃,故为辅药;白术苦、甘、温,能助脾胃之健运,故为佐药;鸡内金可消食健脾,化积滞故为使药,四药合用,共奏行气健脾,化食消滞之功。李岩 et al^[27]和陈少夫 et al^[28]分别报道了白术和木香具有明显的促进小鼠胃排空的作用。据报道砂仁具有明显促进胃排空作用。但对术香冲剂作用机制的研究国内外尚未见报道。我们用葡聚糖蓝2 000标记法,测定了术香冲剂对小鼠胃排空及小肠推进功能具有促进作用,并与西沙必利作用相近。通过正交设计的方法证实了四味药在方剂中对胃排空影响的作用以木香、砂仁为主,白术次之,此恰与中医组方原则相符。白术与木香有交互作用,即2味药合煎作用弱于各单味药,可能与合煎后产生负性协同作用有关;鸡内金对胃排空无有显著的影响,在该方剂中也不与其他药有交互作用。

通过预先给予腹腔内注射阿托品,以阻断M受体作用,初步探讨了其作用机制。结果表明,术香冲剂的促动力作用能够部分被阿托品阻断,尤以促胃动力作用为著。说明该冲剂促动力作用机制部分与激动M受体,增加乙酰胆碱作用有关,同时还可能有对胃肠平滑肌的直接作用及通过神经体液等因素起作用。本实验通过科学的手段,证实了术香冲剂可促进胃肠动力及方剂中各药味的作用,初步阐述了其作用机制,为进一步从祖国医药中开发出新的治疗消化不良药物提供了科学试验依据。

4 参考文献

- 1 冀艳玲,柯美云. 功能性消化不良. 华人消化杂志 1998;6:165-167
- 2 李涯松,朱人敏. 功能性消化不良发病机制的研究. 华人消化杂志 1998;6:439-440
- 3 张昆和,祝金泉,王崇文,谢勇,黄德强,黄缘. 胃电图与功能性消化不良症状分型的关系. 华人消化杂志 1998;6:391
- 4 赵文健,周娅. 功能性消化不良患者焦虑、抑郁性心理障碍45例. 世界华人消化杂志 2000;8:596-597
- 5 刘维新,洪光,傅宝玉,姜若兰,刘峥艳. 功能性消化不良患者消化间

- 期血浆胃动素水平及胃十二指肠动力的改变. 世界华人消化杂志 2001;9:722-724
- 6 唐红卫,黄裕新,高巍. 功能性消化不良胃动力异常与胃肠激素的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:694-697
- 7 彭丽华,梁浩. 抑郁症与消化道功能性疾病. 世界华人消化杂志 1999;7:601-602
- 8 赵荣莱. 功能性消化不良的治疗进展. 华人消化杂志 1998;6:340-341
- 9 朱金照. 促胃肠动力药物的研究现状. 世界华人消化杂志 2001;9:1439-1444
- 10 孙思予,李岩,周卓,金治. 和胃冲剂促进运动障碍样功能性消化不良患者胃排空. 世界华人消化杂志 2000;8:810-812
- 11 庞龙,周德端. 中药对胃肠运动的调节作用. 华人消化杂志 1998;6:535-536
- 12 朱金照,杨国汉,冷恩仁,陈东风. 中药的促胃肠动力作用. 世界华人消化杂志 1999;7:689-690
- 13 王晶,侯家玉. 力胃颗粒对胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2000;8:377-381
- 14 张航向,任平,黄熙,李源. 中药对胃肠激素及胃肠运动的调节作用. 世界华人消化杂志 2000;8:1141-1144
- 15 朱金照,郑伟,冷恩仁,陈东风. 大腹皮对大鼠胃肠道AChE及NOS1阳性神经分布的影响. 世界华人消化杂志 2001;9:101-103
- 16 王振华,吕立生. 中药胃肠通治疗胃肠功能紊乱. 新消化病学杂志 1997;5:448-449
- 17 李岩,孙思予,周卓. 消食行气中药对小鼠胃肠动力的影响. 新消化病学杂志 1997;5:153
- 18 Lin J, Cai G, Xu JY. A comparison between Zhishi Xiaopiwan and cisapride in treatment of functional dyspepsia. *World J Gastroenterol* 1998;4:544-547
- 19 杨敏,房殿春,龙庆林,隋建峰,李前伟,孙念绪. 胃起搏对胃动力紊乱大胃电活动的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:1152-1156
- 20 田丰,沈静雪,李岩,王伟. 运动障碍样型功能性消化不良患者症状、胃排空、胃电间相关性的研究. 世界华人消化杂志 2002;10:739-741
- 21 王虹,顾清,高建萍,顾而立,周磊,孙一俊,张悦. 胃起搏治疗胃肠动力紊乱患者12例. 世界华人消化杂志 2002;10:244-245
- 22 吴灵飞,郑宗茂,李国平,王炳周,詹海勇,曾哲,周泽清. 胃舒散对功能性消化不良的疗效与幽门螺杆菌的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:275-278
- 23 戈焰,崔景朝,周瑞玲,陈玉兴,孙兰,凌方明,陈潞琳. 健胃舒颗粒分煎与合煎的临床观察及实验研究. 中国中西医结合杂志 2002;22:420-423
- 24 张子理,居海宇,郭顺林,雷力民. 胃动灵治疗非溃疡性消化不良的临床研究. 中医杂志 1999;40:479-481
- 25 刘群. 中医治疗功能性消化不良的进展. 中成药 2002;24:541-543
- 26 朱金照,冷恩仁,陈东风,史洪涛,桂先勇. 15味中药促胃肠动力作用的筛选研究. 第三军医大学学报 2000;22:436-438
- 27 李岩,孙思予,周卓,陈苏宁,王兴尧. 健脾行气及消食中药组合对小鼠胃肠动力的影响. 华人消化杂志 1998;6(特刊7):208-209
- 28 陈少夫,李宇权,何凤云,潘丽丽. 木香对胃酸分泌、胃排空及胃泌素、生长抑素、胃动素水平的影响. 中国中西医结合杂志 1994;14:406-408

EGF对小肠缺血再灌注后磷酸化p44/42 MAPK表达的影响

李平, 邢峰, 付小兵, 杨银辉, 郭宝琛

李平, 郭宝琛, 中国人民解放军第304医院麻醉科 北京市 100037
邢峰, 中国人民解放军第二炮兵总医院麻醉科 北京市 100088
付小兵, 杨银辉, 中国人民解放军第304医院创伤研究室 北京市 100037
李平, 男, 1966年生, 北京市人, 汉族, 学士学位, 主治医师, 主要从事麻醉学与重症治疗的临床和研究工作。
国家重点基础研究发展规划基金资助项目, No.G1999054204和国家自然科学基金, No.39900054
项目负责人: 付小兵, 100037, 北京市海淀区阜成路51号, 中国人民解放军第304医院创伤研究室. fuxb@cgw.net.cn
电话: 010-66867396
收稿日期: 2002-05-11 接受日期: 2002-07-12

Effects of EGF on expression of phosphorylated p44/42 MAPK in rat small intestine after ischemia-reperfusion injury

Ping Li, Feng Xin, Xiao-Bing Fu, Yin-Hui Yang, Bao-Chen Guo

Ping Li, Bao-Chen Guo, Department of Anesthesiology, 304 Hospital of PLA, Bei jing 100037, China
Feng Xin, Department of Anesthesiology, the Second Artillery General Hospital of PLA, Beijing 100088, China
Xiao-Bing Fu, Yin-Hui Yang, Trauma Research Institute, 304 Hospital of PLA, Beijing, 100037, China
Supported by the National Basic Science and Development Programme of China, No.G1999054204, and the National Natural Science Foundation of China, No.39900054
Correspondence to: Xiao-Bing Fu, Trauma Research Institute, 304 Hospital of PLA, Beijing, China. fuxb@cgw.net.cn
Received: 2002-05-11 Accepted: 2002-07-12

Abstract

AIM: To investigate the effects of EGF on the characteristics of phosphorylated p44/42 MAPK expression and its biological significance in EGF-induced gut repair after ischemia-reperfusion (I/R) injury.

METHODS: A total of 80 Wistar rats were randomly divided into four groups, namely EGF treated group (E), normal saline control (R), ischemia group (I) and sham operated control (C). In group E and R, the rats were treated with intravenous EGF 100 µg/kg/rat or normal saline respectively after 45 minutes of superior mesenteric artery occlusion. Blood samples were collected at 2, 6, 12 and 24 hours after reperfusion and plasma D-lactate were determined. Tissue samples from intestine were also taken for histological analysis and immunohistochemical analysis of phospho-p44/42 MAPK.

RESULTS: The changes of histological structure and D-lactate indicated that the intestinal barrier was damaged after intestinal I/R injury, while EGF treatment significantly improved the outcome. In group C and I positive signals of phospho-p44/42 MAPK were mainly located in the cytoplasm of the intestinal villi and crypts, while in group I positive cells increased significantly ($P < 0.05$). In group R, positive signals were

found in almost all the cells and the percentage of positive nuclei increased with the time of reperfusion, reaching its peak after 12h of reperfusion. In group E, the percentages were higher than those in group R and the peak of nuclear expression was earlier.

CONCLUSION: EGF administration improves the outcome of I/R induced intestinal damage. After I/R the expression and nuclear translocation of phospho-p44/42 MAPK increases with the time of reperfusion, suggesting its role in intestinal reconstitution. EGF treatment induces its early expression and translocation into the nucleus, suggesting the significance of p44/42 MAPK signaling pathway in EGF-induced gut repair.

Li P, Xin F, Fu XB, Yang YH, Guo BC. Effects of EGF on expression of phosphorylated p44/42 MAPK in rat small intestine after ischemia-reperfusion injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(5):578-582

摘要

目的: 观察表皮生长因子(EGF)对大鼠肠缺血-再灌注(I/R)后磷酸化细胞外信号调节激酶(phospho-p44/42 MAPK)表达的影响。

方法: 夹闭大鼠肠系膜上动脉根部45 min之后放松血管夹形成再灌注, 同时经颈静脉分别注入EGF 100 µg/kg或生理盐水, 分别于伤后2、6、12和24 h将动物活杀。设置对照组和单纯缺血组。检测血浆D-乳酸浓度, 取小肠组织进行形态学观察, 用免疫组织化学方法研究磷酸化p44/42 MAPK的表达。

结果: (1)再灌注后血浆D-乳酸水平升高, 小肠黏膜充血、水肿、炎细胞浸润及坏死糜烂, 再灌注后6 h最显著。EGF显著降低D-乳酸水平升高的幅度($P < 0.05$), 明显改善I/R引起的病理损害。(2)磷酸化p44/42 MAPK染色显示, 正常大鼠的绒毛上皮、陷窝和固有层细胞均有阳性颗粒, 主要存在于胞质内。缺血和再灌注后阳性细胞数量显著增加, 随再灌注时间的延长, 阳性颗粒逐渐转位入核, 在12 h最显著。24 h主要表现为胞质内表达。EGF治疗后阳性细胞数量增多, 细胞核表达的数量增加。

结论: 肠道I/R损伤激活磷酸化p44/42 MAPK的表达, EGF促进p44/42 MAPK的早期表达与核转位, 从而参与细胞的应激反应和增生与分化。

李平, 邢峰, 付小兵, 杨银辉, 郭宝琛. EGF对小肠缺血再灌注后磷酸化p44/42 MAPK表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):578-582
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/578.htm>

0 引言

利用生长因子调控损伤修复的意义已经引起人们的重视^[1], 表皮生长因子(EGF)参与内脏损伤后的主动修复过程也已得到实验证实^[2-5]. 与此同时, 细胞外信号调节激酶(extracellular-signal regulated protein kinase, p44/42 MAPK)在 EGF 等生长因子刺激引起的细胞反应中起重要调控作用^[6-8]. 体外研究证实, EGF 可以通过激活 p44/42 MAPK 通路促进小肠细胞的增生反应^[9-11]. 本实验利用大鼠肠 I/R 损伤模型, 给予大鼠静脉注射 EGF, 观察血浆 D-乳酸浓度的变化规律以及相应的病理学改变, 用免疫组织化学方法研究肠 I/R 引起的 p44/42 MAPK 的表达规律以及 EGF 对 p44/42 MAPK 表达的影响, 进而探讨其在创伤修复中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar 大鼠, 体质量 200-250 g(购自军事医学科学院动物中心), 随机分为对照组(C)、肠缺血组(I)、肠缺血-再灌注组(R)和 EGF 治疗组(E). 根据缺血后再灌注时间的不同将 R 组和 E 组又分成 2, 6, 12 和 24 h 共 4 组(R₂, R₆, R₁₂, R₂₄ 以及 E₂, E₆, E₁₂, E₂₄), 每组 8 只动物. 实验前禁食 12 h, 自由饮水. 采用肠系膜上动脉(SMA)夹闭-松夹方式制成肠缺血-再灌注模型. 大鼠腹腔注射 30 g/L 戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉, 常规消毒后取腹正中切口 3-4 cm, 钝性分离 SMA 根部. E 组和 R 组动物以血管夹夹闭 SMA 根部, 完全阻断血流 45 min 之后放松血管夹, 使肠道血流恢复形成再灌注, 在松开动脉夹的同时经右颈静脉注入 EGF 100 μg/kg(由中国科学院上海生物化学研究所提供)或生理盐水 0.5 mL. 假手术组仅分离 SMA 不作夹闭, I 组不注射 EGF 或生理盐水. 各组动物于关闭腹腔后皮下注射 10 ml 生理盐水抗休克.

1.2 方法 按照设定时间点将动物处死, 取动物肠道石蜡包埋后切片、HE 染色, 光镜下观察. 取门静脉血离心后分离血浆, -80 °C 保存, 用酶联紫外分光光度法测定血浆 D-乳酸水平. 动物肠道经 40 g/L 甲醛固定、脱水、石蜡包埋、切片后, 应用 PowerVision™ 二步法研究磷酸化 p44/42 MAPK 的表达. 采用磷酸化 p44/42 MAPK 小鼠单克隆抗体(cell signaling technology, Inc, 美国)以及相应的第二抗体(北京中山生物技术有限公司), DAB(二氨基联苯胺, 福州迈新生物技术公司), 按照试剂说明书要求进行免疫组织化学技术操作. 石蜡切片按常规脱蜡至水, 在体积分数为 30 ml/L H₂O₂ 中孵育 10 min, 以消除内源性过氧化物酶活性. PBS 冲洗, 置于 0.01 mol/L, pH6.0 的枸橼酸盐缓冲液中进行抗原热修复后, 滴加按 1:100 稀释的一抗, 37 °C 孵育 40 min. PBS 冲洗, 滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 37 °C 孵育 20 min, PBS 漂洗后 DAB 显色, 苏木素复染, 常规脱水, 透明, 封片, 显微镜下观察, 结果以细胞质和/或细胞核着棕色者为阳性染色. 另用

PBS 代替一抗做阴性对照. 光镜下观察阳性细胞在小肠黏膜的分布. 每只大鼠观察 50 个纵向切开的陷窝和绒毛(陷窝腔和绒毛应保持完整), 统计阳性细胞百分率, 其结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, SAS 软件包统计各组间差异.

2 结果

大鼠 SMA 夹闭后, 肠道明显变紫, 蠕动减慢. HE 染色见黏膜上皮出现充血、水肿和炎细胞浸润以及糜烂、坏死, 以伤后 6 h 最明显, 在再灌注后 24 h 基本恢复正常的黏膜结构, E 组动物肠黏膜损伤的程度较 R 组明显减轻.

2.1 血浆 D-乳酸浓度的变化 D-乳酸是肠道细菌特有的代谢产物, 血浆中 D-乳酸含量的变化可反映肠黏膜通透性的改变^[12,13]. 肠缺血 45 min 后, D-乳酸浓度尚未发生明显改变. 再灌注 2 h 和 6 h, 各组动物血浆 D-乳酸浓度较假手术组均显著升高, 但 R 组升高的幅度显著高于 E 组(P < 0.01 或 P < 0.05, 图 1).

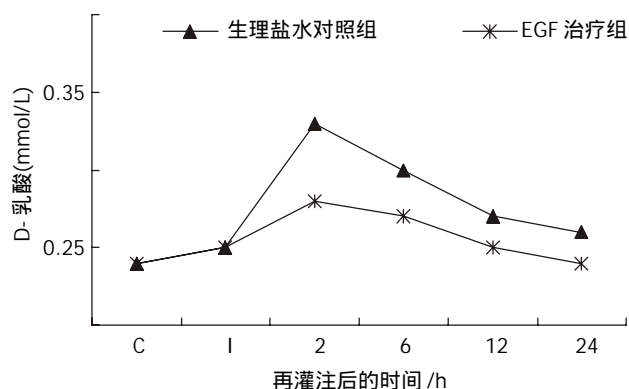
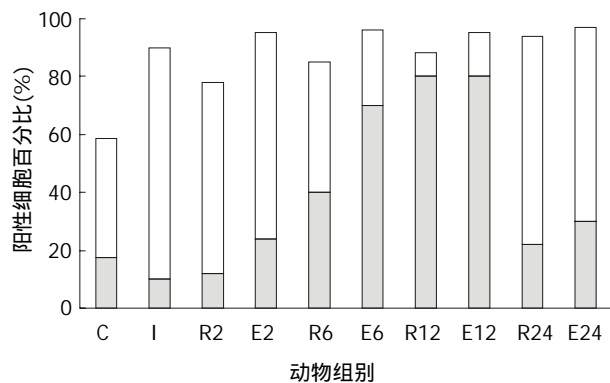


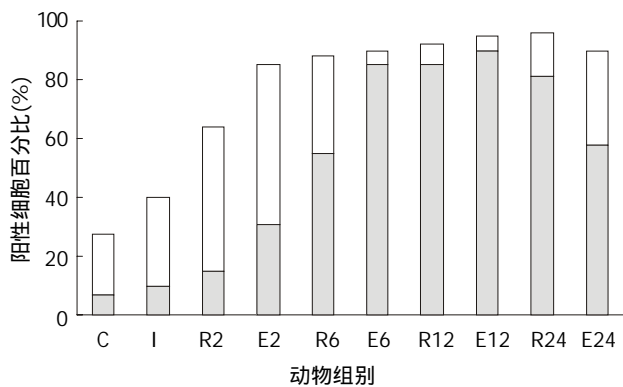
图 1 2 组动物门静脉血浆 D-乳酸浓度的变化趋势.

2.2 磷酸化 p44/42 MAPK 的表达特征 C 组、I 组和 R 组: 在正常和伤后大鼠, 绒毛上皮、小肠陷窝和固有层均可见到染色阳性的细胞. 在 C 组大鼠的绒毛上皮和小肠陷窝, 阳性细胞的比例分别为 59% 和 27.5%, 表现为散在分布于胞质内的棕色颗粒, 大部分靠近细胞核, 少量细胞有核内表达. 小肠陷窝核内表达 p44/42 MAPK 的细胞主要位于陷窝的中下部, 相当于干细胞、短暂扩增细胞及其初级子代细胞的位置. 杯状细胞的胞质内也可见阳性颗粒. I 组大鼠 90% 绒毛上皮细胞和 40% 陷窝细胞的胞质内出现阳性颗粒, 核内表达无明显改变. R 组几乎全部绒毛上皮细胞和陷窝细胞表达磷酸化 p44/42 MAPK, 但随着再灌注时间的延长, 核内表达的比例增加. 在 R₂ 组和 R₆ 组阳性颗粒主要位于胞质中, R₁₂ 组则主要位于细胞核, R₂₄ 组核内表达的比例下降接近 C 组. 各组动物的黏膜固有层均有少量的阳性细胞, 正常情况下主要位于胞质, 随再灌注时间延长核内表达增多, 在 R₁₂ 组最显著(图 2-4). E 组绒毛上皮细胞和陷窝的阳性细胞数量均高于 R 组相应时相点, 核内

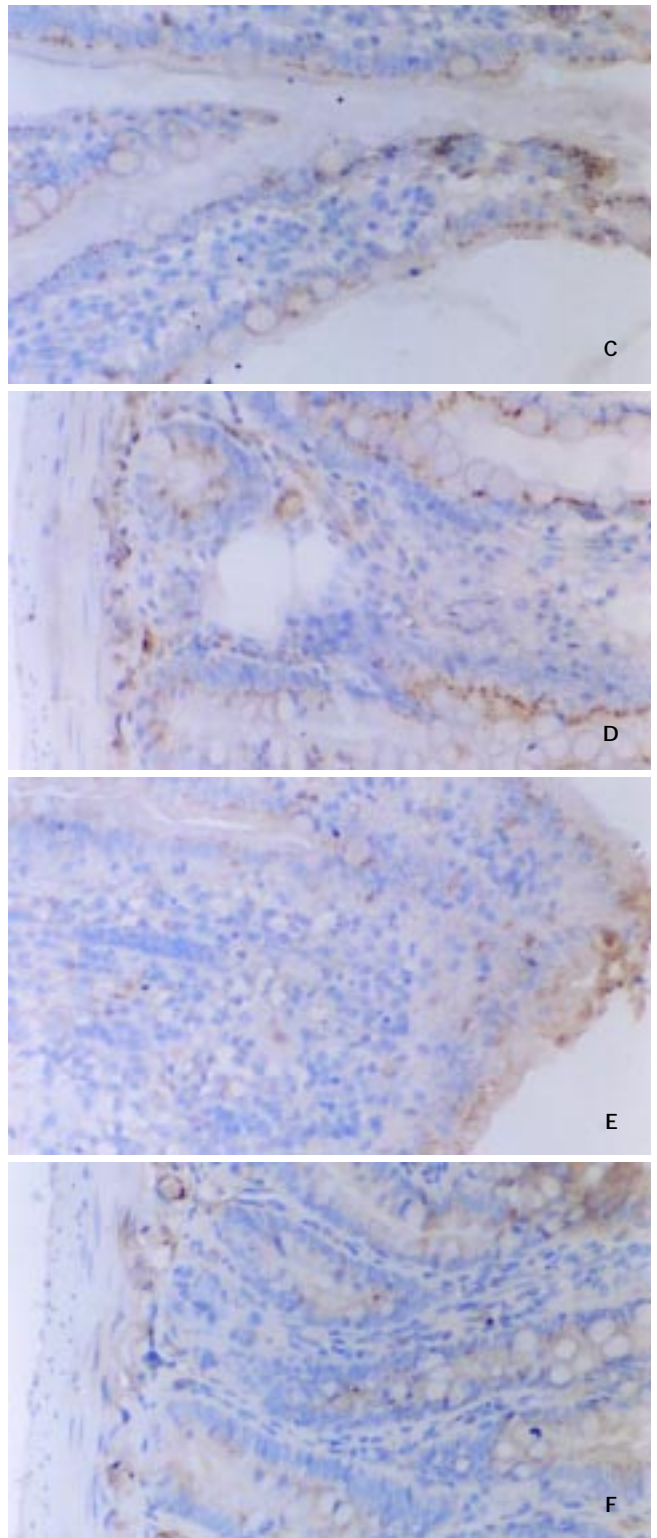
表达的比例也高于R组.E6和E12组主要表现为核内表达,以E6最为显著. E2和E24组主要为胞质内表达(图2-4).



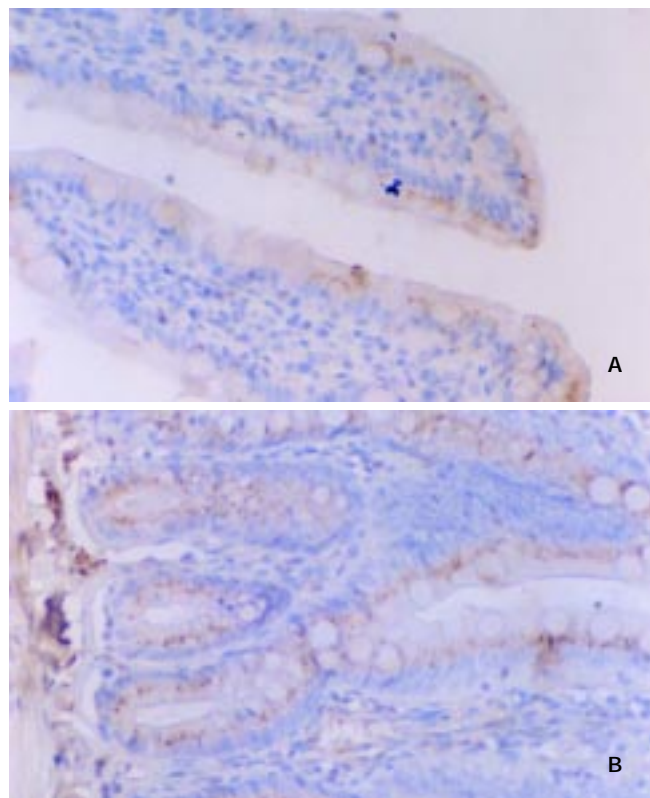
细胞核内出现阳性颗粒的细胞
图2 各组动物小肠绒毛上皮磷酸化 p44/42 MAPK 阳性细胞数量的变化趋势.



细胞核内出现阳性颗粒的细胞
图3 各组动物小肠陷窝磷酸化 p44/42 MAPK 阳性细胞数量的变化趋势.



A:C组小肠绒毛; B:C组小肠陷窝; C:R6组小肠绒毛; D:R6组小肠陷窝; E:E6组小肠绒毛; F:E6组小肠陷窝.
图4 各组动物小肠磷酸化 p44/42 MAPK 的表达.



3 讨论

EGF 是强有力的促细胞分裂因子^[14,15], 对胃肠道黏膜细胞具有促进生长和增生的作用^[16-21], p44/42 MAPK 在胞质内广泛分布, 在未受刺激的细胞内, 主要表现为脱磷酸型, 其苏氨酸和酪氨酸残基被磷酸化后发生激活, 主要与细胞的增生通路有关^[22,23], 已证明 p44/42 MAPK 途径是 EGF 诱导表皮成纤维细胞、角质细胞、

小肠癌细胞 IEC-6 等细胞增生的主要细胞内信号传导通路^[24-27]。在心、肾、肺等多种组织中, 均发现 I/R 损伤可迅速激活 MAPK 信号传导通路, 作为早期细胞内信号参与细胞对应激反应的调节。一般认为 I/R 时 p44/42 MAPK 活性的增加是细胞针对缺氧刺激启动修复过程、促进细胞存活的保护性机制, 对于经历了 I/R 损伤的细胞具有保护作用。在 MAPK 信号途径中的各个组成成分如 p44/42 MAPK、c-fos 的激活均具有相似的分子机制, 都需要保守位点上的双磷酸化作用, 信号转导最终通过基因表达来实现细胞调控, p44/42 MAPK 的磷酸化是 p44/42 MAPK 正在发生功能活动的标志^[28]。EGF 与其受体(EGFR)结合后, 再与 ras 结合, 进而激活 raf-1, raf-1 接着激活 MEK1/MEK2(p44/42 MAPK 的上游激酶), 进而激活 p44/42 MAPK, 后者进入核内, 通过中间反应物介导原癌基因 c-myc、c-fos、c-jun、EIk1、TAL1 等的产生和磷酸化, 影响下游基因的表达, 最终导致细胞的增生反应^[29-33]。p44/42 MAPK 被激活后也可以停留在胞质中, 作用于细胞表面分子如 EGFR、磷脂酶 A2, 启动多条细胞内信号传导通路, 介导胞外环境应激条件信号, 引起细胞内的抗应激反应。

p44/42 MAPK 被激活后, 可以表现为持久激活或短暂激活, 持久激活(活性高的) p44/42 MAPK 可部分转入核内, 可以使相应的转录因子发生磷酸化, 而短暂激活(活性低的) p44/42 MAPK 不能进入核内, 二者由于“入核量”的差异使细胞表达不同质或量的产物, 从而产生不同的细胞生物学效应, 因此 p44/42 MAPK 在转录水平上的差异可以使其产生不同的效应。

本实验中, 在假手术组大鼠的小肠黏膜上皮细胞内, 磷酸化 p44/42 MAPK 主要存在于胞质, 核内表达较少。缺血 45 min 后, 单层柱状上皮和小肠陷窝阳性细胞的比例显著增加, 表明缺血可以迅速激活 p44/42 MAPK 通路, 此时仍主要为胞质内表达。随着再灌注时间的延长, 几乎全部细胞表达磷酸化 p44/42 MAPK, 而肠道组织学改变和血浆 D-乳酸水平的变化表明 I/R 引起肠道损伤, 提示 I/R 损伤持续激活 p44/42 MAPK 通路, 使其参与了 I/R 引起的应激反应。值得注意的是, 无论在绒毛还是陷窝, 核内表达磷酸化 p44/42 MAPK 的细胞数量均随再灌注时间延长而增加, 而进入核内是 p44/42 MAPK 发挥促进细胞增生作用的前提。R 组大鼠核内表达 p44/42 MAPK 的高峰在再灌注后 12 h, EGF 治疗组核内表达的时间较 R 组提前, 持续时间也较 R 组延长。由此看来, EGF 促进了 p44/42 MAPK 的早期激活和核转位。由于绒毛单层柱状上皮主要为分化细胞, 陷窝主要由干细胞、短暂扩充细胞和较初级的增生细胞组成, 磷酸化 p44/42 MAPK 在这些部位的活跃表达表明他与肠道细胞(包括干细胞)的增生与分化有密切联系。本结果表明, 外源性 EGF 参与了肠道内脏损伤的修复过程, 其作用是通过早期激活 p44/42 MAPK 通路, 参与细胞的应激反应, 促进细胞的增生与分化。该结果进一

步证实了我们以前所观察到的采用外源性补充生长因子对缺血性内脏治疗作用的理论^[34]。

4 参考文献

- 1 彭曦, 颜洪, 陶麟辉, 赵云, 王裴, 汪仕良. 早期肠道营养对烧伤大鼠肠黏膜损伤和修复的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:1251-1254
- 2 Leeb SN, Vogl D, Falk W, Scholmerich J, Rogler G, Gelbmann CM. Regulation of migration of human colonic myofibroblasts. *Growth Factors* 2002;20:81-91
- 3 Rongione AJ, Kusske AM, Newton TR, Ashley SW, Zinner MJ, Mcfadden DW. EGF and TGF stimulate proabsorption of glucose and electrolytes by Na⁺/glucose cotransporter in awake canine model. *Dig Dis Sci* 2001;46:1740-1747
- 4 Dignass AU, Sturm A. Peptide growth factors in the intestine. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:763-770
- 5 Eizaguirre I, Aldazabal P, Barrena MJ, Garcia-Arenzana JM, Ariz C, Candelas S, Tovar JA. Effect of growth hormone, epidermal growth factor, and insulin on bacterial translocation in experimental short bowel syndrome. *J Pediatr Surg* 2000;35:692-695
- 6 Koul S, Chaturvedi LS, Sekhon A, Bhandari A, Menon M, Koul HK. Effects of oxalate on the re-initiation of DNA synthesis in LLC-PK1 cells do not involve p42/44 MAP kinase activation. *Kidney Int* 2002;61:525-533
- 7 Llorens F, Garcia L, Itarte E, Gomez N. Apigenin and LY294002 prolong EGF-stimulated ERK1/2 activation in PC12 cells but are unable to induce full differentiation. *FEBS Lett* 2002;510:149-153
- 8 Sah JF, Eckert RL, Chandraratna RA, Rorke EA. Retinoids suppress epidermal growth factor-associated cell proliferation by inhibiting epidermal growth factor receptor-dependent ERK1/2 activation. *J Biol Chem* 2002;277:9728-9735
- 9 Tanimura S, Nomura K, Ozaki K, Tsujimoto M, Kondo T, Kohno M. Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility. *J Biol Chem* 2002;277:28256-28264
- 10 Lewis MD, Ham J, Rees DA, Lewis BM, Scanlon MF. Mitogen-activated protein kinase mediates epidermal growth factor-induced morphogenesis in pituitary GH3 cells. *J Neuroendocrinol* 2002;14:361-367
- 11 Marques SA, Dy LC, Southall MD, Yi Q, Smietana E, Kapur R, Marques M, Travers JB, Spandau DF. The platelet-activating factor receptor activates the extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and induces proliferation of epidermal cells through an epidermal growth factor-receptor-dependent pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:1026-1035
- 12 黎君友, 盛志勇, 吕艺, 于勇, 胡森, 周宝桐. 严重创伤后肠屏障功能损伤及谷氨酰胺的保护. *世界华人消化杂志* 2000;8:1093-1096
- 13 Sun XQ, Fu XB, Zhang R, Lü 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
- 14 陈宝雯, 王洪涛, 刘正新, 贾博琦, 马清钧. 外源性表皮生长因子治疗大鼠慢性胃溃疡对原癌基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 1999;7:504-506
- 15 Xia L, Yuan YZ, Xu CD, Zhang YP, Qiao MM, Xu JX. Effects of epidermal growth factor on the growth of human gastric cancer cell and the implanted tumor of nude mice. *World J Gastroenterol* 2002; 8:455-458
- 16 Chen DL, Wang WZ, Wang JY. Epidermal growth factor prevents gut atrophy and maintains intestinal integrity in rats with acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2000;6:762-765
- 17 Berlanga-Acosta J, Playford RJ, Mandir N. Gastrointestinal cell proliferation and crypt fission are separate but complementary means of increasing tissue mass following infusion of epidermal growth factor in rats. *Gut* 2001;48:803-807
- 18 Reindel JF, Gough AW, Pilcher GD, Bobrowski WF, Sobocinski GP, de la Iglesia FA. Systemic proliferative changes and clinical signs in cynomolgus monkeys administered a recombinant derivative of human epidermal growth factor. *Toxicol Pathol* 2001; 29:159-173
- 19 Avissar NE, Ziegler TR, Wang HT, Gu LH, Miller JH, Iannoli P, Leibach FH, Ganapathy V, Sax HC. Growth factors regulation of rabbit sodium-dependent neutral amino acid transporter ATB0

- and oligopeptide transporter 1 mRNAs expression after enterotomy. *J Parenter Enteral Nutr* 2001;25:65-72
- 20 Duh G, Mouri N, Warburton D, Thomas DW. EGF regulates early embryonic mouse gut development in chemically defined organ culture. *Pediatr Res* 2000;48:794-802
- 21 Stern LE, Erwin CR, O'Brien DP, Huang F, Warner BW. Epidermal growth factor is critical for intestinal adaptation following small bowel resection. *Microsc Res Tech* 2000;51:138-148
- 22 Zhao D, Letterman J, Schreiber BM. Beta-Migrating very low density lipoprotein (beta VLDL) activates smooth muscle cell mitogen-activated protein (MAP) kinase via G protein-coupled receptor-mediated transactivation of the epidermal growth factor (EGF) receptor: effect of MAP kinase activation on beta VLDL plus EGF-induced cell proliferation. *J Biol Chem* 2001;276:30579-30588
- 23 Buder-Hoffmann S, Palmer C, Vacek P, Taatjes D, Mossman B. Different accumulation of activated extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) and role in cell-cycle alterations by epidermal growth factor, hydrogen peroxide, or asbestos in pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;24:405-413
- 24 Kawahara E, Nakada N, Hikichi T, Kobayashi J, Nakanishi I. EGF and beta1 integrin convergently regulate migration of A431 carcinoma cell through MAP kinase activation. *Exp Cell Res* 2002;272:84-91
- 25 Cras-Meneur C, Elghazi L, Czernichow P, Scharfmann R. Epidermal growth factor increases undifferentiated pancreatic embryonic cells in vitro: a balance between proliferation and differentiation. *Diabetes* 2001;50:1571-1579
- 26 Thrane EV, Schwarze PE, Thoresen GH, Lag M, Refsnes M. Persistent versus transient map kinase (ERK) activation in the proliferation of lung epithelial type 2 cells. *Exp Lung Res* 2001;27:387-400
- 27 Harris VK, Kagan BL, Ray R, Coticchia CM, Liaudet-Coopman ED, Wellstein A, Tate Riegel A. Serum induction of the fibroblast growth factor-binding protein (FGF-BP) is mediated through ERK and p38 MAP kinase activation and C/EBP-regulated transcription. *Oncogene* 2001;20:1730-1738
- 28 Feng DY, Zheng H, Tan Y, Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. *World J Gastroenterol* 2001;7:33-36
- 29 Lee JW, Juliano RL. The alpha5beta1 integrin selectively enhances epidermal growth factor signaling to the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in intestinal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1542:23-31
- 30 Oksvold MP, Skarpen E, Wierod L, Paulsen RE, Huitfeldt HS. Re-localization of activated EGF receptor and its signal transducers to multivesicular compartments downstream of early endosomes in response to EGF. *Eur J Cell Biol* 2001;80:285-294
- 31 Jost M, Huggett TM, Kari C, Rodeck U. Matrix-independent survival of human keratinocytes through an EGF receptor/MAPK-kinase-dependent pathway. *Mol Biol Cell* 2001;12:1519-1527
- 32 Pierce KL, Tohgo A, Ahn S, Field ME, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Epidermal growth factor (EGF) receptor-dependent ERK activation by G protein-coupled receptors: a co-culture system for identifying intermediates upstream and downstream of heparin-binding EGF shedding. *J Biol Chem* 2001;276:23155-23160
- 33 赵佐庆, 刘福兰, 张玲. 犬小肠缺血再灌注后 C-fos, PCNA 及 Bax 的表达意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:1021-1026
- 34 Fu XB, Yang YH, Sun TZ, Gu XM, Jiang LX, Sun XQ, Sheng ZY. Effect of intestinal ischemia-reperfusion on expressions of endogenous basic fibroblast growth factor and transforming growth factor β in lung and its relation with lung repair. *World J Gastroenterol* 2000;6:353-355

世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊

本报讯 为了进一步繁荣期刊出版事业, 2002年9月, 经中共中央宣传部同意, 新闻出版总署决定举办第二届国家期刊奖评选活动. 经过反复审核, 全国共推荐出参评科技期刊 522 种. 这些参评期刊经过评选办公室的参评资格审查、出版规范审查、广告内容审查后, 由专家组和评选工作委员会进行评选. 2002年12月初产生评选入围期刊, 并将初评结果在《光明日报》、《科技日报》、《中国新闻出版报》和《中国图书商报》公示, 接受全社会的监督, 最终评出国家期刊奖科技类 30 名, 国家期刊奖提名奖 50 名, 国家期刊奖百种重点期刊 99 名. 世界胃肠病学杂志英文版 (World Journal of Gastroenterology) 获得第二届国家期刊奖百种重点期刊, 并荣获获奖证书、奖杯和获奖徽标.

国家期刊奖是期刊业中最权威的、也是最具影响的奖项. 我们衷心感谢全体编委及作者、读者对世界胃肠病学杂志英文版的支持, 希望在今后能继续得到大家的关心爱护和大力支持, 争取更大的成绩. (世界胃肠病学杂志社 2003-01-23)

捆绑式胰肠吻合术的应用

彭淑牖

彭淑牖, 浙江大学医学院附属第二医院外科 浙江省杭州市 310009
项目负责人: 彭淑牖, 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外科. sypeng@mail.hz.zj.cn
电话: 0571-87783766 传真: 0571-87022776
收稿日期: 2002-07-23 接受日期: 2002-08-26

1	吻合方法对防止胰肠吻合口漏的重要性.....	583
2	胰十二指肠切除术的适应证.....	584
3	胰十二指肠切除术的主要并发症及诊断与治疗.....	587
4	胰十二指肠切除术后胰漏的发生机制.....	589
5	胰肠吻合方法的演进.....	591
6	彭氏捆绑式胰肠吻合术的临床应用.....	593
7	彭氏型捆绑式胰肠吻合术.....	595
8	捆绑式胰肠吻合术防止胰漏的机制.....	596

吻合方法对防止胰肠吻合口漏的重要性

彭淑牖, 刘颖斌

彭淑牖, 刘颖斌, 浙江大学医学院附属第二医院外科 浙江省杭州市 310009
彭淑牖, 男, 1932-11-17 生, 广东省梅县人, 汉族, 1955 年毕业于浙江医科大学, 教授. 主要从事肝、胆、胰外科的临床和基础研究.
项目负责人: 彭淑牖, 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外科. sypeng@mail.hz.zj.cn
电话: 0571-87783766 传真: 0571-87022776
收稿日期: 2002-07-23 接受日期: 2002-08-26

彭淑牖, 刘颖斌. 吻合方法对防止胰肠吻合口漏的重要性. 世界华人消化杂志 2003;11(5):583-584

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/583.htm>

0 引言

自 1935 年 Whipple 发明胰十二指肠切除术(pancreaticoduodenectomy, PD)以来, 胰肠吻合口漏一直是最常见、最严重的并发症, 其危害性主要在于被胆肠液激活的胰酶漏入腹腔, 腐蚀和消化周围组织, 引起致命性大出血、肠漏和不易控制的腹腔感染等, 最终造成患者死亡. 文献报道 PD 后胰肠吻合口漏的发生率在 5-25%, 与之有关的死亡率达到 20-50%. 据美国最有代表性的 2 个胰腺外科中心约翰霍普金斯医院(johns hopkins)和麻省总院(massachusetts general hospital)最近的大宗病例报告, 胰肠吻合口漏的发生率分别为 14% 和 9.2%. 文

献中出现过 30 多种胰肠吻合法, 尤以日本作者为多, 但始终不能完全避免胰肠吻合口漏的发生. 几十年来国内外学者为预防胰肠吻合口漏进行了多方面的研究, 其中胰腺残端的处理为研究的重点, 胰肠吻合是应用最早、最广和最有效的残端处理方法之一, 而其他胰腺残端的处理方法如: 胰胃吻合、胰管节扎、胰管栓塞、全胰切除等都有比较明显的缺陷, 开展受到限制. 合理有效的胰肠吻合的确能够避免吻合口漏的发生.

1 已有的胰肠吻合方法及其优缺点

PD 术后要把胰腺的外分泌液引流入消化道, 即空肠或胃. 相对而言, 胰肠吻合比较方便, 而且符合解剖生理. 1909 年 Coffey 首次通过动物实验证实了胰腺空肠套入吻合的可行性. 所以 Whipple 在施行首例胰十二指肠切除术时就采用胰空肠吻合, 1943 年 Child 将空肠断端上提与胰腺断端吻合, 在其下方行胆管空肠及胃空肠吻合, 同年 Chttel 提出胰十二指肠切除术最主要的问题之一是胰肠吻合, 目前许多单位仍将他列为胰腺残端处理的首选方法, 一些学者将其不断改进, 相继出现了胰空肠套入吻合、胰管与空肠黏膜吻合、空肠浆肌袖与胰腺端端吻合法等.

胰空肠端端套入式吻合、胰管外引流因为操作简单, 直到现在仍有不少外科医生习惯于使用, 但当胰腺质地柔软、胰管细小无法找到, 不能进行胰管外引流时, 有人甚至套入缝合三层或更多, 看起来吻合口的牢固性得到加强, 但实际上他的吻合口漏的发生率几乎没有得到明显的下降. 反而由于吻合口大量的缝合, 增加

了针眼渗漏机会,吻合口间隙渗漏也不能完全避免.有人认为胰管空肠黏膜对黏膜的吻合可兼有胰空肠套入式端吻合的优点,还可较好保持吻合口的通畅率和胰腺功能,对胰腺质地较硬、纤维化和胰管扩张的患者,显然有他的优势,然而吻合技术的高要求,限制了该技术的推广应用,胰肠吻合口漏的发生率略有下降,但也有4-8%.胰肠吻合方法多种多样,但无一能完全避免胰肠吻合口漏的发生.研究和发明避免胰肠吻合口漏的胰肠吻合方法具有重要的临床意义和科学价值.

2 重视胰肠吻合技术的提高,吻合器械和方法的改进胰十二指肠切除术为腹部最大的手术之一,术中要做胰肠、胆肠、胃肠三个吻合口,其中胰肠吻合最重要,也最容易发生吻合口漏.因为胰腺为实质性器官,与空肠进行吻合时张力差异很大,吻合的过程中无论缝合、打结都要求松紧适宜,既不能撕裂胰腺组织又要使二者能够紧贴从而形成愈合面.

吻合时无损伤缝线的应用应该引起足够的重视,以往的缝针针尾往往较粗,缝针穿过后缝线周围留有间隙,一旦穿破毛细小胰管,在主胰管阻塞时毛细胰管会扩张透亮的胰液沿针眼渗出却没有被手术者及时发现,7-10 d后,渗出积聚到一定程度时就形成了胰漏,其中的胰液若被肠液激活,危害性更大.

吻合口漏不仅与吻合方式有关,而且和创伤愈合过程有直接的联系,张圣道教授 et al 发现,在单纯套入式胰肠吻合时,套入部的空肠黏膜给予破坏后可以扩大胰肠吻合口的愈合面,我们也在1999年的实验证实了这一观点.同时我们还进行了捆绑式胰肠吻合术的实验研究,结果发现,将胰腺残端套入空肠后给予同轴捆绑不仅可以消灭两层之间的间隙、促进愈合,而且提高了吻合口的抗破裂压和抗离断力,说明捆绑式胰肠吻合术能够有效的防止胰肠吻合口漏的发生.事实上我们在6a来的近200例临床应用均没有发生胰肠吻合口漏,而全国已有80家医院采用本法,施行了800例均未发生胰肠吻合口漏,效果十分确切.

3 捆绑式胰肠吻合术及其临床意义

捆绑式胰肠吻合术1996年首先在中国实用外科杂志发表,6a来其具体手术方法已见诸文献.通过近6a多的临床应用和改进,其操作已基本规范.甚至有的应用单位和个人称之为彭氏胰肠吻合术加以引用和借鉴.2001年我们又将该术式加以改进,即型捆绑式胰肠吻合术,这种术式更加简化实用,尤其是当胰腺残端较粗时更加适合.

一般认为胰腺质地正常及胰管不扩张时特别容易发生胰肠吻合口漏.捆绑式胰肠吻合术此时更能发挥其作用,因为不论胰腺质地是否正常柔软,胰管有无扩张,都能确保不发生吻合口漏.

近年来PD的适应证有所发展,例如对胆囊癌施行

HPD,对某些中晚期胃癌或复发胃癌施行PD能够挽救一部分患者.这类患者的胰腺质地和胰管均正常,以往由于担心吻合口漏而不敢施行PD,本组中不乏这种患者获得外科切除,就是因为有捆绑式胰肠吻合术作为依靠.

此外,对胰头癌患者近年有不少学者主张扩大根治,一方面手术时间延长,清扫完毕进行吻合时难以集中精力进行精细的黏膜对黏膜吻合,需要一种简便又可靠的方法来完成.另一方面,骨骼化清扫后不但PV、SMV,而且肝动脉、腹腔动脉、肠系膜上动脉、主动脉、下腔静脉、肾静脉等均裸露在手术野中,万一发生胰肠吻合口漏,这些血管都容易受到腐蚀,对生命的威胁极其严重.在这种情况下,捆绑式胰肠吻合术更能起到保护作用.

希望捆绑式胰肠吻合术的应用将对胰腺外科发展起到很大的推动作用.

胰十二指肠切除术的适应证

许斌,刘颖斌,王建伟,曹利平,彭淑牖

许斌,刘颖斌,王建伟,曹利平,彭淑牖,浙江大学医学院第二附属医院浙江省杭州市 310009
项目负责人:许斌,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外科. xubinmd@163.com
电话:0571-85907234
收稿日期:2002-07-23 接受日期:2002-08-31

许斌,刘颖斌,王建伟,曹利平,彭淑牖. 胰十二指肠切除术的适应证. 世界华人消化杂志 2003;11(5):584-587

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/584.htm>

0 引言

1898年意大利Codivilla首次为患者进行了胰头和十二指肠的整块切除,开创了手术治疗胰腺癌的历史^[1]. 1935年美国Whipple为壶腹癌患者成功进行胰十二指肠切除术(PD)之后,吸引了众多医师参与该术式的改进和推广.到40年代末有关该术式的切除范围、吻合方式等问题已日趋规范化.1953年余文光在我国进行了首例胰十二指肠切除术.1980年代以前,由于PD的手术死亡率为10-44%,而5a生存率都<5%,使多数医师感到失望而不能使PD得到广泛应用.1980年代以后PD的手术死亡率降至<5%,而5a生存率升至20%,为此PD手术重新受到重视,不仅得到了广泛开展,而且出现了许多概念上的改变.目前由于手术安全性得到提高,PD的适应证已经放宽了许多,可用于处理

了针眼渗漏机会,吻合口间隙渗漏也不能完全避免.有人认为胰管空肠黏膜对黏膜的吻合可兼有胰空肠套入式端吻合的优点,还可较好保持吻合口的通畅率和胰腺功能,对胰腺质地较硬、纤维化和胰管扩张的患者,显然有他的优势,然而吻合技术的高要求,限制了该技术的推广应用,胰肠吻合口漏的发生率略有下降,但也有4-8%.胰肠吻合方法多种多样,但无一能完全避免胰肠吻合口漏的发生.研究和发明避免胰肠吻合口漏的胰肠吻合方法具有重要的临床意义和科学价值.

2 重视胰肠吻合技术的提高,吻合器械和方法的改进胰十二指肠切除术为腹部最大的手术之一,术中要做胰肠、胆肠、胃肠三个吻合口,其中胰肠吻合最重要,也最容易发生吻合口漏.因为胰腺为实质性器官,与空肠进行吻合时张力差异很大,吻合的过程中无论缝合、打结都要求松紧适宜,既不能撕裂胰腺组织又要使二者能够紧贴从而形成愈合面.

吻合时无损伤缝线的应用应该引起足够的重视,以往的缝针针尾往往较粗,缝针穿过后缝线周围留有间隙,一旦穿破毛细小胰管,在主胰管阻塞时毛细胰管会扩张透亮的胰液沿针眼渗出却没有被手术者及时发现,7-10 d后,渗出积聚到一定程度时就形成了胰漏,其中的胰液若被肠液激活,危害性更大.

吻合口漏不仅与吻合方式有关,而且和创伤愈合过程有直接的联系,张圣道教授 et al 发现,在单纯套入式胰肠吻合时,套入部的空肠黏膜给予破坏后可以扩大胰肠吻合口的愈合面,我们也在1999年的实验证实了这一观点.同时我们还进行了捆绑式胰肠吻合术的实验研究,结果发现,将胰腺残端套入空肠后给予同轴捆绑不仅可以消灭两层之间的间隙、促进愈合,而且提高了吻合口的抗破裂压和抗离断力,说明捆绑式胰肠吻合术能够有效的防止胰肠吻合口漏的发生.事实上我们在6a来的近200例临床应用均没有发生胰肠吻合口漏,而全国已有80家医院采用本法,施行了800例均未发生胰肠吻合口漏,效果十分确切.

3 捆绑式胰肠吻合术及其临床意义

捆绑式胰肠吻合术1996年首先在中国实用外科杂志发表,6a来其具体手术方法已见诸文献.通过近6a多的临床应用和改进,其操作已基本规范.甚至有的应用单位和个人称之为彭氏胰肠吻合术加以引用和借鉴.2001年我们又将该术式加以改进,即型捆绑式胰肠吻合术,这种术式更加简化实用,尤其是当胰腺残端较粗时更加适合.

一般认为胰腺质地正常及胰管不扩张时特别容易发生胰肠吻合口漏.捆绑式胰肠吻合术此时更能发挥其作用,因为不论胰腺质地是否正常柔软,胰管有无扩张,都能确保不发生吻合口漏.

近年来PD的适应证有所发展,例如对胆囊癌施行

HPD,对某些中晚期胃癌或复发胃癌施行PD能够挽救一部分患者.这类患者的胰腺质地和胰管均正常,以往由于担心吻合口漏而不敢施行PD,本组中不乏这种患者获得外科切除,就是因为有捆绑式胰肠吻合术作为依靠.

此外,对胰头癌患者近年有不少学者主张扩大根治,一方面手术时间延长,清扫完毕进行吻合时难以集中精力进行精细的黏膜对黏膜吻合,需要一种简便又可靠的方法来完成.另一方面,骨骼化清扫后不但PV、SMV,而且肝动脉、腹腔动脉、肠系膜上动脉、主动脉、下腔静脉、肾静脉等均裸露在手术野中,万一发生胰肠吻合口漏,这些血管都容易受到腐蚀,对生命的威胁极其严重.在这种情况下,捆绑式胰肠吻合术更能起到保护作用.

希望捆绑式胰肠吻合术的应用将对胰腺外科发展起到很大的推动作用.

胰十二指肠切除术的适应证

许斌,刘颖斌,王建伟,曹利平,彭淑牖

许斌,刘颖斌,王建伟,曹利平,彭淑牖,浙江大学医学院第二附属医院浙江省杭州市 310009
项目负责人:许斌,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外科. xubinmd@163.com
电话:0571-85907234
收稿日期:2002-07-23 接受日期:2002-08-31

许斌,刘颖斌,王建伟,曹利平,彭淑牖. 胰十二指肠切除术的适应证. 世界华人消化杂志 2003;11(5):584-587

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/584.htm>

0 引言

1898年意大利Codivilla首次为患者进行了胰头和十二指肠的整块切除,开创了手术治疗胰腺癌的历史^[1]. 1935年美国Whipple为壶腹癌患者成功进行胰十二指肠切除术(PD)之后,吸引了众多医师参与该术式的改进和推广.到40年代末有关该术式的切除范围、吻合方式等问题已日趋规范化.1953年余文光在我国进行了首例胰十二指肠切除术.1980年代以前,由于PD的手术死亡率为10-44%,而5a生存率都<5%,使多数医师感到失望而不能使PD得到广泛应用.1980年代以后PD的手术死亡率降至<5%,而5a生存率升至20%,为此PD手术重新受到重视,不仅得到了广泛开展,而且出现了许多概念上的改变.目前由于手术安全性得到提高,PD的适应证已经放宽了许多,可用于处理

下列多种复杂的外科情况：

1 胰十二指肠切除术的适应证

1.1 胰头癌及壶腹部癌 历史上最早开展的PD都是用于胰头癌和壶腹部癌患者. 胰头癌和壶腹部癌有共同的临床表现和治疗方式, 尽管后者的预后较好, 但二者能获得长期生存机会的治疗方式均为PD. 由于生物学特性和解剖位置的特殊, 50%以上的胰头癌患者就诊时已属晚期, 即已扩散到腹膜后间隙并累及肠系膜上静脉-门静脉(SMV-PV)系统, 多数学者一直将肿瘤是否侵犯门静脉和肠系膜上静脉作为判断胰头癌能否切除的标志, 这导致了标准根治手术切除率低、术后易复发、5 a生存率低^[2]. Fuhrman et al^[3]的研究表明门静脉和肠系膜上静脉受侵犯主要是由于肿瘤的特殊部位所致, 并不是预后不良的指标. 针对难以切除的胰腺癌及术后复发的病例, Moore于1951年首先报道了受侵肠系膜上静脉联合切除的根治性PD. Fortner于1973年提出了胰腺癌的区域性切除方法(RP). 并进一步将RP手术分为0、I、II三种类型. I型的切除范围: 包括癌肿的全胰或次全胰、部分门静脉、横结肠及其系膜、血管和周围组织、远端胃、十二指肠、胆囊、胆总管. 对门静脉、肝动脉和肠系膜上动脉行骨骼化清扫, 后腹膜淋巴结清扫从膈下开始至肠系膜下动脉, 剥除右肾前1/2的Gerota's筋膜, 清除腹主动脉和下腔动脉前方和两侧的软组织及淋巴结. 肠系膜上静脉和门静脉对端吻合. 残胰、胆总管、胃分别与空肠行Child吻合. 对腹腔动脉、肝动脉和肠系膜上动脉受肿瘤侵犯而进行切除和重建者称为II型. 未对门静脉和上述动脉切除者称为0型. 此后, 不少日本专家也开展了扩大的胰腺癌根治术, 并对其效果提出两种意见. 赞成者认为, 扩大切除术提高了胰头癌的切除率, 并且对可能发生转移的胰周淋巴结和软组织进行了廓清, 减轻了患者的肿瘤负荷, 从而提高5 a生存率. 反对者则认为, 盲目地扩大手术范围并切除腹腔内重要血管, 增加了手术的危险性和手术死亡率, 其术后并发症的机会也会增加, 手术的5 a生存率无明显提高. RP术式未能在临床上广泛开展的原因除了技术上的难度外, 主要是其疗效未得到确定. 但Fortner认为, 术后效果不佳的原因是由于所选病例均为第II、III期胰腺癌患者.

目前国内也有越来越多的医院开展联合肠系膜上静脉-门静脉切除的PD. 按照以往的原则许多患者在剖腹探查后宣布肿瘤无法切除, 导致高达48%的单纯剖腹率, 国外资料^[4]显示常规PD其切除率仅为20%, 而联合血管切除的PD其切除率高达46%. 还有资料^[5]显示联合血管切除的PD使术后5 a生存率提高到20%. 因此结合影像学检查在严格选择的患者中施行联合血管切除的PD可使更多的胰癌得到根治性切除. 有些癌肿看似已侵犯SMV-PV并难于与静脉壁分离但术后病理却证实仅为静脉外膜受侵, 我们对一些病例在用三

头阻断法控制门静脉、肠系膜上静脉、脾静脉血流后安全的进行了PD联合门静脉切除^[6]. 我们还体会到, 特殊手术器械PMOD的应用、捆绑式胰肠吻合术的施行以及PSII管在手术后的保障作用, 对围手术期的成功度过十分重要. 捆绑式胰肠吻合术尤其能有效地防治胰漏的发生, 他消除了医生和患者的后顾之忧. PSII管在术后既有胃肠减压的作用又能给予肠内早期营养支持.

1.2 慢性胰腺炎 慢性胰腺炎是由多种原因所致的胰腺弥漫性或局限性炎症. 由于炎症不断发展, 造成腺体的一系列形态和功能的变化. 在需要外科治疗的慢性胰腺炎患者中, 以难治性腹痛为主要症状者最多见, 其次是梗阻性黄疸、门脉高压、胰头肿块和消化道梗阻. 20 a前PD原则上只用于恶性肿瘤, 且必须有术中病理学证据. 目前已将慢性胰腺炎中有难治性疼痛, 胰头部肿块伴胆、胰管扩张以及不能除外胰癌者正式列为PD的适应证. 理由是慢性炎症与癌肿有时很难鉴别, 且术后疼痛消失或改善者大于90%, 而目前PD手术死亡率较低, 可以作为慢性胰腺炎合理的治疗手段. 切除和引流是慢性胰腺炎手术治疗的两个原则, 外科治疗严重的慢性胰腺炎伴持续性疼痛的方式繁多, 但是实际上只有两类手术方式经常使用且效果较好: (1)胰管引流手术. 包括下列术式: 胰管口成形、Du Val手术(胰尾切除, 胰腺空肠吻合)、Puestow-Gillesby手术(胰尾切除, 胰腺空肠内植入吻合术)、Partington手术(胰管空肠侧侧吻合术)和Warren手术(胰管胃侧侧吻合术). (2)胰腺部分或次全切除. 包括Beger介绍的保留十二指肠的胰头次全切除术, Frey介绍的胰头局限性切除, 以及标准的PD手术. 一般对胰管明显扩张而无肿块者行胰管空肠吻合, 对有胰腺局限性肿块形成者行胰腺切除.

胰头部慢性局限性胰腺炎(FP)又称沟部胰腺炎(groove pancreatitis), 是慢性胰腺炎的一种特殊类型^[7]本病多呈隐匿性发病, 但因炎症的持续发展, 可形成胰头结节段性炎性肿大, 造成胆总管、胰管甚至十二指肠梗阻. 临床上表现为梗阻性黄疸和胰头占位, 常与胰头癌难以鉴别. Gall et al^[8,9]认为对水肿增大及慢性炎性变的胰头行活检常常出现取材读片的错误, 而使诊断不可靠, 即使活检阴性也不能完全除外癌的存在, 此种情况下PD是最合适的手术, 不仅可以解除胆道梗阻还可切除炎症灶中可能存在的癌灶, 而且不至引起胰腺分泌功能低下.

1.3 十二指肠和胰腺的损伤 十二指肠损伤少数为穿透伤所致, 多数为钝性伤所致, 约有80-85%的十二指肠损伤患者可安全的经一期修补而治愈, 约有15-20%的患者为严重损伤而需要复杂的处理^[10]. 对于十二指肠损伤除降部以外的任何一处的损伤均可行清创或节段性切除并一期吻合. 另一种方法是Roux-en-Y型空肠袢与十二指肠损伤段的吻合. 有难以控制的胰腺出血或有十二指肠、壶腹及/或胰腺内段胆管损伤合并存在时须行PD.

胰腺损伤的外科治疗是根据胰腺损伤的程度、部位及有无合并十二指肠、胰管和胰内胆管的损伤来决定不同的术式。胰腺外伤行PD,死亡率高达43%,由于手术难度大、死亡率高、并发症多,临床应用时要严格掌握适应证。Moore根据胰腺损伤的部位、程度及相对应的手术对策,将胰腺损伤分为至度,国内也有人提出不同的分型方法,但都仅对胰头广泛碎裂伤合并十二指肠损伤的患者选择PD。

1.4 胆道恶性肿瘤侵及胰十二指肠区 胆道恶性肿瘤包括胆囊癌和胆管癌。胆囊癌早期不易诊断,部分患者就诊时已累及肝脏、肝门部胆管和胃肠胰等邻近器官。胆管癌根据侵犯范围的不同可采取从单纯胆囊切除术到合并肝脏-胰十二指肠切除术(HPD)这样的扩大根治手术。胆管癌由于其发生位置及恶性程度的特殊,不仅容易直接浸润肝脏或沿Glisson鞘向肝门转移,而且其淋巴转移途径往往为:胆管淋巴结、胆总管淋巴结、胰头后淋巴结及肠系膜上淋巴结,并易直接侵犯胆总管下段及胰头部^[10]。胆管癌行PD即是为了在清除胰十二指肠韧带内的癌浸润和淋巴结转移之后,进一步清除胰后淋巴结和切除受累胰腺。国内、国外文献^[11-14]中均有多例胆管癌行HPD术后长期生存的病例报道。我们已经为17例胆管癌患者施行了HPD,其中1例Nevin V期已无瘤生存6a^[12]。

胆管癌一般是指原发于左右肝管至胆总管下端的肝外胆管癌。肝门部胆管癌根据Bismuth分型的不同一般采用肝外胆道局部切除或联合相应肝段的切除。但也有人提出对于向下蔓延的肝门部胆管癌若累及胰腺也应行包括肝外胆管的根治性PD。中、下段胆管癌目前最有效的治疗仍是根治性的PD。由于胆管癌细胞可以通过血管、淋巴管和神经周围间隙转移至胰十二指肠韧带结缔组织内因此肝门部血管的“骨骼化”处理十分重要,而且应对胆管断端行术中病检以保证足够的切除范围。

1.5 胃结肠肿瘤侵及胰十二指肠区 以往曾将胃癌侵犯胰十二指肠区列为手术的禁忌证,但越来越多的医师已经认识到进展期胃癌通过联合脏器的切除可以提高根治的效果。以前较多的报道是关于胃癌联合左肝和/或结肠的扩大根治切除,近年来出现了许多关于胃癌联合胰十二指肠切除的病例报告和讨论^[15-18]。从胚胎学角度来看,肝脏、胃、十二指肠、胰腺和脾脏都是由前肠延伸而来,包裹在同一系膜之中,彼此的淋巴引流联系在一起,虽然在发育过程中经历了旋转和重排,但他们的血管和淋巴系统仍是密不可分的。换言之,胃的血供和淋巴引流是以腹腔动脉为枢纽并在解剖上与肝、胰、十二指肠、脾、横结肠是不可分隔的。另外,对胃癌淋巴结转移规律的研究已经证实进展期胃癌的转移多不局限于病灶周围的胃旁淋巴结,而可同时累及远离病灶的胃旁淋巴结和深部淋巴结。胃癌淋巴转移按照第1,2,3站顺序规律进行的约占半数,常有中途呈跳跃转移者。对位于胃各区的进展期胃癌,腹腔动脉及其主要分支的根部、肝动脉周围、十二指肠后、胰腺上缘、脾门、

脾动脉周围的淋巴结都有较高的阳性率。因此,当胃癌侵犯邻近脏器时,采用多脏器联合切除术更符合肿瘤整块切除的原则,并有利于系膜淋巴结群的彻底清扫,同时可增加III,IV期胃癌的根治切除机会^[19]。胃远端与胰头紧邻,淋巴结密集且相互交通,胃癌侵犯胰十二指肠主要有以下途径:(1)远端胃后壁癌穿透浆膜,直接侵入胰头。(2)胃癌通过腹膜反折处侵及胰腺浆膜下。(3)胃远端癌侵及十二指肠,再由肠壁侵入胰腺。(4)先发生胰头周围淋巴结转移,再次侵入胰头十二指肠。对于局限型胃癌,癌溃疡(Borrmann II型)呈深掘状,直接侵入胰腺的病例由于淋巴结转移少且晚,最适合联合胰十二指肠切除。由于远端胃癌一旦侵及胰头或十二指肠,容易使第三站淋巴结受侵,故应采用D₃术式。

结肠癌侵犯胰十二指肠区多数是因为癌肿位于结肠肝区而造成,是右半结肠癌手术时较为棘手的问题。由于靠近十二指肠,所以浸润十二指肠时病期相对较早,初次根治性手术时应采取积极合理的扩大术式,包括胰头十二指肠切除或十二指肠局部切除是减少术后复发、延长生存期和改善生存质量的有效措施。

1.6 其他情况 胰头部的少见肿瘤或疾病如:内分泌癌、黏液囊腺癌、浆液囊腺癌、胰头部弥漫性结石以及胰头部的某些囊肿也可采用PD治疗。

2 参考文献

- 沈魁,钟守先,张圣道主编. 胰腺外科. 第1版. 北京:人民卫生出版社, 2000: 432-433
- 彭淑牖, 彭承宏, 吴育连, 刘颖斌. 胰头癌扩大切除的利弊探讨. 中华肝胆外科杂志 2000;6:87-89
- Fuhrman GM, Leach SD, Staley CA, Cusack JC, Charnsangavej C, Cleary KR, El-Naggar AK, Fenoglio CJ, Lee JE, Evans DB. Rationale for en bloc vein resection in the treatment of pancreatic adenocarcinoma adherent to the superior mesenteric-portal vein confluence. *Ann Surg* 1996;223:154-162
- Takahashi S, Ogata Y, Tsuzuki T. Combined resection of the pancreas and portal vein for pancreatic cancer. *Br J Surg* 1994;81:1190-1193
- Conlon KC, Klimstra DS, Brennan MF. Long-term survival after curative resection for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg* 1996;23:273
- 彭承宏, 刘颖斌, 彭淑牖, 吴育连, 史留斌, 陈晓鹏, 高顺良, 徐斌, 孟兴凯. 胰十二指肠联合门静脉切除治疗胰头癌. 肝胆胰外科杂志 2001;13: 83-85
- 王振军, 陈如法, 万远廉, 王彬, 黄廷庭. 胰头部慢性局限性胰腺炎的诊断和处理. 中华外科杂志 1995;33:207-209
- Gall FP, Muhe E, Gebhardt C. Results of partial and total pancreaticoduodenectomy in 117 patients with chronic pancreatitis. *World J Surg* 1981;5:269-275
- Yamaguchi K, Tanaka M. Groove pancreatitis masquerading as pancreatic carcinoma. *Am J Surg* 1992;163:312-316
- Sabiston D C. 克氏外科学. 第15版. 北京:人民卫生出版社, 2000:255
- 彭淑牖, 牟一平, 曹利平, 彭承宏, 蔡秀军, 吴育连, 江献川, 沈正荣, 许元良, 林汉庭, 李君达, 谢隆化. 扩大根治术治疗进展期胆管癌. 外科理论与实践 1999;4:39-42
- 彭淑牖, 牟一平, 蔡秀军, 彭承宏, 曹利平, 吴育连, 林汉庭, 江献川, 沈正荣, 刘颖斌. 中晚期胆管癌 34 例的外科治疗. 中华普通外科杂志 2000;15:328-329
- Kurokawa T, Nonami T, Nakao A, Okuda N, Harada A, Takagi H. The role of extended radical procedures in advanced gallbladder cancer. *Surgery* 1996;120:9:816
- Kondo S, Nimura Y, Hayakawa N, Kamiya J, Nagino M, Uesaka K. Extensive surgery for carcinoma of the gallbladder. *Br J Surg* 2002;89:179-184

- 15 何裕隆,陈创奇,郑章清,彭俊生,刘统成,黄美近,蔡世荣,詹文华. 胃癌侵犯或累及胰十二指肠区域的手术治疗选择. 中国实用外科杂志 2000;20:658-660
- 16 Hirose K, Onchi H, Iida A, Katayama K, Yamaguchi A, Nakagawara G. Surgical results of pancreaticoduodenectomy for carcinoma of the distal third of the stomach. *Int Surg* 1999;84:18-24
- 17 Menjo M, Nimura Y, Hayakawa N, Kamiya J, Kondo S, Nagino M, Miyachi M, Kanai M. Ten-year survival after pancreaticoduodenectomy for advanced gastric cancer: report of two cases. *Hepatogastroenterology* 1999;46:1253
- 18 张雪峰,宗修银,陈源光,曲化远. 根治性胰十二指肠切除在胃癌中的应用. 中华肿瘤杂志 1998;20:145
- 19 彭淑牖. 晚期胃癌不要轻易放弃手术切除的机会. 中国实用外科杂志 2001;21:400-401

胰十二指肠切除术的主要并发症及诊断与治疗

邓贵龙,李海军,刘颖斌,牟一平,彭淑牖

邓贵龙,李海军,刘颖斌,彭淑牖,浙江大学医学院附属第二医院外科 浙江省杭州市 310009
牟一平,浙江大学医学院附属邵逸夫医院外科 浙江省杭州市 310016
项目负责人:邓贵龙,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外科.
电话:0571-87783584 传真:0571-87022776
收稿日期:2002-07-23 接受日期:2002-08-31

邓贵龙,李海军,刘颖斌,牟一平,彭淑牖. 胰十二指肠切除术的主要并发症及诊断与治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(5):587-588

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/587.htm>

0 引言

胰十二指肠切除术(PD)是腹部外科最复杂的手术之一,近年来,对胰腺和壶腹部肿瘤患者 PD 的应用逐渐增加,PD 被认为一种安全、有效的手术. 虽然 PD 在大的医疗中心术后死亡率已降至<5%^[1],但 1990 年以来的资料显示胰十二指肠切除术后并发症仍高为 25-35%^[2-4]. 其术后除了一般腹部外科并发症以外,主要有胰漏、胆漏、出血、腹腔感染以及胃排空障碍等. 如何防治这些致命的并发症,一直是腹部外科医生关注的热点. 本文就近年来对上述并发症所采取的诊治措施进行探讨.

1 胰漏

胰腺手术或胰腺周围脏器手术后腹腔引流液淀粉酶含量超过 1 000 u/L,引流时间超过 2 wk 时,诊断为胰漏^[5]. 胰漏是常见又严重的并发症,其致死率为 20-50%^[6]. 多发生于术后 5-7 d,因手术修补难以成功,一般采用非手术治疗,可采用:(1)有效的引流,保持腹腔引流管通畅,持续吸引. 如果患者症状未能改善,则要考虑做 B 超或 CT 检查,发现胰腺或胰周脓肿应积极施行手术引流;(2)抑制胰液外分泌,一般限于术后 1-2 wk 内.

抑制胰腺外分泌的措施包括:禁食、持续胃肠减压和应用抑制胰腺分泌的药物. 放射疗法也有报道,采用 4 MV 直线加速器照射胰腺,每日 400 rad,连续 5 d,胰腺分泌可以停止. 北京协和医院曾用该法治疗 2 例胰漏,成功 1 例^[7]. 停止照射数周后胰腺外分泌功能可恢复;(3)营养支持. 患者经历大手术后营养状况差,血浆蛋白低时,胰腺断端或吻合口不易愈合,因此营养支持非常重要. 方法包括 TPN、要素饮食,对已形成的胰漏,在 2 wk 后可考虑经口进食.

绝大多数胰漏可自行闭合. Zinner et al^[8]报告的 35 例低流量胰漏(<200 mL/d)平均闭合时间是 76 d;35 例高流量胰漏(>200 mL/d)平均闭合时间是 92 d. 赵平 et al^[9]主张:(1)胰漏持续 3 mo 以上,引流量无减少趋势;(2)引流不畅、反复感染、发热,尤其发现较大的脓腔;(3)腹腔大出血;(4)因胰管断端瘢痕形成导致梗阻性胰腺炎并产生疼痛时,应积极考虑手术治疗. 胰漏的手术方式包括:胰漏窦道切除术、胰漏窦道移植术,切除包括胰漏在内的远侧胰腺和胰漏的内镜治疗.

为了预防胰漏的发生,文献中已出现 20 种方法,大体上包括胰腺残端结扎,胰管栓塞,胰空肠吻合和胰胃吻合等. 目前大多数医院采用胰空肠吻合,其胰肠吻合口漏的发生率仍高达 5-25%^[2-4]. 彭淑牖 et al^[10]设计了捆绑式胰肠吻合术,从 1996 年至今,累计已施行 150 例,没有 1 例发生胰肠吻合口漏,国内也有 80 家医院开展了这项技术,同样没有发生胰肠吻合口漏. 可见胰肠捆绑式吻合是目前避免胰肠吻合口漏的最佳术式.

2 腹腔内出血

2.1 术中出血 多为分离解剖肠系膜上静脉(SMV)、门静脉(PV)或其分支时撕裂破损所致. 术中寻找 SMV 多数主张顺着结肠中静脉干向深部解剖. 彭淑牖 et al^[11]介绍了两种途径:(1)十二指肠横部:作 Kocher 切口之后,向上提紧十二指肠降部,同时将横结肠系膜向下对抗牵拉,即可清楚显露十二指肠横部,继续向远端分离就能很自然地见到 SMV 从十二指肠横部的前面跨越.(2)胰腺下缘:不要直接在胰腺下缘 SMV 的正前方进入. 正确的方法应先在胰体下缘切开后腹膜,然后朝胰颈方向扩大切口. 将胰腺向上向前提起,然后将胰腺后面的疏松组织推开,并向胰颈方向进行解剖,可用手指推开蜂窝组织,而我们使用 POMD 进行推剥,可以十分安全的显露 SMV.

血管损伤出血汹涌时,要保持镇静,切忌用血管钳直接钳夹伤口以免加重损伤. 我们的做法是先采取局部压迫止血,压迫裂口的近端和远端. 倘若手指的压迫会影响下一步的修补,则可以用剥离子压迫,移除局部压迫即可在直视下修补裂口.

2.2 术后出血 手术后早期,多为鲜血自引流管流出,多由于术中止血不彻底或凝血功能障碍所致,应严密观察,立即输液和输血、应用止血药物. 如病情不好转,

- 15 何裕隆,陈创奇,郑章清,彭俊生,刘统成,黄美近,蔡世荣,詹文华. 胃癌侵犯或累及胰十二指肠区域的手术治疗选择. 中国实用外科杂志 2000;20:658-660
- 16 Hirose K, Onchi H, Iida A, Katayama K, Yamaguchi A, Nakagawara G. Surgical results of pancreaticoduodenectomy for carcinoma of the distal third of the stomach. *Int Surg* 1999;84:18-24
- 17 Menjo M, Nimura Y, Hayakawa N, Kamiya J, Kondo S, Nagino M, Miyachi M, Kanai M. Ten-year survival after pancreaticoduodenectomy for advanced gastric cancer: report of two cases. *Hepatogastroenterology* 1999;46:1253
- 18 张雪峰,宗修银,陈源光,曲化远. 根治性胰十二指肠切除在胃癌中的应用. 中华肿瘤杂志 1998;20:145
- 19 彭淑牖. 晚期胃癌不要轻易放弃手术切除的机会. 中国实用外科杂志 2001;21:400-401

胰十二指肠切除术的主要并发症及诊断与治疗

邓贵龙,李海军,刘颖斌,牟一平,彭淑牖

邓贵龙,李海军,刘颖斌,彭淑牖,浙江大学医学院附属第二医院外科 浙江省杭州市 310009
牟一平,浙江大学医学院附属邵逸夫医院外科 浙江省杭州市 310016
项目负责人:邓贵龙,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外科.
电话:0571-87783584 传真:0571-87022776
收稿日期:2002-07-23 接受日期:2002-08-31

邓贵龙,李海军,刘颖斌,牟一平,彭淑牖. 胰十二指肠切除术的主要并发症及诊断与治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(5):587-588

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/587.htm>

0 引言

胰十二指肠切除术(PD)是腹部外科最复杂的手术之一,近年来,对胰腺和壶腹部肿瘤患者 PD 的应用逐渐增加,PD 被认为一种安全、有效的手术. 虽然 PD 在大的医疗中心术后死亡率已降至<5%^[1],但 1990 年以来的资料显示胰十二指肠切除术后并发症仍高为 25-35%^[2-4]. 其术后除了一般腹部外科并发症以外,主要有胰漏、胆漏、出血、腹腔感染以及胃排空障碍等. 如何防治这些致命的并发症,一直是腹部外科医生关注的热点. 本文就近年来对上述并发症所采取的诊治措施进行探讨.

1 胰漏

胰腺手术或胰腺周围脏器手术后腹腔引流液淀粉酶含量超过 1 000 u/L,引流时间超过 2 wk 时,诊断为胰漏^[5]. 胰漏是常见又严重的并发症,其致死率为 20-50%^[6]. 多发生于术后 5-7 d,因手术修补难以成功,一般采用非手术治疗,可采用:(1)有效的引流,保持腹腔引流管通畅,持续吸引. 如果患者症状未能改善,则要考虑做 B 超或 CT 检查,发现胰腺或胰周脓肿应积极施行手术引流;(2)抑制胰液外分泌,一般限于术后 1-2 wk 内.

抑制胰腺外分泌的措施包括:禁食、持续胃肠减压和应用抑制胰腺分泌的药物. 放射疗法也有报道,采用 4 MV 直线加速器照射胰腺,每日 400 rad,连续 5 d,胰腺分泌可以停止. 北京协和医院曾用该法治疗 2 例胰漏,成功 1 例^[7]. 停止照射数周后胰腺外分泌功能可恢复;(3)营养支持. 患者经历大手术后营养状况差,血浆蛋白低时,胰腺断端或吻合口不易愈合,因此营养支持非常重要. 方法包括 TPN、要素饮食,对已形成的胰漏,在 2 wk 后可考虑经口进食.

绝大多数胰漏可自行闭合. Zinner et al^[8]报告的 35 例低流量胰漏(<200 mL/d)平均闭合时间是 76 d;35 例高流量胰漏(>200 mL/d)平均闭合时间是 92 d. 赵平 et al^[9]主张:(1)胰漏持续 3 mo 以上,引流量无减少趋势;(2)引流不畅、反复感染、发热,尤其发现较大的脓腔;(3)腹腔大出血;(4)因胰管断端瘢痕形成导致梗阻性胰腺炎并产生疼痛时,应积极考虑手术治疗. 胰漏的手术方式包括:胰漏窦道切除术、胰漏窦道移植术,切除包括胰漏在内的远侧胰腺和胰漏的内镜治疗.

为了预防胰漏的发生,文献中已出现 20 种方法,大体上包括胰腺残端结扎,胰管栓塞,胰空肠吻合和胰胃吻合等. 目前大多数医院采用胰空肠吻合,其胰肠吻合口漏的发生率仍高达 5-25%^[2-4]. 彭淑牖 et al^[10]设计了捆绑式胰肠吻合术,从 1996 年至今,累计已施行 150 例,没有 1 例发生胰肠吻合口漏,国内也有 80 家医院开展了这项技术,同样没有发生胰肠吻合口漏. 可见胰肠捆绑式吻合是目前避免胰肠吻合口漏的最佳术式.

2 腹腔内出血

2.1 术中出血 多为分离解剖肠系膜上静脉(SMV)、门静脉(PV)或其分支时撕裂破损所致. 术中寻找 SMV 多数主张顺着结肠中静脉干向深部解剖. 彭淑牖 et al^[11]介绍了两种途径:(1)十二指肠横部:作 Kocher 切口之后,向上提紧十二指肠降部,同时将横结肠系膜向下对抗牵拉,即可清楚显露十二指肠横部,继续向远端分离就能很自然地见到 SMV 从十二指肠横部的前面跨越.(2)胰腺下缘:不要直接在胰腺下缘 SMV 的正前方进入. 正确的方法应先在胰体下缘切开后腹膜,然后朝胰颈方向扩大切口. 将胰腺向上向前提起,然后将胰腺后面的疏松组织推开,并向胰颈方向进行解剖,可用手指推开蜂窝组织,而我们使用 POMD 进行推剥,可以十分安全的显露 SMV.

血管损伤出血汹涌时,要保持镇静,切忌用血管钳直接钳夹伤口以免加重损伤. 我们的做法是先采取局部压迫止血,压迫裂口的近端和远端. 倘若手指的压迫会影响下一步的修补,则可以用剥离子压迫,移除局部压迫即可在直视下修补裂口.

2.2 术后出血 手术后早期,多为鲜血自引流管流出,多由于术中止血不彻底或凝血功能障碍所致,应严密观察,立即输液和输血、应用止血药物. 如病情不好转,

应立即开腹探查止血. 发生于手术后 1-2 wk 的出血, 多由于胰肠吻合口漏胰液流入腹腔, 消化腐蚀周围组织所致, 应积极采取非手术治疗; 如有活跃出血时, 可考虑血管造影检查; 如为胃十二指肠动脉残端出血可行动脉栓塞. 必要时进行手术止血.

3 胃肠道出血

术后早期出血可考虑来自三个吻合口、胃黏膜或凝血功能障碍. 分别观察(桥襟)肠腔内引流管和胃管的流出量和性质, 往往可以作出诊断.

3.1 应激性溃疡出血 术后 5-7 d 消化道出血多认为是应激性溃疡出血. 如大量呕血或便血, 出现失血性休克时, 治疗方法应立即大量输血, 同时向胃内注入去甲肾上腺素冰盐水, 应用止血药物. 经静脉输注 H₂ 受体拮抗剂如西米替丁(cimetidine)或雷尼替丁(ranitidine)等以抑制胃酸分泌. 亦可应用生长抑素(somatostatin)及其衍生物. 但如果出血量大, 非手术疗法无效, 必须果断地及时手术 - 清除积满胃腔的血凝块, 电灼散在的溃疡面, 最后作胃造瘘.

3.2 胰肠吻合口出血 多为胰断面的渗血, 是否是被激活的胰酶作用于创面的结果, 尚无定论. 如果保守无效, 应手术探查. 方法是在离开胰肠吻合 1.5 cm 处纵行切开空肠前壁. 从肠腔内观察胰断端和吻合口, 发现出血点即行缝扎止血. 通过这一切口也可探查胆肠吻合口.

4 腹腔内感染

腹腔内感染是一种严重并发症, 多由胰肠吻合口漏、胆漏或腹腔渗血合并感染所致. 患者表现高热、腹痛和腹胀, 食欲下降, 身体日渐消耗, 发生贫血、低蛋白血症等. 这时应加强全身支持治疗, 如输血、血浆、白蛋白等. 应用广谱抗生素, 静脉内营养.

腹腔内感染的预防十分重要, 如麻醉后即静脉输注广谱抗生素. 术中注意无菌操作, 避免胃肠道内容物溢入腹腔. 术中仔细操作, 认真止血. 消化道重建前、后用大量温盐水进行冲洗. 腹腔引流管保持通畅.

5 胆漏

主要临床表现: 术后或拔 T 管后逐渐或突然出现的腹痛、腹膜炎症状, 肝下引流出较多的胆汁样液体, 常伴有发热、黄疸以及恶心、呕吐等. 诊断主要依据手术史、临床表现、腹穿、B 超及胃镜检查等.

患者出现胆漏及胆汁性腹膜炎症状后即予以右侧卧位或半卧位、禁食、胃肠减压、补充水电解质、静注抗生素、适当支持治疗, 应用胃肠外营养. 然后根据胆

漏大小和病情轻重选择手术治疗或非手术治疗. 胰十二指肠切除术应严防胆漏的发生, 一旦发生必须保持通畅引流. 倘若引流不畅通, 有腹膜刺激征者应手术探查.

6 胃排空障碍(DGE)

Yeo et al^[12]报告, 保留幽门的胰十二指肠切除术(PPPD)占 82%, 最常见的术后并发症为 DGE. 可见 DGE 最常见于 PPPD 术后. 预防方法是注意避免损伤 Latarget 神经及其分支, 尽可能保留胃小弯侧的血运, 吻合前先用手指扩张幽门. 为此, 可以施行预防性胃造瘘和空肠造瘘. DGE 一旦发生应通过腹部 B 超或胃管内注入水溶性造影剂, 排除吻合口瘘及机械性梗阻后, 多可保守治疗痊愈, 包括: 胃减压、胃或空肠造瘘营养支持治疗, 中药治疗等.

我们诊断 DGE 的标准定为: 须留置胃管超过 7 d, 7-10 d 定为轻度, 11-14 d 为中度, 14 d 以上为重度. 总体上老年人容易发生 DGE, 近年来我们对老年患者行 PPPD 时多采用预防性胃造瘘口安置 PS 型导管, 起到胃减压和肠营养的作用, 对预防 PPPD 术后发生的 DGE 取得了满意的效果^[13].

7 参考文献

- Lillemoe KD. Current management of pancreatic carcinoma. *Ann Surg* 1995;221:133-148
- Trede M, Schwall G, Saeger HD. Survival after pancreaticoduodenectomy. 118 consecutive resections without an operative mortality. *Ann Surg* 1990;211:447-458
- Cameron JL, Pitt HA, Yeo CJ, Lillemoe KD, Kaufman HS, Coleman J. One hundred and forty-five consecutive pancreaticoduodenectomies without mortality. *Ann Surg* 1993;217:430-438
- Grace PA, Pitt HA, Tompkins RK, DenBesten L, Longmire WP Jr. Decreased morbidity and mortality after pancreaticoduodenectomy. *Am J Surg* 1986;151:141-149
- 沈魁, 钟守先, 张圣道主编. 胰腺外科学. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000:402-405
- 王宇, 杜威, 许元弟. 预防胰十二指肠切除术后并发胰、胆瘘的体会. *中华外科杂志* 1988;26:729
- 赵平, 曾宪九. 胰腺创面不同处理方法对愈合的影响. *中华实验外科杂志* 1986;1:13
- Zinner MJ, Baker RR, Cameron JL. Pancreatic cutaneous fistulas. *Surg Gynecol Obstet* 1974;138:710-712
- 赵平, 朱预, 曾宪九. 胰瘘的引流. *普外临床* 1988;3:122-123
- 彭淑牖, 吴育连, 彭承宏, 江献川, 牟一平, 王家骅, 蔡秀军, 李君达, 陆松春, 徐明坤. 捆绑式胰肠吻合术(附 28 例报告). *中华外科杂志* 1997;3:158-159
- 彭淑牖, 刘颖斌, 徐军明. 如何防治胰十二指肠切除术并发症. *肝胆外科杂志* 2000;2:86-87
- Yeo CJ, Cameron JL, Sohn TA, Lillemoe KD, Pitt HA, Talamini MA, Hruban RH, Ord SE, Sauter PK, Coleman J, Zahurak ML, Grochow LB, Abrams RA. Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complication and outcome. *Ann Surg* 1997;226:248-260
- 彭淑牖, 刘颖斌, 王家骅, 彭承宏, 蔡秀军, 吴育连, 牟一平. 保留幽门的胰十二指肠切除术后胃排空障碍的预防和治疗. *中国实用外科杂志* 1999;6:344-345

胰十二指肠切除术后胰漏的发生机制

王建伟, 许斌, 蔡秀军, 李海军, 刘颖斌, 彭淑牖

王建伟, 许斌, 李海军, 刘颖斌, 彭淑牖, 浙江大学医学院第二附属医院外科
浙江省杭州市 310009
蔡秀军, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院外科 浙江省杭州市 310016
项目负责人: 王建伟, 310009, 浙江省杭州市解放路88号, 浙江大学医学院附属
第二医院外科. jwewa@163.com
电话: 0571-87230506
收稿日期: 2002-07-23 接受日期: 2002-08-31

王建伟, 许斌, 蔡秀军, 李海军, 刘颖斌, 彭淑牖. 胰十二指肠切除术后胰漏的发生
机制. 世界华人消化杂志 2003;11(5):589-590

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/589.htm>

0 引言

自1935年Whipple施行胰十二指肠切除术(pancreaticoduodenectomy, PD)以来, 胰漏一直是术后最常见最严重的并发症, 其危害性主要在于被胆肠液激活的胰液漏入腹腔, 腐蚀消化周围组织, 引起致命性大出血或不易控制的感染最终造成患者死亡. 文献报道, PD术后胰漏发生率在5-25%之间, 而胰漏致死率可高达20-50%. 研究其发生机制是胰腺外科的重要内容.

1 胰漏的定义

在文献资料上胰漏(pancreatic leakage)或瘘(fistula)是同一概念. 从一般的含义上来讲, 胰漏是指胰液从损伤破裂的胰管漏出. 胰液少量漏出, 被周围组织包裹可形成假性囊肿; 若流入腹腔内可导致胰性腹水; 若胰液由于胰管破裂后向后方引流进入腹膜后, 此后再向上引流进入纵隔和胸腔可引起胰性胸水; 若经过一个慢性过程形成瘘管, 则称为胰瘘, 包括胰内瘘和胰外瘘.

术后胰漏的定义不完全相同, 普遍采用的定义指术后3d以上手术放置的引流管引出含淀粉酶(AMS)大于正常血清淀粉酶3倍以上的引流液, 液体量每天超过50ml, 或经放射学检查证实者^[1]. 也有作者报告将引流液AMS>1000 u/L^[2]或2000 u/L^[3]作为诊断胰漏的标准.

2 引发胰漏的危险因素

许多专家研究认为影响胰漏发生的危险因素包括: 胰管细小, 胰腺质地柔软, 年龄大于65岁, 高胆红素血症, 急诊手术, 失血量较大等^[4]. 更尤其是胰腺质地和胰管大小近年来得到广泛研究, 被认为是胰漏发生的重要因素. 由于纤维化, 质硬的胰腺残端易于缝合, 且往往胰腺纤维化提示胰腺外分泌功能不全, 故术后发生胰漏的可能性较小. Hamanaka et al^[5]研究发现, 无纤维化胰腺PD术后胰漏率约为12-28%, 而

纤维化胰腺PD术后胰漏率仅为5-9%, 二者显著差异. 胰管细小, 不易行黏膜对黏膜缝合, 可增加胰漏的危险性, 胰管扩张则减少胰漏的危险性.

上述高危因素多为客观存在而不能由外科医生来改变. 从外科手术的角度来看, 胰十二指肠切除术后胰腺残断的处理及吻合方式等技术性因素是影响胰漏的重要因素.

3 胰漏的表现形式

胰漏的具体表现有两种形式, 一种为胰肠吻合口漏, 是肠腔内的消化液突破了吻合口的薄弱环节和/或肠管压力增高, 进入腹腔. 因此与吻合技术和方式有关. 这种胰漏由于胰酶被肠道消化液激活, 破坏性极大, 可导致许多致命并发症, 如腹腔出血、感染等. 另一种为胰液单纯漏, 是在缝合时缝针穿过毛细胰管造成胰液外渗. 由于未被消化液激活, 单纯的胰漏可自行愈合.

4 吻合方式对胰漏的影响

PD术时可供用于引流胰液的空腔脏器只有两个: 空肠和胃. 胰胃吻合尽管有潜在优点, 但应用的普及程度远不如胰空肠吻合. Fabre et al^[6]的胰胃吻合组中, 胰漏发生率仅为2.5%, 但再手术率高达12%, 主要是由于胰腺断端出血与胃排空障碍. Arnaud et al^[7]通过91例胰空肠吻合和80例胰胃吻合的手术后观察发现二者胰漏的发生率并无显著差别. John Hopkins医院于1993-05/1995-11进行了一项大样本前瞻性研究, 结果显示胰胃吻合术和胰空肠吻合术二者术后胰漏率相当, 分别为12.3%(9/73)和11.1%(8/72)^[8]. 这一研究证明, 胰胃吻合与胰空肠吻合术后胰漏及并发症率均类似, 但胰胃吻合有生理性胰酶不足而影响消化之虞.

胰空肠吻合是应用最早最广的胰残端处理方法. 目前大多应用套入式端端或端侧胰空肠吻合和胰管对空肠黏膜(即黏膜对黏膜)端侧胰空肠吻合. Bartoli et al^[9]复习15a的世界文献, 套入式端端胰空肠吻合1037例和端侧吻合583例, 黏膜对黏膜端端侧吻合741例, 术后胰漏率分别为11.7%(121/1037)、16.5%(96/583)、11.5%(85/741). 这表明套入式端端与黏膜对黏膜胰空肠吻合后胰漏率相类似, 明显低于套入式端侧吻合. 北京协和医院^[10]对套入式端端胰空肠吻合和胰管空肠端侧吻合进行了改进, 设计了胰管空肠吻合、胰残端套入法, 胰漏发生率为2.5%.

5 胰漏的发生机制

5.1 吻合口的潜在间隙 吻合口存在的潜在间隙包括针距间隙和线周间隙. 综观各种吻合方法, 不论是单层缝合还是双层缝合, 在两针之间总有间隙, 有可能成为胰漏发生的“突破口”. 吻合时, 吻合口浆膜面不完整, 缝针针尾直径大于缝线, 缝线穿过针眼后周围存有间隙, 若缝到扩张的外周小胰管, 胰液可通过针眼渗漏.

5.2 肠腔内压力增高 PD术后(尤其是采用Roux-en-Y吻合时),由于一部分上胃肠道的神经支配受影响、激素分泌和代谢紊乱以及空肠缺血等原因,可发生术后早期空肠“麻痹”,空肠桥襻蠕动功能消失,表现为肠管扩张、肠内容物瘀滞,造成“功能性肠梗阻”。Keck et al^[11]将一硅胶管的一端置于胰腺空肠、胆总管空肠吻合口之间的肠腔内,另一端自然引流至体外,目的是减轻吻合口的张力、减少胰液、胆汁、肠液的混合液潴留,结果76例患者仅2例发生胰痿(2.7%)。彭淑牖 et al^[12]使用造瘘减压肠营养组合管(型PS管),在胰十二指肠切除术后通过胃或桥襻造口可同时减压胃、胆道及引流胰液,不仅提供了合理的营养支持,更起到了术后的安全保障作用。

胰肠吻合有较长的空肠桥襻,术后早期胰液和胆汁在肠腔的积聚,增加肠内压和肠襻重量,可导致肠扭曲,容易出现输出襻综合征。结肠后胃空肠吻合需修补横结肠系膜裂孔,Treitz韧带离断处的侧腹膜也要修补,若未予修补或修补不当则容易发生内疝。这些因素均增加胰空肠吻合口的张力,甚至吻合口破裂,胰液渗漏。

5.3 吻合口愈合差 胰腺与空肠黏膜是两种性质不同的组织。肠管黏膜本身不具有愈合功能。胰腺为实质性器官,在与空肠进行吻合时,不同于胃-空肠和空肠-空肠之间的简单吻合。空肠切断时黏膜容易外翻,加之空肠黏膜具有较强的分泌功能,套入后会有一定的分泌液积聚在胰肠吻合的两层之间,使二者之间的间隙加大,不利于愈合。

术中解剖层次不清,操作粗暴,胰腺损伤严重,吻合层次不清晰、胰腺血管破坏过多、空肠断端未保留充分的血管弓,血运不良等因素均可导致吻合口缺血,影响愈合。

5.4 胰腺的残留 PD术中钩突未能完全切除,钩突胰管断裂或不完整,残留的胰腺组织也可能在手术后发生出血、坏死,从而导致胰液渗漏到腹腔内。Sung et al^[13]研究新鲜尸检发现胰断端的无数小动脉分支和小胰管为胰漏的来源,据此设计了一种套入式胰肠吻合,以防止胰漏。

5.5 胰酶对胰肠吻合的消化作用 胆肠液积聚或逆流至胰肠吻合口,则可激活胰酶,腐蚀吻合口,而发生漏。因此近年来许多作者都采用胰管插管引流来防止吻合口被腐蚀,胰管引流管可通过桥襻引出体外,也可剪短后留置肠内使管端超过胆肠吻合口,这种方法固然能够减少胰肠吻合口漏的发生,但却不能避免其发生。

彭淑牖根据以上胰漏发生的途径和机制,认为针孔的存在是引发胰肠吻合口漏的根本原因,设计了捆绑式胰肠吻合术。其防止胰漏的机制是:胰腺的断端

与空肠的缝合仅穿过黏膜层,保持浆肌层完整,吻合口没有针眼外露;也是极重要的一点,是在胰腺套入空肠后,环绕空肠和胰腺进行捆绑,使空肠与胰腺紧密相贴,创造一个密封面,阻止液体在两层之间的流通;从而消除了引发胰肠吻合口漏的突破口,为了促进胰腺残端与空肠的愈合,与胰腺紧贴的空肠黏膜用电凝或石炭酸破坏,避免了这两种结构间的液体积聚。从根本上防止了胰漏发生的可能性,临床应用150例,均未发生胰肠吻合口漏^[14,15]。捆绑式胰肠吻合术有望成为一种标准术式。

6 参考文献

- 1 Yeo CJ, Cameron JL, Sohn TA, Lillemoe KD, Pitt HA, Talamini MA, Hruban RH, Ord SE, Sauter PK, Coleman J, Zahurak ML, Grochow LB, Abrams RA. Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complications, and outcomes. *Ann Surg* 1997;226:248-257
- 2 Tsuji M, Kimura H, Konishi K, Yabushita K, Maeda K, Kuroda Y. Management of continuous anastomosis of pancreatic duct and jejunal mucosa after pancreaticoduodenectomy: historical study of 300 patients. *Surgery* 1998;123:617-621
- 3 Bottger TC, Junginger T. Factors influencing morbidity and mortality after pancreaticoduodenectomy: critical analysis of 221 resections. *World J Surg* 1999;23:164-171
- 4 Berberat PO, Friess H, Kleeff J, Uhl W, Buchler MW. Prevention and treatment of complications in pancreatic cancer surgery. *Dig Surg* 1999;16:327-336
- 5 Hamanaka Y, Nishihara K, Hamasaki T, Kawabata A, Yamamoto S, Tsurumi M, Ueno T, Suzuki T. Pancreatic juice output after pancreatoduodenectomy in relation to pancreatic consistency, duct size, and leakage. *Surgery* 1996;119:281-287
- 6 Fabre JM, Arnaud JP, Navarro F, Bergamaschi R, Cervi C, Marrel E, Domergue J. Results of pancreatogastrostomy after pancreatoduodenectomy in 160 consecutive patients. *Br J Surg* 1998;85:751-754
- 7 Arnaud JP, Tuech JJ, Cervi C, Bergamaschi R. Pancreatogastrostomy compared with pancreaticojejunostomy after pancreaticoduodenectomy. *Eur J Surg* 1999;165:357-362
- 8 Yeo CJ, Cameron JL, Maher MM, Sauter PK, Zahurak ML, Talamini MA, Lillemoe KD, Pitt HA. A prospective randomized trial of pancreatogastrostomy versus pancreaticojejunostomy after pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 1995;222:580-588
- 9 Bartoli FG, Arnone GB, Ravera G, Bachi V. Pancreatic fistula and relative mortality in malignant disease after pancreaticoduodenectomy. Review and statistical meta-analysis regarding 15 years of literature. *Anticancer Res* 1991;11:1831-1848
- 10 赵玉沛,蔡力行,钟守先. 胰管空肠吻合胰残端套入法预防Whipple术后胰痿发生. *中华外科杂志* 1993;31:360-362
- 11 Keck H, Steffen R, Neuhaus P. Protection of pancreatic and biliary anastomosis after partial duodenopancreatectomy by external drainage. *Surg Gynecol Obstet* 1992;174:329-331
- 12 彭淑牖,彭承宏,吴育连,沈宏伟,江献川,苏英,蔡秀军,牟一平. 减压营养组合导管在胃癌术后的应用. *中国实用外科杂志* 1998;18:462-464
- 13 Sung JP, Steward RD, O'Hara VS, Westpal KF, Wilkinson JE, Hill J. A study of forty-nine consecutive Whipple resection for periampullary adenocarcinoma. *Am J Surg* 1997;174:6-10
- 14 彭淑牖,刘颖斌,牟一平,蔡秀军,彭承宏,吴育连,方河清,沈宏伟. 捆绑式胰肠吻合术-150例临床应用. *中华医学杂志* 2002;82:368-370
- 15 Peng S, Mou Y, Cai X, Peng C. Binding pancreatocoejunostomy is a new technique to minimize leakage. *Am J Surg* 2002;183:283-285

胰肠吻合方法的演进

白明东,刘颖斌,李海军,彭淑牖

白明东,刘颖斌,李海军,彭淑牖,浙江大学医学院附属第二医院外科
浙江省杭州市 310009
项目负责人:白明东,310009,浙江省杭州市解放路 88 号,浙江大学医学院附属
第二医院外科.
电话:0571-87783584
收稿日期:2002-07-23 接受日期:2002-08-31

白明东,刘颖斌,李海军,彭淑牖. 胰肠吻合方法的演进. 世界华人消化杂志 2003;
11(5):591-593

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/591.htm>

0 引言

胰腺部分切除尤其是胰十二指肠切除术(Pancreaticoduodenectomy, PD)是治疗胰腺和壶腹周围恶性肿瘤的主要方法. 后者手术复杂, 创伤大, 并发症多, 死亡率高. 尽管 20 年来随着外科学技术的进步, PD 术后死亡率已降至 5% 以下, 但是术后并发症仍高达 27-50%, 其中源于胰肠(胃)吻合口者占主要部分, 并且最为常见和严重, 其发生率为 5-25%, 与之有关的死亡率达 20-50%^[1-4]. 胰肠(胃)吻合的处理是影响胰肠吻合口漏发生的最关键性因素. 自 1935 年 Whipple et al 首次报道 1 例二期胰十二指肠切除术以来, 有关的研究一直在不断进行, 逐渐演进了标准的胰肠(胃)吻合方法, 并由此衍生出多种手术改型及各种辅助处理方法, 他们有着各自不同的效果.

1 胰肠吻合(Pancreaticojejunostomy, PJ)

胰十二指肠切除术开展的早期常规的做法是采用胰管结扎而不做吻合. 其理论原理在于避免了胰消化道吻合, 因此即便有高达 50-100% 的胰漏率, 但因无胰酶激活, 其并发症也是非致命性的^[5-8]. 且与其他方法相比, 死亡率并无不同^[9]. 采用氯丁二烯橡胶(neoprene)进行胰管栓塞首先成功用于胰腺移植和慢性胰腺炎, 后来用于 PD 术后残胰管的处理, 其胰漏率为 4-7%^[9-11], 与胰漏有关的死亡率为 12.5%^[9]. 与胰管结扎相比, 已有显著降低. 胰管栓塞或结扎的最大缺点是导致残留胰腺外分泌功能的立即和永久性丧失, 以及内分泌功能渐进性损害, 造成术后生活质量显著下降. 因此, 除选择性用于少数患者, 尤其是胰腺质地柔软难以进行缝合处理者外, 现已逐渐弃用.

1909 年 Coffey 首次通过犬的实验证实了胰腺空肠套入式吻合(逆行性胰腺引流)的可行性. 在意识到胰管结扎的弊端后, Hunt 于 1941 年首次将其用于 PD 胰腺残端的处理, 目的在于保留胰腺外分泌功能和减少胰漏的发生. 空肠血运丰富, 活动度大且适应性广, 而且大多数胰腺残端与空肠管腔相适配, 残端可安全游离 4-5 cm, 便于吻合. 其基本术式包括: (1)套入式端端胰肠吻合. (2)套入式端侧胰肠吻合. (3)胰管对黏膜端侧胰肠吻合. Bartoli et al^[9]复

习 15a 世界文献, 三者的胰漏率分别为 11.7%(121/1037)、16.5%(96/583)和 11.5%(85/741), 显示套入式端端与胰管对黏膜端侧胰肠吻合有相似的胰漏率, 明显低于套入式端侧胰肠吻合.

胰管对黏膜的吻合除了有与套入式胰肠吻合相似的胰漏率外, 尚在保持吻合通畅性和残留胰腺外分泌功能方面具有优势^[12], 近年来备受推崇. 理论上, 只要技术上可行, 应尽可能行胰管对黏膜吻合. Howard^[13]甚至认为胰管对黏膜吻合比套入式端端胰肠吻合安全性更高, 且不论胰管多细均可施行. 缝合方法与胰腺质地及胰管大小可影响其效果. Ohwada et al^[14]对 43 例 PD 患者采用 5-0 或 6-0 单丝可吸收缝线 Polydioxanone (PDSII) 进行连续缝合, 结果总胰漏率为 2.2%(1/46), 其中胰管直径 2 mm 者胰漏率为 7.7%(1/13), 胰腺柔软和正常者为 4.3%(1/23). Tsuji et al^[15]和 Hwang et al^[16]则同时比较了胰管对黏膜间断缝合和胰管对黏膜连续缝合, 结果显示后者胰漏率明显低于前者. 作者们认为连续缝合操作迅速, 组织对合严密, 止血性及密封性好, 张力分布均匀, 并可避免在狭窄空间过多打结而可能造成的胰管和胰腺损伤.

吻合方法的选择对防止胰漏的发生起重要作用. 一般认为, 对胰腺柔软和(或)胰管细小者采用套入式端端胰肠吻合更能减少胰漏, 而对胰腺纤维化和(或)胰管扩张者采用导管对黏膜吻合则更为安全. 套入式端端胰肠吻合操作相对简单, 缺点是胰腺残端有时不易套入或无法套入肠内而需行残端楔形切除, 相应增加发生胰漏的危险性, 且胰腺残端暴露于肠腔内, 易发生胰腺残端断面组织过度坏死和胰管开口处过度瘢痕化而造成胰液排泌受阻和慢性胰腺炎. 胰管对黏膜吻合优点是胰腺残端断面被空肠浆膜覆盖, 不易出现组织坏死和出血, 可较好保持吻合处通畅性, 缺点是操作繁琐和技术上较为困难.

针对各自的优缺点, 相继出现了一些手术改型, 如在套入式端端吻合中结合胰管对黏膜的吻合方法. 一种做法是将空肠断端黏膜 1 wk 行荷包缝合缩窄, 缝闭胰腺断端, 将带支撑管的胰管送入空肠腔内, 结扎荷包缝合线, 最后完成端端套入吻合^[17]; 另一种做法是将胰管与空肠断端后唇上切开的一个小孔做吻合, 使后唇覆盖于胰腺的断面后, 再行端端套入式吻合. 采用该术式的 PD 术后胰漏率为 2.5%(3/118), 术后 1 a 内能随诊到的患者中需补充胰酶者仅占 16%(12/74)^[18]; 第三种做法是将空肠断端双折后在其顶端做孔, 空肠腔内插入肠道吻合器(GIA 50, 长度 75 mm), 使双折的空肠形成一个双层空肠段. 关闭开孔, 另行切一小孔后行胰管对黏膜吻合(带或不带支撑管), 最后完成套入^[19]. 以上方法多因病例少或缺乏前瞻性对比研究, 其效果尚需做进一步评价.

新近彭氏设计了一种新的吻合方法, 即捆绑式胰肠吻合术^[20-24]. 其理论基础和优点在于: (1)在第一道吻合时, 胰管及胰腺断端与空肠缝合时缝针仅缝至黏膜

下层而不穿透浆肌层,结果无针眼外露。(2)采用胰管对黏膜的吻合方法,如胰管细小,仅吻合胰管后唇与肠黏膜后唇,如此可保持良好的吻合部通畅性。且因胰腺断面被空肠黏膜覆盖,减少了胰腺残端断面的出血、感染和过度瘢痕化。(3)将胰腺残端套入富有血供的空肠浆肌鞘,有利于吻合处迅速愈合。(4)主要在于将空肠浆肌鞘与胰腺残端同轴捆绑,消除了吻合组织间的间隙,从而完全阻断了液体在两层面间的流通,因此能够有效防止胰肠吻合口漏的发生,同时也缩短了吻合时间。临床100例应用结果表明,该手术方法预防胰肠吻合口漏效果确切,也能较好地保持残留胰腺外分泌功能,且不论胰腺质地软硬和(或)胰管有无扩张均适用。动物实验也表明这种方法安全可靠,且可较好保持吻合部通畅性。

胰肠吻合口支撑管的运用能否减少胰肠吻合口漏的发生和降低死亡率尚无统一意见。一些学者认为有一定作用,另一些学者则认为无益甚至有潜在害处。但临床报告及实验资料均提示内支撑的运用可能会对吻合部通畅性的保持起一定作用。是否运用支撑管主要依赖于各人的偏好。

2 胰胃吻合(Pancreaticogastrostomy, PG)

1934年Tripodi和Sherwin首次通过犬实验证实了胰胃吻合的可行性,继后被许多学者所证实。1946年Waugh和Clagett首次报道1例PD胰胃吻合,此后20a少有应用。1967年Park et al再次介绍这一技术,后来应用有增多趋势,但总例数仍然较少,至1993年仅为372例,远少于胰肠吻合术,累计资料结果显示胰肠吻合口漏率为1.8%,死亡率为4.0%,与胰肠吻合口漏有关的死亡占0.2%。胰胃吻合作为PD术后减少胰肠吻合口漏发生率的术式近年来备受推崇。提倡者认为有以下优点:(1)胰腺与胃后壁紧贴,利于无张力吻合。(2)胃壁厚软,血供好,利于吻合部愈合。(3)胃腔大,无胰肠吻合出现的套入困难。(4)胃腔大,外层缝合可在胃腔内行内侧缝合,使其更加牢固。(5)由于胃酸的作用和缺乏肠激酶,胰酶不能被激活,可减少胰胃吻合口的消化作用。(6)无长的空肠襻,可避免因大量胰液和胆汁聚积使腔内压增高而产生的牵拉作用,从而减少吻合部裂开的危险性。(7)可通过胰液分泌量判断吻合部通畅程度,并可通过胃镜直接观察吻合口情况。但胰胃吻合与胰肠吻合相比其安全性是否更优尚有争论。Yeo et al^[2]的一项前瞻性随机研究结果表明,胰胃吻合和胰肠吻合的胰肠吻合口漏率分别为12.3%和11.1%,二者无显著性差异,且二者术后并发症率和术后住院时间均相近,并不支持PG较PJ安全的假设。他认为以往的研究均有一定局限性,如病例少,非随机性及对高危胰肠吻合口漏的病例处理的两种方法缺乏可比性,而且对胰肠吻合口漏的定义缺乏统一标准。

胰胃吻合的最大缺点是从解剖及生理学上改变了胰肠间的自然顺序。此外,胰酶受酸性胃液破坏而可影响

消化功能,酸性胃液还可导致胰腺残端过度坏死、纤维化和继发性胰管阻塞^[17]。

3 胰管的处理和胰肠(胃)吻合部的通畅性

胰肠(胃)吻合中胰管的处理效果尚不令人满意。由于继发性狭窄和胰肠吻合口漏,经常导致胰管连续性和长期通畅性的失败。相对而言,胰肠(胃)吻合的主要目的在于预防严重和致命的胰肠吻合口漏,由于术后早期癌肿复发和死亡,对吻合后的通畅性也并不十分重视,近年来随着相关肿瘤治疗结果的改善,术后胰肠吻合部通畅性和残留胰腺外分泌功能保持明显的日益重要并逐渐被关注。有关恢复胰管连续性的方法有以下几种:(1)胰管植入肠(胃)内;(2)胰腺残端植入肠(胃)内;(3)端侧胰管对黏膜吻合(肠或胃);(4)侧胰管对黏膜吻合(肠或胃)。

首次成功的胰管和十二指肠吻合是由Halsted于1899年在对1例壶腹癌切除后完成的。1909年Coffey在首次胰腺空肠套入式吻合的动物(犬)实验中注意到术后34d肉芽组织堵塞了吻合口;1917年Patrie et al首次进行了胰管对空肠吻合的实验研究;1934年Tripodi和Sherwin首次进行了犬的胰胃套入式吻合并描述了吻合后的远期通畅性。1950年Ferguson和Wangensteen通过动物实验比较了端侧胰管对黏膜(带或不带支撑管)、胰管植入式(带或不带支撑管)和套入式三种端侧吻合方法,结果发现胰管对黏膜带支撑管方法通畅性最好。1980年Telford et al通过6-10wk动物实验表明,胰管对黏膜胰胃吻合胰管有较好的通畅性,胰腺外观及镜检均未出现纤维化改变。1991年Greene et al则通过犬的胰管扩张模型更直接证实了胰管对黏膜胰胃吻合在保持吻合通畅性和残留胰腺功能上的优点,同时也提供了一种很好的研究吻合通畅性的方法。

胰肠吻合后解剖结构的改变使得直接检测吻合口和胰管的状态变得较为困难。通过对胰管结扎和胰肠吻合两组患者进行临床及尸检对比研究,发现10mon后二者在胰岛素和胰酶替代治疗以及胰腺病理改变上并无不同,两组均有近端胰腺纤维瘢痕化及胰管狭窄。与此相对照,而通过对胰管对黏膜吻合1-8a尸检研究证实有70-85%的通畅率。临床上通过胃镜、胰管造影及CT增强检查等随访研究亦证实了胰管对黏膜吻合对维持残留胰腺外分泌功能的重要性。目前的研究均显示胰管对黏膜吻合是获得良好远期通畅性的最佳选择。

总之,胰腺部分切除后胰肠(胃)的处理是影响其并发症(主要是胰肠吻合口漏)和死亡率的关键因素。经过近70a的发展,演进成三种标准手术方式。其中套入式端侧胰肠吻合是目前最常用的方法。胰胃吻合近年来备受关注,尚待进一步开展对比研究以评价其效果。目前的各种吻合方式因有缝线间隙和针道而使胰肠吻合口漏发生的可能性始终存在;吻合通畅性近年来逐渐被关注,胰管对黏膜吻合可以较好保持吻合部通畅性。理想的术式应能预防胰肠吻合口漏,又能保持吻合后远期通畅

性. 从以上观点出发, 目前采用的各种胰肠(胃)吻合方法均不够完善. 新近出现的彭氏捆绑式胰肠吻合术具有独特的理论优势, 即消除了缝合时的针道及缝线间的组织间隙, 并采取了胰管对黏膜缝合方法, 临床应用及动物实验均证实该方法能够可靠防止胰肠吻合口漏的发生, 又可较好地保持吻合通畅性及残留胰腺外分泌功能, 是一种最为理想的吻合方法, 临床应用前景广阔, 有望成为一种标准的胰肠吻合方法.

4 参考文献

- Marcus SG, Cohen H, Ranson JH. Optimal management of the pancreatic remnant after pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 1995; 221:635-648
- Yeo CJ, Cameron JL, Maher MM, Sauter PK, Zahurak ML, Talamini MA, Lillemoe KD, Pitt HA. A prospective randomized trial of pancreaticogastrostomy versus pancreaticojejunostomy after pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 1995;222:580-592
- Yeo CJ. Management of complications following pancreaticoduodenectomy. *Surg Clin North Am* 1995;75:913-924
- Yeo CJ, Cameron JL, Sohn TA, Lillemoe KD, Pitt HA, Talamini MA, Hruban RH, Ord SE, Sauter PK, Coleman J, Zahurak ML, Grochow LB, Abrams RA. Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complications, and outcomes. *Ann Surg* 1997;226:248-260
- Williams JA, Cubilla A, Maclean BJ, Fortner JG. Twenty-two year experience with periampullary carcinoma at memorial sloan-kettering cancer center. *Am J Surg* 1979;138:662-665
- Papachristou DN, Fortner JG. Pancreatic fistula complicating pancreatic resection for malignant disease. *Br J Surg* 1981;68:238-240
- Grace PA, Pitt HA, Tompkins RK, DenBesten L, Longmire WP Jr. Decreased morbidity and mortality after pancreaticoduodenectomy. *Am J Surg* 1986;151:141-149
- Crist DW, Sitzmann JV, Cameron JL. Improved hospital morbidity, mortality, and survival after the Whipple procedure. *Ann Surg* 1987; 206:358-365
- Bartoli FG, Arnone GB, Ravera G, Bachi V. Pancreatic fistula and relative mortality in malignant disease after pancreaticoduodenectomy: review and statistical meta-analysis regarding 15 years of literature. *Anticancer Res* 1991;11:1831-1848
- Di Carlo V, Zerbi A, Balzano G. Treatment of the pancreatic stump after cephalic pancreatoduodenectomy. *Ann Ital Chir* 1997;68: 617-622
- Marczell AP, Stierer M. Partial pancreaticoduodenectomy (Whipple procedure) for pancreatic malignancy: occlusion of a non-anastomosed pancreatic stump with fibrin sealant. *HPB Surg* 1992;5:251-259
- Sikora SS, Posner MC. Management of the pancreatic stump following pancreaticoduodenectomy. *Br J Surg* 1995; 82:1590-1597
- Howard JM. Pancreatojejunostomy: leakage is a preventable complication of the Whipple resection. *J Am Coll Surg* 1997;184:454-457
- Ohwada S, Iwazaki S, Nakamura S, Ogawa T, Tanahashi Y, Ikeya T, Iino Y, Morishita Y. Pancreatojejunostomy—Securing techniques: duct-to-mucosa anastomosis by continuous running suture and Parachuting using monofilament absorbable thread. *J Am Coll Surg* 1997;185:190-194
- Tsuji M, Kimura H, Konishi K, Yabushita K, Maeda K, Kuroda Y. Management of continuous anastomosis of pancreatic duct and jejunal mucosa after pancreaticoduodenectomy: historical study of 300 patients. *Surgery* 1998;123:617-621
- Hwang TL, Jan YY, Chen MF. Secural pancreaticojejunostomy for the pancreaticoduodenectomy. *Hepatogastroenterology* 1996; 43:275-277
- Hamanaka Y, Suzuki T. Modified dunking pancreaticojejunostomy for a soft pancreas. *Br J Surg* 1995;82:404-405
- 赵玉沛, 蔡力行, 钟守先. 胰管空肠吻合胰残端套入法预防Whipple术后胰瘘发生. *中华外科杂志* 1993; 31:360-362
- Nagakawa T. Modified pancreatic invagination into the jejunum with a double intestinal segment—a new technique. *Hepatogastroenterology* 1992; 39: 70-72
- 彭淑牖, 牟一平, 江献川, 彭承宏, 蔡秀军, 赵桂兰, 吴育连, 王家骅, 李

- 君达, 陆松春, 徐明坤, 金成胜, 徐金荣. 胰断端空肠浆肌鞘内套入吻合术(附11例报告). *中国实用外科杂志* 1996;16:596-597
- 彭淑牖, 吴育连, 彭承宏, 江献川, 牟一平, 王家骅, 蔡秀军, 李君达, 陆松春, 徐明坤. 捆绑式胰肠吻合术(附28例报告). *中华外科杂志* 1997; 35: 158-159
 - 彭淑牖, 刘颖斌, 牟一平, 蔡秀军, 彭承宏, 吴育连, 方河清, 曹利平, 沈宏伟. 捆绑式胰肠吻合术100例报告. *胰腺病学* 2001;1:43-45
 - Peng SY, Mou YP, Cai XI, Peng CH. Binding pancreaticojejunostomy is a new technique to minimize leakage. *Am J Surg* 2002; 183:283-285
 - 彭淑牖, 刘颖斌, 牟一平, 蔡秀军, 彭承宏, 吴育连, 方河清, 沈宏伟. 捆绑式胰肠吻合术:150例临床应用. *中华医学杂志* 2002;82:368-370

彭氏捆绑式胰肠吻合术的临床应用

陈晓鹏, 刘颖斌, 李海军, 许斌, 王建伟, 李江涛, 王新保, 吴育连

陈晓鹏, 刘颖斌, 李海军, 许斌, 王建伟, 李江涛, 王新保, 吴育连, 浙江大学医学院附属第二医院外科 浙江省杭州市 310009
项目负责人: 陈晓鹏, 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外科.
电话: 0571-87783584 传真: 0571-87022776
收稿日期: 2002-07-23 接受日期: 2002-08-31

陈晓鹏, 刘颖斌, 李海军, 许斌, 王建伟, 李江涛, 王新保, 吴育连. 彭氏捆绑式胰肠吻合术的临床应用. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):593-594
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/593.htm>

0 引言

胰十二指肠切除术(Pancreaticoduodenectomy, PD)手术范围较大, 危险性较高, 并发症多. 其中胰肠吻合口漏为PD手术后最常见、最严重的并发症之一. 据统计, 目前胰肠吻合口漏的发生率仍高达13%左右, 大约是17% PD手术患者的直接死亡原因. 为了预防, 文献报道有20种方法, 大体上包括胰腺残端(胰管)结扎、胰管栓塞或外引流、全胰切除、胰腺断面的浆膜化、胰胃吻合^[1,2]、胰空肠6-8针间断缝合^[3]、胰空肠套入吻合^[4]、胰管与空肠黏膜吻合^[5]和没有胰管与空肠黏膜吻合的胰管外造瘘术^[6]. 虽然胰肠吻合方法多种多样, 但无一能完全避免胰肠吻合口漏的发生. 为了减少胰肠吻合口漏的发生, 浙江大学医学院附属二院彭淑牖教授经过多年探索和实践后, 设计了捆绑式胰肠吻合术^[7-9], 1996-01/2002-02已在104例PD中应用, 均未发生胰肠吻合口漏. 而同期非捆绑式胰肠吻合术98例, 胰肠吻合口漏发生率为9%, 二者相比有显著性差异($P < 0.01$), 前者住院时间也明显短于后者($P < 0.05$), 其他有关并发症发生率无明显差异. 实践证明捆绑式胰肠吻合术是一种简单、安全而有效的预防胰肠吻合口漏新术式, 目前已在国内80多家市级以上的医院推广使用, 总例数接近800例, 均未发生吻合口漏. 由于这种吻合方式独特, 效果显著可靠, 并且在国内许多大专院校广泛使用, 因此得到了不少国际专家的认可, 甚至有学者称之为彭氏捆

性. 从以上观点出发, 目前采用的各种胰肠(胃)吻合方法均不够完善. 新近出现的彭氏捆绑式胰肠吻合术具有独特的理论优势, 即消除了缝合时的针道及缝线间的组织间隙, 并采取了胰管对黏膜缝合方法, 临床应用及动物实验均证实该方法能够可靠防止胰肠吻合口漏的发生, 又可较好地保持吻合通畅性及残留胰腺外分泌功能, 是一种最为理想的吻合方法, 临床应用前景广阔, 有望成为一种标准的胰肠吻合方法.

4 参考文献

- Marcus SG, Cohen H, Ranson JH. Optimal management of the pancreatic remnant after pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 1995; 221:635-648
- Yeo CJ, Cameron JL, Maher MM, Sauter PK, Zahurak ML, Talamini MA, Lillemoe KD, Pitt HA. A prospective randomized trial of pancreaticogastrostomy versus pancreaticojejunostomy after pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 1995;222:580-592
- Yeo CJ. Management of complications following pancreaticoduodenectomy. *Surg Clin North Am* 1995;75:913-924
- Yeo CJ, Cameron JL, Sohn TA, Lillemoe KD, Pitt HA, Talamini MA, Hruban RH, Ord SE, Sauter PK, Coleman J, Zahurak ML, Grochow LB, Abrams RA. Six hundred fifty consecutive pancreaticoduodenectomies in the 1990s: pathology, complications, and outcomes. *Ann Surg* 1997;226:248-260
- Williams JA, Cubilla A, Maclean BJ, Fortner JG. Twenty-two year experience with periampullary carcinoma at memorial sloan-kettering cancer center. *Am J Surg* 1979;138:662-665
- Papachristou DN, Fortner JG. Pancreatic fistula complicating pancreatic resection for malignant disease. *Br J Surg* 1981;68:238-240
- Grace PA, Pitt HA, Tompkins RK, DenBesten L, Longmire WP Jr. Decreased morbidity and mortality after pancreaticoduodenectomy. *Am J Surg* 1986;151:141-149
- Crist DW, Sitzmann JV, Cameron JL. Improved hospital morbidity, mortality, and survival after the Whipple procedure. *Ann Surg* 1987; 206:358-365
- Bartoli FG, Arnone GB, Ravera G, Bachi V. Pancreatic fistula and relative mortality in malignant disease after pancreaticoduodenectomy: review and statistical meta-analysis regarding 15 years of literature. *Anticancer Res* 1991;11:1831-1848
- Di Carlo V, Zerbi A, Balzano G. Treatment of the pancreatic stump after cephalic pancreatoduodenectomy. *Ann Ital Chir* 1997;68: 617-622
- Marczell AP, Stierer M. Partial pancreaticoduodenectomy (Whipple procedure) for pancreatic malignancy: occlusion of a non-anastomosed pancreatic stump with fibrin sealant. *HPB Surg* 1992;5:251-259
- Sikora SS, Posner MC. Management of the pancreatic stump following pancreaticoduodenectomy. *Br J Surg* 1995; 82:1590-1597
- Howard JM. Pancreatojejunostomy: leakage is a preventable complication of the Whipple resection. *J Am Coll Surg* 1997;184:454-457
- Ohwada S, Iwazaki S, Nakamura S, Ogawa T, Tanahashi Y, Ikeya T, Iino Y, Morishita Y. Pancreatojejunostomy—Securing techniques: duct-to-mucosa anastomosis by continuous running suture and Parachuting using monofilament absorbable thread. *J Am Coll Surg* 1997;185:190-194
- Tsuji M, Kimura H, Konishi K, Yabushita K, Maeda K, Kuroda Y. Management of continuous anastomosis of pancreatic duct and jejunal mucosa after pancreaticoduodenectomy: historical study of 300 patients. *Surgery* 1998;123:617-621
- Hwang TL, Jan YY, Chen MF. Secural pancreaticojejunostomy for the pancreaticoduodenectomy. *Hepatogastroenterology* 1996; 43:275-277
- Hamanaka Y, Suzuki T. Modified dunking pancreaticojejunostomy for a soft pancreas. *Br J Surg* 1995;82:404-405
- 赵玉沛, 蔡力行, 钟守先. 胰管空肠吻合胰残端套入法预防Whipple术后胰瘘发生. *中华外科杂志* 1993; 31:360-362
- Nagakawa T. Modified pancreatic invagination into the jejunum with a double intestinal segment—a new technique. *Hepatogastroenterology* 1992; 39: 70-72
- 彭淑牖, 牟一平, 江献川, 彭承宏, 蔡秀军, 赵桂兰, 吴育连, 王家骅, 李

- 君达, 陆松春, 徐明坤, 金成胜, 徐金荣. 胰断端空肠浆肌鞘内套入吻合术(附11例报告). *中国实用外科杂志* 1996;16:596-597
- 彭淑牖, 吴育连, 彭承宏, 江献川, 牟一平, 王家骅, 蔡秀军, 李君达, 陆松春, 徐明坤. 捆绑式胰肠吻合术(附28例报告). *中华外科杂志* 1997; 35: 158-159
 - 彭淑牖, 刘颖斌, 牟一平, 蔡秀军, 彭承宏, 吴育连, 方河清, 曹利平, 沈宏伟. 捆绑式胰肠吻合术100例报告. *胰腺病学* 2001;1:43-45
 - Peng SY, Mou YP, Cai XI, Peng CH. Binding pancreaticojejunostomy is a new technique to minimize leakage. *Am J Surg* 2002; 183:283-285
 - 彭淑牖, 刘颖斌, 牟一平, 蔡秀军, 彭承宏, 吴育连, 方河清, 沈宏伟. 捆绑式胰肠吻合术:150例临床应用. *中华医学杂志* 2002;82:368-370

彭氏捆绑式胰肠吻合术的临床应用

陈晓鹏, 刘颖斌, 李海军, 许斌, 王建伟, 李江涛, 王新保, 吴育连

陈晓鹏, 刘颖斌, 李海军, 许斌, 王建伟, 李江涛, 王新保, 吴育连, 浙江大学医学院附属第二医院外科 浙江省杭州市 310009
项目负责人: 陈晓鹏, 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外科.
电话: 0571-87783584 传真: 0571-87022776
收稿日期: 2002-07-23 接受日期: 2002-08-31

陈晓鹏, 刘颖斌, 李海军, 许斌, 王建伟, 李江涛, 王新保, 吴育连. 彭氏捆绑式胰肠吻合术的临床应用. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):593-594
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/593.htm>

0 引言

胰十二指肠切除术(Pancreaticoduodenectomy, PD)手术范围较大, 危险性较高, 并发症多. 其中胰肠吻合口漏为PD手术后最常见、最严重的并发症之一. 据统计, 目前胰肠吻合口漏的发生率仍高达13%左右, 大约是17% PD手术患者的直接死亡原因. 为了预防, 文献报道有20种方法, 大体上包括胰腺残端(胰管)结扎、胰管栓塞或外引流、全胰切除、胰腺断面的浆膜化、胰胃吻合^[1,2]、胰空肠6-8针间断缝合^[3]、胰空肠套入吻合^[4]、胰管与空肠黏膜吻合^[5]和没有胰管与空肠黏膜吻合的胰管外造瘘术^[6]. 虽然胰肠吻合方法多种多样, 但无一能完全避免胰肠吻合口漏的发生. 为了减少胰肠吻合口漏的发生, 浙江大学医学院附属二院彭淑牖教授经过多年探索和实践后, 设计了捆绑式胰肠吻合术^[7-9], 1996-01/2002-02已在104例PD中应用, 均未发生胰肠吻合口漏. 而同期非捆绑式胰肠吻合术98例, 胰肠吻合口漏发生率为9%, 二者相比有显著性差异($P < 0.01$), 前者住院时间也明显短于后者($P < 0.05$), 其他有关并发症发生率无明显差异. 实践证明捆绑式胰肠吻合术是一种简单、安全而有效的预防胰肠吻合口漏新术式, 目前已在国内80多家市级以上的医院推广使用, 总例数接近800例, 均未发生吻合口漏. 由于这种吻合方式独特, 效果显著可靠, 并且在许多大专院校广泛使用, 因此得到了不少国际专家的认可, 甚至有学者称之为彭氏捆

绑式胰肠吻合术.

1 彭氏捆绑式胰肠吻合术的手术要点^[7-9]

1.1 切除胰头十二指肠 根据需要选择切口、进腹探查. 常规采用 Kocher 切口, 将十二指肠第二段连同胰腺从腹膜后向前游离, 探查胰头的后方. 游离结肠肝曲将十二指肠第二、三段向前游离. 在横结肠的附着处切开胃结肠韧带, 打开小网膜囊, 将胃向上掀起, 显露胰腺的前面. 在胰腺下缘, 根据肠系膜上动脉搏动的位置分离出肠系膜上静脉. 离断胃体部. 游离肝动脉及周围组织和淋巴结. 切除胰头十二指肠.

1.2 胰腺断端的准备 在拟定切口近端的胰腺上下缘各缝一针, 即以彭氏多功能手术解剖器(PMOD)刮吸法断胰, 断面电凝止血, 胰断端再游离3 cm, 以备套入空肠后捆绑. 一般不作鱼口状切断, 也不需缝合. 无论胰管有无扩张, 均不必插入引流管.

1.3 空肠断端的准备 靠近一根终末动脉处离断空肠, 将空肠远断端上提并外翻3 cm, 用电凝或石炭酸破坏外翻之空肠黏膜, 使其丧失分泌功能(图1).



图1 空肠黏膜外翻并予以破坏

1.4 胰空肠吻合 将胰腺断端与空肠外翻返折处黏. 膜间断缝合数针(注意缝针勿穿过肌层), 吻合后将外翻的空肠复原, 胰腺断端即自然地套入空肠内3 cm. 再将空肠断端与胰腺浆膜间断缝合3-4针固定.

1.5 捆绑 在接近空肠断端系膜缘末端两根动脉间穿一根粗肠线, 环绕空肠结扎, 使空肠与胰腺紧密相贴, 从而阻止液体在二层面间流通(图2). 捆绑松紧度以一中号血管钳头部刚好插入捆绑线下为宜.

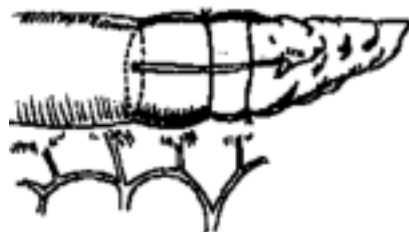


图2 捆绑式胰肠吻合术

以上方法除捆绑之外, 尚要求将胰腺断端与空肠外翻返折处黏. 膜间断缝合数针, 我们称之为 **型**捆绑式胰肠吻合术. 近年, 我们在此基础上, 并结合动物实验, 对 **型**吻合术稍作改进, 称为 **型**捆绑式胰肠吻合术, 即不必将胰腺断端与空肠外翻返折处黏膜及其肌层间断缝合(或仅将胰腺断面前后缘与空肠外翻返折处黏. 膜各缝合1

针, 如胰管扩张, 缝线可分别穿过胰管前后壁), 直接将胰腺断端套入预先外翻并破坏黏膜的空肠内3 cm, 再将空肠断端与胰腺间断缝合3-4针固定, 胰管内亦不必插管外引流. 术中在胰肠吻合口远端空肠截孔、插入导尿管, 并连接一50 mL内含美蓝的注射器针筒. 捆绑前, 如抬高针筒, 可见蓝色液体从空肠与胰腺之间渗出; 适度捆绑后, 液体渗漏消失, 又不会影响胰腺及空肠局部血运.

2 捆绑式胰肠吻合术的优点

综观各种吻合方法, 均存在针眼, 胰空肠吻合口在完全愈合前针眼之间必然存有间隙. 临床上胰十二指肠切除术后常有肠麻痹、肠内压升高. 当肠内压升高后, 这些针眼和间隙都可成为发生胰漏的“突破口”. 捆绑式胰肠吻合术在胰腺与空肠吻合时缝针不穿过浆膜, 型吻合术不作此缝合, 故空肠浆膜上没有针眼; 且在套入空肠部分外加捆绑, 可彻底消除胰空肠间隙. 此时, 即使肠内压增高, 胰液和肠液也不易从吻合口或针眼漏出. 因此, 捆绑式胰肠吻合的最大特点是彻底消除了这些“突破口”, 从而避免胰肠吻合口漏的发生.

本术式还具有其他一些优点: (1)不必向胰管插管, 离断胰腺时不需刻意寻找胰管开口, 缩短了手术时间; (2)包埋胰腺断端的空肠黏膜已被破坏, 失去分泌功能, 不能在胰腺与空肠之间产生液体, 也有利于吻合口的愈合^[12]. 由于黏膜已被破坏, 张力减小, 套入时十分方便; (3)没有胰管外引流, 减轻了患者的痛苦和术后护理. 我们目前已做了部分动物实验, 证明捆绑式胰肠吻合术之胰空肠吻合口的破裂压和离断力较非捆绑式胰空肠吻合术为高; 病理观察还发现, 术后10 d时, 捆绑组胰肠吻合口已基本愈合, 至第15天时吻合口已完全愈合, 亦无胰腺和空肠坏死现象; 而非捆绑组术后第15天胰空肠之间尚存微小间隙; 至第15天吻合口方完全愈合. 说明胰空肠吻合外加捆绑后对局部血液循环无明显影响, 而吻合口的愈合时间有所提前, 可能是由于捆绑加强了胰腺与空肠的黏合程度, 从而促进了愈合.

3 参考文献

- O'Neil S, Pickleman J, Aranha GV. Pancreaticogastrostomy following pancreaticoduodenectomy: review of 102 consecutive cases. *World J Surg* 2001;25:567-571
- Takano S, Ito Y, Watanabe Y, Yokoyama T, Kubota N, Iwai S. Pancreaticojejunostomy versus pancreaticogastrostomy in reconstruction following pancreaticoduodenectomy. *Br J Surg* 2000;87: 423-427
- Kakita A, Yoshida M, Takahashi T. History of pancreaticojejunostomy in pancreaticoduodenectomy: development of a more reliable anastomosis technique. *J Hepatobil Pancreat Surg* 2001;8: 230-237
- 岳茂兴, 李学彪, 张圭显. 胰空肠套入荷包缝合完全胰液外引流术预防胰十二指肠切除术后胰瘘. *中华外科杂志* 1997;35:370-371
- Ohwada S, Ogawa T, Kawate S, Tanahashi Y, Iwazaki S, Tomizawa N, Yamada T, Ohya T, Morishita Y. Results of duct-to-mucosa pancreaticojejunostomy for pancreaticoduodenectomy Billroth I type reconstruction in 100 consecutive patients. *J Am Coll Surg* 2001;193:29-35
- Okamoto A, Tsuruta K. Fistulation method: simple and safe pancreaticojejunostomy after pancreatoduodenectomy. *Surgery* 2000;127:433-438
- 彭淑胤, 牟一平, 江献川, 彭承宏, 蔡秀军, 赵桂兰, 吴育连, 王家骅, 李君达, 陆松春, 徐明坤, 金成胜, 徐金荣. 胰断端空肠浆肌鞘内套入吻合术: (附11例报告). *中国实用外科杂志* 1996;16:596-597
- 彭淑胤, 吴育连, 彭承宏, 江献川, 牟一平, 王家骅, 蔡秀军, 李君达, 陆松春, 徐明坤. 捆绑式胰肠吻合术: (附28例报告). *中华外科杂志* 1997; 35:158-159
- 彭淑胤, 彭承宏, 吴育连, 刘颖斌, 蔡秀军, 牟一平. 胰腺癌手术后早期并发症的防治. *实用肿瘤杂志* 1999;14:267-269

彭氏 型捆绑式胰肠吻合术

史留斌,方河清,刘颖斌,李海军,王建伟,许斌

史留斌,方河清,刘颖斌,李海军,王建伟,许斌,浙江大学医学院附属第二医院外科 浙江省杭州市 310009

项目负责人:史留斌,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外科.

电话:0571-87783584 传真:0571-87022776

收稿日期:2002-07-23 接受日期:2002-08-31

史留斌,方河清,刘颖斌,李海军,王建伟,许斌. 彭氏 型捆绑式胰肠吻合术. 世界华人消化杂志 2003;11(5):595-596

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/595.htm>

0 引言

捆绑式胰肠吻合术在临床应用6a来,已有80家医院使用.尚未发现胰肠吻合口漏^[1-5].2001-01/2002-01,我们对49例患者采用单纯捆绑的方法来建立胰肠吻合口(称之为捆绑型,简称型),与同期35例原先的捆绑式胰肠吻合术(简称型)对比,两组患者均未发生胰肠吻合口漏.型手术简化,时间缩短,十分可靠.

1 型手术的步骤

1.1 断胰 在拟定切线近端的胰腺上、下缘各缝一针.结扎后再做一个空结,形成一个小圆圈(图1A)备用.采用刮吸法断胰,断面充分电凝止血.胰断端游离3cm,胰管开口分三点外翻缝合在胰断端上,令其始终张开,不必留置导管.

1.2 空肠断端的准备 靠近一根终末动脉处离断空肠,距离断端3cm处用肠钳夹住空肠,然后用石炭酸棉球伸入肠腔,破坏黏膜使其丧失分泌功能,随即先后用酒精和盐水清洗.

1.3 套入 (1)除去肠钳.对空肠后壁和胰腺残端背面作一褥式缝合,暂时不结扎,线头留长备用(图1B). (2)距空肠断端10cm处,空肠对系膜缘上作小戳孔,送入透明输液管,经肠腔从空肠断端引出(图1C) (3)用缝线先后穿过胰断端上下缘预置的小圆圈,然后距管端约5cm处,缝合结扎在输液管上,缝线总长20cm以上(图1C). (4)将二断端靠拢,把预置在二者后壁的褥式缝线结扎,胰断端的后壁就开始进入肠腔(图1D). (5)向后牵拉输液管,见管壁上的缝扎线在浆膜外出现时就钳夹二线,使其与输液管分离,继续向外牵拉缝线两端,而不再牵拉输液管(图1E). (6)胰残端完全套入肠腔3cm,随即用无损伤针线把空肠断端缝在胰腺上缘、下缘和前面共三处作固定.

1.4 捆绑 在接近空肠断端两组血管之间的系膜戳孔上穿过一根0号可吸收缝线用以环绕空肠结扎,使空肠与胰腺紧密相贴.结扎的松紧度以结扎线圈内刚好能伸入小号血管钳端为准(图1F),同时可见结扎处空肠凹陷1-2mm.

1.5 检测吻合口 抽出用以牵拉胰残端的缝线,临时固定输液管并通过输液管向肠腔内注入美蓝稀释液(同时钳夹输液管近端空肠)使肠腔明显膨胀后观察输液管内的液平面,使肠腔内压力达到30-40cmH₂O,同时严密注意吻合口周围有无蓝色渗液(先垫上白色纱布)(图1G).检测完毕,吸尽肠腔内液体,拔出输液管,插管开口扩大之后作为胆肠吻合之用.

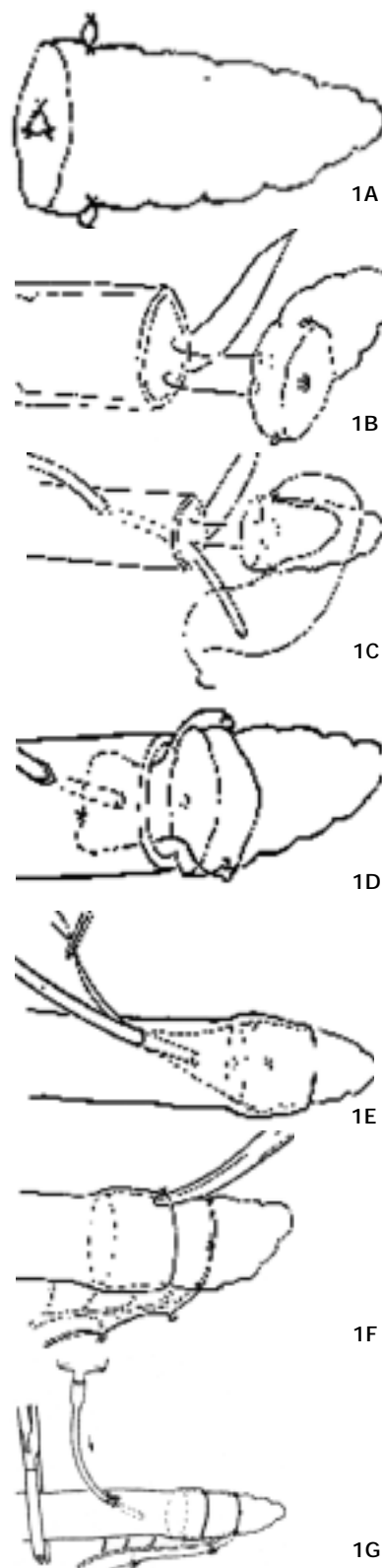


图1A-1G 型捆绑式胰肠吻合术步骤.

完成胆肠和胃肠吻合后,腹腔内安置引流管.术后观察患者总体情况,腹腔引流量及其性状,术后1 mon B超检查,注意胰残端周围有无积液,以后不定期地进行B超检查.

2 型与型的比较

型有以下两大优点:(1)完成吻合时间显著缩短.这是因为简化了几个步骤:包括把空肠断端外翻,黏膜的吻合和胰管内置管等.(2)吻合口可靠性的检测.

型完成吻合之后,不愿向肠腔内注水检测.主要的顾虑为胰肠吻合的间隙形成积液.因此在进行捆绑时往往偏紧.这样又担心压迫胰管,因此须向胰管内置管以抵抗外来压力.型完成吻合后可以大胆向肠腔内注水检测,既能确保安全,又可避免捆绑过紧.最主要的优点更是使术者能对新完成的胰肠吻合口绝对放心.

一般认为胰腺质地正常及胰管不扩张时特别容易发生胰漏.捆绑式胰肠吻合术在此时更能发挥其作用,因为不论胰腺质地是否正常柔软,胰管有无扩张,都能确保不发生吻合口漏,A组有6例,B组有8例属于此类.近年来PD的适应证有所发展,例如对胆囊癌施行HPD,对某些中晚期胃癌或复发胃癌施行PD能够挽救一部分患者.这类患者的胰腺质地和胰管均正常,以往由于担心吻合口漏而不敢施行PD,本组中不乏这种患者获得外科切除,就是因为有捆绑式胰肠吻合术作为依靠.

此外,对胰头癌患者近年有不少学者主张扩大根治,一方面手术时间延长,清扫完毕进行吻合时难以集中精力进行精细的黏膜对黏膜吻合,需要一种简便又可靠的方法来完成.另一方面,骨骼化清扫后不但PV、SMV,而且肝动脉、腹腔动脉、肠系膜上动脉、主动脉、下腔静脉、肾静脉等均裸露在手术野中,万一发生胰漏,这些血管都容易受到腐蚀,对生命的威胁极其严重.在这种情况下,捆绑式胰肠吻合术更能起到保护作用.

3 参考文献

- 1 彭淑牖,吴育连,彭承宏,江献川,牟一平,王家骅,蔡秀军,李君达,陆松春,徐明坤.捆绑式胰肠吻合术(附28例报告).中华外科杂志 1997;35:158-159
- 2 彭淑牖,刘颖斌,徐军明.如何防治胰十二指肠切除术并发症.肝胆外科杂志 2000;2:86-87
- 3 Peng SY, Mou YP, Cai XI, Peng CH. Binding pancreaticojejunostomy is a new technique to minimize leakage. *Am J Surg* 2002;183:283-285
- 4 彭淑牖,刘颖斌,牟一平,蔡秀军,彭承宏,吴育连,方河清,沈宏伟.捆绑式胰肠吻合术-150例临床应用.中华医学杂志 2002;82:368-370
- 5 彭淑牖,牟一平,江献川,彭承宏,蔡秀军,赵桂兰,吴育连,王家骅,李君达,陆松春,徐明坤,金成胜,徐金荣.胰断端空肠浆肌鞘内套入吻合术(附11例报告).中国实用外科杂志 1996;16:596-597

捆绑式胰肠吻合术防止胰漏的机制

刘颖斌,彭淑牖

刘颖斌,彭淑牖,浙江大学医学院附属第二医院外科 浙江省杭州市 310009
项目负责人:彭淑牖,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外科. laoniulyb@163.com
电话:0571-87783584 传真:0571-87022776
收稿日期:2002-07-23 接受日期:2002-08-31

刘颖斌,彭淑牖.捆绑式胰肠吻合术防止胰漏的机制.世界华人消化杂志 2003;11(5):596-597

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/596.htm>

0 引言

胰十二指肠切除术是治愈壶腹周围肿瘤的主要手段,为腹部外科最大手术之一,但该术式操作复杂,自从1935年Whipple首次成功施行以来,经历了67 a的发展,仍然面临着巨大的风险即胰肠吻合漏,一旦发生,被激活胰液具有很强消化力,漏入腹腔会腐蚀和破坏腹腔内组织(血管、肠)、造成出血和感染、肠漏等,长期无法愈合,死亡率很高.所以预防胰漏这一重大课题,一直备受国际外科界的关注.

1996年我们设计和应用了捆绑式胰肠吻合术,在临床应用6 a来,连续施行了200例,无1例胰漏,同时全国有80家医院800多例的使用此术式.同样未发现胰肠吻合口漏,效果独特.上述结果出现是因为捆绑式胰肠吻合术是针对传统胰肠吻合方法的缺陷发生胰肠吻合口漏的主要原因而设计的.

1 胰肠吻合漏的原因

许多专家研究认为影响胰漏发生的危险因素包括:胰管细小,胰腺质地柔软,年龄大于65岁,高胆红素血症,急诊手术,失血量较大等.但这些高危因素多为客观存在而不能由外科医生来改变.所以胰肠吻合方法和吻合技术是影响胰漏的重要因素.我们下列因素往往导致了胰肠吻合漏的发生:(1)吻合口针孔渗漏,以往的缝针针尾往往较粗,缝针穿过后缝线周围留有间隙,一旦穿破毛细小胰管,在主胰管阻塞时毛细胰管也扩张透亮的胰液沿针眼渗出却没有被手术者及时发现,7-10 d后,渗出积聚到一定程度时就形成了胰漏,其中的胰液若被肠液激活,危害性更大.(2)吻合口间隙渗漏,综观各种吻合方法,不论是单层缝合还是双层缝合,在两针之间总有间隙存在,有可能成为胰漏发生的“突破口”.(3)空肠内高压,胰肠吻合有较长的空肠桥攀,术后早期胰液和胆汁在肠腔的积聚,增加肠内压和肠袢重量,可导致肠扭曲,容易出现输出襻综合征. Treitz 韧带离断处的侧腹膜、结肠系膜裂孔若

完成胆肠和胃肠吻合后,腹腔内安置引流管.术后观察患者总体情况,腹腔引流量及其性状,术后1 mon B超检查,注意胰残端周围有无积液,以后不定期地进行B超检查.

2 型与型的比较

型有以下两大优点:(1)完成吻合时间显著缩短.这是因为简化了几个步骤:包括把空肠断端外翻,黏膜的吻合和胰管内置管等.(2)吻合口可靠性的检测.

型完成吻合之后,不愿向肠腔内注水检测.主要的顾虑为胰肠吻合的间隙形成积液.因此在进行捆绑时往往偏紧.这样又担心压迫胰管,因此须向胰管内置管以抵抗外来压力.型完成吻合后可以大胆向肠腔内注水检测,既能确保安全,又可避免捆绑过紧.最主要的优点更是使术者能对新完成的胰肠吻合口绝对放心.

一般认为胰腺质地正常及胰管不扩张时特别容易发生胰漏.捆绑式胰肠吻合术在此时更能发挥其作用,因为不论胰腺质地是否正常柔软,胰管有无扩张,都能确保不发生吻合口漏,A组有6例,B组有8例属于此类.近年来PD的适应证有所发展,例如对胆囊癌施行HPD,对某些中晚期胃癌或复发胃癌施行PD能够挽救一部分患者.这类患者的胰腺质地和胰管均正常,以往由于担心吻合口漏而不敢施行PD,本组中不乏这种患者获得外科切除,就是因为有捆绑式胰肠吻合术作为依靠.

此外,对胰头癌患者近年有不少学者主张扩大根治,一方面手术时间延长,清扫完毕进行吻合时难以集中精力进行精细的黏膜对黏膜吻合,需要一种简便又可靠的方法来完成.另一方面,骨骼化清扫后不但PV、SMV,而且肝动脉、腹腔动脉、肠系膜上动脉、主动脉、下腔静脉、肾静脉等均裸露在手术野中,万一发生胰漏,这些血管都容易受到腐蚀,对生命的威胁极其严重.在这种情况下,捆绑式胰肠吻合术更能起到保护作用.

3 参考文献

- 1 彭淑牖,吴育连,彭承宏,江献川,牟一平,王家骅,蔡秀军,李君达,陆松春,徐明坤.捆绑式胰肠吻合术(附28例报告).中华外科杂志 1997;35:158-159
- 2 彭淑牖,刘颖斌,徐军明.如何防治胰十二指肠切除术并发症.肝胆外科杂志 2000;2:86-87
- 3 Peng SY, Mou YP, Cai XI, Peng CH. Binding pancreaticojejunostomy is a new technique to minimize leakage. *Am J Surg* 2002;183:283-285
- 4 彭淑牖,刘颖斌,牟一平,蔡秀军,彭承宏,吴育连,方河清,沈宏伟.捆绑式胰肠吻合术-150例临床应用.中华医学杂志 2002;82:368-370
- 5 彭淑牖,牟一平,江献川,彭承宏,蔡秀军,赵桂兰,吴育连,王家骅,李君达,陆松春,徐明坤,金成胜,徐金荣.胰断端空肠浆肌鞘内套入吻合术(附11例报告).中国实用外科杂志 1996;16:596-597

捆绑式胰肠吻合术防止胰漏的机制

刘颖斌,彭淑牖

刘颖斌,彭淑牖,浙江大学医学院附属第二医院外科 浙江省杭州市 310009
项目负责人:彭淑牖,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外科. laoniulyb@163.com
电话:0571-87783584 传真:0571-87022776
收稿日期:2002-07-23 接受日期:2002-08-31

刘颖斌,彭淑牖.捆绑式胰肠吻合术防止胰漏的机制.世界华人消化杂志 2003;11(5):596-597

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/596.htm>

0 引言

胰十二指肠切除术是治愈壶腹周围肿瘤的主要手段,为腹部外科最大手术之一,但该术式操作复杂,自从1935年Whipple首次成功施行以来,经历了67 a的发展,仍然面临着巨大的风险即胰肠吻合漏,一旦发生,被激活胰液具有很强消化力,漏入腹腔会腐蚀和破坏腹腔内组织(血管、肠)、造成出血和感染、肠漏等,长期无法愈合,死亡率很高.所以预防胰漏这一重大课题,一直备受国际外科界的关注.

1996年我们设计和应用了捆绑式胰肠吻合术,在临床应用6 a来,连续施行了200例,无1例胰漏,同时全国有80家医院800多例的使用此术式.同样未发现胰肠吻合口漏,效果独特.上述结果出现是因为捆绑式胰肠吻合术是针对传统胰肠吻合方法的缺陷发生胰肠吻合口漏的主要原因而设计的.

1 胰肠吻合漏的原因

许多专家研究认为影响胰漏发生的危险因素包括:胰管细小,胰腺质地柔软,年龄大于65岁,高胆红素血症,急诊手术,失血量较大等.但这些高危因素多为客观存在而不能由外科医生来改变.所以胰肠吻合方法和吻合技术是影响胰漏的重要因素.我们下列因素往往导致了胰肠吻合漏的发生:(1)吻合口针孔渗漏,以往的缝针针尾往往较粗,缝针穿过后缝线周围留有间隙,一旦穿破毛细小胰管,在主胰管阻塞时毛细胰管也扩张透亮的胰液沿针眼渗出却没有被手术者及时发现,7-10 d后,渗出积聚到一定程度时就形成了胰漏,其中的胰液若被肠液激活,危害性更大.(2)吻合口间隙渗漏,综观各种吻合方法,不论是单层缝合还是双层缝合,在两针之间总有间隙存在,有可能成为胰漏发生的“突破口”.(3)空肠内高压,胰肠吻合有较长的空肠桥攀,术后早期胰液和胆汁在肠腔的积聚,增加肠内压和肠袢重量,可导致肠扭曲,容易出现输出襻综合征. Treitz 韧带离断处的侧腹膜、结肠系膜裂孔若

未修补容易发生内疝. 这些因素均增加胰空肠吻合口的张力, 甚至吻合口破裂, 胰肠混合液漏出. 此外吻合口张力大和吻合口血供欠佳等也会影响到胰肠吻合口的愈合.

2 捆绑式胰肠吻合术防止胰漏的机制

2.1 针孔的消除 将肠断端和胰断端靠拢, 用丝线把二者缝合, 连续或间断, 先后唇再前唇. 肠端缝线仅缝黏膜, 避免穿透浆肌层. 这样可消除胰肠吻合口的针孔, 避免了缝线周围留有间隙渗漏的机会. 事实上2001-01/2002-01, 我们已对 49 例患者采用单纯捆绑的方法来建立胰肠吻合口(称之为捆绑型, 简称型), 同样未发生胰肠吻合口漏. 彻底消除了针孔的渗漏, 手术简化, 时间缩短, 十分可靠(图 1).

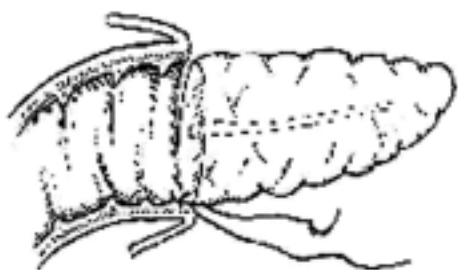


图 1 胰断端与肠黏膜缝合缝针不穿透浆肌层.

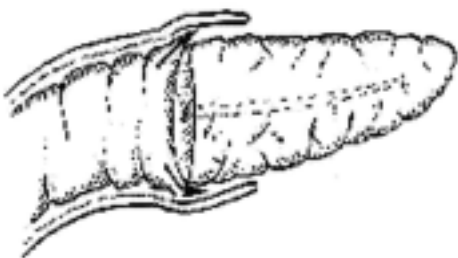


图2 空肠浆肌鞘覆盖胰腺3 cm,二者之间存在间隙,肠胰混合液有可能通过该间隙渗出.

2.2 消除吻合口间隙、扩大愈合面 将黏膜面已破坏的空肠浆肌层翻回原状, 同时将胰断端送入肠腔. 套入肠腔内的胰断端约长 3 cm. 然后, 将空肠断端与胰腺间断缝合固定 4 针. 空肠黏膜破坏的目的是在胰肠吻合口之

间产生一个创面, 扩大愈合面. 继而在接近空肠断端两根动脉之间的系膜上穿一根可吸收线. 环绕空肠浆肌鞘和胰腺同轴捆绑使二者紧贴. 达到消除间隙、加速愈合, 捆绑远端空肠保留血供避免捆绑远端空肠浆肌鞘坏死. 结扎的松紧度以结扎线圈内刚好能伸入小号血管钳端为准, 同时可见结扎处空肠凹陷 1-2 mm.(图 2、3).

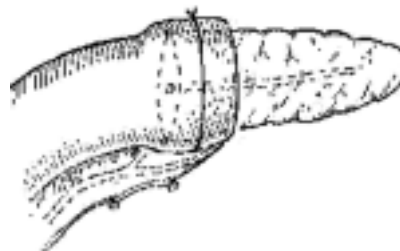


图 3 将空肠浆肌鞘与胰腺捆绑在一起,进一步阻断肠胰液经该间隙渗出末端;空肠保留血管,维持血供.

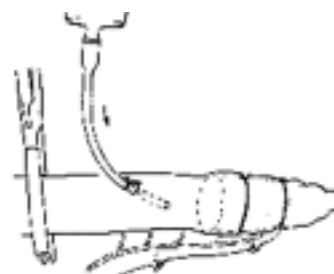


图 4 术中测试吻合口的密封性.

2.3 术中立即测试吻合口的密封性和可靠性, 确保吻合口不漏 在第型完成吻合之后, 不愿向肠腔内注水检测. 主要的顾虑为胰肠吻合的间隙形成积液. 因此在进行捆绑时, 往往偏紧些. 同时又担心压迫胰管, 因此须向胰管内置管以抵抗外来压力. 第型完成吻合后通过胆肠吻合口可以大胆向肠腔内注水检测, 既能确保安全, 又可避免捆绑过紧(见图 4). 使术者能对新完成的胰肠吻合口绝对放心.

通过本组 150 例的和全国 800 例临床实践和观察, 我们体会到捆绑式胰肠吻合术既简化了操作, 又十分安全, 可望成为胰肠吻合的标准术式.

人工肝生物反应器研究进展

向德栋,王英杰,王宇明

向德栋,王英杰,王宇明,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所 重庆市 400038
国家自然科学基金资助课题, No.39970214
项目负责人:王英杰,400038,重庆市高滩岩正街30号,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军感染病研究所. wangyj103@263.net
电话:023-68754475-8062 传真:023-68754142
收稿日期:2002-11-20 接受日期:2002-12-02

摘要

肝功能衰竭有很高的死亡率,肝脏移植是治疗终末期肝病的较好方法,由于供体器官缺乏,费用高昂,需长期使用免疫抑制剂等原因,仍有较多患者不能进行肝脏移植,探索肝功能衰竭非肝脏移植治疗显得非常必要.生物人工肝是近年来肝功能衰竭治疗的热门课题,而生物人工肝装置及对肝功能衰竭治疗效果最有影响的关键部分是生物反应器,因此,生物反应器已成为人工肝研究的重要课题.

向德栋,王英杰,王宇明. 人工肝生物反应器研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(5):598-600

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/598.htm>

0 引言

目前,肝功能衰竭有很高的死亡率,肝脏移植是治疗终末期肝病的较好方法,由于肝脏移植费用高昂,且供体器官缺乏,需长期使用免疫抑制剂等原因,仍有较多的患者不能进行肝脏移植,探索肝功能衰竭非肝脏移植治疗显得非常必要.肝脏是一个能够再生的器官,且有复杂的生物合成、解毒、代谢功能,人们不断探索生物人工肝治疗肝功能衰竭的研究,为肝功能衰竭的治疗开辟新途径.现将近年来有关研究进行综述.

1 用于生物人工肝装置的细胞来源

各种非生物人工肝治疗终末期肝病,均能暂时改善患者的临床症状,但对患者死亡率无明显降低,其主要原因是缺乏肝细胞的生物合成及代谢功能,治疗效果明显下降,鉴于这个原因,人们试图在体外培养肝细胞,利用肝细胞的生理功能,开始支持治疗肝功能衰竭的实验及临床研究,并取得较好效果.目前常用的细胞主要有以下几类:(1)原代肝细胞.1987年,Matsumura et al^[1]报道分离兔肝细胞,原代培养后用于杂合型生物人工肝装置,治疗1例晚期胆管癌患者获得成功.之后,Mundt et al^[2]分离猪肝细胞用于生物人工肝装置,经支持治疗后,为患者进行肝脏移植创造了条件.目前在实验及临床研究中,应用最广泛的是猪肝细胞,其优点是来源广泛,细胞数量多,

又具有合成、代谢及排泌功能.理论上讲,人肝细胞是最为理想的细胞.但伦理道德及人肝细胞来源缺乏,储存运输困难,使其应用受到限制.(2)永生细胞.1990年代中期,人们将人肝细胞系NH25、HHY41用于人工肝装置治疗肝衰竭,取得了一定治疗效果,但是细胞系不能发挥正常人肝细胞的全部功能,之后,人们又相继应用C8-B、HepZ、OUMS-29、NKNT-3等永生细胞用于人工肝治疗肝衰竭的研究,同样取得了一定效果,因安全性原因,故应用受限.起源于肿瘤细胞的细胞系如HepG2、C3A、HuH6、JHH2-2等也试图用于肝功能衰竭的实验及临床研究,但该细胞系来源于肿瘤细胞,存在危害人体的因素,故临床应用仍有顾虑.(3)潜能干细胞.干细胞的研究是近年来生命科学的热点.1998年Shamblott et al^[3]报道人多潜能细胞是体外研究的无价之宝,经培养后,他保持了细胞的生物学特性,并不断增生.Tosh et al^[4]发现胰腺细胞能转化为肝细胞,并建立胰腺细胞系AR42J-B13转化为肝细胞的模型,研究发现转化后的肝细胞具有合成、解毒的功能.Miyazaki et al^[5]研究发现骨髓细胞在一定的培养条件下,诱导分化为肝细胞,能表达肝细胞的标志,随着干细胞的不断深入研究,干细胞应用于人工肝的治疗将为时不远.

2 原代培养肝细胞表型的稳定性

肝脏由多种细胞构成,细胞间及细胞外基质的相互作用是保持肝实质细胞表型稳定的基础.研究表明,将肝实质细胞分离后体外培养,其表型及功能迅速发生改变,肝细胞生物合成及解毒能力下降.因此,人们试图模仿肝脏体内的微环境培养肝细胞,最大限度的发挥其生理功能.Bhatia et al^[6]将肝实质细胞与非实质细胞混合培养,保持了肝细胞的表型稳定.其分子机制目前仍不清楚,可能是细胞之间相互作用的信号传导参与其表型的稳定.

3 生物反应器的设计

生物人工肝装置及对肝功能衰竭治疗效果最有影响的关键部分是生物反应器.随着工程科学及材料科学的发展,对生物反应器的研究步伐加快,反应器中所用细胞种类的增多及对细胞培养表型稳定性的增加,临床应用生物反应器治疗患者已成为现实.设计合理的生物反应器应具备适当的双向物质转运,以便对生物反应器中的肝细胞提供足够的营养,保持细胞活力,排

除治疗细胞的产物, 根据生物分子量大小, 选择半透膜, 在患者及生物反应器中进行物质交换; 保持细胞活力及功能. 目前, 肝细胞在生物反应器中培养不能长期保持肝细胞的功能是一大难题, 其原因是不能在体外为肝细胞生长提供一个合适的微环境. 因此, 在设计生物反应器时不但要考虑有效的物质转运, 还要考虑细胞生长的微环境及相关的化学促进因子; 具有潜在的提高治疗水平. 研究指出, 要保持人的生命, 细胞数量至少是正常人的 10-30%, 成人至少要 150-450 g 肝细胞, 因此, 要求生物反应器有一定的培养空间. 目前研究及应用的生物反应器主要有以下几种: (1) 中空纤维生物反应器: 中空纤维反应器有内腔及外腔, 常将肝脏细胞黏附于中空纤维的外腔, 根据不同来源的细胞选择合适截留分子量的生物膜, 避免发生异种细胞产物所引起的免疫反应, 但肝脏细胞在生物反应器中分布不均, 易造成细胞活力下降. Jasmund et al^[7]指出, 生物反应器的肝脏细胞有高的氧消耗, 他们设计了一种新的可供氧的中空纤维生物反应器, 将肝脏细胞种植在中空纤维的外腔, 并控制氧及温度, 培养递质在中空纤维外腔灌注. 发现供氧的中空纤维生物反应器有多种优点, 不仅可获得高密度的细胞, 而且易掌握. 为了验证该生物反应器的效果, 在超过 3 wk 的培养中, 他们检测了尿素合成、白蛋白合成、糖的消耗、氧的水平及 pH 值等, 结论提示该生物反应器生物化学作用稳定, 能保持细胞活力. Mazariegos et al^[8]用中空纤维反应器培养 70-100 g 猪肝细胞, 用于一位暴发性肝功能衰竭的患者的治疗. 结果表明生物反应器安全. 目前, 该生物反应器在美国进行 I、II 期的安全评估. Custer et al^[9]研究中空纤维生物反应器对培养细胞的影响, 指出在 50 ml/L 二氧化碳及氮平衡条件下, 氧合器的氧在 20-70% 的范围内变动, 氧消耗率及细胞功能稳定, 没有观察到氧中毒的征象. 在另外的实验研究中, 观察到随细胞数量增加, 氧消耗量也随之增加. 但 Flendrig et al^[10]在鼠动物实验中, 造成鼠肝缺血致肝功能衰竭, 肝细胞培养在无生物膜的中空纤维生物反应器中直接用血或血浆灌注, 结果与对照组比较, 鼠的生存状态明显改善, 生命全部延长. 目前, 中空纤维生物反应器应用广泛, 其最大优势是表面积与体积之比大, 便于代谢物的转运, 且能保持有最小的死腔. (2) 平板单层生物反应器: 平板单层生物反应器是将细胞种植在平板上培养, 其优点是细胞分布均匀, 微环境一致, 但表面积与体积之比下降. Shito et al^[11]设计了一种带有内膜氧合器的微管道平板单层生物反应器, 将猪肝细胞培养在反应器中, 观察肝细胞在体外灌注及动物实验中的生物合成功能. 结果表明, 体外灌注 4 d, 肝细胞的蛋白合成稳定. 体内实验用鼠作动物模型, 24 h 在鼠血浆中检测猪白蛋白, 发现这种生物反应器作为肝支持系统很有潜力, 可望更进一步研究. Tilles et al^[12]比较带有内膜氧合器及不带内膜氧合器的平板单层生物反应

器, 结果是带有氧合器的生物反应器能使肝细胞稳定, 生物合成功能加强, 而不带内膜氧合器者与之相反. 他指出在临床应用的生物反应器的设计应考虑到相关的问题, 以便提高治疗效果. (3) 灌注床或支架生物反应器: 该生物反应器是将肝细胞种植在灌注床或支架上, 其优点是与细胞直接接触, 增加了物质的转运, 也促进三维结构的形成, 同时也容易扩大细胞容量, 其缺点是灌注不均一, 易堵塞. Kawada et al^[13]根据灌注床或支架生物反应器的设计原理, 将肝细胞装入多孔的玻璃球微载体内, 利用培养液从外周向中心产生一个营养及氧气的梯度, 形成高密度的细胞且具有高度活力, 三维结构的细胞呈球形, 类似于体内肝细胞分布的过程, 球形细胞间保持紧密的接触, 培养液在细胞空间自由的流动. 结果提示这种反应器能提供一个较好的三维细胞培养环境, 细胞能产生其本来的功能. Nakazawa et al^[14]将猪肝细胞种植在多管道的聚氨酯泡沫床内, 形成许多细胞球形聚集物, 当猪肝功能衰竭后, 用这种装置支持治疗, 与对照组比较, 治疗组血氨的产生被抑制, 肝性脑病发生率低, 血糖稳定, 血肌酐及乳酸盐得到改善, 生命体征平稳, 并有尿的排泄, 生存时间明显延长. Glicklis et al^[15]将刚分离的鼠肝细胞培养在多孔结构的藻酸盐支架内, 该支架中各孔之间互相连接. 在培养的时间内, 细胞数量未发生变化, 细胞活力无下降, 提示在该系统内, 藻酸盐海绵能为肝细胞的生长提供一个有益的环境, 通过肝细胞的集簇性促进培养肝细胞性能的表达. (4) 包被悬浮生物反应器: 该生物反应器是将肝细胞用材料包裹, 制成多孔微胶囊, 然后进行灌注培养. 其优点是所有细胞有相同的微环境, 有大量细胞培养的空间, 减少免疫反应的发生. 缺点是细胞稳定性差, 物质交换能力受限. Khan et al^[16]将山羊肝细胞包被于藻酸盐多聚赖氨酸微胶囊内, 评估该装置对氨、葡萄糖及抗体介导下的细胞毒作用. 在灌注量为 30 mL/min, 给氧处理的条件下, 结果是最适合的细胞数量是 120-180 亿, 去除氯化铵 2.5-5.0 mmol/L, 包被的肝细胞未见溶解. 结论提出包被的细胞能去除氨, 并能保持细胞活力, 包被也能保护肝细胞在抗体介导下的细胞溶解. Chia et al^[17]用双层聚合膜包被鼠肝细胞, 外层用 25% 2-羟乙基甲基丙烯酸酯、25% 2-甲基丙烯酸、50% 甲基丙二酸盐合成聚合体, 内层用修饰的胶原为增加肝细胞的功能作为合适的衬底, 且只允许白蛋白以下的分子渗透, 但不能阻止营养、氧气、生长因子及代谢产物的交换, 结果指出包被肝细胞可用于生物反应器治疗患者.

总之, 肝病发生率不断上升及供体肝脏的缺乏, 以细胞为基础对肝功能衰竭的治疗引起广大医学工作者的关注. 目前, 体外生物人工肝支持系统仍存在一些问题, 需继续加以研究解决. 细胞方面主要存在细胞来源的选择、细胞培养的稳定性和异种细胞引起的免疫反应及感染、肿瘤细胞系对人体的影响等; 生

物反应器装置还不能完全提供细胞黏附、细胞与细胞间作用、细胞与基质作用的结构,造成物质转运与细胞功能的不完善;临床治疗存在对不同病因所致的肝功能衰竭,没有一致的疗效标准及一致的临床试验设计。但部分临床治疗病例及动物实验证明,体外生物人工肝支持系统对肝功能衰竭的治疗是有效的,随着细胞生物学、材料科学及工程学的不断发展,经过广大科技工作者的共同努力,进一步对人工肝装置的不断完善,相信对肝功能衰竭的治疗将带来新的飞跃。

4 参考文献

- 1 Matsumura KN, Guevara GR, Huston H, Hamilton WL, Rikimaru M, Yamasaki G, Matsumura MS. Hybrid bioartificial liver in hepatic failure: Preliminary clinical report. *Surgery* 1987; 101:99-103
- 2 Mundt A, Puhl G, Muller A, Sauer I, Muller C, Richard R, Fotopoulou C, Doll R, Gabelein G, Hohn W, Hofbauer R, Neuhaus Gerlach J. A method to assess biochemical activity of liver cells during clinical application of extracorporeal hybrid liver support. *Int J Artif Organs* 2002;25:542-548
- 3 Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Dc PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordially germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13726-13731
- 4 Tosh D, Shen CN, Slack JM. Differentiated properties of hepatocytes induced from pancreatic cells. *Hepatology* 2002;36:534-543
- 5 Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kad K, Huh NH. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;298:24-30
- 6 Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: Cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J* 1999;13:1883-1900
- 7 Jasmund I, Langsch A, Simmoteit R, Bader A. Cultivation of primary porcine hepatocytes in an OXY-HFB for use as a bioartificial liver device. *Biotechnol Prog* 2002;18:839-846
- 8 Mazariegos GV, Patzer JF, Lopez RC, Giraldo M, Devera MB, Grogan TA, Zhu Y, Fulmer ML, Amiot BP, Kramer DJ. First clinical use of a novel bioartificial liver support system (BLSS). *Am J Transplant* 2002;2:260-266
- 9 Custer L, Mullan CJ. Oxygen delivery to and use by primary porcine hepatocytes in the HepatAssist 2000 system for extracorporeal treatment of patients in end-stage liver failure. *Adv Exp Med Biol* 1998;454:261-271
- 10 Flendrig LM, Te Velde AA, Chamuleau RA. Semipermeable hollow fiber membranes in hepatocyte bioreactors: a prerequisite for a successful bioartificial liver? *Artif Organs* 1997;21:1177-1181
- 11 Shito M, Kim NH, Baskaran H, Tilles AW, Tompkins RG, Yarmush D, Toner M. In vitro and in vivo evaluation of albumin synthesis rate of porcine hepatocytes in a flat-plate bioreactor. *Artif Organs* 2001;25:571-578
- 12 Tilles AW, Baskaran H, Roy R, Yarmush ML, Toner M. Effects of oxygenation and flow on the viability and function of rat hepatocytes cocultured in a microchannel flat-plate bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 2001;73:379-389
- 13 Kawada M, Nagamori S, Aizaki H, Fukaya K, Niiya M, Matsuura D, Sujino H, Hasumura S, Yashida H, Mizutani S, Ikenaga H. Massive culture of human liver cancers cells in a newly developed radial flow bioreactor system: ultrafine structure of functionally enhanced hepatocarcinoma cells lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998;34:109-115
- 14 Nakazawa K, Ijima H, Fukuda J, Sakiyama R, Yamashita Y, Shim M, Shirabe K, Tsujita E, Sugimachi K, Funatsu K. Development of a hybrid artificial liver using polyurethane foam/hepatocyte spheroid culture in a preclinical pig experiment. *Int J Artif Organs* 2002;25:51-60
- 15 Glicklis R, Shapiro L, Agbaria R, Merchuk JC, Cohen S. Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 2000;67:344-353
- 16 Khan AA, Capoor AK, Parveen N, Naseem S, Venkatesan V 5th, Habibullah CM. In vitro studies on a bioreactor module containing encapsulated goat hepatocytes for the development of bioartificial liver. *Indian J Gastroenterol* 2002;21:55-58
- 17 Chia SM, Leong KW, Li J, Xu X, Zeng K, Er PN, Gao S, Yu H. Hepatocyte encapsulation for enhanced cellular functions. *Tissue Eng* 2000;6:481-495

肝纤维化治疗的新热点 - TIMPs

谢玉梅, 聂青和

谢玉梅, 聂青和, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038
项目负责人: 谢玉梅, 710038, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心
收稿日期: 2002-10-25 接受日期: 2002-11-16

摘要

肝纤维化是继发于肝脏炎症或损伤后组织修复过程中的代偿反应, 细胞外基质(ECM)合成增加、降解减少, 最终导致ECM在肝内的过度沉积, 引起肝纤维化以致肝硬化; 以往对肝纤维化过程中ECM的合成研究较多, 随着肝纤维化发生发展研究的深入, 近年来逐渐认识到ECM的降解在肝纤维化发生发展中的重要地位, 目前认为, 基质金属蛋白酶(MMPs)及其抑制物(TIMPs)是调节ECM降解的主要酶, MMPs是一组能降解ECM的重要蛋白分解酶, 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, 因此, 在ECM降解过程中起决定作用; 而TIMPs是一组具有抑制MMPs功能的活性多肽, TIMPs能与MMPs非共价结合抑制MMP的活性, 也可与酶原结合阻止其活化, 抑制ECM的降解; 在肝纤维化形成过程中, MMPs及其抑制因子的平衡在肝纤维化形成过程中起着至关重要的作用。

谢玉梅, 聂青和. 肝纤维化治疗的新热点 - TIMPs. 世界华人消化杂志 2003; 11(5):601-605

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/601.htm>

0 引言

目前, 世界范围内对慢性肝病治疗的两大策略是抗病毒^[1]治疗和阻止肝纤维化的发生^[2-5], 在抗肝炎病毒治疗方面, 虽经多年努力, 但因肝炎病毒经常发生变异, 其治疗效果总是不尽人意, 可以说, 目前尚无特效疗法治疗慢性病毒性肝炎. 因此, 许多科学家把肝病的治疗重点转到如何控制肝病的进展, 防止肝纤维化以致肝硬化的发生方面^[6], 随之而来的是对肝纤维化发生机制的研究.

近年来, 细胞外基质(extracellular matrix ECM)的研究飞速发展, 在正常肝脏的纤维组织中存在ECM生成与降解的动态平衡, 肝纤维化是ECM生成与降解过程失衡的结果^[7,8], 既往对ECM的生成与沉积研究较多, 近年开始对ECM降解的研究也日益深入, 在ECM降解过程中, 基质金属蛋白酶及其抑制物的平衡起着至关重要的作用^[9],

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)

是一组能降解细胞外基质成分的重要蛋白分解酶, MMPs是一组锌酶, 几乎能降解除多糖以外的所有ECM成分, 并能使别的MMPs激活, 形成瀑布效应^[10-13]. 人体已发现的MMP有20种, 按照作用底物不同, MMP可分为4类: (1)间质胶原酶(主要包括MMP-1, MMP-8, MMP-13)主要作用, 型胶原; (2)基质溶解素, 主要包括MMP-3, MMP-10, MMP-11及MMP-7, 主要作用于蛋白多糖等; (3)明胶酶, 主要包括MMP-2及MMP-9, 其中明胶酶A(MMP-2), 即型胶原酶, 主要参与基底膜型胶原的代谢, 与肝纤维化的发生发展紧密相关. (4)膜型金属蛋白酶(含MT-MMP1及MT-MMP2), 位于细胞的表面, 主要与MMP-2的激活有关. 肝纤维化早期, MMPs轻度增高, 而肝纤维化中晚期, MMPs活性则明显降低, 以致于ECM合成超过降解, 引起ECM大量沉积^[14]. 通过调节MMPs活性, 有助于增加基质的降解, 促进肝纤维化的逆转, MMPs在肝内主要由肝星状细胞(HSC)和Kupffer细胞分泌表达^[15,16], 激活的MMP可被普通的蛋白酶清除剂抑制, 如2-巨球蛋白, 但主要被特异的TIMPs所抑制.

组织金属蛋白酶抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP)是一组具有抑制MMPs功能的活性多肽, 他们在ECM代谢的调节中起着非常重要的作用^[17,18]. TIMPs在肝脏中来源主要为HSC、Kupffer细胞少量来源于肝细胞^[19]. TIMPs是组织中MMPs主要的内源性抑制因子, 受许多参与MMP基因调控的细胞因子和生长因子的同步调控^[20-22]. 现已发现四种TIMP即TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3、TIMP-4, 其种类及特点(见表1), 肝脏中仅有TIMP-1和TIMP-2存在. TIMPs对目前已知的MMPs均具有抑制作用.

1 TIMP分子结构及功能

TIMP-1是分子质量为29 ku的糖蛋白, 分子中有184个氨基酸, 其中含有12个半胱氨酸残基, 构成6个双硫键; TIMP-1对MMP活性的抑制是通过N末端3个缬而实现的, TIMP-1由多种结缔组织细胞产生, 在肝脏由Kupffer细胞、HSC及肌纤维母细胞产生, 以活化的HSC表达TIMP-1最强^[23,24]; TGF- β 、干扰素能够诱导TIMP-1的基因表达, TIMP-1能结合除14、19以外的所有MMP而使其活性减弱, TIMP-1与MMP-1、MMP-3结合形成1:1化合物. 肝组织内TIMP-1表达增强可促进纤维化肝间质胶原的沉积; 在病损肝中TIMP-1明显增高, 出现时间较早, 因此, 越来越多的研究人员将其看作是肝纤维化发生过程中一个非常重要的促发因素.

TIMP-2是分子质量为21 ku的蛋白质,人的TIMP-2cDNA序列有38%与TIMP-1序列相同,12个半胱氨酸残基与TIMP-1在同样的位置,具有同样的立体结构,但是不伴有糖基化,TIMP-2可与MMP-1、MMP-2和MMP-3呈1:1结合;TIMP-1及TIMP-2通过N末端结合MMP而形成复合体,不可逆地抑制MMP的活性,TIMP-1和TIMP-2除能与活性MMP结合抑制其活性外,还能以非共价形式与明胶酶原结合,与明胶酶原结合的TIMP-1或TIMP-2仍能抑制MMP的活性,提示TIMP可与明胶酶原、MMP形成三联复合体,TIMP-1及和TIMP-2的基因表达同样可被调节MMP基因表达的生长因子所调节,TNF- α 、EGF、b-FGF增加TIMP-1和间质胶原酶的表达,TGF- β 1可抑制间质胶原酶、基质溶解素、PA及TIMP-2,促进TIMP-1,PAI合成,使前MMP-1,TIMP-1,MMP-2表达增加^[25].IL-1及IL-6可增加TIMP-1的表达,间质胶原酶表达减少;PDGF可以增加间质胶原酶的含量.TIMP-1及和TIMP-2的基因表达可被调节MMP基因表达的生长因子所调节.TNF- α 、EGF、b-FGF增加TIMP-1和间质胶原酶的表达,TGF- β 1可抑制间质胶原酶、基质溶解素、PA及TIMP-2,促进TIMP-1,PAI合成,使前MMP-1,TIMP-1,MMP-2表达增加.

TIMP-3是分子量为24 kDa的蛋白质由188个氨基酸残基组成,与TIMP-1、TIMP-2分别有28%和48%的同源性,相互之间无免疫交叉反应,他与TIMP-2均为非糖基化的蛋白质,TIMP-3以不溶性形式与ECM结合,也能抑制各种MMP活性,与TIMP-1、TIMP-2不同的是,他是以与ECM结合状态存在,能抑制各种MMP活性^[26-33].

TIMP-4是分子量为22.6kDa的蛋白质,于心肌组织中发现,其作用机制不详^[34-36].TIMP-2、3、4主要结合前MMP2、9,因而在肝纤维化时,TIMP-1、TIMP-2的过多表达而抑制MMP活性是纤维生成和沉积的一个重要机制.

2 TIMPs的病理价值

当前肝组织活检仍是诊断肝纤维化的最可靠方法,但

由于肝脏病变的不均一性以及损伤性检查等问题不易被患者接受,难以反复取材,以致不能动态观察肝纤维化的形成过程及其程度,而目前尚无简便、可靠的方法确定肝组织的胶原含量.因此,仅根据肝内纤维增生的情况进行估计,具有一定的局限性;而血清学诊断是近年来研究最广泛的肝纤维化诊断方法.由于取材方便,费用低,便于开展,较为实用.通过对有关的血清学指标进行研究,至今仍未能取得具有确诊意义的指标.测定型前胶原N-末端前肽(P- NP)主要反映纤维化形成和炎症的活动性,并不能反映肝纤维化的程度.近年来,有人检测肝纤维化患者血清中的TIMP-1和胶原酶的活性,发现TIMP-1的水平增高,而胶原酶的活性降低,且二者呈负相关.Li et al用EIA法检测酒精性肝病患者血清TIMP-1水平,并与组织学指标和血清P- P 作对比,结果发现:血清TIMP-1在酒精性脂肪肝患者不增高而早期酒精性肝纤维化即有升高,升高程度与肝组织学纤维化呈显著正相关,因而可以鉴别酒精性脂肪肝与早期酒精性肝纤维化.血清TIMPs水平升高,能使MMPs活性下降,引起肝脏细胞外间质积聚,促使肝纤维化,因此认为检测血清TIMP-1的水平可作为肝纤维化的诊断指标.血清TIMPs与肝纤维化分级呈显著正相关,且在各组慢性肝病之间重叠较少,是一种反映肝脏细胞外基质降解活性低下的指标.Walsh et al^[37-47]亦对慢性肝病患者亦进行了研究,发现血清TIMP-1水平较正常人明显升高,且与血清P- P 和型胶原密切相关.我们采用单克隆抗体固相致敏红细胞黏附技术快速检测TIMP-1和TIMP-2^[48-53],以病理学诊断为肝硬化患者血清标本为阳性对照,正常人血清为阴性对照,检测408例肝病患者血清中TIMP-1和TIMP-2,其中急性肝炎128例,慢性肝炎174例,肝硬化106例,表明肝硬化阳性率明显高于慢性肝炎和急性肝炎,并随着病损程度加重而升高(慢性肝炎明显高于急性肝炎),并同时以TIMP-1 mAb及TIMP-2 mAb进行免疫组化检测其相关蛋白,并以原位杂交法检测TIMP-1 mRNA和TIMP-2 mRNA,对40例肝硬化患者肝组织中TIMP-1和TIMP-2的基因和蛋白表达进行了研究,结果支持我们上述检测结果.免疫组化及原位

表1 TIMPs种类及特点

种类	分子量(ku)	转录产物大小(kb)	抑制 MMPs	特点	在肝病中的意义
TIMP-1	29	0.9	+	与 MMP-9 前体结合	由激活的 HSCs 释放,在纤维化肝脏中明显表达或是肝细胞释放的一种急性期反应物
TIMP-2	21	1.0,3.5	+	与前体 MMP-2 结合 与基质结合	由激活的 HSCs 释放,在纤维化肝脏中明显表达 不清楚
TIMP-3	24	4.5-5.0	+		
TIMP-4	22.6	1.2-1.4	?	于心肌组织发现	不清楚

杂交技术检测结果显示: 肝纤维化时肝脏组织 TIMP-1 表达增多且主要位于新生血管、新生胆管及汇管区和纤维隔中的成纤维细胞^[54-56]. TIMP-1 的异常升高可反映体内 ECM 降解减少, TIMP-1 的血浆水平能反映纤维降解的减少, 故 TIMP-1 作为反映此类患者肝纤维化的血清学指标^[57]有良好的应用前景.

3 TIMPs 为靶基因的治疗研究

随着对肝纤维化发生机制研究的日益深入, 国内虽涌现出了大量自拟中药制剂, 但其治疗机制和作用的靶基因尚不清楚, 故而难以得到专家认可, 使其应用得到限制. 药物的靶向治疗和基因治疗是目前肝纤维化治疗研究中的两种非常有前途的治疗策略. 所谓基因治疗就是指通过基因水平操作将外源基因导入目的细胞并有效表达, 从而达到治疗或预防疾病的目的. 核酸是生物体的核心物质, 与基因组 DNA/RNA 互补的核酸称反义核酸, 包括反义 DNA、反义 RNA、核酶三大反义技术. 根据杂交互补原理, 寡核苷酸可特异性结合基因组 DNA/RNA, 从而定向抑制和阻断特定基因的复制、转录和翻译, 这一寡核苷酸被称为反义寡核苷酸(asON). asON 具有特异、高效、易人工合成等优势, 一般认为 asON 作用表现在当其进入细胞后, 能与互补 mRNA 分子特异结合, 发挥“杂交扣留”或“基因封条”作用而阻止蛋白质翻译过程. 我们选用 TIMP-1 为靶基因, 应用硫代修饰反义寡核苷酸特异性阻断 TIMP-1 的基因和蛋白表达, 实验结果发现, 模型组 TIMP-1 的表达值较正常对照组增高 400% 以上. 通过尾静脉给予 asON 后, 经免疫组化和 PCR 技术检测肝组织 TIMP-1, 发现其 TIMP-1 的蛋白和基因表达量均显著低于其他实验组, 说明经硫代修饰后的 asON 在活体内能确切表达, 并在 mRNA 水平上封闭了实验性肝纤维化大鼠肝脏中的 TIMP-1 的基因和蛋白表达, 使肝纤维化逆转成为可能.

3 展望

迄今为止, 对 MMP、TIMP 与肝纤维化的关系仍有不少问题尚在探索之中. 对 TIMP 在肝纤维化发病中作用的研究尚属起步阶段, 肝纤维化时, MMP、TIMP 调控机制、细胞来源、ECM 各种成分之间及其与细胞之间的相互关系等问题有待进一步研究. 近年随着分子生物学进展, 对 MMP、TIMP 的分子结构和基因调控有了一定的了解, 这对肝纤维化的发病机制研究提供了途径, 并将为临床上各种肝病特别是慢性肝炎和肝癌的诊断提供更加合理的方法, 加强这些方面的研究将对各种肝病的诊治及其发病机制的研究都有深远的意义.

4 参考文献

1 Cheng ML, Wu YY, Huang KF, Luo TY, Ding YS, Lu YY, Liu

- RC, Wu J. Clinical study on the treatment of liver fibrosis due to hepatitis B by IFN α 1 and traditional medicine preparation. *World J Gastroenterol* 1999;5:267-269
- 2 Cai DY, Zhao G, Chen JC, Ye GM, Bing FH, Fan BW. Therapeutic effect of Zijin capsule in liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 1998;4:260-263
- 3 Li DG, Lu HM, Chen YW. Studies on anti liver fibrosis of tetrandrine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; 7:171-172
- 4 Albanis E, Friedman SL. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001;5:315-334
- 5 Okazaki I, Watanabe T, Inagaki Y. Recent advance in understanding mechanisms of fibrogenesis and fibrolysis in hepatic fibrosis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2002;99:353-364
- 6 Li DG, Lu HM, Chen YW. Progress in studies of tetrandrine against hepatofibrosis. *World J Gastroenterol* 1998;4:377-379
- 7 Valkova M. Hepatic fibrogenesis. *Bratisl Lek Listy* 2002;103:76-85
- 8 Murawaki Y, Kawasaki H. Pathophysiology of hepatic fibrosis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 1999;96:1143-1152
- 9 Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001;21:351-372
- 10 Gagliano N, Arosio B, Grizzi F, Masson S, Tagliabue J, Dioguardi N, Vergani C, Annoni G. Reduced collagenolytic activity of matrix metalloproteinases and development of liver fibrosis in the aging rat. *Mech Ageing Dev* 2002;123:413-425
- 11 Watanabe T, Niioka M, Ishikawa A, Hozawa S, Arai M, Maruyama K, Okada A, Okazaki I. Dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. *J Hepatol* 2001;35:465-473
- 12 Lee HS, Huang GT, Miao LH, Chiou LL, Chen CH, Sheu JC. Expression of matrix metalloproteinases in spontaneous regression of liver fibrosis. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1114-1117
- 13 Lichtinghagen R, Michels D, Haberkorn CI, Arndt B, Bahr M, Flemming P, Manns MP, Boeker KH. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are closely related to the fibroproliferative process in the liver during chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2001;34:239-247
- 14 Xin SJ, Zou ZS. Metabolize of extracellular matrix. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:54-56
- 15 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21:373-384
- 16 Benyon RC, Hovell CJ, Gaca MD, Jones EH, Iredale JP, Arthur MJ. Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology* 1999;30:977-986
- 17 Yoshiji H, Kuriyama S, Miyamoto Y, Thorgeirsson UP, Gomez DE, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Tsujinoue H, Nakatani T, Thorgeirsson SS, Fukui H. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver fibrosis development in a transgenic mouse model. *Hepatology* 2000;32:1248-1254
- 18 Vaillant B, Chiamonte MG, Cheever AW, Soloway PD, Wynn TA. Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the th response: new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *J Immunol* 2001;167:7017-7026
- 19 McCrudden R, Iredale JP. Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Histol Histopathol* 2000;15:1159-1168
- 20 Ma C, Tarnuzzer RW, Chegini N. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in mesothelial cells and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Wound Repair Regen* 1999;7:477-485
- 21 Ottino P, Taheri F, Bazan HE. Platelet-activating factor induces the gene expression of TIMP-1, -2, and PAI-1: imbalance between the gene expression of MMP-9 and TIMP-1 and -2. *Exp Eye Res* 2002;74:393-402
- 22 Lee SH, Nan JX, Sohn DH. Tetrandrine prevents tissue inhibitor of metalloproteinase-1 messenger RNA expression in rat liver

- fibrosis. *Pharmacol Toxicol* 2001;89:214-216
- 23 Murphy FR, Issa R, Zhou X, Ratnarajah S, Nagase H, Arthur MJ, Benyon C, Iredale JP. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *J Biol Chem* 2002;277:11069-11076
- 24 Trim JE, Samra SK, Arthur MJ, Wright MC, McAulay M, Beri R, Mann DA. Upstream tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) element-1, a novel and essential regulatory DNA motif in the human TIMP-1 gene promoter, directly interacts with a 30-kDa nuclear protein. *J Biol Chem* 2000;275:6657-6663
- 25 Dudas J, Kovalszky I, Gallai M, Nagy JO, Schaff Z, Knittel T, Mehde M, Neubauer K, Szalay F, Ramadori G. Expression of decorin, transforming growth factor-beta 1, tissue inhibitor metalloproteinase 1 and 2, and type IV collagenases in chronic hepatitis. *Am J Clin Pathol* 2001;115:725-735
- 26 Butler GS, Apte SS, Willenbrock F, Murphy G. Human tissue inhibitor of metalloproteinases 3 interacts with both the N- and C-terminal domains of gelatinases A and B. Regulation by polyanions. *Biol Chem* 1999;274:10846-10851
- 27 Katano Y, Fukuda Y, Nakano I, Toyoda H, Ebata M, Nagano K, Morita K, Yokozaki S, Takeuchi M, Hayashi K, Hayakawa T. The expression of TIMP-3 in hepatoma cell lines. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:531-533
- 28 Okamoto Y, Nakano H. Dibutyl cyclic AMP-induced enhancement of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 expression and its possible relation to the invasive activity of the human hepatoma cell line PLC/PRF/5. *Anticancer Res* 1999;19:5175-5180
- 29 Chong NH, Alexander RA, Gin T, Bird AC, Luthert PJ. TIMP-3, collagen, and elastin immunohistochemistry and histopathology of Sorsby's fundus dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:898-902
- 30 Langton KP, McKie N, Curtis A, Goodship JA, Bond PM, Barker MD, Clarke M. A novel tissue inhibitor of metalloproteinases-3 mutation reveals a common molecular phenotype in Sorsby's fundus dystrophy. *J Biol Chem* 2000;275:27027-27031
- 31 Yeow KM, Kishnani NS, Hutton M, Hawkes SP, Murphy G, Edwards DR. Sorsby's fundus dystrophy tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) mutants have unimpaired matrix metalloproteinase inhibitory activities, but affect cell adhesion to the extracellular matrix. *Matrix Biol* 2002;21:75-88
- 32 Leco KJ, Waterhouse P, Sanchez OH, Gowing KL, Poole AR, Wakeham A, Mak TW, Khokha R. Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 2001;108: 817-829
- 33 Woessner JF Jr. That impish TIMP: the tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *J Clin Invest* 2001;108:831-841
- 34 Young DA, Phillips BW, Lundy C, Nuttall RK, Hogan A, Schultz GA, Leco KJ, Clark IM, Edwards DR. Identification of an initiator-like element essential for the expression of the tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (Timp-4) gene. *Biochem J* 2002;364:89-99
- 35 Huang W, Li WQ, Dehnade F, Zafarullah M. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) gene expression is increased in human osteoarthritic femoral head cartilage. *J Cell Biochem* 2002; 85:295-303
- 36 Bigg HF, Morrison CJ, Butler GS, Bogoyevitch MA, Wang Z, Soloway PD, Overall CM. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 2001;61:3610-3618
- 37 Schuppan D, Jax C, Hahn EG. Serum markers of liver fibrosis. *Dtsch Med Wochenschr* 1999;124:1213-1218
- 38 Sauerbruch T. Serologic diagnosis of liver fibrosis. *Dtsch Med Wochenschr* 1999;124:1191
- 39 Dziankowska-Bartkowiak B, Waszczykowska E, Luczynska M, Zalewska A, Sysa-Jedrzejowska A. Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 2 in systemic sclerosis: a preliminary study. *Med Sci Monit* 2002;8:CR108-112
- 40 Murawaki Y, Ikuta H, Kawasaki H. Clinical usefulness of serum tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1)-2 assay in patients with chronic liver disease in comparison with serum TIMP-1. *Clin Chim Acta* 1999;281:109-120
- 41 Boker KH, Pehle B, Steinmetz C, Breitenstein K, Bahr M, Lichtinghagen R. Tissue inhibitors of metalloproteinases in liver and serum/plasma in chronic active hepatitis C and HCV-induced cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 2000;47:812-819
- 42 Walsh KM, Timms P, Campbell S, MacSween RN, Morris AJ. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases -1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) as noninvasive markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci* 1999;44:624-630
- 43 Kobayashi H, Li ZX, Yamataka A, Lane GJ, Miyano T. Clinical evaluation of serum levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases as predictors of progressive fibrosis in postoperative biliary atresia patients. *J Pediatr Surg* 2002;37:1030-1033
- 44 Holoman J, Glasa J, Galbavy S, Danis D, Molnarova A, Kazar J, Bednarova A, Misianik J. Serum markers of liver fibrogenesis, and liver histology findings in patients with chronic liver diseases. *Bratisl Lek Listy* 2002;103:70-75
- 45 Ninomiya T, Yoon S, Nagano H, Kumon Y, Seo Y, Kasuga M, Yano Y, Nakaji M, Hayashi Y. Significance of serum matrix metalloproteinases and their inhibitors on the antifibrogenetic effect of interferon-alfa in chronic hepatitis C patients. *Intervirolgy* 2001;44:227-231
- 46 Young-Min SA, Beeton C, Laughton R, Plumpton T, Bartram S, Murphy G, Black C, Cawston TE. Serum TIMP-1, TIMP-2, and MMP-1 in patients with systemic sclerosis, primary Raynaud's phenomenon, and in normal controls. *Ann Rheum Dis* 200;60: 846-851
- 47 Li BS, Wang J, Zhen YJ, Liu JX, Wei MX, Sun SQ, Wang SQ. Experimental study on serum fibrosis markers and liver tissue pathology and hepatic fibrosis in immuno-damaged rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:1031-1034
- 48 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Bai XG, Cao YZ. Methodologic research on TIMP-1, TIMP-2 detection as a new diagnostic index for hepatic fibrosis and its significance. *World J Gastroenterol* 2002;8: 282-287
- 49 Xie YM, Nie QH, Zhou YY, Cheng YQ, Kang WZ, Zhao YL. Tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) mRNA and antigens location in the liver of patients with cirrhosis. *Chonghua Chuanranbing Zazhi* 2001;19: 352-354
- 50 Nie QH, Zhou YY, Xie YM, Wang QC, Du DW. SPASE for rapid detection of serum TIMP-1 in patients with liver cirrhosis. *Disi Junyin Daxue Xuebao* 2000;7:793-795
- 51 Xie YM, Nie QH, Zhou YY. MAb-SPASE for detection of serum TIMP-2 in patients with liver cirrhosis. *Xibao Yu Fengzi Mianyi Zazhi* 2000;16:S11-S13
- 52 Nie QH, Zhou YX, Xie YM. Expression and significance of tissue inhibitors of metalloproteinase-1 and -2 in serum and liver tissue of patients with liver cirrhosis. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001; 81:805-807
- 53 Nie QH, Cheng YQ, Xie YM, Zhou YX, Cao YZ. Inhibiting effect of antisense oligonucleotides phosphorothioate on gene expression of TIMP-1 in rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:363-369
- 54 Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000; 113:443-453
- 55 Yata Y, Takahara T, Furui K, Zhang LP, Watanabe A. Expression of matrix metalloproteinase-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in acute liver injury. *J Hepatol* 1999;30:419-424

- 56 Yata Y, Takahara T, Furui K, Zhang LP, Jin B, Watanabe A. Spatial distribution of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 mRNA in chronic liver disease. *J Hepatol* 1999;30:425-432
- 57 Knittel T, Mehde M, Grundmann A, Saile B, Scharf JG, Ramadori G. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during hepatic tissue repair in the rat. *Histochem Cell Biol* 2000;113:443-453

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 封面故事 •

浙江大学医学院附属第二医院外科

浙江大学医学院附属第二医院外科前身为浙江医科大学附属第二医院外科, 创建于 1869 年, 历史悠久, 具有 “严谨、求实、创新” 的优良传统. 1912 年开始招收本科生, 1981 年开始招收硕士研究生; 1986 年被国务院批准为全国首批博士学位授予点之一. 1994 该学科被省教委批准为省级重点扶植学科. 1999 年与浙江大学合并后更名为浙江大学医学院附属第二医院外科.

1 学术地位

该学科为浙江省重点学科, 211 建设项目重点学科, 中国抗癌协会胆囊癌专业委员会依托单位. 曾多次举办 “全国刮吸手术解剖法学习班”, 备受外科界密切关注. 其中肝、胆、胰疾病的外科治疗在国内享有较高的声誉, 并占有重要的地位.

2 硬件条件

该学科由临床外科和外科实验室两部分组成, 拥有 100 张病床和精良的实验室设施, 开展了各种肝、胆、胰疾病的临床和基础研究.

3 技术力量

该学科为博士学位和硕士学位授予点, 设有临床医学博士后流动站. 现有博士生导师 4 名, 硕士生导师 15 名, 教授 12 名, 副教授 8 名, 主治医师 6 名, 住院医师 6 名, 副主任技师 1 名, 主管技师 1 名.

4 临床特色

该学科以肝、胆、胰疾病及胃肠道肿瘤为主, 并兼顾普外科其他疾病的研究和治疗工作. 该学科的彭淑牖教授经过多年研究和临床实践发明的多功能手术解剖器和创立的刮吸法断肝术, 有效的提高了大范围肝癌、高位胆管癌及胆囊癌的手术切除率. 使用这种技术不仅使肝切除手术能在县市级医院普遍开展, 又使以往视为禁区的尾状叶及肝脏任何部位大范围切除成为可能. 该学科成功地切除了高难度尾状叶癌 70 例, 而且效果良好; 中晚期胆囊癌经 “扩大根治术” 后 1 a 生存率已超过 90%. 肝门胆管癌手术切除率达到 82.5%, 居国际领先水平, 此项发明获 2001 年国家技术发明二等奖. 在胰腺疾病的治疗方面, 早在 1950 年代该科就首先在国内开展了胰十二指肠切除术. 而 1996 年该科彭淑牖教授设计和采用的 “捆绑式胰肠吻合术” 杜绝了胰腺癌根治术后最严重的并发症 - 胰漏, 此法在全国 80 多家医院推广应用, 已成功地施行了 1 000 例, 仅有 2 例因没有按照正规操作而术后发生胰漏的. 此术式获得浙江省科技进步一等奖. 除此之外, 该科近年来开展的 “网膜囊造袋术延期开放治疗出血坏死性胰腺炎” 在国内处于领先地位; “序贯式外、内引流治疗假性胰腺囊肿” 也为国际首创.

5 科研方面

该学科承担着多项国家自然科学基金课题和省部级多项基金课题及浙江省科技发展重大项目的课题, 经费总额达 1 000 万元. 先后通过省级以上的成果鉴定 6 项, 获省部级以上奖励 15 项, 国家专利 7 项, 其中包括: “刮吸手术解剖法与多功能手术解剖器” 获 2001 年国家发明二等奖; “捆绑式胰肠吻合术” 获 2001 年浙江省科技进步一等奖; “调控 Ki-67 基因与胰腺癌细胞的增生抑制及凋亡” 获 2001 教育部科技进步二等奖; “刮吸法断肝术” 获 1996 年浙江省科技进步一等奖; “非同位素原位杂交和免疫组化研究人类胰腺癌的 ki-67 基因表达” 获浙江省教委科技进步一等奖及浙江省政府科技进步二等奖; “高渗氯化钠溶液治疗失血性休克的动物实验研究及临床研究” 获浙江省科技成果奖. 镍钛记忆合金支撑管的研制成功填补了国内空白, 获浙江省科技进步一等奖. 该学科在不影响患者的前提下, 对不同肝脏功能状况下肝热缺血时限进行了研究, 首次阐明了不同肝脏功能状况下人肝脏热缺血时限, 对肝脏外科的发展起着重要作用. 同时彭淑牖教授个人也因在科学技术方面的突出贡献, 在 2002 年获得了 “何梁何利基金” 科学与技术进步二等奖和吴孟超肝脏外科医学二等奖.

6 国际合作

该学科的彭淑牖教授曾先后多次应邀赴美国、英国、印度及中国台湾、香港等国家和地区进行讲学和手术示范, 并有苏丹、香港和中国台湾等国家和地区的外科同道前来参观学习彭淑牖教授的手术表演. 为此同这些国家和地区的医学同道和科研机构建立起了良好的友好合作关系.

7 封面图片

图 1 获吴孟超肝胆外科医学奖与裘法祖院士和吴孟超院士合影

图 2 参加世界华人消化大会

图 3 彭淑牖教授

图 4 胰头癌淋巴清扫手术照

图 5 经肝正中裂劈开肝尾叶切除手术照

图 6 捆绑式胰肠吻合术手术照

8 通讯地址

310009, 浙江省杭州市解放路 88 号, 浙江大学医学附属第二医院外科.

p63 基因研究进展

司少艳, 张建中

司少艳, 张建中, 中国人民解放军解放军第306医院病理实验科 北京市 100101
项目负责人: 张建中, 100101, 北京市, 中国人民解放军解放军第 306 医院病理
实验科. zhangjz@sina.com.cn
电话: 010-66356111 传真: 010-64871261
收稿日期: 2002-10-07 接受日期: 2002-10-30

摘要

p63 是近年发现的 p53 家族成员之一, 由于启动子的不同和 3' 端剪切方式的不同, p63 基因可编码多种具有不同活性的异构体, 可分成两大类: 具有反式激活区的 TA 异构体和 N 末端截短的 N 异构体. TA 异构体具有 p53 样活性诱导细胞周期停滞和凋亡, N 异构体则抑制 p53 的功能促进转化细胞的生长. p63 主要在各种上皮组织的发育、分化和形态发生上起重要作用, 对于胚胎形成过程中外胚层的发育具有重要的意义, 在肿瘤发生中更多的是致癌作用而不是抑癌作用.

司少艳, 张建中. p63 基因研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(5):606-609
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/606.htm>

0 引言

p63 是近年发现的 p53 家族成员之一, 与 p53 基因编码单一产物不同的是 p63 基因可编码多种具有不同活性的异构体. p53 的主要功能是抑制细胞生长和诱导凋亡, 大多数肿瘤的发生与 p53 基因突变有关. p53 是目前功能比较明确的肿瘤抑制基因. 虽然 p63 与 p53 在蛋白序列上同源性高达 60%, 但研究发现这两个同源性蛋白在体内具有不同的作用. p63 主要在各种上皮组织的发育、分化和形态发生上起重要作用, 对于胚胎形成过程中外胚层的发育具有重要的意义, 在肿瘤发生中更多的是致癌作用而不是抑癌作用. p63 的功能及其调控以及在肿瘤中的作用目前还不十分清楚, 本文仅就 p63 基因研究现状做一综述.

1 p63 基因结构与功能^[1-9]

p63 基因位于染色体 3q27-3q29 区, 含有两个独立的启动子, 第二个启动子位于下游 30 kb 的一个内含子内. 由于启动子的不同和 3' 端剪切方式的不同, p63 基因至少编码六种异构体, 可分成两大类: 从外显子 1 开始转录具有反式激活区的异构体称为 TA 异构体; 从另一个位于外显子 3 和 4 之间的外显子 3' 开始转录的没有反式激活区的异构体称为 N 异构体. 由于 3' 端剪切方式的不同而产生 3 种 C 末端不同的异构体, 又分为 α 、 β 和 γ , 其中 α 异构体为全长的异

构体, β 异构体为剪切掉外显子 13 的异构体, γ 异构体为剪切掉外显子 11-14 的异构体. p63 在蛋白质结构上具有 p53 的标志性特征: 从 N 端到 C 端具有反式激活区、DNA 结合区和寡聚区, 在 DNA 结合区 p63 与 p53 的同源性高达 60%, 提示 p63 和 p53 能够结合同一 DNA 位点, 反式激活同一靶基因. 寡聚区较高的同源性提示 p63 可与 p53 家族成员形成异聚体或同聚体, 而文献[10]报道更易形成同聚体. 除含有与 p53 共同的三个区域外, 在 p63 较长的 C 末端含有一个 SAM 结构域(sterile motif), 这种 SAM 结构域一般在调控发育的蛋白中才有.

p63 的各异构体具有不同的功能. TAp63 的功能与 p53 类似, 可与 p53 的 DNA 结合位点结合并激活 p53 相关启动子, 如 p21、MDM2 和 Bax 等, 诱导细胞周期的停滞和凋亡. TAp63 各异构体之间 p53 样活性的大小也不尽相同, 其中 TAp63 的转录激活作用最强, 而 Np63 仅有很小的活性, 提示调控成分在 C 末端的 SAM 结构域^[11,12]. Np63 缺乏反式激活区, 不能激活 p53 靶基因的转录, 而是以显性失活的方式抑制 p53 和 TAp63 的反式激活作用, 不诱导凋亡. 体内和体外实验均表明 Np63 可促进转化细胞的生长^[13].

Np63 对 p53 和 TAp63 的抑制作用可能通过以下两种机制: 第一种, Np63 可与 p53 和 TAp63 竞争 DNA 靶位点, 而又不具有反式激活作用, 从而达到抑制作用. 第二种抑制方式可能是 N 异构体与 p53 和 TAp63 之间形成转录激活功能不全的异聚体^[4,10]. 总之, p53 与 p63 之间存在相互作用. 研究表明 p63 主要作为 p53 的失活调控因子起作用, 而 p53 对调控 p63 的稳定性起作用^[14,15]. 这种严格的相互作用使 p63 维持正常的细胞增生和凋亡的平衡而不致发生肿瘤.

2 p63 在组织中的表达

Hall et al^[16]采用免疫组化的方法检测了 p63 在人体各种组织细胞中的表达情况, 发现 p63 在人体组织中呈广泛而有选择性的表达, 如食管、肺、皮肤、肌肉、乳腺、脾、淋巴细胞、神经组织、消化系统和泌尿生殖系统等都有不同程度的表达. 研究还发现 p63 在这些组织细胞中的构成和亚细胞定位都有所不同.

p63 在各种上皮组织中主要分布在增生区, 如食管、口腔黏膜、皮肤、子宫颈的复层膜和生精小管上皮都有很强的核染色. 胃腺颈细胞、大肠基底细胞和小肠隐窝下 1/3 腺细胞中阳性细胞较多, 远离大

肠基底和小肠隐窝, 随着向大肠和小肠表面移行, 其阳性细胞数量和密度逐渐减少. 肾脏中也有大量的肾小管上皮细胞呈阳性反应. 胃体和窦门上皮、肠道绒毛被覆细胞中没有 p63 的表达.

p63在导管腺结构的器官中呈不同的胞质和胞核的染色, 如胰腺和腮腺的一部分腺泡细胞呈很强的核染色, 而二者导管上皮均显示不同的以核和胞质为主的染色类型. 成年人未妊娠乳腺小叶上皮呈广泛的核染色, 皮肤附件结构如毛囊和汗腺呈胞质和胞核染色.

p63在非上皮性结构也有广泛的表达, 胃肠道和子宫内壁的平滑肌, 黏膜下丛和肌神经丛的神经节细胞, 脾、扁桃体和淋巴结滤泡生发中心高度增生的淋巴细胞, 外周血淋巴细胞, 肝细胞等都有较强的胞质或胞核的染色. 而高度增生的胸腺皮质细胞检测不到阳性细胞. 内分泌组织(肾上腺、胰岛、甲状腺和甲状旁腺)有不均匀的细胞核染色, 阳性细胞约占 10-25%.

Western blot 和 RT-PCR 分析表明结肠、卵巢、平滑肌、皮肤和肺以 p63 为主, 食管、肝脏、乳腺、胰腺和前列腺以 Np63 为主^[16-18].

3 p63 在发育中的作用

p63 最长羧基端含有一个 SAM 结构域, 而这种结构存在于许多参与组织发育和分化的信号蛋白中^[2]. 研究还发现 p63 对于胚胎外胚层的发育, 上皮干细胞的增生、生长, 上皮组织的发育、分化和形态发生均具有重要的意义^[19-21].

研究人员采用同源性重组方法培育 p63^{+/+} 和 p63^{-/-} 小鼠, 通过检测这些 p63 基因缺陷小鼠的表型揭示了 p63 对细胞、组织和器官发育的意义. 研究发现 p63 基因缺陷的小鼠发生外胚层顶脊的发育缺陷, 这样的小鼠出生后四肢截短, 毛囊、牙齿、泪腺或唾液腺、皮肤、前列腺、乳腺和尿道上皮等结构缺失^[19,20]. 另外在人类也发现相似发育缺陷的儿童: 缺指(趾)、外胚层发育不良和唇额裂, 称为 EEC 综合征. 继而研究证实 p63 基因突变是 EEC 综合征的主要原因^[22,23]. 上述结果表明 p63 在胚胎形成过程中对于外胚层的发育分化起重要作用.

一项胚胎发育的回顾性分析^[19]显示了 p63 缺陷小鼠缺乏上皮结构的原因: 上皮干细胞在胚胎发育过程中的耗尽. 上皮干细胞对于可再生的多层上皮的发育和维持很重要, 在胚胎发育后期, 原始单层外胚层对中胚层信号做出反应, 分层形成分化的表皮. 然而不象野生型细胞经过干细胞的不对称分裂发育, 一部分上皮干细胞保留下来, 而是 p63 缺失的所有上皮干细胞都被激活经过终末分化, 结果没有上皮干细胞保留下来以维持表皮和其他依赖 p63 的上皮的存在, 而导致 p63 缺陷小鼠出生后缺乏广泛上皮结构. 表明 p63 对于上皮干细胞的增生和生存具有重要的意义. p63 蛋白在上皮组织增生区的高度表达^[16,24]并得到体外实验进

一步证实: 在角质形成细胞中 Np63 是 p53 浓度的 5 倍, 经紫外线照射后, p53 表达升高, Np63 的表达下降, 部分细胞发生凋亡. 而转基因细胞 Np63 的过量表达抑制细胞的凋亡, 凋亡细胞的数量较非转基因细胞下降 40-45%^[25].

4 p63 在肿瘤中的作用

p53 在大于 50% 的肿瘤中发生错意突变或等位丢失, 成为无活性的 p53, 而失去抗肿瘤的功能^[26-29]. 与 p53 相反, p63 在肿瘤中的突变非常罕见. Osada et al^[30]检测了 101 株肿瘤细胞, 分别在 1 株肺癌、1 株头颈癌和 1 株卵巢癌中检测到 p63 的突变, 均位于 DNA 结合区. Hagiwara, et al^[31]检测了 54 种人的肿瘤细胞株, 仅发现两株突变. Tannapfel et al^[32]发现 32 个患者的 68 个胃部肿瘤中仅有 1 例发生了 p63 的多态性无意突变, 没有发现氨基酸的替换和读码框架的改变.

Barrett 食管(barrett esophagus, BE) 相关多层上皮由于在形态学和免疫表型上具有鳞状上皮和柱状上皮的特征, 被认为是 BE 的早期阶段. BE 的食管下部复层鳞状上皮被含有杯状细胞的肠道柱状上皮所取代, BE 可进一步发展为腺癌. Glickman et al^[33]采用免疫组化的方法观察了正常食管、BE 相关多层上皮、BE、食管鳞癌和腺癌、结肠腺癌 p63 的表达情况, 并与 Ki67、细胞角蛋白(cytokeratin, CK)13(鳞状细胞标志)、CK14(基底鳞状细胞标志)、CK8/18(柱状细胞标志)、CK19(基底柱状细胞标志)的表达情况相比较, 以探索食管肿瘤发生的致病机制. 发现正常食管复层鳞状上皮的基底细胞及紧邻基底的一到两层棘细胞和食管黏膜腺导管的基底细胞 p63 阳性; BE 不表达 p63; 13 例中 9 例(69%)BE 相关多层上皮的基底细胞表达 p63, BE 相关多层上皮和黏膜腺导管均为 p63 和 CK8/18 阳性, CK13 分别为 67% 和 30% 阳性, CK14 阴性; 鳞状上皮中 p63 阳性细胞 100%, CK13 和 CK14 阳性, CK8/18 阴性; 在所有食管鳞状细胞癌中 p63 呈弥漫性表达, 但食管和结肠腺癌不表达 p63; 正常食管鳞状上皮 Ki67 阳性的细胞同时表达 p63, 食管鳞状细胞不典型增生和侵袭性鳞状细胞癌中 p63 阳性的细胞也表达 Ki67 蛋白. RT-PCR 分析发现这些表达 p63 的细胞中主要表达 Np63. 以上结果表明 p63 在增生的上皮细胞中表达, 在鳞状细胞癌中表达上调, p63 在鳞状细胞癌发生过程中具有重要的作用; BE 相关多层上皮与黏膜腺导管上皮具有相似性, 可能来源于黏膜腺导管上皮. Tannapfel et al^[34]采用原位杂交的方法分析发现 46 例胃部肿瘤中的 22 例(48%)可检测到 p63 的转录物, 在非肿瘤胃组织中仅有个别的细胞表达 p63, 肿瘤的间质细胞和炎症细胞中 p63 阴性. 因此, 原位杂交清晰地显示出 p63 的转录主要定位于胃的肿瘤细胞. 采用免疫组化的方法分析发现 68 例胃部肿瘤中有 25 例可检测到 p63 蛋白, 阳性细胞在肿瘤组织内

呈不均匀分布,分化程度差的肿瘤阳性细胞明显增多,弥漫型胃癌的大多数肿瘤细胞 p63 阳性.分化差的小肠癌中 p63 阳性细胞数量明显高于分化好的小肠癌.

Park et al^[35]采用 RT-PCR 方法分析了 12 例正常膀胱组织和 47 例膀胱癌 p63 的突变和 TAp63、Np63 的表达情况,其中 6 例膀胱癌有与其匹配的正常膀胱组织.发现 47 例膀胱癌中没有 1 例发生突变.正常膀胱组织中可检测到 TAp63 的表达, Np63 检测不到或极低.47 例膀胱癌中 25 例(53.2%)TAp63 显著降低,30 例(63.8%) Np63 异常过量的表达,6 例具有匹配正常膀胱组织的膀胱癌中,分别有 2 例和 3 例发生肿瘤特异性 TAp63 和 Np63 表达,另外, TAp63 表达量的降低与肿瘤的分期和分级相关. Kaufmann et al^[36]采用免疫组化的方法观察了 73 例来自食管、肛管、肺、头颈部和子宫颈鳞癌,141 例多个原发位点非鳞状细胞癌和 20 例尿道上皮癌的 p63 表达情况,发现 59 例(81%)鳞癌,14 例(70%)尿道上皮癌,20 例(14.2%)非鳞状细胞癌过量表达 p63, p63 阳性细胞呈弥漫型分布.研究还发现各种上皮细胞肿瘤主要表达 Np63 异构体^[21,35-39].

p63 在肿瘤中很少发生突变,而 p63 基因缺失的小鼠也没有表现出易患肿瘤的倾向.另外, p63 基因位点在多种肿瘤中扩增而不是丢失,提示 p63 在肿瘤发生中更多的是致癌而不是抑癌作用^[4,13]. p63 在食管、头颈部、肺、子宫颈等部位的鳞癌、膀胱癌、鼻咽癌中的过量表达^[33, 35, 36, 38-41],而且 Np63 在 Rat-1a 细胞中的过量表达促进转化细胞的生长和无胸腺小鼠肿瘤的生长.另外,增生的角质形成细胞、各种上皮细胞肿瘤和损伤主要表达 Np63 异构体^[21,33,35].上述结果表明 p63 在肿瘤的发生过程中, p63 对调控细胞增生具有重要的作用;在肿瘤发生过程中 Np63 可能通过显性失活的方式抑制 TAp63 和 p53 的功能而促进肿瘤的发生; p63 各异构体之间以及与 p53 之间相互作用可能在肿瘤发生中起到致癌作用,但这些相互作用的调控以及与其他分子的作用有待研究.

总之, p63 蛋白广泛表达于人体正常组织中,增生的上皮细胞尤为显著. p63 对于四肢和外胚层的发育以及上皮干细胞的增生十分重要,在肿瘤发生中尤其是鳞癌的发生中起着重要的作用.由于 p63 多种异构体的存在及其在组织、器官及其肿瘤中呈选择性的表达,因此深入研究 p63 基因的转录剪切机制、各种异构体在细胞周期和肿瘤发生中的作用及其与 p53 和其他相关分子的相互作用,对探讨肿瘤发生的机制、基因治疗,细胞的发育及分化等具有重要的意义.

5 参考文献

- Schmale H, Bamberger C. A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene* 1997;15:1363-1367
- Shimada A, Kato S, Enjo K, Osada M, Ikawa Y, Kohno K, Obinata M, Kanamaru R, Ikawa S, Ishioka C. The transcriptional activities of p53 and its homologue p51/p63: similarities and

- differences. *Cancer Res* 1999;59:2781-2786
- Katoh I, Aisaki KI, Kurata SI, Ikawa S, Ikawa Y. p51A (TA p63 gamma), a p53 homolog, accumulates in response to DNA damage for cell regulation. *Oncogene* 2000;19:3126-3130
- Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998;2:305-306
- Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet* 2002;18:90-95
- Kaelin WG Jr. The emerging p53 gene family. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:594-598
- Kaelin WG Jr. The p53 gene family. *Oncogene* 1999;18:7701-7705
- Levero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci* 2000;113:1661-1670
- Little NA, Jochemsen AG. p63. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:6-9
- Davison TS, Vagner C, Kaghad M, Ayed A, Caput D, Arrowsmith CH. p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53. *J Biol Chem* 1999;274:18709-18714
- Chi SW, Ayed A, Arrowsmith CH. Solution structure of a conserved c-terminal domain of p73 with structural homology to the SAM domain. *EMBO J* 1999;18:4438-4445
- Thanos CD, Bowie JU. p53 family members p63 and p73 are SAM domain-containing protein. *Protein Sci* 1999;8:1708-1710
- Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra WH, Caballero OL, Hill DE, Ratovitski EA, Jen J, Sidransky D. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:5462-5467
- Gaidon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 Down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol* 2001;21:1874-1887
- Ratovitski EA, Patturajan M, Hibi K, Trink B, Yamaguchi K, Sidransky D. p53 associates with and targets Delta N p63 into a protein degradation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:1817-1822
- Hall PA, Campbell SJ, O'Neill M, Royston DJ, Nylander K, Carey FA, Kernohan NM. Expression of the p53 homologue p63 alpha and beta N p63 alpha in normal and neoplastic cells. *Carcinogenesis* 2000; 97:153-160
- Signoretto S, Waltregny D, Dilks J, Isaac B, Lin D, Garraway L, Yang A, Montironi R, McKeon F, Loda M. p63 is a prostate basal cell marker and is required for prostate development. *Am J Pathol* 2000; 6:1769-1775
- Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi MG, Macri E, Rizzo A, Viale G, Dogliani C. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *Am J Surg Pathol* 2001; 8:1054-1060
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F. p63 is an essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* 1999;398:714-718
- Mills A, Zheng B, Wang XI, Vogel H, Roop DR, Bradley A. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* 1999;398:708-713
- Parsa R, Yang A, McKeon F, Green H. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1999;113:1099-1105
- Celli J, Duijf P, Hamel BC, Bamshad M, Kramer B, Smits AP, Newbury-Ecob R, Hennekam RC, van Buggenhout G, van Haeringen A, Woods CG, van Essen AJ, de Waal R, Vriend G, Haber DA, Yang A, McKeon F, Brunner HG, van Bokhoven H. Heterozygous germline mutations in the p53 homologue p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell* 1999;99:143-145
- van Bokhoven H, Hamel BC, Bamshad M, Sangiorgi E, Gurrieri F, Duijf PH, Van molkot KR, van Beusekom E, van Beersum SE, Celli J, Merckx GF, Tenconi R, Fryns JP, Verloes A, Newbury-Ecob RA, Raas-Rotschild A, Majewski F, Beemer FA, Janecke A, Chitayat D, Crisponi G, Kayserili H, Yates JR, Neri G, Brunner HG. p63 gene mutations in eec syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 2001;69:481-492

- 24 Bamberger C, Schmale H. Identification and tissue distribution of novel KET/p63 splice variants. *FEBS Lett* 2001;501:121-126
- 25 Liefer KM, Koster M, Wang XJ, Yang A, McKeon F, Roop DR. Down-regulation of p63 is required for epidermal UV-B-induced apoptosis. *Cancer Res* 2000;60:4016-4020
- 26 Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53
- 27 Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-4878
- 28 Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 1997;90:809-819
- 29 Hainaut P, Hernandez C, Robinson A, Rodriguez-Tome P, Flores T, Hollstein M, Harris CC, Montesano R. IARC database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acid Res* 1998;26:205-213
- 30 Osada M, Ohba M, Kawabara C, Ishioka C, Kanamaru R, Katoh I, Ikawa Y, Nimura Y, Nakagawara A, Obinata M, Ikawa S. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med* 1998;7:839-843
- 31 Hagiwara K, McMenamin MG, Miura K, Harris CC. Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/ CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers. *Cancer Res* 1999;59:4165-4169
- 32 Tannapfel A, Wasner M, Krause K, Geissler F, Katalinic A, Hauss J, Mossner J, Engeland K, Wittekind C. Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1154-1158
- 33 Glickman JN, Yang A, Shahsafaei A, McKeon F, Odze RD. Expression of p53-related protein p63 in the gastrointestinal tract and in esophageal metaplastic disorders. *Hum Pathol* 2001;32:1157-1165
- 34 Tannapfel A, Schmelzer S, Benicke M, Klimpfing M, Kohlhaw K, Mossner J, Engeland K, Wittekind C. Expression of the p53 homologues p63 and p73 in multiple simultaneous gastric cancer. *J Pathol* 2001;195:163-170
- 35 Park BJ, Lee SJ, Kim JI, Lee SJ, Lee CH, Chang SG, Park JH, Chi SG. Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. *Cancer Res* 2000;60:3370-3374
- 36 Kaufmann O, Fietze E, Mengs J, Dietel M. Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical marker for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. *Am J Clin Pathol* 2001;6:823-830
- 37 Nylander K, Coates P, Hall P. Characterization of the expression pattern of p63 alpha and delta N p63 alpha in benign and malignant oral epithelial lesions. *Int J Cancer* 2000;87:368-372
- 38 Weber A, Bellmann U, Bootz F, Wittekind C, Tannapfel A. Expression of p53 and its homologues in primary and recurrent squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 2002;99:22-28
- 39 Crook T, Nicholls JM, Brooks L, O'Nions J, Allday MJ. High level expression of deltaN-p63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC)? *Oncogene* 2000;30:3439-3444
- 40 Choi HR, Batsakis JG, Zhan F, Sturgis E, Luna MA, El-Naggar AK. Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis. *Hum Pathol* 2002;33:158-164
- 41 Quade BJ, Yang A, Wang Y, Sun D, Park J, Sheets EE, Cviko A, Federschneider JM, Peters R, McKeon FD, Crum CP. Expression of the p53 homologue p63 in early cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 2001;81:24-29

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界胃肠病学杂志英文版获得 2003 - 2004 年 国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助

本刊讯 世界胃肠病学杂志英文版(*World Journal of Gastroenterology*)申报的 2002 年度国家自然科学基金重点学术期刊专项基金项目,经专家评审,国家自然科学基金委员会委务会议审定,予以批准资助(项目批准号: 30224801),资助期限 2 年,2003 - 2004 年,资助强度每年 8 万元。

2002 年度重点学术期刊专项基金资助 30 本学术期刊,分别为天体物理学报(英),计算数学(英),理论物理通讯(英),中国物理快报(英),力学学报(英),分析化学,高等学校化学学报,化学学报,化学通报,中国化学工程学报(英),世界胃肠病学杂志(英)作物学报,中国农业科学,中国中西医结合杂志,中国药理学报(英),生物化学与生物物理学报,细胞研究(英)植物学报(英)大气科学进展(英),地球物理学报,地质学报(英),金属学报,稀土学报(英),材料科学技术(英),稀有金属材料与工程,电力系统自动化,计算机科学技术学报(英),管理科学学报,中国科学(中、英),科学通报(中、英) (世界胃肠病学杂志社 2002-10-18)

老年期消化系疾病的诊疗特点

宋于刚

宋于刚,中国人民解放军第一军医大学南方医院 广东省广州市 510515
项目负责人:宋于刚,510515,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学南方医院. songyg@fimmu.com
电话:020-61641001 传真:020-87705671
收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-11-28

宋于刚. 老年期消化系疾病的诊疗特点. 世界华人消化杂志 2003;11(5):610-612
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/610.htm>

0 引言

随着我国国民经济发展、综合国力提高,以及医疗卫生事业的进步,人民生活和健康水平在不断提高,平均寿命不断增长.目前,我国已经接近成为老龄型国家,且人口老龄化速度还在增快,这便给老年医学提出了新的课题与挑战.老龄化对于消化系疾病的发生、发展有着重要影响,使得老年消化专业面临着一系列的新问题.就我国老年消化专业临床、科研工作来说,目前仍存在不少疑难与热点,故应重视对老年消化系疾病诊断和治疗特点的认识.本文便拟就老年期消化系疾病诊疗特点方面的部分内容,进行初步的总结与探讨.

1 胃黏膜的防御基础

胃黏膜经常受食物和内分泌的影响而发生损害,但可以很快修复,使损害局限于最表层细胞,从而防止进入系统循环的物质对器官造成损害.胃黏膜的防御基础不是一个静态屏障,而是抵御特定损害的动态过程,当刺激物在胃内出现时,黏膜的抵御能力也被提高.胃黏膜防御基础的不同组分可被看做是适合于黏膜解剖结构而组织起的多级体系.第一级防御体系由分泌到胃内的胃酸、黏液、碳酸氢盐、免疫球蛋白、表面活性磷脂等组成.第二级防御体系是黏膜上皮,可以显著抵御胃酸引起的损伤,形成对于被动弥散相对紧密的屏障.第三级防御体系是黏膜微循环,及其与黏膜内和黏膜下感觉传入神经的协同作用.第四级防御体系是黏膜免疫系统,如肥大细胞和巨噬细胞可感知外来物质进入黏膜并引起炎症反应.此外,当损害侵入上皮深层时,黏膜能够通过胃腺的再生、外源和内源神经系统支配的更新、微循环的重建来进行修复.在这些过程中,各种细胞因子起到了极其关键的作用^[1,2].

随着人之衰老,机体脏器细胞减少、器官萎缩,在吸收、代谢和排泌等方面的功能,都较青壮年时期有明显的退化.当胃酸和胃蛋白酶等黏膜攻击因子增强,或黏液屏障、黏膜屏障和黏膜血流量等黏膜防御因子减弱,以至二者失衡时,就可引起消化性溃疡.老年

消化性溃疡在临床症状、病变部位、并发症、伴随疾病及死亡率等方面均具有一定的特点.就现有老年消化性溃疡的流行病学资料来看,我国60岁以上老年人中,消化性溃疡患病率为5%左右,其中老年男性消化性溃疡的患病率明显高于老年女性.老年消化性溃疡与抑郁情绪、脑力劳动、年龄及性别、心理状态等影响因素相关^[3,4].

2 老年期消化性溃疡的发病情况

老年消化性溃疡的发病机制是综合、复杂、且个性化的.老年人可因齿疾而妨碍食物在口腔内的充分咀嚼,进而影响到后续的食物消化.老年人胃排空能力减弱,食物在胃内留滞时间延长,细菌更易于生长,并可能对黏膜造成损伤.老年人视觉、嗅觉、味觉功能减退,食物之色、香、味不能很好地刺激老年人各类感受器官,亦使消化受到影响.老年人胃黏膜呈退行性变,往往合并动脉硬化,局部供血量趋向减少,有慢性进行性营养不良.幽门螺杆菌感染是目前公认的胃及十二指肠黏膜炎症的重要致病因素,与十二指肠及胃溃疡的发病密切相关,该结论同样适用于老年人^[5,6].

老年人疼痛的敏感性下降,症状不典型.半数以上老年消化性溃疡缺乏典型上腹部规律性疼痛症状,有时甚至完全无腹痛,或表现为疼痛位置的变异.胸骨后或心前区疼痛者易误诊为心绞痛或心肌梗塞,咽痛和吞咽困难者易误诊为食管疾病,贫血、呕吐、厌食及体重减轻者易误诊为恶性肿瘤.近半数老年消化性溃疡的主诉为非特异性上腹部不适,而一部分患者以出血或穿孔为首发症状.老年消化性溃疡以高位胃体溃疡多见,因为随着年龄增长,胃体、胃底、贲门部溃疡的发生率逐渐升高,而且溃疡面积与年龄成正比.此外,老年消化性溃疡可合并有冠心病、高血压、慢性支气管炎、肺气肿、糖尿病、类风湿性关节炎和退行性骨关节病等诸多病症.老年消化性溃疡的死亡率也较青壮年成倍地增高,有资料表明,70岁以上消化性溃疡死亡率可高达20%以上^[7-9].

3 老年消化道出血和穿孔的发病情况

消化性溃疡并发症主要为出血和穿孔.溃疡并发出血者占溃疡病患者的10-15%,其中老年患者发病率较高.老年人胃黏膜屏障的防御能力下降,胃黏膜易受侵蚀溃烂,且修复难、愈合慢、易再发.老年人胃壁平滑肌退行性变,弹性减退,肌肉疏松,易合并消化

道出血,且出血量多、疗效差、穿孔率高。老年人动脉血管硬化,存在微血管异型,微循环扩张淤血,因动静脉短路增生而引起微血管功能障碍。胃黏膜本身供血不足,处于黏膜贫血萎缩状态,一旦发生溃疡则不易愈合,且出血时由于动脉收缩能力差,出血量多而不易止血。老年人能量代谢障碍,脏器生理功能减退,心、肺、肾的代偿能力降低,内环境不稳定,心排血量下降,组织供血不足而缺氧,能量代谢明显升高,因此溃疡难以愈合和易于并发出血。老年人体液和细胞免疫功能减退,易患各种自身免疫性疾病,并因此而影响溃疡的愈合,成为引起老年消化性溃疡病并出血的又一因素。此外,相当多的老年患者以NSAID等药物为诱因,不仅能导致消化性溃疡的发生,也会促使溃疡活动和出血^[10,11]。

穿孔是消化性溃疡的常见并发症,老年穿孔患者病情更严重、复杂和凶险。老年人胃溃疡较十二指肠溃疡多,溃疡部位随年龄增长而呈高位,因此胃窦、小弯侧等恶性溃疡或溃疡恶变好发部位的穿孔发生率上升。老年人对疼痛反应迟钝,腹肌萎缩,穿孔时大多缺乏腹部症状和体征。往往缺乏持续加剧的上腹痛、腹壁僵硬、反跳性压痛、肠鸣音减弱等症状,板样腹亦可不明显。老年人器官系统功能不全、免疫力低下、感染不易控制,穿孔病情进展快,休克发生率高,且合并症多,死亡率高。老年消化性溃疡穿孔患者溃疡史较长,往往就诊迟、病情重,穿孔直径较大,腹腔污染严重。且穿孔部位越低,时间越长,腹腔污染越重,休克发生率越高,穿孔越不易自行愈合,往往需手术治疗。老年人常伴有程度不等的心、肺、肝、肾等疾患,存在着脏器功能不全,在感染、休克的基础上,加上手术的打击,易诱发重要脏器功能衰竭。因此,要降低死亡率,关键在于正确处理穿孔的合并症,减少严重的并发症,防止心、肺等重要脏器功能衰竭^[12,13]。

4 老年人非溃疡性消化不良的发病情况

非溃疡性消化不良是指有消化不良症状,然而未发现胃肠道溃疡及肿瘤,并排除食管炎及肝、胆、胰疾病的综合征,其症状表现不一,有学者将其分为胃食管反流型、溃疡样型、动力障碍型、吞气症型、特发型等5种类型。非溃疡性消化不良的病因复杂,慢性胃、十二指肠炎,幽门螺杆菌感染,胃动力异常,胃肠激素分泌失调、激素受体敏感性异常,神经精神因素等都可能与之相关联。非溃疡性消化不良主要病理生理改变为排空延迟、胃十二指肠运动不协调等胃肠动力学障碍。老年人非溃疡性消化不良患者在胃肠专科门诊中常见,多以上腹疼痛或不适为主诉,因最终找不到病因而诊断为非溃疡性消化不良。对于消化不良患者来说,老年人经胃镜检查所发现的器质性病变比率,明显高于青壮年人群,因此胃镜检查宜作为评估老年人消化不良病因的重要方法。通过检查可发现胃、十二指肠

炎性病变,消化性溃疡,胃食管反流病,良性肿瘤,乃至恶性肿瘤,从而尽早明确诊断,减少误诊、漏诊。此外,老年人非溃疡性消化不良往往与其生理、心理和社会状况相关,情感障碍在发病中占有一定的位置。因此,应注意避免由于老年人躯体症状较多,掩盖其抑郁心境,给诊断和治疗带来困惑^[14,15]。

5 老年人胃肠动力障碍性疾病的情况

上食管括约肌功能紊乱主要表现为静息时张力异常和开放异常。下食管括约肌功能紊乱则表现为松弛障碍,吞咽时食管中、下段缺乏原发性蠕动,食物不能通过入胃。通过分年龄段测定食管压力,结果显示老年人上食管括约肌静息压显著降低,而下食管括约肌静息压仅相对降低。老年人上食管括约肌压力逐渐减弱,吞咽后松弛延滞,咽收缩压和咽食管蠕动波速率增加,吞咽起始的感觉阈值也增加。吞咽后远端食管同步收缩显著增多且失调,食物通过食管常发生异常。此外,老年人食管蠕动异常也与食管内肠肌间神经元数目减少有关。胃食管返流病相当多见,其发病率随年龄而上升。老年人食管敏感性降低,对症状耐受性上升,并且经常伴随的慢性阻塞性肺疾病或冠状动脉疾病易与胃食管返流病混淆。反酸、吞咽困难、胸痛、呼吸症状、呕吐是老年人胃食管返流病的主要表现,而烧心则少见,出现胃灼热情况表明食管黏膜病变严重。老年人胃酸并不明显增高,而且随年龄增高而发生的萎缩性胃炎和胃酸缺乏,有可能使老年人存在乏酸性反流^[16-18]。

胃肠动力障碍疾病患者存在胃肠电生理活动的异常,胃动力减弱而不能产生有效的收缩,胃十二指肠腔压力梯度差不能形成,致胃排空延缓,胃窦低张。非溃疡性消化不良、胃电节律紊乱、胃排空加速、胃轻瘫、碱性反流性胃炎都属于胃动力障碍性疾病。老年人存在多指标胃动力学功能下降,其胃液排空延迟,胃窦收缩频率、胃窦收缩幅度降低,胃窦运动指数减少。人的生理性摄食随年龄增长而减少,人一生的热卡摄入量也逐渐减少,老年人食欲和饥饿感下降,可引起胃肠动力和运输功能的改变。小肠营养物介导胃排空率的反馈调节,小肠内营养物刺激幽门,使时相性和紧张性压力增高,阻止食糜通过幽门,是胃排空延缓最主要的动力过程。营养物对健康老年人胃排空减缓作用更加显著,使饱感增加,胃扩张延迟,胃的泵功能减弱。小肠内摄入营养物,使青年人和老年人的幽门部时相性压力波和紧张性压力波都增加,但使老年人增加更多。胃肠激素调控着消化道的分泌、运动、吸收、血流和细胞营养等功能,他们的分泌异常必然会影响到消化道的功能,引起各种临床症状和综合征。老年人胃酸排出量明显低于青年人,而老年人胃液生长抑素呈高水平分泌,老年人胃酸分泌功能减弱,与生长抑素及胃泌素水平变化有重要关系^[19-21]。

空腹十二指肠运动呈收缩和静止交替的周期性变化,称肠道迁徙运动复合波,分为I相静止期、II相不规则收缩期和III相规则收缩期,III相波从小肠上段缓慢地向小肠下段移动.对因恶性肿瘤行腹部放射后产生胃肠道症状,即具有假性小肠梗阻的典型表现的、所谓放射性肠病的老年人进行肠道测压,发现其相波延迟,且强度与营养不良程度相关.患帕金森病的老年人常有体重减轻,研究发现其小肠动力低下,口至盲肠通过时间延长,肠通透性也紊乱.功能性便秘在临床上十分常见,这类患者存在结肠、直肠和肛门动力的异常,而经各项检查未发现器质性疾病.老年人便秘与活动减少、食物中缺乏纤维、直肠内粪块嵌塞、直肠脱垂和直肠膨出、痔、神经系病变、憩室病有关.老年人还常在便秘同时存在大便失禁,其重要的发生因素是内、外肛门括约肌张力减弱和肛肠、直肠感觉受损^[22,23].

6 参考文献

- Lacapere JJ, Robert JC, Thomas-Soumarmon A. Efficient solubilization and purification of the gastric H⁺, K⁺-ATPase for functional and structural studies. *Biochem J* 2000;345(Pt2):239-245
- 孙凤蓬, 宋于刚. 胃黏膜防御基础的研究进展. *胃肠病学和肝病学杂志* 2001;10:297-300
- 张玫, 汤哲. 老年人消化性溃疡病与相关因素的影响. *中华内科杂志* 1998;37:702-703
- Moragoda L, Jaszewski R, Kulkarni P, Majumdar AP. Age-associated loss of heterozygosity of tumor suppressor genes in the gastric mucosa of humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282:G932-936
- 徐有青, 王丽华, 崔桂兰, 田自然. 老年人消化性溃疡幽门螺杆菌感染的探讨. *中华老年医学杂志* 1999;18:41
- Stanghellini V, Anti M, Porro GB, Corinaldesi R, Gasbarrini G, Giacosa A, Fiocca R, LaVecchia C, Maconi G, Negri E. Risk indicators of organic diseases in uninvestigated dyspepsia: a one-week survey in 246 Italian endoscopy units. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1129-1134
- Higham J, Kang JY, Majeed A. Recent trends in admissions and mortality due to peptic ulcer in England: increasing frequency of haemorrhage among older subjects. *Gut* 2002;50:460-464
- Hilton D, Iman N, Burke GJ, Moore A, O'Mara G, Signorini D, Lyons D, Banerjee AK, Clinch D. Absence of abdominal pain in older persons with endoscopic ulcers: a prospective study. *Am J Gastroenterol* 2001;96:380-384
- 孙凤蓬, 宋于刚, 朱新生, 汤事能, 杜江, 邱庆林, 赵彤. 冰乙酸性大鼠胃溃疡模型的建立及溃疡胃窦黏膜的光镜和透射电镜观察. *世界华人消化杂志* 2001;9:135-138
- Peura DA, Lanza FL, Gostout CJ, Foutch PG. The american college of gastroenterology bleeding registry: preliminary findings. *Am J Gastroenterol* 1997;92:924-928
- Griffin MR. Epidemiology of nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal injury. *Am J Med* 1998;104:23S-29S
- Raju GS, Bardhan KD, Royston C, Beresford J. Giant gastric ulcer: its natural history and outcome in the H2RA era. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3478-3486
- Pilotto A. *Helicobacter pylori*-associated peptic ulcer disease in older patients: current management strategies. *Drugs Aging* 2001;18:487-494
- Stanghellini V, Anti M, Porro GB, Corinaldesi R, Gasbarrini G, Giacosa A, Fiocca R, LaVecchia C, Maconi G, Negri E. Risk indicators of organic diseases in uninvestigated dyspepsia: a one-week survey in 246 Italian endoscopy units. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1129-1134
- 孙凤蓬, 宋于刚. 胃泌素及其相关胃肠激素的研究进展. *国外医学生理、病理科学与临床分册* 2000;20:229-231
- Csendes A, Smok G, Quiroz J, Burdiles P, Rojas J, Castro C, Henriquez A. Clinical, endoscopic, and functional studies in 408 patients with Barrett's esophagus, compared to 174 cases of intestinal metaplasia of the cardia. *Am J Gastroenterol* 2002;97:554-560
- 孙凤蓬, 宋于刚. 老年人胃肠动力障碍性疾病研究进展. *实用老年医学* 1999;13:92-93
- 宋于刚, 孙凤蓬. 老年人胃肠动力障碍性疾病研究现状. *第一军医大学学报* 1999;19(增刊):89-91
- Chen JD, Ke MY, Lin XM, Wang Z, Zhang M. Cisapride provides symptomatic relief in functional dyspepsia associated with gastric myoelectrical abnormality. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:1041-1047
- 孙凤蓬, 宋于刚, 程蔚, 赵彤. 大鼠胃溃疡及自愈过程中胃泌素、生长抑素与G、D细胞变化关系的实验研究. *中华消化杂志* 2002;22:57-58
- Sun FP, Song YG, Cheng W, Zhao T, Yao YL. Gastrin, somatostatin, G and D cells of gastric ulcer in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:375-378
- Cook CG, Andrews JM, Jones KL, Wittert GA, Chapman IM, Morley JE, Horowitz M. Effects of small intestinal nutrient infusion on appetite and pyloric motility are modified by age. *Am J Physiol* 1997;273:R755-761
- Camilleri M, Lee JS, Viramontes B, Bharucha AE, Tangalos EG. Insights into the pathophysiology and mechanisms of constipation, irritable bowel syndrome, and diverticulosis in older people. *J Am Geriatr Soc* 2000;48:1142-1150

胆道系统运动调节及功能性胆道运动异常的诊治

陈仕珠

陈仕珠, 中国人民解放军解放军第451医院 陕西省西安市 710054
项目负责人: 陈仕珠, 710054, 陕西省西安市友谊东路269号, 中国人民解放军
解放军第451医院内科. chen sz@pub.xaonline.com
电话: 029-2257105
收稿日期: 2002-03-29 接受日期: 2002-11-18

摘要

胆道系统运动调节十分复杂, 其功能紊乱的诊治难度亦大. 正常胆管的结构及压力梯度是胆汁流动的动力. 胆系运动受多种神经和激素的调节, 大多数胃肠激素不同程度地参与胆系运动的调节. 胆囊(GB)容量、胆汁排出量(GEF)受年龄、性别、体重、饮食量及其成分、吸烟、血糖、血氨基酸和胆盐等影响. 试餐超声检查及核素闪烁照相、ERCP对本病有一定诊断价值; 胆道压力测定结果为诊断本病的金标准, 但广泛应用受限制. 功能性胆道运动不良(含GB切除术后胆道动力障碍)分型, 舒张Oddi括约肌(SO)的药物对I型和II型有较好疗效. 内镜SO切开术有效率可达90%以上.

陈仕珠. 胆道系统运动调节及功能性胆道运动异常的诊治. 世界华人消化杂志 2003;11(5):613-618

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/613.htm>

0 引言

功能性胆道疾病临床上十分常见, 发生率约占消化系统疾病门诊数的20%^[1]. 由于其中60%以上的患者症状不明显或因同时存在胃肠功能紊乱等而被其他症状所掩盖, 加上检查和治疗手段的限制, 仅约10-20%的患者得到诊断^[1,2]. 为了提高对本病的认识, 本文对近年来有关功能性胆道疾病的研究进展作一介绍.

1 胆管动力与调节

1.1 胆管结构及动力学 肝内胆管均无平滑肌细胞, 肝外胆管平滑肌细胞发现率分别为肝总管24%, 胆总管十二指肠上段53%, 胰腺段87%; 胆总管上段仅有少量环行或纵行平滑肌束, 在壶腹部形成胆总管括约肌^[3]. 胆汁流动主要依靠胆内压力梯度^[4,5]. 正常时肝内静水压(肝内胆汁分泌压)为2.64-2.94 kPa, 肝外胆管内压为0.98-1.3 kPa, 而SO压为1.07-1.4 kPa. 胆囊(GB)排空后, 其内压力下降至0.98 kPa以下(最低至0.49 kPa)时, 胆汁便流入GB, GB充盈, 压力升高可达1.77-2.16 kPa. 胆管括约肌和SO松弛时胆汁很快排入胆管, 进而排入十二指肠. 如SO功能障碍致胆汁排出障碍, 使胆管压力超过2.94 kPa(直径9 mm)时, 则考虑胆管有扩张^[3].

1.2 胆管运动调节 胆管壁内有较多的神经细胞, 但未形成界限明显的壁内神经丛. 胆总管有主动伸长或缩短运动功能, 有助于转送胆汁^[4]. 自主神经使胆道张力维持正常状态. 胆汁流动的原动力是肝胆汁的正常分泌压在GB排空过程中, 胆管系统主要起输送管道及顺应性收缩或扩张的作用. 而起动力或控制作用的是GB和SO^[6,7].

2 SO和GB运动调节

2.1 SO结构功能 SO由胆总管括约肌、胰管括约肌、壶腹括约肌、中间纤维组成. 胆总管括约肌和中间纤维可见于所有人, 只有1/3和1/6的人有胰管和壶腹括约肌. 正常人胆总管压力约0.66 kPa, 胰管压1.26 kPa, SO基础压1.33 kPa. 胆总管压升高时, SO即松弛, 胆汁排出, 压力降低, 故胆汁一般不会流入胰管^[3]. 调节SO运动的因素多而复杂, 涉及神经和激素(以肽类激素为主)^[8,9].

2.2 GB容量及GB排空 GB分为底、体、颈和GB管. GB管长约3-4 cm; 直径2-3 mm. GB管近GB管颈有螺旋黏膜皱襞称海斯特瓣, 由平滑肌构成, 可防止GB管的过度扩张和塌陷^[3,9]. GB有纵行肌、斜行肌和少许松散排列的环形肌组成的平滑肌层, GB平滑肌收缩可排出胆汁, 是GB胆汁排空的原动力, GB管内螺旋状黏膜皱襞有GB泵作用, 有助于GB充盈^[1-3].

正常人空腹GB容量(fasting gallbladder volume, FGV)与性别、年龄^[10,11]、饮食习惯、胃十二指肠功能状态等有关^[12-15]. 女性FGV通常较男性为少^[11]. 肥胖者FGV通常较多. 瘦男性和胖女性随年龄增加FGV也增加. 低脂低蛋白饮食可使FGV增加^[2]. 长期饮酒者饮入较多酒后可使SO等的运动发生变化而影响GB排空^[16,17]. 肠易激综合征及胆汁返流性胃炎患者FGV增加^[12-15]. 正常人进脂肪餐后, GB可排出其中80%以上的容量, 于1h内GB排出量(gallbladder ejection fraction, GEF)即可达最大^[1,18], 尔后GB开始充盈(充盈多于排出). 禁食状态下, GB呈周期性收缩并排出少量胆汁入十二指肠. 随胃十二指肠移动蠕动复合波(interdigestive motor complex, IMC)向下推移^[1,12,19]. 空腹和餐后GB排空是交替进行的, 在IMC的相和相时, SO以6-8次/min规则地正向蠕动, 使胆汁以脉冲式挤入十二指肠, 结果使充盈大于排空,

相时GB开始收缩, 同时SO松弛, 胆汁以1 mL/min流向十二指肠^[5,19-23], 总体排空多于充盈. 如进食大量脂肪饮食GB可加倍收缩, 以3 mL/min将胆汁排入十二指肠, 此种排空多于餐后1h内达高峰^[20-22]这样, 使来自肝脏新

的稀薄的胆汁不断进入 GB, 同时 GB 胆汁陆续被排出而不致过分浓缩. 进一步研究发现, 餐后 90 min GB 排出的胆汁量为基础量的 6 倍^[22], 即约 5 倍多的胆汁是肝脏新分泌出来的. GB 排空速度与量除与食物成分有关外, 与食物到达十二指肠的速度及十二指肠产生的 GB 收缩素(cholecystokinin, CCK)等的含量、GB 和 SO 上 CCK 等受体密度和敏感性等关系密切^[21,22].

2.3 GB 和 SO 运动的神经调节 已知 GB 和 SO 运动受胆碱能及肾上腺素能神经控制和调节. GB 壁内存在黏膜层和肌层神经丛及较多神经细胞, 但未形成界限清楚的壁内神经丛. GB 壁和 SO 上存在 α 、胆碱能及 β 受体, 前二者介导收缩, 后者介导舒张, 正常情况下 GB 收缩和 SO 舒张是同时发生的. 此外, GB 和 SO 上还分布有生长抑素(somatostatin, SS)等多种肽能神经及其受体, 参与 GB 排空的调节. 切除迷走神经可显著延缓 GB 排空并减少 GEF, 改变 GB 排空方式, 表现为连续排空及再充盈^[23,24]. 刺激迷走神经使 GB 内压增加, SO 松弛, GB 排空增快、增多^[25]. 除肾上腺素能和胆碱能神经外, 免疫组化研究表明, SO 上存在密集的含神经肽的肌间神经^[26,27], 豚鼠 GB 壁分布有组胺受体, 并通过激活 H_1 和 H_2 受体调节 GB 收缩^[28]. 表明肽能神经、组胺能神经等均参与 GB 排空的调节. 此外, GB 排空亦存在头相, 可能是感官-胃液分泌-十二指肠酸化-CCK-胆碱能神经-GB 和 SO 的结果, 而胃相-肠相及回肠结肠相则与食物所达部位继发的神经和体液调节所致^[29].

2.4 GB 和 SO 运动的体液调节 已知许多胃肠激素(gastrointestinal hormone, GH)参与 GB 和 SO 运动的调节^[2,3,29-31]. 脂肪餐进入十二指肠后引起 CCK 释放, CCK 与 GB 及 SO 上的 CCK 受体结合或经胆碱能神经作用产生排空效应. 静注 CCK-8 可使胆总管压明显升高, SO 活动增强, 压力减低^[23]. 但 GB 及 SO 对含肽数量不同的 CCK 反应有异, GB 对同样剂量的 CCK-3(10-80 nmol/kg)和 CCK-2(10-160 nmol/kg)无反应, 而 SO 则可完全松弛. 用于阻滞 CCK 对 SO 作用的药物剂量要比对 GB 的剂量大得多. 除循环 CCK 调节 GB 排空外, 将 CCK-8、CCK-5 和胃泌素置于 GB 腔内, 可引起由神经介导的 GB 收缩, 并呈剂量相关, 其机制可能是通过 CCK-B 型受体, 经内脏神经介导的^[2]. 血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)与 CCK 联用时, 可拮抗 CCK-8 对 SO 的作用, 但单独输注 VIP 则对 SO 活动无明显影响^[23,31]. 静注 P 物质、阿片肽对 SO 的作用与 CCK-8 相似, 使 SO 收缩, 减少胆汁流出, 但作用稍弱^[1,32]. 内源性前列腺素(PG)系统对正常人空腹及餐后 GB 排空均无明显影响^[1], 可参与 CCK 引起的 GB 收缩的调节. 但 PGE 通过刺激 GB 黏液分泌, 抑制 GB 排空, 使 GB 张力增加, 其拮抗剂消炎痛可消除此作用, 防止胆固醇核的形成, 促进 GB 排空. 有研究发现, 心房利钠肽使餐后 GB 收缩, 而空腹则否, 可能是 GB 胆汁对 GB 的作用不同^[33]. 蛙皮素刺激的 GB 收缩可被阿托品和 SS 所抑制, 提示蛙皮

素对 GB 的作用是经胆碱能神经实现的, 而 SS 抑制 GB 排空可能是通过抑制蛙皮素刺激的 CCK 释放^[34,35]. 胃动素调节胃肠运动, 亦调节 GB 排空. 胃动素拟似剂红霉素可促进 GB 排空异常的人的 GB 排空, 提示胃动素可能刺激其 GB 收缩及 SO 舒张^[34]. 胃泌素释放肽直接刺激豚鼠 GB 收缩^[1,2]. SS 通过抑制几乎所有刺激 GB 收缩和/或 SO 松弛的激素的作用而抑制 GB 排空. 静注 SS 可完全消除由进固体、液体食物及胆碱能和 CCK 等引起的 GB 排空, 抑制静息状态时 SO 运动^[30,34-36], 而奥曲肽抑制空腹和进餐引起的 SO 运动, 增加 SO 基础压和收缩波^[31,34-37]. Weber et al^[37] 研究发现, 皮下注射 100 ug 奥曲肽显著增加 SO 收缩频率和基础压, 抑制 GB 收缩, 该作用持续超过 1 h(而循环 SS 半衰期仅约 3 min). 进一步证实奥曲肽可引起 SO 功能不良及减少 GB 排空, 但在 SOD 患者则可使 SO 松弛, 利于 GB 排空^[38,39]. 由于长期应用奥曲肽使 GB 排空缓慢而引起的 GB 结石者高达 20 %^[1,2,40]. 神经减压素 10-40 ng/(kg·h)使餐后 GB 排空明显减少, 而用 2-5 pmol/(kg·min)者则否. 表明神经减压素抑制 GB 排空的作用与剂量有关^[41]. McKirdy et al^[42-44] 研究发现, 一氧化碳可能为 GB 平滑肌收缩的抑制性递质, 参与 GB 运动的调节. 进一步研究表明, 刺激狗 SO 非胆碱能非肾上腺素能(non-adren-ergic non-cholinergic, NANC)神经引起的 SO 松弛可被河豚毒及氧合血红蛋白消除, 但不受阿托品、心得安、酚妥拉明、消炎痛、CCK 及 VIP 的影响, 推测可能是电刺激使 NANC 释放一氧化氮, 进而使 SO 松弛^[45]. 内源性雌激素可延长胃排空, 使食物到达十二指肠的速度减慢, 进而经 CCK 使 GB 排空延缓^[46], 可部分解释女性 GB 结石发生率高的原因. 此外, 甲状腺素、神经肽 Y 可直接或间接抑制 SO 收缩, 调节胆囊排空^[46,47].

2.5 影响 GB 排空的其他因素 在体外, 生理剂量胆盐抑制 GB 收缩; 在体内, GB 内胆盐亦抑制 GB 收缩^[48,49]. 高血糖时 GB 收缩减少^[50]. 静注氨基酸显著引起正常人的 GB 收缩^[51-53], 而高血糖者则无此反应^[1,2]. Garg et al 通过静注氨基酸刺激胆汁排泄来从十二指肠收集胆汁亦证实氨基酸有促进 GB 排空作用^[52-54]. 进脂肪餐时吸烟不影响 GB 收缩, 但进餐后 20-40 min 吸烟则引起 GB 排空延缓^[55]. GB 开始收缩反应由胆碱能神经胞体或轴突上尼古丁受体介导, 而 GB 松弛则可能为释放尼古丁的神经末端的尼古丁受体被激活所致^[56]. 肠外营养和低脂低蛋白饮食使 FGV 增加, GEF 减少, 胆汁淤留, 为 GB 结石形成的危险因素之一^[56,57]. 快速减肥期间 GB 容量增加, 胆汁成分发生有利于成石的变化^[58], 其 GB 收缩减少, 胆固醇饱和度增加, 胆结石形成增多^[59,64], 而胆汁胆固醇增加抑制 GB 肌收缩, 促进结石形成^[57]. 应用熊脱氧胆酸^[65,66]及熊胆醇(ursodiol)或 ibuprofen^[67]对防止减肥诱发的胆结石有一定作用.

3 功能性胆道运动不良的临床表现、诊断和治疗

3.1 功能性胆道运动不良的临床意义 功能性胆道运动功能不良的直接结果是GB排空不良,而GB排空不良为GB结石形成和胰腺炎的重要原因.动物研究表明,GB排空不良常是GB结石形成的原因而非结果.肥胖及限食、体重快速减轻时,由于GB排空减少,胆固醇饱和指数增加,易形成结石^[56-65];如限食至2.092 kg/d(500 cal/d),则GB结石发生率明显增加,3.765 kg/d(900 cal/d)则很少发生GB结石^[59].肢端肥大症患者由于长期应用对GB排空有抑制作用的奥曲肽,使GB结石发生率明显增加^[34-37].SO功能不良(sphincter of oddi dysfunction, SOD)可引起胆汁淤留、胰腺炎及上腹痛综合征^[68-71].

3.2 功能性GB排空不良的临床表现及诊断 一般而言,SO痉挛者症状多较明显^[69,70],而GB收缩无力者则甚少出现明显症状.约20%有症状者亦因发生机制不同而表现不一^[49].主要症状有右上腹不适、隐痛、胀痛或绞痛,部分患者可酷似胆绞痛表现:疼痛较剧烈,向肩背部放射,并可出现黄疸,谷丙转氨酶(ALT)、胰淀粉酶升高及肝胰损害表现^[69-71].急性特发性胰腺炎患者中79%为SOD所致^[72].由于有SOD患者常伴胃肠运动功能紊乱^[66,67],故需与Vater壶腹/十二指肠痉挛所致之上腹痛相区别,后者可通过闪烁照像或十二指肠压力测定鉴别^[68].在部分SOD患者,其胆管括约肌和胰管括约肌为两个独立部分^[71,73],对CCK反应亦异,临床表现及治疗方法亦有不同^[72-74].试餐超声及核素闪烁照相检查患者FGV明显增多,餐后GEF明显减少,最大GB排空速度明显减慢,GB残留胆汁增多,GB排空时间延长^[75-77].SO痉挛或失弛缓者可见胆总管扩张(>12 mm)^[70,71].有胆总管综合征者胆总管内径可 >15 mm^[76].造影及药物试验 内镜逆行胰胆管造影(ERCP)可见造影剂排空缓慢^[1,78].对GB收缩无力所致排空不良者应用拟胆碱能药物或胃动素激动剂^[32]或多巴胺拮抗剂^[79]和作用于壁内神经药物如西沙必利(cisapride)^[80,81]等可使GB排空明显改善.对I、II型SOD患者,应用钙通道阻滞剂等可迅速缓解症状,增加GEF,加快排空速度^[71,82-84].胆道压力测定常表现为^[85,86]:(1)SO基础压升高(>5.3 kPa, 40 mmHg);(2)SO收缩频率、幅度增加;(3)收缩传导逆行增加而逆行增加;(4)SO对CCK等反应异常;(5)胆管、胰管压力升高.35%的患者Vater乳头压力增加(>10.7 kPa, 80 mmHg)^[68,71,74].有研究表明,SO压力测定结果与患者的临床表现大多一致^[87],不明原因急性胰腺炎患者31%有SOD^[88].ERCP可引起严重并发症,而胆道压力测定并发胰腺炎的发生率较ERCP更高.但Chan et al^[89]认为,如技术上可行则测SO压对诊断还是必要的.行压力测定等操作时应用镇静剂对测定结果无明显影响^[90-92].SOD诊断标准为:(1)有胆绞痛史;(2)血清胆红素升高,碱性磷酸酶(ALP)为正常上限的1.5倍;(3)ERCP发现胆总管扩张(>12 mm);(4)ERCP仰卧位45 min胆道仍有造影剂淤留^[78].根据该标准将SOD分为三型^[74].I型:上述4条标准

均有; II型:有胆绞痛史加其他任1-2条标准; III型:仅有胆绞痛.进一步研究发现,在诊断为SOD的患者中,除I型外,II型、III型分别有61%和50%的患者有SO压力异常.关于胆总管扩张的标准,亦曾有人提出 >15 mm作为扩张的指标^[69,70,74],达此数者通常示扩张显著,应排除器质性病变所致.胆道压力测定虽是诊断SOD的金指标,但因增加患者痛苦和受条件限制,故对反复发作,症状典型,经超声、CT等检查符合SOD并排除原发器质性病及经药物试治有效者亦可诊断.Sugawa et al^[92]认为,对I型SOD,行内镜括约肌切开术(EST)前不必行SO压力测定.定量肝胆闪烁照相相对SOD的诊断价值与SO压力测定接近,故可以前者代替后者^[93].

3.3 GB切除术后胆道动力障碍(PCBD) 约30%的慢性GB炎、胆结石术后患者仍有上腹不适或疼痛等症状,其中50%主要由PCBD引起^[94],以女性多见,男女为1:4.这些患者SO基础受缩频率及幅度增高,逆向受缩比例增多.其中I型SOD患者中90%,II型患者中31.8%,III型患者中6.7%SO压力异常;约3-4%的严重患者有胆管扩张.进一步研究发现^[95],PCBD患者血胃泌素水平明显高于对照组.认为GB切除后GB与SO协调作用被破坏,SO缺乏GB收缩反射性引起SO松弛的调节而经常处于受缩或痉挛状态.此外,部分患者在其GB切除前可能就已有SOD,只是其症状被误认为胆石症所致未被诊断而已.PCBD的诊断:即在上述SOD诊断标准的基础上排除消化系溃疡,胆管结石,肿瘤,特发性胰腺炎的无诱因间歇性右上腹痛.

3.4 功能性GB排空不良的治疗 (1)一般治疗:调节饮食,适当减少可诱发SOD的食物摄入;调节情绪和胃肠功能,可减少SOD的发作频率.(2)内镜SO切开术(EST):对反复发作,有明显症状并引起肝、胰损害,经压力测定等检查确诊为SOD和PCBD的患者,行内镜下SO切开术,可显著改善GB运动和GB排空^[92,95-99],消除症状,其近、远期效果较好(有效率达91.7%),但其术后狭窄率达12%^[100].对II型SOD因效果不佳而不主张用EST.(3)气囊扩张:不能使SOD完全缓解^[101],对不能行EST的患者可考虑用气囊扩张^[102].(4)经十二指肠括约肌切开术:效果不佳者达7-35%,可能与手术适应证较难掌握有关^[103-105].(5)药物治疗:已知有胃肠运动功能紊乱患者常同时存在GB或SO运动功能不良或二者运动不协调.应用调节胃肠运动的药物治疗常可使GB排空功能改善^[1,79,83].对伴胃肠运动缓慢者,应用多潘立酮、西沙必利和左舒必利(Levsoulpiride)(75 mg/d)可促进胃排空,同时显著增加GB排空^[79-81,83,84].对正常人,多潘立酮和西沙必利均抑制GB排空,其机制可能是使SO收缩加强所致^[79];对其长期应用是否增加患者GB结石的发生率尚未定论.红霉素为胃动素拟似药,通过增强GB收缩,减少SO压力及收缩幅度而显著增加GB排空,使剩余胆汁减少^[32,106].硝苯吡啶抑制正常人GB收

缩,减少GB排空^[107],但不增加胆结石的发生率;对SOD引起的胆绞痛,特别是对型和型SOD有显著疗效^[71]。硝酸盐类制剂如消心痛等亦具硝苯吡啶样作用,松弛SO。PGE拮抗剂消炎痛可促进餐后GB排空,显著减少GB残余量^[95,108]。阿司匹林350 mg/d治疗2 wk对正常人GB排空无影响,但可明显促进GB结石患者GB排空,减少溶石后GB结石的复发,增加剂量至1.4 g/d,疗效并不增加^[109]。长期应用阿司匹林等非甾醇类抗炎药可减少GB黏液分泌,改变胆汁脂质含量从而阻碍结石的形成^[106],对预防GB结石的发生可能有一定作用,但此类药物不能逆转收缩减弱的GB的收缩功能^[109,110]。

4 参考文献

- 1 陈仕珠. 胆囊排空调节及功能性胆囊排空异常. 新消化病学杂志 1997;5(特刊6):19
- 2 Toouli J. Biliary dyskinesia. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2002;5:285-291
- 3 吴培俊. 胆道系统运动功能及障碍. 世界华人消化杂志 1999;7:603-604
- 4 Hanyu N, Dodds WJ, Layman RD, Hogan WJ, Chey WY, Takahashi I. Mechanism of cholecystokinin-induced contraction of the opossum gallbladder. *Gastroenterology* 1990;98:1299-1306
- 5 Ura K, Sarna SK, Condon RE. Antral control of gallbladder cyclic motor activity in the fasting state. *Gastroenterology* 1992;102:295-302
- 6 Lonovics J, Madacsy L, Szepes A, Szilvassy Z, Velosy B, Varro V. Humoral mechanisms and clinical aspects of biliary tract motility. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1998;228:73-89
- 7 Radberg G, Asztely M, Moonen M, Svanvik J. Contraction and evacuation of the gallbladder studied simultaneously by ultrasonography and 99m Tc-labeled diethyl-iminodiacetic acid scintigraphy. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:709-713
- 8 Grace PA, Poston GJ, Williamson RC. Biliary motility. *Gut* 1990;31:571-582
- 9 陈仕珠,冯少华,邢保华,郭志刚. 急性病毒性肝炎患者胆囊排空功能研究. 华人消化杂志 1998;6:204-206
- 10 Keane P, Colwell D, Baer HP, Clanachan AS, Scott GW. Effects of age, gender and female sex hormones upon contractility of the human gallbladder in vitro. *Surg Gynecol Obstet* 1986;163:555-560
- 11 Palasciano G, Serio G, Portincasa P, Palmieri V, Fanelli M, Velardi A, Calo' Gabrieli B, Vinciguerra V. Gallbladder volume in adults, and relationship to age, sex, body mass index, and gallstones: A sonographic population study. *Am J Gastroenterol* 1992;87:493-497
- 12 陈仕珠,张路,陈旭春,白兰. 肠易激综合征患者胆囊排空功能的研究. 解放军医学杂志 1995;20:362
- 13 陈仕珠,赵红,吴春燕,付卫红,陈旭春. 胆汁返流性胃炎患者胆囊排空功能研究. 华人消化杂志 1998;6:427-429
- 14 Sood GK, Baijal SS, Lahoti D, Broor SL. Abnormal gallbladder function in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 1993;88:1387-1390
- 15 Mearin F, De Ribot X, Balboa A, Antolin M, Varas MJ, Malagelada JR. Duodenogastric bile reflux and gastrointestinal motility in pathogenesis of functional dyspepsia: Role of cholecystectomy. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 1703-1709
- 16 杨春敏,毛高平,张秀荣,张映辉,间一平. 乙醇对清醒兔 Oddi 括约肌运动功能的影响. 世界华人消化杂志 2000;8(特刊8):87
- 17 Goff JS. The effect of ethanol on the pancreatic duct sphincter of Oddi. *Am J Gastroenterol* 1993;88:656-661
- 18 Stolk MF, van Erpecum KJ, Smout AJ, Akkermans LM, Jansen JB, Lamers CB, Peeters TL, vanBerge-Henegouwen GP. Motor cycles with phase III in antrum are associated with high motilin levels and prolonged gallbladder emptying. *Am J Physiol* 1993;264(4 Pt 1):G596-600
- 19 陈仕珠,张忠兵,荆文科,许东谱,周焕章,张洪博,胡家露,王振雄. 胆汁返流性胃炎患者胃、十二指肠黏膜胃肠激素含量及其意义研究. 新消化病学杂志 1993;1:208-210
- 20 Abiru H, Sarna SK, Condon RE. Contractile mechanisms of gallbladder filling and emptying in dogs. *Gastroenterology* 1994;106:1652-1661
- 21 Nilsson BI, Svenberg T, Tollstrom T, Hellstrom PM, Samuelson K, Schnell PO. Relationship between interdigestive gallbladder emptying, plasma motilin and migrating motor complex in man. *Acta Physiol Scand* 1990;139:55-61
- 22 Jazrawi RP, Pazzi P, Petroni ML, Prandini N, Paul C, Adam JA, Gullini S, Northfield TC. Postprandial gallbladder motor function: refilling and turnover of bile in health and in cholelithiasis. *Gastroenterology* 1995;109:582-591
- 23 Behar J, Biancani P. Pharmacologic characterization of excitatory and inhibitory cholecystokinin receptors of the cat gallbladder and sphincter of Oddi. *Gastroenterology* 1987;92:764-770
- 24 Nabae T, Yokohata K, Otsuka T, Inoue K, Yamaguchi K, Chijiwa K, Tanaka M. Effect of truncal vagotomy on sphincter of oddi cyclic motility in conscious dogs. *Ann Surg* 2002;236:98-104
- 25 Patankar R, Ozmen MM, Sanderson A, Johnson CD. Effect of cisapride on gallbladder emptying and plasma CCK in normal and vagotomized human subjects. *Dig Dis Sci* 1996;41:543-548
- 26 Deng ZL, Nabae T, Konomi H, Takahata S, Yokohata K, Ogawa Y, Chijiwa K, Tanaka M. Effects of proximal duodenal transection and anastomosis on interdigestive sphincter of Oddi cyclic motility in conscious dogs. *World J Surg* 2000;24:863-869
- 27 Sand J, Tainio H, Nordback I. Peptidergic innervation of human sphincter of Oddi. *Dig Dis Sci* 1994;39:293-300
- 28 Jennings LJ, Salido GM, Pozo MJ, Davison JS, Sharkey KA, Lea RW, Singh J. The source and action of histamine in the isolated guinea-pig gallbladder. *Inflamm Res* 1995;44:447-453
- 29 Shaffer EA. Review article: control of gall-bladder motor function. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14(Suppl 2):2-8
- 30 Bandyopadhyay A, Chakder S, Lynn RB, Rattan S. Vasoactive intestinal polypeptide gene expression is characteristically higher in opossum gastrointestinal sphincters. *Gastroenterology* 1994;106:1467-1476
- 31 Binmoeller KF, Dumas R, Harris AG, Delmont JP. Effect of somatostatin analog octreotide on human sphincter of Oddi. *Dig Dis Sci* 1992;37:773-777
- 32 Cox MR, Padbury RT, Harvey JR, Baker RA, Toouli J, Saccone GT. Substance P stimulates sphincter of Oddi motility and inhibits trans-sphincteric flow in the Australian brush-tailed possum. *Neurogastroenterol Motil* 1998;10:165-173
- 33 Oh SH, Cho KW, Kim SH, Jeong GB, Kang CW, Hwang YH, Seul KH, Cho BH. Identification of immunoreactive atrial natriuretic peptide in the gallbladder and bile juice of rabbit, pig and human. *Regul Pept* 1994;49:217-223
- 34 Fiorucci S, Santucci L, Morelli A. 5-Hydroxytryptamine 3-receptor antagonist modulates gallbladder emptying and motilin release induced by erythromycin. *Dig Dis Sci* 1993;38:2236-2240
- 35 Mitsukawa T, Takemura J, Nishizono F, Nakatsuru K, Ohgo S, Matsukura S. Effects of atropine, proglumide, and somatostatin analogue (SMS 201-995) on bombesin-induced gallbladder contraction and CCK secretion in humans. *Am J Gastroenterol* 1989;84:1371-1374
- 36 Kiedrowski RV, Huijghebaert S, Raedsch R. Mechanisms of cisapride affecting gallbladder motility. *Dig Dis Sci* 2001;46:939-944
- 37 Weber FH Jr, Sears RJ, Kendall B, Pruett TL, Shaffer HA Jr, Yeaton P. Effect of octreotide on human sphincter of Oddi motility following liver transplantation. *Dig Dis Sci* 1997;42:1168-1175
- 38 Redfern JS, Fortuner WJ. Octreotide-associated biliary tract dysfunction and gallstone formation: pathophysiology and management. *Am J Gastroenterol* 1995;90:1042-1052
- 39 Fazel A, Li SC, Burton FR. Octreotide relaxes the hypertensive sphincter of Oddi: pathophysiological and therapeutic implications. *Am J Gastroenterol* 2002; 97:612-616
- 40 Grosman I, Simon D. Potential gastrointestinal uses of somatostatin and its synthetic analogue octreotide. *Am J Gastroenterol* 1990;85: 1061-1072
- 41 Gullo L, Ancona D, Pezzilli R, Fusconi F, Bolondi L. Study of the effect of neurotensin on meal- and cerulein-induced gallbladder contraction. *Digestion* 1992;53:67-71

- 42 McKirdy ML, McKirdy HC, Johnson CD. Non-adrenergic non-cholinergic inhibitory innervation shown by electrical field stimulation of isolated strips of human gall bladder muscle. *Gut* 1994;35:412-416
- 43 Mourelle M, Guarner F, Molero X, Moncada S, Malagelada JR. Regulation of gall bladder motility by the arginine-nitric oxide pathway in guinea pigs. *Gut* 1993;34:911-915
- 44 Mourelle M, Guarner F, Moncada S, Malagelada JR. The arginine/nitric oxide pathway modulates sphincter of Oddi motor activity in guinea pigs and rabbits. *Gastroenterology* 1993;105:1299-1305
- 45 Tanobe Y, Okamura T, Fujimura M, Toda N. Functional role and histological demonstration of nitric-oxide-mediated inhibitory nerves in dog sphincter of Oddi. *Neurogastroenterol Motil* 1995;7:219-227
- 46 Wedmann B, Schmidt G, Wegener M, Coenen C, Ricken D, Althoff J. Effects of age and gender on fat-induced gallbladder contraction and gastric emptying of a caloric liquid meal: a sonographic study. *Am J Gastroenterol* 1991;86:1765-1770
- 47 陈宝莹,魏经国,王耀程. Oddi 括约肌解剖生理及其运动功能. 世界华人消化杂志 2002;10:226-229
- 48 Lin HC, Zhao XT, Kwok GM, Gu YG, Elashoff JD. Bile salt-dependent inhibition of gallbladder emptying. *Am J Physiol* 1995;269:G988-993
- 49 Xiao ZL, Rho AK, Biancani P, Behar J. Effects of bile acids on the muscle functions of guinea pig gallbladder. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G87-94
- 50 De Boer SY, Masclee AA, Lam WF, Jansen JB, Lamers CB. Effect of intravenous glucose on intravenous amino acid-induced gallbladder contraction and CCK secretion. *Dig Dis Sci* 1994;39:268-274
- 51 Nealon WH, Upp JR Jr, Alexander RW, Gomez G, Townsend CM Jr, Thompson JC. Intravenous amino acids stimulate human gallbladder emptying and hormone release. *Am J Physiol* 1990;259(2 Pt 1):G173-178
- 52 Zoli G, Ballinger A, Healy J, O'Donnell LJ, Clark M, Farthing MJ. Promotion of gallbladder emptying by intravenous aminoacids. *Lancet* 1993;341:1240-1241
- 53 Mearadji B, Masclee AAM, Onkenhout W, Biemond I, Lamers CBHW. Effect of intraduodenal and intravenous amino acid on proximal gastric motor function in man. *Dig Dis Sci* 2001;46:38-45
- 54 Garg PK, Goindi G, Tandon RK. Stimulation of gallbladder by intravenous infusion of amino acid: a new method to obtain duodenal bile for bile analyses. *Dig Dis Sci* 2000;45:904-908
- 55 Jonderko K, Nowak A, Kasicka-Jonderko A, Blaszczynska M. Effect of cigarette smoking on gallbladder emptying and filling in man. *Am J Gastroenterol* 1994;89:67-71
- 56 Parkman HP, Pagano AP, Ryan JP. Investigation of endogenous neurotransmitters of guinea pig gallbladder using nicotinic agonist stimulation. *Dig Dis Sci* 1998;43:2237-2243
- 57 Fu H, Wu W, Zou S, Huang M, Huang C, Xu Y. Effect of cholesterol in bile on cholecystokinin receptor in the gallbladder. *Zhonghua Waike Zazhi* 2002;40:786-788
- 58 Shiffman ML, Shamburek RD, Schwartz CC, Sugerman HJ, Kellum JM, Moore EW. Gallbladder mucin, arachidonic acid, and bile lipids in patients who develop gallstones during weight reduction. *Gastroenterology* 1993;105:1200-1208
- 59 Marks JW, Bonorris GG, Schoenfield LJ. Effects of ursodiol or ibuprofen on contraction of gallbladder and bile among obese patients during weight loss. *Dig Dis Sci* 1996;41:242-249
- 60 Yang H, Petersen GM, Roth MP, Schoenfield LJ, Marks JW. Risk factors for gallstone formation during rapid loss of weight. *Dig Dis Sci* 1992;37:912-918
- 61 Zapata R, Severin C, Manriquez M, Valdivieso V. Gallbladder motility and lithogenesis in obese patients during diet-induced weight loss. *Dig Dis Sci* 2000;45:421-428
- 62 Weinsier RL, Wilson LJ, Lee J. Medically safe rate of weight loss for the treatment of obesity: a guideline based on risk of gallstone formation. *Am J Med* 1995;98:115-117
- 63 Gebhard RL, Prigge WF, Ansel HJ, Schlasner L, Ketover SR, Sande D, Holtmeier K, Peterson FJ. The role of gallbladder emptying in gallstone formation during diet-induced rapid weight loss. *Hepatology* 1996;24:544-548
- 64 Vezina WC, Grace DM, Hutton LC, Alfieri MH, Colby PR, Downey DB, Vanderwerf RJ, White NF, Ward RP. Similarity in gallstone formation from 900 kcal/day diets containing 16 g vs 30 g of daily fat: Evidence that fat restriction is not the main culprit of cholelithiasis during rapid weight reduction. *Dig Dis Sci* 1998;43:554-561
- 65 Shiffman ML, Kaplan GD, Brinkman-Kaplan V, Vickers FF. Prophylaxis against gallstone formation with ursodeoxycholic acid in patients participating in a very-low-calorie diet program. *Ann Intern Med* 1995;122:899-905
- 66 Soffer EE, Johlin FC. Intestinal dysmotility in patients with sphincter of Oddi dysfunction. A reason for failed response to sphincterotomy. *Dig Dis Sci* 1994;39:1942-1946
- 67 Evans PR, Bak YT, Dowsett JF, Smith RC, Kellow JE. Small bowel dysmotility in patients with postcholecystectomy sphincter of Oddi dysfunction. *Dig Dis Sci* 1997;42:1507-1512
- 68 Koussayer T, Ducker TE, Clench MH, Mathias JR. Ampulla of Vater/duodenal wall spasm diagnosed by antroduodenal manometry. *Dig Dis Sci* 1995;40:1710-1719
- 69 Fullarton GM, Murray WR. Evaluation of endoscopic sphincterotomy in sphincter of Oddi dysfunction. *Endoscopy* 1992;24:199-202
- 70 Meshkinpour H, Mollot M. Sphincter of Oddi dysfunction and unexplained abdominal pain: clinical and manometric study. *Dig Dis Sci* 1992;37:257-261
- 71 Chen JW, Thomas A, Woods CM, Schloithe AC, Toouli J, Saccone GT. Sphincter of Oddi dysfunction produces acute pancreatitis in the possum. *Gut* 2000;47:539-545
- 72 Kaw M, Brodmerkel GJ Jr. ERCP, biliary crystal analysis, and sphincter of Oddi manometry in idiopathic recurrent pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 2002;55:157-162
- 73 Evans PR, Dowsett JF, Bak YT, Chan YK, Kellow JE. Abnormal sphincter of Oddi response to cholecystokinin in postcholecystectomy syndrome patients with irritable bowel syndrome. The irritable sphincter. *Dig Dis Sci* 1995;40:1149-1156
- 74 Devereaux BM, Sherman S, Lehman GA. Sphincter of Oddi (pancreatic) hypertension and recurrent pancreatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 2002;4:153-159
- 75 Toouli J, Craig A. Sphincter of Oddi function and dysfunction. *Can J Gastroenterol* 2000;14:411-419
- 76 Rosenblatt ML, Catalano MF, Alcocer E, Geenen JE. Comparison of sphincter of Oddi manometry, fatty meal sonography, and hepatobiliary scintigraphy in the diagnosis of sphincter of Oddi dysfunction. *Gastrointest Ends* 2001;54:697-704
- 77 Madacsy L, Middelfart HV, Matzen P, Hojgaard L, Funch-Jensen P. Quantitative hepatobiliary scintigraphy and endoscopic sphincter of Oddi manometry in patients with suspected sphincter of Oddi dysfunction: assessment of flow-pressure relationship in the biliary tract. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000;12:777-786
- 78 Jung M, Pimentel F, Winter J, Doertenbach J. The common channel syndrome in adults. *Z Gastroenterol* 1993;31:147-150
- 79 Chen SZ, Chen XC, Liu WX, Yang ZS, Guo XL. Domperidone improves gallbladder emptying function in patients with irritable bowel syndrome. *China Natl J New Gastroenterol* 1995;1:48-51
- 80 Ziegenhagen DJ, Heitz W, Krus W, Pohl C, Zehnter E. Cisapride increases gallbladder volume in gallstone patients before and after extracorporeal shock wave lithotripsy. *Aliment Pharmacol Ther* 1993;7:617-622
- 81 Thorens J, Schnegg JF, Brignoli R, Froehlich F, Jansen JB, Dorta G, Blum AL, Gonvers JJ, Fried M. Effect of cisapride on gallbladder motility after extracorporeal shock-wave lithotripsy. *J Hepatol* 1995;22:333-337
- 82 Jonderko K, Nowak A, Kasicka-Jonderko A, Sliwinski Z, Kucio C. Effect of nifedipine on interdigestive gallbladder volume and postprandial gallbladder emptying in man. *Dig Dis Sci* 1991;36:1434-1440
- 83 陈仕珠,步雪,后成才,李莎,陈旭春. 硝苯吡啶改善肠易激综合征患者胆囊排空不良的机制. 华人消化杂志 1998;6:423-426
- 84 陈仕珠,沙建萍,陈旭春,后成才,付卫红,刘望. 胆汁返流性胃炎患者 Oddi 括约肌松弛不良:硝苯吡啶改善胆囊排空作用研究. 世界华人消化杂志 1999;7:1020-1023
- 85 Toouli J, Craig A. Sphincter of Oddi function and dysfunction. *Can J Gastroenterol* 2000;14:411-419

- 86 Thomas PD, Turner JG, Dobbs BR, Burt MJ, Chapman BA. Use of (99m)Tc-DISIDA biliary scanning with morphine provocation for the detection of elevated sphincter of Oddi basal pressure. *Gut* 2000;46:838-841
- 87 Sherman S, Troiano FP, Hawes RH, O'Connor KW, Lehman GA. Frequency of abnormal sphincter of Oddi manometry compared with the clinical suspicion of sphincter of Oddi dysfunction. *Am J Gastroenterol* 1991;86:586-590
- 88 Coyle WJ, Pineau BC, Tarnasky PR, Knapple WL, Aabakken L, Hoffman BJ, Cunningham JT, Hawes RH, Cotton PB. Evaluation of unexplained acute and acute recurrent pancreatitis using endoscopic retrograde cholangiopancreatography, sphincter of Oddi manometry and endoscopic ultrasound. *Endoscopy* 2002;34:617-623
- 89 Chan YK, Evans PR, Dowsett JF, Kellow JE, Badcock CA. Discordance of pressure recordings from biliary and pancreatic duct segments in patients with suspected sphincter of Oddi dysfunction. *Dig Dis Sci* 1997;42:1501-1506
- 90 Cuer JC, Dapoigny M, Bommelaer G. The effect of midazolam on motility of the sphincter of Oddi in human subjects. *Endoscopy* 1993;25:384-386
- 91 Fazel A, Burton FR. The effect of midazolam on the normal sphincter of Oddi: a controlled study. *Endoscopy* 2002;34:78-81
- 92 Sugawa C, Park DH, Lucas CE, Higuchi D, Ukawa K. Endoscopic sphincterotomy for stenosis of the sphincter of Oddi. *Surg Endosc* 2001;15:1004-1007
- 93 Jagannath S, Kalloo AN. Efficacy of biliary scintigraphy in suspected sphincter of oddi dysfunction. *Curr Gastroenterol Rep* 2001;3:160-165
- 94 邹多武, 许国铭, 孙振兴, 李兆申, 尹宁. Oddi 括约肌测压对胆囊切除术后腹痛患者的诊断价值. *第二军医大学学报* 1977;18:117-119
- 95 王继英, 张超, 王旺河, 马玉春, 李国庆, 郑万海. 腹腔镜胆囊切除术后胆道动力障碍的研究. *中华肝胆外科杂志* 2001;7:400-402
- 96 Agarwal DK, Sharma BC, Dhiman RK, Baijal SS, Choudhuri G, Saraswat VA. Effect of endoscopic sphincterotomy on gallbladder motility. *Dig Dis Sci* 1997;42:1495-1500
- 97 Sharma SS. Sphincter of Oddi dysfunction in patients addicted to opium: an unrecognized entity. *Gastrointest Endosc* 2002;55:427-430
- 98 Chandramouli B, Gupta SM, Cohen GE. Scintigraphic evaluation of bile dynamics before and after endoscopic sphincterotomy. *Clin Nucl Med* 1994;19:800-802
- 99 Fullarton GM, Murray WR. Evaluation of endoscopic sphincterotomy in sphincter of Oddi dysfunction. *Endoscopy* 1992;24:199-202
- 100 胡冰, 周代云, 龚彪, 王书智, 张风梅, 王晓琳. 乳头预切开术在内窥镜逆行胰胆管造影术中的应用. *世界华人消化杂志* 1999;7:1052-1054
- 101 Yasuda I, Tomita E, Enya M, Kato T, Moriwaki H. Can endoscopic papillary balloon dilation really preserve sphincter of Oddi function? *Gut* 2001;49:686-691
- 102 Carr-Locke DL. Can endoscopic papillary balloon dilation really preserve sphincter of Oddi function? *Gut* 2001;49:608-609
- 103 李丹. 胆囊切除术胆管损伤的原因及预防方法. *世界华人消化杂志* 1999;7:443
- 104 李兆申. 中国 ERCP 研究现状. *世界华人消化杂志* 2000;8:446-448
- 105 龚建平, 韩本立, 周永碧. 良性胆管狭窄 568 例的分类和外科治疗. *世界华人消化杂志* 2000;8:243-244
- 106 Weber FH Jr, Richards RD, McCallum RW. Erythromycin: a motilin agonist and gastrointestinal prokinetic agent. *Am J Gastroenterol* 1993;88:485-490
- 107 Craig AG, Toouli J. Slow release nifedipine for patients with sphincter of Oddi dyskinesia: results of a pilot study. *Intern Med J* 2002;32:119-120
- 108 O'Donnell LJ, Wilson P, Guest P, Catnach SM, McLean A, Wickham JE, Fairclough PD. Indomethacin and postprandial gallbladder emptying. *Lancet* 1992;339:269-271
- 109 Sterling RK, Shiffman ML, Sugerman HJ, Moore EW. Effect of NSAIDs on gallbladder bile composition. *Dig Dis Sci* 1995;40:2220-2226
- 110 Li YF, Russell DH, Myers SI, Weisbrodt NW, Moody FG. Gallbladder contractility in aspirin- and cholesterol-fed prairie dogs. *Gastroenterology* 1994;106:1662-1667

肠黏膜屏障研究进展

武金宝,王继德,张亚历

武金宝,王继德,张亚历,中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化内科研究所 广东省广州市 510515
国家自然科学基金资助课题, No.30270078
项目负责人:张亚历,5150515,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化内科研究所. zhangyl@fimmu.com
电话:020-61641531
收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-11-16

摘要

肠黏膜屏障是机体屏障系统的重要组成部分. 肠黏膜屏障由肠黏膜机械屏障、化学屏障、生物屏障和免疫屏障组成,各自具有不同的结构、不同的分子调控机制和不同的生物学功能,同时又通过各自的信号通路有机地结合在一起,共同防御外来抗原物质对机体的侵袭,消化系统疾病和一些非消化系统疾病常导致肠黏膜屏障功能障碍. 肠黏膜屏障功能障碍可以进一步加重原发疾病的病情,甚至诱发多脏器功能不全、全身炎症反应综合征,形成恶性循环,危及生命. 因而深入研究肠黏膜屏障必将有助于通过对这些分子调控信号通路进行干预,从而达到防治肠道相关性疾病,筛选有效的黏膜疫苗,为开发新药物提供特异的作用靶点.

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(5): 619-623

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/619.htm>

0 引言

近年来,随着对炎症性肠病、多脏器功能衰竭、细菌移位、肠源性感染等研究的深入,人们对肠道复杂生理功能有了新的认识,注意到肠道不仅是消化和吸收营养物质的重要脏器,而且肠道的其他功能如免疫调节、内分泌功能、黏膜屏障功能,逐渐被重视. 不论肠道的原发性病变,还是继发性损害,均会造成肠功能不同程度的损伤. 当前临床研究的热点主要是肠黏膜屏障功能(gut barrier function). 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^[1],由肠黏膜非特异免疫屏障和肠黏膜特异性免疫屏障组成^[2]. 肠黏膜屏障在保护机体免受食物抗原、微生物极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^[3,4].

1 肠黏膜非特异免疫屏障

肠黏膜非特异免疫屏障由肠黏膜机械屏障、化学屏障、生物屏障组成.

1.1 机械屏障 机械屏障由肠道黏膜上皮细胞、细胞间紧密连接与菌膜三者构成,能有效阻止细菌穿透黏膜进入深部组织,是肠黏膜屏障的结构基础. 肠上皮为单

层柱状上皮细胞,由吸收细胞、杯状细胞及潘氏细胞(paneth cell)等组成. 吸收细胞侧面和质膜在近肠腔侧与相邻的细胞连接形成紧密连接复合体,包括两类:(1)绒毛上皮间紧密连接,孔径较小,结构层次复杂,只允许水分子和小分子水溶性物质有选择性通过;(2)腺管细胞间紧密连接孔径较大而层次较简单,可容许较大的分子通过^[5]. 上皮细胞间的紧密连接由多种功能各异的蛋白质组成,开放和关闭具有可控性,受肠腔内容物成分和细胞因子、黏附素的调控^[6,7];潘氏细胞具有一定的吞噬细菌的能力,并可分泌非特异性的溶菌酶,调节肠道菌群. 近年研究发现,潘氏细胞还分泌天然抗生素肽(Antibiotic peptide)人类防御素 5(human defensin 5, HD-5)和人类防御素 6(human defensin 6, HD-6),都是由 32-36 个氨基酸残基组成的小分子肽,其抗菌谱广,杀灭微生物作用强大^[8-10],在抑制细菌移位、防治肠源性感染方面日益受到重视^[10,11]. 杯状细胞分泌的黏液在黏膜表面形成疏水的黏液凝胶层,主要成分是黏液糖蛋白. 他覆盖肠上皮表面,可阻抑消化道中的消化酶和有害物质对上皮细胞的损害. 研究表明,黏液糖蛋白本身的结构和带有负电荷的特性,有利于包裹细菌;黏液糖蛋白暴露的化学基团与肠上皮表面结构类似,易于细菌识别和黏附^[12];黏液糖蛋白还与病原微生物竞争抑制肠上皮细胞上的黏附素受体,抑制病菌在肠道的黏附定植^[13];黏液糖蛋白协同分泌型 IgA 在黏膜表面形成一个抗感染的抗体黏膜屏障,通过肠的蠕动将捕获在黏液层中的细菌和毒素清除出体外^[14].

1.2 生物屏障 肠道是人体内最大的储菌库,细菌种类多达 400 种以上,99% 左右为专性厌氧菌. 肠道常驻菌群是一个相互依赖又相互作用的微生态系统,这种微生态平衡构成了肠生物屏障^[15],其中深层主要寄居着厌氧菌,中层为类杆菌、消化链球菌,表层是大肠杆菌、肠球菌等. 表层的需氧菌(主要为大肠杆菌)可游动在肠腔中,而深层的专性厌氧菌紧贴于肠黏膜表面,被糖衣包被,比较稳定,形成膜菌群,能阻止表层具有潜在致病性的需氧菌或外来菌直接黏附于肠黏膜细胞. 兼性厌氧肠杆菌可以消耗肠道中的游离氧,并可以在肠道中形成厌氧菌必需的 -350 mV 的氧化还原电势,因而对维持肠道的厌氧环境和厌氧菌的定植起重要的作用^[15,16]. 专性厌氧菌(主要是双歧杆菌等)通过黏附作用与肠上皮紧密结合,形成菌膜屏障,可以竞争抑制肠道中条件致病菌 - 革兰氏阴性杆菌,主要是兼性厌氧菌和需氧菌黏附肠上皮细胞^[15,16],其次专性厌氧菌可分泌

短链脂肪酸来降低肠道的pH值以及抑菌肽均可抑制肠道兼性厌氧菌和外来菌的定植和生长。另外,许多研究证实双歧杆菌除了具有维持肠道正常微生物群平衡、抗感染的作用外,还具有抗肿瘤、抗衰老等生理作用^[15-20]。

1.3 化学屏障

胃肠道分泌的胃酸、胆汁、各种消化酶、溶菌酶、黏多糖、糖蛋白和糖脂等化学物质组成肠黏膜的化学屏障。胃酸能杀灭进入胃肠道的细菌,抑制细菌在胃肠道上皮的黏附和定植。溶菌酶能破坏细菌的细胞壁,使细菌裂解。黏液中含有的补体成分可增加溶菌酶及免疫球蛋白的抗菌作用。其中,肠道分泌的大量消化液可稀释毒素,冲洗清洁肠腔,使潜在的条件致病菌难以黏附到肠上皮上。

2 免疫屏障

肠道黏膜免疫屏障是区别于系统性免疫的功能发达的局部免疫系统。根据功能和分布,可将肠道黏膜免疫系统分成肠相关淋巴组织(gut-associated lymphoid tissue, GALT)和弥散免疫细胞。肠相关淋巴组织主要指分布于肠道的集合淋巴小结,即Peyer结(peyer's patches),是免疫应答的诱导和活化部位;弥散免疫细胞则是肠黏膜免疫的效应部位^[21]。最近几年,发现多种细胞和细胞因子参与肠黏膜免疫应答,为进一步阐明肠黏膜免疫的机制奠定了基础^[22]。

2.1 M细胞

M细胞为一种特化的扁平上皮细胞,是位于黏膜淋巴结的滤泡上皮中的抗原递呈细胞^[22,23]。这些细胞在扫描电镜下因具有特征性的微折叠现象,最初被称作微折叠细胞(microfold cell),后据其有膜样结构而称作膜样细胞(membranous cell)或膜性细胞(membrane cell),简称M细胞^[24]。M细胞与邻近上皮细胞间可通过桥粒紧密连接,形成上皮障碍,将肠道内抗原物质与上皮淋巴组织隔开。研究发现M细胞是大分子颗粒抗原进入上皮淋巴组织的主要途径^[25]。与肠上皮不同的是,M细胞能摄取和运输多种大分子物质,如微生物和微粒等颗粒性抗原,把他们传递给黏膜下的淋巴组织应答^[26]。当黏膜表面的抗原与M细胞膜结合后,M细胞便将其吞入形成吞饮小泡,但抗原很少或完全不在M细胞溶酶体中停留,因而微生物抗原一般仍以完整的活性形式跨过M细胞,直接迅速被转运至上皮下淋巴组织^[27]。M细胞上皮淋巴滤泡生发中心的上皮内专有的抗原递呈细胞如巨噬细胞、树突状细胞,处理经M细胞转运来的抗原然后呈递给T、B淋巴细胞,产生抗原特异性B淋巴母细胞,在生发中心繁殖后,通过血流迁移到远处的黏膜和腺体组织,进一步分化成熟为浆细胞,产生分泌型IgA^[28,29]。可以看出,跨越M细胞转运抗原为启动肠黏膜免疫应答的最重要的第一步,因而,M细胞起“第一信息通道”(first information conduct)的作用^[27,30]。

2.2 上皮内淋巴细胞(intraepithelial lymphocytes, IEL)

IEL是一组CD8⁺细胞^[31,32],主要位于肠道上皮之间和

绒毛顶端,被激活后可释放IL-2, 3, 4, 5, 10、IFN- γ 、IFN- α , TGF- β 等多种细胞因子,因此在防御肠道病原体入侵方面发挥重要的作用^[33,34]。研究表明,IEL有与细胞毒T细胞及NK相似的胞内颗粒,如穿孔素、端粒酶和丝氨酸酯酶,故IEL的主要功能是细胞杀伤作用^[35]。另外,IEL可抑制黏膜部位的过敏反应^[35,36]。

2.3 固有层淋巴细胞(LPL)

LPL位于黏膜固有层,T、B细胞均很丰富。已发现在黏膜部位的免疫应答以Th₂型为主,定居在固有层的CD4⁺Th₂细胞可分泌多种Th₂型细胞因子如TGF- β 、IL-4、IL-5、IL-6及IL-10^[37]。Husband研究了各种Th₂型细胞因子在黏膜免疫中的作用,发现由于IL-4可激活静止期B细胞,故在诱导局部及全身抗体应答中均起关键作用,而IL-5和IL-6则主要在黏膜部位发挥特殊作用^[38]。IL-6在促进肠道和呼吸道IgA应答方面起重要作用,这已通过用基因敲除技术(knockout)灭活IL-6基因得到证实^[39]。IL-4、IL-5、IL-6可协同诱导SIgA⁺B细胞分化成为IgA⁺浆细胞^[40,41]。因此,固有层是黏膜免疫应答的主要效应场所,浆细胞所分泌的大量IgA可通过分泌片的介导进入黏膜表面,中和抗原物质,起到清除外来抗原,保护机体的作用^[12,42,43]。

2.4 免疫效应分子SIgA

分泌型IgA(secretory immunoglobulin A, SIgA)是机体内分泌量最多的免疫球蛋白,是胃肠道和黏膜表面主要免疫球蛋白,对消化道黏膜防御起着重要作用,其中以SIgA为主的体液免疫起主导作用,他是防御病菌在肠道黏膜黏附和定植的第一道防线^[44-47]。目前,对SIgA的表达及其调节、黏膜神经内分泌免疫网络的调节机制等研究已经有了较大的进展,但还有些问题等待解决。肠道中的SIgA可阻止病原体在肠黏膜表面的黏附,可中和细菌产生的毒素,中和病毒,可以增强具有FC受体(FCR)细胞的吞噬功能,并与补体和溶菌酶协同抗菌^[48,49];其次,SIgA可作为封闭抗体抑制由IgM免疫复合物介导的抗体依赖式细胞毒作用(ADCC作用)对肠道局部的免疫炎症损伤^[50]。如果因为使用糖皮质激素、胃肠外营养(TPM)等干扰了SIgA的合成过程,将导致SIgA减少而削弱肠道的免疫功能,可引起肠道菌群失调,发生以脂肪痢为特征的消化吸收障碍,甚至引起肠道细菌的易位而发生肠源性全身感染^[51]。体内实验表明,IL-5能增强特异性IgA的反应;IL-6对分泌IgA的浆细胞在黏膜效应位点的定位、终末分化和增生起关键作用^[52,53]。

2.5 黏附分子与白细胞黏附

多形核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMN)在炎症部位募集、浸润是炎症反应的基本组织病理表现之一,也是导致肠黏膜屏障损伤的重要因素,而白细胞-内皮细胞(PMN-EC)黏附是其发生的分子基础。细胞黏附包括PMN沿EC滚动、PMN-EC紧密黏附及PMN穿越内皮细胞游出三个阶段,各阶段均需多种黏附分子的参与^[54,55]。最近,对黏附分子ICAM-1, ICAM-2及 β 2整合素(β 2-integrins, CD11/CD18)的研究提示,炎症性肠病和其他多种肠炎

模型中白细胞的浸润是白细胞与内皮细胞黏附分子相互作用的结果^[56,57]. ICAM-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1), ICAM-2(inter-cellular adhesion molecule-2, ICAM-2)均为内皮细胞的黏附分子,是免疫球蛋白超家族(super-gene family)的成员. ICAM-1含有5个免疫球蛋白样的细胞外区域,第1个以氨基端的IgA样区域识别CD11a/CD18,第3个则识别CD11b/CD18分子,在Th₁源性细胞因子和细菌产物的刺激下,随着内皮细胞的激活而表达.存在于PMN表面上的β₂整合素的结构是杂二聚体,一个共同的亚基CD18和另外三个免疫学特性相异的亚基CD11a或CD11b或CD11c结合而成三种抗原成分:淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1, CD11a/CD18)、巨噬细胞分化抗原-1(Mac-1, CD11b/CD18)和GP150/95(CD11c/CD18)^[54,58]. PMN通过改变细胞表面整合素的结构和功能来调控与其他细胞的相互作用^[54,59,60].当PMN被激活后,CD11a/CD18和CD11b/CD18被动员到表面上,与受到细胞因子刺激的内皮上的ICAM-1和ICAM-2相互作用,促使PMN淋巴细胞与内皮细胞的黏附^[61,62].实验证实,抗CD11a/CD18和ICAM-1的单克隆抗体可抑制ICAM-1和ICAM-2的黏附作用^[61,63];肠道炎症活动时的组织损伤和功能失调也可抑制这种黏附作用,这也有力地例证了CD11/CD18和ICAM-1, ICAM-2对肠道组织损伤和肠黏膜屏障稳定的重要意义^[64-67].

2.6 整合素与淋巴细胞归巢 正常情况下肠黏膜淋巴细胞进入血循环参加淋巴循环,记忆淋巴细胞可通过肠黏膜的高内皮静脉(high endothelial vein, HEV)重新回到原来所在的肠黏膜和肠系膜淋巴结的现象叫淋巴细胞的归巢(homing).淋巴细胞的归巢则主要取决于淋巴细胞上的黏附分子与靶器官血管内皮细胞上配体之间的相互作用.淋巴细胞归巢到黏膜是由淋巴细胞表达的黏附分子与黏膜血管内皮表达的组织特异性配体相互作用而启动的^[68,69].近几年已发现多种黏附分子参与了淋巴细胞的归巢与定居,其中最主要的是整合素分子.整合素由α、β亚基组成,属于是α型跨膜糖蛋白.因为β亚基可与几个不同的α亚基结合,据此可将整合素分成不同的亚家族^[70,71].其中研究较多的有:(1)整合素α₄β₇及配体MAdCAM-1已知α₄β₇是小鼠淋巴细胞归巢到黏膜组织的主要受体. Berlin et al^[72]发现,表达α₄β₇及CD44^{high}的记忆T细胞可以非常有效地归巢到Peyer结.α₄β₇的主要配体为内皮细胞上的黏膜地址素细胞黏附分子1(mucosal address in cell adhesion molecule 1, MAdCAM-1),属于免疫球蛋白超家族,为50 KD的跨膜糖蛋白. MAdCAM-1主要在肠Peyer结、肠系膜淋巴结的HEV及肠固有层小静脉表达,因此α₄β₇主要介导淋巴细胞归巢到这些黏膜淋巴组织^[70-72].(2)整合素εβ₇及其配体E-钙依赖黏附素(E-Cadherin)εβ₇主要在上皮细胞及IEL中高水平表达,其中B细胞表达水平高于T细胞.关于εβ₇的功能,在体外实证表明抗εβ₇单抗可阻断T细胞黏附于上皮细胞,因此推测他主要

介导上皮内淋巴细胞(IEL)黏附及定居于肠上皮.εβ₇的配体是上皮细胞表达的E-钙依赖黏附素,钙依赖黏附素是另一类黏附分子,有5个细胞外区,尾部及连环蛋白(catenin)及肌动蛋白相连.在固体组织形成过程中,钙依赖黏附素可介导钙离子依赖的同型细胞黏附,具有严格的组织特异性^[72].E-钙依赖黏附素主要在上皮细胞基底面表达,可识别IEL上的εβ₇,介导IEL与上皮细胞黏附,有助于淋巴细胞归巢到黏膜部位^[72-74].

总之,肠道是人体最大且功能复杂的免疫器官,由众多功能复杂的细胞和生物分子成分构成了多层次的防御体系和调控体系^[75].一般生理状况下,肠黏膜免疫系统处于巨量抗原的包围中,既要维持肠黏膜重要的生理功能,即对外来食物抗原产生免疫耐受,保障机体对营养物质的消化和吸收;又要发挥黏膜防御功能,对肠道内条件致病菌、外来菌进行免疫监视和清除^[75].肠黏膜免疫系统如何调节和平衡这两种免疫反应尚待进一步研究,但临床和实验研究观测到,再许多病理状况下,相关生物分子的表达上调和下调,后者的作用可被放大,造成和加剧肠黏膜屏障损害.肠黏膜屏障损害可引起肠黏膜通透性增加,肠道内细菌移位,引发肠源性感染,加重原发疾病^[76,77].现在普遍认为,肠道不仅是MODS的靶器官,更是MODS的启动者^[77-80].因而,加强肠黏膜屏障的深入研究,阐明肠黏膜屏障的分子和免疫机制,可为创伤、烧伤、胰腺炎、休克及MODS、SIRS的防治提供新的手段,可为治疗炎症性肠病和抗肿瘤药物的开发提供新的靶点,为高效安全的黏膜疫苗研制提供新思路^[78-81].

3 参考文献

- 1 Kraehenbuhl JP, Pringault E, Neutra MR. Intestinal epithelia and barrier functions. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11(Suppl 3):3-8
- 2 Laissue JA, Chappuis BB, Muller C, Reubi JC, Gebbers JO. The intestinal immune system and its relation to disease. *Dig Dis* 1993;11:298-312
- 3 Harari Y, Weisbrodt NW, Moody FG. Ileal mucosal response to bacterial toxin challenge. *J Trauma* 2000;49:306-313
- 4 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
- 5 李宁. 肠屏障功能障碍及我们的对策. *中国实用外科杂志* 2000;20:35-36
- 6 Nusrat A, Turner JR, Madara JL. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G851-G857
- 7 Colgan SP, Dzusz AL, Parkos CA. Epithelial exposure to hypoxia modulates neutrophil transepithelial migration. *J Exp Med* 1996;184:1003-1015
- 8 Porter EM, van Dam E, Valore EV, Ganz T. Broad-spectrum antimicrobial activity of human intestinal defensin 5. *Infect Immun* 1997;65:2396-2401
- 9 Condon MR, Viera A, D'Alessio M, Diamond G. Induction of a rat enteric defensin gene by hemorrhagic shock. *Infect Immun* 1999;67:4787-4793
- 10 Ganz T, Lehrer RI. Defensins. *Curr Opin Immunol* 1994;6:584-589
- 11 方文慧,姚咏明,施志国,盛志勇. 肠源性防御素与肠道天然免疫. *解放军医学杂志* 2000;25:463-465
- 12 Mantis NJ, Cheung MC, Chintalacharuvu KR, Rey J, Cortesny

- B, Neutra MR. Selective adherence of IgA to murine Peyer's patch M cells: evidence for a novel IgA receptor. *J Immunol* 2002;169:1844-1851
- 13 Boll G, Rudolph A, Spiess S, Reimann J. Regional specialization of intraepithelial T cells in the murine small and large intestine. *Scand J Immunol* 1995;41:103-113
- 14 罗治彬, 吴嘉惠. 肠道黏膜屏障结构的研究进展. 胃肠病学和肝病杂志 1997;6:372-375
- 15 Lu L, Walker WA. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am J Clin Nutr* 2001;73:1124S-1130S
- 16 张会丰, 李根山, 田秀巧, 刘桂珍, 陈连元. 初乳对早期新生儿肠道菌群的作用. 华人消化杂志 1998;6:735
- 17 Kasravi FB, Wang L, Wang XD, Molin G, Bengmark S, Jeppsson B. Bacterial translocation in acute liver injury induced by D-galactosamine. *Hepatology* 1996;23:97-103
- 18 Sansonetti PJ. Molecular and cellular mechanisms of invasion of the intestinal barrier by enteric pathogens. The paradigm of shigella. *Folia Microbiol (Praha)* 1998;43:239-246
- 19 Kennedy RJ, Kirk SJ, Gardiner KR. Mucosal barrier function and the commensal flora. *Gut* 2002;50:441-442
- 20 周伟. 双歧杆菌与婴幼儿健康. 实用儿科临床杂志 2002;17:260-262
- 21 Nagura H, Sumi Y. Immunological functions of the gut-role of the mucosal immune system. *Toxicol Pathol* 1988;16:154-164
- 22 Walker WA. Development of the intestinal mucosal barrier. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34(Suppl 1):S33-S39
- 23 Kucharzik T, Luger N, Rautenberg K, Linnepe M, Cichon C, Reichelt R, Stoll R, Schmidt MA, Domschke W. Characterization of M cell development during indomethacin-induced ileitis in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:247-256
- 24 Wolf JL, Bye WA. The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Annu Rev Med* 1984;35:95-112
- 25 Hamzaoui N, Pringault E. Interaction of microorganisms, epithelium, and lymphoid cells of the mucosa-associated lymphoid tissue. *Ann N Y Acad Sci* 1998;859:65-74
- 26 Sansonetti PJ, Phalipon A. M cells as ports of entry for enteroinvasive pathogens: mechanisms of interaction, consequences for the disease process. *Semin Immunol* 1999;11:193-203
- 27 Kucharzik T, Luger N, Rautenberg K, Luger N, Schmidt MA, Stoll R, Domschke W. Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 2000;915:171-183
- 28 Trier JS. Structure and function of intestinal M cells. *Gastroenterol Clin North Am* 1991;20:531-547
- 29 Schneider T, Ullrich R, Zeitz M. The immunologic aspects of human immunodeficiency virus infection in the gastrointestinal tract. *Semin Gastrointest Dis* 1996;7:19-29
- 30 赵燕, 王霞, 蔡美英. M 细胞 - 启动黏膜免疫应答的入口. 微生物学免疫学进展 2001;29:89-91
- 31 Taguchi T, McGhee JR, Coffman RL, Beagley KW, Eldridge JH, Takatsu K, Kiyono H. Detection of individual mouse splenic T cells producing IFN-gamma and IL-5 using the enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay. *J Immunol Methods* 1990;128:65-73
- 32 Taguchi T, Aicher WK, Fujihashi K, Yamamoto M, McGhee JR, Bluestone JA, Kiyono H. Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes. Murine CD3⁺gamma/delta TCR⁺ T cells produce IFN-gamma and IL-5. *J Immunol* 1991;147:3736-3744
- 33 Klein JR. T-lymphopoietic capacity of the mouse intestinal epithelium. *Semin Immunol* 1995;7:291-297
- 34 Fujihashi K, Yamamoto M, McGhee JR, Beagley KW, Kiyono H. Function of alpha beta TCR⁺ intestinal intraepithelial lymphocytes: Th₁- and Th₂-type cytokine production by CD4⁺CD8⁻ and CD4⁺CD8⁺ T cells for helper activity. *Int Immunol* 1993;5:1473-1481
- 35 Nagura H, Ohtani H, Takahashi K, Fukushima K. Molecular biological characterization of intestinal intraepithelial lymphocytes and their receptors. *Nippon Rinsho* 1996;54:1162-1169
- 36 Laissue JA, Chappuis BB, Muller C, Reubi JC, Gebbers JO. The intestinal immune system and its relation to disease. *Dig Dis* 1993;11:298-312
- 37 Walia K, Vohra H, Singh H, Ganguly NK. Spectrum of gut immunologic reactions: selective induction of distinct responses to *Vibrio cholerae* WO7 and its toxin. *Microbiol Immunol* 2000;44:931-940
- 38 Husband AJ, Kramer DR, Bao S, Sutherland RM, Beagley KW. Regulation of mucosal IgA responses in vivo: cytokines and adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;54:179-186
- 39 Bromander AK, Ekman L, Kopf M, Nedrud JG, Lycke NY. IL-6-deficient mice exhibit normal mucosal IgA responses to local immunizations and *Helicobacter felis* infection. *J Immunol* 1996;156:4290-4297
- 40 Boyaka PN, Marinaro M, Jackson RJ, van Ginkel FW, Cormet-Boyaka E, Kirk KL, Kensil CR, McGhee JR. Oral QS-21 requires early IL-4 help for induction of mucosal and systemic immunity. *J Immunol* 2001;166:2283-2290
- 41 Zarza BL, Wu Y, Fukatsu K, Johnson CD, Kudsk KA. The neuropeptide bombesin improves IgA-mediated mucosal immunity with preservation of gut interleukin-4 in total parenteral nutrition-fed mice. *Surgery* 2002;131:59-65
- 42 Schafer F, Kewenig S, Stolte N, Stahl-Hennig C, Stallmach A, Kaup FJ, Zeitz M, Schneider T. Lack of simian immunodeficiency virus (SIV) specific IgA response in the intestine of SIV infected rhesus macaques. *Gut* 2002;50:608-614
- 43 Tamada T, Sasaki T. The role of airway submucosal glands in the airway mucosal defense system. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 2001;39:157-165
- 44 Pulimood AB, Mathan MM, Mathan VI. Quantitative and ultrastructural analysis of rectal mucosal mast cells in acute infectious diarrhea. *Dig Dis Sci* 1998;43:2111-2116
- 45 Keren DF, Brown JE, McDonald RA, Wassef JS. Secretory immunoglobulin A response to Shiga toxin in rabbits: kinetics of the initial mucosal immune response and inhibition of toxicity in vitro and in vivo. *Infect Immun* 1989;57:1885-1889
- 46 Macpherson AJ, Hunziker L, McCoy K, Lamarre A. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes Infect* 2001;3:1021-1035
- 47 Saini MS, Liberati DM, Diebel LN. Sequential changes in mucosal immunity after hemorrhagic shock. *Am Surg* 2001;67:797-801
- 48 Kelleher SL, Lonnerdal B. Immunological activities associated with milk. *Adv Nutr Res* 2001;10:39-65
- 49 Silvey KJ, Hutchings AB, Vajdy M, Petzke MM, Neutra MR. Role of immunoglobulin A in protection against reovirus entry into Murine Peyer's patches. *J Virol* 2001;75:10870-10879
- 50 Punthuprapasa P, Thammapalerd N, Chularerk U, Charoenlarp K, Bhaibulaya M. Diagnosis of intestinal amebiasis using salivary IgA antibody detection. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32:159-164
- 51 Kozlowski PA, Williams SB, Lynch RM, Flanagan TP, Patterson RR, Cu-Uvin S, Neutra MR. Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle. *J Immunol* 2002;169:566-574
- 52 Sanderson IR. Nutritional factors and immune functions of gut epithelium. *Proc Nutr Soc* 2001;60:443-447
- 53 Jones SA, Horiuchi S, Topley N, Yamamoto N, Fuller GM. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J* 2001;15:43-58
- 54 Panés J, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology* 1998;114:1066-1090
- 55 罗昆仑, 何振平, 李昆, 段恒春. 坏死性胰腺炎时某些黏附分子表达对中性粒细胞在肺脏聚集的影响. 中华消化杂志 1999;19:182-184
- 56 Dustin ML, Springer TA. Role of Lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu Rev Immunol* 1991;9:27-66
- 57 Malizia G, Calabrese A, Cottone M, Raimondo M, Trejdosiewicz LK, Smart CJ, Oliva L, Pagliaro L. Expression of leukocyte adhesion molecules by mucosal mononuclear phagocytes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991;100:150-159
- 58 江学良, 权启镇, 刘涛, 董兴成. 溃疡性结肠炎研究的新进展. 世界华人消化杂志 2000;8:216-218
- 59 Bernstein CN, Sargent M, Gallatin WM, Wilkins J. Beta-2 integrin/intercellular adhesion molecule(ICAM) expression in the normal human intestine. *Clin Exp Immunol* 1996;106:160-169
- 60 Inoue S, Nakao A, Kishimoto W, Murakami H, Harada A, Nonami T, Takagi H. LFA-1 (CD11a/CD18) and ICAM-1 (CD54) antibodies attenuate superoxide anion release from

- polymorphonuclear leukocytes in rats with experimental acute pancreatitis. *Pancreas* 1996;12:183-188
- 61 Parkos CA, Colgan SP, Liang TW, Nusrat A, Bacarra AE, Carnes DK, Madara JL. CD47 mediates post-adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia. *J Cell Biol* 1996;132:437-450
- 62 Tanaka T, Ohtsuka Y, Yagita H, Shiratori Y, Omata M, Okumura K. Involvement of alpha 1 and alpha 4 integrins in gut mucosal injury of graft-versus-host disease. *Int Immunol* 1995;7:1183-1189
- 63 Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:55-65
- 64 Issekutz TB, Palecanda A, Kadela-Stolarz U, Marshall JS. Blockade of either alpha-4 or beta-7 integrins selectively inhibits intestinal mast cell hyperplasia and worm expulsion in response to *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *Eur J Immunol* 2001;31:860-868
- 65 Papadimitriou MN, Menter DG, Konstantopoulos K, Nicolson GL, McIntire LV. Integrin alpha4beta1/VCAM-1 pathway mediates primary adhesion of RAW117 lymphoma cells to hepatic sinusoidal endothelial cells under flow. *Clin Exp Metastasis* 1999;17:669-676
- 66 Kanwar JR, Harrison JE, Wang D, Leung E, Mueller W, Wagner N, Krissansen GW. Beta7 integrins contribute to demyelinating disease of the central nervous system. *J Neuroimmunol* 2000;103:146-152
- 67 Voura EB, Billia F, Iscove NN, Hawley RG. Expression mapping of adhesion receptor genes during differentiation of individual hematopoietic precursors. *Exp Hematol* 1997;25:1172-1179
- 68 Warnock RA, Askari S, Butcher EC, von Andrian UH. Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 1998;187:205-216
- 69 Basson MD, Modlin IM, Flynn SD, Jena BP, Madri JA. Independent modulation of enterocyte migration and proliferation by growth factors, matrix proteins, and pharmacologic agents in an in vitro model of mucosal healing. *Surgery* 1992;112:299-307
- 70 Salmi M, Alanen K, Grenman S, Briskin M, Butcher EC, Jalkanen S. Immune cell trafficking in uterus and early life is dominated by the mucosal addressin MAdCAM-1 in humans. *Gastroenterology* 2001;121:853-864
- 71 Michie SA, Streeter PR, Butcher EC, Rouse RV. L-selectin and alpha 4 beta 7 integrin homing receptor pathways mediate peripheral lymphocyte traffic to AKR mouse hyperplastic thymus. *Am J Pathol* 1995;147:412-421
- 72 Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC. Alpha 4 integrin mediates lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 1995;80:413-422
- 73 赖燕来. MAdCAM-1 分子:免疫生物学功能. 国外医学免疫学分册 2001;24:17-20
- 74 Lefrancois L, Barrett TA, Havran WL, Puddington L. Developmental expression of the alpha IEL beta 7 integrin on T cell receptor gamma delta and T cell receptor alpha beta T cells. *Eur J Immunol* 1994;24:635-640
- 75 Neutra MR, Mantis NJ, Kraehenbuhl JP. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2001;2:1004-1009
- 76 Laissue JA, Chappuis BB, Muller C, Reubi JC, Gebbers JO. The intestinal immune system and its relation to disease. *Dig Dis* 1993;11:298-312
- 77 Stanley SL Jr. Protective immunity to amebiasis: new insights and new challenges. *J Infect Dis* 2001;184:504-506
- 78 Baue AE. The role of the gut in the development of multiple organ dysfunction in cardiothoracic patients. *Ann Thorac Surg* 1993;55:822-829
- 79 Nieuwenhuijzen GA, Deitch EA, Goris RJ. The relationship between gut-derived bacteria and the development of the multiple organ dysfunction syndrome. *J Anat* 1996;189:537-548
- 80 Yao YM, Sheng ZY, Yu Y, Tian HM, Wang YP, Lu LR, Xu SH. The potential etiologic role of tumor necrosis factor in mediating multiple organ dysfunction in rats following intestinal ischemia-reperfusion injury. *Resuscitation* 1995;29:157-168
- 81 Kraehenbuhl JP, Hopkins SA, Kerneis S, Pringault E. Antigen sampling by epithelial tissues: implication for vaccine design. *Behring Inst Mitt* 1997;98:24-32

线粒体 DNA 与消化性肿瘤关系的研究进展

韩铮波,李 凡,辛 彦

韩铮波,辛彦,中国医科大学附属一院肿瘤研究所 辽宁省沈阳市 110001
李凡,中国医科大学医学基础教研室 辽宁省沈阳市 110001
国家自然科学基金资助项目, No.30070845
项目负责人:辛彦,110001,辽宁省沈阳市和平区南京北街 155 号,中国医科大学附属一院肿瘤研究所第四研究室. xiny@hotmail.com
电话:024-23256666 转 6351 传真:024-23252377
收稿日期:2003-01-04 接受日期:2003-01-13

摘要

线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)编码参与氧化磷酸化和ATP生成所必需的多肽,与核基因组相比mtDNA突变率非常高,加之本身缺乏有效的损伤修复系统,所以mtDNA被认为与肿瘤发生有密切的关系.mtDNA的编码区内缺乏内含子,大多数突变发生于此编码序列,突变的积累可能导致肿瘤的发生.mtDNA的表达改变可能是癌细胞的一个特性.近年来对线粒体基因组的不稳定性(mitochondrial genome instability, mtGI)及mtDNA与核基因组的整合研究逐渐增多,尤其针对消化性肿瘤的研究逐渐增多.肿瘤mtDNA的研究将成为对消化性肿瘤研究的又一项重要课题.本文将对线粒体基因组的突变、表达异常、整合和不稳定性与消化性肿瘤发病机制的关系,尤其是在近年所取得的进展作一综述.

韩铮波,李凡,辛彦.线粒体DNA与消化性肿瘤关系的研究进展.世界华人消化杂志 2003;11(5):624-627

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/624.htm>

0 引言

目前认为肿瘤的生物特征不仅取决于核内遗传物质,而且与核外的线粒体DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)也有一定的关系.与核基因组相比,mtDNA缺乏组蛋白保护,而且没有有效的损伤修复系统,因此mtDNA极易受致癌物攻击,是致癌物作用的重要靶点^[1],各种因素所致的mtDNA损伤(包括突变、整合和不稳定性等)与细胞的癌变、肿瘤的发生之间可能存在一定的关系.在结肠癌、胃癌和肝癌等消化性肿瘤中都有线粒体DNA畸变的报道,但结论不尽相同.

1 mtDNA的结构特点

mtDNA是细胞核外唯一存在的DNA,人的mtDNA是一条长为16 569 bp的双链闭环分子,编码了13种蛋白质(疏水性强,和内膜结合在一起)、22种tRNA和2种rRNA.mtDNA非编码控制区(control region)包括HV区(hypervariable region)、D-loop区及复制转录区,除此外,mtDNA各基因之间很少有非编码碱基的存在.

mtDNA的基因结构全部是外显子,而不包含内含子.哺乳动物细胞mtDNA仅占整个细胞DNA的0.1-1%,1个线粒体中可含有2-10个mtDNA,而整个细胞可含有1 000多个mtDNA.

2 mtDNA遗传系统与细胞核遗传系统的相互作用

整个氧化磷酸化系统(oxidative phosphorylation)是由5个呼吸酶复合体(complex, COX)组成,由核和线粒体基因组的87个基因共同编码合成,其中线粒体有13个基因参与,编码内膜5个酶复合体中的13个亚单位.线粒体中其余的蛋白质(包括外膜和基质中的蛋白质)都由核基因编码,由胞质内的核糖体合成并运送到线粒体内.线粒体基因组的复制和转录都接受了细胞核的指导和调控,因为线粒体DNA和RNA的聚合酶等都是由细胞核内基因所编码,所以线粒体是一种半自主性的细胞器,亦即mtDNA遗传系统只有依靠核基因所合成的大量多肽类物质的协调作用才能发挥作用^[2].

3 消化性肿瘤中线粒体DNA的畸变

3.1 结直肠癌 Polyak et al^[3]在对10个结肠癌细胞系的mtDNA突变研究中,发现有7个系存在突变(12 SrRNA, 16SrRNA, ND1, ND4L, ND5, cty-b, cyt-c氧化酶亚单位),在12种体细胞突变形式当中,有11种是单个碱基的替换,一个是插入突变.序列分析发现mtDNA的突变比核的突变至少多10倍.线粒体HV1和HV2区存在体细胞突变,Alonso et al^[4]用单链构象多态结合异源双链分析方法分析了13例结肠癌组织的HV区,结果有2发生了HV1区A T/G C的置换,1例HV2区C G的缺失.另外,Savre-Train et al^[5]在结肠腺癌细胞系Caco-2中检测到2 583 bp大片的缺失,缺失率为1%.在Habano et al^[6]的另一项研究中,发现有7/45(16%)存在突变,包括3例编码区ND1和ND5移码突变,2例错义突变,1例15 bp的缺失,没有发现大片的缺失.Lu et al^[7]应用差异杂交法对结肠癌细胞系HT-29的mtDNA表达作了研究,结果显示癌细胞mtDNA转录水平(mtRNA)要比正常细胞高,而且ND4、ND4L的mRNA转录水平可能与细胞的分化有关,对结肠癌预后判定作用.在另一项实验中Chester et al^[8]用原位杂交的方法对15例结肠癌患者mRNA水平和其在组织中的分布情况进行了检测和分析,发现ND2的mRNA水平也比正常组织多,作者认为增多的原因可能与组织的呼吸作用增加有关.Yamamoto et al^[9]

用斑点杂交法在家族性结肠息肉病(familial polyposis coli, FPC)细胞中也检测到 ND1 和 16 S rRNA 的转录水平的增高. 线粒体基因组不稳定性(mitochondrial genomic instability, mtGI)是 Habano et al^[10]在结肠癌中发现的. 作者用 PCR-SSCP 检测 45 对结肠癌和正常组织 mtDNA 突变时发现 20/45(44%)D-loop 区存在(CA)_n 不稳定和多聚 C(PolyC)不稳定, 分析后者可能是由于 C 的插入或缺失引起的. mtGI 与突变一样有异质性和同质性之分, 因为研究中发现有的结肠癌全是由突变的 mtDNA 所组成(同质性), 而没有正常的 mtDNA, 这很可能跟细胞的转化有关. 可见结肠癌 mtDNA 点突变的发生比较普遍, 没有大片段的缺失. mtGI 同质性和异质性都可能出现, 但似乎 mtGI 与 MSI(microsatellite instability, MSI) 关系不大.

3.2 胃癌 Alonso et al^[4] 发现 3 例(3/8)胃癌患者癌细胞 mtDNA 的 D-loop 区存在突变, 其中 2 例是 C/G/T/A 的置换, 另 1 例是 A/T/G/C 的置换和 CC/GG 的插入. Tamura et al^[11]采用 PCR-SSCP 和 DNA 测序(DNA direct sequencing)方法对 45 例日本人胃癌、胃腺瘤的 mtDNA 突变进行了检测, 发现仅 2 例(4.4%)发生突变, 未发现大片段的缺失. Maximo et al^[12]在对 32 例原发胃癌的研究中发现 17 例(53%)mtDNA 存在 4 977 bp 大片段的缺失, 其另一项研究还发现 MSI 和 mtDNA 突变之间没有关系, 而且几乎所有的 mtDNA 大片短缺失发生于 MSI 阴性肿瘤中^[13]. Burgart et al^[14]对 32 例胃腺瘤 mtDNA 也进行了突变检测, 发现 4/32(12.5%)D-loop 区存在 50 bp 的缺失, 并且都是在胃贲门附近癌组织中检测到的, 胃远端未检测到. Habano et al^[15]对 62 例胃癌的 mtGI 和核 MSI 进行检测, 发现有 10 例(16%)存在多聚 C(PolyC)的不稳定, 5 例当中出现 mtDNA 突变(其中 4 例存在 mtGI), 7 例存在 MSI-H(其中有 4 例同时存在 mtGI, 具有统计学意义), 5 例点突变(都是发生于 PolyC 不稳定的患者当中). 而且发现, 肠型胃癌从早期到进展期, 其 mtGI、MSI 以及 p53 改变出现的频率非常高; 弥漫型胃癌只在进展期(浆膜或浆膜下侵袭)检测出 MSI. 7 例 MSI 中的 6 例和所有 mtDNA 编码区突变的胃癌都含有大量的肠型肿瘤细胞. Habano 认为 mtDNA 突变对肠型胃癌的发病可能起作用. Schwartz et al^[16]在研究胃癌 MSI、mtGI 和 mtDNA 突变之间的关系时并未发现 MSI 和 mtGI 之间存在联系. Hibi et al^[17]的研究认为血清中 mtDNA 的改变可以用作肿瘤标志物来监测肿瘤 DNA 的变异情况. 根据目前的多数研究结果, 胃癌可能更倾向于发生 mtDNA 大片段的缺失, 这与结肠癌多倾向于点突变的发生有所不同. 与结肠癌另外一点不同是胃癌发生的 mtGI 和核 MSI 二者之间关系比较密切, 但是意义还不清楚.

3.3 肝癌 Luciakova et al^[18]对鼠静止肝癌细胞与非恶性细胞做了 mtDNA 和核 DNA(nDNA)转录水平(mRNA)的对比研究, 发现前者 ND2、cyt-c 氧化酶亚单位、

转录水平增高, 而线粒体的数量却减少, 分析其减少的原因可能与线粒体蛋白质分解代谢增强有关. 另外从莫里斯鼠肝细胞系中建立的 cDNA 文库中, 检测到 mtDNA 所编码的 DN5、cyt-c 氧化酶和 16SrRNA 转录水平增高, 而在正常肝细胞中没有检测到. Yamamoto et al^[19]的一项实验结果显示, 在肝癌周围硬化的组织中存在 mtDNA 的缺失, 而在癌组织中却没有检测到. Nishikawa et al^[20]发现肝癌 mtDNA 突变的发生率较其他类型癌要高, 而且无论是肝癌组织还是癌旁组织都存在 mtDNA 突变, 原因可能是由于肝炎病毒导致肝组织反复破坏和重建, 致使 mtDNA 突变大量积累. 而且突变的程度不同, 程度越高恶性度越高. 但在 Kotake et al^[21]的研究中却发现肝硬化、肝癌组织的 mtDNA 点突变和缺失的发生率明显低于正常肝组织. Okochi et al^[22]对肝细胞肝癌患者的 D-loop 区的遗传改变进行了检测, 发现 17/50(34%)患者存在线粒体 D-loop 区体细胞突变, 并且其中 5/15(33%)配对的血清样品检测也出现与原发癌相同的突变结果. 预示着 mtDNA 突变可能成为肝癌诊断的一个新的肿瘤标志物, 同时也可能是在血清中进行肿瘤 DNA 检测的有效方法^[22].

4 讨论

4.1 mtDNA 的易损伤性和不易修复性 mtDNA 缺乏有效的基因修复系统, 而且由于线粒体自身的特点使之极易受损. 原因可能有以下几点: (1)mtDNA 几乎不受 DNA 结合蛋白质(组蛋白)的保护, 即是裸露的, 所以致癌物容易与之结合. (2)线粒体内脂肪/DNA 的比值很高, 使具有嗜脂性的致癌物优先在占细胞总 DNA 量很少的 mtDNA 上聚集. (3)mtDNA 在整个细胞周期中处于不停的合成状态, 易受外界因素的干扰, 稳定性差. (4)线粒体内氧浓度很高, 易产生氧自由基(oxygen-derived free radicals)及过氧化氢(hydrogen peroxide)等活性氧簇, 他本身又不能合成谷胱甘肽(glutathione)将其有效去除, 因此 mtDNA 易受活性氧损伤, 造成核酸片段的丢失, 碱基修饰以及插入突变等, 尤以核酸片段的丢失最为常见. (5)mtDNA 在复制时由于 mtDNA 多聚酶的校对性差, 以及 tRNA 基因部位易形成发夹样结构导致其复制错配频率明显高于核 DNA^[23].

4.2 mtDNA 诱发细胞癌变的机制

4.2.1 mtDNA 突变和表达异常 由于 mtDNA 缺乏内含子, 突变大都发生于编码区. 包括单个碱基的置换、插入、缺失以及大片段的缺失. mtDNA 在各种与之结合高效的内源性损伤因子和外源性致癌物的作用下, 通过上述损伤机制使 mtDNA 发生突变, 突变的累积增加了肿瘤的发生危险性. 已知活性氧簇(ROS)与 ATP 的生成和肿瘤的启动、进展有关^[24]. 正常细胞线粒体可摄取机体 90% 以上的氧, 1-2% 用于转化为 ROS 超氧化物和过氧化物等; mtDNA 的突变可以增加 ROS 的产生, 而 ROS 的增多又加重了突变效应, 从而加剧了 ROS 超

氧化物和过氧化物的氧化损伤作用,影响线粒体基因组的生物发生并激活核基因组^[25]. 肿瘤细胞mtDNA的转录水平(mRNA)常常增高,而过氧化氢等 ROS 可以影响 mtDNA 的表达^[26]; Wang et al^[27]认为 mtDNA 的转录水平增高,可以造成细胞凋亡降低,可能与其致癌有关;而表达降低可能与衰老更有关. 胃肠黏膜癌变及肝癌的发生过程中不仅存在细胞的增生增强,同时存在细胞凋亡的减少,而且细胞凋亡异常与胃肠癌和肝癌的生长、浸润转移和预后均有一定的关系^[28]. 有作者用三氧化砷^[29]和大黄酸^[30]分别研究了食管癌和胃癌细胞凋亡的发生情况,发现线粒体发生了形态和功能上的改变,并且与细胞的增生有一定的联系,更证实了 mtDNA 与凋亡及肿瘤发生之间的密切关系. 另外在许多肿瘤中还发现编码呼吸链复合体的 mtDNA 表达增加,这也可能是对肿瘤细胞能量需求增多的一种适应反应. 至于 mtDNA 的水平,增加和降低的报道都有,还没有统一的认识. 比较清楚的是 mtDNA 含量与由核基因组编码的线粒体转录因子 A(TFAM)和线粒体单链结合蛋白有直接的关系. 各种消化性肿瘤 mtDNA 的缺失及表达情况见表 1.

表 1 各种消化性肿瘤 mtDNA 的缺失及表达情况

肿瘤类型	缺失片段		mRNA 表达增高的复合体
	长度(bp)	缺失率(%)	
结肠癌	2 583	15.6	复合体 (ND4,ND4L), (cyt-c 氧化酶), (ATP 酶 6.8)
胃癌	4 977	30	-
	50	0.3	-
肝癌	-	-	复合体 (ND2,ND5) (cyt-c 氧化酶 和)

“-”表示未发现缺失和 mtDNA 表达改变.

4.2.2 线粒体基因组不稳定 微卫星不稳定(MSI)是核基因组的不稳定性(NGI)中最常见且仅在肿瘤组织中发生的事件.线粒体基因组也可以出现不稳定(mitochondrial genome instability, mtGI). 活性氧簇(ROS)的破坏、滑链错配(slipped-strand mispairing)和不平衡交换(unequal crossing-over)可能是 mtGI 产生的主要原因^[31]. mtGI 以 D-loop 区的(CA)_n 和 PolyC 为最常见. PolyC 有两种形式:一种是稳定型,在个体中他的长度是相同的(通常为 10 bp);另一种是不稳定型,个体中可含有镶嵌型的多聚 C(8-14 bp), 16 189 位点 T-C 的置换可能是造成不稳定的主要原因. 在同一母系中 PolyC 稳定型和不稳定型之间的比例相似,而在不相关的个体间差别却很大. 由于 mtDNA 是单倍体,所以可能出现有差异的 mtDNA 共存于同一个体中(异质体, heteroplasmy). 解释肿瘤细胞 mtGI 同质体和异质体产生的原因可能有以下四种情况: (1)线粒体遗传过程中同样也存在 mtDNA 的重组^[32]; (2)突变型 mtDNA 具有选择性优势,在细胞连续分裂过程中逐渐取代了野生型 mtDNA,导致细胞向恶性转化; (3)由于 mtDNA

的突变导致线粒体功能缺陷,只有过度复制使之从数量上增加才能补偿线粒体的功能缺陷; (4)瓶颈假说^[31]: 可以解释正常野生型 mtDNA 细胞为何会出现肿瘤细胞中同质的突变型 mtDNA. “正常细胞”中也存在突变型线粒体,只不过野生型占绝对优势,突变型检测不出来而已. 野生型和微量的突变型 mtDNA 在多次分裂后分别得到 5-10 个 mtDNA 单倍体拷贝数,在细胞分裂时由于野生型和突变型 mtDNA 在细胞中易形成各自的集合域,所以两个子细胞分别分享了野生型和突变型 mtDNA 的情况是完全可能的,最终形成了同质性 mtDNA 的两个子细胞,一个是同质野生型,一个是同质突变型,后者在不断扩增的情况下,将使细胞性质发生转化.

4.2.3 mtDNA 与核内 DNA 间的整合作用 在生物的不断进化过程中,适当的线粒体基因组成分对核基因组的插入整合作用对生物进化有意义,但不良的插入可能是某些遗传病、畸形甚至肿瘤易感性的主要病因之一^[33]. 在内源性和(或)外源性损伤因子的直接或间接作用下会造成线粒体的肿胀裂解, mtDNA 损伤片段产生过多,同时由于胞质中 DNA 酶活性较正常细胞明显下降,甚至丧失,导致 mtDNA 的降解失调,使游离于线粒体外的 mtDNA 片段得以大量产生. 获得游离的 mtDNA 在一定的条件下就可能具有类似致癌病毒的作用,穿过核孔,随机整合到核基因组中. 假如这种整合抑制了肿瘤抑制基因或激活了癌基因的活性,就可能导致细胞的恶性转化^[35]. 胡义德 et al^[34]用基因转入技术将 mtDNA 片断转染至小鼠胚胎成纤维细胞(NTH3T3)中,发现转染后的细胞具有在裸鼠体内的成瘤能力. 并从荧光原位杂交和病理染色两方面实验得到证实.

Shay et al^[35]在对 HeLaTG 细胞的研究中发现一段 mtDNA 的整合源于 mtDNA 上几段不相连的基因(12 SrRNA, COX 及 ND4L/ND4)中一部分相连而成. 整合位点在 myc 基因附近. Hadler et al^[36]的动物实验结果显示,鼠肿瘤组织的核基因组中存在大量的类 mtDNA 样的整合. 另外 Michikawa et al^[37]将来自于人细胞系的核 DNA(不含线粒体基因组成分)作模板,一段特定线粒体序列作引物,用 PCR 方法扩增出插入到核基因组并与线粒体 D-loop、tRNA^{leu}、和 tRNA^{phe} 同源的一段假基因(pseudogene),这种插入是生物进化的结果,插入到核基因组的假基因与同源线粒体基因组序列不能结合.

总之目前认为,肿瘤是一种在多因素作用下多基因受损累积致使正常细胞周期异常的一种细胞周期疾病,而其中线粒体可能起着非常重要的作用. 线粒体损伤突变时 ROS 的产生会增多,异常增多的 ROS 具有使 mtDNA 和核 DNA 致突变作用,并参与癌的启动和演进. 实验证明 mtDNA 转录水平增高与消化性肿瘤有的一定的关系,而且血清中 mtRNA 的改变可以间接反映出肿瘤 DNA 的变异情况,可以作为肿瘤诊断的标志物. 消化性肿瘤 mtDNA 的突变和不稳定性不很一致,整体分析他们之间的关系不太成熟,胃癌细胞线粒体基因组

倾向于较大片段的缺失, 且其 mtGI 与 NGI 之间存在一定的联系, 但证据还不足; 结肠癌细胞线粒体基因组更倾向于点突变, 少有大片段的缺失; 对于肝癌比较有意义的是他们片段的缺失. 对于线粒体基因组整合与肿瘤的关系的研究还不多, 但一些实验结果被证明是假基因, 所以实验和分析时应排除假基因的影响.

消化性肿瘤包括胃肠癌、肝癌等的生物学特征不仅取决于核内遗传物质, 而且与核外的 mtDNA 也有一定的关系. 由于肿瘤与线粒体的研究, 特别是 mtDNA 与核整合对肿瘤发生作用的研究才刚起步, 所以许多问题还不清楚. 本文对 mtDNA 与消化性肿瘤的关系作了阐述, 研究的资料和数据表明 mtDNA 参与癌的发生是毫无疑问的. 但 mtDNA 的突变、表达异常、不稳定性以及 mtDNA 与核基因组的整合在消化性肿瘤的发生究竟充当什么样的角色? 如何发挥其致癌作用? 这些问题都有待于进一步研究.

5 参考文献

- Heddi A, Stepien G, Benke PJ, Wallace DC. Coordinate induction of energy gene expression in tissues of mitochondrial disease patients. *J Biol Chem* 1999;274:22968-22976
- Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1999;1410:103-123
- Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nature Genet* 1998;20:291-293
- Alonso A, Martin P, Albarran C, Aquilera B, Garcia O, Guzman A, Oliva H, Sancho M. Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region of colorectal and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis. *Electrophoresis* 1997;18:682-685
- Savre-Train L, Piatyszek MA, Shay JW. Transcription of deleted mitochondrial DNA in human colon adenocarcinoma cells. *Human Mol Genet* 1992;1:203-204
- Habano W, Sugai T, Yoshida T, Nakamura S. Mitochondrial gene mutation, but not large-scale deletion, is a feature of colorectal carcinomas with mitochondrial microsatellite instability. *Int J Cancer* 1999;83:625-629
- Lu X, Walker T, MacManus JP, Seligy VL. Differentiation of HT-29 human colonic adenocarcinoma cells correlates with increased expression of mitochondrial RNA. *Cancer Res* 1992;52:3718-3725
- Chester KA, Robson L, Beget RH, Pringle H, Primrose L, Talbot IC, Macpherson AJ, Owen SL, Boxer G, Malcolm AD. In situ and slot hybridization analysis of RNA in colorectal tumours and normal colon shows distinct distributions of mitochondrial sequences. *J Pathol* 1990;162:309-315
- Yamamoto A, Horai S, Yuasa Y. Increased level of mitochondrial gene expression in polyps of familial polyposis coli patients. *Cancer* 1989;159:1100-1106
- Habano W, Nakamura S, Sugai T. Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome. *Oncogene* 1998;17:1931-1937
- Tamura G, Nishizuka S, Maesawa C, Suzuki Y, Iwaya T, Sakata K, Endoh Y, Motoyama T. Mutations in mitochondrial control region DNA in gastric tumors of Japanese patients. *Eur J Cancer* 1999;35:316-319
- Maximo V, Soares P, Seruca R, Sobrinho-Simoes M. Comments on: Mutations in mitochondrial control region DNA in gastric tumours of Japanese patients. Tamura, et al. *Eur J Cancer* 1999; 35:316-319
- Maximo V, Soares P, Seruca R, Rocha AS, Castro P, Sobrinho-Simoes M. Microsatellite instability, mitochondrial DNA large deletions, and mitochondrial DNA mutations in gastric carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32:136-143
- Burgart LJ, Zheng J, Shu H, Strickler JG, Shibata D. Somatic Mitochondrial mutations in gastric cancer of the mitochondrial genome in human colorectal tumors. *Am J Pathol* 1995;147:1105-1111
- Habano W, Sugai T, Nakamura SI, Uesugi N, Yoshida T, Sasou S. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 2000;118: 835-841
- Schwartz S Jr, Perucho M. Somatic mutations in mitochondrial DNA do not associate with nuclear microsatellite instability in gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 2000;119: 1806-1808
- Hibi K, Nakayama H, Yamazaki T, Takase T, Taguchi M, Kasai Y, Ito K, Akiyama S, Nakao A. Detection of mitochondrial DNA alterations in primary tumors and corresponding serum of colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2001; 94: 429-431
- Luciakova K, Kuzela S. Increased steady state levels of several mitochondrial and nuclear gene transcripts in rat hepatoma with a low content of mitochondria. *Eur J Biochem* 1992;205:1187-1193
- Yamamoto H, Tanaka M, Katayama M, Obayashi T, Nimura Y, Ozawa T. Significant existence of deleted mitochondrial DNA in cirrhotic liver surrounding hepatic tumor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;182:913-920
- Nishikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S, Tamori A, Koh N, Takeda T, Kubo S, Hirohashi K, Kinoshita H, Sato E, Inoue M. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2001;61:1843-1845
- Kotake K, Nonami T, Kurokawa T, Nakao A, Murakami T, Shimomura Y. Human livers with cirrhosis and hepatocellular carcinoma have less mitochondrial DNA deletion than normal human livers. *Life Sci* 1999;64:1785-1791
- Okochi O, Hibi K, Uemura T, Inoue S, Takeda S, Kaneko T, Nakao A. Detection of mitochondrial DNA alterations in the serum of hepatocellular carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2002;8:2875-2878
- Pinz KG, Shibutani S, Bogenhagen DF. Action of mitochondrial DNA polymerase gamma at sites of base loss or oxidative damage. *J Biol Chem* 1995;270:9202-9206
- Toyokuni S, Sagripanti JL. Iron chelators modulate the production of DNA strand breaks and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Free Radic Res* 1999; 31:123-128
- Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 1999; 283:1482-1488
- Li JM, Cai Q, Zhou H, Xiao GX. Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial gene expression of intestinal epithelial cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:1117-1122
- Wang J, Silva JP, Gustafsson CM, Rustin P, Larsson NG. Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:4038-4043
- Zhou HP, Wang X, Zhang NZ. Early apoptosis in intestinal and diffuse gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2000;6:898-901
- 邹世洁, 崔巍, 张宇鹏, 樊雅莉, 李玉梅, 王肃. 大黄酸对胃黏膜上皮细胞生长、增生和凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:447-448
- Shen ZY, Shen J, Li QS. Morphological and functional changes of mitochondria in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenic trioxide. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 31-35
- Awadalla P, Eyre-Walker A, Smith JM, Chen CY, Chen JY, Yi Z. Linkage disequilibrium and recombination in hominid mitochondrial DNA. *Science* 1999; 286:2524-2525
- Bianchi NO, Bianchi MS, Richard SM. Mitochondrial genome instability in human cancers. *Mutat Res* 2001;488:9-23
- Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 2000;408:708-713
- 胡义德, 钱桂生, 毛宝龄, 肖桃元, 李懿, 曹世龙. 线粒体 DNA 片断诱导小鼠胚胎成纤维细胞恶性转化. *中华病理学杂志* 2000;29:39-43
- Shay JW, Werbin H. New evidence for the insertion of mitochondrial DNA into the human genome: significance for cancer and aging. *Mutat Res* 1992;275:227-235
- Hadler HI, Devadas K, Mahalingam R. Selected nuclear Line elements with mitochondrial -DNA-like inserts are more plentiful and mobile in tumor than in normal tissue of mouse and rat. *J Cell Biochem* 1998;68:100-109
- Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 1999;286:774-779

热休克蛋白在胃溃疡中的表达及意义

向廷秀,王丕龙

向廷秀,王丕龙,重庆医科大学附属第一医院消化科 重庆市 400016
项目负责人:王丕龙,400016,重庆市医学院路1号,重庆医科大学附属第一医院
消化科. xiang68733201@yahoo.com.cn
电话:023-68733201
收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-18

摘要

随着对热休克蛋白研究的深入,热休克蛋白对胃黏膜的保护作用引越来越起人们的重视,各种热休克蛋白在胃溃疡不同时期的表达,在保护胃黏膜抵御应激损伤中起着重要作用,特别是热休克蛋白与幽门螺杆菌之间存在着天然联系,参与胃溃疡的发生、发展。因此,构建热休克蛋白疫苗和采用非毒性HSPs诱导剂对溃疡的预防及促进溃疡愈合具有重要的治疗价值。

向廷秀,王丕龙. 热休克蛋白在胃溃疡中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2003;11(5):628-631

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/628.htm>

0 引言

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)又称应激蛋白(stress protein, SP)是生物细胞在某些环境因素或多种应激条件下,特别是热刺激下均可诱导新合成或合成增加的一类高度保守的应激蛋白质。HSPs与多种蛋白质在细胞中形成复合体并通过其形成或解离而参与有关蛋白质的折叠、组装、细胞内运输及降解等过程,以调节靶蛋白的活性和功能。因此,HSPs又被称为“分子伴侣”(molecular chaperone)。HSPs在细胞周期调节、DNA损伤修复、基因产物代谢等过程中起重要作用。近年来研究发现HSPs可保护胃黏膜免受非甾体类抗炎药引起的损害,在胃溃疡的愈合和维持黏膜完整、细胞重建中有重要的作用。消化性溃疡是消化系统常见病,尽管治疗上已取得突破性进展,但治疗时间长,应激刺激下易复发,如能找出非毒性HSPs诱导剂,不仅可减少应激性溃疡的发生,而且可以缩短治疗时间,提高疗效。本文就HSPs在胃溃疡愈合过程中的表达和意义作一综述。

1 热休克蛋白的产生及分类

热休克现象是1962年由遗传学家Ritossa在观察受热应激的果蝇唾液腺细胞多丝染色体形态变化时发现,1974年Tissiers et al发现热休克蛋白广泛存在于人、动物、微生物和植物细胞内,主要在细胞内发挥功能,属非分泌型蛋白质,在细胞内含量相当高,占细胞内总蛋白的5%,热休克蛋白家族由多种蛋白组成,分

类方法很多,目前主要根据分子量大小将热休克蛋白分为4个家族,即:热休克蛋白90家族(83-90 KD)、热休克蛋白70家族(66-78 KD)、热休克蛋白60家族和小热休克蛋白家族(15-39 KD)。不同的HSPs家族不但分子量大小不同,而且其生物学功能亦有差异,其中HSP70、HSP60、HSP47、HSP32与胃溃疡关系密切。HSP70家族最丰富最重要,在高温及各种因素刺激下,HSP70合成明显增加,参与蛋白的折叠、组装、转运与蛋白复合物的降解DNA的复制与修复等过程,且广泛参与机体热耐受、炎症及自身免疫等生理、病理过程,与某些蛋白一起参与细胞增生及凋亡过程,在维持细胞稳定方面具有重要作用。

2 热休克蛋白与幽门螺杆菌

幽门螺旋杆菌(Hp)是嗜人胃黏膜的致病菌,研究表明Hp与HSPs之间存在着天然的联系,将Hp菌株置于42℃环境下,采用放射自显影法可观察到细菌表面有HSP60表达。Hp合成的热休克蛋白主要有HSP60s、HSP10和HSP70。HSP60(又称HspB)在细菌的致病机制中起着重要的作用,他可介导免疫调节,触发胃上皮细胞的自身免疫反应,在胃黏膜病变的发生、发展中充当启动因子;介导病原与宿主的识别与黏附。有研究认为HspB、HspA是Hp的又一类重要的定植因子,在极端不利的理化条件中,能维持菌体活性蛋白的稳定性,显著增强尿素酶的活性。Huesca et al提出HSPs与胃黏膜黏附的双受体模型:即胃内低pH环境上调热休克蛋白70的表达,表达的热休克蛋白70呈现到细菌表面介导Hp与黏液层的硫苷酯结合,Hp穿过黏膜层后与胃上皮的结合^[1,2]。人类HSP60与Hp的HSPB具有较高同源性,且与抗Hp多克隆抗体存在交叉反应^[3]。Hp感染的胃黏膜疾病中,以色谱扫描测定HSP70表达水平显示由低到高依次为胃腺癌、慢性胃炎和胃溃疡^[4]。Hp(+)的胃炎、DU患者胃黏膜中HSP72的表达明显高于Hp(-)的胃炎、DU患者。其机制可能为胃黏膜细胞受到Hp感染刺激时所产生的的一种自身保护机制, Hp感染引起的外源性刺激因素(Hp脂多糖,尿素酶,空泡毒素等)和内源性刺激因素,使细胞内蛋白质构型发生改变,产生变性蛋白,激发细胞的应激反应,激活热休克基因编码HSP72,诱导合成的HSP72能促进细胞内蛋白质的合成、折叠、装配、转位,促使细胞从应激中恢复,减少黏膜细胞的损伤,保护胃黏膜^[5,6]。但Konturek et al^[7]采用给大鼠阿司匹林2g/d,14d后,用

定量 RT-PCR、Western blot 和免疫组化方法检测 Hp 感染大鼠、Hp 根除 3 mo 后的大鼠 HSP70 的表达, 结果发现 Hp 感染鼠的胃黏膜 Hsp70 的表达下降, 根除鼠有较高的表达, 基础 HSP70 和阿司匹林诱导的 HSP70 的表达的减少, 干扰了胃黏膜对 Hp 的适应性, 削弱了 Hp 感染者对阿司匹林的适应性. 因此在胃溃疡的形成中起着重要作用.

3 热休克蛋白在胃溃疡中的表达及意义

在正常大鼠胃组织中, 均可检测到 HSP70、HSP60、HSP47、HSP32 的少量表达, 以黏膜上皮表达较为明显, HSP70 存在胞质及细胞膜周围, 而 HSP60 主要存在胞质, HSP47 主要分布于成纤维细胞和血管内皮细胞, 正常胃黏膜胃腺基底的主细胞有微量 HSP32 表达. 在应激条件下, 胃腺体有多种、大量 HSPs 表达, 并且核中可见表达. Tsukimi et al^[8]发现高水平的 HSC70 (73 KD) 在正常黏膜和乙酸诱导的大鼠胃溃疡组织表达, 在溃疡和溃疡愈合时水平无改变. 而 HSP70、HSP47 是在溃疡期基底部表达尤为明显, 随溃疡的愈合而减少, HSP70 在溃疡的边缘的表达随溃疡愈合渐增加, 奥美拉唑通过促进 HSP70 在溃疡的边缘和基底的表达、诱导 HSP47 在溃疡基底的表达、强烈抑制胃酸分泌而加速溃疡的愈合, 而消炎痛轻微抑制胃酸分泌、明显诱导 HSP47 在胃溃疡基底部的超表达, 延长胃溃疡的愈合. 因此, HSC70 的表达与胃溃疡愈合无关, HSP70 表达的增加可加速胃溃疡的愈合, 而 HSP47 的超表达可延缓胃溃疡的愈合. Guo et al^[9]发现乙酸诱导的胃溃疡基底肉芽组织中的主要组成细胞(成纤维细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞)HSP47 大量表达; HSP32 在溃疡模型诱导 2 h 后丢失, 在 6 h 后又重现, 以后超过正常值, 3-5 d 达高峰, 在溃疡愈合期一直保持高水平, 此期间伴随胃溃疡面积缩小和上皮化; 在溃疡基底 HSP70 从 2 h-5 d 减少, 以后恢复正常, 从而提示 HSP47 作为一种胶原特异的分子伴侣, 积极参与了胃溃疡愈合过程中溃疡组织的修复和重建, HSP32 的抗炎作用可能涉及溃疡愈合时内皮细胞的活化增生、血管生成和肉芽组织的形成. Kawai et al^[10]发现, 大鼠束缚水浸应激时, 30 min 内 HSP70 和 HSP70 mRNA 在胃黏膜被诱导合成, 诱导的程度与黏膜损伤程度呈负相关, 表明 HSP70 在保护胃黏膜抵御应激损伤中起重要作用, 李定国 et al^[11]采用免疫组化方法检测大鼠束缚水浸应激后 HSP 的表达, 发现腺体存在 HSP70 和 HSP60 大量表达, 并且可见核中表达. 如果采用 JPYQR 和丽珠得乐预处理, 随后束缚水浸应激, 结果预处理组溃疡指数明显小于模型组, HSP70 水平明显高于模型组. 其机制可能为预处理表达的 HSP 与应激状态下产生的变性蛋白结合, 发挥分子伴侣作用, 从而减少了胃黏膜的损伤.

4 热休克蛋白与溃疡发生的关系

热休克蛋白可提高胃黏膜细胞对应激原的耐受力, 如

果热休克蛋白缺乏可降低胃黏膜对攻击因子的防御功能, 易形成溃疡. 用离体的原代培养的豚鼠胃黏膜细胞, 给予 43℃ 热应激 1 h, 细胞内 HSP70 合成明显增加, HSP70 编码基因转录显著加速, 而且细胞对随后给予的无水乙醇的抵抗耐受力明显加强; 预先给予大鼠高温处理及中药 JPYQ 或 GGA 处理均可显著提高 HSPs 的表达, 并防止大鼠束缚水浸时发生严重胃溃疡, 这种保护作用可被蛋白质合成抑制剂 CHM 抑制 HSPs 的表达所阻断^[12, 13]. Amici et al^[14]研究发现阿司匹林可通过诱导和延长 HSF(heat shock transcription factor) 结合到 Hsp70 基因的热休克元件上; 抑制环氧化酶, 使细胞膜上花生四烯酸代谢障碍, 从而降低 HSF 被激活的温度阈值; 增强细胞内 HSP70 的转录水平, 使 HSP70 表达明显增高, 从而使胃黏膜对阿司匹林的适应能力增强. 1999 年 Jin et al^[15]也证实: 胃黏膜对阿司匹林(aspirin)诱导的胃黏膜损害的抵抗力增强与胃黏膜中 HSP72 表达增加密切相关. 前列腺素是生物体内主要的炎症递质, 近年发现前列腺素及相关物, 如花生四烯酸, 环氧化酶抑制剂, 水杨酸钠, 阿司匹林, 消炎痛等都参与机体热休克蛋白的表达的调控. Nagayama et al^[16]研究发现如果用低浓度(30 ml⁻¹)的乙醇预处理细胞, 也可诱导 HSP 的表达, 使细胞增加抵御应激引起的损伤, 减少应激性溃疡的发生.

5 热休克蛋白促进溃疡愈合机制的探讨

近年来大多数实验已证实热休克蛋白作为一种细胞内源性保护蛋白, 在防止应激引起的细胞损害或使受损的细胞恢复起重要作用, 但其保护作用机制尚不清楚. 可能有以下几个方面的原因:

5.1 分子伴侣作用 HSP70 是研究最多, 也是最重要的内源性保护细胞和组织在病理条件下免受损伤的因子之一, HSP70 家族能作为“分子伴侣”与应激状态下变性的蛋白分子结合, 可修复被损伤的前核糖体、防止溶酶体破坏、稳定细胞膜, 从而减轻某些蛋白质的变性和聚合, 维持细胞正常的形态和功能, 对抗有害因素. HSP32 在溃疡愈合中持续升高, 参与内皮细胞的活化、增生和血管生成的调节、抗炎、促血管生成和肉芽组织的形成.

5.2 抗凋亡 细胞内的 HSP70 的增加可抑制蛋白激酶 p38 (HOG1) 和 JNK(junN-terminal kinase) 的活性、抑制凋亡激活基因 p53 和 Bax 的表达、抑制氧自由基的生成、抑制凋亡信号转导中蛋白水解酶(caspases)的活性^[17]等多种途径抑制细胞的凋亡, 还能防止线粒体损伤、核碎裂等, 使细胞的生长抑制效应和死亡效应减弱. 有学者将 HSPs 视为抗凋亡蛋白.

5.3 抵抗损伤 HSPs 除能增加细胞的热耐受抵抗损伤外, 还与其他因素损伤细胞时的保护有关, 一氧化氮(NO)对胃黏膜血液供应的调节, 可通过凋亡机制清除中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、单核细胞, 加速急性炎症的

吸收. 但 NO 过量产生, 会导致过氧化自由基的形成, 对宿主细胞具有毒性作用, 是细胞受损的重要因素, 在溃疡中表现为组织和炎症细胞的坏死、溃疡面积的增大. 正常胃组织无 iNOS 的 mRNA 和蛋白质的表达, 溃疡诱导 6 h 后, 溃疡基底 iNOS mRNA 和蛋白质的表达快速增加, 1-3 d 高峰期, 在溃疡愈合期间快速下降. 其原因可能为 HSP70 能抑制 iNOS 基因转录和 iNOS 的合成, 降低 iNOS 活性, 减少 NO 合成, 从而减轻 NO 等炎症因子对机体的损害作用^[18]. 溃疡诱导初期 NO 和 NO 供体可在 RNA 和蛋白质水平诱导 HSP32 的表达, 还能稳定 HSP32 mRNA, 使其发挥抗氧自由基和促炎症吸收的作用, HSP32 对 NOS 又具有负反馈调节作用^[19], 有助于限制过于强烈的 iNOS 的活性和 NO 的产生, 减少组织损伤和启动溃疡愈合过程. 因此, HSPs 与 NOS 的相互调节有利于胃黏膜抵抗损伤.

5.4 加速修复 HSPs 可识别和清除异常的蛋白质, 加速损害严重、不能修复的蛋白质的降解. 创伤的愈合中修复细胞即以成纤维细胞为主, 有赖于细胞的增生及迁移. 在溃疡的愈合过程中, HSP47 作为胶原特异的分子伴侣, 涉及溃疡愈合中肉芽组织和细胞外基质的形成, 细胞外基质在正常的损伤修复和愈合中有重要作用, 促进细胞-细胞间相互作用的调节, 利于细胞移居的几何框架的构建, 但 HSP47 的过度表达可能破坏正常结构和功能导致纤维化. 近来有学者用可诱导 HSP70 的药物作用于糖尿病大鼠的背部创面, 结果发现创面愈合加速^[20], 说明 HSP70 能促进创伤愈合.

6 热休克蛋白在胃溃疡治疗中的应用前景

6.1 促进胃溃疡的愈合 基于热休克蛋白能保护细胞、组织、器官及其与胃溃疡愈合的密切关系, 如果能发现临床上安全又能诱导热休克蛋白表达的药, 可望为促进胃溃疡的愈合寻找新的途径, Ooie et al^[21]使用一种抗溃疡药二香叶基丙酮 GGA(200 mg·kg⁻¹)口服可诱导 HSP72 在心脏的表达, 预防心肌受损. Hirakawa et al^[13]预先给予二香叶基丙酮(GGA)可诱导 HSP 更高水平的表达并防止胃黏膜发生严重损伤. 近年来有研究者发现生胃酮也能诱导热休克蛋白和 mRNA 的表达而起促进溃疡愈合的作用^[16]. 如果联用硫糖铝或奥美拉唑可明显加速胃溃疡的自然愈合过程. 健脾益气中药也可通过 HSPs 机制促进溃疡愈合^[11].

6.2 减少非甾体类抗炎药的副作用 目前临床治疗时使用非甾体类抗炎药往往会出现胃黏膜损伤, 表现为出血、局灶性坏死、甚至发生溃疡和穿孔, 如果同时使用诱导热休克蛋白表达的药, 可望避免消化道副反应发生. Tomisato et al^[22]用乙醇、过氧化氢或盐酸短期处理胃黏膜细胞, 发现细胞膜失去完整性, 致死亡, 而 GGA 可通过诱导热休克蛋白的表达而保护豚鼠胃黏膜免受应激的损伤. 如果必须使用 NSAID, 辅以 GGA 等 HSPs 诱导剂, 有望减少副作用.

6.3 保护胃黏膜 Kawai et al^[10]认为长期给予 GGA 可刺激低蛋白质营养失调的大鼠的胃黏膜的热休克反应, 这种作用对由于基础疾病影响而很难改善营养状况的慢性消耗性疾病有很好的胃黏膜保护作用.

6.4 构建 Hp 疫苗 Hp 纯化的尿素酶(urease, ure)和热休克蛋白及其亚单位成分可作为抗原刺激机体产生保护性的免疫防御和治疗作用. 李明峰 et al^[23]将 HspA 和 UreB 两个目的基因插入同一表达载体, 已在大肠杆菌得到高效表达, HspA-UreB 融合蛋白可能作为一种有效的蛋白质疫苗用于 Hp 的预防和治疗. 为临床应用提供了新的途径.

7 参考文献

- 1 Yamaguchi H, Osaki T, Kurihara N, Taguchi H, Kamiya S. The role of heat shock protein 60(HSP60) of *Helicobacter pylori* in adhesion *H.pylori* to human gastric epithelial cell. *Kansenshogaku Zasshi* 1998;72:487-492
- 2 Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, Hoffman P, Lingwood CA. Characterization of an acidic-pH-inducible stress protein (hsp70), a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 1998;66:4061-4067
- 3 Kobayashi K, Yokota K, Yoshino T, Kawahara Y, Dey A, Hirai Y, Oguma K, Akagi T. Detection of *Helicobacter pylori* associated antigen and heat shock protein 60 on follicular dendritic cells in the germinal centres of low grade B cell lymphoma of gastric mucosa associated lymphoid tissue(MALT). *J Clin Pathol* 1998;51:396-398
- 4 任宏宇, 易粹琼, 张锦坤. 幽门螺杆菌感染胃黏膜的 PCNA 和 HSP70 表达. *同济医科大学学报* 1999;28:135-137
- 5 Leri O, Teichner A, Sinopoli MT, Abbolito MR, Pustorino R, Nicosia R, Paparo Barbaro S. Heat-shock-proteins-antibodies in patients with *Helicobacter pylori* associated chronic gastritis. *Riv Eur Sci Med Farmacol* 1996;18:45-47
- 6 易屏, 李国成, 刘胜洪, 罗树星, 陶秀良. HSP₇₂、HSPB 在幽门螺杆菌感染的十二指肠球部溃疡患者胃黏膜中的表达. *中国中西医结合脾胃杂志* 2000;8:336-338
- 7 Konturek JW, Fischer H, Konturek PC, Huber V, Boknik P, Luess H, Neumann J, Brzozowski T, Schmitz W, Hahn EG, Domschke W, Konturek SJ. Heat shock protein 70 (HSP70) in gastric adaptation to aspirin in *Helicobacter pylori* infection. *J Physiol Pharmacol* 2001;52:153-164
- 8 Tsukimi Y, Nakai H, Itoh S, Amagase K, Okabe S. Involvement of heat shock proteins in the healing of acetic acid-induced gastric ulcers in rats. *J Physiol Pharmacol* 2001;52:391-406
- 9 Guo JS, Cho CH, Wang JY, Koo MWL. Expression and immunolocalization of heat shock proteins in the healing of gastric ulcers in rats. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:17-22
- 10 Kawai T, Teshima S, Kusumoto K, Kawahara T, Kondo K, Kishi K, Rokutan K. A non-toxic heat shock protein 70 inducer, geranyl-geranyl-acetone, restores the heat shock response in gastric mucosa of protein-malnourished rats. *J Lab Clin Med* 2000;2:138-148
- 11 李国成, 罗树星, 黄燊, 陈训武, 邱琦玉. 健脾益气方对急性胃黏膜损伤大鼠热休克蛋白的影响. *中国中西医结合杂志* 1998;18:162-164
- 12 罗树星, 李国成, 陈训武, 黄燊. 中药对大鼠血浆及胃黏膜热休克蛋白的影响. *中国中西医结合脾胃杂志* 1997;5:220-223
- 13 Hirakawa T, Rokutan K, Nikawa T, Kishi K. Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 1996;111:345-357
- 14 Amici C, Rossi A, Santoro MG. Aspirin enhances thermotolerance in human erythroleukemic cells: an effect associated with the modulation of the heat shock response. *Cancer Res* 1995;55:4452-4457
- 15 Jin M, Otaka M, Okuyama A, Itoh S, Otani S, Odashima M, Iwabuchi A, Konishi N, Wada I, Pacheco I, Itoh H, Tashima Y, Masamune O, Watanabes S. Association of 72-kDa heat shock protein expression with adaptation to aspirin in rat gastric mucosa. *Dig Dis Sci* 1999;44:1401-1407

- 16 Nagayama SI, Jono H, Suzaki H, Sakai K, Tsuruya E, Yamatsu I, Isohama Y, Miyata T, Kai H. Carbenoxolone, a new inducer of heat shock protein 70. *Life Sci* 2001; 69:2867-2873
- 17 Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B. The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000;20:7146-159
- 18 Hauser GJ, Dayao EK, Wasserloos K, Pitt BR, Wong HR. HSP induction inhibits iNOS mRNA expression and attenuates hypotension in endotoxin-challenged rats. *Am J Physiol* 1996;271: H2529-2535
- 19 Cavicchi M, Gibbs L, Whittle BJR. Inhibition of inducible nitric oxide synthase in the human intestinal epithelial cell line, DLD-1, by the inducers of heme oxygenase 1, bismuth salts, heme, and nitric oxide donors. *Gut* 2000;47:771-778
- 20 Vigh L, Literati PN, Horvath I, Torok Z, Balogh G, Glatz A, Kovacs E, Boros I, Ferdinandy P, Farkas B, Jaszalts L, Jednakovits A, Koranyi L, Maresca B. Bimoclomol: a nontoxic, hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects. *Nat Med* 1997;3:1150-1154
- 21 Ooie T, Takahashi N, Saikawa T, Nawata T, Arikawa M, Yamanaka K, Hara M, Shimada T, Sakata T. Single oral dose of geranylgeranylacetone induces heat-shock protein 72 and renders protection against ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Circulation* 2001;104:1837-1843
- 22 Tomisato W, Tsutsumi S, Tsuchiya T, Mizushima T. Geranylgeranylacetone protects guinea pig gastric mucosal cells from gastric stressor-induced necrosis by induction of heat-shock proteins. *Biol Pharm Bull* 2001;24:887-891
- 23 李明峰, 何志勇, 凌贞, 张迎春, 沈旭东, 吴祥甫. 幽门螺杆菌 HspA 和 UreB 双价候选疫苗株的构建. *中华微生物和免疫学杂志* 2000; 20:232-235

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

WJG 搭建我国消化化学基础和临床研究惟一国际交流的平台

World Journal of Gastroenterology® (ISSN 1007-9327 CN 14-1219/R) 2003 年由双月刊改为月刊, 加快刊出周期, 展示我国在国际上的食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、Hp 等方面基础和临床研究的成果。

WJG 1998 年被美国科学引文索引(SCI-E)收录。SCI-E 收录文献的作者、题目、源期刊、摘要、关键词等以外, 还收录论文的参考文献, 从而把一篇论文和其他论文之间有意义的联系勾画出来, 也就是把发表论文的两位作者和两位作者群体之间的学术联系显示出来等特点。作为一种比较客观和量化的评价方式之一, 已愈来愈受到科学界的重视。当 WJG 出版 20 天后, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 ISI Web of SCIENCE(<http://www.isinet.com/isi/journals/index.html>)上看到论文的摘要、参考文献、被引用的次数、关键词、单位名称、通讯地址等信息。

WJG 1998 年被美国《医学索引》(*Index Medicus / MEDLINE*)收录。WJG 电子版摘要及全文在印刷版出版前 15 天, 国际上的胃肠病学和肝病专家即可在 PubMed(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi>)上阅读到论文的摘要及全文, 包括彩色、黑白、线条图照片。世界胃肠病学杂志社将 WJG 和世界华人消化杂志出版的过刊和现刊全部放在 www.wjgnet.com 上供国际和国内消化病学者免费使用。WJG 是惟一全面反映我国消化化学专家研究成果的平台之一, 让世界更多的学者在 PubMed 或 www.wjgnet.com 上免费看到来自我国胃肠病学和肝病专家撰写的具有中国特色的创新原始论文。

总之, WJG 提供了一个与世界胃肠病学和肝病专家进行有效的学术交流平台, 促进消化病学研究成果的快速发展。

(世界胃肠病学杂志社)

内镜技术在消化系疾病诊疗中的应用

韩 英

韩英,中国人民解放军北京军区总医院消化内科 北京市 100700
项目负责人:韩英,100700,北京市,中国人民解放军北京军区总医院消化内科.
电话:010-66721168
收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-11-28

韩英. 内镜技术在消化系疾病诊疗中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11(5):
632-634

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/632.htm>

0 引言

内镜技术在消化系统疾病的诊疗中具有不可替代的作用. 近年来,除了传统的消化道内镜(食管、胃、十二指肠、大肠镜)诊断、息肉切除等治疗外,染色、放大内镜,内镜超声(EUS)以及内镜微创治疗技术发展迅速,主要集中在以下几个方面:

1 染色、放大内镜

黏膜染色(包括食管、胃、大肠)对于识别早期恶性肿瘤具有十分重要意义. 碘染色鉴别食管癌,靛胭脂和美蓝染色检测早期大肠癌及癌前病变均已应用于临床. 食管黏膜喷洒碘溶液,通过观察黏膜是否着色来判定病变区域,在该部位取活检往往可以发现早期肿瘤. 大肠黏膜喷洒靛胭脂染色,通过放大内镜观察黏膜隐窝(pit,腺管开口)的形态,判定病变的性质及浸润深度,决定是否进行内镜或手术治疗.

2 内镜超声

由于内镜设备更新换代及临床研究的进展,超声内镜的潜在用处亦大大增加. 消化道内镜超声分为2类,一为超声内镜,二为经普通内镜活检孔道插入超声探头进行检测. 超声诊断学的原理是:声频越高,其影像的分辨率越高,但是其组织穿透深度越浅.最近,美国 Sahai et al^[1]报告了通过普通内镜活检孔道插入高频微探头的临床研究结果.新型微探头有12、20、30 MHz三种声频,可以用于自食管至直肠不同管腔的诊断.新型探头可用于黏膜下病变的判定,异常皱襞、食管-胃底静脉曲张的诊断和鉴别诊断以及肿瘤分期等.新型的导丝引导超声探头可插入胰管及胆管,用于诊断胰、胆管肿瘤或结石^[2].

3 经内镜抗返流技术

3.1 经内镜胃成形术(endoscopic gastroplasty) 通过胃镜经口途径治疗胃食管返流病(GERD)已成为当前的热点.该技术2002年已通过美国药品、食品监督管理局

(FDA)的批准,正式用于临床.该技术利用内镜“缝纫机”,在下食管括约肌(LES)及贲门处进行缝合.此种“缝纫机”有一吸引装置和一缝合针,可缝合至固有肌层.缝合后将缝线拉出,并打一外科结,而后应用特制的外科结推进器将打好的外科结沿内镜送至缝合处,使食管-胃连接处(EGJ)或贲门形成一固定皱襞.该皱襞使EGJ变窄并加强,从而减少返流.该技术对于内镜操作技巧,医师的经验以及使用该操作系统前的培训均有较高要求.国外的一项多中心试验结果表明,64例患者内镜胃成形术前烧心指数22.8,返流指数1.8;术后3mo分别降至9.2(P<0.001)和0.6(P<0.001).并发症:1例小穿孔,2例轻度外套管损伤^[3].内镜“缝纫机”发明人 Paul Swain的一项大样本实验结果证实:102例GERD经内镜下胃成形术患者,术前平均症状指数5,术后3mo降至1(P<0.05);LES长度:术前2cm,术后3cm;LES压力:术前5mmHg;术后8mmHg(P<0.05);食管pH<4的时间:术前8.4%,术后2.7%(P<0.05).并发症:1例穿孔,3例一致性吞咽困难^[4].

3.2 射频技术(radio frequency energy) 该射频装置是由一个配有多排针的囊状物组成,其针尖部产生能量,通过一处理器来控制射频能量及频率.在射频的同时喷水使黏膜冷却以避免黏膜损伤.初步临床应用未发现并发症.术后6mo使用抗酸剂的频度从术前的100%降至21%;食管pH<4的时间从术前的12%降至6.7%(P<0.05);烧心计分从术前3.7降至1.4(P<0.001),GERD的生活质量(QOL)计分从术前24.4降至7.9(P<0.001)^[5].

3.3 注射法 在LES区域注射混合或惰性物质以期将LES区域缩窄,并使括约肌张力增高.该技术操作简单、经济,大多数内镜医师易于掌握,目前尚未见有关临床试验结果的文献报告.

4 胶囊内镜术(capsule endoscopy)

胶囊内镜长27mm,3.7g,经口吞下,可用于诊断上消化道及小肠病变.该技术主要的优势在于采用互补甲基氧模拟装置(complementary methyloxide simulator, COMS).COMS将像束放大从而改善成像的清晰度.最为重要的是,采用COMS可以显著降低胶囊内镜的能量消耗,可使内镜持续工作7h,因此可以完成绝大多数患者的小肠检查^[6].胶囊内镜的最佳适应证是:(1)上消化道内镜、大肠镜无法明确出血部位的消化道出血;(2)小肠钡剂造影疑有病变,但性质不明;(3)克罗恩病或肠病(celiac disease)患者的辅助检查;(4)遗传性假血

友病(von-willebrand病)和黑色素沉着-胃肠息肉综合征(peutz-jegher syndrome)的筛检;(5)HIV和寄生虫感染性肠病以及移植抗宿主病(graft-vs-host disease);(6)肠易激综合征(IBS)和腹痛综合征。

5 内镜黏膜切除术(EMR)

EMR最早起源于日本,而后逐渐为欧美等国家所采用。日本是胃癌高发区,EMR最初用于早期胃癌的内镜下治疗。EMR技术对于黏膜层的消化道病变均适用。该技术的关键是黏膜下注射(生理盐水或含有其他成分的液体,如美蓝,肾上腺素等),使位于黏膜层的病变更趋隆起,以便切除,避免损伤黏膜下组织,防止穿孔(起到缓冲垫作用)^[7]。

最近,发明了在内镜前端安装一帽状装置,通过吸引将黏膜层病变吸入帽状物内。特制的帽状物内装有一个张开的圈套器。黏膜下注射后,黏膜层病变隆起,而后吸引至帽状物内,随之将圈套器勒紧,操作结束^[8]。

另一相似的技术是采用静脉结扎装置,将黏膜下注射后隆起的黏膜吸入结扎装置内,并进行结扎形成一“假性息肉”,而后用圈套器切除。该项结扎技术称之为“结扎/圈套(band and snare)”或“结扎/切除(band and cut)”。该技术较普通的EMR技术略显繁琐,但是对于小的、扁平病变较为适用^[9]。

应用帽状物吸引技术进行EMR,最好先用电凝刀将所要切除的边缘做一标记,以便于更准确地吸引和切除病变区域。EMR技术较为安全,出血及穿孔率均较低。

与电凝切除、激光或光动力等黏膜切除技术相比,EMR技术的最大优势是可以较完整地获取标本用于病理组织学检查。实际上,发明EMR技术的初衷亦是为了诊断,即“大黏膜活检(strip biopsy)”^[10]。目前,EMR主要用于扁平隆起型息肉,无法耐受手术的Barrett's食管黏膜癌变或高度异型增生^[11]。

6 光动力治疗(PDT)

PDT技术由两部分组成:首先要给予光动力药物,使其在靶组织聚集;而后通过激光等能量将上述光动力药物激活。被激活的药物与周围的氧相互作用,从而导致细胞死亡和组织坏死。由于其他新技术的问世,如金属支架,Nd:YAG激光,氩血浆凝固技术,化疗+放疗等,使PDT用于肿瘤的姑息治疗逐渐减少^[12]。

7 氩气血浆凝固技术(argonplasmacoagulation)

该技术不是激光技术。该法最初用于手术中,将氩气通过电凝器前端的电极,当踏下脚踏开关时,射频电流通过氩光束,从而导致血浆离子化并向最近点的周围组织传导、放电。操作时需将一电极回路板置于患者身上以形成闭合回路^[13]。由于固化的组织对电流有抵抗,因此氩气血浆凝固的组织较为表浅。但是,亦有人认为,

该技术的组织损伤可达黏膜肌层,因此提示人们在治疗管壁较薄的部位(如右半结肠)时,应降低功率及氩气流量,以避免深部损伤及穿孔。该技术已成功用于治疗血管扩张症,放射性直肠炎以及扁平腺瘤。该技术对于治疗Barrett's食管可能有一定意义,但是对于新生鳞状上皮黏膜下残存的Barrett's上皮有一定困难^[14]。有人报告,应用高能量和高气流设置可以提高疗效,但亦容易发生并发症如食管狭窄^[15]。

8 硬度可变式肠镜

硬度可变式肠镜可使肠镜在通过乙状结肠时有较好的可曲性和顺应性,减轻受试者的痛苦;通过横结肠及肝脾曲时只要增加硬度即可顺利通过,直达盲肠。该项技术的主要特点就是减轻患者痛苦^[16,17]。

9 超细内镜

为了使内镜受检者更为舒适,提高其依从性,超细、柔软内镜技术方面又有新的尝试^[18]。目前已有5mm内镜问世,3-4mm直径的内镜亦在试验中。Wallace教授报告了采用经济型便携式、外径3.1mm、无活检孔道的食管镜,对有胃-食管返流患者中有无Barrett's食管进行筛检。

10 光学活检(optical biopsy)

光学活检可以提高或部分取代传统的活检及病理诊断技术。该技术将先进的光学技术和计算机技术相结合。例如,利用光散射法可以使内镜医师对黏膜表面进行扫描,通过分析细胞核大小、排列以及细胞间的密集程度判定有无异型增生^[19]。利用内镜共聚焦显微技术(endoscopic confocal microscopy)可以实时观察黏膜上皮细胞。荧光光谱技术,例如激光诱发荧光光谱技术,有助于判定异型增生的区域,指导活检。

11 光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)

内镜光学相干断层扫描技术(endoscopic optical coherence tomography, EOCT)是新近开发的用于消化道成像的技术。该技术与EUS相似,只是其成像原理是光,而EUS成像原理是声。此外,该技术的分辨率是EUS的10倍。初步的研究结果表明,EOCT测定得到的组织结构的层面厚度和组织形态学检查结果相比较,二者有显著一致性^[20,21]。

12 参考文献

- 1 Sahai AV, Schembre D, Stevens PD, Chak A, Isenberg G, Lightdale CJ, Sivak MV Jr, Hawes RH. A multicenter US experience with EUS-guided fine-needle aspiration using the Olympus GF-UM30P echoendoscope: safety and effectiveness. *Gastrointest Endosc* 1999;50:792-796
- 2 Lightdale CJ. Advances in endoscopic ultrasound: 13th international symposium: October 4-6, 2002, New York, New York. *Gastrointest Endosc* 2002;56(4 Suppl):S1
- 3 Filipi CJ, Lehman GA, Rothstein RI, Rajman I, Stiegmann GV,

- Waring JP, Hunter JG, Gostout CJ, Edmundowicz SA, Dunne DP, Watson PA, Cornet DA. Transoral, flexible endoscopic suturing for treatment of GERD: a multicenter trial. *Gastrointest Endosc* 2001;53:416-422
- 4 Swain P, Park PO, Kjellin T. Endoscopic gastroplasty for gastro-esophageal reflux disease. *Gastrointest Endosc* 2000;51:AB144
- 5 Triadafilopoulous G, Utley DS, DiBaise J. Radiofrequency energy application to the gastroesophageal junction for the treatment of gastroesophageal reflux disease. *Gastrointest Endosc* 2000;51:AB223
- 6 Appleyard M, Fireman Z, Glukhovskiy A, Jacob H, Shreiver R, Kadiramanathan S, Lavy A, Lewkowicz S, Scapa E, Shofti R, Swain P, Zaretsky A. A randomized trial comparing wireless capsule endoscopy with push enteroscopy for the detection of small-bowel lesions. *Gastroenterology* 2000;119:1431-1438
- 7 Lightdale CJ. Diagnosis, staging, and cure of early gastrointestinal cancer. *Gastrointest Endosc* 1996;44:95-96
- 8 Tada M, Inoue H, Yabata E, Okabe S, Endo M. Colonic mucosal resection using a transparent cap-fitted endoscope. *Gastrointest Endosc* 1996;44:63-65
- 9 Fleischer DE, Wang GQ, Dawsey S, Tio TL, Newsome J, Kidwell J, Pifti S. Tissue band ligation followed by snare resection (band and snare): a new technique for tissue acquisition in the esophagus. *Gastrointest Endosc* 1996;44:68-72
- 10 Karita M, Tada M, Okita K, Kodama T. Endoscopic therapy for early colon cancer: the strip biopsy resection technique. *Gastrointest Endosc* 1991;37:128-132
- 11 Nijhawan PK, Wang KK. Endoscopic mucosal resection for lesions with endoscopic features suggestive of malignancy and high-grade dysplasia within Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc* 2000;52:328-332
- 12 Lightdale CJ. Esophageal cancer: American college of gastroenterology. *Am J Gastroenterol* 1999;94:20-29
- 13 Watson JP, Bennett MK, Griffin SM, Matthewson K. The tissue effect of argon plasma coagulation on esophageal and gastric mucosa. *Gastrointest Endosc* 2000;52:342-345
- 14 Van Laethem JL, Cremer M, Peny MO, Delhaye M, Deviere J. Eradication of Barrett's mucosa with argon plasma coagulation and acid suppression: immediate and midterm results. *Gut* 1998;43:747-751
- 15 Schulz H, Miehke S, Antos D, Schentke KU, Vieth M, Stolte M, Bayerdorffer E. Ablation of Barrett's epithelium by endoscopic argon plasma coagulation in combination with high-dose omeprazole. *Gastrointest Endosc* 2000;51:659-663
- 16 Brooker JC, Saunders BP, Shah SG, Williams CB. A new variable stiffness colonoscope makes colonoscopy easier: a randomized controlled trial. *Gut* 2000;46:801-805
- 17 Waye JG. Completing colonoscopy. *Am J Gastro* 2000;95:2681-2682
- 18 Han Y, Uno Y, Munakata A. Does flexible small-diameter colonoscope reduce insertion pain during colonoscopy? *World J Gastroenterol* 2000;6:659-663
- 19 Wallace MB, Perelman LT, Backman V, Crawford JM, Fitzmaurice M, Seiler M, Badizadegan K, Shields SJ, Itzkan I, Dasari RR, Van Dam J, Feld MS. Endoscopic detection of dysplasia in patients with Barrett's esophagus using light-scattering spectroscopy. *Gastroenterology* 2000;119:677-682
- 21 Bouma BE, Tearney GJ, Compton CC, Nishioka NS. High resolution imaging of the human esophagus and stomach in vivo using optical coherence tomography. *Gastrointest Endosc* 2000;51:467-474
- 22 Sivak MV Jr, Kobayashi K, Izatt JA, Rollins AM, Ung-Runyawee R, Chak A, Wong RC, Isenberg GA, Willis J. High-resolution endoscopic imaging of the GI tract using optical coherence tomography. *Gastrointest Endosc* 2000;51:474-479

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 征文通知 •

第五届上海国际肝癌肝炎会议征文启事

为了加强国际及沪港学术交流,进一步提高肝癌和肝炎防治研究水平,由上海国际肝癌肝炎会议组织委员会(复旦大学、上海第二医科大学、第二军医大学、中国科学院上海分院、上海市卫生局)和程思远国际肝炎研究基金会(香港)联合主办,定于2004-02-14~17日在香港召开“2004年港沪国际肝癌肝炎会议-第五届上海国际肝癌肝炎会议、第三届程思远肝炎研究基金会国际学术会议”,会议规模定为1200人,大会主席为中国工程院院士、复旦大学汤钊猷教授和香港大学医学院林兆鑫教授、大会邀请程思远、吴阶平两位副委员长为名誉主席,并由国内吴孟超等与美、英、法、德、日等国和香港地区的著名教授担任共同主席。会议邀请国内外著名学者80人作专题报告。欢迎国内外从事肝炎和肝癌基础与临床研究的专家、学者参加大会。投稿(请撰写中英文摘要)及联系事项寄:200023,上海市医学院路136号,复旦大学肝癌研究所国际会议秘书处收。电话:(021)64041990-2436,传真:(021)64037181;电子信箱:qiusj68@zshospital.net. 有关会议的详情及注册,请查询www.hepa2004.org网址。

(2003-03-04)

幽门螺杆菌的研究进展

徐智民, 张万岱, 周殿元

徐智民, 张万岱, 周殿元, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化内科研究所 广东省广州市 510515
项目负责人: 徐智民, 510515, 广东省广州市同和路, 中国人民解放军第一军医大学南方医院全军消化内科研究所. xzmcn@163.com
电话: 020-61641534 传真: 020-87280770
收稿日期: 2002-11-06 接受日期: 2002-11-28

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(5):635-639

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/635.htm>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)的研究自其分离培养成功已近 20 a. 从基础到临床均已进行了大量的研究, 取得很大的进展. 并对慢性胃病的诊断和防治产生了革命性的影响.

1 Hp 的微生物学、微生态学和分子生物学

1.1 Hp 的微生物学 Hp 的培养是研究 Hp 的基础, 1983 年正是因为 Marshall 成功建立了 Hp 分离培养的方法才在世界上广泛开展了 Hp 的深入研究并对上消化道疾病诊断和治疗产生了革命性认识. 由于 Hp 培养相对较为困难, 后来发展了许多依赖尿素酶、免疫和基因的检测方法. 目前对 Hp 的研究已进入新的阶段, 越来越多的学者认识到 Hp 分离培养的重要性, 主要能解决 Hp 的菌株差异分析、Hp 菌株的药敏试验和胃内残存 Hp 的诊断. 目前分离技术已接近简单化和标准化操作, 便于推广, 但对球形变的 Hp 培养仍很困难.

1.2 Hp 的微生态学 Hp 是胃黏膜生境中最主要的微生物, 定植量较大而且单一, 大部分仅伴有轻微的炎细胞浸润, 通常有中性粒细胞浸润; 而少部分患者炎症反应表现明显. 人群中 Hp 的感染率极高, 我国普通人群约有半数人口可检出 Hp 或曾有 Hp 感染. 一般认为, 定植于胃内的 Hp 未经治疗可终生带菌. 因此, Hp 作为一种致病菌曾经并未得到公认. Hp 定植密度与局部的病变程度并不一定呈正相关, 而 Hp 感染所致病变与病程关系更密切.

目前对 Hp 的微生态学研究尚不足, 主要表现为仅对某一时期 Hp 的致病性进行研究, 而对 Hp 在胃内长期定植对宿主的影响的研究缺乏直接的证据. 根据我们的初步观察, 临床中检测的 Hp 绝大多数可产生多种毒素, 但同一菌型的 Hp 对不同感染年龄、不同病程表现不太一样. 在青年人中, 感染 Hp 时多数表现为消化能力增强, 而无其他的不良反应, 这给人一种 Hp 是有益菌的感觉. 内镜下观察多数仅表现为轻度充血. 通过随

访发现, Hp 持续感染者胃黏膜的病变发展较快, 呈进行性加重; 而 Hp 阴性者, 病变加重不明显, 或有愈合倾向. 通过交叉免疫印迹法检测发现, 当产毒 Hp 感染时, 针对相应毒素的抗体滴度较高者自觉症状或内镜下表现多较抗体滴度低者轻微, 提示针对毒素的抗体虽然不能完全清除或预防 Hp 的感染, 但可能起到中和相应的毒素, 而减轻 Hp 毒素对胃黏膜损害的作用. 这种现象在我们对以家庭为单位的流行病学研究中得到支持. 但当长期 Hp 感染导致免疫耐受时, 相应的抗体减少, 可能使 Hp 的致病作用更为明显, 可能会加快导致胃黏膜糜烂、萎缩和肿瘤等病变. 另外, 当胃内生境不适于 Hp 生长 - 如萎缩性胃炎时, Hp 的定植密度明显减少, 采用较不敏感的检测方法如快速尿素酶试验(RUT)等阳性率可明显下降, 而呼气试验可呈弱阳性, 但 Hp 抗体滴度相对较高. 国外研究报告也有类似的结果. 对于这种少量的 Hp 定植对病变发展及转归的意义, 目前尚不明确.

1.3 Hp 的分子生物学 该研究的进展主要是对 Hp 的菌株多态性、致病性差异、耐药基因和全基因组序列等方面的研究. 1997 年 Tomb et al^[1]对 Hp 26 695 基因组序列进行了分析, 发现 Hp 有很好的动力系统、证实了多种黏附素、脂蛋白和外膜蛋白, 显示了宿主和病原相互作用的复杂因素, 为进一步明确 Hp 的致病性、致病机制、耐药及免疫防治有重要意义. 1999 年 Alm et al^[2,3]对另一株不同来源的 Hp 菌株 J99 进行了基因组序列分析, 并与 26 695 的基因组序列进行了比较, 发现两株细菌有 6-7% 的基因有其特殊性, 说明基因差异可能是 Hp 菌株致病性差异的重要因素.

Hp 菌株多态性和致病性研究主要在 vacA 基因的亚型和 cag 致病岛的结构方面. 上海、北京等地对 cagA 致病岛作了比较深入的系统研究, 研究发现我国 Hp 的 cag 致病岛具有以下特点: (1) cag 致病岛检出率高 (95.3%), 但与慢性胃炎、消化性溃疡和胃癌之间的关系尚不确定; (2) cag 致病岛主要以分割的形式存在, 这与国外报道明显不同, 这种分割形式除与 IS605 插入子有关外, 还可能存在新的插入序列参与 cag 致病岛的分割; (3) cagE 基因在 cag 致病岛中的检出率最高, 故可作为 cag 致病岛存在的标志. 然而有关 cag 致病岛与 Hp 致病机制的关系尚不明确.

Hp 根除治疗的广泛应用, 部分抗 Hp 药物的耐药性问题日益突出, 多数与耐药基因有关. 主要是对硝基咪唑类药物(甲硝唑)的耐药性. 发达国家与发展中国家

之间硝基咪唑类药物发生率存在显著差别,并逐年呈上升趋势,发达国家在20-60%而发展中国家在50-90%。其耐药性与*raxA*基因的突变有关。克拉霉素的耐药也日渐增多,目前已高达5%以上。目前研究提示,23S rRNA基因突变是大环内酯类药物耐药最重要的因素^[5]。

2 Hp的流行病学和致病性

世界各地Hp的感染率有一定差异,经济条件较差者高于发达国家,但都较高,并随年龄增大而增长。我国大量人群调查显示Hp感染率大约在60%左右。Hp可在人与人之间传播,Hp感染易发生于人群聚集的学校和家庭。夫妻双方互相传染,且易传染给儿童。大范围的Hp防治似乎并没有明显降低Hp的感染率,但依赖尿素酶的检测率明显降低,可能与不规则的抗Hp药物使用有关。在Hp相关疾病的治疗方面取得良好的疗效。有研究提示胃内Hp阳性者口腔内Hp-PCR的检出率相当高,这可能是Hp经口传播和部分患者Hp根除后再感染的重要因素,但从口腔,内分离培养Hp仍相当困难,主要是口腔内细菌相当多。我们通过对全国以家庭为单位的多点Hp免疫型流行病学调查发现Hp的免疫型存在明显的家庭内聚集现象。Hp感染与慢性活动性胃炎、十二指肠球部溃疡和低度恶性MALT淋巴瘤的关系已得到公认,根除Hp可使这些疾病痊愈且减少复发。

2.1 Hp与胃癌 Hp被认为是I类致癌因子^[1]。我们通过病史回顾及随访发现Hp感染早期多无症状或仅表现为食欲增强及易饥,并在多因素作用下胃黏膜变的粗糙,充血水肿加重、出现糜烂或溃疡形成。多数胃癌患者在发现胃癌数月之前表现为消化增强症状,且多缺少明显的其他明显的致癌因素。而胃癌发生的部分主要位于胃窦、胃角、胃体小弯侧和贲门,与Hp所定植的部位相当一致,显示Hp长期慢性感染在胃癌发生中的作用。

Watanabe et al^[4]给蒙古沙土鼠单纯接种Hp已诱发胃癌的病变。上海市消化疾病研究所报告接种与此相同的国际标准株ATCC43 504和临床胃癌分离株长期感染(84 wk)均有蒙古沙土鼠发生高分化胃癌。而第一军医大学南方医院和中国医科大学分别采用其他Hp菌株更长时间感染蒙古沙土鼠,可诱导鼠胃黏膜出现严重炎症反应、肠化及异型增生,但未见癌肿发生。

在我国进行的两个胃癌高发区现场(山东和福建)的干预研究,都证明了根除Hp可在一定程度上阻止慢性胃炎向萎缩、肠化发生以及阻断已形成的萎缩、肠化的进一步发展。在福建研究现场随访7 a,发现在原先没有肠化者根除Hp预防了胃癌的发生。

从上述情况看来,Hp是胃癌发生过程中一个重要危险因素,已有足够间接证据和直接证据。为根除Hp预防胃癌前病变乃至胃癌的发生提供了重要证据。但仍有许多相关因素、胃癌发生过程的分子生物学机制、其他化学预防的价值(如COX-2抑制剂、维甲酸、抗氧化剂等)等需要研究。

2.2 Hp与功能性消化不良(FD) Hp在FD中的检出率和正常对照相比较,由于Hp的感染率在不同年龄、不同种话、不同地区间存在较大差异,FD的标准也不一致,研究结果不统一。目前的资料仍未表明Hp感染与FD明显相关。但欧洲的Maastricht 2共识报告建议对Hp阳性FD进行根除Hp治疗,认为根除Hp治疗在某些亚组FD可取得症状长期改善。

2.3 Hp与胃食管反流病(GERD) 在Hp感染与GERD方面,虽有争议但较多意见倾向于Hp感染与GERD呈负相关,目前,其证据有二方面:一是在流行病学方面,随着Hp感染率的逐渐下降,GERD和食管腺癌的发生率明显上升,在GERD中Hp的感染率及CagA的检出率均较低,且与食管疾病的严重程度呈负相关^[6]。二是对消化性溃疡及胃炎患者根除Hp后,GERD的发病率高于未根除者^[7]。但这两个证据也有相反的意见^[8,9]。但欧洲的Maastricht 2共识报告上提出权衡利弊,有根除Hp指征者仍应根除Hp。

2.4 Hp和使用非甾体消炎药(NSAIDs) 90-95%的消化性溃疡是Hp感染或NSAID所致,二者合并存在的机会并不少见。较多的研究提示,Hp和NSAID是消化性溃疡发生的两个重要的独立危险因素,二者相互作用,单纯根除Hp本身虽然不足以预防NSAID溃疡但较多意见倾向于对减少NSAID溃疡发生有一定帮助。

2.5 Hp与MALT淋巴瘤 胃的黏膜相关淋巴样组织(MALT)患者Hp的感染度高于对照组。在根除Hp后,这些淋巴组织可以消退。根除Hp后不仅可以使低度恶性MALT淋巴瘤消退^[10],最近也发现对高度恶性MALT淋巴瘤也有效^[11]。Hp的具体致MALT淋巴瘤的机制目前尚不清楚,目前认为,病理为低度恶性MALT淋巴瘤、年轻、肿瘤在胃远端或弥漫性、无淋巴结转移的患者对抗Hp治疗敏感。在早期疗效预测方面,超声胃镜临床分期、t(11;18)(q21;q21)检测对确定根除Hp治疗MALT淋巴瘤有较大价值^[12],无t(11;18)易位的患者对Hp治疗反应较好^[13]。

2.6 Hp感染与胆汁反流性胃炎 我们发现通过尿素酶依赖性试验从胆汁反流性胃炎充血明显的部分检出Hp的阳性率低,但采用血清学或培养的方法,其Hp的检测率明显增高,初步提示部分胆汁反流性胃炎的发生与Hp感染有关,而胆汁反流所致炎症明显的部位(如胃窦)Hp的数量很少,而在胃体而近贲门可能有较多的Hp。但单纯根除Hp治疗对该病疗效欠佳。

2.7 Hp感染与胃肠外疾病的关系 已有一些间接证据显示Hp感染与部分有肠外疾病的发生发展有关,但未得到确认,有待进一步研究。

3 Hp的诊断

3.1 Hp感染的诊断方法 检测Hp感染主要通过:(1)生化试验:依赖尿素酶的胃镜下快速尿素酶(RUT)试验和¹³C尿素呼气试验(¹³C-UBT)和¹⁴C尿素呼气试验(¹⁴C-UBT)

仍是目前临床上诊断 Hp 的主要方法, 且开展更为普遍. RUT 需要胃镜检查, 但同时可明确胃内的病变程度, UBT 属无创检测, 但需排除胃内可疑的恶性病变或癌前病变, 一般多用于 Hp 根除治疗后的复查. 由于抗生素的广泛应用及不规则抗 Hp 治疗, 依赖尿素酶试验的检出率明显下降. (2)形态学检查: Hp 具有典型的形态特点. 在自然生境的胃黏膜上一般呈典型的“S”弯曲, 可较粗大或细小, 因观察角度不同可呈“C”型或“海鸥状”, 培养时间较短时可呈典型形态或杆状弯曲. 在生存条件不利的情况下, 如抗生素作用、培养时间较长、菌落过于密集或培养条件差时多丝状结构相连. Gram 染色呈阴性(红色), Giemsa 染色呈紫红色, 银染易呈棕褐色. 根据此特性可与生化试验结合, 用于鉴定 Hp 和海尔曼螺杆菌(*Helicobacter heilmannii*, 简称 Hh). 常用的方法有 (a)胃黏膜涂片(印片)Gram 染色油镜检查、(b)涂片暗视野观察或相差显微镜观察、(c)组织切片染色油镜检查: HE 染色、Warthin-Starry 银染色、改良 Giemsa 染色、甲苯胺兰染色等. 其中以银染色细菌与组织及黏液的对比最好, 而以 HE 最差, Giemsa 染色介于二者之间. 银染色可以检出组织内或腺腔内单个的典型细菌, 而 HE 染色仅能观察到大量或成簇的 Hp. (3)Hp 分离培养: 作为微生物学诊断的“金标准”, 临床应用尚少, 但由于不规则抗 Hp 治疗及部分胃内病变 Hp 定植量少, Hp 培养显示出其优越性, 受到重视. 我院的实践表明, 部分 RUT 阴性的萎缩性胃炎和胃癌者显示血清中有较高滴度的 Hp 特异性抗体(Western blot 法), 同时也可培养出极少量的 Hp 菌落. 但经胃镜取材的 Hp 培养仍属创伤性诊断方法, 而经吞线及吞棉的取材分离培养可获得一定的阳性率, 只是假阴性率较高. 分离培养技术要求较高, 可用于获得菌株和药敏试验. (4)基于 Hp 抗原抗体的免疫学检测: (a)酶联免疫黏附试验(ELISA)制备或检测的抗原包括混合抗原和特异的分离抗原(多种单一一种特异抗原); 制备和检测的抗体包括混合抗原或特异抗原对应的抗体, 包括 IgG、IgA 和 IgM 等. 检测的标本除了检测抗体用的血液外, 还包括尿液、唾液、胃液; 以及检测抗原用的粪便、血液等. (b)免疫酶试验: 用固定于玻片中的 Hp 菌, 与患者血清中的 Hp 抗体结合, 经酶标二抗显色镜检进行诊断. 测定的是 Hp 全菌抗原. (c)胶乳凝集试验: 将 Hp 抗原结合在胶乳颗粒或胶体金上, 与经稀释的微量待检血清中全菌抗体结合后, 根据出现肉眼可见的凝集反应进行判断. (d)金标渗滤法: 用免疫球蛋白或葡萄球菌 A 蛋白(SPA)包被的胶体金能与免疫复合物结合, 用于血清抗体的快速检测, 阳性反应呈红色, 较易判定. (f)免疫印迹技术(Western blot): Hp 抗原组分在变性聚丙烯酰胺凝胶电泳上根据分子量大小不同被分离, 与待检血清中的相应抗体结合后显色, 根据阳性条带的位置与大小可用于分析感染者血中对 Hp 多种抗原组分的抗体产生情况及用于毒力菌株的测定等, 能较完整反映

Hp 的免疫型, 而且因不同抗原被分离, 不易出现假阳性, 且便于治疗后的随访及诊断残留的 Hp 感染. (g)免疫组化染色: 胃活检组织病理切片经脱蜡复水等处理后, 加 Hp 特异单抗或多抗, 与标记的二抗反应后显色进行诊断, 显色情况依标记系统的不同而不同, 常用的 ABC 法是用生物素标记二抗, 生物素的配体亲合素上结合辣根过氧化物酶, 与底物 DAB 作用后呈棕黄色, 沉积于 Hp 抗原部位. 该方法适合于原位检测产生形态变异的 Hp. (h)血清 Hp 抗原检测(ELISA 法): 国内首先见于吴勤勤 et al 报道, 检测血清中 Hp 的可溶性抗原, 其结果与胃内 Hp 的感染一致, 但目前相关研究较少. (j)粪便 Hp 抗原检测: 国外首报, 国内已引进该项技术. 通过敏感的双抗体夹心法从粪便中检测 Hp 抗原, 与胃内 Hp 感染水平一致, 检查前一段时间的抗 Hp 治疗也易出现假阴性. (5)基于 Hp DNA 的基因检测: 部分 Hp 基因的核酸序列已明确, 以此为依据设计 PCR 引物或探针可进行 Hp 的基因检测. (a)PCR 相关技术: PCR(聚合酶链反应)技术可以在体外成百万倍地扩增靶 DNA, 目前应用于 Hp 检测的引物分别来自尿素酶、鞭毛素、黏附素、细胞毒素等基因. 还有一些 PCR 相关技术应用于 Hp 的基础和临床研究中, 如原位 PCR 用于明确 Hp 与胃上皮的关系、PCR-SSCP(单链构象多态性)用于 Hp 的基因突变研究、PCR-RFLP(限制性长度多态性)用于 Hp 菌株的分型、RAPD(随机扩增片段多态性)用于 Hp 菌株的鉴定等. (b)核酸探针杂交: 目前报道的有原位杂交、膜杂交等, 应用的探针有寡核苷酸探针、PCR 标记长(300-500 bp)探针等, 标记与检测系统则有生物素-亲合素系统、光敏生物素-链酶亲合素系统及地戈辛素-抗地戈辛系统等, 但主要用于 Hp 的基础研究. (c)多重 PCR+ 杂交的膜芯片技术: 可对 Hp 多个毒力相关基因和耐药基因进行 PCR 检测并通过在 NC 膜上的杂交出现确定 Hp 的现症感染及菌株毒力及耐药状况, 对 Hp 治疗的适应证及抗 Hp 药物选择有一定的帮助. 近来先进研究技术如生物芯片、组织阵列和 DHPLC 技术在 Hp 分子生物学研究领域得到应用, 但在临床上开展尚存在一定的难度.

3.2 Hp 感染的诊断标准 1999 年我国继海南三亚 Hp 专家共识会议后, 形成了我国对 Hp 若干问题的共识意见^[14]. 在诊断方面提出: (1)Hp 感染的诊断方法选择原则: Hp 感染诊断标准原则上要求可靠、简单, 以便于实施和推广. Hp 感染的诊断方法很多, 应根据不同的诊断目的和单位的条件选择诊断方法. 应选用经过考核, 具有敏感性、特异性高的试剂和方法进行检测. 并根据各项检测方法的特点, 设立科研和临床诊断标准. (2)Hp 感染的科研诊断标准: Hp 培养阳性或下列四项中任二项阳性者, 诊断为 Hp 阳性: (a)Hp 形态学(涂片、组织学染色或免疫组化染色); (b)尿素酶依赖性试验(RUT、¹³C 或 ¹⁴C-UBT); (c)血清学试验(ELISA 或免疫印迹试验等); (d)特异的 PCR 检测. Hp 的流行病学调查可根据研究目的

和条件,在上述试验中选择一项或二项。(3)Hp感染临床诊断标准:下列二项中任一项阳性者,则诊断Hp阳性:(a)Hp形态学(涂片或组织学染色);(b)尿素酶依赖性试验(RUT、¹³C或¹⁴C-UBT)。(4)Hp感染的根除标准:抗Hp治疗停药至少4wk后复查:(a)Hp形态学检测阴性;(b)尿素酶依赖性试验(RUT、¹³C或¹⁴C-UBT)阴性。用于临床目的,选做一项即可;用于科研目的,需两项均阴性。需取活组织检查者,用于临床目的,取胃窦黏膜;用于科研目的,取胃窦和胃体黏膜。

2002-08-16/19全国幽门螺杆菌第三次学术大会上,对Hp的诊断标准提出了几点修改意见,但尚未形成共识,包括:(1)推荐将Hp分离培养用于临床诊断,尤其是Hp少量定植的情况下、需要行药敏试验、科研和Hp菌型研究时;(2)增加将Hp粪便抗原检测用于现症感染诊断;(3)建议将Hp免疫分型技术用于临床,以便在某些疾病(如溃疡、萎缩和胃癌前病变)早期(表现为FD)即对Hp感染的致病性和宿主的耐受性进行预测,避免发展为难治疾病;(4)建议补充Hp阴性诊断标准,用于需要确定因Hp在体内分布不均或菌量过少所致的诊断困难,主要采用呼气试验(用于Hp分布不均、移位)、Hp分离培养细菌过少、Hp特异的免疫学检测(Hp残留)。(5)因家人、配偶携带Hp引起Hp再感染与复发的鉴别困难,如果患者必须根除Hp,建议其配偶也检测Hp,如果阳性需要治疗。

4 Hp感染的处理

在Hp根除适应证的选择方面,与1999年我国对Hp若干问题的共识意见^[14]对照,我国第三次幽门螺杆菌共识会议结合欧洲Maastricht 2共识报告的意见和我国的具体情况,初步对FD者Hp阳性持根除态度,对长期使用NSAID药物者和有GERD倾向者,根除Hp不太积极,但仍支持根除。

在推荐方案方面,针对目前治疗失败的主要原因是Hp对抗生素耐药性,建议采用耐药性不明显的呋喃唑酮和RBC(雷尼替丁枸橼酸铋)。用新一代的PPI制剂也可提高疗效。

由于Hp的传播途径尚不明确,目前提示口腔内Hp的检测率也相当高,在家庭内的传播不容忽视,可能会降低根除率,但对配偶Hp的检测和治疗尚未得到公认。

5 免疫防治

Hp的感染率无明显下降,而Hp的根除治疗可能不能明显预防Hp的感染,因此免疫防治可能是重要途径。国外已做了较多的工作,但仍无可靠的Hp疫苗用于临床。在我国第三次全国幽门螺杆菌学术会议上报告,广州、上海、西安在疫苗研制上做了大量工作,以下几个方面的研究比较突出:(1)Hp抗原组分筛选,上海市消化疾病研究所进行了Hp外膜蛋白基因克隆和特性鉴定,第一军医大学南方医院对AlpA等多个黏附素基因

及其保守区进行了克隆、表达和抗原性鉴定,中山大学附一医院克隆了Hp-NAP基因,并进行了序列分析。中国疾病预防控制中心报道Hp 2-D电泳将有助于Hp抗原组分筛选。(2)免疫佐剂,上海市消化疾病研究所报道了人工合成的寡核苷酸CpG-ODN在Hp疫苗中的佐剂作用及其免疫保护机制,认为CpG是一个很有前景的佐剂。(3)Hp感染免疫预防机制,中山大学第一附属医院研究表明,无论是以减毒鼠伤寒沙门菌为载体构建的Hp疫苗,还是Hp全菌超声粉碎抗原加霍乱毒素疫苗,均诱导小鼠产生Th1型保护性免疫应答,同时对免疫后胃炎进行了探讨,发现免疫后胃炎的强弱程度与免疫宿主和攻击菌量有关,而与Hp疫苗类型及免疫途径无关。

因此, Hp疫苗研究虽然是很有前景的研究方向,但目前的进展仍很缓慢,存在的主要问题是Hp在人群中感染率太高,感染早期常免疫保护作用不够,而免疫后胃炎比较明显。在Hp免疫及损伤机制方面尚需深入研究。

6 参考文献

- 1 Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, McKenney K, Fitzgerald LM, Lee N, Adams MD, Hickey EK, Berg DE, Gocayne JD, Utterback TR, Peterson JD, Kelley JM, Cotton MD, Weidman JM, Fujii C, Bowman C, Wattery L, Wallin E, Hayes WS, Borodovsky M, Karp PD, Smith HO, Fraser CM, Venter JG. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1997;388:539-547
- 2 Alm RA, Ling LS, Moir DT, King BL, Brown ED, Doig PC, Smith DR, Noonan B, Guild BC, DeJonge BL, Carmel G, Tummino PJ, Caruso A, Uria-Nickelsen M, Mills DM, Ives C, Gibson R, Merberg D, Mills SD, Jiang Q, Taylor DE, Vovis GF, Trust TJ. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 1999;397:6715
- 3 Eidt S, Stolte M. The significance of *Helicobacter pylori* in relation to gastric cancer and lymphoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:318
- 4 Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. *Gastroenterology* 1998;115:642-648
- 5 Xia HX, Fan XG, Talley NJ. Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* and its clinical relevance. *World J Gastroenterol* 1999;5:263-266
- 6 Wu JC, Sung JJ, Chan FK, Ching JY, Ng AC, Go MY, Wong SK, Ng EK, Chung SC. *Helicobacter pylori* infection is associated with milder gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:427-432
- 7 Rokkas T, Ladas SD, Triantafyllou K, Liatsos C, Petridou E, Papatheodorou G, Karameris A, Raptis SA. The association between CagA status and the development of esophagitis after the eradication of *Helicobacter pylori*. *Am J Med* 2001;110:703-707
- 8 Pieramico O, Zanetti MV. Relationship between intestinal metaplasia of the gastro-oesophageal junction, *Helicobacter pylori* infection and gastro-oesophageal reflux disease: a prospective study. *Dig Liver Dis* 2000;32:567-572
- 9 Yerra LN, Bhasin DK, Panigrahi D, Vaiphei K, Sharma BC, Ray P. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with reflux oesophagitis. *Trop Gastroenterol* 1999;20:175-177
- 10 Morgner A, Bayerdorffer E, Neubauer A, Stolte M. Malignant tumors of the stomach. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma and *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol Clin North Am* 2000;29:593-607
- 11 Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Ito M, Masuda H, Miyamoto

- M, Tanaka S, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. *Helicobacter pylori* eradication therapy for high-grade mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas of the stomach with analysis of p53 and K-ras alteration and microsatellite instability. *Int J Oncol* 2001;18:1207-1212
- 12 Liu H, Ye H, Ruskone-Fourmesttraux A, De Jong D, Pileri S, Thiede C, Lavergne A, Boot H, Caletti G, Wundisch T, Molina T, Taal BG, Elena S, Thomas T, Zinzani PL, Neubauer A, Stolte M, Hamoudi RA, Dogan A, Isaacson PG, Du MQ. T(11;18) is a marker for all stage gastric MALT lymphomas that will not respond to *H. pylori* eradication. *Gastroenterology* 2002;122:1286-1294
- 13 Morgner A, Bayerdorffer E, Neubauer A, Stolte M. *Helicobacter pylori* associated gastric B cell MALT lymphoma: predictive factors for regression. *Gut* 2001;48:290-292
- 14 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. *中华医学杂志* 2000;80:394-395

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 征文通知 •

全国第八届中西医结合普通外科学术研讨会征文通知

由中国中西医结合学会急腹症专业委员会主办, 大连医科大学附属第一医院承办的全国第八届中西医结合普通外科学术研讨会将于 2003 年 6 月中旬在辽宁省大连市召开, 现将征文通知如下。

1 征文内容:

(1)急性及慢性胰腺炎的中西医结合基础实验研究和临床经验总结。(2)肝、胆疾病的中西医结合基础实验研究和临床经验总结。(3)梗阻性黄疸的诊断和中西医结合治疗经验。(4)肝、胆、胰腺疾病的影像学诊断及中西医结合介入治疗(5)中西医结合胃肠疾病的基础实验研究和临床经验总结。(6)有关肝胆胰腺胃肠疾病新技术、新进展的应用经验。(7)中西医结合治疗中晚期肿瘤的基础与临床研究(8)有关肝胆胃肠疾病的腹腔镜, 内窥镜诊治新技术和新方法。

2 征文要求:

(1)文章未公开发表过(包括会议及杂志)。(2)请寄 4000 字以内全文及 600 字以内摘要打印稿各一份, 摘要应包括目的, 方法, 结果和结论四部分, 不投摘要者恕不能收入汇编。(3)投稿时请附软盘, 用 word 软件输入, 注明作者姓名, 单位, 邮编并加盖公章或附单位介绍信。(4)稿件请于 2003 年 4 月 15 日前(以邮戳为准)寄至大连医科大学附属第一医院, 陈海龙教授收, 地址: 大连市中山路 222 号, 邮编: 116011。(5)欢迎网上投稿, Email: hailong_chen@x263.net。

3 本次会议将邀请著名中西医结合专家做专题讲座。中国中西医结合普通外科专业委员会将会同中国中西医结合外科杂志对全部征文进行优秀论文评选, 获奖者除参加大会交流外, 还将被授予中国中西医结合学会优秀论文证书。参会者将被授予国家级继续教育学分。

中国中西医结合学会普通外科(急腹症)专业委员会

2003-03-08

肠镜检查在早期大肠癌诊断中的重要作用

张亚历,周殿元

张亚历,周殿元,中国人民解放军第一军医大学南方医院 广东省广州市 510515
项目负责人:张亚历,510515,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学南方医院. zhangyl@fimmu.com
电话:020-61641531 传真:020-87705671
收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-12-16

张亚历,周殿元. 肠镜检查在早期大肠癌诊断中的重要作用. 世界华人消化杂志 2003;11(5):640-642

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/640.htm>

0 引言

大肠癌(colorectal cancer)是指大肠黏膜上皮在环境或遗传等多种致癌因素作用下发生的恶性病变,预后不良,死亡率较高. 随着人民生活水平的提高,高脂肪、高蛋白、低纤维素饮食可能是我国大肠癌发病率逐年增高的主要原因^[1-3]. 现在,大肠癌已成为我国常见的恶性肿瘤之一. 一般认为绝大多数大肠癌的发生来源于腺瘤的癌变^[4],部分直接起源于大肠正常黏膜生发中心的干细胞即 de novo 癌,如 IIc 病变等(图 1). 上述病变各阶段均可通过内镜检查发现. 内镜检查在大肠癌的诊断中具有目前各种影像学无法代替的优势,其重要原因之一是内镜检查不仅能直观地发现大肠黏膜早期病变,并且能借助活检对病变进行组织学评价. 目前,肠镜检查已普遍在基层医院开展,但许多医师注重的是内镜插镜技巧而忽视了黏膜病变的检查方法,影响了大肠癌早期病变的检出率.

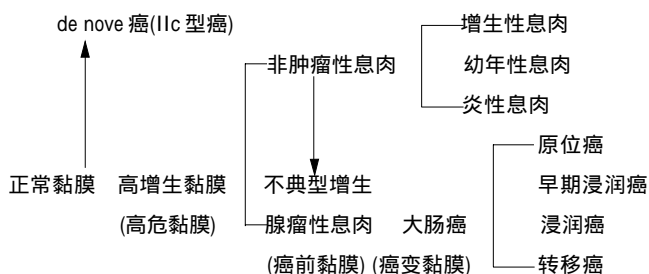


图 1 大肠癌癌变组织的形成过程

1 熟悉大肠癌内镜下形态特点,注意发现早期病变

大肠癌可发生于大肠各段,但以左侧结肠,尤以直肠和乙状结肠多见,可能由于该肠段肠内容物水分被吸收,其中致癌物质浓度过高,且停留时间较长所致. 大肠癌多为单发癌,约 5% 为多发癌. 多发癌分为同时性多发癌与异时性多发癌^[5],前者指大肠内同时存在 2 个以上的癌肿(2 个以上癌肿同时发现或在 6 mo 内相继发现),

后者则指大肠中先后出现 2 个以上癌肿(超过 6 mo 再次发现的肿瘤). 内镜下发现的大肠癌病变以进展期居多,该类型癌形态多典型,表现为黏膜隆起性肿瘤、溃疡、肠壁僵硬、狭窄等病变,一般多按 Borrmann 分类^[7]: Borrmann 1 型为息肉隆起型癌,肿瘤主要向肠腔内生长,常呈菜花样. 该型癌多见于右侧结肠,其原因可能为右侧结肠肠腔宽大,且肠内容物较稀薄,癌肿较易向肠腔内生长发展之故. Borrmann 2 型为溃疡型癌,以癌肿形成较大的溃疡为特征,周边呈结节状围堤,望之如火山口状. Borrmann 3 型癌为浸润溃疡型,该型最常见,因癌肿向肠壁浸润而致隆起性肿瘤境界欠清楚,表面形成溃疡. Borrmann 4 型癌为浸润型癌,多发生于左侧结肠,尤以直肠、乙状结肠为多. 癌细胞向肠壁各层弥漫浸润使肠壁增厚,可累及肠管全周. 其他如胶样癌、黏液癌,内镜下可见肿瘤内有大量的胶冻样黏液,多见于升结肠及盲肠.

大肠早期癌是指癌浸润仅限于黏膜下层. 临床上发现的早期癌以息肉隆起型居多,常见为腺瘤性息肉,尤其是绒毛状腺瘤癌变(息肉癌变若蒂部无浸润均属于早期癌)^[1,6]. 表浅型癌较少见. 根据黏膜形态又分为 IIa、IIb 和 IIc 病变,部分表现为 IIa+IIc 混合型^[7]. IIa 型为扁平隆起型,黏膜轻度隆起或呈分叶状. IIb 型为表面平坦型,黏膜轻度发红或退色,无黏膜隆起或凹陷,该型较少见,内镜下也不容易诊断. IIc 型为表面凹陷型,黏膜呈浅表糜烂或溃疡. 若黏膜在隆起的基础上伴溃疡者称 IIa+IIc 型或 IIc+IIa 型,大体如小盘状,边缘隆起,中心凹陷. 工藤进英^[8]描述了一组以表浅黏膜侧向生长为特征的大肠肿瘤(lateral spreading tumor, LST),根据其表面形态,是否有分叶或结节进一步分为颗粒型和非颗粒型,这类病变实质上多属于 IIa 型或 IIa+IIc 型病变. 一些学者将黏膜肌层与固有肌层之间的黏膜下层按等距离分为三份,根据癌细胞在黏膜下的浸润深度将黏膜下癌(sm 癌)区分为三个亚型,据称 sm 1 型癌一般无癌转移,而 sm 2 和 sm 3 型癌则有转移的可能,这些为临床处理提供了参考. 关于大肠早期癌的结肠镜检出率,根据多田正大 et al^[9]所在医院,1985/1996 年间从 10 357 例大肠腺瘤中检出早期癌 961 例,检出率为 9.3%. 按肉眼形态类型不同,各型早期癌检出率及 sm 癌检出率见表 1.

表 1 1 0357 例不同类型腺瘤早期癌与 sm 癌检出率

肉眼类型	n	早期癌		sm 癌	
		n	(%)	n	(%)
p, sp, s	5 863	647	11.0	128	2.2
a(+dep), b	3 925	82	2.1	6	0.2
LST	293	120	41.0	26	8.9
a + c	163	69	45.1	42	27.5
c, c + a	123	43	35.0	28	22.8
合计	1 0357	961	9.3	230	2.2

近年来结合黏膜染色及放大内镜检查,可提高早期大肠癌的检出率.采用 0.4%靛胭脂内镜下喷洒可将病变的范围及表面形态清楚的显示出来,然后采用放大电子结肠镜对大肠腺管开口形态(pit pattern)进行评价.仔细观察,判断大肠腺管开口的类型,通过分类可以对肿瘤性病变和是否为黏膜癌或黏膜下癌可以作出大致的判断.通常将大肠腺管开口形态分为五型:Ⅰ型为圆形,是正常黏膜的腺管开口;Ⅱ型呈星芒状或乳头状,其组织学表现为增生性病变.Ⅲ_L型腺管开口呈管状或类圆形,比正常腺管开口大,病理组织学为腺瘤,多为隆起样病变;Ⅲ_S型腺管开口呈管状或类圆形,比正常腺管开口小,此类腺管开口多发生于凹陷型肿瘤即Ⅱc病变,病理组织学为腺瘤或早期大肠癌;Ⅳ型腺管开口呈分支状、脑回状或沟纹状,病理组织学为绒毛状腺瘤;Ⅴ_A型腺管开口排列不规则,开口大小不均,多数为早期癌;Ⅴ_N型腺管开口消失或无结构,该型皆为浸润癌.

此外,要注意吻合部复发癌的早期发现,该型癌常需病理活检组织学检查确认.内镜下主要表现为吻合部隆起性肿物,伴充血、水肿、糜烂及出血,并有脓性渗出物附着,吻合口常形成狭窄^[12].超声内镜示肠壁低回声肿块影,管壁层次不清,结构破坏.组织病理学检查可见明显异型的癌性腺体,但肠壁深层组织的复发癌病理取材不容易成功.应注意的是临床上常遇见吻合口未见复发而出现肠外复发转移的情况.

2 掌握内镜检查技巧,特别是注意内镜活检的应用

2.1 肠镜检查时注意避免遗漏病变

内镜检查不仅能检视肿瘤大小、形态、部位、活动度,且能行息肉或早期微小癌灶切除,对可疑病灶能取组织进行活检,因此是目前大肠癌诊断最有效的手段.肠道的清洁程度是结肠镜检查成败的关键之一.服泻剂致泻最为有效,如未泻而清洁灌肠,即使高位灌肠 3-4 次,也常于右侧结肠,尤其升结肠积有粪便,影响进镜与观察病变.结肠镜检查过程中,要注意多发性大肠癌和大肠癌根治术后复发的病例,不仅要仔细观察吻合部,而且又要进行全结肠的观察.注意防止退镜观察时,横结肠、乙状结肠段皱缩在镜身上的肠袢未及观察,一大段肠管突然脱离镜身退

向远方,以致遗漏病变;在这些肠段应缓缓退镜并采取退退进进的方式,使迭聚的肠袢一小段一小段地脱离镜身.

2.2 病理活检是内镜定性诊断的金标准,但不适合对预后的评估

内镜活检对于确定大肠癌尤其是早期癌和息肉癌变以及对病变鉴别诊断有决定性意义^[6].他不仅可明确肿瘤的性质、组织学类型及恶性程度,而且可判断预后,指导临床治疗.绝大多数大肠癌为腺癌,其中乳头状腺癌和高、中分化腺癌多见,均为分化型癌,临床预后较好.此外尚可见到黏液细胞癌、印戒细胞癌、未分化癌、腺鳞癌及鳞状细胞癌等.其中黏液细胞癌、低分化腺癌、印戒细胞癌、未分化癌属于分化不良型癌,临床预后较差.腺鳞癌及鳞状细胞癌主要见于直肠下段近肛管部.但是内镜下的活检对癌肿组织分化程度的判断常有误差,因此用于临床预后的评价,指导意义不大.

2.3 术前肿瘤浸润深度的评估主要依赖超声内镜(EUS)检查

EUS可在内镜观察病变的基础上了解消化管管壁各层次的组织学影像特征及周围邻近重要脏器的超声影像^[13].对判断病变的浸润深度、有无邻近脏器的侵犯以及周围有无肿大淋巴结等准确率较高.大肠癌的基本影像学表现为低回声肿瘤图像;肠壁一层或多层结构不清、消失、扭曲、中断或增厚;不规则的低回声影突入肠腔内外或位于肠壁内形成肿块;周围器官和淋巴结受侵.EUS可显示黏膜面及黏膜以下各层组织的变化,可据此判断癌的浸润深度,是以往各种检查方法难以做到的.其影像特征:(1)黏膜内癌(m 癌),病变局限在第 1、2 层内,表现为第 1 层不平或隆起突出,第 2 层低回声带中可见点状回声或中位回声肿块,第 3 层以下无异常改变;(2)黏膜下层癌(sm 癌),癌组织浸润达黏膜下层时可以看到第 3 层强回声带出现不整、薄层化及断裂破坏图像;(3)固有肌层癌(pm 癌),第 3 层中断,第 4 层不齐、断裂,而第 5 层看不到变化;(4)浆膜层癌(ss, s 癌),指浸润达浆膜或外膜,但还没有浸润到其他脏器的癌.此时肠壁全层被破坏,表现为第 3、4 层中断,第 5 层不整及中断像,但与邻接脏器的边界呈对比鲜明的图像.当浸润毗邻脏器时,边界模糊不清.EUS 诊断大肠癌和评价术前分期较 MRI 和 CT 有更高的准确性,但对肝脏、腹膜等远隔部位的转移,由于 EUS 的穿透深度有限,因此难以作出正确判断,必须与 CT、MRI 配合应用.

2.4 早期癌诊断必须要有病理学检查为依据,但黏膜活检不能诊断早期癌

由于黏膜染色、放大内镜、超声内镜等已用于内镜下大肠黏膜的观察,改善了大肠黏膜早期病变的检出率,然而诊断早期癌必须要以病理学检查为依据^[16].内镜下黏膜染色有助于发现微小黏膜病变和病变范围,但不能诊断大肠癌,这是因为这种染色在癌变黏膜和炎症黏膜间并无特异性.放大内镜及黏膜标本解剖显微镜(实体显微镜)观察有助于大肠癌的辅助诊断,

然而,这也只是一种发现黏膜早期病变而不是确诊的方法.因为任何临床病例的诊断都是个体化诊断,虽然一些大肠癌在放大内镜或解剖显微镜下有一些特征性的改变,例如在解剖显微镜下,黏膜隐窝的表面形态(pit pattern)呈 IIIs 和 V 型者常是早期癌特征性改变,但对每一个具体的病例,任何大体的形态改变均有例外,确诊必须要以病理学检查为依据.超声内镜,尤其是 20 Hz 超声内镜及其超声探头的开发,使其对黏膜病变的辨别能力大大提高.虽然该项检查能发现黏膜增厚等早期病变,但不能进行定性诊断,因为影像学诊断恶性病变是以肿物对周围脏器的浸润或转移为依据,而局限于黏膜内的早期癌并无浸润转移的恶性行为.因此对于黏膜内的低回声肿块病变不能单纯依靠超声内镜进行确诊.

2.5 注意异型增生与癌变的关系,掌握早期癌的诊断标准.内镜活检并不能观察肿瘤的浸润深度,因此不能诊断早期癌.目前,只有两种组织材料适合进行早期癌的诊断^[1]:一是外科切除的手术标本,可对整个病变组织进行观察;二是内镜切除的肿瘤标本,如隆起性病变的圈套电凝切除、扁平病变的黏膜剥离切除等,可对切除组织进行全瘤活检.国内检出的早期癌绝大多数为息肉癌变.由于大肠息肉的形成从组织学上主要涉及黏膜及黏膜下层组织向肠腔的突起,因此,息肉癌变均属于早期癌的范畴.但诊断时必须有个前提,即息肉癌变组织无蒂部的受累.内镜活检进行组织病理学诊断常忽视活检组织的包埋切片方向,诊断时并不重视蒂部或切除残端.如果内镜下病变切除的标本,不能观察蒂部瘤细胞浸润情况,不能诊断早期癌.如果息肉癌变组织,发现蒂部或切除端有癌细胞浸润,则这种息肉癌变为进展期病变,病理活检报告应明确注明“蒂部发现癌细胞,建议考虑手术治疗”.

大肠早期癌的内镜活检诊断目前缺乏统一的标准^[14].由于活检取材较为局限,不能全面观察病变形态,故内镜活检诊断“早期癌”较为慎重.主要原因是活检标本中,腺体的不典型增生与腺体癌变有时不易区分,二者的根本区别是癌细胞的侵袭行为,但内镜活检取材组织小,有时早期癌只能观察到异型性而无癌

细胞侵袭表现.因此在活检组织病理诊断上,应特别注意如下癌细胞的特征:(1)细胞核圆形或不规则形,明显增大浓染,占据胞质大部分,核仁明显;(2)结构异型的腺体,出现腺上皮的不规则或突然中断;(3)异型腺体呈单个散在、条状或团块状生长;(4)黏膜间质中出现散在分布含黏液的异型细胞;(5)腺上皮出现共壁或筛状增生;(6)活检坏死组织中出现畸形浓染的细胞核.过去所谓的“原位癌”是指细胞异型明显但仍局限于腺上皮层内未突破基底膜的病变,相当于重度不典型增生.从细胞生物学特性来看,原位癌不是真正意义上的“癌”,因为癌的本质是瘤细胞出现浸润转移恶性行为.癌细胞浸润首先表现为突破腺体基底膜的生长,若异型腺体突破上皮层的基底膜但局限于黏膜层内,此时称黏膜内癌(m癌).内镜活检诊断应废弃“原位癌”的诊断,因为不典型增生的基本改变是以局限于腺上皮层内的细胞异型为特征,细胞异型程度只是评价不典型增生程度的依据.若在这些分类系统中,再区分出原位癌的诊断,在病理判断上与不典型增生区别十分困难,势必造成癌诊断标准和统计材料的极不一致.此外,由于原位癌与重度不典型增生在治疗模式上并无差异,内镜下可完全治愈,因此报告为“重度不典型增生”更有益于患者对临床诊治模式的选择及减少不必要的心理负担.

3 参考文献

- 1 Zhang YL, Zhang ZS, Wu BP, Zhou DY. Early diagnosis for colorectal cancer in China. *World J Gastroenterol* 2002;8:21-25
- 2 张振书,张亚历.中国大肠癌研究进展. *世界华人消化杂志* 2001;5:489-494
- 3 靖大道,张亚历,李世荣,王振宇.中国结直肠癌的人群筛查与监测现状. *胃肠病学* 2001;6:244-247
- 4 张亚历,张振书主编. *大肠癌的基础与临床*.第1版.上海:上海科技文献出版社,1999:1-39
- 5 张立力,张振书,张亚历,周殿元.胃肠道多原发恶性肿瘤35例分析. *中华内科杂志* 1999;38:88-90
- 6 张亚历.大肠息肉癌变的内镜活检诊断. *中华消化内镜杂志* 1999;16:188-200
- 7 张亚历. *胃肠疾病的内镜、组织病理与超声内镜诊断*.第1版.北京:军事科学出版社,2000:119-220
- 8 工藤进英. *早期大肠癌 - 平坦・陷凹型へのアプローチ*.第1版.东京:医学书院,1993:26-54
- 9 多田正大. *早期大肠癌内视镜ハンドブック*.第1版.东京:中外医学社,1997:69-77

超声内镜检查在胃肠疾病中的临床应用

郭文

郭文,中国人民解放军第一军医大学南方医院 广东省广州市 510515
项目负责人:郭文,510515,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学南方医院. guow@21cn.com
电话:020-61641535 传真:020-87280770
收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-12-18

郭文. 超声内镜检查在胃肠疾病中的临床应用. 世界华人消化杂志 2003;11(5):643-645

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/643.htm>

0 引言

超声内镜检查(endoscopic ultrasonography, EUS)是经内镜(胃镜、结肠镜、腹腔镜等)导入高频微型超声探头,通过体腔在内镜直视下对消化管管壁或邻近脏器进行超声扫描的方法.由于探头可以接近病变,探头频率可大大提高,使图像分辨率明显提高;同时,在消化管管腔内进行超声扫描,可避免皮下脂肪、肠腔气体和骨骼系统对超声波的影响和干扰,获得清晰的消化道管壁的层次结构和周围邻近脏器的超声影像,被称为胃肠道内镜学中最为精确的影像技术^[1].EUS的适应证广泛,凡是消化管本身或邻近器官的病变或疑有病变,经普通内镜及体表超声不能明确诊断者,都可以进行超声内镜检查.他对某些消化系统疾病尤其肿瘤有较高的诊断价值,且可以判定肿瘤管壁浸润深度、有无邻近脏器的浸润及淋巴结的转移等,为外科手术提供重要的术前资料,也为黏膜下病变的定性诊断提供了最佳方法.同时,在EUS引导下通过内镜直视下可进行深层组织脏器的穿刺活检及治疗.目前EUS已成为消化系疾病的重要诊断方法.

1 仪器的类型及性能

常规的超声内镜是将探头置于内镜端部,外配水囊,注入无气水后可直接探查,此类探头直径约10 mm.超声频率为7.5-20 MHz.另一类为微型超声探头(sonoprobe, ultrasonic probe, USP),直径仅1.8-2.4 mm,探头从内镜活检钳道伸至靶器官,可与常规内镜检查同时进行超声扫描,且易通过狭窄部位,并可伸入胆、胰管等小管道探查,又称管内超声(intraductal ultrasonography, IDUS).USP的超声频率为7.5-30 MHz,分辨率较高.

超声扫描有线阵式扫描及环形扫描两类,前者能定向作90-120°线性扫描,扫描方向与内镜镜轴相平行,主要用于EUS引导下的细针抽吸术(endoscopic ultrasonography guided fine-needle aspiration, EUS-FNA),可以观察及追踪穿刺的细针,同时结合多普勒信号

(endoscopic color doppler ultrasonography, ECDUS)显示血液的方向、流量与速度,可提高FNA的安全性,并适用于心脏与血管病变的检查.后者扫描方向与内镜镜轴相垂直,作360°旋转环形扫描,扫描范围广、操作简便,能清楚显示消化管壁各层次结构而应用更为广泛.

三维内镜超声^[2](3D EUS和3D IDUS)可连续获取多个断层切面,可构建三维图像,更有效的了解脏器的相互关系以及病变的体积、位置与范围等特性,通过体积的测量,更能评估治疗的有效性.

2 正常消化管及脏器 EUS 的图像特点

EUS扫描时,正常消化管管壁从里至外可显示为高-低-高-低-高五层回声结构,分别对应于黏膜层表面与腔内液体界面的反射(高回声带)、黏膜肌层(低回声带)、黏膜下层(高回声带)、固有肌层(低回声带)、浆膜下层和浆膜(或外膜)层(高回声带).正常食管壁厚度约3.1-3.3 mm,胃壁厚度 3.7 ± 0.6 mm,十二指肠壁厚度约3 mm,结肠壁厚约2.75 mm.

3 胃肠道的恶性病变

3.1 胃肠道癌肿的超声内镜表现 消化道癌肿的EUS影像均表现为不规则的低回声或中位回声(低于第3层高于第2、4层回声)肿块影,伴局部或全部管壁结构层次的破坏.EUS下管壁的5层结构中,第4层低回声带(固有肌层)是划分早期癌与进展期癌的分界线.如果第4层有病变,则提示进展期癌.EUS对Borrmann型浸润型胃癌有很高的诊断能力.该型胃癌的声像图表现为:大部分或全胃壁弥漫性增厚,多在1 cm以上;为全层增厚,黏膜下层及固有肌层尤明显,回声减弱.增厚的胃壁并无明显结构紊乱,其层次尚可辨认.部分病例黏膜层及黏膜肌层已破坏脱落,扫描仅见3层结构,最表面的即为黏膜下层.南方医院对136例胃癌患者进行EUS检查,此型胃癌36例,EUS均诊断正确,其中12例(33.3%)多次内镜活检未发现癌细胞^[3,4].

腔外组织受浸表现为管壁第4、5层回声带分辨不清,不易分辨低回声的肿瘤组织与外界组织,或低回声肿块突破第5层高回声带侵入外周组织.癌周淋巴结转移可表现为圆形、边界清楚的低回声结节.

3.2 肿瘤术前超声内镜分期 肿瘤浸润深度及淋巴结转移与手术治疗效果及预后密切相关.正确的术前分期有助于确立消化道癌肿的手术术式.例如对EUS确诊直径

< 2 cm 的黏膜内癌, 有可能经内镜黏膜剥离切除术或激光照射法而治愈, 而对于确诊已有周围脏器浸润(尤其是大血管、心包、气管等)或转移的晚期病例可避免不必要的开胸、剖腹探查术。

大量研究表明, EUS对消化道癌肿的术前局部分期十分准确和简便, 优于CT和磁共振(MIR)等其他方法^[5-7]。根据21个中心的研究报告^[1], EUS对食管癌T分期的准确率为84%(1154例), 对胃癌分期总准确率为67-91%^[8], 对结直肠癌正确率达78-89%^[7-10]。南方医院对278例胃癌患者行EUS检查, T分期准确率为85.7%, 其中T1-T4期诊断正确率分别为96.3%、85.4%、73.5%和89.4%。进一步的研究发现, EUS的术前分期与细胞生物学行为有良好的相关性^[3,11-15]。

研究表明, EUS对肿大淋巴结的显示率较高, EUS能发现直径3-5 mm以上肿大的淋巴结。但对转移性淋巴结与炎症反应肿大的淋巴结鉴别较困难。大多数学者^[16,17]将淋巴结回声类型、边界及大小作为主要的判断标准, 认为转移性淋巴结多为圆型、类圆形低回声结构, 回声值与肿瘤组织相似或更低, 边界清晰, 内部回声均质或不均质, 短轴半径 10 mm; 而非特异性炎性肿大的淋巴结常呈高回声改变, 边界模糊, 内部回声均匀。在EUS引导下穿刺活检将有助于提高判断的准确率。

由于穿透深度的限制, EUS评价远处转移(M分期)的能力有限, 必须与CT、MRI配合应用。

3.3 超声内镜对胃肠癌术后复发的诊断 胃肠癌术后的局部复发非常常见。一些吻合口复发可能由内镜及活检诊断, 但是很多复发病灶只出现在黏膜下或浆膜层, 普通内镜无法观察到; 术后组织解剖结构变化, 胃肠造成的伪差使CT等其他影像学检查很难作出准确的判断; 而此时EUS的检查灵敏度高达95%, 特异性仍有80%。术后患者, 吻合口上下的管壁有5层组织可见, 吻合口处只有3层, 内外两层均为高回声线, 中间为相对较厚的低回声。全壁厚 6 mm, 吻合口光滑。局部复发时, 吻合口处可显示结节性低回声或形成不规则增厚 > 7 mm以上。EUS假阳性也与术后纤维疤痕及炎症反应有关。

3.4 胃淋巴瘤的超声内镜检查 胃肠道为原发性结外淋巴瘤最常见的发病部位。胃淋巴瘤较胃癌预后好。如果术前诊断明确并实行恰当的手术治疗, 胃淋巴瘤可获得相当好的预后。然而胃恶性淋巴瘤诊断较为困难, 胃镜与X线检查易与胃巨大皱襞症相混淆, 活组织检查难于取得病理学依据, EUS检查可提供较可靠的依据。因胃淋巴瘤在胃壁内浸润呈水平向生长, 有别于胃癌呈垂直向生长, 病变多局限于第2-3层。早期胃淋巴瘤EUS特征为第2-3层结构异常增厚, 但各层次仍保持原有的特征。进展期则表现为胃壁显著增厚, 胃壁原有层次消失而代之以不规则低回声。若化疗有效, 仍可恢复原有胃壁层次。此外, EUS也是胃淋巴瘤术前分期的一个非常有用的工具。他不仅可判断肿瘤浸润深度

和局部扩散, 还可显示自病变部位向正常胃壁的移行。Caletti et al^[18]对82例原发性胃淋巴瘤患者进行了EUS, 诊断准确率为97%, 敏感率为93%, 特异性为98%。对淋巴瘤浸润深度的诊断准确率为87%。

4 其他胃肠病变

4.1 黏膜下肿瘤的超声内镜检查 EUS是目前诊断消化道黏膜下肿瘤的最佳方法。他可提供有关这些病变的部位、大小和性质(实性或液性)准确的资料。根据肿瘤与管壁层次及其回声特征尚可提示组织学诊断^[9,19], 如在第4层(肌层)显示边界清楚的低回声, 应考虑平滑肌瘤, 平滑肌瘤多表现为内部回声均匀的低回声像。平滑肌肉瘤则表现为内部回声不均匀、混有无回声部分, 边缘凹凸不平并向周围组织浸润。在第3层(黏膜下层)显示边界清楚规则的无回声区, 多是黏膜下囊肿; 如为边界整齐、清晰的、均匀一致的高回声, 多为脂肪瘤; 黏膜下层低回声可见于:(1)异位胰腺;(2)纤维瘤;(3)平滑肌瘤或肉瘤;(4)类癌。其鉴别点有: 异位胰腺边界不清, 表面可有乳头样突起, 回声程度比平滑肌瘤高, 比脂肪瘤低, 内部回声粗糙杂乱、有不规则管状或点状回声混杂; 纤维瘤为边界不清、不规则的低回声, 多位于黏膜下层及肌层之间; 平滑肌瘤或肉瘤能显示与黏膜层和固有肌层的连续关系, 且有类似肌层的低回声; 类癌显示为边界清楚、与固有肌层位于同水平的均匀的低回声。

EUS可辨认黏膜下肿瘤中的血管结构及血管源性肿物, 而避免进行穿刺或活检。另外, EUS可精确地鉴别黏膜下肿瘤与消化管管外的生理性压迫(主动脉、肝、胆、脾、肾等)及病理性压迫(肿瘤、囊肿), 其准确率达90%以上。消化管壁内肿瘤的起源及位置必与管壁5层结构中的某一层有关, 壁外压迫则发生在消化管管壁第5层者高回声结构的外侧, 显示管壁的5层结构完整及其壁外的肿物或器官压迫消化管壁。

4.2 胃巨大皱襞的超声内镜检查 胃巨大皱襞可为一些良性和恶性病变共同具有的特点, 因此准确地判断他们的性质非常重要。由于其活检通常为阴性, 故常规胃镜诊断胃巨大皱襞经常很困难。EUS可详细观察胃壁的不同层次, 准确地判断哪一层次增厚以及层次结构的完整性, 因而EUS对于评价胃巨大皱襞的患者非常有用^[20]。EUS不仅可观察胃巨大皱襞的结构, 而且有助于鉴别良、恶性病变。EUS显示仅有第2层胃壁增厚时, 可能为Ménétrier's病; 如仅为第3层异常增厚, 应怀疑海异尖线虫病。多数硬癌表现为第3层和第4层异常增厚。第2、3层增厚可出现于伴有单纯大皱襞的健康人, 也可出现于胃淋巴瘤。第4层异常增厚仅见于恶性病变。另外, EUS检查可避免对有可能出血的胃曲张静脉做活检。为作出最后诊断, 在排除因壁内血管引起胃壁增厚之后, 必须将EUS和内镜活检(常规钳夹或大块活检)结合应用。

4.3 消化性溃疡的超声内镜检查 EUS 能够显示胃壁的各个层次,可提供X线和内镜检查不能明确的溃疡的内部结构图像和胃壁结构变化的视觉信息,从而能够客观判断溃疡的深度及其治愈的难易性。消化性溃疡的EUS图像表现为:溃疡组织破坏层的回声中断,溃疡基底表面的白苔呈高回声,称为白苔回波,溃疡基底的深处表现为低回声,称为溃疡回波。随着溃疡活动期趋向愈合,白苔回波逐渐不明显,同时溃疡回波缩小,最终消失。愈合期纤维化的回声为高回声。在溃疡瘢痕中,可看到第2层和第4层融合。溃疡的边缘不规则,其周围组织肿胀呈低回声增厚。溃疡有时破坏邻近结构,以致分层不清,此时不能区别炎性病变或浸润性恶性肿瘤。

根据胃黏膜断裂的层次来判断胃溃疡的深度:限于黏膜下层的溃疡(UI-),EUS断层可见第1、2层缺失;深达肌层的溃疡(UI-),第1-3层缺失;穿透肌层的溃疡(UI-)图像为第1-4层缺失。深达或穿透肌层的溃疡可见到第2层和第4层的聚拢,这与组织学的黏膜肌层和固有肌层融合的表现一致。

4.4 门脉高压症的超声内镜检查 EUS 比腹部超声、血管造影、彩色多普勒等检查能更好地观察到门静脉系统的大部分。运用幅射型扫描超声内镜,在正常人和门脉高压症患者均可见到奇静脉、脾、肠系膜及门静脉,而胃、食管静脉曲张和胃及食管周围侧枝静脉则仅见于门脉高压症患者。EUS对食管、胃底静脉曲张的检出率分别为67%和100%^[21]。表现为黏膜及黏膜下层无回声或低回声的管腔图像,呈圆形、椭圆形或长形,其管壁较正常静脉明显变薄。另外,在门脉高压性胃病患者,EUS可观察到胃壁内扩张的小血管。

高频微小超声探头的应用,可避免曲张的静脉受到常规EUS探头周围水囊的压迫,从而更易于检出食管静脉曲张。微探头也用于观察静脉曲张结扎疗法后结扎部位及周围区域的随时间而变化的情况。结扎3min后,结扎部位由无回声区变为高回声区,其原因可能为这些部位血栓形成。

5 参考文献

- 1 Caletti G, Fusaroli P. Endoscopic ultrasonography. *Endoscopy* 1999;31:95-102
- 2 Sumiyama K, Suzuki N, Kakutani H, Hino S, Tajiri H, Suzul H, Aoki T. A novel 3-dimensional EUS technique for real-time

- visualization of the volume data reconstruction process. *Gastrointest Endosc* 2002;55:723-728
- 3 郭文,张亚历,陈村龙,潘德寿,周殿元. 胃癌的超声内镜影像学特征及术前分期的研究. *中华超声影像学杂志* 1998;7:326-329
- 4 郭文,张亚历,张振书,陈村龙. 内镜活检与超声内镜对弥漫浸润型胃癌诊断价值的探讨. *中华消化内镜杂志* 2001;18:224-225
- 5 Guo W, Zhang YL, Li GX, Zhou DY, Zhang WD. Comparison of preoperative TN staging of gastric carcinoma by endoscopic ultrasonography with CT examination. *China Natl J New Gastroenterol* 1997;3:242-245
- 6 Wakelin SJ, Deans C, Crofts TJ, Allan PL, Plevris JN, Paterson-Brown S. A comparison of computerised tomography, laparoscopic ultrasound and endoscopic ultrasound in the preoperative staging of oesophago-gastric carcinoma. *Eur J Radiol* 2002;41:161-167
- 7 Meyenberger C, Wildi S, Kulling D, Bertschinger P, Zala O, Klotz HP, Krestin GP. Tumor staging and follow-up care in rectosigmoid carcinoma: colonoscopic endosonography compared to CT, MRI and endorectal MRI. *Schweiz Rundsch Med Prax* 1996;85:622-631
- 8 Rosch T. Endosonographic staging of gastric cancer: a review of literature results. *Gastrointest Clin North Am* 1995;5:549-557
- 9 郭文,张亚历,张振书,陈村龙,潘德寿,周丹. 内镜超声检查对大肠隆起性病变的诊断价值. *中华超声影像学杂志* 2001;10:396-398
- 10 Tseng LJ, Mo LR, Thian LT, Jao YT. Pre-operative staging of recto-sigmoid colon carcinoma by upper gastrointestinal endoscopic ultrasonography. *Hepatogastroenterology* 1999;46:891-893
- 11 郭文,张亚历,周殿元,张万岱. 胃癌病变术前超声内镜检查分期与p53基因突变的关系. *世界华人消化杂志* 1999;7:1094-1095
- 12 郭文,张亚历,周殿元. 胃癌术前内镜超声检查分期与细胞增生和凋亡关系的探讨. *中华消化内镜杂志* 1999;16:300-302
- 13 郭文,张亚历,吴保平,张立力,孙勇,周殿元. 胃癌病变术前内镜超声检查分期与其细胞增生力学的关系. *中华消化内镜杂志* 1998;15:204-207
- 14 郭文,张亚历,邱红明,吴保平,张立力,周殿元. 胃癌超声内镜分期与微小卫星DNA不稳定性关系的研究. *中国癌症杂志* 1999;9:4-6
- 15 郭文,张亚历,吴保平,张立力,孙勇,周殿元. 胃癌术前超声内镜分期与转移相关基因表达的同步检测分析. *中国胃肠外科杂志* 1998;1:106-109
- 16 Tio TL, Kallimanis GE. Endoscopic ultrasonography of perigastrointestinal lymph nodes. *Endoscopy* 1994;26:776-779
- 17 Hulsmans FH, Bosma A, Mulder PJ, Reeders JW, Tytgat GN. Perirectal lymph nodes in rectal cancer: in vitro correlation of sonographic parameters and histopathological findings. *Radiology* 1992;184:553-560
- 18 Caletti G, Ferrari A, Brocchi E, Barbara L. Accuracy of endoscopic ultrasonography in the diagnosis and staging of gastric cancer and lymphoma. *Surgery* 1993;113:14-27
- 19 Shen EF, Arnott ID, Plevris J, Penman ID. Endoscopic ultrasonography in the diagnosis and management of suspected upper gastrointestinal submucosal tumours. *Br J Surg* 2002;89:231-235
- 20 Songur Y, Okai T, Watanabe H, Motoo Y, Sawabu N. Endosonographic evaluation of giant gastric folds. *Gastrointest Endosc* 1995;41:468-474
- 21 Tio TL, Kimmings N, Rauws E, Jansen P, Tytgat G. Endosonography of gastroesophageal varices: evaluation and follow-up of 76 cases. *Gastrointest Endosc* 1995;42:145-150

老年期消化道出血的鉴别诊断与治疗措施

宋卫生,杨希山

宋卫生,杨希山,中国人民解放军第一军医大学珠江医院消化科
广东省广州市 510282
项目负责人:宋卫生,510282,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学珠江医院消化科.
电话:020-61643170
收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-12-08

宋卫生,杨希山. 老年期消化道出血的鉴别诊断与治疗措施. 世界华人消化杂志 2003;11(5):646-648
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/646.htm>

0 引言

近年来医疗技术的发展突飞猛进,重症监护病房的建立,尖端的血流动力监护仪,内镜和血管造影技术不断进展.但消化道出血的死亡率居高不下,上消化道出血的死亡率自1960年代以来一直10%左右^[1].研究表明,这与社会人口老龄化有关,先进治疗提高的生存率被增加的高危老年期患者所抵消.英国一个资料显示^[2],1550万人口中,上消化道出血的死亡率达14%,但60岁以下,并不伴有恶性疾病及器官衰竭的人仅占0.6%.据统计^[3],80%以上的老年人至少患有一种疾病,大多数还患有2种以上疾病.老年期消化道出血的高危性在很大程度上取决于伴随其他疾病而出现的并发症,如心肌梗塞,吸入性肺炎,肺水肿,脑血管病和肾功能不全等.应予高度重视.

1 上消化道出血

老年期上消化道出血最常见的病因仍为酸相关疾病,国外报道占70-91%^[4-6],国内79.96-85.2%^[7,8].其中消化性溃疡并出血的发病率最高,占一半以上.与中、青年患者不同的是胃溃疡出血的比例明显增多,而且溃疡的位置上移,面积增大,出血前疼痛模糊,被腹胀、纳差、恶心、呕吐等症状所代替.食管炎、胃炎、十二指肠炎出血发生率亦高于中青年患者,可能与服用NSAID和心、脑血管药者较多有关.酗酒者显著减少.究其原因,可能与老年期黏膜血流量下降,上皮细胞更新减慢,以及药物作用,屏障功能减弱有关.

其次为上消化道肿瘤占10%左右,以胃癌多见.多表现为出血量不大,但贫血症状明显,与出血量不相称.纳差、消瘦症状明显.胃平滑肌瘤的出血量往往大于其他良、恶性肿瘤.

其他老年期上消化道出血的病因应为dieulafoy病和血管畸形.如遗传性毛细血管扩张、动静脉畸形.dieulafoy病全消化道均可见到,但以胃最多见,临床上并不罕见.血管畸形国外报道高于国内.但血管畸形无任何先兆

症状,据此可与其他疾病相鉴别.

门脉高压性食管、胃底静脉曲张破裂出血和贲门撕裂(mallory-weiss tears)较中青年明显减少,因病史和临床表现比较明确,鉴别诊断不难.较为罕见病因,如钩虫病引起的上消化道大出血,我们曾见1例65岁男性郊区农民,因解大量黑便,血色素降至38 g/L,最后在手术台上用结肠镜检查证实十二指肠第三段大量钩虫寄生而致黏膜糜烂大出血.

2 下消化道出血

下消化道出血约占消化道出血的20-33%左右^[1,3,9,10],下消化道出血的发病率与年龄成正比,年龄越大,发病率越高.下消化道出血包括小肠及大肠出血.由于全结肠镜的普遍应用,所以大肠出血的病因较易诊断,但小肠出血则较难诊断.由于诊断方法和诊断技术的差异,以及地区和种族的差异,下消化道出血的病因报道不太一致.国内、外下消化道出血最常见的病因是痔疮出血,占下消化道出血的76%.但表现为急性大量出血过程的仅占2-9%,因此痔疮出血并不受临床重视,且诊断容易,常有反复出血病史,又与便秘有关,血呈鲜红色附在大便表面,有时亦可呈喷射状出血.老年期便秘还可形成“粪性”溃疡,溃疡形成与黏附压迫肠黏膜的大便硬块有关,应与鉴别.

肠道肿瘤及息肉是老年期下消化道出血较为常见的原因^[11-14].小肠肿瘤,如平滑肌瘤和淋巴瘤的出血量往往较大,出血和贫血症状明显.结肠肿瘤多为上皮性癌,出血晚,出血量少.多伴有腹痛,大便改变、消瘦和贫血等症状.息肉出血量少,大量血便并不常见.息肉切除术后出血,其量往往较大.

感染性肠道疾病是引起老年期下消化道出血另一较为常见的病因.主要包括急性坏死性小肠炎、溃疡性结肠炎、克罗恩病、伤寒、结核、痢疾等疾病.临床上多有发热、腹泻、腹痛等症状.此类疾病发病过程较急,但构成生命危险的大出血较为少见,结合病史,诊断上相对容易.

憩室和血管畸形被国外公认^[16,17]为老年期下消化道出血中发病率最为常见的二个病因,国内相关报道较少.钱家鸣 et al^[15]报道37例小肠出血的病因中,血管畸形19例,占51.35%,表明我国血管畸形的发病率并不低,过去报道较低的原因可能与国内诊断血管畸形的血管造影、核素扫描和小肠镜检查技术仅限于少数大医院,开展不够普遍有关.憩室病和血管畸形男女

发病率相等, 主要发生在老年期, 多为无症状性大出血, 90% 患者出血呈自限性, 亦可间歇反复发作, 临床上可有缺铁性贫血的表现。NSAID 可能是憩室出血的诱因, 应引起临床重视。另外缺血性肠炎是引起老年期下消化道出血是老年期的特有原因。动脉硬化和肠绞痛的病史是该病诊断的有力证据。

其他罕见的下消化道出血原因, 包括肠套叠、孤立性直肠溃疡、门脉高压性肠病、结肠 dieulafoy 病、子宫内膜异位等。

3 诊断方法

消化道出血的诊断技术日臻完善和成熟。内镜、血管造影、核素扫描和小肠气钡造影是诊断消化道出血重要的必不可少的方法, 使过去大多数不明原因的消化道出血得到了明确诊断。胶囊内镜的问世将为进一步减少消化道不明原因出血再作贡献。在诊断方法的选择上, 优先考虑内镜检查。临床上小肠出血仅占 3-5%, 95% 的消化道出血发生在内镜可以到达的部位。内镜检查直观, 可以取活组织病理检查, 一个熟练的、有经验的内镜医生诊断正确率可达 90% 以上。一般认为 80-95% 的上消化道出血患者通过内镜检查即可明确诊断。因此在病情允许的条件下, 首先进行内镜检查; 在病情不允许的条件下, 创造条件, 尽快行内镜检查, 初步确定出血的病因及部位, 或可缩小诊断的范围, 再作下一步诊断方法的选择。总体来看, 老年期内镜检查还是安全的, 虽然其并发症发生率 (0.24-4.9%) 高于年青患者 (0.03-0.13%)^[1,3], 包括出血、吸入性肺炎、心肌梗塞和穿孔。但只要有所准备, 可以减少或避免并发症的发生。对于内镜检查不能确诊或小肠出血的病变要适当选择血管造影、核素扫描及小肠 X 线检查。目前认为, 对于急性大量出血的患者, 选择性血管造影诊断率较高, 且可同时给予介入治疗; 对于慢性、反复少量出血的患者, 核素扫描的阳性率更高; 小肠气钡造影须在出血间歇期进行, 其阳性率低于血管造影和核素扫描, 但对临床有固定部位疼痛, 伴有梗阻表现, 钡剂尚能通过者仍为首选; 吞线试验结合我国国情, 目前尚不能废弃, 必要时仍可选用。

4 治疗措施

老年期消化道出血的治疗措施与中青年患者相比无本质上的不同。但老年患者存在心、肺、肾功能代偿能力差, 受伴随疾病的相互影响, 再出血率高和并发症多等特点, 在治疗措施的选择上有所差别。

4.1 病情监护 由于老年期患者重要器官功能衰退, 或伴有心脏疾患, 在急性消化道出血时容易诱发心绞痛, 心律失常, 甚至心肌梗塞, 脑血管病, 吸入性肺炎等并发症。入院后给予心、肺功能监护是必要的, 随时观察生命体征的变化, 亦可了解消化道出血的情况。

4.2 饮食要求 急性消化道大出血的患者必须禁食。老年患者有动脉硬化、甚至伴有高血压、血管弹性差、上

皮更新慢等特点, 禁食时间应长于年青患者, 方可有效防止再出血。我们见过数例消化性溃疡并大出血的老年患者, 胃镜检查均已见出血停止, 血凝块形成, 但进食后很快再出血。

4.3 及时输血 老年患者动脉硬化, 脏器衰老, 对缺血特别敏感, 受缺血影响的后果较为严重。及时输血, 可以迅速稳定患者的生命体征, 促进病情的恢复, 防止并发症的发生。只有在稳定的生命体征的基础上, 才能进行程序性诊断和治疗。因此, 我们认为老年期急性消化道出血的输血标准为血红蛋白 10 g/L。

4.4 药物治疗 (1) 酸相关疾病出血的抗酸治疗。H₂ 受体拮抗剂和质子泵抑制剂均是有效的药物, 如能使胃内 PH 达到 6 以上, 止血效果更好, 因此质子泵抑制剂更为理想, 抗酸作用强, 止血效果好, 副作用少。(2) 门脉高压性食管静脉曲张破裂出血时生长抑素及其类似物, 善宁、施他宁的使用, 72 h 的止血率可达到 80% 以上, 无加压素的副作用, 接近内镜治疗的效果。(3) 局部及全身止血药物的使用: 上消化道出血时去甲肾上腺素液、凝血酶、孟氏液口服或胃管内注入均有良好的止血作用。老年患者全身止血药的使用应适度, 出血停止后应立即停药。(4) 保护心、肝、脑、肾功能的药物及辅助对症治疗。

4.5 内镜治疗 内镜治疗安全、可靠、减少再出血, 是消化道出血有效的治疗方法。无论是上消化道出血, 还是下消化道出血, 只要内镜可以到达的部位, 内镜治疗应是优先考虑的。(1) 对于非静脉曲张破裂出血, 可选用电凝或热凝止血、注射法止血、血管钳夹和激光凝固止血^[16]。注射法就是经内镜注射止血, 如注射高渗盐水, 使血管周围组织水肿而压迫血管止血, 注射去甲肾上腺素使周围毛细血管收缩止血, 注射凝血酶使局部血液凝集止血。(2) 对于静脉曲张破裂出血, 可予三腔二囊管压迫, 正确使用三腔二囊管可有效控制食管、胃底静脉曲张破裂大出血。并可以为硬化剂治疗和套扎治疗创造良好的条件。硬化剂注射治疗常用的硬化剂为 50 ml/L 鱼肝油酸钠和 10 ml/L 乙氧硬化醇。同时进行曲张静脉内和曲张静脉旁注射, 静脉内注射后应留针数 10 s-1 min。有效率可达 90% 以上。

套扎治疗较硬化剂治疗更为安全。目前在急性大出血时多采用套扎治疗。但要取得长远的效果, 需配合硬化剂注射。套扎治疗的有效率亦达到 90% 以上。

4.6 放射介入治疗 经皮经肝胃冠状静脉栓塞术 (PTO) 是指经皮经肝插入导管, 沿肝内门静脉右支至门静脉干到达胃冠状静脉, 然后注入栓塞剂, 将冠状静脉栓塞止血。

经颈静脉、肝内门静脉支架分流术 (TIPS) 是在肝内门、腔静脉内放置金属支架进行门、腔静脉分流, 以降低门静脉压力, 减少侧支循环量, 使曲张静脉破裂出血停止。

4.7 选择性静、动脉内药物灌注止血 对老年患者并非很好的治疗手段, 因在血管内滴注加压素时, 对有动

脉硬化的老年患者会出现较多的并发症，如心衰、心律失常、高血压、心肌梗塞、肠缺血坏死等。但在内镜不能到达的部位，手术又有很大风险的情况下，选择性静动脉内药物灌注又是值得应用的方法。加压素的用量为 0.2-0.4 u/min，出血停止后 0.1 u/min 持续 24 h 后可停药，治疗过程中密切观察病情变化，予以相应的处理。

4.8 外科治疗 经上述治疗无效的患者应予手术治疗。手术治疗不仅可以止血，并可将出血病灶，如肿瘤、息肉、憩室等切除，达到根治的目的。老年患者手术死亡率较高，早期手术死亡率(1.1-4%)低于晚期死亡率(15%)。因此，一旦确定手术，应及早手术。

5 参考文献

- 1 Farrell JJ, Friedman LS. Gastrointestinal bleeding in the elderly. *Gastroenterol Clin North Am* 2001;30:377
- 2 Rockall TA, Logan RFA, Devlin HB, Northfield TC. Incidence of and mortality from acute upper gastro intestinal haemorrhage in the united kingdon. *BMJ* 1995;311:222-226
- 3 Farrell JJ, Friedman LS. Gastrointestinal bleeding in older people. *Gastroenterol Clin North Am* 2000;29:1
- 4 Antler AS, Pitchumoni CS, Thomas E, Orangio G, Scanian BC. Gastrointestinal bleeding in the elderly: morbidity, mortality and cause. *AM J Surg* 1981;142:271
- 5 Cooper BT, Weston CF, Neumann CS. Acute upper gastrointestinal

- 6 haemorrhage in patients aged 80yers or more. *QJM* 1988;68:765
- 7 Segal WN, Cello JP. Hemorrhage in the upper gastrointestinal tract in the older patient. *AM J Gastroenterol* 1997;92:42
- 8 郑国安. 老年人上消化道出血 460 例病因分析. *现代医药卫生* 2001;17:11
- 9 项丹妮, 郑松柏, 尹曙明, 王根生, 顾同进, 徐富星, 项平. 老年人上消化道出血 1101 例急诊胃镜检查结果分析及内镜下止血价值评价. *老年医学与保健* 2000;6:27
- 10 Longstreth GF. Epidemiology and outcome of patients hospitalized with acute lower gastrointestinal hemorrhage: Apopulation-based study. *Am J Gastroenterol* 1997;92:419
- 11 Rossini FP, Ferrari A, Spandre M, Cavallero M, Gemme C, Loverci C, Bertone A, Pintor MP. Emergency colonoscopy. *World J Surg* 1989;13:190-192
- 12 冉志华, 沈谋绩, 萧树东. 50 例小肠出血病因及诊断分析. *中华消化杂志* 1996;16:66
- 13 朱萱, 王崇文, 徐萍. 手术证实的 79 例小肠出血诊断分析. *中华消化杂志* 1997;17:70
- 14 李莉, 葛加松. 大肠镜检查 234 例中老年人下消化道出血原因分析. *临床消化病杂志* 2000;12:140
- 15 黄敏, 施仁孝, 张伯明. 内镜检查老年人下消化道出血 472 例分析. *宁夏医学杂志* 2000;22:351
- 16 钱家鸣, 李秀娟, 林克荣, 李景南, 鲁重美. 小肠出血性病变诊断方法的比较与病因分析. *胃肠病学及肝病学杂志* 2001;10:156
- 17 Boley SJ, DiBiase A, Brandt LT. A Low intestinal bleeding in the elderly. *Am J Surg* 1979;137:57
- 18 Boley SJ, Sammartano R, Adams A, DiBiase A, Kleinhaus S, Sprayregen S. On the nature and etiology of vascular ectasias of the colon: Degenerative lesions of aging. *Gastroenterology* 1977; 72:650-660
- 19 Cook DJ, Guyatt GH, Salena BJ, Laine LA. Endoscopic therapy for acute nonvariceal upper gastrointestinal hemorrhage: A meta-analysis. *Gastroenterology* 1992;102:139

《表型遗传修饰与肿瘤》出版发行

本刊讯 本刊编委房静远教授主编的《表型遗传修饰与肿瘤》2003-04 由上海科学技术出版社出版发行全国新华书店发行每本定价 48.00 元。

在基因表达的调控中，表型遗传修饰(epigenesis,又译为表观遗传修饰，遗传外修饰或后生修饰)占主导地位。染色体由 DNA 和组蛋白包裹而成。表型遗传修饰学说的主要内容是下调转录的 DNA 甲基化，而与之密切相关的增强基因表达的组蛋白乙酰化也常常被一并述及。许多疾病，如某些遗传病，病毒感染和肿瘤受表型遗传改变的影响。各种肿瘤的发生过程中有癌基因的低甲基化和抑癌基因的高甲基化，也同时存在着乙酰化的紊乱。通过干预上述表型遗传修饰的异常，可影响肿瘤的进程。

本书是国内第一部有关表型遗传修饰学说的专著，参阅了近几年国外的研究文献，较系统地阐述了表型遗传修饰的相关概念，肿瘤发生中的表型遗传修饰变化，影响这些改变的诸多因素等。对于进一步丰富表型遗传修饰学说的内容和深入研究其在肿瘤等疾病发生和发展中的影响，具有一定的理论意义和临床指导价值。该书适于遗传学，分子生物学和肿瘤学专业的研究生，实验室工作人员和临床工作者参考应用。

(2003-04-08)

老年期消化性溃疡临床用药的合理选择

白 岚

白岚, 中国人民解放军第一军医大学南方医院消化疾病研究所
广东省广州市 510515
项目负责人:白岚,510515,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学南方
医院. blan9988@yahoo.com.cn
电话:020-61641559 传真:020-87703645
收稿日期:2002-2002-11-06 接受日期:2002-12-16

白岚. 老年期消化性溃疡临床用药的合理选择. 世界华人消化杂志 2003;11
(5):649-650

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/649.htm>

0 引言

消化性溃疡是全球性的多发病. 随着社会的老龄化, 老年期消化性溃疡的发生呈增加趋势. 据统计65岁以上胃溃疡发病率为5.2%, 70岁以上增加至8.5%, 并且因其临床症状的不典型极易被忽视, 因而, 针对老年期消化性溃疡的特点, 合理选择临床用药对老年患者的健康及生活质量至关重要.

1 老年期消化性溃疡的特点

1.1 胃溃疡多见 胃溃疡直径常可超过2.5 cm, 且多发, 常常位于胃的近端, 多于高位胃体的后壁或小弯. 可能与随龄性胃体-窦交界上移, 小动脉硬化及黏膜血液灌注不足有关.

1.2 临床症状不典型, 甚至无症状 老年患者的腹部疼痛多失去规律性, 常以腹胀、纳差、体重下降、贫血、大便潜血阳性为多见, 以出血症状首发者占13%.

1.3 易发生巨大溃疡 即胃溃疡直径>3 cm, 十二指肠溃疡直径>2 cm. 巨大胃溃疡恶变率为3.3%, 其合并霉菌感染机会较一般胃溃疡多; 巨大十二指肠溃疡多发于球后壁或球后, 疼痛常放射至背部, 并且胃酸较一般十二指肠球部溃疡低, 溃疡可穿透至胰腺, 并易发生狭窄及梗阻.

1.4 并发症随年龄而有所增加, 出血最为常见 并发大出血率占老年消化性溃疡20%以上, 出血量较多, 常常与临床表现不一致, 并且易发生出血后的序贯性器官功能损害.

1.5 非甾体抗炎药(NSAIDs)所致溃疡较年青人多见 由于老年人群因心、脑血管病变及关节病变服NSAIDs机会多, 而胃黏膜预防机制及耐受性又较差, 因而易发生NSAIDs溃疡^[1-3].

1.6 老年期消化性溃疡愈合较慢 由于代谢率低, 膜血液灌注不足, 上皮修复功能差等所致, 用药时间宜延长.

1.7 老年期消化性溃疡 Hp 感染率高达60%以上, 因而Hp的根治也显得尤为重要^[4].

2 老年期消化性溃疡的内科治疗

消化性溃疡的发生为多因素所致, 根据可能的主要病因, 有无Hp感染, 有无NSAIDs服用史, 是初发溃疡还是复发溃疡, 溃疡本身的特点及是否伴有并发症的存在, 原有何种基础疾病(高血压、糖尿病)等等, 药物选择的侧重点是不同的. 治疗的总体目标是减轻解除溃疡疼痛, 促进溃疡愈合, 预防溃疡复发并减少相关并发症的发生.

2.1 基本治疗 消除或减轻心理压力, 对焦虑紧张失眠者可短期用镇静药; 避免过劳; 减少吸烟; 停药致溃疡药物如NSAIDs、激素、利血平等, 或减少用量, 或更换对胃黏膜损害小的药物, 并与食物或抗酸剂同服; 避免浓茶、咖啡、高度酒精、过辛辣物的直接刺激; 饮食上注意细嚼慢咽, 规律进食, 避免餐间零食及睡前进食, 避免过饱.

2.2 降低胃内酸度的药物

2.2.1 抗酸药 与胃内盐酸结合产生盐和水而降低胃酸. 种类繁多, 有碳酸氢钠、碳酸钙、氧化钙、氧化镁、氢氧化镁、铝碳酸镁、氢氧化铝、磷酸铝等. 分可溶性和不溶性两类. 碳酸氢钠属前者, 止痛效果快, 但长期大量用时可引起代谢性碱中毒, 甚至造成肾损伤; 含钙、铋、铝的制酸剂可致便秘; 镁制剂可致腹泻; 含钠的制酸剂可引起水钠潴留; 部分抗酸药如氢氧化铝可妨碍洋地黄、四环素、异烟肼、铁剂等药物的吸收; 并且此类制剂宜饭后1 h、3 h及睡前各服1次, 7次/d, 患者依从性差, 再加上已有强力的抗胃酸分泌药, 抗酸药有被取代的趋势.

2.2.2 抗胆碱能药 能减少酸和胃蛋白酶分泌, 降低胃肠运动和胃排空, 加强抗酸药的中和效能, 但易导致胃窦部潴留和胃泌素释放, 一般不宜用于治疗胃溃疡仅作为十二指肠溃疡抗酸治疗的辅助用药, 宜餐前30 min服用, 但青光眼、前列腺肥大、胃出口梗阻和返流性食管炎者禁用.

2.2.3 组胺H₂受体拮抗剂 选择性竞争H₂受体, 使壁细胞内cAMP产生及胃酸分泌减少, 治疗消化性溃疡. 这类制剂有西咪替丁(cimetidine)、雷尼替丁(ranitidine)、法莫替丁(famotidine)、尼扎替丁(nizatidine)和罗沙替丁(roxatidine). 西咪替丁为第一代产品, 结构中含咪唑环, 作用时间持续较短(6 h), 长期用副作用大, 其对雄激素受体有亲和力, 可产生男子乳房发育和阳痿, 精子数量减少, 垂体-睾丸功能紊乱; 西咪替丁可抑制肝微粒体氧化酶活性, 延长某些药物(华法林、安

定、利眠宁、消炎痛、心得安、茶碱、苯妥因钠等)的清除,尚可致血肌酐轻度升高,血清氨基转移酶升高;另有血小板减少、粒细胞缺乏甚至骨髓增生低下之报道。肾脏是西咪替丁代谢的重要部位,其清除随年龄增加而减少,所以老年患者宜慎用,并且减量使用,警惕中毒性精神错乱。雷尼替丁为第二代制剂,结构以咪唑环代替咪唑啉环,效能较西咪替丁强5-10倍,且作用时间长,副作用少,不具有抗雄激素作用,不影响肾功能,通过血屏障量小,不导致精神错乱,其对细胞色素P-450系统影响小,但仍可影响药物代谢。法莫替丁为第三代产品,结构上含噻唑啉环,抑制分泌效能较雷尼替丁强7倍,用量小,其不抑制细胞色素P-450药物代谢系统,无明显的药物相互作用。尼扎替丁为一新型H₂受体拮抗剂,和雷尼替丁一样,末端有一个硝基乙烯二胺结构,口服生物利用度>90%,远远超过雷尼替丁和法莫替丁,没有严重副作用,不影响肝细胞色素P-450系统,与内分泌系统无相互作用,亦不影响性功能,老年用药不需调整药量。罗沙替丁为另一新型H₂受体拮抗剂,为壁细胞上组胺H₂受体高度选择性和竞争性的拮抗剂,该药对组胺诱导的胃酸分泌抑制效力与雷尼替丁相似,但其生物利用度>95%,不受进食影响,且不抑制肝氧化酶系统,不产生重要的药物相互作用,长期维持治疗的副反应轻微,可有便秘和腹泻。

2.2.4 质子泵抑制剂^[5,6] 作用于壁细胞胃酸分泌最后一步,可明显抑制任何刺激激发的酸分泌。有奥美拉唑(omeprazole)、兰索拉唑(lansoprazole)、潘托拉唑(pantoprazole)、雷贝拉唑(rabeprazole)^[7,8]。奥美拉唑是一种苯并咪唑硫氧化物,选择性浓缩在胃壁细胞的酸性环境中,在壁细胞中可存留达24h,因而作用持久,即使药物血水平已检测不出,仍能发挥作用,常规剂量可抑制24h酸分泌>90%,迅速控制症状促进溃疡愈合。奥美拉唑长期使用的安全性一直倍受关注,大鼠毒性研究表明,应用大剂量奥美拉唑长期高抑制胃酸分泌可引起胃体肠嗜铬样细胞增生和类癌,可能与血清胃泌素增高有关。奥美拉唑可延长安定、苯妥英钠等一些经细胞色素P-450系统代谢药物的药效,但尚未发现他与茶碱类之间有相互作用。兰索拉唑与奥美拉唑机制和效能相似,没有严重的副作用,主要副反应有腹泻、头痛、恶心、皮疹等。潘托拉唑药理作用与奥美拉唑相同,但其化学稳定性较好,副作用少,偶有头痛、头晕和皮肤刺激等。雷贝拉唑在体外其抗分泌活性是奥美拉唑的2-10倍,1998年上市日本、英国和美国,副作用轻微,包括不适感、腹泻、恶心、皮疹和头晕。

2.3 Hp感染的治疗 针对Hp相关性胃十二指肠溃疡;难治性或复发性消化性溃疡;或已有出血、穿孔等并发症需手术的胃、十二指肠溃疡均应行Hp的根治。宜行四联疗法,即H₂受体拮抗剂或质子泵抑制剂加铋剂和两种抗菌素,可根据具体情况适当选择。

2.4 黏膜保护剂 该类制剂通过增加胃内黏液的分泌、

碳酸的分泌,加强膜的血流、促进上皮细胞修复,与溃疡面形成保护膜等机制发挥作用。

2.4.1 硫糖铝(sucralfate)^[9] 为硫酸化二糖的氢氧化铝盐,不被吸收,无系统副作用,可致便秘。

2.4.2 胶体铋 胶体次枸橼酸铋或三甲二枸橼酸铋,为一种复合铋盐,其与传统铋盐不同,含可溶形态的铋量不大,不会被大量吸收而产生铋神经毒性脑病,仅有的副作用是黑舌和黑粪。

2.4.3 前列腺素(prostaglandin) 常用的有米索前列醇(misoprostol),为人工合成的前列腺素E₁类似物。对预防NSAIDs诱导的胃十二指肠溃疡形成有肯定效果。

2.4.4 醋氨己酸锌(zinc acexamate) 临床效果与西咪替丁相同,无严重副作用,仅少数患者发生头晕、头痛、恶心、呕吐。

2.4.5 替普瑞酮(teprenone) 为萜(terpene)的衍生物,促进胃黏液分泌,增加黏液层疏水性,维持其正常结构和功能,促进上皮细胞修复再生,主要适于胃溃疡。

2.5 胃肠动力药 有胃复安、吗丁啉、西沙必利、贝络纳等,对恶心、呕吐、腹胀提示排空迟缓、胆汁返流或食管返流者可用,对胃溃疡配合抑酸治疗。

总之,老年期消化性溃疡药物治疗时间宜适当延长,尤其是食管溃疡和胃溃疡;Hp感染者应行四联根治;十二指肠活动期溃疡可选择强力的质子泵抑制剂加复方的抗酸剂和黏膜保护剂,维持治疗可用法莫替丁或新型的H₂受体拮抗剂;胃溃疡活动期可短时用质子泵抑制剂配与黏膜保护剂,适当加用胃肠动力药,维持治疗宜用新型的H₂受体拮抗剂;巨大溃疡伴霉菌感染者应先治疗霉菌,并内镜病理随访,警防癌变。

3 参考文献

- Blower AL, Brooks A, Fern GC, Hill A, Pearce MY, Morant S, Bardhan KD. Emergency admissions for upper gastrointestinal disease and their relation to NSAID use. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:281-291
- Tamblyn R, Berkson L, Dauphinee WD, Gayton D, Grad R, Huang A, Isaac L, McLeod P, Snell L. Unnecessary prescribing of NSAIDs and the management of NSAID-related gastropathy in medical practice. *Ann Intern Med* 1997;127:429-438
- Wilcox CM. Relationship between nonsteroidal anti-inflammatory drug use, *Helicobacter pylori*, and gastroduodenal mucosal injury. *Gastroenterology* 1997;113(Suppl):S85
- Kuipers EJ. *Helicobacter pylori* and the risk and management of associated diseases: Gastritis, ulcer disease, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11(Suppl):71-88
- Dekkers CP, Beker JA, Thjodleifsson B, Gabryelewicz A, Bell NE, Humphries TJ. Comparison of rebeprazole 20mg vs. Omeprazole 20mg in the treatment of active duodenal ulcer: a European multicentre study. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:179-186
- 方裕强,许国铭. 质子泵抑制剂的研究进展. *中华消化杂志* 1999;19(增刊):50-52
- Fitton A, Wiseman L. Pantoprazole: A review of its pharmacological properties and therapeutic use in acid-related disorders. *Drugs* 1998;51:460-482
- Prakash A, Faulds D. Rebeprazole. *Drugs* 1998;55:261-267
- Cook D, Guyatt G, Marshall J, Leasa D, Fuller H, Hall R, Peters S, Rutledge F, Griffith L, McLellan A, Wood G, Kirby A. A comparison of Sucralfate and ranitidine for the prevention of upper gastrointestinal bleeding in patients requiring mechanical ventilation. *Canadian critical care Trials group. N Engl J Med* 1998;338:791-797

肥大细胞与功能性胃肠疾病

彭丽华,杨云生

彭丽华,杨云生,中国人民解放军总医院消化内科 北京市 100853
项目负责人:杨云生,100853,北京市,中国人民解放军总医院消化内科.
收稿日期:2002-06-22 接受日期:2002-07-05

摘要

肥大细胞(mast cell, MC)在胃肠道有着广泛的分布,不同部位的MC存在形态学及生物学功能的差异. MC参与功能性胃肠疾病的病理生理过程,与应激、炎症刺激等因素关系密切. MC的活化可导致肠道分泌-运动功能异常,胃排空延迟,可提高内脏对痛觉的敏感性,并参与了脑肠轴调节消化功能的过程.

彭丽华,杨云生. 肥大细胞与功能性胃肠疾病. 世界华人消化杂志 2003;11(5):651-653

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/651.htm>

0 引言

肥大细胞(mast cell, MC)在胃肠道有着广泛的分布,其作用还不十分清楚. 研究发现 MC 在速发型超敏反应、宿主对病原微生物的防御反应、免疫调节反应、神经内分泌系统等方面都发挥着重要作用,与一些胃肠疾病的发生发展具有一定的关系. 功能性胃肠病包括许多疾病,其发病率约占消化系统疾病的 50%. 罗马 II 标准将功能性胃肠疾病分为七大类 25 种,有的又分为若干亚型,其中最常见的是肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)和功能性消化不良(functional dyspepsia, FD)等. 近年来关于 MC 的研究逐渐增多,发现 MC 可能与某些功能性胃肠疾病的发病有关. 本文就这方面的研究进行简要叙述.

1 胃肠道 MC 的分布及形态

MC 广泛分布于人和啮齿动物体内, Weidner et al^[1]研究了人体肺、皮肤、结肠、胃、小肠、乳腺组织及腋窝淋巴结的 MC, 发现不同部位的 MC 存在形态学差异. 根据分泌颗粒的特异性及蛋白酶成分的差异, 人体的 MC 主要分为两型, 即 T 型(tryptase-positive, chymase-negative)和 TC 型(tryptase-positive, chymase-positive). T 型只含有类胰蛋白酶, 无类糜蛋白酶; TC 型既含有类胰蛋白酶, 又含类糜蛋白酶^[2]. 肺 MC 多为 T 型 MC, 皮肤多为 TC 型 MC^[3], 而胃肠道两种 MC 均可见. 翟力平 et al^[4]对 10 例不同胎龄胎儿消化器官的 MC 进行超微结构观察, 发现在胎儿发育接近成熟时, 根据 MC 颗粒的超微结构可分为 TC 和 T 两型; 胎儿发育后期 MC 有分泌活

动, 呈活化状态; 胎儿 MC 与成纤维细胞、上皮细胞、血管、神经等密切接触. 在胎儿消化器官发育成熟过程中, MC 同样有异质性变化, 即使同一部位的 MC 也可表现出截然不同的生物学功能, 且 MC 与周围组织微环境间有相互作用.

人胃部的 MC 于胚胎发育的 13-16 wk 时出现. 甲苯胺蓝染色光镜观察 MC 主要分布在胃黏膜固有层近黏膜肌层处, 数量随黏膜层胃底腺及黏膜肌等结构的发育而增加. MC 体积较小, 形态不规则, 胞核清晰, 胞质内颗粒少, 呈淡紫色. 电镜下见胃黏膜 MC 呈椭圆形、梭形或不规则形, 有的细胞表面有细长的微绒毛; 细胞核位于中央, 有些 MC 核/质比较大, 核内常染色质多, 胞质内有少量膜包颗粒, 还可见线粒体、高尔基复合体等细胞器; 有些 MC 核/质比较小, 核内异染色质多, 胞质内充满膜包颗粒. 人胃黏膜 MC 颗粒形态各异, 有的颗粒内有一到数个高密度的核芯, 周围呈低密度颗粒状, 有的颗粒呈低密度晶格状或板层状, 还有的颗粒内有涡旋状结构, 涡旋中心有时可见致密核芯. 不仅同一细胞内可见形态不一的颗粒, 甚至同一颗粒内亦可同时出现涡旋状、板层状和颗粒状结构. 电镜下还可见黏膜 MC 与胃底腺壁细胞紧密相邻, 有的仅隔一层基膜, 同时可见 MC 颗粒内容物释放后呈空泡状. 该现象提示人胃黏膜层 MC 与壁细胞的分布有密切的关系, 胃黏膜 MC 释放的组胺可能刺激邻近的壁细胞分泌胃酸^[5,6].

肠道 MC 主要位于肠黏膜固有层中, 在醛品红-橙黄 G 染色切片上 MC 被染成紫红色. 电镜下见胞质中含有许多电子密度较高的颗粒, MC 与神经突起、淋巴细胞等密切接触, 神经突起周围无神经髓鞘^[7].

2 MC 在功能性胃肠疾病中的作用

MC 与功能性胃肠疾病关系的研究多数集中于 IBS 和 FD, 与其他功能性胃肠病关系的研究还较少.

2.1 MC 与 IBS 目前已知 IBS 的发病与精神心理因素、食物过敏、既往肠道感染等因素有关, 研究表明 MC 可能参与上述的病理生理过程.

2.1.1 精神心理因素导致 MC 活化 心理刺激能够导致皮肤、脑及肠道 MC 脱颗粒. 这一现象与促肾上腺皮质激素释放因子(corticotrophin releasing factor, CRF)有关^[8]. 在大鼠实验中, 应激引起的结肠功能紊乱和脑室内灌注 CRF 引起的排便增加可被 5-羟色胺(hydroxytryptamine, HT)₂ 受体拮抗剂改善^[9]. 另一些研究表明, CRF 和神经紧

张素(neurotensin, NT)介导的MC脱颗粒可使应激反应导致的结肠黏膜分泌增强和结肠动力紊乱^[8,10]。Addolorato et al^[11]的研究表明伴有肠道症状的患者其焦虑状态与慢性疾病状态有关。在IBS患者中存在自主神经系统活性增强,并可通过MC释放IgE引起肠道动力改变。

2.1.2 MC在炎症反应中的作用 近年对胃肠道功能性疾病的研究发现,急性胃肠感染史是IBS的危险因素之一。调查显示有痢疾病史的患者IBS的发病率上升约2倍^[12]。Nela et al^[13]前瞻性调查了经微生物检查证实的544例细菌性胃肠炎患者,发现在386例完成调查的患者中6个月后有1/4患者有持续的排便习惯改变如稀便、便次增多、排便紧迫感等,23例符合IBS的诊断标准。有研究表明,细菌、寄生虫感染或反复的抗原刺激可以引起肠道MC增多。志贺氏杆菌、霍乱弧菌引起的急性感染性腹泻,患者直肠黏膜固有层深层的MC数量明显增多^[14]。

2.1.3 MC与肠道分泌-运动功能 为观察MC在肠过敏症及物质转运异常中的作用,Perdue et al^[15]对蛋白质敏感的MC缺陷性小鼠WBB6F1-W/Wv(W/Wv)和正常的WBBG1(-)/+/(+/+)小鼠进行研究,发现在W/Wv小鼠中抗原刺激的应答仅为+/+小鼠的30%,电刺激神经的应答仅为+/+小鼠的50%,且不受神经和MC抑制剂的影响。给W/Wv小鼠静脉注射含MC前体的+/+小鼠骨髓细胞后,MC得到恢复,W/Wv小鼠对抗原刺激和神经刺激均可做出正常的应答反应。这些结果为MC活化导致肠过敏症的肠功能异常提供了初步的依据。

2.1.4 MC与内脏感觉异常 近年研究提示,MC活化提高内脏对痛觉的敏感性。胃肠黏膜MC被抗原诱导分泌组胺、前列腺素、5-HT、细胞因子、白三烯等,这些物质具有致痛作用,可能与IBS患者消化道对痛觉的敏感性增高有关。Weston et al^[16]报道IBS患者回肠末端MC明显增多,推测MC与IBS的内脏感觉异常有关。杨云生 et al^[7]进一步研究显示IBS患者回盲部MC与无髓神经纤维密切相邻,提出MC可能是肠道和神经系统之间相互联系、相互影响的一种中间媒介。

IBS患者约1/4伴有泌尿系症状,如尿频、尿急等。Pang et al^[17]发现在患有间质性膀胱炎(IC)的女性患者中常患有IBS,推测二者的发病机制具有一定关联。二者均有腹痛,情绪变化可加重疼痛。在IC和IBS患者中分别取膀胱和结肠黏膜活检经免疫组织化学染色发现,IC患者中膀胱黏膜中MC脱颗粒,数量明显高于正常,结肠黏膜中有同样现象,且大多数MC靠近P物质阳性的神经纤维,P物质与内脏痛觉传导有关,这可能有助于解释IBS患者常同时伴有泌尿系症状的原因。

2.1.5 MC与脑-肠轴的关系 中枢神经系统和精神因素能改变MC的活性。反复暴露于某种气味中的大鼠可出现MC释放组胺的现象^[18]。对蛋白质敏感的大鼠给予视听刺激后,能诱导MC脱颗粒。电刺激颈迷走神经可引起肠内MC释放组胺增加^[19],提示MC参与了脑-肠调节消化的生理功能。

2.2 MC与FD FD的病因和发病机制尚不清楚,可能与多种因素有关。诸如胃酸、胃蛋白酶、胃肠动力异常,精神、遗传、环境因素,消化道激素,幽门螺杆菌感染等。有研究发现在幽门螺杆菌感染的胃黏膜内可观察到MC增多^[20],但组织学上未观察到MC与幽门螺杆菌有直接接触的现象^[21]。在幽门螺杆菌感染的患者中,MC如何发挥生物学效应尚不明确。

王亚雷 et al^[22]为探讨FD患者胃液体排空功能与MC之间的关系,对19例经胃镜、B超等检查证实为FD的患者进行了研究。经胃实时超声检查将其分为胃液体排空正常组10例与胃液体排空延迟组9例,同时将5例体检者作为正常对照。每例取胃窦部、胃体部各2块标本,阿尔新蓝染色光镜观察胃黏膜MC的形态,并计数每高倍镜视野下MC的数目。电镜下计数细胞内颗粒数、已释放递质颗粒数,计算细胞内粒面积与细胞总面积之比。结果表明FD患者中排空延迟者MC数目增多,脱颗粒增多,提示MC与FD患者胃液体排空功能关系密切。

总之,MC作为一种免疫细胞可能参与胃肠道功能性疾病的发生和发展。目前这方面的研究刚刚开始,MC在功能性胃肠疾病中的作用有待深入探讨,其分子生物学的基础有待进一步阐明。MC在胃肠神经-免疫-内分泌网络调控中的地位和意义需要深入的研究,其分子生物学的深入研究对我们进一步理解功能性胃肠病的病理机制、诊断和治疗具有十分重要的意义。

3 参考文献

- Weidner N, Austen KF. Evidence for morphologic diversity of human mast cells. An ultrastructural study of mast cells from multiple body sites. *Lab Invest* 1990;63:63-72
- Irani AM, Bradford TR, Kepley CL, Schechter NM, Schwartz LB. Detection of MCT and MCTC types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J Histochem Cytochem* 1989;37:1509-1515
- 何韶衡,李萍,Mark GB,Andrew FW. 应用双重免疫标记技术鉴定肥大细胞亚型. *中华病理学杂志* 2000;29:383-384
- 翟力平,安巍,杨美林,乔从进,张章. 胎儿消化器官发育中的MC超微结构特点. *解剖学杂志* 1997;20:57-60
- 王彤,景雅,杨琳,乔从进. 人胃黏膜肥大细胞的分布与超微结构. *解剖学杂志* 1998;21:538-540
- 董张兰,王彤,景雅,彭希平. 人胎儿胃肥大细胞的研究. *解剖科学进展* 2000;6:152-154
- 杨云生,周殿元,张万岱,张振书,宋于刚. 肠易激综合征回盲部MC的研究. *中华内科杂志* 1997;36:231-233
- Castagliuolo I, Lamont JT, Qiu B, Fleming SM, Bhaskar KR, Nikulasson ST, Kornetsky C, Pothoulakis C. Acute stress causes mucin release from rat colon: Role of corticotropin releasing factor and mast cells. *Am J Physiol* 1996;271:G884-892
- Miyata K, Ito H, Fukudo S. Involvement of the 5-HT₃ receptor in corticotropin-releasing hormone(CRH)-induced defecation in rats. *Am J Physiol* 1998;274:G827-831
- Castagliuolo I, Leeman SE, Bartolak-Suki E, Nikulasson S, Qin B, Carraway RE, Pothoulakis C. A neurotensin antagonist, SR 48692, inhibits colonic responses to immobilization stress in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1261-1265
- Addolorato G, Marsigli L, Capristo E, Caputo F, Dall'Aglio C, Baudanza P. Anxiety and depression: a common feature of heal care seeking patients with irritable bowel syndrome and food allergy. *Hepatogastroenterology* 1998;45:1559-1564

- 12 潘国宗, 鲁素彩, 柯美云, 韩少梅, 郭慧平, 方秀才. 北京地区肠易激综合症的流行病学研究: 一个整群、分层、随机的调查. *中华流行病学杂志* 2000;21:26-29
- 13 Nela KR, Hebden J, Spiller R. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factor for development of the irritable bowel syndrome. Postal survey of patients. *BJM* 1997;314:779-781
- 14 Pulimood AB, Mathan MM, Mathan VI. Quantitative and ultrastructural analysis of rectal mucosal mast cells in acute infectious diarrhea. *Dig Dis Sci* 1998;43:2111-2116
- 15 Perdue MH, Masson S, Wershil BK, Galli SJ. Role of mast cells in ion transport abnormalities associated with intestinal anaphylaxis. Correction of the diminished secretory response in genetically mast cell-deficient W/W^v mice by bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 1991;87:687-693
- 16 Weston AP, Biddle WL, Bhatia PS, Miner PB Jr. Terminal ileal mucosal mast cells in irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 1993;38:1590-1595
- 17 Pang X, Boucher W, Triadafilopoulos G, Sant GR, Theoharides TC. Mast cell and substance P-positive nerve involvement in a patient with both irritable bowel syndrome and interstitial cystitis. *Urology* 1996;47:436-438
- 18 Russel M, Dark KA, Cummins RE, Ellman G, Callaway E, Peeke HV. Learned histamine release. *Science* 1984;225:733
- 19 MacQueen G, Marshall J, Perdue M, Siegel S, Bienenstock J. Pavlovian conditioning of rat mucosal mast cells to secrete rat mast cell protease II. *Science* 1989;243:83-85
- 20 Mohammadi M, Redline R, Nedrud J, Czinn S. Role of the host in pathogenesis of Helicobacter-associated gastritis: H. felis infection of inbred and congenic mouse strains. *Infect Immun* 1996;64:238-245
- 21 镇学初, 廖松林. 肥大细胞与幽门螺杆菌相关性胃炎. *内镜* 1994;11:336-337
- 22 王亚雷, 刘永革, 侯晓华. 非溃疡性消化不良患者胃液体排空功能与 MC 的关系. *北京医学* 1998;20:161

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

中国科技期刊走向世界的步伐正在加快

截止到 2002 年 7 月, 中国被著名检索系统 SCI-E 收录的科技期刊数从 63 种增加到了 67 种. 从制作 SCI 的美国 ISI (美国科学情报所) 发布的 JCR (期刊引证报告) 上的数据看, 有指标数据的 59 种我国科技期刊中, 80% 以上的期刊影响因子呈上升趋势; 约 90% 的总被引频次都提高了.

在 2001 年的 JCR 中, 总被引频次超过 1000 次的中国科技期刊有 4 个, 他们是《高等学校化学学报》(中文版)(1959 次), 《科学通报》(1628 次), 《物理学报》(中文版)(1227 次), 《中国物理快报》(1215 次).

首次有两个中国科技期刊的影响因子超过 1, 他们是《细胞研究》(2.102) 和《世界胃肠病学杂志》(1.445), 这两种期刊均为我国英文版科技期刊.

从期刊影响因子在本学科的排位看, 进入 SCIE 的我国科技期刊, 有 8 个期刊排在本学科的中上水平, 他们是《力学学报》, 《高等学校化学学报》(中文版), 《中国物理》, 《中国物理快报》, 《科学通报》, 《中国科学 B》, 《中国科学 E》, 《中国有色金属学报》.

在本学科国际期刊中, 我国有 10 个期刊被引频次位于中上水平的. 他们是: 《科学通报》, 《高等学校化学学报》(中文版), 《中国科学 A》, 《物理学报》(中文版), 《中华医学杂志》, 《化学学报》(中文版), 《中国物理快报》, 《中国有色金属学报》, 《中国科学 B》, 《中国药理学报》.

在 SCI-E 网络版收录的中国科技期刊中, 有 25 个期刊是由中国科学出版社出版的, 其中在 JCR 中有指标的期刊有 18 个.

另外, 除 SCI-E 系统外, 中国科技期刊被其他几个重要国际检索系统收录的数量也呈上升趋势. 例如, 在反映工程技术论文的历史超百年的检索系统《EI》(工程索引) 中, 中国被收录的科技期刊从最少时的 40 种, 增加到了 2000 年的 104 种. 这也直接反映了我国科技期刊被国际认可的程度.

国家科技部、中国科技信息研究所, 每年对我国科技期刊在国内的情况做出统计分析, 定期出版《中国科技期刊引证报告》. 以 2000 年数据看, 我国科技期刊的平均影响因子由上一年的 0.208 上升到 0.240, 其中影响因子超过 1 的有 20 个; 总被引频次的平均值达到了 192.2 次, 总被引频次超过 1000 次的期刊有 25 个, 其中《科学通报》的总被引频次达到了 2979 次.

目前, 我国科技期刊数量已达到 4600 余种, 已经形成了一定的规模, 而且门类相对齐全, 为我国基础研究的发展和科研成果转化, 为生产力做出了重要的贡献, 但我们承认中国的科技期刊发展水平与世界发达国家之间存在较大的差距. 随着中国加入 WTO, 对于中国的科技期刊, 既是机遇又是挑战. 我们相信, 通过我国学术界和编辑部门的共同努力, 一定会在不远的将来产生一批具有国际水准的科技期刊.

(2002-11-08)

肝门胆管癌的超声影像学诊断

王 彬,陈路增,赵建勋,孙占祺

王彬,陈路增,北京大学第一医院超声诊断科 北京市 100034
赵建勋,孙占祺,北京大学第一医院普通外科 北京市 100034
项目负责人:王彬,100034,北京市西什库大街8号,北京大学第一医院超声诊断科.
收稿日期:2002-06-01 接受日期:2002-06-18

王彬,陈路增,赵建勋,孙占祺. 肝门胆管癌的超声影像学诊断. 世界华人消化杂志 2003;11(5):654-655

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/654.htm>

0 引言

肝门胆管癌是发生在肝总管和左右肝管汇合处及其近侧上1/3段的恶性肿瘤,其发生率在胆管癌中最高占40-76%^[1]. 鉴于其预后、手术方式及术前影像学诊断与中下1/3段胆管癌不尽相同,应用灰阶和彩色多普勒超声检查(gray-scale and color doppler ultrasonography 以下简称U/S)对肝门胆管癌作出评价^[2-21].

1 肝门胆管癌的U/S检出率与符合率

参照U/S对黄疸和阻塞性黄疸的鉴别诊断指征.(1)依据肝内胆管扩张,首先判断和提示阻塞性黄疸符合率为100%.(2)梗阻部位判断,U/S提示肝门水平梗阻符合率100%,包括左右肝管汇合水平,胆囊管开口以上肝总管水平和一侧肝管起始水平.(3)梗阻病因判断即肝门胆管癌U/S诊断符合率86-97%.肝门部胆管肿块U/S显示率为86-97%.

2 肝门胆管癌的灰阶及彩色多普勒超声图像表现与分型

在病变检出率97%和超声诊断符合率最高为94.5%的基础上,实时灰阶超声显示并大致分为中等回声肿块型含乳头和结节型(63%)、强回声浸润型含截断和狭窄型(37%).彩色多普勒超声显示绝大多数肝门胆管癌为少供血肿瘤,这与肝门部胆管的解剖和供血特点有关,血流信号显示率为64.3%.

3 假阴性或误漏诊原因

假阴性病例大多发生在临床应用超声检查的初期缺乏经验和对肝门胆管癌的认识,早期肿瘤虽能准确提示阻塞性黄疸和梗阻部位,但因肿块较小且与邻近肝实质回声类型相等而难以辨认.其类似单纯狭窄不伴肿块浸润型仅提示肝门部胆管狭窄原因待查.

误诊病例多数亦发生在浸润型,由于病变局部以纤维化为主伴结缔组织中癌浸润,显示胆管壁增厚呈锥形强回声伴后方不同程度衰减,因而误诊为肝门部

胆管结石,少数因侵犯胆囊管引起胆囊大积水而误诊为Mirizzi综合征、肝细胞肝癌胆管内瘤栓、原发性硬化性胆管炎.

4 肿瘤部位判断

按照Bismuth的临床分型,依据肝内胆管扩张及其特征与肿瘤位置关系I型和II型U/S判断符合率均为98%,I型肿块位于肝总管远端,其近端左右肝管及汇合部明显扩张,II型肿块位于汇合部左右肝管之间出现肿块或明显狭窄,a或b 81%肿瘤主要位于右肝管和左肝管起始部,表现为一侧胆管明显扩张.II型相对两点间距离增加.肝内外广泛型.包括肝实质、甚至肝尾叶、门静脉、肝动脉侵犯、肝门淋巴结及肝内转移.

5 肿瘤浸润部位判断

U/S对肝门胆管癌的术前分期研究中,结果可以归纳出四项观察和判断指标,判断符合率不同作者不尽相同,敏感性和特异性由高到低依次为邻近肝实质和胆囊、门静脉、肝动脉和转移性肝门淋巴结.

5.1 邻近肝实质和胆囊浸润

U/S判断符合率35-87%,肿瘤浸润局部胆管壁浆膜至全层强回声缺损或肿块与邻近肝实质回声相等,假阴性判断多发生在I、II型中肝尾叶浸润,胆囊增大反而是胆囊受侵的主要特征.

5.2 门静脉浸润

U/S判断符合率71.4-90%包括门静脉管壁直接侵犯和管腔内瘤栓形成,前者表现为胆管壁与门静脉间共筑强回声局部缺失或变细,后者管腔内等回声型赘生物或肿块阻塞,彩色多普勒显示部分或完全性彩色充盈缺损.

5.3 肝动脉浸润

U/S判断符合率20-77.28% 肿块基底即胆管后壁连同肝动脉管状或圆形横截面管腔消失,而肿块下缘包绕有动脉血流信号.

5.4 转移性肝门淋巴结

U/S判断符合率33-41%,检出其直径大小范围在0.8-1.5cm之间其余均受肠腔气体干扰,胆囊缩小,缺少透声窗和缺乏特异性回声差异不能检出.

6 其他综合评价

Levine和国内董宝玮 et al 先后阐述肝外胆管癌声像图特征以来,肝外胆管癌及其分类分型乃至分期,这一类关键词或学术命名,已被许多作者相继采用并沿用至今,这其中亦包括肝门胆管癌或称Klatskin's肿瘤.U/S一般不受肠腔气体干扰,其肿瘤本身显示率明显

高于中下 1/3 段胆管癌.在陈敏华 et al 胆管癌分期的系列研究中 19 例门脉或肝动脉受侵中有 18 例竟来自上 1/3 段胆管 Ca, 因而被视为其手术切除率低或不能切除, 预后差的主要原因. 然而, 随着各种影像学技术包括灰阶和彩色多普勒 U/S、CT、MRCP、PTC、血管造影和外科技术水平的不断提高, 早期诊断, 合理的手术方式是肝门胆管癌患者获得长期生存的唯一选择与关键.

一组国外资料显示肿瘤切除率由过去 49.2% 升至 86.6%, 根治性切除后 5 a 生存率接近 30%. Klempaner 报告 >5 a 存活率占 69%, 仍能使部分人获得长期存活.

1980年初以来U/S一直是阻塞性黄疸和胆道疾病的首选检查方法, 至今仍得到临床公认. 上述应用研究结果亦得到进一步证实, 但在外科医师看来, 即使是有经验的超声诊断科医生, 虽能提示肿瘤部位但却难以准确判断肿瘤沿胆管向肝内浸润的范围. 所以目前仍把满意的双侧 PTC 所显示的左右肝管两点间的充盈缺损作为可靠的判断指标, 尽管如此, 作为超声影像学诊断的两个重要组成部分, 腹腔镜超声(laparoscopic U/S)和术中超声(intraoperative U/S)为判断肿瘤浸润范围、深度及肝实质肝门部血管, 肝门转移性淋巴结提供了新的可靠手段. 国内尚未取得该方面经验, 而针对肝门胆管癌的肝内局限型可为肝移植适应证之一. 围手术期肝移植患者的彩色多普勒超声检查与血流灌注监测结果, 国内外一致报告其特异性仅次于血管造影.

总之, 对肝门胆管癌, 就单纯运用和综合评价而言, 超声影像学检查仍是目前最好的方法. 提高早期诊断水平和外科技术水平, 作为一个有经验的超声诊断科医生和一个有经验的外科医生将同等重要.

7 参考文献

- 1 汤钊猷主编. 现代肿瘤学. 第 1 版. 上海: 上海医科大学出版社, 1993:852-856
- 2 Looser C, Stain SC, Baer HU, Triller J, Blumgart LH. Staging of hilar cholangiocarcinoma by ultrasound and duplex sonography: a comparison with angiography and operative findings. *Br J Radiol* 1992;65:871-877
- 3 Hann LE, Greatrex KV, Bach AM, Fong Y, Blumgart LH. Cholangiocarcinoma at the hepatic hilus: Sonographic findings. *AJR* 1997;168:985-989
- 4 董宝玮, 陈敏华, 李建国, 王彬. 肝外胆管癌的超声图像诊断. *中华医学杂志* 1983;10:599-601
- 5 孙尧, 戴晓华, 李吉昌, 滕建波, 柳澄. 肝门部胆管癌的超声影像诊断. *中华超声影像学杂志* 1999;6:355-357
- 6 梁萍, 郝凤鸣, 周宁新, 刘永雄, 唐杰, 苏莉, 黄志强. 彩色多普勒血流显像和双功能超声对高位胆管癌切除可能性的术前评估. *中华外科杂志* 1994;5:259-261
- 7 何婉媛, 徐智章, 王文平, 毛枫, 黄备建. 彩色多普勒超声对肝门部胆管癌的诊断价值. *中华超声影像学杂志* 2000;4:216-218
- 8 Bismuth H, Nakach R, Diamond T. Management strategies in resection for hilar Cholangiocarcinoma. *Ann Surg* 1992;215:31-37
- 9 何婉媛, 王文平, 毛枫, 徐智章. 超声对肝门部胆管癌术前分期诊断. *中国医学影像技术* 2000;2:133-135
- 10 解丽梅, 张铭琰, 刘守君, 张军. 超声对肝门部胆管癌的术前评估. *中国临床医学影像杂志* 1999;5:341-343
- 11 Neumaier CE, Bertolotto M, Perrone R, Martinoli C, Loria F, Silvestri E. Staging of hilar cholangio carcinoma with ultrasound. *J Clin Ultrasound* 1995;3:173-178
- 12 Hann LE, Fong Y, Shriver CD, Botet JF, Brown KT, Klimstra DS, Blumgart LH. Malignant hepatic hilar tumors: Can ultrasonography be used as an alternative to angiography with CT arterial portography for determination of resectability? *J Ultrasound Med* 1996;1:37-45
- 13 黄云洲, 陈敏华, 廖盛日, 霍苓, 严昆, 张琳, 吴齐. 超声对胆管癌分期探讨: 对血管浸润的诊断. *中国超声医学杂志* 1999;5:373-375
- 14 陈敏华, 霍苓, 廖盛日, 严昆, 张琳, 黄云洲. 超声对胆管癌术前分期探讨: 关于壁浸润程度诊断. *中国超声医学杂志* 1997;9:27-30
- 15 廖盛日, 陈敏华, 霍苓, 严昆, 张琳, 黄云洲. 超声对胆管癌术前分期探讨: 肝脏及胆囊浸润的超声诊断. *中国超声医学杂志* 1998;8:43-46
- 16 张晖, 陈敏华, 黄云洲, 霍苓, 严昆, 廖盛日, 张琳. 超声对胆管癌术前分期探讨: 肿瘤大小、回声与壁浸润关系. *中国超声医学杂志* 1998;2:28-30
- 17 赵建勋, 孙占祺, 王彬, 黄筵庭. 肝门胆管癌的可切除性判断及术式选择. *中国现代医学杂志* 2001;5:13-16
- 18 Klempaner J, Ridder GJ, Werner M, Weimann A, Pichlmayr R. What constitutes long-term survival after surgery for hilar cholangiocarcinoma? *Cancer* 1997;1:26-34
- 19 Van-Delden OM, de Wit LT, Nieveen-Van-Dijk Kum EJ, Smits NJ, Gouma DJ, Reeders JW. Value of laparoscopic ultrasonography in staging of proximal bile duct tumors. *J Ultrasound Med* 1997;1:7-12
- 20 Watanapa P, Hargrove NS, Sirivatanauksom Y. The potential role of intraoperative ultrasonography in the surgical treatment of hilar cholangiocarcinoma. *HPB Surg* 1996;2:93-96
- 21 王彬, 邵玉红, 陈路增, 王维民, 杨尹默, 詹江华, 吴问汉, 赵建勋, 万远廉. 围手术期肝移植患者彩色多普勒超声检查与监测. *中国现代医学杂志* 2001;8:13-14

Budd - Chiari综合征的分型及诊断

许伟华,朱菊人

许伟华,山东大学第二医院消化内科 山东济南市 250033
朱菊人,山东省立医院消化内科 山东济南市 250021
项目负责人:朱菊人,250021,山东济南市,山东省立医院消化内科.
收稿日期:2002-05-10 接受日期:2002-06-12

许伟华,朱菊人. Budd - Chiari综合征的分型及诊断. 世界华人消化杂志 2003;
11(5):656 - 657

http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/656.htm

0 引言

Budd - Chiari 综合征是具有门脉高压、肝肿大以及临床症状不同类型的肝静脉流出道梗阻. 其可表现为轻度症状直至慢性终末期肝病. 临床误诊率较高. 目前关于 Budd - Chiari 综合征的分型很不统一, 至少有 20 种分类方法, 尚没有一种分型被广泛接受, 极大地限制了其诊断及治疗. 提高对本病的认识并达成一定的共识必将推动对本病的深入研究.

1 Budd - Chiari 综合征的分型

1.1 按病原学分类 Budd - Chiari 综合征据病因不同可分为 3 型^[1]: (1)肝小静脉梗阻型, 又称闭塞性静脉内膜炎, 可能由于摄取吡咯类肝细胞毒素所致. (2)肝大静脉梗阻型多数是继发的, 主要病因是高凝状态、恶性疾病或其他疾病等^[2]. (3)下腔静脉梗阻型是由隔膜^[3,4]、血栓形成或外来压力引起的.

1.2 从阻塞物的病理性质上大致分为 3 型: 膜性^[3], 可以是单纯血栓、炎性血栓或瘤性血栓. 纤维膜性^[4,5], 纤维膜厚薄不一, 薄者仅 1-2 mm, 大多为完全闭塞. 膜的表面光滑, 与静脉瓣相似. 纤维狭窄型, 此种类型肝段下腔静脉某一段完全闭锁. I型可演变成另两型^[6].

1.3 从临床表现上分 3 型 (1)急性型:少见, 病程多在 1 mo 内, 临床表现近似急性肝炎. 起病急, 上腹痛伴腹胀, 肝进行性肿大压痛, 腹水增长迅速, 可伴有黄疸, 死亡率极高. (2)亚急性型, 病程在 1 a 以内, 临床表现最为典型, 有腹水、肝区痛、肝肿大三联征, 也可有黄疸及脾肿大, 胸腹部浅表静脉曲张伴下肢水肿是诊断本病的重要特征. (3)慢性型:病程在 1 a 以上, 主要为膜性梗阻的患者, 可分为两种亚型. 部分患者可因侧支循环完全或下腔静脉膜性梗阻(membranous obstruction of the inferior vena cava, MOVOC)中央有小孔而临床症状不明显, 成为隐匿型, 约占 10%. 显性型的患者起病缓慢, 可反复发作又可自行缓解^[2,7,10].

1.4 根据静脉阻塞部位分类 以往国内外不少学者提出各自的 BCS 分型大多以下腔静脉为分型的出发点^[8,9].

李彦豪^[11]认为应重视肝静脉的通畅程度, 以肝静脉作为分型的核心. 由于目前下腔静脉开通术的技术提高, 下腔静脉的病变程度不再是影响介入治疗技术成功率的重要因素. 他提出四型分类方法, 简述如下: 肝静脉阻塞型, 约占 10-20%, 南方较北方多见. 本型中段肝下腔静脉常有长条状狭窄, 为肝尾状叶肥大所致的假性狭窄; 可分 a、b 两种亚型, a 型:肝静脉近心端膜性狭窄, 远心端扩张; b 型:肝静脉广泛狭窄闭塞. 下腔静脉阻塞型, 约占 50-70%. 主要为肝段下腔静脉狭窄, 而主肝静脉开口在狭窄段的远心端, 肝静脉血回流困难, 甚至出现逆流. 肝、腔静脉阻塞型, 约占 20-30%. 是上述 a、b 型的综合体. 肝小静脉闭塞型. 为肝小静脉广泛阻塞, 主肝静脉和下腔静脉通畅, 而肝静脉楔压降低, 极少见. 临床诊断要点为:肝肿大、门静脉高压症及肝穿刺活检显示肝脏瘀血性改变等.

我们认为, BCS 分型应通俗易懂, 且能体现出临床与病理改变, 并同时治疗有指导作用, 因此根据静脉阻塞部位分型比较合适.

2 Budd - Chiari 综合征的诊断

2.1 临床表现 Budd - Chiari 综合征的初始症状通常是缓慢而模糊的上腹部不适和因门脉高压引起的进行性腹水. 可有肝、脾肿大、黄疸和肝功能障碍. 体检有双下肢水肿和阵发性肺栓塞, 有时在下肢、腹部、腰部有大量静脉曲张. 门脉压继续增高导致食管静脉曲张破溃出血和进行性肝衰. 少数病例起始即为暴发性肝衰^[5,12].

2.2 影像检查 目前超声扫描是诊断 Budd - Chiari 综合征的首要工具, 方便易行, 且其敏感度在 85% 以上^[13]. B 超能较好地显示肝脏形态及实质的改变, 能清楚了解下腔静脉、肝静脉病变的部位、类型和阻塞程度, 特别是对下腔静脉广泛狭窄阻塞, 导管不能插入及对碘过敏者, B 超更显优势, 但对下腔静脉(IVC)内的薄膜样病变有时显示不清血管. 血管造影是诊断 BCS 的主要方法和“金标准”, 可直接显示阻塞部位和范围^[14]. 有下腔静脉造影^[8]和经皮肝穿肝静脉造影^[15]两种途径. 前者能清楚地显示肝段下腔静脉阻塞、狭窄的部位与形态, 但对肝内静脉阻塞狭窄显示不清. 后者可清楚地显示肝静脉病变的形态和范围. 磁共振成像(MRA)^[16,17]为无损伤、无造影剂的血管成像, 能清楚显示病变血管的部位、范围, 可同时显示下腔静脉、肝静脉和门静脉, 对门脉高压、广泛的静脉曲张、自发性分流形

成及血流方向的显示优于其他方法,对BCS的诊断具有明显的优势. CT最易显示肝实质异常,对本病的诊断无特异性^[18].

2.3 诊断 急性BCS大多有腹痛、肝脏肿大压痛和腹水三联征. 慢性患者有肝肿大,门体侧支循环和腹水三联征. B超基本可以明确诊断,有疑问时可进行血管造影,肝活检组织学检查进一步明确. Budd-Chiari综合征极易误诊为慢性肝病,有报道其误诊率近50%,误诊时间可长达数十年^[19],提醒临床医生应注意鉴别. 对肝大、腹水、静脉曲张的应想到本病,特别是胸腹腰背部浅静脉呈垂直方向长链状上行性曲张要想到本病,此外,肝大伴轻度脾大、周围血象不显脾亢、腹水蛋白偏高是本病的特征^[20].

3 参考文献

- 1 鲁泽清. 布加综合征. 国外医学外科学分册 1996;23:11-12
- 2 Singh V, Sinha SK, Nain CK, Bambery P, Kaur U, Verma S, Chawla YK, Singh K. Budd-Chiari syndrome: our experience of 71 patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:550-554
- 3 秦成勇, 朱菊人, 孙成刚, 陆伟君, 叶远红. 柏-查综合征的病因学探讨. *中华内科杂志* 1999;38:397-398
- 4 Riemens SC, Haagsma EB, Kok T, Gouw AS, van der Jagt EJ. Familial occurrence of membranous obstruction of the inferior vena cava: arguments in favor of a congenital etiology. *J Hepatol* 1995;22:404-409
- 5 Okuda K, Yamagata H, Obata H, Sasaki R, Imai F, Okudaira M, Ohbu M, Okuda K. Epidemiological and clinical features of Budd-Chiari syndrome in Japan. *J Hepatol* 1995;22:1
- 6 Terabayashi H, Okudaira K, Nomura F, Ohnishi K, Wong P. Transformation of inferior vena caval thrombosis to membranous obstruction in a patient with the lupus anticoagulant. *Gastroenterology* 1986;91:219-224
- 7 刘包华. Budd-Chiari综合征480例综合分析. *临床肝胆病杂志* 1991;7:5
- 8 祖茂衡, 徐浩, 顾玉明, 李国均, 张庆桥, 魏宁, 王诚. 不同类型Budd-Chiari综合征的介入治疗. *中华放射学杂志* 1998;32:118-121
- 9 周旭, 蔡至道, 徐克. 柏-查综合征的超声诊断与分型的探讨. *中国实用内科杂志* 1994;14:405-407
- 10 孙成刚, 朱菊人, 秦成勇. 柏-查综合征251例临床报告. *临床肝胆病杂志* 1995;11:44-45
- 11 李彦豪. 关于Budd-Chiari综合征介入诊断治疗的再认识. *中华放射学杂志* 1999;33:348-349
- 12 黄和银, 刘爱民, 雷德安. 18例Budd-Chiari综合征的临床特征分析. *第三军医大学学报* 2000;22:840
- 13 刘新, 韩贺山, 王文超, 陈敏, 周诚. MRI和超声诊断Budd-Chiari综合征的对比研究. *实用放射学杂志* 2000;16:201-203
- 14 徐凯, 徐浩, 祖茂衡. Budd-Chiari综合征的CT与超声、静脉造影对比研究. *实用放射学杂志* 1999;15:16-19
- 15 李天晓, 许培钦, 韩新巍, 马秀献, 李树新, 石谨, 刘保山. 经皮肝穿刺肝静脉造影对Budd-Chiari综合征的诊断价值. *中华放射学杂志* 1995;29:319-322
- 16 Noone TC, Semelka RC, Woosley JT, Pisano ED. Ultrasound and MR findings in acute Budd-Chiari syndrome with histopathologic correlation. *J Comput Assist Tomogr* 1996;20:819-822
- 17 Soyer P, Lacheheb D, Caudron C, Levesque M. MRI of adenomatous hyperplastic nodules of the liver in Budd-Chiari syndrome. *J Comput Assist Tomogr* 1993;17:86-89
- 18 Vilgrain V, Lewin M, Vons C, Denys A, Valla D, Flejou JF, Belghiti J, Menu Y. Related articles. Hepatic nodules in Budd-Chiari syndrome: imaging features. *Radiology* 1999;210:443-450
- 19 颜壮东. Budd-Chiari综合征201例误诊分析. *中国乡村医生杂志* 1998;3:38-39
- 20 姚宏昌. Budd-Chiari综合征的诊断和治疗. *天津医药* 1989;284-286

部分脾栓塞术国内应用现状

朱晓玲

朱晓玲,辽宁省人民医院消化内科 辽宁省沈阳市 110015
项目负责人:朱晓玲,110015,辽宁省沈阳市沈河区文艺路33号,辽宁省人民医院
消化内科. zhuxiaolingchen@yahoo.com.cn
电话:024-24147900-8249
收稿日期:2002-10-09 接受日期:2002-10-29

摘要

综述部分脾栓塞术(PSE)国内应用情况,为临床提供治疗依据.根据国内相关资料,针对PSE的机制、临床疗效、并发症、栓塞面积、栓塞范围控制、栓塞物质、PSE的时机和条件、适应证、禁忌证、PSE与外科切脾比较等一系列问题进行较全面的综述.PSE的主要疗效为:(1)改善脾亢.(2)降低门脉压.(3)使脾脏缩小.(4)缓解食管胃底静脉曲张.(5)治疗曲张静脉破裂出血.(6)缓解腹水.(7)改善肝功能.PSE与外科切脾比较,能保留脾脏的正常免疫功能和预防感染的能力,具有适应证广、简便、安全、效果显著、创伤小、并发症少、费用低廉等优点,是替代外科脾切除的首选治疗方法.

朱晓玲.部分脾栓塞术国内应用现状.世界华人消化杂志 2003;11(5):658-662
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/658.htm>

0 引言

自1973年Maddison首先在临床上采用自身凝血块行脾动脉栓塞治疗以及1979年Spigos报道了14例部分性脾栓塞(partial splenic embolization, PSE)术治疗脾亢以来,国内外已陆续报道了应用PSE治疗脾亢,脾破裂与脾相关性疾病^[1-33].总结这一技术的发展,进一步探讨PSE的临床应用,对促进现阶段我国PSE的普及具有重要意义.为此本文就此作一综述.

1 PSE的意义和机制

脾脏是人体的重要储血器官,具有吞噬和破坏血细胞的功能^[34,35].任何原因引起的脾肿大和脾亢,都会使脾脏的吞噬和破坏血细胞的作用增强,同时脾肿大时脾内血管过多,使大量血细胞在脾内滞留,导致外周血细胞减少^[65,66].脾切除能使血像恢复、症状缓解.以往主要是采用手术切脾的方法.但是脾脏在全身防卫系统中的作用十分重要,是一个廓清细菌的生物过滤器,是产生抗体、增强白细胞吞噬能力的重要免疫位点.他能产生淋巴细胞,合成大量的抗体(特别是IgG抗体).全脾切除后将改变患者的免疫功能,出现脾脏过滤功能消失, IgM减少、调节素和调理素水平降低、T淋巴细胞系统出现紊乱、外周血淋巴细胞数量以及淋巴细胞

转换率明显下降,导致爆发感染的机会显著增加^[31].PSE是在保持脾脏部分功能的基础上治疗脾亢,PSE可引起部分脾实质缺血性梗塞、机化、萎缩,最终被纤维组织增生替代,使脾体积缩小,这种不可逆性的病理改变,削弱了脾脏吞噬和破坏血细胞的能力,破坏了脾内血管,减少了血细胞的流滞,使外周血象得到改善.同时免疫功能不受影响,这对于增强患者的免疫能力和预防感染的能力有着十分重要的意义.是一种较好的选择.因此,PSE以其既可纠正脾亢的临床表现,又能保留部分脾以执行其免疫功能,受到临床学者的广泛关注^[36-42].普遍认为PSE是外科性切脾的替代疗法.

2 PSE的疗效评价

2.1 PSE可改善脾亢 综合国内16家报道^[43-58]关于术前术后外周血象变化情况(表1):可见PSE后最先发生反应的是白细胞,可在术后24h就发生,1wk后降至正常平稳.这可能与脾坏死组织所致的无菌性炎症及发热有关.其次是血小板1-3d后开始升高,2wk内持续升高,一般3wk左右达高峰,1-6mo逐渐有所下降,但仍在正常范围.血红蛋白也有一定程度的升高.龚高全^[36]观察了术后红细胞略有增高,无统计学意义.王毅堂^[37]报道了术前白蛋白是27-29g/L,术后升至32-35g/L.有关红细胞和白蛋白方面的报道,由于文章较少,再加上受输血和输白蛋白的影响,不好评论.

表1 PSE前后外周血象的变化

	术前	术后									
		1d	3d	1wk	2wk	3wk	1mo	2mo	3mo	6mo	
白细胞 $\times 10^9/L$	2.5	21.9	12	8.7	6.4	6.5	6.2	7.3	5.9	5.7	
血小板 $\times 10^9/L$	45.4	84	79	117	179	239	148	169	108	118	
血红蛋白 g/L	80.6	100	109	110	108	113	119	121	114	121	

2.2 PSE可降低门脉压 研究表明PSE后由于脾动脉供血量减少,经脾静脉回流入门脉内之血液亦减少,门脉压力逐下降,结果脾静脉及门脉宽度回缩.我们观察了术前及术后2-6wk和术后6-12mo的门脉宽度,证实PSE确实能使门脉内径显著性缩小.张鲁文^[42]测量了术前门静脉、脾静脉内径为1.66、1.54cm,术后为1.25、0.84cm.龚高全^[36]测定了术前门脉主干压力、脾静脉压力、肠系膜上静脉压力分别为51、55、51cm H₂O,术后分别为42、42、43cm H₂O.郑金国^[11]测量了术前脾动脉、脾静脉、门静脉的内径分别为0.7、

1.14、1.60 cm, 术后为 0.65、1.12、1.33 cm. 术前脾动脉、脾静脉、门静脉的血流速度为 1.13、0.22、0.20 M/min, 术后为 0.89、0.15、0.16 M/min. 术前脾动脉、脾静脉、门静脉的血流量为 1.51、1.64、2.60 L/min, 术后为 0.74、0.78、1.36 L/min. 而肝固有动脉血流速度术前 0.68 M/min, 术后 0.73 M/min. 表明 PSE 后脾动脉、脾静脉、门静脉的内径变小、血流速度减慢、血流量减少. 肝固有动脉血流量增加, 可能是由于 PSE 后脾血流量下降, 窃血减少, 肝总动脉血流量增加所致, 故脾栓有改善肝功能的作用.

2.3 PSE 可使脾脏缩小 PSE 后早期发生液化坏死改变, 脾脏并不缩小, 我们观察 2-6 wk 内无明显缩小. 后来由于纤维组织增生, 瘢痕的挛缩过程, 使脾脏体积由肿大逐渐缩小, 直至最后皱缩, 6 mo 后形成皱缩脾. 综合国内 6 家^[41-46]报道, PSE 前脾最大长径是 17.86 cm、厚度是 6.76 cm、脾面积是 130.7 cm², 6-12 mo 后脾最大长径 14.93 cm、脾厚 5.04 cm、脾面积 50.95 cm². 我们测量了 PSE 后 6-12 mo 的脾脏, 证明是显著性缩小. 可以判定, 从脾最大长径、脾厚、脾面积多方面评价, PSE 6-12 mo 后脾脏是明显缩小的. 脾脏的皱缩是临床应用 PSE 治疗脾亢成功的标志.

2.4 PSE 可以缓解食管胃底静脉曲张 我们用内镜对 4 例患者 PSE 前后进行了曲张静脉的观察, 其中 2 例由重度变轻度, 1 例重度变中度, 1 例中度变轻度. 黄飞舟 et al^[38]报道了曲张静脉套扎联合部分脾栓塞术治疗门脉高压症的效果, 发现曲张静脉完全闭塞, 重复硬化次数减少到 2.1 次, 术后仅 1 例再出血. 而单纯硬化闭塞率 80-91%, 重复次数 4 次, 复发出血率 15-17.1%, 认为 PSE 联合硬化优于单纯硬化. 其原理可能由于 PSE 减少了脾血流入门脉的血流量, 有利于降低门脉压力, 也可能与 PSE 后肝血供增加, 肝功能改善有关.

2.5 PSE 对曲张静脉破裂出血的止血效果显著 我院观察 PSE 前 25 例曲张静脉破裂出血的患者, 术后仅 1 例再发出血. 胡亚平 et al^[9]报道, 术前 5 例曲张静脉出血的患者, 术后观察 1 a, 有 1 例再出血. 黄风瑞 et al^[12]报道, 术前 8 例出血者, 术后未再复发. 脾栓的止血作用可能在于, 肝硬化患者门静脉血流量 60-70% 来自脾静脉, PSE 后减少了脾脏到门脉的血流量, 脾静脉、门静脉明显回缩, 门静脉压力和肝静脉楔压明显下降, 从而改善了门脉高压引起的食管、胃底静脉曲张, 再加上血小板回升, 降低了再出血的危险性.

2.6 脾栓有缓解腹水的作用 朱菊人报道 8 例术前有腹水的患者, 术后 6 mo 复查, 腹水皆消失, 2 例随访 1 a, 未复发. 王微 et al^[13]报道 18 例腹水患者栓塞后均明显减轻. 张学军 et al^[10]报道, PSE 可使腹水消失. 我们用 B 超观察了 9 例 PSE 患者术前、术后腹水的变化, 其中 2 例术后腹水消失, 2 例术后缓解, 1 例无变化, 4 例术前无腹水, 术后产生腹水. 脾栓对治疗腹水是有效果的, 但是短期内由于栓塞后脾脏本身渗出及对周

围脏器的刺激作用, 可使一过性腹水增加, 甚至产生胸水及脾周围炎, 长期追踪, 发现随着门脉压的下降和脾面积的缩小, 腹水的复发率也相应的下降.

2.7 PSE 可能有改善肝功能的作用 王毅堂 et al^[37]报道 PSE 术后肝功可获得改善, 表现为原 Child 分级的级别上升, 1 例 C 级于术后 6 mo 升为 B 级, 5 例 B 级有 3 例于术后 4-6 mo 升为 A 级. 杨熙章 et al^[39]报道 128 例 PSE 患者, 56 例肝功改善, 占 43.8%, 患者术后血清白蛋白增高, 凝血酶原时间缩短, 认为 PSE 有改善肝功能的趋势. 可能的机制为 PSE 后脾动脉血流量减少, 肝动脉血流量就增加, 同时由于门静脉压力降低, 使肠系膜上静脉回流改善, 从而提高肝组织的营养有关.

3 PSE 的并发症及处理

3.1 PSE 的主要并发症 综合国内已报道的 1 077 例中, 发生各种并发症的情况如下: 胸膜炎、胸腔积液、胸水 62 例(6%). 腹水 21 例(2%). 消化道出血 10 例(1%). 腹膜炎 10 例(1%). 胰腺炎 7 例(0.6%). 肠麻痹 5 例(0.5%). 肝性脑病 4 例(0.4%). 脾脓肿 3 例(0.3%). 假性囊肿 2 例(0.2%). 肝功能衰竭 2 例(0.2%). 左下肺炎 1 例(0.1%). 脾周围炎 1 例(0.1%). 左下肺不张 1 例(0.1%). 门脉血栓 1 例(0.1%). 脾周积液 1 例(0.1%). 脾破裂 1 例(0.1%). 死亡 1 例(0.1%). 我院 50 例肝硬化 PSE 患者, 合并胸水 9 例, 脾周围炎 2 例, 反应性左下肺炎 1 例, 腹膜炎 1 例, 脾脓肿 1 例, 脾囊肿 1 例.

3.2 并发症的原因及处理 PSE 后当天或第 2-3 天即可出现发热, 可达 38-39℃, 主要与栓塞后脾梗死有关, 轻度发热和左上腹痛不处理, 高热可物理降温及强力退热药, 必要时可加用糖皮质激素配合治疗, 一般 1-2 wk 内体温可恢复正常. PSE 术后脾区疼痛是由于脾包膜紧张所致, 因此当腹痛局限在左上腹而无腹膜刺激症时, 可应用有效镇痛药控制疼痛, 疼痛明显时给盐酸曲马多、硫酸吗啡控释片(美施康定), 疼痛多在 7-20 d 缓解. 为缓解疼痛, 也可给地塞米松 15 mg、10 mg、5 mg 3-5 d. 李征然 et al 提出栓塞脾下极可减轻疼痛. 疼痛可使呼吸运动受阻, 支气管引流不畅而并发左下肺炎及胸腔积液, 术后要应用有效的抗生素. 少量胸水可不处理, 中量以上可穿刺抽液, 有报道注入沙培林有助于胸水吸收. 出现腹水或胸水加重的患者, 可适当补充白蛋白、血浆及加强保肝、利尿. 如持续腹痛及高热不退应警惕脾脓肿的发生, 合并脾脓肿时需穿刺引流及抗生素冲洗, 必要时手术. 我院 50 例中 1 例发生脾脓肿, 该患是女性, 66 岁, 肝功能 Child C 级, 间断呕血 7 a, 每次均住院药物止血后出院, 本次再呕血再住院, 连续 15 d 出血不止, 所有止血药都不能奏效, 三腔管也无济于事, 又无外科手术条件, 最后出现失血性休克, 血压稳定后紧急采用了 PSE, 术后止血成功, 但由于患者失血过多, 抵抗力太差, 脾栓后脾脏血液循环不好, 导致细菌不能清除, 术后 3 mo 出现脾脓肿, 而行外科

切脾治疗. 王毅堂 et al^[37]认为, 脾脓肿的发生主要因为导管和栓塞剂材料消毒不严格及脾栓塞后其血流减慢, 肠道厌氧菌逆行性感染所致. 所以为预防肠道菌沿门静脉的逆行感染, 术前应口服肠道消炎药 3-5 d. PSE 术后要注意观察血小板的变化, 如血小板高于 $300 \times 10^9/L$ 时, 应口服潘生丁等抗凝药以防止门-脾静脉血栓的形成, 并鼓励患者早下床和床上活动. 已合并门脉血栓者, 术后给予肝素治疗 1 wk, 至血栓消失. 术后并发症的发生率及严重程度随栓塞面积的增加而增加. 一般而言, 脾上动脉栓塞的患者发生左下肺不张、肺炎、左侧胸腔积液明显增高, 尽量超选择插管至脾中、下叶动脉栓塞较好.

4 关于栓塞面积、栓塞范围控制、栓塞物质

4.1 栓塞面积 总体栓塞面积在 15-90%. 其中肾移植 75-80%; 肝癌 50-70%; 门脉高压引起的脾亢 65-70%; 特发性血小板减少性紫癜 40-70%; 地中海贫血 75%; 遗传性球形红细胞增多症 40-70%; 遗传性椭圆形红细胞增多症、慢性粒细胞性白血病、高雪氏病、骨髓纤维化、再生障碍性贫血 30-70%; 巨脾以少量多次为宜, 连续 2-3 次, 每次 30% 左右. 我院 50 例肝硬化患者栓塞面积控制在 60-80%.

4.2 栓塞范围控制 多数学者是根据脾动脉主干血流速度的变化控制栓塞程度. 一般认为, 血流速度稍有减慢, 栓塞程度约 30-40%; 轻度减慢为 50-60%; 明显减慢约 70-80%; 脾动脉主干血流呈蠕动样前进或出现短暂停留, 栓塞程度已达 90%. 采用此方法评估栓塞程度, 缺乏客观依据, 易受主观因素影响. 当脾动脉发生痉挛时, 也会影响栓塞程度的判断, 梅崔林报道栓塞前, 根据预期栓塞程度和患者的 1 mm 脾内动脉分支数确定该患者脾栓塞所需的明胶海绵颗粒数, 然后把把这些明胶海绵颗粒缓慢注入脾动脉主干, 可能获得较准确控制脾栓塞程度的目的. 崔俊 et al^[14]发表了关于 PSE 的质量控制及门脉血流动力学变化的报告, 求出了明胶海绵用量的回归方程, 可能更有利于栓塞体积控制在有效的安全范围内.

4.3 栓塞物质 常用的栓塞剂有明胶海绵、聚乙烯醇颗粒、真丝线段、各种微球等. 多数学者是采用 1 mm 左右的明胶海绵碎块或明胶海绵条加抗生素加造影剂, 也有少数医院采用碘油 + 明胶海绵, 认为此法能继发血栓形成, 导致血管永久性栓塞, 防止再通, 减少复发. 我们是将明胶海绵剪成 $1 \times 1 \times 1$ mm 左右的碎块加庆大霉素及造影剂制成悬混状待用.

5 肝硬化患者 PSE 的时机和条件

一般认为 Child A、B 级较好, Child C 级术后反应重, 发生的并发症也多. 我院有 3 例分别在出院后 3 mo、6 mo 和 3 a 死亡, 均为 Child C 级患者, 另外 3 例发生脾脓肿、脾囊肿、腹膜炎的患者, 也发生在 Child C 级组, 因

此对 Child C 级患者实施 PSE, 术前术后应加强管理.

择期手术较紧急手术效果好、安全. 我们对 6 例反复出血, 反复住院, 最终药物治疗无效, 又无外科手术条件的患者, 紧急实行了 PSE, 虽然达到了止血目的, 挽救了患者的生命, 但并发脾脓肿, 脾囊肿, 腹膜炎的 3 例患者, 均发生在这 6 例患者中, 导致术后治疗费用增高. 而择期手术的患者无 1 例发生严重并发症.

有腹水的患者并发腹膜炎概率高, 我院并发腹膜炎的患者均发生在有腹水组. 并发反应性脾周围炎、反应性左下肺炎的患者也发生在有腹水组. 术前尽量消除腹水, 能提高 PSE 的疗效, 减少并发症.

6 PSE 的适应证和禁忌证

6.1 适应证 PSE 适用于所有有外科切脾术指征者, 包括各种原因引起的继发性脾亢和原发性脾亢, 有切脾适应证的各种血液病, 淋巴瘤, 骨髓纤维化, 脾破裂及肾移植术后免疫抑制治疗等. 目前国内实施 PSE 治疗的主要有下列疾病: 肝硬化脾功能亢进、肝癌合并脾功能亢进、肝静脉阻塞综合征、特发性门脉高压症、地中海贫血、血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血性贫血、遗传性球形红细胞增多症、难治性原发性血小板减少性紫癜、难治性再障、Evan's 综合征、系统性红斑狼疮合并血小板减少性紫癜. 此外还有脾静脉栓塞所致的静脉曲张破裂出血、球形红细胞增多症、高血氏病、何杰金氏病、脾脏肿瘤等. 由于 PSE 适应证广, 手术简便, 疗效确切, 该技术被广泛应用于临床^[59-68].

6.2 PSE 的禁忌证 脓毒血症为绝对禁忌证. 顽固性腹水伴原发性腹膜炎者、白蛋白低下和凝血酶原时间明显延长、肝功能代偿功能极差者, 为肝硬化脾栓塞的禁忌证. 巨大脾、严重黄疸、大量腹水为相对禁忌证.

7 PSE 与外科切脾比较

脾脏在全身防卫系统中的作用十分重要. 传统的外科脾切除破坏了脾脏的正常功能, 使免疫功能受损, 易出现致命性感染. PSE 最突出点是既能抑制亢进的脾功能和减少过大的脾面积又能保留部分脾组织及功能. 这对于增强患者机体的免疫能力和预防感染的能力有着十分重要的意义. 这是 PSE 与外科脾切除最重要的区别之一. 我们发现 PSE 后, 患者诉感冒及皮肤感染次数减少, 可能与 PSE 能提高免疫功能有关. 接贵涛和陈虎比较了 PSE 与外科切脾的疗效, 证明两种方法的治愈率、复发率无明显差异. 提出 PSE 可作为替代外科脾切除的首选、安全、有效的治疗方法. 李玉铃 et al^[16]和唐新华 et al^[41]报道了 PSE 前后免疫功能无变化, 证明了 PSE 对免疫功能无影响. 此外 PSE 与外科手术比较, 尚有适应证广、创伤小、痛苦少、疗效确切、术后恢复快、费用低廉等优点.

总之, PSE 可改善外周血象、降低门脉高压、缓解脾大、治疗消化道出血、改善肝功能、缓解腹水,

与外科切脾比较,能保留脾脏的正常免疫功能和预防感染的能力,具有简便、安全、效果显著、创伤小、并发症少、费用低廉等优点,是治疗脾亢的好方法,值得临床推广应用.PSE已经成为替代外科脾切除的首选的治疗方法。

8 参考文献

- 梅雀林,李彦豪,陈勇,鲁恩洁. 部分性脾栓塞术的质量控制. 中华放射学杂志 1998;32:776-778
- 章有光,郭义豪,徐愉,章仙依. 部分性脾栓塞术治疗脾功能亢进(附4例报告). 实用放射学杂志 1998;14:552-553
- 朱晓玲,刘瑞雪,佟晗,李胜息,陈海鸥,张向红,李艳,杨立. 部分脾栓塞术治疗肝硬化、脾功能亢进50例. 世界华人消化杂志 2002;10:980-982
- 朱菊人,张玉珍,郭士杰,傅丽娜,贾宝山,李玉渠,李红旗,胡安常,王振亭. 部分性脾栓塞术治疗肝硬化并门脉高压及脾功能亢进. 临床肝胆病杂志 1990;6:88-89
- 李征然,邹艳,唐文杰,单鸿,朱康顺. 部分脾栓塞术后并发症及其处理. 中国临床医学影像杂志 2000;11:415-417
- 成军,陈易人,吕光成,钱海鑫. 部分脾栓塞术治疗门脉高压脾功能亢进的实验研究. 江苏医药 1992;18:375-376
- 陈华忠,张仲平,蔡修熙,何泽宝. 脾动脉部分栓塞治疗脾功能亢进. 中国现代医学杂志 1997;7:32-33
- 接贵涛,张传汶,阮春慧,李明军. 部分脾栓塞术治疗脾功能亢进的临床研究. 中国综合临床 2000;16:593-594
- 胡亚平,熊福星. 部分性脾栓塞术治疗肝硬变脾功能亢进. 中国基层医药 2001;8:44
- 张学军,权启镇,张修礼. 脾动脉栓塞治疗肝硬化脾功能亢进15例临床观察. 临床消化病杂志 2001;2:88-89
- 郑金国,苏国权,杜瑞清,张新元,邵石祥,常广. 部分脾栓塞术对肝硬化门脉高压症患者肝、脾血流的影响. 介入放射学杂志 1994;3:21-23
- 黄风瑞,王志远,褚海波,赵廷常,胡义利,夏宝枢. 脾栓塞术治疗肝硬化并发脾功能亢进的临床应用. 山东医药 198;29:12-13
- 王微,周平,王纯,王修,金刚,孙洪江. 部分脾栓塞治疗肝癌合并脾机能亢进. 吉林医学 1998;19:296
- 崔俊,韩铭钧,任克,徐克. 脾部分性栓塞的质量控制及门脉血流动力学变化. 世界华人消化杂志 2000;8:839-840
- 高中度,茅爱武,邵维城,徐志朋,蒋廷辉,张丽君. 肝动脉及部分脾动脉栓塞治疗肝癌伴脾功能亢进. 临床消化病杂志 1999;11:149-155
- 李玉玲,钱梅艳,张继芳. 经皮部分脾栓塞治疗肝硬化脾功能亢进疗效观察. 山西临床医药杂志 1999;8:209
- 李桂芳,谢松柏,孙海,杨兴华. 肝动脉栓塞加部分脾栓塞治疗原发性肝癌伴脾亢的临床研究. 中国肿瘤临床 1998;25:47-50
- 王维,王小宜,叶斌,刘涛. 部分性脾栓塞治疗门静脉高压性脾功能亢进. 湖南医科大学学报 1999;24:267-269
- 孙大裕,陈星荣,朱宝荣. 脾栓塞术治疗肝硬化并发脾亢进. 中华消化杂志 1984;4:144
- 江晓肖,费军,唐新华,朱松英,马炬明. 肝硬变患者脾栓塞术后50例并发症分析. 新消化病学杂志 1997;5:340
- 张源慧,杨天楹,严文伟. 原发性血小板减少性紫癜105例脾切除疗效观察. 中华血液病杂志 1986;7:129
- 纪树荃,王伟光,刘智明. 脾栓塞治疗免疫性血小板减少性紫癜. 中华内科杂志 1991;30:602
- 曲国林,董黄英,徐家兴,杨宁,刘淑英,纪树荃. 脾动脉栓塞治疗原发性血小板减少性紫癜(附45例报告). 中华放射学杂志 1992;26:663
- 陈勇. 部分性脾栓塞治疗儿童遗传性贫血的术后反应、并发症及其处理. 中华放射学杂志 1995;8:534
- 吴驰,王建华,颜志平. 脾动脉栓塞治疗肝癌合并脾亢的应用观察. 介入放射学杂志 1994;1:48-49
- 朱建新,侯淑琴,李彦豪主编. 肝胆胰疾病介入诊疗技术. 第1版. 广州:广东科技出版社, 1996:144
- 张丹,张万岱. 部分脾栓塞术治疗肝炎后肝硬化患者门脉高压症10例. 新消化病学杂志 1997;5:386
- 段林,朱壁富. 脾动脉栓塞术的临床应用. 普外临床 1992;7:34-36
- 卜淑蕊. 脾功能亢进症治疗的现状与展望. 胃肠病学和肝病学杂志 1997;6:94-95
- 陈星荣,朱宝荣,孙大裕. 脾栓塞疗法. 中华放射学杂志 1983;17:300
- 席嘉元,翟凌云,吕梁. 真丝线栓塞脾红髓小动脉治疗脾功能亢进的实验研究. 中华放射学杂志 1996;30:781
- 吴恩惠,刘玉清,贺能树主编. 介入性治疗学. 北京:人民卫生出版社, 1994:332-335
- 何贵林,李铁刚,张伟树. 部分性脾栓塞术治疗脾功能亢进(附26例报告). 介入医学杂志 1997;2:132
- 中川定明,郑国芬,李佩娟主编. 脾脏病理学. 第1版. 北京:世界图书出版社, 1991:332
- 杨彤翰,马宏敏,王敖川. 脾动脉造影自然形态观察与意义. 实用放射学杂志 1991;7:214
- 龚高全,王小林,钱晟,颜志平,程洁敏,王建华. 门静脉高压患者部分脾栓塞术对门静脉及其分支压力的影响. 介入放射学杂志 1999;8:193-194
- 王毅堂,徐小军,宋迎新,吴珂. 部分性脾栓塞术治疗肝硬化脾功能亢进的临床应用及价值. 航空航天医药 1999;10:134-136
- 黄飞舟,刘浚阳,晁晚频,王维,朱晒红,李瑞珍. 内镜曲张静脉套扎-部分脾栓塞联合治疗门静脉高压症. 湖南医科大学学报 1998;23:558-560
- 杨熙章,杨永岩,吴纪瑞,许有进,黄淑贞. 部分脾栓塞术在肝癌介入治疗中的应用. 中国医学影像学杂志 2001;9:261-262
- 郑金国,张新元,邵石祥,苏国权,杜瑞清. 部分脾栓塞术治疗肝硬化门脉高压症的研究. 临床肝胆病杂志 1997;5:92-94
- 唐新华,朱松英,朱胜兰,江小肖. 部分脾栓塞术治疗脾功能亢进. 解放军医学杂志 1989;14:218-221
- 张鲁文,毕素栋,黄风瑞. 脾栓塞术治疗脾功能亢进的临床疗效评价. 实用医学杂志 1992;8:2-3
- 杨俊玲,王秀梅,胡治黄. 脾动脉部分栓塞治疗原发性脾功能亢进. 实用医技 2001;8:225
- 陈虎,周健,杨德琦,陈文辉. 部分性脾栓塞术的临床应用 - 附37例报告. 介入放射学杂志 1994;3:135-137
- 张明,朱邵成,赵德政. 部分性脾栓塞治疗脾功能亢进. 临床医学 1997;17:15-16
- 曾辉英,史仲华,李槐,刘德忠,李忱瑞,郭彦军. 部分脾栓塞术治疗肝癌合并脾功能亢进的疗效. 实用癌症杂志 2000;15:632-634
- 王培珍,孔宪牛,刘锦堂,徐岩,薛桂芹. 部分脾栓塞治疗肝硬化门脉高压及脾亢. 胃肠病学和肝胆病杂志 2000;9:227-228
- 赵立新,王瑞明,郭学德. 部分性脾栓塞术治疗脾功能亢进(附7例报告). 中国煤炭工业医学杂志 1998;1:35-36
- 李京雨,张新国,赵振琴. 部分脾栓塞术方法的探讨. 介入放射学杂志 1994;3:15-17
- 玄祖旗,杨仁杰. 肝硬化门脉高压脾功能亢进的部分栓塞治疗. 放射学实践 1997;12:102-105
- 周雁,陈艳敏,龙毓. 真丝线段脾栓塞治疗肝硬化脾功能亢进. 临床肝胆病杂志 1995;11:216
- 王建华,王小林,颜志平主编. 腹部介入放射学. 第1版. 上海:上海医科大学出版社, 1998:60-131
- 陈根生,孙慧玲,金春贤. 丝线加明胶海绵脾脏栓塞治疗脾功能亢进. 介入放射学杂志 2000;2:16
- 陈星荣,林贵,夏宝枢主编. 介入放射学. 第1版. 上海:上海医科大学出版社, 1989:52-56
- 刘国实,邢克英,金东辉. 肝硬变的介入治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:908-909
- 程永德,张正国,陶正龙. 肝脾动脉双栓塞的实验研究. 介入放射学杂志 1996;5:33-34
- 单鸿,罗鹏飞,李彦豪主编. 临床介入诊疗学. 广州:广东科技出版社, 1997:213
- 袁明纯,丁甫月,文伶俐. 部分性脾栓塞术治疗小儿血液病. 中级医刊 1996;31:551
- 胡才校,杨德瑛,钱中贤. 脾栓塞治疗特发性血小板减少性紫癜. 中华血液学杂志 1995;16:152
- 李春生,孙中华,康中. 小部脾栓塞治疗免疫性血小板减少性紫癜的研究. 实用医药杂志 1994;7:4
- 袁明纯,许映华,丁甫月. 部分脾栓塞术治疗有脾切除指征的小儿血

液病. 中华小儿外科杂志 1991;12:202

62 梅雀林,李彦豪,陈勇,鲁恩洁. 部分性脾栓塞术治疗地中海贫血的长期疗效观察. 中华放射学杂志 2000;34:820-822

63 曹国文,李山云,黄佐良,张孝中,周进. 脾动脉栓塞治疗原发型血小板减少性紫癜和脾功能亢进(附6例报告). 实用放射学杂志 1998;14:360-361

64 马培东,张利辉,邓立非,贾太和,田玲娣,孙辉臣,刘继英,李风云,修贺明,郝晓东,陈春兰,强永德,胡雄,张雯,郭宏. 门脉高压症时脾静脉的

病理改变及其临床意义. 新消化病学杂志 1995;21-23

65 李席如,何泽生,吴金兰,马庆久,鲁建国,武永忠. 门脉高压症患者脾动静脉结构成分的变化. 华人消化杂志 1998;6:760-761

66 陈虎,周健,杨德琪. 部分脾栓塞术治疗难治性原发血小板减少性紫癜. 实用放射学杂志 1997;8:475-477

67 接贵涛. 部分脾栓塞术治疗脾功能亢进30例报告. 临床血液学杂志 2000;13:178-179

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版版权归世界胃肠病学杂志社

• 病例报告 •

大肠 3 原癌 1 例

姚红兵,吴爱国,朱卉娟

姚红兵,吴爱国,朱卉娟,中国人民解放军第一军医大学珠江医院普通外科 广东省广州市 510280
 项目负责人:姚红兵,510280,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学珠江医院普通外科. luckstar0503@163.com
 电话:020-61643211 传真:020-61643213
 收稿日期:2002-12-08 接受日期:2002-12-26

摘要

目的:通过多发性大肠癌这一特殊病例,分析其可能的高发因素及临床诊治意义.

方法:收集分析临床资料,包括临床症状体征、电子肠镜检查、手术方式、病理诊断、术后化疗以及随访等.

结果:临床资料和手术标本病理诊断证实本病例为3原癌且部位和分化程度不一.

结论:大肠多发癌与家族性结肠息肉病的关系十分密切.

姚红兵,吴爱国,朱卉娟. 大肠 3 原癌 1 例. 世界华人消化杂志 2003;11(5):662 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/662.htm>

1 病例报告

患者,男,51岁,因大便性状及习惯改变3 mo,加重10 d入院.查体:下腹部轻压痛,未扪及肿块.肛门指检:距肛门约5 cm处可扪及菜花状肿块,约3 × 3 cm大小,紧贴肠管,指套染血.电子肠镜示:(1)肝曲结肠癌;(2)直肠癌;(3)横结肠多发息肉家族史:其兄长死于大肠癌.术中探查与肠镜结果相符,遂行“右半结肠切除术”及“腹会阴联合直肠癌根治术”.术中所见:切除之肿瘤肉眼见一是位于结肠肝曲呈菜花状肿物,另直肠内有两处癌灶,呈溃疡型.病理结果:结肠低分化腺癌,未见淋巴转移;直肠中分化腺癌(两处癌灶),可见淋巴转移(1/4).术后予以抗炎、补液、营养支持及常规化疗一疗程.出院后再次化疗一疗程,随访至今已满半年,患者目前一般情况良好,未发现其他脏器转移.

2 讨论

多发性大肠癌是大肠癌的一种特殊临床病理类型.大肠癌中有2.05-12%为多发性癌^[1].邵永孚等^[2]报道的一组中大肠多发癌约占同期收治的大肠癌的2.6%.国内外很多文献研究资料均表明大肠多发癌与家族性结肠息肉病的关系十分密切.Langevin et al^[3]报道家族性结肠息肉病患者大肠多发癌发生率高达57-60%.Chu et al^[4]报道的一组1202例患者回顾性研究资料表明,多发癌的发生率随结肠多发息肉(SP)的增加而增加.相关的主要因素有息肉数目,大小和息肉类型.经病理证实,本例为3原癌并发结肠息肉且有大肠癌家族史,属大肠多发癌中少见类型,但本例不能确诊为家族性息肉病,不属于家族性结肠息肉病癌变,这提示了在肠道致癌因素作用下,大肠可多中心多起源发生3原癌,形成大肠多发癌的特殊临床表现,具体致病机制有待深入研究.因此,对临床诊治的有大肠癌家族史的患者,除了仔细询问家族史,了解有无家族性结肠息肉病、结肠癌家族史外,做电子肠镜时更应全面检查整个大肠情况,以了解有无多发癌灶,有无合并腺瘤、息肉等病变,以免漏诊^[2].此外,如肿瘤所致大肠梗阻时,可能会影响肠镜对梗阻上方大肠病变的观察而遗漏多发癌灶,因此,术中细致地全结肠探查对及时发现大肠多发癌则非常重要.

3 参考文献

- 1 Kiefer PJ, Thorson AG, Christensen MA. Metachronous colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1986;29:378-382
- 2 邵永孚,余宏迢,渠洁岩,袁兴华,王翔,李铎,吴建雄,解世亮,单毅,周志祥,陈国际,崔修铮,蔡建强,赵鹏,房明杰,王成峰.多发性大肠癌.中华外科杂志 1991;29:533-536
- 3 Langevin JM, Nivatvongs S. The true incidence of synchronous cancer of the large bowel. *Am J Surg* 1984;147:330-333
- 4 Chu DZ, Giacco G, Martin RG, Guinee VF. The significance of synchronous carcinoma of and polyps in the colon and rectum. *Cancer* 1986;56:445-450

液病. 中华小儿外科杂志 1991;12:202

62 梅雀林,李彦豪,陈勇,鲁恩洁. 部分性脾栓塞术治疗地中海贫血的长期疗效观察. 中华放射学杂志 2000;34:820-822

63 曹国文,李山云,黄佐良,张孝中,周进. 脾动脉栓塞治疗原发型血小板减少性紫癜和脾功能亢进(附6例报告). 实用放射学杂志 1998;14:360-361

64 马培东,张利辉,邓立非,贾太和,田玲娣,孙辉臣,刘继英,李风云,修贺明,郝晓东,陈春兰,强永德,胡雄,张雯,郭宏. 门脉高压症时脾静脉的

病理改变及其临床意义. 新消化病学杂志 1995;21-23

65 李席如,何泽生,吴金兰,马庆久,鲁建国,武永忠. 门脉高压症患者脾动静脉结构成分的变化. 华人消化杂志 1998;6:760-761

66 陈虎,周健,杨德琪. 部分脾栓塞术治疗难治性原发血小板减少性紫癜. 实用放射学杂志 1997;8:475-477

67 接贵涛. 部分脾栓塞术治疗脾功能亢进30例报告. 临床血液学杂志 2000;13:178-179

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版版权归世界胃肠病学杂志社

• 病例报告 •

大肠 3 原癌 1 例

姚红兵,吴爱国,朱卉娟

姚红兵,吴爱国,朱卉娟,中国人民解放军第一军医大学珠江医院普通外科 广东省广州市 510280
 项目负责人:姚红兵,510280,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学珠江医院普通外科. luckstar0503@163.com
 电话:020-61643211 传真:020-61643213
 收稿日期:2002-12-08 接受日期:2002-12-26

摘要

目的:通过多发性大肠癌这一特殊病例,分析其可能的高发因素及临床诊治意义.

方法:收集分析临床资料,包括临床症状体征、电子肠镜检查、手术方式、病理诊断、术后化疗以及随访等.

结果:临床资料和手术标本病理诊断证实本病例为3原癌且部位和分化程度不一.

结论:大肠多发癌与家族性结肠息肉病的关系十分密切.

姚红兵,吴爱国,朱卉娟. 大肠 3 原癌 1 例. 世界华人消化杂志 2003;11(5):662 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/662.htm>

1 病例报告

患者,男,51岁,因大便性状及习惯改变3 mo,加重10 d入院.查体:下腹部轻压痛,未扪及肿块.肛门指检:距肛门约5 cm处可扪及菜花状肿块,约3 × 3 cm大小,紧贴肠管,指套染血.电子肠镜示:(1)肝曲结肠癌;(2)直肠癌;(3)横结肠多发息肉家族史:其兄长死于大肠癌.术中探查与肠镜结果相符,遂行“右半结肠切除术”及“腹会阴联合直肠癌根治术”.术中所见:切除之肿瘤肉眼见一是位于结肠肝曲呈菜花状肿物,另直肠内有两处癌灶,呈溃疡型.病理结果:结肠低分化腺癌,未见淋巴转移;直肠中分化腺癌(两处癌灶),可见淋巴转移(1/4).术后予以抗炎、补液、营养支持及常规化疗一疗程.出院后再次化疗一疗程,随访至今已满半年,患者目前一般情况良好,未发现其他脏器转移.

2 讨论

多发性大肠癌是大肠癌的一种特殊临床病理类型.大肠癌中有2.05-12%为多发性癌^[1].邵永孚等^[2]报道的一组中大肠多发癌约占同期收治的大肠癌的2.6%.国内外很多文献研究资料均表明大肠多发癌与家族性结肠息肉病的关系十分密切.Langevin et al^[3]报道家族性结肠息肉病患者大肠多发癌发生率高达57-60%.Chu et al^[4]报道的一组1202例患者回顾性研究资料表明,多发癌的发生率随结肠多发息肉(SP)的增加而增加.相关的主要因素有息肉数目,大小和息肉类型.经病理证实,本例为3原癌并发结肠息肉且有大肠癌家族史,属大肠多发癌中少见类型,但本例不能确诊为家族性息肉病,不属于家族性结肠息肉病癌变,这提示了在肠道致癌因素作用下,大肠可多中心多起源发生3原癌,形成大肠多发癌的特殊临床表现,具体致病机制有待深入研究.因此,对临床诊治的有大肠癌家族史的患者,除了仔细询问家族史,了解有无家族性结肠息肉病、结肠癌家族史外,做电子肠镜时更应全面检查整个大肠情况,以了解有无多发癌灶,有无合并腺瘤、息肉等病变,以免漏诊^[2].此外,如肿瘤所致大肠梗阻时,可能会影响肠镜对梗阻上方大肠病变的观察而遗漏多发癌灶,因此,术中细致地全结肠探查对及时发现大肠多发癌则非常重要.

3 参考文献

- 1 Kiefer PJ, Thorson AG, Christensen MA. Metachronous colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1986;29:378-382
- 2 邵永孚,余宏迢,渠洁岩,袁兴华,王翔,李铎,吴建雄,解世亮,单毅,周志祥,陈国际,崔修铮,蔡建强,赵鹏,房明杰,王成峰.多发性大肠癌.中华外科杂志 1991;29:533-536
- 3 Langevin JM, Nivatvongs S. The true incidence of synchronous cancer of the large bowel. *Am J Surg* 1984;147:330-333
- 4 Chu DZ, Giacco G, Martin RG, Guinee VF. The significance of synchronous carcinoma of and polyps in the colon and rectum. *Cancer* 1986;56:445-450

FAK 在大肠癌中的表达及其临床意义

杨红军, 丁彦青

杨红军, 丁彦青, 中国人民解放军第一军医大学病理学教研室
广东省广州市 510515
国家自然科学基金及国家“973”资助课题, No.30170423, No.
2001C13510208
项目负责人: 丁彦青, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学病理学教研室. dyq@fimmu.com
电话: 020-61642148 传真: 020-87705671
收稿日期: 2002-10-09 接受日期: 2002-11-04

摘要

目的: 研究黏着斑激酶 (FAK) 在大肠癌及癌旁组织中的表达及其与肿瘤细胞分化、浸润、转移等生物学行为的关系。

方法: 应用免疫组织化学 LSAB 法检测 60 例大肠癌及癌旁组织石蜡标本中 FAK 蛋白的表达水平。

结果: FAK 在癌组织中的表达明显高于癌旁组织 ($\chi^2=42.553$, $P=0.000$), 低分化癌组织较高分化、中分化组织中 FAK 的表达水平高 ($\chi^2=4.848$, $P=0.028$), 浸润程度越深表达越高 ($\chi^2=11.518$, $P=0.001$), 有淋巴结转移较无转移组织的表达水平高 ($\chi^2=9.613$, $P=0.002$)。

结论: FAK 可能既是一种转化相关酶又是一种演变相关酶。FAK 的表达量可作为肿瘤发生、发展过程中一种较有价值的病理指标。

杨红军, 丁彦青. FAK 在大肠癌中的表达及其临床意义. 世界华人消化杂志 2003; 11(5): 663-665

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/663.htm>

0 引言

大肠癌是一种常见的恶性肿瘤, 侵袭与远处转移是导致大肠癌患者临床治疗失败和死亡的主要原因之一。肿瘤侵袭转移是一个多步骤肿瘤细胞与宿主细胞相互作用的生物学过程。由整合素 (integrin) 激活 FAK 介导的信号转导在此过程中发挥着重要作用^[1,2]。

整合素是一类跨膜糖蛋白受体, 他与配体 (大部分为 ECM 成分) 的连接促使 FAP 即黏着斑的形成。FAP 是整合素转导信号的结构基础。除细胞骨架蛋白外, 在 FAP 内还存在多种重要的信号转导分子, 如 FAK、Src 等。可以说 FAP 的存在为这些信号分子间的反应提供了一个支架, 便利了整合素介导的信号传递^[3,4]。FAK (黏着斑激酶) 是一非受体酪氨酸蛋白激酶^[5]。FAP 形成后, FAK 发生自主磷酸化而活化并且与 Src 形成信号转导复合物。Src 与 FAK 结合后能够相互激活, 使 FAK 完全活化。活化的 FAK 进而通过 paxillin、Grb2、Cas、PI-3K 及 STAT 等与信号转导有关的分子, 激活多条信号转导通路^[6-8]。从而参与细胞分化、增生、伸展和迁移,

以及肿瘤的侵袭和转移等。因此, FAK 被认为是整合素依赖性信号转导通路的基础分子, 在整合素介导的信号转导途径中起着关键作用^[9,10]。

本研究采用免疫组织化学方法检测了大肠癌及相应癌旁组织中 FAK 的表达, 以此了解 FAK 在大肠癌组织及相应癌旁组织中的表达情况, 并分析他们与癌细胞分化程度及侵袭转移间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我校附属南方医院外科手术标本共 60 例, 全部为腺癌, 其中男性 46 例, 女性 14 例。年龄 26-75 岁, 组织经 100 mL/L 甲醛常规固定, 石蜡包埋, 5 μm 连续切片, 分别进行 H E 染色和免疫组化染色。FAK(H-1) 抗体 (小鼠抗人单克隆抗体) 及生物素标记的羊抗小鼠 IgG 为 Santa Cruz 公司产品。LSAB(SP) 试剂为美国 Vector Laboratories 公司产品, 其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学方法 采用我室创立的真空负压链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法 (LSAB 或 SP 法)^[11]。具体步骤如下: (1) 石蜡切片常规脱蜡至水 10 min; (2) 置于 3 mL/L H_2O_2 甲醇中真空负压 5 min; (3) 水洗 1 min; (4) 切片置入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中, 放入已预先将温度调到 95 左右的真空恒温干燥箱中, 真空负压 10 min, 室温静置 10 min; (5) PBS 洗 3 次, 共 3 min; (6) 加 1 滴或 50 μL 10 mL/L 正常羊血清 (第二抗体动物血清), 真空负压 5 min; (7) 加 1 滴或 50 μL 一抗 (1:100 稀释), 真空负压 5 min; (8) PBS 冲洗 3 次, 共 3 min; (9) 加 1 滴或 50 μL 二抗 (1:100), 真空负压 5 min; (10) PBS 洗 3 次, 共 2 min; (11) 加 1 滴或 50 μL SP 复合物, 真空负压 5 min; (12) PBS 洗 2 次, 共 2 min; (13) DAB- H_2O_2 显色 5 min; (14) PBS 洗 1 min, 水洗 1 min, 苏木素复染 1 min, 中性树脂封固。每例均取 1 片用 PBS 取代一抗作阴性对照。

1.2.2 分化分级标准 参照 WHO 癌细胞分化分级标准: 低分化 (级), 中分化 (级), 高分化 (级)。

1.2.3 半定量结果判断^[12] 免疫组化染色, 无棕黄色为 (-); 淡棕黄色为 (+); 棕黄色为 (++) ; 棕褐色为 (+++)。同样物镜下观察阳性细胞数 (-): 无阳性细胞; (+): 阳性细胞 10%; (++) : 阳性细胞为 11-50%; (+++) : 阳性细胞 >50%。

统计学处理 采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 FAK在大肠癌及癌旁组织中的表达 在60例癌组织中有35例FAK表达为强阳性(+++)或较强阳性(++),在60例癌旁组织中仅有2例较强阳性,二者有显著性差异($\chi^2=42.553$, $P=0.000$).大肠癌与癌旁组织的FAK表达阳性率有显著性差异($\chi^2=8.711$, $P=0.003$),见表1.

表1 FAK在大肠癌及癌旁组织中的表达

组织	n	FAK				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
组织类别						
癌旁组织	60	22	36	2	0	63.3
癌组织	60	8	17	23	12	86.7
分化程度						
低分化	35	4	7	15	9	88.6
高或中分化	25	5	10	7	3	80.0
浸润程度						
黏膜或浅肌层	13	7	4	2	0	46.2
深肌层或全层	47	2	13	20	12	95.7
转移情况						
无淋巴结转移	29	8	10	10	1	72.4
有淋巴结转移	31	0	7	13	11	100.0

2.2 FAK的表达与大肠癌分化程度的关系 在35例低分化大肠癌组织中,表达为强阳性或较强阳性者共24例,在25例高、中分化组织中表达为强阳性或较强阳性者共10例,二者有显著性差异($\chi^2=4.848$, $P=0.028$).但低分化组与高中分化组的FAK表达阳性率相比无显著性差异($\chi^2=0.840$, $P=0.359$),见表1.

2.3 FAK的表达与大肠癌浸润程度的关系 在13例有浅肌层或黏膜浸润的癌组织中,2例为较强阳性.在47例有深肌层或全层浸润的癌组织中,表达为强阳性或较强阳性者共32例.可见FAK在深肌层或全层浸润的癌组织中的表达明显高于浸润较浅的组织,有显著性差异($\chi^2=11.518$, $P=0.001$).2组间的FAK表达阳性率有显著性差异($\chi^2=19.642$, $P=0.000$),见表1.

2.4 FAK的表达与大肠癌转移的关系 在29例无淋巴结转移的癌组织中,表达为强阳性或较强阳性者共11例.31例有淋巴结转移的癌组织中,表达为强阳性或较强阳性者共24例,说明转移组与非转移组之间表达量有显著性差异($\chi^2=9.613$, $P=0.002$),且2组间的FAK表达阳性率也有显著性差异($\chi^2=9.867$, $P=0.002$),见表1.

3 讨论

FAK是一种非受体酪氨酸蛋白激酶,主要在细胞质中表达,与肿瘤关系密切.本研究显示,FAK在大肠癌组织中的表达量明显高于癌旁组织,二者的阳性率有

显著性差异;低分化大肠癌组织的FAK表达量比高、中分化癌组织的表达量高,但他们的阳性率无显著性差异;FAK的表达与癌细胞浸润、转移有关,浸润程度越深,FAK的表达越强,同时有淋巴结转移的癌组织FAK的表达较无转移组高,他们的阳性率有显著性差异.此结果与其他学者的相关研究类似^[13-15].

尽管目前关于FAK在癌组织及低分化癌组织中表达比癌旁及高、中分化癌组织高的原因尚未明了,但通常认为包括以下几个方面:(1)FAK分子中有6个酪氨酸的磷酸化位点,其中Tyr397为自身磷酸化位点,对Src有调控作用.在正常组织中,ECM蛋白含量较低,而在肿瘤基质中,ECM蛋白含量升高,同时,癌旁组织整合素 $\alpha_5\beta_1$ 等亚基高表达,造成基质蛋白相对更少,使整合素不能有效地与基质结合,此时FAK的Tyr397虽然被磷酸化,但FAK的活性并不高,FAK表达较低;另外,在癌旁组织中可能Src的表达本身较低,使Src不能与FAK进行有效的结合,从而使FAK的活性更低,FAK的表达下降^[16].当然,就本实验而言,Src及整合素 $\alpha_5\beta_1$ 等的表达水平尚需实验加以证实;(2)在癌旁组织中还存在着与FAK连接的PTEN等对整合素介导的信号转导起负调控作用的因子,使FAK的活性降低,FAK的表达下降^[17]; (3)也有研究认为FAK的过度表达与其基因量的增加有关^[18].如前所述,FAK的磷酸化在信号转导过程中起着关键作用,因此,FAK表达的上调或下调对此过程也具有深远的影响.癌组织中FAK处于过度表达,从而将存活信号不断放大,导致癌细胞不断地以非锚定生长的方式增生.而肿瘤细胞的不断增生和运动是肿瘤浸润的前提,即肿瘤细胞的增生和运动有利于细胞侵袭和浸润,肿瘤浸润是转移的前奏.所以上述原因也导致了浸润及转移组大肠癌中FAK的表达升高.高、中分化癌与低分化癌的FAK表达阳性率无显著性差异的原因,可能由于FAK是一种在大多数正常组织中都存在的基因^[15,19],可能在正常组织中FAK有表达,但表达水平较低,如本研究所见,癌旁组织FAK表达大多为弱阳性,而在癌组织中表达明显升高.

由此可见,FAK作为整合素介导的信号转导过程中的基础分子,是一种与细胞的癌变、分化、转移相关的蛋白激酶,他可能既是一种转化相关酶,又是一种演变相关酶.FAK表达的高低可能作为肿瘤发生、发展过程中一种较有价值的病理指标,而对FAK表达量及活性的调控对改变癌细胞的发展将有积极作用.

4 参考文献

- 1 Kumar CC. Signaling by integrin receptors. *Oncogene* 1998; 17:1365-1373
- 2 Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285: 1028-1032
- 3 Cary LA, Han DC, Guan JL. Integrin-mediated signal transduction pathways. *Histol Histopathol* 1999; 14: 1001-1009
- 4 Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrins and actin

- filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem* 2000;275:22607-22610
- 5 Schaller MD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:705-710
 - 6 Schlaepfer DD, Hunter T. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol* 1998; 8: 151-157
 - 7 Liu G, Guibao CD, Zheng J. Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 2002;22:2751-2760
 - 8 Hayashi I, Vuori K, Liddington RC. The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nat Struct Biol* 2002;9:101-106
 - 9 Roy S, Ruest PJ, Hanks SK. FAK regulates tyrosine phosphorylation of CAS, paxillin, and PYK2 in cells expressing v-Src, but is not a critical determinant of v-Src transformation. *J Cell Biochem* 2002;84:377-388
 - 10 Salazar EP, Rozengurt E. Src family kinases are required for integrin-mediated but not for G protein-coupled receptor stimulation of focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397. *J Biol Chem* 2001;276:17788-17795
 - 11 蔡俊杰, 邱红明, 张盛. 应用真空负压 LSAB 法快速显示各种组织相关抗原的研究. *中国组织化学与细胞化学杂志* 1996;5:109-111
 - 12 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准. *中国癌症杂志* 1996;6:229-231
 - 13 Ayaki M, Komatsu K, Mukai M, Murata K, Kameyama M, Ishiguro S, Miyoshi J, Tatsuta M, Nakamura H. Reduced expression of focal adhesion kinase in liver metastases compared with matched primary human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2001; 7:3106-3112
 - 14 Brunton VG, Fincham VJ, McLean GW, Winder SJ, Paraskeva C, Marshall JF, Frame MC. The protrusive phase and full development of integrin-dependent adhesions in colon epithelial cells require FAK- and ERK-mediated actin spike formation: deregulation in cancer cells. *Neoplasia* 2001;3:215-226
 - 15 Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J, Simkins S, Xu L. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res* 2000;6:2417-2423
 - 16 Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71:435-478
 - 17 Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998;280:1614-1617
 - 18 Agochiya M, Brunton VG, Owens DW, Parkinson EK, Paraskeva C, Keith WN, Frame MC. Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene* 1999;18:5646-5653
 - 19 Hanks SK, Calalb MB, Harper MC, Patel SK. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 8487-8491

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响

童卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯, 高峰

童卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯, 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外科 重庆市 400042
高峰, 兰州军区总医院普外科 甘肃省兰州市 730001
项目负责人: 童卫东, 400042, 重庆市长江支路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外科. vdtong@hotmail.com
电话: 023-68757248
收稿日期: 2002-11-19 接受日期: 2002-11-29

摘要

目的: 探讨长期应用大黄对结肠机电、肠神经系统的影响。

方法: 建立大鼠“泻剂结肠”模型, 应用电生理、组化及免疫组化技术研究大黄对大鼠结肠动力、ENS 多种神经递质及 Cajal 间质细胞(ICC)的影响。

结果: 大鼠饲养大黄 3 mo 后, 结肠慢波频率减慢; 结肠肌间丛 NADPH 阳性神经细胞数目增多, AchE 阳性神经细胞数目减少; NOS 免疫反应性增强, SOM 免疫反应性减弱; 肌间丛 ICC 分布不均匀, 突起连接杂乱。

结论: 长期应用大黄对结肠动力和 ENS 有损害作用, 在临床治疗顽固性便秘时应避免长期应用大黄等刺激性泻剂。

童卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯, 高峰. 大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):665-667

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/665.htm>

0 引言

大黄是慢传输性便秘(slow transit constipation, STC)患者常用的一种泻剂, STC 结肠动力和多种肠神经递质有异常变化, 但这些变化是否继发于长期服用大黄等刺激性泻剂争议较多^[1]。我们用大黄建立大鼠“泻剂结肠”模型, 用电生理、肌间神经丛铺片、免疫组化、碘化锌-钨酸(zinc iodide-osmic acid, ZIO)染色等方法, 检测结肠机电、肠神经递质及 Cajal 间质细胞(interstitial cells of cajal, ICC)变化, 探讨大黄对结肠动力和肠神经系统(enteric nervous system, ENS)的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 成年 Wistar 大鼠 32 只随机分为对照组和大黄组, 每组 16 只。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 对照组饲以普通干饲料。大黄组饲以含大黄饲料, 起始剂量为 200 mg/(kg·d), 半数致泻剂量为 1 000 mg/(kg·d), 维持此剂量直到稀便消失, 再按 200 mg/(kg·d)递增, 如此保持半数以上动物有下泻作用饲养 3 mo, 最终调整剂量为 2 400 mg/(kg·d)。

1.2.2 结肠肌电测定 禁食 24 h, 在结肠近段(距盲肠约

- filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem* 2000;275:22607-22610
- 5 Schaller MD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 1994;6:705-710
 - 6 Schlaepfer DD, Hunter T. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol* 1998; 8: 151-157
 - 7 Liu G, Guibao CD, Zheng J. Structural insight into the mechanisms of targeting and signaling of focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 2002;22:2751-2760
 - 8 Hayashi I, Vuori K, Liddington RC. The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nat Struct Biol* 2002;9:101-106
 - 9 Roy S, Ruest PJ, Hanks SK. FAK regulates tyrosine phosphorylation of CAS, paxillin, and PYK2 in cells expressing v-Src, but is not a critical determinant of v-Src transformation. *J Cell Biochem* 2002;84:377-388
 - 10 Salazar EP, Rozengurt E. Src family kinases are required for integrin-mediated but not for G protein-coupled receptor stimulation of focal adhesion kinase autophosphorylation at Tyr-397. *J Biol Chem* 2001;276:17788-17795
 - 11 蔡俊杰, 邱红明, 张盛. 应用真空负压 LSAB 法快速显示各种组织相关抗原的研究. *中国组织化学与细胞化学杂志* 1996;5:109-111
 - 12 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准. *中国癌症杂志* 1996;6:229-231
 - 13 Ayaki M, Komatsu K, Mukai M, Murata K, Kameyama M, Ishiguro S, Miyoshi J, Tatsuta M, Nakamura H. Reduced expression of focal adhesion kinase in liver metastases compared with matched primary human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2001; 7:3106-3112
 - 14 Brunton VG, Fincham VJ, McLean GW, Winder SJ, Paraskeva C, Marshall JF, Frame MC. The protrusive phase and full development of integrin-dependent adhesions in colon epithelial cells require FAK- and ERK-mediated actin spike formation: deregulation in cancer cells. *Neoplasia* 2001;3:215-226
 - 15 Cance WG, Harris JE, Iacocca MV, Roche E, Yang X, Chang J, Simkins S, Xu L. Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin Cancer Res* 2000;6:2417-2423
 - 16 Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71:435-478
 - 17 Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. *Science* 1998;280:1614-1617
 - 18 Agochiya M, Brunton VG, Owens DW, Parkinson EK, Paraskeva C, Keith WN, Frame MC. Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene* 1999;18:5646-5653
 - 19 Hanks SK, Calalb MB, Harper MC, Patel SK. Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89: 8487-8491

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响

童卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯, 高峰

童卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯, 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外科 重庆市 400042
高峰, 兰州军区总医院普外科 甘肃省兰州市 730001
项目负责人: 童卫东, 400042, 重庆市长江支路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外科. vdtong@hotmail.com
电话: 023-68757248
收稿日期: 2002-11-19 接受日期: 2002-11-29

摘要

目的: 探讨长期应用大黄对结肠机电、肠神经系统的影响。

方法: 建立大鼠“泻剂结肠”模型, 应用电生理、组化及免疫组化技术研究大黄对大鼠结肠动力、ENS 多种神经递质及 Cajal 间质细胞(ICC)的影响。

结果: 大鼠饲养大黄 3 mo 后, 结肠慢波频率减慢; 结肠肌间丛 NADPH 阳性神经细胞数目增多, AchE 阳性神经细胞数目减少; NOS 免疫反应性增强, SOM 免疫反应性减弱; 肌间丛 ICC 分布不均匀, 突起连接杂乱。

结论: 长期应用大黄对结肠动力和 ENS 有损害作用, 在临床治疗顽固性便秘时应避免长期应用大黄等刺激性泻剂。

童卫东, 张胜本, 刘宝华, 张连阳, 黄显凯, 高峰. 大黄对大鼠结肠动力及肠神经系统的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(5):665-667

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/665.htm>

0 引言

大黄是慢传输性便秘(slow transit constipation, STC)患者常用的一种泻剂, STC 结肠动力和多种肠神经递质有异常变化, 但这些变化是否继发于长期服用大黄等刺激性泻剂争议较多^[1]。我们用大黄建立大鼠“泻剂结肠”模型, 用电生理、肌间神经丛铺片、免疫组化、碘化锌-钨酸(zinc iodide-osmic acid, ZIO)染色等方法, 检测结肠机电、肠神经递质及 Cajal 间质细胞(interstitial cells of cajal, ICC)变化, 探讨大黄对结肠动力和肠神经系统(enteric nervous system, ENS)的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 成年 Wistar 大鼠 32 只随机分为对照组和大黄组, 每组 16 只。

1.2 方法

1.2.1 模型建立 对照组饲以普通干饲料。大黄组饲以含大黄饲料, 起始剂量为 200 mg/(kg·d), 半数致泻剂量为 1 000 mg/(kg·d), 维持此剂量直到稀便消失, 再按 200 mg/(kg·d)递增, 如此保持半数以上动物有下泻作用饲养 3 mo, 最终调整剂量为 2 400 mg/(kg·d)。

1.2.2 结肠机电测定 禁食 24 h, 在结肠近段(距盲肠约

2 cm)安置一对银丝电极，导线经切口引出连接胃肠电放大器。灵敏度 2 mV/cm，连续记录 3 h 左右。以 5 min 为一个时间段，分别计算每个时间段的频率、振幅及变异系数。

1.2.3 结肠神经病理学研究 (1) 肌间丛铺片 NADPH-d 组织化学染色：肌间神经丛铺片制作参照肖岗 et al [2] 肠道铺片法。配制作用液：1.0 g/L β-NADPH diaphorase，0.25 g/L NBT，0.01 mol/L PBS pH 7.2)。将铺片标本 37 孵育 30-40 min，PBS 漂洗终止反应，光镜观察。对照实验于作用液中不加 β-NADPH diaphorase (2) 肌间丛铺片乙酰胆碱酯酶(AchE)组化染色：按照 Karnovsky-Root [3] 法配制作用液，铺片入作用液中孵育 90 min(37)。对照实验以 10⁻⁴ mol/L 毒扁豆碱代替异 -OMPA (3) NOS、SOM、5-HT 免疫组织化学染色：采用 SP 法，按照试剂盒说明书操作 (4) 碘化锌 - 钼酸(ZIO)染色：作用液配制：将 20 g/L 钼酸与 30 g/L 碘化锌 1 : 3 混合，二者均新鲜配制，新鲜混合 (5) 图像分析：在显微镜物镜放大倍数 20 × 下，视野摄入计算机(分辨率为 512 × 476)，测量每个视野阳性染色区域的表面积密度，即面密度。

统计学处理 数据以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用 Microsoft Excel 7.0 进行单因素方差分析，计数资料用二维列联表分析。

2 结果

2.1 结肠肌电测定 与对照组相比，大黄组结肠慢波频率明显减慢，慢波频率变异系数在 25-30 % 之间，振幅无明显变化，振幅变异系数在 45-50 % 之间(表 1)。

表 1 结肠慢波频率、振幅及其变异系数

	频率 (次 /5min)	频率变异 系数(%)	振幅 (mV/5min)	振幅变异 系数(%)
对照组	35.06±8.94	25.50	11.83±5.34	45.12
大黄组	27.07±7.87 ^a	29.07	13.41±6.16	45.94

^aP < 0.05, vs 对照组。

2.2 结肠壁内神经病理变化 (1) 肌间神经丛 NADPH-d 染色：结肠肌间丛神经纤维纵横交错呈网状分布，在 100 倍光镜下对阳性细胞计数，每例随机选取 10 个神经节，每组共 100 个神经节进行计数。结果大黄组阳性细胞数明显高于对照组(图 1)。(2) 肌间神经丛铺片 AchE 组化染色：肌间丛神经节细胞及纤维呈棕红色。对神经节阳性细胞计数，与对照组相比，大黄组阳性细胞在结肠近段和远段均明显减少，大黄组仅在结肠近段明显减少(图 2)。(3) NOS、SOM、5-HT 免疫组化染色：大黄组肌间丛 NOS 免疫反应性明显增强，SOM 免疫反应性降低，而 5-HT 免疫反应性无明显变化 (表 2)。(4) ZIO 染色：对照组 ICC 突起相互连接形成网络，ICC 分布比较均匀；而大黄组 ICC 分布极不均匀，有的视野 ICC 密集，突起连接杂乱，有的视野 ICC 稀少，突起不能相互连接形成网

络(图 3)。高倍镜观察 ICC 的形态，实验组与对照组无明显差别。

表 2 肌间丛 NOS、SOM、5-HT 及 NSE 免疫组化图像分析(面密度/视野)

组别	NOS	SOM	5-HT
对照组	1.275±0.652	1.553±0.658	1.437±0.716
大黄组	2.979±1.073 ^b	0.829±0.371 ^a	1.185±0.640

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 对照组。

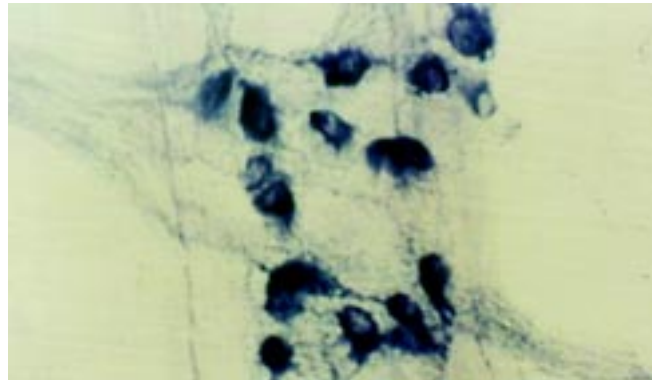


图 1 大黄组肌间丛 NADPH 阳性细胞增多 × 400。



图 2 大黄组肌间丛 Ach 阳性细胞减 × 200。

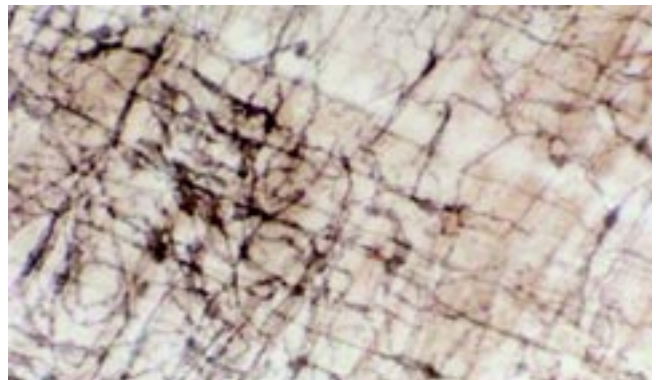


图 3 大黄组肌间丛铺片上, ICC 分布不均匀, 突起连接杂乱 × 400。

3 讨论

3.1 “泻剂结肠”的提出和再认识 1973 年, Smith^[4]报道“泻剂结肠”结肠的主要病理特征包括：肌间丛嗜银性神经元数目减少，平滑肌层变薄，结肠黏膜

黑变。近年的研究发现“泻剂结肠”ENS的多种神经递质含量或分布异常,但争议较多^[5,6]。本研究没有发现结肠扩张、黏膜黑变和平滑肌萎缩等改变,但存在ENS神经递质分布和含量的异常,与文献报道一致。我们认为,“泻剂结肠”是指长期应用刺激性泻剂造成结肠ENS紊乱和相应的功能失调,导致结肠动力障碍,对泻剂反应性下降,使患者对泻剂产生依赖性的一种状况。

3.2 大鼠“泻剂结肠”结肠动力变化 Frieri et al^[7]报道长期服用泻剂的便秘患者结肠慢波频率较对照组升高($P < 0.05$),提示慢波异常与结肠动力障碍有关,但这种改变是服用泻剂引起的还是该病固有的肌电异常不能确定。为此,有人测定了饲以番泻叶6 mo的大鼠结肠在体肌电未发现异常^[8]。我们发现结肠慢波频率减慢,提示长期大剂量应用大黄影响结肠慢波的产生或传导,与文献报道不同。造成结果差异的原因可能与文献中的泻剂用量较小,10-40 mg/(kg·d),恒定剂量饲养,不符合STC患者泻剂用量越用越大的过程有关。

3.3 大鼠“泻剂结肠”结肠壁神经病理变化 本研究发现饲养大黄3 mo可导致大鼠结肠NOS免疫反应性增强。NADPH-d组化染色与免疫组化的结果一致。Izzo et al^[9]报道芦荟(含蒽醌)的致泻作用依赖内源性NOS的调解,提示NO在“泻剂结肠”的病理生理机制中起重要作用。结肠AChE阳性神经元数目减少,提示ACh合成或释放减少。ACh的释放与ENS其他神经递质密切相关,神经肽Y和内源性NO可抑制ACh释放,蛙皮素、SOM、降钙素基因相关肽及某些5-HT受体激动剂可促使ACh释放,而ACh又可促进VIP的释放^[10]。目前尚不能明确在这种作用中是否存在反馈调节机制,Ach含量的异常变化是泻剂的直接作用,还是肠壁内NO含量增多后的继发反应有待进一步研究。

SOM对肠道运动有抑制作用。Tzavella et al^[11]报道大剂量蒽醌500 mg/(kg·d)饲养大鼠6 mo后,放免法测定结肠壁神经肽含量发现SOM含量明显下降。我们的结果表明应用大黄3 mo,大鼠结肠肌间丛SOM免疫反应性降低,与Tzavella结果一致。而Kiernan et al^[12]观察了饲养番泻叶5 mo的大鼠未发现SOM异常,这种结果的不同可能与其所用泻剂剂量较小有关,剂量为95 mg/(kg·d)。

Kiernan未发现“泻剂结肠”5-HT免疫反应异常。我们发现黏膜层免疫阳性反应有增强的表现,可能与肠黏膜分泌功能增强有关。从神经免疫生理学的角度来看,黏膜干细胞释放的5-HT也可通过某种方式作用于神经丛的特异性受体从而发挥调节作用,因此“泻剂结肠”黏膜层5-HT含量的增多很可能与ENS其他递质的变化有内在联系。

3.4 肌间丛ICC变化 ICC对胃肠动力有重要的调控作用^[13]。一方面ICC可能是胃肠道慢波的起搏者(pacemaker cells),另一方面ICC可能参与了NANC神经信息传递过程^[14]。有报道Hirschsprung's病及慢性特发性假性肠梗阻之病变肠段缺乏c-kit免疫反应阳性细胞,提示ICC发育不良或数目减少与胃肠动力紊乱性疾病的发病有关^[15]。最近有报道STC患者结肠壁内ICC减少可能与其发病有关^[16]。目前未见有关“泻剂结肠”ICC变化的报道。我们发现大黄组肌间丛ICC分布不均匀,ICC密集区域其突起相互连接杂乱无章,而ICC稀少区域则无明显的网络形成。既然ICC是肠道慢波的起搏者,其突起形成的网络可能与慢波的传播有关,推测大鼠“泻剂结肠”结肠肌间丛ICC分布和网络的杂乱性与慢波频率减慢有关。

4 参考文献

- Knowles CH, Martin JE. Slow transit constipation: a model of human gut dysmotility. Review of possible aetiologies *Neurogastroenterol Motil* 2000;12:181-196
- 肖岚,蔡文琴,孙瑜. 大鼠空肠肌间神经丛NADPH-黄递酶的光镜及电镜观察. *解剖学报* 1996;27:85-87
- 陆啸梅,周文郁,彭俊云编. 组织化学手册. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 1982:172-175
- Smith B. Pathologic changes in the colon produced by anthraquinone purgatives. *Dis Colon Rectum* 1973;16:455-458
- Krishnamurthy S, Schuffler MD, Rohmann CA, Pope CE. Severe idiopathic constipation is associated with a distinctive abnormality of the colonic myenteric plexus. *Gastroenterology* 1985;88(1pt1):26-34
- Xing JH, Soffer EE. Adverse effects of laxatives. *Dis Colon Rectum* 2001;44:1201-1209
- Frieri G, Parisi F, Corazziari E, Caprilli R. Colonic electromyography in chronic constipation. *Gastroenterology* 1983;84:737-740
- Fioramonti J, Dupuy C, Bueno L. In vivo motility of rat colon chronically pretreated with sennosides. *Pharmacology* 1993;47(Suppl 1):155-161
- Izzo AA, Sautebin L, Borrelli F, Longo R, Capasso F. The role of nitric oxide in aloe-induced diarrhoea in the rat. *Eur J Pharmacol* 1999;386:43-48
- 童卫东, 张胜本. 慢传输型便秘肠神经系统的研究进展. *国外医学外科学分册* 1999;26:212-214
- Tzavella K, Schenkirsch G, Riepl RL, Odenthal KP, Leng-Peschlow E, Muller-Lissner SA. Effects of long-term treatment with anthranoids and sodium picosulphate on the contents of vasoactive intestinal polypeptide, somatostatin and substance P in the rat colon. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:13-20
- Kiernan JA, Heinicke EA. Sennosides do not kill myenteric neurons in the colon of the rat or mouse. *Neuroscience* 1989;30:837-842
- 童卫东, 蔡文琴, 张胜本. Cajal间质细胞研究进展. *解剖科学进展* 1997;3:214-218
- 童卫东, 张胜本, 张连阳, 蔡文琴, 杜文华, 牟江洪. 大鼠结肠肌间神经丛Cajal间质细胞的形态. *解剖学杂志* 1999;22:316-318
- Vanderwinden JM, Rumessen JJ. Interstitial cells of Cajal in human gut and gastrointestinal disease. *Microsc Res Tech* 1999;47:344-360
- He CL, Burgart L, Wang L, Pemberton J, Young-Fadok T, Szurszewski J, Farrugia G. Decreased interstitial cell of Cajal volume in patients with slow transit constipation. *Gastroenterology* 2000;118:14-21

胃癌患者血清 TNF- α 的水平及意义

陈剑群,许统俭,安侠,王营,陈玉林

陈剑群,许统俭,安侠,王营,陈玉林,徐州医学院附属医院消化科 江苏省徐州市 221002

项目负责人:陈剑群,221002,江苏省徐州市淮海西路99号,徐州医学院附属医院消化科. chenjianq@pub.xz.jsinfo.net

电话:0516-5802493 传真:0516-5802297

收稿日期:2002-10-18 接受日期:2002-11-25

摘要

目的:探讨检测肿瘤坏死因子(TNF- α)血清水平对于判断胃癌临床分期的价值和意义。

方法:应用酶联免疫标记法(ELISA)检测胃镜活检病理、手术切除证实的胃癌患者以及晚期姑息治疗的胃癌患者103例血清 TNF- α 水平,并与 26 例确诊为浅表性胃炎患者比较。

结果:早期、中期、晚期和终末期胃癌患者血清 TNF- α 水平(135.46 ± 27.5 , 238.9 ± 55.8 , 252.04 ± 34.7 和 202.86 ± 53.3 pg/mL)显著高于胃炎患者(60.41 ± 11.4 pg/mL, $P < 0.01$),而中晚期患者也显著高于早期患者($P < 0.01$)。

结论:早期检测 TNF- α 有助于胃癌的临床分期、观察治疗效果和判断预后与复发,可作为辅助诊断指标。

陈剑群,许统俭,安侠,王营,陈玉林. 胃癌患者血清 TNF- α 的水平及意义. 世界华人消化杂志 2003;11(5):668-669

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/668.htm>

0 引言

胃癌是消化道肿瘤中最常见的恶性肿瘤,也是发病最为隐袭的肿瘤之一,因而约三分之二的患者出现明显症状就诊时,已经处于中晚期,丧失了手术根治的机会。如果早期通过较为特异手段判断肿瘤的发展阶段,采取合理治疗方法,患者生命质量将得到改善;以免不必要的手术导致病情恶化,加速病情进展使患者死亡。肿瘤坏死因子(TNF- α)是一种由激活的巨噬细胞所分泌的细胞因子,参与机体多种生理、病理和免疫过程。临床研究发现,低浓度 TNF- α 可活化中性粒细胞,刺激单核细胞,激活巨噬细胞,还可通过 T、B 淋巴细胞的调节来影响特异和非特异性免疫功能。高浓度 TNF- α 则可抑制免疫反应,导致机体生理功能紊乱^[1-6]。本研究检测了胃镜活检及手术治疗确诊的胃癌患者术前 TNF- α 血清浓度,并按临床分期进行比较,以探讨早期检测的临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 全部病例来自 1999-02/2002-08 消化科门诊

行胃镜检查、外科住院手术的患者,终末期胃癌为内科住院患者。共 103 例,男 86 例,女 17 例;年龄 25-80 岁,平均 42.5 ± 16.3 岁。根据胃镜活检病理、术后病理及淋巴结检查,病理类型为胃腺癌 67 例,低分化癌 16 例,未分化癌 15 例,印戒细胞癌 5 例。临床分期:(1)早期胃癌:病灶局限,仅侵犯黏膜下层,无淋巴结转移,共 32 例;(2)中期胃癌:侵犯黏膜下层,有少数胃周淋巴结转移,共 29 例;(3)晚期胃癌:手术时有胃周围及腹腔淋巴结转移,伴有腹水,手术仅为姑息性治疗,共 25 例;(4)终末期胃癌:手术后复发或化疗后晚期胃癌,有各种并发症,治疗仅为支持性维持,共 17 例。对照组随机选择胃镜检查的浅表性胃炎 26 例,年龄 22-65 岁,平均 40.8 ± 10.6 岁。

1.2 方法 在患者胃镜检查当天或次日晨抽取空腹肘静脉血 2 mL,用 EDTA 抗凝,高速离心取上清液待测,或放置 -20℃ 冰箱保存。TNF- α 测定按酶联免疫黏附法(ELISA),以 pg/mL 为单位表示血清含量。

统计学处理 用 $\bar{x} \pm s$ 表示血清 TNF- α 水平,采用 PEMS 软件包中的方差分析和 t 检验,统计各组之间的差异性。

2 结果

2.1 胃镜对胃癌分期诊断的评价 由胃镜直接诊断的原位癌仅 11 例,手术治疗 8 例,而其中 6 例手术发现局部浸润,2 例已有病理上的局部淋巴结转移。3 例原位癌在内镜下微波治疗,目前仍在随访。中晚期胃癌的内镜表现与病理符合率可达 80% 以上。

2.2 临床各期胃癌血清 TNF- α 浓度测定结果 (见表 1)

表 1 临床各期胃癌患者血清 TNF- α 测定结果($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	n	TNF- α
早期胃癌	32	135.46 ± 27.5^a
中期胃癌	29	238.86 ± 53.3^{ab}
晚期胃癌	25	252.04 ± 34.7^{ab}
终末期胃癌	17	202.93 ± 55.8^{ab}
浅表性胃炎	26	60.41 ± 11.4

^a $P < 0.01$, vs 浅表性胃炎; ^b $P < 0.01$, vs 早期胃癌患者。

3 讨论

大量的实验和临床研究表明,胃癌的发生与机体免疫功能缺陷有关,而且随着病情恶化免疫功能也明显降低^[1,2]。胃肠道黏膜本身含有大量免疫细胞和淋巴样组织,也是重要的免疫器官。消化道发生肿瘤后,机体

免疫功能降低的原因是多方面的,其中由肿瘤自分泌或旁分泌的肿瘤坏死因子(TNF- α)大量产生,血液中浓度过高,可对机体产生明显的损害,即为原因之一^[4-6]。晚期胃癌患者已经出现转移浸润免疫器官和组织,直接损害免疫系统,细胞免疫功能和体液免疫功能均明显降低。从本组资料也看出这种趋势。终末期患者由于恶液质,机体缺乏应激能力,TNF- α 反而降低。

研究发现TNF- α 可抑制某些肿瘤细胞的生长,因而具有抗肿瘤活性,被认为是一种炎症递质。正常机体内分泌少量的TNF- α ,可活化中性粒细胞,刺激单核细胞,激活巨噬细胞,起到保护作用^[3-15],有的学者将TNF- α 应用于治疗各种肿瘤患者和其他自身免疫性疾病。浅表性胃炎是消化科最常见的一种轻型胃炎,基本不影响机体各项功能,测出低浓度的TNF- α 属于正常范围,而胃癌患者血清TNF- α 浓度是明显上升的,并与病情发展有关(见表1)。当然,升高的TNF- α 可促进肿瘤血管生成,使肿瘤组织能吸收更多的营养物质,促进瘤细胞生长;升高的TNF- α 还激活金属蛋白酶等某些基质降解酶的活性,使基质分解,有利于癌细胞向周围组织浸润并转移^[6-9]。因此,肿瘤进展恶化伴随着TNF- α 的升高。对于疑诊胃癌患者,早期检测血液TNF- α 浓度,可以判断病情、指导治疗。当初诊患者TNF- α 显著升高时,肿瘤可能早期转移;手术后TNF- α 持续升高,提示复发和广泛转移。

4 参考文献

- 1 张学庸主编. 胃癌的基础研究与临床. 第1版. 北京:科学出版社, 1996:10-12
- 2 陈剑群,吴克俭,费素娟,金玉,刘同珞. 榄香烯注射液对恶性肿瘤患者外周血T淋巴细胞亚群的影响. 中国肿瘤临床 1996;23:299-300
- 3 Tsimberidou AM, Giles FJ. TNF-alpha targeted therapeutic approaches in patients with hematologic malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2002;2:277-286
- 4 Terlikowski SJ. Tumour necrosis factor and cancer treatment: a historical review and perspectives. *Rocz Akad Med Bialymst* 2001;46:5-18
- 5 van der Veen AH, Seynhaeve AL, Breurs J, Nooijen PT, Marquet RL, Eggermont AM. In vivo isolated kidney perfusion with tumour necrosis factor alpha(TNF-alpha) in tumour-bearing rats. *Br J Cancer* 1999;79:433-439
- 6 Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D. Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol* 1998;10:573-580
- 7 Nakamoto T, Inagawa H, Takagi K, Tashiro K, Yoshimura H, Nishizawa T, Honda T, Kanou J, Muto Y, Amm E, Soma G. Pharmacokinetics of isolated hepatic perfusion with high dose tumor necrosis factor in rat model. *Anticancer Res* 2000;20:619-622
- 8 Manusama ER, Nooijen PT, Ten Hagen TL, Van Der Veen AH, De Vries MW, De Wilt JH, Van Ijken MG, Marquet RL, Eggermont AM. Tumor necrosis factor-alpha in isolated perfusion systems in the treatment of cancer: the Rotterdam pre-clinical-clinical program. *Semin Surg Oncol* 1998;14:232-237
- 9 Seynhaeve AL, de Wilt JH, van Tiel ST, Eggermont AM, ten Hagen TL. Isolated limb perfusion with actinomycin D and TNF-alpha results in improved tumour response in soft-tissue sarcoma-bearing rats but is accompanied by severe local toxicity. *Br J Cancer* 2002;86:1174-1179
- 10 Lans TE, ten Hagen TL, van Horsen R, Wu PC, van Tiel ST, Libutti SK, Alexander HR, Eggermont AM. Improved antitumor response to isolated limb perfusion with tumor necrosis factor after upregulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II in soft tissue sarcoma. *Ann Surg Oncol* 2002;9:812-819
- 11 Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D. Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol* 1998;10:573-580
- 12 Saito S, Kasai Y, Nomoto S, Fujiwara M, Akiyama S, Ito K, Nakao A. Polymorphism of tumor necrosis factor in esophageal, gastric or colorectal carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2001;48:468-470
- 13 Sheen-Chen SM, Chen HS, Ho HT, Chen WJ, Sheen CC, Eng HL. Effect of bile acid replacement on endotoxin-induced tumor necrosis factor-alpha production in obstructive jaundice. *World J Surg* 2002;26:448-450
- 14 Kulik G, Carson JP, Vomastek T, Overman K, Gooch BD, Srinivasula S, Alnemri E, Nunez G, Weber MJ. Tumor necrosis factor alpha induces BID cleavage and bypasses antiapoptotic signals in prostate cancer LNCaP cells. *Cancer Res* 2001;61:2713-2719
- 15 De Wilt JH, ten Hagen TL, de Boeck G, van Tiel ST, de Bruijn EA, Eggermont AM. Tumour necrosis factor alpha increases melphalan concentration in tumour tissue after isolated limb perfusion. *Br J Cancer* 2000;82:1000-1003

前列腺素E₁对急性胰腺炎二十碳烯酸异常代谢调节的临床研究

李庭赞, 孙丹莉, 孙士其

李庭赞, 孙丹莉, 孙士其, 南京医科大学南京第一医院消化科
江苏省南京市 210006
项目负责人: 李庭赞, 210006, 江苏省南京市长乐路68号, 南京市第一医院消化科. litingzan88@sina.com
电话: 025-6624213 转 8293 传真: 025-2605858
收稿日期: 2002-11-06 接受日期: 2002-11-14

摘要

目的: 通过本次临床观察, 了解急性胰腺炎时二十碳烯酸的异常代谢规律, 并试图探讨前列腺素E₁(PGE₁)对此异常代谢的调节。

方法: 对于急性轻型及急性重型胰腺炎, 根据是否使用PGE₁的干预因素分别加以研究, 患者在入院时即刻及入院满4 d后取血清样本, 测定6-keto-PGF₁及血栓素TXB₂等, 并进行组间比较。

结果: 6-keto-PGF₁在各组间及PGE₁治疗前后均无统计学的显著性差异。关于TXB₂, 入院时, 急性重型胰腺炎组均显著高于急性轻型胰腺炎组(P < 0.01)。经过PGE₁的干预, 4 d后急性重型胰腺炎升高的TXB₂明显回落, 明显低于未使用PGE₁的急性重型胰腺炎组(P < 0.05)。

结论: 急性胰腺炎特别在急性重型胰腺炎时二十碳烯酸出现了异常代谢如TXB₂的明显升高, 而PGE₁对此有明显的调节作用。这对于改善微循环及改善预后等均有重要的临床意义。

李庭赞, 孙丹莉, 孙士其. 前列腺素E₁对急性胰腺炎二十碳烯酸异常代谢调节的临床研究. 世界华人消化杂志 2003;11(5):670-671
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/670.htm>

0 引言

前列腺素作为二十碳烯酸的衍生物, 在人体含内量虽少, 但几乎参与机体所有的细胞活动, 尤其炎症、免疫、过敏等病理过程, 在调节细胞代谢上具有重要的作用。但是急性胰腺炎时二十碳烯酸的代谢状况, 直至目前仍主要停留在实验阶段, 诸多问题有待进一步阐明。

PGE₁因具有保护细胞及改善微循环等作用, 已广泛地用于心肝等疾病的治疗, 近年一些实验研究提

示, PGE₁对急性胰腺炎时二十碳烯酸的异常代谢有一定调节作用, 能改善胰腺炎病变程度及降低死亡率, 但是相关的临床研究尚少见报道。

1 材料和方法

1.1 材料 本研究样本均为住院急性轻型胰腺炎及急性重型胰腺炎患者, 诊断符合1996年中华医学会胰外科学组第二次试行方案之标准, 根据是否应用PGE₁将急性轻型胰腺炎分为未使用PGE₁的MAP₁组(男8例, 女7例, 年龄50.5 ± 22.5岁)及使用PGE₁的MAP₂组(男9例, 女8例, 年龄48.0 ± 19.5岁), 急性重型胰腺炎分为未使用PGE₁的SAP₁组(男9例, 女8例, 年龄62.0 ± 18.5岁)及使用PGE₁的SAP₂组(男11例, 女6例, 年龄50.5 ± 21.0岁)。发病至入院时间急性轻型胰腺炎为23.6 ± 16.7h, 重型胰腺炎为18.6 ± 15.6h。对照组C组为健康体检者(男10名, 女10名, 年龄50.5 ± 21.0岁)。试剂: PGE₁系中澳合资杭州澳亚生物技术有限公司产品, TXB₂及6-keto-PGF₁检测试剂盒系苏州大学血栓与止血研究所生产。

1.2 方法 每例患者分别于确诊后立刻及住院4 d后取静脉血, 离心得血清后作TXB₂及6-keto-PGF₁测定, PGE₁治疗组入院后即经静脉滴注PGE₁, PGE₁ 200 mg放入500 ml生理盐水中, 4-6 h滴完, Qd, 共用4 d, 除此以外, 其他常规治疗如禁食、输液、静脉点滴H₂受体阻断剂、山莨菪碱及加贝酯以及八肽生长抑素衍生物(善宁)等的应用情况相同。

统计学处理 组间均数比较采用t检验。

2 结果

2.1 入院时TXB₂、6-keto-PGF₁的比较 对照组6-keto-PGF₁浓度为89.63 ± 22.6 μg/ml, 而在各胰腺炎组均有所下降, 但是组间无统计学差异(P > 0.05), 对照组TXB₂浓度为136.0 ± 81.6 μg/ml, 在入院时各胰腺炎组均有不同程度的升高, MAP组上升幅度小, 与C组间无统计学差异, 而SAP₁组及SAP₂组分别高达448.6 ± 106.0 μg/ml及456.4 ± 118.8 μg/ml, 均明显高

表1 各组急性胰腺炎TXB₂、6-keto-PGF₁的变化情况分析(̄x ± s, μg/ml)

时间	MAP ₁		SAP ₁		MAP ₂		SAP ₂	
	TXB ₂	PGF ₁	TXB ₂	PGF ₁	TXB ₂	PGF ₁	TXB ₂	PGF ₁
入院时	68.5 ± 25.5 ^a	172.6 ± 95.5	122.5 ± 75.5	448.6 ± 106.0	71.4 ± 30.2 ^a	168.5 ± 101.3	119.5 ± 84.2	456.4 ± 118.8
4 d后	85.6 ± 26.5 ^b	162.3 ± 86.4	110.6 ± 80.7 ^c	395.7 ± 111.0	94.3 ± 30.5 ^b	145.4 ± 84.3	90.3 ± 62.1	191.3 ± 107.5

^aP < 0.05 vs SAP₁、SAP₂; ^bP < 0.01 vs SAP₁; ^cP < 0.01 vs SAP₂.

于C组($P < 0.01$),也明显高于MAP₁及MAP₂组($P < 0.01$). 2.2 PGE₁治疗4 d后TXB₂、6-keto-PGF₁的变化 经过PGE₁4 d的治疗6-keto-PGF₁无显著性的变化,组间仍无统计学差异($P > 0.05$),而各组TXB₂的浓度均有所回落,尤以SAP₂组明显,仅达 $191.3 \pm 107.5 \mu\text{g/ml}$,明显低于SAP₁组的 $395.7 \pm 111.0 \mu\text{g/ml}$ ($P < 0.05$),而SAP₂与MAP₁、MAP₂以及C组间无统计学差异($P > 0.05$),表1.

3 讨论

近年来,国内外关于急性胰腺炎发病机制-微循环障碍的研究取得了一些进展,实验研究提示,特别在急性出血坏死型胰腺炎中,二十碳烯酸出现了异常代谢,如血清PGF₁、TXB₂、PGI₂可出现明显升高,根据推测主要与游离基及一氧化氮增多等有关^[1-5].而PGE₁或PGE₂等可一定程度逆转这种变化,特别关于PGE₁的报道较多,PGE₁的适量应用常能减轻胰腺炎的病情,提高实验对象之成活率,这与PGE₁能增加细胞膜的稳定性、改善血液微循环及抑制胰蛋白酶等多种因素有关^[1-3,6];但是,当PGE₁达到一定用量后,则可加重胰腺炎的病情,机制尚不清楚^[7].

本次临床研究初步揭示了在急性胰腺炎时二十碳烯酸出现了异常代谢,TXB₂上升明显,PGF₁有所下降,对微循环调节作用的平衡被破坏,尤其在急性重型胰腺炎时TXB₂升高显著,TXB₂异常升高,将导致微血管收缩、血流变慢及微血栓形成,这说明在急性重型胰腺炎时存在微循环障碍.PGE₁使用后TXB₂回降明显,适量PGE₁的应用可使这一情况得以逆转,这对于改善微循环障碍和促进病情恢复有益,本次临床研究结果与国外相关实验结论基本一致.

总之,急性胰腺炎患者,在病情早期即出现明显的二十碳烯酸的异常代谢,提示微循环障碍在急性胰腺炎的发生发展中不容忽视,而适量的PGE₁对于这种异常代谢有一定的调节作用.可见,开展这方面的研究对于阐明急性胰腺炎的发病机制以及改善其预后具有一定的临床的意义.

4 参考文献

- 1 Closa D, Rosello-Catafau J, Martrat A, Hotter G, Prats N, Fernandez-Cruz L, Gelpi E. Changes of systemic prostacyclin and thromboxane A2 in sodium taurocholate- and cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 1993;38:33-38
- 2 Closa D, Hotter G, Prats N, Bulbena O, Rosello-Catafau J, Fernandez-Cruz L, Gelpi E. Prostanoid generation in early stages of acute pancreatitis: a role for nitric oxide. *Inflammation* 1994;18:469-480
- 3 Jaworek J, Bonior J, Tomaszewska R, Jachimczak B, Kot M, Bielanski W, Pawlik WW, Sendur R, Stachura J, Konturek PC, Konturek SJ. Involvement of cyclooxygenase-derived prostaglandin E2 and nitric oxide in the protection of rat pancreas afforded by low dose of lipopolysaccharide. *J Physiol Pharmacol* 2001;52:107-126
- 4 Kiviniemi H, Ramo J, Stahlberg M, Laitinen S, Jalovaara P, Viinikka L, Kairaluoma M. Prostacyclin and thromboxane in acute hemorrhagic pancreatitis in dogs. *J Surg Res* 1987;42:232-236
- 5 Van Ooijen B, Kort WJ, Zijlstra FJ, Vincent JE, Wilson JH, Westbroek DL. Prostanoid imbalance in experimental acute necrotizing pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 1998;23:193-198
- 6 Sakai Y, Hayakawa T, Kondo T, Shibata T, Kitagawa M, Sobajima H, Naruse S, Ohnishi ST. Protective effects of a prostaglandin E1 oligomer on taurocholate-induced rat pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1992;7:591-595
- 7 Pozsar J, Berger Z, Simon K, Kovacsai A, Marosi E, Pap A. Biphasic effect of prostaglandin E1 on the severity of acute pancreatitis induced by a closed duodenal loop in rats. *Pancreas* 1996;12:159-164

肝硬化腹水并发肝肾综合征及低渗性脑病与限钠治疗关系的研究

刘建军,智红,吴晓英,李楠

刘建军,深圳市福华中西医结合医院 广东省深圳市 518033
智红,邯郸市第二医院肝病中心 河北省邯郸市 056001
吴晓英,李楠,邯郸市第一医院 河北省邯郸市 056002
河北省科技攻关项目, No.1276189
项目负责人:刘建军,518033,广东省深圳市,福华中西医结合医院.
收稿日期:2002-04-05 接受日期:2002-09-05

摘要

目的:研究肝硬化腹水患者限钠、利尿治疗对腹水消失时间的影响及其与肝肾综合征(HRS)、低渗性脑病的关系。

方法:将应用利尿剂治疗的肝硬化腹水患者随机分为限钠

(142例)与不限钠或静脉输注 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl(148例)两组,观察腹水消失时间及HRS、低渗性脑病发病情况.将明确诊断的HRS、低渗性脑病患者分为限钠与静脉输注 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl(300 mL/d)两组进行对比。

结果:限钠组腹水消失时间 $< 20 \text{ d}$ 者35例,占24.6%,32例并发HRS,占22.5%,29例并发低渗性脑病,占20.4%。不限钠组腹水消失时间 $< 20 \text{ d}$ 者126例,占85.1%,无1例并发HRS及低渗性脑病.继续限钠治疗的HRS与低渗性脑病患者无1例存活.静脉输注 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl治疗组无

于C组($P < 0.01$),也明显高于MAP₁及MAP₂组($P < 0.01$). 2.2 PGE₁治疗4 d后TXB₂、6-keto-PGF₁的变化 经过PGE₁4 d的治疗6-keto-PGF₁无显著性的变化,组间仍无统计学差异($P > 0.05$),而各组TXB₂的浓度均有所回落,尤以SAP₂组明显,仅达 $191.3 \pm 107.5 \mu\text{g/ml}$,明显低于SAP₁组的 $395.7 \pm 111.0 \mu\text{g/ml}$ ($P < 0.05$),而SAP₂与MAP₁、MAP₂以及C组间无统计学差异($P > 0.05$),表1.

3 讨论

近年来,国内外关于急性胰腺炎发病机制-微循环障碍的研究取得了一些进展,实验研究提示,特别在急性出血坏死型胰腺炎中,二十碳烯酸出现了异常代谢,如血清PGF₁、TXB₂、PGI₂可出现明显升高,根据推测主要与游离基及一氧化氮增多等有关^[1-5].而PGE₁或PGE₂等可一定程度逆转这种变化,特别关于PGE₁的报道较多,PGE₁的适量应用常能减轻胰腺炎的病情,提高实验对象之成活率,这与PGE₁能增加细胞膜的稳定性、改善血液微循环及抑制胰蛋白酶等多种因素有关^[1-3,6];但是,当PGE₁达到一定用量后,则可加重胰腺炎的病情,机制尚不清楚^[7].

本次临床研究初步揭示了在急性胰腺炎时二十碳烯酸出现了异常代谢,TXB₂上升明显,PGF₁有所下降,对微循环调节作用的平衡被破坏,尤其在急性重型胰腺炎时TXB₂升高显著,TXB₂异常升高,将导致微血管收缩、血流变慢及微血栓形成,这说明在急性重型胰腺炎时存在微循环障碍.PGE₁使用后TXB₂回降明显,适量PGE₁的应用可使这一情况得以逆转,这对于改善微循环障碍和促进病情恢复有益,本次临床研究结果与国外相关实验结论基本一致.

总之,急性胰腺炎患者,在病情早期即出现明显的二十碳烯酸的异常代谢,提示微循环障碍在急性胰腺炎的发生发展中不容忽视,而适量的PGE₁对于这种异常代谢有一定的调节作用.可见,开展这方面的研究对于阐明急性胰腺炎的发病机制以及改善其预后具有一定的临床的意义.

4 参考文献

- 1 Closa D, Rosello-Catafau J, Martrat A, Hotter G, Prats N, Fernandez-Cruz L, Gelpi E. Changes of systemic prostacyclin and thromboxane A2 in sodium taurocholate- and cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 1993;38:33-38
- 2 Closa D, Hotter G, Prats N, Bulbena O, Rosello-Catafau J, Fernandez-Cruz L, Gelpi E. Prostanoid generation in early stages of acute pancreatitis: a role for nitric oxide. *Inflammation* 1994;18:469-480
- 3 Jaworek J, Bonior J, Tomaszewska R, Jachimczak B, Kot M, Bielanski W, Pawlik WW, Sendur R, Stachura J, Konturek PC, Konturek SJ. Involvement of cyclooxygenase-derived prostaglandin E2 and nitric oxide in the protection of rat pancreas afforded by low dose of lipopolysaccharide. *J Physiol Pharmacol* 2001;52:107-126
- 4 Kiviniemi H, Ramo J, Stahlberg M, Laitinen S, Jalovaara P, Viinikka L, Kairaluoma M. Prostacyclin and thromboxane in acute hemorrhagic pancreatitis in dogs. *J Surg Res* 1987;42:232-236
- 5 Van Ooijen B, Kort WJ, Zijlstra FJ, Vincent JE, Wilson JH, Westbroek DL. Prostanoid imbalance in experimental acute necrotizing pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 1998;23:193-198
- 6 Sakai Y, Hayakawa T, Kondo T, Shibata T, Kitagawa M, Sobajima H, Naruse S, Ohnishi ST. Protective effects of a prostaglandin E1 oligomer on taurocholate-induced rat pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1992;7:591-595
- 7 Pozsar J, Berger Z, Simon K, Kovacsai A, Marosi E, Pap A. Biphasic effect of prostaglandin E1 on the severity of acute pancreatitis induced by a closed duodenal loop in rats. *Pancreas* 1996;12:159-164

肝硬化腹水并发肝肾综合征及低渗性脑病与限钠治疗关系的研究

刘建军,智红,吴晓英,李楠

刘建军,深圳市福华中西医结合医院 广东省深圳市 518033
智红,邯郸市第二医院肝病中心 河北省邯郸市 056001
吴晓英,李楠,邯郸市第一医院 河北省邯郸市 056002
河北省科技攻关项目, No.1276189
项目负责人:刘建军,518033,广东省深圳市,福华中西医结合医院.
收稿日期:2002-04-05 接受日期:2002-09-05

摘要

目的:研究肝硬化腹水患者限钠、利尿治疗对腹水消失时间的影响及其与肝肾综合征(HRS)、低渗性脑病的关系.

方法:将应用利尿剂治疗的肝硬化腹水患者随机分为限钠

(142例)与不限钠或静脉输注 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl(148例)两组,观察腹水消失时间及HRS、低渗性脑病发病情况.将明确诊断的HRS、低渗性脑病患者分为限钠与静脉输注 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl(300 mL/d)两组进行对比.

结果:限钠组腹水消失时间 $< 20 \text{ d}$ 者35例,占24.6%,32例并发HRS,占22.5%,29例并发低渗性脑病,占20.4%.不限钠组腹水消失时间 $< 20 \text{ d}$ 者126例,占85.1%,无1例并发HRS及低渗性脑病.继续限钠治疗的HRS与低渗性脑病患者无1例存活.静脉输注 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl治疗组无

1例因HRS及低渗性脑病死亡,两组有显著性差异($P < 0.01$).

结论:肝硬化腹水患者限钠治疗后,因血浆钠及渗透压下降,腹水消失时间延长,诱发HRS及低渗性脑病.高渗NaCl的应用是治疗HRS和低渗性脑病的关键.

刘建军,智红,吴晓英,李楠.肝硬化腹水并发肝肾综合征及低渗性脑病与限钠治疗关系的研究.世界华人消化杂志 2003;11(5):671-673
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/671.htm>

0 引言

肝硬化腹水患者限钠治疗已应用100 a,并为国内外所公认.我们通过10 a临床研究发现,限钠、利尿治疗易导致血浆钠及渗透压下降,腹水消失时间延长及诱发肝肾综合征(HRS)与低渗性脑病.肝硬化腹水患者限钠治疗时低钠血症较低钾血症常见,低钠后果较低钾严重.不限钠可使腹水消失时间缩短,静脉输注高渗NaCl是治疗HRS及低渗性脑病的关键,对肝硬化腹水、HRS和低渗性脑病发病机制与治疗有重要补充,现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 将1986/2001-06收治的290例肝硬化腹水患者,除应用利尿剂(氢氯噻嗪、螺内酯)及间断补充白蛋白外,随机分为限钠(142例)与不限钠(148例)两组,限钠组钠盐摄入量 < 1.0 g/d.不限钠组除摄入正常含钠食物外,根据临床症状及血浆钠检测结果,对低钠患者静脉输注 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 300 mL/d ,观察两组腹水消失时间及并发HRS、低渗性脑病的发病率.

1.2 方法

1.2.1 HRS与低渗性脑病诊断条件 (一)HRS诊断条件 (1)限钠、使用利尿剂、发汗、导泻和排放腹水等治疗;(2)乏力、纳差、嗜睡和表情淡漠等;(3)尿量减少, $< 500 \text{ mL/24 h}$;(4)血浆钠降低 $< 125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$;(5)血浆尿素氮升高;(6)对利尿剂无效.(二)低渗性脑病诊断条件 (1)符合肝硬化腹水诊断条件;(2)限钠、利尿、导泻、发汗、排放腹水治疗;(3)精神淡漠、嗜睡、乏力、肌张力下降和深反射减弱;(4)无肝性脑病典型症状和体征;(5)血浆钠 $< 125 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,血浆渗透压下降.

1.2.2 HRS与低渗性脑病的治疗方法 将符合HRS与低渗性脑病患者分继续限钠与静脉输注高渗NaCl两组进行治疗.(一)HRS的治疗 继续限钠治疗组(17例),除限钠外,应用胶体溶液(全血、血浆、白蛋白等)扩容,静脉滴注血管活性药物(多巴胺、654-2)及丹参等.静脉输注 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl组(15例),每日补充 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 300 mL ,然后根据病情及血浆钠检测结果决定总补钠量,一般每日补充 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 不超过 300 mL ,连续使用1-7 d.静脉补充高渗NaCl组共补充 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 12900 mL ,分别补充 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 300 mL 2例, 600 mL 6例, 900 mL 5例, 2100 mL 2例,平均每例HRS

患者输注 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 860 mL .全部患者均未排放腹水.(二)低渗性脑病的治疗方法 -继续限钠组(11例),给予限钠、利尿、脱水及降血氨治疗.补钠组(18例),根据血浆钠及渗透压静脉补充 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 300 mL/d ,一般日补充 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 不超过 300 mL ,连续补充1-5 d,18例共补充 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 15600 mL .分别补充 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 300 mL 1例, 600 mL 6例, 900 mL 8例, 1500 mL 3例.平均每例低渗性脑病患者输注 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 866 mL .

2 结果

2.1 限钠与不限钠两组腹水消失时间 限钠与不限钠两组腹水消失时间 $< 20 \text{ d}$ 者分别为35例(24.6%)与126例(85.1%).不限钠组根据血浆钠检测结果,静脉输注 $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl后,利尿剂作用增强,6 h尿量开始增加,24 h尿量增加 $500-1500 \text{ mL}$,两组腹水消失时间有显著性差异($P < 0.01$).

2.2 HRS、低渗性脑病与限钠的关系 限钠组(142例)中32例并发HRS,占22.5%,29例并发低渗性脑病,占20.4%.不限钠组中无1例并发HRS与低渗性病.所以肝硬化腹水患者并发HRS、低渗性脑病与限钠、利尿治疗有关.

2.3 HRS、低渗性脑病限钠与不限钠治疗的结果 (一)HRS治疗结果 -应用胶体溶液扩容、静脉输注血管活性药及继续限钠治疗组17例患者无1例存活,多因严重电解质紊乱、高氮质血症、低钠、低氯,尿量进一步减少或无尿、高度腹胀、低血压、消化道出血或合并低渗性脑病等死亡.静脉输注高渗NaCl治疗组15例,无1例因HRS死亡,静脉输注高渗NaCl 6 h后尿量开始增加,意识障碍者开始恢复,随低钠、低氯血症的纠正,HPS患者完全缓解.(二)低渗性脑病治疗结果 -低渗性脑病患者中,继续限钠(11例)组,给予速尿、甘露醇及降血氨治疗,均未控制病情,多同时合并HRS.10例尿量进一步减少,不可逆血压下降,出现低渗性休克,DIC等导致昏迷及全身衰竭死亡,占91%,1例并发震颤麻痹因肺部感染呼吸衰竭死亡.静脉输注高渗NaCl治疗组18例,多在补钠6 h后精神淡漠、嗜睡和乏力等明显好转或缓解,肌张力、意识障碍恢复正常,尿量增加.无1例因低渗性脑病死亡.同时发现静脉输注高渗NaCl后,对消化道症状(腹部胀气、恶心、呕吐及纳差等)有一定缓解作用.

3 讨论

肝硬化腹水患者钠潴留及限钠治疗为国内外所公认.但我们通过10 a临床研究发现,任何方法治疗腹水均损失电解质,如在限钠基础上应用利尿剂(包括中草药)、导泻、发汗和排放腹水等均可加速电解质损失,使血浆钠及渗透压下降,利尿剂作用减弱或消失,腹水消失时间延长及诱发HRS、低渗性脑病等严重并发症,或使HRS、低渗性脑病患者失去存活机会,因此应引起注意.

3.1 血浆钠对利尿剂作用的影响 所有利尿剂主要通过排钠发挥利尿作用,利尿剂作用越强,排钠就越多,如单用氨苯喋啶,尿钠排出增加 53 mmol/d,单用氢氯噻嗪,尿钠排出量为 105 mmol/d,二者合用尿钠排出量增加至 158 mmol/d,每日从尿中排钠 3.0-9.8 g,使血浆钠及渗透压下降。因血浆钠下降,激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统,尿钠排泄减少,利尿剂作用减弱或消失,产生所谓耐药(抗药)现象,当血浆钠或渗透压低于腹水时,腹水将不可能被吸收,或使腹水呈逆交换状态(腹水渗出量大于吸收量),使腹水消失时间延长。有人^[1]将血浆钠称为利尿剂作用的“靶离子”,靶离子缺乏时利尿剂作用减弱,纠正血浆低钠及低渗状态可使利尿剂作用明显增强。我们得出的结论是:对肝硬化腹水患者进行限钠必然导致血浆钠及渗透压下降,不应根据腹水形成机制限钠,因为血浆低钠后激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统,是低钠患者的一种保护反应,血浆低钠纠正后这种反应将受到抑制,这并非是钠潴留与腹水形成的因素,不应再继续限钠。此时纠正低钠血症可使利尿剂作用增强,尿量增加,腹水消失时间缩短。

3.2 HRS形成原因与限钠治疗关系^[2] 肝硬化腹水患者限钠组 32 例并发 HRS,不限钠组无 1 例并发 HRS,说明 HRS 这种功能性肾功能衰竭与限钠治疗有直接关系,是 HRS 发病的主要原因。对 HRS 患者分组治疗结果表明,应用胶体溶液(全血、血浆、白蛋白等)扩容治疗未能使 HRS 患者死亡率下降。应用高渗 NaCl 能收到理想扩容效果,从临床治疗结果分析,可进一步证实 HRS 的形成与血浆低钠有关。当血浆钠及渗透压下降后,细胞外水分向细胞内转移,有效血循环量减少,肾血流低灌注,刺激入球小动脉压力感受器,使肾素分泌,肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活,肾皮质血管收缩,肾小球滤过率下降,尿量及尿钠排泄减少,尿素氮上升等诱发 HRS,此时限钠可使血压下降,将严重影响肾血流灌注,使肾组织细胞水肿,促使 HRS 的形成与发展。

静脉滴注高渗 NaCl 治疗 HRS,能有效升高血浆钠

及渗透压,使细胞内水分向细胞外转移,迅速增加血容量,是理想的扩容物质,使 HRS 病理变化得到恢复。这一研究还表明,应用利尿剂时适当补钠可以防止 HRS 的形成。对明确诊断的 HRS 患者应尽早果断应用高渗 NaCl,限制水入量,纠正低钠血症(即使认为稀释性低钠)及血浆渗透压是治疗 HRS 的关键,否则将使 HRS 患者失去存活机会。

3.3 肝硬化并发低渗性脑病与限钠的关系^[3] 低渗性脑病是肝硬化腹水患者限钠治疗的常见并发症,有时误诊为肝性脑病。低渗性脑病仍为血浆低钠、低渗透压所致,当血浆钠低于 125 mmol·L⁻¹时,因血浆渗透压下降、细胞外水分向细胞内转移、细胞体积增大、脑细胞水肿和颅内压上升等将导致低渗性脑病。我们在临床工作中发现,限钠、利尿治疗的腹水患者出现表情淡漠、乏力、肌张力下降和意识障碍时,首先考虑为低渗性脑病所致,此时应用脱水剂(甘露醇)不但无效,反而使血钠进一步下降或造成肾脏损害。静脉输注高渗 NaCl 治疗低渗性脑病时,可使细胞内积存的过多水分迅速移到细胞外,细胞水肿减轻,颅内压降低,如输注 180 mL 高渗 NaCl 可从细胞内渗透出水分 700 mL,血浆渗透压上升 17 mmol·L⁻¹,细胞内水分减少 6%,大约 940-1 260 mL 细胞内液移到细胞外,此时对细胞生理状态没有影响,同时增加利尿剂效果。

总之,对肝硬化腹水患者进行限钠治疗是导致严重电解质紊乱及诱发 HRS^[4]、低渗性脑病的重要原因,应对肝硬化腹水形成机制、HRS 发病原因及限钠问题给予重新评价与补充。

4 参考文献

- 1 智红,刘建军. 血浆钠对利尿剂作用的影响. 中国医院药学杂志 2000;20:224-225
- 2 刘建军,智红,刘芙蓉,吴晓红,王红霞. 肝硬变腹水限钠利尿治疗诱发 HRS 与高渗 NaCl 治疗作用. 世界华人消化杂志 2000;8:1071-1072
- 3 刘建军,吴晓英,智红. 肝硬化腹水限钠治疗诱发低渗性脑病临床分析. 胃肠病学与肝病学杂志 1998;7:178-180
- 4 刘建军,智红. 肝肾综合征发病机制与高渗氯化钠溶液的应用. 临床肝胆病学杂志 2001;17:60-61

金属夹联合内镜注射治疗胃肠道出血

王孟春,李立,常桂艳,孙思予,孙素云

王孟春,常桂艳,孙思予,孙素云,中国医科大学附属二院内镜中心
辽宁沈阳市 110004
李立,中国医科大学附属二院理疗科 辽宁沈阳市 110004
项目负责人:王孟春,110004,辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号,中国医科大学附属二院内镜中心. mengchunwang@hotmail.com
电话:024-83956947
收稿日期:2002-11-13 接受日期:2002-12-07

摘要

目的:探讨金属夹联合内镜注射治疗胃肠道出血的疗效。

方法:将患者随机分为两组,分别采用内镜下单纯注射和金

3.1 血浆钠对利尿剂作用的影响 所有利尿剂主要通过排钠发挥利尿作用,利尿剂作用越强,排钠就越多,如单用氨苯喋啶,尿钠排出增加 53 mmol/d,单用氢氯噻嗪,尿钠排出量为 105 mmol/d,二者合用尿钠排出量增加至 158 mmol/d,每日从尿中排钠 3.0-9.8 g,使血浆钠及渗透压下降。因血浆钠下降,激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统,尿钠排泄减少,利尿剂作用减弱或消失,产生所谓耐药(抗药)现象,当血浆钠或渗透压低于腹水时,腹水将不可能被吸收,或使腹水呈逆交换状态(腹水渗出量大于吸收量),使腹水消失时间延长。有人^[1]将血浆钠称为利尿剂作用的“靶离子”,靶离子缺乏时利尿剂作用减弱,纠正血浆低钠及低渗状态可使利尿剂作用明显增强。我们得出的结论是:对肝硬化腹水患者进行限钠必然导致血浆钠及渗透压下降,不应根据腹水形成机制限钠,因为血浆低钠后激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统,是低钠患者的一种保护反应,血浆低钠纠正后这种反应将受到抑制,这并非是钠潴留与腹水形成的因素,不应再继续限钠。此时纠正低钠血症可使利尿剂作用增强,尿量增加,腹水消失时间缩短。

3.2 HRS形成原因与限钠治疗关系^[2] 肝硬化腹水患者限钠组 32 例并发 HRS,不限钠组无 1 例并发 HRS,说明 HRS 这种功能性肾功能衰竭与限钠治疗有直接关系,是 HRS 发病的主要原因。对 HRS 患者分组治疗结果表明,应用胶体溶液(全血、血浆、白蛋白等)扩容治疗未能使 HRS 患者死亡率下降。应用高渗 NaCl 能收到理想扩容效果,从临床治疗结果分析,可进一步证实 HRS 的形成与血浆低钠有关。当血浆钠及渗透压下降后,细胞外水分向细胞内转移,有效血循环量减少,肾血流低灌注,刺激入球小动脉压力感受器,使肾素分泌,肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活,肾皮质血管收缩,肾小球滤过率下降,尿量及尿钠排泄减少,尿素氮上升等诱发 HRS,此时限钠可使血压下降,将严重影响肾血流灌注,使肾组织细胞水肿,促使 HRS 的形成与发展。

静脉滴注高渗 NaCl 治疗 HRS,能有效升高血浆钠

及渗透压,使细胞内水分向细胞外转移,迅速增加血容量,是理想的扩容物质,使 HRS 病理变化得到恢复。这一研究还表明,应用利尿剂时适当补钠可以防止 HRS 的形成。对明确诊断的 HRS 患者应尽早果断应用高渗 NaCl,限制水摄入量,纠正低钠血症(即使认为稀释性低钠)及血浆渗透压是治疗 HRS 的关键,否则将使 HRS 患者失去存活机会。

3.3 肝硬化并发低渗性脑病与限钠的关系^[3] 低渗性脑病是肝硬化腹水患者限钠治疗的常见并发症,有时误诊为肝性脑病。低渗性脑病仍为血浆低钠、低渗透压所致,当血浆钠低于 125 mmol·L⁻¹时,因血浆渗透压下降、细胞外水分向细胞内转移、细胞体积增大、脑细胞水肿和颅内压上升等将导致低渗性脑病。我们在临床工作中发现,限钠、利尿治疗的腹水患者出现表情淡漠、乏力、肌张力下降和意识障碍时,首先考虑为低渗性脑病所致,此时应用脱水剂(甘露醇)不但无效,反而使血钠进一步下降或造成肾脏损害。静脉输注高渗 NaCl 治疗低渗性脑病时,可使细胞内积存的过多水分迅速移到细胞外,细胞水肿减轻,颅内压降低,如输注 180 mL 高渗 NaCl 可从细胞内渗透出水分 700 mL,血浆渗透压上升 17 mmol·L⁻¹,细胞内水分减少 6%,大约 940-1 260 mL 细胞内液移到细胞外,此时对细胞生理状态没有影响,同时增加利尿剂效果。

总之,对肝硬化腹水患者进行限钠治疗是导致严重电解质紊乱及诱发 HRS^[4]、低渗性脑病的重要原因,应对肝硬化腹水形成机制、HRS 发病原因及限钠问题给予重新评价与补充。

4 参考文献

- 1 智红,刘建军. 血浆钠对利尿剂作用的影响. 中国医院药学杂志 2000;20:224-225
- 2 刘建军,智红,刘芙蓉,吴晓红,王红霞. 肝硬变腹水限钠利尿治疗诱发 HRS 与高渗 NaCl 治疗作用. 世界华人消化杂志 2000;8:1071-1072
- 3 刘建军,吴晓英,智红. 肝硬化腹水限钠治疗诱发低渗性脑病临床分析. 胃肠病学与肝病学杂志 1998;7:178-180
- 4 刘建军,智红. 肝肾综合征发病机制与高渗氯化钠溶液的应用. 临床肝胆病学杂志 2001;17:60-61

金属夹联合内镜注射治疗胃肠道出血

王孟春,李立,常桂艳,孙思予,孙素云

王孟春,常桂艳,孙思予,孙素云,中国医科大学附属二院内镜中心
辽宁沈阳市 110004
李立,中国医科大学附属二院理疗科 辽宁沈阳市 110004
项目负责人:王孟春,110004,辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号,中国医科大学附属二院内镜中心. mengchunwang@hotmail.com
电话:024-83956947
收稿日期:2002-11-13 接受日期:2002-12-07

摘要

目的:探讨金属夹联合内镜注射治疗胃肠道出血的疗效。

方法:将患者随机分为两组,分别采用内镜下单纯注射和金

属夹联合内镜下注射治疗胃肠道出血.

结果:单纯注射组即时止血率为80%,联合治疗组即时止血率为100%.

结论:金属夹联合内镜下注射治疗胃肠道出血疗效确切,安全可靠.

王孟春,李立,常桂艳,孙思予,孙素云. 金属夹联合内镜注射治疗胃肠道出血. 世界华人消化杂志 2003;11(5):673-675
http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/673.htm

0 引言

经内镜止血治疗已成为消化道出血首选的止血方法,

疗效确切,且可降低消化道出血患者的手术率和死亡率,方法多种多样,疗效不一,本文观察了金属夹联合应用内镜注射治疗消化道出血的疗效,现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 57例患者随机分为两组,内镜下单纯注射组25例,金属夹联合内镜下注射组32例,病例资料见表1,所有病例均见到活动性出血病灶.器械:PENTAX EG2 940电子胃镜及EC 3 840电子结肠镜,Olympus NM-1K型硬化注射针,Olympus可旋转式金属夹推送器HX-5QR-1(经大肠镜,长1 950 mm)及HX-5LR-1(经内镜,长1 650 mm),配有旋转装置,用于钳夹时调整方向,使用MD-850型金属夹.药物:1 10 000 肾上腺素盐水注射液.

表1 57例消化道出血临床资料

组别	n	男	女	平均年龄	胃溃疡	十二指肠溃疡	Dieulafoy病	胃息肉	肠息肉	喷血	渗血
注射组	25	14	11	43岁	7	5	1	3	5	4	21
联合治疗组	32	19	13	45岁	8	12	2	3	7	8	24

1.2 方法

1.2.1 术前准备 上消化道内镜,空腹8 h以上,术前咽喉部局麻,肌肉注射阿托品;结肠镜,口服自配洗肠液清洁肠道,术前肌注阿托品.

1.2.2 止血过程 确定出血点后首先进行局部注射,于距出血点2 mm周围注射1 10 000 肾上腺素盐水,每次注射0.5-1 mL,反复注射直至出血明显减少或停止,最多注射10 mL;将金属夹安装于推送器上,经活检钳道送入病灶附近,根据病灶位置可旋转夹子方向,缓慢收紧钩钉使夹子充分张开,最大范围约8 mm,尽量使夹子与病灶呈直角接触,贴紧病灶后放出夹子,每位患者放置1-4枚,观察出血完全停止后退镜.

1.2.3 术后处理 均留院观察,上消化道出血者给予抑酸剂及常规补液,下消化道出血者给予常规补液,观察生命指征及血红蛋白、血尿素氮及大便情况等.

2 结果

单纯注射组25例患者经内镜治疗后即时止血率为80%,1 wk内5例患者再发出血,再出血率为20%,分别行手术治疗;联合治疗组32例患者即时止血率为100%,1 wk内2例患者再出血,再出血率为6.25%,1例行介入栓塞治疗,1例行手术治疗;两组患者均无穿孔等严重并发症.两组均有安全有效的止血效果,但联合治疗组效果明显优于单纯注射组.

3 讨论

消化道出血的治疗关键在于及早诊断、迅速止血.内镜诊治技术不但能明确出血病因及部位,而且可通过内镜进行止血治疗.内镜下止血方法很多,根据病情不同可选择不同的方法,如急性胃黏膜病变可选择局部喷洒

止血药,包括凝血酶及中药;静脉曲张破裂出血可选择急诊皮圈套扎或硬化治疗;而消化性溃疡出血、息肉电切后出血根据设备和技术条件可选择局部喷药、局部注射、热探头凝固、金属夹等方法^[1,2],疗效不一,特别是活动性出血单一方法疗效不理想,再出血率较高.如单一喷药只能解决一时止血,不能解决根本问题;热探头和局部黏膜注射在治疗过程中可造成黏膜的副损伤,增加再出血的危险^[3,4],而单纯金属夹法如在出血量较大时视野不清,影响成功率^[5-7].我们使用联合局部黏膜注射和金属夹法治疗消化道出血,即时止血率为100%,1 wk内再出血率6.25%,无严重并发症发生,方法简便易行,安全可靠,大大减轻了患者的痛苦.首先应用局部黏膜注射法使出血减少或停止,保持视野清晰,我们应用的药物为1 10 000 肾上腺素盐水,可使黏膜下血管收缩,促进血管内血小板聚积和血栓形成^[8,9],并可引起局部黏膜肿胀,从而达到止血目的.当出血减少或停止后,在病灶追加止血夹1-4枚,通过对出血性血管和病灶的直接结扎作用及对溃疡面的缝合作用达到巩固止血的目的,且不损伤出血病灶的愈合^[10-13],局部形成肉芽组织后夹子可自行脱落并排出体外.而单纯注射疗法虽然简单易行,但仍逊色于联合治疗组,主要与肾上腺素作用时间短有关,文献^[14,15]报道再出血率为13-20%.

联合治疗组2例再发出血患者均为十二指肠后壁动脉性出血,因部位偏,注射止血效果不确切;同时,由于止血夹与出血病灶难以达到有效的接触角度,导致止血夹仅夹在病灶的表面,易脱落.我们考虑为避免再出血可追加电凝治疗,使局部组织和血管凝固、坏死,形成血栓,或用侧视镜使夹子角度合适,达到止血目的.而单纯注射治疗组在无金属夹条件下可联合注射无水乙

醇、鱼肝油酸钠等硬化剂以提高疗效。

两组患者均未发生严重并发症。我们认为联合应用局部黏膜注射和金属夹法是治疗消化道出血的安全有效的方法，所需设备简单，适于推广。

4 参考文献

- Sung JY, Chung SC, Lo KK, Leung JW. Heater-probe treatment of bleeding peptic ulcers. *Surg Endosc* 1998; 2:234-236
- Park KG, Steele RJ, Mollison J, Crofts TJ. Prediction of recurrent bleeding after endoscopic haemostasis in non-variceal upper gastrointestinal haemorrhage. *Br J Surg* 1994;81:1465-1468
- Bedford RA, van Stolk R, Sivak MV Jr, Chung RS, van Dam J. Gastric perforation after endoscopic treatment of a Dieulafoy's lesion. *Am J Gastroenterol* 1992;87:244-247
- Chung SC, Leung JW, Sung JY, Lo KK, Li AK. Injection or heat probe for bleeding ulcer. *Gastroenterology* 1991;100:33-37
- Gevers AM, De Goede E, Simoons M, Hiele M, Rutgeerts P. A randomized trial comparing injection therapy with hemoclip and with injection combined with hemoclip for bleeding ulcers. *Gastrointest Endosc* 2002;55:466-469
- Binnmoeller KF, Thonke F, Soehendra N. Endoscopic hemoclip treatment for gastrointestinal bleeding. *Endoscopy* 1993;25:167-170
- 姚忆蓉,殷平,袁如华. 内镜下夹子结扎治疗消化道出血的探讨. 华人消化杂志 1998;6(特刊):409
- Lin HJ, Perng CL, Lee FY, Chan CY, Huang ZC, Lee SD, Lee CH. Endoscopic injection for the arrest of peptic ulcer hemorrhage: final results of a prospective, randomized comparative trial. *Gastrointest Endosc* 1993;39:15-19
- Thomopoulos KC, Nikolopoulou VN, Katsakoulis EC, Mimidis KP, Margaritis VG, Markou SA, Vagianos CE. The effect of endoscopic injection therapy on the clinical outcome of patients with benign peptic ulcer bleeding. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32:212-216
- 夏金荣,繆才良,沈琰. 内镜止血夹、热凝和内镜下注射治疗急性上消化道大出血的疗效观察. 中华消化内镜杂志 1999;16:227-228
- Nagasu N, DiPalma JA. Bleeding ulcer: injection or clip? *Am J Gastroenterol* 1998;93:1998
- Lai YC, Yang SS, Wu CH, Chen TK. Endoscopic hemoclip treatment for bleeding peptic ulcer. *World J Gastroenterol* 2000;6:53-56
- Lin LF, Siau CP, Ho KS, Tung JC. Endoscopic hemoclip treatment of gastrointestinal bleeding. *Chung Gung Med* 2001;24:307-312
- Brullet E, Calvet X, Campo R, Rue M, Catot L, Donoso L. Factors predicting failure of endoscopic inject therapy in bleeding duodenal ulcer. *Gastrointest Endosc* 1996; 43:111-116
- Steele RJ, Park KG, Corfts TJ. Adrenaline injection for endoscopic haemostasis in non-variceal upper gastrointestinal haemorrhage. *Br J Surg* 1991;78:477-479

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

内镜诊疗实现无痛苦操作的临床评价

游旭东,陈玲玲,郑晓蕾,王 鹏,吴永伟,孔晓丽,许元印

游旭东,陈玲玲,郑晓蕾,孔晓丽,许元印,平顶山煤业集团总医院消化内科 河南省平顶山市 467000
王鹏,吴永伟,平顶山煤业集团总医院麻醉科 河南省平顶山市 467000
项目负责人:游旭东,467000,河南省平顶山市矿工路中段1号,平顶山煤业集团总医院消化内科. yxdyjj@sohu.com
电话:0375-2729130
收稿日期:2002-11-12 接受日期:2002-11-28

摘要

目的:探讨完全无痛苦状态下内镜操作的临床应用技术。

方法:静脉注射“静安注射液”1.5 mg/kg,患者在全麻醉状态下完成内镜操作全过程。“静安”组299例患者均有内镜检查或治疗适应证,并兼有下列条件之一(1)对内镜插管有恐惧感;(2)需要内镜复查者;(3)咽喉部特别敏感者;(4)既往有心绞痛发作史。常规组为同期285例有内镜检查或治疗适应证者。

结果:在插管全过程中,“静安”组98.7%(295/299)的患者完全无任何不适,1.3%(4/299)的患者稍感头晕,休息10 min后症状完全消失,0.33%(1/299)的患者出现呼吸、心率减慢,20 min恢复正常。常规组39.3%(112/285)的患者感觉非常痛苦;44.9%(128/285)的患者感觉痛苦;9.8%(28/285)的患者感觉不适;1.1%(3/285)的患者放弃检查;0.4%(1/285)

的心率加快、心绞痛停止操作后30 min缓解;4.5%(13/285)的患者中断操作加入“静安”组。两组病例比较感觉痛苦有显著差异($P < 0.05$),不良反应发生率无明显差别($P > 0.05$)。

结论:无痛苦内镜操作是一项安全有效的应用技术,其推广应用有广阔的前景。

游旭东,陈玲玲,郑晓蕾,王鹏,吴永伟,孔晓丽,许元印. 内镜诊疗实现无痛苦操作的临床评价. 世界华人消化杂志 2003;11(5):675-676
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/675.htm>

0 引言

内镜检查是消化道疾病主要的诊断手段,也是诊断消化道疾病最直接和最准确的方法,随着内镜技术的不断进步和发展,内镜下的治疗也越来越显示出巨大的优越性和实用性,但内镜插管本身也给患者带来一些痛苦和不适,由于镜体局部刺激引起生理反应如咽喉部不适、恶心、胃肠痉挛引起疼痛,为了使进行内镜检查和治疗的患者减轻痛苦,我们采用麻醉的方法,在患者无知觉的情况下进行检查和治疗,实现完全无痛苦操作,我院消化内镜室2001-11/2002-06共选择病例299例,特作如下报道^[1-4]。

醇、鱼肝油酸钠等硬化剂以提高疗效。

两组患者均未发生严重并发症。我们认为联合应用局部黏膜注射和金属夹法是治疗消化道出血的安全有效的方法，所需设备简单，适于推广。

4 参考文献

- Sung JY, Chung SC, Lo KK, Leung JW. Heater-probe treatment of bleeding peptic ulcers. *Surg Endosc* 1998; 2:234-236
- Park KG, Steele RJ, Mollison J, Crofts TJ. Prediction of recurrent bleeding after endoscopic haemostasis in non-variceal upper gastrointestinal haemorrhage. *Br J Surg* 1994;81:1465-1468
- Bedford RA, van Stolk R, Sivak MV Jr, Chung RS, van Dam J. Gastric perforation after endoscopic treatment of a Dieulafoy's lesion. *Am J Gastroenterol* 1992;87:244-247
- Chung SC, Leung JW, Sung JY, Lo KK, Li AK. Injection or heat probe for bleeding ulcer. *Gastroenterology* 1991;100:33-37
- Gevers AM, De Goede E, Simoens M, Hiele M, Rutgeerts P. A randomized trial comparing injection therapy with hemoclip and with injection combined with hemoclip for bleeding ulcers. *Gastrointest Endosc* 2002;55:466-469
- Binnmoeller KF, Thonke F, Soehendra N. Endoscopic hemoclip treatmentn for gastrointestinal bleeding. *Endoscopy* 1993;25:167-170
- 姚忆蓉,殷平,袁如华. 内镜下夹子结扎治疗消化道出血的探讨. 华人消化杂志 1998;6(特刊):409
- Lin HJ, Perng CL, Lee FY, Chan CY, Huang ZC, Lee SD, Lee CH. Endoscopic injection for the arrest of peptic ulcer hemorrhage:final results of a prospective, randomized comparative trial. *Gastrointest Endosc* 1993;39:15-19
- Thomopoulos KC, Nikolopoulou VN, Katsakoulis EC, Mimidis KP, Margaritis VG, Markou SA, Vagianos CE. The effect of endoscopic injection therapy on the clinical outcome of patients with benign peptic ulcer bleeding. *Scand J Gastroenterol* 1997; 32:212-216
- 夏金荣,繆才良,沈琰. 内镜止血夹、热凝和内镜下注射治疗急性上消化道大出血的疗效观察. 中华消化内镜杂志 1999;16:227-228
- Nagasu N, DiPalma JA. Bleeding ulcer: injection or clip? *Am J Gastroenterol* 1998;93:1998
- Lai YC, Yang SS, Wu CH, Chen TK. Endoscopic hemoclip treatment for bleeding peptic ulcer. *World J Gastroenterol* 2000;6:53-56
- Lin LF, Siau CP, Ho KS, Tung JC. Endoscopic hemoclip treatment of gastrointestinal bleeding. *Chung Gung Med* 2001;24:307-312
- Brullet E, Calvet X, Campo R, Rue M, Catot L, Donoso L. Factors predicting failure of endoscopic inject therapy in bleeding duodenal ulcer. *Gastrointest Endosc* 1996; 43:111-116
- Steele RJ, Park KG, Corfts TJ. Adrenaline injection for endoscopic haemostasis in non-variceal upper gastrointestinal haemorrhage. *Br J Surg* 1991;78:477-479

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

内镜诊疗实现无痛苦操作的临床评价

游旭东,陈玲玲,郑晓蕾,王 鹏,吴永伟,孔晓丽,许元印

游旭东,陈玲玲,郑晓蕾,孔晓丽,许元印,平顶山煤业集团总医院消化内科 河南省平顶山市 467000
王鹏,吴永伟,平顶山煤业集团总医院麻醉科 河南省平顶山市 467000
项目负责人:游旭东,467000,河南省平顶山市矿工路中段1号,平顶山煤业集团总医院消化内科. yxdyjj@sohu.com
电话:0375-2729130
收稿日期:2002-11-12 接受日期:2002-11-28

摘要

目的:探讨完全无痛苦状态下内镜操作的临床应用技术。

方法:静脉注射“静安注射液”1.5 mg/kg,患者在全麻醉状态下完成内镜操作全过程。“静安”组299例患者均有内镜检查或治疗适应证,并兼有下列条件之一(1)对内镜插管有恐惧感;(2)需要内镜复查者;(3)咽喉部特别敏感者;(4)既往有心绞痛发作史。常规组为同期285例有内镜检查或治疗适应证者。

结果:在插管全过程中,“静安”组98.7%(295/299)的患者完全无任何不适,1.3%(4/299)的患者稍感头晕,休息10 min后症状完全消失,0.33%(1/299)的患者出现呼吸、心率减慢,20 min恢复正常。常规组39.3%(112/285)的患者感觉非常痛苦;44.9%(128/285)的患者感觉痛苦;9.8%(28/285)的患者感觉不适;1.1%(3/285)的患者放弃检查;0.4%(1/285)

的心率加快、心绞痛停止操作后30 min缓解;4.5%(13/285)的患者中断操作加入“静安”组。两组病例比较感觉痛苦有显著差异($P < 0.05$),不良反应发生率无明显差别($P > 0.05$)。

结论:无痛苦内镜操作是一项安全有效的应用技术,其推广应用有广阔的前景。

游旭东,陈玲玲,郑晓蕾,王鹏,吴永伟,孔晓丽,许元印. 内镜诊疗实现无痛苦操作的临床评价. 世界华人消化杂志 2003;11(5):675-676

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/675.htm>

0 引言

内镜检查是消化道疾病主要的诊断手段,也是诊断消化道疾病最直接和最准确的方法,随着内镜技术的不断进步和发展,内镜下的治疗也越来越显示出巨大的优越性和实用性,但内镜插管本身也给患者带来一些痛苦和不适,由于镜体局部刺激引起生理反应如咽喉部不适、恶心、胃肠痉挛引起疼痛,为了使进行内镜检查和治疗的患者减轻痛苦,我们采用麻醉的方法,在患者无知觉的情况下进行检查和治疗,实现完全无痛苦操作,我院消化内镜室2001-11/2002-06共选择病例299例,特作如下报道^[1-4]。

1 材料和方法

1.1 材料 “静安”组 299 例均为我院门诊或住院患者,男 215 例,女 84 例。胃镜诊断 227 例,结肠镜诊断 51 例,内镜治疗 21 例。最大年龄 82 岁,最小年龄 15 岁,平均年龄 39.8 岁。病例入选条件:(1) 有内镜检查或治疗适应证,对内镜插管有恐惧感;(2) 有过内镜检查或治疗病史,需要复查者;(3) 有内镜检查或治疗适应证,咽喉部特别敏感者;(4) 有内镜检查或治疗适应证,既往有心绞痛发作史。对照组为同期 285 例有内镜检查或治疗适应证的患者,男 206 例,女 79 例,最大年龄 83 岁,最小年龄 16 岁,平均年龄 29.5 岁。

1.2 方法 操作前准备:(1)了解有无麻醉史;(2)有无心肺肝及肾脏疾病;(3)常规内镜检查术前准备;(4)基本仪器如监护器、氧气、除颤器等抢救设备及抢救药品的准备。药品方面:芬太尼注射液 0.1 mg、静安注射液 200-400 mg 备用,根据操作时间调整药物用量。具体方法是:患者摆好体位后,放置口垫,给予吸氧,有专职麻醉师静脉注射芬太尼 20 μg 后缓慢注射静安注射液 1.5 mg/kg,用药 30 s 后患者进入睡眠状态,开始进镜,并持续缓慢注入“静安”,退镜时即停止给药,操作结束,患者即刻完全清醒,恢复到检查或治疗前的状态,整个操作过程中密切观察患者的呼吸、血压、血氧饱和度及心率状况。

统计学处理 两组资料用 χ^2 检验。

2 结果

静安组所有病例均在完全睡眠状态下进行操作,全部过程结束后完全清醒,做到了真正意义上的无痛苦检查和治疗,295 例患者对操作完全无记忆,醒后也无任何不适。完全无痛苦率占 98.7%(295/299),4 例患者醒后稍感头晕,休息 10 min 后症状消失,占 1.3%(4/299)。298 例患者在操作过程中呼吸、血氧、心率、血压无明显变化,占 99.67%(298/299),1 例患有慢性支气管炎 10 a 的患者在退镜时出现呼吸减慢、血压下降、心率减慢,经辅助呼吸、吸氧、补液等处理,20 min 后完全恢复正常,不良反应发生率为 0.33%(1/299)。

从注射“静安”到患者意识消失的时间为 30 ± 15 s,芬太尼平均用量 30 μg ，“静安”平均用量 100 mg,停止给药后 0-90 s 完全清醒,少数患者清醒后有轻度头晕,1-3 min 后完全消失,无需特殊处理。

常规组 39.3%(112/285)的患者感觉非常痛苦;44.9%(128/285)的患者感觉痛苦;9.8%(28/285)的患者感觉不适;0.4%(1/285)的患者在操作中出现心率加快、心绞痛停止操作后 30 min 缓解;98.6%(281/285)的患者呼吸、血压、心率无明显变化;1.1%(3/285)的患者放弃检查;4.5%(13/285)的患者中断操作加入“静安”组。

静安组 1.3%(4/299)感觉不适与常规组 39.3 ± 44.9 %(240/285)感觉痛苦比较有显著差异($P < 0.05$);两组病例呼吸、血压、心率变化及不良反应发生率(分别为 0.33%、0.4%)无明显差异($P > 0.05$)。

3 讨论

静安注射液(丙泊酚或异丙酚)为短效静脉麻醉剂,起效快,代谢时间极短,静注后患者迅速入睡,停药后患者快速清醒,不良反应有低血压、心动过缓、呼吸抑制、呃逆等^[5-10]。

目前倡导无痛苦医院,体现人文关怀。尊重患者,关爱患者,为患者减轻痛苦是我们每位医生的责任,我们开展无痛苦内镜技术以来,共检查及治疗患者 299 例,有以下体会:(1) 静安用于内镜操作中,麻醉效果确切,患者入睡及苏醒迅速,用药后对呼吸、血压、心率及血氧饱和度等无明显影响。(2) 无痛苦内镜操作,符合内镜检查“现代”“镇静”的经典标准-无焦虑、合作与遗忘,在麻醉状态下操作,患者完全无意识,避免了内镜操作带来的各种不适感以及由此造成的机体应激反应和精神创伤。(3) 由于患者在无痛苦状态下接受检查或治疗,内镜医生相对不考虑操作时间,从容、仔细、彻底完成检查或治疗,减少漏诊、漏治,从根本上解决了因患者不能耐受而导致诊疗操作中断。(4) 减少了因恐惧、紧张和不合作而产生的并发症,如心脑血管意外、肠痉挛、出血等。(5) 无痛苦内镜操作需要内镜医生及麻醉师的密切配合,同时必须做好操作前的准备工作。在 299 例患者中有 1 例出现了呼吸减慢、心率下降,经及时处理未出现意外。因此,选择患者时要把握好适应证^[11-17]。

总之,无痛苦内镜操作是一项非常有效和安全的新技术,他对于患者耐受性、操作过程及操作效果都具有积极正面的影响,对技术复杂、操作时间长和耐受不佳的患者更有实用价值。值得推广应用。

4 参考文献

- 徐灿霞,唐五良,姜希望,肖定华. 内镜检查术前联合应用异丙酚和咪唑安定的效果. 世界华人消化杂志 2000;8:1197-1199
- 陈世耀,吴同法,刘厚钰,王吉耀,张善身,张希德. 10 a 内镜检查分析. 世界华人消化杂志 1999;7:15-17
- 潘洪珍,苏鲁,洪梅燕. 内镜下行食管支架置入 34 例的手术配合. 世界华人消化杂志 2001;9:852
- 方桢. 食管癌的内镜治疗. 世界华人消化杂志 2000;8:1026-1027
- 周文琴. 内镜下诊断早期胃癌 506 例. 世界华人消化杂志 1999;7:668
- 朱科明,王粤,邓小明,刘树孝. 异丙酚对小白鼠对胃肠道蠕动的功能的影响. 中华麻醉学杂志 1999;2:111-112
- 米卫东,张宏. 芬太尼血浆浓度对麻醉清醒时异丙酚浓度及脑电双频指数的影响. 中华麻醉学杂志 1999;3:134-136
- 袁耀宗主编. 消化系疾病临床新技术. 第 1 版. 北京:人民军医出版社,2002:356-360
- 芮耀诚主编. 现代药理学. 第 1 版. 北京:人民军医出版社,1999:248-249
- 吴云林主编. 消化内镜新进展. 第 1 版. 北京:人民军医出版社,2001:249
- 黄平,王亚青,薛世文,王志津,陈玉莹. 老年人胃镜检查对心血管系统的影响. 中华内科杂志 1999;12:846
- 刘厚钰,姚礼庆. 现代内镜学. 第 1 版. 上海:复旦大学出版社,2001:52-60
- 潘琳,张志燕,吴华星,赵洪清. 经电子内镜电凝治疗老年结肠息肉的多因素分析. 中华内科杂志 2000;8:551
- 林长斌,王怀泉,李文忠. 芬太尼复合丙泊酚全凭静脉麻醉剂量的临床观察. 临床麻醉学杂志 2001;6:311-314
- 刘存明,张国楼. 异丙酚加小剂量芬太尼麻醉在门诊短小手术的应用. 临床麻醉学杂志 1998;2:94-95
- 张捍平,杜洪印,柴伟. 国产与进口异丙酚预防全麻诱导气管插管时心血管反应的比较观察. 临床麻醉学杂志 2001;2:107-108
- 沈伯熊,金雯霞,程志军,周为民,梁志泳,戴杰,唐丹,侯瑞礁. 丙泊酚加曲马多或芬太尼静脉麻醉在无痛人流中的应用. 临床麻醉学杂志 2001;11:641

经皮经肝胆囊引流治疗急性胆囊炎和重症胆管炎的价值

张国梁,朱春兰,任旭

张国梁,朱春兰,任旭,黑龙江省医院附属消化病医院
黑龙江省哈尔滨市 150001
项目负责人:张国梁,150001,黑龙江省哈尔滨市南岗区奋斗路405号,黑龙江省
省医院附属消化病医院. zgl-789@hotmail.com
电话:3609112-3111 传真:3625671
收稿日期:2002-11-12 接受日期:2002-12-02

摘要

目的:探讨经皮经肝胆囊引流(PTGBD)治疗急性胆囊炎(AC)和重症胆管炎(ACST)的临床应用价值。

方法:选择22例急性胆囊炎和10例重症胆管炎,超声引导下经皮经肝胆囊穿刺引流。

结果:32例PTGBD均获成功,全部患者发热、腹痛症状迅速缓解,黄疸减退,1-5 d后复查B超,胆囊水肿、胆囊周围渗出消失,肿大的胆囊迅速恢复正常,使患者很快脱离危险。

结论:PTGBD治疗急性胆囊炎和重症胆管炎安全、有效、易行、能迅速改善患者症状,并发症少,具有重要临床实用价值。

张国梁,朱春兰,任旭. 经皮经肝胆囊引流治疗急性胆囊炎和重症胆管炎的价值. 世界华人消化杂志 2003;11(5):677-678

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/677.htm>

0 引言

急性胆囊炎(AC)和重症胆管炎(ACST)是消化系统疾病急症,临床通常采取手术治疗,急诊手术有一定合并症发生率^[1,2]. 重症胆管炎采用经内镜胆管引流或经皮经肝胆管引流(PTCD)治疗,创伤性小,可迅速缓解症状,临床上已广泛应用. 但毕II式胃手术者内镜治疗难度大,无明显肝内胆管扩张者PTCD难以成功,此类患者引流治疗受到限制. 我院近年开展经皮经肝胆囊引流术(PTGBD),探讨其临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料 1999-01/2002-01 选择32例急性胆囊炎和ACST行PTGBD,男20例,女12例,年龄20-78岁. 其中胆囊炎22例均有发热、腹痛症状. 14例有局限性腹膜炎体征. 重症胆管炎10例,发热、腹痛7例,伴血压下降、意识改变4例,血胆红素定量 <85.5 mmol/L 6例 >85.5 mmol/L 4例. 均有胆囊明显增大,6例无明显肝内胆管扩张,4例轻度扩张,毕II式胃手术患者5例.

1.2 方法 术前碘过敏试验,肌注安定10 mg、强痛定100 mg,常规消毒,局麻至肝被膜,超声引导下使

用19 G套管针经右季肋间穿刺胆囊体部或近颈侧,抽出胆汁证明穿刺成功. 抽取胆汁20-30 mL后注入少量造影剂,看清胆囊轮廓,插入超滑导丝,将外套管沿导丝送至胆囊内,交换0.038加硬导丝,此时在胆囊腔内环绕1周以上,沿导丝推入“C”型管留置在胆囊内. 抽取的胆汁做镜检及细菌培养。

2 结果

2.1 22例急性胆囊炎治疗前超声诊断胆囊结石15例,其中1例伴胆囊息肉样病变,非结石性胆囊炎7例,其中3例为胆管支架术后合并胆囊炎,22例均有胆囊水肿、胆囊周围渗出. 其中16例抽出大量脓性胆汁,余6例胆汁镜检见脓细胞. 全部病例发热、腹痛症状迅速缓解,1-5 d后复查B超胆囊:急性炎症明显减退,胆囊水肿、胆囊周围渗出消失. 造影诊断胆囊结石18例,其中3例为胆囊管结石嵌顿. 11例胆囊管闭塞,胆囊结石伴胆囊内1.2 cm形态不整山田I型隆起1例,胆汁脱落细胞见中度异形细胞,诊断为胆囊癌(术后病理证实). 22例中3例胆囊结石行经皮经肝胆囊镜取石(PTCCS)治疗,3例支架后胆囊炎引流后症状缓解,2-3 wk内拔管,16例2 wk后手术治疗,无合并症发生.

2.2 10例重症胆管炎中,胆管结石7例,恶性胆道梗阻3例(胰头癌1例,十二指肠乳头癌2例),4例患者呼吸、血压不稳定,难以进行经口内镜治疗. PTGBD术后临床症状迅速改善,体温下降,腹痛缓解,血压恢复,意识好转,引流量每天700-1 000 mL. 7例为脓性胆汁,3例镜检见脓细胞. 炎症减退后10例中2例恶性胆道梗阻做经内镜留置金属支架,6例手术治疗,2例经内镜取石。

全部病例胆汁细菌培养,29例阳性,其中25例为革兰氏阴性杆菌。

3 讨论

1975年永川宅和 et al 进行了选择性经皮经肝胆囊穿刺造影术,1978年大藤正雄 et al 开展了超声引导下穿刺技术,1980年永川宅和 et al 对急性化脓性胆囊炎进行了PTGBD疗法,此后该治疗方法在日本得到应用,但在我国报道极少,而PTGBD治疗重症胆管炎尚未见报道. 我们就其适应证、应用价值、并发症等进行讨论。

急性化脓性胆囊炎的PTGBD治疗适应证:不伴穿孔或坏死的急性化脓性胆囊炎均为PTGBD之适应证. 特别是合并感染性休克;合并其他严重疾患;高龄或伴心肾功能不佳难以耐受手术治疗;胆囊周围渗出

明显及脓肿形成者。本组 22 例急性胆囊炎均为 PTGBD 的适应证,均有发烧、腹痛、胆囊肿大及周围渗出,7 例合并感染性休克,6 例心肺功能较差,9 例年龄 65 岁以上。

急性化脓性胆囊炎起病急,进展快,易导致中毒性休克,常继发于胆囊结石等疾病,诊断并不困难,以往多采用急诊外科手术治疗,危险性较大,对于高龄、一般状态差或心肾功能不佳者危险性更大,有些手术只能胆囊造瘘,尚需二次手术。PTGBD 可代替外科急诊胆囊造瘘或“T”管引流。仲吉昭夫^[1]认为急性胆囊炎应首选 PTGBD,进行排除脓汁、减压治疗,使患者摆脱紧急状态。小西一郎 et al^[2]认为对于合并肝床部胆囊周围脓肿者如早期手术治疗,术中感染胆汁腹腔内散布可能性较大,术后于肝床部残留感染灶的危险性也较大。因此,对于急性胆囊炎的治疗,如合并肝床部胆囊周围脓肿或胆囊周围渗出严重者优先行 PTGBD 治疗。未合并者且经超声、CT 证实后,如条件允许,可考虑手术。他们对 22 例急性化脓性胆囊炎患者进行 PTGBD 治疗,均获成功,疗效满意。清松和光 et al^[3]报道 37 例急性胆囊炎的 PTGBD 治疗,上腹痛全例,发热 21 例 PTGBD 术后 1-5 d 内消失,白细胞也恢复正常。渡边五郎 et al 认为 PTGBD 的适应证主要是伴严重合并症的重症胆囊炎,特别是腹膜刺激症状明显,抗炎治疗 24 h 未见改善,超声和 CT 检查诊断胆囊周围炎及周围脓肿的急性胆囊炎。乾和郎 et al 报道 36 例急性胆囊炎的 PTGBD 治疗,均获成功,认为适应证为中等度以上的压痛,38 以上的高热,白细胞 $10 \times 10^9/L$ 以上,超声检查胆囊内大量点状、絮状、碎片状强回声,胆囊周围低回声带的形成等。PTGBD 术后平均 $1.5 \pm 1 d$ 腹痛消失;发热减退 $2.4 \pm 1.6 d$;3 d 白细胞恢复正常。本组 22 例急性胆囊炎 PTGBD 术后 $1.5 \pm 0.5 d$ 腹痛消失, $2.0 \pm 1.5 d$ 发烧减退,均取得非常满意的临床疗效。

PTGBD 还可以作为胆囊切除术引流,减少手术并发症,降低死亡率。仲吉昭夫^[1]认为 PTGBD 治疗后 8-14 d 行手术切除胆囊或 2 wk 后行腹腔镜胆囊切除术(LC),和急性期手术相比,明显降低并发症的发生率。永川宅和 et al 报道 48 例急性胆囊炎术前先行 PTGBD。待全身症状改善后再行胆囊切除术,全部病例均无严重并发症发生。我国牟状博 et al 报道对 18 例重症胆囊炎患者先行 PTGBD 后再行 LC,中转开腹率为 5.5%,对照组为 14.3% ($P < 0.05$)。1995 年 Lu et al 文献报道急性胆囊炎 LC,中转开腹手术率为 8-35%,高于无急性炎症时 3-8%。因此 LC 前行 PTGBD 能有效地控制那些不适合接受急诊 LC 患者的急性胆囊炎,尤其帮助老年患者渡过危险阶段。本组 16 例急性胆囊炎 PTGBD 治疗 2 wk 后行手术切除胆囊或 LC,均无严重并发症发生,其中 10 例 LC 无 1 例中转开腹手术。

急性胆囊炎的 PTGBD 治疗为进一步病因治疗打下了基础。乾和郎 et al 报道 36 例急性胆囊炎 PTGBD 治疗

后,35 例诊断胆囊结石,其中 28 例行 PTCCS 均获成功。本组 3 例 PTGBD 治疗前行 PTCCS 治疗,彻底清除了胆囊炎的致病因素。

重症胆管炎的 PTGBD 治疗适应证:重症胆管炎,无明显肝内胆管扩张或仅轻度扩张而无法行 PTCD 者;PTCD 失败者;高龄、一般状态差,心肺肾功能不佳不能接受手术治疗者,胃毕式术后而无法行内镜治疗(EST、ERBD、ENBD 等)及内镜治疗失败者。本组 10 例重症胆管炎患者,均为 PTGBD 治疗适应证。

急性重症胆管炎是胆道疾病中最凶险的疾病,常见于原发或继发胆管结石、损伤、狭窄、肿瘤、胰腺肿瘤及肝外胆道其他外来压迫所致胆道梗阻,并合并胆道严重感染的疾病,进展快,死亡率高。该病常合并黄疸出现,诊断并不困难。以往多采用手术治疗,行胆总管切开清理胆道后留置“T”型管引流或行胆肠吻合术。但对高龄人群,一般状态差,合并多脏器损伤者手术危险性很大。因此,近年来出现了经内镜治疗方法。包括 EST、ERBD、ENBD 等及 PTCD 治疗方法。但如果患者无肝内胆管扩张或扩张不明显,就不能行 PTCD 术,如果患者已行胃毕式手术,亦不能行内镜治疗,尚有极少数患者内镜治疗失败,仲吉昭夫^[1]认为此时可行 PTGBD 治疗,代替 PTCD。PTGBD 治疗重症胆管炎见效迅速,能很快缓解患者症状。不受年龄、病情等因素影响,能迅速挽救患者生命。本组 10 例 ACST 患者 PTGBD 术后临床症状迅速改善、体温下降、腹痛缓解、意识恢复、生命体征恢复平稳,迅速使患者脱离危险,均获得满意的临床疗效。

PTGBD 治疗时可抽取胆汁行细菌培养,据药物敏感结果给予敏感抗生素,同时可加入生理盐水经 PTGBD 管冲洗胆囊,缩短病程,对治疗有重要意义。PTGBD 并发症及预防:(1)脱管,应用“C”型引流管后几乎可以避免,要随时观察引流量,如出现引流量减少,突然腹痛,应考虑是否脱管,要随时透视,了解引流管的位置,随时调整;(2)送引流管时,胆囊张力高,可能沿穿刺点外溢少许胆汁,引起局限性腹膜炎,所以操作要快,尽量避免;(3)文献报道怀疑胆囊恶性肿瘤的病例,要考虑播种性转移,要对胆囊穿刺部位进行研究^[3]。小西一郎 et al^[2]行 31 例 PTGBD,无 1 例并发症,乾和郎 et al 行 36 例 PTGBD,3 例(8.3%)脱管。本组 28 例患者行 PTGBD,无 1 例发生并发症。

超声引导下 PTGBD 治疗急性胆囊炎和重症胆管炎操作简单、安全、有效、易行,几近无创,能迅速改善临床症状,并发症少,具有重要的临床实用价值。

4 参考文献

- 1 仲吉昭夫. 急性胆道感染症的紧急对处法. 消化器内视镜 1996; 8:1607-1611
- 2 小西一郎,上田顺彦,广野祐介. 选择的经皮经肝胆囊穿刺造影とドナ-ジ 82 例の临床的检讨. 胆と胰 1997;18:175-179
- 3 清松和光,吉田晃治,野中道泰,清永勉,麻生重明,才津秀树,杉原茂孝. 急性胆囊炎に対する PTGBD の有用性について. 胆道 1991;5:334

进展期胰腺癌 299 例

王成锋,赵平,李文波,宋德余

王成锋,赵平,中国医学科学院肿瘤医院中国协和医科大学肿瘤医院腹外科 北京市 100021
李文波,山东省龙口市人民医院外科 山东省龙口市 265700
宋德余,河北省衡水市人民医院外科 河北省衡水市 053000
项目负责人:王成锋,100021,北京市朝阳区潘家园南里17号,医科院肿瘤医院腹外科. wangchengfeng@x263.net
电话:010-67781331-8511/8521
收稿日期:2002-11-12 接受日期:2002-11-29

摘要

目的:探讨进展期胰腺癌的治疗方法。

方法:回顾性分析 1980-2001 年收治的 299 例进展期胰腺癌,分为手术组(243 例):手术(行胆系和/或肠系转流术、活检术等)加或不加辅助治疗;非手术组(56 例):行非手术治疗;并分析其治疗效果。

结果:手术组并发症率 16.9%、死亡率 6.9%;生存期 6.2 mo,加或不加辅助治疗其生存期分别为 6.8 mo 和 5.4 mo;非手术组无并发症和死亡,生存期 5.1 mo。

结论:对进展期无法行根治性切除的胰腺癌、姑息性切除是无益的,对伴发胆系和/或肠系梗阻时行转流术是必须的,围手术期辅助治疗是改善预后的重要方法。

王成锋,赵平,李文波,宋德余. 进展期胰腺癌 299 例. 世界华人消化杂志 2003; 11(5):679-680

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/679.htm>

0 引言

胰腺癌是危及人类健康的主要疾患,近年来发病率逐年上升. 胰腺癌治疗效果差,长期预后不满意. 手术是迄今为止最有效的治疗手段. 但胰腺癌发病隐匿、早期确诊率低、就诊时多不能行根治性手术。

1 材料和方法

1.1 材料 1980/2001 年,共收治资料完整的进展期胰腺癌 299 例,手术治疗 243 例为第一组,非手术治疗 56 例为第二组. 手术组男 166 例,女 77 例,男女比率为 2.2 : 1,年龄为 32-78 岁,平均 57.5 岁,高发年龄 61-70 岁,占 36.2%(88/243). 非手术组男 40 例,女 16 例,男女之比为 2.5 : 1,年龄 31-78 岁,平均 59.2 岁,高发年龄 61-70 岁,占 41.1%(23/56). 手术组主要症状包括黄疸 99 例、上腹饱胀不适和上腹痛各 96 例、体重下降 44 例、腰背痛 28 例. 病程:2 d-30 mo,平均为 3.9 mo. 主要体征包括黄疸 99 例、上腹压痛 61 例、腹部肿物 49 例、肝脏增大 22 例、胆囊增大 19 例. 非手术组包括:腹痛 30 例、黄疸 21 例、上腹饱胀

不适和腰背痛各 13 例、体检发现 4 例,病程:7 d-24 mo,平均为 4.1 mo. 主要体征包括黄疸 20 例、上腹压痛 17 例、上腹肿物 6 例、肝脏增大 5 例、左锁骨上淋巴结肿大 3 例。

1.2 方法

12.1 诊断 术前诊断主要靠 B 超、CT、MRI 和/或 MRCP、ERCP、上消化道造影等. 其中两项影像学证据一致时为临床诊断. 术中探查发现胰腺肿物、质硬、边界不清,周围脏器、血管浸润,腹腔转移灶以及细胞或组织学检查等。

1.2.2 治疗 手术组:单纯胆道转流术 81 例;胆囊空肠吻合术 37 例、胆总管十二指肠吻合术 19 例、胆总管空肠吻合术 8 例、胆囊外引流术 8 例、胆囊十二指肠吻合 5 例、胆道支架置入术 4 例. 单纯胃肠道转流术 29 例:胃空肠 Rou-en-Y 吻合术 29 例. 胆道、胃肠联合转流术 46 例:胆囊空肠+胃空肠吻合术 36 例、胆囊十二指肠+胃空肠吻合术 6 例、胆总管空肠+胃空肠吻合术 3 例、胆道支架置入+胃空肠吻合术 1 例. 其他术式 87 例:探查活检术 78 例(活检成功率 76.9%、60/78)、化疗泵置入术 6 例、无水酒精注射术 2 例、放射野标记术 1 例. 肿瘤大小和部位:手术组(术中探查所见):肿瘤直径 3 cm 20 例、4-5 cm 55 例、6-8 cm 67 例、>8 cm 76 例、无法描述肿瘤大小 25 例. 部位:胰头 129 例、胰体尾 73 例、全胰 17 例、钩突 24 例. 非手术组(影像学所见):肿瘤直径 3 cm 3 例、4-5 cm 26 例、6-8 cm 20 例、>8 cm 7 例. 部位:胰头 25 例、胰体尾 27 例、全胰 1 例、钩突 3 例. 无法切除或未能探查的原因:手术组:肠系膜上静脉和/或门静脉受侵 116 例、肝脏转移 45 例、周围脏器(包括:胃、肝门、脾脏、结肠、十二指肠等)受侵 42 例、广泛转移 38 例、中量以上腹水 15 例、腔静脉受侵 9 例、肿瘤巨大 6 例、其他原因有:腹腔动脉受侵、结肠中动脉受侵、腹主动脉受侵、广泛粘连等. 非手术组:肠系膜上静脉和/或门静脉受侵和肝脏转移各 21 例、淋巴结转移 4 例、周围脏器(包括:胃、肝门、脾脏、结肠、十二指肠等)受侵和广泛转移各 3 例、腹腔动脉侵犯 2 例、中量以上腹水和腹主动脉受侵各 1 例。

辅助治疗:手术组:97 例次,其中:区域性动脉灌注介入治疗 35 例,方法:CAI 和/或 SMAI;用药包括:健则、PDDD、CF、5-FU、MMC、EADM 等的组合;治疗 1-5 次;全身化疗 26 例、单纯放疗 24 例、中医中药 17 例、其他包括放疗、化疗、热疗、区域性动脉灌注介入治疗、免疫治疗、中药等的不同组合治疗 31 例次. 非手术组:区域性灌注化疗 35 例次、方法:CAI 和/或 SMAI,

用药包括:健则、PDDD、CF、5-FU、MMC、EADM等的组合;治疗2-6次;放疗12例;全身化疗+区域性灌注化疗和放疗+区域性灌注化疗各3例;全身化疗2例;化疗+放疗1例。

2 结果

2.1 并发症和死亡率 手术组:并发症率为16.9%(41/243),其中:消化道梗阻11例、消化道出血9例、住院期间再次出现黄疸8例、切口液化、肠痿、多脏器功能衰竭、顽固性腹水、继发性糖尿病各2例、腹腔感染、伤口裂开、伤口感染各1例。死亡率(术后1 mo内死亡):4.9%(12/243),包括:消化道出血5例、肿瘤晚期5例、多脏器功能衰竭2例。非手术组未发现并发症和治疗期间1 mo内死亡病例。

2.1 治疗效果 生存期:手术组:1-24 mo,平均为6.2 mo;其中辅助治疗组为1-24 mo、平均为6.8 mo,非辅助治疗组为1-18 mo、平均为5.4 mo。非手术组:1-14 mo,平均5.1 mo。

3 讨论

手术切除是胰腺癌唯一有效的治疗方法。胰腺癌早期诊断困难,切除率仅15-20%,另外40%为局部进展期、40%为肿瘤晚期^[1]。胰腺癌尤其是胰头癌多伴有胆道和/或消化道梗阻;为此,手术解除梗阻、提高生活质量,活组织检查,放射野标记,腹腔化疗泵置入等手段在不能切除的胰腺癌的治疗中占有重要的地位。

胰腺癌术前可切除性的判断标准为:(1)肿瘤局限于胰腺内或仅有局部、可联合切除的邻近器官如胆总管、十二指肠、胃、脾脏等脏器的浸润。肿瘤与邻近血管的关系为受压、接触或受侵小于血管周径的1/3。(2)无明显的、不可切除的淋巴结转移。(3)无远处脏器、腹膜、网膜的转移。通过术前仔细的体检、影像学检查,多可判定能否切除。

胰腺癌的肿瘤标志物以CA19-9应用价值最大。CA19-9可用于胰腺癌的诊断、鉴别诊断、可切除性和预后的判断及预示肿瘤的复发和转移。影像学检查对判断胰腺癌的可切除性有极大的临床价值,彩色B超、螺旋CT^[2]、MRI+MRCP、DSA等可酌情应用。

胰腺癌是否活检争议较大。早期可切除的胰腺肿瘤不主张针吸活检;不能耐受手术者,决定放、化疗前,不能切除者行活检是必要的。但经皮胰腺穿刺有发生出血、急性胰腺炎、胰痿、脓肿等并发症的可能;在内窥镜超声(EUS)和腹腔镜(LS)引导下穿刺可引起种植转移;穿刺的敏感性仅为50-70%、且阴性结果并不能排除肿瘤。进展期胰腺癌是否行姑息性切除争论较大。探查发现明确无法根治性切除者,做姑息性切除是不适宜的,至今尚未有一项随机对照研究证明姑息性切除能改善患者的预后^[3]。

黄疸可加重肝功能的损害,进而影响一系列的代

谢变化和其他脏器的功能,内引流减黄可以起到缓解症状、提高生活质量、延长生存期的作用^[4]。进展期胰腺癌经内引流减黄治疗后中位生存期达到9 mo,1 a、2 a生存率分别为38.7%、8.1%^[5]。引流成功的标志:引流72 h后,总胆红素下降30%、胆总管直径缩小^[6]。但引流可引起一系列并发症,尤其是感染性并发症^[7]。目前减黄的方式主要有开腹胆肠吻合术和内镜下的置管术。前者创伤大、住院时间长,但效果肯定、维持时间长、可同时行预防性和治疗性胃肠吻合;后者创伤小、恢复快、并发症率低;根据不同情况可酌情运用。对肿瘤不能切除、能耐受开腹探查的患者、多数学者主张行开腹内引流术。

手术组探查不可切除的原因依次是:肠系膜上静脉和/或门静脉受侵、肝脏转移、腹腔广泛转移、周围脏器受侵、中量以上腹水、空肠起始段受侵、腔静脉受侵等。非手术组影像学提示不可切除的原因依次是:肠系膜上静脉和/或门静脉受侵、淋巴结转移、周围脏器受侵、腹腔动脉受侵、中量以上腹水、腹主动脉受侵等。由此可见对胰腺癌不可切除的原因主要是血管的侵犯。

胰腺癌的治疗效果:手术组总的生存期为6.2 mo,加或不加辅助治疗的生存期分别为6.8 mo和5.4 mo,并发症率16.9%;死亡率4.9%;非手术组的生存期为5.1 mo;因非手术组以胰体尾癌居多,且临床分期较晚,故两组无可比性。文献报道胰腺癌手术后的并发症率为20%,死亡率为0-5%,5 a生存率为20%。

总之,胰腺癌的预后很差,改善预后的最有效方法是早期诊断、根治性手术和合理的围手术期处理,对进展期胰腺癌行姑息性切除是无益的,但对同时伴有胆系和/或肠系梗阻者行转流术是改善预后、提高生活质量所必须的,对欲行姑息性长期胆道和/或肠道转流者,实施手术完成转流是最佳的选择。

4 参考文献

- 1 Pelage JP, Soyer P, Boudiaf M, Brocherioa-Spelle I, Dufrene AC, Coumbaras J, Rymer R. Carcinoid tumours of the abdomen: CT Features. *Abdom Imaging* 1999;24:240-245
- 2 Furukawa H, Kosuge T, Mukai K, Iwata R, Ranai Y, Shimada K, Yamamoto J, Ushio K. Helical computed tomography in the diagnosis of portal vein invasion by pancreatic head carcinoma. *Arch Surg* 1998;133:61-65
- 3 Gouma DJ, van Dijkum EJ, van Geenen RC, van Gulik TM, Obertop H. Are there indications for palliative resection in pancreatic cancer? *World J Surg* 1999;23:954-959
- 4 Povosiki SP, Karpeh MS, Conlon KC, Blumgart LH, Bernnan MF. Association of preoperative biliary drainage with postoperative outcome following pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 1999;230:131-142
- 5 Molinari M, Helton WS, Espat NJ. Palliative strategies for locally advanced unresectable and metastatic pancreatic cancer. *Surg Clin North Am* 2001;81:651-666
- 6 Lillemoed KD, Cameron JL, Yeo CJ, Sohn TA, Nakeeb A, Sauter PK, Hruban RH, Abrams RA, Pitt HA. Pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg* 1996;223:718-728
- 7 Padillo J, Puente J, Gomez M, Dios F, Naranjo A, Vallejo JA, Mino G, Pera C, Sitges-Serra A. Improved cardiac function in patients with obstructive jaundice after internal biliary drainage. *Ann Surg* 2001;234:652-656

食管、贲门癌染色体异常分析及意义

武珊珊,刘吉福,王明荣

武珊珊,刘吉福,北京军区总医院胸外科 北京市 100700
王明荣,中国医科院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室 北京市 100021
项目负责人:武珊珊,100700,北京市,北京军区总医院胸外科.
电话:8112-66721629
收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-17

摘要

目的:研究食管、贲门癌细胞染色体异常及意义.

方法:16例食管癌,3例贲门癌采用比较基因组杂交技术,以不同荧光染料分别标记正常人胎盘DNA和癌细胞DNA,与人中期染色体杂交,用荧光显微镜观察摄取图像,通过专用分析软件,确定染色体DNA的扩增和缺失.

结果:食管、贲门癌同一患者可出现多条染色体扩增和缺失,可出现整条染色体或长臂或短臂或某一染色体上DNA位点的扩增或缺失,常见扩增有3q,17q,20q,8q,9q,11q,5p,17p;缺失为4q,4p,9q,18q;6例有8q扩增者,病变均侵犯食管壁全层、邻近组织且伴淋巴结转移.染色体DNA扩增数目最多的见于 期患者, 期最少.

结论:食管、贲门癌细胞染色体DNA扩增和缺失与病变的发生、发展、转移和分期有关.

武珊珊,刘吉福,王明荣.食管、贲门癌染色体异常分析及意义.世界华人消化杂志 2003;11(5):681-684

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/681.htm>

0 引言

食管癌是常见恶性肿瘤,是癌症死亡的常见原因.研究其发生、发展和影响治疗的因素是提高远期生存率的重要环节.从染色体和基因方面进行研究是获取上述资料的关键途径.1999-08/2000-05收集了19例食管、贲门标本,用比较基因组杂交技术研究食管、贲门癌细胞染色体异常及意义,报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 手术切除食管癌16例、贲门癌3例;其中男10例,女9例.避开切除肿瘤的坏死区,取部分肿瘤组织,立即保存于-170℃液氮,备用.标本全部取自北京军区总医院胸外科.食管、贲门癌标本的临床资料见(表1).

表1 食管、贲门癌标本的临床资料

序号	性别	年龄(岁)	病变部位	病理类型	分化程度	TNM 分类	分期
1	女	63	食管中段癌	鳞癌	中分化	T ₂ N ₁ M ₀	b
2	男	63	食管中段癌	鳞癌	中高分化	T ₃ N ₁ M ₀	
3	女	51	食管	鳞癌	中分化	T ₄ N ₁ M ₁	
4	女	58	食管	鳞癌	高分化	T ₂ N ₀ M ₀	a
5	男	51	食管	鳞癌	高分化	T ₂ N ₀ M ₀	a
6	女	74	食管下段癌	鳞癌	低分化	T ₃ N ₀ M ₀	b
7	男	62	食管中下段癌	鳞癌	高分化	T ₃ N ₀ M ₀	b
8	女	73	食管癌	鳞癌	低分化	T ₃ N ₁ M ₀	
9	男	64	食管癌	鳞癌	高分化	T ₃ N ₀ M ₀	b
10	男	51	食管癌	鳞癌	中高分化	T ₃ N ₁ M ₀	
11	男	50	食管中段癌	鳞癌	低分化	T ₄ N ₁ M ₀	
12	女	64	食管癌	鳞癌	低分化	T ₄ N ₁ M ₀	
13	女	58	食管癌	鳞癌	中高分化	T ₁ N ₀ M ₀	
14	女	55	食管上段癌	鳞癌	未分化	T ₃ N ₁ M ₀	
15	男	55	食管中段癌	鳞癌	中高分化	T ₃ N ₁ M ₀	
16	男	76	食管中段癌	鳞癌	中低分化	T ₁ N _x M ₀	
17	男	77	贲门	腺鳞	中低分化	T ₃ N ₀ M ₀	b
18	男	50	贲门	腺癌	低分化	T ₃ N ₁ M ₀	
19	女	68	贲门	腺癌	中低分化	T ₃ N ₁ M ₀	

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 按分子生物学方法常规提取组织基因组DNA.

1.2.2 比较基因组杂交(CGH) (1)探针标记:采用切口平移法,用Biotin-16-dUTP标记肿瘤DNA,用Digoxin-11-dUTP标记参照(胎盘组织)DNA,标记探针最后产物大小在500-1200 bp. (2)探针沉淀:等量的肿瘤探针和正常参照探针混合(500 ng/每管),加Cot-1 DNA、醋酸钠、乙醇沉淀,离心.沉淀的DNA用5 μL杂交液溶解(去离子甲酰胺、40%硫酸葡聚糖和双蒸水),室温放置20 min. (3)用标准方法制备正常外周血淋巴细胞中期染色体片. (4)选择中期染色体分布的最佳部位,用RNase、胃蛋白酶预处理.1%多聚甲酰胺固定,梯度酒精脱水,干燥. (5)杂交:(a)探针变性:杂交混合液在75℃水浴变性8 min,至37℃预复性20 min. (b)中期染色体片变性:将已预处理的中期染色体片置70%去离子甲酰胺2XSSC中,73℃变性2 min.在预冷的2XSSC中洗涤2次,每次5 min.梯度酒精脱水. (6)杂交及封片:将预复性的杂交混合液滴在处理好的中期染色体片标记的部位,用盖玻片封片,37℃,60-72 h.杂交后用50%甲酰胺2XSSC,43℃,15 min.2XSSC X2

洗涤。(7)杂交后标记检测：肿瘤探针的杂交信号用 FITC-avidin 和抗 - avidin 测定；正常参照(胎盘组织)探针用鼠源性 antidigoxin-TRITC 和抗 - 鼠抗体测定；染色体用 4, 6- 二氨基 -2- 苯吡啶(DAPI)复染。

1.2.3 CGH 图像的获取和分析 (1)图像通过荧光显微镜, 63 倍物镜观察, 荧光信号通过冷电荷藕荷设备 (CCD)相机(prinston inc)摄取, 连入计算机; 分别摄取对应 DAPI、TRITC、FITC 3 种荧光染料的 3 个黑白数字图像, 这 3 种染料分别分配蓝、红、绿三原色, 由此合成了彩图。(2) CGH 图像分析: 应用 CGH analyzer 软件(由清华大学编制), 分别计算每条染色体的中轴荧光信号比值, 红、绿荧光的比值相等处为零, 阈值分别定为 1.2 (绿)和 0.8(红), 超过阈值处分别定义为扩增或缺失(图 1)。

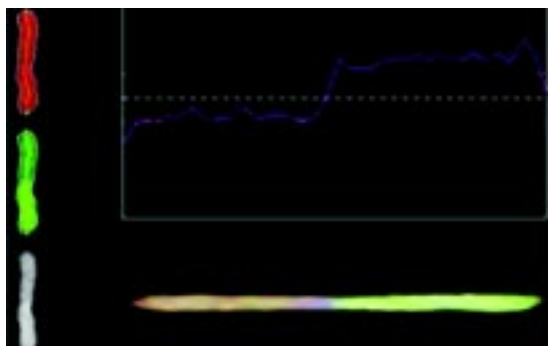


图 1 3 号染色体的中轴计算结果:长臂绿色荧光增强.中央实线代表 1.0 比值,上下的虚线分别表示阈值 1.2 和 0.8 处。

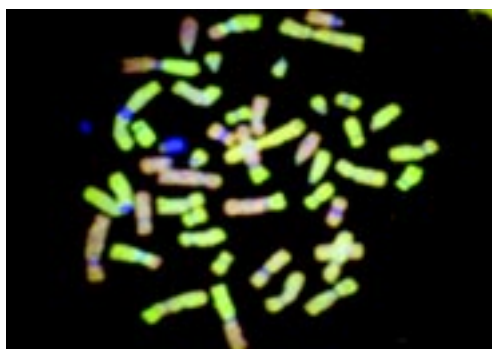


图 2 CCD 拍摄的原始中期染色体照片(病例 14)。



图 3 染色体的红绿两色荧光的比例剖面图,中央实线代表 1.0 比值,左右的虚线分别表示阈值 0.8 和 1.2 处. DNA 拷贝数的扩增和缺失被分辨。

2 结果

16 例食管癌和 3 例贲门癌均被发现有染色体的扩增;染

色体缺失在 3 例贲门癌均存在, 食管癌有 13 例(表 2);常见食管癌染色体异常频率(表3). CCD 拍摄的原始中期染色体照片(图 2); 染色体的红绿两色荧光的比例剖面图(图 3)。

表 2 19 例食管、贲门癌染色体 DNA 的扩增和缺失

序号	期、级	DNA 扩增位点	DNA 缺失位点
1		3q27,5p15,7p1-13,9q21,11,17, 20q12,21q21-222, xp21	1p13-31,4q35,18q2, xp22
2		1q,1p1-21,2q,3q	1p32-pter
3		1q, 2q	
4		5p,8q,11q13,20q	5q13-qter,6q,8p2,9,18q2, xp
5		5,8q12-13,9q,11q,14q,19q11-12, 20q11	4,22,x
6		1q32-qter,2q1,3q27,6p21-22, 6q15-22,7q21,11q13,14q,16,20q12, xp21	3p3q1,4q35,5p,6p23-pter,6q27
7		2p22-23,5p13-15.2,7p13-15, 7q11.2,19,21q,17	4,x
8		2p16,2q32,3q27,5p,8q,11q13, 13q,15q22-qter,17,21, xp22	2p25,8p,15q12-21,18q21-qter
9		1p31-pter,3q,4p,9q34,12,13, 15q26,17,18p	x
10		3q21-27,4p15-q32,8q12-241	1p35,7q3,21
11		1p2,3q	
12		3q1,3q24-qter,5q31,8q,10q21,15q2 19q11-12	1q32,4p15-pter,9,10p, xp22
13		1q,3q,13q,7,8	19
14		1p,3q,5p31-pter,7p15-21,9p11-13, 9q,11,13,17,18,19,20,21q	4,5q,9p22-pter,12,14,15,16,x
15		3q,13q,17	
16		1q22,3q,5p,9	
17		2q,3,16q,20	5p,12,21,19, xp22
18		3q,4q3-qter,6,8p25-pter,11p, 18q,20q1,21q	11
19		1p,9,13,15	1q

表 3 食管癌常见染色体异常的频率

区域	扩增频率		缺失频率	
	区域	频率(n=16)	区域	频率(n=16)
3q	4q	12	5	5
3q27	4q35	12	5	5
5p	4p	7	4	4
5p15	9p	6	2	2
8q	9p22-pter	5	3	3
8q12	18q	6	3	3
9q	18q2	5	3	3
11q	Xp22	6	7	7
11q13		6		
17q		7		
17p		6		
20q		5		
20q12		5		

DNA拷贝数出现明显扩增的常见位点为3q(12例, 75%), 17q, 5p(7例, 43.7%), 8q, 11q, 17p(6例, 37.5%), 9q, 20q(5/16例, 31.3%)。DNA拷贝数减少的位点在4q, 4p, 9q, 18q, xp。DNA拷贝数的扩增和缺失可发生于整条染色体或染色体的一条长臂或短臂,也可以发生于染色体DNA位点,并且以后者更为多见。

食管癌染色体DNA拷贝数增加最多的发生在I期的病例。本组6例中有5例(83.8%), II、III期8例患者仅有3例(37.5%), 2例IV期患者染色体扩增数目均少。DNA缺失也以I期最多见, 3/16例。贲门癌DNA拷贝数扩增数多的仅有1例,以整条染色体扩增或缺失最常见。染色体扩增或缺失的位点分布在一窄区域内,食管癌在3q27, 20q11-12, 8q12-13, 8q12-24.1, 5p15扩增;缺失在18q2, 4q35, 3/16例, X染色体DNA缺失本组食管癌有7例,贲门癌1例。6例有8q扩增的患者,其中有2例T₃N₁M₀, 1例T₄N₁M₀。

3 讨论

研究食管癌细胞染色体异常,包括染色体DNA位点扩增或缺失,是深入了解食管癌发生、发展、转移和对化疗反应的重要途径。然而,食管癌染色体异常改变的复杂性,也增加了此研究的难度。用先进的比较基因组杂交技术(comparative genomic hybridization, CGH)检测肿瘤细胞染色体扩增或/和缺失的部位及基因位点,以分析其临床意义,目前国内尚未见报道。

CGH是一项快速可靠的分子细胞遗传学的检测技术,基本原理是用不同的荧光染料分别标记正常基因组DNA和肿瘤细胞DNA,然后与正常人中期染色体杂交,通过检测染色体上两种荧光信号的相对强度比率,了解肿瘤细胞DNA拷贝数的改变,并能同时进行染色体定位。我们利用这一技术检测了19例食管、贲门癌患者,结果表明食管癌患者染色体扩增和缺失涉及多条染色体,多位点改变,更说明了食管癌遗传学的发生、发展是极其复杂的,与临床上观察到的肿瘤增长速度、转移和预后较有密切联系^[1,2]。食管癌染色体异常的复杂性可表现为同一患者有多条染色体DNA扩增和缺失,3q扩增最多见。本组与文献报道的多种肿瘤检测结果相似^[3-5]。目前已有研究表明3q区域有原癌基因包括上皮细胞转化序列2(epithelial cell transforming sequence₂, ECT₂);截短的P63变形体和易突变基因甲基化CPG结合结构域蛋白4,这些基因在肿瘤的发生过程中有重要作用,这可能是多数肿瘤3q区域出现高频扩增的原因。

致癌基因的扩增是食管癌的重要特征:Tada et al^[6]用比较基因组方法检查了36例食管鳞癌标本,分析了鳞癌细胞扩增、过表达及缺失情况。以3q(75%), 8q23-qter(50%), 11q13(44%)出现扩增频率最高。his1, cyclin-D(bcl-1)定位于11q13位点,表明与癌细胞分化有关。结果表明11q13-qter扩增预示淋巴结转移。本组

食管癌11q染色体扩增有6例占31.6%,而分化好的仅有2例,分化差的有4例;临床观察到11q位点扩增多表现为分化差、恶性度高。myc基因定位于8q,该基因在食管癌中常发现有扩增,间质金属蛋白酶(MMPS)也定位于8q,他能分解细胞外基质的多种内肽酶,该基因与肿瘤侵袭过程有关。本组8q扩增患者食管癌有6例(占37%),其中有3例患者病变侵犯深,伴淋巴结转移。

抑癌基因的缺失是食管癌的另一特征,APC是已知的抑癌基因^[7-9],定位于5q21位点;而DCC为1个促进细胞凋亡的基因,定位于18q染色体^[10]。食管切除标本中,Barrett食管增生,间变到癌变化中,APC等位基因缺失或/和APC蛋白表达缺失较MCC基因发生更早,在不同阶段发生的比率上升,表明这2个基因在癌发生发展中的作用。抑癌基因的缺失促进了癌的发生。本组食管癌中18q缺失有3例(3/16例,占18.8%)。

食管癌染色体DNA拷贝数的增加与病理分期有关。食管癌的DNA倍体数与癌的病理分期的关系已有报道。Watanabe et al^[11]报道78例食管鳞癌中DNA高度单倍体(high grade aneuploid, HGA)多见于晚期癌(占55%),而DNA二倍体则多见于早期癌或表浅癌。食管鳞癌DNA单倍体基因改变率为73.3%,而二倍体基因改变率仅20.0%^[11]。有关胃肠实体瘤DNA倍体数的变化已进行研究^[12]。最近Varis et al^[13]用比较基因组杂交方法,比较胃腺癌与食管鳞癌DNA倍体变化最常见的扩增均在20q(50%), 17q(39%);本组患者染色体扩增20q占36.8%(11/17例), 17q为31.6%(6/17例)。另有报道^[14,15]食管癌发生转移者,6q, 9q杂合性缺失显著。本组中缺失位于6q, 9q者,在I-III期中占17.7%(3/17例),表明这两个位点缺失与癌转移有关。本组癌细胞染色体DNA扩增数目以I期最多,其次是II、III期,IV期最少,这种变化与癌细胞倍体变化应有一定联系。

癌细胞染色体DNA扩增的区域有相近之处。有报道食管原发腺癌以4q, 14q缺失, 2p, 17p扩增常见,而且在染色体窄区域内出现扩增。本组在8q, 5p扩增, 18q, 4q缺失均出现,均显示在染色体窄区域,其意义有待进一步探讨。癌细胞染色体DNA中癌基因扩增在肿瘤的发生和发展中具有重要作用,多种致癌基因扩增,表明食管、贲门癌是多种癌基因联合作用的结果;同时抑癌基因的缺失促进肿瘤的发展。D Cruz et al^[16]研究发现,乳腺癌当c-myc基因存在,又通过激活ras基因突变,促进肿瘤进展;反之消除c-myc基因的诱导作用,无ras基因突变,则乳腺增生或癌病变消退,这进一步证明癌的发生、发展是由多种癌基因协同作用的结果;而在食管癌中,各种癌基因协同作用的方式、途径及影响因素,则有待进一步研究。X染色体DNA缺失与获得性抗药性有关,但是与遗传因素的关系有待探讨。

4 参考文献

- 1 Takashi U, Akira T, Shigefumi Y, Toshihiro A, Hiroaki T, Tomoko F, Shigeto K, Atsunori O, Masaaki O, Kohsuke S. Gain of 5p15 detected by comparative genomic hybridization as an independent marker of poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8:526-533
- 2 Yen CC, Chen YJ, Chen JT, Hsia JY, Chen PM, Liu JH, Fan F S, Chiou TJ, Wang WS, Lin CH. Comparative genomic hybridization of esophageal squamous cell carcinoma: correlations between chromosomal aberrations and disease progression/prognosis. *Cancer* 2001;92:2769-2777
- 3 Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, Reichel MB, Ried T, Dietel M. Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3q, 4q, 5q, 10q, 13q and 17. *Br J Cancer* 1997;75:79-86
- 4 El Rifai W, Frierson HF Jr, Moskaluk CA, Harper JC, Petroni GR, Bissonette EA, Jones DR, Knuutila S, Powell SM. Genetic differences between adenocarcinomas arising in Barrett's esophagus and gastric mucosa. *Gastroenterology* 2001;121:592-598
- 5 Tada K, Oka M, Hayashi H, Tangoku A, Oga A, Sasaki K. Cytogenetic analysis of esophageal squamous cell carcinoma cell lines by comparative genomic hybridization: relationship of cytogenetic aberrations to in vitro cell growth. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;117:108-112
- 6 Tada K, Oka M, Tangoku A, Hayashi H, Oga A, Sasaki K. Gains of 8q23-qter and 20q and loss of 11q22-qter in esophageal squamous cell carcinoma associated with lymph node metastasis. *Cancer* 2000;88:268-273
- 7 Bektas N, Donner A, Wirtz C, Heep H, Gabbert H E, Sarbia M. Allelic loss involving the tumor suppressor genes APC and MCC and expression of the APC protein in the development of dysplasia and carcinoma in Barrett's esophagus. *Am J Clin Pathol* 2000;114:890-895
- 8 Werner M, Walch A. Morphologie und biologie der invasion am beispiel des barrett-karzinoms. [Morphology and biology of invasion with Barret's carcinoma as an example]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2000;84:62-68
- 9 Dolan K, Garde J, Walker S J, Sutton R, Gosney J, Field J K. LOH at the sites of the DCC, APC, and TP53 tumor suppressor genes occurs in Barrett's metaplasia and dysplasia adjacent to adenocarcinoma of the esophagus. *Hum Pathol* 1999;30: 1508-1514
- 10 Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 1998;395: 801-804
- 11 Watanabe M, Kuwano H, Tanaka S, Toh Y, Sadanaga N, Sugimachi K. Flow cytometric DNA analysis is useful in detecting multiple genetic alterations in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999;85:2322-2328
- 12 Sarlomo Rikala M, El Rifai W, Lahtinen T, Andersson LC, Miettinen M, Knuutila S. Different patterns of DNA copy number changes in gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas, and schwannomas. *Hum Pathol* 1998;29:476-481
- 13 Varis A, Puolakkainen P, Savolainen H, Kokkola A, Salo J, Nieminen O, Nordling S, Knuutila S. DNA copy number profiling in esophageal Barrett adenocarcinoma: comparison with gastric adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;127: 53-58
- 14 Hu N, Roth MJ, Emmert-Buck MR, Tang ZZ, Polymeropolous M, Wang QH, Goldstein AM, Han XY, Dawsey SM, Ding T, Giffen C, Taylor PR. Allelic loss in esophageal squamous cell carcinoma patients with and without family history of upper gastrointestinal tract cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3476-3482
- 15 van Dekken H, Geelen E, Dinjens WN, Wijnhoven BP, Tilanus H W, Tanke HJ, Rosenberg C. Comparative genomic hybridization of cancer of the gastroesophageal junction: deletion of 14Q31-32.1 discriminates between esophageal (Barrett's) and gastric cardia adenocarcinomas. *Cancer Res* 1999;59:748-752
- 16 D'Cruz CM, Gunther EJ, Boxer RB, Hartman JL, Sintasath L, Moody SE, Cox JD, Ha SI, Belka GK, Golant A, Cardiff RD, Chodosh LA. C-MYC induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous kras2 mutations. *Nat med* 2001;7:235-239

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

空回肠出血 27 例

石力, 田伏洲, 李旭, 周庆贤, 赵碧, 薛刚

石力, 田伏洲, 李旭, 周庆贤, 薛刚, 成都军区总医院全军普外中心 四川省成都市 610083
赵碧, 成都军区总医院血液科 四川省成都市 610083
项目负责人: 田伏洲, 610083, 四川省成都市, 成都军区总医院全军普外中心. lishi@mail.sc.cninfo.net
电话: 028-86570526
收稿日期: 2002-05-31 接受日期: 2002-07-25

摘要

目的: 对经手术证实的空回肠出血患者 27 例进行分析, 探讨空回肠出血的病因及诊断。

方法: 空回肠出血患者 27 例分别进行 B 超、小肠气钡造影、选择性肠系膜动脉造影、术中肠镜等检查, 最后均以手术及病理证实。

结果: 肿瘤 14 例 (51.9%), 血管发育不良 5 例 (18.5%),

Meckel 憩室 4 例 (14.8%), crohn's 病 3 例 (11.1%), 非特异性溃疡 1 例 (3.7%)。术中肠镜诊断阳性率为 83.3%, 阳性符合率为 100%; 选择性肠系膜动脉造影阳性率为 66.7%, 阳性符合率为 87.5%; 气钡双重造影阳性率为 23.5%, 阳性符合率为 100%; B 超阳性率为 25.9%, 阳性符合率为 85.7%。

结论: 肿瘤为空回肠出血的主要原因。除传统的诊断方法外, B 超在空回肠出血的诊断中也具有较为重要的作用。

石力, 田伏洲, 李旭, 周庆贤, 赵碧, 薛刚. 空回肠出血 27 例. 世界华人消化杂志 2003; 11(5): 684-685

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/684.htm>

0 引言

在消化道出血性疾病的诊断过程中, 对于上消化道及

4 参考文献

- 1 Takashi U, Akira T, Shigefumi Y, Toshihiro A, Hiroaki T, Tomoko F, Shigeto K, Atsunori O, Masaaki O, Kohsuke S. Gain of 5p15 detected by comparative genomic hybridization as an independent marker of poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8:526-533
- 2 Yen CC, Chen YJ, Chen JT, Hsia JY, Chen PM, Liu JH, Fan F S, Chiou TJ, Wang WS, Lin CH. Comparative genomic hybridization of esophageal squamous cell carcinoma: correlations between chromosomal aberrations and disease progression/prognosis. *Cancer* 2001;92:2769-2777
- 3 Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, Reichel MB, Ried T, Dietel M. Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3q, 4q, 5q, 10q, 13q and 17. *Br J Cancer* 1997;75:79-86
- 4 El Rifai W, Frierson HF Jr, Moskaluk CA, Harper JC, Petroni GR, Bissonette EA, Jones DR, Knuutila S, Powell SM. Genetic differences between adenocarcinomas arising in Barrett's esophagus and gastric mucosa. *Gastroenterology* 2001;121:592-598
- 5 Tada K, Oka M, Hayashi H, Tangoku A, Oga A, Sasaki K. Cytogenetic analysis of esophageal squamous cell carcinoma cell lines by comparative genomic hybridization: relationship of cytogenetic aberrations to in vitro cell growth. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;117:108-112
- 6 Tada K, Oka M, Tangoku A, Hayashi H, Oga A, Sasaki K. Gains of 8q23-qter and 20q and loss of 11q22-qter in esophageal squamous cell carcinoma associated with lymph node metastasis. *Cancer* 2000;88:268-273
- 7 Bektas N, Donner A, Wirtz C, Heep H, Gabbert H E, Sarbia M. Allelic loss involving the tumor suppressor genes APC and MCC and expression of the APC protein in the development of dysplasia and carcinoma in Barrett's esophagus. *Am J Clin Pathol* 2000;114:890-895
- 8 Werner M, Walch A. Morphologie und biologie der invasion am beispiel des barrett-karzinoms. [Morphology and biology of invasion with Barrett's carcinoma as an example]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2000;84:62-68
- 9 Dolan K, Garde J, Walker S J, Sutton R, Gosney J, Field J K. LOH at the sites of the DCC, APC, and TP53 tumor suppressor genes occurs in Barrett's metaplasia and dysplasia adjacent to adenocarcinoma of the esophagus. *Hum Pathol* 1999;30: 1508-1514
- 10 Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 1998;395: 801-804
- 11 Watanabe M, Kuwano H, Tanaka S, Toh Y, Sadanaga N, Sugimachi K. Flow cytometric DNA analysis is useful in detecting multiple genetic alterations in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 1999;85:2322-2328
- 12 Sarlomo Rikala M, El Rifai W, Lahtinen T, Andersson LC, Miettinen M, Knuutila S. Different patterns of DNA copy number changes in gastrointestinal stromal tumors, leiomyomas, and schwannomas. *Hum Pathol* 1998;29:476-481
- 13 Varis A, Puolakkainen P, Savolainen H, Kokkola A, Salo J, Nieminen O, Nordling S, Knuutila S. DNA copy number profiling in esophageal Barrett adenocarcinoma: comparison with gastric adenocarcinoma and esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;127: 53-58
- 14 Hu N, Roth MJ, Emmert-Buck MR, Tang ZZ, Polymeropolous M, Wang QH, Goldstein AM, Han XY, Dawsey SM, Ding T, Giffen C, Taylor PR. Allelic loss in esophageal squamous cell carcinoma patients with and without family history of upper gastrointestinal tract cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3476-3482
- 15 van Dekken H, Geelen E, Dinjens WN, Wijnhoven BP, Tilanus H W, Tanke HJ, Rosenberg C. Comparative genomic hybridization of cancer of the gastroesophageal junction: deletion of 14Q31-32.1 discriminates between esophageal (Barrett's) and gastric cardia adenocarcinomas. *Cancer Res* 1999;59:748-752
- 16 D'Cruz CM, Gunther EJ, Boxer RB, Hartman JL, Sintasath L, Moody SE, Cox JD, Ha SI, Belka GK, Golant A, Cardiff RD, Chodosh LA. C-MYC induces mammary tumorigenesis by means of a preferred pathway involving spontaneous kras2 mutations. *Nat med* 2001;7:235-239

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 临床经验 •

空回肠出血 27 例

石力, 田伏洲, 李旭, 周庆贤, 赵碧, 薛刚

石力, 田伏洲, 李旭, 周庆贤, 薛刚, 成都军区总医院全军普外中心 四川省成都市 610083
赵碧, 成都军区总医院血液科 四川省成都市 610083
项目负责人: 田伏洲, 610083, 四川省成都市, 成都军区总医院全军普外中心. lishi@mail.sc.cninfo.net
电话: 028-86570526
收稿日期: 2002-05-31 接受日期: 2002-07-25

摘要

目的: 对经手术证实的空回肠出血患者 27 例进行分析, 探讨空回肠出血的病因及诊断。

方法: 空回肠出血患者 27 例分别进行 B 超、小肠气钡造影、选择性肠系膜动脉造影、术中肠镜等检查, 最后均以手术及病理证实。

结果: 肿瘤 14 例 (51.9%), 血管发育不良 5 例 (18.5%),

Meckel 憩室 4 例 (14.8%), Crohn's 病 3 例 (11.1%), 非特异性溃疡 1 例 (3.7%)。术中肠镜诊断阳性率为 83.3%, 阳性符合率为 100%; 选择性肠系膜动脉造影阳性率为 66.7%, 阳性符合率为 87.5%; 气钡双重造影阳性率为 23.5%, 阳性符合率为 100%; B 超阳性率为 25.9%, 阳性符合率为 85.7%。

结论: 肿瘤为空回肠出血的主要原因。除传统的诊断方法外, B 超在空回肠出血的诊断中也具有较为重要的作用。

石力, 田伏洲, 李旭, 周庆贤, 赵碧, 薛刚. 空回肠出血 27 例. 世界华人消化杂志 2003;11(5):684-685

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/684.htm>

0 引言

在消化道出血性疾病的诊断过程中, 对于上消化道及

结、直肠的病变,常常可以通过十二指肠镜、结肠镜等检查作出诊断。然而,对位于空回肠的病变,其诊断却较为困难。本文对我院1990/2001年经手术证实的空回肠出血患者27例的病因及诊断方法进行分析,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 患者27例,男19例,女8例,年龄23-77(平均43.9)。病程9 d到5 a不等。主要表现为贫血、大便潜血、间断性黑便及暗红色血便。其中23例伴有腹痛、腹部不适等症状,4例为单纯性出血。主要体征为腹部压痛、腹部包块等。

1.2 方法 所有患者均行十二指肠镜、结肠镜检查,未发现上消化道及结直肠病变。全部患者行腹部B超检查,12例行选择性动脉造影,17例行消化道气钡双重造影,所有患者均行手术治疗,6例行术中肠镜。

2 结果

行B超检查27例,提示小肠实性占位7例,其中1例手术证实为Meckel憩室。行气钡双重造影17例,提示Meckel憩室2例,小肠肿瘤1例,crohn's病1例。行选择性肠系膜动脉造影12例,提示小肠肿瘤5例,血管发育不良3例,其中1例诊断为血管发育不良者手术证实为crohn's病。6例行术中肠镜,提示血管发育不良3例,crohn's病1例,空肠非特异性溃疡1例。本组患者中,小肠肿瘤共14例,占51.9%,其中以平滑肌肉瘤的发生率最高(25.9%)。小肠血管发育不良5例,占18.5%,居出血原因的次位。其他出血原因还有crohn's病3例(11.1%),Meckel憩室4例(14.8%)以及非特异性溃疡1例(3.7%)。表1。

表1 各项检查阳性人数及阳性率

	B超	气钡双重造影	选择性肠系膜动脉造影	术中肠镜
受检人数	27	17	12	6
阳性人数	7	4	8	5
阳性率(%)	25.9	23.5	66.7	83.3
阳性符合率(%)	85.7	100	87.5	100

3 讨论

空回肠出血的诊断较为困难,主要原因在于该区域为临床上所常用的十二指肠镜以及纤维结肠镜检查的盲区,而胃肠钡剂检查假阴性率高,选择性动脉造影以及^{99m}Tc标记红细胞放射性核素扫描等阳性检出率较高的方法又

难以常规开展。在出血原因中,本组患者肿瘤14例,约占51.9%,为出血的主要原因,这与其他一些作者的报道相似^[1-5]。其次为血管发育不良(5例,18.5%)。小肠气钡双重造影是目前诊断小肠疾病所运用较广的方法,它对小肠肿瘤、Meckel憩室、克隆病的诊断有一定价值,但该方法假阴性率较高。其阳性检出率为10%左右,本组阳性率为23.5%。选择性肠系膜动脉造影是目前诊断小肠出血的较为理想的方法,当出血量>0.5 ml/min时,其阳性率约50% - 75%^[1,6]。然而,由于临床上常见慢性少量出血的患者,在治疗后又常转化为非活动性出血,且该方法不但价格昂贵,而且为有创的检查手段,部分患者不愿接受,这在一定程度上限制了它的运用。术中肠镜对空回肠出血的诊断阳性率较高,Kendrick et al^[7]对67例不明原因消化道出血患者行术中肠镜检查,其阳性检出率为74%。本组阳性诊断率为83.3%,这可能与病例数较少有关。Manner et al^[8]运用超声对小肠血管瘤作出了诊断。超声诊断Meckel憩室阳性率可达44%^[9]。此外,超声在小肠血肿、肠系膜血肿的诊断中同样具有一定的价值^[10,11]。本组患者7例(25.7%)超声发现腹腔实性占位,结合消化道出血的临床表现,作出了小肠肿瘤的诊断。手术证明超声的阳性诊断符合率为85.7%。本组B超阳性检出率较高,也可能同肿瘤患者所占比例较高有关。然而,作为一种无创、常规的检查,B超在空回肠出血诊断中的作用,应引起人们的重视。

4 参考文献

- 1 黄频,姜泊,侯淑琴. 小肠出血23例诊断分析. 世界华人消化杂志 1999;7:722-723
- 2 任俭,陈立波,丁静民,杨镇. 小肠出血66例诊断分析. 中国实用外科杂志 1999;19:416-418
- 3 王少峰,王崇文. 术中肠镜检查对不明原因小肠出血的诊断价值. 中华消化内镜杂志 2001;18:21
- 4 谭丰平,薛惠平,彭小华. 37例小肠出血临床分析. 中华消化内镜杂志 2001;176-177
- 5 陈凤英,李新华,张桂英. 空回肠出血诊断分析. 湖南医科大学学报 2001;26:70-72
- 6 高鹏,王强,乔森. 辅助检查在小肠出血性疾病诊断中的价值. 腹部外科 1999;12:263-264
- 7 Kendrick ML, Buttar NS, Anderson MA. Contribution of intra-operative enteroscopy in the management of obscure gastrointestinal bleeding. *J Gastrointest Surg* 2001;5:162-167
- 8 Manner M, Scholz E, Wehrmann M, Stickel W. Invagination caused by angiolipoma of the small intestine-a rare cause of occult gastrointestinal hemorrhage. *Chirurg* 2001;72:305-307
- 9 Mostbeck GH, Liskutin J, Dorffner R. Ultrasonographic diagnosis of a bleeding Meckel's diverticulum. *Pediatr Radiol* 2000;30:382
- 10 Lorente-Ramos RM, Santiago-Hernando A, Del Valle-Sanz Y, Arjonilla-Lopez A. Sonographic diagnosis of intramural duodenal hematomas. *J Clin Ultrasound* 1999;27:213-216
- 11 Chao HK, Kong MS. Sonographic diagnosis of mesenteric hematoma. *J Clin Ultrasound* 1999;27:284-286

食管鳞癌免疫组化彩色图像定量分析

韩永,徐燕杰,李宁,布和,宋晶莹,赵敏

韩永,徐燕杰,李宁,宋晶莹,赵敏,中国人民解放军解放军三零九医院病理科 北京市 100091
布和,内蒙古锡林浩特市医院病理科 内蒙古锡林浩特市 026000
项目负责人:韩永,100091,北京市海淀区黑山扈甲17号,中国人民解放军三零九医院病理科. frankbj72@163.com
电话:010-66775260
收稿日期:2002-08-24 接受日期:2002-10-12

摘要

目的:探讨食管鳞癌免疫组化图像定量分析中描述图像色彩的指标在不同分化程度间的变化及作用.

方法:采用S-P法进行肺癌p53、p21和增生细胞核抗原(PCNA)免疫组化染色,应用计算机病理图像分析系统(TD-2000)进行图像分析.

结果:35例食管鳞癌患组中高分化组、中分化组和低分化组p53阳性者分别为7例、9例和9例,PCNA阳性者分别为7例、8例和9例,p21阳性者分别为8例、9例和11例.高分化组p53染色的饱和度($2.15 \pm 1.21\%$)、中分化组($4.95 \pm 2.99\%$)、低分化组($10.95 \pm 1.81\%$),高分化组和中分化组差异有显著性($t=2.31, P<0.05$),中分化组和低分化组差异有显著性($t=5.12, P<0.01$);高分化组PCNA染色的饱和度($3.72 \pm 2.81\%$)、中分化组($7.71 \pm 3.91\%$)、低分化组($12.95 \pm 3.89\%$),高分化组和中分化组差异有显著性($t=2.24, P<0.05$),中分化组和低分化组差异有显著性($t=2.77, P<0.05$);高分化组p21染色的色度(32.16 ± 8.78)、中分化组(53.98 ± 6.95)、低分化组(62.32 ± 2.32),高分化组和中分化组差异有显著性($t=5.71, P<0.01$),中分化组和低分化组差异有显著性($t=9.20, P<0.01$).

结论:用图像色彩的指标定量分析食管鳞癌免疫组化图像可能反应食管鳞癌的不同分化程度.

韩永,徐燕杰,李宁,布和,宋晶莹,赵敏. 食管鳞癌免疫组化彩色图像定量分析. 世界华人消化杂志 2003;11(5):686-688
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/686.htm>

0 引言

病理学高效率而有机地将计算机图像处理系统技术应用病理学教学与临床诊断中,很好地适应于计算机及网络时代的要求.定量病理学技术主要指将数学方法引入病理学观察与研究过程,实现由传统病理学定性观察到定量研究的转变,是近年来定量病理学技术得到长足进展的原因^[1].在免疫组化定量分析方面,有学者应用计算机图像分析技术进行肺癌p53免疫组化定量

分析^[2],以阳性水平指数(PLI),即阳性细胞百分比与阳性平均光密度的乘积作为定量指标^[3].但光密度是细胞在同一光源下吸收光的数值,不能反映切片的色彩变化,而免疫组化阳性着色的色彩是结果判定的重要依据.为了弥补上述不足,我们尝试应用计算机图像分析技术对食管鳞癌p53、p21、PCNA免疫组化染色阳性细胞核的红、绿、蓝色值及色度、饱和度、灰度等描述图像色彩指标进行了定量分析,现报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 35例标本来自我院1997-2002年间心胸外科收治手术切除的食管鳞癌病例,均经病理学确诊,高分化病例9例,中分化病例13例,低分化病例13例.同时取非癌食管组织作为对照.其中男25例,女10例,平均年龄50岁;p53阳性25例,PCNA阳性24例,p21阳性28例.非癌食管组织均为阴性.

1.2 方法

1.2.1 染色方法 标本经 $100\text{ ml}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲醛固定,常规石蜡包埋,切片厚 $4\ \mu\text{m}$,HE染色进行组织学分类.免疫组化采用SP法.p53、PCNA及p21单抗购自SantaCruz公司,试剂盒为北京中山公司产品.苏木素复染.空白对照以PBS取代一抗,阳性对照为已知阳性片.

1.2.2 阳性判断标准 阳性染色主要位于细胞核,呈棕黄色颗粒状,背景清晰.阴性对照无着色.

1.2.3 计算机图像分析 应用北京天地百年科技有限公司TD-2000真彩色病理细胞显微分析系统,显微镜下选取阳性细胞集中的视野,调整图像效果,经彩色CCD摄像机将图像输入计算机病理图像分析系统,转化为数字图像.注意输入图像的背底灰度(即每张载玻片上没有细胞或组织区域的灰度)一致,以消除载玻片透光度及背底灰度等的影响.每个图像选取30个阳性细胞,选择测量指标,由系统自动测量相应数据.

1.2.4 描述图像色彩的指标 免疫组化染色结果的判定,除考虑着色部位外,主要根据着色的色彩判定.图像色彩可根据三基色原理分解为红(R)、绿(G)、蓝(B)三种颜色.三基色按不同比例相加合成混合色.三基色间的比例关系,反映图像呈现的颜色,三基色的色值则反映该基色的强度,这是RGB格式. Munseu提出了HSI格式,I表示灰度,其确定了像素的整体亮度,而不管彩色是什么.色度(H)由角度表示,通常规定 0° 彩色为红色, 120° 为绿色, 240° 为蓝色.饱和度(S)的概念可描述如下:假设有一纯红的颜料,饱和度为100%,混入白色染料后使红色变淡,减少了饱和度.随着红色变得越

来越淡,饱和度降低,最后接近于零(白色)^[4].三基色色值与色度、饱和度、灰度的换算参阅文献[4].由于免疫组化染色DAB显色呈棕色,所以在RGB格式,阳性着色必须是红、绿色值均大于蓝色,且差别越大阳性色彩越强.在此基础上,红、绿色值比较,红色值越大阳性色彩越强.在HSI格式,阳性着色的色度必须 $<90^\circ$,越接近于 0° 阳性色彩越强;饱和度越高阳性色彩越强;灰度色彩越强,阳性色彩越强.如果DAB显色后再经苏木素复染,阳性细胞可能会着有一定的蓝色,这就可能出现蓝色值大于绿色值的情况,但不应大于红色值,此时呈现品红色.这种情况在RGB格式,红色值必须大于蓝色值,且红色值越大阳性色彩越强.绿色值与红、蓝色值比较,差别越大阳性色彩越强.转化为HSI格式则色度必须 $>300^\circ$ 且色度越大阳性色彩越强(越趋近于 360° 也即 0° ,红色);饱和度越高阳性色彩越强;灰度越低阳性色彩越强.

统计学处理 将数据转化成SPSS for windows格式,用SPSS软件进行统计分析.采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

2.1 p53阳性食管鳞癌图像分析 不同分化程度的p53阳性食管鳞癌图像分析结果显示,红、绿、蓝色值均以高分化组高于中分化组、高于低分化组(表1).三基色的比例提示,三组红、绿、蓝色值均依次降低,但以低分化组更明显,说明两组虽均呈红黄色,但低分化组与中分化组和高分化组相比,更偏于红色.三组色度接近,在 45° 左右,呈橙黄色,低分化组略低,

即较中分化组略偏橙色,灰度以中高分化组较高,但差异没有显著性.饱和度以低分化组高于中分化组,差异有非常显著性($t = 5.12, P < 0.01$),中分化组高于高分化组,差异有显著性($t = 2.31, P < 0.05$),说明低分化组色彩较强^[5-8].

2.2 PCNA阳性食管鳞癌图像分析 不同分化程度的PCNA阳性食管鳞癌图像分析结果显示,红、绿色值低分化组高于中分化组、高于高分化组,蓝色值高分化组高于中分化组、高于低分化组,差异没有显著性(表2).三基色的比例提示,高分化组和中分化组红、绿色值非常接近,蓝色值较低,而低分化组红色值高于绿色值,蓝色值低于绿色值,说明虽然三组均呈红黄色,但低分化组与中分化组和高分化组相比,偏于红色.三组色度在 55° 左右,基本呈黄色,以低分化组小于中分化组、小于高分化组,即略偏于橙色,但差异没有显著性.灰度三组基本一致.饱和度低分化组高于中分化组,差异有显著性($t = 2.77, P < 0.05$),中分化组高于高分化组,差异有显著性($t = 2.24, P < 0.05$),说明低分化组色彩较强^[9,10].

2.3 p21阳性食管鳞癌图像分析 不同分化程度的p21阳性食管鳞癌图像分析结果显示,红、绿、蓝色值低分化组均高于中分化组?高于高分化组,但差异没有显著性(表3).三基色的比例提示,高分化组和中分化组红、绿、蓝色值依次降低,低分化组红、绿色值接近,蓝色值较低,说明三组虽均呈红黄色,但高分化组和中分化组与低分化组相比,更偏于红色.三组色度均在 60° 左右,接近黄色,以高分化组小于中分化组小于低分化组,说明高分化组和中分化组偏于橙色,色度高分化

表1 不同分化程度食管鳞癌的p53图像分析结果

分化程度	P53 阳性(n)	饱和度(%)	色度($^\circ$)	灰度	红色度	绿色度	蓝色度
Well	7	2.15 \pm 1.21	52.21 \pm 22.34	175.08 \pm 13.21	175.15 \pm 12.02	173.12 \pm 8.80	172.85 \pm 20.42
Moderate	9	4.95 \pm 2.99	48.72 \pm 20.32	171.87 \pm 11.58	175.08 \pm 12.16	172.25 \pm 10.80	161.45 \pm 15.82
poor	9	10.95 \pm 1.81	45.32 \pm 4.74	163.92 \pm 11.85	175.02 \pm 12.62	162.45 \pm 12.40	142.38 \pm 8.52

表2 不同分化程度食管鳞癌的PCNA图像分析结果

分化程度	PCNA 阳性(n)	饱和度(%)	色度($^\circ$)	灰度	红色度	绿色度	蓝色度
Well	7	3.72 \pm 2.81	50.06 \pm 6.85	171.98 \pm 16.90	171.70 \pm 15.01	174.88 \pm 18.12	165.98 \pm 20.15
Moderate	8	7.71 \pm 3.91	57.55 \pm 6.71	173.51 \pm 14.90	175.97 \pm 13.00	175.57 \pm 15.78	156.47 \pm 17.94
poor	9	12.95 \pm 3.89	55.20 \pm 6.46	174.91 \pm 8.05	181.72 \pm 8.49	176.97 \pm 9.21	146.47 \pm 8.06

表3 不同分化程度食管鳞癌的p21图像分析结果

分化程度	P21 阳性(n)	饱和度(%)	色度($^\circ$)	灰度	红色度	绿色度	蓝色度
Well	8	7.55 \pm 2.32	32.16 \pm 8.78	164.59 \pm 3.59	167.55 \pm 2.98	160.58 \pm 4.98	144.58 \pm 5.75
Moderate	9	7.45 \pm 2.13	53.98 \pm 6.95	167.59 \pm 5.86	169.78 \pm 5.04	165.28 \pm 6.78	147.46 \pm 7.98
poor	11	7.43 \pm 2.22	62.32 \pm 2.32	172.97 \pm 11.61	171.18 \pm 10.98	172.45 \pm 11.72	153.98 \pm 12.95

组高于中分化组, 差异有非常显著性($t=5.71$, $P<0.01$), 中分化组高于低分化组, 差异有非常显著性($t=9.20$, $P<0.01$), 三组饱和度以高分化组略高, 灰度低分化组较高, 但差异没有显著性^[11].

3 讨论

大量研究证明 p53、p21 及 PCNA 变化与肿瘤的发生发展密切相关。p53 基因突变, 抑癌基因失控, 可以导致食管鳞癌的发生。p21 基因与食管鳞癌发生发展关系亦十分密切。PCNA 则常用作恶性增生的指标^[12]。目前, 病理切片免疫组化定量分析仅用阳性细胞数占肿瘤细胞的百分比即 PI 指数来衡量^[13]。免疫组化染色需通过病理切片的着色情况来判定结果, 由于人眼对相同强度光的主观感觉不同, 将会影响对结果的判定。而应用计算机进行图像分析, 则可避免这种主观感觉的偏差。有研究表明应用图像分析技术对细胞核 DNA 含量进行定量分析, 能较好地反映病理图像与 DNA 量的关系。有学者应用图像分析技术进行 DNA 倍体分析, 结果与流式细胞仪测定结果非常接近^[14]。亦有学者用计算机图像处理技术, 对痰涂片中巴氏染色的角化性鳞癌细胞(KSCC)、非角化性鳞癌细胞(NKSCC)和腺癌细胞(ACC)胞质进行了色度学定量分析, 结果 KSCC 的红、绿、蓝色值显著高于 NKSCC 和 ACC, 且差值较大, 而灰度在各组间的差值则较小, KSCC 与 NKSCC, KSCC 和 ACC 的色度差值较大, 差异极为显著, KSCC、NKSCC、ACC 三组间饱和度差异显著, KSCC 明显高于 NKSCC 和 ACC, 从而认为红、绿、蓝色值、色度、饱和度等描述图像色彩指标在 KSCC 和 NKSCC、KSCC 与 ACC 的鉴别中有重要价值, 其分辨的敏感程度优于灰度图像分析。我们则应用计算机图像分析技术对食管鳞癌 p53、PCNA 和 p21 免疫组化染色阳性的病理切片进行了图像分析。免疫组化染色经 DAB 显色后阳性细胞呈棕色, 再经苏木素复染, 将着有一定的蓝色, 这会在一定程度上影响对染色的判定。采用多媒体彩色图像分析系统进行定量分析, 分别测定红、绿、蓝三种颜色的色值, 可用来区分细胞对不同颜色的着色程度, 并可通过三基色色值或计算色度、饱和度、灰度来对细胞呈现的色彩进行定量描述^[15-17]。本研究结果显示,

对同一组织类型、同是免疫组化染色阳性的食管癌细胞, 一些反映着色色彩的指标在不同分化程度之间确实存在着差别, 这种差别单纯应用定性指标或形态学指标无法充分显示, 图像分析技术则可弥补这一不足。

4 参考文献

- 1 张桂珍, 赵世光, 薄立华, 崔亚南, 刘霆, 徐辉. 计算机图像处理系统在病理学教学及临床诊断中的应用. 白求恩医科大学学报 2000;26:171-173
- 2 Kaya H, Kotiloglu E, Inanli S, Ekicioglu G, Bozkurt SU, Tutkun A, Kullu S. Prevalence of human papilloma virus(HPV)DNA in larynx and lung carcinomas. *Pathologica* 2001;93:531-534
- 3 吴培仁, 钟芷芬, 洪永寿. 食管鳞癌 DNA 定量分析的临床意义. 中国肿瘤临床与康复 1998;5:25-26
- 4 孙立新, 宋立刚, 宋志杰, 胡建功, 赵晓明, 金小平, 李民. 肺鳞癌免疫组化彩色图像定量分析. 中国肺癌杂志 2001;4:216-218
- 5 李道堂, 石殿鹏, 孙兰萍, 仲伟霞, 杨瑞森, 罗景玉, 王家林, 陈刚, 李秀玲. p53、PCNA 及 VEGF 表达与食管鳞癌预后的相关性研究. 肿瘤防治杂志 2001;8:247-250
- 6 廖琼, 杨霞, 孙维纲, 廖乘风. 食管鳞癌 p53、c-erbB-2 蛋白表达研究. 中国组织化学与细胞化学杂志 2000;9:175-177
- 7 王永康, 陈景寒, 孟龙, 杜德利, 刘静. p53 和 nm23 联合表达对食管鳞癌淋巴结转移的影响. 临床与实验病理学杂志 1999;15:414-416
- 8 陈守惠, 洪东旭, 叶欣, 吴若华, 葛惠敏. p27 和 p53 在食管鳞癌中的表达及其意义. 中国现代医学杂志 2002;12:7-9
- 9 李淳, 程继东, 蔡维佳. HSP70、P 糖蛋白、PCNA 在食管鳞癌中的表达. 实用癌症杂志 1999;14:205-207
- 10 马福成, 张传山, 胡沛臻, 王文亮. p21^{WAF1/CIP1} 与 PCNA 在食管鳞状细胞癌发病中的意义. 诊断病理学杂志 2002;9:178-179
- 11 谢斌生, 易建华, 杜兴贵, 朱礼国, 姚俊霞. Rb、p21、MMP 2 和 LN R 在食管鳞癌中的表达及其与侵袭和转移的关系. 实用癌症杂志 2001;16:393-396
- 12 Stoner GD, Gupta A. Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2001;22:1737-1746
- 13 廖美琳, 林振琼, 周允中, 赵家美, 许凯黎. 非小细胞肺癌生物学特性检测的临床意义. 中华结核和呼吸杂志 1998;21:30-33
- 14 Polkowski W, Van lanschot JJ, offerhaus GJ. Barrett esophagus and cancer: pathogenesis, carcinogenesis, and diagnostic dilemmas. *Histol Histopathol* 1999;14:927-944
- 15 Walch A, Bink K, Gais P, Stangl S, Hutzler P, Aubele M, Mueller J, Hofler H, Werner M. Evaluation of c-erbB-2 overexpression and Her-2/neu gene copy number heterogeneity in Barrett's adenocarcinoma. *Anal Cell Pathol* 2000;20:25-32
- 16 Shirakawa Y, Naomoto Y, Kimura M, Kawashima R, Yamatsuji T, Tamaki T, Hamada M, Haisa M, Tanaka N. Topological analysis of p21^{WAF1/CIP1} expression in esophageal squamous dysplasia. *Clin Cancer Res* 2000;6:541-550
- 17 Hashimoto N, Tachibana M, Dhar DK, Yoshimura H, Nagasue N. Expression of p53 and RB proteins in squamous cell carcinoma of the esophagus: their relationship with clinicopathologic characteristics. *Ann Surg Oncol* 1999;6:489-494



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

