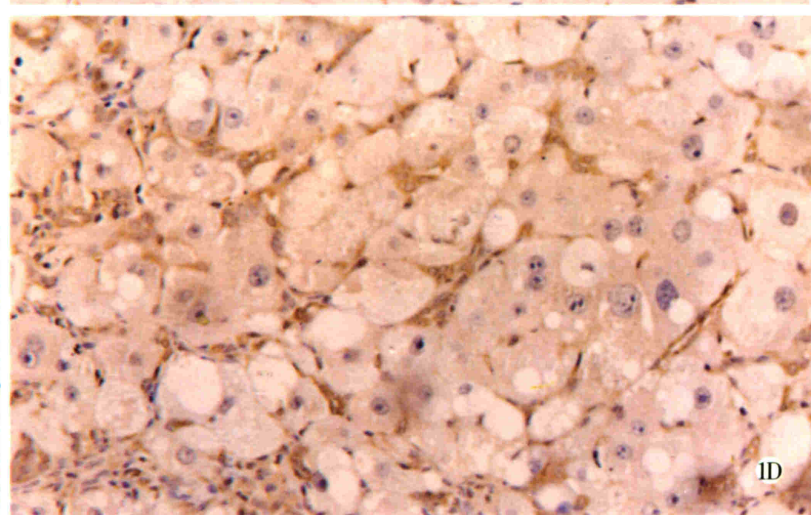
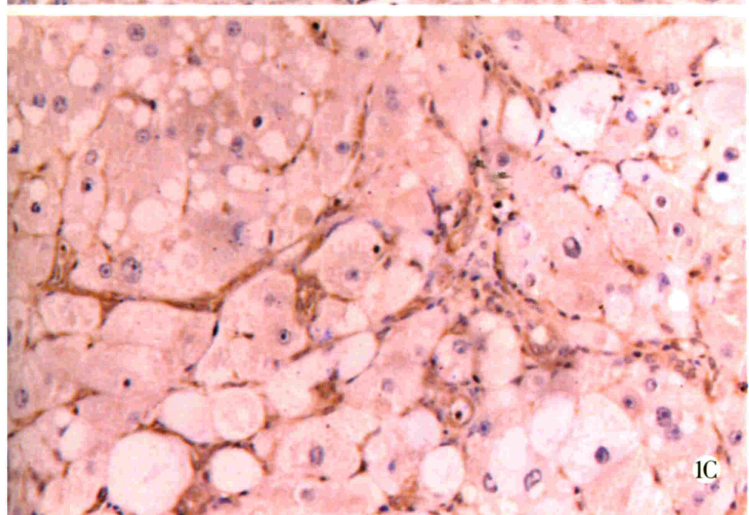
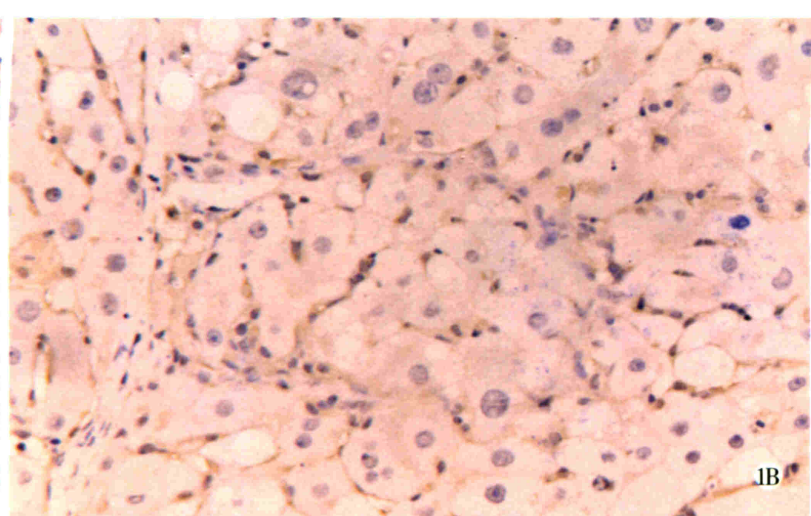
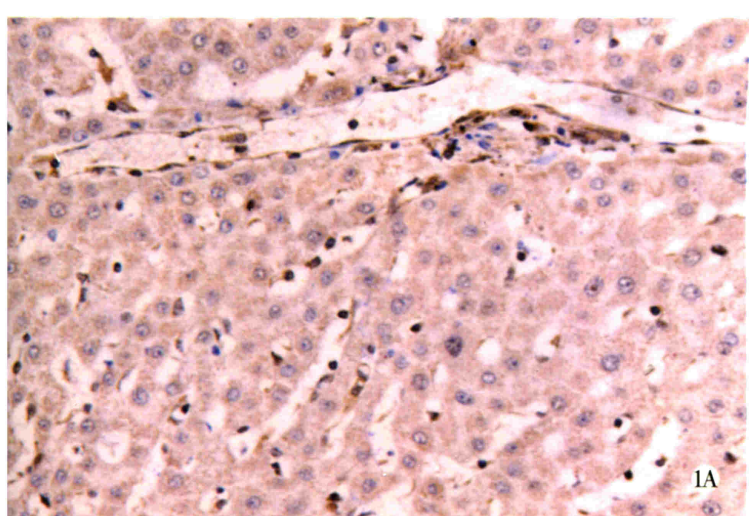


世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 6 月 15 日 第 11 卷 第 6 期 (Volume 11 Number 6)



6/2003

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 6 月 15 日 第 11 卷 第 6 期 (总第 110 期)

述 评

689 肝脏胶原蛋白检测进展与评析 刘成海

病毒性肝炎

693 甲型肝炎减毒活疫苗(LA-1 株)大规模免疫长期效果观察 龚健,李荣成,徐志一,江世平,罗东,杨进业,李艳萍,陈修荣,黄贵彪,凌文武,韦光武,汪莹怡

697 HCV-Fc 融合基因疫苗真核表达载体的构建及表达 冯志华,王全楚,周永兴,郝春秋,聂青和

701 胸腺肽 $\alpha 1$ 对慢性乙型肝炎患者免疫系统的影响 段国荣,聂青和,周永兴,王全楚,田长印,刘拉羊,薛红安

705 蛋白激酶 C 对肾小球前小动脉平滑肌细胞 I 型 IP_3 受体表达影响 王静艳,刘沛,韩峰

肝 癌

708 抗肝癌单链免疫毒素基因修饰的 PBMCs 在动物体内的抑瘤作用 程虹,刘彦仿,张惠中,沈万安,张菊,张静

712 经皮穿刺氩氦刀冷冻治疗肝癌 31 例 钱国军,陈汉,吴孟超

716 大鼠肝细胞癌形成过程中 MMP-2mRNA 的表达及应用 BB-94 的影响 张志,方石岗,高毅,蒋泽生,孙尔维

基 础 研 究

719 西安酒精性肝病流行病学 鲁晓岚,陶明,罗金燕,耿燕,赵平,赵红莉

723 蛋白激酶 C 在肝细胞缺氧预处理中的作用 单毓强,高毅,王瑜,潘明新

726 肝硬化不同病期 ET-1, NO 对离体肝脏血流动力学的调节作用 姚冬梅,姚希贤,杨川杰,冯志杰,房红梅,高军萍

730 大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用 梁增文,张国,王天才

733 环氧合酶-2 反义核酸对人胆管癌细胞增生的影响 吴高松,武小勇,邹声泉,裘法祖

737 ONO-3403 对胆囊收缩素刺激的大鼠胰腺外分泌的影响 陈少夫,刘维新,山本光胜,大槻真

741 内皮抑素-可溶性血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒的包装与鉴定 李喆,潘欣,潘卫,曹贵松,闻兆章,方国恩,戚中田,毕建威,华积德

745 激活素 A 对肝星状细胞细胞外基质合成的影响 刘清华,李定国,黄新,尤汉宁,潘勤,徐雷鸣,徐芹芳,陆汉明

749 脾静脉结扎诱导继发性脾功能亢进犬动物模型的评价 刘全达,马宽生,何振平,丁钧,董家鸿

753 IL-6 与整合素家族细胞黏附分子在大鼠急性坏死性胰腺炎合并多器官损伤模型中的表达 孙威,张俊东,赵滢,赵宇,王强

临 床 研 究

756 老年消化道多原发癌的早期诊断及综合治疗 蔡昌豪,吴本伊,吴道宏,邵勇,王孟薇

焦 点 论 坛

760 进一步深化慢性乙型肝炎诊断治疗的实用性研究 李梦东,聂青和

762 慢性乙型肝炎临床分度、诊断的一些问题 周永兴

766 慢性乙型肝炎的鉴别诊断及常见并发症 聂青和

768 特殊人群乙型肝炎的临床特点及处理 罗新栋,聂青和

772 病理学检测在慢性乙型肝炎诊断治疗中的价值 郎振为

775 经皮肝脏活体穿刺活检技巧及研究进展 滕光菊,聂青和

776 乙型肝炎的实验检查及其临床意义 郝春秋,聂青和

780 慢性乙型肝炎的抗病毒治疗 程明亮,吴亚云

783 慢性乙型肝炎的免疫治疗 施光峰

785 慢性乙型肝炎的中医药治疗 申德林,王全楚,焦栓林

787 乙型肝炎病毒携带者的诊断与治疗 江家骥,朱琪

789 慢性乙型肝炎肝纤维化的诊断与治疗 蔡卫民,张彬彬

791 乙型肝炎病毒慢性感染和肝癌发生 苏勤

795 治疗性疫苗-慢性乙型肝炎患者的希望 王全楚,聂青和

文 献 综 述

799 抗乙型肝炎病毒肝靶向药物制剂的研究进展 王九平,白雪帆

803 腺病毒载体的特点及其在 HCV 研究中的应用 郝春秋,冯志华,聂青和

806 HCVC 区 DNA 疫苗的研究现状 孙利,周永兴

810 病毒性肝炎基因治疗的研究和面临的挑战 贾战生,冯志华,周永兴

文献综述	815 抗 HCV 树突状细胞疫苗的制备及功能研究 王全楚,冯志华,周永兴 819 疫苗新概念及新型疫苗的研制 冯志华,王全楚 823 特殊状态下的逆行胰胆管造影检查术 智发朝 824 胃肠道出血的内镜诊治 陈村龙,宋于刚,周殿元 827 介入内镜学在胆胰疾病中的应用 刘思德 829 老年期消化性溃疡与恶性肿瘤溃疡、应激性溃疡的鉴别 吴保平,肖冰 831 老年人消化道急症 黄纯炽
研究快报	834 肠癌细胞 BAI1 基因表达的检测及其抗肿瘤作用 王志华,康熙雄,张智清,申宝忠,李莹 836 三氧化二砷对鸡胚移植胆管癌生长的抑制作用 喻智勇,王曙光,郑秀海,李昆 838 小鼠实验性肝损伤中 NO 的动态检测及意义 陈会松,柳利明,黄华,杨晋辉
临床经验	841 结肠黑变病 25 例 孙军,李岩 842 保留胰腺的脾动脉干及脾切除术在胃癌根治术中的意义 陈志新,胡建昆,张波,陈佳平,周总光 844 萎缩性胃炎临床证型分类研究 朱方石,姒健敏,王良静 846 叶酸对胃癌前细胞凋亡的影响 曹大中,刘顺英,赵建学 848 短肠综合征的远期并发症 4 例 周伟,江志伟,姜军,朱维铭,张佃良,李宁,黎介寿 851 幽门螺杆菌感染与慢性肝病的临床关系 焦建中,聂青和,赵春林,吴永胜,文绍先,吴群 853 内支架术与腔内近距离放射治疗联合应用治疗晚期食管癌 8 例 申宝忠,于友涛 855 组织黏合剂 Histoacryl 治疗胃静脉曲张活动性出血的疗效 曾黎明,陈村龙,智发朝 856 肝病患者血清肿瘤坏死因子 α 水平变化 徐学刚,张美稀,董惠芳,杨协珍,金树根,陈建杰,王灵台 859 尼美舒利引起肝脏损害 14 例 关英,徐峰,胡莲,周甘平 861 脾脏体积、脾静脉血流及血细胞计数在门静脉高压症分期中的意义 王秀艳,游晚功,施宝民,穆庆岭,吴泰璜 863 大连地区糖尿病患者与健康成年人肠内菌群的比较 孙艳,刘波,赵静玫,王海岩,徐和利,李雪松 865 影像学检查对肝门部胆管癌进展范围评价的临床价值 张国梁,韦斌,朱春兰,任旭 867 分离培养在 Hp 感染诊断中的重要地位 史济经,闵海阳,王青,杨慧芳,王洪涛,张振华 870 HBV 感染者 HBV DNA 与抗原抗体标志物的关系 陈雪娟,李刚,刘淑芳,陈文思,李桂侠 871 乙型肝炎肝组织中细胞间黏附分子-1 及 Fas 的表达及意义 张闯峰,郑瑞丹,孟家榕,郭以河,林福地 873 轮状病毒全身感染对肝胆胰的影响 姚英氏,李宁,欧巧群 877 良性肝病患者血清 AFP 升高的临床意义 程天霞 875 胆源性胰腺炎手术治疗 58 例 黄建勇,马清涌,马建新 879 经皮肝穿刺胆道引流治疗外伤后胆瘘 汪邵平,霍枫,张玉新,裴世强
病例报告	840 以肠梗阻为首表现的原发性小肠肿瘤 4 例 赵永玲,魏芳
编委来信	707 711 江学良
投稿细则	附 1-4 世界华人消化杂志投稿细则
封面故事	730 大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用 梁增文,张国,王天才

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

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2003-06-15
原刊名 新消化病学杂志

总顾问 陈可冀
黄象谦
黄志强
黎介寿
刘耕陶
裘法祖
汤钊猷
王宝恩
危北海
吴孟超
吴咸中

张金哲
张学庸
赵东海
周殿元
社长总编辑 马连生
中文编辑 潘伯荣
王瑾晖
英文编辑 张建中
排 版 李少华
校 对 李天华

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:wcjd@wjgnet.com
出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市 2345 信箱
E-mail: wcjd @ 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(PJ)》
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录数据库
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 每期 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证
1401004000050

肝脏胶原蛋白检测进展与评析

刘成海

刘成海,上海中医药大学肝病研究所上海市曙光医院 上海市 200032
刘成海博士,上海中医药大学肝病研究所暨上海市曙光医院研究员. 主要从事
肝纤维化的基础与临床研究,第一与通讯作者发表论文29篇,出版专著7本,获
得奖励5次.

项目负责人:刘成海,200032,上海市零陵路530号,上海中医药大学肝病研究
所上海市曙光医院. chenghailiu@hotmail.com
电话:021-54231109 传真:021-64036889
收稿日期:2002-09-20 接受日期:2002-11-29

摘要

胶原含量多少可以直接反映肝脏纤维化程度之轻重,胶原蛋白含量测定在肝纤维化机制与药理研究中极其重要,往往是结果分析的“终点指标”. 综述肝脏胶原蛋白的生化与病理检测方法,结合个人实践体会,分析其各种不同方法的特点及适应范围. 认为肝组织胶原蛋白以羟脯氨酸含量检测可靠,培养细胞总胶原分泌宜采用同位素掺入与胶原酶消化的方法,各型胶原分泌量可采用ELISA法,各型胶原沉积量可采用Western blot法. 肝组织与培养细胞胶原病理染色,主要用于胶原蛋白定性分析与表达位置检测,正确应用图像分析可半定量.

刘成海. 肝脏胶原蛋白检测进展与评析. 世界华人消化杂志 2003;11(6):689-692
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/689.asp>

0 引言

胶原是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要蛋白质成分,约占机体总蛋白的25%^[1]. 多细胞器官中的多数细胞均与ECM大分子密切联系,ECM不仅为细胞提供结构支架,而且也是重要的信号调节分子,能调控细胞的生长、代谢与分化. 肝脏中胶原含量丰富,对肝细胞的分化、肝小叶结构与功能的维持等有重要影响. 慢性肝炎、肝硬化等慢性肝病均存在着以胶原为主的ECM增生沉积的病理变化,即肝纤维化. 研究表明^[2],肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)在肝损伤后,活化为“肌成纤维样细胞(myofibroblast like cell, MFB)”,大量合成与分泌间质性胶原等ECM,是肝纤维化的细胞学基础. 肝纤维化时,胶原等ECM成分的数量与分布位置均发生改变,表现为数量增加3-5倍,内皮下间隙(狄氏间隙)胞外基质成分从正常的低密度基底膜样基质向以纤维胶原为主的间质性胶原转变. 这种胶原的数量与分布的改变,明显影响肝脏的结构与功能. 因此,准确、合理分析肝脏胶原的含量变化,在肝纤维化机制研究与抗肝纤维化药物评价中均有重要意义. 但是,胶原类型较多,结构稳定,多难溶于水,一般化学方法不易区分,迄今国内外尚未见稳定的试剂盒. 本文

就常用的肝脏胶原分析方法简要归纳,并就各自特点与优缺点评述于下.

1 肝脏胶原的种类与结构特征

迄今已确定了19种不同基因的胶原类型^[1,2],以发现先后的时间顺序、冠以罗马字母命名. 胶原的分子结构特征是由3条左手螺旋 α 肽链绞合成右手旋转的超三螺旋. 胶原既可由相同的3条 α 链组成,如III型胶原由3条 $\alpha 1(III)$ 链组成 $[\alpha 1(III)]_3$,也可由不同的 α 链组成,如I型胶原由2条 $\alpha 1(I)_2$ 1条 $\alpha 2(I)$ 链组成 $[\alpha 1(I)_2\alpha 2(I)]$. 尽管不同类型胶原的 α 链是特定基因的表达产物,但其一级结构均为“Gly-X-Y”(X多为Pro, Y多为Hyp). “羟化”是胶原蛋白转录后的修饰特点,通过脯氨酸或赖氨酸羟化酶使脯氨酸或赖氨酸残基加上羟基. 羟脯氨酸羟基通过分子间氢键起稳定胶原螺旋结构的作用;羟赖氨酸羟基则提供糖类分子的附着位点,并在胶原分泌至胞外后,通过赖氨酸氧化酶在羟赖氨酸、赖氨酸之间醛基缩合,发挥稳定胶原分子间交连的作用. 间质性胶原成纤维索状,具有弹性与韧性,多起维持组织结构作用;基底膜胶原多为筛状,具有过滤功能.

肝脏中主要有5类胶原^[3],间质性胶原包括I, III, V, VI等,基底膜胶原有IV型胶原. 正常人肝脏胶原约占肝重的2%,肝硬化时上升至8-10%. 正常人肝脏胶原中I, III, IV, V, VI型胶原含量分别为42.5%、39.5%、6.9%、10.6%与0.6%,肝硬化时分别为56.5%、28.0%、5.5%、9.6%与0.5%,以I型胶原显著增加为特征. 位置分布上,I、III型等间质胶原多分布于汇管区与大血管区,IV型胶原主要分布于肝窦狄氏间隙. 肝脏慢性损伤时,I型胶原显著增多,使正常肝内I/III型胶原比例倒置,取代狄氏间隙的IV胶原,导致肝窦毛细血管化与肝纤维化.

2 肝组织羟脯氨酸含量测定法

羟脯氨酸是肝脏胶原蛋白所特有的氨基酸,因此测定羟脯氨酸含量,可明确胶原总体水平. 该方法是分析组织胶原水平的标准方法,有水解、衍生与检测等3个过程. 水解,即在组织蛋白质样品中加入浓盐酸(6 mol/L),真空状态下高温(105℃左右)反应18-24 h,将胶原的一级结构破坏,使蛋白质分解为氨基酸,而后将水解液烘干,蒸发掉盐酸. 水解的完全与否,对羟脯氨酸测定结果影响很大. 但该方法较为烦琐,且酸雾对烘箱等设备有腐蚀影响. 1982年Stein提出气相水解法^[4],而后

Waters 公司推出了商品化仪器 - 气相水解工作台, 其基本过程是将 100-500 pM 的蛋白质或多肽样品置于水解试管中冷冻抽干, 在水解反应器中加入 200 μ l 浓盐酸与 2 % 苯酚, 然后将反应试管转移到反应器中抽真空 110 $^{\circ}$ C 反应 22 h. 该改进方法无需烘干, 并可减轻腐蚀与提高工作效率.

衍生, 即水解液与同其他化合物反应生产有颜色的化合物. 其原理是基于酸性水解液中 4-羟脯氨酸经氯铵 T 氧化, 而后与欧氏溶液 [25 % (w/v) 对二甲氨基甲苯、27.3 % (v/v) 高氯酸的异丙醇溶液] 反应生成吡咯样物质. 通过高效液相色谱 (high performance liquid chromatography) 或分光光度计比色, 可检测其水解液中羟脯氨酸的含量. 检测主要是化学比色法, 除分光光度计外, 无需其他特殊设备与技术, 简单易行. 1950 年代建立, 后在 1980 年代经 Jamall et al [5] 改良, 更为简便可靠, 是常用的方法. 羟脯氨酸与反应产物吡咯正相关, 通过测定反应液中吡咯在最大吸收峰 ($\lambda_{\max 560}$) 处的吸光度 (A) 值, 并通过羟脯氨酸标准品建立外标准, 即羟脯氨酸与最终反应产物吸光度值的直线回归方程, 可计算出样品的 4-羟脯氨酸含量. 外标准中羟脯氨酸与吡咯吸光度呈良好的线性关系, 显著正相关, 我们多次实验均得到很好的重复性结果, 图 1.

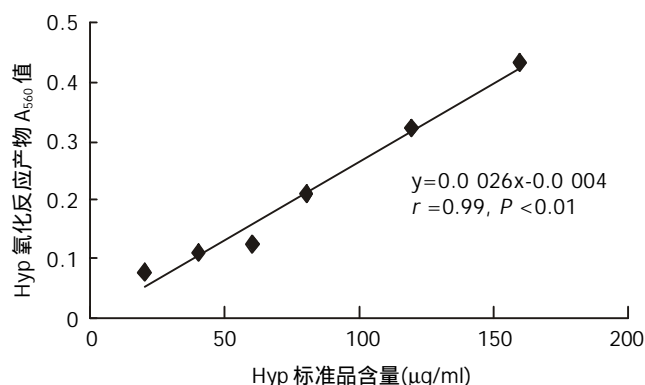


图 1 羟脯氨酸标准品与最终反应产物吸光度值的直线相关回归.

Jamall 要求羟脯氨酸标准品新鲜配置, 但我们发现 50 % 异丙醇溶解的标准品溶液 4 $^{\circ}$ C 放置过夜后溶解性与灵敏性更好, 而且相当稳定, 超过半年仍可很好的重复使用. 我们采用化学比色法检测正常肝脏组织羟脯氨酸含量大致为 (203 \pm 60) μ g/g 肝组织, 二甲氨基脲纤维化大鼠中含量为 (370 \pm 66) μ g/g 肝组织 [6,7], 四氯化碳纤维化大鼠中含量为 (241 \pm 48) μ g/g 肝组织 [8]. 但是化学比色法灵敏度较低, 只可检测到 1 μ g (7.6 nmol) 以上的 4-羟脯氨酸, 多适用于胶原丰富的肝组织大样品, 不宜于细胞培养小样品. 此外, 不能区分测定羟脯氨酸的同源异构体 - 3-羟脯氨酸. 而后发展改进的高效液相色谱法则弥补了这些缺点 [9], 可较好地测定 3-羟脯氨酸与 4-羟脯氨酸, 并将测量水平提高到 pmol 级. 但是其需要特殊的 HPLC 设备与技术. 此外, 虽然两种脯氨酸含量测定方法, 无需同位素标记, 可方便较好的检

测肝组织胶原总体水平, 但是均需水解反应, 其强酸条件较为苛刻, 时间较长; 也无法区别不同类型的胶原含量.

3 同位素标记脯氨酸掺入与胶原酶消化法测定胶原生成率 胶原蛋白的翻译需要大量脯氨酸, 部分脯氨酸成为前胶原肽链的组成成分, 并经羟化修饰为羟脯氨酸. 因此, 通过脯氨酸掺入可了解胶原生成情况. 脯氨酸广泛存在于许多蛋白质中, 非为胶原蛋白所特有, 仅仅脯氨酸掺入并不能代表细胞的胶原生成 [10]. 纯化的胶原酶可特异性切割胶原蛋白 (-Pro-X ↓ -Gly-pro-, 箭头所指为酶切部位), 使之降解为小片段. 因此, 可首先通过同位素标记的脯氨酸掺入, 获得新生成的脯氨酸标记的总蛋白量 (同位素掺入量); 而后通过胶原酶的特异降解, 区分胶原与非胶原蛋白. 通过计算胶原酶敏感蛋白即胶原蛋白在总蛋白的百分比, 即可测出细胞内的胶原合成率与细胞外胶原分泌率. 大致步骤与方法如下.

3.1 [3 H]Pro 掺入 前胶原 α 肽链在胞内翻译后, 有一系列翻译后修饰, 其中之一是在脯氨酸 - 4-羟化酶 (prolyl-4-hydroxylase, P4H) 催化下, 在 Pro 残基的 4 位 C 原子上进行羟化. 该羟化酶有 2 个 α 亚基与 2 个 β 亚基组成, 其活性需 Fe^{2+} , α -酮戊二酸与抗坏血酸等参与. 常规的掺入反应为: 含 1-5 % 胎牛血清的 Duplecco 改良培养液 (duplecco's modified eagle's medium, DMEM), 5-20 mCi [2, 3- 3 H]-Pro, 50 μ g/ml 的抗坏血酸, 温育细胞 24 h. 其中抗坏血酸有抗氧化作用, 保持 Fe^{2+} 在还原状态; 3 H 较 ^{35}S 半衰期长, 处理容易, 故多采用. 此外, 为防止非同位素标记 Pro 的竞争掺入, 提高 [3 H]Pro 掺入效率, 细胞培养液采用缺乏 Pro 的 DMEM.

3.2 胶原酶消化与测定 掺入后, 所收集的样本 - 无论培养上清还是细胞层蛋白, 均包括未掺入细胞的游离 [3 H]Pro 与 [3 H]Pro 掺入的总蛋白, 而该掺入总蛋白包括非胶原蛋白与胶原蛋白. 因此, 去除游离 [3 H]Pro 的影响与区分非胶原蛋白, 是测定胶原生成率的关键. 非胶原蛋白可通过胶原酶消化而区分, 而去除游离 [3 H]Pro 大致有以下 2 种方法. (1) 透析后消化法: 透析去除游离 [3 H]Pro, 而后将样本进行消化 [5] (图 2). 透析一般是将样本置于透析袋, 经 25 mM Tris-HCl pH 7.4 与 50 mM 乙酰马来醛透析液, 4 $^{\circ}$ C 下透析 3-4 d, 每天更换透析液, 直至透析液中放射性降至本底水平. 乙酰马来醛为蛋白酶抑制剂, 可防止样本蛋白的非特异降解. 透析后, 蛋白样本等分为 3:1 份不消化, 直接测定总蛋白含量; 1 份加入胶原酶、 CaCl_2 (胶原酶激活剂) 与乙酰马来醛等, 37 $^{\circ}$ C 下反应 2 h, 以裂解胶原蛋白; 1 份为空白对照, 消化反应中时不加胶原酶. 后 2 份经三氯醋酸沉淀与离心, 分离未被酶消化的非胶原蛋白, 离心上清即为胶原蛋白. 分别计数总蛋白的每分钟脉冲数 (counts per minute, cpm)、胶原蛋白 (cpm_c) 与空白对照 (cpm_b) 的放射性, 即可算出胶原生成率 (公式 1). 我们采用此法测

定传一代培养肝星状细胞的胶原生成率, 分别为细胞内 0.8-1.2%、细胞外 2.5-4%。而总蛋白中胶原蛋白的 [^3H]Pro 掺入量分别为细胞内 7.9%、细胞外 12.8% 左右^[11]。该方法无需对消化后沉淀的非胶原蛋白溶解与测定, 但是消化前的透析较烦琐, 时间较长, 重复性欠佳。

$$\text{胶原生成率} = \frac{100}{5.4 \times (\text{cpm}_i - \text{cpm}_e) \div (\text{cpm}_e - \text{cpm}_0) + 1} \quad (\text{公式 1})$$



图2 透析法消化法测定细胞胶原生成率流程图。

(2)直接消化法^[12]: 不透析, 将样本等份为 2: 1 份不加胶原酶, 为空白对照; 另一份加胶原酶消化。而后经三氯醋酸沉淀, 离心, 分别取上清与溶解的沉淀物, 测定每分钟衰变率(disintegration, dpm)图 3。胶原绝对含量以空白管与胶原酶消化管沉淀物的数值计算。胶原的生成率以胶原酶消化管的上清与沉淀物放射活性计算, 公式 2。该方法无需透析, 简易方便, 费时较短, 但是需要溶解沉淀的非胶原蛋白, 一般溶剂难以溶解, 可采用 Packard 公司的 Soluene 350 溶剂。两种方法均不受接种细胞数量的影响, 可较好的反映细胞胶原生成情况, 但不适于整体动物体内与临床患者的胶原生成量分析。

$$\text{胶原含量} = \text{空白管沉淀物 dpm} - \text{胶原酶管沉淀物 dpm} \quad (\text{公式 2-1})$$

$$\text{胶原生成率} = \frac{(\text{上清 cpm} - \text{沉淀 cpm}) \div 5.4}{(\text{上清 cpm} - \text{沉淀 cpm}) \div 5.4 + \text{沉淀 cpm}} \quad (\text{公式 2-2})$$



图3 直接消化法测定细胞胶原生成率流程图。

4 专一抗体结合、免疫反应法测定不同类型胶原含量

4.1 免疫印迹法(western blot) 于培养细胞, 蛋白可分为上清蛋白、细胞蛋白(包括胞膜蛋白、胞质蛋白与核蛋白)、基质蛋白等多种, 图 4。因此根据蛋白样品的来源不同, 可以分别分析胶原分泌、细胞内胶原合成或细胞外胶原沉积量等。即若采用培养上清, 则为分泌量; 若采用细胞粗提物, 则为细胞内生成量; 若采用培养器皿上沉积蛋白, 则为胶原沉积量。蛋白样品制备后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 使蛋白质因分子量大小而区分; 将凝胶转移到硝酸纤维素等膜上, 脱脂奶粉或牛血清蛋白封闭后, 经特异性胶原抗体(如 I 型胶原抗体)孵育结合, 洗涤未结合的抗体, 而后与偶联 HRP 或 AKP 酶的抗抗体结合, 经化学显色, X 片曝光。通过分子量位置可确定胶片上胶原蛋白表达条带。此法定性与定量相结合, 特异性高, 灵敏度好, 结果直观明了。且可通过标准分子量蛋白比较定位, 区分胶原蛋

白的不同亚型。蛋白表达量既可肉眼直观判断, 也可计算机图像分析扫描, 由于图片为黑白方式, 条带较规则, 无需二值分割, 采用图像分析软件即可较好分析蛋白表达量。并且可设立严格的内参照, 排除样本上样量与转移效率等因素的影响, 即洗脱该膜胶原抗体后, 用“看家蛋白”抗体(如 β -actin, β -tubulin, HSP-70 等)在同一张膜上连续免疫结合呈色。图 5 为用该法检测原代培养肝星状细胞的细胞内 I 型胶原蛋白表达。但 western blot 方法需要一定的设备与技术。

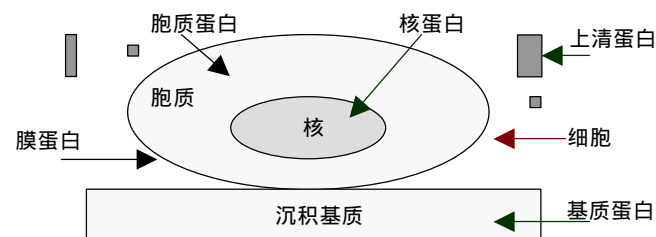


图4 培养细胞蛋白种类。贴壁细胞分泌蛋白于培养上清(可溶性上清蛋白), 分泌并沉积蛋白于培养皿上(不溶性基质蛋白), 细胞自身蛋白(胞膜蛋白、胞质蛋白与核蛋白等)。

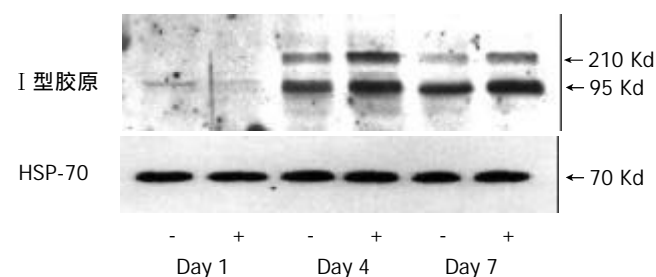


图5 western blot 法分析原代培养肝星状细胞 I 型胶原蛋白表达。肝星状细胞分别培养 1 d、4 d、7 d, 给予 100 pmol/L TGF- β 1 刺激(+), 提取细胞裂解液, 经 8% SDS-PAGE 电泳, 硝酸纤维素膜转移, I 型胶原及 HPS70 抗体 western blot 分析。

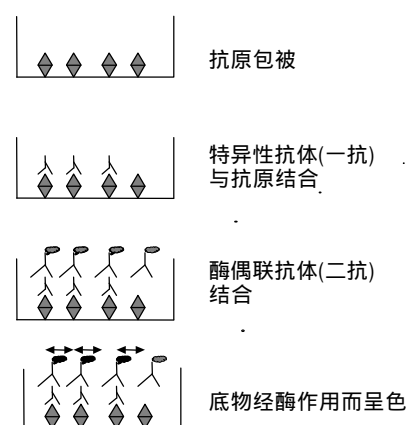


图6 ELISA 法检测胶原示意图。

4.2 酶联免疫测定法(ELISA) 此法原理亦为免疫结合。将目的胶原样本作为抗原包被于 96 孔板上, 与抗体结合, 再与 HRP 或 AKP 酶偶联的抗体结合, 经化学显色反应, 酶标仪读取吸光度值。由于抗体-抗原抗体复合物-酶-底物显色之间有正相关关系, 故检测显色底物的吸光度值, 即可测知抗原(胶原)的相对含量^[13]图 6。通过一定浓度梯度稀释胶原标准品建立外标准, 计算出

胶原含量与最终显色产物之间的直线回归方程,以此方程及样本反应的吸光度值,即可计算出样本胶原的浓度.该方法适合于体外细胞实验,同样具有灵敏、特异的优点,可以分析细胞上清或细胞内各型胶原的分泌量或合成量,并且经细胞总蛋白或DNA浓度校正,可以排除细胞数量的影响^[14].缺点是每一步都需洗涤,过程较长;不适于组织标本;样本的包被主要是物理结合,不同材料间重复性较差.

5 病理胶原染色、彩色图像分析法半定量原位分析总胶原与不同类型胶原的含量

既往病理组织化学与免疫组织化学观察多应用于定性研究,随着形态定量方法的发展和计算机技术的普及,图像分析仪器的广泛应用,生物形态学向定量研究发展.图像分析方法大致为:首先将显微镜下的组织染色图像通过摄像头与图像采集卡录入计算机.其次是在计算上选取所要分析的目标,因免疫组化染色蛋白呈一定颜色,且因背景染色或衬染,周围组织有不同颜色着色,因此需要设定色彩的上下限阈值,二值分割,将目标蛋白质“伪彩色”,使之成为计算机识别.而后自动计算所识别对象的面积、灰度等参数值,从而半定量组织目标蛋白的含量.该方法简便易行、自动化程度高,非常适合于临床肝组织等难以进行生化分析的小样组织标本,随胶原染色方法的不同,可以分别分析总胶原或各种不同类型的胶原含量.目前用于图像分析的常见胶原病理染色方法有:(1)丽春红总胶原染色,常规显微镜镜头下观察总胶原的变化;(2)天狼猩红染色,偏振光下分别观察I、III型胶原的变化,一般I型胶原呈黄红色,III型胶原呈绿色;(3)通过各种特异胶原抗体进行肝脏组织免疫组化染色,分别观察各种不同型别胶原的变化.

这三种方法共同存在着随机取样时的抽样误差与二值分割时的背景干扰.抽样误差包括组织取材部位,图像采集视野等^[15].而图像二值分割时,目标染色蛋白区域的选取往往较大程度上受组织片背景的亮度强弱与颜色深浅,组织片本身染色的深浅,及其设定选取颜色范围的上限与下限等多种因素影响,所测光密度值也往往随之有较大范围波动.此外需要指出的是,天狼猩红染色+偏振光观察以区分I、III型胶原的方法目前有许多争议.Junqueira et al^[16]于1978年采用该方法,发现I型胶原呈黄色、桔黄或红色,III型胶原呈绿色.Nicoletti et al^[17]证实了该发现,我国也有学者采用该方法以鉴别I、III型胶原^[18,19].但是Junqueira et al^[20]在其后的文章强调了该方法对于胶原染色特异性,没再提及鉴别胶原性质;而Pierard et al发现该方法主要反应总胶原含量,而不能区分胶原型别^[21,22].然而,无论何种病理染色方法,主要在于反应胶原的分布位置与性质;图像分析的干扰因素较多,严格控制条件排除干扰,可进行半定量,可靠的定量分析仍需采用生化方法.

总之,胶原含量多少可以直接反映肝纤维化程度之轻重,其蛋白含量测定在肝纤维化研究中极其重要,往往是“终点指标”(endpoint).在实际应用中,应根据具体情况与目标,选择合适的方法.

致谢:承蒙上海中医药大学肝病研究所徐列明研究员与顾宏图助理研究员提供部分材料与宝贵意见,特此致谢!

6 参考文献

- 1 查锡良,胶原,陈惠黎.生物大分子的结构和功能.上海:上海医科大学出版社,1999:113-123
- 2 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250
- 3 Aycock RS, Seyer JM. Collagens of normal and cirrhotic human liver. *Conn Tis R* 1989;23:19-31
- 4 Meltzer NM, Tous GI, Gruber S, Stein S. Gas-phase hydrolysis of proteins and peptides. *Anal Biochem* 1987;160:356-361
- 5 Jamall IS, Fiinelli VN, Que Hee SS. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem* 1981;112:70-75
- 6 刘成海,陈文惠,王臻楠,胡义扬,刘成.二甲基亚硝胺致大鼠直脂质过氧化变化与药物干预作用. *中华肝脏病杂志* 2001;9(Suppl 7):18-20
- 7 陈文惠,刘平,徐光福,陆雄,熊卫国,李风华,刘成海.脂质过氧化在二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化形成过程中作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:645-648
- 8 胡义扬,刘平,刘成,顾宏图,徐列明,刘成海,季光.丹参提取物对CCl₄和DMN诱导大鼠肝纤维化的影响. *上海中医药杂志* 1999;10:7-10
- 9 Lindblad W, Diegelmann RF. Quantitation of hydroxyproline isomers in acid hydrolysates by high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 1984;138:390-395
- 10 徐列明.脯氨酸掺入不代表细胞的胶原合成. *中华消化杂志* 1995;15:272
- 11 刘成海,刘成,刘平,徐列明.扶正化瘀复方药物血清对大鼠肝贮脂细胞增生及胶原合成的影响. *中国实验方剂学杂志* 1996;6:20-23
- 12 Eickelberg O, Kohler E, Reichenberger F, Bertschin S, Woodtli T, Erne P, Perruchoud AP, Roth M. Extracellular matrix deposition by primary human lung fibroblasts in response to TGFβ1 and TGFβ3. *Am J Physiol* 1999;276:L814-824
- 13 Rennard SI, Berg R, Martin GR, Foidart JM, Robey PG. Enzyme linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. *Anal Biochem* 1980;104:205-214
- 14 刘成海,王晓玲,刘平,刘成,谭英姿,顾宏图.扶正化瘀319方药物血清对肝星状细胞I型胶原及转化生长β1表达的影响. *中国中西医结合杂志* 1999;19:412-414
- 15 申洪.病理形态定量研究中几个问题讨论. *临床与实验病理* 1993;9:78-81
- 16 Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differebtial staining of collagen type I, II and III by sirus red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn* 1978;41:267-274
- 17 Nicoletti A, Heudes D, Hinglais N, Appay MD, Philippe M, Sassy-Prigen C, Bariety J, Michel JB. Left ventricular fibrosis in renovascular hypertension rats. *Hypertension* 1995;26:101-111
- 18 张晶,何静雯,王泰龄,赵静波.苦味酸天狼猩红偏振光法鉴别I型及III型胶原纤维. *中华病理杂志* 1996;25:180-181
- 19 陈宇蒙,陈丹,王彤海,李玉瑞.苦味酸天狼猩红和偏振光法对实验性矽肺胶原纤维的研究. *中华病理杂志* 1993;22:53-54
- 20 Junqueira LC, Bionolas G, Brentani R. Picosirus staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447-455
- 21 Pierard GE. Sirius red polarization method is useful to visualize the organization of connective tissue but not the molecular composition of their fibrous polymers. *Matrix* 1989;9:68-71
- 22 James J, Bosch KS, Zuyderhoudt FM, Houtkooper JM, VanGool J. Histophotometric estimation of volume density of collagen as an indication of fibrosis in rat liver. *Histochemistry* 1986;85:129-133

甲型肝炎减毒活疫苗(LA-1株)大规模免疫长期效果观察

龚健,李荣成,徐志一,江世平,罗东,杨进业,李艳萍,陈修荣,黄贵彪,凌文武,韦光武,汪萱怡

龚健,李荣成,杨进业,李艳萍,广西壮族自治区疾病预防控制中心
广西省南宁市 530021
徐志一,汪萱怡,复旦大学医学院流行病学教研室 上海市 200032
江世平,罗东,柳州市柳城县卫生防疫站 广西省柳州市 545001
陈修荣,隆安县卫生防疫站 广西省隆安县 532700
黄贵彪,梧州市卫生防疫站 广西省梧州市 543002
凌文武,田阳县卫生防疫站 广西省田阳县 533600
韦光武,宁明县卫生防疫站 广西省宁明县 532500
龚健,女,1960-02-24生,广西省贵港市人,汉族,1983年华中科技大学同济
医学院本科毕业,副主任医师。主要从事病毒性肝炎的预防控制研究。
国家“九五”攻关课题基金资助项目, No.96-906-03-01
项目负责人:徐志一,200032,上海市医学院路138号,复旦大学医学院流行病
学教研室。 xuzhiyi@plazal.snu.ac.kt
电话:021-64039691 传真:021-64039691
收稿日期:2002-07-04 接受日期:2002-08-09

Long-term immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated hepatitis A vaccine (LA-1 strain)

Jian Gong, Rong-Cheng Li, Zhi-Yi Xu, Shi-Ping Jiang, Dong Luo,
Jin-Ye Yang, Yan-Ping Li, Xiu-Rong Chen, Gui-Biao Huang,
Wen-Wu Ling, Guang-Wu Wei, Xuan-Yi Wang

Jian Gong, Rong-Cheng Li, Jin-Ye Yang, Yan-Ping Li, Guangxi Center
for Disease Prevention and Control, Nanning 530021, Guangxi Zhuang
Autonomous Region, China
Zhi-Yi Xu, Xuan-Yi Wang, Medical College, Fudan University, Shanghai
200032, China
Shi-Ping Jiang, Dong Luo, Liuzhou Anti-Epidemic & Hygiene Center,
Liuzhou 545001, Guangxi Province, China
Xiu-Rong Chen, Long-An Anti-Epidemic and Hygiene Center, Long-
An 532700, Guangxi Province, China
Gui-Biao Huang, Wuzhou. Anti-Epidemic and Hygiene Center,
Wuzhou 543002, Guangxi Province, China
Wen-Wu Ling, Tianyang Anti-Epidemic and Hygiene Center, Tianyang,
Guangxi Province, China
Guang-Wu Wei, Ningming Anti-Epidemic and Hygiene Center,
Ningming, Guangxi Province, China
Supported by the National Ninth-Five Project Of China, No. 96-906-03-01
Correspondence to: Prof. Zhi-Yi Xu, Medical College, Fudan University,
138 Yixueyuan Road, Shanghai 200032, China. xuzhiyi@plazal.snu.ac.kt
Received: 2002-07-04 Accepted: 2002-08-09

Abstract

AIM: To evaluate the long-term protective efficacy following a large scale immunization with a live attenuated hepatitis A vaccine (the LA-1 strain) and immune persistence of the vaccine with different immunization schedules.

METHODS: A randomized controlled double-blind study was conducted in 212 985 children between 1.5 and 10 years of age from 8 counties in Guangxi province (10 0735 in vaccine group and 112 250 in control group). Vaccine group was received one dose of HAV vaccine of 10^{6.75} TCID₅₀ (LA-1 strain, China). Surveillance of the incidence of hepatitis A in the two groups was started 1 month after vaccination. To evaluate the persistence of antibodies, 156 children of

6-9 years old with hepatitis A antibody negative were divided into 3 groups with equalities in age and sex. Group A was given one dose of the vaccine, Group B and C were immunized according to 0,6 and 0,12 schedules respectively. During follow-up of every individual, the blood specimens were collected at 6, 12, 24 and 36 months after immunization in Group A and 12, 24 and 36 months after first dose and 1 month after second dose in Group B and C. Anti-HAV levels were expressed as GMTs in mIU/ml by serial immunoglobulin dilutions (WHO standard) and HAVAB-Imx kit (Abbott Lab, USA).

RESULTS: During a follow-up for 36 months, 71 cases of symptomatic HAV infection were found in the control and 2 in the vaccine group (63.25/10⁶ vs 1.99/10⁶ respectively). The protective efficacy was estimated at 96.85 % with 95 % lower confidence limit of 92.4%. The antibody positive rate in Group A after 6-24 months was 88.6-91.4 %, the GMT was 105-106 mIU/ml, but each of those decreased to 80.0 % and 99.20 mIU/ml after 36 months. GMT reached to the top in Group B and C 1 month after the second dose, 1 024.63 mIU/ml and 3 463.21 mIU/ml respectively. But during the time from top GMT to 24th month, the GMT of Group B and C decreased rapidly to about 59.4 % and 83 % respectively, and it continually declined slowly at 36th month to 459.68 mIU/ml and 506.23 mIU/ml, which were 6 % and 15 % lower than that at 24th month. It showed that the antibody level in Group B and C after 2 doses were significantly higher than that in Group A from beginning to end, at 36th month the GMT of Group B and C were 4.6 times and 5.1 times to that of Group A, and the antibody positive rate (97 %) was higher than that of Group A (80 %) at the same time.

CONCLUSION: A single dose of live attenuated hepatitis A vaccine can come into being high and persistent protection against hepatitis A. Booster dose induces an immune response which persists for at least three years in 97 % of the subjects. The high GMT still present at month 36 predicts a long-term persistence of antibody.

Gong J, Li RC, Xu ZY, Jiang SP, Luo D, Yang JY, Li YP, Chen XR, Huang GB, Ling WW, Wei GW, Wang XY. Long-term immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated hepatitis A vaccine (LA-1 strain). Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(6):693-696

摘要

目的: 观察甲型肝炎减毒活疫苗(LA-1株)大规模接种的长期保护效果和不同免疫程序的免疫持久性。

方法: 212 985例1.5-10岁儿童随机分成疫苗组和对照组。疫苗组每人接种1针甲肝疫苗,接种1 mo后观察两组甲肝发病情况。6-9岁的甲肝抗体(抗HAV)阴性儿童156例按年龄和性别均衡分为A、B、C组, A组接种1剂疫苗, B组按0、6 mo、C组按0、12 mo程序分别接种2剂疫

苗, 然后随访各组抗 HAV 变化.

结果:甲型肝炎 3 a 累积发病率在对照组为 63.25/10 万(71/112 250), 疫苗组为 1.99/10 万(2/100 735), 保护率 96.85 % (95 %CI 下限为 92.44 %). A 组免疫后 6、12、24、36 mo 抗 HAV 阳性率分别为 91 %、89 %、89 %、80 %, 抗体几何平均滴度(GMT)分别为 106、105、106、99 mIU/ml; B 组 7、12、24、36 mo 的阳性率分别为 100 %、98 %、95 %、98 %, GMT 分别为 1204、773、489、459 mIU/ml, C 组 12、13、24、36 mo 的阳性率分别为 82 %、100 %、100 %、97 %, GMT 分别为 92、3 463、596、506 mIU/ml. B、C 组在第 36 个月的 GMT 分别是 A 组的 4.6 倍和 5.1 倍, 阳性率高于同期 A 组($P=0.008$).

结论:甲肝减毒活疫苗(LA-1株)1针免疫有高而持久的保护效果和免疫原性; 2针免疫可显著提高其免疫持久性; 0、6 程序与 0、12 程序的长期免疫效果相同.

龚健,李荣成,徐志一,江世平,罗东,杨进业,李艳萍,陈修荣,黄贵彪,凌文武,韦光武,汪萱怡. 甲型肝炎减毒活疫苗(LA-1株)大规模免疫长期效果观察. 世界华人消化杂志 2003;11(6):693-696

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/693.asp>

0 引言

我国是病毒性肝炎高流行区, 其中甲型肝炎病毒(HAV)感染居各型肝炎病毒之首^[1]. 甲型肝炎(简称甲肝)是儿童肝炎和肝炎暴发流行的主要型别^[2,3], 较长时期内预防甲肝的暴发或流行任务仍十分艰巨^[1]. 用甲型肝炎疫苗实施主动免疫已证明是预防和控制甲型肝炎的最有效手段^[4-10]. 我国研制的甲肝减毒活疫苗 LA-1 株在滴度达到 $10^{6.75}$ TCID₅₀ 时, 经大规模人群观察, 安全性、近期免疫原性和保护效果良好, 与国外甲肝灭活疫苗近期效果相似^[11]. 本文报告该疫苗在农村地区儿童中大规模接种的长期保护效果和不同免疫程序的免疫持久性, 为甲肝疫苗免疫策略的制订提供科学依据.

1 材料和方法

1.1 材料 广西农村人群中甲型肝炎感染率为 84 %, 感染上升速度最快年龄段在 1-5 岁. 本课题所在的 8 个县(市)甲肝年发病率 1991/1995 年 2-9 岁人群中约为 30/10 万-170/10 万, 对其中两个县 1-10 岁儿童 9 400 人免前血清学调查, 甲型肝炎易感率为 80-85 %.

1.2 方法

1.2.1 疫苗保护效果的研究 在柳城县和隆安县采用个体随机分组方法, 对 114 588 名 1.5-10 岁的儿童按个体出生月份单数或双数随机分成甲肝疫苗接种组(58 955 名)和对照组(55 633 名), 其中 7 316 名为经血清学筛选确定的甲肝易感(即血清抗 HAV-IgG 阴性)儿童: 接种组和对照组分别为 3 771 名和 3 545 名; 在田阳等 6 县(市)对 120 105 名 1.5-10 岁儿童不做免前筛选, 以行政村

或班级为单位, 按整群随机方法分成甲肝疫苗组(63 488 例)和对照组(56 617 例). 疫苗组每人接种 1 针甲肝疫苗. 儿童家长、现场的疫苗接种工作人员均不了解分组情况. 免后 1 mo 开始对两组的甲型肝炎发病情况随访 3 a. 凡有症状和/或体征、谷丙转氨酶(ALT)异常、抗 HAV-IgM 阳性者, 确诊为临床甲型肝炎病例.

1.2.2 不同免疫程序研究 在柳城县 1 个小学疫苗组中, 对血清抗 HAV-IgG 阴性的 156 名儿童分为 A、B、C 3 个组, 各组人数分别为 35、62、59 人, 平均年龄分别为 7.6 岁、6.6 岁、7.3 岁, 男女之比分别为 0.8:1、0.8:1、1.4:1. A 组接种 1 剂甲肝疫苗; B 组按 0、6 mo 程序, C 组按 0、12 mo 程序分别接种 2 剂甲肝疫苗. A 组于接种后 6 mo、12 mo、24 mo、36 mo, B 组和 C 组均在第 2 针接种后 1 mo、首针接种后 12 mo、24 mo、36 mo 定时人随访采血, 无菌分离血清, 冻存于 -20 °C, 空运至实验室检测血清甲肝抗体(抗 HAV-IgG). 检测工作均在 2 wk 内完成. 血清一般不反复冻融, 以保证标本中抗体滴度不因反复冻融而下降.

1.3 疫苗 疫苗为卫生部长春生物制品研究所生产的甲型肝炎减毒活疫苗 LA-1 株, 每剂含量 $10^{6.75}$ TCID₅₀. 接种部位在上臂皮下.

1.4 检测 免前用 ELISA 检测筛选抗 HAV-IgG, 试剂盒购自浙江省医科院. 免后随访血清抗 HAV-IgG 用 Abbott 公司的 IMx mEIA 试剂及相应的自动检测仪检测, 以同时检测的不同浓度 WHO 标准抗体单位制成标准曲线, 换算出每毫升血中抗体毫国际单位(mIU/ml). 疑似病例的抗 HAV-IgM 检测用上海实业科华生物技术有限公司的 ELISA 试剂盒.

2 结果

2.1 保护效果 观察 3 a, 在随访对象 234 693 人中, 共报告疑似病例 248 例, 经实验室确诊, 73 例为临床甲型肝炎病例. 其中对照组和疫苗组分别为 71 例和 2 例, 3 a 累积发病率分别为 63.25/10 万(71/112 250)和 1.63/10 万(2/122 443), 保护率 97.42 %, 95 %可信度下限为 93.4 %.

2.2 不同免疫程序的抗体水平 3 a 动态观察 A 组儿童在接种后 6-24 mo 的抗体阳性率和抗体几何平均滴度(GMT)基本维持在同一水平(88.6-91.4 % 和 105-106 mIU/ml), 第 36 个月时略有下降, 阳性率为 80.0 %, GMT 较第 24 个月下降 6 %, 为 99.20 mIU/ml(表 1).

表 1 甲型肝炎减毒活疫苗(LA-1株)1针免疫后 3 a 的抗体变化(A组)

免疫后(mo)	检测数	抗-HAV		抗-HAV GMT	
		阳性数	阳性率 %	mIU/ml	95 % CI
6	35	32	91.4	106.31	69.77-162.00
12	35	31	88.6	105.09	73.15-141.22
24	35	31	88.6	105.77	74.97-149.23
36	35	28	80.0	99.20	71.75-137.16

B组(0、6 mo 程序)和C组(0、12 mo 程序)的抗体均在第2针接种后1 mo 达到高峰, 然后各组 GMT 均呈先快后慢趋势下降, 第24个月, 分别比峰值下降了59.4%和83%,

第36个月较第24个月分别下降了6%和15%; 第36个月时B、C组的抗体水平趋于相同, 阳性率分别为97.6%和96.94%, GMT 分别为459.68 mIU/ml 和506.23 mIU/ml(表2).

表2 甲肝减毒活疫苗(LA-1株)2针免疫后3 a 的抗体变化(B组、C组)

免疫后时间(mo)	B组(0、6 mo 程序)					C组(0、12 mo 程序)				
	<i>n</i>	S	SP(%)	GMT(mIU/ml)	GMT95 %CI	<i>n</i>	S	SP(%)	GMT(mIU/ml)	GMT95 %CI
7-	55	55	100	1 204.63	876.48-1 655.65	-	-	-	-	-
12-	54	53	98.1	773.15	43.15-1 100.54	60	49	81.7	91.92	66.15-127.00
13-	-	-	-	-	-	31	31	100.0	3463.21	2561.0-4 683.26
24-	56	53	94.6	489.12	339.85-703.98	34	34	100.0	596.57	456.47-779.66
36-	41	40	97.6	459.68	306-688.86	32	31	96.9	506.23	337.15-760.11

表3 甲肝减毒活疫苗(LA-1株)不同免疫程序的抗体水平比较

		A组	B组	C组
程序		1针	2针(0、6)	2针(0、12)
峰值	阳性率(%)	91.4	100	100
	GMT(mIU/ml)	106.31	1 204.63	3 463.21
免后24 mo	阳性率(%)	88.6	94.6	100.0
	GMT(mIU/ml)	105.77	489.12	596.57
免后36 mo	阳性率(%)	80.0	97.6	96.9
	GMT(mIU/ml)	99.20	459.68	506.23

由表3可比较不同免疫程序的抗体水平. 抗体阳性率峰值在B、C组均为100%, A组高为91.4%; 在GMT峰值上, B组是A组的11.3倍, C组是A组的32.6倍、B组的2.9倍. 在第36个月, B组和C组的GMT虽然已较峰值显著下降, 但仍分别是A组的4.6倍和5.1倍, 抗体阳性率为97%左右, 也高于同期A组(80%, $\chi^2=7.11$, $P=0.008$).

3 讨论

实施甲肝疫苗接种是减少甲型肝炎发病的最有效手段^[12]. 国外甲肝灭活疫苗在泰国40 119例5-15岁儿童(易感率75%, 年发病率119/10万)中以随机对照方法观察3针免疫的保护效果, 随访5-10 mo, 保护率为97%(95%CI, 87-99%)^[13]; 在美国的甲型肝炎高流行区对儿童实施甲肝疫苗常规免疫6a, 疫苗保护率为98%(95%CI, 86-100%)^[14]. 国产甲肝减毒活疫苗(LA-1株)滴度为 $10^{5.5}$ TCID₅₀时, 在广西28 679例中小学生整群随机对照观察中, 1针免疫后第3年的保护率为78.8%^[15]. 由于疫苗的滴度对于疫苗的保护效果至关重要, 近年来我国规定甲肝减毒活疫苗应不低于 $10^{6.5}$ CCID₅₀^[16]. 本文在234 693例儿童中观察甲肝减毒活疫苗LA-1株在滴度达到 $10^{6.75}$ TCID₅₀后1针免疫的第3年保护率为97.42%(95%可信限下限93.4%), 显著高于滴度为 $10^{5.5}$ TCID₅₀时的3a保护效果^[15], 与国外的甲肝灭活疫苗的保护效果^[13,14]相似.

提示该疫苗滴度达到 $10^{6.75}$ TCID₅₀时, 可获得高而持久的保护效果.

疫苗对甲型肝炎控制的有效期限取决于疫苗所能提供的保护期限^[17], 而后者与疫苗刺激产生的抗体水平密切相关. 甲肝灭活疫苗1针免疫时, 产生的抗体水平仅能提供短时间的保护, 而2针免疫后刺激的高水平抗体水平可提供长期保护^[18]. 本文中, 甲肝减毒活疫苗接种2针后, 抗体GMT峰值达到1024mIU/ml(0、6 mo 程序组)和3463mIU/ml(0、12 mo 程序组), 与国外甲肝灭活疫苗2针免疫后达到的GMT峰值相当^[19-23], 第3年仍有97%的抗体阳性率和较高水平的抗体滴度, 预示着抗体有长期存在的可能. 尽管2针免疫诱导的抗体GMT达到峰值后会有大幅度回落, 但当他降至一定水平趋于稳定时, 抗体滴度在免疫后3a仍达到1针的5倍左右, 抗体阳性率(97%)也显著高于1针(80%). 提示2针免疫可显著提高甲肝减毒活疫苗的免疫持久性, 与国产甲肝减毒活疫苗H₂株观察结果一致^[24].

甲肝减毒活疫苗以不同程序进行2针免疫后, 所诱导的抗体水平在达到峰值后都呈先快后慢地下降, 与甲肝灭活疫苗以0、6 mo 和0、12 mo 程序免疫后的抗体滴度变化动态^[25-29]相同. 说明虽然减毒活疫苗和灭活疫苗的免疫机制不同, 但以相同免疫程序接种后, 二者的抗体水平变化趋势是相似的. 本文中疫苗1针免疫后抗体缓慢下降趋势则与刘景晔 et al^[30]在儿童中对该疫苗1针免疫后随访3a观察到的抗体动态趋势一致.

甲肝减毒活疫苗(LA-1株)以不同程序免疫2针后, 抗体GMT峰值在0 mo、12 mo 程序组显著高于0 mo、6 mo 程序组, 与Vidor et al^[31]对甲肝灭活疫苗的观察结果相同. 3a随访结果显示, 甲肝减毒活疫苗0 mo、6 mo 程序和0 mo、12 mo 程序免疫效果是一样的. 虽然抗体滴度峰值在0 mo、12 mo 程序组(3 463mIU/ml)显著高于0 mo、6 mo 程序组(1 024 mIU/ml), 但随着免疫年限延长, 两组抗体水平趋于接近, 随访36 mo, 抗体滴度已十分接近(459.68 mIU/ml 和506.23 mIU/ml), 抗体阳

性率亦如此(97.6 % 和 96.9 %). 说明甲肝减毒活疫苗(LA-1 株)以这两种免疫程序均可产生良好的长期免疫效果.

致谢:在此感谢李泰新、农艺、黄全诚、肖波、黄兆能、李可刚、莫宇文、黄月葵、韦增良、莫建军等对工作的支持和协作.

4 参考文献

- 戴志澄, 祁国明. 中国病毒性肝炎 - 血清流行病学调查(上卷)1992-1995. 第1版. 北京: 科学技术文献出版社, 1997:19-35
- Poovorawan Y, Chatchatee P, Chongsrisawat V. Epidemiology and prophylaxis of viral hepatitis: a global perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(Suppl):S155-166
- Lai JY. Hepatitis A and E in Hong Kong. *Hong Kong Med J* 1997;3:79-82
- Werzberger A, Mensch B, Nalin DR, Kuter BJ. Effectiveness of hepatitis A vaccine in a former frequently affected community: 9 years' followup after the monroe field trial of VAQTA(RR). *Vaccine* 2002;20:1699-1701
- Zhao Y, Meng Z, Guo J. Protective efficacy of H(2) strain live attenuated hepatitis A vaccines in an outbreak of hepatitis A. *Zhonghua Yufang Yixue Zazhi* 2000;34:144-146
- Zamir C, Rishpon S, Zamir D, Leventhal A, Rimon N, Ben-Porath E. Control of a community-wide outbreak of hepatitis A by mass vaccination with inactivated hepatitis A vaccine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:185-187
- Craig AS, Sockwell DC, Schaffner W, Moore WL Jr, Skinner JT, Williams IT, Shaw FE, Shapiro CN, Bell BP. Use of hepatitis A vaccine in a community-wide outbreak of hepatitis A. *Clin Infect Dis* 1998;27:531-535
- Hepatitis A vaccination programs in communities with high rates of hepatitis A. *Morb Mortal Wkly Rep* 1997;46:600-603
- Kaic B, Borcic B, Ljubicic M, Brkic I, Mihaljevic I. Hepatitis A control in a refugee camp by active immunization. *Vaccine* 2001;19:3615-3619
- Irwin DJ, Millership S. Control of a community hepatitis A outbreak using hepatitis A vaccine. *Commun Dis Public Health* 1999;2:184-187
- Xu Z, Li R, Meng Z. Immunogenicity and efficacy trials of live attenuated hepatitis A vaccines. *Zhonghua Yixue Zazhi* 1998;78:254-256
- Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *Mmwr Recomm Rep* 1999;48(RR-12):1-37
- Bruce LI, Rapin S, Prayura K, Thanom L, Weera P, Saroj S, Tithinun S, Assad S, John WB. Field efficacy trial of inactivated hepatitis A vaccine among children in thailand (an extended abstract). *Vaccine* 1992;10(Suppl 1):159
- Averhoff F, Shapiro CN, Bell BP, Hyams I, Burd L, Deladisma A, Simard EP, Nalin D, Kuter B, Ward C, Lundberg M, Smith N, Margolis HS. Control of hepatitis A through routine vaccination of children. *JAMA* 2001;286:2968-2973
- Jiang SP, Huang QC, Chen JM. A prospective epidemiological investigation on the effect of China-mode attenuated live vaccine against hepatitis A in the population of Liuzhou. *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* 1995;16:140-142
- 中国生物制品标准化委员会. 甲型肝炎减毒活疫苗制造及检定规程. 中国生物制品规程 2000 年版. 化学工业出版社, 2000:P187
- Totos G, Gizaris V, Papaevangelou G. Hepatitis a vaccine: persistence of antibodies 5 years after the first vaccination. *Vaccine* 1997;15:1252-1253
- Bell BP. Hepatitis A vaccine. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002;13:165-173
- Fan PC, Chang MH, Lee PI, Safary A, Lee CY. Follow-up immunogenicity of an inactivated hepatitis A virus vaccine in healthy children: results after 5 years. *Vaccine* 1998;16:232-235
- Connor BA, Phair J, Sack D, McEniry D, Hornick R, Banerjee D, Jensen E, Kuter B. Randomized, double-blind study in healthy adults to assess the boosting effect of vaqta or havrix after a single dose of havrix. *Clin Infect Dis* 2001;32:396-401
- Poovorawan Y, Kosuwon P, Sutra S, Theamboonlers A, Vimolket T, Safary A. Comparison of the reactogenicity and immunogenicity of two different dose levels of hepatitis A vaccine in healthy children and adolescents. *Asian Pac J Allergy Immunol* 1998;16:111-117
- Findor JA, Canero Velasco MC, Mutti J, Safary A. Response to hepatitis A vaccine in children after a single dose with a booster administration 6 months later. *J Travel Med* 1996;3:156-159
- Wiedermann G, Kundi M, Ambrosch F. Estimated persistence of anti-HAV antibodies after single dose and booster hepatitis A vaccination (0-6 schedule). *Acta Trop* 1998;69:121-125
- Wang X, Ma J, Zhang Y. Primary study on immunologic effect of live attenuated hepatitis A vaccine (H(2) strain) after booster dose. *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* 2000;21:124-127
- Van Herck K, Van Damme P. Inactivated hepatitis A vaccine-induced antibodies: follow-up and estimates of long-term persistence. *J Med Virol* 2001;63:1-7
- Van Damme P, Thoelen S, Cramm M, Meheus A. Safety and immunogenicity of a high-potency inactivated hepatitis A vaccine. *J Travel Med* 1996;3:83-90
- Castillo de Febres O, Chacon de Petrola M, Casanova de Escalona L, Naveda O, Naveda M, Estopinan M, Bordonnes G, Zambrano B, Garcia A, Dumas R. Safety, immunogenicity and antibody persistence of an inactivated hepatitis A vaccine in 4 to 15 year old children. *Vaccine* 1999;18:656-664
- Chan CY, Lee SD, Yu MI, Wang YJ, Chang FY, Lo KJ. Long-term follow-up of hepatitis A vaccination in children. *Vaccine* 1999;17:369-372
- Wiedermann G, Kundi M, Ambrosch F, Safary A, D' Hondt E, Delem A. Inactivated hepatitis A vaccine: long-term antibody persistence. *Vaccine* 1997;15:612-615
- 刘景晔, 郭建军, 王伟, 谢宝生, 李光谱, 姚为民, 刘丽莎, 王鹏斌. 甲肝减毒活疫苗(LA-1)免疫持久性观察. *中国生物制品学杂志* 1998;11:116-118
- Vidor E, Ratheau C, Briantais P, Vuillier D. Comparison of two immunization schedules with an inactivated hepatitis A vaccine (Avaxim TM). *J Travel Med* 1998;5:167-172

HCV - Fc融合基因疫苗真核表达载体的构建及表达

冯志华,王全楚,周永兴,郝春秋,聂青和

冯志华,王全楚,周永兴,郝春秋,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
冯志华,女,1964-11-08生,山西省忻州市人,汉族,医学博士,副教授,副主任医师,硕士研究生导师。主要从事病毒性肝炎治疗方面的研究,发表论著22篇。参加编写医学专著4部。
国家自然科学基金资助课题, No.30170822
项目负责人:冯志华,710038,陕西省西安市灞桥区新寺路1号,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。 fengzh@fmmu.edu.cn
电话:029-3577742 传真:029-3537377
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-25

Construction and expression of chimeric plasmid pHCV-IgFc

Zhi-Hua Feng, Quan-Chu Wang, Yong-Xing Zhou, Chun-Qiu Hao, Qing-He Nie

Zhi-Hua Feng, Quan-Chu Wang, Yong-Xing Zhou, Chun-Qiu Hao, Qing-He Nie, The Center of Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shan'xi Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30170822
Correspondence to: Zhi-Hua Feng, The Center of Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases of PLA, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaan'xi Province, China. fengzh@fmmu.edu.cn
Received: 2002-10-25 Accepted: 2002-11-25

Abstract

AIM: To construct a recombinant chimeric plasmid of HCV-Fc that can express HCV core protein and IgG Fc.

METHODS: The HCV core gene derived from the plasmid pBRTM/HCV1-3011 by using polymerase chain reaction (PCR) was inserted into the backward position of cytomegalovirus (CMV) immediate early promoter element of Fc plasmid (pIgFc), then the recombinant plasmid pHCV-IgFc was obtained.

RESULTS: The insert DNA of pHCV-IgFc was HCV core and Fc gene confirmed by endonuclease, PCR and sequencing. HCV core gene and Fc gene expressed transiently with Lipofectamine 2000 coated in human hepatoblastoma 7 721 cells, which was confirmed by immunofluorescence.

CONCLUSION: Recombinant chimeric plasmid vector pHCV-IgFc can express HCV core and Fc gene transiently in 7 721 cells. It may be useful in transfection of dendritic cells and development into dendritic cell vaccine.

Feng ZH, Wang QC, Zhou YX, Hao CQ, Nie QH. Construction and expression of chimeric plasmid pHCV-IgFc. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(6):697-700

摘要

目的: 构建能表达HCV C-Fc融合基因的真核表达载体,为

进一步修饰和转染树突状细胞,制备能高效表达HCV C和Fc基因的树突状细胞疫苗做准备。■

方法: 用分别含有Kpn I和Xho I酶切位点的HCV C区基因上、下游引物,以含有HCV H株基因序列的质粒pBRTM/HCV1-3011为模板,通过PCR扩增获得HCV C区基因片段回收后,以Kpn I和Xho I双酶切,定向插入到含IgG1 Fc基因的质粒pIgC3双粘端位点之间,获得重组表达质粒pHCVFc。通过Kpn I双位点酶切、PCR及插入片段序列测定对质粒进行了鉴定。以抗HCV C单克隆抗体为一抗,利用间接免疫荧光法检测了pHCV-IgFc在人肝癌细胞7 721中的瞬时表达。■

结果: 酶切、PCR及测序鉴定证实, pHCV-IgFc插入片段为HCV C区基因片段,免疫荧光法检测表明其可以在7 721细胞中瞬时表达。■

结论: 构建的质粒pHCV-IgFc可以在7721细胞中瞬时表达HCV C区基因,为研究HCV C-Fc融合基因修饰的树突状细胞的功能奠定了基础。

冯志华,王全楚,周永兴,郝春秋,聂青和. HCV - Fc融合基因疫苗真核表达载体的构建及表达. *世界华人消化杂志* 2003;11(6):697-700
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/697.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染是当前危害人类健康的重要传染病,至今尚无特异性的预防和治疗措施。基因治疗作为一种控制HCV感染的新途径,正在受到人们的重视^[1-23]。树突状细胞具有最强的抗原呈递能力,可广泛用于肿瘤和感染性疾病的免疫治疗,其诱导的强烈的CTL反应在HCV基因治疗中具有很好的应用前景^[24-27]。我们构建了HCV C-Fc融合基因真核表达载体,并证实其可以在7721细胞中瞬时表达HCV C基因,为下一步制备转染和表达HCV C及Fc融合基因的树突状细胞疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 pBRTM/HCV1-3011质粒(HCV-H)含除5' NCR外的全部HCV序列,是由美国华盛顿大学Rice教授惠赠;含Fc基因的质粒载体pIgC3(Fc上游含Kpn I, BamH I单酶切位点)为张新海博士惠赠;大肠杆菌MC1061及人肝癌细胞7 721株均为本室保存。Kpn I, BamH I, T4DNA连接酶, Taq DNA聚合酶, dNTP,

PCR产物回收试剂盒及P1asmid Purification Kit均为Promega公司产品. 脂质体Lipofectamie 2000, 1 640培养基及胎牛血清均为Gibco公司产品; 小鼠抗人HCV C单克隆抗体购自中国预防科学院. PCR引物设计, 参考已发表的HCV H株核心区序列设计I对引物. 根据克隆所需, 在每条引物的5'端引入相应的限制性内切酶识别序列及保护碱基, 采用DNA SIS和OLIGO核酸分析软件在微机上进行分析. 引物由宝生物(大连)有限公司合成, 序列如下: P1 (HCV C基因上游引物, 5'端含有Kpn I位点及起始码) 5' TTG GTACCATGAGC ACGAATCCTAAACCT3'; P2 (HCV C下游引物, 5'端含有BamH I位点及插入碱基以保证下游Fc基因三联密码子顺读): 5' ATTGGATCCTTGGCTGAAGCGGG CCACAGT3'.

1.2 方法

1.2.1 pHCV-IgFc质粒的构建 参照文献. 以pBRTM/HCV1-30II质粒为模板, 用合成的分别含有Kpn I及BamH I限制性内切酶识别序列的HCV C区基因上下游引物进行PCR扩增. PCR在100 μ L的反应缓冲液中进行(50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH9.0 25 $^{\circ}$ C, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 g/L Triton X-100), 其中含上下游引物各100 pmol, dNTP各25 μ L, 模板质粒5 μ L, Taq聚合酶1U, 三温循环的程序为: 预变性94 $^{\circ}$ C 5 min, 变性94 $^{\circ}$ C 45 s, 退火55 $^{\circ}$ C 45 s, 延伸72 $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环后, 72 $^{\circ}$ C再延伸10 min, PCR产物回收(按试剂盒说明书操作)后, 用Kpn I/BamH I双酶切, 获得572 bp的HCV C基因片段, 即目的DNA; 含Fc基因的载体pIgFc3亦用Kpn I/BamH I双酶切, 切胶回收获得3 500 bp的载体DNA. 目的DNA与载体DNA在16 $^{\circ}$ C下经T4 DNA连接酶连接16 h(连接体系为: 目的DNA 0.4 μ g, 载体DNA 0.1 μ g, 10 \times Buffer 2 μ L, T4 DNA连接酶16 μ L, 加无离子水至20 μ L), 获得重组质粒. 将重组质粒转化到用氯化钙制备的新鲜感受态大肠杆菌E.coli MC1061中, 挑取阳性克隆, 扩增后提取并纯化质粒, 得到含HCVC-Fc融合基因的真核表达质粒pHCV-IgFc.

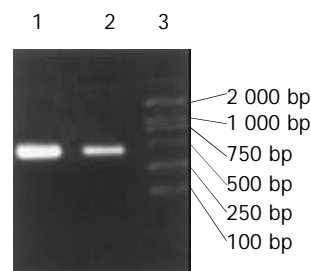
1.2.2 pHCV-IgFc的鉴定 酶切鉴定: 将重组质粒pHCV-IgFc和空载体质粒pIgFc3分别用Kpn I单酶切. 10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定. PCR鉴定: 分别以重组质粒pHCV-IgFc和空载体质粒pIgFc3为模板, 用前面合成的HCVC区基因上游及下游引物在相同的反应体系中进行PCR扩增, PCR产物用10 g/L琼脂糖凝胶电泳鉴定. 测序鉴定: 为确保重组质粒pHCV-IgFc中插入序列及读码框的正确性, 对其进行测序鉴定, 由宝生物(大连)有限公司的自动测序仪完成.

1.2.3 pHCV-IgFc在人肝癌细胞株7721中的瞬时表达 将重组质粒pAd. HCV-C用 lipofectamine 2000转染7721细胞, 72 h后收集爬片细胞, 以小鼠抗HCV-C单克隆抗体为一抗做间接免疫荧光实验, 检测重组载体

pHCV-IgFc插入的HCV-C基因在人肝癌细胞株7721中的瞬时表达情况.

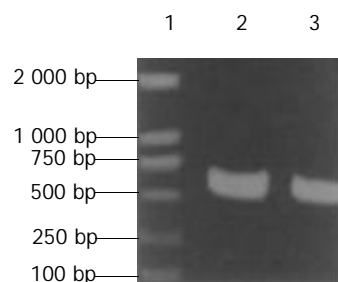
2 结果

2.1 重组质粒pHCV-IgFc的双位点酶切鉴定 插入的HCV-C基因片段含有另一个Kpn I位点. 重组质粒pHCV-IgFc经Kpn I双位点酶切后, 可切下300 bp片段, 空载体质粒pIgFc3只用一个Kpn I酶切位点. 电泳酶切片段, 证明插入片段和载体大小均正确(图1):



Line 1,2 重组质粒pHCV-IgFc经Kpn I双位点酶切后300 bp片段; Line3 Marker (DL-2000)
图1 重组质粒的酶切鉴定.

2.2 重组质粒pHCV-IgFc的PCR鉴定 利用前面合成的PCR引物, 以重组质粒pHCV-IgFc为模板进行PCR^[14], 反应产物电泳后发现572 bp的条带(插入的HCV C基因)存在; 对照组用相同的引物. 以空载体质粒pIgFc为模板进行PCR, 反应产物电泳后未见条带存在(图2). 证明重组质粒pHCV-IgFc中成功地插入了HCV C基因.



Line 1 Marker (DL-2000); Line2-3; 重组质粒pHCV-IgFc PCR产物
图2 重组质粒的PCR鉴定.

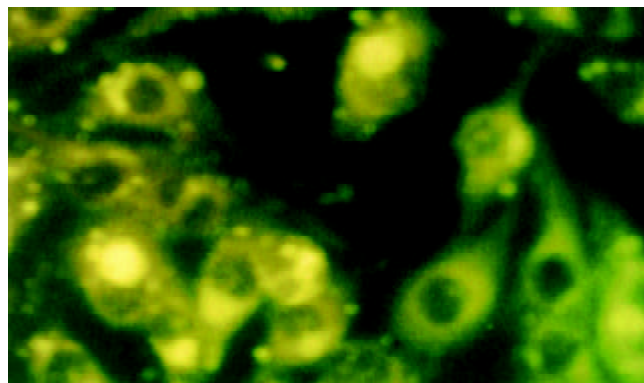


图3 重组质粒pHCV-IgFc在人肝癌细胞株7721中的瞬时表达.

2.3 重组质粒 pAd.HCV-C 的测序鉴定 重组质粒 pHCV-IgFc 由宝生物(大连)有限公司测序, 插入片段正是 HCVH 株 C 区基因, 结果如下:

2.4 重组质粒 pHCV-IgFc 在人肝癌细胞株 7 721 中的瞬时表达 转染了重组质粒 pHCV-IgFc 的人肝癌细胞株 7 721 细胞, 以抗 HCV C 单克隆抗体为一抗, 进行间接免疫荧光检测, 获得阳性结果(图 3); 未转染的 7 721 细胞进行间接免疫荧光检测, 未见阳性结果. 表明 pHCV-IgFc 在 7 721 中瞬时表达了 HCV C 抗原.

3 讨论

丙型肝炎病毒(HCV)感染常导致慢性肝炎、肝硬化、甚至肝癌及肝外病变. HCV 基因序列的高度变异性以及机体细胞免疫功能低下使病毒得以逃避宿主免疫系统的作用而造成病毒的持续感染, 因而难以治疗及预防. 基因疫苗是将编码抗原的外源基因插入合适的表达载体中, 再以载体免疫机体, 使目的基因在机体内高效表达, 达到基因治疗的目的. 丙型肝炎基因疫苗诱导特异性免疫应答产生已被大量的实验室证实^[28]. 但普遍存在着抗体滴度不高, CTL 杀伤力不强等问题. 其原因可能与 HCV 感染后, 抗原提呈细胞(APC), 尤其是树突状细胞(dendritic cells, DC)数量减少、功能降低有关^[29]. 如何绕过或提高 DC 免疫功能低下, 诱导出更强有力的、更具广泛性的免疫应答, 应当成为基因疫苗和免疫治疗亟待解决的问题之一.

一个理想的抗原呈递策略, 应当是全方位、强有力的诱导 CD₈⁺CTL、CD₄⁺Th 及 B 细胞应答, 这样才能更有效的清除病原体及肿瘤细胞. 近年来, 以免疫球蛋白(主要是 IgG1)的 Fc 段为基础构建的新型免疫分子进展很快, 有望用于新型免疫复合外物制剂的研制. IgG1 的 Fab 与 Fc 是功能相对独立的片段, Fab 中的可变区负责与抗原结合, 而 Fc 段能与免疫效应细胞的 Fc γ 受体(Fc γ R)结合, 发挥其调节免疫效应、细胞炎症反应、细胞毒效应以及激活吞噬细胞的作用. DC 本身表面带有 Fc γ R, 因此由 Fc γ R 介导的吞噬细胞内在化的过程可加强免疫应答的抗原提呈.

要获得有效的防治 HCV 感染的疫苗, 必须克服 HCV 多型、易变带来的困难^[30-34]. HCV 中和抗体位点所在膜区(E 区)呈高度变异性, 机体感染 HCV 后易发生免疫耐受. 因此, 采用传统方法构建的以产生中和抗体为主的体液免疫型疫苗难以获得对不同 HCV 株型同时具有防治功效的疫苗. 要克服这种困难, 就必须诱导机体产生对预防和清除不同株型 HCV 感染具有重要作用的细胞免疫应答^[35-39]. Saito et al 研究发现, 仅用 HCV E 区基因免疫难以诱导有效的细胞免疫应答. HCV CE1 区含有 5 个 CTL 表位, 以 HCV CE1 区基因免疫机体, 可产生较强的针对不同株型 HCV 的 CTL 反应, 且杀伤效应至少可持续 100 d 以上. 因此, 我们选用在我国常见的 HCV II 型 H 株 C 区基因作为目的基因, 插入到含人 IgG1 Fc

段基因的载体 pIGC3 中, 以此为基础构建了 HCV C-Fc 的可分泌型真核表达载体 pHCV-IgFc. 经双酶切、PCR 扩增及测序三重鉴定, 证实插入片段为 HCV C 区基因. 重组质粒 pHCV-IgFc 在人肝癌细胞 7 721 中瞬时表达了 HCV C 抗原, 证实了其表达功能的完整性. 以上工作为以后制备能表达 HCV C 及 Fc 抗原的树突状细胞疫苗提供了物质保证, 为进一步探讨抗 HCV 基因疫苗及树突状细胞疫苗奠定了基础^[40,41].

4 参考文献

- 1 Imanishi T, Obika S. Down-regulation of a gene-expression by an antisense BNA oligonucleotide. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 2002;120:85-90
- 2 He Y, Nakao H, Tan SL, Polyak SJ, Neddermann P, Vijaysri S, Jacobs BL, Katze MG. Subversion of cell signaling pathways by hepatitis c virus nonstructural 5a protein via interaction with Grb2 and P85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* 2002; 76:9207-9217
- 3 Lee MN, Jung EY, Kwun HJ, Jun HK, Yu DY, Choi YH, Jang KL. Hepatitis C virus core protein represses the p21 promoter through inhibition of a TGF-beta pathway. *J Gen Virol* 2002; 83(Pt 9):2145-2151
- 4 Zhu F, Eckels DD. Functionally distinct helper T-cell epitopes of HCV and their role in modulation of NS3-specific, CD8 (+)/tetramer positive CTL. *Hum Immunol* 2002;63:710-718
- 5 Jin J, Yang JY, Liu J, Kong YY, Wang Y, Li GD. DNA immunization with fusion genes encoding different regions of hepatitis C virus E2 fused to the gene for hepatitis B surface antigen elicits immune responses to both HCV and HBV. *World J Gastroenterol* 2002;8:505-510
- 6 Alvarez LL, Duenas CS, Vina A, Ramos T, Pichardo D, Morales J. Additives and protein-DNA combinations modulate the humoral immune response elicited by a hepatitis C virus core-encoding plasmid in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:95-99
- 7 Deng T, Fan G, Chen T, Chen N, Hu D, Wang M, Jia K. Expression and immune response to hepatitis C virus core gene combined hepatitis B virus core gene with two multiple cloning sites vector. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:77-80
- 8 Brinster C, Chen M, Boucreux D, Paranhos-Baccala G, Liljestrom P, Lemmonier F, Inchauspe G. Hepatitis C virus non-structural protein 3-specific cellular immune responses following single or combined immunization with DNA or recombinant Semliki Forest virus particles. *J Gen Virol* 2002;83 (Pt 2):369-381
- 9 Prince AM. Perspectives on prophylactic and therapeutic immunization against hepatitis B and C viruses. *Transfus Clin Biol* 2001;8:467-470
- 10 Ou Yang P, Hwang LH, Tao MH, Chiang BL, Chen DS. Co-delivery of GM-CSF gene enhances the immune responses of hepatitis C viral core protein-expressing DNA vaccine: role of dendritic cells. *J Med Virol* 2002;66:320-328
- 11 Brinster C, Muguet S, Lone YC, Boucreux D, Renard N, Fournillier A, Lemmonier F, Inchauspe G. Different hepatitis C virus nonstructural protein 3 (Ns3)-DNA- expressing vaccines induce in HLA-A2.1 transgenic mice stable cytotoxic T lymphocytes that target one major epitope. *Hepatology* 2001; 34:1206-1217
- 12 Sato J, Murata K, Lechmann M, Manickan E, Zhang Z, Wedemeyer H, Rehmann B, Liang TJ. Genetic immunization of wild-type and hepatitis C virus transgenic mice reveals a hierarchy of cellular immune response and tolerance induction against hepatitis C virus structural proteins. *J Virol* 2001;75:12121-12127
- 13 Prince AM, Shata MT. Immunoprophylaxis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:1091-1103
- 14 Forns X, Payette PJ, Ma X, Satterfield W, Eder G, Mushahwar IK, Govindarajan S, Davis HL, Emerson SU, Purcell RH, Bukh

- J. Vaccination of chimpanzees with plasmid DNA encoding the hepatitis C virus (HCV) envelope E2 protein modified the infection after challenge with homologous monoclonal HCV. *Hepatology* 2000;32:618-625
- 15 Eckels DD. MHC: function and implication on vaccine development. *Vox Sang* 2000;78 (Suppl 2):265-267
- 16 Encke J, Wands JR. Ethanol inhibition: the humoral and cellular immune response to hepatitis C virus NS5 protein after genetic immunization. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1063-1069
- 17 Kamei A, Tamaki S, Taniyama H, Takamura S, Nishimura Y, Kagawa Y, Uno-Furuta S, Kaito M, Kim G, Toda M, Matsuura Y, Miyamura T, Adachi Y, Yasutomi Y. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by an intrahepatic inoculation with an expression plasmid. *Virology* 2000;273:120-126
- 18 Heile JM, Fong YL, Rosa D, Berger K, Saletti G, Campagnoli S, Bensi G, Capo S, Coates S, Crawford K, Dong C, Wininger M, Baker G, Cousens L, Chien D, Ng P, Archangel P, Grandi G, Houghton M, Abrignani S. Evaluation of hepatitis C virus glycoprotein E2 for vaccine design: an endoplasmic reticulum-retained recombinant protein is superior to secreted recombinant protein and DNA-based vaccine candidates. *J Virol* 2000;74:6885-6892
- 19 Pancholi P, Liu Q, Tricoche N, Zhang P, Perkus ME, Prince AM. DNA prime-canarypox boost with polycistronic hepatitis C virus (HCV) genes generates potent immune responses to HCV structural and nonstructural proteins. *J Infect Dis* 2000;182:18-27
- 20 Lee AY, Polakos NK, Otten GR, Ulmer JB, Houghton M, Paliard X. Quantification of the number of cytotoxic T cells specific for an immunodominant HCV-specific CTL epitope primed by DNA immunization. *Vaccine* 2000;18:1962-1968
- 21 Song MK, Lee SW, Suh YS, Lee KJ, Sung YC. Enhancement of immunoglobulin G2a and cytotoxic T-lymphocyte responses by a booster immunization with recombinant hepatitis C virus E2 protein in E2 DNA-primed mice. *J Virol* 2000;74:2920-2925
- 22 Arichi T, Saito T, Major ME, Belyakov IM, Shirai M, Engelhard VH, Feinstone SM, Berzofsky JA. Prophylactic DNA vaccine for hepatitis C virus (HCV) infection: HCV-specific cytotoxic T lymphocyte induction and protection from HCV-recombinant vaccinia infection in an HLA-A2.1 transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:297-302
- 23 Gordon EJ, Bhat R, Liu Q, Wang YF, Tackney C, Prince AM. Immune responses to hepatitis C virus structural and nonstructural proteins induced by plasmid DNA immunizations. *J Infect Dis* 2000;181:42-50
- 24 Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 1999;162:5584-5591
- 25 Auffermann GS, Keeffe EB, Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 2001;97: 3171-3176
- 26 Matsue H, Kusuhara M, Matsue K, Takashima A. Dendritic cell-based immunoregulatory strategies. *Int Arch Allergy Immunol* 2002;127:251-258
- 27 Santin AD, Bellone S, Underwood LJ, O'Brien TJ, Ravaggi A, Pecorelli S, Cannon MJ. Novel immunotherapeutic strategies in gynecologic oncology. Dendritic cell-based immunotherapy for ovarian cancer. *Minerva Ginecol* 2002;54:133-144
- 28 Hao CQ, Zhou YX, Feng ZH, Li JG, Jia ZS, Wang PZ. Construction, identification and expression of framework plasmid pAd.HCV-C of adenovirus expression vector of HCV C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:635-639
- 29 Chen MY, Huang ZQ, Chen LZ, Gao YB, Peng RY, Wang DW. Detection of hepatitis C virus NS5 protein and genome in Chinese carcinoma of the extrahepatic bile duct and its significance. *World J Gastroenterol* 2000;6:800-804
- 30 Wu J, Cheng ML, Ding YS, Liu RC, Li J, Wang WL, Hu L. Five years following-up Survey of risk factor of virus hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1365-1367
- 31 Deng ZL, Ma Y, Yuan L, Teng PK. The importance of hepatitis C as a risk factor for hepatocellular carcinoma in Guangxi. *World J Gastroenterol* 2000;6(Suppl 3):75
- 32 Yan FM, Chen AS, Hao F, Zhao XP, Gu CH, Zhao LB, Yang DL, Hao LJ. Hepatitis C virus may infect extrahepatic tissues in patients with hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2000;6:805-811
- 33 Jia ZS, Zhou YX, Lian JQ, Feng ZH, Li GY, Zhang WB. Computerized design of hepatitis C virus RNA-directed hammerhead ribozymes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:300-302
- 34 Du DW, Zhou YX, Feng ZH, Yao ZQ, Li GY. Immune responses to interleukin 12 and hepatitis B gene vaccine in H2 d mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:128-130
- 35 Li JG, Zhou YX, Lian JQ, Jia ZS, Feng ZH. Inhibitory effect of ribozyme on HBeAg in human HCC cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:28-30
- 36 Restifo NP, Ying H, Hwang L, Leitner WW. The promise of nucleic acid vaccines. *Gene Ther* 2000;7:89-92
- 37 Song ZQ, Hao F, Zhang J, Gu CH. Detection of antibodies against hypervariable region 1 in sera from patients with hepatitis C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:666-668
- 38 Elliott SL, Pye S, Le T, Mateo L, Cox J, Macdonald L, Scalzo AA, Forbes CA, Suhrbier A. Peptide based cytotoxic T-cell vaccines; delivery of multiple epitopes, help, memory and problems. *Vaccine* 1999;17:2009-2019
- 39 Navas MC, Fuchs A, Schvoerer E, Bohbot A, Aubertin AM, Stoll-Keller F. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Med Virol* 2002; 67:152-161
- 40 Moriya O, Matsui M, Osorio M, Miyazawa H, Rice CM, Feinstone SM, Leppla SH, Keith JM, Akatsuka T. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells treated with an anthrax toxin fusion protein. *Vaccine* 2001;20:789-796
- 41 Galle MB, DeFranco RM, Kerjaschki D, Romanelli RG, Montalto P, Gentilini P, Pinzani M, Romagnoli P. Ordered array of dendritic cells and CD8+ lymphocytes in portal infiltrates in chronic hepatitis C. *Histopathology* 2001;39:373-381

胸腺肽 $\alpha 1$ 对慢性乙型肝炎患者免疫系统的影响

段国荣, 聂青和, 周永兴, 王全楚, 田长印, 刘拉羊, 薛红安

段国荣, 西安市中心医院感染科 陕西省西安市 710003
聂青和, 周永兴, 王全楚, 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
田长印, 刘拉羊, 薛红安, 西安交通大学第二医院感染病科 陕西省西安市 710004
段国荣, 女, 1963-11-13 生, 河南省内黄县人, 汉族, 医学硕士, 发表论文 18 篇。
项目负责人: 段国荣, 710003, 陕西省西安市北大街后宰门 185 号, 西安市中心医院感染科。 xin8853@163.com
电话: 029-7268341-7017
收稿日期: 2002-07-10 接受日期: 2002-07-22

Effect of thymosin- $\alpha 1$ on immune function with chronic hepatitis B

Guo-Rong Duan, Qing-He Nie, Yong-Xing Zhou, Quan-Chu Wang, Chang-Yin Tian, La-Yang Liu, Hong-An Xue

Guo-Rong Duan, Department of Infectious Diseases, Xi'an Central Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China
Qing-He Nie, Yong-Xing Zhou, Quan-Chu Wang, Chinese PLA Center of Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Chang-Yin Tian, La-Yang Liu, Hong-An Xue, Department of Infectious Diseases, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Guo-Rong Duan, Department of Infectious Diseases, Xi'an Central Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China. xin8853@163.com
Received: 2002-07-10 Accepted: 2002-07-22

Abstract

AIM: To realize effect of thymosin- $\alpha 1$ ($T\alpha 1$) on immune function with chronic hepatitis B (CHB) and to evaluate the efficacy of $T\alpha 1$ in the treatment of CHB.

METHODS: Sixty patients with CHB were randomly chosen. Twenty-five cases were received $T\alpha 1$ (1.6 mg, sc, twice a week, 3-6mo) and thirty-five were received $T\alpha 1$ combined with Lamivudine (0.1 g, po, once a day, 3-6 mo). Hepatic function, virological analyses (HBeAg, HBsAg, HBV-DNA) and immunological analyses (peripheral blood T lymphocytes subset, IFN- α and IL-4 levels) from patients in pretreatment and posttreatment were observed.

RESULTS: At the end of treatment, ALT and T-Bil were decreased in the group of $T\alpha 1$ combined with Lamivudine ($P < 0.01$), HBeAg/HBsAg remained negative ($n = 9$) and HBV-DNA levels were also low ($n = 14$) in the group of $T\alpha 1$ combined with Lamivudine ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively) as compared with healthy individuals. CD_4^+ T Cell (from 31.3 ± 2.4 to 36.1 ± 2.5), the level of IFN- γ (from 71.3 ± 21.0 to 83.7 ± 21.4) and Th1/Th2 (from 0.79 ± 0.2 to 0.98 ± 0.3) increased in the group of $T\alpha 1$ ($P < 0.01$, $P < 0.05$ and $P < 0.05$, respectively).

CONCLUSION: $T\alpha 1$ is efficient to treat patients with CHB because it can elevate the level of cellular immunity, which

is beneficial to viral clearance.

Duan GR, Nie QH, Zhou YX, Wang QC, Tian CY, Liu LY, Xue HA. Effect of thymosin- $\alpha 1$ on immune function with chronic hepatitis B. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(6):701-704

摘要

目的: 了解胸腺肽 $\alpha 1$ ($T\alpha 1$) 对慢性乙型肝炎患者免疫系统的影响, 评价 $T\alpha 1$ 对慢性乙型病毒性肝炎的疗效。

方法: 选择 60 例慢性乙型肝炎患者, 其中 $T\alpha 1$ 组 25 例, 给予 $T\alpha 1$ (1.6mg, sc, 2 次 /wk, 3-6 mo) 治疗, 联合组 35 例, 给予 $T\alpha 1$ 联合贺普丁 (0.1 g, po, 1 次 /d, 3-6 mo) 治疗, 另选 60 例作为对照组, 仅给予保肝治疗。应用双抗体酶联分析法检测治疗前后血清中 IFN- γ 和 IL-4 的浓度, 以 IFN- γ 代表 Th1, IL-4 代表 Th2, 从而计算 Th1/Th2 比值; 采用流式细胞仪观察外周血 CD_4^+ T, CD_8^+ T 细胞亚群。

结果: 联合组与对照组比, 治疗后肝功能改善显著 ($P < 0.01$); 联合组乙型肝炎病毒标志物 HBsAg 或 HBeAg 阴转 (9 例) 及 HBV-DNA 定量指标降低 (14 例), 与对照组比, 均具有统计学差异 ($P < 0.01$; $P < 0.05$)。但 $T\alpha 1$ 组分别与对照组、联合组比, 无统计学差异 ($P > 0.05$)。 $T\alpha 1$ 组治疗后 CD_4^+ T 细胞增高 (由 31.3 ± 2.4 增高到 36.1 ± 2.5) 具有统计学意义 ($P < 0.01$), CD_8^+ T 细胞稍高且 CD_4^+/CD_8^+ 无明显变化, 相差无统计学意义 ($P > 0.05$); IFN- γ 浓度 (由 71.3 ± 21.0 增高到 83.7 ± 21.4) 及 Th1/Th2 比值升高 (由 0.79 ± 0.2 增高到 0.98 ± 0.3) 均有统计学意义 (P 均 < 0.05), 但 IL-4 表达水平变化无统计学意义。

结论: $T\alpha 1$ 能提高机体的细胞免疫功能, 有利于病毒清除和疾病的恢复。

段国荣, 聂青和, 周永兴, 王全楚, 田长印, 刘拉羊, 薛红安. 胸腺肽 $\alpha 1$ 对慢性乙型肝炎患者免疫系统的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(6):701-704
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/701.asp>

0 引言

我国是病毒性肝炎的高发区, 乙型肝炎居首位, 目前尚缺乏特效治疗。目前抗病毒药物效果不尽人意。因此, 寻找更有效的治疗措施, 一直为临床医师及科研人员所关注^[1-17]。化学合成的胸腺肽 $\alpha 1$ (thymosin- $\alpha 1$, 日达仙, $T\alpha 1$) 对病毒性肝炎的治疗虽已有报道, 但多在于观察肝功能、病毒复制指标等。而对于细胞免疫指

标的检测报道较少,尤其是Th1/Th2及外周血T淋巴细胞亚群的变化.为此,我们旨在观察患者外周血Th1/Th2及T淋巴细胞亚群的变化,同时对患者肝功能生化指标及病毒复制指标进行观察分析,从而评价T α 1对CHB的疗效.

1 材料和方法

1.1 材料 慢性乙型肝炎(CHB)患者60例来自第四军医大学唐都医院,西安交通大学第二医院及西安市中心医院.其中T α 1组25例,联合组35例,另选60例作为对照组.男21例,女14例.年龄21-60(平均40)岁.诊断符合1995年(北京)第五次全国传染病与寄生虫病学术会议修订的标准. IFN- γ 和IL-4双单克隆抗体ELISA检测试剂盒,均购自深圳晶美生物工程有限公司,批号991225. HBV-DNA PCR检测试剂盒购自广州市中山医科大学达安基因股份有限公司,批号S19990003. CD₄-FITC和CD₈-PE产地法国马赛(immunotech france). Epics-Profile 二型流式细胞仪,美国Coulter公司生产.

1.2 方法 T α 1(日达仙,美国赛生公司)1.6 mg,皮下注射,2次/wk,其中35例患者加用抗病毒药物(贺普丁)0.1 g,口服,1次/d,同时配合多种维生素,肌苷等常规保肝治疗.疗程3-6 mo. 随机选择60例CHB患者作为对照,仅给予保肝等对症处理.患者于治疗前后抽血检测肝功能.血清病毒学指标:HBsAg,抗-HBs, HBeAg,抗-HBe,抗-HBc, PCR-HBV-DNA. 细胞免疫指标:CD₄⁺T, CD₈⁺T, CD₄⁺/CD₈⁺及细胞因子IFN- γ , IL-4浓度. 药物毒副作用观察. 外周血T细胞亚群检测步骤:先加20 μ L双标抗体于小试管底,再加抗凝血100 μ L,混匀,放置室温(18-25 $^{\circ}$ C)孵育30min;加RBC溶解液1 mL,待RBC溶解后上流式细胞仪检测;波长488 nm时FITC(异硫氰酸荧光素)呈蓝-绿荧光,PE(藻红蛋白)呈红色荧光,计数3 000个细胞,记录分析直方图,数据经ELITE软件处理.血清IFN- γ 检测步骤:从已平衡至室温的密封袋中取出所需板条,分别将标本及不同浓度标准品(100 μ L/孔)加入相应孔中,然后再加入生物素化抗体工作液(50 μ L/孔)和酶结合物(20-25 $^{\circ}$ C)共同孵育120 min.洗板3次.先后加入底物A, B各100 μ L/孔,避光置室温10-30 min.加入终止液50 μ L/孔,混匀后即刻在ELISA读数仪上测量A₄₅₀值,绘制标准曲线,并测定各血清标本中IFN- γ 的浓度(ng/L).血清IL-4检测步骤同上.

统计学处理 结果数据采用 $\bar{x} \pm s$,方差分析, χ^2 检验.

2 结果

联合组与对照组比, T-Bil和ALT相差有统计学意义($P < 0.01$,表1);T α 1组与对照组比及T α 1组与联合组比,均无统计学差异($P > 0.05$).在T α 1组未见药

物副反应;在联合组治疗过程中2例发生轻度恶心,1例出现白细胞轻微下降,治疗结束后自行恢复.

2.1 治疗后肝功能及病毒学标志 检测病毒学标志,在T α 1组和联合组HBeAg或HBsAg阴转共13例(13/60),HBV-DNA定量指标下降20例(20/60).13例HBeAg或HBsAg阴转同时伴随HBV-DNA定量指标降低.在肝功能复常方面:联合组与对照组比,有统计学差异($\chi^2 = 8.681$, $P = 0.0032$);在阴转方面:联合组与对照组比,相差有统计学意义($\chi^2 = 7.518$, $P = 0.0061$);在HBV-DNA定量指标下降方面:联合组与对照组比,相差有统计学意义($\chi^2 = 4.448$, $P = 0.035$,表2,3)T α 1组与对照组比及T α 1组与联合组比,均无统计学差异($P > 0.05$).

表1 T α 1治疗CHB前后肝功能差值($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	T-Bil (μ mol/L)	ALT (μ kat/L)	AST (μ kat/L)	ALP (μ kat/L)	γ -GT (μ kat/L)
对照组	60	10 \pm 6	86 \pm 22	28 \pm 7	31 \pm 10	22 \pm 8
T α 1组	25	13 \pm 8	96 \pm 22	31 \pm 10	35 \pm 12	23 \pm 8
联合组	35	16 \pm 9 ^b	108 \pm 29 ^b	30 \pm 6	37 \pm 18	26 \pm 11

^b $P < 0.01$, vs 对照组比.

表2 T α 1治疗CHB肝功能及病毒学指标变化(*n*)

分组	<i>n</i>	肝功能复常	HBV M 阴转	HBV-DNA 下降
对照组	60	36	4	12
T α 1组	25	19	4	6
联合组	35	31 ^b	9 ^b	14 ^a

^a $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$, vs 对照组比.

表3 T α 1治疗前CHB HBV-DNA定量拷贝分布情况(*n*)

分组	<i>n</i>	$<10^4$	10^4	10^5	10^6	10^7	$>10^7$
对照组	60	0	7	13	24	12	4
T α 1组	25	0	0	6	7	9	3
联合组	35	0	1	13	11	7	3

2.2 细胞免疫变化 T α 1组治疗前后CD₄⁺T细胞增高具有统计学意义($t = 6.93$, $P = 0.000$),CD₈⁺T细胞略高且CD₄⁺/CD₈⁺相差无统计学意义($t = 1.50$, $P = 0.141$; $t = 1.41$, $P = 0.1638$);治疗前后IFN- γ 表达水平及Th1/Th2比值变化有统计学差异($t = 2.07$, $P = 0.0441$; $t = 2.63$, $P = 0.0117$),IL-4表达水平变化无统计学意义($t = 0.41$, $P = 0.6856$,表4,图1).

表4 T α 1组治疗CHB后细胞免疫指标变化

治疗	CD ₄ ⁺ (%)	CD ₈ ⁺ (%)	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺	IFN- γ (ng/L)	IL-4(ng/L)	Th1/Th2
前	31.3 \pm 2.4	37.3 \pm 4.3	0.96 \pm 0.1	71.3 \pm 21.0	89.8 \pm 40.1	0.79 \pm 0.2
后	36.1 \pm 2.5 ^b	39.1 \pm 4.2	1.00 \pm 0.1	83.7 \pm 21.4 ^a	85.3 \pm 38.0	0.98 \pm 0.3 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 治疗前.

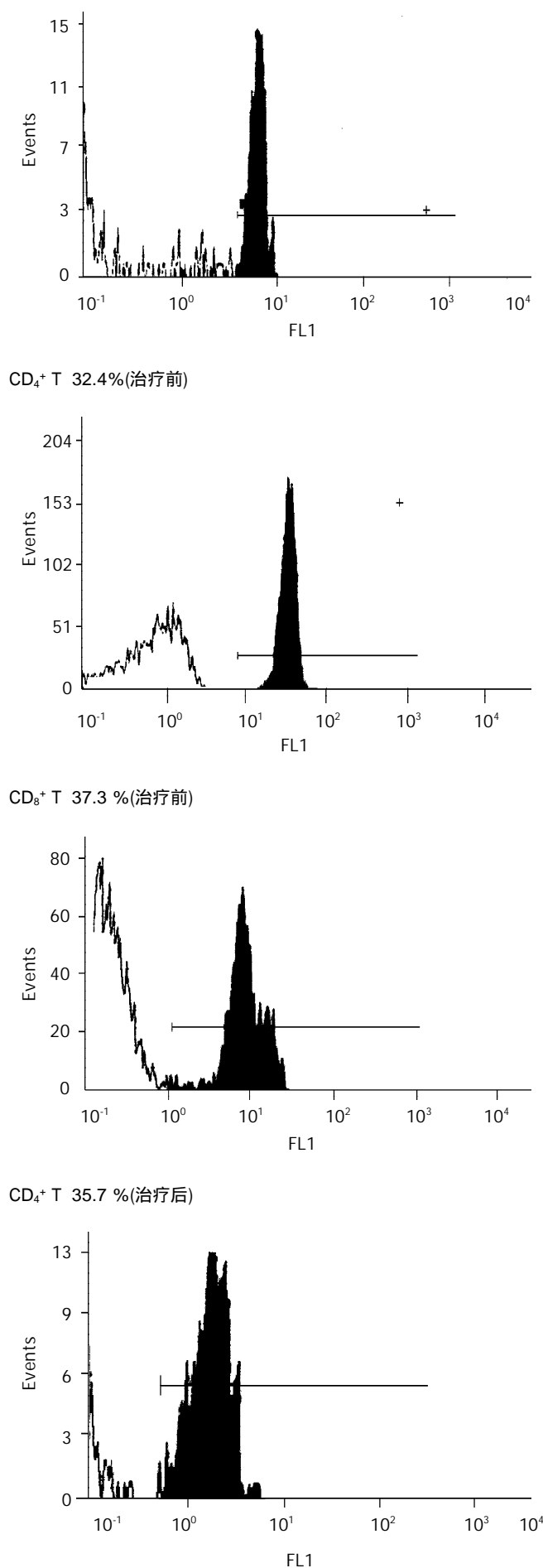


图1 $T\alpha 1$ 治疗 CHB 前后血淋巴细胞流式细胞仪检测.

3 讨论

病毒性肝炎是我国常见病多发病, 目前尚缺乏特效治疗, 其主要原因是发病机制较为复杂, 尚未完全阐明^[18-41]. 多数资料表明, CHB 患者细胞免疫功能低下^[42,43]. $T\alpha 1$ 能促进 T 细胞成熟和影响免疫调节细胞的功能, 还能增强 IFN- γ 及 IL-2 等细胞因子的生成, 促进免疫缺陷的重建. 这也是 $T\alpha 1$ 用于 CHB 治疗的理论依据. 本研究显示, 联合组与对照组比, 治疗前后肝功能显著改善, $T\alpha 1$ 组分别与对照组、联合组比, 肝功能改善无统计学意义; 联合组与对照组相比, 治疗前后病毒学标志, 包括 HBeAg 或 HBsAg 阴转, HBV-DNA 定量指标降低均具有统计学差异, 但 $T\alpha 1$ 组分别与对照组、联合组比差异无统计学意义. 可见, 无论在肝功能改善方面, 还是在病毒学标志方面, $T\alpha 1$ 联合抗病毒药物(贺普丁)均显示良好的治疗效果. 本研究还显示, 在 $T\alpha 1$ 组, 治疗前后 CD_4^+ 相差具有统计学意义, 治疗后 CD_8^+ 稍高, CD_4^+/CD_8^+ 无明显变化, 相差无统计学意义. 这表明 $T\alpha 1$ 能提高机体的细胞免疫功能, CD_4^+ 增高可促使机体分泌 IFN- γ 、IL-2 等细胞因子, 有利于病毒清除. 治疗后 IFN- γ 水平较治疗前高, 这可能与 $T\alpha 1$ 能增强 IFN- γ 的生成有关, 但仍低于正常血清 IFN- γ 水平(结合血清细胞因子检测结果). 可能原因是: (1) 患者血清中可能存在诱导 IFN 的抑制因子; (2) 产生 IFN 的活性细胞功能降低; (3) 药物剂量不足或疗程不够长. 因此, 加用 IFN- γ 治疗或 $T\alpha 1$ 疗程延长, 可能效果更好.

早在 1986 年 Mosmann et al 就发现小鼠的 CD_4^+ 细胞株接受抗原刺激可分化成 Th1 和 Th2 两个亚群. 前者分泌 IL-2, IFN- γ , TNF- β 等可促进细胞免疫. 后者分泌 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 等可促进体液免疫. 以后研究又进一步证实人类也存在这两种亚型. 日前, 越来越多的证据表明, Th1/Th2 平衡的变化会影响感染的结局^[44-48]. 我们曾报道 35 例 CHC 患者 Th2 类细胞因子占优势, 还报道 30 例 CHB 患者 Th2 类细胞因子较 Th1 类细胞因子水平高, 分别与正常对照组比, 均有统计学差异. 本研究中, 以 IFN- γ 代表 Th1, IL-4 代表 Th2, 从而计算 Th1/Th2 比值. 在 $T\alpha 1$ 组, 治疗前后 Th1/Th2 比值变化有统计学差异, 可能是由于 IFN- γ 浓度变化幅度大于 IL-4 所致. Th1/Th2 比值增高可促进机体细胞免疫应答, 有利于病毒清除和疾病的恢复.

总之, 如何有效提高机体的细胞免疫功能, 如何终止病毒复制, 从而维持患者的肝功能稳定, 是目前急需解决的问题. 免疫调节剂($T\alpha 1$)有利于肝炎病毒的清除和疾病的恢复. 加大药物剂量或延长疗程可能效果更好. 联合抗病毒药物(贺普丁)治疗可能更具优势, 既可利用 $T\alpha 1$ 提高细胞免疫功能的特点, 又可利用贺普丁持续抑制病毒复制的特点, 从而达到提高疗效的目的. 致谢: 感谢第四军医大学唐都医院中心实验室张盈华主任的大力支持.

4 参考文献

- 1 Zhao LS, Qin S, Zhou TY, Tang H, Liu L, Lei BJ. DNA based vaccination induces humoral and cellular immune responses against hepatitis B virus surface antigen in mice without activation of c-myc. *World J Gastroenterol* 2000;6:239-243
- 2 Wen SJ, Xiang KJ, Huang ZH, Zhou R, Qi XZ. Construction of HBV specific ribozyme and its recombinant with HDV and their cleavage activity in vitro. *World J Gastroenterol* 2000;6:377-380
- 3 Huang ZH, Zhuang H, Lu S, Guo RH, Xu GM, Cai J, Zhu WF. Humoral and cellular immunogenicity of DNA vaccine based on hepatitis B core gene in rhesus monkeys. *World J Gastroenterol* 2001;7:102-106
- 4 Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000;192:921-930
- 5 Fang JN, Jin CJ, Cui LH, Quan ZY, Choi BY, Ki MR, Park HB. A comparative study on serologic profiles of virus hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:107-110
- 6 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
- 7 Liu HB, Meng ZD, Ma JC, Han CQ, Zhang YL, Xing ZC, Zhang YW, Liu YZ, Cao HL. A 12 year cohort study on the efficacy of plasma-derived hepatitis B vaccine in rural newborns. *World J Gastroenterol* 2000;6:381-383
- 8 Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2000;74:4165-4173
- 9 Li H, Li RC, Liao SS, Yang JY, Zeng XJ, Wang SS. Persistence of hepatitis B vaccine immune protection and response to hepatitis B booster immunization. *World J Gastroenterol* 1998;4:493-496
- 10 Zhuang L, You J, Tang BZ, Ding SY, Yan KH, Peng D, Zhang YM, Zhang L. Preliminary results of Thymosin- α versus interferon- α treatment in patients with HBeAg negative and serum HBV DNA positive chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:407-410
- 11 He XS, Huang JF, Chen GH, Fu Q, Zhu XF, Lu MQ, Wang GD, Guan XD. Ortho topic liver transplantation for fulminant hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2000;6:398-399
- 12 Zeng XJ, Yang GH, Liao SS, Chen AP, Tan J, Huang ZI, Li H. Survey of coverage, strategy and cost of hepatitis B vaccination in rural and urban areas of China. *World J Gastroenterol* 1999;5:320-323
- 13 McClary H, Koch R, Chisari FV, Guidotti LG. Inhibition of hepatitis B virus replication during schistosoma mansoni infection in transgenic mice. *J Exp Med* 2000;192:289-294
- 14 Heise T, Guidotti LG, Cavanaugh VJ, Chisari FV. Hepatitis B virus RNA-binding proteins associated with cytokine-induced clearance of viral RNA from the liver of transgenic mice. *J Virol* 1999;73:474-481
- 15 Heise T, Guidotti LG, Chisari FV. Characterization of nuclear RNases that cleave hepatitis B virus RNA near the La protein binding site. *J Virol* 2001;75:6874-6883
- 16 Yan JC, Ma JY, Pan BR, Ma LS. Studies on virus hepatitis B in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:611-616
- 17 Liu QM, Fu JR, Zhang HQ, Wang FX, Gong ZI, Zhang RY, Zhang SL. Clinical studies of Chinese drug ganshuning on chronic hepatitis and hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1096-1098
- 18 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- 19 Liao SS, Li RC, Li H, Yang JY, Zeng XJ, Gong J, Wang SS, Li YP, Zhang KL. Long term efficacy of plasma-derived hepatitis B vaccine among Chinese children: a 12-year follow up study. *World J Gastroenterol* 1999;5:165-166
- 20 Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, Li JX, Dai DS, Wang XM, Zhang SZ, Yu HY, Sun W, Hao GR. Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (adr subtype) genomes. *World J Gastroenterol* 2001;7:111-114
- 21 Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999;284:825-829
- 22 Tang RX, Gao FG, Zeng LY, Wang YW, Wang YL. Detection of HBV DNA and its existence status in liver tissues and peripheral blood lymphocytes from chronic hepatitis B patients. *World J Gastroenterol* 1999;5:359-361
- 23 Wang JY, Wang XL, Liu P. Detection of serum TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-8 in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 1999;5:38-40
- 24 Pasquetto V, Wieland S, Chisari FV. Intracellular hepatitis B virus nucleocapsids survive cytotoxic T-lymphocyte-induced apoptosis. *J Virol* 2000;74:9792-9796
- 25 Guidotti LG, Borrow P, Brown A, McClary H, Koch R, Chisari FV. Noncytotoxic clearance of lymphocytic choriomeningitis virus from the hepatocyte. *J Exp Med* 1999;189:1555-1564
- 26 Fang DX, Li FQ, Tan WG, Chen HB, Jin HY, Li SQ, Lin HJ, Zhou ZX. Transient expression and antigenic characterization of HBsAg of HBV nt551 A to G mutant. *World J Gastroenterol* 1999;5:73-74
- 27 Wang Y, Liu H, Zhou Q, Li X. Analysis of point mutation in site 1896 of HBV precore and its detection in the tissues and serum of HCC patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:395-397
- 28 Hu YP, Yao YC, Li JX, Wang XM, Li H, Wang ZH, Lei ZH. The cloning of 3'-truncated preS/S₁ gene from HBV genomic DNA and its expression in transgenic mice. *World J Gastroenterol* 2000;6:734-737
- 29 Chen K, Han BG, Ma XK, Zhang HQ, Meng L, Wang GH, Xia F, Song XG, Ling SG. Establishment and preliminary use of hepatitis B virus preS1/2 antigen assay. *World J Gastroenterol* 1999;5:550-552
- 30 Hong Y, Cheng J, Dong J, Li K, Wang L, Wang G, Liu Y. Experimental study on the immune responses in H-2b mice immunized by recombinant HBsAg vaccine and DNA vaccines of HBV envelope genes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:137-140
- 31 Han P, Liu Y, Cheng J, Wang G, Lu YY, Li K, Li L. The expression of oncogene c-myc upregulated by c-terminally truncated middle surface protein of hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:141-144
- 32 Lu YY, Li K, Cheng J, Wang L, Liu Y, Duan HJ, Zhang LX. Cloning and expression of hepatitis B virus X gene in yeast. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2002;10:15-18
- 33 Wu W, Zhang S, Wu YL, Ye J, Xi RP. Relationship between insulin-like growth factor I and liver function and number connection test. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1391-1394
- 34 Li D, Zhang LJ, Chen ZX, Huang YH, Wang XZ. Effects of TNF α , IL-6 and IL-10 on the development of experimental rat liver fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1242-1245
- 35 He Y, Zhou J, Dou KF. Construction of hepatocyte growth factor expression vector and detection of expression in human hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1143-1146
- 36 Qin JM, Zhang YD. Expression of eNOS and iNOS in rats of acute liver failure. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:1003-1007
- 37 Han JQ, Hu C, Liu SX, Xiu HM, Xu Z, Hu DR. The mechanism of the Chinese herbal compound in protecting hepatocyte in vitro. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:902-906
- 38 Jiang YG, Wang YM, Li QF. Expression and significance of HLA-DR antigen and heat shock protein 70 in chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:907-910
- 39 Yan JC, Chen WB, Ma Y, Tian RX, Ding TL, Xu CJ. Relationship between transforming growth factor beta-1 and vascular diseases in hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:751-754
- 40 Zhang XL, Yao XX, Li YJ, Wang LF. Effect of high-dose vitamin C on hepatic function and cell immunity in patients with liver cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:649-652
- 41 Bai Y, Cao ZC, Zhuang JJ, Gou LY, Liu JD, Song YG. Protective effect of phlebotomy in experimental liver damage. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:149-152
- 42 Shi H, Wang FS. Host factors in chronicity of hepatitis B virus infection and their significances in clinic. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:66-69
- 43 Lau GK. Hepatitis B infection in China. *Clin Liver Dis* 2001;5:361-379
- 44 Li J, Tang B. Effect on replication of hepatitis B virus by Chinese traditional medicine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:945-946
- 45 Farrell G. Hepatitis B antigen seroconversion: effects of lamivudine alone or in combination with interferon alpha. *J Med Virol* 2000;61:374-379
- 46 Liu J, McIntosh H, Lin H. Chinese medicinal herbs for chronic hepatitis B: a systematic review. *Liver* 2001;21:280-286
- 47 Wang JP, Li XH, Zhu Y, Wang AL, Lian JQ, Jia ZS, Xie YM. Detection of serum sIL-2R, IL-6, IL-8, TNF- α and lymphocytes subsets, mIL-2R in patients with chronic hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:763-766
- 48 Li CP, Wang KX, Wang J, Pan BR. mIL-2R, T cell subsets & hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2002;8:298-300

蛋白激酶C对肾小球前小动脉平滑肌细胞I型IP₃受体表达影响

王静艳,刘沛,韩峰

王静艳,刘沛,韩峰,中国医科大学附属第二医院感染科 辽宁省沈阳市110004
王静艳,女,1963-11-20生,辽宁省开原县人,汉族。1986年中国医科大学本科毕业,1992年中国医科大学硕士研究生毕业,副教授。主要从事慢性肝病及并发症的发生机制和治疗研究。
国家自然科学基金资助, No.39870337
项目负责人:刘沛,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感染科。syliupe@yahoo.com
电话:024-83956962 传真:024-23891793
收稿日期:2002-09-13 接受日期:2002-10-03

Effects of protein kinase C on type I inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor expression in smooth muscle cells of rat glomerular afferent arterioles

Jing-Yan Wang, Pei Liu, Feng Han

Jing-Yan Wang, Pei Liu, Feng Han, Department of Infectious Disease, No 2 Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Supported by the Natural Scientific Foundation of China, No. 39870337
Correspondence to: Dr. Pei Liu, Department of Infectious Disease, No 2 Affiliated Hospital, China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. syliupe@yahoo.com
Received: 2002-09-13 Accepted: 2002-10-03

Abstract

AIM: To investigate the effects of protein kinase C (PKC) on type I inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor (IP₃ R) expression in rat glomerular afferent arterioles smooth muscle cells (RASM) treated with TNF- α .

METHODS: RASM were isolated and cultured from rats, type I IP₃ R mRNA in RASM treated with TNF- α and PKC activator or TNF- α and PKC inhibitor or PKC activator or PKC inhibitor were detected by Northern blot.

RESULTS: TNF- α enhanced the expression of type I IP₃ R mRNA in RASM; PKC inhibitor significantly inhibited the expression of type I IP₃ R mRNA induced by TNF- α (14 814.0 \pm 2 029.9, 11 334.0 \pm 1 104.9, $P < 0.05$). PKC activator significantly enhanced the expression of type I IP₃ R mRNA in RASM treated without TNF- α (22 554.5 \pm 2 625.2, 28 128.0 \pm 3 698.6, $P < 0.05$). PKA inhibitor could not inhibit the expression of type I IP₃ R mRNA induced by TNF- α .

CONCLUSION: TNF- α plays a role in signal transduction in RASM. TNF- α may act as the promoter of type I IP₃ R mRNA in RASM or activates PKC that results in the expression of type I IP₃ R protein. PKC and IP₃ promote releasing of intracellular Ca²⁺ in RASM, inducing RASM constrict. The renal blood flow diminution is involved in the development of renal dysfunction.

Wang JY, Liu P, Han F. Effects of protein kinase C on type I inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor expression in smooth muscle cells of rat glomerular afferent arterioles. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(6):705-707

摘要

目的:探讨蛋白激酶C(PKC)对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)引起的肾小球前小动脉平滑肌细胞(RASM)内I型三磷酸肌醇(IP₃)受体mRNA过度表达的影响。

方法:通过对 RASM 的分离、培养,应用核酸杂交技术分别检测在 TNF- α 和 PKC 抑制剂、TNF- α 和 PKA 抑制剂及 PKC 激动剂作用下, RASM 内 I 型 IP₃ 受体 mRNA 的表达情况。

结果:TNF- α 促进 RASM 内 I 型 IP₃ 受体 mRNA 表达增加; PKC 抑制剂明显抑制 TNF- α 诱导的 I 型 IP₃ 受体 mRNA 过度表达的作用 (14 814.0 \pm 2 029.9, 11 334.0 \pm 1 104.9, $P < 0.05$); PKC 激动剂能增强 RASM 内 I 型 IP₃ 受体 mRNA 表达 (22 554.5 \pm 2 625.2, 28 128.0 \pm 3 698.6, $P < 0.05$); PKA 抑制剂-H₈₉ 不影响 TNF- α 诱导 I 型 IP₃ 受体 mRNA 的表达。

结论: TNF- α 影响细胞内储备 Ca²⁺ 释放信息传递系统可能通过激活 PKC 作用于 I 型 IP₃ 受体基因,使 I 型 IP₃ 受体 mRNA 合成增加,导致 I 型 IP₃ 受体蛋白过度表达,参与促进 RASM 内储备 Ca²⁺ 大量释放至胞质,引起肾小球前小动脉平滑肌收缩,使肾血流量减少,肾小球滤过率下降,导致肾功能异常。

王静艳,刘沛,韩峰. 蛋白激酶C对肾小球前小动脉平滑肌细胞I型IP₃受体表达影响. 世界华人消化杂志 2003;11(6):705-707

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/705.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子- α (TNF- α)在许多疾病发生中起重要作用^[1-3],是引起重型肝炎发生的重要因子^[4]。当重型肝炎患者出现肝肾综合征(HRS)后,预后极差。最近研究^[5]报告, TNF- α 可以诱导肾小球前小动脉平滑肌细胞(RASM)内I型三磷酸肌醇(IP₃)受体过度表达,这可能是 HRS 发生的病理生理学基础。我们观察 RASM 在 TNF- α 、蛋白激酶C(PKC)抑制剂和激动剂的作用下,细胞内I型IP₃受体mRNA表达水平,探讨TNF- α 引起I型IP₃受体mRNA过度表达机制。

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar, ♂大鼠,8周龄,体质量150 g,由中国医科大学动物中心提供。TNF- α 、细胞培养液

RPMI1 640、胎牛血清及谷氨酰胺等购于 Sigma 公司。 α -肌动蛋白和肌浆蛋白重链 SM-1 和 SM-2 单克隆抗体购于 Dako 公司。蛋白激酶 C 抑制剂(bisindolylmaleimide, GFX)、蛋白激酶 C 激动剂(phorbol myristate acetate, PMA)和蛋白激酶 K 抑制剂(dihydrochloride, H_{89})购于 Calbiochem 公司。

1.2 方法 肾小球前小动脉平滑肌细胞(RASMC)的分离、培养和鉴定参照 Zhu et al (Am J Physiol 1996;271:f1237)的方法,应用第3-4代 RASMC 进行实验。每次实验用从一只大鼠分离的 RASMC 进行,共重复3次实验。培养细胞长至一单层细胞时进行实验。每次实验分别设 TNF- α (100 μ g/L)同时添加 GFX(10 nmol/L)和 H_{89} (2 μ mol/L) 2组,以添加 TNF- α 为对照组。另外,设添加 PMA (100 μ g/L)组和未添加组。均在培养8h收集 RASMC,用硫氰酸胍裂解经 TNF- α 和 PKC 抑制剂、激动剂和 PAK 抑制剂处理的 RASMC,用酚-氯仿抽提细胞内总 RNA, -80 $^{\circ}$ C 保存待用。根据 Nakagawa et al (Proc Natl Sci USA 1991; 88:6244)报告的 I 型 IP_3 受体 cDNA 全序列设计。引物选自 I 型 IP_3 受体基因 SII(splice domain of the type I IP_3 R)区段的上下游序列(5'-CGTGGATGTTCTACACAGACCAG-3')和(5'-TTGGAAGTCTTGAAGAGACTA-3'),由中国科学院上海生物研究所合成。按照 Sharma et al (J Biol Chem 1997; 272:14617)报告的方法制备 I 型 IP_3 受体 cDNA 探针。将 -80 $^{\circ}$ C 保存的 RNA 室温溶解后取 20 μ g 加入琼脂糖凝胶后电泳,转膜,用 32 P 标记的 I 型 IP_3 受体 cDNA 探针进行杂交、洗膜,自显影,获得 I 型 IP_3 受体 mRNA 特异性电泳带。然后洗膜去掉核素,用 RNA 的 18S cDNA 作为探针进行 2 次杂交,获得 18S 特异电泳带作为内参。应用 Scion Image 图像分析软件对扫描获得的核酸杂交图像进行量化,然后用质控内参排除操作误差,进行样本标准化处理。计算方法如下:标准化的样本数值=样本量化数值-同一样本内参的量化数值。

统计学处理 将各次应用 Scion Image 图像分析软件扫描所得各组标准化的样本数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间数据用方差分析进行比较,当 $P < 0.05$ 时为有显著性。

2 结果

当 RASMC 暴露 TNF- α (100 μ g/L) 8 h, RASMC 内 I 型 IP_3 受体蛋白为 TNF- α 非添加组的 1.68 倍, I 型 IP_3 受体 mRNA 为 0 暴露时间组的 1.38 倍^[5]。为探讨 TNF- α 诱导 RASMC 内 I 型 IP_3 受体过度表达的机制,我们应用 PKC 抑制剂(GFX)、PKC 激动剂(PMA)和蛋白激酶 K 抑制剂(H_{89})观察在 TNF- α 作用下, GFX、PMA 和 H_{89} 对 RASMC 内 I 型 IP_3 受体 mRNA 表达的影响。

2.1 PKC 抑制剂的影响 当将 GFX(10 nmol/L)和 TNF- α 同时加入 RASMC 进行培养,8 h 后检测 I 型 IP_3 受体 mRNA,经 Scion Image 图像分析软件对图片扫描, GFX 添加组 IP_3 受体 mRNA 水平为 $11\ 334.0 \pm 1\ 104.9$, 明显低于非添加组 $14\ 814.0 \pm 2\ 029.9$, 为对照组的 76.5 % (对

照组为 100 %), 两组之间比较有显著差异($P < 0.05$), 说明 GFX 具有抑制 TNF- α 诱导 RASMC 内 I 型 IP_3 受体 mRNA 过度表达的作用。

2.2 PKC 激动剂的影响 当将 PMA(100 μ g/L)加入 RASMC 进行培养,8 h 后检测 I 型 IP_3 受体 mRNA 水平, PMA 添加组 I 型 IP_3 受体 mRNA 表达增加($28\ 128.0 \pm 3\ 698.6$), 与对照组($22\ 554.5 \pm 2\ 625.2$)(100 %)相比较为 124.7 %; 两组之间比较有显著差异($P < 0.05$), 说明 PMA 能增强 RASMC 内 I 型 IP_3 受体 mRNA 表达水平。

当将 H_{89} (2 μ mol/L)和 TNF- α 同时加入 RASMC 进行培养,8 h 后检测 I 型 IP_3 受体 mRNA,未发现 H_{89} 对 TNF- α 增强 RASMC 内 I 型 IP_3 受体 mRNA 表达的影响。

3 讨论

肝硬化、肝癌和重型肝炎常并发 HRS^[6]。肾血流减少,肾小球滤过率降低,是引起急性肾功能衰竭的主要原因,而肾小球前小动脉的收缩和舒张功能的状态直接影响着肾血流和肾小球滤过率。肾小球前小动脉的收缩和舒张受着细胞内 Ca^{2+} 的调节。当细胞膜上的受体接受某些特异性物质刺激后,细胞内出现 IP_3 水平增高,而增高的 IP_3 与 IP_3 受体结合后导致细胞内储备 Ca^{2+} 释放,使效应细胞发生生物反应^[7]。众所周知,一些血管活性物质,如内皮素^[8]、血管紧张素 II、血管加压素^[9]和白三烯^[10]等均能提高细胞内 Ca^{2+} 释放,引起细胞收缩,其主要机制是刺激细胞内 IP_3 水平增高。许多临床研究证明^[11,12]: HRS 患者血清中许多血管活性物质明显增高,并认为是导致 HRS 时肾血流量减少和肾小球滤过率下降的主要原因^[13]。但是,临床上应用血管活性物质拮抗剂治疗 HRS 未得到良好效果,提示导致 HRS 时肾血流量减少和肾小球滤过率下降发生可能还通过其他途径。最近研究发现,细胞因子可以诱导许多细胞内的第二信使及其受体过度表达。TGF- β 可以抑制肾系膜细胞内 I 型 IP_3 受体表达,并抑制血管紧张素 II 刺激细胞内储备 Ca^{2+} 释放;重型肝炎患者血清中 TNF- α 明显升高^[4],是肝坏死发生的重要因子。TNF- α 可以通过活化 Fas 引起心肌细胞内 IP_3 水平增高,诱导其细胞凋亡^[14]。 IP_3 受体家族在鼠的肾脏上广泛存在, I 型和 III 型 IP_3 受体主要存在于血管壁细胞内,尤其是血管平滑肌细胞^[15]。TNF- α 可以诱导 RASMC 内 I 型 IP_3 受体蛋白表达增加。过度表达的 I 型 IP_3 受体为 RASMC 内储备 Ca^{2+} 大量释放提供了可能性^[5]。但是,细胞内储备 Ca^{2+} 大量释放又受其他细胞内第二信使(如 DAG-PKC)的影响。PKC 抑制剂可以使血管肌原性张力降低,而 PKC 激动剂则使血管张力增高^[16]。这可能是由于 PKC 引起 IP_3 受体磷酸化,动员细胞内储备 Ca^{2+} 大量释放所致^[17]。活化的 PKC 可以介导 TNF- α 对肠上皮细胞的损伤作用^[18]。我们的研究发现, PKC 抑制剂 - GFX 可以明显抑制 TNF- α 诱导的 RASMC 内 I 型 IP_3 受体的过度表达;而 PKA 抑制剂 - H_{89} 无此作用; PKC 激动剂 - PMA 能增强 RASMC

内 I 型 IP₃ 受体 mRNA 表达水平. 在许多生理反应过程中, 需要 IP₃ - Ca²⁺ 和 DAG - PKC 两条信号途径同时参与并协调作用, 尤其是一些细胞对激动剂产生持久反应时, PKC 与 IP₃ 的协同作用更为突出. 我们的结果提示: TNF- α 诱导的 RSMC 内 I 型 IP₃ 受体的过度表达可能是通过所活化的 PKC 作用于 I 型 IP₃ 受体的基因促使 I 型 IP₃ 受体 mRNA 过度表达. 肾血流量受肾小球前小动脉收缩和舒张的控制, 而血管平滑肌细胞内 Ca²⁺ 水平高低与肾小球前小动脉的舒张收缩功能直接相关. 所以, RSMC 内 I 型 IP₃ 受体表达增加和 PKC 的正反馈作用可能是血管活性物质引起细胞内储备 Ca²⁺ 释放入胞质, 促进肾小球前小动脉发生异常收缩的病理生理基础.

由此可见, TNF- α 在重型肝炎并发肾功能衰竭中起到一定作用, 其作用机制是参与了细胞内的信息传递系统的变化. TNF- α 可能是通过直接增强 I 型 IP₃ 受体的 mRNA 表达或通过所活化的 PKC 作用于 I 型 IP₃ 受体的基因促使 I 型 IP₃ 受体过度表达, 由此导致 I 型 IP₃ 受体蛋白表达增加. 为重型肝炎、肝硬化患者血中高浓度的内皮素和血管紧张素 II 刺激 RSMC 内 IP₃ 水平增高, 引起大量储存 Ca²⁺ 迅速释放入胞质, 致肾小球前小动脉发生异常收缩, 肾血流量减少, 肾小球滤过率降低, 肾功能衰竭发生提供了病理生理学基础.

4 参考文献

- 1 Wang JY, Wang XL, Liu P. Detection of serum TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-8 in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 1999;5:38-40
- 2 臧国庆, 俞红, 周霞秋, 廖丹, 谢青, 王斌. TNF- α 体外介导小鼠肝细胞凋亡和坏死. *世界华人消化杂志* 2000;8:303-306
- 3 董满库, 崔彦, 陈昌玮, 周立艳, 刘子沛, 李晓鸥, 吉敏. 大鼠肝脏缺血再灌注损伤中 TNF- α 的变化. *世界华人消化杂志* 2001;9:354-355
- 4 Muto Y, Nouri-Aria KT, Meager A, Alexander GJ, Eddleston AL, Williams R. Enhanced tumor necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* 1988;2:72-74
- 5 王静艳, 孙锦春, 吕颀, 刘沛. 肿瘤坏死因子- α 增强大鼠肾小球前小动脉平滑肌细胞内 I 型三磷酸肌醇受体的表达. *中华内科杂志* 2002;41:86-89
- 6 Bataller R, Gines P, Guevara M, Arroyo V. Hepatorenal syndrome. *Semin Liver Dis* 1997;17:233-247
- 7 Michikawa T, Hamanaka H, Otsu H, Yamamoto A, Miyawaki A, Furuichi T, Tashiro Y, Mikoshiba K. Transmembrane topology and sites of N-glycosylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 1994;269:9184-9189
- 8 Badr KF, Murray JJ, Breyer MD, Takahashi K, Inagami T, Harris RC. Mesangial cell, glomerular and renal vascular response to endothelin in the rat kidney. Elucidation of signal transduction pathways. *J Clin Invest* 1989;83:336-342
- 9 Arroyo V, Gines P, Jimenez W. Ascites, renal failure and electrolyte disorders in cirrhosis. Pathogenesis, diagnosis and treatment, in oxford textbook of clinical hepatology, edited by mcintyre N, Benhamou JP, Bircher J. Oxford Med Publications, 1991:pp429-470
- 10 Moore K, Taylos GW, Maltby NH, Siegers D, Fuller RW, Dollery CT, Williams R. Increased production of cysteinyl leukotrienes in hepatorenal syndrome. *J Hepatol* 1990;11:263-271
- 11 Moller S, Emmeluth C, Henriksen JH. Elevated circulating plasma endothelin-1 concentrations in cirrhosis. *J Hepatol* 1993;19:285-290
- 12 Lloch J, Gines P, Arroyo V, Salmeron MJ, Gines A, Jimenez W, Gaya J, Rivera F, Rodes J. Effect of dipyridamole on kidney function in cirrhosis. *Hepatology* 1993;17:59-64
- 13 Anand R, Harry D, Holt S, Milner P, Dashwood M, Goodier D, Jarmulowicz M, Moore K. Endothelin is an important determinant of renal function in a rat model of acute liver and renal failure. *Gut* 2002;50:111-117
- 14 Woodcock EA, Matkovich SJ, Binah O. Ins(1,4,5)P₃ and cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res* 1998;40:251-256
- 15 Fujimoto T, Nakade S, Miyawaki A, Mikoshiba K, Ogawa K. Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol* 1992;119:1507-1513
- 16 Osol G, Laher I, Cipolla M. Protein kinase C modulates basal myogenic tone in resistance arteries from the cerebral circulation. *Circ Res* 1991;68:359-367
- 17 Witche DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem* 1991;266:11144-11152
- 18 Chang Q, Tepperman BL. The role of protein kinase C isozymes in TNF-alpha-induced cytotoxicity to a rat intestinal epithelial cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G572-583

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

• 编委来信 •

编辑:您好!

我写的关于溃疡性结肠炎分型治疗的 3 篇文章被国内影响因子排名第一的《世界华人消化杂志》录用, 非常荣幸和感谢. 现将和这 3 篇文章相关的述评《重视溃疡性结肠炎的诊断和个体化规范化治疗》寄去, 请按有关规定审阅.

我的关于溃疡性结肠炎动物模型、发病机制、诊断和治疗的一系列研究论文主要发表在《世界华人消化杂志》和《World Journal of Gastroenterology》上, 现在已经获得全军科技进步奖 2 项, 中英国际合作课题、山东省卫生厅课题和济南军区课题各一项, 《溃疡性结肠炎的现代诊疗和进展》一书也将于年内出版, 我也被邀请到国内许多城市作相关报告. 所有这些成绩取得, 都和杂志的一贯支持分不开, 再次表示衷心感谢. 而我也将一如既往关心、支持、宣传和爱护杂志, 共同发展和提高.

江学良 2003-05-19

抗肝癌单链免疫毒素基因修饰的PBMCs在动物体内的抑瘤作用

程虹,刘彦仿,张惠中,沈万安,张菊,张静

程虹,刘彦仿,张静,中国人民解放军第四军医大学西京医院病理科
陕西省西安市 710033
张惠中,沈万安,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军骨肿瘤研
究所 陕西省西安市 710038
张菊,中国人民解放军第四军医大学基础部生物化学教研室
陕西省西安市 710033
程虹,女,1967-06-24生,安徽省宣州市人,汉族,病理学博士,讲师。
军队“九·五”重点补充课题, No.98M098
项目负责人:刘彦仿,710033,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学西
京医院病理科。 yfliu@fmmu.edu.cn
电话:029-3375497
收稿日期:2002-12-23 接受日期:2003-01-02

In vivo antitumour activity of PBMCs via genetic modification of single-chain immunotoxin

Hong Cheng, Yan-Fang Liu, Hui-Zhong Zhang, Wan-An Shen,
Ju Zhang, Jing Zhang

Hong Cheng, Yan-Fang Liu, Jing Zhang, Department of Pathology,
Xijing Hospital Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi
Province, China
Hui-Zhong Zhang, Wan-An Shen, Orthopaedics Oncology Institute of
Chinese PLA, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University,
Xi'an 710038, Shaanxi Province, China
Ju Zhang, Department of Biochemistry, Fourth Military Medical
University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China
Supported by Army Ninth Five Key Project, No.98M098
Correspondence to: Yan-Fang Liu, Department of Pathology, Xijing
Hospital Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi
Province, China. yfliu@fmmu.edu.cn
Received: 2002-12-23 Accepted: 2003-01-02

Abstract

AIM: To investigate *in vivo* antitumour activity of single-chain immunotoxin (sFv-TNF- α fusion protein).

METHODS: HCC-specific killer cells were generated by transducing the recombinant retroviral virus in supernatant of the virus producing cells (C₂₂) into human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). SMMC-7721 xenograft nude mice were given iv either 1×10^6 (0.2 mL) transduced or mock-transduced PBMCs once five days for three weeks and tumour growth was detected.

RESULTS: Tumour growth were (20.8 \pm 4.9) mg/d in PBMCs/PST group and (28.5 \pm 6.7)mg/d in PBMCs/ pLXSN group, with a significant difference ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Genetic modification of PBMCs by single-chain immunotoxin has antitumour activity *In vivo*.

Cheng H, Liu YF, Zhang HZ, Shen WA, Zhang J, Zhang J. *In vivo* antitumour activity of PBMCs via genetic modification of single-chain immunotoxin. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(6):708-711

摘要

目的:用携带分泌型抗肝癌单链免疫毒素基因(sFv-TNF- α)的重组逆转录病毒感染人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs),使其表达并分泌针对人肝癌细胞的sFv-TNF- α 融合蛋白,观察转导的PBMCs/PST静脉注射后对荷肝癌裸鼠的抑瘤作用。

方法:分离正常人PBMCs并用PHA和IL-2进行体外刺激培养,用感染性重组病毒产生细胞C₂₂(PA317/PST)产生的病毒上清转导后,经尾静脉输入荷肝癌裸鼠体内,注射细胞数为每只 1×10^6 (0.2 mL),每5 d注射1次,共注射3次。定期观察记录肿瘤生长情况,注射3次后处死,取出瘤组织称质量、记录,进行统计学处理,并制备石蜡切片进行常规HE染色及免疫组化染色观察。

结果:实验组肿瘤生长速率为(20.8 \pm 4.9) mg/d,对照组为(28.5 \pm 6.7) mg/d,经t检验, $P < 0.05$ 。

结论:经重组逆转录病毒转导的PBMCs/PST在裸鼠体内对人肝癌细胞系SMMC-7721移植瘤具有一定的生长抑制作用。

程虹,刘彦仿,张惠中,沈万安,张菊,张静. 抗肝癌单链免疫毒素基因修饰的PBMCs在动物体内的抑瘤作用. 世界华人消化杂志 2003;11(6):708-711
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/708.asp>

0 引言

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是人类常见的恶性肿瘤之一, 有较高的发病率和死亡率, 历有癌王之称. 其多发生于亚洲、非洲和地中海流域, 全世界每年约有100多万患者死于肝癌, 其中我国就有11万人^[1-7], 且发病率有上升的趋势. 迄今为止, 肝癌的病因和发病机制仍不十分清楚, 更无理想的治疗手段^[8-18]. 随着现代分子生物学和免疫学的发展, 自1990年代初迄今, 已有百余项肿瘤基因治疗方案获准进入临床试验, 但临床疗效与预期的目标之间还存在较大差距, 原因之一就是肿瘤细胞的特异性识别尚未解决. 肿瘤特异性单链抗体的问世为基因治疗靶向性问题的解决提供了新的手段, 近年来成为肿瘤免疫基因治疗中的热点, 目前已有多种单链免疫毒素基因治疗计划进入临床试验^[19-27]. 我们在成功克隆抗肝癌单链抗体基础上, 将其与TNF- α 基因相连构建成分泌型抗肝癌单链免疫毒素基因, 细胞学实验表明, 该重组基因转入

人外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)后可表达并分泌具有特异性结合活性的抗肝癌 sFv-TNF- α 融合蛋白, 后者对体外培养的肝癌细胞具有杀伤作用. 为进一步观察分泌型抗肝癌单链免疫毒素在体内的生物学作用, 我们用携带分泌型抗肝癌单链免疫毒素基因的逆转录病毒产生细胞 C₂₂ 的上清转导人 PBMCs, 观察转导的 PBMCs /PST 静脉注射后对荷肝癌裸鼠的抑瘤作用.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系 SMMC-7721 为本室保存, RPMI1640 常规传代培养. 转染的逆转录病毒产生细胞系 C₂₂ 由本室构建^[28], 用 DMEM 常规传代培养. DMEM, G418, SuperscriptTM 逆转录试剂盒和 Trizol Reagent 为 Gibco 公司产品, Polybrene 为 Sigma 公司产品, MTT 为 Serva 公司产品, PHA 购自 Sigma 公司, 超级小牛血清购自杭州四季青生物工程材料研究所. 重组人 IL-2 为上海生物技术研究所产品. 淋巴细胞分离液购自上海试剂二厂.

1.2 方法^[28-30] 消化对数生长期的 SMMC-7721 细胞, 无血清 RPMI1640 培养液洗涤 2 次, 计数活细胞数, 调整细胞数, 将细胞重悬于 PBS 中. 在无菌条件下, 将 0.2 mL 细胞悬液接种于裸鼠胸部皮下, 含活细胞数为每只 5×10^6 , 共 10 只. 接种后置无特殊病原体饲养室饲养, 定期观察记录肿瘤生长情况. 抽取正常人外周血 50 mL, 肝素抗凝, 加入淋巴细胞分离液 50 mL, 室温 1 400 g 离心 30 min, 吸取单个核细胞层悬液, 40 mL 无血清 RPMI1640 洗涤细胞 3 次(1 000 g 离心 10 min), 计数, 用含 200 mL/L 小牛血清的完全 RPMI1640 培养液稀释为活细胞 1×10^9 /L, 加入 5×10^5 /L IL-2 及 5×10^3 μ g/L PHA, 于 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 培养 3 d, 换含 5×10^5 /L IL-2, 200 mL/L 小牛血清的完全 RPMI1640 培养液继续培养 3 d 后, 进行逆转录病毒的转导. 用 C₂₂ 细胞制备重组逆转录病毒上清, 取 C₂₂ 细胞上清(不含 G418) 5 mL 及 8 mg/L Polybrene 感染 1×10^6 个 PBMCs, 置 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂ 孵箱内培养 6 h, 换普通完全 RPMI1640 培养液, 连续感染 3 d, 转导的 PBMCs 命名为 PBMCs/PST. 对照组 PBMCs 用 PA317/pLXSN(空白载体)细胞上清感染, 转导的 PBMCs 命名为 PBMCs/pLXSN. 接种 7 d 的荷肝癌裸鼠随机分为实验组 5 只和对照组 5 只. 分别离心收集连续感染 3 d 的 PBMCs/PST 和 PBMCs/pLXSN 细胞, 计数, 无血清 RPMI1640 培养液洗涤 2 次后重悬于生理盐水, 从尾静脉注射入裸鼠体内, 实验组注射 PBMCs/PST, 对照组注射 PBMCs/pLXSN, 注射细胞数为每只 1×10^6 (0.2 mL), 每 5 d 注射 1 次, 共注射 3 次. 注射后置无特殊病原体饲养室饲养, 定期观察记录肿瘤生长情况. 注射 3 次后处死各组荷瘤裸鼠, 取出瘤组织称重、记录, 进行统计学处理, 并固定, 制备石蜡切片, 常规 HE 染色、免疫组化染色观察.

2 结果

2.1 荷肝癌裸鼠模型的建立 接种人肝癌细胞系 SMMC-7721 的 10 只裸鼠 7 d 后均成瘤, 移植瘤直径约为 0.58 cm.

2.2 PBMCs/PST 的体内抑瘤作用 经尾静脉注射 PBMCs/PST 3 次后, 肉眼观察接种 SMMC-7721 细胞的实验组裸鼠移植瘤体积较小, 处死后取出瘤组织称质量并计算肿瘤生长速率, 实验组为 (20.8 ± 4.9) mg/d, 对照组为 (28.5 ± 6.7) mg/d, 经 t 检验, $P < 0.05$. HE 染色可见肿瘤细胞呈巢状分布, 纤维组织分隔, 瘤细胞大小不等, 核大且深染, 核分裂相多见(图 1), 符合肝细胞肝癌的组织学形态. 以鼠抗人 TNF- α 多克隆抗体进行免疫组化染色, 可见瘤组织中少数细胞有强、弱不等的阳性信号, 分布于细胞膜上(图 2), 对照组肿瘤组织免疫组化染色未见阳性信号.

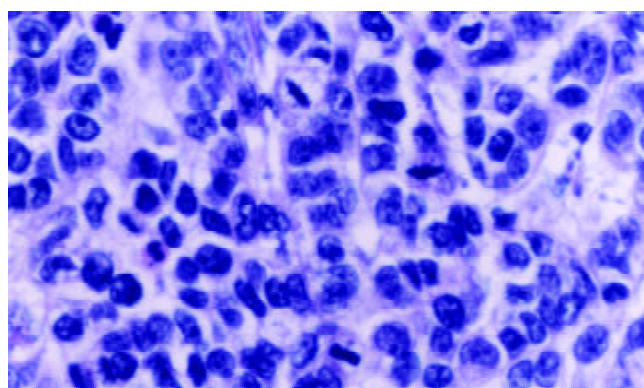


图 1 接种肝癌细胞 HHCC 的裸鼠移植瘤组织 HE 染色 $\times 400$.

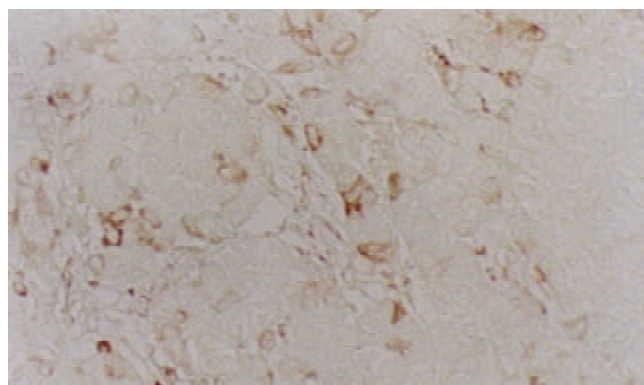


图 2 实验组裸鼠移植瘤免疫组化染色细胞膜阳性 $\times 400$.

3 讨论

要实现基因治疗的目的, 最终必须将目的基因转入靶细胞. 实现人类实体瘤基因治疗的途径主要有 2 种, (1) 在体靶细胞的转染(in vivo), 即直接基因治疗途径, 例如将细胞因子或肿瘤抗原的基因表达载体直接体内注射或将 MHC-I 基因直接注射入瘤体内等治疗肿瘤; (2) 离体靶细胞的转染(ex vivo), 即间接基因治疗途径, 必须分离并培养离体的靶细胞, 并在接受基因转移后移植回人体以治疗疾病, 例如应用体外基因修饰的 TIL、瘤苗、成纤维细胞等体内回输或接种的方法治疗肿瘤^[31-34]. 我们选择逆转录病毒介导的体外基因转移方法进行基

因治疗的研究, 要求基因转移的靶细胞既要容易获得, 又要容易回输到人体, 因此, 我们采用PBCs作为基因转移的靶细胞. 由于目前所常用的基因转移方法^[35-41] (包括逆转录病毒载体-包装细胞转移系统)效率均不高, 获得大量的靶细胞是重要的先决条件, 因此, 要求该细胞易于体外培养, 而且具有一定的分裂和增殖能力. 此外, 逆转录病毒载体对处于活跃分裂状态的细胞感染率和基因转移率较高, 而对未分化的分裂不十分活跃的细胞感染率和基因转移率较低, 因此, 基因治疗中应尽量选择处于活跃分裂状态的细胞作为靶细胞. PBCs具备上述的各项条件, 目前是一种较理想的基因治疗靶细胞^[42-44]. 虽然有研究表明, TIL抗肿瘤的活性是PBCs的50-100倍, 而且具有良好的肿瘤病灶趋向性和浸润性^[45-49], 但由于其不易分离和培养, 在某些肿瘤如肝癌中TIL数量极少, 无法满足基因治疗中反复操作的要求, 因而其应用受到很大的限制.

我们分离出正常人PBCs, 并用PHA和IL-2进行体外刺激培养, 用携带分泌型抗肝癌单链免疫毒素基因的重组逆转录病毒感染, 使其表达并分泌针对人肝癌细胞的sFv-TNF- α 融合蛋白, 再经尾静脉输入荷肝癌裸鼠体内, 观察转导的PBCs/PST对荷肝癌裸鼠体内肿瘤生长的抑制作用. 本实验结果表明, 经重组逆转录病毒转导的PBCs/PST在裸鼠体内对人肝癌细胞系SMMC-7721移植瘤具有一定的生长抑制作用, 这种抑瘤作用可能是由于转导的PBCs/PST作为外源目的基因的载体, 在体内能够不断表达并分泌针对人肝癌细胞的免疫毒素-TNF- α 融合蛋白, 这种靶向性融合蛋白分子在肝癌移植瘤局部富集, TNF- α 通过与肝癌细胞表面的受体结合而导致跨膜信号的传导, 表现出TNF- α 的生物学活性作用, 从而直接或间接发挥对肝癌细胞的抑制作用^[50-53]. 此外, PBCs/PST分泌的靶向性sFv-TNF- α 融合蛋白的抑瘤作用不仅针对原发灶肿瘤细胞, 而且对转移至身体任何部位甚至进入血管及淋巴管的肿瘤细胞同样具有生长抑制作用, 是集免疫、基因治疗、靶向治疗和过继免疫治疗为一体的一种新的免疫基因治疗方法, 为肝癌的靶向基因治疗提供一条新的途径.

4 参考文献

- Llovet JM, Fuster J, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;49:7-11
- Yang LJ, Wang WL. Preparation of monoclonal antibody against apoptosis-associated antigens of hepatoma cells by subtractive immunization. *World J Gastroenterol* 2002;8:808-814
- Wang FS, Liu MX, Zhang B, Shi M, Lei ZY, Sun WB, Du QY, Chen JM. Antitumor activities of human autologous cytokine-induced killer (CIK) cells against hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *World J Gastroenterol* 2002;8:464-468
- Zhang G, Long M, Wu ZZ, Yu WQ. Mechanical properties of hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:243-246
- Sun ZJ, Pan CE, Liu HS, Wang GJ. Anti-hepatoma activity of resveratrol *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2002;8:79-81
- El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma and hepatitis C in the

- united states. *Hepatology* 2002;36(Suppl 5):S74-83
- Liu WW. Etiological studies of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:93-95
- Li MS, Yuan AL, Zhang WD, Liu SD, Lu AM, Zhou DY. Dendritic cells *in vitro* induce efficient and special anti-tumor immune response. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:161-163
- Chen HB, Zhang JK, Huang ZL, Sun JL, Zhou YQ. Effects of cytokines on dendritic cells against human hepatoma cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:191-193
- Liu LH, Xiao WH, Yang JL. Effects of 5-Aza 2'-deoxycytidine on growth of human hepatocellular carcinoma cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:420-423
- Fu JM, Yu XF, Shao YF. Telomerase and primary liver cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:461-463
- Du QY, Wang FS, Xu DP, Liu H, Lei ZY, Liu MX, Wang YD, Chen JM, Wu ZZ. Cytotoxic effects of CIK against hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:863-866
- Llovet JM, Mas X, Aponte JJ, Fuster J, Navasa M, Christensen E, Rodes J, Bruix J. Cost effectiveness of adjuvant therapy for hepatocellular carcinoma during the waiting list for liver transplantation. *Gut* 2002;50:123-128
- Llovet JM, Sala M, Bruix J. Nonsurgical treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2000;6(6 Suppl 2):S11-15
- Bruix J, Llovet JM. Locoregional treatments for hepatocellular carcinoma. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999;13:611-622
- Xia SS. Current status of liver transplantation in China. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:645-646
- Chen HY, Liu WH, Qin SK. Induction of arsenic trioxide on apoptosis of hepatocarcinoma cell lines. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:532-535
- Ishikawa M, Yogita S, Miyake H, Fukuda Y, Harada M, Wada D, Tashiro S. Differential diagnosis of small hepatocellular carcinoma and borderline lesions and therapeutic strategy. *Hepatology* 2002;49:1591-1596
- Peipp M, Kupers H, Saul D, Schlierf B, Greil J, Zunino SJ, Gramatzki M, Fey GH. A recombinant CD7-specific single-chain immunotoxin is a potent inducer of apoptosis in acute leukemic T cells. *Cancer Res* 2002;62:2848-2855
- Ueno A, Arakawa F, Abe H, Matsumoto H, Kudo T, Asano R, Tsumoto K, Kumagai I, Kuroki M, Kuroki M. T-cell immunotherapy for human MK-1-expressing tumors using a fusion protein of the superantigen SEA and anti-MK-1 scFv antibody. *Anticancer Res* 2002;22:769-776
- Pennell CA, Erickson HA. Designing immunotoxins for cancer therapy. *Immunol Res* 2002;25:177-191
- Tur MK, Sasse S, Stocker M, Djabelkhir K, Huhn M, Matthey B, Gottstein C, Pfitzner T, Engert A, Barth S. An anti-GD2 single chain Fv selected by phage display and fused to Pseudomonas exotoxin A develops specific cytotoxic activity against neuroblastoma derived cell lines. *Int J Mol Med* 2001;8:579-584
- Matthey B, Engert A, Barth S. Recombinant immunotoxins for the treatment of Hodgkin's disease (Review). *Int J Mol Med* 2000;6:509-514
- Rosenblum MG, Horn SA, Cheung LH. A novel recombinant fusion toxin targeting HER-2/NEU-over-expressing cells and containing human tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 2000;15:88267-88273
- Vallera DA, Kuroki DW, Panoskaltsis-Mortari A, Buchsbaum DJ, Rogers BE, Blazar BR. Molecular modification of a recombinant anti-CD3epsilon-directed immunotoxin by inducing terminal cysteine bridging enhances anti-GVHD efficacy and reduces organ toxicity in a lethal murine model. *Blood* 2000;96:1157-1165
- Tsutsumi Y, Onda M, Nagata S, Lee B, Kreitman RJ, Pastan I. Site-specific chemical modification with polyethylene glycol of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) improves antitumor activity and reduces animal toxicity and immunogenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8548-8553
- Bera TK, Kennedy PE, Berger EA, Barbas CF, Pastan I. Specific killing of HIV-infected lymphocytes by a recombinant

- immunotoxin directed against the HIV-1 envelope glycoprotein. *Mol Med* 1998;4:384-391
- 28 Cheng H, Liu YF, Zhang HZ, Shen WA. Construction of the recombinant retroviral vector encoding anti-HCC single-chain bifunctional antibody and establishment of a stable virus producing PA317 cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:708-709
 - 29 Chen SY, Yang AG, Chen JD, Kute T, King CR, Collier J, Cong Y, Yao C, Huang XF. Potent antitumour activity of a new class of tumour-specific killer cells. *Nature* 1997;385:78-80
 - 30 Yang AG, Chen SY. A new class of antigen-specific killer cells. *Nat Biotechnol* 1997;15:46-51
 - 31 Dai YM. Targeting chemotherapy: a new focus in gene therapy research. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:469-472
 - 32 Barzon L, Bonaguro R, Castagliuolo I, Chilosi M, Gnatta E, Parolin C, Boscaro M, Palu G. Transcriptionally targeted retroviral vector for combined suicide and immunomodulating gene therapy of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5304-5311
 - 33 Indraccolo S, Habeler W, Tisato V, Stievano L, Piovan E, Tosello V, Esposito G, Wagner R, Uberla K, Chieco-Bianchi L, Amadori A. Gene transfer in ovarian cancer cells: A comparison between retroviral and lentiviral vectors. *Cancer Res* 2002;62:6099-6107
 - 34 Martin KR, Klein RL, Quigley HA. Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors. *Methods* 2002;28:267-275
 - 35 Mochizuki H, Miura M, Shimada T, Mizuno Y. Adeno-associated virus-mediated antiapoptotic gene delivery: *in vivo* gene therapy for neurological disorders. *Methods* 2002;28:248-252
 - 36 Kim SH, Lechman ER, Kim S, Nash J, Oligino TJ, Robbins PD. Ex vivo gene delivery of IL-1Ra and soluble TNF receptor confers a distal synergistic therapeutic effect in antigen-induced arthritis. *Mol Ther* 2002;6:591-600
 - 37 Wang F, Xia X, Hu H, Li L, Tian Y, Chen X, Huang Q. Liposome-mediated gene transfer into retina. *Chunghua Yenke Tsachih* 2002;38:520-522
 - 38 Pan X, Pan W, Ke CW, Zhang B, Cao GW, Qi ZT. Tetracycline controlled DT/VEGF system gene therapy mediated by adenovirus vector. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1121-1126
 - 39 Guo JC, Li JC, Fan DM, Qiao TD, Zhang XY. Regulation of HSP70 expression in human gastric cancer cell line SGC7901 by gene transfection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:773-776
 - 40 Ewert K, Ahmad A, Evans HM, Schmidt HW, Safinya CR. Efficient synthesis and cell-transfection properties of a new multivalent cationic lipid for nonviral gene delivery. *J Med Chem* 2002;45:5023-5029
 - 41 Hurez V, Hutton RD, Oliver J, Matthews RJ, Weaver CK. Gene delivery into primary T cells: overview and characterization of a transgenic model for efficient adenoviral transduction. *Immunol Res* 2002;26:131-141
 - 42 MacGregor RR, Ginsberg R, Ugen KE, Baine Y, Kang CU, Tu XM, Higgins T, Weiner DB, Boyer JD. T-cell responses induced in normal volunteers immunized with a DNA-based vaccine containing HIV-1 env and rev. *AIDS* 2002;16:2137-2143
 - 43 Keating SM, Bollinger RC, Quinn TC, Jackson JB, Carruth LM. Cross-clade T lymphocyte-mediated immunity to HIV Type 1: implications for vaccine design and immunodetection assays. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1067-1079
 - 44 Papageorgiou K, Isenberg D, Latchman D. Optimisation of herpes simplex virus-based vectors for delivery to human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol Methods* 2002;270:235
 - 45 Dreno B, Nguyen JM, Khammari A, Pandolfino MC, Tessier MH, Bercegeay S, Cassidanius A, Lemarre P, Billaudel S, Labbarriere N, Jotereau F. Randomized trial of adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:539-546
 - 46 Labbarriere N, Pandolfino MC, Gervois N, Khammari A, Tessier MH, Dreno B, Jotereau F. Therapeutic efficacy of melanoma-reactive TIL injected in stage III melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:532-538
 - 47 Parker C, Milosevic M, Panzarella T, Banerjee D, Jewett M, Catton C, Tew-George B, Gospodarowicz M, Warde P. The prognostic significance of the tumour infiltrating lymphocyte count in stage I testicular seminoma managed by surveillance. *Eur J Cancer* 2002;38:2014
 - 48 Paul S, Calmels B, Acres RB. Improvement of adoptive cellular immunotherapy of human cancer using *ex-vivo* gene transfer. *Curr Gene Ther* 2002;2:91-100
 - 49 Donskov F, Bennedsgaard KM, Von Der Maase H, Marcussen N, Fisker R, Jensen JJ, Naredi P, Hokland M. Intratumoural and peripheral blood lymphocyte subsets in patients with metastatic renal cell carcinoma undergoing interleukin-2 based immunotherapy: association to objective response and survival. *Br J Cancer* 2002;87:194-201
 - 50 Zhang JK, Sun JL, Chen HB, Zeng Y, Qu YJ. Influence of granulocyte macrophage colony stimulating factor and tumor necrosis factor on anti-hepatoma activities of human dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2000;6:718-720
 - 51 Cheng H, Liu YF, Zhang HZ, Shen WA, Zhang SZ. Construction and expression of anti-HCC immunotoxin of sFv-TNF- α and GFP fusion proteins. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:640-644
 - 52 Zhang GQ, Yu H, Zhou XQ, Liao D, Xie Q, Wang B. TNF- α induced apoptosis and necrosis of mice hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:303-306
 - 53 Liang WJ, Huang ZY, Ding YQ, Zhang WD. Lovo cell line apoptosis induced by cyclo heximide combined with TNF α . *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:326-328

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

• 编委来信 •

总编:寄来的 2003 年第 5 期中英文杂志收到,一口气读完,真有点爱不释手。两本杂志,从内容到形式,堪称精品。英文版增加到 244 页,刊登了 51 篇高水平文章;中文版 190 页,刊登了 61 篇文章,信息容量显著增加,既突出了我国在消化系统肿瘤和病毒性肝炎方面研究的优势和特色,又进一步缩短了文章的刊出周期。同时,新一届编委会成员大部分都承担各类课题,为保证杂志论文质量提供了更好的基础。

在栏目设置方面,有好的临床研究方面的论文可专门刊登在《临床研究》专栏中,以推动和提高我国临床研究的水平。

另外,通过电子邮件寄送的录用通知已经收到,今天已按规定将版面费寄出,请查收。相信杂志会越办越好!

江学良编委 2003-05-26

经皮穿刺氩氦刀冷冻治疗肝癌31例

钱国军,陈 汉,吴孟超

钱国军,陈汉,吴孟超,中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院 上海市 200438

钱国军,男,1967-05-02生,浙江省萧山市人,汉族. 1991年第二军医大学本科毕业,1997年第二军医大学外科学硕士毕业,主治医师,讲师. 主要从事肝癌微创外科治疗.

项目负责人:钱国军,200438,上海市,中国人民解放军第二军医大学附属东方肝胆外科医院.

电话:021-25070847

收稿日期:2002-07-26 接受日期:2002-08-09

Percutaneous cryoablation in treatment of liver cancer: a report of 31 cases

Guo-Jun Qian, Han Chen, Meng-Chao Wu

Guo-Jun Qian, Han Chen, Meng-Chao Wu, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
Correspondence to: Dr. Guo-Jun Qian, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China. qgjs@public6.sta.net.cn

Received: 2002-07-26 Accepted: 2002-08-09

Abstract

AIM: To describe the indication, efficacy and clinical significance of percutaneous cryoablation in the treatment of liver malignancy.

METHODS: Total 31 patients with histologically or clinically confirmed primary or metastatic malignancies were treated pcutaneously under ultrasound guidance using the cryocare surgical system from July 2001 to January 2002. All patients were followed up to determine the serum tumor marker, and reveal CT scans, MRI images or ultra-sound images.

RESULTS: This therapy was performed in 31 patients including 26 cases with Child A liver reserve, 4 cases with Child B and 1 cases with Child C. There were 21 cases of primary liver cancer and 10 metastatic liver cancer. AFP positive small liver cancer became AFP negative in 80 % patients. The rate of completely concreted necrosis in small hepatic cancer with negative AFP was 66.7 %, shown by CT or MRI. The curative rate for metastasis liver cancer was 50 % at CT, MRI or tumor marker level.

CONCLUSION: Percutaneous cryoablation is a kind of new palliative treatment for liver carcinoma. It is minimally invasive, safe and effective especially for patients with unresectable liver cancer.

Qian GJ, Chen H, Wu MC. Percutaneous cryoablation in treatment of liver cancer: a report of 31 cases. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003; 11(6):712-715

摘要

目的: 探讨氩氦刀冷冻治疗肝脏恶性肿瘤的适应证、疗效及临床意义.

方法: 2001-07/2002-01 肝癌患者 31 例在 B 超引导下经皮穿刺氩氦刀冷冻治疗肝脏肿瘤. 术后患者定期复查血清肿瘤标记物、B 超检查及 CT 或 MRI.

结果: 患者肝功能 Child A 级 26 例, Child B 级 4 例, Child C 级 1 例. 原发性肝癌 21 例, 转移性肝癌 10 例. 小肝癌(肿瘤直径 ≤ 5 cm)甲胎蛋白阳性者治疗后转阴占 80 % (8/10), 甲胎蛋白阴性者治疗后 CT 或 MRI 复查病灶完全坏死达 66.7 % (2/3). 转移性肝癌治疗后瘤标降至正常或 CT、MRI 提示病灶完全坏死者占 50 % (5/10).

结论: 氩氦刀冷冻治疗肝癌是一种微创、安全、疗效可靠的新方法. 对于不适宜行手术治疗的肝癌患者是一种有效的治疗方法.

钱国军,陈汉,吴孟超. 经皮穿刺氩氦刀冷冻治疗肝癌 31 例. 世界华人消化杂志 2003;11(6):712-715

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/712.asp>

0 引言

超低温冷冻损毁肿瘤组织是近年开展的外科治疗新技术^[1-13], 是用局部冷冻的方法损毁肿瘤组织, 氩氦刀靶向冷冻损毁术(targeted cryoablation therapy)不会导致过量肝组织被切除, 因而使一些无法耐受肝脏手术的肿瘤患者可以接受该治疗^[14, 15]. 我们通过对经皮穿刺氩氦刀冷冻治疗肝癌的临床总结, 探讨了此疗法治疗肝癌的适应证、疗效及安全性和临床意义.

1 材料和方法

1.1 材料 2001-07/2002-01 肝癌患者 31 例行 B 超引导下经皮穿刺氩氦刀冷冻治疗肝癌术, 其中男性 24 例, 女性 7 例, 年龄 29-80(平均年龄 56.5). 原发性肝癌 21 例, 其中甲胎蛋白阳性 15 例, 阴性 6 例. 转移性肝癌 10 例, 来自胃肠道 9 例、乳腺 1 例. 肝功能 Child A 26 例, Child B 4 例, Child C 1 例, 根据 B 超确定肿瘤最大径为肿瘤大小值, 范围为 1.6-10.5 cm. 小肝癌 17 例, 大肝癌 14 例. 行单次氩氦刀治疗 25 例, 两次 5 例, 三次 1 例. 所有患者均采用连续硬膜外麻醉, 同时实时监测血压、脉搏、血氧饱和度、呼吸、心电图等.

1.2 方法 使用 CRYOCARE SURGICAL SYSTEM (CRYO-20 型) 冷冻外科系统. 治疗刀直径分别为 2、3、5、8 mm, 依据瘤体大小、形状、部位等分别予单独或组合使用. 一般认为 2、3、5 mm 的冷冻刀在活体肝

脏实质内持续冷冻 15-20 min 可产生 2.5×4.5 cm、 3.5×6 cm、 6×7 cm 冷冻坏死区^[3]. 术前基础麻醉为 0.5 mg 阿托品或 10 mg 654-2 和吗啡 10 mg 或度冷丁 100 mg 皮下或肌肉注射. 首先以 B 超探头行肿瘤术前定位, 按需要摆体位, 选择进针点及进针方向, 按常规消毒铺无菌巾单, B 超引导下于肋间或肋缘下进带芯穿刺针, 将针尖穿刺进入肿瘤底部后拔除内芯, 引入金属导丝后再拔除穿刺针, 通过导丝经皮引入鞘管套后抽出内芯, 将氩氦刀顺着穿刺鞘插入肿瘤固定, 根据肿瘤区域将穿刺鞘外拔 3-5 cm, 不同角度的进针均依以上顺序操作, 开启氩氦刀冷冻系统电脑主机, 刀尖区域应在 1 min 内降至 -120°C 以下, 持续冷冻 15-20 min, 将冰球范围超过肿瘤边缘 1 cm 以上, 开启氦气加热系统直至将温度加热至 30°C 以上再重复一次冷-热循环, 结束后 B 超引导下以明胶海绵及止血生物胶填塞穿刺道止血(图1-4). 冷冻手术成功的关键是多刀组合使得冷冻产生的冰球完整覆盖肿瘤组织并超过其边缘 1 cm, 防止术后并发症的关键是良好的止血技巧. 所有患者定期随访, 随访时间为 3 mo-1 a, 影像学观察肿瘤有无复发及大小变化、血清肿瘤标志物监测及近期和远期并发症和副作用. 肿瘤根治标准: 血清肿瘤标记物阳性者术后(1-2 mo)转阴; MRI 或 CT 等影像资料提示肿瘤坏死、无明确存活病灶(图 5-10).

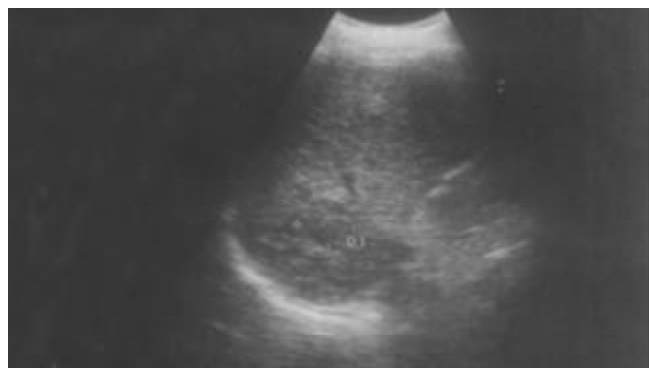


图1 B超定位.

2 结果

小肝癌(≤ 5 cm)共计 13 例, 包括 2 例系术后复发病灶. AFP 阳性(10 例)治疗后转阴性 8 例, 转阴率为 80 %. AFP 阴性小肝癌共 3 例, 治疗后 CT、MRI 提示未见明确存活病灶的 2 例, 占 66.7 %, 大肝癌(>5 cm)共 8 例, 治疗后 AFP 转阴性或 CT、MRI 提示肿瘤完全坏死 2 例, 占 25 %. 转移性肝癌共 10 例, 治疗后肿瘤标志物降至正常或 CT、MRI 提示完全坏死 5 例, 占 50 %. 随访 3-12 mo, 期间 5 例患者死亡, 其中 3 例系肿瘤未控制、广泛播散所致, 1 例因肝功能衰竭死亡, 1 例因突发心脏病死亡. 全组未发现术中、术后严重并发症; 较常出现的问题包括: (1)由于多刀组合冷冻范围过大导致术中全身体温下降而致寒颤及心率减慢 6 例. (2)术中皮肤表面由于接触冷冻刀杆而致皮肤冻伤 8 例.

(3)25 例术后局部疼痛、呕吐、轻度发热不适, 但并不严重. (4)31 例术后肝功能均有轻度损伤如血清酶谱异常等, 经常规保肝治疗均可恢复. 未发现术后穿刺道出血、胆瘘、血管损伤、感染等严重并发症. (5)胸腔积液, 本组 6 例出现术后右侧胸腔积液, 均为中等量以下, 未影响呼吸, 未行胸腔穿刺抽液.

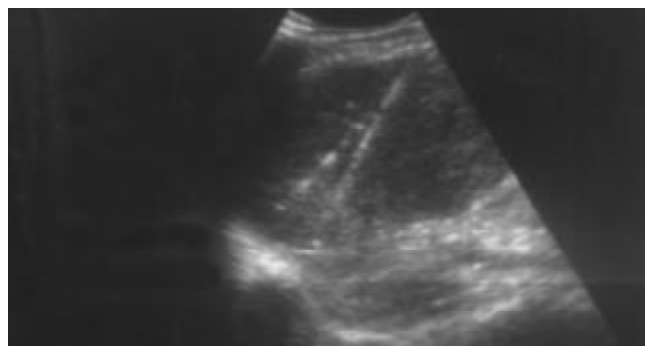


图2 导丝进入肿瘤.

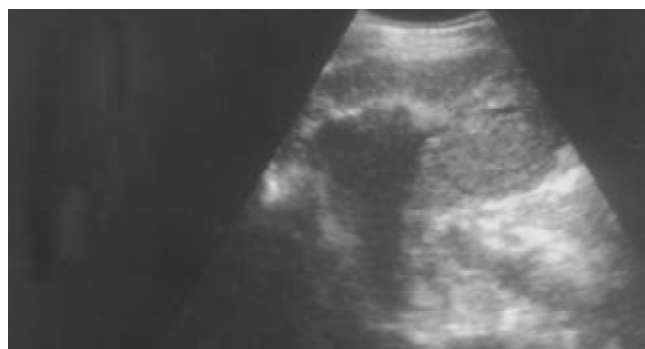


图3 开始冷冻.

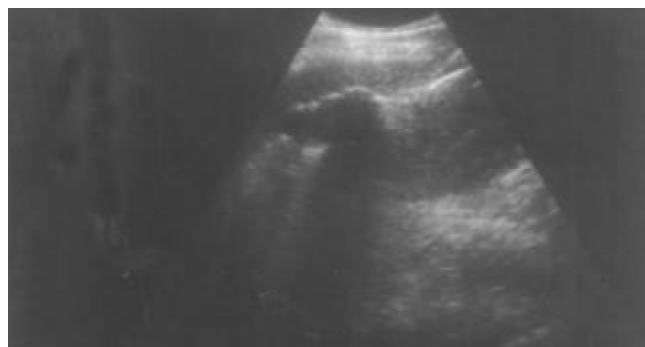


图4 冷冻结束.



图5 原发性肝癌合并门脉癌栓.



图6 放射治疗后肿瘤缩小.

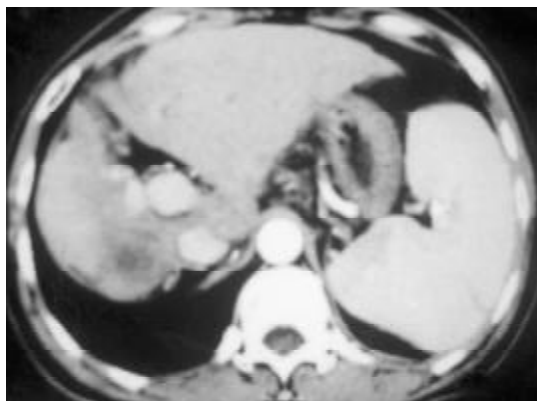


图10 氩氦刀冷冻治疗后 14 mo.

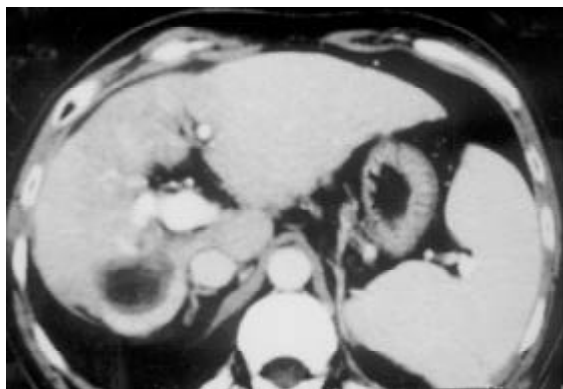


图7 氩氦刀冷冻治疗后 2 mo.

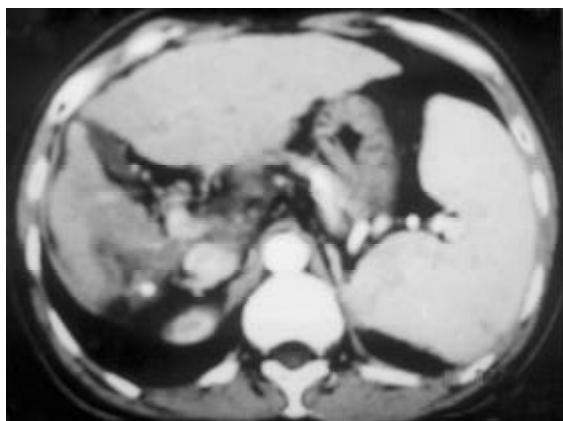


图8 氩氦刀冷冻治疗后 4 mo.

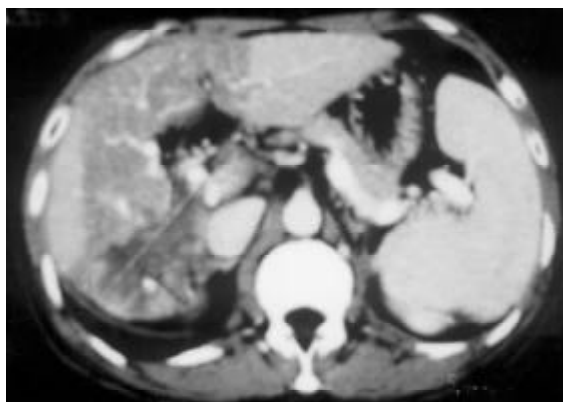


图9 氩氦刀冷冻治疗后 14 mo.

3 讨论

肝癌在我国是常见肿瘤疾病,就诊时多已属晚期,治疗仍有困难^[16-24]. 氩氦刀(cryocare surgical system)有4或8个能单独或组合应用的热绝缘超导刀,超导刀中空,可输出高压氩气,并籍高压氩气在刀尖的快速膨胀作用而使病变组织快速降温,而当输出高压氦气时,又使冰球在数分钟内解冻及迅速升温. 由于氩氦刀制冷或加热均局限于超导刀尖端一定区域内,刀杆有良好的冷热绝缘性,因此不会对穿刺路径上的组织产生严重损伤. 氩氦刀的温差电偶直接安装于刀尖,可连续监测刀尖温度. 另有4-8个独立测温探针可实时监测冷冻区域边缘的温度以便于控制冷冻速度及范围,使冷冻治疗即使在大血管周边也是安全有效^[27]. AFP阳性小肝癌治疗后转阴率为80%,AFP阴性小肝癌治疗后CT、MRI检查坏死率达66.7%,大肝癌治疗后AFP转阴或CT、MRI提示肿瘤完全坏死的亦达25%. 国外报道转移性肝癌行冷冻治疗较多^[26,28,29],本组转移性肝癌治疗后瘤标降至正常或CT、MRI复查肿瘤完全坏死未见明确复发灶的达50%. 说明经皮穿刺氩氦刀冷冻治疗对于不适合行手术治疗的小肝癌具有良好的治疗效果,对于>5 cm的大肝癌,配合TACE治疗等^[30],仍具有相当的治愈率并能明显延长患者生存期. 氩氦刀冷冻治疗肝脏恶性肿瘤具有创伤小,恢复快,疗效好等特点. 但由于肿瘤三维形状及氩氦刀经皮穿刺治疗所能达到区域的匹配等问题,并非所有肝癌患者都适合. 适应证:肝脏恶性肿瘤直径 ≤ 5 cm,数目不超过3个,肝功能分级为Child A或B;肿瘤直径>5 cm的大肝癌多刀组合冷冻与TACE或局部放疗相结合仍能取得良好效果甚至根治;(3)肿瘤位于大血管边上或肝门部位,直径 ≤ 5 cm,手术有困难或风险较大者. 可能出现的副作用和并发症有:(1)肝癌病灶在肝表面时,冷冻可能会引起肝包膜破裂造成术中术后出血,如冷冻范围较大,最好采用术中直视下操作以便于止血.(2)术后出血是一个严重并发症,据报道发生率为1%,根据我们的操作经验,只要掌握经皮肝内穿刺道填塞止血法,可以避免该并发症;我们曾以5 mm直径冷冻刀配以15F外鞘行多例经皮穿刺冷冻治疗,未发生术后出血.(3)大

范围冷冻术后出现的肌红蛋白尿是常见的,但只要予输液、利尿剂、碱化尿液等治疗,均未发生严重肾功能受损情况。(4)胆管损伤、胆瘘。冷冻肝门部肿瘤时可能致胆管损伤,但由于胆管位于Glisson鞘内,鞘内有门脉,肝动脉的血液快速流动而导致带走“冷冻量”,因此胆管损伤并不常见。(5)皮肤冻伤及肝功能轻度损害。由于快速致冷常使氩氦刀杆温度亦快速降低,如与皮肤表面接触易致轻度冻伤,常表现为皮肤水泡,予局部消毒包扎保持干燥等常很快痊愈。肝功能损害一般均较轻,常表现为血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶升高,予输液、保肝药物应用后均很快恢复正常。(6)胸腔积液,本组6例出现术后右侧胸腔积液,均为中等量以下,未影响呼吸,未行胸腔穿刺抽液。(7)国外有报道肝冷冻术后出现肝脓肿及肺部损伤^[1,25],本组未发生此类并发症。

总之,根据我们的临床治疗经验,对于肿瘤直径在5 cm以下的、数目在3个以内未能行手术切除的肝脏恶性肿瘤,经皮穿刺氩氦刀冷冻治疗术是一种疗效确实、安全的微创治疗方法,而对于直径在5 cm以上的大肿瘤,行多刀组合冷冻治疗,配合TACE介入治疗和放射治疗等亦可取得良好的疗效。

4 参考文献

- Chapman WC, Debelak JP, Wright Pinson C, Washington MK, Atkinson JB, Venkatakrishnan A, Blackwell TS, Christman JW. Hepatic cryoablation, but not radiofrequency ablation, results in lung inflammation. *Ann Surg* 2000;231:752-761
- Bilchik AJ, Wood TF, Allegra D, Tsioulis GJ, Chung M, Rose DM, Ramming KP, Morton DL. Cryosurgical ablation and radiofrequency ablation for unresectable hepatic malignant neoplasms: a proposed algorithm. *Arch Surg* 2000;135:657-662
- Popken F, Seifert JK, Engelmann R, Dutkowski P, Nassir F, Junginger T. Comparison of iceball diameter and temperature distribution achieved with 3-mm accuprobe cryoprobes in porcine and human liver tissue and human colorectal liver metastases in vitro. *Cryobiology* 2000;40:302-310
- Siperstein AE, Berber E. Cryoablation, percutaneous alcohol injection, and radiofrequency ablation for treatment of neuroendocrine liver metastases. *World J Surg* 2001;25:693-696
- Ruers TJ, Joosten J, Jager GJ, Wobbes T. Long-term results of treating hepatic colorectal metastases with cryosurgery. *Br J Surg* 2001;88:844-849
- Gignoux BM, Ducerf C, Mabrut JY, Rivoire M, Rode A, Baulieux J. Cryosurgery of primary and metastatic cancers of the liver. *Ann Chir* 2001;126:950-959
- Mala T, Edwin B, Samset E, Gladhaug I, Hol PK, Fosse E, Mathisen O, Bergan A, Soreide O. Magnetic-resonance-guided percutaneous cryoablation of hepatic tumours. *Eur J Surg* 2001;167:610-617
- Nakazaki H, Watanabe M, Hasebe Y, Takita W, Ooshiro M, Seo A, Kurihara A, Kobayashi K, Teramoto T, Hirano K. Percutaneous cryosurgery for liver tumors. *Gan To Kagaku Ryoho* 2001;28:1599-1602
- Bischof JC. Quantitative measurement and prediction of biophysical response during freezing in tissues. *Annu Rev Biomed Eng* 2000;2:257-288
- Berger WK, Poledna J. New strategies for the placement of cryoprobes in malignant tumors of the liver for reducing the probability of recurrences after hepatic cryosurgery. *Int J Colorectal Dis* 2001;16:331-339
- Samset E, Mala T, Edwin B, Gladhaug I, Soreide O, Fosse E. Validation of estimated 3D temperature maps during hepatic cryosurgery. *Magn Reson Imaging* 2001;19:715-721
- Barnett CC Jr, Curley SA. Ablative techniques for hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol* 2001;28:487-496
- Mala T, Frich L, Edwin B, Samset E, Hol PK, Fosse E, Mathisen O, Bergan A, Soreide O, Gladhaug I. Cryoablation-a treatment option for inoperable liver tumors? *Tidsskr Nor Laegeforen* 2001;121:2510-2515
- 方驰华, 俞金龙, 田碧文, 汪森明, 张积仁, 方石岗, 张明珠. 手术联合氩超冷刀治疗晚期巨块多灶型肝脏恶性肿瘤. *世界华人消化杂志* 2001;9:119-122
- 刘剑仑, 李挺, 杨南武, 韦长元, 陈建思, 李航. 肝癌的冷冻外科治疗72例. *世界华人消化杂志* 2000;8:595-596
- 高宗恩, 张承勋, 庞闽厦, 孙鹏. 肝癌供血的特点及其在介入治疗中的意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:1449-1451
- 黄鼎智, 吴英德, 宋向群, 胡晓桦, 康平.^[25] 碘油栓塞照射联合体外局部放射治疗肝癌. *世界华人消化杂志* 2001;9:1198-1201
- 管文贤, 李开宗, 姜科峰. 肝细胞癌与肝移植. *世界华人消化杂志* 2001;9:1292-1295
- 张智坚, 吴孟超, 陈汉, 陈夷, 郭佳. 经皮肝穿刺射频热凝治疗肝脏恶性肿瘤. *中华外科杂志* 2001;39:749-752
- 吴孟超. 我国肝脏外科学回顾. *世界华人消化杂志* 2000;8:1201-1204
- Chen MS, Li JQ, Zhang YQ, Lu LX, Zhang WZ, Yuan YF, Guo YP, Lin XJ, Li GH. High-dose iodized oil transcatheter arterial chemoembolization for patients with large hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:74-78
- Zhao WH, Ma ZM, Zhou XR, Feng YZ, Fang BS. Prediction of recurrence and prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after resection by use of CLIP score. *World J Gastroenterol* 2002;8:237-242
- Qin LX, Tang ZY. The prognostic significance of clinical and pathological features in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:193-199
- Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- Riley DK, Babinchak TJ, Zemel R, Weaver ML, Rotheram EB. Infectious complications of hepatic cryosurgery. *Clin Infect Dis* 1997;24:1001-1003
- Rivoire M, Voiglio EJ, Kaemmerlen P, Molina G, Michot JP, Finzy J, Delay E. Cryosurgery of liver neoplasms. *Ann Chir* 1997;51:54-59
- Weber SM, Lee FT Jr, Chinn DO, Warner T, Chosy SG, Mahvi DM. Perivascular and intralesional tissue necrosis after hepatic cryoablation: results in a porcine model. *Surgery* 1997;122:742-747
- Junginger T, Seifert JK, Weigel TF, Heintz A, Kreitner KF, Gerharz CD. Cryotherapy of liver metastases Initial results. *Med Klin* 1998;93:517-523
- Pearson AS, Izzo F, Fleming RY, Ellis LM, Delrio P, Roh MS, Granchi J, Curley SA. Intraoperative radiofrequency ablation or cryoablation for hepatic malignancies. *Am J Surg* 1999;178:592-599
- Clavien PA, Kang KJ, Selzner N, Morse MA, Suhocki PV. Cryosurgery after chemoembolization for hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *J Gastrointest Surg* 2002;6:95-101

大鼠肝细胞癌形成过程中 MMP-2 mRNA 的表达及应用 BB-94 的影响

张 志,方石岗,高 毅,蒋泽生,孙尔维

张志,高毅,蒋泽生,孙尔维,中国人民解放军第一军医大学珠江医院器官移植科 广东省广州市 510282

方石岗,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 510282

张志,男,1980-11-08 生,江西省湖口市人,汉族,2001 年第一军医大学本科毕业,现为第一军医大学珠江医院器官移植科硕士研究生。

广东省自然科学基金课题, No.974053

项目负责人:方石岗,510282,广东省广州市工业大道中 253 号,中国人民解放军第一军医大学珠江医院普通外科。 mshiji@hotmail.com

电话:020-61643402

收稿日期:2002-07-26 接受日期:2002-11-04

Effect of batimastat on Matrix metalloproteinase-2 mRNA in rat hepatocellular carcinoma

Zhi Zhang, Shi-Gang Fang, Yi Gao, Ze-Sheng Jiang, Er-Wei Sun

Zhi Zhang, Yi Gao, Ze-Sheng Jiang, Er-Wei Sun, Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province China

Shi-Gang Fang, Department of general surgery, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province China Supported by the Natural Scientific Foundation of Guangdong Province, No. 974053

Correspondence to: Dr. Shi-Gang Fang, Department of general surgery, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province China. mshiji@hotmail.com

Received: 2002-07-26 Accepted: 2002-11-04

Abstract

AIM: To study the dynamic changes of matrix metalloproteinase-2 mRNA in liver tissue during the experimental hepatocarcinogenesis and the effect of Batimastat on it.

METHODS: Hepatocellular carcinoma was induced with the administration of diethylnitrosamine (DEN) in rats. BB-94 was intraperitoneally injected to treat the experimental models. Reverse transcription polymerase chain reaction was used for quantitative analysis of MMP-2 mRNA expression level during the induction and therapy.

RESULTS: The expression of MMP-2 mRNA was increased throughout the hepatocarcinogenesis, and reach had its maximum plateau in the early hepatocarcinogenesis stage. BB-94 no effect on MMP-2 mRNA expression.

CONCLUSION: MMP-2 mRNA expression is increasing during hepatocarcinogenesis, and BB-94 has no effect on MMP-2 mRNA expression.

Zhang Z, Fang SG, Gao Y, Jiang ZS, Sun EW. Effect of batimastat on Matrix metalloproteinase-2 mRNA in rat hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(6):716-718

摘要

目的: 观察肝癌形成过程中 MMP-2 mRNA 表达的动态变

化, 探索明胶酶在肝癌生长浸润中的作用. 应用明胶酶抑制剂 Batimastat (BB-94) 进行治疗, 观察其对明胶酶 mRNA 表达的影响.

方法: 应用 RT-PCR 法对大鼠肝癌形成过程中各期 MMP-2 mRNA 表达情况进行观察, 并与 Batimastat 治疗组和正常对照组进行统计分析.

结果: 诱癌过程中早期肝硬化期 MMP-2 mRNA 表达成缓慢增高趋势, 至癌变期表达明显较增高, 并呈一平台. 诱癌不同时期应用 BB-94 对 MMP-2 mRNA 相对表达值无影响.

结论: 诱癌过程中 MMP-2 mRNA 表达持续升高. BB-94 治疗对 MMP-2 mRNA 的表达没有影响.

张志,方石岗,高毅,蒋泽生,孙尔维. 大鼠肝细胞癌形成过程中 MMP-2 mRNA 的表达及应用 BB-94 的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11(6):716-718

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/716.asp>

0 引言

研究表明, 明胶酶 A(基质金属蛋白酶 2, matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 可以降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM) 的主要成分 IV 型胶原, 在肿瘤组织中呈高表达, 对肿瘤的发展和转移起重要作用^[1-4]. 我们前期的研究证明, 在肝癌形成过程中, MMP-2 在酶原及酶活性水平呈逐渐升高的趋势^[5]. 为进一步揭示其变化规律, 我们从 mRNA 水平观察了肝癌形成过程中 MMP-2 的动态变化, 同时应用 MMP-2 的抑制剂 Batimastat(BB-94) 进行治疗, 观察其对 MMP-2 mRNA 表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁 Wistar 大鼠, 124 只, 体质量 130-150 g, 第一军医大学动物实验中心提供, 随机分为正常组(28 只), 诱癌模型对照组(56 只)及 BB-94 治疗组(40 只), 应用经典的二乙基亚硝胺(DENA)(*动物学报* 1996; 42: 166-170)诱导肝癌模型. 正常组及诱癌组各平均分成 7 个亚组, 于诱癌 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 wk 各处死 1 个亚组, 取肝左叶液氮保存. 治疗组 40 只大鼠平均分为 4 个亚组, 在造模 8, 12, 16, 20 wk 分别选取一个亚组每日予 BB-94 悬液(英国牛津生物技术公司惠赠)腹腔注射(30 mg/kg), 用药 4 wk. 于 24 wk 处死各亚组大鼠, 取肝左叶液氮保存.

1.2 方法 取液氮保存的肝组织约 50-100 mg, 加入 Trizol 溶液 1 mL 匀浆, 放入 1.5 mL Eppendorf 管中, 室温放置 5 min, 加入氯仿 200 μ L 混匀, 室温放置 15 min, 11 000 r/min, 2-8 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取水相, 加入异丙醇 0.5 mL 混匀, 室温放置 10 min, 11 000 r/min, 2-8 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后 7 000 r/min, 2-8 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃上清空气干燥 5-10 min, DEPC 水 100 μ L 溶解提取物, 取 10 μ L 作纯度和定量分析, 余 -10 $^{\circ}$ C 保存备用. 采用紫外分光光度计检测提取物, 计算 RNA 浓度(A260, 核酸稀释倍数 * 40/1 000, A260/A280>1.8). 取 1 μ g RNA 提取物, 加入 5 倍逆转录缓冲液 5 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, Oligo(dt)15 primer 50 mg/L, 混匀, 65 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 室温加入 M-MLV 逆转录酶 200 μ , 0.1MDTT 2 μ L, RNAsin 20 μ , DEPC 水补至总体积 25 μ L, 37 $^{\circ}$ C 逆转录 1 h, 95 变性 5 min, 取 cDNA10 μ L 行 PCR 扩增. β -actin 上游引物: 5' -ACCCCTGAAAAAGATGA-3', 下游引物: 5' -ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'. MMP-2 上游引物: 5' -TTCTTCAAGGACCGGTTATTTGG-3', 下游引物: 5' -CTTCTTCACTTCATTGTATCTCCA-3'. PCR 条件: 10 倍 PCR 缓冲液 5 μ L, 4 dNTP 10 nmol, 引物各 25 pmol, 逆转录产物 10 μ L, 总体积 50 μ L, 加灭菌石蜡油 50 μ L, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 80 $^{\circ}$ C 3 min, 加 Tap 酶 1 M. 94 $^{\circ}$ C 50 s, 56 $^{\circ}$ C 70 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 循环 30 次, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min. MMP-2, β -actin 引物基因扩增条带大小分别为 330 bp 和 120 bp. 取 PCR 产物 8 μ L 经 10 g/L 琼脂糖电泳, 紫外线灯下观察见 330 bp 和 120 bp 条带(参照基因产物), 凝胶图像吸光密度分析系统进行 PCR 产物条带扫描定量分析, 同时拍照保存.

统计学处理 试验结果应用 SPSS 8.0 进行处理, 计量资料行单因素方差分析, LSD 法进行组间检验, 两组间率的比较用 χ^2 检验.

2 结果

在诱发大鼠肝癌过程中, 早期肝硬化期 MMP-2mRNA 表达缓慢增高, 而至癌变期(16 wk)表达明显较增高, 并呈一平台.(表 1). 采用单因素方差分析治疗各组 and 诱癌各组之间 MMP-2 相对表达值无明显差异, 说明 BB-94 治疗对 MMP-2mRNA 的表达无影响(表 2).

表 1 MMP-2 灰度值/ β -actin 灰度值($\bar{x} \pm s$)

t/wk	诱癌组(n=8)	正常对照组(n=4)
0	4.28 \pm 0.98	4.37 \pm 0.85
4	4.32 \pm 0.87	4.31 \pm 0.76
8	8.44 \pm 1.56 ^{ac}	4.47 \pm 0.85
12	11.89 \pm 1.88 ^{ac}	4.35 \pm 0.79
16	24.21 \pm 2.58 ^{ac}	4.43 \pm 0.97
20	26.31 \pm 3.15 ^{ac}	4.56 \pm 0.95
24	25.67 \pm 3.01 ^{ac}	5.01 \pm 1.02

^aP <0.05 vs 同期正常对照; ^cP <0.05 vs 前期试验组.

表 2 第 24 周各组大鼠 MMP-2/ β -actin mRNA 灰度值相对表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MMP-2 相对表达值
诱癌组	8	25.7 \pm 3.0
治疗组		
8 wk 给药组	10	24.5 \pm 3.0
12 wk 给药组	10	26.3 \pm 3.2
16 wk 给药组	10	25.1 \pm 2.9
20 wk 给药组	10	26.2 \pm 3.5

3 讨论

本实验结果表明在诱癌过程中 MMP-2mRNA 呈持续增高趋势. 与 Benyon et al^[6]的研究结果一致, 肝硬化期 MMP-2mRNA 轻度升高至正常对照的 3-4 倍. 此时, 肝细胞坏死后肝脏行组织修复, 胶原等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)增生沉积, 同时, ECM 的降解吸收也上调, 在此过程中 MMP-2 起关键作用. 我们的前期研究也证明, 肝硬化形成过程中, MMP-2 的酶原和活性形式均升高; 肝硬化的形成与 MMP-2 降解 IV 型胶原增多有密切的关系^[7-9]. 与 Takahara et al^[10]的结果不同, 本实验显示, 肝硬化形成期, MMP-2 的表达从 mRNA 水平即开始升高, 并非 MT1-MMP 激活 MMP-2 增多所致.

已经证实, MMP-2 在多种肿瘤的侵袭转移中起到重要作用^[11-14]. 国内外众多研究指出, 在肝细胞癌中, MMP-2 蛋白水平亦呈高表达, 与肝肿瘤侵袭转移的关系极为密切^[5,15-19]. 而针对 MMP-2 的 BB-94 治疗, 能起到减小癌肿面积的效果; 同时, Yamamoto et al^[2]也发现, 在肝癌细胞的培养上清中, 可以检测到活性 MMP-2 分子; 而肝癌形成过程中 MMP-2mRNA 表达的变化, 国内外未见报道. 本研究结果提示, 肝细胞癌形成和侵袭转移过程中, MMP-2 表达升高起自 mRNA 水平, 自非典型增生期开始, MMP-2mRNA 表达即已较肝硬化期明显升高. 非典型增生的细胞, 已经具有了某些癌细胞的生物学行为, 从基因表达水平为肿瘤的进一步发展作准备. 至早期癌变期及肿瘤演进期(相当于诱癌第 16, 20, 24 周)肝癌组织中的 MMP-2mRNA 表达继续升高至正常的 5-7 倍. 肝癌细胞主动表达 MMP-2, 对于其快速生长和侵袭转移有重要意义^[1,2,20-24].

值得注意的是, MMP-2mRNA 表达量在肝癌形成后即成一平台, 表明 MMP-2 的表达与肿瘤的生长时间、肿瘤的大小无关; 而 Arii 和 Ogata 的研究也证明, 低分化肝癌 MMP-2mRNA 表达高于高分化肝癌; Ogata 还提出, 肝癌细胞表达 MMP-2 与否, 可纳入肝癌分级的标准^[25,26]; 所以, MMP-2mRNA 表达的水平, 可能仅与肿瘤的分化程度有关.

BB-94 是第一个在肿瘤模型治疗中广泛应用的 MMPs 抑制剂. 在裸鼠肠壁大肠癌种植转移模型中, BB-94 的治疗能够抑制肿瘤生长和侵袭转移^[27]. BB-94

能控制黑色素瘤转移, 明显减少 B16-BL6 鼠腹腔注射黑色素瘤细胞后肺转移灶的数量和大小^[28,29].

我们前期试验结果表明, 近期 BB-94 治疗可以明显缩小癌结节的面积^[30]. BB-94 能阻断酶原型 MMP-2 的活化, 可通过降低 MMP-2 的活性来抑制肝癌的生长和转移. Kinoshita et al^[30] 研究表明膜型金属蛋白酶 (membrane type MMP, MT1-MMP) 是 MMP2 的直接激活剂, MMP-2 的前导肽被 MT1-MMP 切除后而激活, 这一过程可被组织金属蛋白酶抑制因子和 BB-94 阻断. 有报道指出, BB-94 可以直接与活性 MMP-2 的钙离子结合部位结合, 从而达到直接抑制活性 MMP-2 的效果^[31]. 以上结果均提示, BB-94 能够从蛋白水平抑制 MMP-2 的活性. 但其作用起始是否可以追溯到 mRNA 表达调节水平, 是否能够减少 MMP-2 mRNA 的表达; 抑或, 由于肿瘤转移是一个极其复杂的调节过程, 抑制 MMP-2 的蛋白活性是否会导致肿瘤细胞代偿性表达 MMP-2 mRNA 升高? 目前国内外没有这方面的研究报道.

从本实验的结果来看, BB-94 治疗对肝癌组织表达 MMP-2 mRNA 的量没有影响. 说明, BB-94 治疗仅仅是从蛋白激活水平起作用, 对 MMP-2 转录和翻译水平没有正向或负向的调节作用. 但这个结果是否意味着肝癌细胞表达 MMP-2 mRNA 的量只受肿瘤分化程度的作用, 而不受外界细胞接触、MMP-2 活性浓度等反馈调控的影响, 则有待进一步观察研究和讨论.

4 参考文献

- Musso O, Theret N, Campion JP, Turlin B, Milani S, Grappone C, Clement B. In situ detection of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and the metalloproteinase inhibitor TIMP2 Transcripts in human primary hepatocellular carcinoma and in liver metastasis. *J Hepatol* 1997;26:593-605
- Yamamoto H, Itoh F, Adachi Y, Sakamoto H, Adachi M, Hinoda Y, Imai K. Relation of enhanced secretion of active matrix metalloproteinases with tumor spread in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1997;112:1290-1296
- Giannelli G, Bergamini C, Marinosci F, Fransvea E, Quaranta M, Lupo L, Schiraldi O, Antonaci S. Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2002;97:425-431
- Sawada S, Murakami K, Murata J, Tsukada K, Saiki I. Accumulation of extracellular matrix in the liver induces high metastatic potential of hepatocellular carcinoma to the lung. *Int J Oncol* 2001;19:65-70
- 蒋泽生, 方石岗, 高毅, 汪爽, 陈建锋. 二乙基亚硝胺诱发大鼠肝细胞癌发生过程中基质金属蛋白酶动态变化. *世界华人消化杂志* 2001; 9:759-762
- Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ. Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996;110: 821-831
- 高毅, 王宇, 杨继震, 黄宇琦. 实验性肝纤维化过程中明胶酶 A 基因表达的动态变化. *世界华人消化杂志* 1999;7:1003-1004
- 黄宇琦, 高毅, 杨继震, 方石岗, 王宇. 大鼠肝纤维化基质金属蛋白酶及其抑制因子的表达. *世界华人消化杂志* 1999;7:795-796
- Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Bechstein WO, Neuhaus P, Gressner AM, Schuppan D. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 1997;150:1647-1659
- Takahara T, Furui K, Yata Y, Jin B, Zhang LP, Nambu S, Sato H, Seiki M, Watanabe A. Dual expression of matrix metalloproteinase-2 and membrane-type 1-matrix metalloproteinase in fibrotic human livers. *Hepatology* 1997;26:1521-1529
- Fan YZ, Zhang JT, Yang HC, Yang YQ. Expression of MMP-2, TIMP-2 protein and the ratio of MMP-2/TIMP-2 in gallbladder carcinoma and their significance. *World J Gastroenterol* 2002;8:1138-1143
- Yu C, Pan K, Xing D, Liang G, Tan W, Zhang L, Lin D. Correlation between a single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer. *Cancer Res* 2002;15:6430-6433
- Kuittinen O, Soini Y, Turpeenniemi-Hujanen T. Diverse role of MMP-2 and MMP-9 in the clinicopathological behavior of Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 2002;69:205-212
- Matsuyama Y, Takao S, Aikou T. Comparison of matrix metalloproteinase expression between primary tumors with or without liver metastasis in pancreatic and colorectal carcinomas. *J Surg Oncol* 2002;80:105-110
- 朱争艳, 杜智, 王毅军, 张文, 孙保存. 原发性肝癌钙粘素 E 和基质金属蛋白酶检测及临床意义. *世界华人消化杂志* 2001;9:839-840
- 曲增强, 吴孟超, 陈汉, 钱其军, 方石岗. IV 型胶原酶的表达与肝癌侵袭转移的关系. *新消化病杂志* 1997;5:575-576
- 张云生, 高毅, 黄宇琦, 王宇, 杨继震. 基质金属蛋白酶在肝细胞癌中的表达. *广东医学* 2000;23:132-134
- 刘景章, 赵子渊, 陈保华, 高毅. 肝硬化肝癌 IV 型胶原酶的表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:711-713
- 刘景章, 高毅. 基质金属蛋白酶在肝细胞癌中表达的实验研究. *中国误诊学杂志* 2002;2:499-501
- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Metalloproteinases and cancer invasion. *Seminars Cancer Biol* 1990;1:99-106
- Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Reviews* 1993;73:161-165
- Tryggvason K, Hoyhtya M, Pyke C. Type-IV collagenases in invasive tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1993;24:209-218
- Stetler-Stevenson WG. Progelatinase A activation during tumor cell invasion. *Invasion Metast* 1994;14:259-268
- Arii S, Mise M, Harada T, Furutani M, Ishigami S, Niwano M, Mizumoto M, Fukumoto M, Imamura M. Overexpression of matrix metalloproteinase-9 gene in hepato cellular carcinoma with invasive potential. *Hepatology* 1996;24:316-322
- Ogata R, Torimura T, Kin M, Ueno T, Tateishi Y, Kuromatsu R, Shimauchi Y, Sakamoto M, Tamaki S, Sata M, Tanikawa K. Increased expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase and matrix metalloproteinase-2 with tumor dedifferentiation in hepato cellular carcinomas. *Hum Pathol* 1999;30:443-450
- Wang X, Fu X, Brown PD, Crimmin MJ, Hoffman RM. Matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 (batimastat) inhibits human colon tumor growth and spread in a patient-like orthotopic model in nude mice. *Cancer Res* 1994;54:4726-4728
- Chirivi RG, Garofalo A, Crimmin MJ, Bawden LJ, Stoppacciaro A, Brown PD, Giavazzi R. Inhibition of the metastatic spread and growth of B16-BL6 murine melanoma by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. *Int J Cancer* 1994;58:460-464
- Dabrowska A, Giermasz A, Marczak M, Golab J, Jakobisiak M. Potentiated antitumor effects of interleukin 12 and matrix metalloproteinase inhibitor batimastat against B16F10 melanoma in mice. *Anticancer Res* 2000;20:391-394
- 蒋泽生, 方石岗, 高毅, 陈建锋, 汪爽. Batimastat 对大鼠原发性肝癌生长侵袭转移的影响. *世界华人消化杂志* 2001;9:546-549
- Kinoshita T, Sato H, Takino T, Itoh M, Akizawa T, Seiki M. Processing of a precursor of 72-Kilodalton type IV collagenase/gelatinase A by a recombinant membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 1996;56:2535-2538
- Zervos EE, Shafii AE, Haq M, Rosemurgy AS. Matrix metalloproteinase inhibition suppresses MMP-2 activity and activation of PANC-1 cells in vitro. *J Surg Res* 1999;84:162-167

西安酒精性肝病流行病学

鲁晓岚,陶 明,罗金燕,耿 燕,赵 平,赵红莉

鲁晓岚,罗金燕,赵平,赵红莉,西安交通大学第二医院消化病研究室
陕西省西安市 710004
陶明,西安交通大学医学院流行病学教研室 陕西省西安市 710061
耿燕,西安交通大学第二医院检验科 陕西省西安市 710004
卫生部科研基金资助课题, No.98-1-236
项目负责人:鲁晓岚,710004,陕西省西安市西五路 157 号,西安交通大学第二
医院消化病研究室. Xiaolan_lu@163.com
电话:029-7276936-29660 传真:029-7231758
收稿日期:2002-10-08 接受日期:2002-10-18

Epidemiology of alcoholic liver diseases in Xi'an

Xiao-Lan Lu, Ming Tao, Jin-Yan Luo, Yan Gen, Ping Zhao,
Hong-Li Zhao

Xiao-Lan Lu, Jin-Yan Luo, Ping Zhao, Hong-Li Zhao, Department of
Digestive Diseases, The Second Hospital of Xi'an Jiaotong University,
Xi'an 710004, Shaanxi Province, China
Ming Tao, Department of Epidemiology, Xi'an Jiaotong University
Medical College, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China
Yan Gen, Department of Laboratory Medicine, The Second Hospital,
Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China
Supported by the Scientific Foundation of Ministry of Public Health,
No.98-1-236
Correspondence to: Dr. Xiao-Lan Lu, Department of Digestive Diseases,
The Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, 157 Xiwulu, Xi'an
710004, Shaanxi Province, China. Xiaolan-lu@163.com
Received:2002-10-08 Accepted:2002-10-18

Abstract

AIM:To investigate the characteristics of ethanol consumption in Xi'an area, and to explore the prevalence of alcoholic liver disease and the correlation of the quantity of ethanol consumed with the development of alcoholic liver disease.

METHODS:By random cluster sampling, 9 professional groups of people were chosen in the city and the rural areas as subjects. Questionnaire was taken and the data collected and analyzed by specialists.

RESULTS:During April to June 2000, 3 613 persons were investigated. Among them 1270 were drinkers, in which 90.1 % were males and only 126 females. 78 persons were alcoholic fatty liver patients (6.1 %). The prevalence rate was 2.2 % in all subjects. Only one female patient with alcoholic liver disease (0.3 %), and 5 cases of alcoholic cirrhosis (0.1 %) were found. Alcoholic fatty liver patients consumed the equivalent of 31.3+24.2 g absolute ethanol with a mean duration of 14.0+7.4 years. With increase of alcoholic consumption the serum levels of ALT and AST increased. The prevalence rate of alcoholic fatty liver is higher in city than that in rural area.

CONCLUSION:Alcohol drinkers in Xi'an are very popular. Males are the major population. Alcoholic fatty liver is the most common type of ALD with prevalence rate of 2.2 %.

The equivalent of 30 g ethanol consumed in more than 14 years may result in alcoholic fatty liver. The alterations of liver function are parallel to the consumption of alcohol.

Lu XL, Tao M, Luo JY, Gen Y, Zhao P, Zhao HL. Epidemiology of alcoholic liver diseases in Xi'an. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(6):719-722

摘要

目的:酒精性肝病近年呈增长之势,世界各国对其越来越重视.本研究采用流行病学方法调查西安地区人群的饮酒情况,初步明确酒精性肝病的患病率及与饮酒的关系.

方法:将西安城乡 9 种代表性职业人群作为本次调查对象,整群随机抽样,采取问卷调查方法,由专人统一询问检测.

结果:2000-04/06 共调查 9 种职业人群 3 613 例,其中饮酒人数 1 270 例,占 35.2 %, 90.1 % 为男性,是男性群体的 52.2 %,女性仅 126 例.检出酒精性肝病患者 82 例,占 6.5 %,为调查人数的 2.3 %,只 1 例女性.酒精性肝硬化 4 例,分别占 0.3 % 和 0.1 %. 78 例酒精性脂肪肝患者日均饮酒 31.3 ± 24.2 g,平均饮酒 14.0 ± 7.4 a,且随饮酒量和饮酒时限增加,ALT 和 AST 亦渐升高.发病高峰年龄在 40 岁左右.营养不良可能加重肝功能损伤.

结论:西安地区饮酒现象较普遍,男性为主要饮酒人群.酒精性脂肪肝为酒精性肝病最常见类型,患病率 2.2 %,日均饮酒 30 g,持续 14 a 即可能患此病,且与 ALT、AST 水平有正向关系.

鲁晓岚,陶明,罗金燕,耿燕,赵平,赵红莉. 西安酒精性肝病流行病学. 世界华人消化杂志 2003;11(6):719-722

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/719.asp>

0 引言

随着酒精消耗量的增多,饮酒引发的肝脏疾病越来越多^[1,2].酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD),包括酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver, AF)、酒精性肝炎(alcoholic hepatitis, AH)和酒精性肝硬化(alcoholic cirrhosis, AC)^[3].ALD 的研究在我国刚刚起步,缺乏人群统计资料.为明确其在我市患病率,及每日饮多少酒、持续饮酒多长时间有患 ALD 危险性,及其他影响因素,我们于 2000-04/06 对西安地区城乡不同职业人群进行了随机抽样调查.

1 材料和方法

西安城乡年满18岁各种职业人群作为本次调查对象, 整群随机抽样, 问卷调查, 调查表统一设计, 统一标准, 人员统一培训, 对每一调查对象负责询问、查体、腹部B超(型号: 西门子亚当)检查, 并行肝功、HBV标志物、抗-HCV、血糖、血脂等检测。酒精性肝病诊断标准参考1995年全国第一次酒精性肝病会议标准: 酒精性脂肪肝: 有长期饮酒史, 即: 持续饮酒1a以上, 每日饮酒折合酒精量>20g; B超或CT有典型脂肪肝特异性改变; 轻型患者肝功可基本正常。酒精性肝硬化: 长期饮酒史同上; B超或CT有肝硬化证据。酒精量换算公式为: 饮酒量(ml) × 酒精含量(%) × 0.8(酒精比重) = g。并除外病毒感染、糖尿病、高脂血症及药物等引起的肝功损伤。

统计学处理 用SPSS 10.0统计软件包进行资料的录入及分析, 危险因素用logistic回归分析。

2 结果

2000-04/06 我们共调查工人、农民、军人、机关干部、知识分子、商人、大学生、医务人员和饮食服务业人员共3700例, 剔除资料不完整者, 有效病例数3613例。男2191例, 占60.6%, 女1422例, 占39.4%, 平均年龄 36 ± 13 岁。饮酒人数1270例, 占总数的35.1%。男1144例, 占男性群体52.2%; 女126例, 为女性群体的8.9%, 主要分布在高收入家庭和家有人有饮酒者中, 相当部分亦因工作需要而饮酒。男女之比: 9.1:1。不同职业人群饮酒暴露率工人、军人、商人最高, 在48.0%以上; 其次是机关干部, 42.9%; 农民最低仅22.8%。不同职业间差异非常明显, $\chi^2=164.4$, $P=0.000$ 。AF在不同职业人群中的分布城市明显高于农村, 干部群体高于其他群体。机关干部患病率最高18.7%; 其次是商人和知识分子, 分别为11.0%和9.0%。患病率最低的是军人和大学生, 各只有1.4%和1.3%。各人群间AF患病率差异非常显著, $\chi^2=71.7$, $P=0.000$ 。不同年龄组人群饮酒量及饮酒暴露率各异(表1), 20-50岁的青壮年为饮酒主要群体。50-60岁以后饮酒人数明显下降。各年龄组饮酒暴露率有显著性差异, $\chi^2=20.11$, $P=0.003$ 。饮酒人群中, 783(61.7%)人平均每月最多饮酒1次, 197(15.5%)人每天至少饮酒1次, 常饮38°-60°白酒的556(43.7%)人, 其余则以葡萄酒, 啤酒等有色酒为主。经常少量和偶尔大量饮酒者最多, 分别为619例和467例, 占总数的85.6%; 经常大量及酗酒者只有58(4.6%)例。可见人群中以间断少量饮酒, 饮低度酒、有色酒的人最多。

AF共检出78例(未检出合并乙肝或丙肝感染者), 占饮酒人数的6.1%, 为调查人数的2.2%, 女性仅1例。73.6%集中在30-50岁年龄段, 平均年龄 41 ± 6 岁。AC检出4例, 占饮酒人数的0.3%, 总人数的0.1%。AF患者平均每日饮酒量 31.3 ± 24.2 g, 平均饮

酒时间 14.0 ± 7.4 a。饮酒量最大者单次440g, 日均220g。饮酒时间最短4a, 最长47a。肝功正常者38例, 占48.7%。ALT和AST异常者均是轻、中度升高, AST无一超过3334nkat/L, 97.5%的患者ALT在3334nkat/L以内。ALT平均 1058 ± 233 nkat/L, AST平均 878 ± 172 nkat/L。仅 γ -GT异常者4例, ALP异常者2例。由表2肝功损害与饮酒的关系见, ALT和AST水平与日均饮酒量及饮酒年限间均有很好相关性, r 分别为0.53和0.61, $P<0.01$ 。随饮酒量和时间增长, AF患病率呈递增趋势(表3, 4), 饮酒量30g一组和20g两组间差异很明显, $\chi^2=6.29$, $P<0.05$ 。30g以上各组间差异不显著, $P>0.05$ 。饮酒15-20a组和<5a组AF患病率差异有统计学意义, $\chi^2=6.81$, $P<0.05$ 。日均饮酒量<40g者占64.2%。饮酒时间10a以下者占33.3%。

另外, 性别、经济收入、文化程度、家人饮酒情况、吸烟、水果蔬菜蛋奶肉等营养因素及年龄、职业、家族肝病史、肥胖等10个因素中, 前五个指标是饮酒的相关因素。相对P值分别为0.18, 1.20, 1.20, 3.56和5.00, 回归系数分别为-1.70, 0.16, 0.17, 1.27和1.61。营养可能为保护性因素, P值和回归系数分别为0.93和-0.07。

表1 不同年龄人群饮酒状况分析

年龄(y)	调查人数	饮酒人数	饮酒暴露率 %
<20	257	84	32.7
20-	1231	476	38.7
30-	887	300	33.8
40-	643	237	36.9
50-	338	110	32.5
60-	182	45	24.7
≥70	65	18	27.7

$\chi^2=20.11$, $P=0.003$ 。

表2 肝功损伤与饮酒量和年限的关系

转氨酶(nkat/L)	人数	日均饮酒量(g)	日最高饮酒量(g)	饮酒年限(a)	始饮酒年龄(y)
正常	38	15.7 ± 13.8	67.3 ± 41.8	10.6 ± 8.3	18.4 ± 6.9
ALT<1254	27	24.2 ± 16.1	86.1 ± 77.2	12.9 ± 10.90	18.0 ± 9.3
ALT<3334	11	40.7 ± 32.2	118.5 ± 101.4	14.5 ± 5.4	20.7 ± 4.8
ALT≥3334	2	75.0 ± 49.5	40.3 ± 31.5	25.0 ± 14.1	23.0 ± 4.24
AST<1254	20	32.3 ± 24.9	86.0 ± 75.1	15.7 ± 12.4	19.0 ± 7.4
AST<3334	2	75.0 ± 49.4	40.3 ± 31.5	25.0 ± 14.1	23.0 ± 4.24

表3 日均饮酒量与AF患病率关系

日均饮酒量(g)	饮酒人数	AF患者数	AF患病率(%)
<20	880	31	3.52
20-	170	14	8.24
30-	42	5	11.90
40-	99	13	13.13
≥50	79	15	18.99

$\chi^2=45.19$, $P=0.000$ 。

表4 饮酒年限与AF患病率的关系

饮酒年限(a)	饮酒人数	AF患者数	AF患病率(%)
< 5	262	7	2.68
5-	293	20	6.82
10-	233	13	5.58
15-	143	12	8.45
≥ 20	339	26	7.67

$\chi^2=11.30$, $P<0.025$.

3 讨论

嗜酒可引发一系列肝脏疾患, 对社会劳动力影响较大^[1,2], 重症患者死亡率较高^[4,5], 且随酒精消耗量增加而增加^[6]. 西方国家肝硬化几乎一半与酒精有关, 日本ALD患者也呈上升趋势^[4]. 我国肝脏疾患虽仍以病毒性肝炎及肝炎肝硬化为主, 但随着生活水平提高, 嗜酒者在人群中的比例成倍增长. 近几年住院患者中ALD比前些年明显增加. 本资料显示, 饮酒者占一般人群的35.1%, 远高于1991年北京地区的调查; 在男性人群中占52.2%, 与郝伟 et al 报道的湖南两地市的57.5%相近. 这可能与各地饮食, 文化及近几年经济发展差异和教育, 干预因素有关^[7,8]. 经济因素对女性及农村人群的影响特别明显^[9], 经济相对落后的农民饮酒率最低. 经济状况较好的机关干部、商人、军人等最高. 大多数资料显示, 饮酒除与职业相关外^[10], 与性别亦相关, 男性均占主导地位^[11,12], 与本资料相同. 但女性更敏感^[13,14], 少量的酒, 更短时间就可致病.

酒精摄入体内放出较多热量, 抑制摄入者的食欲, 使蛋、奶等营养物质摄入减少, 脂质和蛋白质代谢紊乱, 有更大患肝病危险^[15]. 故营养对饮酒者可能有一定保护作用^[7,16], 营养不良则会加重肝功能损伤^[17,18]. 但肥胖却会增加嗜酒者患肝病的危险^[19].

酒精所致肝病, 除轻微病理改变者外, 最常见的为脂肪肝, 其次为肝硬化. 因脂肪肝可不经肝炎直接发展为肝硬化, 故AH相对少见. 我们未发现转氨酶明显升高, 或有发热、黄疸等典型症状的AH患者, 以脂肪肝的检出为主, 肝硬化检出率很低. 说明AF在我国人群, 特别是城市人群中已较普遍, 患病率已达2.2%, 在饮酒人群中达6.1%. 据统计, 酒精所致脂肪肝约占脂肪肝病因的近一半^[20].

饮酒量和饮酒年限与AF患病率及肝功损伤有明显量效关系. 国外大多数资料提示: 平均每日饮酒40-120 g^[21-23,12], 持续5-10 a可致ALD, AC则需更长时间^[22]. 国内倾向40-50 g, 持续5 a以上. 英国和意大利则以日均30 g作为患ALD危险剂量^[19], 并有时依赖性升高. 这与我们资料每日饮酒30 g持续14 a左右可致肝病相符合. 同时比较了日均饮酒≤30 g且饮酒时间<15 a, 和日均饮酒>30 g且饮酒时间>15 a的两组饮酒人群, AF患病率分别为2.0%和14.7%, $\chi^2=44.57$, $P=0.000$.

从表3, 4也可看出, 日均饮酒30 g和持续饮酒15 a以上组AF患病率明显高于低剂量和短年限各组. 说明长期大量饮酒是AF危险因素, 且在一定条件下各自可独立影响AF患病率. 本资料所有AF患者开始饮酒年龄一般在20岁左右, 患病高峰年龄在40岁左右, 与非酒精性脂肪肝发病高峰年龄类似^[24]. 也说明持续饮酒10 a后是AF高发期. 这些均支持我们的结论. 可解释为何大学生和军人群体AF检出率较低. 干部群体AF比例高估计除与饮酒量有关外还和频度有关. 但饮酒是否患肝病个体差异较大^[25,23], 与肿瘤等其他疾病一样可能与个人体质因素^[26-29]、饮酒方式种类和生活习惯^[30-32]有关, 如饮酒是否佐餐、饮茶^[33]等.

AF患者中, 平均饮酒量和饮酒年限与肝损伤明显正相关^[19], 随饮酒量和饮酒持续时间增加, ALT与AST水平随之升高. 我们提倡少饮酒, 勿持续饮酒. 但当ALT与AST达3 334.0 nkat/L时, 最高饮酒量有所减少. 推测与患者出现自觉症状后开始自我控制. 有报道AF患者肝功AST/ALT>2^[34], γ -GT升高较明显, 本组资料及国外部分资料未发现此特点^[11]. 可能系体检人群, 患者几无症状, 肝功损伤轻, 以细胞质中ALT的释出为主. 出现黄疸者很少见. 国外报道ALD与乙型和丙型肝炎合并存在者较多^[35,36], 特别是对HCV的易感性增加^[37,38]. 我们未发现此关系, 与Miyano et al^[39]的报道相似. 可能与国外HCV感染率高^[40], 国内吸毒、药瘾人数较少、HCV感染率相对较低有关^[41,42].

4 参考文献

- 1 Roizen R, Kerr WC, Fillmore KM. Cirrhosis mortality and per capita consumption of distilled spirits, United States, 1949-1994: trend analysis. *West J Med* 1999;171:83-87
- 2 Kerr WC, Fillmore KM, Marvy P. Beverage-specific alcohol consumption and cirrhosis mortality in a group of English-speaking beer-drinking countries. *Addiction* 2000;95:339-346
- 3 Menon KV, Gores GJ, Shah VH. Pathogenesis, diagnosis, and treatment of alcoholic liver disease. *Mayo Clin Proc* 2001;76:1021-1029
- 4 Campollo O, Martinez MD, Valencia JJ, Segura-Ortega J. Drinking patterns and beverage preferences of liver cirrhosis patients in Mexico. *Subst Use Misuse* 2001;36:387-398
- 5 O'Keefe C, McCormick PA. Severe acute alcoholic hepatitis: an audit of medical treatment. *Ir Med J* 2002;95:108-109
- 6 Bopp M, Gmel G. Alcohol consumption and gender in the 20th century: the case of Switzerland. *Soz Praventivmed* 1999;44:211-221
- 7 Naveau S, Giraud V, Ganne N, Perney P, Hastier P, Robin E, Pessione F, Chossegros P, Lahmek P, Fontaine H, Ribard D, Dao T, Filoche B, El Jammal G, Seyrig JA, Dramard JM, Chousterman M, Pillegand B. Patients with alcoholic liver disease hospitalized in gastroenterology. A national multicenter study. *Gastroenterol Clin Biol* 2001;25:131-136
- 8 Xie X, Mann RE, Smart RG. The direct and indirect relationships between alcohol prevention measures and alcoholic liver cirrhosis mortality. *J Stud Alcohol* 2000;61:499-506
- 9 Tao M, Lu XL, Chen CH. Analysis of drinking habits and cofactors in Xi'an countryside. *Xibei Yufang Yixue Zazhi* 2001;4:1-3
- 10 Hemmingsson T, Ringback-Weitof G. Alcohol-related hospital utilization and mortality in different occupations in Sweden in 1991-1995. *Scand J Work Environ Health* 2001;27:412-419

- 11 Hourigan KJ, Bowling FG. Alcoholic liver disease: a clinical series in an Australian private practice. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:1138-1143
- 12 Jarque-López E, González-Reimers F, Rodríguez-Moreno F, Santolaria-Fernández A, López-Lirola R, Ros-Vilamajo JG, Martínez-Riera A. Prevalence and mortality of heavy drinkers in a general medical hospital unit. *Alcohol Alcohol* 2001;36:335-338
- 13 Tsukamoto H, Lu SC. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury. *Faseb J* 2001;15:1335-1349
- 14 Thurman RG. Sex-related liver injury due to alcohol involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Can J Gastroenterol* 2000;14:129-135
- 15 Bunout D. Nutritional and metabolic effects of alcoholism: their relationship with alcoholic liver disease. *Nutrition* 1999;15:583-589
- 16 Korourian S, Hakkak R, Ronis MJ, Shelnutt SR, Waldron J, Ingelman-Sundberg M, Badger TM. Diet and risk of ethanol-induced hepatotoxicity: carbohydrate-fat relationships in rats. *Toxicol Sci* 1999;47:110-117
- 17 Roongpisuthipong C, Sobhonslidsuk A, Nantiruj K, Songchitsomboon S. Nutritional assessment in various stages of liver cirrhosis. *Nutrition* 2001;17:761-765
- 18 Sobhonslidsuk A, Roongpisuthipong C, Nantiruj K, Kulapongse S, Songchitsomboon S, Sumalnop K, Bussagorn N. Impact of liver cirrhosis on nutritional and immunological status. *J Med Assoc Thai* 2001;84:982-988
- 19 Gordon H. Detection of alcoholic liver disease. *World J Gastroenterol* 2001;7:297-302
- 20 Bellentani S, Saccoccio G, Masutti F, Croce LS, Brandi G, Sasso F, Cristanini G, Tiribelli C. Prevalence of and risk factors for hepatic steatosis in Northern Italy. *Ann Intern Med* 2000;132:112-227
- 21 Walsh K, Alexander G. Alcoholic liver disease. *Postg Med J* 2000;76:280-286
- 22 Campollo O, Martinez MD, Valencia JJ, Segura-Ortega J. Drinking patterns and beverage preferences of liver cirrhosis patients in Mexico. *Subst Use Misuse* 2001;36:387-398
- 23 Ropero Gradilla P, Villegas Martinez A, Fernandez Arquero M, Garcia-Agundez JA, Gonzalez Fernandez FA, Benitez Rodriguez J, Diaz-Rubio M, de la Concha EG, Ladero Quesada JM. C282Y and H63D mutations of HFE gene in patients with advanced alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig* 2001;93:156-163
- 24 Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): where are we now and where are we going? *Gut* 2002;50:585-588
- 25 Monzoni A, Masutti F, Saccoccio G, Bellentani S, Tiribelli C, Giacca M. Genetic determinants of ethanol-induced liver damage. *J Mol Med* 2001;7:255-262
- 26 Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. Glutathione S-transferases M1, T1 genotypes and the risk of gastric cancer: A case-control study. *World J Gastroenterol* 2001;7:506-509
- 27 Cai L, Yu SZ, Zhang ZF. Cytochrome P450 2E1 genetic polymorphism and gastric cancer in Changle, Fujian Province. *World J Gastroenterol* 2001;7:792-795
- 28 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma-cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 29 Su M, Lu SM, Tian DP, Zhao H, Li XY, Li DR, Zheng ZC. Relationship between ABO blood groups and carcinoma of esophagus and cardia in Chaoshan inhabitants of China. *World J Gastroenterol* 2001;7:657-661
- 30 Wu J, Cheng ML, Zhang GH, Zhai RW, Huang NH, Li CX, Luo TY, Lu S, Yu ZQ, Yao YM, Zhang YY, Ren LZ, Ye L, Li L, Zhang HN. Epidemiological and histopathological study of relevance of Guizhou Maotai liquor and liver diseases. *World J Gastroenterol* 2002;8:571-574
- 31 Cheng ML, Wu J, Wang HQ, Xue LM, Tan YZ, Ping L, Li CX, Huang NH, Yao YM, Ren LZ, Ye L, Li L, Jia ML. Effect of Maotai liquor in inducing metallothioneins and on hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:520-523
- 32 Cai L, Yu SZ, Ye WM, Yi YN. Fish sauce and gastric cancer: an ecological study in Fujian Province, China. *World J Gastroenterol* 2000;6:671-675
- 33 Jia XD, Han C. Chemoprevention of tea on colorectal cancer induced by dimethylhydrazine in Wistar rats. *World J Gastroenterol* 2000;6:699-703
- 34 Sorbi D, Boynton J, Lindor KD. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating nonalcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94:1018-1022
- 35 Degos F. Hepatitis C and alcohol. *J Hepatol* 1999;31:113-118
- 36 Yamanaka T, Shiraki K, Nakazaawa S, Okano H, Ito T, Deguchi M, Takase K, Nakano T. Impact of hepatitis B and C virus infection on the clinical prognosis of alcoholic liver cirrhosis. *Anticancer Res* 2001;21:2937-2940
- 37 Anderson S, Nevins CL, Green LK, El-Zimaity H, Anand BS. Assessment of liver histology in chronic alcoholics with and without hepatitis C virus infection. *Dig Dis Sci* 2001;46:1393-1398
- 38 Schiff ER. The alcoholic patient with hepatitis C virus infection. *Am J Med* 1999;27:95S-99S
- 39 Miyano S, Maeyama S, Iwaba A, Ogata S, Koike J, Kishi M, Uchikoshi T. A clinicopathological study of acute hepatitis in heavy drinkers, unrelated to hepatitis A, B, or C viruses. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:69S-74S
- 40 Wietzke-Braun P, Meier V, Braun F, Ramadori G. Combination of "low-dose" ribavirin and interferon alfa-2a therapy followed by interferon alfa-2a monotherapy in chronic HCV-infected non-responders and relapsers after interferon alfa-2a monotherapy. *World J Gastroenterol* 2001;7:222-227
- 41 Yang JM, Wang RQ, Bu BG, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. Effect of HCV infection on expression of several cancer-associated gene products in HCC. *World J Gastroenterol* 1999; 5:25-27
- 42 Feng DY, Chen RX, Peng Y, Zheng H, Yan YH. Effect of HCV NS3 protein on p53 protein expression in hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:45-46

蛋白激酶C在肝细胞缺氧预处理中的作用

单毓强,高 毅,王 瑜,潘明新

单毓强,高毅,王瑜,潘明新,中国人民解放军第一军医大学附属珠江医院肝胆外科 广东省广州市 510282
单毓强,男,1975-03-18生,浙江省东阳市人,汉族,1997年浙江医科大学临床医学系本科毕业,住院医师,现为第一军医大学附属珠江医院肝胆外科在读研究生。广东省自然科学基金资助项目, No.001086
项目负责人:高毅,510282,广东省广州市工业大道253号,中国人民解放军第一军医大学附属珠江医院肝胆外科。 gaoyi6164@163.com
电话:020-85143402
收稿日期:2002-09-13 接受日期:2002-10-03

Effect of protein kinase C during hepatocyte hypoxic precondition

Yu-Qiang Shang, Yi Gao, Yu Wang, Ming-Xin Pan

Yu-Qiang Shang, Yi Gao, Yu Wang, Ming-Xin Pan, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China
Supported by the Natural Scientific Foundation of Guangdong Province, No.001086
Correspondence to: Yi Gao, Department of Hepatobiliary Surgery, Zhujiang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China. gaoyi6146@163.com
Received:2002-09-13 Accepted:2002-10-03

Abstract

AIM:To investigate the effects of protein kinase C (PKC) on hypoxic preconditioning (HP) for hepatocyte.

METHODS:Through a normal liver cell HP model, PKC inhibitor and activator were utilized to analyze the phosphorylation of PKC. The cellular structure and viability were also observed. All the data were statistically analyzed.

RESULTS:Compared with the phosphorylation of PKC in the control without HP [(710.5±78.8) fkat/g], the phosphorylation of PKC was obviously increased in HP treated model [(1 823.7±268.2) fkat/g] and PMA treated model [(2 541.2±326.5) fkat/g] ($P < 0.01$). Cellular changes were less. In addition, opposite changes were found in PKC inhibited groups, and the phosphorylation of PKC was [(1 088.0±89.3) fkat/g] ($P < 0.01$).

CONCLUSION:The activation of PKC is the important chain of HP in the preservation of liver cell, and its mechanism may be involved in protein phosphorylation.

Shang YQ, Gao Y, Wang Y, Pan MX. Effect of protein kinase C during hepatocyte hypoxic precondition. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003; 11(6):723-725

摘要

目的:研究蛋白激酶C(PKC)在肝细胞缺氧预处理中的作用。

方法:建立体外肝细胞缺氧预处理模型,应用PKC抑制剂白屈菜季铵碱(chelerythrine chloride, CHE)和激动剂豆蔻

酸佛波酰乙酯(phorbol12-myristate13-acetate, PMA),通过检测PKC磷酸化活性,细胞存活率,同时在透射电镜下观察肝细胞超微结构改变,研究PKC的作用。对相关数据进行统计学处理。

结果:和缺氧复氧组的PKC磷酸化活性(710.5±78.8) fkat/g比较,缺氧预处理组的PKC磷酸化活性(1 823.7±268.2) fkat/g和PKC激动剂组的PKC磷酸化活性(2 541.2±326.5) fkat/g显著增高($P < 0.01$),肝细胞结构损伤改变较小;和缺氧预处理组比较,PKC抑制剂组相应指标呈相反的变化,PKC磷酸化活性(1 088.0±89.3) fkat/g ($P < 0.01$)。

结论:肝细胞缺氧预处理细胞保护作用中,PKC通路起到至关重要的作用。

单毓强,高毅,王瑜,潘明新. 蛋白激酶C在肝细胞缺氧预处理中的作用. 世界华人消化杂志 2003;11(6):723-725

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/723.asp>

0 引言

缺血预处理能够提高器官组织对缺血再灌注损伤的耐受能力^[1-4],缺血预处理对肝脏也有保护作用^[5,6],但保护机制的研究较少,为研究PKC在缺氧预处理肝细胞保护效应中的作用,以缺氧复氧损伤模型为研究对象,应用PKC激动剂、抑制剂和等信号转导工具药,观察其在缺氧预处理中的作用,以期进一步探讨PKC在缺氧预处理在体内的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 正常人肝细胞株L02购自中国医学科学院上海细胞所。厌氧培养箱(上海医疗器械厂),50 ml/L CO₂电热恒温培养箱(Harris公司);白屈菜季铵碱(Calbiochem公司),硝酸纤维素滤膜(PVDF膜):宝灵曼公司,PKC活性测定试剂盒:Promega Corp, γ -32p:Amersham公司, PMA。1.2 方法 正常人肝L02细胞株接种贴壁于含100 ml/L灭活胎牛血清的RPMI1640培养液中,培养箱内常规培养,维持细胞处于对数生长期。缺氧培养采用去氧和去血清培养:混合气(0.90 N₂ + 0.08 CO₂+0.02 H₂)平衡KHH^[7]平衡盐溶液1 h,测血气PO₂≤4 kPa,细胞培养液换成平衡KHH平衡盐溶液,在厌氧培养箱(0.90 N₂ + 0.08 CO₂+0.02 H₂)中培养,最大限度模拟体内肝脏缺血状态;复氧培养,采用含血清培养基进行常规培养。随机分组进行处理,每组6个样本:(1)正常对照组

(control, C), 常规孵育培养; (2)缺氧复氧组(hypoxia reoxygenation HR), 缺氧培养6 h, 复氧培养9 h; (3)缺氧预处理组(hypoxic precondition, HP), 缺氧培养5 min, 复氧培养5 min, 进行3个循环的缺氧复氧预处理, 随后处理同HR组; (4)HR+PMA组, PMA终浓度为150 nmol/L^[8]加于培养液, 10 min后, 处理同HR组; (5)HP+白屈菜季铵碱(CHE)组:加终浓度为50 nmol/L^[9]的白屈菜季铵碱于培养液, 10 min以后, 处理同HP组. 使用四唑盐比色法(MTT)常规检测细胞存活率. 按以上各组描叙方法分组处理后, 含2 g/L DMOS 2.50 g/L胰酶消化成的单细胞悬液, 按PKC活性测定试剂盒(promega corp)检测操作步骤进行测定每组PKC活性. 按以上各组描叙方法分组处理后, 含2 g/L DMOS 2.50 g/L胰酶消化成的单细胞悬液, 收集细胞在透射电镜下观察组织超微结构.

统计学处理 各组数据用均数 \pm 标准差($n=6$, $\bar{x}\pm s$), 应用S.A.S 6.12统计软件包对检测数据进行方差分析处理. $P<0.05$ 表示统计学上有显著性差异, $P>0.05$ 则为无差异.

2 结果

2.1 细胞存活率 在各组中, HR组细胞存活率($35.6\pm 4.0\%$)最低, 和C组($95.0\pm 10.8\%$)比较差异显著($P<0.01$); 和HR组比较, HP组($81.5\pm 12.1\%$)的显著升高($P<0.01$); 和HP组比较, CHE($47.2\pm 5.4\%$)组下降明显, 存在显著性差异($P<0.01$); 和HR组比较, PMA组($75.3\pm 11.9\%$)显著增高($P<0.01$).

2.2 细胞PKC活性 HR组PKC活性(710.5 ± 78.8) fkat/g和C组(544.5 ± 85.2) fkat/g比较无显著性差异($P<0.01$).和HR组比较, HP组PKC活性(1823.7 ± 268.2) fkat/g显著升高($P<0.01$);和HP组比较, HP+CHE组PKC活性(1088.0 ± 89.3) fkat/g下降明显, 存在显著性差异($P<0.01$); 和HR组比较, HR+PMA组PKC活性(2541.2 ± 326.5) fkat/g显著增高($P<0.01$).

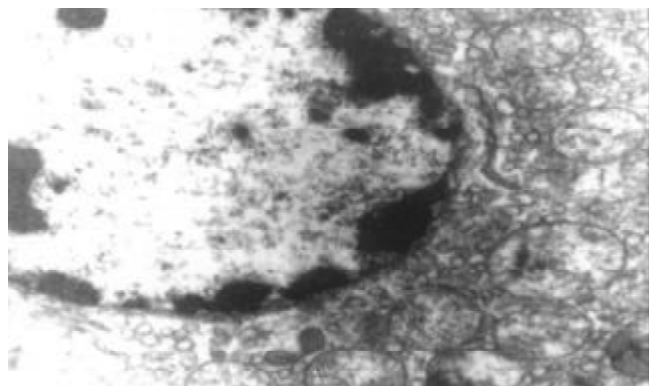


图1 缺氧复氧损伤肝细胞 EM $\times 10\ 000$.

2.3 肝细胞超微结构 C组细胞器结构完整, 线粒体排列整齐. HR组肝细胞肿胀, 线粒体肿胀, 呈气球样改变, 基质加深, 减少, 呈絮状改变, 嵴减少, 排列紊乱, 细胞核内染色体边聚(图1). HP和PMA组细胞形态基本

正常, 细胞器无明显水肿变性, 少量中性粒细胞、淋巴细胞浸润, 线粒体排列正常, 无明显肿胀(图2、3). CHE组细胞肿胀, 线粒体肿胀, 气球样改变, 细胞核内染色体边聚, 细胞改变与HR组相近(图4).

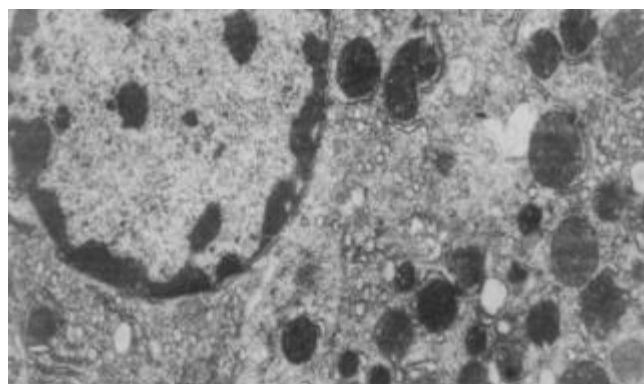


图2 HP组肝细胞 EM $\times 8\ 000$.

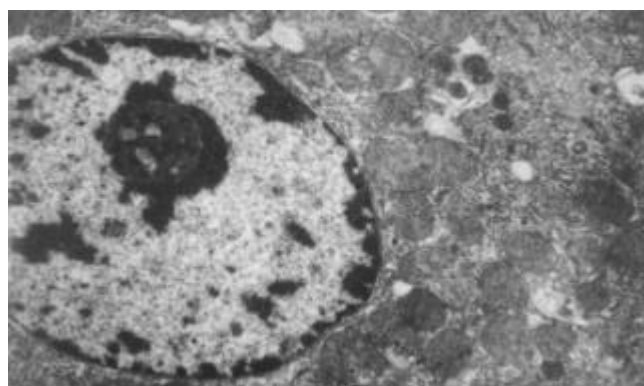


图3 PMA组肝细胞 EM $\times 6\ 300$.

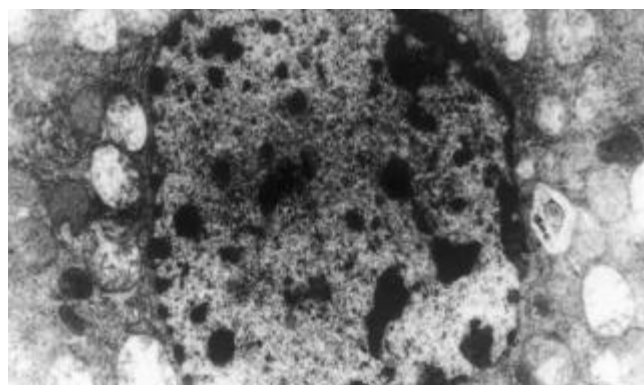


图4 CHE组肝细胞 EM $\times 6\ 300$.

3 讨论

目前研究普遍认为缺血预处理的细胞保护机制为多种因素综合作用的结果. 缺血预处理信号转导方面的机制研究主要来自于心脏和脑的资料, 其研究结果推测保护效应细胞内信号转导途径是:缺血预处理引起内源性触发物质释放, 如腺苷、去甲肾上腺素、活性氧、缓激肽、血管紧张素II、NO等^[10-13], 作用于细胞膜上相应的受体^[14-16], 使受体偶联的G蛋白^[17]发生空间

构象的改变, 细胞内信号转导开始启动, 激活磷脂酶, 水解膜磷脂产生二酰基甘油(diacylglycerol, DAG)^[18], 并和 Ca^{2+} 协同作用于 PKC, 使膜转位 PKC 激活^[19], 从而导致一系列的信号通路开放^[20-23], 大量研究证实, PKC 的激活在缺血预处理信号转导中是非常重要的环节^[24-26], 其中 PKC- ϵ 亚型发挥关键的传递者作用^[27], 而在肝细胞预处理中, PKC 的作用未见结论性报道, 肝细胞内信号转导是否和心脏相似尚不清楚^[28-30]. 本实验通过建立体外人正常肝细胞缺氧预处理模型, 检测 PKC 磷酸化活性, 细胞存活率, 同时在透射电镜下观察肝细胞超微结构改变, 以及使用 PKC 抑制剂和激动剂来判定 PKC 在信号转导中的作用^[5]. 实验表明缺氧预处理引起 PKC 磷酸化活性增强, 细胞存活率明显升高, 细胞电镜超微结构损伤改变减轻, 细胞器基本维持正常, 出现保护效应. 同时, 通过抑制 PKC 活性, 细胞器损伤明显, 增加细胞死亡, 预处理保护效应消失. 然而, 不经预处理的作用, 直接用激动剂活化 PKC, 同样能模拟出预处理类似的保护, 验证了 PKC 通路在其中的作用, 由此我们推测, 在预处理对人肝细胞的保护作用中, PKC 通路激活和预处理导致细胞保护作用密切相关, PKC 磷酸化激活是信号通路中不可缺少的重要环节.

然而, PKC 的众多亚型对细胞的作用各不相同, PKC- ϵ 是预处理中激活发挥作用的主要 PKC 亚型之一, 应用转基因方法特异激活 PKC- ϵ 就能诱导出预处理的保护作用, 本实验通过检测总的 PKC 活性, 得出 PKC 激活参与了细胞保护, 可能和某个亚型激活有关, 但是, 各亚型在信号转导过程中作用机制大相径庭, 那些具体亚型在其中的主导作用, 有待于进一步探讨.

4 参考文献

- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-1136
- Tanhehco EJ, Yasojima K, McGeer PL, McGeer EG, Lucchesi BR. Preconditioning reduces myocardial complement gene expression in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H1157-1165
- Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischaemia in rabbit myocardium. *Br J Pharmacol* 1995;115:222-224
- Lei DX, Peng CH, Peng SY, Jiang XC, Wu YL, Shen HW. Safe upper limit of intermittent hepatic inflow occlusion for liver resection in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:713-717
- Ricciardi R, Meyers WC, Schaffer BK, Kim RD, Shah SA, Wheeler SM, Donohue SE, Sheth KR, Callery MP, Chari RS. Protein kinase C inhibition abrogates hepatic ischemic preconditioning responses. *J Surg Res* 2001;97:144-149
- Chen XH, Li ZZ, Bao MS. Ischemic preconditioning protects liver from ischemia-reperfusion injury in rats. *Xin Xiaohuabingxue Zazhi* 1997;5:763-764
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Bagnati M, Albano E. Ischemic preconditioning reduces Na^+ accumulation and cell killing in isolated rat hepatocytes exposed to hypoxia. *Hepatology* 2000;31:166-172
- Zhao J, Renner O, Wightman L, Sugden PH, Stewart L, Miller AD, Latchman DS, Marber MS. The expression of constitutively active isotypes of protein kinase C to investigate preconditioning. *The J Bio Chem* 1998;36:23072-23079
- Marra F, Arrighi MC, Fazi M, Caligiuri A, Pinzani M, Romanelli RG, Efsen E, Laffi G, Gentilini P. Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by in vivo liver injury in the rat. *Hepatology* 1999;30:951-958
- Sun JZ, Tang XL, Knowlton AA, Park SW, Qiu Y, Bolli R. Late preconditioning against myocardial stunning: an endogenous protective mechanism that confers resistance to postischemic dysfunction 24 hours after brief ischemia in conscious pigs. *J Clin Invest* 1995;95:388-403
- Dana A, Baxter GF, Walker JM, Yellon DM. Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A1 receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:1142-1149
- Tang XL, Takano H, Rizvi A, Turrens JF, Qiu Y, Wu WJ, Zhang Q, Bolli R. Oxidant species trigger late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;282:H281-291
- Yamashita N, Hoshida S, Taniguchi N, Kuzuya T, Hori M. Whole-body hyperthermia provides biphasic cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in the rat. *Circulation* 1998; 98:1414-1421
- Matoba S, Tatsumi T, Keira N, Kawahara A, Akashi K, Kobara M, Asayama J, Nakagawa M. Cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition against hypoxia/reoxygenation injury in cultured rat cardiac myocytes. *Circulation* 1999;99:817-822
- Parsons M, Young L, Lee JE, Jacobson KA, Liang BT. Distinct cardioprotective effects of adenosine mediated by differential coupling of receptor subtypes to phospholipases C and D. *FASEB J* 2000;14:1423-1431
- Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991;84:350-356
- Farfel Z, Bourne H, Iiri T. The expanding spectrum of G protein diseases. *New Engl J Med* 1999;340:1012-1020
- Cohen MV, Liu Y, Liu GS, Wang P, Weinbrenner C, Cordis GA, Das DK, Downey JM. Phospholipase D plays a role in ischemic preconditioning in rabbit heart. *Circulation* 1996;94:1713-1718
- Lee HT, Emala CW. Protein kinase C and G(i/o) proteins are involved in adenosine- and ischemic preconditioning-mediated renal protection. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:233-240
- Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:248-253
- Iwai T, Tanonaka K, Koshimizu M, Takeo S. Preservation of mitochondrial function by diazoxide during sustained ischaemia in the rat heart. *Br J Pharmacol* 2000;129:1219-1227
- Carroll R, Yellon DM. Myocardial adaptation to ischaemia-the preconditioning phenomenon. *Int J Cardiol* 1999;68(Suppl 1): S93-101
- Yao Z, Tong J, Tan X, Li C, Shao Z, Kim WC, vanden Hoek TL, Becker LB, Head CA, Schumacker PT. Role of reactive oxygen species in acetylcholine-induced preconditioning in cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1999;277(6pt2):H2504-H2509
- Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, Vay D, Domenicotti C, Nitti MP, Paola D, Pronzato MA, Albano E. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes. *Hepatology* 2001;33:131-139
- Wu S, Li HY, Wong TM. Cardioprotection of preconditioning by metabolic inhibition in the rat ventricular myocyte involvement of kappa-opioid receptor. *Circ Res* 1999; 84:1388-1395
- Inagaki K, Kihara Y, Hayashida W, Izumi T, Iwanaga Y, Yoneda T, Takeuchi Y, Suyama K, Muso E, Sasayama S. Anti-ischemic effect of a novel cardioprotective agent, JTV519, is mediated through specific activation of delta-isoform of protein kinase C in rat ventricular myocardium. *Circulation* 2000; 101:797-804
- Ping P, Zhang J, Cao X, Li RC, Kong D, Tang XL, Qiu Y, Manchikalapudi S, Auchampach JA, Black RG, Bolli R. PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits. *Am J Physiol* 1999;276(5pt2):1468-1481
- Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999; 29:126-132
- Peralta C, Closa D, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J, Hotter G. Hepatic preconditioning in rats is defined by a balance of adenosine and xanthine. *Hepatology* 1998;28:768-773
- Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpi E, Prats N, Rosello-Catafau J. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;229:264-270

肝硬化不同病期 ET-1, NO 对离体肝脏血流动力学的调节作用

姚冬梅,姚希贤,杨川杰,冯志杰,房红梅,高军萍

姚冬梅,姚希贤,杨川杰,冯志杰,房红梅,高军萍, 河北医科大学二院消化内科 河北省石家庄市 050000

姚冬梅,女,1973-11-18生,河北省石家庄人,汉族. 1997年河北医科大学本科毕业,2000年河北医科大学硕士研究生毕业,现为河北医科大学博士研究生,主要从事慢性肝病的研究.

项目负责人:姚希贤,050000,河北省石家庄市,河北医科大学二院消化内科河北省消化病研究所. yaoxixian@263.net

电话:0311-7046901-8631

收稿日期:2002-07-12 接受日期:2002-08-23

Effects of ET-1 and NO on hepatic hemodynamics at various stages of isolated perfused cirrhotic liver in rats

Dong-Mei Yao, Xi-Xian Yao, Chuan-Jie Yang, Zhi-Jie Feng, Hong-Mei Fang, Jun-Ping Gao

Dong-Mei Yao, Xi-Xian Yao, Chuan-Jie Yang, Zhi-Jie Feng, Hong-Mei Fang, Jun-Ping Gao, Department of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China

Correspondence to: Xi-Xian Yao, Department of Gastroenterology, Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. yaoxixian@263.net

Received: 2002-07-12 Accepted: 2002-08-23

Abstract

AIM: To investigate the effects of ET-1, NO on hepatic hemodynamics in isolated perfused rat liver at various stages of liver cirrhosis (LC).

METHODS: LC was induced by an intraperitoneal injection of CCL₄ combined with ethanol as drinking water. According to time points of CCL₄ injection, and combined with histopathological changes of liver and ascites, the isolated perfusion of liver was performed at a constant flow rate to determine the modulating effects of ET-1 and NO in the ends of 9th week (E-LC) and 14th week (L-LC) after injected CCL₄.

RESULTS: After perfusion of L-NAME into the portal vein, there were no significant changes in the perfused pressure of portal vein (PP) and the hepatic venous pressure (Phv) of the L-LC group, the E-LC group and control group ($P > 0.05$). After perfusion of ET-1, the PP of each group increased significantly ($P < 0.01$). The elevated ranges of PP of the L-LC group was more than that of the E-LC group ($P < 0.01$), both of which were higher than that of the control group ($P < 0.01$). Compared with the ET-1 groups, the PP of the control group, the E-LC group and the L-LC group increased significantly ($P < 0.05$) after perfusion of ET-1+L-NAME. There were no significant differences between the elevated ranges of PP of the L-LC and that of the E-LC group ($P > 0.05$), both of which were more than that of the control group ($P < 0.01$).

CONCLUSION: ET-1 plays a key role in elevating intra-hepatic resistance, facilitating synthesis of NO, which grow stronger in LC. With the development of LC, the compensation of NO decreases further. It is considered that antagonist of ET receptor and NO provider can increase synthesis of NO and be thus used in treatment of the high pressure of portal vein.

Yao DM, Yao XX, Yang CJ, Feng ZJ, Fang HM, Gao JP. Effects of ET-1 and NO on hepatic hemodynamics at various stages of isolated perfused cirrhotic liver in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(6):726-729

摘要

目的: 在肝硬化(LC)形成的不同病期、离体状态下动态研究内皮素-1(ET-1)、一氧化氮(NO)对肝循环血流动力学调节作用的变化规律.

方法: 皮下注射四氯化碳菜籽油溶液, 乙醇代饮水, 制备大鼠LC模型. 根据造模不同时间, 结合肝组织病理改变及有无腹水对 LC 进行分期, 将造模第 9 周末定为 LC 早期(E-LC), 14 wk 末定为 LC 晚期(L-LC). 采用离体肝灌注技术动态研究 ET-1, NO 对肝血流动力学调节作用的变化规律.

结果: 门脉灌注 L-NAME, L-LC 组、E-LC 组和对照组 PP 和 Phv 均无明显改变($P > 0.05$). 门脉灌注 ET-1 可明显增加大鼠的 PP($P < 0.01$), L-LC 组 PP 增加幅度大于 E-LC 组($P < 0.01$)和对照组($P < 0.01$). 给予 L-NAME+ET-1 与单独给予 ET-1 相比, PP 进一步升高($P < 0.05$), LC 大鼠 PP 增加幅度大于正常大鼠($P < 0.01$), 但 L-LC 组与 E-LC 组 PP 增加幅度无明显差异($P > 0.05$).

结论: ET-1 是导致肝内血流阻力增加的主要原因, ET-1 可促进 NO 合成, 此作用在 LC 时增强, NO 代偿不足, 且随着 LC 病情发展 NO 代偿能力进一步下降, 导致 ET-1、NO 间作用失衡是引起 LC 门脉压增高的重要原因. 在本病的治疗上可考虑应用 ET 受体拮抗剂或 NO 供体增加肝内 NO 合成, 来抑制 ET-1 的作用, 降低肝内阻力.

姚冬梅,姚希贤,杨川杰,冯志杰,房红梅,高军萍. 肝硬化不同病期 ET-1, NO 对离体肝脏血流动力学的调节作用. 世界华人消化杂志 2003;11(6):726-729
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/726.asp>

0 引言

内皮素(ET)是强烈缩血管活性物质, 包括 ET-1, ET-2, ET-3 三种, 其中 ET-1 对血管的收缩作用最强. ET 受

体(ETR)有ET_A和ET_B两种, ET_B分为ET_{B1}和ET_{B2}, ET_{B1}主要表达于内皮细胞, 与血管舒张剂 NO 等释放偶联; ET_{B2}主要表达于血管平滑肌细胞, 与血管收缩机制偶联. NO 由 L- 精氨酸(L-Arg)在一氧化氮合酶(NOS)代谢下产生. NOS 有三种异构型:神经原型(nNOS)、内皮型(eNOS)和诱生型(iNOS). 前二者存在于脑组织、周围神经及血管内皮, 依赖于钙/钙调蛋白(Ca²⁺/CaM). 肝硬化(LC)患者 ET-1^[1-13]、NO^[14-18]等多种血管活性物质(VAS)均有增加. ET-1 通过收缩肝窦和门静脉前终末枝增加肝内阻力^[19-23], NO 在 LC 肝血流动力学紊乱中的作用尚不十分清楚, 有研究显示 ET-1 与 NO 间作用失衡是导致肝内血流阻力增加的重要原因. ET-1, NO 等 VAS 彼此相互作用、相互影响、在 LC 不同病期、不同部位情况有所不同, 导致了治疗困难. 因此对 LC 不同病期 VAS 调节作用的变化规律进行研究十分必要. 目前尚乏在 LC 不同病期动态研究 ET-1, NO 对肝血流动力学调节作用的报道. 我们在离体状态下排除体内其他 VAS 干扰, 对 ET-1, NO 对肝血流动力学调节作用之变化规律进行研究, 进一步揭示 ET-1, NO 在门脉高压(PHT)发生中的作用及其机制, 以对 PHT 治疗提供理论依据.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ 清洁级 SD 大鼠 64 只, 质量 180-220 g, 购自河北医科大学实验动物中心. 八道生理记录仪(RM-6280 型, 四川成都仪器厂). ET-1, L-NAME(NOS 抑制剂)购自美国 Sigma 公司.

1.2 方法 皮下注射 500 mL/L CCl₄ 菜籽油溶液 3 mL/kg, 2 次/wk, 50 mL/L 乙醇代饮水, 制备大鼠 LC 模型. 造模 9 wk 末, 肝脏表面出现细小颗粒状结节, 边缘变钝, 肝内纤维组织增生明显, 有假小叶形成, 腹水形成少见, 腹水量一般不超过 2 mL, LC 组体质量(597 ± 32 g)与对照组(595 ± 22 g)无明显差异(P > 0.05);造模 14 wk 末, LC 组体质量(509 ± 104 g)较对照组(664 ± 33 g)明显下降(P < 0.01), 多有腹水形成, 腹水量 2-60 mL; 肝脏表面粗糙, 可见大小不等的结节, 肝内有大量纤维组织增生, 小叶间隔增宽, 大量假小叶形成. 因此, 将造模 9 wk 末定为 LC 早期(E-LC), 14 wk 末定为 LC 晚期(L-LC). 对照组大鼠采用菜籽油溶液皮下注射 3 mL/kg 体重, 2 次/wk. 于 LC 的早期和晚期分别设立 LC 与正常对照(Control)两大组, 每组 16 只大鼠. 每个大组根据灌流药物不同又分成以下 4 个小组: (1)L-NAME 组(4 只):门脉灌注 1 mmol/L L-NAME; (2)LNAME+ET-1 组:门脉灌注 L-NAME(1 mmol/L)10 min 后灌注 ET-1(10 nmol/L); (3)ET-1 组(4 只):门脉灌注 10 nmol/L ET-1; (4)空白组(4 只):不加药物继续灌流 Krebs' s 溶液. 大鼠禁食过夜, 自由饮水, 硫喷妥钠 100 mg/kg 腹腔注射麻醉, 常规开腹, 分离门静脉, 胆管插管监测胆汁流率. 结扎胃、十二指肠韧带、脾韧带、肝动脉、脾静脉、肠

系膜上静脉, 结扎并切除食管. 门静脉插管经三通一端通过压力换能器与八道生理仪相连监测门脉灌注压(PP), 另一端连于恒流泵, 以每克肝 1.7 mL/min 的恒定流速向肝内灌流. 迅速结扎切断腹主动脉, 结扎并切断肾脏上方下腔静脉, 打开胸腔, 出肝下腔静脉内插管至肝静脉, 分离切除肝脏, 移出体外, 肝静脉插管经三通一端通过压力换能器与八道仪相连监测肝静脉压(Phv), 另一端连于灌流系统的流出端, 建立离体肝灌流通路. 灌流液为含 40 g/L 牛血清白蛋白的 Krebs' s 溶液(NaCl 118.3, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄·7H₂O 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, 葡萄糖 11.0 mmol/L, pH 7.4), 加以混合氧(O₂/CO₂, V/V:0.95/0.05)灌冲达饱和, 灌流 20 min, 排除肝内血液成分后, 进行再循环灌流, 20 min 后, 灌流系统基本达到稳定状态, 此时的 PP 和 Phv 为基础状态(baseline)压力, 然后开始给药进行干预. 灌流过程中持续监测胆汁流率并检测灌流液 pH 值、氧分压、K⁺ 浓度以及酶学等指标(表 1). 预实验结果显示本实验离体肝脏可在体外存活 6 h, 并保持对药物反应良好状态.

统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用 t 检验, 以 P < 0.05 具有统计学意义.

2 结果

2.1 抑制 NO 合成对 LC 大鼠 PP 和 Phv 的作用 基础状态下 L-LC 组 PP 高于 E-LC 组(P < 0.01)高于对照组(P < 0.01). 门脉灌注 L-NAME, L-LC 组、E-LC 组、对照组 PP 与 Phv 均无明显变化(P > 0.05, 表 2). 灌流过程中空白组 PP、Phv 较基础状态亦无明显改变(P > 0.05), 灌流本身对灌注压无明显影响(表 2).

2.2 ET-1 对 LC 大鼠 PP 和 Phv 的调节作用 门脉灌注 ET-1 可明显增加大鼠的 PP (P < 0.01), L-LC 组 PP 增加幅度(Δ PP₁)大于 E-LC 组(P < 0.01)大于对照组(P < 0.01); 门脉灌注 ET-1 对 Phv 无明显调节作用(P > 0.05).

2.3 抑制 NO 合成对 ET-1 的影响 给予 L-NAME+ET-1 与单独给予 ET-1 相比, PP 进一步增高(P < 0.05), Phv 无明显变化(P > 0.05), LC 大鼠 PP 增加幅度(Δ PP₂)大于正常大鼠(P < 0.01), 但 L-LC 组 PP 增加幅度与 E-LC 组无明显差异(P > 0.05).

表 1 Krebs' s 灌注前后肝脏各参数的变化($\bar{x} \pm s$)

参数	灌注前	灌注后
pH	7.40 ± 0.05	7.38 ± 0.04
PO ₂ (kPa)	7.81 ± 2.71	9.16 ± 4.41
K ⁺ (mmol/L)	6.53 ± 0.31	6.78 ± 0.61
ALT (U/L)	10.1 ± 4.33	7.21 ± 4.24
AST(U/L)	17.64 ± 5.25	12.32 ± 4.14
ALP(U/L)	3.55 ± 0.98	3.14 ± 0.77
Bilirubin(μmol/L)	1.86 ± 0.79	1.43 ± 1.06

*P > 0.05, vs 灌注前.

表2 ET-1, NO对离体肝脏PP和Phv的影响($\bar{x} \pm s$, kPa)

		对照组	E-LC	L-LC
基础状态	PP	0.838 \pm 0.09	1.159 \pm 0.12	1.446 \pm 0.21
	Phv	0.132 \pm 0.06	0.146 \pm 0.07	0.173 \pm 0.08
L-NAME	PP	0.844 \pm 0.11	1.181 \pm 0.11	1.431 \pm 0.23
	Phv	0.137 \pm 0.04	0.150 \pm 0.08	0.149 \pm 0.03
ET-1	PP	1.461 \pm 0.19 ^a	2.102 \pm 0.15 ^{ac}	2.985 \pm 0.16 ^{acd}
	Δ PP ₁	0.687 \pm 0.08	0.942 \pm 0.03 ^c	1.589 \pm 0.04 ^{cd}
	Phv	0.136 \pm 0.02	0.161 \pm 0.01	0.164 \pm 0.01
L-NAME+ET-1	PP	1.716 \pm 0.18 ^{ab}	2.341 \pm 0.19 ^{abc}	3.338 \pm 0.21 ^{abcd}
	Δ PP ₂	0.183 \pm 0.04	0.307 \pm 0.05 ^c	0.304 \pm 0.04 ^c
	Phv	0.151 \pm 0.03	0.154 \pm 0.04	0.148 \pm 0.02
空白对照组	PP	0.825 \pm 0.08	1.163 \pm 0.13	1.442 \pm 0.25
	Phv	0.164 \pm 0.07	0.144 \pm 0.03	0.156 \pm 0.04

^aP < 0.01, vs 基础状态; ^bP < 0.05, vs ET-1组; ^cP < 0.01, vs 空白对照组; ^dP < 0.05, E-LC vs L-LC.

3 讨论

LC患者血浆ET-1^[1-13], NO^[14-18]等多种VAS均有增加,作用失衡是导致血流动力学紊乱的主要原因。ET-1, NO间存在相互作用:ET-1能诱导内皮细胞eNOS表达,促进内皮细胞钙内流增加NO合成,并与血管内皮细胞ET_{B1}结合促进NO释放;NO则通过增加cGMP抑制ET-1合成,拮抗ET-1之缩血管效应。体外研究发现NO能抑制ET-1诱导的HSC收缩^[22,23],增加NO合成能削弱ET-1升高门脉压的作用^[19-23]。ET、NO等血管活性物质在导致门脉高压中各自作用,相互影响^[24-30],以及在肝硬化的不同时期、不同病理阶段,这些物质在体内分布及对肝脏和内脏血管的调节作用各家报道不尽一致。我们根据造模不同时间,结合肝组织病理改变及有无腹水对LC进行分期,采用离体肝灌注技术,在不受其他血管活性物质干扰的情况下,动态研究了ET-1, NO对肝血流动力学的调节作用。证明ET-1能增加PP,增加肝内血流阻力^[31-34],且随LC病情发展肝循环对ET-1收缩反应敏感性增强,说明ET-1是导致PHT的主要VAS,ET-1在LC,尤其是LC晚期PHT发生中起着重要作用。肝硬化时ET-1浓度增加,且随着病情加重增高更为明显,此对ET在门脉高压中的作用进一步肯定,并对研究肝硬化门脉高压的发生机制及对本病的治疗提供了有意义资料。

有关ET-1, NO间相互作用的研究结果显示:单独给予L-NAME无论是LC组还是对照组PP均无明显改变(表2),既往也有类似报道^[22,23],基础状态下NO在门脉压维持中未起主要作用,可能与肝内一氧化碳(CO)合成增加抑制cGMP合成酶系统功能,对抗了NO的扩血管效应。但联合给予L-NAME+ET-1与单独给予ET-1相比,PP进一步升高,L-LC组与E-LC组PP增加幅度(Δ PP₂)无明显差异(P > 0.05),但均高于正常

大鼠。抑制NO合成能加强ET-1的升压作用,即NO能拮抗ET-1的升压作用,由于基础状态下NO在门脉压维持中并未起主要作用,这就说明ET-1可能通过与ET_{B1}结合、增加内皮细胞Ca²⁺内流,上调eNOS表达等促进了NO合成与释放,且此促进作用在LC时增强。LC时肝循环对ET-1收缩反应敏感性增加,ET-1促进NO合成作用增强可能系肝循环对抗ET-1升压作用的代偿机制之一。LC时肝内ET-1合成增加,而eNOS活性减低、eNOS源性NO合成减少,肝循环对ET-1收缩反应敏感性增强远远超出了NO的代偿能力,且随LC病情发展肝循环对ET-1收缩反应敏感性进一步增高,而ET-1促进NO合成作用并未随之增强,随着LC病情发展NO代偿能力进一步下降,导致ET-1, NO间作用失衡是肝内血流阻力增加的重要原因^[18,21]。

LC时肝内ET-1合成增加,且ET-1升高随病情发展而加重,随LC病情加重肝循环对ET-1反应敏感性增强、NO代偿能力下降,所以作者认为在本病的治疗上可考虑应用NO供体增加肝内NO合成,抑制ET-1作用、降低肝内阻力。如能通过转基因技术靶向增加肝内NO合成,不但可直接拮抗ET-1的缩血管作用,还能抑制肝内ET-1的合成,可在不加重高动力循环状态的情况下降低肝内阻力^[15,24]。L-LC后期随病情加重肝循环对ET-1反应敏感性亦有增强,因此推测导致门脉高压的主要始动因素可能为ET,ET可增加内脏小动脉内皮细胞eNOS的表达,如同肝循环内脏血管NO可能也系代偿性增高?因此认为应用ET受体拮抗剂或ET转化酶抑制剂可能是良好的选择^[35-39]。用药后非但可降低肝内阻力,而且可能通过减少内脏小动脉NO的合成,改善内脏高动力循环状态。

4 参考文献

- Liu F, Li JX, Li CM, Leng XS. Plasma endothelin in patients with endotoxemia and dynamic comparison between vasoconstrictor and vasodilator in cirrhotic patients. *World J Gastroenterol* 2001;7:126-127
- Chen S, Liu B, Cai XM, Gu CH. Clinical significance of changes of endothelin and nitric oxide levels in peripheral blood of patients with severe hepatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:122-124
- Wu CH. Fibrodynamics-elucidation of the mechanisms and sites of liver fibrogenesis. *World J Gastroenterol* 1999;5:388-390
- Hasegawa T, Kimura T, Sasaki T, Okada A. Plasma endothelin-1 level as a marker reflecting the severity of portal hypertension in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2001;36:1609-1612
- Ohara N, Futagawa S, Watanabe S, Fukasawa M, Takamori S. Clinical investigation of endothelin-1 and nitric oxide in patients with portal hypertension focusing on plasma levels and immunohistological staining of liver tissues. *Hepatol Res* 2001;21:40-54
- Alam I, Bass NM, Bacchetti P, Gee L, Rockey DC. Hepatic tissue endothelin-1 levels in chronic liver disease correlate with disease severity and ascites. *Am J Gastroenterol* 2000;95:199-203
- Kuddus RH, Nalesnik MA, Subbotin VM, Rao AS, Gandhi CR. Enhanced synthesis and reduced metabolism of endothelin-1 (ET-1) by hepatocytes—an important mechanism of increased endogenous levels of ET-1 in liver cirrhosis. *J Hepatol* 2000;33:725-732

- 8 Hocher B, Brause M, Mendes U, Berger D, Buhler H, Gross P. Impact of the endothelin system on water and sodium excretion in patients with liver cirrhosis. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1133-1138
- 9 Kamath PS, Carpenter HA, Lloyd RV, McKusick MA, Steers JL, Nagorney DM, Miller VM. Hepatic localization of endothelin-1 in patients with idiopathic portal hypertension and cirrhosis of the liver. *Liver Transpl* 2000;6:596-602
- 10 Helmy A, Jalan R, Newby DE, Johnston NR, Hayes PC, Webb DJ. Altered peripheral vascular responses to exogenous and endogenous endothelin-1 in patients with well-compensated cirrhosis. *Hepatology* 2001;33:826-831
- 11 张莉娟,王小众,黄月红,陈治新. 降钙素基因相关肽、血管紧张素 II 和内皮素在大鼠纤维化中的作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:457-459
- 12 李蕴钊,孙静媛,王笑梅,张首省,杨胜彩. 一氧化氮和内皮素在肝硬化合并肝肾综合征患者中的变化及意义. *世界华人消化杂志* 2000;8:484-485
- 13 张晓岚,姜慧卿,靳洪涛,秦玉彩,姚希贤. 肝硬化患者血浆降钙素基因相关肽及内皮素-1 的水平. *世界华人消化杂志* 2000;8:929-930
- 14 Huang YQ, Xiao SD, Zhang DZ, Mo JZ. Nitric oxide synthase distribution in esophageal mucosa and hemodynamic changes in rats with cirrhosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:213-216
- 15 Van de Casteele M, Omasta A, Janssens S, Roskams T, Desmet V, Nevens F, Fevery J. In vivo gene transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats. *Gut* 2002;51:440-445
- 16 张崴,任万英,张世兰,王海滨. 肝硬化腹水患者血浆降钙素原与一氧化氮的变化. *世界华人消化杂志* 2002;10:1353-1354
- 17 Wiest R, Groszmann RJ. Nitric oxide and portal hypertension: its role in the regulation of intrahepatic and splanchnic vascular resistance. *Semin Liver Dis* 1999;19:411-426
- 18 Cahill PA, Redmond EM, Sitzmann JV. Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol Ther* 2001;89:273-293
- 19 Fukushima H, Doi Y, Kudo H, Kayashima K, Kiyonaga H, Nagata T, Itoh H, Fujimoto S. Synthesis and receptor sites of endothelin-1 in the rat liver vasculature. *Anat Rec* 2000;259:437-445
- 20 Petrowsky H, Schmandra T, Lorey T, Hanisch E, Herrmann G. Endothelin-induced contraction of the portal vein in cirrhosis. *Eur Surg Res* 1999;31:289-296
- 21 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002;50:571-581
- 22 Zhang M, Luo B, Chen SJ, Abrams GA, Fallon MB. Endothelin-1 stimulation of endothelial nitric oxide synthase in the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome. *Am J Physiol* 1999;277:G944-G952
- 23 Tong Q, Zeng L. Study on the correlation of plasma NO, ET-1 and ALT in the patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *J Tongji Med Univ* 2000;20:203-204
- 24 Yu Q, Shao R, Qian HS, George SE, Rockey DC. Gene transfer of the neuronal NO synthase isoform to cirrhotic rat liver ameliorates portal hypertension. *J Clin Invest* 2000;105:741-748
- 25 Bauer M, Bauer I, Sonin NV, Kresge N, Baveja R, Yokoyama Y, Harding D, Zhang JX, Clemens MG. Functional significance of endothelin B receptors in mediating sinusoidal and extrasinusoidal effects of endothelins in the intact rat liver. *Hepatology* 2000;31:937-947
- 26 Chan CC, Wang SS, Lee FY, Chang FY, Lin HC, Chu CJ, Chen CT, Huang HC, Lee SD. Endothelin-1 induces vasoconstriction on portal-systemic collaterals of portal hypertensive rats. *Hepatology* 2001;33:816-820
- 27 Sarela AI, Mihaimeed FM, Batten JJ, Davidson BR, Mathie RT. Hepatic and splanchnic nitric oxide activity in patients with cirrhosis. *Gut* 1999;44:749-753
- 28 Shah V, Toruner M, Haddad F, Cadelina G, Papapetropoulos A, Choo K, Sessa WC, Groszmann RJ. Impaired endothelial nitric oxide synthase activity associated with enhanced caveolin binding in experimental cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1999;117:1222-1228
- 29 Shah V. Cellular and molecular basis of portal hypertension. *Clin Liver Dis* 2001;5:629-644
- 30 Vapaatalo H, Mervaala E. Clinically important factors influencing endothelial function. *Med Sci Monit* 2001;7:1075-1085
- 31 Kojima H, Sakurai S, Kuriyama S, Yoshiji H, Imazu H, Uemura M, Nakatani Y, Yamao J, Fukui H. Endothelin-1 plays a major role in portal hypertension of biliary cirrhotic rats through endothelin receptor subtype B together with subtype A in vivo. *J Hepatol* 2001;34:805-811
- 32 Tieche S, De Gottardi A, Kappeler A, Shaw S, Sagesser H, Zimmermann A, Reichen J. Overexpression of endothelin-1 in bile duct ligated rats: correlation with activation of hepatic stellate cells and portal pressure. *J Hepatol* 2001;34:38-45
- 33 Heneghan MA, Harrison PM. Pathogenesis of ascites in cirrhosis and portal hypertension. *Med Sci Monit* 2000;6:807-816
- 34 Bruno CM, Neri S, Sciacca C, Caruso L. Plasma endothelin-1 levels in liver cirrhosis. *Int J Clin Lab Res* 2000;30:169-172
- 35 Yokomori H, Oda M, Ogi M, Kamegaya Y, Tsukada N, Nakamura M, Ishii H. Enhanced expression of endothelin receptor subtypes in cirrhotic rat liver. *Liver* 2001;21:114-122
- 36 Rockey DC. Vasoactive agents in intrahepatic portal hypertension and fibrogenesis: implications for therapy. *Gastroenterology* 2000;118:1261-1265
- 37 Kojima H, Yamao J, Tsujimoto T, Uemura M, Takaya A, Fukui H. Mixed endothelin receptor antagonist, SB209670, decreases portal pressure in biliary cirrhotic rats in vivo by reducing portal venous system resistance. *J Hepatol* 2000;32:43-50
- 38 Poo JL, Jimenez W, Maria Munoz R, Bosch-Marce M, Bordas N, Morales-Ruiz M, Perez M, Deulofeu R, Sole M, Arroyo V, Rodes J. Chronic blockade of endothelin receptors in cirrhotic rats: hepatic and hemodynamic effects. *Gastroenterology* 1999;116:161-167
- 39 Zhang C, Liu JJ, Wang JY. Hemodynamic influence of selective endothelin receptor antagonists on portal hypertensive rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:1339-1344

大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用

梁增文, 张国, 王天才

梁增文, 张国, 广西壮族自治区人民医院消化内科
广西壮族自治区南宁市 530021
王天才, 华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所
湖北省武汉市 430030
梁增文, 男, 1968-06-06 生, 广西壮族自治区天等县人, 壮族. 1992 年广西医科大学本科毕业, 2000 年广西医科大学硕士研究生毕业, 主治医师. 主要从事肝纤维化的研究.
广西壮族自治区自然科学基金资助项目, No.0135035
项目负责人: 张国, 530021, 广西壮族自治区南宁市桃源路 6 号, 广西壮族自治区人民医院消化内科. phdoctorzhang@163.net
电话: 771-2808513-2627
收稿日期: 2002-10-07 接受日期: 2002-10-22

Extracellular signal-regulated kinase in liver fibrogenesis of rat

Zeng-Wen Liang, Guo Zhang, Tian-Cai Wang

Zeng-Wen Liang, Guo Zhang, Department of Digestive Diseases, People's Hospital, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Nationality Autonomous Region, China
Tian-Cai Wang, Hepatic Institute, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by the Natural Scientific Foundation of Guangxi Zhuang Nationality Autonomous Region, No.0135035
Correspondence to: Dr. Guo Zhang, Department of Digestive Diseases, People's Hospital, 6 Taoyuan Road, Nanning 530021, Guangxi Zhuang Nationality Autonomous Region, China. phdoctorzhang@163.net
Received: 2002-10-07 Accepted: 2002-10-22

Abstract

AIM: To explore the role of ERK signal transduction pathway in the pathogenesis of liver fibrosis via investigating the expression and distribution of ERK1 in rats with liver fibrosis.

METHODS: Liver fibrosis model of rats were made by subcutaneously injecting with CCl₄. Thirty-two male SD rats (weight 250-300 g) were randomly scarified at 1, 4 and 8 weeks after injection of CCl₄ respectively, and their liver were used to detect ERK1 expression by immunohistochemical staining.

RESULTS: The expression of ERK1 in rats after injection with CCl₄ were found chiefly in hepatic stellate cells (HSC) and all significantly higher than those in normal rats ($P < 0.05$). Moreover, it presented with a progressive tendency for the expression of ERK1 in rats respectively at 1st, 4th and 8th week after injection with CCl₄ ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The activation of ERK signal transduction pathway enhances HSC proliferation, and it may play an important role in liver fibrogenesis in rat.

Liang ZW, Zhang G, Wang TC. Extracellular signal-regulated kinase in liver fibrogenesis of rat. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(6):730-732

摘要

目的: 通过研究大鼠肝纤维化模型肝组织中细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)的表达和分布规律, 初步探讨 ERK 信号传导通路在肝纤维化发病机制中的作用.

方法: ♂ SD 大鼠 32 只, 质量 250-300 g, 皮下注射 CCl₄ 制备大鼠肝纤维化模型, 分别于注射 CCl₄ 后 1, 4, 8 wk 处理动物, 采用免疫组织化学方法检测肝组织中 ERK1 的表达及分布.

结果: ERK1 主要表达于肝星状细胞中. CCl₄ 注射诱导后, 大鼠肝组织中 ERK1 的表达较正常对照明显增强 ($P < 0.05$). 且 CCl₄ 注射 1, 4, 8 wk 组肝组织中 ERK1 的表达强度呈明显的逐级递增的趋势 ($P < 0.05$).

结论: ERK 信号传导通路的激活促进肝星状细胞的活化增生, 可能与大鼠肝纤维化的发生发展有关.

梁增文, 张国, 王天才. 大鼠肝纤维化中细胞外信号调节激酶的作用. *世界华人消化杂志* 2003;11(6):730-732

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/730.asp>

0 引言

细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)可能与器官纤维化的发生有关^[1-4]. 但 ERK 通路是否参与肝纤维化过程尚无明确报道. 我们应用免疫组织化学方法对 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠肝组织进行检测, 初步探讨该信号转导通路在肝纤维化发生中的作用如下.

1 材料和方法

1.1 材料 健康 ♂ SD 大鼠(由华中科技大学实验动物中心提供)32 只, 质量 200-300 g, 随机均分为 1, 4, 8 wk 及正常对照 4 组. 主要试剂: 兔抗人 ERK1 抗体和 ABC 二抗试剂盒购自北京中山生物技术有限公司, 内源性生物素封闭液(ABB 液)购自武汉博士德公司.

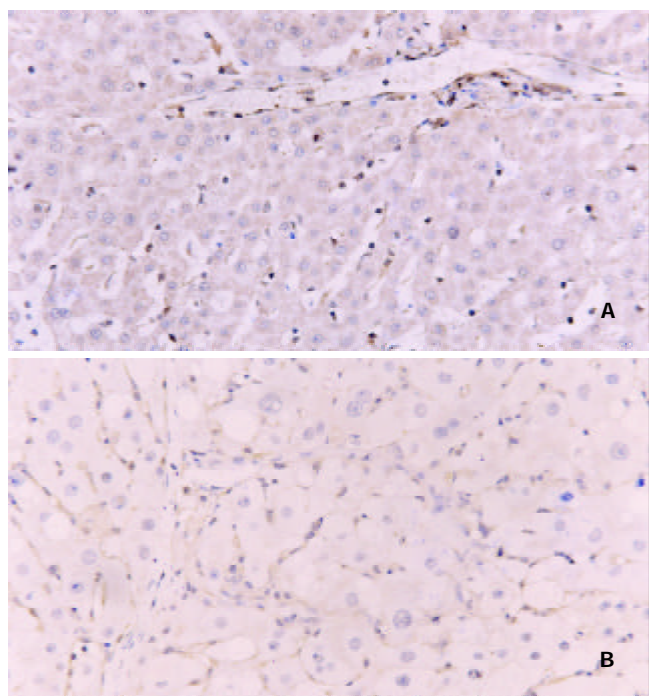
1.2 方法 肝纤维化模型制备及标本处理: 按 0.3 ml/100 g 体重的剂量, 皮下注射 40 ml/L CCl₄ 油剂, 2 次/wk. 分别在注射 CCl₄ 第 1, 4, 8 周分批处死动物, 留取肝脏组织, PBS(PH7.4)清洗后 100 ml/L 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 连续 5 μ m 切片. 免疫组织化学染色: 采用 SABC 法, 石蜡切片常规脱蜡, 30 ml/L H₂O₂ 甲醇溶液室温孵育 15 min, PBS 洗涤 5 min \times 2 遍后, 用

0.01 mol/L 的柠檬酸缓冲液(pH6.0)加热至 92-96 °C 修复抗原 15 min, 冷却后依次滴加 ABB 液和正常兔血清封闭各 10 min, 而后用 ERK1 一抗 4 °C 孵育过夜; 次日取出切片以 PBS 冲洗后, 再依次滴加生物素化羊抗兔二抗、链酶卵白素; 最后 DAB 显色, 苏木素复染. 常规乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片保存. 光镜下观察并分析 ERK1 表达情况. ERK1 抗体稀释度为 1:200. 用 PBS 代替一抗作阴性对照. 图像分析和数据统计: 用 HPIAS-1000 型全自动医学图像彩色分析系统(由华中科技大学同济医学院病理教研室提纲)进行图像半定量分析, 每张切片随机选取 5 个视野, 测定肝组织中 ERK1 的棕黄色阳性表达颗粒的平均吸光度 A 值.

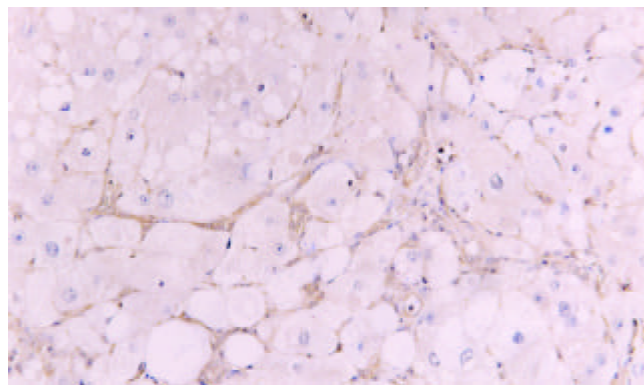
统计学处理 应用 SPSS 统计软件对四组数据进行 ANOVA 检验, 结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

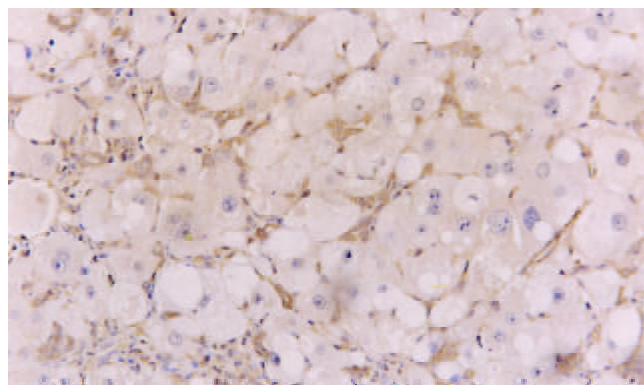
在正常肝组织中, ERK1 呈针尖状棕黄色弱阳性表达, 主要见于汇管区、小叶中央静脉周围及肝索 Disse 腔间隙中. 高倍镜下, ERK1 分布于 Disse 间隙的 HSC 胞质中, 肝细胞未见表达(图 1A). 在 CCl₄ 注射 1, 4, 8 wk 组肝组织中, ERK1 的表达明显增多、增强, 低倍镜下可见小叶中央静脉周围、汇管区以及肝小叶内均有大量条索状、星芒状的 ERK1 阳性表达. 高倍镜下, ERK1 阳性表达主要分布于 HSC 胞质、胞核中. 在 8 wk 组肝纤维化组织中, 除 HSC 表达外, 亦有零星肝细胞胞质、胞核呈 ERK1 阳性(图 1B, C, D). 随 CCl₄ 诱导时间的延长, ERK1 在正常对照组及 CCl₄ 注射 1, 4, 8 wk 组肝组织中的表达强度呈明显的逐级递增的趋势(0.3597 ± 0.0140 , 0.3849 ± 0.0199 , 0.7876 ± 0.0316 , 0.9125 ± 0.0158 , $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$).



A: 正常.
B: CCl₄ 注射 1 wk.



C: CCl₄ 注射 4 wk.



D: CCl₄ 注射 8 wk.
图 1 大鼠肝组织中 ERK1 的表达 SABC $\times 200$.

3 讨论

肝纤维化是大多数慢性肝病向肝硬化发展的共同病理过程^[5-7]. 研究证实, 肝星状细胞(haptic stellate cell, HSC)增生、活化及分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)是肝纤维化形成的重要机制^[8-12]. 近年资料表明, 肝慢性损伤及炎症反应时, HSC 最强的促分裂剂血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)及其受体的表达明显增强^[13-16]. 而 PDGF 活化信号可能是通过 Ras/raf/ERK 级联通路进行转导的^[17-20]. 为此, 我们对 ERK1 在大鼠肝纤维化发生、发展中的表达及分布进行了研究, 结果显示: CCl₄ 注射诱导后, 大鼠肝组织中 ERK1 的表达较正常对照明显增多、增强; 在正常大鼠肝组织中, ERK1 呈肝间质细胞胞质分布, 正常肝细胞内则未见表达; 在 CCl₄ 诱导各阶段, ERK1 在 HSC 胞质、胞核均有表达, 呈核浆型分布; 随着 CCl₄ 注射诱导时间的延长, 肝组织 ERK1 表达呈逐渐增强趋势.

Ras/raf/ERK 信号通路是 MAPK 众多途径中不可缺少的组成之一, 能将多种细胞外信号通过磷酸化的活化方式逐级传递至细胞核, 激活多种转录因子, 参与细胞增生、分化以及细胞恶性转化等多种生理、病理过程^[21-23]. ERK(包括 ERK1、ERK2 两种亚型)即是此通路中极为关键的一员, 负责将胞质内的活化信号传递入胞核内^[24-26]. ERK 为丝氨酸/苏氨酸激酶, 激活后可催化 c-jun、c-fos、c-myc 以及核糖体 S6 蛋白激酶

(RSK)的磷酸化,后者诱导靶基因的转录,促使细胞由G0期进入到G1期,继而调节细胞增生^[27-30].我们的结果显示,在各肝纤维化组中,ERK1的表达强度随着肝纤维化程度的加重而明显增强,而且由单纯性胞质分布转变为核质型分布,提示ERK携带信号的核转入明显增多,与HSC的增生密切相关.而HSC作为肝纤维化形成过程中起关键作用的细胞,他的激活是整个事件发生的开端,由此推测,ERK介导的信号通路促进肝星状细胞的增生、活化,参与了肝纤维化发生、发展过程.

4 参考文献

- Jaster R, Sparmann G, Emmrich J, Liebe S. Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells. *Gut* 2002;51:579-584
- Chess PR, Toia L, Finkelstein JN. Mechanical strain-induced proliferation and signaling in pulmonary epithelial H441 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L43-51
- Ihn H, Tamaki K. Oncostatin M stimulates the growth of dermal fibroblasts via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Immunol* 2000;165:2149-2155
- Hannken T, Schroeder R, Zahner G, Stahl RA, Wolf G. Reactive oxygen species stimulate p44/p42 mitogen-activated protein kinase and induce p27(Kip1): role in angiotensin II-mediated hypertrophy of proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 2000;11:1387-1397
- Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000;46:443-446
- Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells. *Liver* 1998;18:2-13
- 秦建平,蒋明德.肝星状细胞的表型及调控与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2001;9:801-804
- Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001;21:437-451
- 黄光存,张锦生.肝星状细胞激活的细胞内信号转导. *世界华人消化杂志* 2001;9:1056-1060
- 刘涛,胡晋红,蔡溱,计一平.贮脂细胞内的信号传导分子. *世界华人消化杂志* 2001;9:805-807
- Wu J, Zern MA. Hepatic stellate cells: a target for the treatment of liver fibrosis. *J Gastroenterol* 2000;35:665-672
- 姜慧卿,张晓岚.肝纤维化的发生机制. *世界华人消化杂志* 2000;8:687-689
- Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells-a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d808-826
- 刘学松,张锦生,张月娥.血小板源生长因子对肝星状细胞增生和胶原及血小板源生长因子表达的影响. *中华病理学杂志* 2000;29:27-29
- Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 1999;19:129-140
- 辛绍杰,赵景民,王林杰,王松山.血小板衍生生长因子及其受体与病毒性肝炎肝纤维化的关系. *中华实验和临床病毒学杂志* 1998;12:51-53
- Iwamoto H, Nakamuta M, Tada S, Sugimoto R, Enjoji M, Nawata H. Platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor AG1295 attenuates rat hepatic stellate cell growth. *J Lab Clin Med* 2000;135:406-412
- Marra F, Arrighi MC, Fazi M, Caligiuri A, Pinzani M, Romanelli RG, Efsen E, Laffi G, Gentilini P. Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factors actions in hepatic stellate cells, and is induced by in vivo liver injury in the rat. *Hepatology* 1999;30:951-958
- Carloni V, Pinzani M, Giusti S, Romanelli RG, Parola M, Bellomo G, Failli P, Hamilton AD, Sebt SM, Laffi G, Gentilini P. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase by PDGF is dependent on ras in human hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:131-140
- Mallat A, Gallois C, Tao J, Habib A, Macclouf J, Mavrier P, Preaux AM, Lotersztajn S. Platelet-derived growth factor-BB and thrombin generate positive and negative signals for human hepatic stellate cell proliferation. Role of a prostaglandin/cyclic AMP pathway and cross-talk with endothelin receptors. *J Biol Chem* 1998;273:27300-27305
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 1999;79:143-180
- Toyoda M, Hashimoto N, Tokita K, Goldstein BJ, Yokosuka O, Kanatsuka A, Suzuki Y, Saito Y. Increased activity and expression of MAP kinase in HCC model rats induced by 3'-methyl-4-dimethylamino-azobenzene. *J Hepatol* 1999;31:725-733
- Schnaper HW. Cell signal transduction through the mitogen-activated protein kinase pathway. *Pediatr Nephrol* 1998;12:790-795
- 陈黎明,习羽,王陆军.细胞因子对细胞外基质在肝内沉积的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:59-60
- 周志琦,刘强.真核生物的MAPK级联信号传递途径. *生物化学与生物物理进展* 1998;25:496-503
- Reeves HL, Thompson MG, Dack CL, Burt AD, Day CP. The role of phosphatidic acid in platelet-derived growth factor-induced proliferation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 2000;31:95-100
- Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A, Ueki T, Hirano T, Yamamoto H, Fujimoto J, Okamoto E, Hayashi N, Hori M. Activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998;27:951-958
- Nguyen DH, Catling AD, Webb DJ, Sankovic M, Walker LA, Somlyo AV, Weber MJ, Gonias SL. Myosin light chain kinase functions downstream of Ras/ERK to promote migration of urokinase-type plasminogen activator-stimulated cells in an integrin-selective manner. *J Cell Biol* 1999;146:149-164
- 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
- He KL, Gai LY, Huang DX, Liu NK, Tang CS. Inhibition of ERK1/2 activity and c-fos mRNA after coronary artery balloon injury by intracoronary radiation in swine. *Shengli Xuebao* 2000;52:301-304

环氧合酶 - 2 反义核酸对人胆管癌细胞增生的影响

吴高松,武小勇,邹声泉,裘法祖

吴高松,武小勇,邹声泉,裘法祖,华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科 湖北省武汉市 430030
吴高松,男,1966-05-03 生,湖北省武穴市人,汉族. 1989 年同济医科大学本科毕业,2000 年同济医科大学博士研究生毕业,主治医师. 主要从事肝胆外科分子生物学研究.

项目负责人:吴高松,430030,湖北省武汉市,华中科技大学同济医学院附属同济医院普外科. wugaosong9172@sina.com

电话:027-83660874 传真:027-83662851

收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-11-13

Effects of cyclooxygenase-2 antisense vector on proliferation of human cholangiocarcinoma cells

Gao-Song Wu, Xiao-Yong Wu, Sheng-Quan Zou, Fa-Zu Qiu

Gao-Song Wu, Xiao-Yong Wu, Sheng-Quan Zou, Fa-Zu Qiu, Department of General Surgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Correspondence to: Dr. Gao-Song Wu, Department of General Surgery, Tongji Hospital, 1095 Jiefang Road, Wuhan 430030, Hubei Province, China. wugaosong9172@sina.com

Received: 2002-11-06 Accepted: 2002-11-13

Abstract

AIM: To transfect antisense vector of human COX-2 gene into COX-2 highly expressing cholangiocarcinoma cell line QBC939 and to explore its biological activities and role in carcinogenesis.

METHODS: QBC939 cells were transfected with antisense vector of human COX-2 gene using LipoVec™ transfecting technique. Transfected cells were selected with G418; COX-2 mRNA was examined by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and COX-2 protein expression was detected by immunocytochemistry using isozyme selective antibodies. The proliferative status of transfected cells was measured by using methabenzthiazuron (MTT) assay; Cell cycle and apoptosis was analyzed by using flow cytometry (FCM).

RESULTS: RT-PCR showed a lower COX-2 mRNA level in transfected cells and immunocytochemistry showed weaker COX-2 protein expression in transfected cells. The proliferative index of the transfected cells decreased significantly ($P < 0.01$), the percentage of S phase decreased remarkably in transfected cells ($9.27 \pm 1.91\%$) compared with that in QBC939 cells without transfection ($16.35 \pm 2.87\%$) ($P < 0.05$), and the percentage of G0/G1 phase increased remarkably in transfected cells ($75.16 \pm 4.13\%$) compared with that in QBC939 cells without transfection ($57.31 \pm 10.16\%$) ($P < 0.05$). Transfection with antisense vector of human COX-2 gene had no significant influence on the apoptosis in QBC939 cells ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Transfection with antisense vector of human

COX-2 gene is able to inhibit the proliferation of human cholangiocarcinoma QBC939 cells.

Wu GS, Wu XY, Zou SQ, Qiu FZ. Effects of cyclooxygenase-2 antisense vector on proliferation of human cholangiocarcinoma cells. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(6):733-736

摘要

目的: 用反义环氧合酶-2(COX-2)重组载体转染COX-2高表达人胆管癌细胞QBC939, 观察其对QBC939细胞的生长抑制作用, 并探讨其作用机制.

方法: 通过脂质体介导将COX-2反义核酸质粒转入QBC939细胞, 经G418筛选获得稳定表达COX-2反义核酸的胆管癌转染细胞模型. 采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术检测转染前后QBC939细胞COX-2 mRNA表达的变化, 应用免疫细胞化学链霉亲和素-生物素复合物(SABC)技术检测转染前后QBC939细胞COX-2蛋白表达水平的变化, 应用四唑氮蓝(MTT)比色法检测COX-2反义核酸对QBC939细胞增生的影响, 应用流式细胞仪测定细胞周期和细胞凋亡.

结果: 反义COX-2基因转染后胆管癌细胞中COX-2 mRNA表达水平明显下调, COX-2蛋白表达减弱. 转染反义COX-2重组载体的QBC939细胞生长速率明显下降($P < 0.01$), 细胞周期分析转染后细胞比转染前细胞增生指数显著下降($P < 0.01$), S期细胞比例为 $9.27 \pm 1.91\%$, 比转染前($16.35 \pm 2.87\%$)明显降低($P < 0.05$), G0/G1期细胞比例为 $75.16 \pm 4.13\%$, 比转染前($57.31 \pm 10.16\%$)明显上升($P < 0.05$), 细胞被抑制在G0/G1期; COX-2反义核酸转染对QBC939细胞凋亡率无明显影响($P > 0.05$).

结论: COX-2反义核酸导入可抑制QBC939细胞增生.

吴高松,武小勇,邹声泉,裘法祖. 环氧合酶-2反义核酸对人胆管癌细胞增生的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(6):733-736

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/733.asp>

0 引言

COX-2除了在炎症反应中起作用外, 还与癌症的发生有关^[1-3]. COX-2表达上调与胆管癌的形成关系密切^[4]. 我们通过脂质体介导将反义COX-2重组载体转染COX-2高表达人胆管癌细胞QBC939, 观察COX-2反义核酸对QBC939细胞的生长抑制作用, 并探讨其作用机制, 为COX-2反义核酸用于胆管癌的治疗提供实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 人胆管癌细胞系 QBC939 由第三军医大学西南医院王曙光教授^[5]建系并惠赠, 我室保存; RPMI1640 培养基及胎牛血清购自 Gibco 公司; 胆管癌 QBC939 细胞在含 10 mL/L 胎牛血清的培养基中置于 37 °C, 50 mL/L CO₂ 孵育箱常规培养; 人 COX-2 反义重组质粒载体 pcDNA3.1/hCOX2(-) 由第四军医大学西京医院吴开春教授^[6]构建并惠赠; 空载体 pcDNA3.1 由我室保存. LipoVecTM 脂质体购自美国 InvivoGen 公司; RNA 提取试剂盒 RNA-SOLV 为 Omega 公司产品; PBR322 marker 购自晶美公司; 引物由上海生工公司合成; 兔抗人 COX-2 多克隆抗体购自北京中山生物技术有限公司 (Santa Cruz 公司产品); SABC 试剂盒和 DAB 显色剂购自武汉博士德公司.

1.2 方法 取 pcDNA3.1/hCOX2(-) 质粒或 pcDNA3.1 质粒 3 µg 加入 (或不加任何质粒作空白对照) LipoVecTM 脂质体 100 µL 中混匀, 室温下作用 30 min 配置脂质体与质粒复合物. 以每孔 5×10^5 个细胞接种在 6 孔板中, 贴壁后用 20 倍体积含血清培养基稀释的上述复合物常规培养 3 d. 将各组细胞倍比稀释 (1:10, 1:50, 1:250) 至 24 孔板, 换用含 G418 (300 mg/L) 的筛选液继续培养 2 wk 后, 随机挑选转染组细胞克隆及对照组克隆, 扩大培养, 分别命名为 QBC-AS 和 QBC-P. 采用 RT-PCR 方法检测转染细胞 COX-2 mRNA 表达水平的变化. COX-2 上游引物: 5'-ACAATGCTGACTATGGCTAC-3', 下游引物: 5'-AACTGATGCGTGAAGTGCTG-3', 扩增产物 238 bp; 内参照 β -actin 上游引物: 5'-CATCACCATTGGCAATGAGCG-3', 下游引物: 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTCCGAC-3', 扩增产物 348 bp. 对数生长期细胞传代培养 3 d 后收集细胞. 细胞总 RNA 的提取按一步法 RNA 提取试剂 RNA-SOLV 说明书进行. 取 1/10 样品测定 RNA 浓度及纯度后用于 RT-PCR 扩增. cDNA 的合成: 冰上混合 RNA 样品 2 µL 及随机六聚体引物 1.25 µL, 70 °C 5 min 后, 加入逆转录酶缓冲液 4 µL, RNasin 0.5 µL 及 10 mmol/L dNTP 1.25 µL, 25 °C 5 min, 37 °C 60 min, 70 °C 加热 10 min 终止反应. PCR 反应体系: cDNA 10 µL, 10 × Taq 酶缓冲液 2 µL, 10 mmol/L dNTP 0.4 µL, 25 mmol/L MgCl₂ 0.8 µL, 上下游引物各 1 µL 及 Taq 酶 1 µL, 补水至 50 µL. PCR 反应条件: 94 °C 45 s, 58 °C 30 s, 72 °C 60 s, 共 30 次循环. 最后, 72 °C 3 min. 取扩增产物 10 µL, 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳分离, 紫外光下以计算机图像分析系统成像和定量分析, 以 COX-2/ β -actin 蛋白的吸光度比值表示 COX-2 mRNA 表达水平. 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化对数生长期肿瘤细胞, 制成单细胞悬液, 接种在盖玻片上, 置孵育箱中培养, 待细胞贴壁后取出, 用 PBS 清洗 2 次, 4 °C 冷丙酮固定 10 min 后取出自然干燥, -20 °C 冰箱保存, 进行免疫细胞化学 SABC 染色. 具体方法参见文献[4]. 每次实验均

设阴性和阳性对照. 用 PBS 代替一抗作阴性对照, 用已知阳性白片人结肠癌作阳性对照. MTT 比色试验: 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化对数生长期肿瘤细胞, 制成单细胞悬液. 以每孔 1.0×10^4 个细胞接种于 96 孔培养板. 置于 37 °C 50 mL/L CO₂ 孵育箱中分别培养 1, 2, 3 或 4 d 后每孔加入 MTT (5 g/L) 20 µL, 孵育 4 h, 弃上清, 加入 150 µL DMSO, 振荡 5 min 使结晶物充分溶解, 在酶联免疫检测分析仪上测定 A490 nm 值. 以只加培养液不加细胞的阴性对照孔调零, 每种样品设 3 个复孔, 实验重复 3 次. 收集培养 2 d 的 QBC-AS 和 QBC-P 肿瘤细胞, 胰酶充分消化, 800 r/min 离心 5 min, -20 °C 预冷的 80% 乙醇固定. 在流式细胞仪上作细胞周期和凋亡分析, 实验重复 3 次.

统计学处理 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示. 采用 SPSS 统计软件包的 t 检验, $P < 0.05$ 被认为有显著性意义.

2 结果

2.1 胆管癌细胞 COX-2 蛋白表达及 mRNA 表达水平 QBC-AS 细胞 COX-2 mRNA 表达水平与 QBC-P 细胞及 QBC939 细胞相比明显下调, QBC-P 细胞和 QBC939 细胞中 COX-2 mRNA 表达水平无明显变化 (图 1). COX-2 阳性表达表现为胞质或胞核出现棕黄色颗粒. QBC939 细胞表达呈强阳性, 胞质与胞核均有表达, COX-2 反义基因转染后的 QBC-AS 细胞表达呈弱阳性, 主要为胞质着色 (图 2, 3).

2.2 基因转染对胆管癌细胞增生周期和凋亡的影响 分别在培养 1, 2, 3, 4 和 5 d 测细胞密度, 绘制生长曲线 (图 4). QBC-AS 细胞生长速率明显低于对照组 QBC-P 细胞和 QBC939 细胞, 而 QBC-P 细胞和 QBC939 细胞生长速率无明显变化. QBC-AS 组 S 期细胞为 0.09 ± 0.02 , 比对照 QBC939 组 (0.16 ± 0.03) 明显降低 ($P < 0.05$), QBC-AS 组 G0/G1 期细胞为 0.75 ± 0.04 , 比 QBC939 组 (0.57 ± 0.10) 显著增高 ($P < 0.01$), 增生指数明显降低 ($P < 0.01$), 增生指数 (PI) 用 $(S+G2/M) \% \times 100$ 表示, QBC-AS 组和 QBC939 组细胞增生指数分别为 22.6 ± 9.0 和 41.8 ± 10.1 ; 细胞凋亡分析显示 COX-2 反义基因转染不影响细胞凋亡 ($P > 0.05$), QBC-AS 组和 QBC939 组细胞凋亡率分别为 4.0 ± 0.9 和 2.8 ± 0.2 . QBC-P 组与 QBC939 组细胞周期和细胞凋亡无明显差异 ($P > 0.05$).

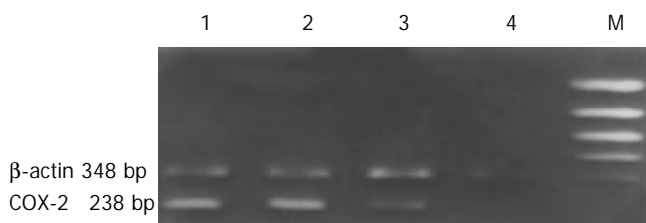


图 1 COX-2 RT-PCR 电泳图, β -actin 为内参照. 1、2 泳道: QBC939 细胞; 3 泳道: QBC-P 细胞; 4 泳道: QBC-AS 细胞; M 泳道: PBR322 分子量标准.

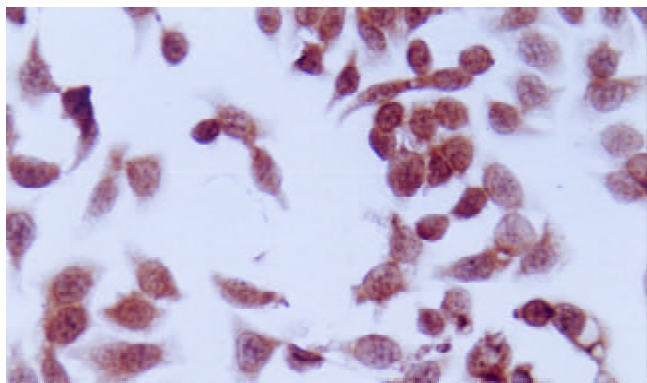


图2 QBC939细胞COX-2表达呈强阳性,胞质与胞核均有表达. 免疫组织化学SABC法 $\times 200$.

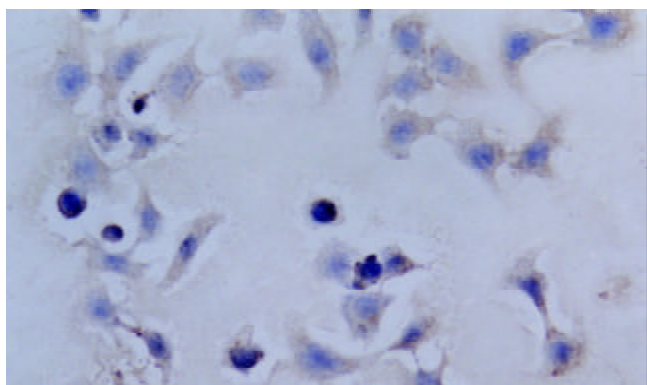


图3 COX-2反义基因转染后的QBC-AS细胞表达呈弱阳性,主要为胞质着色. 免疫组织化学SABC法 $\times 200$.

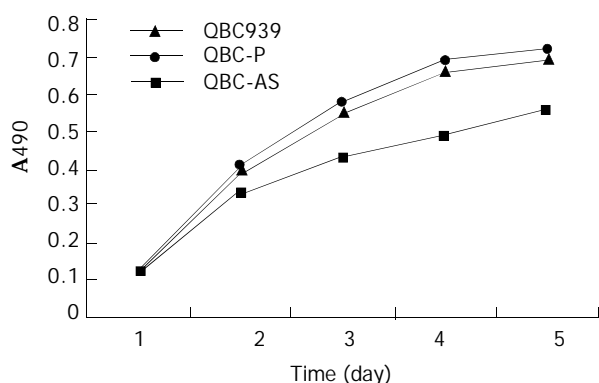


图4 转染前后肿瘤细胞生长曲线. QBC-AS与QBC939和QBC-P细胞比较,第2天增生速度就开始下降,第3天后增生速度下降就比较明显.

3 讨论

近年研究表明, COX-2不仅是炎症反应的中心环节,而且在很多肿瘤组织中表达上调,与肿瘤的发生与发展关系密切^[7-22]. COX-2基因表达的蛋白被认为是一种原癌蛋白(prooncogenic protein)^[23]. Uefuji et al^[24]用RT-PCR方法检测了37例胃腺癌的COX-2 mRNA水平,他们的研究表明mRNA水平与肿瘤大小有关, pT2-pT4期胃癌COX-2 mRNA水平明显高于pT1期胃癌,提示COX-2可能促进胃腺癌的进展. COX-1则普遍被认为与肿瘤的发生与发展无关,只有极少数报道提示COX-1有与COX-2类似的作用. Narko et al^[25]报道通过上调COX-1表达水平可使在体外培养的永生内皮细胞 ECV

向肿瘤细胞转化; Marks et al^[26]在小鼠皮肤鳞状细胞癌模型的研究中发现COX-1表达缺陷鼠的致瘤率和形成肿瘤的体积比野生型小鼠明显降低. COX-2促进肿瘤的发生、发展的作用机制包括:提高促进肿瘤血管生长的因子VEGF的表达水平;通过催化花生四烯酸代谢的产物血栓素A₂、PGE₂和PGI₂直接刺激诱导肿瘤血管形成;通过激活Bcl-2或Akt而阻止内皮细胞的凋亡^[27]; Tsujii et al^[28]报道,结构性COX-2的表达能导致结直肠癌细胞表型的变化,从而引起结直肠癌细胞转移潜能的改变. 流行病学研究表明,长期服用阿司匹林或其他非甾体类抗炎药的人群结肠癌、直肠癌、胃肠癌及肺癌的发生率较低^[29-31].

胆管癌被称为21世纪癌王,目前还没有有效的治疗方法. 胆管癌发病的高危因素有:胆管结石;原发性硬化性胆管炎;先天性胆管扩张症,特别是行囊肿肠管吻合术后以及中华支睾吸虫感染、慢性炎症肠病等,这些因素中有一个共同的环节:慢性损伤和炎症. COX-2是炎症反应的中心环节,因此我们提出一个假说:胆管癌的发生可能通过COX-2途径. 我们以前的实验表明COX-2在胆管癌组织中为诱导性表达,其表达上调与胆管癌的形成关系密切^[4]. 本实验通过脂质体介导将反义COX-2重组载体转染COX-2高表达人胆管癌细胞QBC939,观察COX-2反义核酸对QBC939细胞的生长抑制作用. 我们的实验表明,反义COX-2基因转染后胆管癌细胞中COX-2 mRNA表达水平明显下调,COX-2蛋白表达减弱. 转染反义COX-2重组载体的QBC939细胞生长速率明显下降. 细胞周期分析表明,反义基因转染后胆管癌细胞被抑制在G0/G1期, G0/G1期细胞比例比转染前明显上升;反义基因转染后比转染前增生指数显著下降, S期细胞比例比转染前明显降低,但COX-2反义核酸转染对QBC939细胞凋亡率无明显影响. 提示COX-2反义基因转染能改变QBC939细胞的增生状态,其抑制胆管癌细胞增生作用是通过改变细胞周期而不是通过影响细胞凋亡机制实现的.

4 参考文献

- 1 Yoon JH, Higuchi H, Werneburg NW, Kaufmann SH, Gores GJ. Bile acids induce cyclooxygenase-2 expression via the epidermal growth factor receptor in a human cholangiocarcinoma cell line. *Gastroenterology* 2002;122:985-93
- 2 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
- 3 Cheng J, Imanishi H, Amuro Y, Hada T. NS-398, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, inhibited cell growth and induced cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2002;99:755-761
- 4 Wu GS, Wang JH, Liu ZY, Zou SQ. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in extra-hepatic cholangiocarcinoma. *HBPD INT* 2002;1:429-433
- 5 王曙光, 韩本立, 段恒春, 陈意生, 彭志明. 肝外胆管癌细胞系的建立. *中华实验外科杂志* 1997;14:67-68
- 6 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. *世界华人消化杂志* 2000;8:1211-1217

- 7 Kisley LR, Barrett BS, Bauer AK, Dwyer-Nield LD, Barthel B, Meyer AM, Thompson DC, Malkinson AM. Genetic ablation of inducible nitric oxide synthase decreases mouse lung tumorigenesis. *Cancer Res* 2002;62:6850-6856
- 8 Sonoshita M, Takaku K, Oshima M, Sugihara K, Taketo MM. Cyclooxygenase-2 expression in fibroblasts and endothelial cells of intestinal polyps. *Cancer Res* 2002;62:6846-6849
- 9 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
- 10 Cheng J, Imanishi H, Iijima H, Shimomura S, Yamamoto T, Amuro Y, Kubota A, Hada T. Expression of cyclooxygenase 2 and cytosolic phospholipase A (2) in the liver tissue of patients with chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Hepatol Res* 2002;23:185-195
- 11 Davies G, Martin LA, Sacks N, Dowsett M. Cyclooxygenase-2 (COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention. *Ann Oncol* 2002;13:669-678
- 12 Seno H, Oshima M, Ishikawa TO, Oshima H, Takaku K, Chiba T, Narumiya S, Taketo MM. Cyclooxygenase 2- and prostaglandin E (2) receptor EP (2)-dependent angiogenesis in Apc (Delta716) mouse intestinal polyps. *Cancer Res* 2002;62:506-511
- 13 Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE, Schror K. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 1999;59:198-204
- 14 Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Sakamoto K, Bostwick DG, Mukhtar H. Lipoxigenase-5 is overexpressed in prostate adenocarcinoma. *Cancer* 2001;91:737-743
- 15 Weddle DL, Tithoff P, Williams M, Schuller HM. Beta-adrenergic growth regulation of human cancer cell lines derived from pancreatic ductal carcinomas. *Carcinogenesis* 2001;22:473-479
- 16 Ristimaki A, Nieminen O, Saukkonen K, Hotakainen K, Nordling S, Haglund C. Expression of cyclooxygenase-2 in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Am J Pathol* 2001;158:849-853
- 17 Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:429-434
- 18 Tong BJ, Tan J, Tajeda L, Das SK, Chapman JA, DuBois RN, Dey SK. Heightened expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-delta in human endometrial adenocarcinoma. *Neoplasia* 2000;2:483-490
- 19 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric adenomas and adenocarcinomas. *J Surg Oncol* 2001;76:26-30
- 20 Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, Ono H, Saito D, Nakadaira S, Kosuge T, Yoshida S. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors. *Cancer* 2001;91:333-338
- 21 Fantappie O, Masini E, Sardi I, Raimondi L, Bani D, Solazzo M, Vannacci A, Mazzanti R. The MDR phenotype is associated with the expression of COX-2 and iNOS in a human hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatology* 2002;35:843-852
- 22 Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res* 2002;62:1567-1572
- 23 Oshima M, Murai N, Kargman S, Arguello M, Luk P, Kwong E, Taketo MM, Evans JF. Chemoprevention of intestinal polyposis in the Apcdelta716 mouse by rofecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor. *Cancer Res* 2001;61:1733-1740
- 24 Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric adenomas and adenocarcinomas. *J Surg Oncol* 2001;76:26-30
- 25 Narko K, Ristimaki A, MacPhee M, Smith E, Haudenschild CC, Hla T. Tumorigenic transformation of immortalized ECV endothelial cells by cyclooxygenase-1 overexpression. *J Biol Chem* 1997;272:95-98
- 26 Marks F, Furstenberger G. Proliferative responses of the skin to external stimuli. *Environ Health Perspect* 1993;101:95-97
- 27 Gately S. The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000;19:19-27
- 28 Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3336-3340
- 29 Lynch PM. COX-2 inhibition in clinical cancer prevention. *Oncology* 2001;15(Suppl 5):21-26
- 30 Saha D, Roman C, Beauchamp RD. New strategies for colorectal cancer prevention and treatment. *World J Surg* 2002;26:26-30
- 31 Davies G, Martin LA, Sacks N, Dowsett M. Cyclooxygenase-2 (COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention. *Ann Oncol* 2002;13:669-678

ONO-3403对胆囊收缩素刺激的大鼠胰腺外分泌的影响

陈少夫,刘维新,山本光勝,大槻眞

陈少夫,中国医科大学附属二院消化内科 辽宁省沈阳市 110004
刘维新,中国医科大学第一临床学院消化内科 辽宁省沈阳市 110001
山本光勝,大槻眞,日本産業医科大学第三内科 日本国北九州市 807
陈少夫,男,1962-11-02生,江苏沐阳人,汉族. 1985年毕业于中国医科大学医学系,医学博士,现为消化内科副教授.主要从事胃肠激素与胃肠疾病的研究,发表文章30篇.
项目负责人:陈少夫,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. csf196211@yahoo.com.cn
电话:024-23893501-6651 传真:024-23891793
收稿日期:2002-10-08 接受日期:2002-10-29

Effects of protease inhibitor ONO-3403 on pancreatic exocrine response to CCK in rats

Shao-Fu Chen, Wei-Xin Liu, Mitsuyoshi Yamamoto, Otsuki Makoto

Shao-Fu Chen, Department of Gastroenterology, Second Clinical College, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Wei-Xin Liu, Department of Gastroenterology, First clinical college, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Mitsuyoshi Yamamoto, Otsuki Makoto, Third Department of Internal Medicine, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Kitakyushu 807, Japan
Correspondence to: Dr. Shao-Fu Chen, Department of Gastroenterology, Second Clinical College, China Medical University, 36 Shanhao Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. csf196211@yahoo.com.cn
Received: 2002-10-08 Accepted: 2002-10-29

Abstract

AIM: To examine the pancreatic exocrine response to CCK-8 and to clarify the mechanism of the pancreatic exocrine hypersecretion after oral administration of synthetic protease inhibitor ONO-3403 in rats.

METHODS: A single oral dose of synthetic protease inhibitor ONO-3403 was given to rats by orogastric tube 6h and 12h before experiments. The pancreatic juice was collected before test and after stimulation of stepwise increasing doses of CCK-8. The output of protein, amylase, lipase and bicarbonate in pancreatic juice or pancreatic tissue were determined by Lowry method, Chromogenic method with blue-dyed starch polymer, Whitaker method and by the DST 800 multtitration system, respectively.

RESULTS: Oral administration of ONO-3403 had no influence on pancreatic juice flow and output of protein in basal and CCK-8 stimulation at 6h after ONO-3403 pretreated, but it caused a significant increase in pancreatic juice flow (peak level 215 ± 9 ulper 30 min vs 93 ± 6 ulper 30 min, $P < 0.01$) and protein output (peak level 16475 ± 1801 ug per 30 min vs 5920 ± 593 ug per 30 min, $P < 0.01$) of the basal and CCK-8 stimulation at 12h after ONO-3403 pretreated. The basal pancreatic juice flow and output of amylase (470 ± 32 su per 30 min at 6h $P < 0.01$, 394 ± 47 su per 30 min at 12h, $P < 0.05$ vs 251 ± 32 su per 30 min), bicarbonate (2.224 ± 0.333 umolper 30 min at 6h, $P < 0.05$; 3.148 ± 0.374

umolper 30 min at 12h, $P < 0.01$ vs 1.428 ± 0.282 umolper 30 min) were significant high after ONO-3403 pretreated than those of control group. There was no change in lipase output compared with control group. The pancreatic weight, pancreatic contents of protein and amylase in ONO-3403 pretreated rats were similar to those in control rats.

CONCLUSION: ONO-3403 can increase pancreatic exocrine secretion and sensitivity to CCK-8 stimulation. The mechanism of ONO-3403 induced pancreatic exocrine hypersecretion may be a feedback regulation of the pancreas by increasing CCK secretion.

Chen SF, Liu WX, Yamamoto M, Makoto O. Effects of protease inhibitor ONO-3403 on pancreatic exocrine response to CCK in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(6):737-740

摘要

目的: 观察新型蛋白酶抑制剂ONO-3403对进食大鼠基础的及CCK-8刺激的胰腺外分泌功能的影响, 探讨ONO-3403增加胰腺外分泌的机制。

方法: 对进食的Wistar大鼠, 分别于实验前6h和12h经胃管给与ONO-3403(20 ug/kg)后收集基础的和静脉注射CCK-8后的胰液, 并对胰腺组织进行匀浆处理. 用Lowry法、产色素法和Whitaker法, 分别测定胰液及胰腺组织中的蛋白含量, 淀粉酶和脂肪酶含量。

结果: (1)基础的及CCK-8刺激的12h组的胰液容积(峰值 215 ± 9 ulper 30 min vs 93 ± 6 ulper 30 min, $P < 0.01$), 蛋白含量(峰值 16475 ± 1801 ug per 30 min vs 5920 ± 593 ug per 30 min, $P < 0.01$), 均较对照组明显增加. 而6h组无显著变化. (2)基础胰液中淀粉酶含量(6h组 470 ± 32 su per 30 min $P < 0.01$, 12h组 394 ± 47 su per 30 min $P < 0.05$, 较对照组 251 ± 32 su per 30 min 明显增加), HCO_3^- 含量(6h组 2.224 ± 0.333 umolper 30 min $P < 0.05$, 12h组 3.148 ± 0.374 umolper 30 min $P < 0.01$, 较对照组 1.428 ± 0.282 umolper 30 min 明显增加). 而脂肪酶无显著的变化. (3) 6h组和12h组的胰腺质量及胰腺组织中蛋白质, 淀粉酶含量均无显著变化($P > 0.05$).

结论: ONO-3403能增加进食大鼠的胰腺外分泌及对CCK-8刺激的敏感性, 其机制可能是通过CCK调节的胰腺反馈而起作用的。

陈少夫,刘维新,山本光勝,大槻眞. ONO-3403对胆囊收缩素刺激的大鼠胰腺外分泌的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(6):737-740
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/737.asp>

0 引言

已被证实小肠近端的胰蛋白酶和糜蛋白酶对胰腺的外分泌起负反馈作用^[1-5]。有报道显示^[6-8]，向十二指肠内输入人工合成的蛋白酶抑制剂camostat能引起肠腔内蛋白酶的抑制，而使血浆胆囊收缩素(CCK)浓度升高，并能刺激胰腺的外分泌，因此推测CCK在胰蛋白酶对胰腺外分泌的反馈调节中起主导作用。我们选择一种新型的蛋白酶抑制剂ONO-3403，它在抑制蛋白酶活性方面比camostat强5-10倍，作用时间更长^[9]。在我们先前的实验已经证实ONO-3403能增加进食大鼠的胰腺外分泌及对胰泌素刺激的敏感性^[10]，其机制可能是通过CCK调节的胰腺反馈而起作用的。本实验进一步观察大鼠口服ONO-3403后，是否能促进胰腺外分泌及增加对CCK刺激的敏感性，以寻找ONO-3403对胰腺外分泌的作用机制及与胰腺外分泌相应的负反馈机制。蛋白酶抑制剂在急、慢性胰腺炎的治疗中起重要的作用^[11-18]，探讨新型蛋白酶抑制剂对胰腺的作用机制有较重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ wistar 大鼠，体重250-300 g，大鼠饲养在23℃，12 h明暗交替的环境中，可以自由的饮水和获得标准的饲料饮食。药物ONO-3403(ethyl-N-allyl-N-[(E)-2-methyl-3-[4-amino-phenoxy(arbonyl)phenyl]propenoyl]amino acetate methansulfonate)是一种人工合成的蛋白酶抑制剂，由日本小野制药公司提供，实验前用蒸馏水溶解并调整pH至6.4备用。胆囊收缩素(CCK-8)购自日本大阪肽蛋白研究所。

1.2 方法^[19-23] 将大鼠30只随机分成3组，每组10只，即对照组可自由的饮食水，不给予ONO-3403；6 h组和12 h组分别于实验开始前6 h和12 h，经胃管将ONO-3403(20 ug/kg)灌入大鼠胃内，亦可自由的饮食水。实验开始先用Urethare(1.6 g/kg)腹腔注射麻醉后，剥离出颈内静脉，用聚乙烯导管插入颈内静脉，以备注射CCK-8。行腹正中切口，结扎幽门，行胆管和胰管插管，胆

管在肝门的下方和胰腺的近端结扎，将插入胆管的聚乙烯导管引入十二指肠，保持在整个实验过程中胆汁流入十二指肠，在总胆胰管的远端近十二指肠入口处插入胰管插管，以获得纯净的胰液，每30 min收集1次胰液。在1 h的平衡期后，先收集30 min的基础胰液，然后进行CCK-8的剂量反应的研究，每30 min阶梯式增加CCK-8的剂量，分别为62.5, 125, 250, 500, 1 000, 2 000, 4 000 ng/(kg·h)，以2 mL/h的速度经颈内静脉输入体内，收集每个剂量的CCK-8刺激下的胰液，以备测定胰液的容积，蛋白含量，HCO₃⁻的含量及淀粉酶，脂肪酶的含量。上述实验结束后，通过放血法处死大鼠，迅速切除胰腺，清除其中的淋巴结，脂肪组织后，称其质量，切除约300 mg的胰腺组织，放入-70℃冰箱中保存，以备测定胰腺组织中蛋白和淀粉酶的含量。测定前，切取胰腺组织的一部分，用组织匀浆器，2 000 r/min，在4℃ 0.15 mol/L的氯化钠溶液中进行胰腺组织匀浆。胰液及胰腺组织中蛋白含量用Lowry法测定，使用小牛血清蛋白为标准品。淀粉酶含量用产色素法测定，以Somogyi单位表示。脂肪酶含量用Whitaker法测定，以国际单位(IU)表示。HCO₃⁻含量用DST800多样分析系统(radiometer, copenhagen, denmark)，在采集胰液后迅速进行检测^[24,25]。

统计学处理 数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，用两个样本均数差异的t检验法，进行显著性检验。

2 结果

2.1 ONO-3403对基础的和CCK-8刺激的胰液容积的影响 6 h前给与ONO-3403的大鼠胰液容积与对照组相比没有明显的变化， $P > 0.05$ 。而12 h前给与ONO-3403的大鼠胰液容积与对照组相比，无论基础的和CCK-8刺激的胰液容积均明显增加， $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ，并在CCK-8浓度500 ng/(kg·h)时胰液容积达高峰为 $215.8 \pm 9.1 \mu\text{L}/30 \text{ min}$ ，以后逐渐下降至与对照组相同水平，提示ONO-3403能增加进食大鼠的胰液外分泌，但起作用的时间延迟至12 h，而在6 h并未起作用(表1)。

表1 ONO-3403对基础的和CCK-8刺激的胰液容积的影响($\mu\text{L}/30 \text{ min}$)

分组	CCK-8 剂量 ng/(kg·h)							
	0	62.5	125	250	500	1 000	2 000	4 000
对照组 (n=10)	27.5±2.8	34.4±2.4	50.2±2.9	74.1±7.4	93.6±6.6	108±9.5	104.6±8.3	88.5±8.1
6 h 组 (n=10)	32.6±3.1	62.2±8.0	99.5±14.5	136.4±15.3	171.2±13.8	173.1±16.7	147.3±9.5	102±6.9
12 h 组 (n=10)	59.2±7.1 ^a	103.2±11.0 ^a	145.8±7.1 ^a	169.2±9.7 ^a	215.8±9.1 ^a	201.8±11.2 ^a	167±19.6 ^b	116±24.4

^aP < 0.01 vs 对照组; ^bP < 0.05 vs 对照组。

2.2 ONO-3403对基础的和CCK-8刺激的胰液蛋白含量的影响 6 h前给与ONO-3403的大鼠胰液蛋白含量与对照组相比略有增加, 但差异不显著, $P > 0.05$. 而12 h前给与ONO-3403的大鼠胰液蛋白含量与对照组相比, 无论基础的和CCK-8刺激的均明显增加, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,

并在CCK-8浓度500 ng/(kg·h)时胰液蛋白含量达高峰为 $16\,475 \pm 1\,801.6 \mu\text{g}/30 \text{ min}$, 以后逐渐下降至与对照组相同水平, 提示ONO-3403能增加进食大鼠的胰液外分泌中的蛋白含量, 但起作用的时间延迟至12 h, 而在6 h并未起作用. 说明胰液蛋白含量增加与胰液容积增加是同步的(表2).

表2 ONO-3403对基础的和CCK-8刺激的胰液蛋白含量的影响($\mu\text{g}/30 \text{ min}$)

分组	CCK-8 剂量 ng/(kg.h)							
	0	62.5	125	250	500	1 000	2 000	4 000
对照组 (n =10)	237.6±8.9	929.3±119.2	2 486.3±411.5	4 668.4.1±625.2	5 920.7±593.7	7 539.4±1 041.5	7 424.8±749.6	5 316.9±626.2
6 h 组 (n =10)	356.1±47.8	3 228.5±926.7	7 004.9±1 091.5	8 975.1±943.1	9 531±740.3	6186.7±548.8	3 967.2±412.4	2 818.3±389.8
12 h 组 (n =10)	425.1±73.9 ^a	4 672.6±728.4 ^a	9 055.8±700.3 ^a	13 038.4±952.6 ^a	16 475±1 801.6 ^a	13 140±2 067.9 ^a	9 630.2±1 708.9 ^b	5 659.8±893.8

^a $P < 0.01$ vs 对照组; ^b $P < 0.05$ vs 对照组.

2.3 ONO-3403对基础胰液中淀粉酶、脂肪酶和 HCO_3^- 含量的影响 6 h前和12 h前给与ONO-3403的大鼠基础胰液中淀粉酶含量和 HCO_3^- 含量与对照组相比均明显增加, 二者差异显著, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$. 而基础胰液中脂肪酶含量6 h组和12 h组与对照组相比无明显的变化, $P > 0.05$. 提示ONO-3403能增加进食大鼠的基础胰液中淀粉酶和 HCO_3^- 含量, 并在给药后6 h开始起作用, 而脂肪酶含量无明显变化或可能在给药12 h以后才能起变化. 说明ONO-3403能增加基础胰液外分泌中胰酶的含量(表3).

表3 ONO-3403对基础胰液中淀粉酶、脂肪酶和 HCO_3^- 的影响

分组	淀粉酶(su/30min)	脂肪酶($\text{u} \times 10^3/30\text{min}$)	HCO_3^- (mmol/30 min)
对照组 ($n=10$)	251.5±32.5	290.5±58.3	1.428±0.282
6 h组 ($n=10$)	470.2±56.3 ^a	288.7±13.6	2.224±0.333 ^b
12 h组 ($n=10$)	394.5±47.3 ^b	287.3±24.7	3.148±0.374 ^a

^a $P < 0.01$ vs 对照组; ^b $P < 0.05$ vs 对照组

表4 ONO-3403对胰腺质量、胰腺蛋白和淀粉酶含量的影响

分组	胰腺质量(mg)	蛋白含量(mg/pancreas)	淀粉酶含量($10^3 \times \text{su}/\text{pancreas}$)
对照组 ($n=10$)	995.1±54.3	189.5±12.5	1194.6±179.3
6 h组 ($n=10$)	1 052.6±53.2	196.3±15.6	737.2±43.8
12 h组 ($n=10$)	1 096.2±42.4	217.5±21.9	855.6±75.8

$P > 0.05$ vs 对照组.

2.4 ONO-3403对胰腺重量, 胰腺组织中的蛋白含量和淀粉酶含量的影响 6 h前和12 h前给与ONO-3403的大鼠胰腺重量和胰腺蛋白含量与对照组相比有增加的趋势, 但差异不显著, $P > 0.05$. 而胰腺淀粉酶含量6 h组和12 h组与对照组相比亦无明显的变化, $P > 0.05$ (表4).

3 讨论

单位时间内胰液容积, 胰液蛋白含量, 淀粉酶含量, 脂肪酶含量及 HCO_3^- 含量的变化能反映胰液外分泌的变化. 蛋白质、淀粉酶和脂肪酶由胰腺腺泡细胞分泌, 水和 HCO_3^- 由胰管上皮细胞分泌. CCK既能作用于胰腺腺泡细胞, 促进其分泌胰酶; 也能作用于胰管上皮细胞, 促进其分泌水和 HCO_3^- ^[26,27]. 本研究表明, ONO-3403能增加进食大鼠胰液流量、胰液淀粉酶、蛋白质及 HCO_3^- 的分泌, 并能增强胰腺对CCK刺激的敏感性而使胰液外分泌增加. 其机制可能是通过CCK调节的胰腺反馈而起作用的.

在进食大鼠的十二指肠内有较多的蛋白酶底物即食物蛋白, 此状态下的胰腺外分泌较空腹时强, 分泌至十二指肠腔内的蛋白水解酶的活性较高, 口服蛋白酶抑制剂ONO-3403后在十二指肠内抑制了蛋白水解酶的活性, 而使肠腔内蛋白未能充分代谢, 蛋白可刺激CCK的释放, CCK可促进胰腺外分泌增加, 包括胰液流量, 蛋白含量, 淀粉酶含量, HCO_3^- 含量, 但脂肪酶未见明显变化. 胰腺的这一负反馈机制可能是通过肠腔内的多种内源性的CCK释放肽而引起的, 其中一种称为监视肽(monitor peptide, MP)^[28], 由胰腺分泌至胰液中, 其他CCK释放肽由小肠分泌至肠腔内, 如腔内CCK释放因子(LCRF)^[29]和diazepam-binding inhibitor (DBI)^[30]. 这些CCK释放肽都对胰蛋白酶敏感, 可被其

降解.当经胃管给与ONO-3403后,抑制了十二指肠内蛋白酶的活性,使这些CCK释放肽的降解减少,促进了CCK的释放,而使胰腺外分泌增强.

给与ONO-3403 6 h胰腺外分泌增加的强度与给与ONO-3403 12 h相比较弱,说明ONO-3403对进食大鼠的作用延迟.对这一延迟作用的现象,我们推测,在口服ONO-3403后,降低了十二指肠内蛋白酶的活力或直接作用于小肠的CCK产生细胞,使CCK的产生明显增加.CCK刺激胰酶的分泌,包括MP和胰蛋白酶,糜蛋白酶同时进入十二指肠.在空腹状态下,这些蛋白水解酶使MP,LCRP和DBI水解失活,这样就进一步抑制了CCK的释放,而在进食状态下,食物蛋白能与CCK释放肽竞争胰蛋白酶和糜蛋白酶,使CCK释放肽失活减少,能持续刺激CCK的释放,而产生延迟胰腺外分泌增加.对这种延迟反应的另一种推测是进食的大鼠胃内食物延迟了ONO-3403向十二指肠的排空,使其抑制胰酶的作用延迟,进而使胰腺外分泌增加延迟.

CCK是小肠黏膜中CCK产生细胞分泌的一种激素^[31],其重要的生理作用是刺激胰腺的腺泡细胞分泌胰酶等物质^[32],在给与蛋白酶抑制剂ONO-3403后,胰腺外分泌对CCK的敏感性与对照组相比明显增强,说明ONO-3403能使内源性CCK分泌增强,加上外源性CCK,提高了CCK的血浓度,使胰腺外分泌明显增加.CCK浓度的增加可使胰腺组织水肿,产生炎症,胰腺质量的增加是胰腺炎症水肿的标志^[33].我们的实验证明给与ONO-3403后大鼠的胰腺质量,胰腺蛋白含量和胰腺淀粉酶含量与对照组相比无明显变化,说明经口给与ONO-3403后不能造成胰腺明显水肿,不能使胰腺淀粉酶和蛋白质的合成减少.

本研究表明,蛋白酶抑制剂ONO-3403能刺激进食大鼠的胰腺外分泌,使胰腺外分泌对CCK的敏感性增加,这一反应的机制可能是十二指肠内CCK释放肽失活减少,使CCK产生增加,而使胰腺外分泌增加.

4 参考文献

- Watanabe S, Takeuchi T, Chey WY. Mediation of trypsin inhibitor-induced pancreatic hypersecretion by secretin and cholecystokinin in rats. *Gastroenterology* 1992;102:621-628
- 曾悦,王兴鹏. 胰酶替代治疗的临床实践. 世界华人消化杂志 2000; 8:1037-1038
- 徐晓红,汤晶. 慢性胰腺炎的外内分泌功能变化. 世界华人消化杂志 2001;9:1276-1278
- Li P, Lee KY, Ren XS, Chang TM, Chey WY. Effect of pancreatic proteases on plasma cholecystokinin, secretin, and pancreatic exocrine secretion in response to sodium oleate. *Gastroenterology* 1990;98:1642-1648
- Jin HO, Song CW, Chang TM, Chey WY. Roles of gut hormones in negative-feedback regulation of pancreatic exocrine secretion in humans. *Gastroenterology* 1994;107:1828-1834
- Kawanami T, Funakoshi A, Suzuki S, Kanai S, Sato Y, Miyasaka K. Oral administration of a synthetic trypsin inhibitor increases pancreatic duct function in CCK-A receptor-deficient rats. *Pancreas* 2000;20:394-400
- Kawanami T, Suzuki S, Yoshida Y, Kanai S, Takata Y, Shimazoe T, Watanabe S, Funakoshi A, Miyasaka K. Different effects of trypsin inhibitors on intestinal gene expression of secretin and on pancreatic bicarbonate secretion in CCK-A-receptor-deficient rats. *Jpn J Pharmacol* 1999;81:339-345
- Otsuki M, Tani S, Fujii M, Nakamura T, Okabayashi Y, Koide M. Differential effects of proteinase inhibitor camostat on exocrine pancreas in fed and fasted rats. *Am J Physiol* 1993;265:R896-R901
- Senokuchi K, Nakai H, Nakayama Y, Odagaki Y, Sakaki K, Kato M, Maruyama T, Miyazaki T, Ito H, Kamiyasu K, Kim SI, Kawamura M, Hamanaka N. New orally active serine protease inhibitors. *J Med Chem* 1995;38:2521-2523
- 陈少夫,山本光勝,大槻眞. 蛋白酶抑制剂ONO-3403对胰泌素刺激的大鼠胰腺外分泌的影响. 世界华人消化杂志 2002;10:792-795
- 王兴鹏. 中国胰腺疾病研究的现状与展望. 世界华人消化杂志 2000;8:843-846
- 周新泽,毛勤生,陈玉泉,沈洪熏. 大鼠急性胰腺炎病理学特征与氧自由基变化的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:108-109
- 谢传高,王兴鹏. 内毒素与胰腺损伤. 世界华人消化杂志 2000;8: 1039-1041
- 吴伟康. 急性胰腺炎的病因、病理. 世界华人消化杂志 2001;9:410-411
- 陈保华,高毅,杨继霞. 重症急性胰腺炎的现代治疗. 世界华人消化杂志 2001;9:336-337
- 朱春兰,张国军,汤晶. 慢性胰腺炎的保守治疗. 世界华人消化杂志 2001;9:1279-1281
- 薛承锐,齐清会. 急性胰腺炎的预后与评估. 世界华人消化杂志 2001;9:413-414
- 杨玉龙,王邦茂. 急性胰腺炎的内科治疗. 世界华人消化杂志 2001; 9:414-416
- Yamamoto M, Shirohara H, Otsuki M. CCK-, secretin-, and cholinergic-independent pancreatic fluid hypersecretion in protease inhibitor-treated rats. *Am J Physiol* 1998;(2 Pt1):G406-G412
- Watanabe N, Otsuki M. A cholecystokinin receptor antagonist, lorglumide, stimulates biliary secretion in conscious rats. *European J Pharmacol* 1994;264:331-336
- Nakano S, Tachibana I, Otsuki M. Effects of cholecystokinin receptor antagonist lorglumide on rat exocrine pancreas. *Pancreas* 1994;9:425-433
- Tachibana I, Akiyama T, Kanagawa K, Shirohara H, Furumi K, Watanabe N, Otsuki M. Defect in pancreatic exocrine and endocrine response to CCK in genetically diabetic OLETF rats. *Am J Physiol* 1996;270:G730-G737
- Czakó L, Yamamoto M, Otsuki M. Pancreatic fluid hypersecretion in rats after acute pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1997;42:265-272
- Tachibana I, Otsuki M. Effects of a new benzodiazepine derivative cholecystokinin receptor antagonist FK480 on pancreatic exocrine secretion in anesthetized rats. *Dig Dis Sci* 1994;39:1321-1328
- Li Y, Hao YB, Owyang C. Evidence for autoregulation of cholecystokinin secretion during diversion of bile pancreatic juice in rats. *Gastroenterology* 1995;109:231-238
- Iwai K, Fukuoka SH, Fushiki T, Tsujikawa M, Hirose M, Tsunasawa S, Sakiyama F. Purification and sequencing of a trypsin-sensitive, cholecystokinin-releasing peptide from rat pancreatic juice. Its homology with pancreatic secretory trypsin inhibitor. *J Biol Chem* 1987;262:8956-8959
- Spannagel AW, Green GM, Guan D, Liddle RA, Faull K, Reeve JR Jr. Purification and characterization of a luminal cholecystokinin-releasing factor from rat intestinal secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:4415-4420
- Lu L, Louie D, Owyang C. A cholecystokinin releasing peptide mediates feedback regulation of pancreatic secretion. *Am J Physiol* 1989;256:G430-G435
- Miyasaka K, Guan DF, Liddle RA, Green GM. Feedback regulation by trypsin: evidence for intraluminal CCK-releasing peptide. *Am J Physiol* 1989;257:G175-G181
- Herzig KH, Schon I, Tatemoto K, Ohe Y, Li Y, Folsch UR, Owyang C. Diazepam binding inhibitor is a potent cholecystokinin-releasing peptide in the intestine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7927-7932
- Li W, Zheng TZ, Qu SY. Effect of cholecystokinin and secretin on contractile activity of isolated gastric muscle strips in guinea pigs. *World J Gastroenterol* 2000;6:93-95
- Wang QJ, Adrian TE. Effect of protease inhibitors on peptide-stimulated amylase secretion from dispersed pancreatic acini. *International J Pancreatol* 1995;17:261-269
- Voigt JP, Wenz D, Voits M, Fink H. Does increased endogenous CCK interact with serotonin to reduce food intake in rats. *Peptides* 2000;21:1895-1901

内皮抑素 - 可溶性血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒的包装与鉴定

李 喆, 潘 欣, 潘 卫, 曹贵松, 闻兆章, 方国恩, 戚中田, 毕建威, 华积德

李喆, 曹贵松, 闻兆章, 方国恩, 毕建威, 华积德, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院普通外科 上海市 200433
潘欣, 潘卫, 戚中田, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室 上海市 200433
李喆, 男, 1974-07-29 生, 天津市人, 汉族. 1998 年第二军医大学军医系本科毕业, 2000 年第二军医大学博士生.
国家自然科学基金资助项目, No.30171055
项目负责人: 潘欣, 200433, 上海市翔殷路 800 号, 中国人民解放军第二军医大学微生物学教研室. panxinx@yahoo.com
电话: 021-25070314 传真: 021-25070312
收稿日期: 2002-09-13 接受日期: 2002-10-03

Packaging and identification of recombinant adenovirus carrying endostatin-soluble vascular endothelial growth inhibitor gene

Zhe Li, Xin Pan, Wei Pan, Gui-Song Cao, Zhao-Zhang Wen, Guo-En Fang, Zhong-Tian Qi, Jian-Wei Bi, Ji-De Hua

Zhe Li, Gui-Song Cao, Zhao-Zhang Wen, Guo-En Fang, Jian-Wei Bi, Ji-De Hua, Department of Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Xin Pan, Wei Pan, Zhong-Tian Qi, Department of Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30171055.
Correspondence to: Dr. Xin Pan, Department of Microbiology, Second Military Medical University, 800 Xiangyin Road, Shanghai 200433, China. panxinx@yahoo.com
Received: 2002-09-13 Accepted: 2002-10-03

Abstract

AIM: To acquire recombinant adenovirus carrying endostatin-soluble vascular endothelial growth inhibitor gene.

METHODS: IL-3 signal sequence and human endostatin gene (hENDO) and gene of an elastin peptide motif (Val-Pro-Gly-Val-Gly) were amplified with PCR and then ligated with soluble vascular endothelial growth inhibitor gene (sVEGI). The fusion gene was cloned into adenovirus vector pCA13. The recombinant adenovirus were packaged by means of lipofectamine-mediated gene transfer procedure and identified by PCR.

RESULTS: The fusion gene, about 1 114 bp, which included IL-3 signal sequence, entire human endostatin gene, elastin peptide linker gene and soluble vascular endothelial growth inhibitor gene, was successfully cloned into the adenovirus vector pCA13 downstream from the CMV promoter. The map of restriction enzyme digestion and nucleotide sequence determination showed that the fusion gene sequence was the same as reported sequence, and in one ORF. The recombinant adenovirus could be packaged and the titer

of the rough recombinant adenovirus was about 2×10^{11} TCID₅₀/L.

CONCLUSION: The recombinant adenovirus containing fusion gene of hENDO-sVEGI can express the fusion protein in mammalian cells and secrete to extracellular matrix from cells. The success of packaging and identification this recombinant adenovirus lays the foundation for studying tumor gene therapy by the fusion gene.

Li Z, Pan X, Pan W, Cao GS, Wen ZZ, Fang GE, Qi ZT, Bi JW, Hua JD. Packaging and identification of recombinant adenovirus carrying endostatin-soluble vascular endothelial growth inhibitor gene. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(6):741-744

摘要

目的: 构建内皮抑素 - 可溶性血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒载体并包装成重组腺病毒, 为下一步基因治疗打下基础.

方法: 用 PCR 方法在 hENDO 基因的 5' 端引入 IL₃ 信号肽、3' 端引入弹性蛋白连接肽序列(linker), 再与 sVEGI 基因连接, 插入到 pCA13 腺病毒载体中. 用脂质体介导包装出重组腺病毒, PCR 法对重组腺病毒进行鉴定.

结果: 构建完成 hENDO-sVEGI 融合基因重组腺病毒载体, 融合基因包括 IL₃ 信号肽、hENDO 全长基因、弹性蛋白连接肽序列和 sVEGI 基因, 总长度约 1 114 bp, 经酶切鉴定、序列分析证实克隆序列、插入方向和读码框架均正确. 可包装出携带融合基因的重组腺病毒, 用 TCID₅₀ 法测定粗制重组腺病毒滴度为 2×10^{11} TCID₅₀/L.

结论: 成功构建了 hENDO-sVEGI 融合基因, 连接肽序列使两蛋白空间构象不受影响, IL₃ 信号肽保证蛋白可被分泌至胞外. 完成携带融合基因的重组腺病毒的包装与鉴定, 为进一步开展肿瘤基因治疗研究奠定了基础.

李喆, 潘欣, 潘卫, 曹贵松, 闻兆章, 方国恩, 戚中田, 毕建威, 华积德. 内皮抑素 - 可溶性血管内皮细胞生长抑制因子融合基因重组腺病毒的包装与鉴定. 世界华人消化杂志 2003;11(6):741-744

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/741.asp>

0 引言

目前肿瘤的抗血管生成疗法已成为国内外研究的焦点^[1-5]. 有 24 种血管生成抑制剂正在进行着不同阶段的临床验证. 由于肿瘤血管生成是一个多步骤的复杂调控过程,

不同阶段有不同调控因素发挥主导作用,因而单一针对某一治疗环节的药物疗效有限.不同机制的血管生成抑制剂有协同治疗作用,如IFN α 和TNP470^[6].联合应用鼠内皮抑素(mEndostatin)和血管抑素(mAngiosatin)能彻底根除小鼠体内的移植瘤^[7],mEndostatin和mAngiosatin联合基因和融合基因治疗都在动物实验中取得了很好的治疗效果^[8,9].我们将两种血管生成抑制剂基因进行融合,表达出具有两种药物活性的融合蛋白,从不同环节阻断肿瘤血管生成,达到事半功倍的效果.我们构建了携带hENDO-sVEGI融合基因的重组腺病毒载体,以期为肿瘤的抗血管生成基因治疗提供实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 pCA13、pJM17质粒、293细胞由第二军医大学微生物教研室保存并提供;内皮抑素和可溶性血管内皮细胞生长抑制因子基因的克隆及鉴定由微生物教研室完成;PCR产物克隆载体pMD-18-T为大连TaKaRa公司产品;大肠杆菌DH5 α 为微生物教研室保存.Taq DNA多聚酶、各种限制性内切酶、T₄DNA连接酶、 λ DNA/EcoR I +Hind III marker均购于华美生物工程公司;DMEM, lipofectAMINETM为Gibco产品;PCR引物由上海生工公司合成:引物1为5'-GCAAGCTTGCCACCATGAGCCGCTGCCGCTCTGCTCTGCTCAACTCTGGTCCGCCCGGACTCCAACACAGCCACCGCGAC-3';引物2为5'-CACCGAATTTCGTACTCTCTGGTACCTTGGAGGCAGTCATGAAG-3';引物3为5'-ACGAATTCGGTGCCAGTTGTGAGAC-3';引物4为5'-GCGGATCCCTATAGTAAGAAGGCTCC-3'.

1.2 方法 用PCR方法,以hENDO基因为模板用引物1和引物2扩增IL₃/hENDO-linker片段,在5'端引入Hind III酶切位点和IL₃信号肽序列,3'端引入弹性蛋白连接肽序列和EcoR I酶切位点;以sVEGI基因为模板用引物3'和引物4扩增sVEGI片段,在5'端引入EcoR I酶切位点,3'端引BamH I酶切位点.PCR反应进程为:94℃变性5 min;94℃45 s,50℃45 s,72℃120 s,共循环30次;最后,72℃延伸10 min.产物经纯化后,分别克隆到pMD-18-T载体,送上海生工公司用M13引物进行DNA自动测序.腺病毒载体pCA13用Hind III和BamH I双酶切线性化,用Hind III/EcoR I将IL₃/hENDO-linker片段从携带目的基因的pMD18-T载体上游离下来,用EcoR I/BamH I将sVEGI片段从携带目的基因的pMD18-T载体上游离下来,在T₄DNA连接酶作用下,将线性化的pCA13与Hind III-EcoR I IL₃/hENDO-linker片段和EcoR I-BamH I sVEGI片段进行连接,转化DH5 α 钙化菌,分别挑取克隆进行质粒的小量制备;以Hind III+BamH I, Hind III+EcoR I, EcoR I+BamH I酶切鉴定

阳性克隆,分别以载体上的Bgl II或Sac I位点酶切鉴定融合基因被正确克隆在CMV启动子的下游以确认读框正确.将质粒pJM17与重组腺病毒载体以1:5比例混合,用lipofectAMINE共转染24孔板中(用板中间的孔)的293细胞.约4 d,可见细胞病变(CPE)出现.收集细胞及上清,-70-37℃反复冻融3次,用上清液(含Ad)50 μ L加完全培养液200 μ L感染293细胞,约2 d(48 h)收集呈CPE表现的细胞及上清,制备Ad粗提液(混合克隆),同法大量扩增病毒,-70℃保存.包装好的腺病毒命名为:AdCA13-hENDO-sVEGI.收集293细胞,计数,调整细胞浓度为10⁸/L,接种96孔板每孔细胞悬液100 μ L.第2天当细胞铺满时,吸去上清,加入各稀释度的粗制重组腺病毒.混合收集到的Ad粗提液10 mL,-70-37℃反复冻融3次,4 000 r/min 10 min,用完全培养液将病毒作连续10倍稀释,从10⁻¹-10⁻¹⁰作为滴定的稀释度.用最后8个稀释液加入96孔板,每孔加0.1 mL,每个稀释度10孔;纵行#11和12用做阴性对照,每孔加0.1 mL完全培养液,5%CO₂孵箱培养10d,倒置显微镜读板,确定每行阳性孔的比率.按Karber's的统计方法计算病毒滴度.

2 结果

2.1 融合基因腺病毒载体的构建和酶切鉴定 扩增的IL₃/hENDO-linker片段约为647 bp,sVEGI片段为476 bp(图1).将PCR扩增的目的基因分别直接亚克隆于pMD18-T载体上,然后将目的基因取下,与经相应酶切的pCA13载体连接构建携带融合基因的腺病毒载体(图2).以Hind III+BamH I,Hind III+EcoR I,EcoR I+BamH I酶切pCA13-hENDO-sVEGI分别得到1 114 bp hENDO-sVEGI片段,647 bp IL₃/hENDO-linker片段和467 bp的sVEGI片段,证明融合基因被正确克隆到pCA13载体(图3).Bgl II、Sac I位点酶切鉴定融合基因被正确克隆在CMV启动子的下游以确认读框正确(图4).

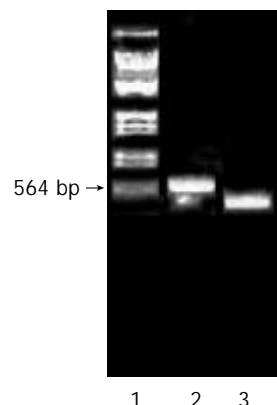


图1 IL₃/hENDO-linker和sVEGI基因PCR扩增电泳图.
1: λ DNA/EcoR I +Hind III marker(21227 bp, 5 148 bp, 4 269 bp, 3 530 bp, 2 027 bp, 1 904 bp, 1 587 bp, 1 375 bp, 941 bp, 831 bp, 564 bp);
2:647 bp的IL₃/hENDO-linker片段; 3: 476 bp的VEGI片段.

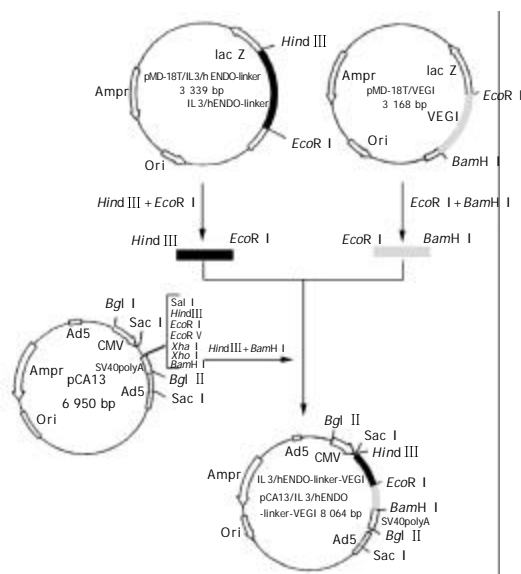
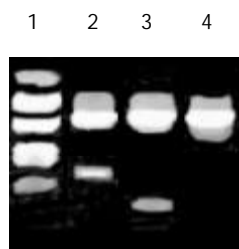
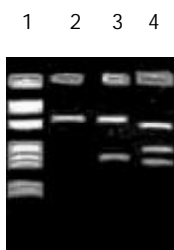


图2 pCA13 -hENDO-sVEGI 质粒的构建流程示意图.



1: λ DNA/EcoRI +HindIII marker(21 227 bp,5 148 bp,4 269 bp,3 530 bp,2 027 bp,1 904 bp,1 587 bp,1 375 bp,941 bp,831 bp,564 bp)
 2: Digesting with HindIII and BamHI (1 114 bp,6.95 kb)
 3: Digesting with BglII (1 707 bp,6.3 kb)
 4: Digesting with EcoRI and BamHI (476 bp, 7.69 kb).
 图3 pCA13 -hENDO-sVEGI 质粒的目的基因酶切鉴定



1: λ DNA/EcoRI +HindIII marker (21 227 bp,5 148 bp, 4 269 bp,3 530 bp,2 027 bp,1 904 bp,1 587 bp,1 375 bp,941 bp,831 bp,564 bp)
 2: Digesting with HindIII and BamHI (1 114 bp,6.95 kb)
 3: Digesting with BglII (1 707 bp,6.3 kb)
 4: Digesting with SacI (1 535 bp,2.0 kb,4.5 kb).
 图4 pCA13 -hENDO-sVEGI 质粒目的基因插入部位的酶切鉴定

2.2 携带融合基因的重组腺病毒 质粒 pCA13-hENDO-sVEGI 与 pJM17 用 lipofectAMINETM 共转染 293 细胞进行同源重组, 约 4 d 可见 CPE 出现. 收集细胞及上清, -70-37 °C 反复冻融 3 次, 4 000 r/min, 4 °C 10 min, 用引物 3 和引物 4 对病毒裂解液行 PCR, 扩增出 sVEGI 片段, 说明重组腺病毒包装成功. 用上清液(含 Ad)50 μ L 加完全培养液 200 μ L 接种 293 细胞, 48-72 h 收集呈 CPE 表现的细胞, 制备 Ad 粗提液(混合克隆). 同法大量扩增病毒, 制备 Ad hENDO-sVEGI 粗提液, 并进行效价滴定, 病毒滴度为 2×10^{11} TCID₅₀/L.

3 讨论

抗血管生成疗法作为一种新兴疗法, 还存在不少缺点有待改进. 内源性血管生成抑制剂的基因治疗被认为是最有前途的治疗策略^[10-19]. 我们选择两个强效的内源性血管生成抑制基因, 将其融合并成功构建携带融合基因的重组腺病毒载体, 期望融合蛋白分子能发挥两种分子的活性, 既对血管生成产生协同抑制作用, 又通过 sVEGI 的直接细胞毒、诱导凋亡、免疫调节作用杀伤肿瘤细胞, 产生最理想的协同抑瘤效应.

内皮抑素是迄今所发现的最有效的血管生成抑制剂之一, 没有耐药性, 不需进一步给药就能延长肿瘤的休眠期^[7], 未见毒副作用^[20,21], 在美国已进入了 II 期临床试验. 内皮抑素基因是一个很好的治疗基因^[22-31]. VEGI 是从人脐静脉内皮细胞 cDNA 文库中筛选得到的一个 TNF 家族的新成员^[32]. VEGI 属于 II 型跨膜蛋白, 基因定位于人染色体 9q32, 在部分内皮细胞中大量表达, 其氨基酸序列与肿瘤坏死因子(TNF)家族成员有 20-30 % 的同源性. 其可溶性的胞外分子(sVEGI)能特异性显著抑制牛肺动脉内皮细胞(BPAEC)和人脐静脉内皮细胞(HUVEC)增生^[33], 体外血管生成模型中显著抑制牛主动脉内皮细胞在胶原纤维中形成管样结构^[33], 体内鸡胚尿囊膜新生血管实验中可剂量依赖性抑制 FGF 或 VEGF 诱导的毛细血管生成. 基因转移可溶性分子可降低鼠源性 MC-38 结肠癌细胞的成瘤性, 抑制肿瘤生长; 组织学检测发现肿瘤中的微血管密度明显降低, 内皮细胞增生受抑显著, 凋亡数量增加^[34]. Zhai et al^[35]将表达可溶性 VEGI 的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞与人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 混合注射裸鼠体内, 发现异种移植的肿瘤生长明显受到抑制. 以上结果说明分泌到肿瘤局部的 VEGI 通过抑制新生血管生成抑制肿瘤生长. 除抑制内皮细胞增生外, Harids et al^[36]发现 sVEGI 对乳腺癌细胞 MCF-7、Hela 细胞、髓样细胞 U-937 和 ML-1a 四种肿瘤细胞均有抑制作用, 加入合成抑制剂环己酮亚胺时, 细胞毒作用更加明显, 因此推测是通过抑制蛋白合成而发挥作用的.

内皮抑素与 VEGI 这两种血管生成抑制因子的作用机制目前尚不明确, 但并不妨碍对其进行研究利用. 我们参照 Invivogen 基因公司的作法, 两基因之间采用缬氨酸-脯氨酸-甘氨酸-缬氨酸-甘氨酸(Val-Pro-Gly-Val-Gly)五个氨基酸的弹性蛋白酶连接肽, 保证翻译后两蛋白空间构象不受影响, IL3 信号肽保证蛋白可被分泌至胞外.

4 参考文献

- 1 Saphir A. Angiogenesis: the unifying concept in cancer? *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1658-1659
- 2 Oehler MK, Bicknell R. The promise of anti-angiogenic cancer therapy. *Br J Cancer* 2000;82:749-752
- 3 Tomanek RJ, Schattman GC. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *Anat Rec* 2000;261:126-135
- 4 Thompson WD, Li WW, Maragoudakis M. The clinical manipulation of angiogenesis: pathology, side-effects, surprises,

- and opportunities with novel human therapies. *J Pathol* 2000; 190:330-337
- 5 Vacca A, Ribatti D, Pellegrino A, Dammacco F. Angiogenesis and anti-angiogenesis in human neoplasms. Recent developments and the therapeutic prospects. *Ann Ital Med Int* 2000;15:7-19
 - 6 Parangi S, O'Reilly M, Christofori G, Holmgren L, Grosfeld J, Folkman J, Hanahan D. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de-novo tumor-growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2002-2007
 - 7 Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Anti-angiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997;390:404-407
 - 8 Scappaticci FA, Smith R, Pathak A, Schloss D, Lum B, Cao Y, Johnson F, Engleman EG, Nolan GP. Combination angiostatin and endostatin gene transfer induces synergistic antiangiogenic activity in vitro and antitumor efficacy in leukemia and solid tumors in mice. *Mol Ther* 2001;3:186-196
 - 9 Scappaticci FA, Contreras A, Smith R, Bonhoure L, Lum B, Cao Y, Engleman EG, Nolan GP. Statin-AE: a novel angiostatin-endostatin fusion protein with enhanced antiangiogenic and antitumor activity. *Angiogenesis* 2001;4:263-268
 - 10 Folkman J. Antiangiogenic gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9064-9066
 - 11 Tanaka T, Cao Y, Folkman J, Fine HA. Viral vector-targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res* 1998;58:3362-3369
 - 12 Cao Y, O'Reilly MS, Marshall B, Flynn E, Ji RW, Folkman J. Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J Clin Invest* 1998;101:1055-1063
 - 13 Nguyen JT, Wu P, Clouse ME, Hlatky L, Terwilliger EF. Adeno-associated virus-mediated delivery of antiangiogenic factors as an antitumor strategy. *Cancer Res* 1998;58:5673-5677
 - 14 Machein MR, Risau W, Plate KH. Antiangiogenic gene therapy in a rat glioma model using a dominant-negative vascular endothelial growth factor receptor2. *Hum Gene Ther* 1999;10:1117-1128
 - 15 Indraccolo S, Minuzzo S, Gola E, Habeler W, Carrozzino F, Noonan D, Albini A, Santi L, Amadori A, Chieco-Bianchi L. Generation of expression plasmids for angiostatin, endostatin and TIMP-2 for cancer gene therapy. *Int J Biol Markers* 1999;14:251-256
 - 16 Chen QR, Kumar D, Stass SA, Mixson AJ. Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res* 1999;59:3308-3312
 - 17 Matsuda KM, Madoiwa S, Hasumi Y, Kanazawa T, Saga Y, Kume A, Mano H, Ozawa K, Matsuda M. A novel strategy for the tumor angiogenesis-targeted gene therapy: generation of angiostatin from endogenous plasminogen by protease gene transfer. *Cancer Gene Ther* 2000;7:589-596
 - 18 Bergers G, Hanahan D. Cell factories for fighting cancer. *Nat Biotechnol* 2001;19:20-21
 - 19 Regulier E, Paul S, Marigliano M, Kintz J, Poitevin Y, Ledoux C, Roecklin D, Cauet G, Calenda V, Homann HE. Adenovirus-mediated delivery of antiangiogenic genes as an antitumor approach. *Cancer Gene Ther* 2001;8:45-54
 - 20 Berger AC, Feldman AL, Gnant MF, Kruger EA, Sim BK, Hewitt S, Figg WD, Alexander HR, Libutti SK. The angiogenesis inhibitor, endostatin, does not affect murine cutaneous wound healing. *J Surg Res* 2000;91:26-31
 - 21 Bloch W, Huggel K, Sasaki T, Grose R, Bugnon P, Addicks K, Timpl R, Werner S. The angiogenesis inhibitor endostatin impairs blood vessel maturation during wound healing. *FASEB J* 2000;14:2373-2376
 - 22 Yoon SS, Eto H, Lin CM, Nakamura H, Pawlik TM, Song SU, Tanabe KK. Mouse endostatin inhibits the formation of lung and liver metastases. *Cancer Res* 1999;59:6251-6256
 - 23 Szary J, Szala S. Intra-tumoral administration of naked plasmid DNA encoding mouse endostatin inhibits renal carcinoma growth. *Int J Cancer* 2001;91:835-839
 - 24 Ding I, Sun JZ, Fenton B, Liu WM, Kimsely P, Okunieff P, Min W. Intratumoral administration of endostatin plasmid inhibits vascular growth and perfusion in MCa-4 murine mammary carcinomas. *Cancer Res* 2001;61:526-531
 - 25 Blezinger P, Wang J, Gondo M, Quezada A, Mehrens D, French M, Singhal A, Sullivan S, Rolland A, Ralston R, Min W. Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene. *Nat Biotechnol* 1999;17:343-348
 - 26 Sauter BV, Martinet O, Zhang WJ, Mandeli J, Woo SL. Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4802-4807
 - 27 Read TA, Sorensen DR, Mahesparan R, Enger PO, Timpl R, Olsen BR, Hjelstuen MH, Haraldseth O, Bjerkvig R. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat Biotechnol* 2001;19:29-34
 - 28 Joki T, Machluf M, Atala A, Zhu J, Seyfried NT, Dunn IF, Abe T, Carroll RS, Black PM. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat Biotechnol* 2001;19:35-39
 - 29 Feldman AL, Restifo NP, Alexander HR, Bartlett DL, Hwu P, Seth P, Libutti SK. Antiangiogenic gene therapy of cancer utilizing a recombinant adenovirus to elevate systemic endostatin levels in mice. *Cancer Res* 2000;60:1503-1506
 - 30 Chen CT, Lin J, Li Q, Phipps SS, Jakubczak JL, Stewart DA, Skripchenko Y, Forry-Schaudies S, Wood J, Schnell C, Hallenbeck PL. Antiangiogenic gene therapy for cancer via systemic administration of adenoviral vectors expressing secretable endostatin. *Hum Gene Ther* 2000;11:1983-1996
 - 31 Wen XY, Bai Y, Stewart AK. Adenovirus-mediated human endostatin gene delivery demonstrates strain-specific antitumor activity and acute dose-dependent toxicity in mice. *Hum Gene Ther* 2001;12:347-358
 - 32 Tan KB, Harrop J, Reddy M, Young P, Terrst J, Emery J, Moore G, Truneh A. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* 1997;204:35-46
 - 33 Yue TL, Ni J, Romanic AM, Gu JL, Keller P, Wang C, Kumar S, Yu GL, Hart TK, Wang XK, Xia ZG, DeWolf WE Jr, Feuerstein GZ. TL1, a novel tumor necrosis factor-like cytokine, induces apoptosis in endothelial cells. Involvement of activation of stress protein kinases (stress-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase) and caspase-3-like protease. *J Biol Chem* 1999;274:1479-1486
 - 34 Zhai Y, Yu J, Iruela AL, Huang WQ, Wang Z, Hayes AJ, Lu J, Jiang G, Rojas L, Lippman ME, Ni J, Yu GL, Li LY. Inhibition of angiogenesis and breast cancer xenograft tumor growth by VEG1, a novel cytokine of the TNF superfamily. *Int J Cancer* 1999;82:131-136
 - 35 Zhai Y, Ni J, Jiang GW, Lu JM, Xing L, Lincoln C, Carter KC, Janat F, Kozak D, Xu SM, Rojas L, Aggarwal BB, Ruben S, Li LY, Gentz R, Yu GL. VEG1, a novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas in vivo. *FASEB J* 1999;13:181-189
 - 36 Harids V, Shrivastava A, Su J, Yu GL, Ni J, Liu D, Chen SF, Ni Y, Ruben SM, Gentz R, Aggarwal BB. VEG1, a new member of the TNF family activates nuclear factor-kappaB and c-jun n-terminal kinase and modulates cell growth. *Oncogene* 1999;18:6496-6504

激活素 A 对肝星状细胞细胞外基质合成的影响

刘清华,李定国,黄新,尤汉宁,潘勤,徐雷鸣,徐芹芳,陆汉明

刘清华,李定国,黄新,尤汉宁,潘勤,徐雷鸣,徐芹芳,陆汉明,上海第二医科大学附属新华医院消化内科 上海市 200092
刘清华,女,1971-02-11,浙江宁波人,汉族,1989/1996 年在上海第二医科大学攻读学士、硕士学位,现为主治医师,消化内科博士研究生,主要从事消化疾病的临床和基础研究。■

国家自然科学基金资助项目, No.30170411

项目负责人:李定国,200092,上海市杨浦区控江路 1665 号,上海第二医科大学附属新华医院消化内科。 Dingguo_li@yahoo.com.cn
电话:021-65790000-5316 传真:021-55055127

收稿日期:2002-11-19 接受日期:2002-12-09

Effect of Activin on extracellular matrix secretion in isolated rat hepatic stellate cell

Qing-Hua Liu, Ding-Guo Li, Xin Huang, Han-Ning You, Qin Pan, Lei-Ming Xu, Qin-Fang Xu, Han-Ming Lu

Qing-Hua Liu, Ding-Guo Li, Xin Huang, Han-Ning You, Qin Pan, Lei-Ming Xu, Qin-Fang Xu, Han-Ming Lu, Department of Gastroenterology of Xinhua Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200092, China

Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30170411

Correspondence to: Dr. Ding-Guo Li, Department of Gastroenterology, Xinhua Hospital, 1665 Kongjiang Road, Shanghai 200092, China. Dingguo_li@yahoo.com.cn

Received:2002-11-19 Accepted:2002-12-09

Abstract

AIM: To investigate the effect of activin A on the extracellular matrix secretion of rat hepatic stellate cell.

METHODS: Hepatic stellate cells were isolated and purified from normal male Sprague-Dawley rat liver by a combination of pronase-collagenase perfusion and density gradient centrifugation. Passaged hepatic stellate cells were divided randomly into eight groups: control group(A group), ACTA 1 $\mu\text{g/L}$ group (B group), ACTA 10 $\mu\text{g/L}$ group(C group), ACTA 100 $\mu\text{g/L}$ group (D group), TGF β_1 10 $\mu\text{g/L}$ group(E group), TGF β_1 10 $\mu\text{g/L}$ plus ACTA 1 $\mu\text{g/L}$ group(F group), TGF β_1 10 $\mu\text{g/L}$ plus ACTA 10 $\mu\text{g/L}$ group(G group), TGF β_1 10 $\mu\text{g/L}$ plus ACTA 100 $\mu\text{g/L}$ group(H group). 24 h after incubation secretion of procollagen III, collagen IV and mRNA of collagen III in hepatic stellate cells were detected by radioimmunoassays and semi-quantitative RT-PCR method respectively.

RESULTS: Extracellular matrix secretion in passaged hepatic stellate cells was enhanced by activin A according to its concentration, the capacity of extracellular matrix secretion by 100 $\mu\text{g/L}$ activin A was equal to that of 10 $\mu\text{g/L}$ TGF β_1 , extracellular matrix secretion and type III collagen mRNA expression in passaged hepatic stellate cells were enhanced by activin A and TGF β_1 in a synergistic manner.

CONCLUSION: Activin A may contribute to hepatic fibrogenesis.

Liu QH, Li DG, Huang X, You HN, Pan Q, Xu LM, Xu QF, Lu HM. Effect of Activin on extracellular matrix secretion in isolated rat hepatic stellate cell. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(6):745-748

摘要

目的:探讨激活素A(activin A, ACT A)对肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成的影响。■

方法:采用原位酶灌注法和密度梯度离心法分离HSC。初次传代后, HSC 随机分为 8 组:空白对照组(A 组)、ACTA 1 $\mu\text{g/L}$ 组(B 组)、ACTA 10 $\mu\text{g/L}$ 组(C 组)、ACTA 100 $\mu\text{g/L}$ 组(D 组)、TGF β_1 10 $\mu\text{g/L}$ 组(E 组)、ACTA 1 $\mu\text{g/L}$ +TGF β_1 10 $\mu\text{g/L}$ 组(F 组)、ACTA 10 $\mu\text{g/L}$ +TGF β_1 10 $\mu\text{g/L}$ 组(G 组)、ACTA 100 $\mu\text{g/L}$ +TGF β_1 10 $\mu\text{g/L}$ 组(H 组)。加药后 24 h, 采用放射免疫法检测培养液Ⅲ型前胶原、Ⅳ型胶原含量及半定量 RT-PCR 方法测定细胞Ⅲ型胶原 mRNA 表达。

结果:ACT A 能刺激体外培养 HSC 分泌 ECM, 在一定浓度范围内(1-100 $\mu\text{g/L}$)呈剂量依赖关系; 100 $\mu\text{g/L}$ ACT A 刺激 HSC 分泌 ECM 的能力与 10 $\mu\text{g/L}$ TGF- β_1 相当, 而且 ACT A 能协同 TGF- β_1 发挥这一生物学效应。

结论:激活素 A 参与肝纤维化形成。

刘清华,李定国,黄新,尤汉宁,潘勤,徐雷鸣,徐芹芳,陆汉明. 激活素 A 对肝星状细胞细胞外基质合成的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(6):745-748

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/745.asp>

0 引言

激活素(activin, ACT)属于转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族, 是由两个亚单位(β_A 和 β_B)组成的二聚体糖蛋白, 根据亚单位组成不同可分为 ACT A($\beta_A\beta_A$)、ACT B($\beta_B\beta_B$) 和 ACT AB($\beta_A\beta_B$), 其中以 ACT A 最为重要^[1-3]。近年研究表明, ACT A 是肝脏生长抑制性递质, 可抑制肝细胞生长, 诱导其凋亡^[4-6]。这种特性与 TGF- β_1 在肝内的作用相似。已知 TGF- β_1 作为重要的细胞因子参与肝纤维化形成^[9-12], 关于 ACT A 在肝纤维化形成中所起的作用以及与 TGF- β_1 关系还不是很明确, 为此我们进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料 Sprague-Dawley δ 大鼠, 质量 400-450 g,

购自中国科学院上海实验动物中心, 普通饲料喂养, 自由进食. 基因重组人 TGF- β 1, 为 R & D 公司产品; 基因重组人 ACTA 由日本 Ajinomoto 药物研究室 Eto Yusuzu 博士惠赠; 链酶蛋白酶、IV 型胶原酶、DNA 酶、Nycodenz 为 Sigma 公司产品; DMEM 培养基为 Gibco 公司产品; 小牛血清、胰蛋白酶、mRNA 抽提试剂盒为上海华美生物工程公司产品; 逆转录试剂盒为 Promega 公司产品; Tag 酶、琼脂糖、dNTP 为上海生物工程公司产品; III 型胶原及 β -actin 引物由上海生物工程公司合成.

1.2 方法 采用原位酶灌注法和密度梯度离心法分离 HSC^[13,14]. 大鼠经 2.5 g/L 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉后, 门静脉穿刺, 恒流泵以 20 ml/min 速度依次灌注前灌流液、链酶蛋白酶溶液和胶原酶溶液. 肝组织软化后, 分离肝脏, 剪碎后于链酶蛋白酶、胶原酶和 DNA 酶液中振荡消化 30 min. 所得悬液 200 目网过滤, 滤液离心, 500 g \times 7 min, 弃上清, D-hanks 液重复离心洗涤 3 次. 以 1:2 的体积与 180 g/L Nycodenz 混匀, 上覆少许 DMEM 培养液, 行密度梯度离心, 1 500 g \times 7 min. 取界面处细胞, D-hanks 液离心洗涤 2 次, 500 g \times 7 min. 用含 200 ml/L 小牛血清的 DMEM 培养液重悬细胞, 5-10 \times 10⁸/L 的浓度接种培养细胞, 24 h 后换液, 14 d 后传代. 台盼蓝排斥法鉴定细胞活率; 自发荧光观察鉴定其纯度. 取初次传代的 HSC, 以含 200 ml/L 小牛血清的 DMEM 培养液调整细胞浓度约为 2 \times 10⁸/L 接种 6 孔板. 待细胞融合生长后, 换含 10 ml/L 小牛血清的 DMEM 培养 24 h, 将细胞分为 8 组: (1)空白对照组(A 组); (2)ACTA 1 μ g/L(B 组):加 ACTA 浓度为 1 μ g/L; (3)ACTA 10 μ g/L(C 组):加 ACTA 浓度为 10 μ g/L; (4)ACTA 100 μ g/L(D 组):加 ACTA 浓度为 100 μ g/L; (5)TGF β ₁ 10 μ g/L(E 组):加 TGF β ₁ 浓度为 10 μ g/L; (6)ACTA 1 μ g/L+TGF β ₁ 10 μ g/L(F 组):加 ACTA 浓度为 1 μ g/L, TGF β ₁ 浓度为 10 μ g/L; (7)ACTA 10 μ g/L+TGF β ₁ 10 μ g/L(G 组):加 ACTA 浓度为 10 μ g/L, TGF β ₁ 浓度为 10 μ g/L. (8)ACTA 100 μ g/L+TGF β ₁ 10 μ g/L(H 组):加 ACTA 浓度为 100 μ g/L, TGF β ₁ 浓度为 10 μ g/L. 药物作用 24 h 后, 分别采用放射免疫法检测培养液 III 型前胶原(procollagen III, PC III)、IV 型胶原(collagen IV, C IV)含量或半定量 RT-PCR 方法测定细胞 III 型胶原 mRNA 表达. PC III、C IV 含量测定采用放射免疫法, 按试剂盒说明书操作.

III 胶原 mRNA 相对表达量 RT-PCR 检测:(1)RNA 提取和逆转录反应按试剂盒说明书操作; (2)引物设计及扩增条件:根据文献报道的大鼠 III 型胶原及 β -actin 的 cDNA 序列, 应用 Oligo 引物设计软件在计算机上设计相应引物. III 型胶原:上游, 5' -tggtcca acc agg aga gaa gg-3'; 下游, 5' -atccgtctc gac ctg gct ga-3', 扩增片段长 300 bp. 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 7 min. β -actin:上游, 5' -tac ccc att gaa cac ggc at-3'; 下游, 5' -tca cgc acg att tcc ctc tc-3',

扩增片段长 428 bp. 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 28 次; 72 $^{\circ}$ C 7 min. (4)半定量分析:PCR 产物在 20 g/L 琼脂糖凝胶上电泳后摄像, 图像使用复日 Smartview 分析软件行密度定量, III 型胶原与 β -actin 比值作为 III 型胶原 mRNA 相对表达量.

统计学处理 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异采用方差分析, 两组组间差异用 Dunnett's t 检验, 所有数据均用 SPSS10.0 软件分析.

2 结果

2.1 HSC 细胞的得率和纯度 用本法分离的 HSC, 其得率为 5 \times 10⁶-1 \times 10⁷/肝, 以 4 g/L 台盼蓝染色细胞存活率在 90% 以上. 新鲜分离的 HSC 在波长为 325-328 nm 紫外线激发下, 呈明亮蓝绿色荧光(图 1). 培养 1 wk 后, HSC 完全激活, 呈梭型生长(图 2).

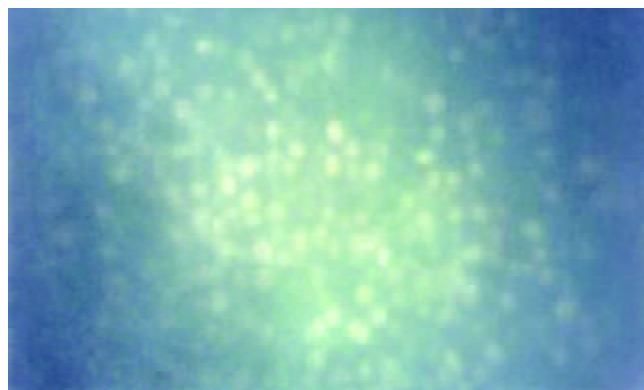


图 1 新鲜分离的 HSC 在紫外线激发后呈蓝绿色荧光 \times 1100.

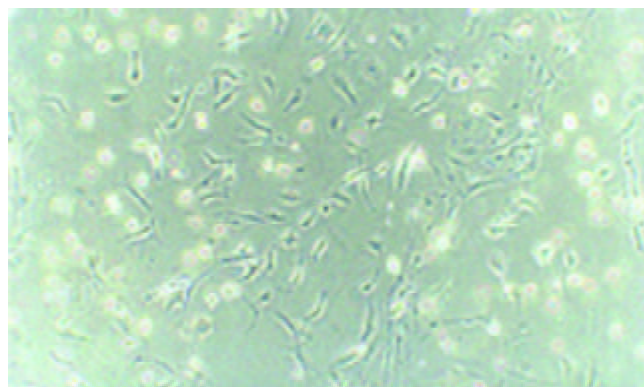


图 2 HSC 完全激活后呈梭型生长 \times 1100.

2.2 ACTA 及联合 TGF β ₁ 对 HSC 分泌 PC III、C IV 影响 ACTA 促进 HSC 分泌 PC III 型、C IV, 并呈剂量依赖关系(表 1). 当 ACTA 浓度为 100 μ g/L 时, 能显著促进 HSC 分泌 PC III、C IV ($P < 0.01$). 100 μ g/L ACTA 促进 HSC 分泌 ECM 作用与 10 μ g/L TGF β ₁ 相当 ($P > 0.05$). 不同浓度 ACTA (1, 10, 100 μ g/L) 与 TGF β ₁ (10 μ g/L) 合用引起的剂量依赖性促进 HSC 分泌 ECM 作用不仅比单独使用 ACTA 时作用强, 而且两药合用时 HSC 分泌 ECM 比两药理论相加值大 ($P < 0.05$) (图 3、4).

表1 不同浓度 ACTA 及其与 TGFβ₁ 合用对大鼠分泌 ECM 的影响

组号	分组	PC III (ng/L)	C IV (μg/L)
1	空白对照组	6.6 ± 2.3	90.6 ± 12.7
2	ACTA 1 μg/L	6.7 ± 1.8	92.5 ± 9.1
3	ACTA 10 μg/L	7.9 ± 2.6	112.1 ± 25.4
4	ACTA 100 μg/L	20.5 ± 3.6 ^b	240.5 ± 47.2 ^b
5	TGFβ ₁ 10 μg/L	20.7 ± 6.8 ^b	253.1 ± 44.3 ^b
6	TGFβ ₁ 10 μg/L+ ACTA 1 μg/L	23.3 ± 7.1 ^b	261.7 ± 56.5 ^b
7	TGFβ ₁ 10 μg/L+ ACTA 10 μg/L	30.1 ± 10.7 ^b	331.2 ± 97.6 ^b
8	TGFβ ₁ 10 μg/L+ ACTA 100 μg/L	50.4 ± 10.0 ^b	526.3 ± 103.1 ^b

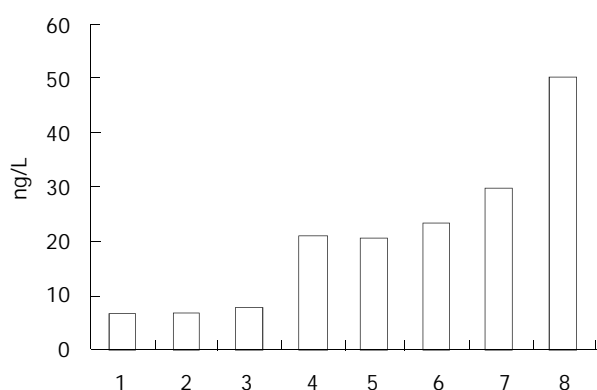
^bP < 0.01 vs 空白对照组.

图3 ACT A及联合 TGFβ1 对 HSC 分泌 PC III 影响.

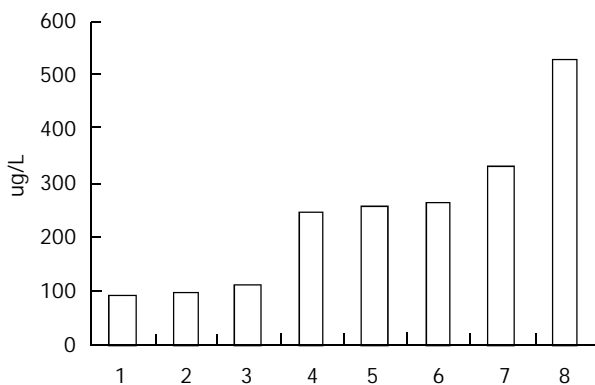


图4 ACT A及联合 TGFβ1 对 HSC 分泌 C IV 影响.

2.3 HSC 总 RNA 质量鉴定 用微量紫外分光光度仪检测 RNA A₂₆₀/A₂₈₀ 介于 1.8-2.0, 表明 RNA 未被蛋白质污染. 1% 琼脂糖凝胶电泳显示 28S 和 18S 两条带(图 5). 摄像后, 图像使用复日 Smartview 分析软件行密度定量, 28S 约为 18 S 两倍, 说明 RNA 无明显降解, 可用于 RT-PCR 实验.

2.4 ACT A 及联合 TGFβ₁ 对大鼠 HSC III 型胶原 mRNA 表达影响 10 μg/L TGFβ₁ 能显著增加 HSC 分泌 III 型胶原 mRNA (52.6 ± 5.1 % vs 23.4 ± 3.5 %, P < 0.01), 10 μg/L ACT A 对其影响不明显 (25.1 ± 6.5 %), 但是联合 10 μg/L TGF β₁ 后促进 HSC 分泌 III 型胶原 mRNA 较二者理论相加值大 (66.1 ± 8.2 %, P < 0.05) (图 6、表 2).

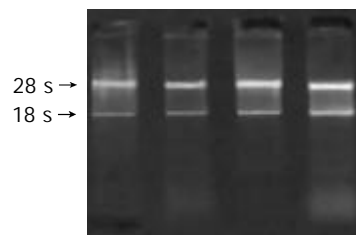
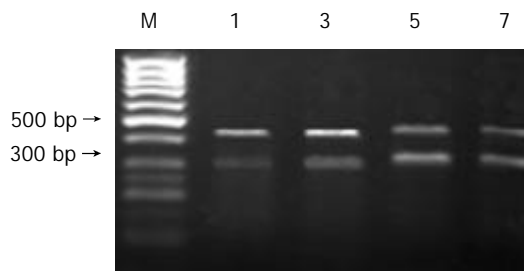


图5 RNA 电泳图.

图6 10 μg/L ACTA 及其与 10 μg/L TGFβ₁ 合用对大鼠 HSC III 型胶原 mRNA 影响.表2 ACTA 及其与 TGFβ₁ 合用对大鼠 HSC III 型胶原 mRNA 影响

组号	分组	III 型胶原 mRNA (%)
1	空白组	23.4 ± 3.5
3	ACTA 10 μg/L	25.1 ± 6.5
5	TGFβ ₁ 10 μg/L	52.6 ± 5.1 ^b
7	TGFβ ₁ 10 μg/L+ ACTA 10 μg/L	66.1 ± 8.2 ^b

^bP < 0.01 vs 空白对照组.

3 讨论

我们研究证实了 ACTA 能刺激体外培养 HSC 分泌 ECM, 在一定浓度范围内 (1-100 μg/L) 呈剂量依赖关系; 100 μg/L ACT A 刺激 HSC 分泌 ECM 的能力与 10 μg/L TGF-β₁ 相当, 而且 ACT A 能协同 TGF-β₁ 发挥这一生物学效应. Sugiyama et al.^[15] 研究发现在二甲基亚硝胺和猪血清诱导的大鼠肝纤维化模型中 ACTA 表达增高, 首次证实除 TGF-β₁ 外, 这一家族其他成员 ACTA 在肝纤维化组织中过量表达; 我们的研究也显示正常肝脏能够表达 ACT A, 在肝纤维化形成过程中其表达一过性下降, 然后又逐渐升高^[16,17], 这些资料均显示 ACTA 可能参与肝纤维化形成.

HSC 在肝损伤过程中被激活经表型转化而成为肌成纤维细胞, 产生大量 ECM 促进肝纤维化形成, 是肝纤维化发生发展的中心环节, 体外培养 HSC 常作为肝硬化基础及实验治疗研究的重要手段^[18-26]. ECM 过度沉积是肝纤维化形成中关键的一步, 检测 ECM 成分的含量常作为肝纤维化的辅助诊断手段^[12,27]. 目前认为 PC III, C IV, 层粘连蛋白及透明质酸是最具代表性的肝纤维化血清学指标. 肝纤维化时, HSC 胶原 mRNA 表达增加, 特别是 I, III 型胶原^[28,29]. 因此, 在实验中我们采用体外培养的 HSC 作为研究的靶细胞, 用放射免疫

检测培养细胞上清液 PC III、C IV 含量及细胞 III 型胶原 mRNA 表达。我们研究证实随着 ACT A 浓度增加, 其促进 HSC 分泌 ECM 能力增加。在 1-100 $\mu\text{g/L}$ 剂量范围内, 以 100 $\mu\text{g/L}$ 促进 HSC 分泌 PC III, C IV 能力最强 ($P < 0.01$); 在 10 $\mu\text{g/L}$ ACT A 时对 HSC 表达 III 型胶原 mRNA 影响不明显, 当联合 10 $\mu\text{g/L}$ TGF β_1 后, 其促进 HSC 表达 III 型胶原 mRNA 较二者理论相加值大 ($P < 0.05$), 说明二者具有协同作用。

在肝星状细胞表面存在 ACTA 受体, 其结构与 TGF- β_1 受体相似, 均属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 有 3 种形式, 即 I 型受体(R I)、II 型受体(R II)和 III 型受体(R III)。在信号转导时, ACTA, TGF- β_1 分别与各自的 R II 结合, 然后激活各自的 R I, 由 R I 向细胞内转导生物学信息变化; R III 因缺乏细胞内区, 不是信号转到所必需^[30-36]。在 HSC 表面分别存在 ACTA 与 TGF- β_1 两种受体, 其生物学活性相似, 但又各自独立。我们的研究证实 ACTA 协同 TGF- β_1 刺激 HSC 分泌 ECM, 共同参与肝纤维化形成。

4 参考文献

- Welt C, Sidis Y, Keutmann H, Schneyer A. Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002;227: 724-752
- Sakai R, Eto Y. Involvement of activin in the regulation of bone metabolism. *Mol Cell Endocrinol* 2001;180:183-188
- Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, Baillie AJ, Robertson DM, Ethier JF. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 2002;191:35-43
- 黄新, 李定国. 激活素、抑制素及卵泡抑素与肝脏。世界华人消化杂志 1999;7:780-781
- Hughes RD, Evans LW. Activin A and follistatin in acute liver failure. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:127-131
- Rossmann W, Chabicovsky M, Grasl-Kraupp B, Peter B, Schausberger E, Schulte-Hermann R. Follistatin overexpression in rodent liver tumors: a possible mechanism to overcome activin growth control. *Mol Carc* 2002;35:1-5
- Ichikawa T, Zhang YQ, Kogure K, Hasegawa Y, Takagi H, Mori M, Kojima I. Transforming growth factor beta and activin tonically inhibit DNA synthesis in the rat liver. *Hepatology* 2001; 34:918-925
- Takabe K, Lebrun JJ, Nagashima Y, Ichikawa Y, Mitsushashi M, Momiyama N, Ishikawa T, Shimada H, Vale WW. Interruption of activin A autocrine regulation by antisense oligodeoxynucleotides accelerates liver tumor cell proliferation. *Endocrinology* 1999;140: 3125-3132
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:d793-d807
- Wells RG, Fibrogenesis V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G845-G850
- 向德栋, 魏永利, 李奇芬. 转化生长因子 $\beta-1$ 对 Ito 细胞作用的分子机制。世界华人消化杂志 1999;7:980-981
- Wei HS, Li DG, Lu HM, Zhan YT, Wang ZR, Huang X, Zhang J, Cheng JL, Xu QF. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl_4 . *World J Gastroenterol* 2000;6:540-545
- 朱永红, 胡大荣. 肝脏星形细胞系的建立及其应用。世界华人消化杂志 1999;7:348-349
- 龚建平, 韩本立. 肝脏细胞的分离、培养和鉴定技术。世界华人消化杂志 1999;7:417-419
- Sugiyama M, Ichida T, Sato T, Ishikawa T, Matsude Y, Asakura H. Expression of activin A is increased in cirrhotic and fibrotic rat livers. *Gastroenterology* 1998;114:550-558
- Huang X, Li DG, Lu HM, Wang ZR, Wei HS, Wang YP, Zhang J, Xu QF. Expression of activins, follistatin mRNA in the development of hepatic fibrosis. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2002;10:85-88
- Huang X, Li DG, Wang ZR, Wei HS, Cheng JL, Zhan YT, Zhou X, Xu QF, Li X, Lu HM. Expression changes of activin A in the development of hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2001;7:37-41
- Liu XJ, Yang L, Mao YQ, Wang Q, Huang MH, Wang YP, Wu HB. Effects of the tyrosine protein kinase inhibitor genistein on the proliferation, activation of cultured rat hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:739-745
- Liu XJ, Yang L, Wu HB, Qiang O, Huang MH, Wang YP. Apoptosis of rat hepatic stellate cells induced by anti-focal adhesion kinase antibody. *World J Gastroenterol* 2002;8:734-738
- Cheng ML, Wu J, Wang HQ, Xue LM, Tan YZ, Ping L, Li CX, Huang NH, Yao YM, Ren LZ, Ye L, Li L, Jia ML. Effect of Maotai liquor in inducing metallothioneins and on hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:520-523
- Zhang XL, Liu L, Jiang HQ. Salvia miltiorrhiza monomer IH764-3 induces hepatic stellate cell apoptosis via caspase-3 activation. *World J Gastroenterol* 2002;8:515-519
- Yao XX, Tang YW, Yao DM, Xiu HM. Effects of Yigan Decoction on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:511-514
- Chen PS, Zhai WR, Zhou XM, Zhang JS, Zhang YE, Ling YQ, Gu YH. Effects of hypoxia, hyperoxia on the regulation of expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:647-651
- Wang JY, Zhang QS, Guo JS, Hu MY. Effects of glycyrrhetic acid on collagen metabolism of hepatic stellate cells at different stages of liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:115-119
- Du WD, Zhang YE, Zhai WR, Zhou XM. Dynamic changes of type I, III and IV collagen synthesis and distribution of collagen-producing cells in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *World J Gastroenterol* 1999;5:397-403
- Liu C, Liu P, Liu CH, Zhu XQ, Ji G. Effects of Fuzhenghuayu decoction on collagen synthesis of cultured hepatic stellate cells, hepatocytes and fibroblasts in rats. *World J Gastroenterol* 1998; 4:548-549
- Yao L, Yao ZM, Yu T. Influence of BOL on hyaluronic acid, laminin and hyperplasia in hepatofibrotic rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:872-875
- 王晓玲, 刘平, 刘成海, 刘成. 拆方扶正化瘀方对肝细胞及肝星状细胞功能的影响。世界华人消化杂志 1999;7:663-665
- 向德栋, 李奇芬, 王宇明, 王雅凡. 维生素 E 乳剂对肝脏星状细胞 III 型前胶原和 MMP1mRNA 表达的影响。世界华人消化杂志 1999; 7:1085
- Date M, Matsuzaki K, Matsushita M, Tahashi Y, Sakitani K, Inoue K. Differential regulation of activin A for hepatocyte growth and fibronectin synthesis in rat liver injury. *J Hepatol* 2000;32:251-260
- Chen W, Woodruff TK, Mayo KE. Activin A-induced HepG2 liver cell apoptosis: involvement of activin receptors and smad proteins. *Endocrinology* 2000;141:1263-1272
- Chen YG, Lui HM, Lin SL, Lee JM, Ying SY. Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. *Exp Biol Med (Maywood)* 2002;227:75-87
- Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM. Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett* 2001;502:4-10
- Chen A. Acetaldehyde stimulates the activation of latent transforming growth factor-beta1 and induces expression of the type II receptor of the cytokine in rat cultured hepatic stellate cells. *Biochem J* 2002;368(Pt 3):683-693
- Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 2002;35:49-61
- Dooley S, Delvoux B, Lahme B, Mangasser-Stephan K, Gressner AM. Modulation of transforming growth factor beta response and signaling during transdifferentiation of rat hepatic stellate cells to myofibroblasts. *Hepatology* 2000;31:1094-1106

脾静脉结扎诱导继发性脾功能亢进犬动物模型的评价

刘全达,马宽生,何振平,丁 钧,董家鸿

刘全达,马宽生,何振平,丁钧,董家鸿,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,西南肝胆外科医院 重庆市 400038
刘全达,男,1971-08-11生,江苏省宜兴市人,汉族,博士研究生,主治医师,主要从事肝胆胰脾外科的临床和基础研究。
全军医学科研“十五”重点课题, No.02Z005
项目负责人:刘全达,400038,重庆市沙坪坝区高滩岩,中国人民解放军第三军医大学西南医院肝胆外科。liuquanda@sina.com
电话:023-65398541
收稿日期:2002-08-01 接受日期:2002-10-03

Evaluation of a canine model of secondary hypersplenism induced by splenic vein ligation

Quan-Da Liu, Kuan-Sheng Ma, Zhen-Ping He, Jun Ding, Jia-Hong Dong

Quan-Da Liu, Kuan-Sheng Ma, Zhen-Ping He, Jun Ding, Jia-Hong Dong, Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China
Supported by The “Tenth-Five” Fundamental Medical Scientific Research Project of PLA, China, No.02Z005
Correspondence to: Quan-Da Liu, Institute of Hepatobiliary Surgery & Southwest Hepatobiliary Surgery Hospital, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. liuquanda@sina.com
Received: 2002-08-01 Accepted: 2002-10-03

Abstract

AIM: To introduce and evaluate a canine model of secondary hypersplenism induced by splenic vein ligation.

METHODS: Eighteen healthy mongrel dogs were randomly divided into three groups. The first group ($n=4$) underwent laparotomy, the second ($n=10$) and third groups ($n=4$) underwent laparotomy plus ligation of splenic vein and its collateral branches to induce congestive splenomegaly. At the end of the third week, splenectomy was performed in the third group. The blood cell counts for peripheral venous blood were determined weekly, and the radiographic and histopathological changes of spleen also obtained regularly.

RESULTS: The erythrocyte and platelet counts decreased in the first week, and were significantly lowered (erythrocyte count of $(6.8 \pm 1.2) \times 10^{12}/L$ in control vs. $(5.1 \pm 0.7) \times 10^{12}/L$ in second group, $P < 0.01$; and platelet counts of $(398 \pm 58) \times 10^9/L$ vs. $(230 \pm 86) \times 10^9/L$, $P < 0.05$ respectively) at the end of 3rd week after splenic vein ligation thereafter sustained. The splenomegaly, erythrocytopenia and thrombocytopenia had remained over 9 weeks. No significant changes of the leukocyte counts were observed after splenic vein ligation throughout the experiment ($P > 0.05$). The abnormal status of erythrocytopenia and thrombocytopenia was ameliorated by splenectomy, and the erythrocyte and platelet counts were similarly to the levels of the control group in the second week after splenectomy. After the end of 3rd week after splenic vein ligation, the splenic histopathological changes conformed to the changes of

chronic congestive splenomegaly.

CONCLUSION: The method of splenic vein ligation to induce experimental secondary hypersplenism is simple and effective. This is a relative ideal model for surgical or interventional therapy on hypersplenism.

Liu QD, Ma KS, He ZP, Ding J, Dong JH. Evaluation of a canine model of secondary hypersplenism induced by splenic vein ligation. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(6):749-752

摘要

目的: 介绍并评价脾静脉结扎诱导的继发性脾功能亢进犬动物模型。

方法: 18只健康成年杂种狗随机分为I组(对照组 $n=4$)、II组(脾静脉结扎 $n=10$)和III组(脾静脉结扎+脾切除 $n=4$)。通过结扎狗的脾静脉主干和脾静脉属支引起淤血性脾肿大;脾静脉结扎后第3周第III组行脾切除术。定期观察动物外周血细胞变化以及影像学、组织病理学改变。

结果: 脾静脉结扎后1wk内外周血红细胞、血小板开始下降,第3周末二者下降明显(I组红细胞和血小板计数分别为 $(6.8 \pm 1.2) \times 10^{12}/L$ 、 $(398 \pm 58) \times 10^9/L$, II组为 $(5.1 \pm 0.7) \times 10^{12}/L$ 、 $(230 \pm 86) \times 10^9/L$, 分别 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);红细胞和血小板减少、脾脏肿大可持续9wk以上;但脾静脉结扎后白细胞水平无显著改变。脾切除术后2wk红细胞和血小板逐渐恢复正常。脾静脉结扎3wk后脾脏组织病理学改变逐渐符合慢性脾脏淤血改变。

结论: 脾静脉结扎方法简单,可以建立确切的继发性脾功能亢进,可以作为脾功能亢进外科或介入治疗的较理想模型。

刘全达,马宽生,何振平,丁钧,董家鸿. 脾静脉结扎诱导继发性脾功能亢进犬动物模型的评价. 世界华人消化杂志 2003;11(6):749-752

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/749.asp>

0 引言

继发性脾功能亢进(脾亢)是肝硬化的常见表现,其直接后果是出凝血机制紊乱,引发或加重曲张静脉出血^[1-4]。脾切除术是外科最常用的方法,且疗效确切^[5-7]。但随着对脾脏免疫功能认识的深入^[8-12],保留部分脾脏已得到公认^[13-18]。临床也逐渐应用选择性脾动脉栓塞术、脾内无水酒精注射等微创方法^[19-22]治疗继发性脾亢。但在继发性脾亢的微创治疗的实验研究中,尚缺乏脾脏肿大犬动物模型^[23-28]。我们在对脾脏射频消融治疗脾亢的实

验研究中,建立了一种快速诱导的继发性脾亢的犬动物模型,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年杂种狗18只(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不拘,质量12-17 kg,随机分为3组:Ⅰ组(对照组, $n=4$);Ⅱ组(脾静脉结扎, $n=10$);Ⅲ组(脾静脉结扎+脾切除, $n=4$)。脾静脉结扎参照Sahin et al^[28]加以改良。动物空腹过夜,腹部备皮后,以速眠新(长春市军需大学兽医研究所提供)肌肉注射(0.1 mL/kg)全身麻醉,建立静脉通道,术中快速输入平衡液500 ml,无菌条件下手术:Ⅰ组剖腹术;Ⅱ组剖腹术+脾静脉结扎;Ⅲ组剖腹术+脾静脉结扎。为避免脾静脉侧枝循环建立,在脾静脉汇入门静脉处结扎脾静脉主干后20 min,再在脾门处分别结扎扩张的脾静脉属支。术后归圈饲养,温度 $24\pm 2^\circ\text{C}$,食水不限。术后2 wk再手术,Ⅰ组:剖腹术;Ⅱ,Ⅲ组:剖腹术+脾静脉侧枝血管结扎。术后3 wk再次手术,Ⅰ,Ⅱ组:剖腹术;Ⅲ组:剖腹术+脾切除术。

1.2 方法 所有动物术后每周行腹部CT或超声检查,了解脾脏大小(脾脏厚度和长径)改变;实验4 wk起第Ⅱ组每周处死1只,实验9 wk动物全部处死,切除脾脏均经40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,连续5 μm 切片,HE染色后镜检,了解脾脏组织病理学改变。实验当天术前和术后每周采动物外周血行血细胞计数(白细胞、红细胞和血小板)。血标本立即送我院门诊检验科行自动血细胞计数仪Sysmex(K-4500)检测,每个标本重复2次,取其均值。

统计学处理 计量数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,均与对照Ⅰ组行t检验, $P<0.05$ 为相差显著。

2 结果

2.1 外周血细胞的变化 与作对照组Ⅰ组的外周血的血小板计数 $[(398\pm 58)\times 10^9/\text{L}]$ 和红细胞计数红细胞 $[(6.8\pm 1.2)\times 10^{12}/\text{L}]$ 相比,Ⅱ、Ⅲ组动物在脾静脉结扎后1 wk即出现红细胞和血小板下降。在3 wk末Ⅱ组 $[(230\pm 86)\times 10^9/\text{L}]$ ($t=3.553$, $P<0.01$)和Ⅲ组 $[(225\pm 96)\times 10^9/\text{L}]$ ($t=3.085$, $P<0.05$)显著下降;3 wk末Ⅱ组 $[(5.1\pm 0.7)\times 10^{12}/\text{L}]$ ($t=3.369$, $P<0.05$)和Ⅲ组红细胞计数 $[(4.9\pm 0.6)\times 10^{12}/\text{L}]$ ($t=2.832$, $P<0.05$)亦显著降低;第Ⅲ组脾切除术后红细胞和血小板逐渐恢复,脾切除后2 wk基本恢复至正常;Ⅱ组到9 wk实验结束血小板和红细胞一直保持在低水平。整个实验过程中三组白细胞水平变化均不显著($P>0.05$,图1-3)。

2.2 脾脏影像学和组织病理学 采用Doppler超声(图4A)和CT检查(图4B)显示,脾脏结扎后体积明显增大(图4C),与术中探查和影像学结果一致。2 wk剖腹时发现脾脏略有缩小,脾门周围又出现数支扩张的脾静脉属支;予再次结扎后,此后探查脾门仅见网状迂曲的小静脉网,无明显扩张的粗大静脉。术中组织病理学检查提示,与正常

脾脏结构比较,脾静脉结扎组3 wk末脾脏明显充血,脾窦扩张,4 wk以后脾脏内可见纤维组织增生,脾窦内有较多微血栓,脾小梁明显增粗(图5)。上述组织病理学表现符合慢性脾淤血改变。

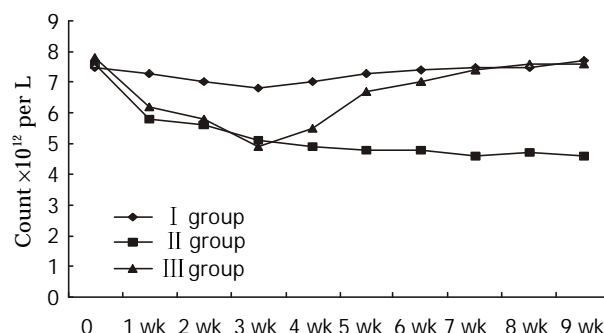


图1 血小板水平的时间动态变化。

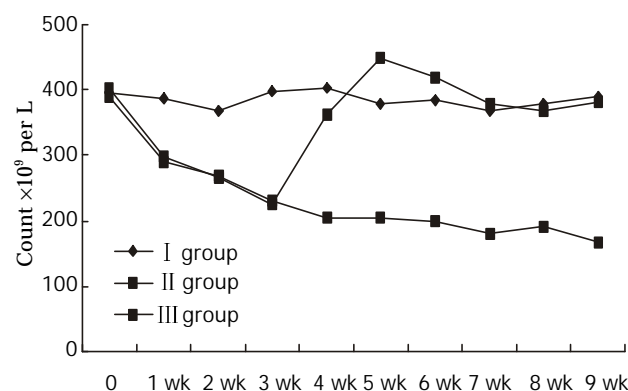


图2 红细胞水平的时间动态变化。

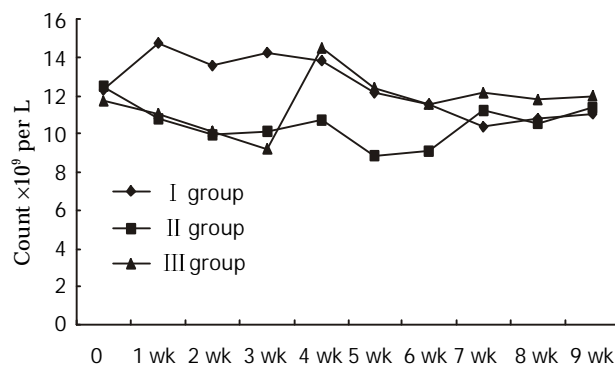
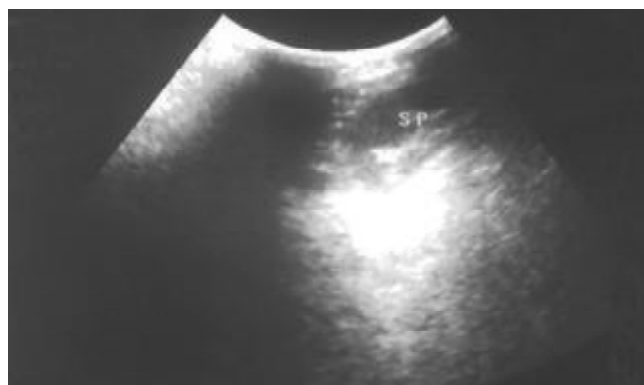
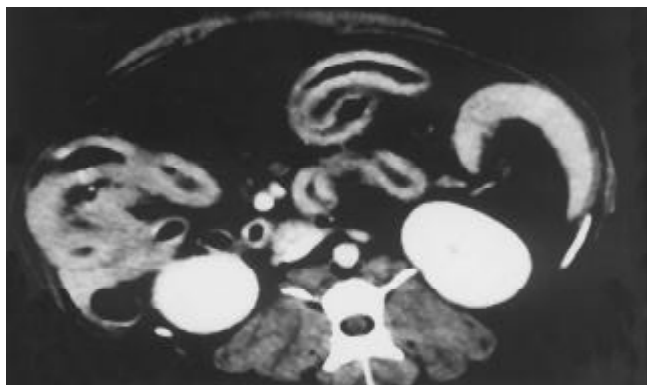


图3 白细胞水平的时间动态变化。



A Doppler 超声示脾脏厚度正常;



B CT显示脾脏正常;

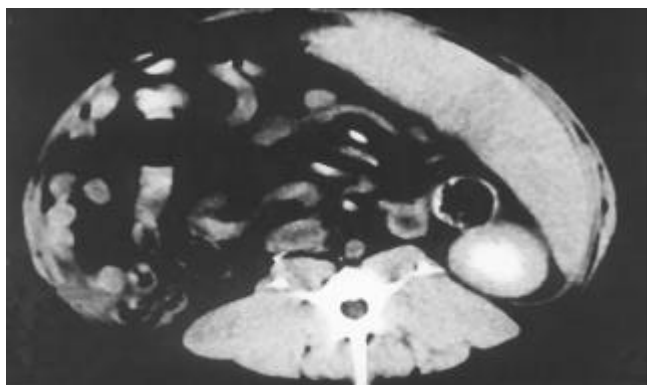
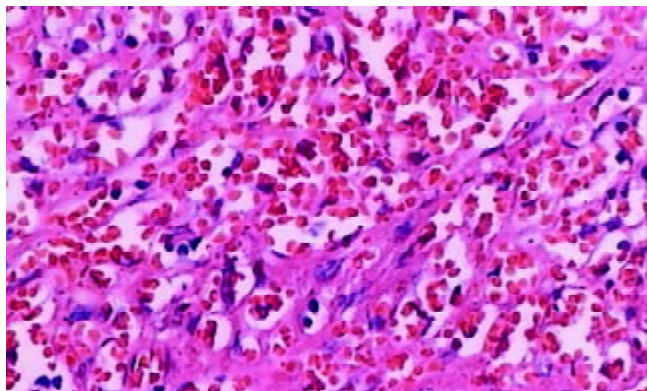
C 脾静脉结扎后3 wk末CT显示巨脾;
图4 脾脏的影像学检查.

图5 脾静脉结扎后9 wk末脾脏组织病理学改变 HE×200.

3 讨论

我们采用脾静脉结扎均成功诱导继发性脾亢, 该方法类似于临床的脾静脉血栓形成引起区域性门静脉高压, 但后者仅50%左右出现脾脏肿大, 脾亢者更少^[29-33]. 其根本原因是脾静脉慢性闭塞过程中血流逐渐通过扩张的胃短静脉、胃网膜静脉等侧枝血管代偿, 因而脾大、脾亢并不明显. 为了防止上述侧枝形成, Sahin et al^[28]采用在脾门处分别结扎脾静脉属支的方法, 但该方法诱导的脾亢仅能维持5 wk左右. 我们发现, 即使在脾门处结扎脾静脉, 术后1 wk探查时仍可见到代偿的粗大脾静脉属支, 脾脏缩小, 提示1次手术无法保证彻底的阻断脾静脉流出道. 因此我们设计结扎脾静脉主干基础

上, 结合快速液体输入, 待脾静脉属支扩张后, 再在脾门处分别结扎扩张的脾静脉属支, 2 wk后再次结扎代偿的粗大脾静脉属支, 这就尽可能地完成脾静脉流出道的阻断. 该方法极大地提高了脾亢动物模型的成功率. 由于潜在侧枝循环被阻断, 而高压的动脉血流仍持续向脾内灌注, 从而确保了巨脾和脾亢的长时间维持. 研究表明, 我们的脾亢模型持续时间达9 wk以上.

脾脏长时间淤血状态下, 除脾门周围出现细小网状血管网外, 脾脏组织学结构出现一些特征性改变, 即脾脏被膜增厚、脾窦淤血扩张、白髓萎缩、纤维化, 本实验脾静脉结扎后的组织病理学改变符合上述脾淤血改变. II, III组动物脾静脉结扎后红细胞和血小板计数在1 wk即出现下降, 在3 wk末与对照组相比下降显著, 而且脾静脉结扎引起的红细胞和血小板下降可以被脾切除术纠正. 这些结果证实, 脾静脉结扎可以诱导红细胞减少和血小板减少. 外周血细胞计数和脾脏组织学改变均提示, 动物脾静脉结扎可以成功诱导继发性脾亢模型. 整个实验过程中, 白细胞下降并不显著, 脾静脉结扎后引起的急性脾脏肿大是否能刺激并动员全身炎症反应从而代偿白细胞减少? 本实验未进行相关研究, 但脾静脉结扎可能不是脾亢性白细胞减少症的理想模型.

随着脾脏免疫功能认识的深入, 尽可能地保留良性脾脏疾病的部分脾脏功能的认识已经被临床医师所接受. 临床许多脾亢患者由于全身情况差、高龄或者伴有其他不适合手术的疾病, 如何处理脾亢相对棘手. 目前有选择性脾动脉栓塞、脾脏酒精注射等微创措施^[19-22], 但临床疗效均不太满意, 前者较多出现脾脓肿, 后者栓塞范围不易控制. 我们正在探索射频消融^[34-37]治疗脾亢的动物研究, 发现狗的脾肿大模型比兔、猪更适合射频消融疗效的需要, 能够满足射频针展开直径2.0-3.5 cm的工作需要.

总之, 脾静脉结扎建立继发性脾亢方法简单、有效, 脾静脉属支的彻底结扎是保证模型成功的关键. 该模型可以作为脾功能亢进外科或介入治疗的较理想模型. 致谢: 梁天学、朱斌、马新、吴政谦等医师提供手术协助和周代全副主任技师的帮助.

4 参考文献

- Okudaira M, Ohbu M, Okuda K. Idiopathic portal hypertension and its pathology. *Semin Liver Dis* 2002;22:59-72
- Jiao YF, Okumiyu T, Saibara T, Kudo Y, Sugiura T. Erythrocyte creatine as a marker of excessive erythrocyte destruction due to hypersplenism in patients with liver cirrhosis. *Clin Biochem* 2001;34:395-398
- Bajaj JS, Bhattacharjee J, Sarin SK. Coagulation profile and platelet function in patients with extrahepatic portal vein obstruction and non-cirrhotic portal fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:641-646
- Bashour FN, Teran JC, Mullen KD. Prevalence of peripheral blood cytopenias (hypersplenism) in patients with nonalcoholic chronic liver disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2936-2939
- Lin MC, Wu CC, Ho WL, Yeh DC, Liu TJ, Peng FK. Concomitant splenectomy for hypersplenic thrombocytopenia in he-

- patic resection for hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 1999;46:630-634
- 6 Carr JA, Shurafa M, Velanovich V. Surgical indications in idiopathic splenomegaly. *Arch Surg* 2002;137:64-68
- 7 McCormick PA, Murphy KM. Splenomegaly, hypersplenism and coagulation abnormalities in liver disease. *Baillieres Best Prac Res Clin Gastroenterol* 2000;14:1009-1031
- 8 杨英祥, 陆家齐, 杨兴东, 冀振华, 邱宝安, 张志成. 脾切除对内毒素诱发肝脏脂多糖结合蛋白和 TNF α 基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:654-658
- 9 Hansen K, Singer DB. Asplenic-hyposplenic overwhelming sepsis: postsplenectomy sepsis revisited. *Pediatr Dev Pathol* 2001;4:105-121
- 10 Kyriazanos ID, Tachibana M, Yoshimura H, Kinugasa S, Dhar DK, Nagasue N. Impact of splenectomy on the early outcome after oesophagectomy for squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Eu J Surg Onco* 2002;28:113-119
- 11 Altamura M, Caradonna L, Amati L, Pellegrino NM, Urgesi G, Miniello S. Splenectomy and sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001;23:153-161
- 12 Seabrook TJ, Hein WR, Dudler L, Young AJ. Splenectomy selectively affects the distribution and mobility of the recirculating lymphocyte pool. *Blood* 2000;96:1180-1183
- 13 de Buys Roessingh AS, de Lagausie P, Rohrlisch P, Berrebi D, Aigrain Y. Follow-up of partial splenectomy in children with hereditary spherocytosis. *J Pediatr Surg* 2002;37:1459-1463
- 14 Jiang HC, Sun B, Qiao HQ, Xu J, Piao DX, Yin H. Clinical application of serial operations with preserving spleen. *World J Gastroenterol* 2001;7:876-879
- 15 Sarkar PK, Bhattacharya DK. Splenectomy and splenic slice grafting in the management of thalassemia. *Pediatr Surg Int* 2001;17:369-372
- 16 Zhang H, Chen J, Kaiser GM, Mapudengo O, Zhang J, Exton MS, Song E. The value of partial splenic autotransplantation in patients with portal hypertension: a prospective randomized study. *Arch Surg* 2002;137:89-93
- 17 Pachter HL, Grau J. The current status of splenic preservation. *Adv Surg* 2000;34:137-174
- 18 Sockrider CS, Boykin KN, Green J, Marsala A, Mladenka M, Zibari GB. Partial splenic embolization for hypersplenism after liver transplantation. *Transplant Proc* 2001;33:3472-3473
- 19 Sakai T, Shiraki K, Inoue H, Sugimoto K, Ohmori S, Murata K, Takase K, Nakano T. Complications of partial splenic embolization in cirrhotic patients. *Dig Dis Sci* 2002;47:388-391
- 20 Obatake M, Muraji T, Kanegawa K, Satoh S, Nishijima E, Tsugawa C. A new volumetric evaluation of partial splenic embolization for hypersplenism in biliary atresia. *J Pediatr Surg* 2001;36:1615-1616
- 21 Kimura F, Itoh H, Ambiru S, Shimizu H, Togawa A, Yoshidome H, Ohtsuka M, Shimizu Y, Shimamura F, Miyazaki M. Long-term results of initial and repeated partial splenic embolization for the treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Roentgenol* 2002;179:1323-1326
- 22 Shimizu T, Onda M, Tajiri T, Yoshida H, Mamada Y, Tanai N, Aramaki T, Kumazaki T. Bleeding portal-hypertensive gastropathy managed successfully by partial splenic embolization. *Hepatogastroenterology* 2002;49:947-949
- 23 刘平, 高云华. 肝纤维化动物模型的建立. *世界华人消化杂志* 2002;10:693-695
- 24 王宪波, 刘平, 陆雄, 刘成海, 胡义扬, 顾宏图, 刘成. 二甲基亚硝酸胺大鼠肝纤维化形成中门脉压力的动态变化. *世界华人消化杂志* 2002;10:401-405
- 25 刘成海, 李风华, 顾宏图, 胡义扬, 刘平, 刘成. g干扰素对大鼠二甲基亚硝酸胺肝纤维化肝脏胶原代谢的作用. *世界华人消化杂志* 2002;10:313-316
- 26 陆雄, 刘成海, 徐光福, 陈文慧, 刘平. 大鼠肝纤维化形成中肝窦壁层粘连蛋白及IV型胶原蛋白的变化. *世界华人消化杂志* 2001;9:260-262
- 27 Lei DX, Peng CH, Peng SY, Jiang XC, Wu YL, Shen HW. Safe upper limit of intermittent hepatic inflow occlusion for liver resection in cirrhotic rats. *World J Gastroenterol* 2001;7:713-717
- 28 Sahin M, Tekin S, Aksoy F, Vatansev H, Seker M, Avunduk MC, Kartal A. The effects of splenic artery ligation in an experimental model of secondary hypersplenism. *J R Coll Surg Edinb* 2000;45:148-152
- 29 Olakowski M, Lampe P, Boldys H, Slota J, Olakowska E. Neuroendocrine pancreatic carcinoma causing sinistral portal hypertension. *Med Sci Monit* 2001;7:1326-1328
- 30 Jaroszewski DE, Schlinkert RT, Gray RJ. Laparoscopic splenectomy for the treatment of gastric varices secondary to sinistral portal hypertension. *Surg Endosc* 2000;14:87
- 31 Sakorafas GH, Tsiotou AG. Splenic-vein thrombosis complicating chronic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:1171-1177
- 32 Sakorafas GH, Sarr MG, Farnell MB. The significance of sinistral portal hypertension complicating chronic pancreatitis. *Am J Surg* 2000;179:129-133
- 33 Suhocki PV, Berend KR, Trotter JF. Idiopathic splenic vein stenosis: a cause of gastric variceal hemorrhage. *South Med J* 2000;93:812-814
- 34 Nishida T, Inoue K, Kawata Y, Izumi N, Nishiyama N, Kinoshita H, Matsuoka T, Toyoshima M. Percutaneous radiofrequency ablation of lung neoplasms: a minimally invasive strategy for inoperable patients. *J Am Coll Surg* 2002;195:426-430
- 35 Liu LX, Jiang HC, Piao DX. Radiofrequency ablation of liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:393-399
- 36 Jiang HC, Liu LX, Piao DX, Xu J, Zheng M, Zhu AL, Qi SY, Zhang WH, Wu LF. Clinical short-term results of radiofrequency ablation in liver cancers. *World J Gastroenterol* 2002;8:624-630
- 37 Liu QD, Ma KS, He ZP, Ding J, Huang XQ, Dong JH. Experimental study on the feasibility and safety of radiofrequency ablation for secondary splenomegaly and hypersplenism. *World J Gastroenterol* 2003;9:813-817

IL-6与整合素家族细胞黏附分子在大鼠急性坏死性胰腺炎合并多器官损伤模型中的表达

孙 威,张俊东,赵 滢,赵 宇,王 强

孙威,赵滢,赵宇,王强,中国医科大学附属二院普通外科 辽宁省沈阳市 110003
张俊东,大庆市第一医院普通外科 黑龙江省大庆市 163001
孙威,男,1968-07-11生,辽宁省沈阳市人,汉族,中国医科大学普通外科博士生.
项目负责人:孙威,110003,辽宁省沈阳市和平区三好街36号,中国医科大学附
属二院普通外科. sunweii@hotmail.com
电话:024-83956513
收稿日期:2003-03-07 接受日期:2003-03-25

Expression of IL-6 and integrin family cell adhesion molecules in acute necrotizing pancreatitis complicated with multiple organ injury in rats

Wei Sun, Jun-Dong Zhang, Ying Zhao, Yu Zhao, Qiang Wang

Wei Sun, Ying Zhao, Yu Zhao, Qiang Wang, Department of General Surgery, 2nd Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China
Jun-Dong Zhang, Department of General Surgery, The First Hospital of Daqing City, Daqing 163001, Heilongjiang Province, China
Correspondence to: Dr. Wei Sun, Department of General Surgery, 2nd Hospital of China Medical University, Shenyang 110003, Liaoning Province, China. sunweii@hotmail.com
Received: 2003-03-07 Accepted: 2003-03-25

Abstract

AIM: To detect the expression of integrin family cellular adhesion molecules LFA-1, Mac-1 and IL-6 in acute necrotizing pancreatitis complicated with multiple organ injury.

METHODS: The flow cytometer was used to detect the expression of LFA-1 and Mac-1 on leukocyte and the radio-immunity to detect the IL-6 in acute necrotizing pancreatitis of rats at different time points.

RESULTS: The expression of LFA-1 and Mac-1 increased significantly in acute pancreatitis group compared with that in control group at all time points ($P < 0.01$), i.e.: LFA-1: 1 h, 7.6 ± 0.4 vs 22.7 ± 1.6 ; 3 h, 7.9 ± 0.5 vs 26.7 ± 5.5 ; 6 h, 13.5 ± 1.8 vs 30.3 ± 1.6 ; 12 h, 9.7 ± 0.7 vs 20.3 ± 4.2 ; 24 h, 10.1 ± 1.1 vs 15.9 ± 0.7 . Mac-1: 1 h, 6.2 ± 1.1 vs 7.0 ± 2.5 ; 3 h, 6.3 ± 0.8 vs 36.0 ± 1.5 ; 6 h, 7.9 ± 1.2 vs 27.1 ± 1.4 ; 12 h, 6.4 ± 0.4 vs 22.5 ± 2.1 ; 24 h, 7.1 ± 0.4 vs 20.6 ± 1.6 . Expression of IL-6 increased significantly in acute pancreatitis group compared with that in control group, i.e.: 1 h, 65.6 ± 3.2 vs 72.4 ± 4.0 ($P < 0.05$); 3 h, 68.2 ± 5.5 vs 155.3 ± 16.3 ($P < 0.01$); 6 h, 69.3 ± 2.6 vs 229.2 ± 16.4 ($P < 0.01$); 12 h, 73.4 ± 2.6 vs 287.7 ± 13.9 ($P < 0.01$); 24 h, 76.9 ± 3.3 vs 289.5 ± 16.1 ($P < 0.01$). Morphological examination demonstrated that inflammatory cells, interstitial edema, interstitial hemorrhage, desquamation and disintegration occurred in the lungs and kidneys.

CONCLUSION: IL-6, LFA-1 and Mac-1 may play the very active role in acute pancreatitis.

Sun W, Zhang JD, Zhao Y, Zhao Y, Wang Q. Expression of IL-6 and integrin family cell adhesion molecules in acute necrotizing pancreatitis complicated with multiple organ injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(6):753-755

摘要

目的: 检测IL-6与整合素家族细胞黏附分子LFA-1, Mac-1在大鼠急性坏死性胰腺炎合并多器官损伤中表达的动态变化。

方法: 应用放免法连续测定大鼠急性坏死性胰腺炎合并多器官损伤模型血清IL-6的变化. 应用流式细胞仪, 于多个时相点检测整合素家族细胞黏附分子LFA-1, Mac-1在SD大鼠急性坏死性胰腺炎合并多器官损伤血中性粒细胞表面表达的变化. 并检测血浆淀粉酶及胰腺、肺和肾脏的病理学损害。

结果: IL-6, LFA-1和Mac-1在炎症组中各个时相点的表达均明显高于对照组, LFA-1: 1 h, 7.6 ± 0.4 vs 22.7 ± 1.6 ($P < 0.01$); 3 h, 7.9 ± 0.5 vs 26.7 ± 5.5 ($P < 0.01$); 6 h, 13.5 ± 1.8 vs 30.3 ± 1.6 ($P < 0.01$); 12 h, 9.7 ± 0.7 vs 20.3 ± 4.2 ($P < 0.01$); 24 h, 10.1 ± 1.1 vs 15.9 ± 0.7 ($P < 0.01$). Mac-1: 1 h, 6.2 ± 1.1 vs 7.0 ± 2.5 ($P < 0.05$); 3 h, 6.3 ± 0.8 vs 36.0 ± 1.5 ($P < 0.01$); 6 h, 7.9 ± 1.2 vs 27.1 ± 1.4 ($P < 0.01$); 12 h, 6.4 ± 0.4 vs 22.5 ± 2.1 ($P < 0.01$); 24 h, 7.1 ± 0.4 vs 20.6 ± 1.6 ($P < 0.01$). IL-6: 1 h, 65.6 ± 3.2 vs 72.4 ± 4.0 ($P < 0.05$); 3 h, 68.2 ± 5.5 vs 155.3 ± 16.3 ($P < 0.01$); 6 h, 69.3 ± 2.6 vs 229.2 ± 16.4 ($P < 0.01$); 12 h, 73.4 ± 2.6 vs 287.7 ± 13.9 ($P < 0.01$); 24 h, 76.9 ± 3.3 vs 289.5 ± 16.1 ($P < 0.01$). 炎症组中血浆淀粉酶明显高于对照组, 并有明显的胰腺、肺和肾脏的病理学改变。

结论: IL-6和整合素家族细胞黏附分子LFA-1, Mac-1均参与了急性坏死性胰腺炎继发多器官功能损伤的过程。

孙威,张俊东,赵滢,赵宇,王强. IL-6与整合素家族细胞黏附分子在大鼠急性坏死性胰腺炎合并多器官损伤模型中的表达. *世界华人消化杂志* 2003;11(6):753-755

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/753.asp>

0 引言

急性坏死性胰腺炎(acute necrotizing pancreatitis, ANP)的发病机制至今仍未完全清楚^[1-5], 研究发现过度激活的中性白细胞对自身组织的损伤是急性胰腺眼导致全

身并发症的重要原因^[6-19]. 我们应用放免法和流式细胞术检测了 IL-6 及整合素家族细胞黏附分子 LFA-1, Mac-1 在 ANP 合并多器官功能损伤的模型中的表达, 以探讨上述炎症递质在 ANP 合并多器官损伤中的作用及其机制.

1 材料和方法

1.1 材料 SD 大鼠雌雄不拘, 质量 250-300 g. 随机分成对照组和 ANP 组, 各 25 只. 模型制作前 12 h 禁食, 自由饮水, 吸入麻醉(氟烷、氧气、笑气)混合吸入, 流量 2 L/min, 诱导成功后麻醉吸入量减半. ANP 模型采用谷俊朝等的方法(中华实验外科杂志 1998;5:395), 上腹正中切口, 长约 3 cm, 显露胰腺, 结扎胰管于十二指肠降部胰管末端开口处, 50 g/L 牛磺胆酸钠 10 ml/Kg 于胰腺被膜下多位点注射(一般取 8-10 个位点), 分层关腹. 对照组仅行开腹手术, 轻轻翻动十二指肠及胰腺后关腹. 牛磺胆酸钠(和光纯药工业株式会社); RaBA-Super 血生化仪; Coulter Epics XL 流式细胞仪; FITC 标记的小鼠抗大鼠 LFA-1 mAb 和 FITC 标记的小鼠抗大鼠 Mac-1 mAb 均购自美国 BD PharMingen 公司; 对照用 FITC 标记的兔抗羊 IgG 抗体及 IL-6 放免试剂盒购自 Sigama 公司.

1.2 方法 模型制作成功后分 1, 3, 6, 12 和 24 h 五个时相点, 每个时相点 5 只动物, 麻醉下剖腹经下腔静脉取血 2 mL, 1 mL 用 20 g/L EDTA 抗凝, 另外 1 mL 行 IL-6 放免检测及血生化检查, 测定血淀粉酶(amyase), BUN, Cr, 并取部分胰腺、肺脏、肾脏经 40 g/L 甲醛固定, 常规石蜡切片行 HE 染色, 观察病理改变. 抗凝血离心(1 500 r/min, 10 min); 取白细胞层, 经溶血素 3 mL 溶血 15 min × 2 次; 离心 1 500 r/min, 10 min × 2 次; 弃上清, 得白细胞加入 PBS 定容至 1 mL; 吹打沉淀, 取白细胞悬液 300 μl, 分别置于 3 个流式细胞仪专用试管, 每管各加 100 μL; 三管分别加入 LFA-1 mAb、Mac-1 mAb 及对照兔抗羊 IgG 抗体 20 μL, 4 °C 避光反应 30 min; 各管加入 4 °C PBS 洗两次, 以清除未结合的抗体, 800 r/min 离心 5 min × 2 次, 弃上清, 加入 4 °C PBS 定容至 1 mL, 置于冰上至上样检测. 调整流式细胞仪的荧光检测变异系数使其稳定在 2 % 左右. 光源为 488 nm 的氩离子激光, FITC 受激发后发出绿色荧光, 启动 Coulter 流式细胞仪专用 Elite 分析软件, 分别测定中性粒细胞前向散射光及侧向散射光, 测定平均荧光密度(mean fluorescence intensity, MFI). IL-6 放射免疫测定严格按照说明书步骤进行.

统计学处理 结果以均值 ± 标准差表示, 应用 Excel 软件行 t 检验.

2 结果

2.1 病理和血清学改变 炎症组各组均有血性腹水, 并随模型制作后时间的延长腹腔内血性腹水量逐渐增多, 胰腺周围有皂化斑形成, 胰腺瘀血呈灰褐色, 镜下见胰

腺呈片状坏死, 红细胞外渗, 有大量白细胞浸润, 腺胞水肿呈岛状. 肺瘀血明显, 镜下见: 肺间质水肿, 肺泡上皮细胞肿胀有些出现坏死, 并伴有白细胞浸润. 肾脏水肿明显, 肾包膜呈灰白色或暗红色, 镜下见肾小管上皮细胞肿胀有的出现坏死, 肾间质有片状出血, 中性粒细胞浸润, 且肾小管内有较多管型; 对照组则无明显病理改变. IL-6 在 ANP 组各时相点表达均明显高于对照组(P < 0.05 或 P < 0.01), 且逐渐升高. ANP 组各时相点的血淀粉酶, BUN, Cr 均明显高于对照组(表 1).

表 1 大鼠血 amyase, BUN, Cr, IL-6 变化($\bar{x} \pm s$)

组别	t/h				
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组 amyase(U/L)	70±6.5	150±11	160±17.5	167±17	171±21
ANP 组 amyase(U/L)	350±12 ^b	680±26 ^b	840±21 ^b	810±33 ^b	780±17 ^b
对照组 BUN(mmol/L)	4.3±0.9	5.7±1	5.5±1.3	6.1±1.5	5.9±1.5
ANP 组 BUN(mmol/L)	7±1.2 ^a	10.5±1.1 ^b	7.1±1.5 ^b	23.8±2.2 ^b	24.5±1.8 ^b
对照组 Cr(μmol/L)	70±5.5	78±4.2	75±4.3	80±6.6	76.5±6.7
ANP 组 Cr(μmol/L)	77±4.9 ^a	120±7.1 ^b	190±5.8 ^b	210±12.5 ^b	225±11.7 ^b
对照组 IL-6(ng/L)	65.6±3.2	68.2±5.5	69.3±2.6	73.4±2.6	76.9±3.3
ANP 组 IL-6(ng/L)	72.4±4.0 ^a	155.3±16.3 ^b	229.2±16.3 ^b	87.7±13.9 ^a	289.5±16.1 ^b

同一时相点比较 ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, vs 对照组.

2.2 白细胞表面 LFA-1, Mac-1 表达 LFA-1 在 ANP 组各时相点表达的 MFI 均明显高于对照组(P < 0.05 或 P < 0.01), LFA-1 在白细胞表面表达 MFI 于模型制作后 6 h 达到最高峰. Mac-1 在 ANP 组各时相点表达的 MFI 明显高于对照组(P < 0.05 或 P < 0.01), Mac-1 在白细胞表面表达 MFI 于模型制作后 3 h 表达即达到最高峰(表 2).

表 2 白细胞表面 LFA-1, Mac-1 表达变化($\bar{x} \pm s$)

组别	t/h				
	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h
对照组 LFA-1 MFI	7.6±0.4	7.9±0.5	13.5±1.8	9.7±0.7	10.1±1.1
ANP 组 LFA-1 MFI	22.7±1.6 ^b	26.7±5.5 ^b	30.3±1.6 ^b	20.3±4.2 ^b	15.9±0.7 ^b
对照组 Mac-1 MFI	6.2±1.1	6.3±0.8	7.9±1.2	6.4±0.4	7.1±0.4
ANP 组 Mac-1 MFI	7.0±2.5 ^a	36±1.5 ^b	27.1±1.4 ^b	22.5±2.1 ^b	20.6±1.6 ^b

同一时相点比较 ^aP < 0.05, ^bP < 0.01, vs 对照组.

3 讨论

ANP 临床过程极为凶险, 死亡率很高^[20-23], 而早期死亡的主要原因多为器官衰竭, 其发病机制仍不是很清楚, 临床上也尚未发现特别有效的疗法. 目前的研究发现一些炎症递质在 ANP 合并多器官功能损伤时起重要作用^[24-27]. 由于多种炎症递质的共同作用, 导致急性胰腺炎从局部病变迅速发展为 ANP, 在胰腺组织大量坏死的同时, 并发全身多个脏器功能障碍^[28,29]. IL-6 就是这些炎症递质中的一种, 他促进 T 淋巴细胞分化增生,

促进急性期反应等作用导致组织损伤.整合素家族细胞黏附分子中LFA-1、Mac-1只表达在白细胞表面,是目前被发现与炎症创伤后白细胞活化关系比较密切的整合素家族细胞黏附分子.近年偶有其在急性胰腺炎中表达研究的报道^[30-34],但对其在胰腺炎合并多器官损伤中的动态研究至今未见报道.

我们发现,IL-6、LFA-1和Mac-1在ANP组各时相点表达均明显高于对照组,三者的表达有明显的一致性.同时ANP各组均出现胰腺、肺脏和肾脏的病理学改变和血液生化学改变.血液生化学改变及病理学改变与IL-6、LFA-1和Mac-1上调表达具有明显的一致性.关于ANP中IL-6与LFA-1、Mac-1的相互关系目前国内外尚未见报道.我们认为IL-6、LFA-1和Mac-1均参与了ANP多器官损伤的过程,白细胞尤其是中性粒细胞被ANP发生后产生大量的前炎症因子如IL-6等所启动激活;导致白细胞在肺、肾、肝等脏器的脉管系统扣押;白细胞开始在上述脏器的脉管系统内皮细胞的表面黏附;黏附在内皮细胞的白细胞释放弹力蛋白酶和氧自由基等毒性物质;此类毒性物质能损伤血管的内皮细胞表面,导致脏器的微血管通透性升高,从而导致脏器的间质水肿.

4 参考文献

- 1 吴伟康.急性胰腺炎的病因、病理.世界华人消化杂志 2001;9:410-411
- 2 贺丽,陈少夫,曹晓辉,张力达,潘丽丽,周卓.急性胰腺炎患者血清IL-15、IL-18和sTNF-1R的变化意义.世界华人消化杂志 2003;11:57-60
- 3 王彩花,钱可大,朱永良,唐训球.急性胰腺炎患者TNF和IL-6变化意义.世界华人消化杂志 2001;9:1434
- 4 夏时海,赵晓晏,郭萍,达四平.犬重症急性胰腺血循环障碍及血小板活化因子拮抗剂的干预.世界华人消化杂志 2001;9:550-554
- 5 李云,钱家勤,秦仁义,申铭.急性胰腺炎患者的免疫功能变化.世界华人消化杂志 2000;8:923-924
- 6 陈浩,李非,程韵枫,孙家邦.大鼠重症急性胰腺炎病情演变中中性白细胞的作用.世界华人消化杂志 2001;9:776-779
- 7 de Dios I, Perez M, de la Mano A, Sevillano S, Orfao A, Ramudo L, Manso MA. Contribution of circulating leukocytes to cytokine production in pancreatic duct obstruction-induced acute pancreatitis in rats. *Cytokine* 2002;20:295-303
- 8 Descamps FJ, Van den Steen PE, Martens E, Ballaux F, Geboes K, Opdenakker G. Gelatinase B is diabetogenic in acute and chronic pancreatitis by cleaving insulin. *FASEB J* 2003;17:887-889
- 9 Ammori BJ. Role of the gut in the course of severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2003;26:122-129
- 10 Shields CJ, Sookhai S, Winter DC, Dowdall JF, Kingston G, Parfrey N, Wang JH, Kirwan WO, Redmond HP. Attenuation of pancreatitis-induced pulmonary injury by aerosolized hypertonic saline. *Surg Infect* 2001;2:215-224
- 11 Demols A, Deviere J. New frontiers in the pharmacological prevention of post-ERCP pancreatitis: the cytokines. *JOP* 2003;4:49-57
- 12 Zhao H, Chen JW, Zhou YK, Zhou XF, Li PY. Influence of platelet activating factor on expression of adhesion molecules in experimental pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2003;9:338-341
- 13 Zhou Z, Chen Y, Yu Y, Chen H. Hemorheology and expression of neutrophil adhesion molecules CD18 and CD62L in pancreatic microcirculation of Caerulein induced experimental acute pancreatitis. *Zhonghua Yufang Yixue Zazhi* 2002;36:528-530
- 14 Shields CJ, Winter DC, Redmond HP. Lung injury in acute pancreatitis: mechanisms, prevention, and therapy. *Curr Opin Crit Care* 2002;8:158-163
- 15 Song AM, Bhagat L, Singh VP, Van Acker GG, Steer ML, Saluja AK. Inhibition of cyclooxygenase-2 ameliorates the severity of pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:G1166-1174
- 16 Brady M, Bhatia M, Christmas S, Boyd MT, Neoptolemos JP, Slavin J. Expression of the chemokines MCP-1/JE and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in early acute pancreatitis. *Pancreas* 2002;25:260-269
- 17 Clemons AP, Holstein DM, Galli A, Saunders C. Cerulein-induced acute pancreatitis in the rat is significantly ameliorated by treatment with MEK1/2 inhibitors U0126 and PD98059. *Pancreas* 2002;25:251-259
- 18 Hartwig W, Carter EA, Jimenez RE, Jones R, Fischman AJ, Fernandez-Del Castillo C, Warshaw AL. Neutrophil metabolic activity but not neutrophil sequestration reflects the development of pancreatitis-associated lung injury. *Crit Care Med* 2002;30:2075-2082
- 19 Mikami Y, Takeda K, Shibuya K, Qiu-Feng H, Egawa S, Sunamura M, Matsuno S. Peritoneal inflammatory cells in acute pancreatitis: Relationship of infiltration dynamics and cytokine production with severity of illness. *Surgery* 2002;132:86-92
- 20 Yousaf M, McCallion K, Diamond T. Management of severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 2003;90:407-420
- 21 Hartwig W, Werner J, Muller CA, Uhl W, Buchler MW. Surgical management of severe pancreatitis including sterile necrosis. *J Hepatobil Pancreat Surg* 2002;9:429-435
- 22 Hartwig W, Werner J, Uhl W, Buchler MW. Management of infection in acute pancreatitis. *J Hepatobil Pancreat Surg* 2002;9:423-428
- 23 Abu-Zidan FM, Windsor JA. Lexipafant and acute pancreatitis: a critical appraisal of the clinical trials. *Eur J Surg* 2002;168:215-219
- 24 Makhija R, Kingsnorth AN. Cytokine storm in acute pancreatitis. *J Hepatobil Pancreat Surg* 2002;9:401-410
- 25 Keck T, Balcom JH 4th, Fernandez-del Castillo C, Antoniu BA, Warshaw AL. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil migration and alveolar capillary leakage in pancreatitis-associated lung injury in the rat. *Gastroenterology* 2002;122:188-201
- 26 Shimada M, Andoh A, Hata K, Tasaki K, Araki Y, Fujiyama Y, Bamba T. IL-6 secretion by human pancreatic periacinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators. *J Immunol* 2002;168:861-868
- 27 Rau B, Baumgart K, Paszkowski AS, Mayer JM, Beger HG. Clinical relevance of caspase-1 activated cytokines in acute pancreatitis: high correlation of serum interleukin-18 with pancreatic necrosis and systemic complications. *Crit Care Med* 2001;29:1556-1562
- 28 Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary permeability, and improved survival rates. *Surgery* 2000;128:399-407
- 29 Lundberg AH, Granger DN, Russell J, Sabek O, Henry J, Gaber L, Kotb M, Gaber AO. Quantitative measurement of P- and E-selectin adhesion molecules in acute pancreatitis: correlation with distant organ injury. *Ann Surg* 2000;231:213-222
- 30 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
- 31 Kylanpaa-Back ML, Takala A, Kempainen E, Puolakkainen P, Kautiainen H, Jansson SE, Haapiainen R, Repo H. Cellular markers of systemic inflammation and immune suppression in patients with organ failure due to severe acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:1100-1107
- 32 Hatano N, Sugiyama M, Watanabe T, Atomi Y. Opsonin receptor expression on peritoneal exudative and circulatory neutrophils in murine acute pancreatitis. *Pancreas* 2001;23:55-61
- 33 Mann DV, Kalu P, Foulds S, Edwards R, Glazer G. Neutrophil activation and hyperamylasaemia after endoscopic retrograde cholangiopancreatography: potential role for the leukocyte in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Endoscopy* 2001;33:448-453
- 34 Hartwig W, Jimenez RE, Fernandez-del Castillo C, Kelliher A, Jones R, Warshaw AL. Expression of the adhesion molecules Mac-1 and L-selectin on neutrophils in acute pancreatitis is protease- and complement-dependent. *Ann Surg* 2001;233:371-378

老年消化道多原发癌的早期诊断及综合治疗

蔡昌豪,吴本俨,吴道宏,邵勇,王孟薇

蔡昌豪,吴本俨,吴道宏,邵勇,王孟薇,中国人民解放军解放军总医院老年消化科 北京市 100853

蔡昌豪,男,1955-03-21生,辽宁省辽阳市人,汉族。1982年白求恩医科大学毕业,副主任医师、副教授。主要从事消化系统疾病及消化系统肿瘤早期诊断、治疗临床研究。

项目负责人:蔡昌豪,100853,北京市复兴路28号,中国人民解放军总医院老年消化科。chchai1960@sina.com.cn

电话:010-66939413

收稿日期:2002-12-05 接受日期:2002-12-22

Early diagnosis and treatment of multiple primary malignant tumors in gastrointestinal tract in the elderly

Chang-Hao Cai, Ben-Yan Wu, Dao-Hong Wu, Yong Shao, Meng-Wei Wang

Chang-Hao Cai, Ben-Yan Wu, Dao-Hong Wu, Yong Shao, Meng-Wei Wang, Department of Geriatric Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Correspondence to: Dr.Chang-Hao Cai, Department of Geriatric Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China. chchai1960@sina.com.cn

Received:2002-12-05 Accepted:2002-12-22

Abstract

AIM:To explore and investigate the experience of early diagnosis and treatment with multiple primary malignant tumors in the elderly.

METHODS:Fifty-nine cases of PMPTs patients admitted to our hospital in the period of 1980 to 2002 were studied retrospectively, including early diagnosis, the 5-and 10-year survival rates in first and second cancer after endoscopic mucosal resection, resection and radiotherapy, the interval time between sequential tumors and proper treatment.

RESULTS:Eleven (19 %)patients had synchronous tumors and 48 (81 %) patients had metachronous tumors, of these, double cancer, triple cancer in the gastrointestinal tract were 26 cases and 7 cases, respectively. Early diagnosis in patients with PMPT in double and triple primary cancers in gastrointestinal tract were 58 % and 38 % respectively. The interval time between the cancers varied between 6 months and 21 years. The median interval time was 48 months, and that between second and third was 60 months. The 5 year survival rates from the date of the treatment of the first cancer were 75 %(9/12), for those who had endoscopic mucosal resection, and 67 %(14/21), for those who received radical operation and 64 %(7/11), for radiotherapy respectively. The 10 year survival rates were 41 %(5/12) 38 %(8/21) 27 %(3/11) respectively.

CONCLUSION:Early diagnosis of MPT elevated 5-year survival rates. Endoscopic treatment was recommended for early

stage carcinomas of the gastrointestinal tract in the elderly.

Cai CH, Wu BY, Wu DH, Shao Y, Wang MW. Early diagnosis and treatment of multiple primary malignant tumors in gastrointestinal tract in the elderly. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(6):756-758

摘要

目的:探讨老年人消化道多原发癌早期诊断及综合治疗经验。

方法:回顾分析1980-2002年收治的59例老年消化道恶性肿瘤的多原发癌早期诊断、肿瘤的间隔时间及内镜、手术、放射治疗的5、10 a生存率。

结果:同时癌11例,异时癌48例。首癌至次癌中位间隔48 mo,次癌至第三癌中位间隔时间60 mo。双原发、三原发癌早期诊断分别为58 %、38 %。内镜治疗12例,手术治疗21例,放射治疗11例,5 a生存率分别为75 %、67 %、64 %。10 a生存率分别为41 %、38 %、27 %。内镜治疗中位生存104 mo,取得了与手术治疗中位生存109 mo相同的远期效果。

结论:早期多原发癌适当治疗可以提高病患的5 a生存率,内镜治疗早期消化道肿瘤值得推荐。

蔡昌豪,吴本俨,吴道宏,邵勇,王孟薇. 老年消化道多原发癌的早期诊断及综合治疗. *世界华人消化杂志* 2003;11(6):756-758

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/756.asp>

0 引言

老年人多原发恶性肿瘤不多^[1-7],而早期诊断者更少^[8]。早期治疗多个肿瘤预后不比单个肿瘤差^[9-11]。由于老年人多伴有重要脏器疾病,即使诊断肿瘤,往往因心脑血管疾病而失去手术机会。因而近几年内镜治疗消化道肿瘤屡见报告^[12-16],但5、10 a生存资料尚少^[17-20]。我们1980/2002-11诊断以消化道肿瘤为主的多原发癌59例,双重癌43例,3重癌16例;双重消化道癌26例,3重消化道癌7例。并经内镜治疗12例,手术治疗21例,放疗11例,其5 a生存率分别为75 %、67 %、64 %。10 a生存率分别为41 %、38 %、27 %。内镜治疗中位生存104 mo,取得了与手术治疗中位生存109 mo相同的远期效果。19例健在。现将早期诊断及综合治疗结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 共收治消化道肿瘤的多原发癌59例,男57例,女2例,年龄61-89岁。首癌中位年龄72岁;次癌中位年龄76岁;三癌中位年龄79岁。

1.2 方法 经肿瘤标志物、腹部超声(BUS)、胃肠镜、CT、MRI 检查发现肿瘤, 均经病理证实. 44 例经手术、内镜、放射治疗, 其余 15 例经内科治疗. 对治疗后生存时间进行随访. 计算次癌、末癌 5 a 生存率、10 a 生存率, 末癌生存时间、首癌至终点总生存时间.

统计学处理 生存时间的比较应用 t 检验, 非参数检验, Kaplan-Meier 生存曲线表示, 以 $P < 0.05$ 为差异显著性界限.

2 结果

2.1 肿瘤分布 首癌消化道癌 48 例, 次癌 35 例, 三癌 7 例. 双重癌 43 例, 3 重癌 16 例. 消化道双重癌、三重癌分别为 26 例(26/43, 60 %)、7 例(7/16, 44 %). 合并其他系统肿瘤首位是肺癌 13 例, 前列腺癌 11 例列第 2 位. 全组同时癌 11 例, 异时癌 48 例(双重癌 35 例, 3 重癌 13 例). 异时癌间隔 6-252 mo, 中位数 48 mo, 间隔 5 a 以上 20 例, 10 a 以上 8 例, 15 a 以上 3 例. 次癌至三癌间隔时间中位数为 60 mo. 肿瘤分布见表 1.

表1 多发肿瘤器官分布

	消化道癌	肺癌	肝癌	前列腺癌	血液系统	喉癌	唇癌	其他癌
首癌	48	3	-	3	1	1	1	2
次癌	35	8	2	7	3	1	-	3
三癌	7	2	2	1	1	-	-	3
总计	90	13	4	11	5	2	1	8

2.2 早期癌 消化管癌首癌早期诊断 36 例(36/48, 75 %) 次癌早期 23 例(23/35, 66 %), 第三癌消化系 11 例, 7 例为早期癌; 双早期癌 25 例, 首癌早期次癌进展期 11 例, 次癌早期首癌进展期 15 例, 双进展期癌 8 例.

2.3 生存时间 早期癌(双早或含 1 个早癌)与双进展期癌的 Kaplan-Meier 生存曲线见图 1, 生存分布之间具有显著性差异(* $P = 0.002$).

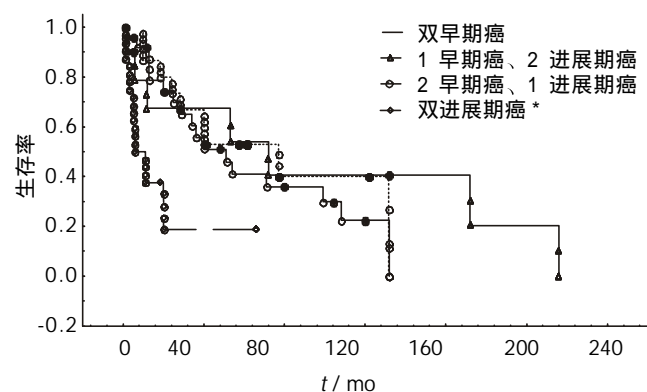


图1 Kaplan-Meier 生存曲线示意图 * $P = 0.002$.

同时癌 5 a 生存 4 例, 5 a 生存率 36 %. 本组 48 例异时癌首癌、次癌 5 a、10 a 生存率见表 2.

表2 异时癌首癌、次癌 5、10 a 生存

	双重癌(n=35)	三重癌(n=13)	次癌(n=35)
5 a	25(71)	10(77)	19(54)
10 a	15(43)	6(46)	7(20)

2.4 治疗 内镜治疗 12 例, 手术治疗 21 例, 放疗 11 例, 中位生存时间分别为 104, 109, 68 mo, 3 组间生存时间无显著性差异($P = 0.89956$).

3 讨论

诊断标准多发癌符合 Warren 提出的诊断标准, 即: (1) 每一肿瘤都是恶性肿瘤; (2) 每一肿瘤有各自的病理形态; (3) 排除彼此互为转移的可能性. 两癌相隔小于 6 mo 的称同时癌, 大于 6 mo 的称异时癌. 患两个以上癌的称双重癌或多重癌. 胃肠道多原发癌发病率 5.1-8 %^[21-24], 合并其他系统癌发病率可达 9.5-13.5 %^[25,26]. 可见消化道多发癌不少见.

消化道多重癌, 发生在消化道癌之后 48 例, 发生在前 11 例. 消化道双重癌 26 例(26/43, 60 %), 消化道三重癌 7 例(7/16, 44 %). 文献[3,20,23]报告多原发癌按系统分, 消化道列第一位. 文献报告高龄男性前列腺癌发病率可达 50 % 以上. 因此消化道癌后, 注意肺部、前列腺的检查, 有助于早期多发癌的检出. 消化道第一癌早期诊断 36 例(36/48, 75 %), 次癌早期诊断 23 例(23/35, 66 %), 第三癌消化系癌 11 例, 7 例为早期癌; 双早期癌 25 例, 首癌早期次癌进展期 11 例, 次癌早期首癌进展期 15 例, 双进展期癌 8 例. 双早期癌诊断率 58 % (25/43), 三重癌早期诊断率 38 % (6/16), 高于单发胃癌的早期诊断率. 肿瘤术前检查不全面, 同时癌术前容易漏诊^[6,27]. 本组有 2 例术前诊断单个胃癌, 手术切除标本中均发现第二个病灶. 1 例大肠癌患者直肠肿瘤致肠腔狭窄, 未进行狭窄以上肠道检查, 手术后发现横结肠还存在另外 1 个肿瘤. 因此, 认真术前肠镜检查、术后随访对发现大肠癌复发和异时多原发癌重要^[6,21].

本组 12 例(6 例胃癌, 5 例大肠癌, 1 例膀胱癌)内镜(钳除、黏膜剥脱、电凝)治疗, 其中 3 例双癌均经内镜治疗, 另 9 例首癌手术切除, 次癌内镜治疗. 选择内镜治疗是因为患者年高身体状况不能耐受手术或因患者本人不接受手术治疗. 6 例胃癌 1 例无癌生存 8 a, 现健在. 其余 5 例有癌残留, 其中 1 例 2 a 后手术切除, 仍为早癌, 另 4 例 2 例带癌存活 2 例死于本病. 5 例大肠癌, 1 例同时镜下钳除 2 个癌灶, 无病生存 99 mo; 另 4 例电凝治疗, 无病至终点. 1 例膀胱癌镜下电凝 1 次无病生存 132 mo, 仍健在. 内镜治疗 12 例中位生存 104 mo, 5 a 生存率 75 % (9/12), 10 a 生存率 41 % (5/12); 手术治疗双癌/三重癌 21 例, 中位生存 109 mo, 5 a 生存率 67 % (14/21), 10 a 生存率 38 % (8/21). 放射治疗 11 例, 双癌均接受放疗的有 4 例, 另 7 例首癌经手术切除, 次癌放疗, 接受放疗的均非消化管肿瘤, 中位生存 68 mo, 5 a 生存率

64 %(7/11), 10 a生存率 27 %(3/11). 三种疗法治疗结果生存时间无显著性差异($P=0.89\ 956$), 与文献报告相符^[14,28,29]. 随访双原发异时癌 35 例, 首癌后 5 a生存 71 %(25/35), 10 a生存率 43 %(15/35), 3 原发癌 5 a生存率 77 %(10/13), 10 a以上 46 %(6/13). 同时癌 11 例, 首癌后 5 a生存率 36 %(4/11). 异时癌 5 a生存高于文献 51-60 %的报告^[11,30], 接近单发大肠癌、肺癌手术后 5 a生存率 70 %的水平^[22,31]. 但本组同时癌 5 a生存明显低于异时癌, 说明同时癌预后不佳. 次癌 5 a随访 39 例, 5 a生存率 49 %(19/39), 10 a 8 例(8/39, 21 %); 第三癌后 4 a 5 例(5/16, 31 %). 全组 19 例健在, 双原发癌 14 例, 3 原发癌 5 例, 末癌中位生存时间前者 106.5 mo, 后者 118.2 mo. 高于文献^[18,32,33] 24-83 mo 的报告.

4 参考文献

- Kaneki T, Koizumi T, Kawashima A, Tsushima K, Kubo K, Fujimoto K, Honda T, Akamatsu T. Double cancer (lung and colon cancer) that showed complete remission with irinotecan and cisplatin combined chemotherapy. *J Gastroenterol* 2000; 35:864-869
- Eriguchi N, Aoyagi S, Hara M, Okuda K, Tamae T, Fukuda S, Hashino K, Sato S, Fujiki K, Furukawa S, Jimi A. Synchronous or metachronous double cancers of the pancreas and other organs: report on 12 cases. *Surg Today* 2000;30:718-721
- Arai T, Sawabe M, Takubo K, Kanazawa K, Esaki Y. Multiple colorectal cancers in the elderly: a retrospective study of both surgical and autopsy cases. *J Gastroenterol* 2001;36:748-752
- Onoue S, Katoh T, Chigira H, Matsuo K, Suzuki M, Shibata Y, Maeda M. Synchronous multiple primary cancers of the stomach and duodenum in aged patients: report of two cases. *Surg Today* 2000;30:735-738
- Chen JH, Chen CC, Tzeng LM, Tsay SH, Chiang JH, Lu CC, Chang FY, Lee SD. Resection of triple synchronous tumors-gastric adenocarcinoma, gallbladder adenocarcinoma and stromal tumor of the stomach. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2001; 64:655-660
- Chen HS, Sheen-Chen SM. Synchronous and "early" metachronous colorectal adenocarcinoma: analysis of prognosis and current trends. *Dis Colon Rectum* 2000;43:1093-1099
- Iwamura T, Shibata N, Haraguchi Y, Hisashi Y, Nishikawa T, Yamada H, Hayashi T, Toyoda K. Synchronous double cancer of the stomach and rectum with situs inversus totalis and polysplenia syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:148-153
- Shimizu Y, Tukagoshi H, Fujita M, Hosokawa M, Kato M, Asaka M. Endoscopic screening for early esophageal cancer by iodine staining in patients with other current or prior primary cancers. *Gastrointest Endosc* 2001;53:1-5
- Cai CH, Wang MW. A clinicopathological analysis of 22 cases of multiple malignant tumors. *Chin Med Sci J* 2002;17:124-126
- 张东, 张进川, 李文兵. 14 例老年多原发肺癌临床分析. 军医进修学院学报 2002;23:176-178
- Kumagai Y, Kawano T, Nakajima Y, Nagai K, Inoue H, Nara S, Iwai T. Multiple primary cancers associated with esophageal carcinoma. *Surg Today* 2001;31:87287-87286
- Ando N, Niwa Y, Ohmiya N, Ito B, Sasaki Y, Goto H. Simultaneous multiple early cancers of esophagus and stomach treated by endoscopic mucosal resection. *Endoscopy* 2002; 34:667-669
- Lambert R. Endoscopic treatment of esophagogastric tumors. *Endoscopy* 1998;30:80-93
- Giovannini M, Bernardini D, Moutardier V, Monges G, Houvenaeghel G, Seitz JF, Derlpero JR. Endoscopic mucosal resection(EMR): results and prognostic factors in 21 patients. *Endoscopy* 1999;31:698-701
- Kato H, Haga S, Endo S, Hashimoto M, Katsube T, Oi I, Aiba M, Kajiura T. Lifting of lesions during endoscopic mucosal resection(EMR) of early colorectal cancer: implications for the assessment of resectability. *Endoscopy* 2001;33:568-573
- Sadahiro S, Ishida H, Tokunaga N, Mukai M, Tajima T, Makuuchi H, Miyagawa M. Experimental assessment of endoscopic mucosectomy with a cap-fitted panendoscopy. *Endoscopy* 1998;30:713-717
- van-Etten B, van-der-Sijp J, Kruij R, Oudkerk M, van-der-Holt B, Wiggers T. Ferumoxide-enhanced magnetic resonance imaging techniques in pre-operative assessment for colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2002;28:645-651
- Ullah R, Bailie N, Kinsella J, Anikin V, Primrose WJ, Brooker DS. Pharyngo-laryngo-oesophagectomy and gastric pull-up for post-cricoid and cervical oesophageal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol* 2002;116:826-830
- Suzuki T, Takahashi H, Yao K, Inagi K, Nakayama M, Makoshi T, Nagai H, Okamoto M. Multiple primary malignancies in the head and neck: a clinical review of 121 patients. *Acta Otolaryngol Suppl* 2002;547:88-92
- Kagei K, Hosokawa M, Shirato H, Kusumi T, Shimizu Y, Watanabe A, Ueda M. Efficacy of intense screening and treatment for synchronous second primary cancers in patients with esophageal cancer. *Jpn J Clin Oncol* 2002;32:120-127
- Tomoda H, Taketomi A, Baba H, Kohnoe S, Seo Y, Saito T. Multiple primary colorectal and gastric carcinoma in Japan. *Oncol Rep* 1998;5:147-149
- 汤钊猷. 现代肿瘤学. 第 2 版. 上海:上海医科大学出版社, 2000: F877
- 王成峰, 邵永孚, 张海增, 兰忠民. 多原发恶性肿瘤. 中国肿瘤临床 2000;27:439-442
- Dinis-Ribeiro M, Lomba-Viana H, Silva R, Moreira-Dias L, Lomba-Viana R. Associated primary tumors in patients with gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 2002;34:533-535
- Poon RT, Law SY, Chu KM, Branicki FJ, Wong J. Multiple primary cancers in esophageal squamous cell carcinoma: incidence and implications. *Ann Thorac Surg* 1998;65:1529-1534
- Nagasawa S, Onda M, Sasajima K, Takubo K, Miyashita M. Multiple primary malignant neoplasms in patients with esophageal cancer. *Dis Esophagus* 2000;13:226-230
- Koide N, Hanazaki K, Fujimori Y, Igarashi J, Kajikawa S, Adachi W, Amano J. Synchronous gastric cancer associated with esophageal cancer: a retrospective study of twenty-four patients. *Am J Gastroenterol* 1998;93:758-762
- Shim CS. Endoscopic mucosal resection: an overview of the value of different techniques. *Endoscopy* 2001;33:271-275
- Inoue H, Tani M, Nagai K, Kawano T, Takeshita K, Endo M, Iwai T. Treatment of esophageal and gastric tumors. *Endoscopy* 1999;31:47-55
- Okada M, Tsubota N, Yoshimura M, Miyamoto Y. Operative approach for multiple primary lung carcinomas. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:836-840
- 汤钊猷. 现代肿瘤学. 第 2 版. 上海:上海医科大学出版社, 2000:809
- Wind P, Rouillet MH, Quinaux D, Laccoureye O, Brasnu D, Cugnenc PH. Long-term results after esophagectomy for squamous cell carcinoma of the esophagus associated with head and neck cancer. *Am J Surg* 1999;178:251-255
- Takubo K, Nakamura K, Sawabe M, Arai T, Esaki Y, Miyashita M, Mafune K, Tanaka Y, Sasajima K. Primary undifferentiated small cell carcinoma of the esophagus. *Hum Pathol* 1999;30: 216-221

进一步深化慢性乙型肝炎诊断治疗的实用性研究

李梦东, 聂青和

李梦东, 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
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: 李梦东, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街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.
电话: 023-68754007
收稿日期: 2002-12-10 接受日期: 2002-12-20

李梦东, 聂青和. 进一步深化慢性乙型肝炎诊断治疗的实用性研究. 世界华人消化杂志 2003;11(6):760-762

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/760.asp>

0 引言

病毒性肝炎是世界性常见病、多发病, 我国是乙型肝炎的高流行区, 全世界的慢性乙型肝炎患者我国占50%以上, 其发展过程充分反映出医学科学工作者坚忍不拔、锲而不舍的精神和实事求是的科学态度. 当前慢性乙型病毒性肝炎有几个值得关注的问题提出来和同道商讨.

1 乙型肝炎病毒(HBV)的变异是无止境的

有文献指出所有的病毒分离物都是病毒株的混合, 在一个宿主身上可以发现多种病毒变异株, 这种情况在RNA病毒及逆转录病毒特别明显. 因为当RNA复制或逆转录时缺乏较正确(proof-reading enzyme), 核苷酸的错误植入频率平均是1 000-10万核苷酸中有一个点取代、缺失或插入. 在逆转录病毒复制一个周期的子代中大约有50%会发生某种突变.

所谓野生型指的是可以传播, 并且在多种宿主均很稳定的病毒. 但是所有分离株均会有一些分子水平上的变异, 这可称为变异株分为两类: 第一类变异指的是在—群感染宿主中已经存在有自然进化的病毒, 具体表现在基因型及亚型. HBV全序列测定, 基因型间核苷酸序列的差异是8%. 由于S基因序列的变化和全序列的变化一致, 因此根据S基因序列即可分型, 其界限是核苷酸序列的差异是4.2%. 基因型改变而并不改变其抗原性, 但与抗原亚型之间似有某些联系, 基因型更像是不同地理区域的宿主在免疫选择性压力下自然进化的结果. 基因型及亚型的临床意义及其重要性迄今仍难下定论^[1].

第二类变异指的是受特异性抗体、疫苗接种以及抗病毒治疗的压力而发生的变异. 当变异株各成员之间差别不超过核苷酸总长度的2-5%时, 这种差别不至于构成病原体的基因型或血清型发生改变, 可将这种变异株称为准种(quasispecies或Swarm). 可以认为准种是所有微生物逃避攻击的一个普遍现象, 并且有可能进

一步被筛选成为优势株.

在丙型肝炎病毒(HCV)感染者血浆及肝脏内任何时候都可以发现HCV的多种变异体. 因此任何一个HCV感染者都存在有准种, 与HCV的基因序列密切相关而又不完全相同^[2]. 例如在近期感染者的血液中, 从病毒RNA产生的cDNA克隆中的近85%可能表明是独特的基因变异株. 发现有HCV的准种的同时, 也提到HBV有准种存在, 近来国内也已开始注意HBV、HCV的准种现象. 从理论上讲准种的出现, 可能不再被Th、CTL或特异性抗体所识别, 而成为持续性感染的病因.

当前研究者对于HCV易于变异及其易变部位已比较明确. 关于HBV的变异近十多年来的研究颇多, 研究资料比较集中在关于前C区及S基因区的变异.

1989年Carman et al^[3]首次在乙型肝炎患者中证实, HBsAg、抗-HBe及HBV DNA均持续阳性而HBeAg阴性的患者在前C区末端出现在1 896、1 899 nt(均由A替代G)和1 909 nt(由T替代C)的点突变, 并在1896nt处使原来编码色氨酸的前C区第28个密码子(TGG)转变为翻译终止密码子(ATG), 因而前C蛋白的翻译中断, HBeAg不能产生. 目前一般将这种突变称为A1 896型.

HBV前C区突变株可与野生株同时并存或混合感染. 说明一个病毒家族引起感染者可能有多个成员, 这些变异株能够一起传播, 然后以不同的速度独立复制, 直到有一个优势株出现, 或者借随机突变之后, 在选择作用及传播作用影响下出现优势株, 这一普遍概念在HBV感染中已经得到证实. 野生型HBV感染者中, HBeAg每年自发性转为抗-HBe者约10-20%, 抗-HBe阳性者不一定是突变株HBV感染; 同是突变株感染者的临床表现仍相差悬殊. 关于前C基因变异与临床意义的研究结果并不一致, 抗-HBe阳性者可以是无临床表现的慢性HBsAg携带者, 也可以是严重的慢性肝炎及肝硬化^[4]. 一些病例在转变为抗-HBe阳性后, 肝脏病变仍持续存在, 另一些患者虽抗-HBe呈阳性, 但肝脏炎症仍可缓解, 此点已得到我国学者的支持.

有报道HBV突变株可发生在干扰素治疗之后, 8例HBV野生型慢性感染者, IFN治疗1-5 mo之后, 3例出现前C区和前S区突变株, 可能与宿主免疫压力及治疗影响有关. 关于前S/S基因区的变异同样受到研究者的重视, 国内学者已经注意到此种变异的重要意义, 并进行了较深入的研究.

HBsAg含有的多肽约占据HBV基因组的1/3以上. 这些氨基酸是高度保守的, 抗原性位点主要在半胱氨酸124/137及139/147之间, 特异性抗体对aa139到147的亲合性更强. HBV感染或免疫接种后的抗HBs主要能识别的位点为主要亲水区(major hydrophilic region, MHR). 表面抗原的“a”决定簇为各种亚型所共有, 次决定簇恰在此区. 因此, 目前公认sG145R变异株(精氨酸取代甘氨酸, 国际上习惯称为sR145)的临床意义较大.

当前对 HBV 感染者母亲所生婴儿主张用特异性高价免疫球蛋白及乙肝疫苗(HBIG/HBsAg)被动加主动免疫,但仍会有2-3%的婴儿出现HBV感染.序列分析证明,这种感染主要是突变株引起,可以逃避免疫攻击.这种突变株主要是sR145.

当肝病终末期患者进行肝移植,并用人类抗-HBs或高效价乙肝免疫球蛋白治疗以防止移植物再次感染时,有些病例HBsAg仍为阳性.6例此类患者中有3例呈现HBV在移植物内再次被激活,病毒表面基因测序表明sR145单独感染者1例,第二例除有sR145感染外还有其他突变混合如sT140S(丝取代苏)及sC124Y(取代半胱)或为此例患者的准种;第三例患者为sC137Y(取代半胱).HBIG以及抗-HBs能导致HBV选择性压力,主要能形成sR145突变株已逐渐得到公认.国内不少学者对此问题均有丰富的研究及讨论.HBV表面抗原及其亚型的变异;变异株的单独感染或混合感染,不仅会造成疫苗接种主动免疫及特异性抗体被动免疫预防的失败,这也是市售常规试剂漏检的重要原因.

干扰素治疗的压力除可引起前C区A1896的突变外,也可引起HBsAg/抗-HBs血清转换时出现变异株,这可能是病毒的庇护所.已证明此种突变株也可出现在aa142处为sP142S(丝氨酸取代脯氨酸).此类患者已清除HBeAg及HBsAg,但HBV-DNA仍为阳性伴ALT升高.干扰素治疗后也可出现前S1的缺失,即aa21到47区,一般认为此区是负责HBV与肝细胞接触的受体部位,此区的缺失会影响到HBsAg产量减少.看来干扰素治疗对HBV的压力似乎主要集中在前C/C区及前S区.

拉咪呋啶治疗慢性乙型肝炎,HBV的变异多发生在HBV逆转录酶的活性最强部位,即高度保守的546-575位氨基酸区段中的落氨酸(Y)-蛋氨酸(M)-天冬氨酸(D)-天冬氨酸(D)位点,称为YMDD变异并不妥当,因为552位M被V(缬氨酸)取代而形成YVDD或M被I(异亮氨酸)取代而形成YIDD,二者可单独存在,M552V亦可与YMDD上游23个氨基酸处形成的L528M(在528位上亮氨酸被蛋氨酸取代)合并存在.一般认为这种变异与出现耐药性有关.亚洲的慢性乙型肝炎经拉咪呋啶治疗1a后出现变异者为15%,其中11%(31/295)为野生株与变异株混合感染,其余4%(12/295)为单纯变异株感染.用药2a变异率可达38%,治疗4a的变异率达67%.国内的研究结果与此相似.说明拉咪呋啶的治疗压力可能集中在多聚酶的活性区^[6].

其他尚有P基因区的变异,可能阻止HBV的复制,X基因区的变异则可影响HBxAg的表达,启动子(promoter)、增强子(enhancer)的变异也是很诱人的研究课题,并认为可能与临床有关,这些部位变异的研究资料尚不充分.

2 目前的抗病毒治疗仍不理想

自从1976年报告干扰素 α (IFN- α)对慢性乙型肝炎有

较好治疗效果以来,目前应用已较广泛,所用制剂虽然各不相同,但效果近似.国外的报告干扰素5-10 MU/d或3次/wk,疗程4-6 mo,其疗效大约是30-40%,主要表现为HBeAg的消失,随后出现抗-HBe的血清学转换,可能使HBsAg消失者约为7.8%,对照组为1.8%.国内的报告一般认为5 MU/d者优于3 MU/d \times 4 wk者,以后3次/wk \times 20 wk,疗程6 mo,随访1a疗效主要表现为病情好转.HBeAg转阴者达62.7%,出现抗-HBe者达59.3%,HBV-DNA转阴者57.6%,HBsAg转阴者1.7%.

自1993年使用拉咪呋啶治疗慢性HBV感染以来,已取得一定疗效.美国FDA于1998年正式批准后已广泛应用于临床,治疗前肝炎活动程度明显者疗效较好,口服100 mg/d,血清ALT水平 $>$ 正常上限1倍或2倍者治疗1a,HBeAg血清转换率可达17-21%.治疗2a HBeAg血清转换率可达27-38%,治疗3a达40-53%,HBV DNA下降,临床病情好转.国内对429例患者的治疗观察,其中304例完成3a的治疗,其效果与上述结果相似,ALT复常率达68%,YMDD区出现变异者达71%^[6].国内近期报告用拉咪呋啶治疗慢性乙型肝炎肝硬化失代偿患者89例,血清HBV DNA均阴性;治疗组49例,其中HBeAg阳性29例,阴性20例;对照组40例,其中HBeAg阳性21例,阴性19例.持续服药52 wk.治疗组HBV DNA阴转率55.81%(24/43例),对照组阴转率5.26%(2/38例)($P<0.01$).治疗组ALT复常率为67.57%(25/37例),对照组为43.48%(10/23例)($P\geq 0.05$).国内学者用拉咪呋啶治疗慢性重型乙型病毒性肝炎20例(对照20例),拉咪呋啶150 mg/d,口服2 wk后改为100 mg/d.随访观察1a以上者11例,6 mo者4例.治疗2 wk后临床表现好转,疗程中治疗组死亡者1例(5%),对照组死亡者8例(40%).治疗组存活者肝功能维持正常,HBV DNA持续阴性,仍在继续治疗中.从上述结果来看,干扰素治疗虽要求HBsAg阴转,但达到阴转的比例甚低.干扰素与拉咪呋啶的近期与远期临床效果大体上看来是近似的.很难得的是拉咪呋啶可用于治疗慢性乙型重型肝炎及肝硬化,并收到较好的效果.

国内近期报告用磷甲酸钠3 g静滴,2次/d,疗程15 d.治疗慢性乙型肝炎47例(对照组20例),肝功能较对照组有好转,42例HBV DNA水平下降,2例HBeAg阴转(对照组1例阴转).用单磷酸阿糖腺苷5-10 mg/(Kg \cdot d)静滴,疗程28 d,治疗结束时HBeAg及HBV DNA阴转率分别为43.5%(166/382)及41.5%(132/318例),联合胸腺肽治疗28例,治疗结束后2a随访HBeAg及HBV DNA阴转率分别为42.8%及44.3%,干扰素对照组(3 MU/d)分别为50.0%及53.1%($P>0.05$).国内近期报告用苦参素治疗慢性乙型肝炎的效果,治疗2 mo时ALT复常率与硫普罗宁治疗对照组无显著差别,但停药后随访6 mo ALT复常率为53.3-58.3%之间,显著高于硫普罗宁组.HBeAg阴转率苦参素组为30-40.9%,高于对照

组的16.7%。HBV DNA阴转率苦参素静滴组和肌注组在治疗2 mo时,分别为42%和32.7%,均优于苦参素口服组和对照组。即使用左旋咪唑涂布治疗慢性乙型肝炎患者,2次/wk,1支/次(500 mg/5 ml),3 mo为1疗程,其疗效在治疗组HBsAg、HBeAg、HBV DNA转阴率分别为2.6%(3/117例)、35.1%(34/97例)、43.0%(40/93例)、对照组则分别为1.7%(1/58例)、25.5%(13/51例)、3.6%(1/28例)。

以上是治疗慢性乙型肝炎的几种药物,如果加用胸腺肽其疗效可能会更好。即使如此,如果从清除病毒的角度来衡量其疗效,可能都是不理想的。大致上看来,很难评价那一种疗法更为优越。因此,对慢性乙型肝炎的治疗药物仍有待进一步开发研制。在临床研究及评价药物疗效时,必须制定更为严格的科研设计,合理的病例及标本收集方案、统一而标准的检测试剂及操作方法,才能得出有说服力的结论^[7]。

3 应加强对宿主的研究

以HBV感染为例,是否急性自限性或急性暴发性;慢性感染的临床表现如何,宿主的免疫应答因素显然起决定性作用,这是许多感染性疾病发病机制中的普遍规律。因此,除对肝炎病毒的致病性进行深入的研究之外,应进一步开展对宿主免疫耐受状态及激活免疫应答机能的研究。

国内外学者虽然早已重视这方面的问题^[8,9],但研究得并不充分,新的进展不多。近来国内学者的研究认为慢性乙型肝炎患者外周血树突状细胞免疫功能低下,与其表面CD86的表达率下降及树突状细胞分泌IL-12减少密切相关,无法有效地向T细胞呈递抗原信息,加上分泌IL-12减少,内分泌性IFN- γ 缺乏,不能产生有效的Th1反应,是造成HBV感染难以清除的重要原因。国外学者证实慢性乙型肝炎患者树突状细胞的表型不成熟和功能缺失,由此导致IL-12的产生和刺激T细胞增生能力的降低,可能是HBV感染持续发展的原因之一。然而国内的学者研究曾认为从慢性乙型肝炎患者外周血培养的树突状细胞刺激T淋巴细胞增生的效应明显高于未经抗原处理的树突状细胞。这方面的分歧可能是病例标本数目过少或研究方法上的不一致所造成的,有待更多的研究资料积累。

国内近期报道HLA-DR12和DRB1*1201可能对机体免受HBV长期感染有保护性意义,而HLA-DR9或DQ9可能使宿主易发生HBV持续感染。国外学者研究证明MHC II类等位基因DRB1*1302、DRB1*02及DRB1*04对HBV持续感染有抗性,而等位基因DRB1*07者对HBV持续感染的易感性增加。这些研究均值得进行更多的资料积累,并进行深入的探讨,才有可能阐明HBV持续感染的机制^[10]。

关于临床研究中病例及标本的收集、考核及评价治疗药物的疗效时,试剂及检测方法的规范和标准,是否

也应在《病毒性肝炎的防治方案》中加以明确,以上拙见供同道及专家们参考。

4 参考文献

- 1 Suk FM, Lin MH, Newman M, Pan S, Chen SH, Liu JD, Shih C. Replication advantage and host factor-independent phenotypes attributable to a common naturally occurring capsid mutation (I97L) in human hepatitis B virus. *J Virol* 2002;76:12069-12077
- 2 Asselah T, Martinot M, Cazals-Hatem D, Boyer N, Auferin A, Le Breton V, Erlinger S, Degott C, Valla D, Marcellin P. Hypervariable region 1 quasispecies in hepatitis C virus genotypes 1b and 3 infected patients with normal and abnormal alanine aminotransferase levels. *J Viral Hepat* 2002;9:29-35
- 3 Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing for mutation of e antigen in patients with chronic HBV infection. *Lancet* 1989;II:585-591
- 4 Alexopoulou A, Karayiannis P, Hadziyannis SJ, Aiba N, Thomas HC. Emergence and selection of HBV variant in an anti-HBe positive patient persistently infected with quasispecies. *J Hepatol* 1997;26:748-753
- 5 Ling R, Mutimer D, Ahmed M, Boxall EH, Elias E, Dusheiko GM, Harrison TJ. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996;24:711-713
- 6 Honkoop P, Niesters HG, de Man RA, Osterhaus AD, Schalm SW. Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B incidence and patterns. *J Hepatol* 1997;26:1393-1395
- 7 刘泽富,聂青和. 病毒性肝炎的诊断和治疗. 第1版. 北京:人民军医出版社, 2001:478-630
- 8 Thursz MR, Thomas HC. Host factors in chronic viral hepatitis. *Semin Liver Dis* 1997;17:345-350
- 9 Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AV. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995;332:1065-1069
- 10 Lindemann M, Barsegian V, Siffert W, Ferencik S, Roggendorf M, Grosse-Wilde H. Role of G protein beta3 subunit C825T and HLA class II polymorphisms in the immune response after HBV vaccination. *Virology* 2002;297:245-252

慢性乙型肝炎临床分度、诊断的一些问题

周永兴

周永兴,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:周永兴,710038,陕西省西安市新寺路1号,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. zyxdf@fmmu.edu.cn
电话: 029-3537377 传真:029-3537377
收稿日期:2002-12-10 接受日期:2002-12-20

周永兴.慢性乙型肝炎临床分度、诊断的一些问题. 世界华人消化杂志 2003; 11(6):762-766

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/762.asp>

0 引言

慢性肝炎的分度和诊断是临床诊断中密切相关的两个问题,长期以来在临床上慢性肝炎的诊断受 De Groote et al^[1]的慢性肝炎分类的影响,该分类法以肝组织病理有界

面性炎症(界板破坏, 又称碎屑样坏死)定为慢性迁延性肝炎(CPH) 和慢性活动性肝炎(CAH)的分界线, 无为慢性迁延性肝炎, 有为慢性活动性肝炎; 并认为二者是相互独立的疾病, 他的临床过程、治疗和预后也不相同; 后来增加了慢性小叶性肝炎(C LH), 即肝组织病理仅见小叶内炎症和肝细胞坏死, 比 CPH 病变轻; 这一鉴于病理学标准的命名既忽视了病因学不同所致肝炎的特点, 又混淆几种特殊类型肝炎的诊断, 并由此而影响了治疗。如自身免疫性肝炎、Willson' s 病、 α - 抗胰蛋白酶缺乏症、原发性硬化胆管炎与原发胆汁性肝硬化等都属特殊类别的肝病, 但他们的肝穿刺活检病理特征与慢性病毒性肝炎可有相似的改变, 因而造成将 Willson' s 病等误诊为自身免疫性肝炎或慢性病毒性肝炎, 自身免疫性肝炎误诊为慢性病毒性肝炎。因此 1994 年洛杉矶世界消化病学会学术会议和 1994-06 墨西哥坎肯世界肝病学会学术会议上国际工作小组建议废除 CPH 和 CAH 这种不固定的诊断, 推荐应将病因学、病毒学及病毒血清学、特异免疫学结果和临床表现(包括生化检验和 B 型超声波) 结合起来综合判定^[2]。在我国直到 2000 年中华医学会传染病与寄生虫病学会及肝病学会专家组结合实际重新修订公布了我国病毒性肝炎防治方案, 其对慢性肝炎的定义是急性

肝炎病程超过 6 mo, 或原有乙型、丙型、丁型肝炎或 HBsAg 携带史, 本次又因同一病原再次出现肝炎症状、体征及肝功能异常者可诊断为慢性肝炎。如病原为乙型肝炎病毒, 则诊断为慢性乙型肝炎。

1 慢性乙型肝炎的临床分度

为反映慢性乙型肝炎肝功能损伤程度, 临床上将之分为 3 度, 即轻度、中度和重度^[3]。(1) 轻度: 临床症状、体征轻微或缺, 肝功能检测仅 1 或 2 项指标轻度异常; (2) 中度: 临床症状、体征和肝功能检测结果居于轻度和重度之间; (3) 重度: 有明显或持续的肝炎症状, 如乏力, 纳差, 腹胀; 或有尿黄、便溏; 或伴有肝病面容、肝掌、蜘蛛痣、脾大(除外其他原因), 但无门静脉高压症者。肝功能生化指标检测血清 ALT 和 / 或 AST 反复或持续升高, 血清白蛋白降低或球蛋白明显升高致 A/G 比值异常; 除上述条件外, 凡血清白蛋白 ≤ 32 g/L, 胆红素 > 5 倍正常上限值, 胆碱酯酶 < 2500 U/L, 血液凝血酶原活动度在 60-40 %, 四项指标中有一项达上述程度者即可诊断为重度慢性肝炎。由于慢性乙型肝炎患者临床表现差异较大, 实际工作中肝功能生化指标往往是临床分度的重要依据, 详见表 1。

表 1 临床分度肝功能检测参考指标

项目	轻度	中度	重度
ALT 和 / 或 AST(IU/L)	\leq 正常 3 倍	$>$ 正常 3 倍	$>$ 正常 3 倍
胆红素(μ mol/L)	\leq 正常 2 倍	$>$ 正常 2 倍 - 正常 5 倍	$>$ 正常 5 倍
血清白蛋白(A)(g/L)	≥ 35	$< 35 - > 32$	≤ 32
A/G	≥ 1.4	$< 1.4 - > 1.0$	< 1.0
电泳 γ 球蛋白(γ EP)(%)	≤ 21	$> 21 - < 26$	≥ 26
凝血酶原活动度(PTA)(%)	> 70	70-60	$< 60 - > 40$
胆碱酯酶(CHE)(U/L)	> 5400	$\leq 5400 - > 4500$	≤ 4500

表 2 慢性肝炎临床分度与肝组织病理变化的关系

临床分度	肝组织病理变化
轻度 A	汇管区炎, 小叶内点状坏死, 少许纤维向外延, 小叶结构完整, 相当于 CLH 及 CPH(G_1 、 S_1)
轻度 B	汇管区炎并界面炎症, 少数纤维间隔形成, 相当于原轻型 CAH (G_2 、 S_2)
中度	汇管区炎症, 界面炎症明显且向腺泡内发展, 呈桥状坏死, 伴纤维间隔形成, (G_3 、 S_3)
重度	桥状坏死, 多小叶融合性坏死, 伴肝细胞花结, 再生小结节形成, (G_4 、 S_4)

B 超也是慢性乙型肝炎临床分度的重要依据之一。如轻度: B 超结果肝脾无明显改变; 中度: B 超检查则可见肝内回声稍增粗增强, 分布尚 / 欠均匀, 肝和 / 或脾轻度肿大; 重度: B 超显示肝内回声明显增粗增强, 且分布不均; 肝表面欠光滑, 缘钝; 门静脉内径增宽(接近或稍大于正常上限 1.3 cm); 脾肿大变厚变长, 脾静脉内径变宽(接近或稍大于正常上限 0.8 cm)。

这一分度首先反映了慢性乙型肝炎不论临床还是病理具有轻重不同的程度, 反映慢性肝炎不同阶段有不同的病理表现, 且是渐进的(表 2^[4]), 避免了过去出现的将一个病 - 慢性肝炎分割成两个病, 即 CPH 和 CAH。

第二肝炎疾病进展的关键是病原及机体的免疫状况, HBV 本身不直接至肝损伤, 但病毒的复制和病毒抗原的表达可激发机体的免疫反应造成肝脏炎症, 而非病理学决定病变的发展和特异治疗。

第三临床研究大量事实表明肝脏的炎症活动程度可依感染 - 免疫状态的改变而转换, 即免疫耐受时病变轻微, 免疫耐受丢失时病变激活; 病毒复制活跃 HBeAg 阳性被清除时炎症活动, HBeAg 转阴随之病情静息, 部分抗 - HBe 阳性也可因病毒变异而病情加重, 是一个由轻加重和 / 或由重转轻的动态过程, 因此在临床分度时必需根据当时的病情及检测分析, 不要拘泥于既往的分度。

第四乙型肝炎患者起病隐匿,许多患者完全没有自觉症状;而肝穿刺组织病理仅反应一个时间点的变化,如见汇管区轻度炎症、小叶内有点状坏死,这是一种非特异性的病变,当患胃肠道或全身疾病时肝脏可发生这种反应性病变;或急性肝炎缓解期、原发性胆汁性肝硬化的早期也可出现这种变化,因而也很难单凭病理来判定是否为慢性肝炎。所以上述二者都有其片面性,故当前临床和病理学家都认为慢性肝炎应综合病原、临床及病理来判定。虽然肝组织病理变化是临床分度的基础,但临床上不可能每个患者都能做肝穿刺,并且有的患者可能无临床症状,这种情况下实验室肝功能生化指标的检测及B超的检查对于慢性乙型肝炎的临床分度是非常重要的。

2 慢性乙型肝炎的临床诊断

2.1 诊断原则 慢性乙型肝炎的临床诊断原则,我国2000年的方案规定确诊是先以临床分型与病原学分型相结合,辅以肝组织病理学结果,再按慢性乙型肝炎分度标准行临床分度。具体诊断书写方法为“病毒性肝炎 乙型 慢性(轻、中或重度),病理学炎症活动度以G₀₋₄,纤维化程度以S₀₋₄来表示。

2.2 诊断中的若干问题

2.2.1 AsC与慢性乙型肝炎 慢性无症状HBsAg携带者(chronic asymptomatic HBV carrier, AsC)是指HBsAg持续存在6 mo以上,无肝病相关症状和体征,血清ALT正常者。我国有HBsAg携带者约1.3亿人,估计约35-50%是在母婴围产期感染。流行病学调查婴幼儿期感染80-90%成为AsC,成年人感染成为AsC<5%^[5-7]。而慢性乙型肝炎绝大多数是由AsC发展而来。所以AsC与慢性乙型肝炎密切相关。什么情况下将AsC诊断为慢性乙型肝炎呢?(1)根据HBV感染的自然生活史分析:婴幼儿期感染HBV后病毒在人体的自然生活史大致分为三期:免疫耐受期、免疫清除期和病毒低复制期。通常婴幼儿期感染初期绝大多数呈免疫耐受状态,病毒复制活跃,HBVM中HBeAg阳性,HBVDNA高拷贝数,但肝脏无活动性病变,一般持续到20岁左右,这类感染者可能是真正的AsC。约20岁以后进入免疫清除期,CTL对感染细胞发动攻击,则HBeAg可转换成HBeAb阳性,病毒复制受抑制,HBVDNA低拷贝数,肝功能损伤,因多不能彻底清除发展成慢性乙型肝炎,反反复复持续到40岁左右^[8]。所以HBV感染者如无自觉症状,虽HBV血清学检测HBeAg阳性,HBVDNA呈高复制状态,而肝功能正常,B超正常者,一般诊断为AsC。如该类感染者诉与同年龄人比抵抗力低易感冒,易疲乏,或食欲欠佳,或饭后上腹不适,或肝区不适,具其中任何一条、特别是携带到15岁以后,可诊断为慢性乙型肝炎轻度。(2)根据AsC肝组织病理学特点分析:骆抗先 et al^[9] 1985年对257名青年AsC行肝组织学检查,结果10.5%正常,45.5%轻度病变,10.1%呈CLH表现,23.7%为CPH,10.1%显CAH,个别似肝硬化。从这个研究看20岁后的AsC诊断慢性乙

型肝炎有90%的准确性。(3)AsC不同年龄段的特点:前已述婴幼儿期感染HBV后的自然史,如成年期感染则多自然获得免疫力,成AsC者<5%。但免疫力低下,包括患有其他慢性疾病,或用免疫抑制剂者,感染HBV后可以和婴幼儿期感染类同,成为AsC。老年人感染因免疫力已降低,肝脏免疫损伤轻微,感染后呈轻度慢性乙型肝炎过程,且多为低感染高免疫状况^[9]。

2.2.2 典型慢性乙型肝炎 即便典型慢性乙型肝炎每1例起病及临床表现也均不相同,约有1/3的感染者可突然发病,起始的临床表现和急性乙型肝炎一样,乏力,纳差伴恶心、厌油及上腹不适等明显的胃肠道症状;少数患者有发热,关节痛;部分出现眼结膜黄染甚或皮肤黄染。肝功能ALT升高,持续不正常,HBeAg阳性,HBVDNA高复制。约2/3的慢性感染者常以各种各样的症状就医,如67%的患者以乏力就诊,65%以不固定的上腹部或右肋部痛。多无体征,只有通过实验室检查作出诊断。这类患者100%ALT升高(47-1370U/L),98%AST升高,7%有血清胆红素增高;HBVM HBsAg阳性,部分HBeAg阳性,HBVDNA也阳性^[10]。

2.2.3 抗-HBe阳性慢性乙型肝炎^[5,11-14] 通常HBV感染早期均呈HBsAg、HBeAg、抗-HBc三项阳性,HBeAg阴性,抗-HBe阳性意味着病毒复制变弱。从急性感染发展成慢性乙型肝炎的过程看,急性乙肝经感染病毒与机体免疫相互作用后,如机体免疫清除病毒则病毒血清学标志首先HBeAg转阴,抗-HBe变阳,随后HBV-DNA消失,再HBsAg清除,抗-HBs阳转,疾病痊愈。若免疫不能将病毒彻底清除,仅能将病毒控制在低水平复制状态,则HBsAg不能发生转换,免疫损伤持续缓慢进行形成慢性肝炎,这种静息的低复制的野毒株患者约占慢性乙型肝炎患者的1/3,HBVM为HBsAg、抗-HBe、抗-HBc阳性,HBV-DNA低水平,这类患者肝脏病变静息,肝功损伤轻微。但也可ALT升高,或ALT正常而AST升高,或转氨酶均正常而免疫球蛋白增高,或肝功正常而B超肝回声增强脾脏肿大。

在我国HBV感染者如自发出现抗-HBe阳转可以是病毒C基因变异所致。除少数变异株感染本身表现为慢性过程,ALT可反复轻度升高,HBV-DNA复制水平为中低度,但感染长期持续,病变逐渐进展,肝组织纤维化程度高,易进展成肝硬化。新近台湾学者Hsu et al对CHB患者自发HBeAg转换后的长期预后进行研究,283例最短随访1 a,最长随访18.4 a,平均8.6 a。结果66.8%持续缓解,33.2%仍ALT升高达2倍正常上限值,其中4.2%与HBeAg阳转有关,24%与HBV-DNA阳性有关,4.2%原因不清。结论是HBeAg自发转换总体看多数病情持续缓解,但33.2%的患者病变活动,且易发展成肝硬化和HCC^[11]。

2.2.4 慢性乙型肝炎重度 临床上慢性乙型肝炎重度和慢性重型肝炎不易区别,从临床表现、体征和实验室检查数据看,有时很难区别,在缺乏肝组织学依据(肝

组织病理学示亚大块肝坏死及以上为重型) 情况下凝血酶原活动度是诊断的重要鉴别点,活动度<40 %即为重型,相反诊断慢性乙型肝炎重度。

2.2.5 慢性隐匿型乙型肝炎^[14] 急性乙型肝炎恢复的标志是:患者血清HBV-DNA的消失;血清HBeAg转换、HBsAg转换;血清转氨酶正常。这些变化意味着乙型肝炎病毒的清除和疾病的康复。新近法国巴斯德研究所 Brechot 博士提出存在隐匿型乙型肝炎病毒感染。文献及研究表明: (1) 对血清抗-HBc和抗-HBs阳性而发生急性HBV感染,慢性肝炎和HCC不同类型的患者多截面研究,均显示有HBV-DNA的持续存在;一般在肝组织里HBV-DNA的阳性率显著高于血清中; (2) 在抗-HBc和抗-HBs均阴性而有肝炎的临床和生化表现的患者,也证实HBV-DNA呈持续阳性;但HBV-DNA的阳性率以抗-HBc和抗-HBs阳性者最高; (3) HBsAg阴性的急性、尤其暴发性肝炎患者HBV-DNA检测阳性率低,血和肝里分别为10 %与7 %; HBsAg阴性伴有或不伴HCC的慢性肝炎患者30-35 %血清HBV-DNA阳性(范围在5-55 %); (4) 在对HBV高暴露的人群中阳性率在7-60 %;这类人肝组织里的阳性率也显著高于血清中,40-50 %对13-71 %,与是否伴有HCC无关; (5) 随访急性HBV感染康复者,临床生化持续10-30 a均正常,但其中55 %的患者血清HBV-DNA持续阳性(共检45份标本); (6) 随访自发的或抗病毒治疗后HBsAg转为阴性的慢性肝炎患者在血和肝组织中HBV-DNA的检出率分别高达28 %和94 %;这些患者在HBsAg转换后HBV-DNA的水平和抗-HBc与抗-HBs滴度明显低; (7) 自限性肝病患者及肝血清学生化学指标正常的献血和捐器官者HBV-DNA检测均阴性; (8) 许多实验及临床研究也证实HBsAg阴性血液的传染性。Michalak et al 报道鸭急性感染WHV恢复后,WHV-DNA在血、肝和PBMC里持续终生; Thiers et al 用HBsAg阴性HBV-DNA阳性血清给猩猩注射,结果猩猩感染了HBV; 输HBsAg阴性的血和母亲为HBsAg阴性结果发生了输血后肝炎和母婴HBV-DNA的传染; HBsAg阴性肝硬化行肝移植后发生植入肝的再感染; 来自HBsAg阴性的器官致受者发生了感染; 这些观察均系通过检测患者肝组织中病毒的RNA(包括病毒的基因组)和cccDNA证实。因此HBV血清标志的缺乏不能除外HBV-DNA(含有传染性病毒颗粒)在血清中循环,该类血清的传染和HBsAg阳性血的传染是相同的。对土拨鼠的研究也有同样的结论。在人和土拨鼠通过对PBMC系和在肝标本中鉴定HBV基因组的研究也证实HBsAg阳性和阴性HBV感染具相同的细胞向性。由于各作者的PCR方法未能标准化,采用标本量及试剂的不同,HBV-DNA检测差异变化在 10^1 - 10^3 拷贝/mL; 总之,这些研究共同确认了HBV感染是一个长期持续的感染,甚至在病毒免疫反应明显有效时仍有HBV存在。结合临床经常见到HBVM全阴性或抗-HBs与抗-HBc阳性而肝功能异常,反复ALT升高伴脾脏肿大,且迁延数年不能确诊。对这类患者本人认为在排除了其他

嗜肝病毒感染后,应考虑隐匿性慢性乙型肝炎的诊断。

3 讨论

慢性乙型肝炎临床表现复杂,很少在发生后即能作出早期诊断,并且还常被误诊或漏诊。究其原因: (1) 从个体感染的时间看,慢性乙型肝炎在我国感染多发生于婴幼儿期,此期婴幼儿免疫器官尚未发育成熟,免疫功能还不健全,对于HBV呈免疫耐受状态,所以表现长时期的病毒血症和慢性无症状的HBsAg携带,而病变轻微病程漫长。 (2) 感染与免疫。感染后病毒的清除决定于机体的免疫清除能力,后者又取决于人体的免疫遗传素质,如HLA的表型对于限制HBV感染的发展和清除是否发生慢性乙型肝炎重要因素,HLA表达低下CTL不能很好识别感染的肝细胞,因而不能将肝细胞内的病毒彻底清除; T细胞特异性克隆及细胞因子产生的状况也使宿主清除病毒能力受影响, T细胞亚群的失衡致清除能力降低。另一方面病毒干扰机体的免疫功能,如病毒表达的蛋白HBeAg能增强T细胞的免疫耐受; 感染病毒的肝细胞因HBcAg的表达及HBV DNA的复制而抑制HLA的表达,HLA表达水平低既影响CTL的免疫识别又使INF- γ 产生不足,使溶细胞及非溶细胞性清除病毒能力下降; HBV的变异致抗原的低亲和性使APC抗原呈递率低,则诱导CD4⁺T细胞以Th2亚型占优势,免疫失衡,CD8亚型CTL应答低下,清除病毒能力降低。因此,机体免疫清除能力下降和病毒对免疫清除能力的抑制都造成病程迁延,病情反复,时轻时重。 (3) 慢性乙型肝炎临床表现的“沉默”(silent)^[5,14]。Sherlock在Zuckerman et al 编著的病毒性肝炎一书中写道:慢性乙型肝炎常表现沉默,临床表现并不经常与病变的程度一致。如有的患者平时无任何不适,发病即为慢性乙型肝炎,所谓原发性慢性乙型肝炎; 有的患者临床非常稳定不知何时因某一因素,如劳累、感冒、腹泻、某些药物、饮酒、精神刺激等突然复发。相反有的患者肝功能检测转氨酶反复升高,久治不愈,以为病重,而肝组织病理学检查却病变轻微。 (4) 另外临床医生经验的差异,知识面的广博程度不一导致误诊,如有的患者因上腹不适,饭后饱胀而按慢性胃炎治疗10 a,结果查HBVM阳性、肝功异常而确诊为慢性乙型肝炎; 患者的医疗常识、经济水平也给慢性乙型肝炎的诊断带来一些困难,临床上许多患者因无症状而不做健康检查,有的症状模糊,间断发生,或易乏而能坚持工作,或偶有消化不良不耐油腻,因经济或工作问题不看医生,待就医已为明显慢性乙肝。所以如何提高对慢性乙型肝炎的认识在当前仍是值得重视的问题,早期诊断、适时而合理的治疗对于降低传染性,阻断纤维化,减少肝硬化和肝癌的发生起着非常重要的作用。

隐匿性HBV感染最常见于高流行区,在高流行区有70-90 %的人暴露于HBV,低流行区暴露率仅5-20 %。这种长期反复的暴露是形成大量隐匿性HBV感染的重要原因之一^[14,15]。我国为乙型肝炎的高发区,临床上常

见到大量不明原因的肝病患者,我们曾行肝组织活检,并行HBV抗原的免疫组化和原位杂交检测发现血清HBVM全阴性或抗-HBs、抗-HBc阳性患者原位杂交阳性率达15%;但由于肝组织是石蜡包埋,所以免疫组化未能检出,原位杂交阳性率也不高,如采用冰冻切片或检测外周血单个核细胞可能获得更高的阳性率.因此在慢性乙型肝炎诊断时还必需提高对隐匿性HBV感染的认识.

4 参考文献

- 1 De Groote J, Desmet VJ, Gedigk P, Korb G, Popper H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H, Uehlinger F. A classification of chronic hepatitis. *Lancet* 1968;2:626-628
- 2 Batts KP, Ludwig J. Chronic hepatitis, An update on terminology and reporting. *Am J Surg Pathol* 1995;19:1409-1417
- 3 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000;8:324-329
- 4 骆抗先. 乙型肝炎的基础和临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:265-286
- 5 Zuckerman AJ, Thomas HC. Viral hepatitis. *London: Churchill Living* 1997:1-14
- 6 高征寿. 病毒性肝炎防治研究. 第1版. 北京: 北京出版社, 1993:27
- 7 Chu CM, Liaw YF. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: an immunopathological study. *J Gastroenterol Hepatol* 1997;12:S218-222
- 8 骆抗先,梁焱森. 慢性无症状乙型肝炎病毒感染者的临床病理学特点. 中华内科杂志 1985;24(增刊):37-39
- 9 骆抗先,何超,汪能平,梁焱森. 老年人中无症状乙型肝炎病毒感染. 中华流行病学杂志 1992;13:65-67
- 10 郝连杰. 肝炎及其后果. 第5版. 北京:人民卫生出版社, 2001:127-144
- 11 Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, Sheen IS, Chiou HY, Chu CM, Liaw YF. Long-Term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002;35:1522-1526
- 12 Amarapurkar DN, Baijal R, Kulshrestha PP, Agal S, Chakraborty MR, Pramani K SS. Profile of hepatitis Be antigen-negative chronic hepatitis B. *Indian J Gastroenterol* 2002;21:99-101
- 13 Sung JJ, Chan HL, Wong ML, Tse CH, Yuen SC, Tam JS, Leung NW. Relationship of clinical and virological factors with hepatitis activity in hepatitis Be antigen-negative chronic hepatitis B virus-infected patients. *J Viral Hepat* 2002;9:229-234
- 14 Chan HL, Tsang SW, Leung NW, Tse CH, Hui Y, Tam JS, Chan FK, Sung JJ. Occult HBV infection in cryptogenic liver cirrhosis in an area with high prevalence liver disease. *Hepatol Res* 2002;22:139-144
- 15 Conjeevaram HS, Lok AS. Occult hepatitis B virus infection: A hidden menace? *Hepatology* 2001;34:204-206

慢性乙型肝炎的鉴别诊断及常见并发症

聂青和

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:聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路1号, 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. nieqinghe@hotmail.com
电话:029-3377742 传真:029-3537377
收稿日期:2002-12-10 接受日期:2002-12-20

聂青和. 慢性乙型肝炎的鉴别诊断及常见并发症. 世界华人消化杂志 2003; 11(6):766-768

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/766.asp>

0 引言

临床医师特别是内科医师会经常遇到肝功能检测持续或反复异常的患者,如能尽快明确其病因、疾病进展程度和预后,给予恰当的治疗,则可有效地阻止疾病恶化,阻断其向肝硬化、肝癌的发展.多种原因均可引起慢性肝炎,如酒精、药物、代谢性和自身免疫性疾病等,但在我国目前仍以病毒性肝炎(指HBV、HCV、HDV感染)最为多见.

慢性乙型肝炎是指既往有乙型肝炎或HBV携带史,或急性乙型肝炎病程超过6 mo,而目前仍有肝炎症状、体征及肝功异常者可以诊断为慢性乙型肝炎(CHB)^[1].严格讲,CHB是HBV感染引起的具有慢性肝炎组织学改变特征的病理过程,他处在急性肝炎之后和肝硬化之前,是病程超过6 mo而持续存在的肝细胞坏死和炎症.

1 慢性HBV感染急性活动^[2]

短期内出现持续数日以上的发热、乏力、消化道症状和肝区疼痛等症状,肝肿大和压痛等体征,ALT升高,参考流行病学资料,可诊断为急性病毒性肝炎,但需与慢性乙肝的急性活动相鉴别.急性无黄疸病例症状轻微多不自觉,目前求医的“急性”无黄疸性乙型肝炎多为AsC的急性活动,二者可以从表1中的几个方面加以鉴别.

表1 急性乙型肝炎与慢性HBV感染急性活动的鉴别

鉴别点	急性乙型肝炎	AsC急性活动
初发症状	典型	较轻
过去史	无	曾检出过HBsAg
家族史	一般无慢性HBV感染者	常有慢性HBV感染者
黄疸	有或无	常无
ALT升高	500-1 000 U/L	200-600 U/L
IgM抗HBc(滴度)	> 1:1000	(-),或< 1:1 000
HBeAg	早期血清转换	持续(+)或转换
HBsAg	6 mo内阴转	炎症可消退,HBsAg持续
肝组织活检	小叶炎症明显而均匀	汇管区炎症明显,可有纤维化
病程	≤ 6 mo	>6 mo

2 慢性乙型肝炎鉴别诊断

2.1 各型肝炎的鉴别^[3] 慢性病毒性肝炎可由HBV、HBV合并HDV或HCV引起,他们在临床、生化及组织学的表现有所不同.(1)慢性丙型肝炎:起病隐匿,患者多有输血或血制品史,症状较轻,多无黄疸或仅有轻度黄疸,肝、脾肿大较少、较轻,ALT轻度增高;病情活动后又缓解,以波动的临床经过为特征;肝组织炎症较轻,界面性炎症仅占汇管区周边一部分,小叶内炎症亦轻微,病程长期迁延后可有较重的纤维化.病毒标志物检查可有抗HCV和/或HCV-RNA阳性.(2)慢性丁型肝炎:没

有特殊的临床表现,在下列情况下需考虑本病:迅速进展的HBsAg(+)慢性肝炎和肝硬化;抗HBe(+)/血清HBV-DNA(-)的慢性肝炎;长期稳定的AsC病变突然激活;来自HDV感染高发区的慢性乙型肝炎患者.在血清或肝组织中检出HDV抗原或其RNA,血清中出现高滴度IgM或IgG型抗HD抗体可确定HDV的慢性感染.(3)重叠感染其他病毒:鉴别引起病变活动的病原体的最确切方法可能是肝内特异性CTL对感染细胞的杀伤效应,但难以常规检测.外周血检出的病毒不一定是引起肝病变的“元凶”,检出肝病变活动的病原在HAV、HBV及HDV需用各自病毒特异性IgM抗体;在HCV需用IgG型抗体;在HEV,因IgM型抗体不够灵敏和特异,IgG型抗体可混淆过去感染,重叠HEV感染的诊断需结合临床分析.

2.2 药物性肝炎 药物可引起各种类型的肝损害,引起肝损害的机制可以是药物或其代谢产物的直接毒性作用或免疫特异性.多数药物各自引起一种病变,有些药物可引起多种病变,一种病变也可以由不同药物引起.药物也可加重原已存在的肝脏病变.药物性肝炎的临床表现如一般肝炎,继续应用病因性药物可使肝组织炎症激活;广泛的汇管区和汇管区周围炎,以及明确的纤维化,支持慢性药物性肝炎的诊断.应用某些药物的慢性HBV感染者,病情加重时需考虑药物反应.这类药物包括双醋酚丁、甲基多巴、异烟肼、酮康唑、硝基咪唑啉等.一般停药后临床和生化改变可有不同程度的改善或恢复,再次用药后病变可复发加重.

2.3 中毒性肝炎 为除药物以外其他物质引起的肝脏的毒性损害,其表现和发生机制基本同药物性肝炎.一般消除毒性物质后,临床和生化改变可有不同程度的改善或恢复,再次接触有毒物质时肝损害可复发加重.也有一些剧毒物质可引起不可恢复的肝损害,甚至引起死亡.

2.4 酒精性肝病 酒精性肝病已成为我国仅次于病毒性肝炎的第二肝病病因.国外有人报道每日饮酒精80g,连续5a后即可有人成为肝硬化.酒精性肝病可分为单纯型(纯由酒精引起)和混合型(伴有HBV或HCV感染),后者在组织学上为酒精肝纤维化和病毒性慢性肝炎的混合表现.酗酒者慢性肝炎除有过量饮酒所致肝损伤外,更可有某种免疫学机制在起作用.典型酒精性肝炎与慢性乙型肝炎容易鉴别,但以各种程度肝细胞损害纤维化为特征的酒精性肝纤维症一般无炎细胞浸润.部分病例于扩大的Glisson囊及纤维间隔可有轻度淋巴细胞浸润,须与慢性乙肝鉴别.

2.5 脂肪性肝炎(脂肪肝) 是指非酒精性脂肪肝,严重者可发展为肝硬化.脂肪肝为营养障碍性肝损害之一,多并发于肥胖或糖尿病患者,与酒精性肝损害不易鉴别.脂肪肝多见于肥胖者,女性较男性多见,伴有糖尿病、高脂血症者为易发因素.肝脂肪沉着、小叶中心部肝细胞周围性纤维化和小叶中心性或小叶周边性马洛里小体可帮助鉴别.该病也不乏有Glisson囊及窦内出现淋

巴细胞浸润者,须与慢性乙型肝炎鉴别.

2.6 自身免疫性肝炎 自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)原因尚不清楚,但可除外其他损害肝脏的多种因素,如病毒、药物、遗传性和代谢性肝损伤. AIH在我国较少见,约占慢性肝病的10-20%,女性多于男性(4:1).目前将抗核抗体(ANA)和/或抗平滑肌抗体(SMA)阳性者列为I型,发病年龄有10-20岁和45-70岁两个高峰.将抗肝肾微粒体抗体(LKM)阳性列为II型,多见于2-14岁的儿童,成人仅占4%,ANA和SMA均为阴性.通常是中年妇女有自身免疫表现的慢性肝炎.其黄疸、蜘蛛痣、肝掌、脾肿大等较慢性乙型肝炎多见,并可有闭经等内分泌障碍,还可有肾炎、关节炎、心肌炎及心包炎等多脏器病变.自身免疫性肝炎以检出自身抗体为最明显的特征,约75%可检出抗核抗体,65%可检出抗平滑肌抗体,25%可检出抗线粒体抗体,同时存在 γ 球蛋白明显增高.该型肝炎的另一特点就是用肾上腺皮质激素治疗有效.

2.7 肝豆状核变性 肝豆状核变性亦称Wilson病,为遗传性铜代谢障碍引起的疾病,以肝硬化、锥体系统神经症状和角膜色素环(K-F环)三联征为突出的临床表现.半数患者首先发现肝脾肿大、肝功能异常,长期ALT轻度升高,易被误诊为慢性病毒性肝炎.本病已成为儿童及青少年肝病较多见的病因之一.血清铜蓝蛋白减低、尿铜增多,肝活检铜含量增多.治疗可试用D青霉胺和硫酸锌等排铜药物.有条件可行异体原位肝移植手术.

3 HBV感染的常见并发症^[4]

HBV感染属不严格的嗜肝性感染,病变主要表现为肝脏损害,但HBV还具有泛嗜性特点,除主要在肝细胞内繁殖外,还可在骨髓细胞、PBMC、肾脏、心、肺、肠、胰、脾、脑等多种组织器官中检出.虽然HBV在肝外组织器官中的量少,病毒蛋白的表达常不完全而较少发生病变,但由于免疫复合物或其他免疫机制介导,仍可出现一些肝外表现和并发症,其中主要以肾脏、胆道、胰腺及血液系统合并症为主(表2).

4 病变活动性检测和评价

慢性HBV感染以后的最终结果取决于病变的活动与否.慢性乙型肝炎的活动性病变是在病情进展中的病变,主要包括慢性乙肝轻度B亚型(界面性炎症)、中度(桥接坏死)、重度(融合坏死、花结形成)和活动性肝硬化(结节周围界面性炎症)等,有发生肝炎后肝硬化、重症肝炎或肝衰竭的可能性.非活动性病变是病情稳定的病变,主要包括灶性炎、反应炎、慢性乙肝轻度A亚型(汇管区炎)、活动静息后的残余病变和非活动性肝硬化,病情即使迁延或已有小叶改建,只要炎症吸收,预后仍较好.因而区分病变的活动性和非活动性是十分必要的,二者虽然是相对稳定的,但也是可以相互转变的^[5].

临床症状、体征和实验室检查的多种参数都是非特

异性的,并不能准确地反映病变的特点,因此难以作为鉴别活动性的可靠依据.若无肝组织病理检查,有时很难明确诊断.肝穿刺组织学病理检查虽是确诊慢性乙型肝炎的金标准,但有时由于病变分布不均匀,仍有

偶尔误诊的可能.表3列举了部分鉴别的要点,对判定慢性乙型肝炎的活动性可能有所帮助.正确的鉴别有赖于临床资料和病理检查的综合分析,对一时难以确定的病例,进行定期复查将能提高确诊率.

表2 HBV感染的常见并发症

并发症	肝炎病期	发生频率	可能机制
相关性肾炎	多见于AsC	儿童不少见	循环免疫复合物沉积、病毒侵袭
轻型肾病	急性乙肝	不少见	不明
肾小管酸血症	慢性肝病	较少见	肝、肾抗原交叉免疫
胆道感染	急性乙肝,慢性肝病	约50%	病毒侵袭、细菌感染
急性胰腺炎	重型乙肝最常见	很常见	病毒侵袭
溶血性贫血	急性或慢性乙肝	较常见	传缺陷、自身免疫
再生障碍性贫血	肝炎恢复后	罕见	病毒损害骨髓细胞、染色体异常

表3 慢性乙型肝炎活动性与非活动性的鉴别

活动性慢性乙型肝炎	非活动性慢性乙型肝炎
症状重,黄疸,肝脾肿大,ALT持续增高(确诊)	症状轻微(可能确诊)
出现肝外病变,或自身抗体阳性(很可能确诊)	罕见
血清白蛋白偏低,球蛋白偏高(很可能)	罕见
血象一种或数种血细胞降低(可能)	罕见
症状虽轻微,观察中病情有较大的波动(可能)	症状轻微,长期稳定(很可能)
虽抗HBe阳性,病情仍活动(很可能)	抗HBe阳性,病情稳定(确诊)
明显的界面性炎症伴桥接坏死(确诊)	汇管区炎,界板完整(确诊)
无汇管区周围炎,但腺泡内炎症明显(可能取样不足)	

5 参考文献

- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订.病毒性肝炎防治方案.中华肝脏病杂志 2000;8:324-329
- Sherlock S. Clinical features of hepatitis. In: Zuckerman AJ, Thomas HC. Viral hepatitis. London: Churchill Living, 1997:1-14
- 刘泽富,聂青和.病毒性肝炎的诊断与治疗.第1版.北京:人民军医出版社, 2001:449-477
- 骆抗先.乙型肝炎的基础和临床.第2版.北京:人民卫生出版社, 2001:445-472
- Hsu YS, Chien RN, Yeh CT, Sheen IS, Chiou HY, Chu CM, Liaw YF. Long-Term outcome after spontaneous HBeAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002;35:1522-1526

特殊人群乙型肝炎的临床特点及处理

罗新栋,聂青和

罗新栋,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:聂青和,710038,陕西省西安市新寺路1号,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. nieqinghe@hotmail.com
电话:029-3377742 传真:029-3537377
收稿日期:2002-12-10 接受日期:2002-12-20

罗新栋,聂青和.特殊人群乙型肝炎的临床特点及处理.世界华人消化杂志 2003;11(6):768-772

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/768.asp>

1 儿童与乙型肝炎

我国是乙型肝炎的高发区,从人群总体乙型肝炎病毒(HBV)感染率分析,大约10%的儿童也被HBV所感染.绝大多数儿童慢性肝炎仍以慢性乙型肝炎为主,好发年龄7-9岁,男性多见,其中大约10%为二重感染.新生儿和幼儿感染HBV后,因免疫耐受及免疫系统发育不全等常形成携带状态或轻型慢性乙型肝炎,相当一部分成人原发性肝细胞癌由此发展而来.因此,儿童乙型肝炎的防治具有重要的临床意义.

1.1 传播途径 母婴传播是儿童感染乙肝病毒最重要的传播途径,具体包括宫内感染、分娩时感染、出生后密切接触感染.据统计,母亲呈HBsAg和HBeAg双阳性分娩的婴儿,其HBV感染率高达95%,其中大部分在分娩

过程中感染, 10-20 %可能为宫内感染. 宫内感染的具体分子机制尚不十分明确. 已证实母乳、唾液中均含低滴度 HBV DNA, 可通过破损的口腔、消化道黏膜感染婴儿, 故 HBsAg、HBeAg 双阳性或 HBV DNA 阳性的母亲应避免母乳喂养.

1.2 儿童的病理生理特点 胎儿期肝胆系统不断生长发育, 出生后仍在继续分化成熟中, 学龄前儿童才逐渐接近成人. 儿童肝脏的病理生理等方面与成人有较大差异, 年龄愈小差别愈大. 儿童肝细胞对一些必需酶类的合成能力较低, 其分解、合成、贮存和解毒等功能均不完善. 婴幼儿对感染的免疫应答不成熟, 宫内暴露的一些母源性抗体可削弱新生儿的免疫应答, 导致儿童感染 HBV 后易于形成慢性化或携带状态, 即使发病其症状也明显较成人轻. 感染的年龄越小, 免疫耐受性越稳定. 这些特点导致儿童乙型肝炎诸多与成人不同之处(表 1)^[1].

表 1 儿童肝脏的生理特点与乙型肝炎临床表现的关系

儿童肝脏生理特点	儿童肝炎临床特点
质量相对较大	肝肿大显著
血流量相对较多	对缺氧敏感, 易受损
肝细胞再生能力强	病毒清除后易恢复
免疫系统发育不全	炎症较轻, 易慢性化
结缔组织发育不全	较少发生肝硬化
合成活跃肝细胞易受损	低白蛋白血症, 凝血酶原降低, 灭活功能较低 高胆固醇血症, 浮肿, 肝掌、蜘蛛痣等

1.3 儿童乙型肝炎临床特点^[2] (1)急性乙型肝炎儿童感染 HBV 后少数发生轻型急性乙型肝炎, 大多是亚临床或轻型慢性乙型肝炎. 与成人比较, 儿童急性乙型肝炎发病更快, 全身症状明显, 前驱期的上呼吸道和肠胃道症状较突出, 黄疸较轻微而肝肿大较明显, 病期短于成人(2-4 wk). 无黄疸者为大多数, 但不易发现, 易误诊为急性胃肠炎、腹泻、上呼吸道感染等. 黄疸前期大多患儿有发热, 少数高热, 大多仅持续 1-3 d, 少数可达 1 wk. 可有鼻塞、流涕、咳嗽、咽充血等呼吸道症状. 消化道症状可有食欲不振、恶心、呕吐, 婴儿多有腹泻. 绝大多数患儿肝脏肿大, 脾脏也常肿大. 某些患儿出现颜面毛细血管扩张、蜘蛛痣或肝掌, 与儿童肝脏的雌激素灭活功能低下有关, 勿诊断慢性肝炎或肝硬化. 极少的儿童急性乙型肝炎可发展为急性肝衰竭, 可能与 HBV 前 C 区变异有关. 尚有淤胆型, 亦少见. 进入恢复期在 2-4 wk 内黄疸可消退, ALT 下降至正常; 肝脏脾脏可在 2-3 mo 内恢复正常. (2)慢性乙型肝炎儿童感染 HBV, 还常见于下列慢性临床经过: (a)慢性迁延性过程 儿童感染 HBV 后, 病程迁延 6 mo 以上不愈. 多黄疸, 常有疲乏、纳差、易呼吸道感染等. 肝脏轻-中度肿大, 一般脾脏不大. 血清转氨酶值有时波动. 慢性活动性过程 病情较重, 多伴脾大, ALT 值增高、球蛋白值增高, 以及各种自身抗体如类风湿因子、抗核抗体等出现. (b)慢性 HBV 携带者 感染 HBV 后症状

好转或始终无症状出现, 但血清 HBsAg 持续阳性超过 6 mo 以上, 甚至 > 10 a; HBV DNA 阳性. 有的 HBsAg 浓度很低或消失, 表现为抗 HBc、HBV DNA 单项阳性. (c)隐匿 HBV 感染 HBV 标志物阴性而 HBV DNA 阳性, 但 HBV DNA 可以阴转, 常见于乙肝恢复期和无症状的儿童中. (3)可有下列并发症: (a)乙肝病毒相关性肾炎可呈无症状性血尿和或蛋白尿、急性肾炎综合征, 肾病综合征、急性肾衰, 以肾炎综合征为主. 造成临床表现多种多样的原因可能与 HBV 具有多种抗原且各种抗原、抗体分子量大小以及带电荷不同所致免疫复合物沉着部位不同, 从而表现出多样性的临床特征. 目前 HBV 与儿童膜性肾病之间的关系已得到大多数学者公认, 且发现 HBeAg 与膜性肾病可能有关. 症状以肉眼或镜下血尿为主, 水肿及高血压相对较轻, 肾功能多在正常范围. (b)血清病样表现可见皮疹、关节炎等. (c)婴儿丘疹样肢皮炎 为乙型肝炎感染在婴幼儿时期有皮肤病变的特殊类型, 其面部和四肢有非化脓性红色丘疹. 血清中检测出 HBsAg 阳性率相当高. 病毒亚型绝大多数是 ayw. (d)其他再生障碍性贫血、结节性动脉周围炎、过敏性紫癜等. 儿童慢性乙型肝炎也可进展至肝硬化甚至肝细胞癌, 但很少见.

1.4 预防 鉴于目前尚无令人满意的抗 HBV 药物, 因此同时做好预防工作比单纯治疗更为重要. 现有基因工程疫苗较血源性疫苗安全、免疫性强、保护率更高, 但使用中还有不少问题. 如仍有 10-20 % 的人不能产生保护性抗体, 达到起保护作用的抗体滴度维持时间有限(儿童可能仅 4-6 a). 近几年来还发现有 HBV 变异株, 可使已有免疫力者再感染. 但乙型肝炎最终控制的希望还是在于疫苗, 如目前的研究热点 DNA 疫苗. 优质的疫苗结合严格的免疫程序, 希望在不远的将来乙型肝炎成为继天花、脊髓灰质炎后又一个依靠疫苗消灭的疾病. 接种对象应以可能发生母婴传播的婴儿、母亲和入托的学龄前儿童为重点. HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 阳性母亲的婴儿免疫失败率较高, 可达 55 %. 目前认为主要是宫内感染 HBV, 使表面抗体产生较慢或滴度较低. 孕妇在产前多次注射乙肝疫苗和乙肝免疫球蛋白, 可能提高体液免疫反应, 降低宫内感染, 但具体方法还不成熟^[3].

1.5 治疗 总体治疗原则同成人患者, 尚须结合儿童的特点. 儿童的营养要求高于成人. 适当的营养在儿童肝炎的治疗中很重要. 急性期应合理地安排饮食. 根据需要进行三高饮食(碳水化合物、蛋白质、维生素), 以患儿食欲及耐受程度为准, 恢复期食欲有可能亢进, 应注意适当控制, 勿进食过多. 急性肝炎患儿经休息, 适当的营养即可恢复健康, 不必应用太多的药物. 慢性肝炎病程较长, 症状较多, 发病机制比较复杂, 须根据病情全面分析, 采用适当药物进行综合治疗, 其中抗病毒治疗无疑是最关键的(表 2). 儿童慢性乙型肝炎的抗病毒治疗现状与成人类似, 尽管 α 干扰素(IFN- α)有效率不高, 但目前还是抗 HBV 的一线药物. 总体疗效并不理想, HBV 基因组的多样性可能是重要原因之一. 美国肝病学会的推荐儿

童 6 MU/m², 3 次 /wk(不超过 10 MU)疗程 4-6 mo, 依病情可延长至 1 a^[4]. 国内可按实际使用的成人剂量调整.

HBV对拉咪呋啶(lamivudine)耐药性的产生和诱导变异使其长期疗效并不令人满意, 与 IFN- α 常规联用的长期疗效可能并不优于单用 IFN- α , 延长疗程也未获良效^[5], 国外已有不主张使用者^[6]. 12 岁以上儿童最佳剂量为 3 mg/kg, 1 次 /d.

阿德福韦(adefovir)由美国 Gilead 公司生产, 国外的注册商品名为 Hepsera, 已在美国批准上市, 为安全起见还未用于儿童. 阿德福韦是腺嘌呤核苷类似物, 同拉咪呋啶的作用类似, 也可以强有力地抑制乙肝病毒 DNA 复制, 使 HBV DNA 的滴度迅速降低或转阴, 据报告

其有效率同拉咪呋啶接近或更高^[7]. 但阿德福韦对拉咪呋啶应用后出现的 YMDD 变异株(包括 YVDD 和 YIDD 变异)病毒有很强的抑制作用, 强度不低于对野生株的作用, 因此可用于对拉咪呋啶耐药的患者, 也可以用于对拉咪呋啶不敏感的患者. 二是成人长期用药后(目前已用药 2 a 以上)未发现任何与药物有关的病毒变异现象, 因此也就未发现与病毒变异有关的耐药现象. 有希望不久可用于儿童.

2 孕妇与乙型肝炎

妊娠以后, 孕妇新陈代谢增加, 营养消耗过多, 机体发生一系列生理变化. 妊娠期肝炎以乙型占绝大多数. 随妊

表 2 儿童慢性乙型肝炎治疗策略

HBeAg	HBV DNA	ALT	治疗策略
+	+	<2 倍正常值	IFN- α 及拉咪呋啶效果差, 监测患者若 ALT 升高, 可以考虑治疗
+	+	>2 倍正常值	IFN- α 及拉咪呋啶治疗, 对 IFN- α 无效或有禁忌证的患者, 拉咪呋啶治疗
-	+	>2 倍正常值	IFN- α 及拉咪呋啶治疗, 需要长期治疗
-	-	<2 倍正常值	不需治疗
+/-	+	肝硬化	代偿期: IFN- α 及拉咪呋啶治疗(密切监测患者)失代偿期: 拉咪呋啶, 目前未定最佳疗程.
+/-	-	肝硬化	代偿期: 观察 失代偿期: 肝移植

表 3 妊娠期黄疸的鉴别诊断

	肝组织学	妊娠期	黄疸	临床表现	ALT
急性脂肪肝	脂肪变	36-40 wk	呕吐, 1-2 wk 后黄疸	脑病、肾衰、出血	增高
妊娠期肝内淤胆	灶性淤胆	7~39 wk, 再孕再发	瘙痒后见黄疸	消化道症状、肝肿痛	正常
先兆子痫	出血、梗死性坏死	> 20wk	少数为溶血性	水肿、高血压、蛋白尿、	正常
毒血症			黄疸	DIC	增高

娠周数的增加, 妊娠期肝炎的发病率、重症肝炎的发生率及死亡率亦增加, 肝炎和妊娠间互有影响也加重, 对胎儿及新生儿可造成威胁, 甚至早产、死胎. 2.1 妊娠期生理特点 妊娠期肝大小和组织学正常. 妊娠时肝脏的负荷增加, 子宫压迫引起门静脉系统循环减缓, 导致肝脏处理解毒能力的相对和绝对下降, 并随妊娠期增加而更趋严重. 2/3 健康孕妇因雌激素过高出现肝掌和蜘蛛痣, 而分娩后很快消失, 原因就在于此. 正常妊娠不会引起 ALT 和 AST 的升高, 而血清 ALP 自妊娠开始就逐渐升高, 分娩时达正常 2-4 倍, 产后 2-8 wk 恢复正常. 妊娠中期白蛋白下降大约 20%, 而 α 和 β 球蛋白末期轻度升高, γ 球蛋白末期可轻度降低. 妊娠时期的免疫状态轻度降低对 HBV 感染的发生发展无明显影响.

2.2 妊娠期肝炎临床特点 除一般的肝炎症状外, 在肝炎基础上合并妊娠其妊娠反应可较重, 而孕期乙型肝炎可发生在妊娠的任何时间, 症状如恶心、呕吐、疲

乏、不适, 可类似正常妊娠反应. 孕妇乙型肝炎与同龄妇女在发病后的临床过程、生化试验和肝组织病变并无明显差异. (1) 乙型肝炎对孕妇的危害病毒 HBV 携带者早孕反应加重, 妊娠中、晚期妊高征发生率增高, 其原因可能与肝脏功能有损害时, 对醛固酮灭活能力下降有关. HBsAg 阳性产妇比阴性产妇的产后出血、切口感染、宫内感染增多. 实际上对所谓 HBV 携带者活检可见基本肝组织正常者只有 1/2 左右, 其余均为慢活肝、脂肪肝等, 而且妊娠使肝脏受损可能性更大、更重, 故不可掉以轻心. (2) 妊娠对乙型肝炎的影响仅个别情况妊娠可致 HBV 携带者病变活动; 轻型患者如多次妊娠、或产后哺乳, 可能加重病情. 较重的慢性乙型肝炎或肝硬化患者, 常有闭经和性欲减退, 很少怀孕. 怀孕后尤其在妊娠期晚期肝脏负荷达高峰, 易引起肝脏大块坏死性病变, 临床发生急性或亚急性重型肝炎, 导致肝功能衰竭. 另外在妊娠期由于内分泌变化, 卵巢和胎盘产生激素增多, 妨碍肝脏的脂肪运转及胆汁排

泄,可造成肝内胆汁瘀滞而发生瘀胆型肝炎。(3)乙型肝炎对妊娠的影响国外以往多认为肝炎对妊娠除早产率较高外,无其他影响,产儿的存活率取决于分娩时其成熟程度,与母亲病情直接关系较小,但目前观点以有所变化^[6]。国内统计早、中期妊娠约有20-30%流产,尤其以中、晚期妊娠者胎儿及新生儿死亡比较高,其原因主要是此期重型肝炎发生率过高。在妊娠末期发生的急性乙型肝炎,可能引起早产、死产和新生儿窒息。慢性乙型肝炎已经静息、肝硬化者的代偿功能良好,可能无明显妨碍;但亦可引起早产、死产或新生儿窒息。死亡率以晚期妊娠患者最高。HBV感染对胎儿似无致畸作用,亦不引起先天性疾病。肝炎患者流产、早产及胎死率较高,其原因可能有全身病毒血症,胆红素代谢障碍,血中胆酸含量增高,共同刺激易引起子宫兴奋收缩。

2.3 鉴别诊断 孕妇出现黄疸必须与以下可引起妊娠期黄疸的疾病鉴别^[1],见表3。

2.4 治疗处理及预后 对肝炎的处理在孕妇与非孕妇的原则相同。目前大部分临床肝炎治疗用药对孕妇禁用或慎用,加上孕期肝脏负荷较大等因素,孕期肝炎的恢复常不理想,肝功能持续恶化者不在少数,治疗较为棘手。具体用药可根据经验和药物说明来选择,尽可能减少药物数量和种类,治疗时间选择妊娠中晚期,可不必等妊娠结束后才进行抗病毒治疗。患有乙型肝炎的妇女,最好在HBV DNA阴转及肝功能基本正常6 mo后怀孕,妊娠晚期酌情使用抗病毒治疗,拉咪呋啶可试用^[9]。

妊娠早期发生肝炎一般较轻,妊娠对轻、中型病毒性肝炎也没有明显的影响,预后大多良好,可在密切观察下继续妊娠,但须特别注意休息和营养。早期重型慢性乙型肝炎和代偿性肝硬化,食管静脉无明显曲张,无明显出血倾向,孕妇年龄不大,若患者要求也可在密切观察下继续妊娠。妊娠中、晚期发生肝炎,尤其是中晚期重型肝炎或失代偿的肝硬化,妊娠和肝炎相互影响较大,常促使流产、早产、死胎、死产和产后大出血,最好尽早终止妊娠;妊娠末期发生急性乙型肝炎,应密切观察病情。如病情较重,须警惕加重为急性肝衰竭,此时不一定终止妊娠。因衰竭的肝脏常难负荷较大手术,应尽量避免剖腹产。胎儿确已死亡者及早引产有利于肝功能恢复,可用产钳以缩短产程。对有凝血机制障碍者,产前适当补给维生素K、少量新鲜冰冻血浆,尽量减少会阴切开术及剖宫产术,必要时加强对切口护理,同时应用对肝损害小的广谱抗生素预防感染。对晚期妊娠的暴发型肝炎及早应用大量冻干血浆有预防弥散性血管内凝血所致大出血的作用^[3]。

3 HIV感染者与乙型肝炎

人类免疫缺陷病毒(HIV)与HBV具有许多重要共性,如二者有相似的传播途径,故二者重叠感染的机会是非常大的。目前尚无国内HIV/HBV重叠感染率的准确报道,根据国外报道HIV/AIDS患者的HBV感染率高达61-95%,

从国内HBV的高感染率推测HIV/HBV重叠感染率也相近。HIV/HBV重叠感染患者男性显著高于女性,青少年患者占半数以上,HIV/HBV的传播途径主要为血液和性乱传播。HIV/HBV的重叠感染可改变HBV自然病史,加剧HIV感染的病程,严重影响临床防治^[10]。

3.1 临床特点 HIV/HBV重叠感染者的起病多较缓,肝病的临床症状多不明显,主要特征为长期发热、消瘦、全身酸痛、浅表淋巴结肿大、慢性腹泻及瘙痒性皮炎,但无特异性。重叠感染者中HBsAg、HBeAg阳性而无症状者比例明显增多,急性肝炎极少(<5%)。试验室检查总胆红素、ALT轻微异常者居多,持续时间较长。死亡率非常高。

HIV/HBV均可感染淋巴细胞和肝细胞,并在分子水平上相互影响,HIV可增强HBV的感染力。体内外试验表明,HBV的X蛋白亦可刺激HIV的潜在基因,并作为协同因子增强HIV复制,促进HIV病情发展及传播。HIV/HBV重叠感染后,HIV所致的免疫功能紊乱可使HBV的自然病程发生改变,大约20%的患者可发展为携带状态。Gilson et al^[11]认为HIV/HBV重叠感染可致肝细胞表达HBsAg和DNA聚合酶活性增加,血液中HBV DNA显著增高,并可使原已无法测出HBsAg的乙型肝炎患者的HBV DNA被重新检出,但ALT峰值低,肝组织学损害轻微。由于慢性患者的肝损害主要属于T细胞介导的细胞毒性免疫性肝细胞溶解反应,HIV致使细胞毒性T细胞减少,因而患者临床症状轻微,体征和组织学改变不显著^[12]。

3.2 预防及处理 吸毒和性乱人群的HBV感染率明显高于当地一般人群,提示该人群特殊的社会行为与HBV感染有关,如静脉吸毒共享注射器及使用未消毒的注射用具和毒品稀释液有密。因此,加强对该类人群的管理,杜绝其不良的社会行为,提倡使用一次性注射器和进行安全性行为的教育,不仅对降低HBV感染率而且对阻断HIV的传播都具有十分重要的意义^[13]。

肝炎活动时治疗原则同成人患者,可根据具体情况调整。尽管HIV/HBV重叠感染者肝组织学损害轻微,且极少有肝硬化及暴发性肝炎发生,但HBV复制增强,促使HIV难以根除并加速AIDS临床症状恶化,抗病毒治疗更为棘手。拉咪呋啶及干扰素对HIV/HBV重叠感染疗效都不理想,治疗4 a以后约有90%耐药。阿德福韦用于HIV/HBV重叠感染者的疗效尚待观察。

4 参考文献

- 1 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:304-314
- 2 Chongsrisawat V, Poovorawan Y. Management of chronic hepatitis B and C virus infections. *Indian J Pediatr* 2002;69:149-154
- 3 刘泽富, 聂青和. 病毒性肝炎的诊断和治疗. 北京: 人民军医出版社, 2001:1-630
- 4 Selimoglu MA, Aydogdu S, Unal F, Zeytinoglu A, Yuce G, Yagci RV. Alpha interferon and lamivudine combination therapy for chronic hepatitis B in children. *Pediatr Int* 2002;44:404-408
- 5 Yuce A, Kocak N, Ozen H, Gurakan F. Prolonged interferon alpha treatment in children with chronic hepatitis B. *Ann Trop*

- Paediatr* 2001;21:77-80
- 6 Dikici B, Bosnak M, Bosnak V, Dagli A, Davutoglu M, Yagci RV, Haspolat K. Comparison of treatments of chronic hepatitis B in children with lamivudine and alpha-interferon combination and alpha-interferon alone. *Pediatr Int* 2002;44:517-521
 - 7 Papatheodoridis GV, Dimou E, Papadimitropoulos V. Nucleoside analogues for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and viral resistance. *Am J Gastroenterol* 2002 ;97:1618-1628
 - 8 Has R, Yuksel A, Topuz S. Hepatitis B infection in pregnancy: is it really not harmful to the fetus? *Prenat Diagn* 2001;21:701-702
 - 9 Tomasiewicz K, Modrzewska R, Krawczuk G, Lyczak A. Lamivudine therapy for chronic hepatitis B virus infection and pregnancy: a case report. *Int J Infect Dis* 2001;5:115-116
 - 10 Berger A, Preiser W. Viral genome quantification as a tool for improving patient management: the example of HIV, HBV, HCV and CMV. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:713-721
 - 11 Gilson RJ, Hawkins AE, Beecham MR, Ross E, Waite J, Briggs M, McNally T, Kelly GE, Tedder RS, Weller IV. Interactions between HIV and hepatitis B virus in homosexual men: effects on the natural history of infection. *AIDS* 1997;11:597-606
 - 12 Thio CL, Seaberg EC, Skolasky R Jr, Phair J, Visscher B, Munoz A, Thomas DL. Multicenter AIDS Cohort Study. HIV-1, hepatitis B virus, and risk of liver-related mortality in the (MACS). *Lancet* 2002;360:1921-1926
 - 13 Bonnet F, Lawson-Ayayi S, Thiebaut R, Ramanampamonjy R, Lacoste D, Bernard N, Malvy D, Bonarek M, Djossou F, Beylot J, Dabis F, Morlat P. A cohort study of nevirapine tolerance in clinical practice: French aquitaine cohort, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2002;35:1231-1237

病理学检测在慢性乙型肝炎诊断治疗中的价值

郎振为

郎振为, 北京佑安医院病理科 北京市 100054
项目负责人: 郎振为, 100054, 北京市丰台区右安门外西头条8号, 北京佑安医院病理科. langzw@21n.com
电话: 010-63055864 传真: 010-63293371
收稿日期: 2002-12-10 接受日期: 2002-12-20

郎振为. 病理学检测在慢性乙型肝炎诊断治疗中的价值. 世界华人消化杂志 2003;11(6):772-774

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/772.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒是一种嗜肝病毒, 感染肝组织后, 常使肝脏出现一定的病理变化, 通过对活体或尸解肝组织病理检查, 可以对病变的器官或组织直观地观察形态和结构的改变、了解病变的发展阶段及其趋势, 分析判断机体的抗病毒机能状态, 是明确诊断、判断炎症活动度、纤维化程度以及药物疗效的金标准。此外, 采用分子病理学的检测技术还可以对肝组织中的乙肝病毒的抗原或核酸进行原位检测, 以验证或确定 HBV 的感染及病毒复制状态。

1 慢性乙型肝炎与肝脏活检

限于尸体解剖的广泛开展, 更多的病理诊断是基于肝

脏活检。尽管 1.5 cm 长的肝针吸组织仅占肝组织的 1/10 万, 但许多肝脏疾病时所出现的病变较为均一, 能较准确地反映肝组织的病变指导临床工作。40 a 前, Schiff 的 1 324 例肝活检资料中, 约 75 % 为临床诊断提供了重要帮助; 约 50 % 的检查结果证实了临床诊断; 大约 25 % 的病理检查改变了原临床诊断。近年来的分子生物学突飞猛进, 更大大地提高了病理检查在肝病诊断的价值。

肝脏具有强大的代偿功能, 常常可以观察到肝组织病变十分明显, 而临床症状及实验室改变缺如或轻微, 有时会在肝组织形态学改变很久以后, 才会出现临床和实验室检查的异常。病毒性肝炎是一种变质为主的炎症, 慢性乙型病毒性肝炎除具有肝细胞胞质疏松化、气球样变、嗜酸性变性以及点、灶性坏死等基本病变外, 汇管区及汇管区周围炎症常较明显, 较重者可出现碎屑坏死、桥接坏死及融合性坏死。慢性乙型肝炎时, 常可见到三种桥接坏死形式中的两种类型; 汇管-汇管型桥接坏死最常见于慢性活动性肝炎, 多数学者认为是碎屑坏死扩展而成。汇管-中央型桥接坏死多见于较重的慢性活动性肝炎, 从周边坏死扩大至小叶中央区, 破坏小叶结构, 较易进展成肝硬化。据资料统计, 桥接坏死者中约 18 % 能进展成肝硬化。多小叶融合坏死也常导致小叶结构紊乱。坏死常导致不同程度的肝纤维化, 包括汇管区、汇管区周围纤维化、局限窦周纤维化及纤维间隔形成。

2 慢性病毒性肝炎的病理学诊断标准

2000 年由中华医学会传染病与寄生虫学分会修订的“病毒性肝炎防治方案”中, 将慢性病毒性肝炎病变炎症活动度(G)及纤维化程度(S)分别分为 G1-G4 和 S0-S4。当肝小叶中出现肝细胞变性, 点、灶性坏死或凋亡小体; 汇管区无或有单个核细胞浸润、扩大, 无或有限局性界面性炎症, 而小叶结构完整时, 肝组织学改变可为 G1-2 及 S0-2, 临床上为轻度慢性肝炎。当小叶内炎症明显, 出现融合坏死或少数桥接坏死, 汇管区界面性炎症明显, 约 50 % 的界板被破坏, 出现纤维间隔。但小叶结构大部分仍保存时, 肝组织的病变为 G3 及 S1-3, 临床上为中度慢性肝炎。当汇管区炎症严重或伴重度碎屑坏死; 桥接坏死累及多数小叶, 以及大量纤维间隔形成, 致使肝组织结构破坏时, 肝组织病理学诊断为 G4 及 S2-4, 临床上为重度慢性肝炎。

临床上诊断为轻度、中度和重度慢性肝炎者, 经肝组织病理检测, 其符合率分别为 75.8-85.7 %、43-45.1 % 及 28-55.6 %。因此, 临床上诊断为慢性肝炎中、重度者有必要采用肝穿刺活检证实。临床上诊断为轻型肝炎的患者中有 1/4-1/5 经病理证实为中、重度, 甚至是早期肝硬化。一些资料表明慢性肝炎中度和重度较轻度有更好的抗病毒治疗效果, 因此, 通过肝组织的病理检查及分级, 结合患者的血清转氨酶和病毒水平, 能更准确的预测哪些患者可能获得抗病毒治疗的效应^[1]。

在对肝组织炎症和纤维化进行半定量评估以及比较抗病毒治疗疗效方面,最常用的是 Knodell et al^[2]的组织学活动指数(histological activity index, HAI)评分系统,分别按界面性炎症、及桥接坏死的程度按 0-10 分评定;按小叶内肝细胞变性和坏死的范围及汇管区的炎症状况分别记分为 0-4 分,按纤维化的程度分别记 1-4 分. HAI 值可以综合反映肝组织的损伤程度.此外,根据治疗前后的分值变化来评定药物治疗的效果,如治疗后较治疗前总分值 ≤ 2 分以上者为改善;HAI 变化 $+1$ & -1 为未改善;HAI 上升 2 分时为恶化.

Knodell 评分系统在炎症活动度方面划分较细致,易于掌握,但在纤维化分值方面偏低,过于简单.其后, Scheuer (1991 年)、Ludwing (1993 年)、Desmet (1994 年)、Ishak (1995 年) et al 相继提出了修改方案. 1994 年法国 Chevallier et al^[3]提出了纤维化的形态结构与间隔数量相结合的半定量评分系统较为合理,随后国内王泰龄又加以修改^[4],此方案除根据小叶内的纤维化及汇管区的间隔长度给予一定分值外,还将纤维间隔的数量和宽度分值相乘并 2 倍化,这样仅在纤维化方面,最大分值可达到 29 分,抗纤维化治疗显效的标准为治疗后较治疗前计分 ≤ 5 分,有效为 ≤ 2 分.

慢性乙型肝炎除汇管区炎及其界面性炎和纤维化外,毛玻璃样肝细胞的出现有助于乙型肝炎慢性化病变的诊断.在镜下其形态特点为肝细胞胞质内可见卵圆形或圆形的斑块,有时其边缘呈空晕状,HE 染色后呈浅依红色、细颗粒状,具有毛玻璃的外观.电镜下可见成丛增生的滑面内质网,在囊内含有丝状 HBsAg,地衣红或醛品红可显示病毒抗原中的二硫键,也可通过免疫组化证实.毛玻璃样肝细胞多见于 HBV 无症状携带者和轻度慢性肝炎,多属免疫耐受期的病毒高度复制状态.临床上一些诊断为急性病毒性肝炎者肝组织中查见毛玻璃样肝细胞时,可诊断为慢性肝炎急性发作.鉴于光面内质网增生聚集改变无特异性,在一些药物性肝损害等非特异性病变时也可观察到毛玻璃样肝细胞,需经免疫组化检测 HBsAg 阳性,方可定为慢性 HBV 感染.

慢性乙型病毒性肝炎肝组织中也可见到不同程度的肝脂肪变性,肝脂变多为小泡性,弥散分布.近来我们发现一些慢性乙肝肝组织中具备酷似非酒精性脂肪肝病特点,如汇管区病变轻微,位于小叶 III 区、占据肝小叶 2/3 的大泡性脂变混杂以胞质疏松化或气球样变的肝细胞,脂性肉芽肿等.经免疫组化显示 HBsAg 或 HBcAg 阳性信号出现于胞质疏松化或气球样变的肝细胞质或核内,表明慢性乙型肝炎时同样也存在有肝脂肪变性.其他的一些肝组织学改变也有助于慢性肝炎的诊断;如肝实质炎症轻,汇管区病变重,汇管区周围炎伴色素性吞噬细胞.汇管区淋巴细胞滤泡形成、小叶内及汇管区浆细胞浸润而甲型肝炎 IgM 抗体阴性以及汇管-中央型桥接坏死或汇管-汇管型桥接坏死出现均提示慢性化.

3 慢性乙型肝炎的分子病理学检测

在病理检测工作中常可见到一些慢性无症状 HBV 感染者,即血清学病毒标志阳性 6 mo 以上,无肝病相关症状和体征,血清转氨酶正常者,其肝组织中甚至存有 G3 以上的炎症性病变.

骆抗先 et al 曾报道一组 261 例慢性无症状携带者的肝组织检查结果;正常者仅约 10%,灶性炎和非特异性反应性炎症占 45%,有汇管区炎的轻度慢性肝炎约为 25%,有明显小叶病变的慢性炎症和有界面性炎症的慢性肝炎各约 10%,其中有个别病例已是早期肝硬化^[5].杨柳明 et al^[6]报道的 327 例转氨酶正常的慢性乙型肝炎感染者中,均有炎症及不同程度的肝纤维化,其中 G3 占 23 例(7%);S3-4 为 33 例(10.1%).

免疫组化和原位杂交等分子病理学检测手段有助于慢性乙型肝炎的病原学诊断.约 30-40%的血清病毒学标志全阴性的患者经免疫组化可检测出肝组织 HBsAg 或/和 HBcAg 阳性.在血清学 HBV 阳性的肝组织中 HBsAg 的检出率约为 78-94%,HBsAg 阳性细胞在肝组织中的分布极不规则,故临床送检单注明血清 HBV 标志阳性时而免疫组化呈阴性结果时,需重复作免疫组化检测.此外,用 HBsAg 阳性细胞在肝组织中的数量进行半定量分析是不可靠的.

根据 HBsAg 在肝细胞胞质中的分布形态可分为包涵体样型、周边型、弥漫型、膜型和过渡型,有时同一肝组织切面可以观察到几种类型 HBsAg 的表达.其中以包涵体样型最为多见;其次为弥漫型,指阳性物质呈很细的颗粒状,均匀地分散在肝细胞胞质内,此型尤多见于血清 HBeAg 和 HBV DNA 阳性患者;其余各型并不多见,检出率在 10% 以下.

HBcAg 的检出率在 61-75% 左右.根据阳性物质的分布形态可分为核型、浆型和膜型.核型和浆型常混合存在,单独膜型表达甚为少见.

一般情况下,浆型和膜型 HBsAg 及 HBcAg 的表达,提示有 HBV 的活跃复制,肝组织多有活动性的炎症病变;而包涵体样型或周边型 HBsAg 和核型 HBcAg 则多与 HBV DNA 整合状态有关,肝组织炎症病变多相对静止.抗病毒治疗后,肝组织中 HBcAg 浆型转变为核型以及肝细胞内 HBcAg 减少也往往作为抗病毒治疗有效的观测指标之一.

Pre-S1 和 Pre-S2 在肝组织中的检出率略低于 HBsAg,约为 55-65%,其表达类型及分布同 HBsAg. HBeAg 阳性物质在肝细胞中表达较 HBsAg 或 HBcAg 弱,分布与后者类同.

一些文献曾认为;乙型肝炎 e 抗原阳性者,很可能进展成慢性活动性肝炎,然而,新近的一些文献认为;抗-HBe 阳性的慢性乙型肝炎患者中肝组织炎症、坏死及肝纤维化的程度较 HBeAg 阳性者严重,可能与 HBeAg

的消失可使更多的细胞毒性T细胞(CTL)进入肝组织对感染的肝细胞进行攻击,导致肝损伤加重,也可能与HBV前C/C变异有关^[7]. HBxAg的检出率为43-73%,多于胞质内表达,核型和膜型少见. Pre-S1、Pre-S2、HBeAg及HBxAg一般不作为常规分子病理学检测,仅用于一些科研检测如肝癌及癌周组织中的检测.

根据核酸碱基互补的原理,1991年由Lan创建了肝组织切片中HBV DNA原位杂交检测技术,此技术能从形态学方面观察病毒核酸的数量及定位,较免疫组化敏感和特异,特别适于患者血清学病毒标记阳性而免疫组化反复检测阴性或血清阴性、免疫组化阳性时确诊HBV感染以及是否需采取抗病毒治疗. 与免疫组化相比,原位杂交检测操作复杂;须选择适当的阴、阳性对照,肝细胞中病毒拷贝数较低时,不易检出. 原位PCR则结合了PCR和原位杂交的优点,较原位杂交提高了40-50%的敏感性,但也存在操作复杂、成本高,仅适合于特殊要求或科研.

乙型肝炎病毒并不是严格的嗜肝病毒,借助于与前S1受体的结合,以及细胞膜上假设的IgG受体、IL-6受体、无涎糖蛋白受体以及膜联蛋白(annexin)V等,病毒颗粒能选择性的附着并侵入人体非肝细胞. 肝外组织的HBV感染可成为病毒的贮存场所,对于乙型肝炎病毒感染的慢性化、感染的再活动、移植肝的再度感染和抗病毒治疗的复发,都可能起着重要的作用.

近年来对肝组织中一些细胞因子的检测也有助于临床诊疗水平的提高. Fas/FasL及PCNA/Ki67的检测可以了解肝细胞的凋亡及增生状态;肝星状细胞的凋亡及数量减少是治疗肝纤维化逆转过程中的先期信号. 转化生长因子 β (TGF- β)和血小板源生长因子(PDGF)等细胞因子作为促肝纤维化的重要调节因子作用已较明确,这些因子可直接作用于肝星状细胞和肝细胞等,使其增生、活化,分解及产生细胞外基质导致肝纤维化的发生. 采用抗- α SMA免疫组化方法,可以显示肝星状细胞的存在,通过治疗前后肝星状细胞数量或凋亡的变化,可以判断抗纤维化药物的疗效. 新近文献介绍了肝星状细胞标记物,纤维母细胞激活蛋白(fibroblast activation protein, FAP)的表达与肝组织的炎症记分和纤维化程度较 α -SMA更为相关.

4 慢性乙型肝炎的病理组织学鉴别

慢性乙型肝炎须与以下其他病因引起的慢性肝炎病理组织学病变鉴别.(1)自身免疫性肝炎;女性多见,血清ANA、SMA阳性,或LKM、SLA阳性,转氨酶升高,镜下可见界板碎屑坏死,汇管区单个核细胞尤其是浆细胞浸润明显,通常伴门静脉周围及小叶内炎症,肝细胞脂肪变性,有时也可见胆管损伤破坏等病变.(2)慢性丙型肝炎;较为特征性的5项组织学改变有门脉区淋巴细胞

或滤泡形成聚集,胆管损伤,大泡性脂肪变性,小叶内Kupffer细胞或淋巴细胞聚集及受损细胞出现Mallory小体样物质. 借助于血清丙型肝炎抗体和/或HCV RNA阳性,肝组织抗HCV NS₃Ag或HCV NS₅Ag免疫组化可明确诊断.(3)药物诱发性慢性肝炎:服药史、胆汁淤积性改变、肝细胞坏死、脂肪变性及肉芽肿有助于诊断. 停药后数周或数月肝组织可恢复正常.(4)原发性胆汁性肝硬化:主要的组织学改变为小叶间胆管变性坏死、基底膜破坏,并伴有淋巴细胞、浆细胞浸润,汇管区淋巴细胞密集,甚至滤泡形成,肉芽肿出现,小叶间胆管减少消失,细小胆管增生,肝细胞羽毛状变性,后期可出现肝纤维化和肝硬化.(5)原发性硬化性胆管炎:肝内、肝外或肝内外胆管的纤维性炎症为特征性病理改变,表现为胆管壁增厚、炎症细胞浸润,以及呈“洋葱”样的纤维化.(6) α 1-抗胰蛋白酶缺乏症:最特征的组织学表现为肝小叶周围的肝细胞质内出现抗PAS阳性小体,呈小滴状. 此外,还可出现多种改变包括肝细胞变性、巨细胞形成、胆汁淤积、门脉纤维化、胆管炎和肝硬化. 免疫组化可用于证实肝细胞内小体的存在,但在其他一些肝脏病变时也可观察到这种小体,需作进一步检查.(7)Wilson病:可出现类似慢性活动性肝炎的组织学改变,包括气球样变、糖原样细胞核、嗜酸性小体及单个核细胞浸润. 肝小叶外围部位铜过量淤积时会导致肝细胞坏死、胆汁淤积和脂肪变性. 肝细胞内可出现铜染颗粒及不典型的脂褐素颗粒有助于诊断,但铜也常见于任何慢性胆汁淤积性疾病,在再生结节中呈阴性着色,而使其特异性降低.(8)酒精性肝病:早期为肝脂肪变,进展可出现肝细胞水样变性、气球样变,中性粒细胞浸润, Mallory小体,肝纤维化及肝硬化.(9)非酒精性脂肪肝病:无饮酒史,肝小叶Ⅲ区为主的肝脂肪变性,混合性炎症细胞浸润,肝细胞气球样变,肝细胞坏死,糖原核, Mallory小体以及肝脏纤维化.

5 参考文献

- 1 郎振芳,徐瑞平,王思葵,仇洪田,斯崇文,崔振宇,田庚善. 单磷酸阿糖腺苷治疗慢性乙型肝炎的肝组织学前瞻性研究. 中华内科杂志 2001;40:394-397
- 2 Knodell RG, Ishak KG, Black WC, Chen TS, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan TW, Wollman J. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. *Hepatology* 1981;1:431-435
- 3 Chevallier M, Guerret S, Chossegros P, Gerard F, Grimaud JA. A histological semiquantitative scoring system for evaluation of hepatic fibrosis in needle liver biopsy specimens: comparison with morphometric studies. *Hepatology* 1994;20:349-355
- 4 王泰岭,刘霞,周元平,何静雯,张晶,李宇章,段钟平,王宝恩. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案. 中华肝病杂志 1998;6:195-197
- 5 骆抗先. 乙型肝炎临床与活体组织病理. 第1版. 北京:科学出版社, 2001:235
- 6 杨柳明,赵延龙,吴志荣,陈杜芳,岑卓英,徐克成,左建生,危北海. 肝活检对转氨酶正常的慢性乙型肝炎感染的临床意义. 中华消化杂志 2001;21:590-592
- 7 Fattovich G, Brollo L, Alberti A, Giustina G, Pontisso P, Realdi G, Ruol A. Chronic persistent hepatitis type B can be a progressive disease when associated with sustained virus replication. *J Hepatol* 1990;11:29-33

经皮肝脏活体穿刺活检技巧及研究进展

滕光菊, 聂青和

滕光菊, 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: 聂青和, 710038, 陕西省西安市新寺路1号, 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. nieqinghe@hotmail.com
电话: 029-3377742 传真: 029-3537377
收稿日期: 2002-12-10 接受日期: 2002-12-20

滕光菊, 聂青和. 经皮肝脏活体穿刺活检技巧及研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(6):775-776
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/775.asp>

0 引言

为了早期、快速、准确地诊断肝脏疾病, 经皮肝脏穿刺活检(percutaneous liver biopsy)是目前确诊肝脏疾病科学、简便、有效的方法之一。一般而言, 凡肝脏疾患通过临床、实验室或其他辅助检查, 仍无法明确诊断者, 可考虑作此检查。然而肝脏穿刺活检是有一定创伤性的。一项问卷调查表明, 29.5%的医生不愿意使用肝组织活检, 主要原因是担心其危险性^[1]。鉴于此, 我们探讨一下临床上经皮肝脏穿刺活检的技巧, 回顾该技术的最新研究进展。

1 经皮肝脏穿刺活检

1.1 肝组织活检的指征 即便对于熟练的操作者, 经皮肝组织活检仍具有潜在的危险性。仅在明确肝脏的组织学改变对患者的益处超过活检所承受的风险时, 肝活检才是必要的。因此, 肝组织活检一般在下列情况下进行: (1)不明原因的肝炎; (2)肝代谢性疾病; (3)肝脏占位性病变; (4)肝移植患者; (5)肝脏酶异常等。例如, 有人曾对1 020例小儿肝活检进行分析, 显示非病毒性肝损害占9.6%, 其中病因达18种之多, 前5位是: (a)与脂类代谢有关的疾病; (b)肝豆状核变性; (c)肝糖原储积症; (d)进行性肌营养不良; (e)自身免疫性肝炎。由此, 肝活检可以为肝病的诊断提供重要的线索。

1.2 术前准备 做好一切术前常规准备, 尤其要注意出凝血时间和凝血酶原时间, 如不正常则应肌注维生素K34 mg, 1次/d, 共3 d, 并口服钙剂及维生素C或进行成分输血等临床处理, 待各项检查正常时方可穿刺。对于存有凝血障碍的肝硬化患者, 给予小剂量的重组因子VIIa治疗后, 即可予以纠正, 可以进行肝组织活检^[2]。

1.3 操作方法 关于其操作方法, 许多教科书和杂志上均有描述, 我们一般采取以下过程: (1)患者取仰卧位, 稍向左侧, 背部可垫一枕, 并预先铺好腹带, 右臂上举于头后。一般取腋前线第8肋间和腋中线第9肋间为穿刺点, 肝肿大超出肋缘下5 cm以上者, 亦可自肋缘下穿刺; (2)皮肤常规消毒, 铺无菌巾, 2%利多卡因局部麻醉应达肝包膜。用特制的带有针芯活塞的薄壁穿刺针或无针芯

的薄壁穿刺针(针尾垫一小片棉花或扎一小片细纱布, 以阻挡吸得的肝组织进入注射器), 将针栓连接硬质胶管, 以丝线扎紧, 管之另端与20 ml注射器连接, 内盛3-5 ml无菌生理盐水; (3)用穿刺锥于穿刺点皮肤上刺一小孔。助手持注射器, 术者将穿刺针通过皮肤小孔沿肋骨上缘于胸壁垂直方向刺入0.5-1 cm。将注射器内盐水推出少许, 以排出可能存留于针腔内的皮肤及皮下组织; (4)抽吸注射器造成负压, 嘱患者在深吸后呼气末屏息片刻(宜预先练习2-3次)。于开始屏息时, 迅速将针直线刺入肝脏, 并立即拔出, 深度不超过6 cm。将针头内的肝组织注入甲醛瓶内或其他特定的固定液瓶内; (5)穿刺部位盖无菌纱布, 扎以腹带, 压上小沙袋, 平卧6 h, 测脉搏、血压等。

妊娠合并病毒性肝炎患者穿刺时间最好在孕妇妊娠35 wk以后, 以防穿刺引起早产。穿刺点要高于正常位置, 一般根据肝浊音界选5-6肋间平腋中线, 必要时作B超定位, 穿刺深度宜浅, 皮下进针4-5 cm, 术后除观察患者情况外, 还要紧密观察胎儿心音变化。

对于儿童, 由于小儿的生理和心理特点, 要固定好儿童的体位, 对不能合作或精神过于紧张的儿童, 可在术前给予适量的镇静剂, 以免进针时儿童体位的变动, 使穿刺落空, 误伤相邻器官。Lachaux et al^[3]对144例婴儿和儿童进行了经皮肝脏穿刺, 仅1例有出血情况, 没有引起患儿死亡。但患有癌症和经历过骨髓移植的儿童肝活检后易出现出血和死亡^[4]。

1.4 并发症 肝组织活检后, 患者容易出现腹痛、出血、气胸等并发症, 部分患者因此要住院处理^[5]。对于腹膜后出血、肝被膜下血肿、感染性休克、动静脉瘘、胆漏等这些并发症较为罕见, 但亦有报道, 经皮肝脏穿刺活检后胆道出血的发生率为0-1%, 往往是一个不可预测、缺少症状或迟发性的并发症^[6]。最近, 对861例患者经皮肝组织活检并发症情况的回顾研究显示, 60例患者活检后2 h因为剧烈疼痛而要求静脉给予止痛剂, 12例患者活检后12 h出现血腹、血胸或严重低血压等严重并发症^[7]。Piccinino et al^[8]回顾了68 276例经皮肝组织活检的并发症情况, 由于血腹和其他恶性疾病或肝硬化等的死亡率为9/10万, 其中61%的并发症在活检后2 h, 96%在1 d之内发生。所以, 术后应卧床24 h。穿刺后头2 h内, 每30 min测脉搏、血压一次; 如无变化, 改为1次/h, 共6次。如有出血征象, 应考虑输血, 必要时请外科会诊。我们采用定位、麻醉和穿刺均为平静呼吸, 三点均在一个位置, 可以使患者无疼痛感。穿刺点局部用沙袋加压, 可防止皮下渗血, 腹部用腹带包扎, 可减少因呼吸引起的肝脏活动, 防止肝脏出血。一次单纯的肝穿活检可能同时发生多种肝内并发症, 所以肝脏穿刺活检时一定要谨慎认真对待。

2 讨论

活体组织穿刺术是采取肝组织标本的一种简易手段。肝活体组织穿刺方法有多种, 如一般穿刺术、套管针穿刺

术、分叶切取术和快速肝穿刺术等。目前,经皮快速肝穿刺术较安全,多为临床所采用。但必须预先训练患者屏息动作,以配合操作。穿刺针进入肝脏后绝对不得搅动,穿刺深度一般不超过6 cm。有下列情况者应视为禁忌:(1)出血倾向;(2)大量腹水;(3)肝缩小或浊音界叩不清;(4)疑肝包虫病或肝血管瘤者;(5)严重贫血或一般情况差;(6)肝外胆道阻塞;(7)细菌性胆管炎;(8)右侧胸腔或其他脏器有急性疾患者。(9)患者不能配合。最近的研究认为对于镰状细胞贫血肝病患者不应进行肝组织活检穿刺^[9],然而也有报告认为^[10],即便对于患有血友病的丙型肝炎患者,只要有适当的防范意识,也可进行肝组织活检。

对于肝脏活检穿刺的成功率方面,有时由于病灶太小,定位困难,未能刺中目标。但通常原因为:(1)穿刺针与注射器连接处漏气,未形成负压,故术前要仔细检查穿刺器械,要用玻璃注射器;(2)患者腹水较多,穿刺针进入腹腔后吸入腹水使负压消失;(3)重型肝炎患者由于肝细胞大块坏死,肝组织结构塌陷、缩小,穿刺抽不到肝实质组织。

随着影像医学的发展,B超引导下自动活检术和CT引导下的经皮肝穿刺活检技术,使取材准确,成功率高。回顾性研究发现,尽管超声引导的肝组织活检与肋间盲目穿刺下组织损伤没有显著区别,但超声引导下活检成功率明显升高,准确成功率可达99.8%^[11]。MRI可清晰显示病变大小、性状、位置以及病变与相邻结构的空间关系,尤其是能显示分辨出CT并扫时难以显示的等密度病灶。因此,MRI导引可精确地测算出进针角度和深度,并且显示进针路径,采用合适的MRI扫描有利于穿刺小的病灶,提高刺中率和活检正确率。据报道MRI导引针尖定位精确性在直径2-3 mm的范围^[12]。张雪哲 et al^[13]应用常规0.5T MRI扫描机对13例患者作MRI引导经皮肝穿刺活检,刺中率为100%,活检正确率为92.3%,未出现任何并发症。他们认为MRI导引经皮肝穿刺活检是一种安全、正确有效的诊断和鉴别诊断方法。

3 参考文献

- 1 Muir AJ, Trotter JF. A survey of current liver biopsy practice patterns. *J Clin Gastroenterol* 2002;35:86-88
- 2 Carvalho A, Leitao J, Louro E, Maia R, Galdes C, Ventura C, Silvestre M, Porto A. Small dose of recombinant factor VIIa (rFVIIa) to perform percutaneous liver biopsies in cirrhotic patients. *Rev Esp Enferm Dig* 2002;94:280-285
- 3 Lachaux A, Le Gall C, Chambon M, Regnier F, Loras-Duclaux I, Bouvier R, Pinzaru M, Stamm D, Hermier M. Complications of percutaneous liver biopsy in infants and children. *Eur J Pediatr* 1995;154:621-623
- 4 Cohen MB, A-Kader HH, Lambers D, Heubi JE. Complications of percutaneous liver biopsy in children. *Gastroenterology* 1992;102:629-632
- 5 Van Leeuwen DJ, Wilson L, Crowe DR. Liver biopsy in the mid-1990s: questions and answers. *Semin Liver Dis* 1995;15: 340-359
- 6 Rossi P, Sileri P, Gentileschi P, Sica GS, Ercoli L, Coscarella G, De Majo A, Gaspari AL. Delayed symptomatic hemobilia after ultrasound-guided liver biopsy: a case report. *Hepatogastroenterology* 2002;49:1659-1662
- 7 Wawrzynowicz-Syczewska M, Kruszewski T, Boron-Kaczmarek A. Complications of percutaneous liver biopsy. *Rom J Gastroenterol* 2002;11:105-107
- 8 Piccinino F, Sagnelli E, Pasquale G, Giusti G. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. *J Hepatol* 1986;2:165-173
- 9 Zakaria N, Knisely A, Portmann B, Mieli-Vergani G, Wendon J, Arya R, Devlin J. Acute sickle cell hepatopathy represents a potential contraindication for percutaneous liver biopsy. *Blood* 2003;101:101-103
- 10 Venkataramani A, Behling C, Rond R, Glass C, Lyche K. Liver biopsies in adult hemophiliacs with hepatitis C: a united states center's experience. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2374-2376
- 11 Gunneson TJ, Menon KV, Wiesner RH, Daniels JA, Hay JE, Charlton MR, Brandhagen DJ, Rosen CB, Porayko MK. Ultrasound-assisted percutaneous liver biopsy performed by a physician assistant. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1472-1475
- 12 Langen HJ, Stutzer H, Kugel H, Hesselmann V, Schulte O, Walter C, Landwehr P. Precision of MRI-guided needle placement-experimental results. *Rofo Fort Geb Rontg Neuen Bild Verf* 2000;172: 922-926
- 13 张雪哲,卢延,王武,洪闻,陆立,黄振国. 磁共振成像引导肝脏穿刺活检. *中华医学杂志* 2001;81:968-970

乙型肝炎的实验检查及其临床意义

郝春秋,聂青和

郝春秋,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:聂青和,710038,陕西省西安市新寺路1号,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. nieqinghe@hotmail.com
电话:029-3377742 传真:029-3537377
收稿日期:2002-12-10 接受日期:2002-12-20

郝春秋,聂青和. 乙型肝炎的实验检查及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11(6):776-780

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/776.asp>

0 引言

乙型肝炎在临床上的表现千变万化,给临床医生的诊断和治疗带来困惑。为了准确恰当的评估乙肝患者的病情,必须依赖相关的实验室检测和辅助检查,主要包括HBV血清标志物检测、肝脏酶类生化检测、肝组织病理学检查和B超、CT、MRI等影像学检查及胃镜等器械检查。本文主要探讨以上几种检查在乙型肝炎诊断中的临床意义。

1 HBV血清标志物的检测意义

1.1 HBV的抗原抗体系统

1.1.1 HBsAg和抗-HBs HBsAg是HBV的外膜蛋白,可作为HBV感染的标志,但不能反映病毒有无复制、传染性和预后^[1]。HBsAg有10个亚型,在流行病学及疫苗研制上有重要意义;临床可有不同亚型的HBV交叉感染,与病情轻重、转归及肝外表现有关^[2]。HBsAg阴性并不能完全除外HBV感染,人群中约有3%的HBV携带者HBsAg阴性,可能与S基因突变或HBsAg低水平表达使常规方法难于检出有关^[3]。

抗-HBs 为 HBV 抗体系统中唯一的中和抗体, 对 HBV 有保护性免疫作用, 主要见于乙肝恢复期、痊愈期或疫苗接种后. 慢性乙肝患者抗-HBs 出现后仍可有 HBV 复制, 但通常在 1 a 内 HBV-DNA 滴度逐渐下降至消失. HBsAg 和抗-HBs 通常不同时存在, 但当 a 决定簇变异时, HBV 能逃避抗-HBs 的中和并表达变异株的 HBsAg, 出现 HBsAg 和抗-HBs 的共存现象^[4]. 此外, 临床上也会遇到抗-HBs(+)而 HBsAg(-), 但病情仍继续发展的情况, 也是由于 a 决定簇变异所致, 需引起注意^[5].

1.1.2 HBeAg 和抗-HBe HBeAg 是 C 区编码的核壳蛋白的分泌型, 由前 C 蛋白在肝细胞内转移过程中, 经氨基端与羧基端分别去除 19 和 33 个氨基酸的修饰加工, 分泌到肝细胞表面和血液中形成 HBeAg^[6]. HBeAg 是临床上简便实用的判定 HBV 复制的血清标志物, HBeAg 存在于 HBV 感染早期, 如持续存在常提示慢性化. 在慢性 HBV 相关肝病中, HBeAg 的存在多伴有病变活动和 ALT 波动.

抗-HBe 阳性常提示 HBV 复制减少或停止, 病变趋向稳定, 但其并非保护性抗体. 血清 HBeAg/抗-HBe 转换被认为是 HBV 感染过程的转折点, 即由免疫耐受转为免疫激活, HBV 由复制活跃转为相对静止. 但当出现 HBV 前 C 区和 C 区基因突变时, HBeAg 不能表达, 此时尽管 HBeAg(-), 仍有 HBV-DNA 复制^[7], 且可能使其致病力增强, 这就是临床上常见到的 HBeAg(-), 抗-HBe(+)患者仍有高滴度 HBV-DNA 存在的原因.

1.1.3 HBcAg 和抗-HBc HBcAg 为 HBV 的核壳蛋白, 并不能直接在血清中检出, 通常用去垢剂除去血清中 Dane 颗粒外壳或将 HBcAg 与抗-HBc 免疫复合物离解时才能测到^[8], 其存在也是 HBV 复制的标志之一, 但并不列为常规检测项目, 不在乙肝五项检测项目之中.

抗-HBc 为 HBV 的另一种非保护抗体, 与抗-HBs 相比, 其产生更早, 滴度更高, 且存在更久. 高滴度

抗-HBc 表示现行感染, 常与 HBsAg 并存; 低滴度抗-HBc 表示过去感染, 常与抗-HBs 并存. 无论 HBV 是否清除, 抗-HBc 可持续存在数 10 a, 因而临床上常见单项抗-HBc(+)的患者^[9], 可有以下几种解释: (1)假阳性, 常规 ELISA 法假阳性率较高, 可用 RIA 法复查; (2)急性乙肝恢复早期 HBsAg 消失而抗-HBs 尚未出现的所谓“窗口期”; (3)自然感染者数年, 抗-HBs 滴度下降至不能检出而呈单项抗-HBc(+); (4)部分为 HBsAg(-)的 HBV 携带者; (5)被动获得抗-HBc.

1.1.4 HBxAg 和抗-HBx HBxAg 为 X 基因编码蛋白, 可在 HBV 感染的部分阶段检出, 常与病毒复制有关. 抗-HBx 亦为非保护性抗体, 可在 HBeAg(+)的活动性肝炎、肝硬化和原发性肝癌患者血清中检测到. 现认为 HBxAg 可转式激活肝细胞内的原癌基因, 促进肝细胞癌变, 因而 HBxAg 在肝癌细胞中的阳性率较高^[10].

1.1.5 前 S 抗原和抗-前 S 前 S1 和前 S2 抗原均为 HBV 外膜蛋白的组成部分, 见于 HBV 感染的最早期, 在 HBsAg 消失前消失, 为 HBV 清除的最早迹象. 前 S1 持续存在多提示慢性化, 尤以 HBV 慢性感染及 HBeAg(+)的慢性携带者检出率为高. 前 S1 常提示 HBV 复制^[11].

抗-前 S 是 HBV 感染过程中最早出现的抗体, 但存在短暂, 在急性感染的恢复期中仅存在 6-12 mo, 在自然免疫的人群中很少检出. 早期出现抗-前 S 提示 HBV 行将清除; 在急重肝患者中出现, 提示预后良好.

在临床上, 乙肝患者有不同的 HBV 抗原抗体组合, 他们分别代表着不同的临床意义, 要全面的、综合的和正确的对其判断, 才能作出恰当的诊断, 以利于制定正确的治疗方案. 下表列出了临床上常用的乙肝六项不同组合的主要临床意义(表 1).

1.2 DNA 多聚酶 为 HBV 最大的编码区 P 区编码, 是 HBV-DNA 合成必需的多聚酶, 为 HBV 复制的标志.

表 1 HBV 抗原抗体(乙肝六项)不同组合的临床意义

HBsAg	HBeAg	HBcAb	HBcAb-IgM	HBeAb	HBsAb	临床意义
+	+	-	-	-	-	急性 HBV 感染早期, HBV 复制活跃
+	+	+	-	-	-	急慢性 HBV 感染, HBV 复制活跃
+	-	+	+	-	-	急慢性 HBV 感染, HBV 复制中度
+	-	+	+	+	-	急慢性 HBV 感染, HBV 复制低度, 异型慢性乙型肝炎
+	-	+	-	+	-	HBV 复制停止或极低; 或 HBV 突变株感染
-	-	+	+	-	-	平静的 HBV 携带状态, HBsAg 极低
-	-	+	-	-	-	测不出, HBsAg/抗-HBs 空白期
-	-	+	-	-	-	HBV 既往感染, 未产生抗-HBs
-	-	+	+	+	-	抗-HBs 出现现阶段, HBV 复制低
-	-	+	-	+	+	HBV 感染恢复阶段
-	-	+	-	-	+	HBV 感染恢复阶段
+	+	+	+	-	+	不同亚型 HBV 再感染
+	-	-	-	-	-	HBV DNA 整合
-	-	-	-	-	+	病后或接种疫苗后获得免疫

急性乙肝时其出现早于HBsAg,持续增高预示慢性化。

1.3 HBV-DNA 是HBV感染、复制和病情活动的直接指标,较其他HBV标志更具诊断价值,通常以分子杂交法(分辨率为 $2-10\text{ pgmL}^{-1}$ 或每毫升 10^5-10^6 拷贝)或聚合酶链反应法(PCR,分辨率为 $1-10\text{ fgmL}^{-1}$ 或每毫升 10^3-10^4 拷贝)对组织、血液或其他体液中HBV-DNA进行定性、定量或原位检测。分子杂交法特异性强,结果可靠,但阳性率比PCR略低;PCR灵敏度极高,方法简便易行,但有时有假阳性出现,需谨慎。由于HBV-DNA的检测敏感度极高(尤以PCR法为甚),常用于鉴定HBsAg(-)和HBeAg(-)甚至除HBV-DNA以外所有HBV标志均阴性的隐匿性HBV感染和复制^[12]。HBV-DNA的原位检测可以从肝组织上对HBV-DNA进行定位检测,对乙肝的发病机制研究有重要意义,且肝组织之HBV-DNA检测较血清敏感性高,即血清标本HBV-DNA阴性的病例,其肝组织亦不乏得以检出^[13]。HBV-DNA的定量检测是指在传统的定性检测的基础上,再进一步对HBV-DNA进行的量化检测,主要是建立在定量分子杂交和定量PCR基础上。近年迅速发展的HBV-DNA定量检测在判断HBV感染者的病情发展、决定抗病毒治疗方案及评估抗病毒药物疗效等方面有非常重要的意义。但目前定量PCR的分辨率约为每毫升 10^3-10^4 拷贝,尚达不到HBV零拷贝的鉴别,所以定量PCR阴性并不能说明患者体内无HBV存在,只能说明HBV的病毒载量很低。

2 肝脏酶类生化检测的意义

肝脏是重要的生化反应器官,含有大量的酶类,当其损伤时肝脏酶的释放是反映肝细胞损伤的重要指标。肝炎时常用于临床检测的酶有以下几类:(1)主要反映肝细胞损伤的酶如ALT、AST、LDH及ChE等;(2)反映胆汁淤积的酶如ALP、 γ -GT及5'-NT等;(3)反映肝纤维化的酶如MAO等。此外ALP、 γ -GT及LDH可能还与肝脏肿瘤有一定关系。

2.1 转氨酶 主要指丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)。ALT主要存在于肝细胞质内,其他脏器如骨骼肌、心肌细胞内也含少量,任何肝细胞损害(膜通透性增加或细胞死亡),血清中酶活性将明显增高。AST的分布以心肌最多,其次为肝脏和肾脏,且其在细胞内有60%分布于胞质中,40%于线粒体中。因而,ALT的升高较AST更能特异性的表示肝细胞的损伤,当有心肌、肾脏等损害时也常可引起AST的升高,需注意与肝细胞的损害鉴别;由于AST有40%存在于线粒体,AST线粒体同工酶的持续增高提示肝细胞损伤严重,预后不良。ALT和AST在不同情况时升高幅度不同:(1)中毒、缺血和缺氧时升高最著,可达 1 万 IU/L ;(2)急性病毒性肝炎次之,约 $300-3\text{ 000 IU/L}$;(3)慢性病毒性肝炎和自身免疫性肝炎一般在 1 000 IU/L 以内;(4)酒精性肝病为轻、中度增高, $100-500\text{ IU/L}$ 之间,且常 $\text{AST} > \text{ALT}$;(5)肝硬化患者正常或轻度增高,常为正常值的2-4倍;(6)其他情况如脂肪肝,常可出现正常值3倍以内的增加。ALT/AST

比值在鉴别诊断中有一定意义^[14],在肝细胞损害时,多数情况下 $\text{ALT/AST} > 1$ 。当 $\text{ALT/AST} < 1$ 时,常见于各种原因的肝硬化;如为慢性肝炎,常提示纤维组织增生或肝硬化进展;在急性肝炎病程后期,提示有重症化倾向,如比值 < 0.5 ,则预后不佳;当 $\text{ALT/AST} < 0.3$,且 $\text{AST} > 500\text{ IU/L}$ 时,常提示心功衰竭或肝脏肿瘤。

应该明确,转氨酶的升高并不能区别肝细胞的损害程度,如急性肝炎时ALT剧烈增高是肝细胞水肿致膜通透性增加引起,而非大量坏死;重症肝炎时因大量肝细胞坏死,使转氨酶释放衰竭,随着胆红素升高和凝血酶原时间延长,ALT反而下降,提示预后不良。

2.2 乳酸脱氢酶(LDH) 组织分布广泛,其水平升高除急慢性肝病外,还见于骨骼肌、心肌损害及脑卒中及肺肾梗死等。由于器官特异性低,其在肝脏疾病中的意义主要是鉴别肝外原因所致的转氨酶升高。

2.3 胆碱酯酶(ChE) 由肝脏合成并存在于血清中,肝脏疾病时此酶活性降低,可用于评价肝脏功能状态,尤其在重症肝炎时常用于判断预后,如ChE活性降至正常的10%以下,常提示预后不良。

2.4 碱性磷酸酶(ALP或AKP) 胆道系统是ALP产生的主要部位,包括毛细胆管、胆囊黏膜及大胆管等,任何原因引起的胆汁阻滞均可导致胆道黏膜合成ALP增加。肝胆疾病时ALP的升高是由于合成的增加和胆道排泌能力下降的共同结果。ALP增高可有多种原因:(1)ALP正常值3倍以内的增高无明显特异性,可发生在包括各型病毒性肝炎在内的各种肝脏疾病^[15];(2)肝浸润性疾病,如肿瘤、肉芽肿及结核等,ALP可显著增高;(3)肝内外胆道病变,包括胆汁淤积、小毛细胆管的炎症损害(原发性胆汁性肝硬化)和肝内外胆道梗阻(肿瘤、结石、炎症等);(4)其他原因,如骨骼系统疾病、肺炎及肺栓塞、右心衰竭等亦可ALP升高。

2.5 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT) 在体内分布广泛,主要存在于肾、胰、肝和脾脏。其增高主要有以下几种意义:(1)各种原因的胆汁淤积均有 γ -GT增高,他是反映胆汁淤积最灵敏的血清酶,且增高水平与胆汁淤积的程度正相关;(2) γ -GT与AFP同样具有癌胚抗原的性质,在原发和继发性肝癌时均可显著增高;(3)酒精性肝损害时, γ -GT可显著增高(10倍以上);(3)急性病毒性肝炎时可与ALT、AST平行增高(可达5倍),且随病情的好转而下降,但较转氨酶下降为慢;(4)在非酒精性脂肪肝变时(肥胖、糖尿病等),可有 γ -GT的轻度升高;(5)其他疾病包括胰腺病、心肌病、肾脏病、肺脏病及糖尿病也可有 γ -GT的升高。

2.6 5'-核苷酸酶(5'-NT) 主要存在于胆小管窦状隙膜内,其他脏器如心肌、脑、血管及胰腺也可存在,但血清水平的升高仅见于肝胆疾病。5'-NT对肝胆系统疾病诊断的意义与ALP相似,但比ALP更敏感、更具特异性^[16]。

2.7 单胺氧化酶(MAO) 主要存在于肝、肾、脑及各种

器官的结缔组织细胞的线粒体中,少量存在于胞质中。MAO参与胶原纤维的生成,主要用于肝硬化的诊断。肝硬化时MAO的活性明显增高,且与纤维化的程度和范围呈正相关。急性肝炎肝细胞坏死时及明显肝炎活动期部分患者可出现MAO增高,提示纤维组织增生活跃。

3 病理学检测的意义

慢性肝炎临床表现不典型者,应进行肝穿刺病理检查加以确诊。实践证明,通过肝穿刺病理检查,可纠正许多临床诊断。如许多AsC病例肝穿刺病理检查可发现“轻微肝炎(minimal hepatitis)”,部分病例呈中度甚至重度慢性乙肝之改变。慢性HBV感染以后的最终结果取决于病变的活动与否。慢性乙型肝炎的活动性病变是在病情进展中的病变,有发生肝炎后肝硬化、重症肝炎或肝衰竭的可能性;非活动性病变是病情稳定的病变,预后较好。因而区分病变的活动性和非活动性是十分必要的。临床症状、体征和实验室检查的多种参数都是非特异性的,并不能准确地反映病变的特点,因此难以作为鉴别活动性的可靠依据。若无肝组织病理检查,有时很难明确诊断。肝穿刺组织学病理检查是确诊慢性乙型肝炎的金标准^[17],但有时由于病变分布不均匀,仍有偶尔误诊的可能。正确的鉴别有赖于临床资料和病理检查的综合分析,对一时难于确定的病例,进行定期复查将能提高确诊率。

4 其他辅助检查

4.1 凝血酶原时间(PT) 血块凝结是一系列复杂化学反应的最终结果,涉及13种因子,其中凝血酶原、V、Ⅶ、Ⅸ、X、Ⅺ、Ⅻ和纤维蛋白原在肝内合成。PT不仅取决于血浆凝血酶原浓度,亦与其他肝内合成的凝血因子有关。因而任何急性或慢性肝脏疾病都可引起PT延长,PT延长标志肝细胞坏死和肝功能衰竭,能迅速反映暴发性肝衰竭,是肝脏疾病预后不良的灵敏标志^[18]。但PT延长并不是肝脏疾病特异的,其用于肝脏疾病的诊断并不灵敏、特异,PT延长还见于一些先天性凝血因子缺陷、获得性凝血因子消耗过多等情况,此外有些药物也影响PT,因而对PT延长的解释须慎重。

4.2 甲胎蛋白(AFP) 在6wk后的人胚胎,AFP是正常的血浆成分,在胚胎生命的12-16wk达到最高浓度,出生后数周在血液中消失。在急性病毒性肝炎、慢性活动性肝炎和活动性肝硬化患者,AFP增高标志肝细胞的活跃再生^[19];在有广泛肝细胞坏死的患者中,AFP升高可能预后较好。患者出现极高的血清AFP水平,或AFP水平呈持续进行性升高,以HCC最为可能,也有可能出现在睾丸和卵巢的胚胎瘤、肝转移的胃肠道肿瘤。AFP轻微增高,也应谨慎除外HCC的可能。

4.3 影像学检查 影像学辅助检查对普通的较轻的慢性乙型肝炎的诊断意义不大。如B超、CT及MRI核素检查在慢性轻度乙肝患者可以无明显异常变化,或轻微

的弥漫性炎症变化。在中、重度慢性乙肝患者检查时可有明显炎症、坏死及肝组织再生的表现,部分较重的患者可有腹水形成、肝脏结构紊乱、早期肝硬化等征象^[20]。影像学检查同时对排除和确诊肝脏占位性病变有决定性意义。

B超作为现代影像学的重要诊断辅助工具,具有安全、价廉、重复性好、无创伤等优点在肝病的诊断、鉴别诊断、疗效观察和预后及肝活组织检查等许多方面均发挥着积极的作用。随着慢性肝炎患者的肝组织炎症活动程度的加重,其肝右叶最大斜径、脾厚和脾门静脉宽度也将出现明显的异常改变,并且随着肝纤维化的加重,可使肝小叶结构紊乱和假小叶形成,B超声像图表现为回声增强、光点增粗、分布不均和血管(尤其3级血管)走行不清等。当B超表现为大小不等的结节状或地图状的强回声分布并伴有条索状和网状回声增强等改变时,常提示为慢性重度肝炎或早期肝硬化。但在临床上,尚有为数不少的伴有早期肝硬化的慢性重度肝炎患者并不一定会出现门脉压增高。因此,单凭门静脉宽度作为诊断肝硬化的主要依据,可使许多早期肝硬化患者被延误诊断。而且,有的学者提出,门静脉的宽度并不能准确反映门脉高压的程度。因此,在应用B超诊断慢性肝病时,尚应注意结合临床资料、肝功能检查、HBV血清标志和CT、MRI等其他影像学资料,才能得出正确的判断。

5 参考文献

- Bernardi M, Biselli M, Gramenzi A. Chronic hepatitis B. Recent advances in diagnosis and treatment. *Recent Prog Med* 2002; 93:397-402
- Sanchez LV, Maldonado M, Bastidas-Ramirez BE, Norder H, Panduro A. Genotypes and S-gene variability of Mexican hepatitis B virus strains. *J Med Virol* 2002;68:24-32
- Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis* 2002;2:479-486
- Yukimasa N, Ohkushi H, Fukasawa K, Fukuchi K, Takagi Y, Gomi K. Hepatitis B virus gene mutations in the sera of three patients with coexisting hepatitis B surface antigen and anti-surface antibody. *Rinsho Byori* 2000;48:184-188
- Cabrero M, Bartolom inverted question mark J, Caramelo C, Barril G, Carreno V. Molecular analysis of hepatitis B virus DNA in serum and peripheral blood mononuclear cells from hepatitis B surface antigen-negative cases. *Hepatology* 2000; 32:116-123
- Liang TJ, Ghany M. Hepatitis Be Antigen-the dangerous endgame of hepatitis B. *N Engl J Med* 2002;347:208-210
- Acharya SK. HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Indian J Gastroenterol* 2002;21:93-95
- Fabrizi F, Lunghi G, Martin P, Poordad FF. Serological and molecular testing in hepatitis B and the dialysis patient. *Int J Artif Organs* 2002;25:91-99
- Ali HY, Faransawy ZE, Al-Megthab NA. Clinical and prognostic values of anti-hepatitis B core immunoglobulin M detection in asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers. *Saudi Med J* 2002;23:777-781
- Yeh CT. Hepatitis B virus X protein: searching for a role in hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:339-341
- Fan YF, Lu CC, Chen WC, Yao WJ, Wang HC, Chang TT, Lei HY, Shiau AL, Su JJ. Prevalence and significance of hepatitis B virus

- (HBV) pre-S mutants in serum and liver at different replicative stages of chronic HBV infection. *Hepatology* 2001;33:277-286
- 12 Hu KQ. Occult hepatitis B virus infection and its clinical implications. *J Viral Hepat* 2002;9:243-257
- 13 Kasprzak A, Wysocki J, Zabel M, Surdyk-Zasada J. Detecting the replication of the hepatitis B virus using the ImmunoMax technique following treatment with interferon-alpha in children with chronic hepatitis. *Med Sci Monit* 2002;8:PR1-PR7
- 14 Zamin JJ, de Mattos AA, Perin C, Ramos GZ. The importance of AST/ALT rate in nonalcoholic steatohepatitis diagnosis. *Arq Gastroenterol* 2002 ;39:22-26
- 15 Hasan KN, Rumi MA, Hasanat MA, Azam MG, Ahmed S, Salam MA, Islam LN, Hassan MS. Chronic carriers of hepatitis B virus in Bangladesh: a comparative analysis of HBV-DNA, HBeAg/anti-HBe, and liver function tests. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2002;33:110-117
- 16 Rathnakumar G, Raste AS. Can 5' nucleotidase estimation be a predictor of liver metastases? *Indian J Cancer* 2000;37:23-26
- 17 Hahm GK, Niemann TH, Lucas JG, Frankel WL. The value of second opinion in gastrointestinal and liver pathology. *Arch Pathol Lab Med* 2001;125:736-739
- 18 Friedberg B, Watine J, Miedouge M. Unresected colorectal liver metastases: prognostic value of laboratory variables. *Gastroenterol Clin Biol* 2001;25:962-966
- 19 Yang SS, Cheng KS, Lai YC, Wu CH, Chen TK, Lee CL, Chen DS. Decreasing serum alpha-fetoprotein levels in predicting poor prognosis of acute hepatic failure in patients with chronic hepatitis B. *J Gastroenterol* 2002;37:626-632
- 20 Semelka RC, Martin DR, Balci C, Lance T. Focal liver lesions: comparison of dual-phase CT and multisequence multiplanar MR imaging including dynamic gadolinium enhancement. *J Magn Reson Imag* 2001;13:397-401

慢性乙型肝炎的抗病毒治疗

程明亮,吴亚云

程明亮,吴亚云,贵阳医学院感染病学教研室 贵州省贵阳市 550004
项目负责人:程明亮,550004,贵州省贵阳市,贵阳医学院感染病学教研室.
chengml@21cn.com
电话:0851-6828383 传真:0851-6820341
收稿日期:2002-12-10 接受日期:2003-01-10

程明亮,吴亚云. 慢性乙型肝炎的抗病毒治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(6): 780-783

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/780.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎的治疗,主要从抗病毒、改善肝功能、免疫调节及抗肝纤维化四个方面进行.有效的抗病毒治疗可减轻肝组织的炎症坏死,防止慢性乙型肝炎发展至肝硬化和(或)肝细胞癌,延长患者的生存期,因而抗病毒治疗是治疗慢性乙型肝炎最主要的措施.目前,国内外公认有效的抗乙型肝炎病毒(下英文缩写 HBV)药物主要有干扰素和核苷类似物两大类,现简介如下.

1 干扰素(interferons, INF)

干扰素主要有 α 、 β 、 γ 三种,用于病毒性乙型肝炎治疗抗病毒治疗的是 INF- α . INF- α 抗 HBV 的治疗效应是通过其抗病毒活性及免疫调节活性实现的. INF- α 抗病毒活性是通过 INF- α 与靶细胞膜上的 INF- α 受体结合,在细胞内诱生蛋白激酶、2'-5'-寡腺苷酸合成酶、磷酸二酯酶等抗病毒蛋白,从而阻碍病毒核酸及蛋白的合成,抑制病毒复制. INF- α 的免疫调节作用是通过增强靶细胞表面 MHC 分子表达和诱导 Th1 型细胞因子正向调节特异性细胞免疫功能,以协同增强其直接抗病毒效应. INF- α 的主要作用靶位点是 HBV DNA,他不仅抑制 HBV DNA 复制,还可抑制病毒蛋白的表达,因而 INF- α 治疗有效的患者表现为 HBV DNA 和 HBeAg 同时阴转.

INF- α 多采用 3-5 MU(国外多采用 5-10 MU),3 次/wk,肌肉注射,疗程 3-6 mo. 血清 HBeAg 和 HBV DNA 阴转率可达 40 % 左右,停药 6 mo 后,持续阴转率达 25 % 左右. 为提高疗效,(1)常在治疗开始的最初 15 d-1 mo,进行诱导治疗,即每日注射 1 次,维持较高和稳定的血药浓度,以便能有效地抑制血清 HBV 水平,以后改为隔日 1 次注射,直至疗程结束.(2)加大剂量:采用 3 MU、5 MU、10 MU INF- α 治疗慢性乙型肝炎 6 mo, 5 MU、10 MU 组在促进肝生化指标改善,抑制病毒复制,远、近期疗效上均优于 3 MU 组和对照组;5 MU、10 MU 剂量组间远、近期疗效未见明显差异,多项不良反应比较,10 MU 组明显高于 3 MU 及 5 MU 组. 表明适当加大 INF- α 治疗剂量有助于提高疗效,在权衡药物疗效及其不良反应发生率和药品费用后,认为选择 5 MU 的治疗量较为理想^[1]. (3)延长疗程:部分患者在 6 mo 疗程结束时未获完全效应,这时只要血清病毒水平比基础水平有显著降低或只要血清病毒水平持续降低,延长疗程能提高有效率,获得完全疗效后需再巩固 2-3 mo. (4)联合用药: INF- α 与其他抗病毒药物如核苷类似物或免疫调节剂等联合治疗可提高疗效.

INF- α 治疗慢性乙型肝炎的疗效常与下列因素有关:(1)传播方式:非母-婴传播者优于母-婴垂直传播者;(2)年龄:成人优于儿童患者;(3)性别:女性患者优于男性患者;(4)病程:感染病程短者优于感染病程长者;(5)血清 ALT 水平:治疗前血清 ALT 水平高者优于 ALT 水平低者;(6)治疗前血清 HBV DNA 水平:血清 HBV DNA 水平低者优于水平高者;(7)肝组织炎症:炎症明显者优于炎症轻者,炎症在 G₁-G₃ 者效果好;(8)无抗 HBV 药物治疗史患者优于有抗 HBV 治疗史患者;(9)干扰素抗体阴性患者优于阳性患者. 因而,在选择 INF- α 治疗前应参考这些影响因素,预测其疗效,以免造成经济浪费.

INF- α 的适应证为 HBV 复制期患者(HBV DNA 阳性, HBeAg 阳性或 HBeAg 阴性,后者为前 C 区变异),且血清 ALT 升高 >3-5 UNL(正常最高限值), <10 UNL; 肝组织炎症病变较明显(炎症分级在 G₁-G₃); 无黄疸或血清

胆红素 $<2\text{UNL}$, 且无上升趋势者. 有下列情况之一者不宜用 INF- α 治疗: (1)血清胆红素升高 $>2\text{UNL}$; (2)失代偿性肝硬化; (3)自身免疫性疾病; (4)有严重脏器病变(如严重心、肾疾病、糖尿病、甲亢或甲减、神经精神异常等).

INF- α 治疗过程中可出现流感样症状、骨髓抑制现象、精神神经系统症状, 并可诱发一些自身免疫性疾病等不良反应, 这些不良反应与 INF- α 剂量呈依赖关系. 其中流感样症状最常见, 多发生在第 1-2 次注射 INF- α 治疗后 2-4 h, 表现为发热、全身肌肉酸痛、乏力、厌食等, 患者一般可以耐受, 无需停药, 仅予解热镇痛药对症处理, 以后再注射上述症状减轻不再出现. 骨髓抑制现象表现为血小板或白细胞减少, 通过减少剂量至原剂量的 40% 或停药后可恢复. 一旦出现精神神经系统症状或诱发自身免疫性疾病如甲亢、血小板减少性紫癜等, 应立即停药, 停药后症状亦可缓解.

长效干扰素(PEG-IFN)是大分子物质聚乙二醇(PEG)与 INF 的连接体. 由于 PEG 在 INF 分子表面形成一个分子屏障, 降低了 INF 的免疫原性, 保护其免受酶的分解, 使其半衰期延长, 排泄慢, 能较长时间维持恒定的有效血浓度, 更有效地降低血中病毒水平, 用于治疗慢性丙型肝炎, $180\text{ }\mu\text{g}$, 1 次/wk, 疗程 6 mo, 疗效优于一般基因工程 INF, 其治疗慢性乙型肝炎的临床试验仍在进行中.

近年的研究表明肝实质细胞诱生的内源性 INF 较外源性 INF 治疗效果^[2], 如何制备一种稳定高效的 INF 诱生剂用于慢性乙型肝炎的治疗将成为肝病学者又一研究热点.

2 核苷类似物

老一代核苷类似物如阿糖腺苷、阿昔洛韦等也曾用于治疗慢性乙型肝炎. 由于毒性大, 疗效差, 现已少用. 新一代核苷类似物由于具有较强的抗毒作用, 不良反应轻、少, 使用方便, 已成为目前抗病毒药物研究领域的热点. 新一代核苷类似物分嘧啶衍生物和嘌呤衍生物两大类, 前者代表的有拉咪呋啶(lamivudine, LAM); 后者有泛昔洛韦(famciclovir, FCV)、潘昔洛韦(penciclovir, PCV). 我国目前只有拉咪呋啶及泛昔洛韦正式上市用于临床, 现将应用情况作一简要介绍.

核苷类似物的作用靶位是 HBV DNA 多聚酶亦称逆转录酶(reverse transcriptase, RT). 核苷类似物通过抑制 HBV DNA 多聚酶的活性, 与 DNA 合成所需的底物三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)竞争逆转录酶上的结合位点, 掺入至延长中的 DNA 链后, 因其缺乏 3'-OH 而不能与其后的 dNTP 形成 3', 5'-磷酸二酯键, 导致 DNA 合成提前终止, 从而抑制 HBV 复制过程. 因不影响病毒蛋白的表达, 核苷类似物治疗有效的患者表现为 HBV DNA 阴转, 而 HBeAg 常不阴转. 各种核苷类似物必须在细胞中转化成磷酸盐的有效形式后才能发挥抑制 HBV 复制作

用, 具有(1)迅速、有效地降低血清 HBV DNA 水平; (2)可改善肝功能及肝组织病变; (3)不良反应轻、少, 耐受性好, 口服方便(除潘昔洛韦需静脉注射外)等优点. 却有停药后复发率高及长期治疗可发生病毒变异, 产生耐药的缺点.

2.1 拉咪呋啶 拉咪呋啶化学名称为 2', 3'-二脱氧-3-硫胞嘧啶核苷, 是第一个用于治疗慢性乙型肝炎患者的口服抗病毒药物. 口服后在体内磷酸化成三磷酸拉咪呋啶后才能抑制 HBV DNA 多聚酶活性, 并与脱氧胞嘧啶核苷竞争性掺入至合成中的 HBV DNA 链中, 使其不能继续延伸而终止 DNA 合成, 从而抑制 HBV DNA 复制. 肝细胞内 HBV 复制减弱, 释放入血中的 HBV DNA 和抗原减少, 免疫清除机制作用的新的靶抗原合成减少或停止, 肝脏炎症便随之减轻或停止. 肝细胞内 HBV 抗原在机体免疫机制作用下被逐渐清除, 最终清除与否主要取决于宿主自身的免疫清除能力. 拉咪呋啶不仅可防止肝纤维化, 还可使肝纤维化逆转^[3]. 大量临床资料表明, 口服拉咪呋啶 100 mg/d , 2-4 wk 后, HBV DNA 水平开始下降, HBV DNA 阴转率达 90%. 治疗 1 a, HBV DNA 持续阴转率为 80%, ALT 持续复常率为 60%, 50-70% 患者肝组织炎症坏死病变及肝纤维化程度明显改善, 但 HBeAg 阴转率及 HBeAg 转换率(即 HBeAg 阴转, 抗-HBeAg 阳转)却不高, 分别为 20-25% 和 15-20%. 以下因素可影响拉咪呋啶的疗效: (1)延长疗程能提高的 HBeAg 血清转换率. 用拉咪呋啶治疗 2、3、4 a, HBeAg 转换率分别为 29%、40% 和 47%^[4]. (2)治疗前 ALT 水平与 HBeAg 血清转换率呈正比, 治疗前 ALT $>5\times\text{UNL}$ 患者, 1 a 后其血清转换率为 65%, 而 ALT $<2\text{UNL}$ 患者, 血清转换率仅为 5%^[5]. (3)治疗前 HBV DNA 水平低者, 血清转化率高. 采用拉咪呋啶 100 mg/d , 治疗慢性乙型肝炎 12 mo, 治疗前血清 HBV DNA $<1.5\times 10^4\text{ fg/ml}$ 组 6、12 mo 的血清转化率分别为 41.7% 及 58.3%, 治疗前血清 HBV DNA $\geq 1.5\times 10^4\text{ fg/ml}$ 组 6、12 mo 的血清转化率分别为 26.3% 及 26.3%. 因此, 拉咪呋啶治疗慢性乙型肝炎患者, 应选择治疗前 HBV DNA 及 ALT 水平明显增高 HBV 复制期患者. 血清 HBeAg 及 HBV DNA 均阴性、ALT 持续正常的 HBV “健康”携带者, 由于 HBV 复制基本停止, 使用拉咪呋啶治疗, 意义不大.

拉咪呋啶由于不能清除肝细胞内的 cccDNA(闭合共价环状 DNA), HBV 感染患者使用拉咪呋啶后, 如果 HBeAg 持续阳性, 所有患者停用后都将出现血清 HBV DNA 水平的反跳, 回升到治疗前水平. 少数患者因肝细胞内 HBV 复制迅速增加, 抗原表达增加, 这使特异性 T 细胞作用的靶抗原增加, 免疫清除和肝细胞损伤增加, 肝脏炎症再度出现甚至加重. HBV “健康”携带者由于处于免疫耐受期, 除 HBV DNA 回升外, ALT 无变化, 无病情加重表现. 因此, 慢性乙型肝炎患者在停用拉咪呋啶后应密切观察 6-12 mo.

在长期使用拉咪呋啶过程中, 特别是疗程超过 6 mo

时,部分患者体内开始出现HBV基因变异,以DNA多聚酶C区第552位蛋氨酸(M)被缬氨酸(V)或异亮氨酸(I)取代的YMDD变异(M552V、M552I)最常见,常同时伴有DNA多聚酶B区第528位亮氨酸为蛋氨酸取代的变异(L528M)。YMDD变异最早可在拉咪呋啶治疗后2 wk内出现,一般出现在治疗后6 mo后,表现为HBV DNA水平再次升高或阳转,ALT异常升高,一般低于治疗前水平。YMDD变异的发生可能与下列因素有关:(1)疗程延长,变异发生率逐渐升高,拉咪呋啶治疗1、2、3、4 a变异发生率分别为14-32%、38%、49%、及66%^[6]。(2)HBeAg阳性较HBeAg阴性易发生变异;(3)治疗前HBV DNA水平高者易发生变异;(4)使用免疫抑制剂者易发生变异,多见于肝移植患者,但变异出现并不影响肝移植的预后;(5)作用于不同靶位的抗病毒药物联合治疗,可减少YMDD变异发生。拉咪呋啶联合INF-治疗者未见或极少发生YMDD变异,而单用拉咪呋啶治疗患者,30%左右发生YMDD变异。迄今为止,尚未发现YMDD变异与药物治疗剂量、病毒基因、性别、年龄、种族等有关。由于YMDD是逆转录酶结合dNTP及合成DNA所必需的重要功能性序列。拉咪呋啶对HBV DNA多聚酶的亲和力与存在于第552位核苷酸的侧链氨基酸长度有关,蛋氨酸被异亮氨酸、缬氨酸取代,使得其侧链长度进行性缩短,导致HBV DNA多聚酶与拉咪呋啶结合力下降,诱发耐药,使得HBeAg血清转换率降低。同时HBV DNA多聚酶与dNTP结合力也下降,使HBV变异株复制能力下降。为了避免、延缓、降低耐药性的发生,除了很好地掌握拉咪呋啶治疗适应证外,缩短疗程、不同抗HBV作用机制的药物联合治疗不失可行之举。YMDD变异后,虽致HBV DNA水平再次升高或阳转,ALT升高,但临床研究表明相当一部分患者仍获得血清转换和肝组织的改善,说明对拉咪呋啶治疗仍然有效,因为拉咪呋啶仍可继续抑制残余野生株的复制。ALT升高是机体对变异株的识别激发免疫清除机制所致。免疫清除机制的激发,可阻止变异株复制,继而有可能发生HBeAg血清转换。故发生YMDD变异并不是停止治疗的指征。YMDD变异株复制能力较野生株低,停药后野生株很快恢复为优势株,而可能导致病情加重。

凡是在用拉咪呋啶期间,出现ALT异常波动,在除外引起ALT升高的其他原因,如是否合并其他病毒特别是嗜肝病毒的感染,有无酗酒,是否合并酒精性或非酒精性脂肪肝,有无同时使用其他损肝药物,是否按规定、正规服药等后,应注意是否出现了YMDD变异,有条件的医院可进行HBV基因测序检测。如ALT回升<2UNL,HBV DNA水平低于治疗前水平,可继续拉咪呋啶治疗;如ALT<5UNL,HBV DNA高于治疗前水平或持续不降,疗程>6 mo考虑拉咪呋啶对病毒抑制作用下降,可停用拉咪呋啶或改用其他有效治疗;如ALT≥5 UNL或合并胆红素等生化指标明显异常,出现肝失代偿迹象者,不宜轻易停药,应进行积极的保肝、对症治疗。

拉咪呋啶治疗过程中,少数患者可出现乏力,恶心,头痛,肌痛等不良反应。由于耐受性良好,可用于失代偿性肝硬化、重型肝炎及肝移植患者。不良反应不随疗程延长而增加。

2.2 泛昔洛韦 泛昔洛韦属嘌呤核苷类似物,口服迅速吸收,并转化成三磷酸泛昔洛韦发挥抗病毒作用,其作用机制与拉咪呋啶大致相似。采用泛昔洛韦500 mg,3次/d,治疗慢性乙型肝炎16 wk,HBeAg阴转率为14%,70%患者HBV DNA下降,阴转率为21%,ALT水平较治疗前明显下降^[7]。泛昔洛韦抗病毒效果与药物剂量大小及用药时间有关,要达到较满意的远期的抑制病毒效果需延长用药时间^[8]。与拉咪呋啶一样,长期应用泛昔洛韦亦可诱发HBV变异,变异位于DNA多聚酶B区,即第528位亮氨酸被蛋氨酸取代(L528M)。泛昔洛韦与其他作用于病毒不同靶位的抗病毒药物联合应用,亦有相加或协同作用。拉咪呋啶耐药株多发生DNA多聚酶的C区YMDD变异,伴或不伴DNA多聚酶B区的变异,而泛昔洛韦耐药株多发生DNA多聚酶B区变异(L528M)。因而拉咪呋啶耐药伴B区变异者与泛昔洛韦有交叉耐药,否则对泛昔洛韦敏感。

HBV DNA复制周期开始于cccDNA转录前基因组RNA。cccDNA存在于肝细胞核中,他的半衰期很长,与肝细胞的寿命相仿,一般为10-100 d,只肝细胞内有cccDNA,病毒复制就不会停止,而病毒复制率取决于cccDNA的数量,只有机体的细胞免疫功能被充分激发,才能耗竭cccDNA,持久地抑制HBV的复制和表达,才可能获得持续的抗病毒效应。INF-α及核苷类似物由于均不能完全抑制和清除HBV cccDNA,单用于治疗慢性乙型肝炎,虽能取得一定疗效,一旦停药,cccDNA又重新复制和表达,出现HBV DNA和HBeAg阳性。cccDNA的清除必须借助于机体的免疫调节。目前,有人应用具有免疫调节作用的INF-α与拉咪呋啶等核苷类似物联合或序贯治疗慢性乙型肝炎。常用序贯治疗方法为先用拉咪呋啶20 wk,然后联合INF-α 4 wk,停用拉咪呋啶,再单用INF-α治疗24wk。认为有较好的疗效,但由于报道的病例数不多,还需进行深入研究。

3 参考文献

- 1 陆坚,马为民,周伯平,敖飞建,王召钦,刘艳,戴炜,王平.不同剂量干扰素治疗慢性乙型肝炎疗效的比较.中华肝脏病杂志 2000;8:313
- 2 Wieland SF, Guidotti LG, Chisari FV. Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 2000;74:4165-4173
- 3 Boni C, Bertolotti A, Penna A, Cavalli A, Pilli M, Urbani S, Scognamiglio P, Boehme R, Panbianco R, Fiaccadori F, Ferrari C. Lamivudine treatment can restore T cell responsiveness in chronic hepatitis B. *J Clin Invest* 1998;102:968-975
- 4 Liaw YF, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Chien RN, Dent J, Roman L, Edmundson S, Lai CL. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. Asia hepatitis lamivudine study group. *Gastroenterology* 2000;119:172-180
- 5 Farrell G. Hepatitis B antigen seroconversion: effects of lamivudine alone or combination with interferon alpha. *J Med Virol* 2000;61:374-379

- 6 李晓迎,王晶波,王磊. 拉咪呋啶治疗慢性乙肝 HBeAg 血清转化及其影响. 山东医药 2001;20:36-37
- 7 Trepo C, Jezek P, Atkinson G, Boon R, Young C. Famciclovir in chronic hepatitis B: results of a dose-finding study. *J Hepatol* 2000;32:1011-1018
- 8 陈压西,郭树东,齐珍元. 泛昔洛韦体内抗鸭乙型肝炎病毒核酸的疗效研究. 中华肝脏病杂志 2000;8:51

慢性乙型肝炎的免疫治疗

施光峰

施光峰,复旦大学附属华山医院传染病科 上海市 200040
项目负责人:施光峰,200040,上海市乌鲁木齐中路12号,复旦大学附属华山医院传染病科. gfs@shmu.edu.cn
电话:021-62489999-6565 传真:021-62489015
收稿日期:2002-10-30 接受日期:2003-01-10

施光峰. 慢性乙型肝炎的免疫治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(6):783-785
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/783.asp>

0 引言

慢性乙型肝炎患者均存在免疫功能紊乱,如其外周血的 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺、NK 与 LAK 细胞活性均明显下降等. 针对 HBV 抗原的特异性 CD8⁺T 细胞免疫功能低下是造成乙肝慢性化的主要原因^[1]. 国内多数患者在幼年时感染 HBV,处于对 HBsAg 的免疫耐受状态. 肾上腺皮质激素曾被应用于慢性活动性乙型肝炎的治疗,但是激素可抑制抗体的产生,且长期应用易继发感染. 所以近年来乙肝免疫学治疗的关键在于如何打破免疫耐受状态,诱导有效的机体免疫,抑制并清除 HBV. 近期国内外的研究,均侧重于免疫调节剂和乙肝治疗性疫苗的研究.

1 免疫调节剂的应用

此类药物通过增加机体的免疫功能使病毒有可能被清除. 国内曾应用猪苓多糖和香菇多糖等非特异性免疫增强剂治疗肝炎,具有一定疗效. 近年来,国内外均已应用 IL-2 和胸腺肽等免疫促进剂治疗乙肝.

1.1 IL-2 和 LAK 细胞 IL-2 主要由活化的 Th1 细胞产生,和靶细胞膜表面相应的 IL-2R 结合后,可刺激免疫细胞增生和活化,提高 CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 比值,促进细胞免疫和体液免疫. LAK 细胞,即淋巴因子活化杀伤细胞,由 IL-2 等淋巴因子刺激 LAK 前体细胞后产生,具有杀伤肿瘤细胞和病毒感染细胞的细胞毒性. 慢性乙肝患者体内因 IL-2 和 LAK 细胞活性低下而使机体的免疫功能下降,不能有效清除被 HBV 感染的肝细胞. 所以外源性地补充 IL-2 或 LAK 细胞,能起到调节免疫、控制病毒感染的目的. LAK 细胞悬液静脉回输治疗慢性乙肝的方法在国内应用已有 10 a,但是近年更多见的是使用 IL-2 的相关报道. 除了单用法外,目前更主张 IL-2

与 LAK 细胞或其他细胞因子、抗病毒药物和治疗性疫苗联合应用^[2]. 其给药方式包括静脉、皮下和肌肉给药等途径. 日剂量根据给药途径有所不同,1 000-40 000 U/d,间断或持续应用,疗程一般为 1-2 mo. 包括发热在内的多种不良反应均和其剂量密切相关. IL-2 在动物实验研究中效果良好,但是其半衰期短和大剂量应用时不良反应多等缺点限制了其在临床上的应用.

1.2 胸腺肽(TF) 国内应用胸腺肽治疗慢乙肝已有 10 a,由于其有效成分含量低,目前国内外多主张应用胸腺肽提纯物 TF α 1 治疗慢乙肝,并对其机制进行了研究. You et al^[3] 的研究显示,IFN α 治疗有效的慢乙肝患者多在前 4 mo 内发生 HBeAg 血清转换,停药后随访过程中血清转换率下降. 而单用 TF α 1 的治疗有效率,随着疗程的结束逐渐增高,类似情况也见于其他一些临床试验. Mutchnick et al^[4] 的研究中,在 TF α 1 治疗期间和治疗结束后,机体外周血中的 CD4⁺ Th 细胞和由单核细胞产生的 IFN γ 均增高. 可能 TF α 1 激活了 HBV 特异性的 Th 细胞,增强机体对病毒抗原的体液免疫;通过分泌 IFN α、IFN γ、TNF 和 IL-2 以及加强 IL-2R 的表达诱导 CTL 细胞加强细胞免疫^[5,6]. 可见,TF α 1 治疗有效者中出现的延迟反应主要由于其能持久加强 Th 细胞功能的免疫调节能力. 以 SciClone 制药公司生产的日达仙(1.6 mg/支)为例,采用皮下注射的方式,一般 1-2 次/wk,疗程为 6 mo 左右. 患者对该药的耐受性好. 目前认为,将 TF α 1 与抗病毒药物如 IFN 或拉咪呋啶等核苷类似物联合治疗的方法更佳,但具体的方案有待进一步的临床试验加以印证.

1.3 干扰素(IFN α) 在应用 IFN α 治疗慢乙肝患者期间随访患者的外周血,可见 NK 细胞杀伤活性增高,CD4⁺ 和 CD4⁺/CD8⁺ 比值上升,提示其除了直接的抗病毒活性外,也有提高机体免疫的作用.

2 治疗性疫苗的研制

乙肝疫苗问世已经 30 a,经历了从预防性疫苗向治疗性疫苗的发展. 后者的应用对象为慢乙肝患者或 HBV 携带者,可由高纯度和高含量的抗原和免疫佐剂组成而增强其免疫原性,并通过不同途径呈递乙肝抗原,打破机体的免疫耐受,有效诱导免疫应答,产生治疗作用.

部分学者就治疗性疫苗的作用机制进行了探讨,如 Couillinet et al^[7] 应用乙肝疫苗治疗慢乙肝活动期患者后,50 % 的患者在减少病毒复制和消除对 HBsAg 耐受方面产生疗效. 提示疫苗注射后,经 HBV 特异的 CD4⁺ Th1 细胞介导,产生大量 IFN α 或 IFN γ,诱导产生对外膜抗原的外周血单核细胞增生反应,在控制病毒血症方面发挥重要作用. Akbar et al^[8] 报道了 HBV 转基因鼠实验中,疫苗应答组树突状细胞诱导 T 细胞增生能力和抗 HBs 水平明显高于非应答组,提示 MHC-II 和树突状细胞上的 CD86 抗原表达增强,其 IL-12、IL-2 和 TNF-α 产物增加,表明树突状细胞的活性反应是影响疗效的重要因

素. 结合治疗性乙肝疫苗的发展和应用情况, 简介如下.

2.1 基因工程蛋白疫苗 包括HBsAg或HBsAg+Pre-S2蛋白的亚单位疫苗. 如法国Pasteur-Merieux研究所的Gen-Hevac B疫苗(含HBsAg和Pre-S2蛋白), 曾被单用或者和干扰素序贯用于治疗慢乙肝, 患者血清HBV-DNA明显下降者和阴转者共达44-50%^[9].

2.2 重组活病毒疫苗 利用病毒载体如牛痘活腺病毒表达HBsAg接种黑猩猩的实验提示其诱导产生的抗体效价明显低于上述亚单位疫苗. Vical公司使用带有HBcAg基因的重组逆转录病毒注入HBV持续感染的黑猩猩体内, 能在肝细胞表面表达HBcAg并诱导产生HBcAg特异的CTL, 但同时并未发生HBV标志的变化.

2.3 多肽疫苗, 此种疫苗的理论基础正是基于抗原分子表位水平的研究. 由于蛋白质抗原通过表位来体现其免疫特异性, 有效的保护性免疫有赖于一组表位的搭配与组合. 已知HBcAg中的多肽18-27是HLA-A2组织相容性抗原, 可被CTL识别而产生免疫应答. 将其和Th细胞多肽表位(破伤风类毒素的T细胞表位肽, TT830-843)以及脂质分子共价结合后制成了Theradign-HBV疫苗, 提高了CTL多肽的免疫原性, 诱导产生特异性CTL而有清除HBV的作用^[10].

2.4 DNA疫苗 1990年Wolff通过实验证实了外源基因在体内的转染和表达, 从而为DNA疫苗的产生奠定了理论基础. DNA疫苗的制备包括: (1)编码某种蛋白质抗原的基因片段的扩增, 包括HBsAg、HBcAg和HBeAg等基因均可作为目的基因. (2)插入真核细胞表达载体以构建重组质粒, 可供插入目的基因的载体包括逆转录病毒载体、腺病毒载体和纯化的裸DNA载体. 机体接种疫苗后, 宿主细胞摄取质粒并表达抗原蛋白, 诱导机体产生特异性的细胞免疫和体液免疫应答. 如Davis et al 在小鼠中应用含编码HBsAg和Pre-S基因和真核细胞启动子的重组质粒DNA(裸DNA疫苗)免疫后, 可诱导CTL和抗HBs的产生, 效果较理想^[11]. Davis et al^[12]在黑猩猩的动物实验中, 应用2 mg裸DNA肌肉注射一次即可诱生高滴度抗HBs, 加强免疫后抗HBs滴度更高. 而如果用400 µg DNA免疫则无法测得抗HBs, 即使再次免疫, 产生的抗体滴度低、持续时间短, 提示DNA疫苗应用于较大体重的动物时, 要求质粒的有效剂量也越大. 但是, 抗体持续时间短暂, 可见DNA疫苗对黑猩猩的免疫效果尚不理想.

2.5 免疫复合物型治疗性疫苗 多数疫苗通过提高其抗原的免疫原性而使机体易于发生免疫应答, 发挥其治疗作用. 而闻玉梅 et al 研制的免疫复合物型疫苗是通过改变对HBsAg的呈递方式来诱生有效的免疫应答, 消除免疫耐受性. 应用足量HBsAg和高效价抗人HBsIg复合物对14例慢性乙型肝炎患者进行了治疗, 效果令人满意.

3 免疫治疗现状的评价

目前乙肝免疫学治疗的方案尚不成熟, 除了单用治疗性疫苗或免疫调节剂外, 目前多主张将他们和其他药

物联合应用, 通过不同机制协同作用, 起到抗病毒和免疫调节作用. 方案包括疫苗和细胞因子、抗病毒药物的合用^[13], 以及不同种类的治疗性疫苗的联合应用等方法. 当然, 其疗效评价应依靠严格的动物实验和临床研究来论证. 在治疗性疫苗的研制与应用中, 以下几个方面值得注意. (1)佐剂的应用: 部分专家认为提高治疗性疫苗疗效的关键在于佐剂的使用. 多种物质可作为佐剂, 如Al(OH)₃、QS-21(皂树皮提纯物酰化三萜糖甙)以及猪苓多糖等多糖类物质、poli I: C、卡介苗和费氏佐剂脂质体、胸腺素和细胞因子等. 其配合乙肝疫苗使用时, 能延缓抗原释放, 延长抗原和免疫细胞的作用时间, 刺激活化单核巨噬细胞并引起淋巴细胞的非特异性增生, 从而增强免疫物质的免疫原性, 促进机体的免疫应答能力. (2)接种方式: 包括皮内注射和肌肉注射两种途径. DNA疫苗应用时使用的基因枪, 是种无针头的皮肤粉末推注器. 在氦气冲击下, 可将HBV DNA疫苗无痛注入皮内. 黏附在显微金粉颗粒上的HBV DNA质粒在表皮细胞内和金粉分离, 表达目的抗原. 此法可大大节省DNA疫苗的接种剂量, 而且皮内注射的免疫途径能诱生更强的HBV特异性免疫应答. 这是由于树突状细胞在皮肤组织中分布密度高, 更有利于抗原的摄取和呈递. (3)DNA疫苗的安全性: DNA疫苗有诸多优点, 他通过人工方法获得天然的免疫效果, 机体对其免疫应答全面, 有利于彻底清除病毒等. 但是, 疫苗的DNA可与宿主基因组整合而诱发抑制癌基因的灭活和原癌基因的活化, 注射疫苗后机体可产生抗DNA抗体和自身抗体, 诱导机体产生特异的免疫耐受等问题依然存在, 有待进一步解决.

乙肝的免疫治疗, 已经取得很大的进步. 笔者认为, 其未来的发展趋势包括: (1)治疗性疫苗的研制和应用, 仍然是一大热点; (2)上述免疫学治疗方法和抗病毒治疗的综合应用; (3)乙肝的免疫基因治疗: 将抑制病毒复制和表达的基因(如IL-2、IL-12、IFN和B7等基因)导入细胞内表达, 诱发机体的免疫应答, 抵抗和清除HBV; (4)乙肝的免疫导向治疗: 在医学生物技术基础上, 将治疗药物和导向载体(HBV McAb)结合制成制剂. 注射机体后, 药物由载体运送到肝脏后发挥治疗作用. 具有效果好、不良反应少的特点.

总之, 乙肝是严重威胁人类生命健康的一大疾病, 而乙肝免疫学治疗方面的进展将有助于该病的更好控制. 由于他是通过提高机体的免疫能力而达到清除病毒的作用, 该方法也可应用于其他的病毒感染, 其发展具有更为深远的意义.

4 参考文献

- 1 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:43-50
- 2 Dahmen A, Herzog-Hauff S, Bocher WO, Galle PR, Lohr HF. Clinical and immunological efficacy of intradermal vaccine plus lamivudine with or without interleukin-2 in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2002;66:452-460

- 3 You J, Zhuang L, Tang BZ, Yang WB, Ding SY, Li W, Wu RX, Zhang HL, Zhang YM, Yan SM, Zhang L. A randomized controlled clinical trial on the treatment of thymosin- α 1 versus interferon- α in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:411-414
- 4 Mutchnick MG, Lindsay KL, Schiff ER, Cummings GD, Appelman HD, Peleman RR, Silva M, Roach KC, Simmons F, Milstein S, Gordon SC, Ehrinpreis MN. Thymosin α 1 treatment of chronic hepatitis B: results of a phase III multicentre, randomized, double-blind and placebo-controlled study. *J Viral Hepat* 1999;6:397-403
- 5 Chien RN, Liaw YF, Chen TC, Yeh CT, Sheen IS. Efficacy of thymosin α 1 in patients with chronic hepatitis B: A randomized, controlled trial. *Hepatology* 1998;27:1383-1387
- 6 Tong WB, Zhang CY, Feng BF, Tao QM. Establishment of a nonradioactive assay for 2'-5' oligoadenylate synthetase and its application in chronic hepatitis C patients receiving interferon- α . *World J Gastroenterol* 1998;4:70-73
- 7 Couillin I, Pol S, Mancini M, Driss F, Brechot C, Tiollais P, Michel ML. Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B induction of T cell proliferative response specific for envelope antigens. *J Infect Dis* 1999;180:15
- 8 Akbar SM, Abe M, Masumoto T, Horiike N, Onji M. Mechanism of action of vaccine therapy in murine hepatitis B virus carriers: vaccine induced activation of antigen presenting dendritic cells. *J Hepatol* 1999;30:755
- 9 Pol S, Driss F, Carnot F, Michel ML, Berthelot P, Brechot C. Efficacy of immunotherapy with vaccination against hepatitis B virus on virus B multiplication. *CR Acad Sci III* 1993;316:688-691
- 10 Pol S, Driss F, Michel ML, Nalpas B, Berthelot P, Brechot C. Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1994;334:342
- 11 Vitiello A, Ishioka G, Grey HM, Rose R, Farness P, LaFond R, Yuan L, Chisari FV, Furze J, Bartholomeuz R. Development of a lipopeptide-based therapeutic vaccine to treat chronic HBV infection. I. Induction of a primary cytotoxic T lymphocyte response in humans. *J Clin Invest* 1995;95:341-349
- 12 Davis HL, Schirmbeck R, Reimann J, Whalen RG. DNA-mediated immunization in mice induces a potent MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to the hepatitis B envelope protein. *Human Gene Therapy* 1995;6:1447-1456
- 13 Rahman F, Dahmen A, Herzog-Hauff S, Bocher WO, Galle PR, Lohr HF. Cellular and humoral immune responses induced by intradermal or intramuscular vaccination with the major hepatitis B surface antigen. *Hepatology* 2000;31:521-527

慢性乙型肝炎的中医药治疗

申德林,王全楚,焦桂林

申德林,王全楚,焦桂林,中国人民解放军解放军第153中心医院感染病科
河南省郑州市 450042

项目负责人:申德林,450004,河南省郑州市郑上路须水镇,中国人民解放军解放军第153中心医院感染病科. Delinshen@hotmail.com

电话:0371-7815946 传真:0371-7815946

收稿日期:2002-12-10 接受日期:2002-12-20

申德林,王全楚,焦桂林. 慢性乙型肝炎的中医药治疗. 世界华人消化杂志 2003; 11(6):785-787

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/785.asp>

0 引言

乙型肝炎患者多,乙型肝炎治疗难、预后差、费用

高,这是许多肝病专家对慢性乙型肝炎达成的共识.慢性乙型肝炎治疗难是由多种因素造成的:如确切的发病机制不清楚;免疫应答不完全;病毒的基因变异;肝细胞内的病毒不能有效控制等;最重要的是目前我国尚缺乏有效的具有自主知识产权的抗病毒药物.进口的抗病毒药物种类不多但疗程很长(至6 mo以上),价格昂贵(一疗程约2.3万人民币),易复发,有的慢乙肝患者抗病毒治疗过程中病毒标志阴转,ALT复常,停用抗病毒治疗后病毒标志再度阳转,ALT升高.部分慢乙肝患者反复多次,终因承受不了沉重的经济负担而放弃治疗.

近年来国内广泛开展了中医药治疗慢性乙型肝炎的实验和临床研究,筛选出的中药达数百种,认为具有一定的抑制乙肝病毒复制的效果,概括其主要疗法有解毒养肝、补肾祛邪、益气养阴、活血化瘀、通阳解毒、清热化湿等.据报道,每年发表的中草药治疗慢性乙型肝炎的随机临床实验至少有几十篇,且几乎都报告了有效的阳性结果^[1,2].但勿容置疑的是,近年来中医药治疗慢性乙型肝炎的广告充斥市场,其中有的冠以清除HBsAg阴转率达80%和清除肝细胞内的病毒来夸大疗效的宣传,严重影响及破坏中医中药的声誉,给患者增加不必要的经济负担,在社会上造成不良的影响.目前中医药治疗慢性乙型肝炎的实验和临床报告甚多,但经得起严格检验和重复的甚少,难以取得学术界共识.中医药治疗慢性乙型肝炎的临床疗效究竟如何需要进一步研究.

1 中医药治疗慢性乙型肝炎

慢性乙型肝炎的发病机制,是由多因素造成,往往是诸多矛盾汇集一身.既有HBV的持续存在,又有机体免疫功能失调;既有肝细胞炎症、坏死,又有肝纤维组织增生;既有热毒内蕴,又有瘀血阻络,气阴亏虚;既有肝脏本身病变,还有肝外系统表现^[3,4].目前还没有哪一种药物或方法能解决慢乙肝的全部问题,乙型肝炎的中药治疗包括以下几种方法:(1)清肝利湿促进黄疸消退;(2)活血化瘀改善肝脏微循环;(3)调理气血调动全身免疫功能;(4)健脾益肾改善肝炎的临床症状;(5)滋阴、补气,治疗各种并发症.因此从抗病毒、抗肝脏炎症、抗肝纤维化等三个环节治疗慢乙肝已达成共识.

对于轻度慢性乙型肝炎患者早期抗病毒治疗和免疫调控疗法是控制慢乙肝进展的关键.这类患者转氨酶持续反复升高者多提示病毒的复制,肝脏的炎症,治疗宜采用抑制病毒复制和控制肝脏炎症双管齐下的措施.抗病毒治疗其本,保肝降酶治疗其标,标本兼治是中医药治疗慢性乙型肝炎的法则.例如,慢性乙肝轻度(慢性迁延型肝炎)患者往往是HBVDNA水平高,而肝组织损伤轻,临床见转氨酶长期轻度升高,HBeAg、HBV DNA持续阳转,患者多表现为乏力、纳差、腹胀、胁痛等症状,此阶段多为机体免疫功能不全或呈低反应状态,这类患者抗病毒治疗效果可能没有慢性肝炎中度(慢性活动型肝炎)疗效好.治疗包括两个方面:一是通过调节免疫反

应,常采用干扰素 α ;二是直接抑制病毒复制,常采用核苷酸类药物。此时用干扰素 α 抗病毒可能比用胸腺肽更趋合理,因为干扰素 α 应用后感染的肝细胞也遭到不同程度肝损失,更有利于病毒的清除,中医辨证多属于邪蕴肝郁,脾肾两虚。提示正气不足,抗邪不力,正邪相持,迁延不愈。有人采用补肾固本方法联合西医治疗,以期提高疗效。许多中药在实验室内被证明有明显的抗HBV作用,如对肝癌2.2.15细胞株内HBV的抑制等^[5],但具体应用于临床时,这些中药的抗HBV作用常令人失望。笔者认为,中药抗乙肝病毒的优势是联合西药,仅靠中药难以取得理想疗效。

对于慢性乙型肝炎中度患者抗炎治疗有所侧重。慢性乙型肝炎中度(慢性活动型肝炎)患者临床特点为消化道症状明显,一般不能胜任工作,肝功能损害较重,可能会出现黄疸或蛋白代谢异常,血清HBeAg、HBVDNA阳性,此类患者如不采取有效措施有可能向重症化发展。针对这类患者笔者多采用“急则治其标,缓则治其本”的原则,当务之急是控制肝脏炎症,阻止黄疸继续上升,促进肝细胞再生,此时给予中医药将发挥特有的疗效,如强力宁、甘利欣、复方丹参等。黄疸呈上升趋势暂不宜进行抗病毒治疗,尤其是干扰素 α ,否则将会加重肝脏损害,促使黄疸上升。待黄疸呈下降趋势Bil $<50\text{mmol/L}$ 时可考虑抗病毒治疗,如贺普丁、胸腺肽、干扰素 α 。慢肝中度者中医辨证多属肝胆湿热、瘀血阻络,治疗宜以随证治为主,先从清热解毒、活血化瘀入手,配合西药综合治疗常能收到较好疗效。

慢性乙型肝炎中度或重度患者肝细胞内的炎症、坏死持续存在,必然引起肝内纤维组织增生,有人认为,由母婴传播的慢性乙肝病毒携带者,约有1/3可发展为慢性肝炎,慢乙肝中度约1/3可发展为肝硬化,活动性肝硬化约1/3可发展为肝衰竭,甚至肝癌^[2]。即便是积极的抗病毒治疗,有部分也难以阻止病情发展。所以,在抗病毒、控制肝脏炎症的同时,也应抗肝纤维化治疗。中医认为慢性肝病的基本病理机制是正衰邪盛,湿热未尽,关键在血瘀,在病理上表现为肝纤维化形成。经现代医学研究,中药中“活血化瘀”药物具有抗肝纤维化作用^[6],中医药以活血化瘀为主的整体治疗抗肝纤维化占有重要地位。笔者自拟软肝缩脾丸抗肝纤维化临床和实验研究显示一定的疗效。我们采用益气活血、软坚散结作用的软肝缩脾丸,治疗慢性肝炎及肝纤维化患者,观察发现其具有保护肝细胞,改善血清蛋白代谢,降低血清HA、PCⅢ的作用。动物实验证实,软肝缩脾丸对大鼠中毒性肝纤维化具有一定的预防作用。研究表明,软肝缩脾丸对肝纤维化大鼠TIMP-1、TIMP-2基因调节及蛋白表达的具有明显的抑制作用。其机制可能是通过改善肝内微循环,控制肝细胞炎症反应,改善肝脏功能,减少细胞外基质的生成与沉积,促进胶原的降解,调节免疫功能等作用,从而达到抗肝纤维化的目的。

近年来在实验和临床上,证实有抗肝纤维化作用的

中药有:大黄蛰虫丸、复方鳖甲片、软肝缩脾丸,经过“八·五”“九·五”国家科技公关项目的努力,出现了319平肝胶囊、861冲剂、衰肝冲剂、抗纤方等,为我国广大的临床患者提供了一些新的药物治疗手段,近期出现了丹酚酸乙、氧化苦参碱等一些有良好的抗肝纤维化苗头的新型中药单体成分,充分体现了我国在肝纤维化研究领域的特色。

慢性HBV携带者的中药治疗:慢性HBV携带者的治疗仍是一大难题,既往由于缺乏有效的抗病毒药物,患者多数处于免疫耐受状态,许多抗病毒药物需通过机体的免疫应答发挥作用,故抗病毒治疗难以奏效,致使不少慢性HBV携带者放弃治疗。此类HBV携带者如不进行抗病毒治疗,数年后约1/3患者发展为慢性乙型肝炎或肝硬化。针对上述情况,笔者对80例慢性HBV携带者进行肝穿活检,结果100%肝组织有炎症活动病变,25%肝组织有纤维组织增生,其中3例提示早期肝硬化。对这类患者笔者给予抗病毒和免疫调控以及中药联合治疗,收到一定疗效。通过肝穿活检体会到,对那些乏力、纳差、腹胀、鼻衄或牙龈经常出血和B超提示肝脏弥漫性损伤的患者,即便是肝功能正常,也要给予抗病毒和免疫调控治疗。因为这类患者不属于一般HBV携带者(无任何症状、肝功正常、B超正常、年龄 <15 岁,属于慢性隐匿型范畴。对于隐匿型乙型肝炎临床医师往往放弃治疗,针对这样患者及时肝穿活检,进行病情判断和指导治疗。

2 讨论

乙型肝炎是被世界卫生组织列为全球第九大引起死亡的疾病,全世界已有20多亿人口被感染,约3亿5千万成为慢性乙肝病毒携带者。慢性乙肝病毒携带者易发生肝硬化或肝癌,全世界每年约有100万患者死于肝病,其中1/3在中国^[4]。中西医结合治疗乙型肝炎是我国独特的治疗方法。在肝炎的治疗方面,许多外国学者也不得不承认我国的优势。中西医结合治疗乙型肝炎的优点是:可相互减轻副作用,增加疗效。例如西医的抗病毒药物干扰素可引起发热、白细胞减低等症状,中药可减轻其副作用,改善临床症状,促进肝细胞恢复,使干扰素疗效更佳。还有许多降酶药物、退黄药物都是从中药中提炼出来的。作为祖国传统医学的中医药在治疗慢性乙型肝炎中发挥了一定作用。

然而,中医药抗乙肝病毒的疗效似乎不如西药疗效好,抗肝脏炎症、抗肝纤维化更能显示出中医药的优势。为了评价传统中药治疗慢性乙肝的效果和安全性,Liu, McIntosh, Lin et al 进行至少随访3 mo的随机或半随机试验。将中药(单药或复方成药)与安慰剂、不治疗、常规非特异性治疗或干扰素进行对比的试验均被纳入。中药加上干扰素与单用干扰素进行对比的试验也被纳入。试验可能是双盲、单盲或非盲法。数据由两个评价员独立提取,采用治疗意向分析。9个随机对照试验,包括

936 名患者,符合纳入标准. 只有一个试验的方法学质量被认为是合格的. 这 9 个试验检测了 10 种不同的中药. 与非特异性治疗和安慰剂比较,扶正解毒汤(中药复方)在血清 HBsAg、HBeAg、HBV DNA 转阴方面有显著性效果;猪苓多糖对血清 HBeAg 和 HBV DNA 转阴有效;苦味叶下珠对血清 HBeAg 转阴有效. 与干扰素治疗相比,复方叶下珠和苦参碱对血清 HBeAg 和 HBV DNA 转阴以及转氨酶降低没有显著性差异. 被研究的其他中药没有显著性效果. 某些中药可能对慢性乙肝有效. 但证据不足,以至没法推荐任何一种单独的中药. 还需要设计严密、随机、双盲、安慰剂对照的临床试验.

中药治疗也并非价廉物美,而且部分中草药有不同程度的毒副作用,尤其是一些肝炎常用药物,如川楝子、龙胆草、山豆根等等,长期使用不仅可以加重乙肝病情,而且可直接引起药物性肝炎. 所以,使用中药也要做到因时、因人而异. 最近国外文献报道使用中草药出现肝脏毒性和其他严重的负性事件. 如日本近年来发表的文献报道小柴胡汤治疗慢性肝病时发生间质性肺炎等,因此对现有治疗慢性乙型肝炎的中草药应当科学验证,重新评价,正确引导,规范管理,从而进一步提高中草药的疗效及中医药的临床应用价值.

3 参考文献

- 1 刘建平,秦献魁,McIntosh H. 中草药治疗慢性乙型肝炎随机对照试验的系统评价. 中国中西医结合杂志 2002;22:58-60
- 2 申德林. 病毒性肝炎的中西医诊治及进展. 第 1 版. 郑州:河南医科大学出版社, 2000:214
- 3 陈立华. 中医中药治疗慢性乙型肝炎的若干问题探讨. 中国中西医结合杂志 2000;20:4-5
- 4 刘平,曾民德,王吉耀. 中西医结合抗纤维化. 中国中西医结合杂志 2002;22:328-332
- 5 刘泽富,聂青和. 病毒性肝炎的诊断与治疗. 第 1 版. 北京:人民军医出版社, 2001:573-608
- 6 徐克成,危北海,姚希贤,张万岱. 慢性乙型肝炎当代中西医结合治疗. 世界华人消化杂志 1999;7:970-974

乙型肝炎病毒携带者的诊断与治疗

江家骥,朱 琪

江家骥,朱琪,福州市传染病医院肝病研究所 福建省福州市 3500025
项目负责人:江家骥,350025,福建省福州市西洪路 312 号,福州市传染病医院肝病研究所.

电话:0591-3722198

收稿日期:2002-10-30 接受日期:2003-01-10

江家骥,朱琪. 乙型肝炎病毒携带者的诊断与治疗. 世界华人消化杂志 2003; 11(6):787-789

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/787.asp>

0 引言

我国为乙型肝炎病毒携带者大国,目前全世界乙型肝炎病毒携带者约为 3.5 亿,我国就有 1.3 亿,因此如何

规范乙型肝炎病毒携带者的诊断与治疗,是摆在我们面前急待解决的问题,本文就此问题作一探讨.

1 乙型肝炎病毒携带者(乙肝病毒携带者)的定义

乙肝病毒携带者到目前为止尚无一个规范的定义,在许多文章中经常出现下列命名:“健康携带者”、“HBsAg 阳性无症状携带者”、“慢性无症状 HBV 携带者”(chronic asymptomatic HBV carrier, AsC),究竟以哪一种命名为妥?多年来大样本的跟踪随访及肝穿活检研究结果表明,这些携带者中仅有少数为真正的“健康携带者”,其余大部分为潜伏状态下的迁延性肝炎或活动性肝炎病例,有的甚至已达到肝硬变程度. 因此真正的“健康携带者”应该具备以下几个条件^[1]: (1)从未有过明确的肝炎发病史(如急性肝炎等),一直没有临床症状(如容易疲劳、食欲不振、肝区不适或疼痛等)和体征(肝掌、蜘蛛、面色晦暗、脾肿大等); (2)血清乙肝表面抗原 HBsAg 阳性,但是肝功能始终正常(如血清转氨酶、胆红素、白蛋白比值等); (3)肝活检组织正常或大致正常,在这些标准中,肝活检组织检查最为关键,也最为困难,严格地说健康携带者只能指肝组织无变化者,但是让每位乙肝病毒表面抗原阳性者都做肝穿刺检查是极不现实的,真正的“健康携带者”仅占乙肝病毒携带者的 15-20%. 因此,以健康携带者来命名是不恰当的,且可能延误治疗,给患者带来负面的影响. 世界各地均有报道 HBsAg 阴性 HBV 感染,经分子生物学和免疫组织化学检出肝细胞内有 HBV 的病毒抗原和病毒核酸以及血中有病毒核酸. 因此,AsC 应包括 HBsAg 阳性和 HBsAg 阴性的仅肝内存在病毒者和同时有病毒血症者. 故以 HBsAg 阳性无症状携带者来定义乙肝病毒携带者,将会对一部分 HBsAg 阴性病例的遗漏,出现漏诊,因此我们认为乙肝病毒携带者应定义为:慢性无症状 HBV 携带者.

AsC 的肝组织可无改变,也可出现由轻微病变至肝硬化的系列慢性肝病谱^[2],我院对 24 例 AsC 患者进行肝穿刺活体组织检查,其中 76.9% 肝脏病理组织有不同的炎症改变,15.4% 肝组织未见炎症反应. 骆抗先研究 261 例 AsC 肝活检的肝组织表现:肝组织正常者仅约 10%,灶性炎症和非特异反应性炎症 45%,仅有汇管区炎的轻度慢性肝炎约 25%,有明显小叶病变的慢性肝炎和有界面炎症的慢性肝炎各约 10%,其中个别已是肝硬化^[3]. 因此,AsC 诊断应通过体征、影像学及肝组织病理诊断来综合判断其处于哪个阶段,而不能简单的认为 AsC 就是健康者. AsC 的诊断依据: (1)HBV 感染时间 6 mo 或 6 mo 以上; (2)无肝炎症状和体征,各项肝功能检查正常,经 6 mo 观察无变化者; (3)影像学和/或肝组织病理正常或不同程度的异常.

2 预后

大多数 AsC 在漫长的 HBV 携带后携带状态能自行结束,AsC 的肝组织病变 60-80% 是非活动性的,进展

性的肝炎仅10-20%。慢性肝炎5a内12-20%进入肝硬化,而肝硬化5a内分别有5%进入肝细胞癌(HCC)或肝衰竭^[4]。

2.1 慢性携带状态的结束 HBV携带者在其少年儿童阶段尽管HBeAg阳性并有大量病毒复制,却多不发病,也无明显的肝细胞损害而表现为HBeAg阳性AsC。至成年期大约20岁左右大多经过一过性的肝细胞损害而后转为抗HBe阳性的AsC,这一过程可视为人体免疫机制将感染的肝细胞加以破坏和清除的过程。抗HBe阳性AsC,处于HBV复制静止状态,其病毒量明显减少,是HBV感染的恢复期,感染终将结束。然而抗HBe阳性是一个较长的过程。每年有超过10%的AsC个例HBeAg阳性转为阴性,而HBsAg转阴的不足2%。1-12岁的AsC,年阴转率0.6%,主要发生在抗HBe阳性、有显著肝组织学改变、母亲HBsAg阴性的小儿。

2.2 病变活动和进展 (1)慢性肝炎:大约20%AsC在不同时期发生肝炎,AsC亚临床活动远比临床诊断慢性肝炎要多,故AsC中慢性肝炎的发生率可能较此为高。(2)肝硬化和肝细胞癌:肝硬化和肝细胞癌是基于炎症坏死后过度增生而发展的,炎症坏死性肝病是发生的必要条件,故AsC并不能直接发生肝硬化和肝细胞癌。但不少AsC有亚临床活动,在数年至数十年亚临床活动后,肝硬化或肝细胞癌似在AsC的基础上“突然”发病。我国有70-90%的HCC为HBsAg阳性^[5]。

3 AsC的治疗

我国有1.3亿的AsC者,因此如何合理而适当地处理这些人群已不仅是医学问题,而且是重要的社会问题^[6]。然而,目前还没有一种较统一而又规范的治疗措施,且市场上又充塞了大量的缺乏经科学验证而又真实有效的药物,给社会资源造成巨大浪费^[7]。我们从以下几个方面着手,为AsC提供一个治疗原则。

3.1 卫生宣传 AsC者大多存在一些心理问题,近90%的AsC者在查出之前无症状或症状轻微不被发觉,但一旦得知为HBV携带者就表现紧张、恐惧、不知所措。逐渐出现倦怠、乏力、肝区不适、多梦、失眠,近30%的人有焦虑,担心发生肝硬化、HCC;担心传染给家人和亲友,从而妨碍正常的学习、工作和生活,有些甚至不敢结婚或婚后不敢怀孕,这主要是由于我国当前对HBV感染的知识的宣传教育还不够,广大社会人士对此问题认识不深,建议全社会动员起来,采用各种宣传形式,包括在中小学中开设卫生课等,做到AsC者了解自己,社会人士不对AsC者歧视。

3.2 对AsC进行科学管理 对AsC者建立一个防治网络系统,以便早期检出病变活动,早期发现肝硬化、HCC的可疑病例,及时诊断、治疗,做好宣传教育,使AsC者对问题有正确认识,减少传播机会。(1)建立保健档案:出诊或体检时,发现的HBsAg携带者需继续复查,如6mo后持续携带,可诊断为AsC,普查或一次门诊,不可

能充分了解其全面情况,因此,最好建立保健档案,了解其病理状态,才能做出相应的适当处理。(2)定期观察:主要观察内容包括症状、肝掌、蜘蛛痣、肝脾肿大、乙肝病毒标志物(HBV-M)、ALT和白/球蛋白(A/G)等。一般HBeAg阳性者每3mo门诊采血复查一次, HBeAg阴性者每6mo查一次,按保健档案内容填写记录。因为AsC发生原发性肝癌(HCC)的危险性较正常人群大为增加(高34倍),因对有肝癌家族史、老年人、长期饮酒者或肝癌好发地区者6mo-1a应进行甲胎蛋白及B超检查一次。无肝癌相关因素者,1-2a应进行甲胎蛋白及B超检查一次。ALT升至正常高限2.5倍以上或不够2.5倍但间隔15d复查仍异常者,表示病情活动,有的个例活动十分隐蔽,ALT仅间歇性轻微升高,对于有病情活动的个例复查应缩短每月一次。特别要加强预防母婴传播的对策,AsC怀孕应缩短检查时间,尤其妊娠晚期应每月查肝功一次,注意发生重型肝炎。(3)保健咨询:主要也是宣传教育,应使AsC能自由接受医学观察,能自我保健。可采取门诊、信函或电话咨询。医务人员应学习有关知识,在定期复查中,正确对AsC者及其家属给予保健指导,如:性生活最好使用安全套,性生活要有节制,尽量避免强体力劳动或剧烈运动,对新生儿指导接种HBIG与乙肝疫苗,HBV不通过蚊虫传染等。对AsC应十分关心,需积极建立医患相互信赖关系,使AsC者信任医生,依从保健指导,需解决心理上的疑难问题,解脱忧愁,提高适应能力,有利身心健康。(4)一切AsC均应有以下一般性约束和要求:(1)不能献血及组织器官,流出的血液、月经必须适当处理,尽量避免他人接触,污染物应彻底消毒或及时烧毁。(2)牙刷、剃刀、浴巾、毛巾和手帕必须专用,采取分餐制(HBV一般不通过消化道传播,但当被接触人群有口腔炎症及黏膜破损或消化道炎症及黏膜破损时可通过消化道传播)。(3)AsC的家属和同居人员亦应接受检查,特别是其母父、子女、同胞和配偶也要检查有否感染。(4)求医就诊时,必须主动告诉医生自己是AsC,医生可尽量避免开出损害肝脏的药物,特别是接受手术、分娩、修牙、针灸或有出血(如创伤出血、咯血、呕血或便血)时,以便区别诊疗处理,避免造成院内感染。(5)不宜从事整容、牙医、助产、托幼、食品加工和餐饮服务行业工作。上述约束和要求的贯彻中,应注意无论对AsC本人或其周围人群都不要促成精神紧张,更不能形成顾虑甚至恐惧。不可盲目扩大职业回避范围,不应将AsC列为一切职业择优录取的排斥对象。

4 药物治疗

关于HBV携带者的治疗问题,使临床医生感到十分棘手,多年来国内外学者的实践证明,无论是免疫调节还是抗病毒疗法、或二者结合,收获均微^[3-7]。有些药物和疗法由于缺乏严格的双盲和前瞻性研究,结果重复性差。近年来,国内外学者均倾向于对HBV慢性携带者不应常规使用抗病毒药物治疗^[8]。免疫抑制剂可能导致HBV DNA的清除延缓,甚至出现致死性肝炎的发生^[9]。临床医生应根据不同情况采用不同的方法加以处理。

4.1 非复制期的 AsC, 如乙肝两对半呈小三阳, HBV-DNA $<10^5$ copy/mL 或斑点杂交法阴性者, 一般病情不活动, 无需治疗。

4.2 高复制期的 AsC, 如乙肝两对半呈大三阳, 且 HBV-DNA $>10^5$ copy/mL, 肝脏无明显的损害, 原则上不主张进行治疗, 但间断服用一些护肝药物也无不可, 切忌滥用药物造成药物性肝损害。

4.3 对影像学或肝组织学检查有病理改变者, 很可能已是迁延性或活动性肝炎, 他们实际已是亚临床型肝炎, 病变在潜移默化中发生进展。这些人群有必要加以适当的保肝治疗和抗病毒治疗, 但抗病毒治疗效果差。由于儿童乙肝患者的 ALT 变化往往与肝组织的病理改变不一致, 肝组织学改变严重于生化的变化, 这是因为小儿免疫耐受或免疫紊乱等原因, 因此对于小儿只要肝脏有活动性病变, 有病毒活动性复制, 都是抗病毒治疗的指征。

5 对 AsC 的一些建设性意见

5.1 AsC 患者能否饮酒? 饮酒量多少? 是我们所关注的, 我们认为 AsC 患者以不饮酒为宜, 若是确实交际或工作需要饮酒的话, 一定要慎重, 即使原来酒量较大的人, 每日饮酒量亦要 <20 g/d, 饮酒 <40 g/wk。

5.2 AsC 在使用肝损药物时应如何把握? 原则上 AsC 患者尽量避免使用损肝药物, 但是, 当 AsC 合并结核病时, 必须使用抗痨药物时, 可以在保肝的基础上继续使用, 并定期检查肝功, 原则上, ALT $<$ 正常 3 倍, 胆红素 $<$ 正常 2 倍, 白蛋白 >35 g/L, 不主张停药, 可密切观察继续使用但一定要慎重, 每 15 d 检查肝功一次。糖尿病尽量避免口服降糖药物, 改用胰岛素治疗。

5.3 AsC 者接受器官移植、化疗或免疫抑制剂治疗时, 可于术前或化疗前 1-2 mo 给予拉咪呋啶抗病毒治疗, 或密切观察肝功能变化, 一旦 ALT 异常升高, 立即给予拉咪呋啶治疗, 剂量 0.1 mg, 1 次/d, 持续时间依病情而定, 最大限度地减少 HBV 的再活动。

6 参考文献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000;8:324-329
- 2 骆抗先. 乙型肝炎临床与活体组织病理. 第 1 版. 北京:科学出版社, 2001:160-176
- 3 骆抗先. 乙型肝炎的基础和临床. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社, 2001:315-326
- 4 Sherlock S. Clinical features of hepatitis. In: Zuckerman AJ, Thomas HC. Viral hepatitis. London: Churchill Livingstone, 1997:1-30
- 5 刘泽富, 聂青和. 病毒性肝炎的诊断与治疗. 第 1 版. 北京:人民军医出版社, 2001:221-268
- 6 Chan HL, Tsang SW, Leung NW, Tse CH, Hui Y, Tam JS, Chan FK, Sung JJ. Occult HBV infection in cryptogenic liver cirrhosis in an area with high prevalence of HBV infection. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1211-1215
- 7 Kato Y, Nakao K, Hamasaki K, Kato H, Nakata K, Kusumoto Y, Eguchi K. Spontaneous loss of hepatitis B surface antigen in chronic carriers, based on a long-term follow-up study in Goto Islands, Japan. *J Gastroenterol* 2000;35:201-205
- 8 Bernardi M, Biselli M, Gramenzi A. Chronic hepatitis B. Recent advances in diagnosis and treatment. *Recent Prog Med* 2002; 93:397-402
- 9 Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002;2:43-50

慢性乙型肝炎肝纤维化的诊断与治疗

蔡卫民, 张彬彬

蔡卫民, 张彬彬, 浙江大学医学院附属第一医院传染病研究所
浙江省杭州市 310003
项目负责人:蔡卫民, 310003, 浙江省杭州市庆春路 79 号, 浙江大学医学院附属第一医院传染病研究所.
电话:0571-87236580
收稿日期:2002-10-30 接受日期:2003-01-10

蔡卫民, 张彬彬. 慢性乙型肝炎肝纤维化的诊断与治疗. 世界华人消化杂志 2003;11(6):789-791

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/789.asp>

0 引言

肝纤维化可由多种原因引起, 我国以乙型肝炎最为常见, 因其病因难以去除, 故人们十分重视乙型肝炎肝纤维化的研究, 本文就其诊断与治疗作扼要讨论。

1 乙型肝炎肝纤维化的诊断

肝纤维化的诊断仍应强调综合考虑, 笔者等在多年研究肝纤维化血清指标谱的基础上, 于 1995 年提出“肝纤维化诊断的积分方案”, 可供参考。现结合新进展作介绍。

1.1 临床诊断(提供线索) 询问病史, 全面体检。

1.2 组织病理学诊断

1.2.1 肝活检组织病理学检查的基本要求 组织病理学检查是明确诊断, 衡量炎症活动度、纤维化程度, 以及判定药物疗效的重要依据。为避免因肝穿刺组织太小给正确诊断带来困难, 力求用粗针穿刺, 标本长度须在 1 cm 以上(1.5-2.5 cm)。至少在镜下包括 3 个以上汇管区。肝穿标本应做连续切片, 常规作苏木素-伊红、网状纤维和(或)Masson 三色染色, 以准确判断肝内炎症、结构改变及纤维化程度, 并根据需要增加免疫组织化学或病毒抗原或核酸的原位检查。

1.2.2 慢性肝炎组织学分级、分期 详见 2000 年西安全国肝病会议通过的病毒性肝炎防治方案。

1.3 血液学检查

1.3.1 反映间质代谢的指标反映间质代谢的指标可分为 (1)参与间质代谢的酶, 如羟化酶、氧化酶、胶原酶(属金属蛋白酶类, MMPs)和肽酶; (2)胶原和胶原代谢产物, 如Ⅲ型前胶原肽(PⅢP)与Ⅲ型前胶原(PCⅢ), Ⅳ型胶原(C-Ⅳ), I 型和Ⅵ型胶原, 羟脯氨酸(Hyp)等; (3)非胶原糖蛋白, 包括层粘连蛋白(LN), 纤维连接蛋白(FN), 粗纤维调节蛋白(又称波状蛋白 UN)、细胞粘连蛋白等; (4)蛋白多糖, 由一个核心蛋白连接多个糖胺多糖(GAG)组成, 如透明质酸(HA)等。有关 HA、PCⅢ、C-Ⅳ、LN 对肝纤维化的诊断价值已有详尽报道^[1]。本文着重报道 TIMP-1 在肝纤维化中的诊断价值。1993 年 Murawaki et al^[2,3]报道血清 TIMP 以酶复合物形式存在,

采用酶标法检测健康人血清TIMP含量为 164 ± 20 ng/mL,慢迁肝、慢活肝及肝硬化患者与健康人相比分别升高10%、36%、62%,并发现血清TIMP与血清胶原酶活性呈负相关,与肝纤维化程度密切相关.1999年Murawaki et al^[4]报道健康人血清TIMP-1浓度为 155 ± 17 ng/mL(酶标法),慢迁肝、慢活肝及肝硬化患者与健康人相比分别升高18%、35%、63%.Lichtinghagen et al^[5]认为外周血白细胞MMP-2、MMP-9、TIMP-1和TIMP-2的mRNA水平与血清中蛋白浓度无关,血循环中MMP-2/TIMP-1的比值与肝纤维化程度相关.聂青和 et al^[6]用固相致敏红细胞黏附技术检测肝硬化患者血清TIMP-1和TIMP-2阳性率分别为73.6%、61.2%,且血清TIMP-1和TIMP-2含量与肝组织中二者的表达水平有明显相关性,认为TIMP-1和TIMP-2,特别是TIMP-1可作为一种有价值的肝纤维化的诊断指标.多数研究证实,血清TIMP-1与血清PⅢP、Ⅳ型胶原密切相关.目前越来越多的研究人员将血清(浆)TIMP-1水平看作肝纤维化诊断指标,但是需要与其他指标联合分析.郑敏 et al^[7]初步研究认为测PBMCs内的TIMP-1mRNA、MMP-1/TIMP-1的mRNA比值对慢性肝炎肝纤维化诊断有较大价值,并且二者联合检测可使灵敏度达82.86%、特异度达100%,而血清TIMP-1对肝纤维化的早期诊断有一定价值,灵敏度为65%,特异度为75%,这与Murawaki et al^[8]的报道一致,若三者联合检测将使特异度达到100%.Li et al^[9]用酶标法检测酒精性肝病患者血清TIMP-1水平,并与组织学对比,发现血清TIMP-1在酒精性脂肪肝时不增高,而在早期酒精性肝纤维化时即有增高,增高水平与肝纤维化程度呈正相关.Koulentaki et al^[10]ELISA法检测19例处于黄疸期的急性病毒性肝炎患者血清TIMP-1、2,发现血清TIMP-2水平与正常对照组比较明显增加,而血清TIMP-1浓度与正常人比较无明显改变.Boeker et al^[11]对59例慢性丙型肝炎、19例丙肝肝硬化、30名健康人血清TIMP-1水平的变化研究后发现:正常对照组<慢性肝炎无肝纤维化者<慢性肝炎伴有肝纤维化者<肝硬化者.对于其他病因引起的肝纤维化,血清TIMP-1是否也同样具有较强的特异性有待于深入研究.

1.3.2 参与调节肝纤维化形成的细胞因子的检测 血清中的TGF- β 1(细胞抑制法和酶标法)与正常人有较大的重叠,其诊断价值国内尚无一致观点.罗瑞红 et al^[12]认为血清TGF- β 1有助于诊断肝硬化和S2期以上的肝纤维化,与血清HA同时检测时,可粗略估计肝纤维化的程度.李成忠 et al^[13]报道200例慢性肝炎患者中,仅个别纤维化病例血清TGF- β 1水平显著高于正常人,认为血小板数量、肝组织炎症程度、血清和血浆中含量不同等因素影响其临床应用的价值.郑敏 et al^[7]用酶标法检测了60例慢性肝炎患者血清TGF- β 1含量,认为其对肝纤维化的诊断价值不大.郑敏 et al已报道用定量PCR法检测PBMC中TGF- β 1 mRNA水平,并初步发现其在PBMC中

含量与在肝组织中的含量差异无显著性,且认为肝纤维化患者PBMC中TGF- β 1和IFN- γ mRNA含量的比值可能有较大的临床意义.

1.3.3 反映慢性肝损伤指标 蔡卫民 et al研究认为血清腺苷脱氨酶(ADA)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)等反映慢性肝损伤较ALT为佳.Walsh et al^[14]认为ALT与肝纤维化相关性较差.Tran et al^[15]认为凝血酶原指数是判断肝纤维化的最佳指标之一.Oberti et al^[16]检测了63例慢性肝病患者凝血酶指数、GGT、 α 2巨球蛋白等指标,认为凝血酶指数对诊断肝硬化有重要意义.李成忠 et al^[13]认为GGT可作为有无肝纤维化的指标之一,A/G比值可作为判断肝纤维化程度的指标之一.其他可用于辅助诊断的指标还有 γ -球蛋白、IgG、AFP、APOA1等.

1.4 影像学诊断 超声、CT和(或)MRI的合理选用及相互对照验证,有助于动态观察.使用量化或半量化标准观察肝脏的弹性、肝脏体积、肝脏表面的边缘、肝包膜厚度、肝实质、肝内血管和胆管、脾脏和脾静脉以及胆囊等指标的改变,对肝纤维化的诊断和评估病变的活动度可提供有价值的参考资料.现有的资料表明,门静脉主干,门静脉每分钟血流量参数、脾厚度、脾静脉宽度及肝右叶最大斜径等参数的改变与肝纤维化程度有较好的相关性.

2 乙型肝炎肝纤维化的治疗

目前将肝纤维化治疗分为去除致病因子(彻底治疗原发病)、抗肝纤维化治疗及对症支持疗法,至今已获公认^[17].

2.1 彻底去除原发病因极为重要,抗肝纤维化治疗亦不可忽视 α 干扰素和拉咪呋啶抗HBV作用已获承认,虽不理想,但至今尚无更好者.使用这些药物祛去病毒仍有赖于机体免疫功能,所以在用药同时请勿使用免疫抑制剂为好.中医中药抗HBV已有较多的报道,但确切疗效尚待证实.现有人主张拉咪呋啶加中医中药(如乙肝散)治疗亦获益.业已公认去除病因后,肝纤维化仍可继续发展,因而有必要进行抗肝纤维化治疗.

2.2 抗肝纤维化治疗

2.2.1 适应证 (1)若HBV DNA和HBeAg阳性、ALT>正常2倍、血清胆红素升高<正常2倍,应予抗病毒治疗,剂量、疗程、疗效考核标准详见有关规定.蔡卫民 et al进行的肝纤维化动物实验研究显示,在炎症明显活动期,胶原合成、分泌增加,但其降解也增加,胶原沉积增加不明显,血清肝纤维化指标也可明显异常,暂不考虑抗肝纤维化治疗.但也有人主张抗病毒治疗的同时抗肝纤维化治疗;(2)若HBV-DNA和HBeAg阴性,肝活证实肝纤维化程度>2期(S2)或血清肝纤维化指标>正常上限值($\bar{x} \pm 2s$),应予抗肝纤维化治疗.或经降酶、降黄疸等对症治疗后血清肝纤维化指标仍异常者,亦应抗肝纤维化治疗;(3)所谓健康乙型肝炎病毒携带者(血清HBV DNA和HBeAg阳性,但肝功能正常);(4)明显肝硬化者或明显黄疸、腹水者,或伴有其他严重器质性疾病者,目前尚无适宜的抗肝纤维化治疗方法.

2.2.2 抗肝纤维化药物疗效评价 详见有关报道^[18].

2.2.3 抗肝纤维化药物 目前国内外学者报道的抗肝纤维化药物多达数十种, 但多限于动物实验或因较大的毒性而在临床研究中停止使用. 最近, Dubuisson et al^[19]报道用去甲肾上腺素拮抗剂(OHDA, 6-羟基多巴胺)或特异的 α 1肾上腺素受体拮抗剂(prazosin)阻断交感神经信号传导, 可以抑制肝纤维化的发展. 因肾上腺素受体拮抗剂安全性大, 故有望用于临床治疗. 国外尚无一种抗纤维化药物获得药品管理机构批准用于临床, 我国已有两种抗肝纤维化药物获得国家药品监督管理局(SDA)批准. 一种为注射用重组人 γ 干扰素, 1 MU/支, 9 mo为一疗程. 前3 mo 1次/d, 1支/次, 肌注; 后6 mo 隔日1次, 1支/次, 肌注. 治疗组总有效率为66%(显效率为24.2%), 对照组总有效率为16.2%(显效率为7.4%), 两组比较差异显著. 另一种为解放军302医院研制的复方鳖甲软肝片, 以鳖甲、赤芍、黄芪、冬虫夏草、板兰根等中药组成. 在临床上报道较多的抗肝纤维化中药复方有北京友谊医院研制的以丹参、黄芪为主的10味中药组成“816”方和上海中医药大学研制的以桃仁、虫草菌丝、丹参及松黄等组成319肝平胶囊(扶正化瘀319方). 上海第二医科大学新华医院等对汉防己甲素(Tet)进行了体外、动物实验与临床研究, 均证明有较好的抗肝纤维化作用. 广泛应用的还有西列宾胺、维生素E、硫酸锌, 虽无明显副作用, 但疗效有限.

3 参考文献

- 1 蔡卫民, 郑敏, 翁红雷, 刘荣华. 慢性肝炎患者血清纤维化指标的检测及其意义. *中华内科杂志* 2001; 40:448-451
- 2 Murawaki Y, Yamamoto H, Kawasaki H, Shima H. Serum tissue inhibitor of metalloproteinases in patients with chronic liver disease and with hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 1993;218:47-58
- 3 Murawaki Y, Kawasaki H, Burkhardt H. Serum collagenase activity in chronic liver diseases. *Pathol Res Pract* 1994;190:929-933
- 4 Murawaki Y, Ikuta Y, Kawasaki H. Clinical usefulness of serum tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 assay in patients with chronic liver disease in comparison with serum TIMP-1. *Clin Chim Acta* 1999;281:109-120
- 5 Lichtinghagen R, Huegel O, Seifert T, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Bahr M, Boeker KH. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and their inhibitors in peripheral blood cells of patients with chronic hepatitis C. *Clin Chem* 2000;46:183-192
- 6 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
- 7 郑敏, 蔡卫民, 翁红雷. 肝炎肝纤维化患者血清及外周血单个核细胞内 MMP-1、TIMP-1、TGF- β 1 和 PDGF-BB 的检测与意义. *临床肝胆病杂志* 2002;18:89-90
- 8 Murawaki Y, Ikuta Y, Okamoto K, Koda M, Kawasaki H. Diagnostic value of serum markers of connective tissue turnover for predicting histological staging and grading in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol* 2001;36:399-406
- 9 Li J, Rosman AS, Leo MA, Nagai Y, Lieber CS. Tissue inhibitor of metalloproteinase is increased in the serum of precirrhotic and cirrhotic alcoholic patients and can serve as a marker of fibrosis. *Hepatology* 1994;19:1418-1423
- 10 Koulentaki M, Valatas V, Xidakis K, Kouroumalis A, Petinaki E, Castanas E, Kouroumalis E. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in acute viral hepatitis. *J Viral Hepat* 2002;9:189-193
- 11 Boeker KH, Haberkorn CI, Michels D, Flemming P, Manns MP, Lichtinghagen R. Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin Chim Acta* 2002;316:71-81

- 12 罗瑞红, 杨绍基, 谢俊强, 赵志新, 何有成, 姚集鲁. 肝纤维化五项标志物的诊断意义. *中华肝脏病杂志* 2001; 9: 148-150
- 13 李成忠, 万谟彬, 曾民德, 茅益民, 范竹萍, 曹爱平, 李继强, 邱德凯, 苏炳华, 何清波, 陆伦根, 叶军, 蔡雄, 陈成伟, 王吉耀, 胡德昌, 张清波, 巫善明, 周霞秋, 朱金水, 张惠泉. 非创伤性诊断指标优势组合对肝纤维化诊断价值的初步研究. *中华肝脏病杂志* 2001;9:261-263
- 14 Walsh KM, Timms P, Campbell S, MacSween RN, Morris AJ. Plasma levels of matrix metallo proteinase-2(MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases-1and -2(TIMP-1 and TIMP-2)as noninvasive markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci* 1994;44:624-630
- 15 Tran A, Hastier P, Barjoan EM, Demuth N, Pradier C, Saint-Paul MC, Guzman-Granier E, Chevallier P, Tran C, Longo F, Schneider S, Piche T, Hebuterne X, Benzaken S, Rampal P. Non invasive prediction of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Gastroenterol Clin Biol* 2000;24:626-630
- 16 Oberti F, Valsesia E, Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, Aube C, Gallois Y, Rifflet H, Maiga MY, Penneau-Fontbonne D, Cales P. Noninvasive diagnosis of hepatic fibrosis or cirrhosis. *Gastroenterology* 1997;113:1609-1616
- 17 叶维法. 肝病治疗学, 第1版. 天津: 天津科学技术出版社, 1990: 341-345
- 18 蔡卫民. 肝纤维化的治疗. *现代医药卫生* 2002;18:259-260
- 19 Dubuisson L, Desmouliere A, Decourt B, Evade L, Bedin C, Boussarie L, Barrier L, Vidaud M, Rosenbaum J. Inhibition of rat liver fibrogenesis through noradrenergic antagonism. *Hepatology* 2002;35:327-331

乙型肝炎病毒慢性感染和肝癌发生

苏 勤

苏勤, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科 陕西省西安市 710038
国家自然科学基金项目, No.3880376, 39470778, 30171052
项目负责人: 苏勤, 710038 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学唐都医院病理科. qinsu@fmmu.edu.cn
电话: 029-3377467 传真: 029-3552079
收稿日期: 2002-10-10 接受日期: 2003-01-10

苏勤. 乙型肝炎病毒慢性感染和肝癌发生. *世界华人消化杂志* 2003;11(6):791-795
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/791.asp>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是人类最常见的恶性肿瘤之一. 在世界范围内居男性最常见恶性肿瘤的第7位, 居女性第9位; 在中国被列为男性恶性肿瘤的第3位, 仅次于胃癌和食管癌. 全世界每年大约43.7万人被诊断为HCC, 其中约一半发生在中国. 多数HCC在发现时已进入进展期, 恶性程度高, 其5a存活率小于3%^[1]. 近年来的流行病学和实验室研究初步表明, HCC的主要发病因素有乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)或丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)慢性感染、黄曲霉素B1(aflatoxin B₁, AFB₁)的摄入以及酗酒. 在我国, HBV慢性感染是一种最常见的致病因素, 在启东和广西的某些地区还有AFB₁摄入这一因素同时存在.

1 HBV与HCC的关联: 流行病学证据

HCC在不同国家或地区发生率差别很大, 男性HCC年

发生率在莫桑比克高达 112.9/10 万,而在欧洲多数国家仅为 3/10 万,这种地理位置上的差异与世界范围内的 HBV 感染率基本一致.来自大多数地区的数据证实 HCC 发病率与乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)携带率呈正相关.另一方面, HCC 患者中 HBsAg 携带率与所处的地区密切相关, HCC 高危地区, 塞内加尔为 61.2 %, 南非为 61.6 %, 香港为 82.0 %, 中国大陆为 86.0 %, 菲律宾为 70.0 %;中危地区希腊为 45.9 %;低危地区美国为 14.7-17.9 %^[2,3].

在中国,至少 80 %的 HCC 发生于 HBsAg 携带者,而 HBsAg 携带者中 HCC 发生率显著高于不带 HBsAg 的人群.在一项对 22 707 位中国台湾居民的长达 6 a 的前瞻性调查中, Beasley et al 发现 HBsAg 阳性人群中 HCC 年发生率为 528/10 万,而 HBsAg 阴性个体仅为 2.5/10 万,相对危险性为 217,并发现携带 HBsAg 与其他癌症和肝内转移癌之间没有联系,证明了 HCC 与 HBV 持续感染之间关联的特异性^[4].

HBV 感染发生在 HCC 发生之前,围产期感染并转为慢性过程是 HCC 发生的危险因素之一^[5].在诸如南部非洲、中国台湾和新加坡等 HBV 感染发生率较高的地区, HCC 常发生于较年轻的个体(50 岁以下),甚至在儿童;而在欧洲和美洲, HCC 多发生于 50 岁以上的个体.

对于这些看起来十分可靠的数据应该指出两点.第一,上述所谓 HBV 慢性携带者仅指 HBsAg 携带者,尚不包括 HBV 隐匿型感染^[6].最近的一项研究显示,在某些所谓“HCV 相关”的 HCC 组织^[7]和血清标本^[8,9]中也存在 HBV 序列,提示至少在部分“HCV 相关”的 HCC 病例中, HBV 隐匿型感染也是一种可能的致癌因素^[6,9].第二,上述流行病学研究数据只是表明 HBV 慢性感染与人 HCC 有关,要证实 HBV 参与人 HCC 发生还需许多直接证据,主要包括实验研究和针对 HBV 的干预疗法对 HCC 发生的影响的研究.

2 HBV 和 HCC 的关联:实验室证据

几个方面的实验室研究已经确立了 HBV 和 HCC 之间有着明显且特异的联系,但这种联系仅限于 HBV 持续性感染.

2.1 动物模型的研究 HBV 是一种嗜肝 DNA 病毒,呈环状的 DNA 部分为双股,基因组长度仅为 3 200 bp 左右,但却有 6 个部分重叠的开放阅读框架.三种动物嗜肝病毒与 HBV 在形态和基因组结构上极为相似,即土拨鼠肝炎病毒(woodchuck hepatitis virus, WHV),地松鼠肝炎病毒(ground squirrel hepatitis virus, GSHV)和中国家鸭乙型肝炎病毒(duck hepatitis B virus, DHBV),他们都是部分双股 DNA 病毒,有与 HBV 相似的 S 抗原、C 抗原和 DNA 聚合酶(P)等编码区. HBV、WHV 和 GSHV 还有第四个基因编码框, X 基因,编码 x 蛋白. HBV 与 WHV、GSHV 和 DHBV 之间同源核苷酸比例分别为 70 %、50 %和 40 %,都能引起肝脏慢性持续感染,形态学上类似于慢性肝炎.近 20 a 来人们对于 WHV 与 HCC 的研究为 HBV 的致癌

作用提供了一系列间接的,但却强有力证据.从幼龄时感染 WHV 的土拨鼠几乎 100 %在 3 a 之内发生 HCC,而未感染的土拨鼠 HCC 自然发生率极低;虽然 DHBV 持续感染也能引起病毒 DNA 整合入肝细胞并能造成基因重排,但其致癌能力至今还未确立^[10].

2.2 HBV DNA 转基因动物研究 HBV 感染具有明显的种属特异性,如何建立与人自然感染情况相似,但又经济方便的 HBV 感染动物模型一直困扰着科学家们.向小鼠受精卵或早期胚胎中注射 HBV DNA 或其片段,由此在子代小鼠中部分成为 HBV 转基因小鼠.目前已成功地进行了 HBV S 基因及 X 基因的转基因研究,结果是有启示意义的.

Kim et al^[11]在 1991 年首先报道,涉及到 HBV x 蛋白(HBV x protein, HBx)编码区的转基因可诱发小鼠癌前变异肝细胞病灶(foci of altered hepatocytes, FAH)和 HCC,表明了 HBx 在肝脏的致癌性.在其后的研究中, Koike et al^[12,13]表明, HBx 致癌性的强弱与其表达水平有关.

另一个 HBV 转基因动物模型是 Chisari et al^[14]制备的.他们把含 PreS1/S2 的 HBV DNA 片段与小鼠白蛋白启动子一起构建成重组体,这种转基因小鼠肝细胞中大量表达 HBsAg(p25, gp27)及 PreS1/S2 多肽(p43, gp45),导致大部分肝细胞中这些蛋白异常储积于滑面内质网内,形成毛玻璃样细胞.在这些小鼠肝脏中,出生后 6 mo 开始出现 FAH, 9 mo 出现肝细胞腺瘤,存活 12-34 mo 的 31 只动物中,有 8 只出现 HCC (25.8 %)^[15].然而,这一模型中有 2 个事实值得注意.首先在肝实质的肿瘤前期病灶 FAH 及肿瘤细胞中, HBsAg 表达明显减弱或已停止,这种 HBsAg 表达与 HCC 发生和进展的关系在 HBV 持续感染的人肝脏中也存在^[16];其次, Chisari 模型中所用的重组体含有 HBx 编码序列,尚不知道这一模型中是否有 HBx 表达,因而不能完全除外 HBx 的致癌作用.

2.3 HBV DNA 的体外细胞转染实验 Schaefer et al^[17]用 HBV DNA 转染经 SV40 大 T 抗原(SV40-TAg)基因永生化的小鼠肝细胞系 FMH202 和转化生长因子 α (transforming growth factor α , TGF α)永生化的小鼠肝细胞系 AML12,得到了稳定表达 HBV 颗粒的克隆,这些克隆都获得转化能力.此外,用 HBV DNA 转染永生化细胞系 NIH3T3 和 HepG2 细胞系也使其转化.应用 HBV DNA 中部分片段进行细胞转染观察显示, x 蛋白编码基因最有可能是一种肿瘤基因,在高水平表达的情况下能在短期内引起细胞转化.然而,这些体外实验结果能够在多大程度上反映体内情况?在自然感染的人或动物肝脏中, x 蛋白表达水平远低于上述转染细胞或转基因动物肝组织.实际上,直到最近才在 WHV 感染的土拨鼠肝脏内经免疫沉淀浓缩和高度敏感的化学发光检测技术证明 x 蛋白的存在^[18].在 HBV 感染的人肝组织中 HBx 含量可能更低,其检测始终是一个相当困难而又充满争议的问题.

2.4 HBx 的功能及其与人 HCC 发生的关系

2.4.1 HBx 的功能 HBx 是一种 154 aa 小肽,其功能仍

未完全搞清. 在 WHV, x 蛋白为病毒复制所必需, 但对 HBV 的复制没有如此重要. 已报道 HBx 有许多功能, 其中与宿主细胞的生长调节有关的功能可能与 HCC 发生有关. (1) 反式激活其他基因: 主要是应用几个细胞系(包括 HepG2、HuH7 和 NIH3T3)发现的. 其靶基因既有病毒序列, 也有细胞序列. 前者包括 HBV 基因组中 C 基因 P/EnhI/II、S1 基因 P/EnhI/II、S2 基因 P/EnhI/II 和 X 基因 P/EnhI、HIV-1 的 LTR、HSV 的 TK、MMTV 的 LTR、RSV 的 LTR、SV40 的 P/Ehn 和 CMV 的 P/Ehn; 后者包括 M- 肌动蛋白、白蛋白和 α - 球蛋白等编码基因, HLA-DR/MHC、全属硫蛋白及 β - 干扰素、丙氨酸 tRNA (tRNA^{Ala}), 原癌基因 c-myc、c-jun、c-fos、ras、raf, 以及 AP-2、NF-kB、增强子结合蛋白(EBP)、TATA 结合蛋白(TATA-BP)、TGFb、CDK2 和 CDC2 等细胞调节因子的编码基因^[19]. 基于上述体外实验结果, 目前认为 HBx 可能通过反式激活某种类型细胞中的生长调节基因而参与人 HCC 发生. 已发现人肝脏中胰岛素样生长因子 II (insulin-like growth factor II, IGF II) 基因在某些散在的(肝小多角细胞)或灶性分布的(小细胞性不典型增生)小肝细胞内先后活化, 而 IGF II 表达与 HBx 表达有关, 提示 HBx 可能通过活化某些肝细胞中的 IGF II 基因, 引起这种细胞的增生形成肝实质的小细胞性不典型增生, 参与 HCC 发生^[20]. 最近的观察已表明肝小多角细胞不仅参与肝脏实质修复, 而且见于较晚期的混合细胞性 FAH 中^[21], 可能与这些癌前病灶中小细胞性不典型增生有关. (2) 结合 p53 蛋白的能力: p53 蛋白由 P53 肿瘤抑制基因编码, 具有调节细胞周期和细胞凋亡, 以及 DNA 修复等功能, 与肿瘤细胞的恶性生长紧密关联. P53 基因突变可导致 p53 蛋白失去上述功能, 导致细胞恶变. Feitelson et al^[22]报道 HBx 可与野生型 p53 结合, 导致后者灭活, 这被认为是 HCC 的另一发病机制. (3) 干扰细胞 DNA 修复: 近年来的研究显示, HBx 可与细胞内的一种 DNA 修复相关蛋白结合, 这种结合导致宿主细胞对紫外线损伤的抵抗力降低, 这提示 HBx 也可通过干扰细胞 DNA 修复过程而参与 HCC 发生. 此外, 还有报道称 HBx 和 p53 的结合也可阻断这种 DNA 相关蛋白的功能. 但实际上, 这种蛋白间的结合在 HBV 感染的人肝组织中并不常见^[23-25].

2.4.2 HBV 感染的人肝组织及 HCC 中 HBx 的表达 尽管已在 WHV 感染的土拨鼠肝组织中成功地检测到 x 蛋白, 但在人肝组织中检测 HBx 却非常困难^[23,24]. 这可能由于其表达量远低于 WHV x 蛋白或其半衰期短.

应用重组的 HBx 或人工合成的 HBx 片段, 已经制备了至少 22 个多克隆或单克隆抗体, 其中多数被认为是特异的, 适用于 HBx 的免疫组化、免疫沉淀、免疫印迹或酶联免疫测定. 然而, 不同实验室应用各自生产的抗体进行的免疫组化和免疫沉淀结果非常不一致, 难以评价. 为了澄清这一问题, Su et al^[24]从 5 个实验室收集了上述抗体中的 11 个, 对其进行了鉴定. 结果表明,

几乎所有抗体都识别黏附于纤维素膜上的 HBx, 但与组织内的 HBx 结合的特异性或亲和力多数不完全合格. 应用多种抗体进行免疫组化和免疫沉淀反应, 他们在 HBV 相关的肝硬变及 HCC 组织中显示出了 HBx, 表明其只存在于 HBV 慢性感染的肝脏中, 仅见于胞质中. 阳性细胞包括 FAH 内或外的肝细胞、肝小多角细胞以及 HCC 细胞. 阳性细胞数在肝硬变组织中少, 在有的 FAH 和 HCC 组织中较多, 这不同于 HBsAg 和 HBcAg 的表达. 后二者虽然在慢性乙型肝炎及肝硬变组织中常广泛表达, 但在 FAH 及其形成的结节中表达明显减弱, HCC 组织中表达基本停止. 由于癌周肝硬变实质大部分被变异肝细胞病灶或结节占据, 其 HBsAg 和 HBcAg 表达水平远低于不荷 HCC 的肝硬变. 这些数据表明, 在 HCC 发生(肝实质细胞→变异肝细胞病灶 FAH→变异肝细胞结节→HCC)的过程中, HBx 表达得到选择性地保持, 提示他参与人 HCC 发生. 他们的结果还表明, 无论是在 HCC 中, 还是在肝实质中, HBx 和 p53 表达的组织学及亚细胞分布都不同, 在其匀浆中也未发现他们的免疫共沉淀证据. 这表明二者在人肝组织及 HCC 中独立存在^[25].

2.4.3 HBx 与人 HCC 发生 有充足的体外及动物实验证据表明 HBx 是一种致癌基因, 但要在人体肝脏证实这一点还需大量证据. Feitelson et al^[19,22]提出 HBx 通过结合 p53 而灭活其功能是 HBV 诱发 HCC 发生的一个重要机制, 但 HBV 感染肝脏中 HBx 和 p53 独立存在这一事实不支持上述假说^[25]. 基于 HBx 表达在 HCC 组织及某些癌前病灶中的选择性保留, HBx 对多种细胞生长调节因子的反式激活作用, 以及 HBV 感染人肝脏中 IGF II 和 HBx 表达的密切关系, 有理由认为 HBx 可通过反式激活某些生长调节基因而参与人 HCC 发生^[10,20,24].

3 HBV 和 HCC 的关联: 临床干预研究

尽管已报道多种制剂可抑制慢性乙型肝炎患者体内 HBV 的复制, 其中包括针对病毒 DNA 的反义核酸, 但目前尚无法安全清除肝细胞内的整合型病毒序列. 只有提高人群的卫生及健康水平, 实行大规模的疫苗接种才能从根本上控制 HBV 的传播. 目前已有 70 多个国家进行儿童普遍预防接种. 在出生后 3 mo 内进行预防接种已经使 HBV 传播发生率及病毒携带者的出现率显著降低. 如果上述免疫保护作用能够导致相应人群中 HCC 发生率显著降低, 将是 HBV 感染与人 HCC 发生之间因果关系的直接证据.

HCC 多发于 40-60 岁的成年人, 因此要全面观察 HBV 免疫接种后 HCC 发生率的降低至少需 40 a. 已有证据表明, 这种接种免疫已经导致接种人群中 HCC 发生率显著减低. 在中国台湾, HCC 是一种较常见的儿童恶性肿瘤, 100% 发生于 HBV 携带者. 1997 年的一项统计报告显示, 在 6-14 岁年龄组, HCC 年发生率已由 1981-1986 年的 0.7/10 万降至 1986-1990 年的 0.57/10 万, 1990-1994 年

又降至0.36/10万; HCC年发生率在1974-1984年间出生的儿童中为0.52/10万, 在1984-1986年间出生的儿童中降到0.13/10万^[26]。来自韩国的最新统计资料表明, 即使在成人, 通过注射HBV疫苗进行人工免疫也能显著降低HCC发生的危险性^[27]。

上述数据表明, 人HCC发生确与HBV持续感染有关。同时也显示, 通过全球性地HBV疫苗接种, 人类会在很大程度上预防HBV相关HCC的发生。

4 HBV感染诱发HCC的可能模式以及肝实质内的“癌前病变”

HBV相关的HCC发生机制仍未完全搞清。较有影响的模式有以下三个: (1) HBV DNA嵌入激活某些原癌基因; (2) HBx的反式激活其他肿瘤相关基因; (3) HCC发生的多阶段模式(多步多击理论)和抵抗细胞(R细胞)理论^[10]。

肿瘤的发生是一个逐渐演进的过程, 人体某些部位发生的增生性病变容易演变为癌, 称为癌前病变。已提出的人肝脏内“癌前病变”主要包括以下五种。

4.1 肝实质的大细胞性改变(large-cell change, LCC) 又称肝细胞异型增生(liver cell dysplasia)。1973年由Anthony et al^[28]描述, 是指肝细胞体积增大, 伴核增大、核多形及多个核出现, 多年来一直被某些作者认为是“癌前病变”。然而, 近年来的研究表明肝实质细胞的这种改变不是癌前病变, 而是对某些致病因子的反应, 可能反映了肝细胞的有丝分裂障碍^[21,29]。

4.2 肝实质的小细胞性改变(small-cell change, SCC) 又称小细胞性异型增生(small-cell dysplasia), 是1983年Watanabe et al^[30]在HBV相关的肝硬化中观察到的一种改变。作者认为, 某些类型的SCC, 尤其是小细胞性病灶或结节, 可能是一种真性不典型增生, 是肝脏的癌前病变。

4.3 腺瘤样增生(adenomatoid hyperplasia, AH) 这种结节性病变首先被日本学者Arakawa et al描述, 是指硬变肝脏中体积明显大于其周围结节的结节状病变。多数AH直径0.8-2.0 cm, 常有几个汇管区, 可通过高清晰度的超声波检查发现并被手术切除。依其是否伴有SCC把这种病变分为普通型AH和不典型AH。已经知道前者不过是体积较大的再生结节, 与HCC的关系不如后者密切。但对后者的性质仍所知甚少, 这一点可以由其拥有许多模棱两可的描述性名称反映出来^[10]。因此, 国际工作组建议使用“伴肝细胞异型增生的结节”(dysplastic nodule)代表后者, 以取代其他描述性名称^[31]。近年来的研究表明, 部分不典型AH属肝细胞单克隆性增生^[32,33]。

4.4 变异肝细胞病灶(FAH)和结节(nodules of altered hepatocytes) FAH是指由细胞学和细胞化学表型明显变异的成熟肝细胞组成的局部病灶。这种病灶最先在给予亚硝胺类致癌剂的大鼠肝脏内被发现, 后来相继在包括大鼠、小鼠、土拨鼠、火鸡、鱼类以及转基因小鼠几种动物模型中被显示, 在化学致癌物、放射线及致癌病

毒诱发的肝癌发生早期出现。大量的证据表明, FAH是肝细胞肿瘤的前体, 可演变为肝细胞腺瘤和HCC^[34]。实际上, FAH在10a前已被用作评价药品致癌性的一个指标^[35]。最近的研究表明, 在Bannasch模型上得到的大部分知识都能用于解释人HCC的发生, FAH也见于人肝硬化及其他慢性肝脏病变中, 属于HCC前期病变; 伴有SCC的FAH应被看作肝实质的癌前(恶性前期)病变^[21]。

4.5 肝硬化 由于约80%的HCC发生于硬变肝脏内, 100a来肝硬化都被认为是HCC的前期病变。然而, 不同类型的肝硬化之间发生HCC的可能性有很大差别, FAH发生率及其平均直径也不相同; 另一方面, 并不是所有的HCC都发生在肝硬化出现之后。因此, 认为肝硬化本身是一种癌前病变的观点在概念和医疗实践上都是不全面的, 肝硬化与HCC之间不是因果关系。在病理发生过程中二者可能有某种联系, 但他们是两个不同的, 可分开的病理过程。这正象Theise评论的那样, 如果说二者有联系, 那也更象堂兄弟, 而不是父子关系^[36]。致谢: 此文的完成曾得益于与刘彦仿、Peter Bannasch、Claus H Schroeder、聂青和教授的讨论, 作者深表感谢。

5 参考文献

- 1 Parkin DM. The global burden of cancer. *Semin Cancer Biol* 1998;8:219-235
- 2 Austin H, Delzell E, Grufferman S, Levine R, Morrison AS, Stolley PD, Cole P. A case-control study of hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus, cigarette smoking, and alcohol consumption. *Cancer Res* 1986;46:962-966
- 3 Yeh FS, Mo CC, Luo S, Henderson BE, Tong MJ, Yu MC. A serological case-control study of primary hepatocellular carcinoma in Guangxi, China. *Cancer Res* 1985;45:872-873
- 4 Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan. *Lancet* 1981;2:1129-1133
- 5 Beasley RP. Hepatitis B virus, the major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1988;61:1942-1956
- 6 苏勤. 乙型肝炎病毒隐匿型感染. *肝脏* 2002;7:197-198
- 7 Koike K, Shimotouno K, Okada S, Okamoto H, Hayashi N, Ueda K, Kaneko S, Koike K, Yokosuka O, Chiba T, Marusawa H, Hino O, Utida T, Omata M, Juji T, Nojiri N, Takada K, Miyamura T, Osuga T, Ito Y. Survey of hepatitis B virus co-infection in hepatitis C virus-infected patients suffering from chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma in Japan. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:1270-1272
- 8 Su Q, Wang SF, Chang TE, Breitkreutz R, Hennig H, Takegoshi K, Edler L, Schröder CH. Circulating hepatitis B virus nucleic acids in chronic infection: representation of differently polyadenylated viral transcripts during progression to nonreplicative stages. *Clin Cancer Res* 2001;7:2005-2015
- 9 苏勤, 张伟, 刘节, 王淑芳, Takegoshi K, Schröder CH. 乙型肝炎病毒慢性感染者血清中不同类型病毒转录体的检测及其意义. *世界华人消化杂志* 2003; 11:134-143
- 10 刘泽富, 聂青和. 病毒性肝炎的诊断和治疗. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2001:221-262
- 11 Kim CM, Koike K, Saito I, Miyamura T, Jay G. HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice. *Nature (London)* 1991;351:317-320
- 12 Koike K. Hepatitis B virus HBx gene and hepatocarcinogenesis. *Intervirology* 1995;38:134-142
- 13 Koike K, Moriya K, Iino S, Yotsuyanagi H, Endo Y, Miyamura T, Kurokawa K. High-level expression of hepatitis B virus HBx

- gene and hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 1994;19:810-819
- 14 Chisari FV, Filippi P, Buras J, McLachlan A, Popper H, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6909-6913
- 15 Toshkov I, Chisari FV, Bannasch P. Hepatic preneoplasia in hepatitis B virus transgenic mice. *Hepatology* 1994;20:1162-1172
- 16 Su Q, Zerban H, Otto G, Bannasch P. Cytokeratin expression is reduced in glycogenotic clear hepatocytes but increased in ground-glass cells in chronic human and woodchuck hepadnaviral infection. *Hepatology* 1998;28:347-359
- 17 Schaefer S, Gerlich WH. In vitro transformation by hepatitis B virus DNA. *Intervirology* 1995;38:143-154
- 18 Dandri M, Chirmacher P, Rogler CE. Woodchuck hepatitis X protein is present in chronically infected woodchuck liver and woodchuck hepatocellular carcinomas, which are permissive for viral replication. *J Virol* 1996;70:5246-5254
- 19 Feitelson MA, Duan LX. Hepatitis B virus X antigen in the pathogenesis of chronic infections and the development of hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 1997;150:1141-1157
- 20 Su Q, Liu YF, Zhang JF, Zhang SX, Li DF, Yang JJ. Expression of insulin-like growth factor II in hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma: its relationship with hepatitis B virus antigen expression. *Hepatology* 1994;20:788-799
- 21 Su Q, Benner A, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Human hepatic preneoplasia: phenotypes and proliferation kinetics of foci and nodules of altered hepatocytes and their relationship to liver cell dysplasia. *Virchows Archiv* 1997;431:391-406
- 22 Feitelson MA, Zhu M, Duan LX, London WT. Hepatitis Bx antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1993;8:1109-1117
- 23 Henkler F, Waseem N, Golding MH, Alison MR, Koshy R. Mutant p53 but not hepatitis B virus X protein is present in hepatitis B virus-related human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:6084-6091
- 24 Su Q, Schröder CH, Hofmann WJ, Otto G, Pichlmayr R, Bannasch P. Expression of hepatitis B virus X protein HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatology* 1998;27:1109-1120
- 25 Su Q, Schröder CH, Otto G, Bannasch P. Overexpression of p53 protein is not directly related to hepatitis B x protein expression and is associated with neoplastic progression in hepatocellular carcinomas rather than hepatic preneoplasia. *Mutation Res* 2000;462:365-380
- 26 Chang MH, Chen CJ, Lai MC, Hsu HM, Wu TC, Kong MS, Liang DC, Shau WY, Chen DS. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in Children. *N Eng J Med* 1997;336:1855-1859
- 27 Lee MS, Kim DH, Kim H, Lee HS, Kim CY, Park TS, Yoo KY, Park BJ, Ahn YO. Hepatitis B vaccination and reduced risk of primary liver cancer among male adults: a cohort study in Korea. *Int J Epidemiol* 1998;27:316-319
- 28 Anthony PP, Vogel CL, Barker LF. Liver cell dysplasia: a premalignant condition. *J Clin Pathol* 1973;26:217-223
- 29 Santoni-Rugiu E, Nagy P, Jensen MR, Factor VM, Thorgerisson SS. Evolution of neoplastic development in the liver of transgenic mice co-expressing *c-myc* and transforming growth factor- α . *Am J Pathol* 1996;149:407-426
- 30 Watanabe S, Okita K, Harada T, Kodama T, Numa Y, Takemoto T, Takahashi T. Morphologic studies of the liver cell dysplasia. *Cancer* 1983;51:2197-2205
- 31 International Working Party. Terminology of nodular hepatocellular lesions. *Hepatology* 1995;22:983-993
- 32 Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Terada M, Hasegawa H. Clonal origin of atypical adenomatous hyperplasia of the liver and clonal identity with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1988;95:1664-1666
- 33 Piao Z, Park YN, Kim H, Park C. Clonality of large regenerative nodules in liver cirrhosis. *Liver* 1997;17:251-256
- 34 Bannasch P. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma: sequential cellular, molecular, and metabolic changes. *Prog Liver Dis* 1996;14:161-197
- 35 Bannasch P. Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I. Hepatic preneoplasia. *Carcinogenesis* 1986;7:689-695
- 36 Theise ND. Cirrhosis and hepatocellular neoplasia: more like cousins than like parent and child. *Gastroenterology* 1996;111:526-528

治疗性疫苗 - 慢性乙型肝炎患者的希望

王全楚,聂青和

王全楚,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:王全楚,710038,陕西省西安市新寺路1号,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. quanchuwang998@hotmail.com
电话:029-3377595 传真:029-3537377
收稿日期:2002-12-10 接受日期:2002-12-20

王全楚,聂青和. 治疗性疫苗 - 慢性乙型肝炎患者的希望. 世界华人消化杂志 2003;11(6):795-798

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/795.asp>

0 引言

疫苗的概念是在 200 a 前 Jenner 发现事先接种牛痘能够阻止天花的发生之后首先提出的. 近 100 a 来, 疫苗的开发和应用已成为医学科学的重大成就之一, 且已广泛用于传染病的预防和治疗. 这些疫苗成功的原因在于他能够有效地诱导机体产生保护性抗体. 然而, 对某些细胞内病原菌如结核杆菌、利什曼原虫以及寄生虫等这些抗体几乎不起作用, 因为对这些病原体的防御更多地依赖于细胞免疫, 而不是抗体介导的体液免疫. 对如乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、疟原虫等感染, 则可能需要细胞免疫和体液免疫的双重介导.

1995 年前医学界普遍认为, 疫苗只作预防疾病用. 随着免疫学研究的发展, 人们发现了疫苗的新用途, 即可以治疗一些难治性疾病. 从此, 疫苗兼有了预防与治疗双重作用, 治疗性疫苗属于特异性主动免疫疗法. 现在准获使用的疫苗来自杀死或灭活的完整细胞、重组蛋白或减毒的活病原体, 都能刺激机体产生抗体. 然而除了减毒活疫苗如水痘 - 带状疱疹病毒疫苗外, 其他疫苗并不能特异的诱导细胞免疫, 此外, 如果用减毒活疫苗来预防诸如 HIV 之类的病毒感染, 可能给疫苗制备和接种疫苗的人群带来危险. 因此, 积极寻找既能同时诱导体液和细胞免疫应答又具安全性的疫苗, 实乃当务

之急. 最近出现的新型疫苗如核酸疫苗、T 细胞疫苗、树突状细胞疫苗等彻底改变了疫苗多为蛋白、只能预防的经典概念, 引进了治疗性疫苗和核酸及细胞疫苗的新内容, 大大拓展了人们对疫苗组成和功能认识, 被称为是疫苗学的第三次革命. 因他们不但具有传统疫苗的一般功能, 且能激发机体特异性细胞和体液免疫应答, 用于临床现症患者的治疗. 故称之为新概念疫苗.

新概念疫苗与传统疫苗的区别表现在: (1) 成分不同: 传统疫苗多为死疫苗 / 减毒活疫苗或重组亚单位疫苗; 新型疫苗则为编码无毒力抗原蛋白的病毒核酸或能激发特异性机体免疫应答的细胞疫苗; (2) 机制不同: 传统疫苗主要靠病毒的抗原蛋白刺激机体产生中和性保护抗体; 新型疫苗不仅能刺激机体产生保护性抗体, 而且能激发特异性细胞免疫应答; (3) 作用不同: 传统疫苗只能起到一定的预防作用, 新型疫苗不仅能预防疾病, 而且更能起到特异的治疗作用, 治疗性疫苗具有更广泛的应用前景. 现就治疗性疫苗的新概念以及目前在慢性乙型肝炎中的研究现状作一简要的概述.

1 核酸疫苗

所谓核酸疫苗(nucleic acid vaccine), 是将含编码外源蛋白基因的质粒 DNA, 直接导入动物组织, 外源基因于体细胞中表达后, 表达产物被提呈, 与主要组织相容性复合物(MHC)结合, 刺激机体产生相应的抗体和细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs), 分别介导体液免疫和细胞免疫应答. 这种外源基因是抗原的来源, 具有疫苗的功能, 又称为 DNA 疫苗, 由于不需任何化学载体, 故又称裸 DNA 疫苗^[1,2].

1990 年 Wolff et al 在做小鼠基因治疗试验时偶然发现, 将编码基因的质粒 DNA 直接注射入动物肌肉细胞内, 能在动物体内表达抗原并诱导机体产生免疫应答. 这一发现打开了通往新的免疫途径的大门. 由于不加任何佐剂或载体, 故又称裸 DNA 免疫. 1994 年在日内瓦召开的专题会议上将这种疫苗定名为核酸疫苗. 核酸疫苗的出现或许将是疫苗发展史上的一次革命. 现已做了大量的 DNA 疫苗的动物试验. 主要包括流行性感冒病毒、乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、狂犬病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、疟原虫和支原体及肿瘤的预防和治疗研究等^[3-9].

迄今, 国外已有至少 4 种 DNA 疫苗被批准进入 I 期临床试验. 1996 年美国 FDA 批准对健康志愿者进行艾滋病 DNA 疫苗人体实验. 1998 年 MacGregor et al 首次报道了 DNA 疫苗治疗艾滋病病毒 HIV-1 感染者的人体实验结果. 据最新消息, 英国已经批准在今年 8 月开始进行一种专门针对非洲人的 HIV DNA 疫苗的 I 期临床试验. 1998 年, 美国海军宣布他们已经成功地在健康人体上检测了针对疟疾的 DNA 疫苗, 他们认为这种疫苗最早得到广泛应用将可能在 2005 年. 目前, DNA 免疫接种的领域正在迅速发展, 已经发展的现行疫苗不仅使用 DNA, 而且还包括附加物, 他有助于 DNA 进入靶细胞, 或者起到

佐剂的作用, 刺激或诱导免疫应答^[10-13].

1.2 乙肝病毒核酸疫苗 乙型肝炎核酸疫苗就是将乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)一种或几种抗原的编码基因直接注入宿主体内, 该基因能在宿主细胞内转录和表达, 并继而诱生特异的体液和细胞免疫应答. 这类疫苗不含蛋白质或多肽, 仅含核酸, 在体内表达后具有疫苗功能, 被称作乙型肝炎核酸疫苗, 包括 DNA 疫苗和 RNA 疫苗, 主要是指 DNA 疫苗. 近年来兴起的核酸疫苗的研究已在乙肝的防治中显示出诱人的应用前景, 引起了国内外学者们的关注. 与传统的血源疫苗和基因工程相比, 乙肝 DNA 疫苗有很多优点, 如: 比乙肝血源疫苗相对安全; 比基因工程多肽疫苗的制备简单、快捷; 性质更稳定, 便于保存和运输; 乙肝 DNA 疫苗还可通过对目的基因的构建, 选择所需的抗原决定簇, 可以对同种异株的病毒产生免疫应答, 发挥交叉保护作用. 更为重要的是, 乙肝 DNA 疫苗可在机体的真核细胞中表达糖基化抗原蛋白, 并可按照病毒抗原的天然构象进行折叠, 模拟了病毒的自然感染过程, 不仅可以诱导针对 HBsAg 的保护性抗-HBs 产生, 而且可以同时诱发特异的细胞免疫, 所以兼有预防和治疗作用, 不久的将来乙肝病毒核酸疫苗将应用于临床^[14,15].

2 T 细胞疫苗

T 细胞疫苗原是指将 T 细胞或体外 T 细胞表位多肽刺激产生的 T 细胞作为疫苗接种, 用于治疗某些自身免疫疾病. 但将依据 MHC-I 类分子特异的多肽结合基序(MHC binding motif)合成的多肽, 在体外诱导产生的抗原特异性细胞毒 T 淋巴细胞(CTL), 用于治疗病毒性疾病, 则是近几年的新思维, 新设想^[16], 将 T 细胞从过去应用为靶细胞转变成效应细胞, 为 T 细胞疫苗的概念增添了新的内涵.

2.1 T 细胞疫苗与 CTL 反应 自从 Doherty 和 Zinkernagel 发现 CTL 能够杀伤外源微生物感染细胞, 而且这种杀伤作用依赖于 CTL 对外源多肽和自身分子(MHC)的双重识别之后, 越来越多的研究表明: 病毒特异性的 CTL 介导的细胞免疫具有清除病毒的功能, 是宿主防御病毒感染的主要机制之一. 正因为此, CTL 表位及 CTL 介导的细胞免疫应答的研究受到越来越多的关注. 传统的病毒疫苗(减毒或灭活), 含有完整的病毒蛋白质, 以刺激机体产生抗体为主, 难以有效诱导产生 MHC-I 类限制性的 CTL 和清除细胞内病毒颗粒. 目前临床应用的过继免疫治疗如 LAK 细胞、CD3-AK 细胞均为非特异杀伤细胞, 靶向性差. 因此, 有学者已直接用单个或多个 CTL 多肽导入体内(多肽疫苗), 诱导机体产生特异性 CTL 应答^[17-19], 虽然能够观察到 CTL 应答, 但有时滴度不高, 可能是由于较短的 CTL 多肽更易被血清蛋白酶降解, 从较短的(通常为几个-十几个氨基酸)多肽中去除一个或两个氨基酸将改变其结合 HLA 的能力; 若将几个多肽交联, 既可能形成新的 CTL 表位, 诱导特异性 CTL 失败, 又可能产

生针对多肽的抗体;另外,低剂量抗原皮下注射可以产生免疫应答,而高剂量静脉注射则可能引起免疫耐受。

2.2 治疗病毒性肝炎 T细胞疫苗是用多肽在体外诱导产生特异性CTL,后者被克隆、扩增、筛选和鉴定后,仅将MHC-I类限制的CD8⁺ T细胞输入机体,诱导细胞免疫应答产生,从而解决了多肽疫苗存在的上述问题,而且直接回输CTL,可以人为地控制CTL的强度,避免其过度,导致大量受染肝细胞死亡,也可避免其过低,无清除病毒作用。

治疗性疫苗被认为是抗病毒治疗的一个重要方向,已有研究者进行了探索。其中DNA疫苗和HLA限制的识别HBc表位的细胞毒T淋巴细胞疫苗能够活化细胞和体液免疫应答。在转基因鼠中,这种治疗性疫苗能够打破免疫耐受,但人体研究尚待开展。因此,我们在国家自然科学基金的资助下,利用转染了HBV基因(S+S1)或(S+S1+S2)的小鼠骨髓瘤SP2/0细胞皮下注射,形成的皮下移植瘤HBV小鼠模型和HBV基因转染细胞系,发现MHC-I限制的CTL表位多肽体外诱导的特异性CTL,在体内外对HBV感染细胞均具有杀伤作用,可能成为病毒性疾病或肿瘤免疫较好的疫苗后选之一^[20,21]。

3 树突状细胞疫苗

树突状细胞(dendritic cell, DC)是专职抗原呈递细胞,能有效地将抗原呈递给T淋巴细胞,从而诱导CTL活化。荷载抗原的DC具有疫苗的功能,故称树突状细胞疫苗。荷载的抗原既可以是病毒抗原、HLA限制的CTL表位(8-10个氨基酸的短肽)基因,也可以是肿瘤细胞,还可以是编码肿瘤抗原的基因。由于DC细胞疫苗可以不依赖于CTL靶细胞,又有较高的抗原呈递效率,正成为新一代疫苗的代表^[22]。

3.1 研究意义及现状 核酸疫苗诱导特异性免疫应答产生已被大量的实验室证实,但普遍存在着抗体滴度不高,CTL杀伤率不强等问题。其原因可能与病原体感染后,抗原呈递细胞(APC),尤其是树突状细胞数量减少、功能降低有关^[23-26]。如何绕过或提高DC免疫功能低下,诱导出更强有力的、更具广泛性的免疫应答,应当成为基因疫苗和免疫治疗亟待解决的突出问题之一。业已证实,DC是目前发现的功能最强的抗原呈递细胞,也是唯一能激活初始T细胞的抗原呈递细胞^[27]。因此,应用抗原或抗原多肽体外冲击致敏DC,然后将之回输或免疫接种荷瘤宿主或带病毒特异性抗原的宿主,进行免疫治疗;利用DC与肿瘤细胞融合成为新型带有DC功能及肿瘤特异抗原的融合细胞瘤苗的报道^[28];以及利用病毒载体将带有肿瘤或病毒抗原的编码基因转染DC,使之在DC内持续表达相应特异性抗原,诱导产生特异性抗肿瘤或抗病毒免疫反应等方法应运而生。

3.2 DC在HBV发病机制中的作用 近年来,越来越多的证据表明,由DC激活的细胞免疫特别是CTL介导的免疫反应,在HBV发病机制中发挥着十分重要的作用。

一般认为,细胞免疫功能低下是HBV感染慢性化的主要原因。作为主要的抗原呈递细胞,DC的功能缺陷将直接影响T细胞的免疫反应。已有实验证实DC可诱导肿瘤细胞免疫耐受,但婴幼儿免疫耐受是否与此有关尚需进一步研究。Oka et al^[29]使用HBV转基因鼠(HBVTg)模型研究PBMC来源的DC与免疫接种后应答的关系,发现疫苗接种后应答者DC功能明显强于无应答者。在另一些实验中有潜在DC功能的HBV Tg经免疫接种治疗后无HBsAg和HBeAg的表达,HBV DNA滴度也较低。DC功能较差者治疗前毫无反应,两组治疗前HBsAg、HBeAg和HBV DNA浓度无差异。提示DC活化程度可作为判断免疫治疗预后的指标。研究发现,DC免疫可以打破HBVTg对CTL的免疫耐受,而且转基因鼠不能产生抗HBs只与DC功能缺陷有关,与T、B细胞功能无关。经IFN处理后DC可上调表达MHC和T细胞抗原(KLM)。国内外学者已有报道慢性乙型肝炎患者外周血DC功能明显低下,抗原呈递不足可能是导致HBV感染慢性化的原因之一^[30]。

近年来,科学家在几种动物模型中进行了乙肝DNA病毒感染的“感染与免疫”机制研究,取得明显进展。应用四聚体和细胞质内细胞因子染色在慢性乙型肝炎患者进行的细胞免疫应答的研究,阐明了慢性乙型肝炎的基础免疫缺陷。这些基础实验研究对评价各种疫苗和候选疫苗的治疗作用是极其重要的。1998年国外开始用乙肝病毒基因转移鼠为动物模型研究乙肝病毒治疗性疫苗的抗病毒作用。同年在法国、日本也开始用乙肝病毒某些基因片段表达的多肽加上各种不同佐剂配制的治疗性疫苗作临床研究,观察这种多肽疫苗对慢性乙肝病毒携带者的治疗作用。其结果揭示,这种疫苗对乙肝病毒基因转移鼠有抗病毒作用,单一应用特别是与抗乙肝病毒药联合应用,对慢性乙肝病毒携带者有一定的疗效。1999年美国研制了新的多肽治疗性疫苗,并对这种治疗性疫苗的免疫学作用进行了深入研究。美国这一研究具有很大意义,因为这一研究中,作者提出了一些免疫学检测方法,这些检测方法不仅可以预测治疗效果,而且还初步证明,治疗性疫苗可以打破慢性乙肝病毒感染患者最主要的免疫学反应紊乱,即对乙肝病毒及其抗原不产生免疫应答-免疫耐受状态。我国学者闻玉梅 et al 报告,现在有多种治疗性乙肝疫苗正在进行临床前期或临床研究,由复旦大学与北京生研所合作开发的重组治疗性乙肝疫苗(YIC)已通过了国家药品监督管理局认证。

免疫耐受是造成慢性乙肝病毒携带者呈持续病毒感染状态的主要原因之一,也是治疗上最难解决的问题。现有治疗慢性乙肝的抗病毒药对慢性乙肝病毒携带者疗效不佳,其主要原因是这些抗病毒药可以抑制乙肝病毒复制,但不能清除乙肝病毒;对机体的免疫耐受状态的逆转没有肯定的作用。从发展趋势来看,乙肝病毒治疗性疫苗将成为本世纪对慢性乙肝病毒感染特别是慢性乙肝病毒携带者治疗研究领域的热点,他与现有抗乙肝病

毒药物的联合应用,将成为一种新的治疗方法.

4 参考文献

- Smith HA, Klinman DM. The regulation of DNA vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 2001;12:299-303
- Evans TG, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Demeter L, Suzich JA, O'Brien D, Campbell M, White WI, Balsley J, Reichman RC. A Phase 1 study of a recombinant viruslike particle vaccine against human papillomavirus type 11 in healthy adult volunteers. *J Infect Dis* 2001;183:1485-1493
- Zeytin HE, Tripathi PK, Bhattacharya-Chatterjee M, Foon KA, Chatterjee SK. Construction and characterization of DNA vaccines encoding the single-chain variable fragment of the anti-idiotypic antibody 1A7 mimicking the tumor-associated antigen disialoganglioside GD2. *Cancer Gene Ther* 2000;7:1426-1436
- Ferry G. First DNA malaria vaccine on trial in Africa. *Curr Biol* 2000;10:R810-811
- Hanke T, McMichael AJ. Design and construction of an experimental HIV-1 vaccine for a year-2000 clinical trial in Kenya. *Nat Med* 2000;6:951-955
- Bendandi M. Anti-idiotypic vaccines for human follicular lymphoma. *Leukemia* 2000;14:1333-1339
- Mincheff M, Tchakarov S, Zoubak S, Loukinov D, Botev C, Altankova I, Georgiev G, Petrov S, Meryman HT. Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: a phase I/II clinical trial. *Eur Urol* 2000;38:208-217
- Lee SW, Li H, Strong TV, Moore SE, Conry RM. Development of a polynucleotide vaccine from melanoma antigen recognized by T cells-1 and recombinant protein from melanoma antigen recognized by T cells-1 for melanoma vaccine clinical trials. *J Immunother* 2000;23:379-386
- Talwar GP, Diwan M, Razvi F, Malhotra R. The impact of new technologies on vaccines. *Natl Med J India* 1999;12:274-280
- Lawrence G, Cheng QQ, Reed C, Taylor D, Stowers A, Cloonan N, Rzepczyk C, Smillie A, Anderson K, Pombo D, Allworth A, Eisen D, Anders R, Saul A. Effect of vaccination with 3 recombinant asexual-stage malaria antigens on initial growth rates of *Plasmodium falciparum* in non-immune volunteers. *Vaccine* 2000;18:1925-1931
- Boyer JD, Cohen AD, Vogt S, Schumann K, Nath B, Ahn L, Lacy K, Bagarazzi ML, Higgins TJ, Baine Y, Ciccarelli RB, Ginsberg RS, MacGregor RR, Weiner DB. Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines. *J Infect Dis* 2000;181:476-483
- Stevenson FK. DNA vaccines against cancer: from genes to therapy. *Ann Oncol* 1999;10:1413-1418
- Orme IM. Beyond BCG: the potential for a more effective TB vaccine. *Mol Med Today* 1999;5:487-492
- Yuen MF, Lim WL, Cheng CC, Lam SK, Lai CL. Twelve-year follow-up of a prospective randomized trial of hepatitis B recombinant DNA yeast vaccine versus plasma-derived vaccine without booster doses in children. *Hepatology* 1999;29:924-927
- Lau GK, Carman WF, Locarnini SA, Okuda K, Lu ZM, Williams R, Lam SK. Treatment of chronic hepatitis B virus infection: an Asia-Pacific perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 1999;14:3-12
- Steinman RM. Dendritic cells and immune-based therapies. *Exp Hematol* 1996;24:859-862
- 王全楚,周永兴,姚志强,冯志华. 不同载体及靶基因对乙型肝炎病毒DNA疫苗免疫效果的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:289-291
- 吴超,邹全明. 幽门螺杆菌黏膜疫苗的研究进展. *世界华人消化杂志* 2000;8:203-205
- 宋志强,郝飞,王永刚,闵峰,王宇明. 丙型肝炎病毒HVR1抗血清体外阻断HCV的感染. *世界华人消化杂志* 2000;8:171-174
- 杜德伟,周永兴,冯志华,姚志强,李光玉. IL-12及HBV基因疫苗共同免疫小鼠的效果. *世界华人消化杂志* 2000;8:128-130
- 李文波,姚志强,周永兴,冯志华. HBV基因疫苗联合抗原蛋白免疫小鼠的研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:188-190
- 李明松,袁爱力,张万岱,刘思德,吕爱民,周殿元. 树突状细胞体外诱导抗肝癌免疫. *世界华人消化杂志* 1999;7:161-163
- Ohr HF, Pingel S, Bocher WO, Bernhard H, Herzog-Hauff S, Rose-John S, Galle PR. Reduced virus specific T helper cell induction by autologous dendritic cells in patients with chronic hepatitis B-restoration by exogenous interleukin-12. *Clin Exp Immunol* 2002;130:107-114
- Beckebaum S, Cicinnati VR, Dworacki G, Muller-Berghaus J, Stolz D, Harnaha J, Whiteside TL, Thomson AW, Lu L, Fung JJ, Bonham CA. Reduction in the circulating pDC1/pDC2 ratio and impaired function of ex vivo-generated DC1 in chronic hepatitis B infection. *Clin Immunol* 2002;104:138-150
- Lin CM, Wang FH. Selective modification of antigen-specific CD4(+) T cells by retroviral-mediated gene transfer and in vitro sensitization with dendritic cells. *Clin Immunol* 2002;104:58-66
- Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- Akbar SM, Horiike N, Onji M, Hino O. Dendritic cells and chronic hepatitis virus carriers. *Intervirology* 2001;44:199-208
- Bocher WO, Dekel B, Schwerin W, Geissler M, Hoffmann S, Rohwer A, Arditti F, Cooper A, Bernhard H, Berrebi A, Rose-John S, Shaul Y, Galle PR, Lohr HF, Reisner Y. Induction of strong hepatitis B virus (HBV) specific T helper cell and cytotoxic T lymphocyte responses by therapeutic vaccination in the trimera mouse model of chronic HBV infection. *Eur J Immunol* 2001;31:2071-2079
- Oka Y, Akbar SM, Horiike N, Joko K, Onji M. Mechanism and therapeutic potential of DNA-based immunization against the envelope proteins of hepatitis B virus in normal and transgenic mice. *Immunology* 2001;103:90-97
- You Z, Huang X, Hester J, Toh HC, Chen SY. Targeting dendritic cells to enhance DNA vaccine potency. *Cancer Res* 2001;61:3704-3711

抗乙型肝炎病毒肝靶向药物制剂的研究进展

王九平,白雪帆

王九平,白雪帆,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:王九平, 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:2002-11-19

摘要

乙型肝炎病毒感染严重危害人类健康,全身抗病毒和调节免疫功能的治疗效果尚不理想,近年来国内外开展肝靶向药物的研究,即用某中具有特殊亲和力的载体把抗乙肝病毒药物运送到肝靶器官,达到了小剂量、高效应,低毒副性反应的目的,靶向抗乙肝病毒药物可能成为肝炎治疗中确实有效的方法之一。

王九平,白雪帆. 抗乙型肝炎病毒肝靶向药物制剂的研究进展. 世界华人消化杂志 2003;11(6):799-802
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/799.asp>

0 引言

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染引起的一种严重危害人类健康的传染病^[1-10]. 全世界大约有 20 亿人感染过 HBV, 3.5 亿携带 HBV, 而持续 HBV 感染会导致肝硬化和原发性肝癌, 死亡率^[11-17]很高. 尽管国内外医学家采用全身抗病毒和调节免疫功能的方法, 但治疗效果尚不理想, 其主要原因可能是药物在 HBV 主要复制部位 - 肝脏中分布较少. 虽然可通过肝动脉或门静脉给药来提高药物在肝脏的分布, 但有一定的创伤. 针对这一问题, 近年来开展肝靶向药物(targeted drug system)抗乙肝病毒的研究, 即采用医学生物技术将治疗药物与靶向载体结合, 以使药物能被特异运送至靶器官与靶细胞, 较好地达到了小剂量、高效应, 低毒副性反应的目的. 因此, 通过靶向抗乙肝病毒药物可能成为肝炎治疗中确实有效的方法之一^[18-29]. 现将肝靶向给药抗乙肝病毒的研究现状及应用前景作一综述.

1 主动靶向

1.1 肝细胞半乳糖受体介导的肝靶向药物 肝细胞半乳糖受体(hepatocyte galactose receptor, H-Gal-R)仅存在于哺乳动物的肝实质细胞膜上, 他能特异的识别和结合以非还原半乳糖或 N-乙酰半乳糖为末端的糖蛋白, 该受体介导的胞吞作用的糖蛋白定向转运到胞内溶酶体进行代谢. 利用 H-Gal-R 介导的各种药物、酶或基因定向转运到肝细胞内发挥作用. Hashida et al^[30] 实验证实, H-Gal-R 介导系统对肝有较高的亲和性, 且肝吸收迅速.

干扰素(IFN)是目前 HBV 治疗的首选药^[31-34], 但临床应用中存在用量大、毒副作用大、费用昂贵等缺点. 将以 D-半乳糖为起始物合成 2-亚氨基-2-甲氧基-1-硫代-β-D-半乳糖吡糖苷(IME-半乳糖苷)与 INFα₁ 相结合获得共轭物 Gal-INFα₁^[30]. 研究表明:Gal-INFα₁ 具有明显的趋肝性, INFα₁ 效价为 345 901 kU/L, 而 Gal-INFα₁ 的效价为 958 668 kU/L, 后者为前者的 2.27 倍. 这一结果显示, 将半乳糖引入 INFα₁ 后, 不仅可提高 INFα₁ 在肝脏的分布, 而且也增强了 INFα₁ 的生物活性.

核苷类药物在抗乙型肝炎病毒药物中也占有相当重要的地位^[35-37]. 但疗效不很理想, 主要是由于乙型肝炎病毒核心抗原存在于肝细胞内, 核苷类药物需进入肝细胞, 并经胸腺嘧啶核苷激酶催化三磷酸化后方显效. 而核苷类药物不易透过肝细胞, 且乙肝病毒感染的细胞缺少胸腺嘧啶核苷激酶, 宿主细胞磷酸化作用缓慢, 达不到抑制病毒复制的有效浓度. 大剂量给药可提高血药浓度, 但在血中未被磷酸化的药物可迅速经肾排泄而出现血尿和肾功能障碍等毒副作用. 为了提高核苷类药物治疗乙型肝炎的疗效并降低其毒性, 在国内外广泛开展 H-Gal-R 介导的肝靶向核苷类抗病毒药物的研究. 实验研究证明^[38,39], 以乳糖化人血清白蛋白(L-HAS)为载体的阿糖腺苷-乳糖化人血清白蛋白(L-HAS-Ara-AMP)和无环鸟苷-乳糖化人血清白蛋白(L-HSA-ACV-A); 以 NGA 为载体的无环鸟苷-半乳糖基新糖白蛋白(NGA-ACV-A); 以 CMD 为载体的半乳糖化羧甲基葡聚糖-阿糖胞苷(Gal-CMD-Ara-C). 动物体内示踪表明交联物能迅速积聚于肝细胞, 并延长药物作用时间. 交联物在肝内与游离药物有相同的抑制病毒 DNA 合成的作用, 所需导向药物的剂量较游离药少 5-10 倍, 其毒副作用极低. 无环鸟苷(ACV)乳糖血清白蛋白(LSA)交联物可显著减少在肾脏的堆积. 小鼠经 0.6 μg/g 已经证明阿糖腺苷和单磷酸阿糖腺苷能抑制乙肝病毒(HBV)复制, 但剂量相关的神经肌肉疼痛综合征阻碍了该药的临床应用. 将单磷酸阿糖腺苷与含末端半乳糖残基的乳糖化血清清蛋白形成偶联物乳糖化清蛋白单磷酸阿糖腺苷(L-HSA-Ara-AMP), L-HSA 是半乳糖末端糖蛋白, 通过受体介导可选择性进入肝脏, 提高了肝脏中单磷酸阿糖腺苷(Ara-AMP)的浓度, 而且还因良好的靶向性而降低了药物的使用剂量. Xie et al^[40] 采用麻鸭乙肝病毒动物模型, 用单磷酸阿糖腺苷(Ard-AMP)与半乳糖化血清白蛋白交联物(L-HSA-Ara-AMP)治疗 10 d, 观察用药前后血清中鸭乙肝病毒(DHBV)DNA,

DHBsAg, 肝组织病理学变化及药物的不良反应. 结果表明, L-HSA-Ara-AMP 用药后能使血清 DHBV DNA 水平降低, 对血清 DHBsAg 作用相对缓慢, 治疗过程中未见 L-HSA-Ara-AMP 不良反应, 既降低 Ara-AMP 的使用剂量, 避免了 Ara-AMP 的不良反应, 又能抑制 DHBVDNA 的复制, 在体内达到了抗 DHBV 的作用. Fiumme et al^[41]临床上用 Ara-AMP 半乳糖化共轭物 35 mg/kg 治疗 5 例慢性乙型肝炎患者, 结果 3 例血清 HBV-DNA 消失, 另 2 例治疗期 HBA-DNA 水平明显下降, 而其药量比游离药物低 3-6 倍.

反义寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleotides, ASODN)能有效抑制培养细胞中的乙型肝炎病毒基因的表达, 是值得研究的新型抗病毒药剂, 但 ASODN 的生物利用度和稳定性较差, 因此还需要积极寻找新的 ASODN 修饰方法, 从而增强 ASODN 的生物利用度和稳定性. 郭军 et al^[42]以人工合成 2 种糖化多聚赖氨酸导向配体, 与互补 HBVmRNA 多聚腺苷酸的反义寡核苷酸复合物结合, 体外肝细胞和小鼠体内实验显示, 两种导向配体-ASODN 复合物可使 2.2.15 细胞荧光染色率达 75.3% 和 83.8%, 而单纯 ASODN 组则为 24.3% 和 1.8%. 冰冻切片观察荧光染色主要聚集在肝脏中. 说明导向配体无论在体内外均具有良好的导向 ASODN 进入肝细胞的功能. 另有实验证明半乳糖化白蛋白和半乳糖化多聚赖氨酸连接的 ASODN 也明显提高了抗乙肝病毒的活性.

1.2 抗体介导的靶向药物 普通的靶向抗病毒药不能选择感染与非感染的细胞, 因此对正常的细胞可造成一定的损害, 在原发性肝癌的治疗中, 就是利用抗体的高度特异性, 用抗体将药物导向肿瘤细胞. 将博来霉素 A 6 与抗人肝癌单抗 H 111 偶联, 在体外, 对人肝癌细胞抑制率达 90%; 在裸鼠, 对移植的人肝癌细胞抑制率为 78%, 而等剂量游离 A 6 的抑癌率仅为 30%. H 111 A 6 对人肝癌的抑制作用明显高于游离 A 6. 为增强导向治疗的“弹头”杀伤效果, 胡晓华 et al^[43]制备了同时携带¹³¹I 和 MMC 的双弹头马抗人 A FP 抗体(¹³¹I A FPAb MMC), 对荷人肝癌裸鼠的定位显像,¹³¹I A FPAb MMC 有良好的定位作用, 抑癌率可达 73.55%. 对 22 例配对的中晚期原发性肝癌的治疗显示: 治疗组有效率为 63.2%, 明显高于对照组(31.8%); 治疗组 1a 生存率(52.6%)也明显高于对照组(22.7%), 且无严重副作用. 由此可以推测, 若在交联物或在抗病毒药物上交联某一特异性的抗 HBV 的抗体, 有可能将药物导向感染的细胞. 叶维法 et al^[44]以抗 HBV 单抗抗抗体[抗-HBs 的 F(ab')₂ 片段]体[抗-HBs 为载体交联干扰素, 并使用慢性乙型肝炎的治疗, 结果显示, HBeAg 转阴率达 79.4%, HBV-DNA 转阴率达 75%, 显著高于文献报告的普通干扰素的疗效, 且不良反应明显减轻.

2 被动靶向制剂

2.1 脂质体介导的靶向药物 脂质体(liposome) 是由脂质

双分子层组成类似生物膜结构的封闭小囊, 药物包裹于囊室内无需化学键形成, 有利于保持药物活性. 脂质体对肝脏有良好的靶向性, 进入机体可迅速被肝内丰富的网状内皮系统吸收, 一旦脂质体到达靶组织, 可经多种途径发挥作用. 药物-脂质体进入细胞, 溶酶体破坏, 载体被溶酶体酶所分解, 药物将被释放入胞质, 发挥细胞毒作用. 另外, 脂质体与抗原决定簇相结合, 使脂质体内包含的药物在细胞表面高浓度地持续释放, 所释放的药物将通过被动扩散或细胞膜运输系统进入细胞. 脂质体还可作为免疫佐剂, 调节机体的免疫应答, 而制备脂质体的多种天然磷脂还是肝细胞保护剂, 所以, 脂质体包裹抗病毒药物在乙型肝炎的治疗中^[45-48], 即可靶向抗病毒, 又有可以调节免疫和保护细胞功能. 干扰素制成脂质体的体外试验证明其抗乙肝作用病毒为等量游离干扰素的 10-1 000 倍. 陈启荣 et al^[49]作了脂质体介导反义寡核苷酸体外抗乙型肝炎病毒作用的研究, 以 2, 2, 15 细胞为靶细胞, 针对 HBVS 基因和 Pre C 基因翻译起始区设计合成了 16 聚硫代反义寡核苷酸, 脂质体促进转染. 用放射免疫测定法(RIA)测乙型肝炎病毒 HBsAg 和 HBeAg 含量. 结果显示: 脂质体介导 PS-ASON 在浓度 1 μmol/L 时特异性抑制 90% HBsAg 和 92% HBeAg 的产生, 同时未见对细胞的毒性作用. 脂质体介导反义寡核苷酸的抗病毒作用显著高于单独用 ASODN(P < 0.01). 脂质体介导的 ASODN 是一种很有潜力的抗 HBV 药物.

2.2 微球介导的肝靶向药物 微球(microspheres)是将药物分子分散或黏附于高分子物质载体中而形成的微粒分散系统. 其微粒大小不等, 一般为几个微米, 已知肝脏大量存在的网状内皮细胞能对血液中 0.7-7 μm 的颗粒产生内吞和融合作用. 将药物和载体(白蛋白、明胶、乙基纤维素、淀粉等)结合制成微球, 与脂质体比较具有稳定性好、载药量大、有肝靶向和缓慢释药的特点^[50-52], 微球还具有促进抗原靶向抗原呈递细胞(APCs); 活化 T 及 B 细胞, 促进信号传递和淋巴细胞的增生活化; 诱导 T 及 B 细胞的免疫记忆^[53-55]等作用, 因而备受人们的关注. 张志荣 et al^[56]肝靶向万乃洛韦毫微粒的研究, 用乳化聚合法制备了万乃洛韦聚氰基丙烯酸正丁酯毫微粒, 对其形态、大小及其分布、体外释药特性、载药量、初步稳定性、动物体内的分布和体外肝细胞的摄取情况进行了研究. 结果表明: 对肝细胞具有通透性; 静注后 15 min 有 74.5% 集中在肝脏. 提示, 万乃洛韦毫微粒对于提高万乃洛韦对病毒性乙型肝炎的治疗效果和降低其对肾脏的毒性有意义.

吴晓蓉 et al^[57]将疫苗包裹在可生物降解的微球中, 制成一种极有潜力的新型疫苗载体系统. 采用聚-DL-乳酸-聚乙二醇共聚物(PELA)为材料, 包裹乙型肝炎表面抗原(HBsAg), 制成缓释微球疫苗, 以皮下注射或口服的方式免疫 balb/c 小鼠, 研究其免疫原性. 同时以乙肝常规铝佐剂疫苗免疫两剂作为对照. 结果表明, 皮下注射单剂微球疫苗后, 在 14 wk, 小鼠血清 IgG 滴度

可达到与铝佐剂疫苗组相当的水平, 维持较高的滴度; 此外, 口服微球疫苗组诱导的血清 IgG 滴度较低, 但其 SIgA 明显高于对照组和皮下注射微球疫苗组, 可见, 口服微球疫苗可诱导更高水平的黏膜抗体反应. PELA 微球作为疫苗载体系统是可行的, 采用可生物降解的聚合物制备缓释的微球疫苗具有潜在的优势, 初步试验表明单剂乙肝微球疫苗皮下注射可达到与多剂注射常规疫苗相似的免疫保护水平.

总之, 不同途径介导的抗乙肝病毒药物靶向制剂具有不同的特点, 不同的选择性, 有些药物也已进入临床研究阶段, 但要用于临床还有一些问题亟待解决. 如脂质体对某些药物包封率低, 药物易于渗漏, 脂质也易被氧化, 稳定性差等. 理想的脂质体应具备以下条件: (1)保持较长的循环半衰期; (2)耦联方法应该有效、简单、快速并适用于人体; (3)抗体的存在不应干扰药物的装载及释放; (4)脂质体药物应保留他们在体内的靶识别作用, 能够以足够的剂量与靶细胞结合并释放药物, 使其治疗功效高于单独用药或无导向器的脂质体药物. 抗体介导给药虽然能进一步选择感染与非感染细胞, 但仍存在的许多问题: (1)稳定性差, 如对 pH 值变化敏感, 对热不稳定, 提纯过程中易变性等; (2)特异性较低, 易于正常细胞交叉反应, 产生抗抗体等. 尽管肝靶向药物还存在着许多问题, 随着靶向制剂理论进一步阐明, 肝靶向药物仍有广阔的临床应用前景.

3 参考文献

- Zhao LS, Qin S, Zhou TY, Tang H, Liu L, Lei BJ. DNA-based vaccination induces humoral and cellular immune responses against hepatitis B virus surface antigen in mice without activation of *c-myc*. *World J Gastroenterol* 2000;6:239-243
- Chen XS, Wang GJ, Cai X, Yu HY, Hu YP. Inhibition of hepatitis B virus by oxymatrine in vivo. *World J Gastroenterol* 2001;7:49-52
- Yotsuyanagi H, Hino K, Tomita E, Toyoda J, Yasuda K, Iino S. Precore and core promoter mutations, hepatitis B virus DNA levels and progressive liver injury in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2002;37:355
- Miranda J, Cabezas C. Hepatitis B among health workers. *Rev Gastroenterol Peru* 2001;21:128-135
- Hu YP, Hu WJ, Zheng WC, Li JX, Dai DS, Wang XM, Zhang SZ, Yu HY, Sun W, Hao GR. Establishment of transgenic mouse harboring hepatitis B virus (adr subtype) genomes. *World J Gastroenterol* 2001;7:111-114
- Amarapurkar D, Das HS. Chronic liver disease in diabetes mellitus. *Trop Gastroenterol* 2002;23:3-5
- Goldmann DA. Blood-borne pathogens and nosocomial infections. *J Allerg Clin Immunol* 2002;110(Pt2):S021-26
- Zheng WC, Qi GR. tRNA-embedded hammerhead ribozymes mediate destruction of HBV (Subtype adr) in vitro. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 1998;30:432-438
- Kakimi K, Isogawa M, Chung J, Sette A, Chisari FV. Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. *J Virol* 2002;76:8609-8620
- Dikici B, Bosnak M, Bosnak V, Dagli A, Ece A, Yagci RV, Haspolat K. Combination therapy for children with chronic hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1087-1091
- Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, Nakanishi M. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001;44:43-47
- Assy N, Paizi M, Gaitini D, Baruch Y, Spira G. Clinical implication of VEGF serum levels in cirrhotic patients with or without portal hypertension. *World J Gastroenterol* 1999;5:296-300
- Merican I, Guan R, Amarapuka D, Alexander MJ, Chutaputti A, Chien RN, Hasnain SS, Leung N, Lesmana L, Phiet PH, Sjalfoellah Noer HM, Sollano J, Sun HS, Xu DZ. Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:1356-1361
- Notas G, Xidakis C, Valatas V, Kouroumalis A, Kouroumalis E. Levels of circulating endothelin-1 and nitrates/nitrites in patients with virus-related hepatocellular carcinoma. *J Viral Hepat* 2001;8:63-69
- Seki S, Sakaguchi H, Kitada T, Tamori A, Takeda T, Kawada N, Habu D, Nakatani K, Nishiguchi S, Shiomi S. Outcomes of dysplastic nodules in human cirrhotic liver: a clinicopathological study. *Clin Cancer Res* 2000;6:3469-3473
- Kubicka S, Rudolph KL, Hanke M, Tietze MK, Tillmann HL, Trautwein C, Manns M. Hepatocellular carcinoma in Germany: a retrospective epidemiological study from a low-endemic area. *Liver* 2000;20:312-318
- Brechot C, Gozuacik D, Murakami Y, Paterlini-Brechot P. Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). *Semin Cancer Biol* 2000;10:211-231
- Di Stefano G, Busi C, Camerino A, Nardo B, Fiume L. Enhanced liver blood concentrations of adenine arabinoside accomplished by lactosaminated poly-L-lysine coupling: implications for regional chemotherapy of hepatic micrometastases. *Biochem Pharmacol* 2000;1:301-304
- Wong ET, Chew YP, Lee LA, Lee CG. Therapeutic strategies for hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Curr Drug Targets* 2002;3:369-378
- Lau GK, He ML, Fong DY, Bartholomeusz A, Au WY, Lie AK, Locarnini S, Liang R. Preemptive use of lamivudine reduces hepatitis B exacerbation after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Hepatology* 2002;36:702-709
- Julyan PJ, Seymour LW, Ferry DR, Daryani S, Boivin CM, Doran J, David M, Anderson D, Christodoulou C, Young AM, Hesselwood S, Kerr DJ. Preliminary clinical study of the distribution of HPMA copolymers bearing doxorubicin and galactosamine. *J Control Release* 1999;57:281-290
- Seymour LW, Ferry DR, Anderson D, Hesselwood S, Julyan PJ, Poyner R, Doran J, Young AM, Burtles S, Kerr DJ. Cancer research campaign phase I/II clinical trials committee. Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin. *J Clin Oncol* 2002;20:1668-1676
- Hopewell JW, Duncan R, Wilding D, Chakrabarti K. Preclinical evaluation of the cardiotoxicity of PK2: a novel HPMA copolymer-doxorubicin-galactosamine conjugate antitumour agent. *Hum Exp Toxicol* 2001;20:461-470
- Slidregt LA, Rensen PC, Rump ET, van Santbrink PJ, Bijsterbosch MK, Valentijn AR, van der Marel GA, van Boom JH, van Berkel TJ, Biessen EA. Design and synthesis of novel amphiphilic dendritic galactosides for selective targeting of liposomes to the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J Med Chem* 1999;42:609-618
- Di Campli C, Wu J, Zern MA. Targeting of therapeutics to the liver: liposomes and viral vectors. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:950-954
- Di Campli C, Wu J, Gasbarrini A, Gasbarrini G, Zern MA. Gene therapy for human liver diseases. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:421-429
- Malaguarnera M, Restuccia S, Ferlito L, Mazzoleni G, Giugno I, Pistone G. Antiviral drugs in chronic hepatitis B: review and meta-analysis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2001;39:4-11
- Antiv Torresi J, Locarnini S. Iral chemotherapy for the treatment of hepatitis B virus infections. *Gastroenterology* 2000;118:S83-103
- Takakura Y, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M. Development of gene drug delivery systems based on pharmacokinetic studies. *Eur J Pharm Sci* 2001;13:71-76
- Hashida M, Nishikawa M, Yamashita F, Takakura Y. Cell-

- specific delivery of genes with glycosylated carriers. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;52:187-196
- 31 Sliedregt LA, Rensen PC, Rump ET, van Santbrink PJ, Bijsterbosch MK, Valentijn AR, van der Marel GA, van Boom JH, van Berkel TJ, Biessen EA. Design and synthesis of novel amphiphilic dendritic galactosides for selective targeting of liposomes to the hepatic asialoglycoprotein receptor. *J Med Chem* 1999;42:609-618
 - 32 Tupasi TE, Co VM, Clarin MS, Alesna ET, Divinagrancia EM, Mangubat NV. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oromucosal low-dose interferon following prednisone withdrawal for chronic hepatitis B infection in Filipino patients. *Int J Infect Dis* 2002;6:37-41
 - 33 Zampino R, Marrone A, Cirillo G, del Giudice EM, Utili R, Karayiannis P, Liang TJ, Ruggiero G. Sequential analysis of hepatitis B virus core promoter and precore regions in cancer survivor patients with chronic hepatitis B before, during and after interferon treatment. *J Viral Hepat* 2002;9:183-188
 - 34 Wu LK, Liu H, Xue PL, Lu ZG, Du KF. Influence of a triplex superimposed treatment on HBV replication and mutation during treating chronic hepatitis B. *Zhonghua Shiyao He Linchuang Bingduxue Zazhi* 2001;15:236-238
 - 35 Zoulim F. A preliminary benefit-risk assessment of Lamivudine for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. *Drug Saf* 2002;25:497-510
 - 36 Lok AS. Hepatitis B infection: Pathogenesis and management. *J Hepatol* 2000;1:89-97
 - 37 Little JW. Recent advances in the treatment of viral hepatitis. *Gen Dent* 2000;48:672-679
 - 38 Di Stefano G, Lanza M, Busi C, Barbieri L, Fiume L. Conjugates of nucleoside analogs with lactosaminated human albumin to selectively increase the drug levels in liver blood: requirements for a regional chemotherapy. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:638-642
 - 39 Fiume L, Di Stefano G, Busi C, Mattioli A, Bonino F, Torrani-Cerenzia M, Verme G, Rapicetta M, Bertini M, Gervasi GB. Liver targeting of antiviral nucleoside analogues through the asialoglycoprotein receptor. *J Viral Hepat* 1997;4:363-370
 - 40 Xie Q, Guo Q, Zhou XQ, Gu RY. Effect of adenine arabinoside monophosphate coupled to lactosaminated human serum albumin on duck hepatitis B virus. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:125-126
 - 41 Fiume L, Boinino F, Mattioli A. Inhibition of HBV replication by vidarabine monophosphate conjugated with lactosaminated serum albumin. *Lancet* 1998;332:13
 - 42 郭军,周永兴,姚志强,王升启,温守明,王保成. 半乳糖受体介导的反义硫代寡核苷酸肝细胞导向作用的体内外研究. *中华传染病杂志* 1997;15:16-19
 - 43 胡晓华,吴英德,周德南.“双弹头”抗AFP抗体对肝癌导向综合治疗的实验和临床研究. *中华肿瘤临床* 1998;2:44-46
 - 44 叶维法,钟振义. 肝炎学大典. 第1版. 天津科学技术出版社, 1995:946
 - 45 Lutsiak CM, Sosnowski DL, Wishart DS, Kwon GS, Samuel J. Use of a liposome antigen delivery system to alter immune responses in vivo. *J Pharm Sci* 1998;87:1428-1432
 - 46 Gao Y, Luo D, Cai S. A study of hepatitis B virus(HBV) anti-genome and its inhibitory effect on HBV replication. *Zhonghua Neike Zazhi* 2001;40:243-246
 - 47 Kim CK, Jeong EJ, Kim MH. Comparison of in vivo fate and immunogenicity of hepatitis B surface antigen incorporated in cationic and neutral liposomes. *J Microencapsul* 2000;17:297-306
 - 48 Kalenik TN, Motavkina NS, Vorob'ev AA. Liposome-incorporated interferon. The design of liposomal interferon. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1999;3:55-58
 - 49 陈启荣,邵俊斌,印慧,喻铮琴. 脂质体介导反义寡核苷酸体外抗乙型肝炎病毒作用的研究. *武警医学* 2000;7:391-393
 - 50 Moynihan JS, Jones DH, Farrar GH, Howard CR. A novel microencapsulated peptide vaccine against hepatitis B. *Vaccine* 2001;19:3292-3300
 - 51 Machluf M, Apte RN, Regev O, Cohen S. Enhancing the immunogenicity of liposomal hepatitis B surface antigen (HBsAg) by controlling its delivery from polymeric microspheres. *J Pharm Sci* 2000;89:1550-1557
 - 52 Moynihan JS, D' Mello FI, Howard CR. 48-mer synthetic peptide analogue of the hepatitis B virus "a" determinant induces an anti-HBs antibody response after a single injection. *J Med Virol* 2000;62:159-166
 - 53 Moynihan JS, Blair J, Coombes A, D' Mello F, Howard CR. Enhanced immunogenicity of a hepatitis B virus peptide vaccine using oligosaccharide ester derivative microparticles. *Vaccine* 2002;20:1870-1876
 - 54 Defoort JP, Martin M, Casano B, Prato S, Camilla C, Fert V. Simultaneous detection of multiplex-amplified human immunodeficiency virus type 1 RNA, hepatitis C virus RNA, and hepatitis B virus DNA using a flow cytometer microsphere-based hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2000;38:1066-1071
 - 55 Shi L, Caulfield MJ, Chern RT, Wilson RA, Sanyal G, Volkin DB. Pharmaceutical and immunological evaluation of a single-shot hepatitis B vaccine formulated with PLGA microspheres. *J Pharm Sci* 2002;91:1019-1035
 - 56 张志荣,何勤. 肝靶向万乃洛韦毫微粒的研究. *药学报* 1998;33:702-706
 - 57 吴晓蓉,贾文祥,刘莉,张再蓉,邝玉,李孝红,邓先模. PELA微球乙型肝炎疫苗的免疫原性研究. *生命科学研究* 2000;2:167-172

腺病毒载体的特点及其在 HCV 研究中的应用

郝春秋,冯志华,聂青和

郝春秋,冯志华,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:郝春秋,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

由于腺病毒(adenovirus, Ad)载体在哺乳动物及其多种细胞上进行基因转移和蛋白表达的高效性,使其在基因疫苗及基因治疗的研究中受到人们的青睐,成为当前使用最多的病毒载体之一.为了克服其存在的不足并取得更满意的效果,人们在腺病毒载体的构建和改进方面做了大量的工作.本文谨就腺病毒分子生物学特点、腺病毒载体的优缺点、近年来腺病毒载体构建原理与方法的改进及其在HCV研究中的应用进展作一扼要综述.

郝春秋,冯志华,聂青和. 腺病毒载体的特点及其在 HCV 研究中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11(6):803-805

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/803.asp>

0 引言

从理论上讲,利用病毒具有与细胞表面受体结合并将其基因组导入宿主细胞的特性,将控制病毒复制的基因及部分病毒复制非必需基因去除后,任何一种病毒都可发展成为基因表达或基因转移载体.但目前已开发的病毒载体中,以逆转录病毒载体和腺病毒载体最常用.由于逆转录病毒载体能将外源基因整合进靶细胞的基因组内,实现目的基因的长期稳定表达,因而主要用于*ex vivo*的基因研究^[1-4];但由于外源基因的插入有导致基因突变的危险,具有潜在的遗传毒性,不能满足*in vivo*基因治疗的需要.腺病毒载体利用病毒自身感染宿主细胞的特点,简便有效的将目的基因导入靶细胞,并使其有效表达.腺病毒为DNA病毒,极少发生插入突变,载体操作方便、宿主广泛、容易繁殖,并具有携带外源基因容量大、可表达接近翻译后成熟水平蛋白质等特点,已被广泛用于多种疾病的*in vivo*基因治疗^[5-8].

1 腺病毒的分子生物学

人类腺病毒属于线状双链DNA(dsDNA)病毒,无囊膜结构,其基因组与核心蛋白结合形成病毒子内核,蛋白质外壳是直径约80 nm的正二十面体,由252个颗粒组成,几何排列成240个非顶角六邻体和12个五邻体.在超过50种的腺病毒血清型中,人腺病毒2型(Ad2)及5型(Ad5)的研究最为深入,常用作基因转移的载体^[9].

腺病毒基因组长约36 kb,其两端各有一个100-165 nt LTR,含有复制起点和包装型号.腺病毒进入细胞核后仍保持线状结构,不与染色体发生整合.其基因组的复制分为早期和晚期两部分,在早期阶段至少有7个病毒启动子起始转录,产生30多种mRNA,其中E1a产物是主要的转录调控物,涉及到病毒和细胞基因的反式激活,对其他基因的转录有阻遏作用,是腺病毒复制所必需的基因;早期基因E₂产物是晚期基因表达的反式因子和病毒复制必需的因子;晚期基因产物是病毒的结构蛋白^[10-12].在构建腺病毒载体时,通常将E1区基因切除,消除E1a产物对其他基因转录的阻遏作用,并使之变成复制缺陷型的载体.这种复制缺陷的重组腺病毒仍具有感染靶细胞的能力但不发生复制,因而不会直接造成靶细胞的损害.

2 腺病毒载体的构建

由于腺病毒基因组较大,不便直接进行分子克隆,故构建腺病毒载体时,将病毒基因组左端制成含E1区缺失的穿梭质粒(如pAd.CMV-Link.1),将目的基因插入其多克隆位点后再与含腺病毒基因组的重组质粒(如pJM17)共转染至293细胞内进行同源重组^[13-16].由于人类巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)的主要立即早期启动子(immediate early promoter, IEP)可以明显的提高腺病毒载体的基因表达水平^[17,18],所以在构建腺病毒穿梭质粒时,常把CMV IEP构建在插入的目的基因之前,用于提高插入基因的表达水平.人腺病毒本身的宿主范围不广,不符合作为腺病毒载体的要求,但当腺病毒与SV40病毒或其他猴病毒发生重组后,宿主范围的限制性得以克服^[19,20],能有效地转化非分裂细胞,并大量表达外源蛋白,在此猴病毒显然起了一种反式的辅助功能.在我们的实验中,包装腺病毒载体的穿梭质粒pAd.CMV-Link.1就是Ad5与SV40的杂合体.

在构建HCV结构基因腺病毒表达载体时,将HCV结构基因的不同片段定向克隆到以E1区缺失的腺病毒基因组左端部分制成的穿梭质粒pAd.CMV-Link.1中^[21].由于E1区基因为腺病毒复制所必需,E1区的缺损可造成病毒在复制阶段的流产,因此需要有转化了E1区基因的包装细胞即人胚肾293细胞提供反式补偿才能复制和扩增.包装腺病毒载体时,需将插入了目的基因的穿梭质粒与含腺病毒基因组的重组质粒pJM17共转染至转化了腺病毒E1区基因的包装细胞293内进行同源重组^[14,15].由于pJM17是包装信号(Ψ)缺失的腺病毒基

因组质粒,他本身不能被包装成病毒^[22],必须与含包装信号(Ψ)的穿梭质粒 pAd.CMV-Link.1 重组后才能形成有感染性的病毒.这表明,要形成能持续复制传代的有感染性的腺病毒载体,基因组重组质粒 pJM17、穿梭质粒 pAd.CMV-Link.1 和包装细胞 293 三者缺一不可.因此,在腺病毒载体包装时,有重组病毒生成后形成的空斑就是含有目的基因的阳性空斑^[23].

3 腺病毒载体的优缺点

腺病毒载体法是基因治疗中最有前途的基因转移方法之一,其在介导体内基因治疗方面所表现出的多方面的优势使得这一载体系统正在成为基因治疗领域中最具魅力的载体之一.腺病毒的生物学特性已得到广泛的研究,由于其含有一个中等大小的基因组(平均 36 kb),适合于容纳较大片段基因,与逆转录病毒载体相比,腺病毒载体能有效地把外源基因转运到各种靶细胞和组织中.腺病毒载体作为真核细胞基因转移载体有以下优点^[24-26]: (1)制备简便:腺病毒基因组的结构和功能研究的比较清楚,载体容易构建和操作. (2)宿主范围广:可转入分裂后的非分裂细胞中发挥作用,也可以感染处于分裂状态的细胞. (3)感染性强:可经不同途径进入不同组织(可以在肠道内繁殖,也可以在呼吸道内繁殖). (4)包装容量大:经改建的腺病毒基因部分缺失载体的克隆容量可达 10 kb^[27],腺病毒基因完全缺失载体的克隆容量可高达 37 kb^[28]. (5)病毒繁殖滴度高. (6)安全性好:重组腺病毒在结构上比较稳定,小鼠实验证明,腺病毒 DNA 一般在染色体外存在,无病毒基因整合的证据,因而不会引起插入突变;野生型 4、7 型腺病毒在成人只引起很轻的疾病,在美军中用野生型 4、7 型腺病毒株作为口服活疫苗预防呼吸道感染免疫接种 30 a,证明是安全可靠的;目前无资料证明 4、7 型腺病毒感染与人类恶性肿瘤有关,在人类的肿瘤细胞中未发现有腺病毒基因组的整合.由于以上特点的存在,使腺病毒载体成为继逆转录病毒载体后被广泛应用的载体系统,尤其在 in vivo 基因治疗和研究方面更为突出.

腺病毒载体同样还存在着一些不足^[29-31],为了克服这些不足,人们不断对其进行着改良.第一代腺病毒载体是由去除其基因组 E1 和 / 或 E3 区而获得的,复制需在表达 E1 蛋白的 293 细胞中完成.由于载体与 293 细胞间存在同源序列,载体在 293 细胞中繁殖时通过重组可重新获得 E1 区,出现复制型腺病毒(RCA),使其可以合成腺病毒的早期和晚期蛋白,激发宿主针对腺病毒的细胞和体液免疫,使第一代腺病毒载体在体内的持续时间及再次应用受到限制.为了减少 RCA 的产生,进一步降低病毒自身蛋白的合成,人们利用互补细胞系^[32](如 PER.C6, 能表达 E1 蛋白,但与载体不存在同源序列)代替 293 细胞,并制备了双缺失的第二代腺病毒载体^[33];只保留复制和包装必需的顺式作用元件而去除了腺病毒载体中所有编码基因的第三代腺病毒载

体^[28](即所谓“无肠”, gutless). 这些改良的载体可避免 RCA 的产生,大大降低宿主对病毒的免疫反应,利于载体的长期应用.

4 腺病毒载体在 HCV 研究中的应用

目前,表达 HCV 基因的腺病毒载体已广泛应用于 HCV 的分子生物学、发病机制、疫苗研制及 HCV 所致的肝硬化和肝细胞肝癌等方面的研究.腺病毒表达载体是一种很好的 HCV 抗原表达载体^[34],用其免疫小鼠后可以产生有效的针对 HCV 的细胞免疫和体液免疫^[35],尤其是其表达的 HCV 结构抗原 CE1 或 CE1E2 可以刺激机体产生有效的 CTL 效应,且这种 CTL 效应可持续 100 d 以上^[36].有人利用携带 HCV 结构和非结构基因的腺病毒载体进行免疫诱导,确定了几个人 HLA-A₂ 限制的 HCV CTL 表位^[37]和几个小鼠 H-2^d 限制的 HCV CTL 表位^[36],这对设计和研制抗 HCV 治疗性疫苗具有重要意义.有人分别利用表达 HCV C-E1 和 HCV C-E2 蛋白的腺病毒表达载体感染树突状细胞(dendritic cells, DC),证实了 HCV C-E1 和 C-E2 蛋白的表达均可导致树突状细胞抗原呈递功能的降低,从而引起抗 HCV 的 T 细胞免疫功能缺陷,导致 HCV 的持续感染^[38,39];但也有人利用该载体进行研究得出了不同的观点,认为 HCV C 及 C-E1 蛋白的表达并不影响宿主清除肝细胞 HCV 感染的能力^[40].此外,还有人利用表达 HCV C 蛋白的腺病毒表达载体证实了 C 蛋白的表达可影响细胞的生存能力和细胞膜的通透性^[41];C 蛋白的表达在丙型肝炎患者肝细胞的恶变过程中起一定作用^[42];也有人认为 HCV 保守的 C 蛋白在 HCV 疫苗的研制中具有重要作用^[43].

诸多的研究表明,腺病毒载体是一种很好的基因转移和表达载体,有较好的发展潜力.

5 参考文献

- 1 Gysin R, Wergedal JE, Sheng MH, Kasukawa Y, Miyakoshi N, Chen ST, Peng H, Lau KH, Mohan S, Baylink DJ. Ex vivo gene therapy with stromal cells transduced with a retroviral vector containing the BMP4 gene completely heals critical size calvarial defect in rats. *Gene Ther* 2002;9:991-999
- 2 Hachein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 2002;346:1185-1193
- 3 Musgrave DS, Pruchnic R, Bosch P, Ziran BH, Whalen J, Huard J. Human skeletal muscle cells in ex vivo gene therapy to deliver bone morphogenetic protein-2. *J Bone Joint Surg Br* 2002;84:120-127
- 4 Lynch CM. Gene therapy for hemophilia. *Curr Opin Mol Ther* 1999;1:493-499
- 5 Zhao J, Pettigrew GJ, Thomas J, Vandenberg JJ, Delriviere L, Bolton EM, Carmichael A, Martin JL, Marber MS, Lever AM. Lentiviral vectors for delivery of genes into neonatal and adult ventricular cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol* 2002;97:348-358
- 6 Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Ishii-Watabe A, Uchida E, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T. CAR- or alphav integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber

- modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Ther* 2002;9:769-776
- 7 Havenga MJ, Lemckert AA, Ophorst OJ, van Meijer M, Germeraad WT, Grimbergen J, van Den Doel MA, Vogels R, van Deutekom J, Janson AA, de Bruijn JD, Uytdehaag F, Quax PH, Logtenberg T, Mehtali M, Bout A. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol* 2002;76:4612-4620
 - 8 Wang G, Berk AJ. In Vivo association of adenovirus large E1A protein with the human mediator complex in adenovirus-infected and -Transformed cells. *J Virol* 2002;76:9186-9193
 - 9 Sandig V, Youil R, Bett AJ, Franlin LL, Oshima M, Maione D, Wang F, Metzker ML, Savino R, Caskey CT. Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1002-1007
 - 10 Stevens JL, Cantin GT, Wang G, Shevchenko A, Shevchenko A, Berk AJ. Transcription control by E1A and MAP kinase pathway via Sur2 mediator subunit. *Science* 2002;296: 755-758
 - 11 Nada S, Trempe JP. Characterization of adeno-associated virus rep protein inhibition of adenovirus E2a gene expression. *Virology* 2002;293:345-355
 - 12 Jing XJ, Kalman-Maltese V, Cao X, Yang Q, Trempe JP. Inhibition of adenovirus cytotoxicity, replication, and E2a gene expression by adeno-associated virus. *Virology* 2001;91:140-151
 - 13 Chen Q, Wang JZ, Liu H, Wu Y, Fan M. Construction and characterization of recombinant adenoviruses expressing biologically active human brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2000;32:121-125
 - 14 Kee C, Sohn S, Hwang JM. Stromelysin gene transfer into cultured human trabecular cells and rat trabecular meshwork in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2856-2860
 - 15 Liu Q, Lu Z, Zhang W, Yan J. Construction and identification of recombinant adenovirus vector containing the hVEGF165 gene. *J Tongji Med Univ* 2000;20:186-189
 - 16 Ishii H, Yoshida M, Hajjar KA, Yasukochi Y, Numano F. Construction of recombinant adenoviral vector of annexin II. *Ann N Y Acad Sci* 2000;902:311-314
 - 17 Sanchez TA, Habib I, Leland Booth J, Evetts SM, Metcalf JP. Zinc finger and carboxyl regions of adenovirus E1A 13S CR3 are important for transactivation of the cytomegalovirus major immediate early promoter by adenovirus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:670-677
 - 18 Habib NA, Hodgson HJ, Lemoine N, Pignatelli M. A phase I/II study of hepatic artery infusion with wtp53-CMV-Ad in metastatic malignant liver tumours. *Hum Gene Ther* 1999;10:2019-2034
 - 19 Xu ZL, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, Uchida E, Mayumi T, Hayakawa T. Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *J Control Release* 2002;81:155-163
 - 20 Johnson MA, Pooley C, Lowenthal JW. Delivery of avian cytokines by adenovirus vectors. *Dev Comp Immunol* 2000;24:343-354
 - 21 Hao CQ, Zhou YX, Feng ZH, Li JG, Jia ZS, Wang PZ. Construction, identification and expression of framework plasmid pAd.HCV-C of adenovirus expression vector of HCV C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:635-639
 - 22 Zhou HS, Zhao T, Rao XM, Beaudet AL. Production of helper-dependent adenovirus vector relies on helper virus structure and complementing. *J Gene Med* 2002;4:498-509
 - 23 Davis AR, Wivel NA, Palladino JL, Tao L, Wilson JM. Construction of adenoviral vectors. *Mol Biotechnol* 2001;18:63-70
 - 24 Pandori M, Hobson D, Sano T. Adenovirus-microbead conjugates possess enhanced infectivity: a new strategy for localized gene delivery. *Virology* 2002;299:204-212
 - 25 Nasz I, Adam E. Recombinant adenovirus vectors for gene therapy and clinical trials. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2001;48:323-348
 - 26 Adam E, Nasz I. Adenovirus vectors and their clinical application in gene therapy. *Orv Hetil* 2001;142:2061-2070
 - 27 Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:440-447
 - 28 Morsy MA, Gu M, Motzel S, Zhao J, Lin J, Su Q, Allen H, Franlin L, Parks RJ, Graham FL, Kochanek S, Bett AJ, Caskey CT. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7866-7871
 - 29 Gelse K, Jiang QJ, Aigner T, Ritter T, Wagner K, Poschl E, von der Mark K, Schneider H. Fibroblast-mediated delivery of growth factor complementary DNA into mouse joints induces chondrogenesis but avoids the disadvantages of direct viral gene transfer. *Arthritis Rheum* 2001;44:1943-1953
 - 30 Sellers KW, Katovich MJ, Gelband CH, Raizada MK. Gene therapy to control hypertension: current studies and future perspectives. *Am J Med Sci* 2001;322:1-6
 - 31 Rasmussen UB, Banchaibi M, Meyer V, Schlesinger Y, Schughart K. Novel human gene transfer vectors: evaluation of wild-type and recombinant animal adenoviruses in human-derived cells. *Hum Gene Ther* 1999;10:2587-2599
 - 32 Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoebe RC. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 1998;9:1909-1917
 - 33 Hu H, Serra D, Amalfitano A. Persistence of an [E1-, polymerase-] adenovirus vector despite transduction of a neoantigen into immune-competent mice. *Hum Gene Ther* 1999;10:355-364
 - 34 Seong YR, Lee CH, Im DS. Characterization of the structural proteins of hepatitis C virus expressed by an adenovirus recombinant. *Virus Res* 1998;55:177-185
 - 35 Seong YR, Choi S, Lim JS, Lee CH, Lee CK, Im DS. Immunogenicity of the E1E2 proteins of hepatitis C virus expressed by recombinant adenoviruses. *Vaccine* 2001;19:2955-2964
 - 36 Bruna-Romero O, Lasarte JJ, Wilkinson G, Grace K, Clarke B, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus. *Hepatology* 1997;25:470-477
 - 37 Urbani S, Uggeri J, Matsuura Y, Miyamura T, Penna A, Boni C, Ferrari C. Identification of immunodominant hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T-cell epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV antigens. *Hepatology* 2001;33:1533-1543
 - 38 Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, Lopez-Diaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, Garcia N, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol* 2002;76:5062-5070
 - 39 Hiasa Y, Horiike N, Akbar SM, Saito I, Miyamura T, Matsuura Y, Onji M. Low stimulatory capacity of lymphoid dendritic cells expressing hepatitis C virus genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249:90-95
 - 40 Sun J, Bodola F, Fan X, Irshad H, Soong L, Lemon SM, Chan TS. Hepatitis C virus core and envelope proteins do not suppress the host's ability to clear a hepatic viral infection. *J Virol* 2001;75:11992-11998
 - 41 Kalkeri G, Khalap N, Akhter S, Garry RF, Fermin CD, Dash S. Hepatitis C viral proteins affect cell viability and membrane permeability. *Exp Mol Pathol* 2001;71:194-208
 - 42 Dubourdeau M, Miyamura T, Matsuura Y, Alric L, Pipy B, Rousseau D. Infection of HepG2 cells with recombinant adenovirus encoding the HCV core protein induces p21(WAF1) down-regulation - effect of transforming growth factor beta. *J Hepatol* 2002;37:486
 - 43 Liu ZX, Nishida H, He JW, Lai MM, Feng N, Dennert G. Hepatitis C virus genotype 1b core protein does not exert immunomodulatory effects on virus-induced cellular immunity. *J Virol* 2002;76:990-997

HCV C 区 DNA 疫苗的研究现状

孙 利,周永兴

孙利,周永兴,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:孙利,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:2002-10-29 接受日期:2002-11-16

摘要

1974年Golafieid 首先报告输血后非甲非乙型肝炎. 1989年Choc et al 应用分子克隆技术获得本病毒基因克隆, 并命名本病及其病毒为丙型肝炎 (Hepatitis C)和丙型肝炎病毒 (HCV).由于至今尚未分离到病毒颗粒,使得必须以可得到的病毒核酸成分进行重组、表达蛋白,进而进行疫苗研究.本文详细阐述了HCV C区基因结构、HCV C蛋白功能以及HCV-C区DNA疫苗方面的内容及进展,以期将来进一步的研究提供帮助.

孙利,周永兴. HCV C 区 DNA 疫苗的研究现状. 世界华人消化杂志 2003;11(6):806-809

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/806.asp>

0 引言

HCV 归为黄病毒科 HCV, 是肠道外非甲非乙型肝炎的主要致病因子, 呈世界范围性, 其致病常引起持续感染, 并且 HCV 的慢性感染和慢性肝脏疾病、肝硬化及肝细胞癌(HCC)明显相关^[1-7]. 因此, 运用疫苗保护免受 HCV 感染很有必要.从基因学角度来说, 慢性病毒性肝炎属获得性基因疾病, DNA 疫苗能诱导细胞免疫及体液免疫, 从而使其成为免疫治疗的策略之一^[1,8]. 相信随着分子生物学技术的发展, 基因治疗将为慢性病毒性肝炎患者带来福音.

1 HCV C 区基因结构

HCV 病毒体呈球形, 直径<80 nm(在肝细胞中为 36-40 nm, 在血液中为 36-62 nm), 为单股正链 RNA 病毒, 在核衣壳外包绕含脂质的囊膜, 囊膜上有刺突.HCV-RNA 全长 9 600 bp, 含有一个大的单一开放阅读框(ORF), 编码约 3 010 个氨基酸的病毒前体蛋白.在 HCV 的编码基因中, 核心区基因位于 HCV 基因组 1-191 位氨基酸, 具有高度遗传保守性, C 基因表达产物具有良好的抗原稳定性.

2 HCV C 蛋白功能

C 蛋白经宿主蛋白酶裂解后产生蛋白 P23、P21 和 P16 (仅见于 HCV-1). C 蛋白主要位于胞质的内质网表面,

少数位于胞核内^[9], 呈颗粒状, 可在昆虫细胞内形成 40-60 nm 颗粒, 可能形成病毒衣壳;可调节几种转录和翻译的细胞基因, 作用于 5' UTR 的 IRES, 从而影响转录起始.C 蛋白可通过上调细胞周期蛋白 E 促进细胞增生, 可能通过基因调节实现致癌作用. C 蛋白促进或抑制细胞对 Fas 介导的凋亡, 与淋巴毒素- β 受体的尾部作用而抑制程序性细胞死亡(PCD). C 蛋白是较强的免疫刺激原, 可产生较强的免疫反应, 通过 NF- κ B 途径影响细胞水肿和免疫反应. HCV 核心蛋白的 N 端含有两个 DNA 结合区, 结合区序列与核内转移信号的部分重叠以及对结合靶 DNA 序列的非选择性可能是 HCV 核心蛋白具有多功能的基础^[10].

HCV 感染的慢性化和致 HCC 产生主要是通过病毒基因编码的蛋白与宿主细胞的相互作用实现.HCV 核心蛋白具有与 DNA 结合的基序、核定位信号、磷酸化位点, 可能具有基因调节的功能.近年来, 有大量的体内外实验揭示 HCV 核心蛋白能与细胞的多种蛋白结合, 调节多种细胞基因的转录活性, 在 HCV 感染的病理发生和慢性化以及宿主细胞的恶性转化等过程中起重要作用, 主要表现在影响细胞凋亡和免疫系统的功能, 并参与细胞恶性转化的发生等.

3 DNA 疫苗的概述

3.1 DNA 疫苗的定义 DNA 疫苗是将编码某种抗原蛋白的外源基因(DNA 或 RNA)直接导入动物体细胞内, 并通过宿主细胞的表达系统合成抗原蛋白, 诱导宿主产生对该抗原蛋白的免疫应答, 以达到预防和治疗疾病的目的. DNA 疫苗又称为基因疫苗或核酸疫苗, 这种免疫称为 DNA 介导的免疫、基因免疫、核酸免疫以及遗传免疫等.

3.2 构建 疫苗研究最鼓舞人心的新领域之一是 DNA 疫苗.将有关的基因克隆到大肠杆菌的质粒中, 使哺乳动物细胞增加该基因的表达.将其注入动物体内后, 该质粒进入宿主细胞核, 在核内仍以非整合形式存在, 并按要求合成抗原.以这种方式产生的抗原优于传统疫苗.首先, 在细胞内产生的抗原有可能以更为天然的折叠构型而有利于中和抗体的产生.抗原也可被带到细胞表面, 由淋巴细胞抗原 1 型分子表达.该质粒载体可能含免疫调节序列, 可刺激细胞免疫.

3.3 组成 DNA 疫苗由病毒的保护性抗原基因和载体质粒两部分组成.目的基因通常是选择该病毒的主要保护性抗原基因, 最好是可对多数毒株都有保护作用的抗

原基因. 抗原基因可以是单个基因或具有协同保护功能的一组基因, 也可以是编码抗原决定簇的一段核苷酸序列. 质粒载体必须是能在大肠杆菌中高拷贝地扩增, 而在动物细胞内则能高效表达, 但不复制, 也不含有向宿主细胞基因组内整合的序列. 一般以 PBR322 或 PUC 质粒为基本骨架, 带有细菌复制子(ORI), 真核生物的启动子(有的含有增强子)和 Poly-A 加尾信号. 启动子大多来源于病毒基因组, 如 CMV, PSV, LTR 等, 其中以 CMV 的转录活性最高; Poly-A 序列具有保证 mRNA 在体内的稳定性的作用, 这种稳定性因 Poly-A 来源不同而异, 目前认为较好的 Poly-A 来自牛生长激素基因或兔 B 球蛋白基因; 载体中如果含 SV40 复制起始点, 应该使其缺失. 筛选基因可以选用卡那霉素, 氨苄青霉素或新霉素等抗性基因.

3.4 优点 传统用于传染病预防的疫苗有减毒活疫苗、灭活疫苗、亚单位疫苗和重组活载体疫苗等, 与这些疫苗相比, DNA 疫苗免疫效果好, 对已有免疫力的个体接种仍可起作用, 且免疫应答持久, 很微量的抗原即可刺激机体产生强而持久的免疫应答. DNA 疫苗引起 CTL 应答, 不存在散毒及毒力回升的危险. DNA 疫苗易于构建, 且方法简便、价格低廉、用量少, 便于贮藏和运输, 使用也较为方便, 比其他疫苗更经济. DNA 疫苗具有相同的理化性质, 为联合免疫提供了可能.

3.5 免疫应答 在开发和研制 HCV 疫苗的过程中, DNA 免疫是在快速构建、评价和筛选免疫原方面的有效办法. DNA 疫苗是一种新的针对靶抗原诱导产生免疫的方法. 他直接使识别基因编码的抗原和包含基因片段的抗原成为疫苗传播媒介, 识别候选基因可快速进入感染机体和肿瘤细胞. DNA 一项优点是在免疫的所有路径均显示了活性, 特别是细胞毒 T 细胞反应, 而在蛋白疫苗中很难产生. 对于各种病毒包括那些血液传播的病毒, DNA 疫苗均可被用于预防措施中. 对于慢性感染和肿瘤患者, DNA 疫苗则可作为一种治疗措施. 在这种情况下, 可把具有免疫活性的基因片段引入疫苗中, 对基因片段进行合适处理以及联合增加免疫的操作识别系统^[11].

4 HCV C 区 DNA 疫苗的研究进展

4.1 丙肝 DNA 疫苗定义 丙肝 DNA 疫苗含有编码病毒蛋白(如核心蛋白、包膜蛋白)的基因, 宿主细胞摄取外源性 DNA 并表达病毒基因、产生相应的病毒蛋白, 后者通过宿主细胞的主要组织相容性复合体 I 类(MHC-I)途径刺激 CD₈⁺ 细胞毒性 T 细胞启动细胞介导的免疫反应, 从而发挥抗病毒作用^[12].

4.2 HCV C 区 DNA 疫苗制备 HCV 的 DNA 疫苗制备主要集中在能刺激保护性抗体产生的包膜蛋白以及能诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的核心蛋白或 NS 5 肽. 将编码核心蛋白(pC)、E1 蛋白(pE1)、E2 蛋白(pE2)、核心蛋白 E1、E2(pCE1E2)、E1 和 E2 蛋白(pE1E2)、E2 结构 N- 端高变区(pE2-HVR)的质粒转染到哺乳类动物细胞

以及接种于鼠, 发现 6 种 DNA 质粒在细胞内均能表达特异性的抗原, 但有编码核心蛋白的质粒能导致特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞反应. 两种长度的 HCV 核心基因片段在 E.coli 中的表达, 从 HCV 感染者的血清扩增出核心区基因, 利用表达质粒 pQE-30, 构建了两种重组质粒, 其插入片段分别为 HCV 的全长核心区基因(c573)和“截断型”基因(c375). 经 IPTG 诱导, 含两种质粒的菌株都表达了目的蛋白, c573 表达的蛋白分子量为 22 kD, 表达量占菌体蛋白的 8.7 %; c375 表达的蛋白分子量为 19 kD, 表达量占菌体蛋白的 39.9 %. 经 Ni-NTA 金属螯合层析纯化, 获得了高纯度的目的蛋白. 这两种蛋白均可特异地与丙型肝炎患者血清发生反应, 表明具有良好的抗原活性.

4.3 HCV C 区 DNA 疫苗表达 人肝细胞^[13]和黑猩猩对 HCV 很敏感, 但 HCV 体外培养尚未找到敏感有效的细胞培养系统. 有报道 HCV 核心蛋白在酵母中表达成功^[14], 以非融合蛋白的方式, 在大肠杆菌中高效表达了完整的 HCV 核心蛋白, 具有较高生物活性^[15,16]. Hao et al^[17] 构建了 HCV C 基因腺病毒表达载体的骨架质粒, 并证实其可以在 7721 细胞中瞬时表达 HCV C 基因. 应用 PCR 方法获取完整的 HCV 核心区 cDNA 片段, 克隆到真核表达载体 PBK-CMV 上, 可在 HepG2 中稳定表达 C 蛋白, 提供了理想的实验用细胞株^[18].

4.4 免疫应答 HCV 核心基因疫苗能诱导 Balb/c 小鼠产生良好的细胞及体液免疫应答^[19-25]. 表达 HCV 结构蛋白(C, E1, E2)的 FVB/n 转基因小鼠及野生型(WT)FVB/n 小鼠经肌肉注射免疫表达核心(pHCVC)质粒或 C/E1/E2(pHCVSt)质粒. WT 和转基因小鼠经结构蛋白或包膜蛋白免疫后均可产生抗 C 抗体和显示 T 细胞增生反应. WT 小鼠免疫 pHCVSt 后, 只产生抗 E2 的 CTL 活性, 非针对抗 C 或抗 E1, 而当 WT 小鼠免疫 pHCVC 时可产生强烈的抗 C 的 CTL 活性. 经 pHCVSt 免疫的转基因小鼠未测出抗 C 或抗包膜蛋白的 CTL 活性, 但免疫 pHCVC 的转基因小鼠产生了独特型抗 C 的 CTL 活性^[26].

4.5 增强策略 Balb/c(H-2d)和 C57bl/6 小鼠接受联接多顺反子 C/E1/E2/NS2/NS3(pRC/C-NS3)的黄疸病毒增强了对 HCV 蛋白的抗体和细胞反应, CD8(+)T 细胞反应增强^[27]. 重组体 pCD-HCV1、pCD-HCV2 和 pCD-HCV3 均可诱导小鼠产生抗体和脾细胞对 HCV 抗原增生反应^[28-30]; 重组体还可诱导鼠 PBMC 对 HCV 抗原的增生反应及使 SP2/0-HCV-C 细胞成瘤性显著降低; 通过免疫鼠荷瘤检测体内 CTL 反应, 可观察到免疫组鼠发瘤时间滞后, 发瘤部位减少和存活时间延长. 重组质粒 pcDNA HCV-C 治疗组, 使 SP2/0-HCV-C 细胞成瘤性显著降低, 对 HCV 皮下移植瘤有一定的治疗作用^[31]; 与表达 IL-12 质粒联合接种后, 治疗作用加强^[32]. 脂质转染剂^[33]或联合注射 GM-CSF 细胞因子^[22]可以促进基因疫苗的摄取并增强其诱导的抗病毒免疫应答的效力. pRSC-HBV/HCV 可分别表达 HBcAg 及 HCV 核蛋白, 免疫 Balb/c 小鼠后可诱

导其体液免疫应答^[34,35]. 双表达载体 pcDNA3.0 BA 同时输送 GM-CSF 与 pc154 基因能增强 Balb/c 小鼠对 HCV C 蛋白基因的体液免疫应答及免疫鼠脾淋巴细胞对特异性抗原刺激的增生能力^[36]. 重组的 HCV 结构区 DNA 疫苗 (pBK-CMV) 能诱导小鼠体内特异性 T 淋巴细胞反应^[37]. rhIL-12 可在体外显著增加慢性 HCV 感染者淋巴细胞的增生反应^[38].

4.6 联合免疫 HCV 多表位抗原基因 PCX 克隆到真核表达载体 pREP9(RSV 启动子)及 pcDNA3 (CMV 启动子)中, 构建真核表达载体 pREP9/PCX 及 pcDNA3/PCX, 将其肌肉注射免疫小鼠及家兔, 可诱发特异性免疫应答且安全性好^[39]. HCV 口服减毒鼠伤寒沙门菌 DNA 疫苗可诱发特异性的免疫应答^[40]. 为探讨复合多表位丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 及恶性疟原虫 (plasmodium falciparum, Pf) 双价疫苗的可行性, Huang et al^[41] 将人工合成的复合多表位 HCV 基因 PCX 及 Pf 抗原基因 AB (SPf66+SPf105) 克隆到谷胱甘肽转硫酶 (Glutathione S-transferase, GST) 表达载体 pGEX-2T 中, 并在大肠杆菌中高效表达 GST-HCV-Pf 复合抗原 (GST-CAB), 发现 GST-CAB 融合蛋白具有良好的 HCV 及 Pf 免疫特异性, 可诱发病理想的体液及细胞免疫应答, 可望成为 HCV-Pf 双价疫苗的候选抗原. 免疫多表位的 PCX 蛋白可以诱导机体产生高水平的免疫应答^[42]. HCV 不同区段的基因重组抗原或人工合成多肽可诱导 HLA-II 类分子限制 CD₄⁺ T 细胞增生, 这种增生反应的强弱可能反映不同人群对 HCV 免疫应答的不同, 并与 HCV 感染的预后有关. CspcDNA3.1 融合重组质粒都优于 CpcDNA3.1+SpcDNA31 联合基因的免疫, 融合 DNA 疫苗有望成为慢性病毒性肝炎预防和治疗的控制剂^[43].

4.7 展望 DNA 疫苗可产生强大的细胞免疫, 这是灭活的传统疫苗无法产生的. 联合疫苗机制可诱导增强 CD8 (+)CTL 和 IgG2a 反应, 这会涉及许多病原体疫苗的发展, 包括 HCV, 后者需要很强的抗体和 CTL 反应^[44]. 电基因传递 (EGT) 法将质粒 DNA 转入到肌纤维中, 是一种提高遗传免疫力的策略. EGT 诱导产生的体液反应比传统的裸 DNA 免疫高 10-30 倍. EGT 提高细胞和体液免疫的能力是抗原非依赖性的, 可望成为将来防治 HCV 及其他感染性疾病的一种安全低费用的治疗方法^[45]. 用复制和非复制核酸疫苗与 rSFVs 来评估抗 HCV 疫苗的发展^[46]; 描述 p214K9 表位并结合用流式细胞仪分析 CTL 反应可以成为定级不同 HCV 疫苗策略产生原始 CTL 反应的能力的方法之一^[47]. DNA 疫苗产生的细胞免疫在保护机体免受结核杆菌、疟原虫、利什曼原虫、HIV 等细胞内致病原的侵袭方面起重要作用. 实际上, 这是迄今为止一直在小鼠体内进行的研究^[48]. 给 20 名志愿者肌注 3 剂恶性疟原虫环孢子蛋白, 其中 11 名志愿者外周血出现细胞毒 T 细胞. 这些资料十分鼓舞人心, 但其安全性问题以及是否能产生保护水平的免疫反应需进一步得以验证.

5 参考文献

- 1 Prince AM. Perspectives on prophylactic and therapeutic immunization against hepatitis B and C viruses. *Transfus Clin Biol* 2001;8:467-470
- 2 Li J, Wang WL. Detection of hepatitis C virus RNA in the tissue of hepatocellular carcinoma by multiple detection system. *Chin J Experimental Clinical Virol* 2000;14:47-51
- 3 Liu RH. Chronic liver disease and hepatitis B and hepatitis C virus infection. *J Ningxia Med* 2000;22:209-210
- 4 Wang RQ, Zhou ZC, Yang JM, Fang DC. Expression of oncogenes and tumor-suppressor gene in the tissues of hepatocellular carcinoma with different types of HBV, HCV infection. *Chongqing Med* 2000;29:99-100
- 5 Yang JM, Wang RQ, Pu B, Zhou ZC, Fang DC, Luo YH. The effect of hepatitis C virus infection on expression of several cancer-associated gene products in hepatocellular carcinoma. *Tumour* 2000;20:40-42
- 6 Zhang WJ, Yu XL, Du CX, Yin Q, Du SC. The infections of HBV HCV HGV TTV in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) and the possibility and prevention in interventional treatment. *Shaanxi Tumour Med* 2002;10:27-29
- 7 Prince AM, Shata MT. Immunoprophylaxis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:91-103
- 8 Brinster C, Inchauspe G. DNA vaccines for hepatitis C virus. *Intervirology* 2001;44:143-153
- 9 Chen LB, Chen PL, Fan GR, Li L, Liu CY. Localization of hepatitis C virus core protein in the nucleus of peripheral blood mononuclear cells of hepatitis C patients. *Chin J Experimental Clinical Virol* 2002;16:37-39
- 10 Yi DX, Guan DY. Determination of DNA binding domains in hepatitis C virus core protein. *Chin J Hepatol* 2001;9:160-162
- 11 Stevenson FK, Rosenberg W. DNA vaccination: a potential weapon against infection and cancer. *Vox Sang* 2001;80:12-18
- 12 Tang XP, Xu YL, Yuan XZ, Zhang FC. Activity of HCV-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *Chin J Epidemiol* 2001;19:212-215
- 13 Ma QY, Hao F, Wang YM. Study on the infection of normal adult hepatocytes with HCV in vitro. *J Third Military Med University* 2001;23:1216-1218
- 14 Li K, Wang L, Cheng J, Zhang LX, Lu MY, Li L. Cloning and expression of the gene of hepatitis C virus core in yeast. *J Surg Advanced Colle* 2002;23:1-3
- 15 李华, 潘承恩, 陈武科, 王全颖, 杨广笑. 丙型肝炎病毒核心区基因在大肠杆菌中的高效表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:221-223
- 16 Zhao W, Liao GY, Li WD, Chen JY, Zhang XW, Sun MB, Jiang SD. Expression of hepatitis C virus core protein in E.coli and its immunological characteristics. *Immunol J* 2001;17:425-429
- 17 Hao CQ, Zhou YX, Feng ZH, Li JG, Jia ZS, Wang PZ. Construction, identification and expression of framework plasmid pAd. HCV-C of adenovirus expression vector of HCV C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:635-639
- 18 刘重阳, 刘为纹, 杨建民, 鲁荣, 罗元辉. HCV 核心基因 cDNA 真核表达载体的构建及其表达. *世界华人消化杂志* 2000;8:1049-1050
- 19 Tan DM, Liu SH, Li CZ, Fan XG, Yan MY, Sun KZ. V specific cellular and humoral immune responses induced by intramuscular injection of DNA vaccine containing HCV core gene in mice. *Fundamental Med Clinic* 2000;20:41-42
- 20 Feng ZH, Zhou YX, Jia ZS, Lian JQ, Jiao CS, Li JG. Construction and gene immunization of recombinant expression plasmid of Hepatitis C virus core gene. *Chin J Immunol* 2000;16:184-186
- 21 Ceng XW, Du Y, Wang QC. Research on DNA vaccines of hepatitis C virus. *J Sichuan University* 2000;37:582-585
- 22 Ou-Yang P, Hwang LH, Tao MH, Chiang BL, Chen DS. Co-delivery of GM-CSF gene enhances the immune responses of hepatitis C viral core protein-expressing DNA vaccine: role of dendritic cells. *J Med Virol* 2002;66:320-328
- 23 Duenas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Alvarez-Obregon JC, Herrera A, Lorenzo LJ, Pichardo D, Morales J. A truncated variant of the hepatitis C virus core induces a slow but potent immune response in mice following DNA immunization. *Vaccine* 2000;19:992-997
- 24 Deng T, Chen NL, Chen TB, Wu SS, Wang MW, Jia KM. Plasmid hepatitis C virus core protein: DNA-based immunization for im-

- immune responses in Balb/c mice. *Chin J Immunol* 1999;11:494-496
- 25 Feng ZH, Zhou YX, Jia ZS, Lian JQ, Li JG, Li WB. Immune responses to recombinant expression plasmid encoding hepatitis C virus core antigen. *Chin J Internal Med* 1999;7:462-468
- 26 Sato J, Murata K, Lechmann M, Manickan E, Zhang Z, Wedemeyer H, Rehmann B, Liang TJ. Genetic immunization of wild-type and hepatitis C virus transgenic mice reveals a hierarchy of cellular immune response and tolerance induction against hepatitis C virus structural proteins. *J Virol* 2001;75:12121-12127
- 27 Pancholi P, Liu Q, Tricoche N, Zhang P, Perkus ME, Prince AM. DNA prime-canarypox boost with polycistronic hepatitis C virus (HCV) genes generates potent immune responses to HCV structural and nonstructural proteins. *J Infect Dis* 2000;182:18-27
- 28 Dou J, Liu KZ, Chen Z, Wo EJ, Liu Y, He NX, Xu CH, Chen MH. Study on immune responses to recombinant protein in mice inoculated with pCD-HCV1 DNA recombinant. *Chin J Epidemiol* 1999;2:91-93
- 29 Dou J, Liu KZ, Chen Z, Wo JR, Liu Y, Xu CH, He NX, Zhang MT, Wang XZ. Preliminary inquiry into approach of HCV-DNA nucleic acid immunity. *Chin J Immunol* 1999;4:155-157
- 30 Dou J, Liu KZ, Chen Z, Wo JE, Liu Y, Xu CH, Chen MH, Jin JH. Experimental study of immunization of mice with hepatitis C virus genetic vaccine constructs. *Chin J Internal Medicine* 1999;6:390-392
- 31 Shan MM, Liu KZ, Chen Z. DNA Vaccination of the induction of immune responses by hepatitis C structural antigens. *Viral Sinica* 2000;15:14-21
- 32 Du DW, Zhou YX, Feng ZH, Jia ZS, Jiao CS, Wang QC, Li JG. Enhancing therapeutic effect of DNA vaccine against hepatitis C virus infection by interleukin-12. *Chin J Epidemiol* 2001;19:11-14
- 33 Feng ZH, Zhou YX, Wang QC, Du DW, Jiao CS, Li JG. Lipofectamine coated hepatitis C virus core gene vaccine promotes the efficacy of immune responses. *J Fourth Military Medical University* 2000;21:817-819
- 34 Deng T, Fan GR, Chen TB, Chen NL, Hu DR, Li L, Huang SL, Jia KP. Constructs and expression of hepatitis C virus core gene combined hepatitis B virus core gene with two multiple cloning sites vector. *Chin J Immunol* 2002;18:149-152
- 35 Deng T, Fan G, Chen T, Chen N, Hu D, Wang M, Jia K. Expression and immune response to hepatitis C virus core gene combined hepatitis B virus core gene with two multiple cloning sites vector. *Chin J Med* 2002;82:77-80
- 36 Liao GY, Zhang XW, Sun MB, Cheng JY, Yang HJ, Jiang D. Enhancement of immune response to HCV core gene by GM-CSF gene with bicistronic vector. *Immunol J* 2001;17:289-294
- 37 Li B, Yin PQ, Wang J, Dou J, Lin L, Wang LX, Shi ZY. DNA immunization of mice with a plasmid encoding hepatitis C virus structural proteins elicits significant cell-mediated immune responses. *Immunol J* 2001;17:323-327
- 38 Fan XG, Ou ZM, Hu GL. Effect of IL-12 on lymphoproliferative response in individuals with chronic hepatitis C virus infection. *Chin J Immunol* 2000;16:220-226
- 39 Zhang LY, Ren DM, Chen LS, Guo MQ, Huang JS, Shen XR, Zhang Q, Xie YM, Chen LY, Jia FX. Immunogenicity of a multiple epitope antigen gene of hepatitis C virus in mice and rabbits. *Chin J Cellular Molecular Immunol* 2001;17:52-54
- 40 Huang JS, Hu YQ, Xie YM, Xu C, Zhang MH, Zhang LY, Chen LY, Ren DM. Immunogenicity of a multi-epitopes antigen gene of hepatitis C virus carried by attenuated *Salmonella typhimurium* SL3261. *Chin J Epidemiol* 1999;4:234-237
- 41 Huang JS, Zhong XL, Bi HX, Dong WQ, Zhang Q, Xie YM, Yuan J, Li AK, Dong N, Ren DM. Expression of multi-epitopes antigen gene of hepatitis C virus and *Plasmodium falciparum* fused to glutathione S-transferase gene. *Chin J Immunol* 1999;6:250-253
- 42 He CQ, Yang F, Dai JJ, Hu F, Huang JS, Li QH. Immune responses in rhesus monkeys vaccinated with multi-epitope antigen of HCV and challenged by HCV virus. *Viral Sinica* 2002;17:30-33
- 43 Ying W, Xu ZK, Xue XP, Ma YY, Fu L, Lu X. Study on the immunization effect of the chimeric and the united genetic immunization including HBV and HCV. *Chin J Cellular Molecular Immunol* 2001;17:473-474
- 44 Song MK, Lee SW, Suh YS, Lee KJ, Sung YC. Enhancement of immunoglobulin G2a and cytotoxic T-lymphocyte responses by a booster immunization with recombinant hepatitis C virus E2 protein in E2 DNA-primed mice. *J Virol* 2000;74:2920-2925
- 45 Zucchelli S, Capone S, Fattori E, Folgori A, Di Marco A, Casimiro D, Simon AJ, Laufer R, La Monica N, Cortese R, Nicosia A. Enhancing B- and T-cell immune response to a hepatitis C virus E2 DNA vaccine by intramuscular electrical gene transfer. *J Virol* 2000;74:11598-11607
- 46 Vidalin O, Fournillier A, Renard N, Chen M, Depla E, Boucreux D, Brinster C, Baumert T, Nakano I, Fukuda Y, Liljestrom P, Trepo C, Inchausti G. Use of conventional or replicating nucleic acid-based vaccines and recombinant Semliki forest virus-derived particles for the induction of immune responses against hepatitis C virus core and E2 antigens. *Virology* 2000;276:259-270
- 47 Lee AY, Polakos NK, Otten GR, Ulmer JB, Houghton M, Paliard X. Quantification of the number of cytotoxic T cells specific for an immunodominant HCV-specific CTL epitope primed by DNA immunization. *Vaccine* 2000;18:1962-1968
- 48 Gordon EJ, Bhat R, Liu Q, Wang YF, Tackney C, Prince AM. Immune responses to hepatitis C virus structural and nonstructural proteins induced by plasmid DNA immunizations. *J Infect Dis* 2000;181:42-50

病毒性肝炎基因治疗的研究和面临的挑战

贾战生,冯志华,周永兴

贾战生,冯志华,周永兴,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
全军医药卫生基金资助项目, No.98D041
国家自然科学基金资助项目, No.39570652
项目负责人:贾战生 710038,陕西省西安市灞桥区新寺路 1 号,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.
电话:029-3377752
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-06

摘要

病毒性肝炎是目前严重危害人类健康的最常见的世界性感染性疾病之一,迄今仍无有效的抗病毒药物.抗病毒基因疗法作为一种新的治疗手段,可望从病因上解决病毒性肝炎的治疗问题.本文结合我们自己的研究综述抗肝炎病毒基因疗法的研究现状和面临的挑战,重点介绍抗肝炎病毒核酶和DNA免疫的研究.

贾战生,冯志华,周永兴.病毒性肝炎基因治疗的研究和面临的挑战.世界华人消化杂志 2003;11(6):810-814

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/810.asp>

0 引言

病毒性肝炎是目前严重危害人类健康的最常见的世界性感染病.乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)感染容易慢性化,并与肝硬化和肝细胞癌(HCC)的发生密切相关,严重威胁人类身心健康^[1-10].由于HBV和HCV基因变异和机体对病毒的免疫耐受,导致干扰素和抗病毒核苷类药物的治疗效果也不令人满意^[11-14].因此,寻求新型抗肝炎病毒药物成为迫切需要.

基因治疗技术的发展,为抗肝炎病毒治疗研究提供了新的机遇^[15-17].随着分子生物学技术的发展和人类基因组计划的完成,基因疗法也从过去的治疗遗传性疾病发展到医学的许多领域,如慢性病毒感染^[18-21]、心血管系统疾病^[20,21]、肿瘤^[22-26]、自身免疫性疾病^[27-29]、代谢性疾病^[30,31]等,并取得了突出的进展.基因治疗的定义和内容也随之扩大,即通过转导目的基因达到治疗疾病的目的均属基因治疗范畴.抗病毒性肝炎基因治疗是基因疗法的一个重要分支,尤其在严重威胁人类健康的HIV、HBV和HCV的研究方面取得了很大进展.目前,用于抗肝炎病毒基因治疗的主要策略包括:反义技术、核酶(ribozymes)^[32,33]、基因免疫^[34-38]、干扰肽或蛋白质^[39]、优势负突变物(dominant negative mutants)、单链抗体等.本文结合我们的研究回顾10 a来国内外抗肝炎病毒基因治疗的研究现状和面临的挑战,重点介绍核酶和基因免疫的研究.

1 核酶(ribozyme, Rz)

核酶是生物体内一种具有催化功能的小RNA分子,普遍存在于自然界^[40].通过对核酶进行人工设计和改造,人们可以获得自然界罕见的、定向的RNA内切酶,用于生物学研究^[41-45].由于核酶具有特异结合靶RNA分子,可以干扰或阻断靶基因的复制和表达,并且结构简单,可人工设计合成,因此是当前抗肿瘤和抗病毒基因治疗的重要手段之一,尤其用于慢性持续性病毒感染的基因治疗.1991年Saver at al 首先将核酶用于抗人免疫缺陷病毒(HIV)的研究.目前抗HIV核酶已进入临床前期研究, Li at al 选用人造血干细胞,来源于胎盘或脐带的CD34+细胞,他们以10名新生儿中取来CD34+细胞,用SCF因子, IL-3、IL-6刺激细胞生长,用MJT载体表达发夹状核酶,结果表明对正常细胞, HIV暴露组, HIV感染组之间生长无明显差异,细胞培养可达4 wk以上,用不同的方法都观察到核酶转染细胞可明显抑制HIV的复制.他们认为通过转染抗HIV核酶CD34+干细胞,可有效阻止HIV的感染.美国和澳大利亚已将抗人免疫缺陷病毒核酶用于I期和II期临床验证,取得了令人满意的效果.1992年, von-Weizasacher at al 率先开展了抗HBV核酶的研究工作.他们选择设计了3个锤头结构核酶,在体外转录HBV和核酶RNA分子,在特定条件下温育,通过丙烯酰胺凝胶电泳和放射性自显影技术显示核酶对靶基因的切割作用,并计算其切割率.作者还证明了多位点核酶联合可提高切割效率,并可用来对抗病毒的变异.随后,世界各地的许多学者先后对HBV和HCV核酶进行了广泛而深入的研究.2000年Zhuang at al^[44]报道,用双位点核酶的真核表达载体,在细胞中表达针对HBV的X基因的核酶,结果表明不但使HBV X蛋白大为下降,而且使S抗原亦有下降. Macejak at al^[46]设计了15个锤头状核酶,针对HCV的5' TR区域,在以荧光素酶为报道基因的细胞研究系统中,这15个核酶都有抑制活性,从40-80%不等,个别的可达90%以上,提示这是一个潜在的治疗HCV感染的方法.

体外研究结果表明,理想的靶序列和切割位点选择是核酶研究的关键,计算机设计和核酶文库是当前选择设计抗病毒核酶的有效方法,锤头结构和发夹结构核酶由于分子较小,容易通过多种途径获得,故成为目前最多选用的两种核酶类型.我们应用上海生物化学研究所陈安农编制的核酶设计软件,成功地设计了抗HBV C区基因mRNA的三位点核酶,并设计了针对

HCV 5 非编码区(213 和 260 位点)和 C 区(407 和 498 位点)的锤头结构核酶^[46]. Lieber at al 报道, 从核酶文库中筛选的出 6 个针对 HCV RNA 保守序列的锤头结构核酶, 用重组腺病毒载体, 在稳定表达 HCV 基因产物 CHO 细胞和感染 HCV 的患者分离的肝细胞证明, 单个核酶或联合核酶均能降低 HCV RNA 水平. Putlitz at al 学者用重组筛选方法从一个发夹型核酶库中(5×10^5)确定能有效地在转基因人肝癌细胞(HHC)中切割 HBV 前基因组 RNA 的 4 个发夹型核酶. 通过实验发现 HBV RNA 上有 40 个部位可以和核酶结合, 从中选出 17 个在 HBV 所有亚型中都存在的序列, 设计了 4 个发夹形核酶, 与靶基因共转染于 HHC 细胞系. 结果表明:核酶对 HBV 的抑制率分别为 80 %, 69 %, 66 % 和 49 %.

我们于 1996 年开始了抗 HBV 核酶的研究工作^[47]. 首先利用计算机辅助设计了三个针对 HBV C 基因 mRNA 的锤头结构核酶, 在其 5'- 和 3'- 端带有自剪切核酶. 结果表明:该核酶在细胞外能特异切割靶 RNA 分子, 串联或联合核酶切割效率明显高于单个核酶; 在转染 HBV 基因的人肝癌细胞系(2.2.15), 通过脂质体介导的基因转染方法证明, 该核酶可有效抑制 HBeAg 的表达, 其抑制率为 55-66 %. 我们又选择了 HCV 5 非编码区和 C 区, 设计了 4 个锤头结构核酶, 应用基因重组方法构建了带自剪切的核酶真核表达载体(pcDNA3), 与靶基因(pCMVNCRIuc)共转染于人肝癌细胞(HHCC), 以 luc 为报告基因证明, 抗 HCV 5 非编码区核酶可有效抑制病毒的复制, 其抑制率在 40-70 % 之间^[48,49]. 最近, 我们又将抗 HCV 5 非编码区核酶与抗 C 区核酶联合转染, 结果表明联合核酶的抑制活性较单个核酶显著增高. 国内许多学者近年也探讨了不同结构核酶对 HBV 和 HCV 的抗病毒研究. 同济医科大学最近报道设计了带有自剪切的发夹结构核酶, 在体外证明可特异切割 HBV 核心基因^[50]. 第一军医大学也报道设计并构建了 HBV 特异性核酶, 并在体外证明其切割活性^[51]. 上海生化所最近报道他们设计的抗 HBV 锤头结构核酶与靶基因共转染 HepG2 细胞, 发现可有效地抑制 HBV 基因的表达, 其抑制效率与释放的核酶量有关^[52,53]. 由于缺乏肝炎病毒感染的小动物模型, 黑猩猩代价昂贵, 国内抗肝炎病毒核酶的研究患处在细胞水平, 尚未见到动物实验研究报告.

核酶同其他基因治疗技术都受到两个基本技术的限制, 即将目的基因有效地导入靶细胞, 目的基因的表达达到治疗水平^[54]. 抗肝炎病毒核酶导入体内的方法有 2 种策略^[28]: (1)从宿主分离肝细胞, 在体外将核酶基因导入肝细胞, 再将带有核酶的基因移植到宿主肝脏, 这也是当前基因治疗研究的一种有效方法, 随着人骨髓造血干细胞在体外的培养成功可大大促进干细胞基因治疗的发展; (2)直接将核酶真核表达载体通过某种途径到入体内, 该技术简单, 但受到体内分布, 靶细胞内定位等条件的影响. 最近 Lee at al ^[55]观察了抗 HCV 5 非编

码区 195 位点的一个核酸抗性核酶在 C57Bl/6 小鼠体内的分布和药代动力学. ³²P 标记的核酶通过皮下或静脉给药, 计量为 10 mg/kg 或 30 mg/kg, 其肝脏的高峰浓度比体外细胞抑制浓度的值高. 该核酶在皮下的吸收达 89 %, 其半衰期为 23 min. 为了确定核酶在靶组织的细胞内定位, 作者应用四甲基罗丹明标记核酶注射小鼠, 15 min-48 h 可在肝组织发现核酶荧光, 静脉途径可达 72 h, 当 15-30 min 时在肝细胞胞核和胞质内均发现绿色荧光. 结果说明该核酶主要由肝细胞摄取, 具有靶细胞“倾向性”.

提高核酶对靶基因的抑制效率一直是研究者们追求的目标. 最近 Macejak at al ^[56]报道, 在体外 IFN- α 可增强核酶的抗病毒抑制作用. 作者以 HCV- 脊髓灰质炎病毒嵌合体为靶, 设计了针对 HCV 5' 非编码区核酶, 在 HeLa 细胞证明抗 HCV 核酶、IFN- α 均可有效地抑制病毒的复制, 当联合核酶时 IFN- α 的浓度可减少 5-12.5 倍, 当加入适量的 IFN- α , 核酶的浓度也可减少 3 倍. 结果表明低剂量的 IFN- α 增强核酶的抗病毒作用, 其抑制率达 98 %, 说明 IFN- α 联合抗病毒核酶可能提高治疗效果. 虽然近年来, 有许多核酶药业公司也开始了核酶抗肝炎病毒的研究, 美国 Welch at al 和 Wu at al ^[57]的实验室进行了核酶对 HBV 和 HCV 基因治疗的研究, 并拟用于 I 期和 II 期临床试验. 然而, 已报道的研究结果缺乏动物体内的研究, 尚未见人体的研究报道. 核酶在细胞水平对病毒基因表达的抑制作用还不理想, 对机体的毒理作用研究还不够, 需要进一步加强核酶抗肝炎病毒基因治疗的基础和临床研究.

2 基因免疫(gene immunization)

基因免疫又称 DNA 免疫, 由于这种外源基因具有疫苗功能, 又称为 DNA 疫苗, 他是疫苗研究史上的一次革命, 故称之为第三代疫苗^[58]. 由于基因免疫具有预防和治疗病原感染的作用, 又是通过转基因手段实现, 因此, 被认为是一种新的基因治疗策略. 基因免疫与其他基因治疗策略不同, 他通过诱导机体免疫应答实现治疗目的, 并产生持久的免疫力, 而且制备过程简单, 实施治疗容易, 受到广泛重视. 1996-02 在美国联合召开了基因疫苗质量控制与标准化研讨会, 会议制定了基因疫苗临床实验指南. 目前美国食品与药品管理局(FDA)已批准几项有关 HIV、HBV、人乳头瘤病毒(PHV)、疟原虫、流感病毒、结核杆菌等 DNA 疫苗进行临床研究, 其中疟疾 DNA 疫苗在 I 期或 II 期临床研究中均取得满意的保护效果, 已进入 III 期临床, 极有希望获得批准. 1993 年, Davis at al 首先开始了抗 HBV DNA 疫苗的研究. 迄今, 国内外学者先后研究了 HBV 和 HCV 不同基因片段免疫应答效果, 并证明在小鼠体内, 可诱导特异性抗体产生和特异性细胞毒 T(CTL)细胞反应. 我们也研究了 HBV S 片段的免疫应答作用, 并观察了 IL-12 及免疫共刺激序列(CpG)对 DNA 免疫的增强作

用^[59-61].最近 Oka et al^[58] 研究报道,将 HBV S 大蛋白及中蛋白真核表达载体注射转基因小鼠,结果 28/30 只小鼠 HBsAg 清除,而对照组 6/29 只有效.其他研究亦证明,CpG、IL-2 和 IL-12^[62] 均能增强 HBV DNA 免疫效诱导细胞和体液免疫应答.应用 HBV 转基因小鼠,注射 pCMVS2S 可完全清除血浆中的 HBsAg,并能长时间抑制肝细胞表达 HBsAg^[62].他们又将 pCMVS2S 注射黑猩猩,也证明可保护其免受 HBV 感染量的攻击,结果提示应用 HBV 基因免疫可以预防和治疗 HBV 感染,为 HBV DNA 疫苗临床研究奠定重要的实验基础^[62].

HCV 病毒编码被膜蛋白(E)的基因容易发生变异,机体缺乏保护性抗体产生,传统疫苗的研究又遇到一定困难.因此,抗 HCV 基因免疫的研究更具有迫切性和实际意义. Arichi et al^[63] 比较了 6 种 HCV 不同基因区 DNA 疫苗诱导免疫应答的作用,结果表明 6 种重组质粒均能在小鼠体内刺激特异性抗体应答,而 CTL 应答仅在含 C 基因的质粒组中产生.我们选择了 HCV C 或与结合 E1E2 区,构建了真核表达载体,并联合 IL-2 或 IL-12 质粒载体共同免疫小鼠^[64],结果表明 HCV 结构区基因与 pIL-2 联合免疫, HCV 特异性抗体水平升高,而对 CTL 的杀伤作用增强不明显,与 IL-12 质粒共免疫,诱导的抗体反应和 CTL 活性均明显增强,尤以细胞免疫为著,提示 pIL-12 可增加 HCV 特异性细胞免疫反应.我们又应用转染 HCV C 蛋白的 SP2/0 细胞接种小鼠形成 HCV 移植瘤为感染动物模型,观察该质粒免疫对肿瘤形成的影响,发现应用 HCV C 基因免疫可显著抑制发瘤时间、延长存活时间,联合 pIL-12 质粒,可显著增加 HCV DNA 免疫诱导特异 CTL 反应其活性.对 DNA 疫苗诱导免疫应答的机制,以及提高免疫应答效果许多学者进行了多方面的研究^[65-69].大多数学者认为骨骼肌是最有效的摄取外源基因表达蛋白抗原的组织.肌肉组织具有安全、体积大、免疫接种容量大的优点,因此多被用来进行 DNA 免疫注射.肌纤维对外源质粒摄取的具体机制目前还不清楚.可能因骨骼肌具有丰富的 T 小管系统和肌浆网结构使骨骼肌肌纤维直接摄取外源 DNA.有作者用编码虫荧光素酶的质粒 DNA 免疫小鼠后发现,表达的酶活性呈 DNA 剂量依赖关系,而且报道基因可持续表达 19 mo 之久.提示 DNA 肌肉注射免疫可产生持久的免疫应答.此外,肌细胞合成分泌的外源抗原与产生的特异性抗体可以形成抗原-抗体复合物,并沉积于树突状细胞表面,可长效释放 Ag,诱导产生记忆性 T、B 细胞^[70,71].

使编码抗原的基因最佳表达,并诱导机体产生有效地的免疫应答是实现基因免疫抗病毒治疗的关键.因此,国内外学者从多方面探讨增强基因免疫的应答效果,目前的研究策略集中在优化载体、使用肌肉再生剂、与细胞因子共表达、使用免疫刺激序列(CpG)^[68]、应用修饰的树突状细胞(DC)、注射共刺激信号分子及

免疫佐剂等.不同作者均取得了积极的研究结果,为设计新型临床应用 DNA 疫苗提供了理论依据.目前,印度学者已经用 HBV DNA 疫苗注射成人,研究疫苗的安全性及免疫原性^[69].为了使 DNA 疫苗制品的申报有章可循, FDA 在网上公布了《预防感染病的质粒 DNA 疫苗制备要点》(points to consider on plasmid DNA vaccines for preventive infectious disease indications).该要点还对 DNA 疫苗的修饰、佐剂、和免疫器械的使用等做了规定.其主要内容包括:DNA 疫苗制备要点简介, FDA 生物制品评价及研究中心对 DNA 疫苗制品的基本要求和管理办法,申报新药应提供材料的基本要求和管理办法,有效性和安全性评价等.此外,对 DNA 疫苗研制中的靶基因和载体选择、载体的构建和体外转染、动物模型、免疫途径和方法、攻击及保护力的鉴定等相关指标做了规定.在我国官方尚未提出具体规定之前,该要点可为国内 DNA 疫苗研究提供借鉴.若欲了解详细内容,可访问下列网站:<http://www.fda.gov/cber>, <http://www.dnavaccine.com>, <http://www.genweb.com>.

3 挑战和策略

病毒性肝炎基因治疗的研究伴随分子生物技术的发展已走过 10 a 的历程,在基础和临床前研究均已取得了很大进展,显示出某些令人兴奋的前景.但多数研究步入临床过程艰难,在一些发达国家的研究热潮开始趋于缓慢.2000 年,美国《Science》周刊发表法国学者 Cavazzana et al^[72] 的文章,应用转基因方法成功治疗 2 例患严重联合免疫缺陷综合征(severe combined immunodeficiency, SCID)的患儿,使基因疗法重又唤起生机.美国基因治疗研究专家 Anderson et al^[73] 说:当前基因疗法正处于最坏的时刻,也是最好的时刻.结合我们的研究和目前这一领域的进展,还需要在以下几方面进一步加强研究.(1)实现目的基因的高效表达和有控表达:目的基因在细胞内有效抑制是实现抗病毒基因治疗的关键,应从载体和启动子的优化、转送基因方法的改进、与靶基因的共域化(colocation)和有效调控表达、造血干细胞作为基因载体的潜能^[54] 等方面进行深入研究.(2)抗原表位的优化组合:选择 HBV 和 HCV 基因的有效抗原表位,组成 T 细胞、B 细胞表位抗原和辅助性 T 细胞表位复合抗原,产生新的复合表位多肽疫苗,或构建复合表位基因载体,制备 DNA 疫苗,以提高免疫效果^[74].最近,有作者提出建立表达库免疫的思路,可实现选择最有效免疫原部位的优化组合^[75,76].并可用 Th1 和 Th2 细胞因子基因共免疫以改变基因疫苗诱导的免疫反应类型.(3)加强其他基因治疗方法学探讨如细胞内干扰肽或蛋白质,优势负突变物、单链抗体细胞内免疫、IRES 特异性抑制性 RNA 等.探讨 RNA 修复技术在肝炎病毒基因治疗中的应用^[77],研究树突状细胞体外基因修饰对 DNA 免疫的增强作用^[70-80].(4)加强动物实验研究 缺乏人嗜肝病毒感染的小动物模型限制了抗肝炎

病毒药物的发展. HBV和HCV转基因小鼠基因治疗性研究可为临床研究提供依据, 在条件许可下可应用当前唯一对HBV和HCV易感动物 - 黑猩猩作为研究对象进行研究^[81]. 同时应与抗原蛋白联合应用、建立嵌合型或多重抗原DNA疫苗, 以提高基因免疫的保护范围和免疫效果等. (5) 进行人体试验研究在缺乏感染动物模型条件下, 选择志愿者进行临床研究很有必要, 但必须保证其安全性并获得法律上的许可^[82].

基因疗法也同其他医学领域的新技术和方法一样, 如抗生素的产生、单克隆抗体技术、器官移植等, 需要多年时间发展, 不断走向成熟, 从早期的期望, 经过一定的挫折和失败, 最后走向成功^[73]. 要使基因疗法真正用于人类疾病的防治, 仍有一段很长的路要走, 但我们深信, 随着上述研究的不断深入, 必将给人类疾病, 尤其是难治性的慢性疾病如肿瘤、HIV、HBV和HCV感染等, 带来新的治疗契机^[83,84].

4 参考文献

- Pybus OG, Charleston MA, Gupta S, Rambaut A, Holmes EC, Harvey PH. The epidemic behavior of the hepatitis C virus. *Science* 200;292:2323-2325
- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:51-68
- Ding X, Mizokami M, Yao G, Xu B, Orito E, Ueda R, Nakanishi M. Hepatitis B virus genotype distribution among chronic hepatitis B virus carriers in Shanghai, China. *Intervirology* 2001;44:43-47
- Jieantet D, Chemin I, Mandrand B, Zoulim F, Trepo C, Kay A. Characterization of two hepatitis B virus populations isolated from a hepatitis B surface antigen-negative patient. *Hepatology* 2002;35:1215-1224
- Kenny-Walsh E. The natural history of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001;5:969-977
- Rosenberg S. Recent advances in the molecular biology of hepatitis C virus. *J Mol Biol* 2001;313:451-464
- Drazan KE. Molecular biology of hepatitis C infection. *Liver Transpl* 2000;6:396-406
- Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, Shintani Y, Kyoji M. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis. *Oncology* 2002;62 (Suppl):29-37
- Koike K, Moriya K, Kimura S. Role of hepatitis C virus in the development of hepatocellular carcinoma: Transgenic approach to viral hepatocarcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:394-400
- Yao F, Terrault N. Hepatitis C and hepatocellular carcinoma. *Curr Treat Options Oncol* 2001;2:473-483
- Santantonio T, Anna Niro G, Sinisi E, Leandro G, Insalata M, Guastadisegni A, Pastore G. Lamivudine/interferon combination therapy in anti-HBe positive chronic hepatitis B patients: a controlled pilot study. *J Hepatol* 2002;36:799-804
- Wolters LM, Hansen BE, Niesters HG, Zeuzem S, Schalm SW, De Man RA. Viral dynamics in chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy. *Liver* 2002;22:121-126
- De Ledinghen V, Trimoulet P, Winnock M, Bernard PH, Bourliere M, Portal I, Remy AJ, Szostak N, Levy S, Tran A, Abergel A, Chene G, Fleury H, Couzigou P. Daily or three times per week interferon alpha-2b in combination with ribavirin or interferon alone for the treatment of patients with chronic hepatitis C not responding to previous interferon alone. *J Hepatol* 2002;36:819-826
- Chiou HC, Lucas MA, Coffin CC, Banaszczyk MG, Ill CR, Lollo CP. Gene therapy strategies for the treatment of chronic viral hepatitis. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1:629-639
- Cornberg M, Wedemeyer H, Manns MP. Hepatitis C: therapeutic perspectives. *Forum* 2001;11:154-162
- Lott WB, Takyar SS, Tuppen J, Crawford DH, Harrison M, Sloots TP, Gowans EJ. Vitamin B12 and hepatitis C: molecular biology and human pathology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4916-4921
- Rodriguez F, Harkins S, Slifka MK, Whitton JL. Immunodominance in virus-induced CD8(+) T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *J Virol* 2002;76:4251-4259
- Schmitz V, Qian C, Ruiz J, Sangro B, Melero I, Mazzolini G, Narvaiza I, Prieto J. Gene therapy for liver diseases: recent strategies for treatment of viral hepatitis and liver malignancies. *Gut* 2002;50:130-135
- Hirschi KK, Goodell MA. Hematopoietic, vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells. *Gene Ther* 2002;9:648-652
- Askari AT, Penn MS. Targeted gene therapy for the treatment of cardiac dysfunction. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2002;14:167-177
- Park KI, Ourednik J, Ourednik V, Taylor RM, Aboody KS, Auguste KI, Lachyankar MB, Redmond DE, Snyder EY. Global gene and cell replacement strategies via stem cells. *Gene Ther* 2002;9:613-624
- Havlik R, Jiao LR, Nicholls J, Jensen SL, Habib NA. Gene therapy for liver metastases. *Semin Oncol* 2002;29:202-208
- Kaneda Y. Gene therapy: a battle against biological barriers. *Curr Mol Med* 2001;1:493-499
- Ruiz J, Mazzolini G, Sangro B, Qian C, Prieto J. Gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 2001;19:324-332
- Sly WS, Vogler C. Brain-directed gene therapy for lysosomal storage disease: going well beyond the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:5760-5762
- Lee JH, Ku JL, Park YJ, Lee KU, Kim WH, Park JG. Establishment and characterization of four human hepatocellular carcinoma cell lines containing hepatitis B virus DNA. *World J Gastroenterol* 1999;5:289-295
- Melo ME, Qian J, El-Amine M, Agarwal RK, Soukhareva N, Kang Y, Scott DW. Gene transfer of Ig-fusion proteins into B cells prevents and treats autoimmune diseases. *J Immunol* 2002;168:4788-4795
- Ni YH. In vivo hepatic gene therapy. *Acta Paediatr Taiwan* 2001;42:191-200
- Yang Z, Chen M, Wu R, Fialkow LB, Bromberg JS, McDuffie M, Naji A, Nadler JL. Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer. *J Immunol* 2002;168:6479-6485
- Yamaoka T. Gene therapy for diabetes mellitus. *Curr Mol Med* 2001;1:325-337
- Qin XY, Shen KT, Zhang X, Cheng ZH, Xu XR, Han ZG. Establishment of an artificial beta-cell line expressing insulin under the control of doxycycline. *World J Gastroenterol* 2002;8:367-370
- Feng Y, Kong Y, Wang Y, Qi G. Antiviral activity of a hammerhead ribozyme against HBV in HepG2.2.15 cells. *Shengwu Xue Yue Shengwu Xue Bao* 2002;34:204-208
- Kruger M, Beger C, Welch PJ, Barber JR, Wong-Staal F. C-SPACE (cleavage-specific amplification of cDNA ends): a novel method of ribozyme-mediated gene identification. *Nucleic Acids Res* 2001;29:94
- Heijtkink RA, van Bergen P, van Roosmalen MH, Sunnen CM, Paulij WP, Schalm SW, Osterhaus AD. Anti-HBs after hepatitis B immunization with plasma-derived and recombinant DNA-derived vaccines: binding to mutant HBsAg. *Vaccine* 2001;19:3671-3680
- Amara RR, Villinger F, Altman JD, Lydy SL, O'Neil SP, Staprans SI, Montefiori DC, Xu Y, Herndon JG, Wyatt LS, Candido MA, Kozyl NL, Earl PL, Smith JM, HLA, Grimm BD, Hulsey ML, Miller J, McClure HM, McNicholl JM, Moss B, Robinson HL. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 2001;292:69-74
- Jin J, Yang JY, Liu J, Kong YY, Wang Y, Li GD. DNA immunization with fusion genes encoding different regions of hepatitis C virus E2 fused to the gene for hepatitis B surface antigen elicits immune responses to both HCV and HBV. *World J Gastroenterol* 2002;8:505-510
- Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* 2000;18:927-974
- Cochlovius B, Stassar MJ, Schreurs MW, Benner A, Adema GJ.

- Oral DNA vaccination: antigen uptake and presentation by dendritic cells elicits protective immunity. *Immunol Lett* 2002;80:89-96
- 39 Lazdina U, Hultgren C, Frelin L, Chen M, Lodin K, Weiland O, Leroux-Roels G, Quiroga JA, Peterson DL, Milich DR, Sallberg M. Humoral and CD4(+) T helper (Th) cell responses to the hepatitis C virus non-structural 3 (NS3) protein: NS3 primes Th1-like responses more effectively as a DNA-based immunogen than as a recombinant protein. *J Gen Virol* 2001;82(Pt6):1299-1308
 - 40 Yamamoto M, Hayashi N, Takehara T, Ueda K, Mita E, Tatsumi T, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Intracellular single-chain antibody against hepatitis B virus core protein inhibits the replication of hepatitis B virus in cultured cells. *Hepatology* 1999;30:300-307
 - 41 Wilson WD, Li K. Targeting RNA with small molecules. *Curr Med Chem* 2000;7:73-98
 - 42 Fedor MJ. The role of metal ions in RNA catalysis. *Curr Opin Struct Biol* 2002;12:289-295
 - 43 Wang DY, Lai BH, Sen D. A general strategy for effector-mediated control of RNA-cleaving ribozymes and DNA enzymes. *J Mol Biol* 2002;318:33-43
 - 44 Zhuang X, Kim H, Pereira MJ, Babcock HP, Walter NG, Chu S. Correlating structural dynamics and function in single ribozyme molecules. *Science* 2002;296:1473-1476
 - 45 Weinberg M, Passman M, Kew M, Arbutnot P. Hammerhead ribozyme-mediated inhibition of hepatitis B virus X gene expression in cultured cells. *J Hepatol* 2000;33:142-151
 - 46 Macejak DG, Jensen KL, Jamison SF, Domenico K, Roberts EC, Chaudhary N, von Carlowitz I, Bellon L, Tong MJ, Conrad A, Pavco PA, Blatt LM. Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. *Hepatology* 2000;31:769-776
 - 47 贾战生,周永兴,连建奇,冯志华,李光玉,张文彬. 抗丙型肝炎病毒锤头结构核酶的计算机设计. 世界华人消化杂志 1999;7:300-302
 - 48 李谨革,周永兴,连建奇,贾战生,冯志华. 核酶对乙型肝炎病毒细胞内抑制作用. 中华内科杂志 2000;39:27-31
 - 49 贾战生,周永兴,连建奇,冯志华. 锤头结构核酶在肝癌细胞内对丙型肝炎病毒基因表达的抑制作用. 中华医学杂志 1999;79:631-632
 - 50 贾战生,周永兴,连建奇,冯志华. 抗 HCV 5' 非编码区核酶对病毒基因表达翻译启动的抑制作用. 中华传染病杂志 2000;18:10-12
 - 51 Song YH, Lin JS, Liu NZ, Kong XJ, Xie N, Wang NX, Jin YX, Liang KH. Anti-HBV hairpin ribozyme-mediated cleavage of target RNA in vitro. *World J Gastroenterol* 2002;8:91-94
 - 52 Wen SJ, Xiang KJ, Huang ZH, Zhou R, Qi XZ. Construction of HBV-specific ribozyme and its recombinant with HDV and their cleavage activity in vitro. *World J Gastroenterol* 2000;6:377-380
 - 53 Feng Y, Kong YY, Wang Y, Qi GR. Inhibition of hepatitis B virus by hammerhead ribozyme targeted to the poly(A) signal sequence in cultured cells. *Biol Chem* 2001;382:655-660
 - 54 Van Tendeloo VF, Van Broeckhoven C, Berneman ZN. Gene therapy: principles and applications to hematopoietic cells. *Leukemia* 2001;15:523-544
 - 55 Lee PA, Blatt LM, Blanchard KS, Bouhana KS, Pavco PA, Bellon L, Sandberg JA. Pharmacokinetics and tissue distribution of a ribozyme directed against hepatitis C virus RNA following subcutaneous or intravenous administration in mice. *Hepatology* 2000;32:640-646
 - 56 Macejak DG, Jensen KL, Pavco PA, Phipps KM, Heinz BA, Colacino JM, Blatt LM. Enhanced antiviral effect in cell culture of type 1 interferon and ribozymes targeting HCV RNA. *J Viral Hepat* 2001;8:400-405
 - 57 Wu CH, Shen L, Wu GY. Gene therapy applications in gastroenterology and hepatology. *Can J Gastroenterol* 2000;14:57-61
 - 58 Oka Y, Fazle Akbar SM, Horiike N, Joko K, Onji M. Mechanism and therapeutic potential of DNA-based immunization against the envelope proteins of hepatitis B virus in normal and transgenic mice. *Immunology* 2001;103:90-97
 - 59 李文波,姚志强,周永兴,冯志华. HBV 基因疫苗联合抗原蛋白免疫小鼠的研究. 世界华人消化杂志 1999;7:188-190
 - 60 杜德伟,周永兴,冯志华,李光玉,姚志强. IL-12 及 HBV 基因疫苗共同免疫小鼠的效果. 世界华人消化杂志 2000;8:128-130
 - 61 杜德伟,周永兴,冯志华,李光玉,姚志强. 基因疫苗诱导小鼠抗 HBV 皮下移植瘤免疫研究. 世界华人消化杂志 1999;7:955-957
 - 62 Gherardi MM, Ramirez JC, Esteban M. Towards a new generation of vaccines: the cytokine IL-12 as an adjuvant to enhance cellular immune responses to pathogens during prime-booster vaccination regimens. *Histol Histopathol* 2001;16:655-667
 - 63 Arichi T, Saito T, Major ME, Belyakov IM, Shirai M, Engelhard VH, Feinstone SM, Berzofsky JA. Prophylactic DNA vaccine for hepatitis C virus (HCV) infection: HCV-specific cytotoxic T lymphocyte induction and protection from HCV-recombinant vaccinia infection in an HLA-A2.1 transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:297-302
 - 64 冯志华,周永兴,贾战生,李谨革,连建奇. 丙型肝炎病毒核心基因免疫诱导细胞免疫应答研究. 中华内科杂志 1999;38:462-464
 - 65 Kwon TK, Park JW. Intramuscular co-injection of naked DNA encoding HBV core antigen and Flt3 ligand suppresses anti-HBc antibody response. *Immunol Lett* 2002;81:229-234
 - 66 Ou-Yang P, Hwang LH, Tao MH, Chiang BL, Chen DS. Co-delivery of GM-CSF gene enhances the immune responses of hepatitis C viral core protein-expressing DNA vaccine: role of dendritic cells. *J Med Virol* 2002;66:320-328
 - 67 Brinster C, Muguet S, Lone YC, Boucreux D, Renard N, Fournillier A, Lemonnier F, Inchauspe G. Different hepatitis C virus nonstructural protein 3 (Ns3)-DNA-expressing vaccines induce in HLA-A2.1 transgenic mice stable cytotoxic T lymphocytes that target one major epitope. *Hepatology* 2001;34:1206-1217
 - 68 Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-760
 - 69 Bapat S, Joshi D, Naik SS, Bavdekar A, Bhav S, Pandit A. Hepatitis B immunization in adolescent girls. *Indian Pediatr* 2001;38:1160-1162
 - 70 Cho JH, Youn JW, Sung YC. Cross-priming as a predominant mechanism for inducing CD8(+) T cell responses in gene gun DNA immunization. *J Immunol* 2001;167:5549-5557
 - 71 Mumper RJ, Ledebur HC Jr. Dendritic cell delivery of plasmid DNA. Applications for controlled genetic immunization. *Mol Biotechnol* 2001;19:79-95
 - 72 Cavazzana-Calvo M, Hachez-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbäum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 2000;288:669-672
 - 73 Anderson WF. Gene therapy: the best of times, the worst of times. *Science* 2000;288:627-629
 - 74 Yang W, Jackson DC, Zeng Q, McManus DP. Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. *Vaccine* 2000;19:103-113
 - 75 Singh RA, Wu L, Barry MA. Generation of genome-wide CD8 T cell responses in HLA-A*0201 transgenic mice by an HIV-1 ubiquitin expression library immunization vaccine. *J Immunol* 2002;168:379-391
 - 76 Moore RJ, Lenghaus C, Sheedy SA, Doran TJ. Improved vectors for expression library immunization- application to Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs. *Vaccine* 2001;20:115-120
 - 77 Watanabe T, Sullenger BA. RNA repair: a novel approach to gene therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;44:109-118
 - 78 Steinman RM, Pope M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J Clin Invest* 2002;109:1519-1526
 - 79 Smith SG, Patel PM, Porte J, Selby PJ, Jackson AM. Human dendritic cells genetically engineered to express a melanoma polyepitope DNA vaccine induce multiple cytotoxic T-cell responses. *Clin Cancer Res* 2001;7:4253-4261
 - 80 Coombes BK, Mahony JB. Dendritic cell discoveries provide new insight into the cellular immunobiology of DNA vaccines. *Immunol Lett* 2001;78:103-111
 - 81 Pancholi P, Lee DH, Liu Q, Tackney C, Taylor P, Perkus M, Andrus L, Brotman B, Prince AM. DNA prime/canarypox boost-based immunotherapy of chronic hepatitis B virus infection in a chimpanzee. *Hepatology* 2001;33:448-454
 - 82 Dahmen A, Herzog-Hauff S, Bocher WO, Galle PR, Lohr HF. Clinical and immunological efficacy of intradermal vaccine plus lamivudine with or without interleukin-2 in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2002;66:452-460
 - 83 Zheng B, Woo PC, Ng M, Tsoi H, Wong L, Yuen K. A crucial role of macrophages in the immune responses to oral DNA vaccination against hepatitis B virus in a murine model. *Vaccine* 2001;20:140-147
 - 84 Shetty K, Wu GY, Wu CH. Gene therapy of hepatic diseases: prospects for the new millennium. *Gut* 2000;46:136-139

抗 HCV 树突状细胞疫苗的制备及功能研究

王全楚,冯志华,周永兴

王全楚,冯志华,周永兴,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
国家自然科学基金资助课题, No.30170822
项目负责人:冯志华,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, fengzhihua@hotmail.com
电话:029-3377595
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-19

摘要

树突状细胞(dendritic cell, DC)是目前发现的功能最强的专职抗原递呈细胞,在免疫反应中起着举足轻重的作用,因此备受重视. 1990 年以来,人们在体外诱导扩增 DC 成功之后,克服了以往由于 DC 在组织中含量很少、难以获取的困难,使 DC 研究取得了许多突破性的进展,为人们探索新的疾病防治手段开辟了新的天地. 以下从树突状细胞的特性、体外诱生及以 DC 为基础的治疗性疫苗在抗 HCV 感染中的作用等三个方面作一综述.

王全楚,冯志华,周永兴. 抗 HCV 树突状细胞疫苗的制备及功能研究. 世界华人消化杂志 2003;11(6):815-818
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/815.asp>

0 引言

丙型肝炎病毒(HCV)感染是当前危害人类健康的重要传染病,至今尚无特异性的预防和治疗措施^[1-20]. 基因疫苗作为一种控制 HCV 感染的新途径,正在受到人们的重视^[21]. 丙型肝炎基因疫苗诱导的特异性免疫应答已被大量的实验室证实. 但普遍存在着抗体滴度不高, CTL 杀伤率不强等问题. 其原因可能与 HCV 感染后,抗原提呈细胞(APC),尤其是树突状细胞(DC)数量减少、功能降低有关^[22-24]. 如何绕过或提高 DC 免疫功能低下,诱导出更强有力的、更具广泛性的免疫应答,应当成为基因疫苗和免疫治疗亟待解决的问题之一. 利用基因修饰或抗原致敏的树突状细胞作为疫苗具有最强的抗原呈递能力,可广泛用于肿瘤和感染性疾病的免疫治疗,其诱导的强烈的 CTL 反应在 HCV 基因治疗中具有很好的应用前景^[25-40].

1 DC 的特性和体外诱生

1.1 DC 的特性 树突状细胞最先由 Steinman 和 Cohn 在 1973 年描述. Steinman 阐述了 DC 与功能相关的几大特性: (1)DC 具有捕获加工处理抗原的能力; (2)DC 高表达 MHC II 类产物(>10⁶/细胞); (3)DC 表达丰富的黏附分子及共刺激因子,如 ICAM、LFA-3、整合素、B7、CD40、IL-12 等,这些表面标志随 DC 的不同分化阶

段而有变化; (4)DC 具有显著区别于其他细胞的表面标志. 活化的 DC 不表达 T 细胞、B 细胞和单核/巨噬细胞的典型表面标志,却表达 CD83、S100、CD40、CD80、CD86、CD1a、CD11a、CD45、HLA-ABC 和 HLA-DR、HLA-DQ^[41,42]等. 根据 DC 的异质性,有人将其分为髓系和淋巴系两大类. 不同的 DC 担负着不同的使命. 胸腺髓质中的 DC 参与胸腺中 T 细胞的阴性选择,髓系 DC 对 T 细胞免疫反应可产生强烈的刺激作用,并可分泌 IL-12,调节 T 细胞和 NK 细胞功能,促进 Th0 朝 Th1 方向分化,显著影响 Th1 和 Th2 的平衡. DC 在外周性免疫耐受中也起重要作用. 淋巴系 DC 倾向于促进 Th2 分化,并可递呈源自凋亡细胞的肽片段,据此,DC 可通过递呈来自体细胞的自身抗原给 T 细胞而诱导对自身蛋白的耐受. 迁移中的髓系 DC,包括 LC,在遭遇外源抗原后产生活性,移向淋巴器官启动免疫反应^[41]. DC 对 B 细胞的生长和免疫球蛋白的分泌有重要作用. 二者虽同为 APC,但 DC 有较高 MHC 及共刺激因子的表达并能大量产生 IL-12; DC 通过 Fc 及多聚凝集素(multilectin)受体中和抗原, B 细胞则有抗原特异性免疫球蛋白受体. DC 同时调控着 B 细胞所产生的免疫球蛋白的种类, IL-10 与 TGF- β 诱导 IgA1 的生成, IgA2 的表达则严格依赖于 B 与 DC 的直接相互作用,这说明 DC 控制着黏膜的免疫. 滤泡型 DC 直接维持激活 B 细胞的活力、生长与分化,生发中心含有 CD11c⁺DC,他可携带免疫复合物,有较强的刺激 B 细胞的能力. DC 与 B 细胞间作用方式也遵循双信号原则,即 DC 上的特异性抗原被 BCR 接受产生第一信号, DC 上 CR2L 与 B 细胞上 CR 结合,这对共刺激因子提供第二信号调控体液免疫. 总之, DC 对 T、B 细胞的生长分化、抗病毒和抗肿瘤免疫以及免疫耐受等方面均有重要作用.

1.2 DC 的体外诱生 体外诱生 DC 有许多不同的方案. 骨髓、脐血和外周血干细胞、外周血单核细胞,都可以作为前体来诱导分化为 DC^[43], 奥地利学者甚至提出乳铁传递蛋白(Lactoferrin)阳性的中性粒细胞在体外也可转型为 DC. 用不同的起始细胞群诱生 DC 需要不同的培养条件. 用 CD34⁺ 细胞诱生 DC 时, 去掉非贴壁细胞可显著降低淋巴细胞的污染. CD14⁺ 单核细胞在合适的条件下也可分化为 DC^[42]. 尽管用不同的前体细胞扩增 DC 的方法各不相同, 但 GM-CSF 似乎是必不可少的. GM-CSF 可诱导 DC 前体扩增, 促使其分化, 并可在体外维持 DC 存活达 6 wk. IL-4 往往与 GM-CSF 同时使用, 特别是

将外周血单个核细胞或单核细胞作为前体时, IL-4可抑制巨噬细胞克隆形成, 诱导 DC 生长和成熟. 当用骨髓或脐血 CD34⁺ 细胞作前体时, 则用 TNF- α 代替 IL-4. TNF- α 可降低粒细胞的产生, 上调细胞 GM-CSF β 链的表达, 增强其对细胞因子信号的反应能力. 许多其他细胞因子也被证明对 DC 的产生具有促进作用^[44-47], 如 IL-13, SCF, TGF- β 1 等. 有报道向用 GM-CSF、TNF- α 和 IL-4 刺激的骨髓 CD34⁺ 细胞培养体系中加入 Flt3 配体可使 DC 的收获率提高 5 倍, 再加入 SCF 可进一步提高. 持续的流动灌注培养体系可进一步增强 DC 的扩增. 甲胎蛋白对 DC 可产生抑制作用, 下调共刺激分子的表达; IL-10 可以抑制 DC 的分化, 将未成熟 DC 转化为可诱导产生耐受的 APC, 这也许可成为治疗自身免疫性疾病和过敏性疾病的有效方法. LPS、PGE₂、含非甲基化 CpG 基序的寡核苷酸(CpG-ODN)等免疫调节因子可以促进 DC 成熟从而增强抗原提呈功能. 不同的前体细胞, 不同的细胞因子和培养条件可以改变 DC 的表型和功能. GM-CSF 和 IL-4 有利于髓系 DC 分化, 而 IL-3 促进向淋巴系 DC 分化. CD40L 则对两种 DC 的成熟都有促进作用^[42]. 虽然目前已有的方法可以扩增出一定数量的 DC, 但不足之处是方法复杂, 所需细胞因子的量较大, 培养时间长, 成本高. 所以, DC 大量扩增方法学的优化也是下一步研究的关键问题.

2 DC 在 HCV 发病机制中的作用

近年来, 越来越多的证据表明由 DC 激活的细胞免疫特别是 CTL 介导的免疫反应, 在机体抵御恶性肿瘤和传染性疾病中发挥着十分重要的作用. 而且最近 DC 疫苗的临床 I、II 期试验也取得了令人鼓舞的结果, 显示出 DC 疫苗在恶性肿瘤等疾病中的巨大前景. 目前研究认为, 细胞免疫因可识别和清除病毒感染, 故对 HCV 的清除起重要作用. HCV 感染早期 T 细胞反应的强度、表位特异性和细胞因子分泌情况等很可能将决定感染的预后. HCV 感染时, 除病毒感染的非造血细胞外, 淋巴结和骨髓来源的 DC 作为专职抗原提呈细胞也直接参与启动抗病毒 T 细胞应答^[8].

Auffermann-Gretzinger et al^[49]研究发现慢性丙型肝炎患者外周血 DC 经同源刺激后不能分化成熟, 其膜表面分子仍为未成熟型, 虽能摄取抗原, 但不能呈递抗原. 自限性 HCV 感染者 DC 功能跟正常人一样可以分化成熟. 提示 DC 抗原呈递能力下降可能是导致持续感染慢性化的原因之一. Bain et al^[50]报告 HCV 感染者外周血 DC 虽然形态及摄取抗原能力正常, 但刺激 T 细胞增生能力较正常人明显降低. 用 RT-PCR 检测 DC 培养液中 HCV 病毒极其准种, 6 例中 5 例可检测到 HCV RNA 阳性. 其中 1 例 DC 中 HCV RNA 序列不同于血清、肝脏及其他部位, 提示 HCV 引起的 DC 刺激能力下降可能由于 DC 本身储存病毒所致. Kakumu et al^[51]观察 HCV 和 HBV 引起的原发性肝癌(HCC)中 DC 分泌 IL-12 以及 T

细胞刺激能力下降. 21 例 HCV、5 例 HBV 所致的 HCC 均可见 DC 功能下降. Kanto et al^[48]发现 HCV 感染所致的 DC 功能下降可被 HCV 核心区抗原刺激后恢复. 作者发现 24 例慢性丙型肝炎患者 DC 刺激前 CD86、IFN- γ 的表达以及 T 细胞刺激能力均低于正常组 DC. 但核心区抗原刺激后 DC 可持续 T 细胞增生能力.

3 抗 HCV 树突状细胞疫苗的制备方法

DC 疫苗包括病毒特异性抗原负载的 DC 疫苗和特异性抗原基因导入的 DC 疫苗两种, 前者为增加 DC 的抗原呈递功能, 将病毒特异性的抗原负载到 DC 细胞或体外致敏 DC 制成特异性 DC 疫苗或瘤苗. 在抗肿瘤免疫中已取得较好效果. 用同样的方法治疗肝炎也取得相似结果. 如将 HBsAg 致敏的 DC 转入 H-2 小鼠体内, 可诱导 MHC-限制的 HBsAg 特异性 CTL 反应^[52]. Bocher et al^[53]用 BALB/C 小鼠全身致死性照射后植入 SCID 小鼠骨髓以支持快速植入 PBMC 制成可感染 HBV 或 HCV 的动物模型, 用上述模型来研究抗原 HBcAg 负荷的 DC 疫苗诱发了强烈的针对 HBc 的原发性 Th 细胞反应和特异性 CTL 反应. 由于基因转染的 DC 疫苗能提供更多更有效的可供识别的抗原表位, 而且可以最终克服 HLA 限制, 已成为最具发展前景, 备受人们关注的研究热点. 目前在基因转染 DC 的方法上人们已经进行了许多探索, 将特异性抗原基因导入 DC 的方法有如下几种.

3.1 DNA 转染 DC 虽然裸 DNA 转染 DC 的效率较低, 但仍然有几个研究小组在不断探索^[54]. 采用基因枪轰击的方法将编码 HPV-16E7 的质粒导入鼠骨髓来源的 DC, 将存活的转基因 DC 免疫小鼠后, 不仅在体内产生抗原特异性的 CTL 反应, 而且还引起随后对致死量 HPV-16 转化的肿瘤细胞攻击的排斥. 采用电击法和脂质体介导的方法将 pEGFP 质粒分别导入 CD34⁺ 来源的 DC(PC-DC), 郎汉斯细胞(PC-LC)和 CD14 来源的 DC(Mo-DC), 实验结果表明^[55], 脂质体介导法对 3 种 DC 几乎无效, 而电击法的转染效率分别为 PC-DC12%, PC-LC16%, Mo-DC2%.

3.2 重组腺病毒介导的转染 近年来的研究表明重组腺病毒介导的转染效率比裸 DNA 转染 DC 的效率高^[56]. 90% 的鼠骨髓来源的 DC 能有效转染 Ad(γ -gal), 但研究发现, 直接用 AdRSVGFP 转染人外周血 DC, 只有大约 20% 的 DC 表达 GFP, 加用脂质体后, 转染效率可高达 90%, 说明脂质体可以增强腺病毒介导的基因转染 DC 的效率^[57]. 使用腺病毒载体作为基因转移载体来制备疫苗, 遇到的主要问题是病毒本身基因的表达成为潜在的免疫原, 尽管动物实验表明, 反复注射病毒转染的 DC, 仅仅产生低滴度的中和抗体. 利用适度的紫外线照射重组腺病毒, 既不改变腺病毒结合受体的结构和进入细胞的能力, 又能封闭腺病毒本身基因的转录, 随后用 Poly(L-lysine)共价结合紫外线照射的腺病毒, 结果高效地将外源基因转入 DC, 且没有共存的腺病

毒基因的表达, 这为 DC 疫苗的制备提供了一种更加安全的方法^[58].

3.3 逆转录病毒介导的基因转染 与腺病毒载体不同的是, 逆转录病毒能将转移的外源基因整合到转染细胞的基因组中去, 使之得到有效和稳定的表达. 目前, 一些实验已证明, 利用逆转录病毒将 TSA 基因导入鼠和人的 DC 是可行的. 如用 MFG 逆转录病毒系统将 LacZ 基因转入人外周血 DC, 7 d 后, 35-67 % 的 DC 显示出较高的 β -gal 活性, 20 d 后 PCR 依然能检测出 LacZ 基因的存在, 表明 LacZ 基因已稳定整合于 DC 基因组中, 另外逆转录病毒转染的 DC 依旧保持着 DC 的生物学特性, 并能诱导产生抗原特异的 CTL^[59].

3.4 重组痘病毒介导的基因转染 DC 重组痘病毒介导 TSA 基因转染 DC 具有转染率高、基因表达快、培养时间短等特点. 重组痘病毒转染的 DC 也能产生抗原特异性 CTL. 重组痘病毒介导的黑色素瘤相关抗原基因 MART-1 转染 DC 后, 接种于黑色素瘤患者, 结果在患者体内产生 MART-1 特异性的 CTL 反应, 显示出重组痘病毒在制备 DC 疫苗上的巨大潜力^[60].

3.5 DNA 疫苗直接转染 DC 尽管 DNA 疫苗仅能直接转染较少一部分的 DC, 但是实验已发现在引流淋巴结的 DC 被广泛激活, 从而为效应细胞的活化提供了最佳的条件. 因此 DNA 疫苗若以 DC 为载体能得到良好的免疫效果.

总之, 树突状细胞系统作为机体内免疫反应的始动子和调节子, 具有激活 CD8⁺CTL 及 CD4⁺T 辅助细胞的能力, 控制着体内免疫反应的过程, 因而他已成为抗肿瘤和抗病毒免疫反应的中心环节. 近几年来, 有关 DC 系统及其抗肿瘤疫苗的实验研究取得了显著的进展, 促进了 DC 疫苗在部分肿瘤患者体内的 I, II 期临床研究的深入, 但是在抗病毒免疫方面尤其是抗肝炎病毒的免疫治疗方面尚处于开始阶段, 随着 DC 研究的深入, 体外获得大量的 DC 和制备 DC 疫苗的技术日趋成熟, 特别是可以针对每个患者制备特异的 DC 疫苗, 从而进行特定的免疫学治疗. 相信上述 DC 疫苗在不久的将来可能成为病毒性肝炎临床治疗的一种不可缺的辅助手段.

4 参考文献

- Blum HE. Molecular targets for prevention of hepatocellular carcinoma. *Dig Dis* 2002;20:81-90
- Carreno V. Present treatment expectations and risks of chronic hepatitis C. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:74-79
- Tessmann K, Erhardt A, Haussinger D, Heintges T. Cloning and molecular characterization of human high affinity antibody fragments against Hepatitis C virus NS3 helicase. *J Virol Methods* 2002;103:75-88
- Moralli D, Vagnarelli P, Bensi M, De Carli L, Raimondi E. Insertion of a loxP site in a size-reduced human accessory chromosome. *Cytogenet Cell Genet* 2001;94:113-120
- 刘文恩, 谭德明, 范学工, 欧阳颖, 张铮. 丙型肝炎病毒感染发病机制中自身免疫反应的作用. *世界华人消化杂志* 1999;7:120-121
- 杜竞辉, 查文章. 丙型肝炎与原发肝癌关系研究现状. *世界华人消化杂志* 1999;7:176

- 范学工, 唐发清, 欧志明, 章锦香, 刘国成, 胡国岭. 慢性丙型肝炎病毒感染外周血淋巴细胞增生反应. *世界华人消化杂志* 1999;7:1038-1040
- 吴海滨, 李智伟, 李颖. 外周血单核细胞中丙型肝炎病毒 RNA 正负链检测的临床意义. *世界华人消化杂志* 1999;7:220-221
- Assy N, Minuk GY. A comparison between previous and present histologic assessments of chronic hepatitis C viral infections in humans. *J New Gastroenterol* 1999;5:107-110
- Song ZQ, Hao F, Min F, Ma QY, Liu GD. Hepatitis C virus infection of human hepatoma cell line 7721 in vitro. *World J Gastroenterol* 2001;7:685-689
- 王宏林, 张宝良, 杨波, 李兰芝, 朱善德, 郭仁宣. 丙肝病毒感染者血清内源性 β -葡糖醛酸酶活性与胆红素结石的关系. *世界华人消化杂志* 2001;9:1074
- 刘斌, 王宇明. 丙型肝炎病毒非结构区 NS5A 研究进展. *世界华人消化杂志* 2001;9:949-953
- 王平忠, 聂青和, 张中伟, 白宪光. 丙型肝炎病毒感染的人群 HCV RNA 定量研究. *世界华人消化杂志* 2000;8:1247-1250
- 李华, 潘承恩, 陈武科, 王全颖, 杨广笑. 丙型肝炎病毒核心区基因在大肠杆菌中的高效表达. *世界华人消化杂志* 2001;9:221-223
- 王平忠, 周永兴. 西安地区丙型肝炎病毒基因分型研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:757-759
- 宋志强, 郝飞, 王永刚, 闵峰, 王宇明. 丙型肝炎病毒 HVR1 抗血清体外阻断 HCV 的感染. *世界华人消化杂志* 2000;8:171-174
- 刘明旭, 王福生, 金磊, 雷周云, 施红, 刑利和. 丙型肝炎患者 LDL-R 等位基因的多态性. *世界华人消化杂志* 2001;9:217-218
- 闵峰, 郝飞. 丙型肝炎病毒包膜糖蛋白与保护性免疫. *世界华人消化杂志* 1999;7:1065-1067
- 贾战生, 周永兴, 连建奇, 冯志华, 李光玉, 张文彬. 抗丙型肝炎病毒锤头结构核酶的计算机设计. *世界华人消化杂志* 1999;7:300-302
- 宋志强, 郝飞, 张娟, 顾长海. 丙型肝炎患者血清中高变区 1(HVR1) 抗体的检测与分析. *世界华人消化杂志* 1999;7:666-668
- 王全楚, 周永兴, 姚志强, 冯志华. 不同载体及靶基因对乙型肝炎病毒 DNA 疫苗免疫效果的影响. *世界华人消化杂志* 2000;8:289-291
- 李明松, 袁爱力, 张万岱, 陈学清, 谭晓华, 朴英杰. 树突状细胞诱导的抗肿瘤免疫诱导移植瘤细胞凋亡并抑制其增生. *世界华人消化杂志* 2000;8:56-58
- 邢利和, 王福生, 刘明旭, 朱传琳. 树突状细胞与肝脏疾病. *世界华人消化杂志* 2000;8:1276-1279
- 李明松, 袁爱力, 张万岱, 陈学清, 张亚历, 周殿元. 大肠癌患者外周血树突状细胞免疫功能研究. *世界华人消化杂志* 1999;7:429
- Irvine AS, Trinder PK, Laughton DL, Ketteringham H, McDermott RH, Reid SC, Haines AM, Amir A, Husain R, Doshi R, Young LS, Mountain A. Efficient nonviral transfection of dendritic cells and their use for in vivo immunization. *Nat Biotechnol* 2000;18:1273-1278
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Milanese M, Magni M, Longoni P, Mortarini R, Anichini A, Tomanin R, Scarpa M, Gianni AM. Large-scale feasibility of gene transduction into human CD34⁺ cell-derived dendritic cells by adenoviral/polycation complex. *Br J Haematol* 2000;111:344-350
- Zhu Y, Koo K, Bradshaw JD, Sutton WF, Kuller LR, Bucala R, Anderson D, Mossman SP, Villinger F, Haigwood NL. Macaque blood-derived antigen-presenting cells elicit SIV-specific immune responses. *J Med Primatol* 2000;29:182-192
- Koido S, Kashiwaba M, Chen D, Gendler S, Kufe D, Gong J. Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA. *J Immunol* 2000;165:5713-5719
- Mitchell DA, Nair SK. RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2000;106:1065-1069
- Weissman D, Ni H, Scales D, Dude A, Capodici J, McGibney K, Abdool A, Isaacs SN, Cannon G, Kariko K. HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response. *J Immunol* 2000;165:4710-4717
- Rugghetti A, Biffoni M, Sabbatucci M, Rahimi H, Pellicciotta I, Fattorossi A, Pierelli L, Scambia G, Lavitrano M, Frati L, Nuti M. Transfected human dendritic cells to induce antitumor immunity. *Gene Ther* 2000;7:1458-1466
- Shiku H, Wang L, Ikuta Y, Okugawa T, Schmitt M, Gu X, Akiyoshi K, Sunamoto J, Nakamura H. Development of a cancer vaccine: peptides, proteins, and DNA. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46:S77-82

- 33 Nishimura T, Nakui M, Sato M, Iwakabe K, Kitamura H, Sekimoto M, Ohta A, Koda T, Nishimura S. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46:S52-61
- 34 Glasspool-Malone J, Somiari S, Drabick JJ, Malone RW. Efficient nonviral cutaneous transfection. *Mol Ther* 2000;2:140-146
- 35 Hayashi S, Johnston SA, Takashima A. Induction of Th2-directed immune responses by IL-4-transduced dendritic cells in mice. *Vaccine* 2000;18:3097-3105
- 36 Hadzantonis M, O'Neill H. Review: dendritic cell immunotherapy for melanoma. *Cancer Biother Radiopharm* 1999;14:11-22
- 37 Barratt-Boyes SM, Zimmer MI, Harshyne LA, Meyer EM, Watkins SC, Capuano S 3rd, Murphey-Corb M, Falo LD Jr, Donnenberg AD. Maturation and trafficking of monocyte-derived dendritic cells in monkeys: implications for dendritic cell-based vaccines. *J Immunol* 2000;164:2487-2495
- 38 Yang S, Vervaert CE, Burch J Jr, Grichnik J, Seigler HF, Darrow TL. Murine dendritic cells transfected with human GP100 elicit both antigen-specific CD8(+) and CD4(+) T-cell responses and are more effective than DNA vaccines at generating anti-tumor immunity. *Int J Cancer* 1999;83:532-540
- 39 Diao J, Smythe JA, Smyth C, Rowe PB, Alexander IE. Human PBMC-derived dendritic cells transduced with an adenovirus vector induce cytotoxic T-lymphocyte responses against a vector-encoded antigen in vitro. *Gene Ther* 1999;6:845-853
- 40 Li X, Lu S, Wang G, Yue B, Wang Z. Function of dendritic cell in chronic hepatitis C patients. *Zhonghua Neike Zazhi* 2002;41:325-328
- 41 Navas MC, Fuchs A, Schvoerer E, Bohbot A, Aubertin AM, Stoll-Keller F. Dendritic cell susceptibility to hepatitis C virus genotype 1 infection. *J Med Virol* 2002;67:152-161
- 42 Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, Lopez-Diaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, Garcia N, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol* 2002;76:5062-5070
- 43 Ou-Yang P, Hwang LH, Tao MH, Chiang BL, Chen DS. Co-delivery of GM-CSF gene enhances the immune responses of hepatitis C viral core protein-expressing DNA vaccine: role of dendritic cells. *J Med Virol* 2002;6:320-328
- 44 Moriya O, Matsui M, Osorio M, Miyazawa H, Rice CM, Feinstone SM, Leppla SH, Keith JM, Akatsuka T. Induction of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in mice by immunization with dendritic cells treated with an anthrax toxin fusion protein. *Vaccine* 2001;20:789-796
- 45 Galle MB, DeFranco RM, Kerjaschki D, Romanelli RG, Montalto P, Gentilini P, Pinzani M, Romagnoli P. Ordered array of dendritic cells and CD8+ lymphocytes in portal infiltrates in chronic hepatitis C. *Histopathology* 2001;39:373-381
- 46 Akbar SM, Horiike N, Onji M, Hino O. Dendritic cells and chronic hepatitis virus carriers. *Intervirology* 2001;44:199-208
- 47 Ito A, Kanto T, Kuzushita N, Tatsumi T, Sugimoto Y, Miyagi T, Takehara T, Katayama K, Mochizuki K, Hiramatsu N, Kasahara A, Yoshiya I, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N. Generation of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes from healthy individuals with peptide-pulsed dendritic cells. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:309-316
- 48 Kanto T, Hayashi N, Takehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 1999;162:5584-5591
- 49 Auffermann-Gretzinger S, Keefe EB, Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 2001;97:3171-3176
- 50 Bain C, Fatmi A, Zoulim F, Zarski JP, Trepo C, Inchauspe G. Impaired allostimulatory function of dendritic cells in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology* 2001;120:512-524
- 51 Kakumu S, Ito S, Ishikawa T, Mita Y, Tagaya T, Fukuzawa Y, Yoshioka K. Decreased function of peripheral blood dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma with hepatitis B and C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:431-436
- 52 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- 53 Bocher WO, Dekel B, Schwerin W, Geissler M, Hoffmann S, Rohwer A, Arditti F, Cooper A, Bernhard H, Berrebi A, Rose-John S, Shaul Y, Galle PR, Lohr HF, Reisner Y. Induction of strong hepatitis B virus (HBV) specific T helper cell and cytotoxic T lymphocyte responses by therapeutic vaccination in the trimeric mouse model of chronic HBV infection. *Eur J Immunol* 2001;31:2071-2079
- 54 Zhang W, Yang H, Zeng H, Chen Z. Induction of Th1 immune response against tumor by genetically engineered fusion of tumor cells and dendritic cells. *Zhonghua Xueye Xue Zazhi* 2002;23:61-64
- 55 Cui Z, Mumper RJ. Topical immunization using nanoengineered genetic vaccines. *J Control Release* 2002;81:173-184
- 56 Xia DJ, Zhang WP, Zheng S, Wang J, Pan JP, Wang Q, Zhang LH, Hamada H, Cao X. Lymphotactin cotransfection enhances the therapeutic efficacy of dendritic cells genetically modified with melanoma antigen gp100. *Gene Ther* 2002;9:592-601
- 57 Armstrong AC, Dermime S, Allinson CG, Bhattacharyya T, Mulryan K, Gonzalez KR, Stern PL, Hawkins RE. Immunization with a recombinant adenovirus encoding a lymphoma idiotype: induction of tumor-protective immunity and identification of an idiotype-specific T cell epitope. *J Immunol* 2002;168:3983-3991
- 58 Shibagaki N, Udey MC. Dendritic cells transduced with protein antigens induce cytotoxic lymphocytes and elicit antitumor immunity. *J Immunol* 2002;168:2393-2401
- 59 Tang H, Cao X, Zhu X. Induction of potent antitumor immune response of leukemia antigen-pulsed dendritic cells by IL-2 gene modification. *Zhonghua Xueye Xue Zazhi* 1999;20:573-576
- 60 Foley R, Tozer R, Wan Y. Genetically modified dendritic cells in cancer therapy: implications for transfusion medicine. *Transfus Med Rev* 2001;15:292-304

疫苗新概念及新型疫苗的研制

冯志华,王全楚

冯志华,王全楚,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
国家自然科学基金课题, No.30170822
项目负责人:冯志华,710038,陕西省西安市灞桥区新寺路1号,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. fengzh@fmmu.edu.cn
电话:029-3577742 传真:029-3537377
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-25

摘要

随着免疫学研究进展,关于疫苗的传统概念也发生了根本变化:(1)成分不同:传统疫苗多为死疫苗/减毒活疫苗或重组亚单位疫苗;新型疫苗则为编码无毒力抗原蛋白的病毒核酸或能激发特异性机体免疫应答的细胞疫苗;(2)机制不同:传统疫苗主要靠病毒的抗原蛋白刺激机体产生中和性保护抗体;新型疫苗不仅能刺激机体产生保护性抗体,而且能激发特异性细胞免疫应答;(3)作用不同:传统疫苗只能起到一定的预防作用,新型疫苗不仅能预防疾病,而且更能起到特异的治疗作用(治疗性疫苗),具有更广泛的应用前景.因此,我们将上述与传统疫苗不同,且能激发机体特异性免疫应答的新型疫苗统称为新概念疫苗,其中包括核酸疫苗、T细胞疫苗、树突状细胞疫苗等,并就新概念疫苗目前的研究现状作一简要的概述.

冯志华,王全楚. 疫苗新概念及新型疫苗的研制. 世界华人消化杂志 2003; 11(6):819-822

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/819.asp>

0 引言

疫苗的概念是在200 a前Jenner发现事先接种牛痘能够阻止天花的发生之后首先提出的.近100 a来,疫苗的开发和应用已成为医学科学的重大成就之一,且已广泛用于传染病的预防和治疗.这些疫苗成功的原因在于他能够有效地诱导机体产生保护性抗体.然而,对某些细胞内病原菌如结核杆菌、利什曼原虫以及寄生虫等这些抗体几乎不起作用,因为对这些病原体的防御更多地依赖于细胞免疫,而不是抗体介导的体液免疫.对如乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、人类免疫缺陷病毒(HIV)、疟原虫等感染,则可能需要细胞免疫和体液免疫的双重介导.

现在准获使用的疫苗来自杀死或灭活的完整细胞、重组蛋白或减毒的活病原体,都能刺激机体产生抗体.然而除了减毒活疫苗如水痘-带状疱疹病毒疫苗外,其他疫苗并不能特异的诱导细胞免疫,此外,如果用减毒活疫苗来预防诸如HIV之类的病毒感染,可能给疫苗制备和接种疫苗的人群带来危险.因此,积极寻找

既能同时诱导体液和细胞免疫应答又具安全性的疫苗,实乃当务之急.最近出现的新型疫苗如核酸疫苗、T细胞疫苗、树突状细胞疫苗等彻底改变了疫苗多为蛋白、只能预防的经典概念,引进了治疗性疫苗和核酸及细胞疫苗的新内容,大大拓展了人们对疫苗组成和功能的认识,被称为是疫苗学的第三次革命.因他们不但具有传统疫苗的一般功能,且能激发机体特异性细胞和体液免疫应答,用于临床现症患者的治疗.故称之为新概念疫苗.本文拟就近年来发展最快的核酸疫苗、T细胞疫苗、树突状细胞疫苗等作一简介.

1 核酸疫苗

所谓核酸疫苗(nucleic acid vaccine),是将含编码外源蛋白基因的质粒DNA,直接导入动物组织,外源基因于体细胞中表达后,表达产物被提呈,与主要组织相容性复合物(MHC)结合,刺激机体产生相应的抗体和细胞毒性T淋巴细胞(CTLs),分别介导体液免疫和细胞免疫应答.这种外源基因是抗原的来源,具有疫苗的功能,又称为DNA疫苗,由于不需任何化学载体,故又称裸DNA疫苗.

1.1 发现及意义 核酸疫苗最早是由美国Wisconsin大学的Wolff及同事们和Philip领导的Vical小组于1989年偶然发现的.1992年美国Merck实验室的Ulmer领导的研究小组率先将包含流感病毒核心蛋白(NP)基因序列的重组质粒注射小鼠股四头肌,发现的确刺激产生了特异性的CTL,能保护小鼠抵抗不同流感病毒株感染.这一结果有多方面的意义.(1)CTL介导的细胞免疫象中和性保护抗体介导的体液免疫一样,在抵抗病原体感染和清除病原体感染两方面均有重要作用.(2)以往疫苗的保护作用多依赖疫苗刺激机体产生的中和性保护抗体,但象流感病毒、丙肝病毒(HCV)及免疫缺陷病毒(HIV)等病原体外膜蛋白容易变异,所刺激产生的是型或株特异性中和抗体,给疫苗预防带来了困难.而其核心蛋白均非常保守,刺激机体产生的细胞免疫不仅可能预防不同病毒株的交叉感染,而且可能在治疗某些持续感染性疾病中有其积极的意义.(3)由于CTL介导的细胞免疫在某些病毒感染和肿瘤发病上有相似的重要作用,DNA免疫方法也可能用于抗肿瘤免疫.也就是说,核酸免疫这种方法不仅可用于感染性疾病的预防,还可应用于基因治疗.因此,Ulmer他们将在这一领域的首篇研究报告发表在《Science》上之后,该项发现立即被视为疫苗业的一场革命.因为该技术不是注入死或

减毒活疫苗或重组病毒亚单位,而是用能编码无毒力但有抗原性的病毒蛋白的DNA接种人体,因而使疫苗接种变的非常方便,人体细胞在体内产生的病毒蛋白很可能同时诱生细胞和体液免疫应答.这篇文章,不仅向科学界展示了向学术禁区的挑战,而且开辟了疫苗研究的新时代.在随后的几年中,越来越多的实验室证实了DNA免疫对在保护和治疗病原体感染的有效性.目前,DNA免疫已经成为世界瞩目的防治传染病、肿瘤以及移植免疫治疗的新的研究热点^[1-18].

1.2 国内外研究现状 核酸疫苗已经在许多难治性感染性疾病、自身免疫性疾病、过敏性疾病和肿瘤性疾病的预防及治疗领域显示出广泛的应用前景.国外已有多家公司,开通了多个介绍核酸疫苗的网站,如DNA vaccine.com,关于核酸疫苗的文章也是每年数以千计,与核酸疫苗相关的专利已超过120项.足以看出核酸疫苗的广泛的应用前景.迄今,国外已有至少4种核酸疫苗被批准进入I期临床试验.1996年美国FDA批准对健康志愿者进行艾滋病核酸疫苗人体实验.1998年美国宾西法尼亚大学医学院MacGregor及其同事们首次报道了核酸疫苗治疗HIV-1感染者的第一次人体实验结果.他们认为该疫苗不仅具有免疫原性,而且应用于人体是安全的,有望成为治疗HIV的有效方法.同年,美国佛罗里达的Ugen et al的HIV-1人体试验取得了同样的结果.随后瑞士苏黎世大学医院感染病科Weber et al在4名无症状HIV携带者体内也进行了试验.他们选择的目的基因为HIV-1 gp160,获得了同样的预期结果^[19].据最新消息,英国已经批准在2002-08开始进行一种专门针对非洲人的HIV核酸疫苗的I期临床试验(HIV A亚型,是肯尼亚和非洲其他地区最流行的HIV菌株)^[20].1998年,美国海军宣布他们已经成功地在健康人体上检测了针对疟疾的核酸疫苗,2000年美国陆军也同样在成年健康志愿者体内进行了疟疾的核酸疫苗的试验^[21].

目前,乙肝病毒核酸疫苗也已应用于临床^[22].美国费城已有人用成纤维细胞生长因子DNA疫苗治疗末级外周动脉闭塞病^[23].瑞典也有人正在研究用DNA免疫接种预防各种病原体引起的婴幼儿腹泻.中国与德国合作开发的一种艾滋病核酸疫苗将于近期申请进入人体实验阶段.如获批准,这将是中国的首次艾滋病疫苗人体实验.

2 T细胞疫苗

T细胞疫苗原是指将T细胞或体外T细胞表位多肽刺激产生的T细胞作为疫苗接种,用于治疗某些自身免疫疾病.但将依据MHC-I类分子特异的多肽结合基序(MHC binding motif)合成的多肽,在体外诱导产生的抗原特异性细胞毒T淋巴细胞(CTL),用于治疗病毒性疾病,则是近几年的新思维,新设想,他将T细胞从过去应用为靶细胞转变成效应细胞,为T细胞疫苗的概念增添了新的内涵.

2.1 研究意义及现状

2.1.1 治疗某些自身免疫疾病 T细胞引起的迟发性变态反应可能是某些自身免疫疾病的病因.在动物实验中,把动物体内引起疾病的T细胞移入其他健康的动物体内,也能引起疾病,所以认为T细胞是患病的原因.因此,同传染病的预防接种一样,如果把致病的T细胞灭活后代替微生物疫苗注入体内,即使致病T细胞再移入体内,也不再引起疾病,并将此构想试用于治疗.小鼠变态反应性脑脊髓炎的实验已成功,而且还证明用于治疗人类类似疾病多发性硬化症也有一定效果.

2.1.2 治疗某些病毒性疾病 自从Doherty和Zinkernagel发现CTL能够杀伤外源微生物感染细胞,而且这种杀伤作用依赖于CTL对外源多肽和自身分子(MHC)的双重识别之后,越来越多的研究表明:病毒特异性的CTL介导的细胞免疫具有清除病毒的功能,是宿主防御病毒感染的主要机制之一. Doherty和Zinkernagel也因他们的发现于1996年获得了生理和医学诺贝尔奖.正因为此,CTL表位及CTL介导的细胞免疫应答的研究受到越来越多的关注.传统的病毒疫苗(减毒或灭活),含有完整的病毒蛋白质,以刺激机体产生抗体为主,难以有效诱导产生MHC-I类限制性的CTL和清除细胞内病毒颗粒.目前临床应用的过继免疫治疗如LAK细胞、CD3-AK细胞均为非特异杀伤细胞,靶向性差.因此,有学者已直接用单个或多个CTL多肽导入体内(多肽疫苗),诱导机体产生特异性CTL应答,虽然能够观察到CTL应答,但有时滴度不高,可能是由于较短的CTL多肽更易被血清蛋白酶降解,从较短的(通常为几个-十几个氨基酸)多肽中去除一个或两个氨基酸将改变其结合HLA的能力;若将几个多肽交联,既可能形成新的CTL表位,诱导特异性CTL失败,又可能产生针对多肽的抗体;另外,低剂量抗原皮下注射可以产生免疫应答,而高剂量静脉注射则可能引起免疫耐受.

T细胞疫苗是用多肽在体外诱导产生特异性CTL,后者被克隆、扩增、筛选和鉴定后,仅将MHC-I类限制的CD8+ T细胞输入机体,诱导细胞免疫应答产生,从而解决了多肽疫苗存在的上述问题,而且直接回输CTL,可以人为地控制CTL的强度,避免其过度,导致大量受染肝细胞死亡,也可避免其过低,无清除病毒作用.

因此,我们在国家自然科学基金的资助下,已经利用转染了HCV基因(C+E1)或(C+E1+E2)的小鼠骨髓瘤SP2/0细胞皮下注射,形成的皮下移植瘤HCV小鼠模型和HCV基因转染细胞系,发现MHC-I限制的CTL表位多肽体外诱导的特异性CTL,在体内外对HCV感染细胞均具有杀伤作用,可能成为病毒性疾病或肿瘤免疫较好的治疗性疫苗后选之一.

3 树突状细胞疫苗

树突状细胞(dendritic cell, DC)是专职抗原递呈细胞,能有效地将抗原递呈给T淋巴细胞,从而诱导CTL活

化. 荷载抗原的 DC 具有疫苗的功能, 故称树突状细胞疫苗. 荷载抗原既可以是病毒抗原、HLA 限制的 CTL 表位(8-10 个氨基酸的短肽)基因, 也可以是肿瘤细胞, 还可以是编码肿瘤抗原的基因. 由于 DC 细胞疫苗可以不依赖于 CTL 靶细胞, 又有较高的抗原递呈效率, 正成为新一代疫苗的代表^[24-34].

3.1 研究意义及现状 核酸疫苗诱导特异性免疫应答产生已被大量的实验室证实, 但普遍存在着抗体滴度不高, CTL 杀伤率不强等问题. 其原因可能与病原体感染后, 抗原提呈细胞(APC), 尤其是树突状细胞数量减少、功能降低有关^[35]. 如何绕过或提高 DC 免疫功能低下, 诱导出更强有力的、更具广泛性的免疫应答, 应当成为基因疫苗和免疫治疗亟待解决的突出问题之一. 业已证实, DC 是目前发现的功能最强的抗原提呈细胞, 也是唯一能激活初始 T 细胞的抗原呈递细胞. 因此, 应用抗原或抗原多肽体外冲击致敏 DC, 然后将之回输或免疫接种荷瘤宿主或带病毒特异性抗原的宿主, 进行免疫治疗; 利用 DC 与肿瘤细胞融合成为新型带有 DC 功能及肿瘤特异抗原的融合细胞瘤苗的报道; 以及利用病毒载体将带有肿瘤或病毒抗原的编码基因转染 DC, 使之在 DC 内持续表达相应特异性抗原, 诱导产生特异性抗肿瘤或抗病毒免疫反应等方法应运而生^[36-60].

这些方法存在着 DC 激活时间短, 治疗不彻底或利用病毒载体的安全性等问题. 一个理想的抗原提呈策略, 应当是全方位、强有力的诱导 CD_8^+ CTL, CD_4^+ Th 及 B 细胞应答, 这样才能更有效的清除病原体及肿瘤细胞. 近年来, 以免疫球蛋白(主要是 IgG1)的 Fc 段为基础构建的新型免疫分子进展很快, 有望用于新型免疫复合制剂的研制. IgG1 的 Fab 与 Fc 是功能相对独立的片段, Fab 中的可变区负责与抗原结合, 而 Fc 段能与免疫效应细胞的 Fc γ 受体(Fc γ R)结合, 发挥其调节免疫效应、细胞炎症反应、细胞毒效以及激活吞噬细胞的作用. DC 本身表面带有 Fc γ R, 因此由 Fc γ R 介导的吞噬细胞内在化的过程可加强免疫应答的抗原提呈. 我们基于 BALB/c 小鼠(H-2^d)DC 表面的 Fc I 型受体(Fc γ R I 即 CD_{64})与人 IgG1 重链 Fc 段具有高亲和力^[61,62], 而 HCV 基因组内的核心区(C)是结构基因中最保守的区域, 该区含至少 5 个重要的抗原表位或细胞毒 T 细胞(CTL)表位, 拟将 HCV C 基因与人 IgG1 Fc 基因融合, 构建了分泌融合蛋白的真核表达载体, 转染经体外活化的 DC 之后, 接种 BALB/c 小鼠, 将利用已建立的表达 HCV C 抗原的靶细胞(SP2/0-HCV-C, H-2^d)及其荷瘤鼠(BALB/c 小鼠)模型, 观察该融合基因修饰的 DC, 在体内、体外诱导抗 HCV 特异性 CTL、T 细胞增生及抗体应答的强度, 为提高基因疫苗诱导免疫应答的效率提供新的手段, 可望为 HCV 防治提供新的思路 and 理论依据.

4 参考文献

- 1 Miller M, Cho JY, Baek KJ, Castaneda D, Nayar J, Rodriguez M, Roman M, Raz E, Broide DH. Plasmid DNA encoding the respiratory syncytial virus G protein protects against RSV-induced airway hyperresponsiveness. *Vaccine* 2002;20:3023-3033
- 2 Kojima Y, Xin KQ, Ooki T, Hamajima K, Oikawa T, Shinoda K, Ozaki T, Hoshino Y, Jounai N, Nakazawa M, Klinman D, Okuda K. Adjuvant effect of multi-CpG motifs on an HIV-1 DNA vaccine. *Vaccine* 2002;20:2857-2865
- 3 Wang QC, Zhou YX, Yao ZQ, Feng ZH. Effects of DNA vector constructs and different genes on the induction of immune responses by HBV DNA based vaccine. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:289-291
- 4 Du DW, Zhou YX, Feng ZH, Yao ZQ, Li GY. Immune responses to interleukin 12 and hepatitis B gene vaccine in H-2d mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2000;8:128-130
- 5 Li WB, Yao ZQ, Zhou YX, Feng ZH. Studies on immunization with HBV gene vaccine plus HBsAg protein in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999;7:188-190
- 6 Howard KA, Alpar HO. The development of polyplex-based DNA vaccines. *J Drug Target* 2002;10:143-151
- 7 Hasan UA, Harper DR, Wren BW, Morrow WJ. Immunization with a DNA vaccine expressing a truncated form of varicella zoster virus glycoprotein E. *Vaccine* 2002;20:1308-1315
- 8 Rosinha GM, Myiوشي A, Azevedo V, Splitter GA, Oliveira SC. Molecular and immunological characterisation of recombinant *Brucella abortus* glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase, a T-and B-cell reactive protein that induces partial protection when co-administered with an interleukin-12-expressing plasmid in a DNA vaccine formulation. *J Med Microbiol* 2002;51:661-671
- 9 Weiss R, Scheibelhofer S, Freund J, Ferreira F, Livey I, Thalhamer J. Gene gun bombardment with gold particles displays a particular Th2-promoting signal that over-rides the Th1-inducing effect of immunostimulatory CpG motifs in DNA vaccines. *Vaccine* 2002;20:3148
- 10 von Reyn CF, Vuola JM. New vaccines for the prevention of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2002;35:465-474
- 11 Deng H, Kowalczyk D, O I, Blaszczyk-Thurin M, Quan Xiang Z, Giles-Davis W, Ertl HC. A modified DNA vaccine to p53 induces protective immunity to challenge with a chemically induced sarcoma cell line. *Cell Immunol* 2002;215:20-31
- 12 Epstein SL, Tumpey TM, Misplon JA, Lo CY, Cooper LA, Subbarao K, Renshaw M, Sambhara S, Katz JM. DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg Infect Dis* 2002;8:796-801
- 13 Raynard RS, Bricknell IR, Billingsley PF, Nisbet AJ, Vigneau A, Sommerville C. Development of vaccines against sea lice. *Pest Manag Sci* 2002;58:569-575
- 14 Riedl P, El-Kholy S, Reimann J, Schirmbeck R. Priming biologically active antibody responses against an isolated, conformational viral epitope by DNA vaccination. *J Immunol* 2002;169:1251-1260
- 15 Triccas JA, Sun L, Palendira U, Britton WJ. Comparative affects of plasmid-encoded interleukin 12 and interleukin 18 on the protective efficacy of DNA vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol Cell Biol* 2002;80:346-350
- 16 Zhao LS, Qin S, Zhou TY, Tang H, Liu L, Lei BJ. DNA-based vaccination induces humoral and cellular immune responses against hepatitis B virus surface antigen in mice without activation of C-myc. *World J Gastroenterol* 2000;6:239-243
- 17 Singh G, Parker S, Hobart P. The development of a bicistronic plasmid DNA vaccine for B-cell lymphoma. *Vaccine* 2002;20:1400-1411
- 18 Wierzbicki A, Kiszka I, Kaneko H, Kmiecik D, Wasik TJ, Gzyl J, Kaneko Y, Kozbor D. Immunization strategies to augment oral vaccination with DNA and viral vectors expressing HIV envelope glycoprotein. *Vaccine* 2002;20:1295-1307
- 19 Weber R, Bossart W, Cone R, Luethy R, Moelling K. Phase I clinical trial with HIV-1 gp160 plasmid vaccine in HIV-1-infected asymptomatic subjects. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:800-803
- 20 Hanke T, McMichael AJ, Mwau M, Wee EG, Ceberej I, Patel S, Sutton J, Tomlinson M, Samuel RV. Development of a DNA-MVA/HIVA vaccine for Kenya. *Vaccine* 2002;20:1995-1998

- 21 Le TP, Coonan KM, Hedstrom RC, Charoenvit Y, Sedegah M, Epstein JE, Kumar S, Wang R, Doolan DL, Maguire JD, Parker SE, Hobart P, Norman J, Hoffman SL. Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine* 2000;18:1893-1901
- 22 Tacket CO, Roy MJ, Widera G, Swain WF, Broome S, Edelman R. Phase I safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. *Vaccine* 1999;17:2826-2829
- 23 Comerota AJ, Throm RC, Miller KA, Henry T, Chronos N, Laird J, Sequeira R, Kent CK, Bacchetta M, Goldman C, Salenius JP, Schmieder FA, Pilsudski R. Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J Vasc Surg* 2002;35:930-936
- 24 Coombes BK, Mahony JB. Dendritic cell discoveries provide new insight into the cellular immunobiology of DNA vaccines. *Immunol Lett* 2001;78:103-111
- 25 Toyokawa H, Inaba M, Takai S, Sato S, Beuth J, Ko HL, Matsui Y, Kwon AH, Kamiyama Y, Ikehara S. Enhancement of circulating dendritic cell activity by immunomodulators (OK432 and KP-40). *Anticancer Res* 2002;22:2137-2145
- 26 Nagata Y, Ono S, Matsuo M, Gnjatic S, Valmori D, Ritter G, Garrett W, Old LJ, Mellman I. Differential presentation of a soluble exogenous tumor antigen, NY-ESO-1, by distinct human dendritic cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:10629-10634
- 27 Ausiello CM, Fedele G, Urbani F, Lande R, Di Carlo B, Cassone A. Native and genetically inactivated pertussis toxins induce human dendritic cell maturation and synergize with lipopolysaccharide in promoting T helper type 1 responses. *J Infect Dis* 2002;186:351-360
- 28 Bjorck P, Lie WR, Woulfe SL, Klein BK, Olson W, Storkus WJ. Progenipoietin-generated dendritic cells exhibit anti-tumor efficacy in a therapeutic murine tumor model. *Int J Cancer* 2002;100:586-591
- 29 Syme RM, Bryan TL, Gluck S. Dendritic cell-based therapy: a review focusing on antigenic selection. *J Hematother Stem Cell Res* 2001;10:601-608
- 30 Reinhard G, Marten A, Kiske SM, Feil F, Bieber T, Schmidt-Wolf IG. Generation of dendritic cell-based vaccines for cancer therapy. *Br J Cancer* 2002;86:1529-1533
- 31 Gitlitz BJ, Figlin RA, Pantuck AJ, Beldegrun AS. Dendritic cell-based immunotherapy of renal cell carcinoma. *Curr Urol Rep* 2001;2:46-52
- 32 Schijns VE. Induction and direction of immune responses by vaccine adjuvants. *Crit Rev Immunol* 2001;21:75-85
- 33 Tsuchiya T, Chida K, Suda T, Schneeberger EE, Nakamura H. Dendritic cell involvement in pulmonary granuloma formation elicited by bacillus calmette-guerin in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:1640-1646
- 34 Kalady MF, Onaitis MW, Padilla KM, Emani S, Tyler DS, Pruitt SK. Enhanced dendritic cell antigen presentation in RNA-based immunotherapy. *J Surg Res* 2002;105:17-24
- 35 Kakumu S, Ito S, Ishikawa T, Mita Y, Tagaya T, Fukuzawa Y, Yoshioka K. Decreased function of peripheral blood dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma with hepatitis B and C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:431-436
- 36 Foss FM. Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol* 2002;29(Suppl 7):5-11
- 37 Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, Mortarini R, Rivoltini L, Marincola FM, Anichini A. Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *J Natl Cancer Inst* 2002;94:805-818
- 38 Enomoto M, Nagayama H, Sato K, Xu Y, Asano S, Takahashi TA. In vitro generation of dendritic cells derived from cryopreserved CD34+ cells mobilized into peripheral blood in lymphoma patients. *Cytotherapy* 2000;2:95-104
- 39 Sun JY, Krouse RS, Forman SJ, Senitzer D, Sniecinski I, Chatterjee S, Wong KK Jr. Immunogenicity of a p210(BCR-ABL) fusion domain candidate DNA vaccine targeted to dendritic cells by a recombinant adeno-associated virus vector in vitro. *Cancer Res* 2002;62:3175-3183
- 40 Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, Schuler G. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195:1279-1288
- 41 Narendran P, Elsegood K, Leech NJ, Dayan CM. Dendritic cell-based proliferative assays of peripheral T cell responses to tetanus toxoid. *Ann N Y Acad Sci* 2002;958:170-174
- 42 Indar A, Maxwell-Armstrong CA, Durrant LG, Carmichael J, Scholefield JH. Current concepts in immunotherapy for the treatment of colorectal cancer. *J R Coll Surg Edinb* 2002;47:458-474
- 43 Zhang W, Yang H, Zeng H, Chen Z. Induction of Th1 immune response against tumor by genetically engineered fusion of tumor cells and dendritic cells. *Zhonghua Xueye Xue Zazhi* 2002;23:61-64
- 44 Insug O, Ku G, Ertl HC, Blaszczyk-Thurin M. A dendritic cell vaccine induces protective immunity to intracranial growth of glioma. *Anticancer Res* 2002;22:613-621
- 45 Chang AE, Redman BG, Whitfield JR, Nickoloff BJ, Braun TM, Lee PP, Geiger JD, Mule JJ. A phase I trial of tumor lysate-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8:1021-1032
- 46 Kakumu S, Ito S, Ishikawa T, Mita Y, Tagaya T, Fukuzawa Y, Yoshioka K. Decreased function of peripheral blood dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma with hepatitis B and C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:431-436
- 47 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- 48 Zhang J, Zhang JK, Zhuo SH, Chen HB. Effect of a cancer vaccine prepared by fusions of hepatocarcinoma cells with dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:690-694
- 49 Tanaka Y, Koido S, Chen D, Gendler SJ, Kufe D, Gong J. Vaccination with allogeneic dendritic cells fused to carcinoma cells induces antitumor immunity in MUC1 transgenic mice. *Clin Immunol* 2001;101:192-200
- 50 Mumper RJ, Ledebur HC Jr. Dendritic cell delivery of plasmid DNA. Applications for controlled genetic immunization. *Mol Biotechnol* 2001;19:79-95
- 51 Fong L, Brockstedt D, Benike C, Breen JK, Strang G, Ruegg CL, Engleman EG. Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol* 2001;167:7150-7156
- 52 Chen Z, Moyana T, Saxena A, Warrington R, Jia Z, Xiang J. Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. *Int J Cancer* 2001;93:539-548
- 53 Sathaporn S, Eremin O. Dendritic cells (II): Role and therapeutic implications in cancer. *J R Coll Surg Edinb* 2001;46:159-167
- 54 Oh S, Belz GT, Eichelberger MC. Viral neuraminidase treatment of dendritic cells enhances antigen-specific CD8(+) T cell proliferation, but does not account for the CD4(+) T cell independence of the CD8(+) T cell response during influenza virus infection. *Virology* 2001;286:403-411
- 55 Rini BI, Small EJ. Immunotherapy for prostate cancer. *Curr Opin Rep* 2001;3:418-423
- 56 Sadanaga N, Nagashima H, Mashino K, Tahara K, Yamaguchi H, Ohta M, Fujie T, Tanaka F, Inoue H, Takesako K, Akiyoshi T, Mori M. Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res* 2001;7:2277-2284
- 57 Boura P, Kountouras J, Lygidakis NJ. Tumor immunity and immunotherapy. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1040-1044
- 58 Burdin N, Moingeon P. Cancer vaccines based on dendritic cells loaded with tumor-associated antigens. *Cell Biol Toxicol* 2001;17:67-75
- 59 Akbar SM, Horiike N, Onji M, Hino O. Dendritic cells and chronic hepatitis virus carriers. *Intervirology* 2001;44:199-208
- 60 Slovin SF. Vaccines as treatment strategies for relapsed prostate cancer: approaches for induction of immunity. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001;15:477-496
- 61 Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol* 2001;29:1247-1255
- 62 Zhang JK, Li J, Chen HB, Sun JL, Qu YJ, Lu JJ. Antitumor activities of human dendritic cells derived from peripheral and cord blood. *World J Gastroenterol* 2002;8:87-90

特殊状态下的逆行胰胆管造影检查术

智发朝

智发朝,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: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. zfc@fimmu.com
电话:020-61641534 传真:020-87280770
收稿日期:2002-09-20 接受日期:2002-11-29

智发朝. 特殊状态下的逆行胰胆管造影检查术. 世界华人消化杂志 2003;11(6):823

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/823.asp>

0 引言

所谓特殊状态下的逆行胰胆管造影,主要是指由各种原因所造成的十二指肠乳头的位置异常,或内镜到达十二指肠乳头的路径与常规不同等状态下的逆行胰胆管造影. 主要包括十二指肠憩室、乳头部畸形、胃大部切除 B-II 式术后、胆肠吻合术后等^[1].

1 术前准备和所用器械同常规 ERCP 检查.

2 十二指肠憩室

十二指肠憩室是造成 ERCP 插管困难的最常见因素,憩室可单发或多发,离乳头较远的憩室,对插管无明显影响,而靠近乳头的憩室,会对插管造成困难,尤其十二指肠乳头位于憩室内者,插管更为困难. 对虽然受憩室影响,但乳头尚可看见者,可用导管或切开刀将覆盖乳头的皱襞挑开,再插管,一旦插管成功,尽可能放置导丝,以确保后续的操作. 对于十二指肠乳头位于憩室内者,由于很难直接看到乳头,不能进行直视下插管,可用导管或切开刀轻轻试插,边插边少量注射造影剂,若未能确定插入胰胆管,且不可用力插入或插入过深,否则容易穿孔.超滑导丝配合应用,能提高插管成功率. 有人将内镜送入憩室内进行插管,应非常小心,以免造成穿孔.

3 乳头部畸形

乳头顶部不平、充血、肿胀、结石嵌顿等都会造成乳头部的畸形. 对乳头顶部不平、充血、肿胀者,插管可选用锥形造影导管或切开刀,必要时以超滑导丝配合. 反复插管不能成功者,可以做预切开. 结石嵌顿可以引起明显的乳头肿胀、开口阻塞,或胆总管十二指肠瘘. 直接插管可能并不困难,但通常先用电刀(针式电刀更适宜)将乳头做小或中切开,之后用电刀或导管将嵌顿的结石拨出,再插管造影. 如果从乳头开口处插管困难,可从瘘口处插管造影.

4 胃大部切除 B-II 式术后逆行胰胆管造影术

胃大部切除 B-II 式术后,内镜从胃到达十二指肠降

部乳头处的路径发生改变,使得逆行胰胆管造影更为困难,并发症也明显增多(尤其是穿孔)^[2]. 先将十二指肠镜送达残胃的胃小肠吻合口,观察吻合口及鞍部情况,一般来说,输入襻开口没有输出襻开口明显,进入输入襻也比较困难,输入襻常位于视野的2-5点钟位,且输入襻内常有胆汁. 据此特征,可循腔进入输入襻,直到十二指肠残端或发现十二指肠乳头. 某些病例,可能输入襻和输出襻的位置与常规位置相反. 对进入输入襻困难者,可以在X线监视下进镜,如首先进入的是输出襻,可以在退镜靠近输出襻开口处,用活检钳钳取少量黏膜组织以留下血迹做标记,以免反复进入输出襻. 注意在进入输入(出)襻较长时,要防止结襻过长,否则易引起穿孔,老年者更甚. 对疑难病例,先用直视胃镜观察,并做标记,对确定输入襻和寻找乳头有很大帮助. 直视镜直接用于插管造影,因没有抬钳器,操作更为困难,成功率不高.

B-II 式术后内镜到达十二指肠乳头的途径及方向与正常结构者相反,图像的上下方位与正常状态相反. 这就使得用标准导管在自然弯曲下插管非常困难,胆管造影也比胰管造影困难. 但以下方法有助于插管: (1)选用新导管,新导管较旧导管直,插管容易成功;目前有专门用于 B-II 式术后造影用的导管,建议选用. (2)将内镜前端置于十二指肠第二部分和第三部分的连接处,保持内镜前端和乳头的适当距离,有助于插管成功. (3)运用导丝(或放置支架用的内引导导管),将导丝伸出造影导管的前端,通过改变导丝的长度和抬钳器的角度,使得导丝和导管易于进入胰、胆管. (4)插管成功后,放置塑料内支架,利于后续治疗. 行 Roux-Y 者,ERCP 几乎是不可能的.

5 胆肠吻合术后

胆肠吻合术的吻合口多位于十二指肠球部左侧壁,如吻合口不狭窄,则很容易发现,插管多不困难. 吻合口狭窄者,可用导丝辅助插管;吻合口过大者,可用球囊造影,使球囊堵塞开口处,造影剂充分充盈胆管,获得良好造影结果.

6 其他

胃大部切除 B-I 式术后、胰腺手术后,一般对 ERCP 影响不大.

7 参考文献

- 1 Cotton PB, Williams CB. Practical gastrointestinal endoscopy. fourth edition. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1996:105-138
- 2 Faylona JM, Qadir A, Chan AC, Lau JY, Chung SC. Small-bowel perforations related to endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) in patients with billroth II gastrectomy. *Endoscopy* 1999;31:546-549

胃肠道出血的内镜诊治

陈村龙,宋于刚,周殿元

陈村龙,宋于刚,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:陈村龙,510515,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学南方医院. cunlong@fimmu.com
电话:020-61641531 传真:020-61641531
收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-12-16

陈村龙,宋于刚,周殿元. 胃肠道出血的内镜诊治. 世界华人消化杂志 2003; 11(6):824-826

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/824.asp>

0 引言

胃肠道出血是一组临床常见的病征, 尽管大约 2/3 的消化道出血属自限性, 但总的死亡率高达 8.0-13.7%。近 10 a 来, 由于内镜诊疗技术的普遍应用, 虽然未能减少胃肠道出血的发生率, 但有充分证据表明内镜止血治疗能降低出血的死亡率, 可明显减少再出血率、输血量、急诊手术率和患者的住院费用^[1-3]。

1 胃肠道出血的分类

根据出血的部位、以屈氏韧带为界将其分为上消化道出血和下消化道出血。根据胃肠道出血量的多少、速度快慢、在肠腔内停滞时间的长短, 临床表现的不同, 可分三类: (1)慢件隐性出血:肉眼不能观察到便血, 又无明显临床症状, 仅用化验方法证实粪便潜血阳性。(2)慢性显性出血:肉眼能观察到鲜红、咖啡色呕吐物或黑色的粪便, 临床上无循环障碍史。(3)急性大量出血:肉眼观察到呕血、黑色粪便或暗红色血便, 伴循环障碍和重度贫血, 可出现低血压或休克症状, 常需紧急处理, 如延误诊疗常可导致死亡。

2 胃肠道出血的原因

2.1 上消化道出血的原因 上消化道出血原因繁多, 按照发病机制, 可粗略分为炎症溃疡性疾患、机械性疾患、血管性疾患、肿瘤、全身性疾患等五大类。上消化道大出血的病因中, 国内外文献报道基本一致, 最多见为溃疡病, 约占 50%, 其次为食管静脉曲张破裂, 再次为应激性病变和胃肿瘤^[4-6]。

2.2 下消化道出血的原因 以出血为主要症状的消化道疾病在临床上很常见, 其中多数表现为少量显性便血, 占 90%, 而隐性出血和大量出血仅各占 5%。隐性出血多发生在右半结肠和小肠。少量显性出血主要发生在结肠、直肠, 血便如为鲜红色, 以左半结肠多见, 果酱样或咖啡色以右半结肠好发。大量急性出血大部分来自结肠和小肠, 少数出血量大, 出血速度快者, 上消

化道来源也可发生。下消化道出血病因主要有:大肠息肉、大肠癌、炎症性肠病、结肠憩室、血管畸形、内痔和肛周疾病等。国内以大肠息肉最常见, 国外报道则以憩室多见^[4,5,7]。

3 胃肠道出血的内镜诊断

3.1 内镜检查的顺序及时间 (1)顺序的选择:隐性出血的病因既可来自上消化道, 也可来自下消化道, 所以应先除外饮食、药物等外源性因素造成大便隐血阳性和凝血机制异常等原因。然后行上消化道内窥镜检查, 如无异常发现, 再考虑结肠镜检查或小肠镜检查^[3,4]。显性便血一般均是下消化道病因引起, 先作肛周与直肠检查, 除外内痔和肛周疾病, 再选择结肠镜检查。急性呕血一般为上消化道出血, 首先选择胃镜检查。急性大量新鲜便血多来于下消化道, 少数也可由上消化道引起。一般先做上消化道紧急内窥镜检查, 排除病变后再做结肠镜检查^[4,7]。可疑小肠出血时可选择血管造影、同位素扫描等检查。(2)时间的选择:为了提高诊断率, 镜检时间选择十分重要。目前多数认为, 如果病情许可, 镜检时间越早越好。消化道出血内镜检查时间分出血停止时期和活动性出血期间紧急内镜检查。从诊断方面来考虑, 一般最起作用的是停止出血的 24 h 内, 因可作充分的胃肠道准备, 保证顺利地看清胃肠黏膜, 可观察到出血停止后一些痕迹变化, 如溃疡、血痂、憩室等, 但有些微小病灶在停止期可能很隐蔽或不明显而不易发现。如出血停止的间歇期不能明确诊断, 也可选择活动性出血期紧急检查。紧急检查除可诊断外, 更多的是用于内镜下止血, 但因胃肠腔内有鲜血积聚, 掩盖病灶, 妨碍观察, 常使诊断价值受到一定的限制。活动性出血期行紧急内镜检查前, 应及时备血、输血、补液、吸氧等以保证患者生命体征相对稳定, 最好先行冰盐水洗胃或清洁灌肠后再行检查。

3.2 急诊胃镜检查 近 10 a, 急诊胃镜检查已被列为急性上消化道出血的首选诊断方法, 其诊断正确率高达 85-94%^[1,8], 并可根据出血表现区分活动出血或近期出血, 前者指病灶有喷血或渗血, 后者见病灶呈褐色基底, 粘连血块、血痂, 或有隆起小血管; 见到病灶但无上述表现者即称非出血性病灶。由于采用急诊检查, 加深了对出血病因的认识。如果同时存在多个病变, 急诊检查可确定其出血所在。如肝硬变并发上消化道出血者进行急诊胃镜检查, 除了发现食管静脉曲张外, 常可发现其他原因的出血, 如糜烂性胃炎, 食管贲门黏膜

撕裂症, 胃十二指肠溃疡, 食管炎等. 急诊胃镜检查的并发症与常规镜检并无差别, 主要并发症有出血、穿孔、心肺意外、药物反应和感染等.

3.3 急诊肠镜检查 急诊肠镜检查因受肠道准备的限制, 阳性诊断率仅达 75 %^[2,7]. 作方法与常规检查基本相同, 因肠腔内有大量积血, 影响观察, 只能不断用力注水冲洗, 不用吸引以免堵塞管道, 造成检查失败. 插入时尽可能避开血凝块, 使镜头位于积血的上方进镜. 整个插入过程尽量少注气. 检查过程中, 镜管开始插入直肠后, 一面观察, 一面缓缓前进, 见到出血灶或发现插入部位肠腔已无积血, 表示镜端已超越出血部位, 宜停止前进、徐徐退出仔细检查. 对于出血灶的诊断, 以窥视下直接见到活动性渗血最可靠. 若病灶上有血凝块或陈旧性出血斑痕也有参考价值. 由于这些患者一般情况较差, 病情变化大, 不能忍受较长时间检查, 要求操作者技术熟练, 动作轻柔, 尽可能缩短检查时间. 一般认为急诊肠镜检查的并发症与常规检查无明显差别.

3.4 小肠镜检查 临床较多采用推进式小肠镜, 实际上是上消化道内镜的延长. 术前准备同胃镜检查, 多数需要静脉注射安定 10 mg 或杜冷丁 50 mg, 解痉灵 40 mg 以保持镇静和减少小肠蠕动. 小肠镜进入降部后, 拉直镜身, 将滑管送入十二指肠, 然后采用钩拉法循腔进镜, 当内镜深入达 90-100 cm 时, 镜头已到达或超过屈氏韧带, 这往往是最困难的环节, 应熟练应用钩拉法消除肠袢的锐角及镜身的弯曲, 通过调节角度钮循腔前进, 少注气, 一般均可顺利进入空肠. 通过屈氏韧带后, 镜身的走向可分为顺时针型和逆时针型两种, 以逆时针型容易插入. 小肠镜通过屈氏韧带的成功率可达 95 % 以上, 但插入的深度只能抵空肠上段, 一般达屈氏韧带下 50-80 cm. 小肠镜检查对原因不明的消化道出血最有诊断价值. 多数作者报告其对远端十二指肠和近端空肠出血的诊断率为 40 % 左右, 以动静脉畸形最多见^[9,10].

3.5 胶囊肠镜检查 胶囊肠镜是一个 11 × 30 mm 药丸大小的无线肠镜, 由电池、光源、成像系统和传送器等部件构成. 这种无创性检查不仅能达到目前内镜普遍难以达到的小肠位置, 而且可获得清晰的图像, 为小肠疾病的诊断提供了新的方法^[11]. 通过临床应用证实胶囊肠镜对小肠病变的诊断整体上优于推进式小肠镜, 尤其对那些出血量不大的复发性小肠出血有较好的诊断价值^[12]. 胶囊肠镜目前还存在着检查时间相对较长、不能进行镜下活检及治疗以及一次性使用价格相对昂贵的缺点.

3.6 术中内镜检查 怀疑肠道疾病, 剖腹探查不易确定病变性质及部位时, 可在手术台上经口或肛门或从盲肠切口插入小肠镜, 手术医师用手将肠管套在内镜上, 能够观察全部小肠黏膜, 判定原因不明的消化道出血部位, 若发现病灶, 则在肠浆膜面上留线头作记号, 待所有病灶定位后, 根据病变的性质和分布情况决定切除范围^[10]. 但对新近有出血的患者及检查时正在出血的

患者观察不满意, 人为肠套叠可引起肠黏膜损伤.

4 胃肠道出血的内镜治疗

4.1 食管胃底静脉曲张出血的内镜治疗 (1)适应证与禁忌证: 适应证包括有食管静脉曲张破裂急性出血期间; 内科保守治疗、三腔管压迫 24 h 仍有出血; 内科保守治疗出血停止 6-12 h 后; 食管静脉曲张明显, 且既往有出血病史; 不宜或拒绝外科手术的食管静脉曲张. 禁忌证包括有严重心肺功能不全、出血性休克尚未纠正; 明显凝血机制障碍或出血倾向; 有其他内镜检查禁忌证(如高血压、肝昏迷、精神分裂症等); 门脉癌栓、Budd-Chiari 综合征所致食管静脉曲张. (2)治疗方法: (a)硬化治疗: 注射部位应选择于破口下方进行, 如未发现破口, 可在食管下端近贲门处进行. 血管内注射选择曲张明显的静脉, 用 5 mm 长穿刺针斜刺入静脉后, 推入硬化剂 3-5 mL, 退针后用镜端或内镜气囊压迫穿刺点 3-5 min. 血管旁注射将硬化剂注射于静脉两旁的黏膜下组织, 注射量每点 0.5 mL 即可. 有多条静脉曲张需行多点注射时, 应避免各注射点在同一平面上, 以免术后引起瘢痕狭窄. 关于重复治疗的间隔时间, 目前意见不一致, 多数主张间隔 7-10 d 一次. (b)套扎治疗: 套扎器主要有一次性和连环套扎器. 按说明书于镜端安装套扎器, 将套扎器透明帽口接触曲张静脉, 开动吸引器将曲张静脉吸入透明帽内形成静脉瘤, 旋转套扎器把手的开关即可将前端的橡皮圈打出套住曲张静脉形成球状. 在套扎完第一条静脉后, 再选择第二条曲张静脉进行套扎, 可连续套扎 5-6 处曲张静脉. 与硬化治疗一样, 套扎时从最近贲门处开始, 螺旋形后退逐条静脉套扎. 同时伴有明显胃底静脉曲张的患者, 单纯行食管静脉套扎治疗可能加重胃底静脉曲张出血的危险, 应先行胃底静脉硬化或组织胶注射治疗, 再行食管静脉套扎. (c)组织胶注射: 尤其适用于食管胃底均有明显静脉曲张的患者, 应先处理胃底静脉曲张. 与硬化治疗的原理相同, 组织黏合剂与血液相遇后由液态迅速转化为固态, 如注入血管内能立即凝固变硬而阻塞血管. 由于组织胶黏稠度大, 在整个注射过程中严禁吸引, 助手动作要迅速、熟练, 否则很容易阻塞内镜或注射针而导致治疗失败. 曲张静脉消失时间约需 2-6 mo, 治疗次数 1-4 次. 组织胶注射对食管胃底静脉曲张急性出血的止血率为 85-100 %, 再出血发生率 2-36 %, 较普通硬化注射疗效好^[8,13].

4.2 非静脉曲张出血的治疗 非静脉曲张出血是指除了食管胃底静脉曲张之外其他各种原因引起的上消化道出血, 可为新鲜糜烂或黏膜损伤导致的渗血、小血管破裂所致的活动性出血, 内镜下止血已成为这类出血的最直接有效的方法. 止血的方法种类很多, 可概括为药物喷洒止血、药物注射止血、金属夹止血、高温凝固止血, 术者应根据自身医院所具备的治疗配件结合患者具体病情选择合适的止血措施. (1)药物喷洒止血: 适用于较大面积的弥漫性糜烂渗血, 如急性胃黏

膜病变,消化性溃疡等.在内镜直视下用喷洒导管将止血药物直接喷洒于出血面.所用的止血药物主要有1:50 000的去甲肾上腺素盐水、50 mL/L的孟氏液、凝血酶盐水溶液、生物蛋白胶等.(2)药物注射止血:适用于局灶性静脉涌血、小动脉喷血的紧急处理,如横径动脉出血、息肉切除后出血等.用内镜注射针于出血灶的四周注入止血药物,通过收缩血管和黏膜肿胀压迫止血.注射药物主要有1:10 000的肾上腺素盐水(或高渗盐水)、无水乙醇、其他硬化剂^[14].(3)金属夹止血:是近年来开发的一项新技术,适用于目标明确的小血管破裂出血.金属止血夹现多为钛夹,通过把手可控制张开或夹紧,助手将止血夹装于把手前端,术者将金属夹通过活检管道送达出血部位,嘱助手张开止血夹,对准出血点后嘱助手收紧夹子,冲洗观察止血效果,如未止血可再夹一次^[15].该方法也可与注射止血法结合应用.(4)高温凝固止血:用于出血量较大的活动性渗血,主要通过高温凝固效应达到止血目的.具体方法有高频电凝、热探头、激光、微波、氩气刀等,新近推出的氩气刀具有凝固快、穿透浅、不须紧贴组织也能起凝固作用的优点,值得推广^[16].

消化道出血量大,而且正处于出血的活动期时,胃镜检查常很难发现出血病灶,此时可通过冲洗吸引清除部分积血,或通过变换体位来寻找出血灶.有时积血太多寻找困难时不要一味强求,应当机立断外科会诊或行放射介入治疗.

5 参考文献

- 1 Sandel MH, Kolkman JJ, Kuipers EJ, Cuesta MA. Nonvariceal upper gastrointestinal bleeding: differences in outcome for patients admitted to internal medicine and gastroenterological services. *Am J Gastroenterol* 2000;95:2357-62
- 2 Ghosh S, Watts D, Kinnear M. Management of gastrointestinal haemorrhage. *Postgrad Med J* 2002;78:4-14
- 3 Fallah MA, Prakash C, Edmundowicz S. Acute gastrointestinal bleeding. *Med Clin North Am* 2000;84:1183-208
- 4 Peura DA, Lanza FL, Gostout CJ, Foutch PG. The american college of gastroenterology bleeding registry: preliminary findings. *Am J Gastroenterol* 1998;93:283-284
- 5 Wilcox CM, Clark WS. Causes and outcome of upper and lower gastrointestinal bleeding: the Grady Hospital experience. *South Med J* 1999;92:44-50
- 6 Mittal SK, Kalra KK, Aggarwal V. Diagnostic upper GI endoscopy for hematemesis in children: experience from a pediatric gastroenterology centre in north India. *India J Pediatr* 1994; 61:651-654
- 7 Anand AC, Patnaik PK, Bhalla VP, Chaudhary R. Massive lower ingtestinal bleeding-a decade of experience. *Trop Gastroenterol* 2001;22:131-134
- 8 Grace ND. Diagnosis and treatment of gastrointestinal bleeding secondary to portal hypertension. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:3039-3040
- 9 智发朝,陈村龙,杨希山. 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
- 10 卢绮萍,史陈让,李道芬. 小肠出血的诊治. *临床外科杂志* 1994; 2:292-293
- 11 Appleyard M, Glukhovskiy A, Swain P. Wireless-capsule diagnostic endoscopy for recurrent small-bowel bleeding. *N Engl J Med* 2001;344:232-233
- 12 Appleyard M, Fireman Z, Glukhovskiy A. A randomized trial comparing wireless capsule endoscopy with push enteroscopy for the detection of small-bowel lesions. *Gastroenterology* 2000; 119:1431-1438.
- 13 吴云林,钟捷,孙蕴伟. 组织黏合剂 Histoacryl 治疗消化道急性出血. *中华消化内镜杂志* 1998;15:90-91
- 14 Chung SC, Leung JW, Leong HT, Lo KK. Adding a sclerosant to endoscopic epinephrine injection in actively bleeding ulcers: a randomized trial. *Gastrintest Endosc* 1993;39:611-615
- 15 吴云林,钟捷,袁耀宗. 经内镜金属钛夹治疗消化道急性出血. *中华消化杂志* 1998;18:251-252
- 16 Johanns W, Luis W, Janssen J, Kahl S, Greiner L. Argon Plasma coagulation (APC) in gastroenterology: experimental and clinical experiences. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:581-587

介入内镜学在胆胰疾病中的应用

刘思德

刘思德,中国人民解放军第一军医大学南方医院消化科 广东省广州市 510515
项目负责人:刘思德,510515,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学南方医院消化科. liuside@msn.com
电话:020-61641534 传真:020-87280770
收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-12-18

刘思德. 介入内镜学在胆胰疾病中的应用. 世界华人消化杂志 2003;11(6): 827-828

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/827.asp>

0 引言

1968 年经内镜逆行胆胰管造影(ERCP)用于临床以来^[1], 人们第一次在内镜下经造影将胆胰管显示清楚, 使胆胰疾病的诊治提高到了一个新的水平. 1974 年 Katagi et al^[2]首先将经口胰管镜(peroralpancreatroscope, PPS)应用于临床, 可直接观察到胰管内的情况. 同年 Kawai 和 Classen et al^[3,4]首次采用内镜乳头括约肌切开(EST)治疗胆总管结石, 开创了不用开刀, 经口取出胆总管结石的历史. 1983 年 Starizu et al^[5]首创经内镜乳头气囊扩张(EPBD)治疗胆总管结石, 他将成为一种可保留括约肌功能的取石方法. 近年来, 随着内镜技术的提高及内镜医师经验的积累, 介入内镜技术已越来越广泛地应用于胆胰疾病的诊疗中, 并已成为微创外科的一个重要分支, 本文重点介绍目前常用的介入内镜技术在胆胰疾病诊疗中的应用现状及进展.

介入内镜在胆胰疾病诊治方面的常用技术主要包括胆道镜技术、十二指肠镜技术、胰管镜技术和超声内镜技术.

1 胆道镜的应用

1937 年 Huard 开展了经皮经肝的胆管穿刺造影术(PTC). 1941 年 McIver 与 Wappler 设计了硬性胆道镜. 1953 年 Widegans 设计了新型硬质胆道镜. 1962 年 Glenn et al 在 PTC 的基础上开展了经皮经肝胆管引流术(PTCD), 并为随后的术前胆道镜的应用开辟了通路. 1965 年美国医师 Shore 与 ACMI 公司研制成功软性胆道镜, 此后于 1970 年代末、1980 年代初, 胆道镜技术已广泛应用于肝胆胰疾病的诊断与治疗, 胆道镜在诊断方面其突出的优点是他能够直视胆管内部真实面貌, 鉴别胆管内结石、肿瘤、血块、气泡、蛔虫等, 并对可疑病灶取活体组织以做病理确诊. 术中术后胆道镜检查再配合以碎石技术, 在胆管插管气囊扩张技术的基础上, 可明显降低肝内胆管结石的残石发生率, 使胆道术后残石的发生率降至 2% 以下, 国内一组 826 例报道, 术中术

后利用胆道镜技术使结石取净率达 97%^[6], 短期随访效果满意. 胆道镜的另一特点是他可以进入病理扩张的 III - IV 级肝内胆管, 克服了外科手术在肝内的盲区. 因为有结石的胆管其结石之上经常有扩张, 尽管开口处可能有膜样狭窄, 胆道镜一般都能进入扩张的 II 级或 III 级肝管, 通过网篮或加压冲洗等方法可以取出更远一级(III 级或 IV 级)肝管结石.

2 十二指肠镜技术的应用

十二指肠镜技术即经内镜逆行胰胆管造影(ERCP)、经内镜乳头括约肌切开术(EST)、经内镜胆管引流术(ERBD)、经内镜鼻胆管引流术(ENBD)、经内镜胰管引流术(ERPD)及子母镜技术. (1)ERCP: ERCP 技术经过 30 a 的发展, 目前已成为诊疗胆胰疾病的常规方法, ERCP 所得的“胆管树”可形象地提示结石、肿瘤、蛔虫、畸形, 并标示出位置. 特别是壶腹癌的早期诊断是 ERCP 检查的独到之处. ERCP 可清晰直观地显示胆管胰管的分支走行及变异, 可精确定位胆道系统的病变, 对外科医师制定手术计划有极大帮助. ERCP 又是目前诊断慢性胰腺炎、胰腺结石、肿瘤常用和可靠的方法, 是诊断胰腺分裂的唯一方法. 并可于清醒状态下非手术获取人体胰液进行胰液微量元素检测和癌基因的研究. (2)EST: 主要适用于胆总管结石的治疗, 占适应证的 80% 以上, 急性胆源性胰腺炎、急性胆管炎、乳头狭窄、乳头癌等均可采用. 以往 EST 对大结石的取石效果不理想, 在网篮机械碎石(ML)等碎石方法应用后明显提高了 EST 的取石效果, 成功率明显上升. 文献[7-10]报道 EST 成功率 85-98%, 结石 1 次清除率 89-95.7%^[7,8,10,11], 但这与结石性质, 大小、多少等因素有关. (3)EPBD: 通过十二指肠镜达到十二指肠乳头, 用球囊扩张乳头, 使其开口扩大, 达到自然排石或用球囊或网篮取石. 这种方法侵入性小, 不破坏括约肌的解剖结构, 术后乳头括约肌功能基本恢复^[12]. EPBD 成功率 85-100%^[10,13,14], 主要用于直径<12 mm 的胆总管结石. (4)经口胆道子母镜(PCS): 胆道子母镜临床应用已 10 年以上, 是诊治复杂胆道疾病的一种有效方法. 该系统由子镜和母镜组成, 操作时先将母镜插至十二指肠乳头, 子镜通过母镜活检孔道送入, 在两名操作者密切配合下将子镜插入胆道后, 即可在直视下对胆道内病变情况进行诊断, 治疗. 配合内镜液电碎石(EHL)或激光碎石(LL)可治疗胆结石. 主要用于治疗胆道内巨大结石、嵌顿结石、Mirrizzi 综合征、网篮取石失败等. 但子母镜因价格昂贵、子镜易损

坏、技术难度较大等原因临床未能广泛应用。

3 胰管镜技术的应用

1974年Katagi和Takekoshi首先将经口胰管镜(peroralpancreatroscope, PPS)应用于临床,可直接观察到胰管内的情况。随后Rosch et al及Nakamura et al相继应用胰管镜观察胰管。但是由于当时设备及技术均较落后,胰管镜难以获得清晰的图像,且易损坏,缺乏活检及细胞刷检的操作孔,因此限制了他的临床应用。1990年代以后,随着技术和设备的不断改善,特别是电子胰管镜的出现,使胰管镜的成像越来越清晰,可早期发现细微的病变。镜身也更加耐用,不易损坏。此外有的胰管镜还增加了记忆合金套管、气囊等附件,使胰管镜的操作更加灵活,并能够进行活检、细胞刷检,甚至能进行镜下治疗。目前胰管镜的应用包括(1)不明原因的胰管扩张。(2)胰管狭窄,主要用于胰管良恶性狭窄的鉴别诊断。(3)临床怀疑胰腺癌。(4)慢性胰腺炎。(5)可疑结石导致的梗阻性胰腺炎。(6)胰管内占位性病变。(7)胰管镜下的治疗:应用精细的探头和配件,能在管道内进行某些治疗如胰管内结石的碎石治疗。

4 超声内镜技术及介入性超声内镜技术

内镜超声(EUS)检查自1980年首次应用于消化领域的诊断以来,为内镜下诊断开辟了一个全新的领域,20 a的迅速发展使之成为一种较为成熟的内镜诊断技术,很大程度地增加了内镜的应用范畴,提高了内镜的诊断能力,是临床一种很有价值的非介入性诊断手段。1990年代初,随着凸面线阵型超声内镜的诞生,借助超声内镜引导下的一系列介入治疗也随即应运而生。采用直径2 mm、频率7.5-30 MHz的微细超声探头,能通过普通胃镜活检孔插入到十二指肠乳头开口及胆总管或胰管内进行管腔内超声内镜检查(intraductal ultrasonography, IDUS)。利用这项检查的优势还可取胆汁、胰液进行生物化学分析或脱落细胞检查等。在IDUS基础上又开展了管腔内彩色多普勒超声检查(intraductal color doppler ultrasonography, ICDUS),能更清楚地显示肿瘤区域血管分布和改变等情况,如门静脉受压或其内癌栓形成等。三维腔内超声(three dimensional intraductal ultrasonography, 3D-IDUS)是对IDUS图像作电脑三维影像处理,对进一步了解肿瘤的形态、大小、浸润程度等情况很有价值。

通过超声内镜引导下细针穿刺术(endoscopic ultrasonography fine needle aspiration, EUS-NA)对可疑病灶及淋巴结取活检,作病理检查。EUS-FNA不仅较安全,有效,对患者痛苦小,且对壶腹周围占位性病变的诊断和鉴别诊断很有参考价值。EUS引导下注射治疗术

(EUS-FNI):在EUS引导细针穿刺的基础上,可以将药物或免疫细胞通过穿刺针对病灶内部进行局部注射,以达到预期的治疗目的。EUS引导下囊肿穿刺引流术(EUS-drainage)^[15]:在EUS的实时引导,尤其是彩色多普勒扫描的协同下,可以准确、清晰地判定囊肿的具体位置及与胃肠壁之间的血管分布情况,并测定距离和确定穿刺方向,较常规内镜或X线介导下的穿刺更为安全可靠。据目前已有的文献资料,总有效率为80-90%。大多数患者的假性囊肿于术后2 wk左右开始缩小,4 mo左右消失。EUS引导下射频切除术(EUS-RFA)。在EUS引导下,将带有射频发生器的穿刺针通过胃壁穿刺入胰腺内肿瘤组织,然后以射频高温使肿瘤组织发生坏死,以期达到射频切除的治疗目的。

5 参考文献

- 1 McCune WS, Shorb PE, Moscovitz H. Endoscopic cannulation of the ampulla of Vater: a preliminary report. *Ann Surg* 1968; 167:752
- 2 Katagi K, Takakoshi T. Endoscopic diagnosis of pancreatic cancer. *Stom Intest* 1974;9:1533-1541
- 3 Kawai K, Akasaka Y, Murakumi K. Endoscopic sphincterotomy of the ampulla of Vater. *Gastrointest Endo* 1974;20:148
- 4 Classen M, Demling L. Endoskopische sphincterotomie der papilla Vateri und staintextraktion aus ductus choledochus. *Dtsch Med Wochenschr* 1974;99:496
- 5 Starizu Oo M, Ewek, Meyer Z. Endoscopic papillary dilatation (EPD) for treatment of common bile duct stones and papillary stenosis. *Endoscopy* 1983;15:197
- 6 Wojtum S, Gil J, Gietka W. Endoscopic Sphincterotomy for choledocholithiasis: A prospective Single-Center on the short-term and long-term treatment results in 483 patients. *Endoscopy* 1997; 40:697
- 7 Choudari CP, Fogel E, Gottlieb K, Sherman S, Lehman GA. Therapeutic biliary endoscopy. *Endoscopy* 1998;30:163-173
- 8 今阳一,吉浜丰,増田卒淳[ほか],碎石,除石法.と成績-机械的碎石.胆と卒 1993;14:1257
- 9 Bergman J, Rauws E, Fockens P. Randomised trial of endoscopic balloon dilation versus endoscopic sphincterotomy for removal of bile duct stones. *Lancet* 1997;349:1124
- 10 Hammarström LE, Holmin T, Stridbeck H. Endoscopic treatment of bile duct calculi in patients with gallbladder in situ: long-term outcome and factors predictive of recurrent symptoms. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:294
- 11 Mathuna P, Siegenberg D, Gibbons D. The acute and long-term effect of balloon sphincteroplasty on papillary structure in pigs. *Gastrointest Endosc* 1996;44:650
- 12 Mathuna P, White P, Clarke E. Endoscopic balloon sphincteroplasty papillary dilatation for bile duct stones: efficacy, safety, and follow up in 100 patients. *Gastrointest Endosc* 1995;42:468
- 13 Song SY, Lee DH, Chung JB. Endoscopic removal of common bile duct stones without sphincterotomy. *Gasterentology* 1996; 110:A476
- 14 Fockens P, Johnson TG, van Dullemen HM. Endosonographic imaging of pancreatic pseudocysts before endoscopic transmural drainage. *Gastrointest Endosc* 1997;46:412-416
- 15 Goldgerg SN, Mallary S, Gazelle GS. EUS-Guided radiofrequency ablation in the pancreas: results in a porcine model. *Gastrointest Endosc* 1999;50:392-401

老年期消化性溃疡与恶性肿瘤溃疡、应激性溃疡的鉴别

吴保平, 肖冰

吴保平, 肖冰, 中国人民解放军第一军医大学南方医院消化内科研究所
广东省广州市 510515
项目负责人: 吴保平, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学南方医院. bpwu@263.net
电话: 020-61641556 传真: 020-87705671
收稿日期: 2002-11-06 接受日期: 2002-11-29

吴保平, 肖冰. 老年期消化性溃疡与恶性肿瘤溃疡、应激性溃疡的鉴别. 世界华人消化杂志 2003;11(6):829-830

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/829.asp>

0 引言

近十多年来的统计资料表明, 随着社会的老齡化, 消化性溃疡老年患者的比率呈增高趋势. 老年期消化性溃疡临床表现多不典型, 有许多方面与青壮年消化性溃疡不同. 老年人十二指肠溃疡发病率等于或少于胃溃疡; 老年人消化性溃疡患者中无症状或症状不明显者的比率较高, 疼痛多无规律, 食欲不振、恶心、呕吐、体重减轻、贫血等症状较为突出^[1]. 因而, 了解老年期消化性溃疡的特点, 重视其与恶性肿瘤溃疡、应激性溃疡的鉴别对采取适当的治疗十分重要.

1 老年期消化性溃疡的特点

1.1 临床症状不典型, 甚至无症状 老年患者的痛觉迟钝, 其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, 以出血症状首发者约占13%. 老年期溃疡多在因其他疾病作内镜或X线钡餐检查时被发现, 或当发生出血、穿孔等并发症时, 甚至于尸体解剖时始被发现. 其合并霉菌感染机会较一般消化性溃疡多; 胃酸水平较低^[2,3].

1.2 胃溃疡多见, 直径常可超过2.5 cm, 且多发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. 胃镜检查所见: 溃疡规则, 呈圆形或椭圆形, 边缘锐而光整、充血; 基底平滑, 覆灰白或灰黄色苔; 周围黏膜柔软, 皱襞常向溃疡集中; 胃壁有正常蠕动. 老年期易发生巨大溃疡, 即胃溃疡直径>3 cm, 十二指肠溃疡直径>2 cm. 巨大十二指肠溃疡多发于球后壁或球后, 疼痛常放射至背部, 溃疡可穿透至胰腺, 并易发生狭窄及梗阻^[4,5].

1.3 X线钡餐检查^[1,2] 龛影位于胃腔外, 呈圆形或椭圆形, 边缘光滑, 由于溃疡周围组织的炎症和水肿, 龛影周围可出现透亮带. 在愈合过程中, 因溃疡部位纤维组织增生和收缩, 出现黏膜皱襞向溃疡集中的现象. 此外, 还可发现局部痉挛、激惹、十二指肠球部畸形和局部压痛等, 这些均为溃疡的间接征象. 需注意的是,

巨型十二指肠溃疡(即直径>2.0 cm)可与十二指肠球正常的上、下穹窿, 甚至整个十二指肠球极为相似. 在缺乏肯定溃疡壁龛的情况下, 提示十二指肠溃疡病的X线所见是十二指肠球部畸形. 造成畸形的原因不外乎是痉挛、黏膜水肿、瘢痕收缩和十二指肠周围粘连. 常见的畸形有: (1)球部一侧, 通常是大弯侧的痉挛性切迹; (2)十二指肠球持续性痉挛和(或)纤维化引起的“三叶草”畸形; (3)十二指肠球部上或下穹窿消失; (4)幽门管偏位; (5)十二指肠球整个痉挛或严重瘢痕收缩引起的球部极度变小, 甚至成为不规则的硬管, 此时常伴有梗阻.

1.4 并发症随年龄而有所增加, 出血最为常见 消化性溃疡合并出血占老年人上消化道出血的30-50%, 其中胃溃疡居多(59%), 这与老年人胃黏液分泌减少、黏膜退行性变、动脉硬化和微循环供血不足导致黏膜屏障防御功能减退有关. 溃疡患者在发生出血前常有上腹疼痛加重的现象, 但一旦出血后, 上腹疼痛多随之缓解. 老年患者并发出血前可无症状. 并发大出血率占老年消化性溃疡20%以上, 出血量与临床表现不一致, 并且易发生出血后的序贯性器官功能损害, 因而随着年龄增长合并出血的危险性亦增加^[6,7].

1.5 人群调查显示, 60岁以上的老年人中有10-20%曾经或正在使用非甾体消炎药(NSAIDs), 加拿大和美国一些地区使用该类药物的老年人达27-40%, 6%的患者服用该类药物的时间为全年的75%以上^[8]. NSAIDs类药物副作用广泛, 临床上最常见者为消化不良、溃疡形成、出血、穿孔甚至引起死亡. 许多研究表明, NSAIDs可使消化性溃疡的并发症增加3-5倍, 来自不同人群的资料估计, 在全部消化性溃疡的并发症中约15-35%为NSAIDs所致. 在美国老年人中约41 000例住院患者和3 300例死亡患者与NSAIDs有关^[9]. 由于老年人群因心、脑血管病变及关节病变服NSAIDs机会多, 而胃黏膜防御机制及耐受性又较差, 故NSAIDs极易引起老年人消化性溃疡. NSAIDs对老年人的胃黏膜均产生不同程度的损害, 其中以糜烂出血性胃炎及胃体胃窦多发性浅表溃疡最多, 部分表现为巨大溃疡和复合性溃疡. 老年性NSAIDs溃疡的临床表现多样化, 部分患者无明显的消化道症状, 且NSAIDs溃疡的症状与胃镜下表现缺乏相关性, 除了常见的腹痛、呕血、黑便等症状外, 应注意无痛性黑便和消化不良的症状^[10].

1.6 老年期消化性溃疡愈合较低慢 由于代谢率低, 黏膜血液灌注不足, 上皮修复功能差等所致. 另外, 老

年期消化性溃疡幽门螺杆菌(Hp)感染率高达60%以上,高于青壮年消化性溃疡的Hp感染率^[11].

2 恶性肿瘤溃疡的特征

2.1 多见于老年人,病史呈进行性持续性发展,病程较良性溃疡为短,粪便潜血多持续阳性.全身表现(如转移后)多明显,抑酸药治疗效果差.

2.2 胃镜检查所见^[12,13] 早期胃癌凹陷型有较为明显的溃疡,凹陷多超过黏膜层,有时与良性溃疡不易鉴别,超声胃镜可发现黏膜第一层和第二层结构紊乱,第三层仍保持完整和连续性;黏膜下层癌时,可见癌肿浸润引起的黏膜第三层不规则和狭窄,但无中断现象.超声胃镜还有助于发现早期胃癌有无局部淋巴结转移.中晚期胃癌溃疡及糜烂的边缘隆起,凹凸不平,较硬而脆,污秽不规则,有虫蚀样改变.溃疡呈阶梯样凹陷,基底可能残存岛状黏膜,覆污秽苔,触之易出血.周围黏膜增厚,皱襞中断呈杵状或虫蚀样,或断端呈“U”形、“V”形融合等.胃壁蠕动减弱或消失.胃镜检查时取病变部位组织及刷取细胞作病理检查提示有中-重度不典型增生或异型细胞浸润.

2.3 X线钡餐检查^[12] 龛影位于胃腔内,呈三角形或不规则形,边缘不齐.龛影周围无透亮带.癌性浸润致周围黏膜隆起成结节状或息肉状,增厚而不规则、僵硬,皱襞中断,断端呈杵状、边缘毛糙.

2.4 血清胃蛋白酶原Ⅰ及胃蛋白酶原Ⅰ/Ⅱ之比增高,肿瘤标志物CEA、CA19-9、CA₁₂₅等癌胚抗原及单克隆抗体可增高,但这些检测假阳性与假阴性较高,特异性不强^[11,13].

2.5 老年恶性溃疡患者易被误诊 有资料显示60-69岁年龄组误诊率较高.多误诊为消化性溃疡、慢性胃炎等.老年人反应迟钝,缺乏典型病史,症状隐匿或较轻,未能及早行胃镜及X线检查而延误诊断.胃癌早期缺乏典型的特异症状及体征,随着病情的发展可逐渐出现非特异的酷似胃炎或胃溃疡的症状,如上腹饱胀不适、隐痛、返酸、嗝气、恶心、呕吐、纳差、黑便等,多数患者服药后症状可一度减轻,未再进一步检查而延误诊断.部分患者对胃镜检查有恐惧心理,症状不突出时拒绝行胃镜检查导致延误诊断^[14-16].对转移灶引起症状缺乏认识,胃癌可经淋巴道、血道、腹膜种植等方式转移而出现各种不同的症状及体征,常常原发病灶较小,病变轻,但已有远处转移,可不出现消化道症状,极易延误诊断.因此,及早行胃镜及X线检查并适时进行病理组织学检查,对良、恶性溃疡的最终鉴别和及时诊断具有极为重要的意义^[17].

3 应激性溃疡的特点

3.1 有严重烧伤、颅脑外伤、脑肿瘤、颅内外科手术和其他中枢神经系统疾病、严重外伤和大手术、严重的急性或慢性内科疾病(如脓毒血症、呼吸衰竭)等病史.

3.2 主要表现是上消化道出血,多发生在上述疾病2-15d,轻者仅粪便潜血阳性,重者可呕血和(或)黑便,可出现贫血和休克症状,往往难以控制.这是因为应激性溃疡发生急剧,位于溃疡下面的血管未能形成血栓的缘故.除非Cushing溃疡,穿孔少见.出血前往往无胃肠道症状,少数患者有上腹隐痛或不适感^[18].

3.3 内镜检查特征^[18,19] 胃黏膜广泛糜烂及表面上皮不规则损害,溃疡多发生于高位胃体,也可扩展至胃远端,呈多发性浅表性不规则的溃疡,不穿过黏膜肌层,不易引起穿孔.但中枢神经系统损伤所致的Cushing溃疡往往穿透胃壁各层而引起穿孔.溃疡直径在0.5-1.0cm,甚至更大.溃疡愈合后不留瘢痕.

3.4 诊断在相当程度上依靠病史和临床表现.任何经受应激性刺激,既往无消化性溃疡病史的患者,突然出现上消化道出血时,应考虑应激性溃疡的可能.由于溃疡表浅,上消化道钡餐阳性率仅5-10%,急诊胃镜检查可以确诊^[19].

总之,老年期消化性溃疡与恶性肿瘤溃疡、应激性溃疡的鉴别应结合病史、临床表现、及早行胃镜及X线检查并适时进行病理组织学检查进行综合判断,以达到及时诊断和治疗的目的.

4 参考文献

- 1 陈灏珠.实用内科学.第10版.北京:人民卫生出版社,1999:1568-1574
- 2 叶任高.内科学.第5版.北京:人民卫生出版社,2001:401-403
- 3 秦光梅,杨天文,王新,张成芳,郑洁.青年与老年消化性溃疡的临床特点分析.第三军医大学学报 2001;23:1114
- 4 祖毅,秦光梅,王新.消化性溃疡的临床分析.中华消化内镜杂志 1999;14:40-41
- 5 郭惠学,周怀力,王文栋,朱云清.老年人上消化道出血临床分析.中国腹部疾病杂志 2001;1:408-409
- 6 James JF, Lawrence SF. Gastrointestinal bleeding in older people. *Gastroenterol Clin Nor Am* 2000;29:1-36
- 7 Tambllyn R, Berkson L, Dauphinee WD. Unnecessary prescribing of NSAIDs and the management of NSAID-related gastropathy in medical practice. *Ann Intern Med* 1997;127:429-438
- 8 Wilcox CM. Relationship between nonsteroidal anti-inflammatory drug use, *Helicobacter pylori*, and gastroduodenal mucosal injury. *Gastroenterology* 1997;113(Supple):S85-89
- 9 汤金海.老年人非甾体类消炎药相关性胃病162例临床分析.中国腹部疾病杂志 2001;1:324-325
- 10 Vandenplas Y. *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol* 2000;6:20-31
- 11 吴云林.胃癌内镜诊断和治疗.新消化病学杂志 1996;4:106-107
- 12 李蜀予.388例胃良、恶性溃疡内镜分析.中国内镜杂志 1996;2:34-36
- 13 王冠庭.胃癌早期诊断与治疗的新进展.华人消化杂志 1998;6(特刊7):62-65
- 14 袁卫忠,查彩琴,陆承涵.17例老年人良恶性溃疡误诊分析.现代中西医结合杂志 2001;10:1795-1796
- 15 刘福坤,陈忠豪,李国立,祁晓平,许哲,黎介寿.胃癌术前介入治疗后血管变化与癌组织坏死的关系.华人消化杂志 1998;6:686-688
- 16 郭瑞明,李宝寅.老年胃癌的诊断与治疗.中国腹部疾病杂志 2001;1:62-63
- 17 潘国宗,曹世植.现代胃肠病学.北京:科学出版社,1994:951-957
- 18 徐克成,江石湖.消化病现代治疗.第1版.上海:上海科技教育出版社,2001:65-66
- 19 崔振华.严重外伤并发应激性溃疡大出血14例外科治疗.中国腹部疾病杂志 2001;1:200-201

老年人消化道急症

黄纯炽

黄纯炽,中国人民解放军第一军医大学珠江医院 广东省广州市 510282
项目负责人:黄纯炽,510282,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学珠江医院. huangcc@fimmu.com
电话:020-61643170
收稿日期:2002-11-06 接受日期:2002-11-20

黄纯炽. 老年人消化道急症. 世界华人消化杂志 2003;11(6):831-833
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/831.asp>

1 老年人急症的特点及急救原则?

老年急症是指老年人突然发生的疾病和意外,有时还包括一些慢性疾病的骤然加剧,如肝硬变并发食管静脉曲张破裂出血、各种急腹症等.老年急症通常有以下特点:(1)一人多病,体征多而复杂;(2)自觉症状和体征不典型;(3)容易发生水、电解质和酸碱平衡紊乱;(4)容易发生意识障碍和精神症状;(5)易发生药物不良反应;(6)病程长,恢复慢;(7)并发症多,死亡率高.老年急症的急救原则:“生命第一”是最基本的原则,因此,一旦发现,应立即进行抢救,抢救工作应持续进行不能中断,直至病情稳定;同时还必须早期诊断、早期治疗,以防止合并症的发生,造成多器官功能衰竭.

2 老年人急症检查与诊断的基本原则?

随着医学科学的蓬勃发展,许多新的辅助检查方法层出不穷,如新型电子内镜、选择性血管造影(SAG)、CT、MRI等.这些辅助检查给临床诊断提供了必要的工具,有时甚至在疾病的诊断中起到了决定的作用.但是,就目前的技术条件而言,即使是最先进的仪器和实验室检查,都不能完全避免假阳性和假阴性结果的出现.对老年人来说,某些特殊检查(如SAG)还可能出现不良并发症.老年急症患者往往病情重、变化快,常常来不及作特殊检查就必须作出临床初步诊断和拟定治疗方案.辅助检查无论如何也代替不了病史、临床症状和体征的分析.因此在急症救治过程中,既不能坐等特殊检查结果,更不能盲目轻信或完全依赖辅助检查结果,尤其是当它们与临床表现相矛盾时,应以病史、临床症状、体征和病情的动态变化作为诊治的首要立足点和出发点.只有这样才能及时作出正确的诊断和有效的挽救患者的生命.

3 老年人急症诊疗过程中有哪些要求?

(1)争分夺秒,及时处理:老年人体质虚弱、器官代偿功能差,出现急症前来就诊时病情往往已相当严重,还可能在短期内迅速恶化.因此必须尽快作出诊断,及时处理.对某些一时不能明确诊断的疑难病例,则应先抢

救生命,密切观察病情变化,边治疗、边检查、边修正抢救方案,以免贻误抢救时机.(2)询问病史和体格检查既要全面细致,又要重点突出:消化道急症最突出的表现是消化系统的症状和体征,但这些症状和体征往往并非消化系疾病所独有,如急性上腹痛,也可能是急性心肌梗死^[1,2]、夹层动脉瘤破裂或下叶肺炎的首发症状.因此,问病查体时要有全局观念,既要突出重点,又要全面细致,以免误诊.(3)高度警惕消化系恶性肿瘤:因老年人消化系恶性肿瘤的发生率和死亡率均高居前列,在问病查体时应特别注意癌瘤的征象,一旦发现可疑线索,应作进一步检查,以尽快确诊,避免耽误手术时机.(4)进行某些特殊检查要慎重:老年人的病理生理特点决定了他们在作某些特殊检查时容易发生意外,如内窥镜检查、血管造影术、ERCP等.作这些检查应持慎重态度,对患者的情况应有充分的估计,权衡利弊后再作决定.病情需要而必须作这些检查时,应做好签字手续,小心操作并做好必要的急救准备.

4 老年人上消化道出血的临床特点?

(1)在病因上,由于老年人有其好发的疾病谱,引起出血的原因与青壮年不完全相同,青壮年是十二指肠球部溃疡和食管静脉曲张破裂,而老年人则是胃溃疡和胃癌^[3-5].此外,急性胃黏膜病变、药物性胃炎、食管癌、食管贲门黏膜撕裂综合征和Dieulafoy病也是老年人上消化道出血的重要病因;(2)在临床表现方面,由于老年人血管弹性差,不易止血^[5],常以头昏、乏力、心悸等贫血症状就诊或突然进入休克.由于器官功能趋于衰退,一旦消化道出血则很容易发生其他脏器功能不全甚至衰竭,其发生率可高达22%,出血量超过2000mL者,100%有严重脏器受损,受累器官以心血管占首位,主要表现为心律失常、心肌梗死^[6,7]和心力衰竭等;(3)除容易并发上述心血管并发症外,还常并发脑梗塞^[8]、肾功能衰竭和感染等;(4)在诊断方面,急诊胃镜检查虽然也适用于老年人,且普遍认为比较安全,但老年人的病理生理特点决定了其并发症的发生率要高于青壮年,因此,检查前要做好术前谈话并签字,同时需补充血容量、做心电图并做好必要的急救准备.

5 老年人上消化道出血的救治中应注意哪些方面的问题?

(1)护理上,由于老年人的各种反应较迟钝,如患者有呕吐时,易发生窒息或吸入性肺炎,因此,应使患者的头侧卧;(2)由于老年人对缺血的耐受性差,输

血指标应适当放宽,但输血、输液的量和速度一定要全面考虑,以免发生肺水肿和急性心力衰竭;(3)老年患者多有动脉硬化、血液黏稠度大和脏器血供不足,在选用止血方法和止血药物时要考虑这些因素,一般主张应用以抑制胃酸分泌的药物和局部作用的止血药物、方法为主,如静脉应用 H_2 受体拮抗剂或质子泵抑制剂和胃内(经胃管或口服)冰盐水+去甲肾上腺素,云南白药,凝血酶,氢氧化铝凝胶或磷酸铝凝胶(吉福士凝胶);或经内镜直视下止血.尽可能避免静脉使用对凝血和纤维蛋白降解过程有直接作用或对全身血液循环有明显影响的止血药物,如止血环酸^[8]、血管加压素等,以免诱发心脑血管意外.但可以应用止血敏、安络血和生长抑素(施他宁)及生长抑素类似物(奥曲肽)^[9]。(4)要注意保护心、脑、肾等重要器官功能。

6 老年人下消化道出血的临床和诊治特点?

下消化道出血是指 Treitz 韧带以下的消化道出血.空肠与回肠病变引起的出血相对比较少见,因此下消化道出血主要来自大肠的病变.老年人下消化的出血的病因与老年疾病谱有关,恶性肿瘤(主要是大肠癌)占53%以上,肠息肉约占20%,其他尚有溃疡性结肠炎、恶性淋巴瘤、小肠腺癌、肠血管畸形、肠憩室病、缺血性肠炎和肛肠疾病等.因此,对老年人下消化道出血者,应首先作直肠指诊及纤维(电子)肠镜检查,如大肠未发现出血性病变者,再检查小肠.在止血治疗方面,针对不同的病因而选择不同的方法,包括抗炎、内镜下息肉摘除、选择性动脉止血药物灌注或栓塞等.全身应用止血药物应注意的事项同上消化道出血.由于老年人下消化道出血病因的上述特点,决定了其中多数患者需要外科手术治疗,术前应尽可能明确出血部位和原因,如果术前无法明确或因挽救生命而需要进行紧急手术的大出血患者,可在术中行纤维镜检查协助寻找出血部位和原因。

7 肠缺血综合征的定义?有何临床表现?

肠缺血综合征(intestinal ischemia syndrome)是一组因小肠、结肠供血不足而发生的以急性缺血性病变为特征性疾病,主要累及结肠脾曲及其相邻的横结肠和降结肠^[10],也可累及小肠.本症在临床上可分为急性肠缺血和慢性肠缺血,多见于老年人,60岁以上者发病率最高^[10].急性肠缺血包括急性肠梗塞和缺血性结肠炎,前者以突然发作的脐周绞痛、进行性加重并迅速进展为弥漫性疼痛、阵发性加剧为主要症状,多数伴呕吐,呕吐物为暗红色血样液体,不含血块,可同时排黏液大便或鲜血便,随后出现发热、肠梗阻、肠穿孔^[11]、腹膜炎的症状和体征,肠穿孔后数小时内常出现外周循环衰竭;后者的典型表现为突发左季肋部或左下腹部绞痛,排鲜血便或血水样便为其特征性症状之一.直肠指诊时,二者均可见指套血染。

8 如何诊治肠缺血综合征?

由于该病症状并无特异性^[12],早期诊断有一定困难,关键对本征有无足够的认识.可依据下列几点进行诊断:(1)老年患者突然出现急性腹痛,持续2-3h仍不能缓解,即应考虑本征的可能.如有便血、腹部压痛、腹膜炎的表现,腹腔穿刺有浆液血性液体,对本病诊断帮助更大;(2)急性肠梗塞时血白细胞升高,常达 $20.0 \times 10^9/L$ 以上,中性粒细胞比例增高,血红蛋白下降,大便潜血阳性或全血便,血淀粉酶升高,但不超过正常值的2倍;(3)腹部立位平片:小肠内无气体,表示有小肠阻塞的可能;若出现麻痹性肠梗阻,可见肠内大量积气,肠壁水肿增厚,边缘呈锯齿状或乳头状突起;重者可见气腹征或结肠壁内线形气影;(4)钡剂灌肠X线摄片:急性期可见拇指印征(thumb printing),又称“假瘤征”(psudotumor),即结肠边缘呈弧形切迹;(5)纤维肠镜检查:病变变化迅速是本病肠镜所见之特点(急性期、3-5d后和数周后检查所见变化很大).急性期病变部位肠黏膜水肿、出血,暗红色黏膜突向肠腔,有浅表坏死、溃疡,覆有灰白色膜.活组织检查,黏膜有广泛坏死性改变^[10].但如疑有肠穿孔、腹膜炎时禁止行肠镜检查。(6)肠系膜动脉造影时,下列征象有一定价值:肠系膜上动脉分支变窄;肠血管分支不规则;动脉弓痉挛;透壁血管充盈受损。

急性肠缺血的治疗要遵循以下原则:(1)禁食,用胃肠外营养支持;(2)扩充血容量,但纠正休克时,禁用升压药,治疗心功能不全时,禁用洋地黄类药物;(3)纠正水、电解质和酸碱失衡;(4)应用广谱抗生素;(5)持续(低流量)给氧;(6)可肛管排气及低压排便灌肠,但应避免肛管插入过深和高压灌肠;(7)解痉镇痛,腹痛时可予解痉剂,一般不予镇痛剂,除非已确诊.禁用肾上腺皮质激素。(8)抗血管阻塞:可用肝素抗凝、链激酶溶栓和静滴低分子右旋糖酐等,选择性肠系膜动脉插管加压滴注罂粟碱^[12]对严重动脉痉挛而无血栓形成者有效。(9)外科治疗:如疑有肠坏死、肠穿孔时应及时手术^[12],这是避免肠管广泛坏死、挽救生命最有效的方法.根据发病时间长短和病变程度,可采用摘栓或肠管切除。

9 老年人急性胰腺炎的临床特点?

以往认为,60岁以上的老年人急性胰腺炎的发病率低,但事实证明,老年人急性胰腺炎并不少见,约占总数的10-20%^[13].与青壮年相比,老年急性胰腺炎有以下临床特点:(1)胆道疾病^[13]和酗酒仍为老年人急性胰腺炎的主要病因,但老年人服药的品种较多,药物(如肾上腺皮质激素、噻嗪类利尿剂等)引起急性胰腺炎的机会增多,同时,老年人常伴动脉粥样硬化,发生急性胰腺炎时,可因血液灌注降低而加重胰腺的缺血坏死;(2)临床表现不典型^[14],病情隐匿,容易漏诊,老年患者的腹痛可以极轻微或全无腹痛.我院曾收治1例73岁高龄坏死型胰腺炎患者,从病程开始至出现胰腺脓肿的整个过程均无明显腹痛.极少数全无腹痛而突然出现休克

或昏迷;(3)常有心、肺、脑、肾等脏器病变,发病后易发生神志模糊,也容易发生水、电解质、酸碱平衡紊乱和多器官功能衰竭等并发症,死亡率高^[13];(4)手术治疗要慎重,若为胆源性胰腺炎,特别是不适合做手术者,宜应用内镜下乳头肌切开术(EST)等内镜下介入治疗。

10 老年人急腹症的临床特点?

老年人急腹症是以急性腹痛为主要特征,伴有急性全身症状的一种多发病。具有起病急、发展快、病情重、变化多和病因复杂等特点,其死亡率明显高于青壮年。有人统计375例75岁以上老年腹部急症手术的死亡率达31.7%。老年人由于脏器功能衰退,反应能力低,临床表现不典型^[15,16],易导致误诊误治^[17]。(1)老年人患急腹症时症状体征常与病理变化不符,往往局部病理变化重,而症状体征不明显,体温、白细胞计数变化不显著,疼痛也不如年轻人重,由于腹部肌肉松弛,腹膜炎时腹肌紧张可以不明显^[15,16]。因此,为提高老年急腹症诊断的正确率,首先要注意的是提高警惕性,其次是应重视主要症状和掌握临床特点,询问病史要仔细,体格检查既要全面又要重点突出。(2)由于老年人常有血管退行性变,患急腹症时易致脏器血运障碍,容易发生脏器坏死,如坏疽性阑尾炎、绞窄性肠梗阻等的发生率较高。同时手术后容易发生肠系膜血栓形成或下肢血栓性静脉炎。(3)老年人多患有心血管疾病、肾脏病、肺部慢性病变、糖尿病等^[16],当发生急腹症时,病情更加复杂,二者常互相混淆和相互影响,导致诊治困难。(4)导致老年人急腹症的常见病有绞窄疝、肠梗阻、胃或十二指肠穿孔,其次为胆道疾患、阑尾炎、胰腺和肠系膜血管疾患等。(5)对于需要进行手术治疗的老年、危重急腹症患者,应采用最简单、最迅速而有效的方法,如胃肠穿孔的单纯

缝合、内出血的病灶止血、肠梗阻的解除或肠外置造瘘^[18]、胆系疾病的胆囊造瘘或胆总管引流或EST等,一般待患者一般情况好转或恢复后,再根据需要进行彻底根治^[15]。(6)老年人抵抗力低,对药物的耐受性减退,药物排泄减慢,易发生不良反应和医源性并发症如二重感染、菌群失调等,增加了问题的严重性,应引起临床医生的足够重视。

11 参考文献

- 董立钧,张培菊,吴宁,黄小芹. 老年人急性心肌梗塞的首发症状特点. 济宁医学院学报 1998;21:51-53
- 洪达荣. 不典型急性心肌梗死3例误诊分析. 新医学 1998;29(特刊2):119
- 沈洁,周怡和,朱国清. 老年人上消化道出血病因分析. 华人消化杂志 1998;6(特刊7):454
- 石莉,梁浩. 老年人上消化道出血的临床特点观察. 华人消化杂志 1998;6(特刊7):466
- 吴增耀. 老年性消化性溃疡出血临床特点(附565例分析). 福建医药杂志 1999;21:22-24
- 俞丽芬. 上消化道大出血诱发急性心肌梗死. 河北医学 1999;5:28-29
- 王高生. 继发性消化性溃疡出血后的急性心肌梗死(附4例分析). 广州医药 2000;31:25-26
- 谭章文,赵英恒. 上消化道大出血并发脑梗塞17例临床分析. 广州医药 1999;30:54-55
- 李志刚,胡慧英,杨文娟. 奥曲肽治疗老年消化道出血46例. 华人消化杂志 1998;6:243
- 吕英志,王晓宇. 21例缺血性肠炎临床病理分析. 诊断病理学杂志 1998;5:143-145
- 杨鸿禧,张丕利. 急性肠缺血综合征1例. 内科急危重症杂志 1999;5:63
- 杨贵方,罗利群. 肠缺血性疾病6例. 内蒙古医学杂志 1997;25:210
- 马利林,沈洪薰. 100例老年急性胰腺炎临床诊治与分析. 实用老年医学 1995;9:64-65
- 郑卫华. 老年急性胰腺炎52例特点. 新消化病学杂志 1996;4:531
- 邓建中,甄作均,钟广益. 老年消化道穿孔109例临床分析. 广东医学院学报 1999;17:55-56
- 葛步军,蔡同年. 老年消化性溃疡穿孔的临床特点和诊疗体会. 上海铁道大学学报 1999;20:55-57
- 李万程. 老年消化性溃疡穿孔误诊17例分析. 新医学 1998;29:119-120
- 曲化远,宗修锐,陈源光,逯云山,王希泽. 老年结肠癌梗阻56例临床特点与外科治疗. 中国肿瘤临床与康复 2000;7:47-49

肠癌细胞 BAI1 基因表达的检测及其抗肿瘤作用

王志华,康熙雄,张智清,申宝忠,李 莹

王志华,康熙雄,申宝忠,李莹,哈尔滨医科大学肿瘤研究所
黑龙江省哈尔滨市 150040
张智清,中国疾病预防控制中心病毒学研究所 北京市 100052
国家自然科学基金, No.39270765 和黑龙江省重点攻关课题基金资助,
No.G00C190401
项目负责人:王志华,150040,黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路 150 号,哈尔滨
医科大学肿瘤研究所. hljwzh@163.com
电话:0451-2620314 传真:0451-6665003
收稿日期:2003-01-10 接受日期:2003-03-26

摘要

目的:探讨大肠癌细胞和组织中 BAI1 基因的表达情况及 BAI1对血管和肿瘤生长的抑制作用。

方法:提取大肠癌细胞总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒的步骤反转录成 cDNA,PCR 产物行 20 g/L 脂糖凝胶电泳分析。BAI1对血管和肿瘤生长的抑制作用应用微血管数量(MVQ)和肿瘤移植实验的方法进行。

结果:大肠癌细胞、癌组织中大多数 BAI1 不表达或表达下降,在全部转移的淋巴结中不表达,在小鼠 CC95 大肠癌细胞移植肿瘤内注射 Ad-hBAI1 表达载体可以有效的影响肿瘤的血管生成($P < 0.05$),并抑制肿瘤的生长($P < 0.01$)。

结论:BAI1 在肠癌细胞、组织及转移的淋巴结中表达降低,该 Ad-hBAI1 表达载体可抑制肿瘤新生血管的形成并抑制肿瘤的生长。

王志华,康熙雄,张智清,申宝忠,李莹. 肠癌细胞 BAI1 基因表达的检测及其抗肿瘤作用. 世界华人消化杂志 2003;11(6):834-836
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/834.asp>

0 引言

肿瘤生长与转移过程中发生着持续而失控的血管生成(angiogenesis),血管生成是肿瘤增生、侵袭、转移的重要环节,研究发现血管生成是一种复杂的过程,包括内皮细胞激活、增生、迁移、血管基底膜破坏,形成新的血管和血管网,并且与已存在的血管网连接,原发肿瘤的血管生长使肿瘤细胞脱落易于转移。基于这一认识,人们逐渐将注意力集中在研究血管生成的生物学基础上,探讨减弱血管生成的递质,评价用抗血管生成物质来阻止肿瘤生长的方案和途径。最近 Nishimri et al^[1]首次发现并克隆出一个新的基因,具有抑制肿瘤血管生成的作用,命名为脑特异性新生血管抑制因子 1(brain-specific angiogenesis inhibitor 1, BAI1),为了进一步证实其作用,本研究观察了大肠癌患者 BAI1 的表达情况,试图寻找用 BAI1 治疗肿瘤的新途径。

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI1640 培养液来自 GIBCO 公司;基因重组脑特异性新生血管抑制因子 1 表达载体(Ad-hBAI1)由日本东京大学医科学研究所馈赠。肿瘤组织和细胞株:人直肠癌组织从临床外科手术切除的肿瘤组织中获得,直肠癌细胞株 CC95 由本所培养、建立。实验动物: BALB/C 裸鼠,♀,5-6 周龄,从中国医学科学院动物部获得,在无病原微生物的洁净条件下实验、饲养。

1.2 方法

1.2.1 人大肠癌细胞 BAI-1 的表达 采用异硫氰酸胍一步法提取大肠癌细胞总 RNA,按 RT-PCR 试剂盒的步骤反转录成 cDNA。BAI1 基因的 PCR 引物:5' 端引物为 5'-ACTCATCCTGCGACGGTGTG-3',3' 端引物为 5'-TCCCTCAGGTCCTTCATGCG-3'。PCR 参数:94℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 2 min,30 次循环,PCR 产物行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.2 Ad-hBAI1 对新生血管的抑制作用 裸鼠体内接种 1×10^5 CC95 细胞,2 wk 后取出肿瘤组织,观察微血管数量(microvessel quantity, MVQ),确定 BAI1 对肿瘤组织新生血管的抑制情况,方法(1)微血管染色,石蜡切片,HE 染色和免疫组织化学染色 LSAB 法(应用 Pako 公司试剂盒)。方法(2)微血管计数,低倍镜下观察切片全部视野,找到肿瘤血管密度最高区域,在高倍镜下(200×)随机选取 5 个高倍视野计数微血管,其均值即为 MVQ。

1.2.3 Ad-hBAI1 对肿瘤生长的抑制作用 BALB/C 裸鼠随机分成 3 组,每组 5 只,每只背部皮下接种 1×10^5 CC95 细胞,第 1、2、3 组在第 1、3、5、7、9 日局部分别注射 RPMI1640、腺病毒载体和腺病毒重组表达载体 Ad-hBAI1(2 μg/次),每天观察并记录肿瘤生长情况。

统计学处理 结果采用未配对计量资料的 t 检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 大肠癌细胞 BAI1 的表达 从大肠癌组织、淋巴结和培养细胞 CC95 提取 mRNA,反转录成 DNA,PCR 扩增,电泳分析。临床手术切除的 20 例样品中 7 例阳性,CC95 细胞和其他 13 例阴性,转移性淋巴结无表达,非转移性淋巴结有阳性表达。

2.2 BAI1 抑制肿瘤生长和肿瘤血管生成 按前述方法,2 wk 后经麻醉处死小鼠,免疫组化染色,镜下观察,肿瘤内的血管扭曲、分支紊乱、吻合丰富、管腔不规则。

则, Ad-hBAI1 治疗组的肿瘤内血管增生受到明显抑制(表 1), MVQ 与对照组相比差异显著($P < 0.05$).

表 1 BAI1 表达载体的抗肿瘤血管生成作用

组别	处理	微血管数量(MVQ)
1	RPMI1640	64 ± 16.5
2	Ad-LacZ	59 ± 19.3
3	Ad-hBAI1	37 ± 17.8

$P < 0.05$ vs RPMI 1 640 组和 Ad-LacZ 组.

2.3 Ad-hBAI1对肿瘤生长的抑制作用 每组动物分别给予局部注射 RPMI1640、腺病毒载体和腺病毒重组表达载体, 定期观察肿瘤大小, 进行比较. 给予 Ad-hBAI1治疗注射的实验动物的肿瘤生长速度与对照组相比明显减缓($P < 0.01$, 图 1).

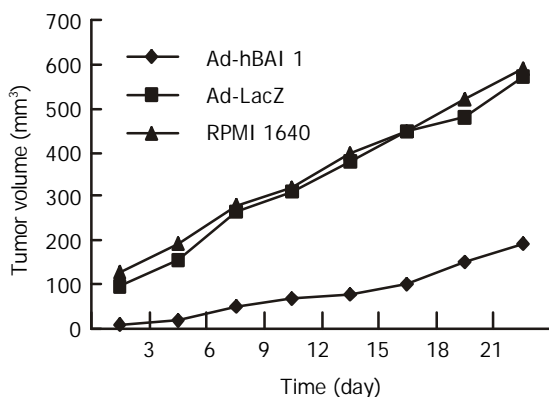


图 1 重组表达载体 Ad-hBAI1 对 CC95 细胞移植肿瘤的生长抑制.

3 讨论

肿瘤血管的新生是受众多血管生成因子严密控制的, 正调节因子包括血管内皮生长因子(VEGF), 成纤维细胞生长因子(FGF), 转化生长因子(TGF), 血管生长素(angionenin)等, 负调节因子包括血小板反应蛋白(TBS)、血管抑素(angiostatin)、内皮抑素(endostatin)等, 这些正负因子作为肿瘤血管靶向基因治疗的靶分子受到人们的关注, 有的已进入临床实验阶段^[2-16]. BAI1 是较晚发现的肿瘤血管抑制因子, 该基因在人脑中特异性表达, 编码由 1 584 个氨基酸残基组成的细胞膜蛋白, 含有 5 个血栓海绵蛋白-1(TSP-1)重复序列, 在体外可抑制由基底膜成纤维细胞生长因子(bFGF)诱发的血管新生, 该基因至少有一个功能性的 p53 结合序列诱导 p53 活化, 发挥该抑癌基因的作用^[1], 有研究者发现在结肠癌和肺癌患者的肿瘤组织中 BAI1 的表达明显减低^[17-19]. 最近证明在胃癌转移灶中 BAI1 几乎不表达^[20].

大肠癌是临床上多见的恶性肿瘤, 其发病的确切机制尚未明了, 大量的研究证明其发生伴有多种癌基因的改变^[21-35]. 我们的研究结果证明临床手术切除的 20 例癌组织中大多数 BAI1 不表达或表达下降, 在全部转

移的淋巴结中不表达, 而向小鼠 CC95 大肠癌细胞移植肿瘤注射 Ad-hBAI1 表达载体可以有效的抑制肿瘤的生长, 影响肿瘤的血管生成, BAI1 何以有如此的功效尚未可知, 推测可能和其功能性的 p53 结合序列诱导 p53 抗癌基因活化有关.

总之, 我们的研究证明 BAI1 可抑制肿瘤的新生血管并因而抑制肿瘤的生长, 提示 BAI1 可以作为一个新的目的基因, 在肿瘤血管靶向基因治疗中具有潜在的应用价值.

4 参考文献

- Nishimori H, Shiratsuchi T, Urano T, Kimura Y, Kiyono K, Tatsumi K, Yoshida S, Ono M, Kuwano M, Nakamura Y, Tokino T. A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis. *Oncogene* 1997;15:2145-2150
- Mulligan-Kehoe MJ, Kleinman HK, Drinane M, Wagner RJ, Wieland C, Powell RJ. A truncated plasminogen activator inhibitor-1 protein blocks the availability of heparin-binding vascular endothelial growth factor isoforms. *J Biol Chem* 2002;277:49077-49089
- Nakashima T, Kondoh S, Kitoh H, Ozawa H, Okita S, Harada T, Shiraishi K, Ryozaawa S, Okita K. Vascular endothelial growth factor-C expression in human gallbladder cancer and its relationship to lymph node metastasis. *Int J Mol Med* 2003; 11:33-39
- Linder-Stragliotto C, Strander H, Munck-Wikland E, Sten-Linder M. Low levels of endostatin in the urine from patients with malignant disease. *Tumour Biol* 2002;23:222-227
- Van Moerselaar RJ, Voest EE. Angiogenesis in prostate cancer: its role in disease progression and possible therapeutic approaches. *Mol Cell Endocrinol* 2002;197:239-250
- Yabushita H, Noguchi M, Kinoshita S, Kishida T, Sawaguchi K, Noguchi M. Angiostatin expression in endometrial cancer. *Oncol Rep* 2002;9:1193-1196
- Hajitou A, Grignet C, Devy L, Berndt S, Blacher S, Deroanne CF, Bajou K, Fong T, Chiang Y, Foidart JM, Noel A. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *FASEB J* 2002;16:1802-1804
- Te Velde EA, Vogten JM, Gebbink MF, van Gorp JM, Voest EE, Borel Rinkes IH. Enhanced antitumour efficacy by combining conventional chemotherapy with angiostatin or endostatin in a liver metastasis model. *Br J Surg* 2002;89:1302-1309
- Sacco MG, Soldati S, Mira Cato E, Cattaneo L, Pratesi G, Scanziani E, Vezzoni P. Combined effects on tumor growth and metastasis by anti-estrogenic and antiangiogenic therapies in MMTV-neu mice. *Gene Ther* 2002;9:1338-1341
- Kuhn H, Riedel A, Eichler W, Aust G, Gessner C, Wirtz H. Influence of adenoviral vector on expression of angiogenesis regulating factors in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 2002;51:461-466
- Conti CJ. Vascular endothelial growth factor: regulation in the mouse skin carcinogenesis model and use in antiangiogenesis cancer therapy. *Oncologist* 2002;7(Suppl 2):4-11
- Ambati BK, Joussen AM, Ambati J, Moromizato Y, Guha C, Javaherian K, Gillies S, O'Reilly MS, Adamis AP. Angiostatin inhibits and regresses corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2002;120:1063-1068
- Kunz M, Hartmann A. Angiogenesis--anti-angiogenesis. Significance for tumor growth and metastasis. *Hautarzt* 2002; 53:373-384
- Indraccolo S, Gola E, Rosato A, Minuzzo S, Habeler W, Tisato V, Roni V, Esposito G, Morini M, Albini A, Noonan DM, Ferrantini M, Amadori A, Chieco-Bianchi L. Differential effects of angiostatin, endostatin and interferon-alpha(1) gene transfer on in vivo growth of human breast cancer cells. *Gene Ther* 2002;9:867-878

- 15 Kim ES, Herbst RS. Angiogenesis inhibitors in lung cancer. *Curr Oncol Rep* 2002;4:325-333
- 16 Ma HI, Lin SZ, Chiang YH, Li J, Chen SL, Tsao YP, Xiao X. Intratumoral gene therapy of malignant brain tumor in a rat model with angiostatin delivered by adeno-associated viral (AAV) vector. *Gene Ther* 2002;9:2-11
- 17 Yoshida Y, Oshika Y, Fukushima Y, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N, Miura S, Nakamura M. Expression of angiostatic factors in colorectal cancer. *Int J Oncol* 1999;15:1221-1225
- 18 Fukushima Y, Oshika Y, Tsuchida T, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, Ueyama Y, Tamaoki N, Nakamura M. Brain-specific angiogenesis inhibitor 1 expression is inversely correlated with vascularity and distant metastasis of colorectal cancer. *Int J Oncol* 1998;13:967-970
- 19 Hatanaka H, Oshika Y, Abe Y, Yoshida Y, Hashimoto T, Handa A, Kijima H, Yamazaki H, Inoue H, Ueyama Y, Nakamura M. Vascularization is decreased in pulmonary adenocarcinoma expressing brain-specific angiogenesis inhibitor 1 (BAI1). *Int J Mol Med* 2000;5:181-183
- 20 Lee JH, Koh JT, Shin BA, Ahn KY, Roh JH, Kim YJ, Kim KK. Comparative study of angiostatic and anti-invasive gene expressions as prognostic factors in gastric cancer. *Int J Oncol* 2001;18:355-361
- 21 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
- 22 张振书, 张亚历. 中国大肠癌研究进展. 世界华人消化杂志 2001;9:489-494
- 23 曲娴, 刘建平, 曲宏, 孙红霞. 大肠癌 C-erbB-2 和 EGFR 的表达意义. 世界华人消化杂志 2001;9:838-839
- 24 曲娴, 陈杰, 刘彤华. 表皮生长因子受体单克隆抗体抗人结肠癌 LST174 的作用. 世界华人消化杂志 2001;9:841
- 25 金月玲, 黄培林, 王亚平, 黄照权, 王建东, 孟明. nm23-H1 基因突变与大肠癌转移的相关性. 世界华人消化杂志 2001;9:965-966
- 26 沈志祥, 曹歌, 孙军. 结直肠癌组织 COX-2 mRNA 表达的病理意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1082-1084
- 27 唐朝晖, 邹声泉. DPC4/SMAD4 基因与结肠癌. 世界华人消化杂志 2001;9:1190-1193
- 28 蔡崎, 陆洪芬, 孙孟红, 杜祥, 范月珍, 施达仁. 结直肠癌组织中 CD44v3, v6 蛋白的表达意义. 世界华人消化杂志 2000;8:1255-1258
- 29 许沈华, 冯建国, 李德川, 牟瀚舟, 楼荣灿. 大肠癌患者外周血 CD44 水平与临床病理的相关性研究. 世界华人消化杂志 2000;8:432-435
- 30 郭文君, 吴洪娟, 刘雨清, 张伟栋, 黄文波. Rasp21, GST-pi 在大肠腺瘤癌变中的表达. 世界华人消化杂志 2000;8:104
- 31 周海波, 张居民, 颜云. 结直肠癌组织中 DPC4 基因的分子生物学研究. 世界华人消化杂志 2002;10:1140-1142
- 32 孙哲, 高鹤立. P21ras、P16 在大肠癌中的表达及临床意义. 世界华人消化杂志 2001;9:1399-1403
- 33 范如英, 李世荣, 武子涛, 吴霞. 散发性大肠癌组织及粪便 P53 蛋白 K-ras 及 APC 基因的检测. 世界华人消化杂志 2001;9:771-775
- 34 谷化平, 倪灿荣, 詹熔洲. 大肠癌 CD15, CD44v6 和 nm23H1 的 mRNA 表达与转移及预后的相关性. 世界华人消化杂志 2000;8:887-891
- 35 季代金, 曹燕, 张亚历, 姜泊, 余宁, 冯福才, 周殿元. 大肠癌 HT-29, Lovo 细胞 p53 转录表达差异同步研究. 世界华人消化杂志 2000;8:77-79

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 •

三氧化二砷对鸡胚移植胆管癌生长的抑制作用

喻智勇, 王曙光, 郑秀海, 李 昆

喻智勇, 王曙光, 郑秀海, 李昆, 中国人民解放军第三军医大学西南肝胆外科医院 重庆市 400038
项目负责人: 喻智勇, 400038, 重庆市, 中国人民解放军第三军医大学西南肝胆外科医院. rsyzy@mail.tmmu.com.cn
电话: 023-65398063
收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-02-17

摘要

目的: 探讨三氧化二砷(As_2O_3)对鸡胚移植胆管癌生长的抑制作用及其机制。

方法: 建立胆管癌 QBC₉₃₉ 细胞株鸡胚移植模型, 接种癌细胞后 9 d 切取标本, 比较 As_2O_3 作用组和对照组肿瘤生长、血管生成情况, 原位末端标记法检测肿瘤组织细胞凋亡, 免疫组化检测核增生抗原(PCNA)与血管内皮生长因子(VEGF)的表达。

结果: As_2O_3 作用组肿瘤生长和血管生成受到抑制, 细胞凋亡增多、PCNA 和 VEGF 表达减弱。

结论: As_2O_3 有抗胆管癌的作用。其机制与诱导细胞凋亡, 抑制癌细胞增生、癌组织 VEGF 表达以及肿瘤血管生成有关。

喻智勇, 王曙光, 郑秀海, 李昆. 三氧化二砷对鸡胚移植胆管癌生长的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11(6):836-838

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/836.asp>

0 引言

胆管癌对目前的化疗药物常常敏感性欠佳^[1]。近年我国在三氧化二砷(As_2O_3)治疗白血病方面取得重大突破, 疗效好而副作用少^[2]; 对其他如食管癌^[3]、大肠癌^[4]等实体瘤也有效。本实验以胆管癌鸡胚移植模型观察 As_2O_3 对胆管癌生长的抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 胆管癌 QBC₉₃₉ 细胞株, 由王曙光教授建株^[5]; As_2O_3 由哈尔滨伊达药业有限公司提供; SABCD 免疫组化试剂盒、TUNEL 凋亡试剂盒购自武汉博士得生物工程有限公司; PCNA、VEGF 抗体系 Santa Cruz 公司产品。实验用胚蛋购自第三军医大学微生物教研室。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与传代 QBC₉₃₉ 细胞, 接种于含 100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素和 100 mL/L 灭活小牛血清的新鲜 RPMI-1640 培养液中, 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO_2 培养箱中培养, 6 d 传代一次。实验采用指数生长期的细胞。

1.2.2 鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)的制备^[6] 胚蛋孵育至 7 d 时, 在照卵灯下寻找胚头, 约在胚头右下方 0.5-1 cm

处划定约 $0.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$ 的开窗位置. 在鸡蛋气室端钻1-2 mm的小孔并穿透气室壳膜. 在蛋壳开窗位置用小砂轮磨切开窗, 吹去蛋壳上磨切的粉尘, 75 mL/L 乙醇消毒, 揭去开窗处的蛋壳. 用橡皮吸头从气室小孔轻轻吸气使绒毛膜下沉. 用虹膜刀切破壳膜, 暴露出CAM. 暴露已制备好的CAM, 进行实验干预.

1.2.3 鸡胚接种与药物干预 选择生长良好的胚蛋45只, 接种癌细胞后随机分3组: PBS组、 As_2O_3 作用组、顺铂(DDP)作用组. 接种方法: QBC₉₃₉细胞用RPMI-PBS稀释, 接种量 $6 \times 10^6/0.1 \text{ mL}$. 鸡胚开窗后立即接种于CAM相对无血管区. 接种后第3天将浸有 As_2O_3 或DDP的玻璃滤纸放置于癌细胞接种部位, As_2O_3 和DDP按血药浓度2倍稀释^[7], 分别为 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $4 \mu\text{g}/\text{mL}$; 对照组用0.01M PBS浸泡的滤纸. 每日更换一次滤纸, 严格无菌操作. 封窗后放入孵化箱, 观察肿瘤生长和血管生成情况. 接种后第9天取材, 测量肿瘤大小, 肿瘤组织HE染色观察.

1.2.4 免疫组化指标的检测 标本用4 mL/L多聚甲醛固定, 石蜡包埋. 切片脱蜡至水. 按SABC操作步骤(枸橼酸盐抗原热修复)检测PCNA、VEGF的表达. 根据阳性细胞的百分率分为4个等级: 0分(无阳性细胞), 1分(阳性细胞 $<30\%$), 2分(阳性细胞 $30\%-70\%$), 3分(阳性细胞 $>70\%$); 阳性细胞染色强度也分为4个等级: 0分(无阳性细胞), 1分(浅黄色), 2分(黄色), 3分(棕黄色); 将2者评分相加后除以2得出VEGF表达的综合评分. 高倍镜下随机选择至少2个视野计数1 000个细胞核黄色细胞, 计算出PCNA表达的阳性细胞百分数.

1.2.5 凋亡TUNEL检测 切片脱蜡至水. 按TUNEL操作步骤检测组织凋亡细胞. 细胞核染色紫蓝色颗粒者(碱性磷酸酶)为凋亡细胞. 计算阳性细胞百分数同PCNA计算方法.

统计学处理 采用SPSS 8.0进行统计分析. 测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用t检验和 χ^2 检验, $P < 0.01$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 鸡胚模型的大体观察 接种癌细胞后1-3 d, 瘤体生长缓慢, 3 d后, 生长迅速, 瘤体明显增大; 至第7天, 瘤体最大径可达9 mm左右; 其后肿瘤生长减慢. 癌细胞种植成功率达100%. 接种癌细胞3 d后, 血管辐凑现象明显, 与肿瘤诱导血管生成作用有关. 早期瘤组织HE镜检见癌细胞体积减小, 间质少; 4 d后可见癌组织形成巢状腺腔样结构, 并且有新生血管形成(图1). 肿瘤周围血管 As_2O_3 组比PBS组细而少.

2.2 肿瘤生长的比较 接种癌细胞第9天采集标本, 测量大小(直径)如下: PBS组 $5.8 \pm 1.21 \text{ mm}$, As_2O_3 组 $2.6 \pm 0.7 \text{ mm}$, DDP组 $2.8 \pm 0.5 \text{ mm}$. PBS组与 As_2O_3 组差异显著($P < 0.01$), As_2O_3 组与DDP组比较差异不显著($P > 0.05$).

2.3 VEGF和PCNA的表达 TUNEL检测凋亡结果, 见表1.

表1 免疫组化和凋亡检测结果($\bar{x} \pm s$)

实验分组	n	VEGF	PCNA	凋亡指数
PBS组	10	2.06 ± 0.46	48.88 ± 5.33	4.11 ± 1.9
As_2O_3 组	10	1.33 ± 0.43	24.66 ± 4.21	32.22 ± 5.4

$P < 0.01$, As_2O_3 组 vs PBS组.

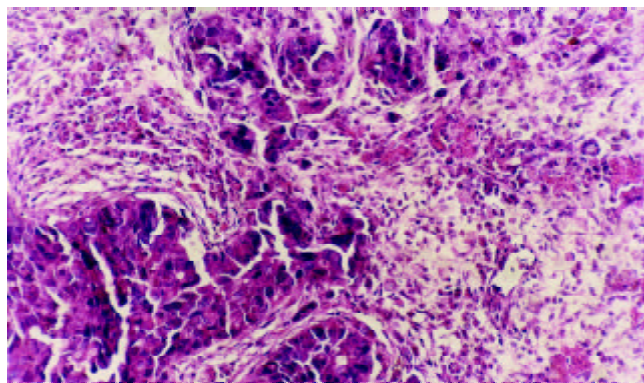


图1 鸡胚移植胆管癌组织学(HE $\times 200$).

3 讨论

胆道癌起病隐匿、根治困难、预后很差. 手术与非手术治疗5 a生存率 $<12\%$, 胆道癌的根治主要依赖手术^[1,8,9]. 放化疗和介入等综合治疗措施有助于提高总体治疗效果, 目前多数学者认为化疗对胆道肿瘤有一定效果^[1,10-12], 因此有必要探索新的化疗药物.

As_2O_3 已经成功的应用于实体肿瘤化疗的实验研究. 经 As_2O_3 作用的移植胆管癌生长受到显著抑制. 本组资料采用滤纸给药的方式, 局部浓度高, 与临床常用的肝动脉灌注化疗相似. 一般认为 As_2O_3 的抗癌机制与诱导肿瘤细胞凋亡有关^[2,3]. 实验研究结果与文献报道一致, As_2O_3 作用组癌细胞凋亡显著, 而对照组凋亡细胞少见; 同时发现癌细胞核增生抗原表达减弱, 推测与 As_2O_3 阻滞癌细胞周期有关.

在实体瘤, 肿瘤的增长有赖于新生血管的生长和内皮细胞的增生^[13], 肿瘤细胞与血管内皮细胞之间相互促进, 分泌细胞增生因子, 此过程内皮细胞的增生依赖肿瘤微环境促进增生与诱导凋亡信号刺激的平衡^[14]. 经 As_2O_3 作用的胆管癌组织细胞凋亡增加, 生长受到抑制, 癌组织中刺激内皮细胞增生的VEGF表达明显减弱, 与文献^[15]报道结果一致; 大体观察 As_2O_3 作用组癌组织周围辐辏血管较PBS组稀少, 认为 As_2O_3 具有抑制肿瘤血管生成的作用, 进而抑制肿瘤的生长.

总之, As_2O_3 能够有效抑制鸡胚移植胆管癌的生长, 其抗癌作用与诱导癌细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成有关. 有必要进一步研究并应用于临床.

4 参考文献

- 1 廖彩仙, 杨家丁. 胆管癌的基础与临床. 第1版. 上海: 第二军医大学出版社, 1999: 108
- 2 Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J,

- Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z, Wang ZY. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 1997;89:3354-3360
- 3 Shen ZY, Shen WY, Chen MH, Shen J, Zeng Y. Reactive oxygen species and antioxidants in apoptosis of esophageal cancer cells induced by As_2O_3 . *Int J Mol Med* 2003;11:479-484
- 4 魏晓莹,郑杰,张东生,张建民. 三氧化二砷诱导人结肠癌 LoVo 细胞凋亡的细胞生物学研究. 临床与实验病理学杂志 2001;17:508-511
- 5 王曙光,韩本立,段恒春,陈意生,彭志明. 肝外胆管癌细胞系的建立. 中华实验外科杂志 1997;14:245-246
- 6 付生法,陆应麟,张朝山,陈堃. 检测血管生长因子作用的鸡胚绒毛尿囊膜技术. 军事医学科学院院刊 1993;17:294-297
- 7 胡建昆,陈志新,陈佳平,严律南,毛咏秋,邹立群,王朝华. 大肠癌化疗药物敏感性与癌细胞 DNA 含量的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:713-714
- 8 中华医学会外科学会胆道外科学组. 肝外胆道癌全国调查 1098 例分析. 中华外科杂志 1990;28:516-520
- 9 石景森,周连锁,王作仁,罗建,王林,郝秀原,马庆久,李发智,汪涛,任斌,卢云,刘绍诒. 肝外胆道癌 830 例临床分析. 中华外科杂志 1997;35:645-648
- 10 Gebbia V, Majello E, Testa A, Pezzella G, Giuseppe S, Giotta F, Riccardi F, Fortunato S, Colucci G, Gebbia N. Treatment of advanced adenocarcinomas of the exocrine pancreas and the gallbladder with 5-fluorouracil, high dose levofolinic acid and oral hydroxyurea on a weekly schedule. Results of a multicenter study of the southern Italy oncology group (G.O.I.M.). *Cancer* 1996;78:1300-1307
- 11 Kuhn R, Hribaschek A, Eichelmann K, Rudolph S, Fahlke J, Ridwelski K. Outpatient therapy with gemcitabine and docetaxel for gallbladder, biliary, and cholangio-carcinomas. *Invest New Drugs* 2002;20:351-356
- 12 Taieb J, Mitry E, Boige V, Artru P, Ezenfis J, Lecomte T, Clavero-Fabri MC, Vaillant JN, Rougier P, Ducreux M. Optimization of 5-fluorouracil (5-FU)/cisplatin combination chemotherapy with a new schedule of leucovorin, 5-FU and cisplatin (LV5FU2-P regimen) in patients with biliary tract carcinoma. *Ann Oncol* 2002;13:1192-1196
- 13 Okuda K, Nakanuma Y, Miyazaki M. Cholangiocarcinoma: recent progress. Part 2: molecular pathology and treatment. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:1056-1063
- 14 Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999;59:728-733
- 15 Roboz GJ, Dias S, Lam G, Lane WJ, Soignet SL, Warrell RP Jr, Rafii S. Arsenic trioxide induces dose- and time-dependent apoptosis of endothelium and may exert an antileukemic effect via inhibition of angiogenesis. *Blood* 2000;96:1525-1530

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 •

小鼠实验性肝损伤中 NO 的动态检测及意义

陈会松,柳利明,黄 华,杨晋辉

陈会松,柳利明,黄华,杨晋辉,昆明医学院第二附属医院消化科
云南省昆明市 650101
昆医附二院科研基金资助, No.2000021
项目负责人:黄华,650101,云南省昆明市西山区麻园 1 号,昆明医学院第二附属医院消化科. hhtrq78@yahoo.com
电话:0871-5351281-2362
收稿日期:2002-12-12 接受日期:2002-12-30

摘要

目的:动态检测 一氧化氮(nitric oxide, NO)在急性肝损伤中血清浓度变化,探讨 NO 在急性肝损伤中的作用。

方法:以刀豆蛋白(concanavalin-A, ConA)诱导小鼠急性肝损伤构建实验动物模型.用硝酸还原酶法动态检测了40只正常小鼠(对照组)及40只(实验组)小鼠2 h、4 h、8 h及24 h血清中NO的浓度水平.同时测定血中谷丙转氨酶(ALT)变化。

结果:实验组2 h时点NO浓度显著低于对照组且与ALT呈高度负相关($P < 0.05$).实验组4 h时点NO浓度显著高于对照组且与ALT呈高度正相关($P < 0.01$).

结论:NO对肝脏有双重作用,即既有保护作用又有损害作用。

陈会松,柳利明,黄华,杨晋辉. 小鼠实验性肝损伤中 NO 的动态检测及意义. 世界华人消化杂志 2003;11(6):838-840

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/838.asp>

0 引言

一氧化氮(NO)在肝损伤中的作用,国内外已有大量的相关文献报道,但是不同的研究有不同的结果^[1-4],且NO在肝损伤中的作用机制至今尚未完全阐明,说明NO与肝损伤的关系也有必要进一步研究.本实验以刀豆蛋白A(ConA)诱发小鼠急性肝损伤模型,动态检测NO在血清中的变化,观察其与ALT之间的关系,以探讨其在肝损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂昆明种小鼠,体重24-26 g,6-8 wk,(由昆明医学院动物饲养中心提供),ConA(美国Sigma公司产品),NO试剂盒(由南京建成生物工程研究所提供)。

1.2 方法 将80只实验小鼠随机分为2组,每组40只,对照组小鼠尾静脉注射生理盐水0.3 mL/只,实验组小鼠尾静脉注射ConA(20 mg/kg,以等体积的生理盐水溶解),所有小鼠自由进食水.各组小鼠均分别于2 h、4 h、8 h及24 h眼球取血并立即分离血清分装于抗凝管中,于4℃保存待测.后立即处死小鼠,取肝右中叶用100 mL/L甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋切片,HE染色后,行光镜观察肝组织病理变化.应用化学比色硝酸还原酶法检测NO,按说明书进行操作.采用生化自动分析仪测定ALT。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件包. 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示. 两组间比较用 t 检验, 相关性用直线相关分析(bivariate 过程), $P < 0.05$ 认为差异有显著性.

2 结果

2.1 成功诱导急性肝损伤模型 用 ConA 成功诱导昆明小鼠急性肝损伤: 实验组小鼠应用 ConA 4 h 后, 活动明显减少, 精神萎靡, 对外界声光刺激不灵敏, 悬吊觅食不能, 尿黄, 个别小鼠毛发直立, 24 h 内无死亡.

2.2 肝组织病理检查结果 对照组大体观见肝脏颜色鲜红, 表面呈细沙粒状, 质地柔软、光滑. 光镜下见肝小叶结构正常, 肝细胞索排列规律、整齐, 肝窦无增宽, 汇管区及中央静脉无异常. ConA 实验组 8 h 组肝细胞损伤程度最重, 后逐渐减轻. 大体观肝脏稍肿胀, 颜色暗红, 表面细沙粒状较明显, 组织脆, 钳夹易出血, 镜下见肝细胞索破坏, 肝窦稍增宽, 内有大量瘀血, 肝细胞弥漫性浊肿, 核固缩、溶解甚至消失, 点、灶状及片状坏死多见. 汇管区及中央静脉、肝窦内可见大量中性粒细胞和淋巴细胞浸润.

2.3 血清 NO 动态检测 表 1.

表 1 血清 NO 值动态检测结果($\mu\text{mol/L}$)

组别	n	NO 不同时点值			
		2 h	4 h	8 h	24 h
对照组	40	55.50 \pm 9.06	57.04 \pm 8.18	56.90 \pm 7.07	57.20 \pm 5.50
实验组	40	42.05 \pm 3.56 ^a	91.10 \pm 18.78 ^{ab}	70.56 \pm 8.95	53.60 \pm 10.12

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

2.4 血清 ALT 动态检测 表 2.

表 2 血清 ALT 值动态检测结果(U/L)

组别	n	ALT 不同时点值			
		2 h	4 h	8 h	24 h
对照组	40	45.00 \pm 8.00	46.01 \pm 7.10	44.50 \pm 6.50	47.00 \pm 8.00
实验组	40	92.02 \pm 14.90	353.68 \pm 43.20	868.66 \pm 82.341	35.56 \pm 22.88

$P < 0.01$ vs 对照组.

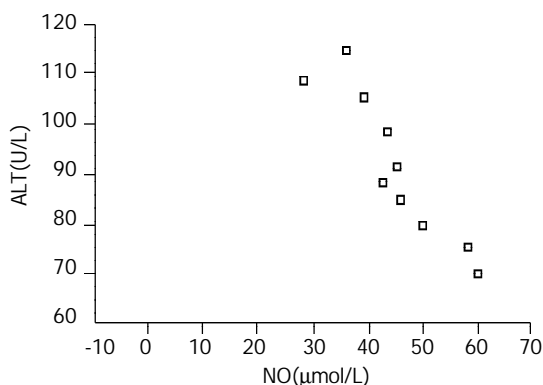


图 1 2 h 组血清 NO 与肝损伤程度相关性分析.

2.5 实验组 2 h NO 时值与肝损伤关系, 经 Bivariate 分析结果显示 NO 水平与 ALT 呈显著负相关($r = -0.769$, $P < 0.05$), 即在肝损伤 2 h 内, NO 越低, 肝损伤程度越重(图 1).

2.6 实验组 4 h 血清 NO 值与肝损伤相关程度经 Bivariate 过程分析, NO 水平与肝损伤程度呈显著正相关($r = 0.860$, $P < 0.01$). 即 NO 值越高, 肝损伤程度越重(图 2)

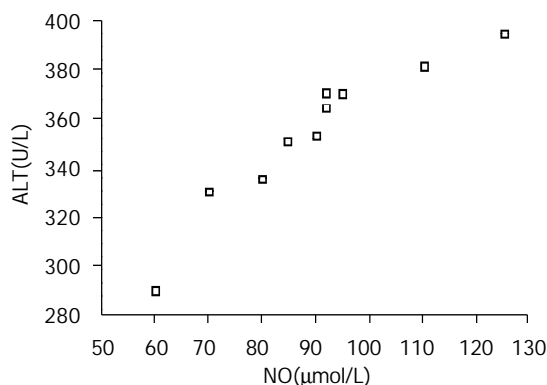


图 2 4 h 血清 NO 与肝损伤程度相关性分析.

3 讨论

ConA 是一种应用广泛的促有丝分裂原物质, 实验证明他在体内可诱导小鼠 T 淋巴细胞依赖性肝损伤, 因其致肝损伤的病理机制与人类自身免疫性肝病、病毒性肝炎尤其是急性肝炎的病理机制极为相似, 故这一模型的建立和应用可以为我们深入研究各型肝病肝细胞损害的细胞学与分子学机制提供重要的理论依据^[5].

NO 是体内嗜脂性和有高反应性的气体传递及调节递质, 由 NOS(一氧化氮合酶)催化 L-精氨酸生成, 属于典型的自由基. 其主要具有信息传导功能和细胞毒性因子功能. 信使功能主要参与神经系统的信息传递及使血管扩张, 由结构型 NO 合成酶合成(cNOS). 细胞毒性因子功能对细菌、真菌和肿瘤细胞产生杀伤作用, 同时也对正常组织产生损伤, 由诱导型 NO 合成酶(iNOS)合成.

国外学者 Sergent et al^[6] 和 Fiorucci et al^[7] 研究表明, NO 在肝损伤过程中可对肝脏起保护作用. 但国内外大多数研究表明, 当 NO 在肝脏中的浓度远远高于其生理浓度时, 则其可通过以下几种机制造成肝细胞损害、坏死. (1)通过抑制线粒体呼吸使肝细胞因能量缺乏或产生大量的自由基而死亡. (2)通过抑制肝细胞蛋白质的合成从而使肝细胞发生坏死或凋亡. (3)通过使肝细胞的 DNA 断裂或突变使肝细胞发生凋亡. (4)通过引起组织细胞脂质过氧化和细胞毒性损伤肝细胞. (5)通过间接改变细胞内的 cAMP 含量对肝细胞的正常代谢产生影响使肝细胞受损. (6)通过使肝细胞对 TNF- α 的敏感性提高而加重肝损伤. 在本实验中我们对对照组及实验组不同时点及肝匀浆中 NO 的时值均进行了检测. 经对实验结果分析, 我们发现 NO 浓度水平变化分两个阶段, 第一阶段是 2 h 实验组, NO 水平同对照组比较不但没有增高反而显著降低, 而 ALT(肝损伤程度)却显著增高, 同时 NO 与肝损伤呈负相关, 提示在肝损伤早期, NO 对肝细胞起保护作用. NO

浓度下降原因推测在于其通过“自我牺牲”或“保护耗竭”方式,使肝细胞对损伤的应答产生有益的调节,从而发挥其对肝脏的保护作用.第二阶段是在2 h后至24 h内,NO水平同对照组相比则明显增高,同时肝损害程度加重,NO与ALT呈显著正相关.提示随着大量的NO产生,其对肝脏的作用由保护转向损害.说明高浓度的NO对肝脏有损伤作用.通过本实验,我们证实了在急性肝损伤中NO对肝脏的双重作用.

总之,在ConA诱导的急性肝损伤中,NO是一个重要的细胞因子,在肝损伤不同阶段其作用不同.他既可对肝脏起破坏作用又对肝脏起保护作用,为临床进一步研究NO在急性肝炎的发病机制及病理生理变化以及合理应用NO拮抗剂提供理论基础.他在肝损伤中更深层次的作用机制,有待我们进一步研究.

4 参考文献

1 Muriel P. Nitric oxide protection of rat liver from lipid

- peroxidation, collagen accumulation and liver damage induced by carbon tetrachloride. *Biochem pharmacol* 1998;56:773-779
- 2 Morikawa A, Kato Y, Sugiyama T, Koide N, Chakravorty D, Yos T, Yokochi T. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced hepatic injury in D-galactosamine-sensitized mice as an experimental endotoxic shock model. *Infect Immun* 1999;67:1018-1024
- 3 Sass G, Koerber K, Bang R, Guehring H, Tiegs G. Inducible nitric oxide synthase is critical for immune-mediated liver injury in mice. *J Clin Invest* 2001;107:439-447
- 4 习玲,滕书玲. 大鼠急性肝损伤中NO的变化及肝组织坏死面积的图像分析. *山西医科大学学报* 2001;32:396-397
- 5 Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B, Del Soldato P, Morel Ignarro LJ. An NO derivative of ursodeoxycholic acid protects against Fas-mediated liver injury by inhibiting caspase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2652-2657
- 6 Sergeant O, Griffon B, Morel I, Chevanne M, Dubos MP, Cillard P, Cillard J. Effect of nitric oxide on iron-mediated oxidative stress in primary rat hepatocyte culture. *Hepatology* 1997;25:122-127
- 7 Fiorucci S, Santucci L, Antonelli E, Distrutti E, Del Sero G, Morelli O, Romani L, Federici B, Del Soldato P, Morelli A. NO-aspirin protects from T cell-mediated liver injury by inhibiting caspase-dependent processing of Th1-like cytokine. *Gastroenterology* 2000;118:404-421

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

• 病例报告 •

以肠梗阻为首表现的原发性小肠肿瘤 4 例

赵永玲,魏芳

赵永玲,魏芳,开封市第二人民医院 河南省开封市 475002
项目负责人:赵永玲,475002,河南省开封市第二人民医院.
电话:0378-2651531
收稿日期:2002-11-12 接受日期:2002-12-16

摘要

目的:探讨原发性小肠肿瘤的特殊表现形式-肠梗阻,预防误诊.

方法:自1998年以来,我院收治肠梗阻30例,其中确诊小肠肿瘤4例,主要表现为反复腹胀、腹痛、恶心、呕吐.本文作者回顾性分析,以提高对本病的认识.

结果:原发性小肠肿瘤临床上可表现为腹痛、腹块、消化道出血及肠梗阻,多以小肠出血为首发症状,此4例首先表现为不完全肠梗阻.

结论:肠梗阻反复发作未能明确病因时,应考虑到小肠肿瘤.

赵永玲,魏芳. 以肠梗阻为首表现的原发性小肠肿瘤 4 例. 世界华人消化杂志 2003;11(6):840
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/840.asp>

1 病例报告

例1 女,49岁,农民.反复腹胀、恶心、呕吐2 mo,加重20 d.胃镜显示:返流性胃炎.腹平片:肠管胀气.钡餐透示:钡剂通过十二指肠悬韧带较缓慢,且距十二指肠悬韧带约20 cm处不再下行.后经外科手术探查并切除肿块,病理证实为空肠低分化腺癌.

例2 女,40岁,教师.反复腹胀、恶心4 a,腹痛、右下腹块2 mo. B超检查发现右下腹部有一约3.5 × 3.0 cm大小包块.外科手术探查并切除肿块,病理证实为回肠平滑肌瘤.

例3 男,35岁,工人.反复腹胀、腹痛、恶心1 a,加重1 mo.先后3次住院治疗,曾行胃镜、B超、纤维结肠镜,全消化道X线钡餐检查均无明显异常发现.再次钡透示:十二指肠

剂逆流,下行困难.后经剖腹探查病理证实为空肠中分化腺癌.

例4 男,32岁,工人.反复上腹胀满6 a,加重伴腹痛、腹块1 mo.多次胃镜、B超检查无异常.1 mo前再次B超发现腹部包块4.5 × 3.0 cm,纤维结肠镜检查无异常,最后手术切除,病理证实为回肠平滑肌肉瘤.

2 讨论

原发性小肠肿瘤占胃肠道肿瘤的36%,临床上可表现为腹痛、腹块、消化道出血及肠梗阻,多以小肠出血为首发症状.此4例首先表现为不完全肠梗阻,鉴于小肠细长,检查不易,诊断困难,医师对本病的认识不够等影响早期诊断.

本组误诊原因:(1)小肠肿瘤症状开始无特异性,确诊前均开始误诊为胃炎,后表现为不完全肠梗阻.(2)缺乏简单有效的检查手段.常规的全消化道钡餐检查对小肠疾病诊断的阳性率仅为5%.本组3例均行此项检查,由于检查技术和设备条件的因素,国内目前仅有少数医院开展小肠镜检查,选择性腹腔动脉造影对小肠病变引起的出血兼有定位和定性诊断价值,但不能诊断病因,必须一定的设备,B超检查由于肠腔气体干扰而影响观察.(3)医生对小肠肿瘤认识不足,因小肠肿瘤与胃炎、胃或十二指肠溃疡并存,内镜检查因发现以上良性病变未再深入检查,并因长期呕吐合并电解质紊乱而误诊.(4)缺乏胃镜、B超及X线钡透重复检查,症状消失后拒绝进一步检查.(5)小肠平滑肌瘤为良性肿瘤,生长缓慢,早期不易发现,并可向肠腔外膨胀式生长,少数可恶变(平滑肌肉瘤),也是我们对小肠肿瘤易漏诊?误诊的原因之一.

总之,我们认为:肠梗阻反复发作未能明确病因时,应考虑到小肠肿瘤,在胃镜十二指肠镜和结肠镜检查排除食管胃十二指肠及结肠占位后,酌情进行小肠镜、小肠气钡造影,术中内镜检查及剖腹探查.

结肠黑变病 25 例

孙 军,李 岩

孙军,锦州市中心医院消化内科 辽宁省锦州市 121004
李岩,中国医科大学第二临床学院消化内科 辽宁省沈阳市 110004
项目负责人:孙军,121004,辽宁省锦州市上海路二段51号,锦州市中心医院消化内科. sj680801@yahoo.com.cn
电话:013941610711
收稿日期:2003-01-11 接受日期:2003-02-18

摘要

目的:探讨结肠黑变病的病因及其与结肠肿瘤的关系.

方法:对25例结肠黑变病患者的临床资料、镜下表现及病理进行回顾性分析.

结果:长期服泻药患者16例(64%),未有明确服泻药史患者8例(32%);病变分布左半结肠患者14例,结肠癌患者1例,结肠息肉患者9例,病理示管状腺瘤患者8例,混合型患者1例,管状腺癌患者1例.

结论:结肠黑变病病因可能与细胞凋亡有关;结肠黑变病与结肠肿瘤有密切关系.

孙军,李岩. 结肠黑变病25例. 世界华人消化杂志 2003;11(6):841-842
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/841.asp>

0 引言

结肠黑变病(melanos coli, MC)指结肠黏膜固有层内巨噬细胞含有脂褐素的一种黏膜色素沉着性病变.随着电子结肠镜的广泛应用,本病检出率逐渐上升,本研究对我院1997-01/2002-07行电子结肠镜检查的3897例患者进行统计,检出MC25例,检出率0.64%,国内报道本病检出率为0.06-5.9%^[1].

1 材料和方法

1.1 材料 25例MC患者男15例,女10例,年龄48-76岁,平均62岁.便秘19例,腹泻2例,血便1例,下腹痛及腹胀等3例.因便秘服泻药(大黄,番泻叶,芦荟,麻仁润肠丸,果导)者16例,服药时间2 mo-20 a;未有明确服泻药史者8例,其中腹泻2例;不详1例.

1.2 方法 全部患者均用OLYMPUS CF240型电子结肠镜,并行病理检查.

2 结果

2.1 服泻药情况 长期服泻药16例占64%,未有明确服泻药史8例占32%.

2.2 结肠镜下表现 结肠黏膜弥漫或局部有棕褐色或黑褐色色素沉着性改变,呈颗粒状、虎斑状、网状,肠腔视野反光减弱,普遍灰暗.病变分布全结肠6例,左半

结肠14例,右半结肠5例.

2.3 并发疾病 结肠癌1例,溃疡性结肠炎1例,结肠息肉9例.

2.4 病理检查 黏膜固有层间质中均有不同程度的吞噬棕褐色色素的巨噬细胞.结肠息肉病理:管状腺瘤8例,混合型1例.结肠癌病理示管状腺癌1例.

2.5 随访情况 12例服泻药的便秘患者有完整随访史.每3-6 mo随访一次,每次均行肠镜及病理检查,随访时间6-28 mo,其中1例停服泻药18 mo,镜下及病理所见色素消失,4例停服泻药患者镜下均有不同程度色素变浅,但病理仍然证实MC.继续服用泻药患者镜下色素颜色逐渐加深.

3 讨论

MC国外报道较多,1829年Crureilheir首先描述了这种病变.1857年Virchow将其命名为结肠黑变病,一直沿用至今.病因不清,多数报道认为长期服泻药、尤其是蒽醌类泻药有关,大量泻药引起结肠黏膜上皮细胞凋亡,产生凋亡小体被巨噬细胞所吞噬,并通过基底膜小孔移行至黏膜固有层,在巨噬细胞的溶酶体内,凋亡小体转化为脂褐素,随着泻药长期应用,这些含色素巨噬细胞不断聚集,形成典型MC^[2].本研究25例MC患者,长期服泻药16例,占64%,与上述报道相符,可是本研究25例MC患者中有8例(32%)未有明确服泻药史,其中2例腹泻,1例合并溃疡性结肠炎,因此Byers et al^[3]认为泻药应用不是促使MC发生的唯一因素,细胞凋亡在MC中起重要作用,MC是细胞凋亡加速的非特异性标志,引起凋亡原因许多,如衰老等,所以可解释本研究中MC患者年龄48-76岁,平均62岁,年龄偏大.

目前,MC与结肠肿瘤的关系一直存在争论,陈宗永 et al^[4]在2-8 a随访过程中,在MC基础上逐步出现颗粒样增生、息肉及结肠息肉恶变.而国外学者Nusko et al^[5]认为结肠癌与MC和泻药无关,但结肠息肉在MC中被检出率高,息肉近端分布较多,且病理所示管状腺瘤和混合状腺瘤较多,结肠息肉无色素沉着.本研究25例MC,腺瘤9例(36%),其中管状腺瘤8例,混合状腺瘤1例,与之相符. Nusko et al^[5]将结肠息肉与MC之间的密切联系解释为在暗带色素黏膜背景上的白色小息肉容易被发现.本研究中发现结肠癌1例(4%),结肠息肉9例(36%),我们认为MC与结肠肿瘤有密切关系,有无因果关系需进一步研究.

MC应动态观察,发现结肠息肉及时切除.针对MC

应去除病因, 停药泻药, 改用促胃肠动力药及微生态制剂以及粗纤维饮食. 本研究对 MC 随访, 停药泻药患者中 1 例色素消失, 4 例色素不同程度变浅, 证实了 MC 是一种可逆性疾病.

4 参考文献

- 1 纪小龙, 朱成, 李向红, 张子其, 张勇, 李维华, 王孟薇. 结肠黑变病的病理探讨. 中华消化杂志 1994;14:38-39

- 2 Walker NI, Smith MM, Smithers BM. Ultrastructure of human melanosis coli with reference to its pathogenesis. *Pathology* 1993;25:120-123
- 3 Byers RJ, Marsh P, Parkinson D, Haboubi NY. Melanosis coli is associated increase in colonic epithelial apoptosis and not with laxative use. *Histopathology* 1997;30:160-164
- 4 陈宗永, 屠柏强, 刘进进, 卢蕊芬, 汪清. 结肠黑变病的内镜资料分析. 中华消化内镜 1999;16:186
- 5 Nusko G, Schneider B, Ernst H, Wittekind C, Hahn EG. Melanosis coli-a harmless pigmentation or a precancerous condition. *Z Gastroenterol* 1997;35:313-318

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 •

保留胰腺的脾动脉干及脾切除术在胃癌根治术中的意义

陈志新, 胡建昆, 张波, 陈佳平, 周总光

陈志新, 胡建昆, 张波, 陈佳平, 周总光, 四川大学华西医院普外科
四川省成都市 610041
国家杰出青年科学基金资助课题, No.39925032 和四川省科委基金, No.413026
项目负责人: 陈志新, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院普外科.
czx1961@peoplemail.com.cn
电话: 028-85422482
收稿日期: 2002-08-26 接受日期: 2002-11-17

摘要

目的: 探讨保留胰腺的脾动脉干及脾切除术在胃癌根治术中的意义.

方法: 对 20 例胃上部及胃体部癌行保留胰腺的脾动脉干及脾切除术以期预防性清扫第 10 及第 11 组淋巴结的患者进行了前瞻性研究.

结果: 20 例术中清扫出第 10 及第 11 组可疑转移淋巴结平均 6 枚/例, 术后病理切片检查有 11 例患者第 10 组淋巴结有癌转移(22/60), 有 9 例患者第 11 组淋巴结有癌转移(20/56), 其中有 6 例患者第 16a1、16a2 组淋巴结有癌转移? 无胰瘘及其他并发症发生.

结论: 胃上部及胃体部癌转移至第 10 及第 11 组淋巴结的机会较大, 对肿瘤直径 >5 cm 的患者, 应常规预防性清扫上述两组淋巴结?

陈志新, 胡建昆, 张波, 陈佳平, 周总光. 保留胰腺的脾动脉干及脾切除术在胃癌根治术中的意义. 世界华人消化杂志 2003;11(6):842-844

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/842.asp>

0 引言

近年来, 胃上部及胃体部癌的发生率有逐渐增加的趋势, 外科治疗仍是最有效的治疗方法^[1-6]. 术式选择上, 大多数学者主张行全胃切除术. 但关于淋巴结清扫范围及联合脏器切除的问题, 目前尚有争议^[5-12]. 我院 2001-

05/2002-05, 对 20 例胃上部及胃体部癌行保留胰腺的脾动脉干及脾切除术以期预防性清扫第 10 及第 11 组淋巴结的患者进行了前瞻性地研究, 近期结果报告如下.

1 材料和方法

1.1 材料 男 11 例, 女 9 例; 年龄 36 岁-71 岁(平均 53.3 岁); 病变大小: 5-7 cm 8 例, 7 cm 以上 12 例, 术前均经胃镜活检得到病理组织学证实.

1.2 方法 切除大网膜、小网膜、肝十二指肠韧带腹膜、横结肠系膜前叶和胰腺被膜, 清扫第 8、9、12、13、14 组淋巴结, 于根部结扎胃左动脉, 清扫第 7 组淋巴结及脾动脉近段 1/3 血管周围淋巴结, 在脾动脉根部结扎, 显露胰尾, 分离脾静脉和胰尾动脉后予以结扎, 游离胰腺上缘, 将脾动脉中段及远段 1/3 血管周围脂肪及淋巴结(第 11 组), 脾脏(第 10 组)连同胃、胃网膜、胃周 1-6 组淋巴结整块切除, 保留胰腺实质和脾静脉. 然后行食管-空肠 Roux-en-Y 吻合, 重建消化道.

2 结果

对 20 例直径 >5 cm 的胃上部及胃体癌行保留胰腺的脾动脉干及脾切除术, 术后清除第 10 及第 11 组可疑转移淋巴结平均 6 枚/例, 术后病理切片检查有 11 例患者第 10 组淋巴结有癌转移(22/60), 有 9 例患者第 11 组淋巴结有癌转移(20/56), 其中有 6 例患者第 16a1、16a2 组淋巴结有癌转移. 20 例手术后无 1 例发生胰瘘及其他并发症.

3 讨论

胃癌的基础研究虽已取得很大的进展, 但应用于临床尚需有一段时间^[13-25]. 对于胃上部及胃体部癌的治疗, 强调的是要行根治性切除, 特别是淋巴结的彻底清扫.

但在根治性近端胃或全胃切除术中,为清扫脾动脉周围淋巴结或/和脾门淋巴结而切除胰腺的远侧部,术后常出现胰瘘,急性胰腺炎,膈下脓肿和糖尿病等并发症,患者的死亡率也明显增加。为避免这些问题,早在1979年Maruyama et al 等就开展了保留胰腺的全胃切除术,手术保留胰腺和脾静脉,而将脾、脾动脉和其周围的脂肪结缔组织包括淋巴结完全切除。术后并发症发生率和死亡率均降低^[26-29]。我们的术式在脾动脉根部结扎,显露胰尾,分离脾静脉和胰尾动脉后予以结扎,保证了胰背动脉对胰腺的血供,可避免胰腺坏死,使术后并发症的发生率和死亡率降低到0。保留胰腺的理论依据在于:(1)在切除脾动脉以清扫其周围的淋巴结后,胰腺的血供良好,因为胰背动脉的左支,即胰横动脉仍可保证远侧胰腺的血供,而脾静脉紧贴胰腺实质,二者间无淋巴回流。(2)胃的淋巴引流只进入胰腺包膜下,不进入胰实质,胰实质内无淋巴结转移。而胰周的淋巴结转移仅在胰包膜下的脂肪结缔组织内,常在脾门和脾动脉周围,因此,保留胰腺不会影响手术的根治性。(3)切除脾动脉后胰腺实质周围所有的淋巴脂肪结缔组织可被完整切除,该手术操作经我们应用具有可行性?切除脾脏可以彻底清除第10组淋巴结,胃癌根治术脾脏切除与否,一直存有争议,部分学者认为脾脏切除将严重破坏机体的免疫功能,使术后感染的机会大大增加^[25-29],因此对切除脾脏应持慎重态度或在胃癌根治术中尽可能地进行保脾淋巴结清扫。但有学者研究证实,按这种方法清扫后脾门淋巴结残留率达74.7%,很难达到根治目的^[26, 27]。我们研究发现:胃上部及胃体部癌患者行保留胰腺的脾动脉干及脾切除术清扫第10及第11组淋巴结彻底,并且所清除的淋巴结的癌转移率高,所有患者术后并未出现全身爆发性感染及脾窝积液、腹腔感染。当然这与我科专业分工细、手术组人员固定也有一定的关系,因此,我们认为,对于进展期胃上部及胃体癌,尤其是浆膜已受侵犯,能行根治切除者,主张保留胰腺的脾动脉干及脾切除术。此时,脾门如触不到明显肿大淋巴结,亦不能否定转移。

胃癌患者,其主要的预后因素是肿瘤深度和有无淋巴结转移,而联合胰切除没有生存优势,且手术时间长,手术期失血、输血增多,手术并发症多,术后生存质量无改善,不应作为扩大淋巴结清扫的标准术式。对于胃中上部癌直接侵犯了胰体尾,应行全胃联合胰体尾切除术,而采用预防性的胰体尾切除应该予以否定。保留胰腺的脾动脉干及脾切除术能在有效地保留患者胰腺功能的同时彻底切除癌肿,清除转移淋巴结,手术安全,并发症少,患者的生存质量亦得到了最大限度的改善,值得进一步研究。

4 参考文献

- 1 Shiraishi N, Adachi Y, Kitano S, Kakisako K, Inomata M, Yasuda K. Clinical outcome of proximal versus total gastrectomy for proximal gastric cancer. *World J Surg* 2002;26:1150-1154
- 2 Mariette C, Castel B, Tournel H, Fabre S, Balon JM, Triboulet JP. Surgical management of and long-term survival after adenocarcinoma of the cardia. *Br J Surg* 2002;89:1156-1163
- 3 Matsui H, Uyama I, Sugioka A, Fujita J, Komori Y, Ochiai M, Hasumi A. Linear stapling forms improved anastomoses during esophagojejunostomy after a total gastrectomy. *Am J Surg* 2002;184:58-60
- 4 Yasuda K, Shiraishi N, Adachi Y, Inomata M, Sato K, Kitano S. Risk factors for complications following resection of large gastric cancer. *Br J Surg* 2001;88:873-877
- 5 Hu JK, Chen ZX, Zhou ZG, Zhang B, Tian J, Chen JP, Wang L, Wang CH, Chen HY, Li YP. Intravenous chemotherapy for resected gastric cancer: meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Gastroenterol* 2002;8:1023-1028
- 6 Martin RC 2nd, Jaques DP, Brennan MF, Karpeh M. Extended local resection for advanced gastric cancer: increased survival versus increased morbidity. *Ann Surg* 2002;236:159-165
- 7 Kondo H, Yamao T, Saito D, Ono H, Gotoda T, Yamaguchi H, Yoshida S, Shimoda T. Metastatic tumors to the stomach: analysis of 54 patients diagnosed at endoscopy and 347 autopsy cases. *Endoscopy* 2001; 33:507-510
- 8 Meyer W, Popp M, Klinger L, Awad-Allah A, Gebhardt C. Results of surgical therapy of adenocarcinomas of the esophagogastric junction according to a standardized surgical resection technique. *Dig Surg* 2002;19:269-274
- 9 Maehara Y, Kakeji Y, Oda S, Takahashi I, Akazawa K, Surimachi K. Time trends of surgical treatment and the prognosis for Japanese patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 2000;83:986-991
- 10 Adachi Y, Tasuda K, Inomata M, Sato K, Shiraishi N, Kitano S. Pathology and prognosis of gastric carcinoma: well versus poorly differentiated type. *Cancer* 2000;89:1418-1424
- 11 Lekakos LN, Triantafillopoulos JK, Milingos ND, Sfikakis PG. Adenocarcinoma of the gastric cardia :treatment via a left thoracoabdominal approach. *Am Surg* 2002;68:584-590
- 12 Roukos DH. Current status and future perspectives in gastric cancer management. *Cancer Treat Rev* 2000;26:243-255
- 13 Sagara N, Katoh M. Mitomycin C resistance induced by TCF-3 overexpression in gastric cancer cell line MKN28 is associated with DT-diaphorase down-regulation. *Cancer Res* 2000; 60:5959-5962
- 14 Tao HQ, Zou SC. Effect of preoperative regional artery chemotherapy on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:451-454
- 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 Yao YL, Xu B, Song YG, Zhang WD. Overexpression of cyclin E in mongolian gerbil with *Helicobacter pylori*-induced gastric precancerosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:60-63
- 17 Fu QG, Meng FD, Shen XD, Guo RX. Efficacy of intraperitoneal thermochemotherapy and immunotherapy in intraperitoneal recurrence after gastrointestinal cancer resection. *World J Gastroenterol* 2002;8:1019-1022
- 18 Ren J, Dong L, Xu CB, Pan BR. Expression of sphingosine kinase gene in the interactions between human gastric carcinoma cell and vascular endothelial cell. *World J Gastroenterol* 2002;8:602-607
- 19 Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002;6:987-993
- 20 Deng DJ. Progress of gastric cancer etiology: N-nitrosamides 1990s. *World J Gastroenterol* 2000;6:613-618
- 21 Yao XX, Yin L, Sun ZC. The expression of HTERT mRNA and cellular immunity in gastric cancer and precancerosis. *World J Gastroenterol* 2002;8:586-590
- 22 Cao WX, Cheng QM, Fei XF, Li SF, Yin HR, Lin YZ. A study of preoperative methionine-depleting parenteral nutrition plus chemotherapy in gastric cancer patients. *World J Gastroenterol* 2000;6:255-258
- 23 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
- 24 Xue FB, Xu YY, Wan Y, Pan BR, Ren J, Fan DM. Association of *H. pylori* infection with gastric carcinoma: a Meta analysis. *World J Gastroenterol* 2001;7:801-804
- 25 Konno H, Baba M, Maruo Y, Tanaka T, Kanai T, Nishino N, Suzuki S, Nakamura S, Baba S. Measurement of pancreatic blood flow to prevent pancreatic juice leakage after pancreas-preserving total gastrectomy for gastric cancer. *Eur Surg Res* 1997;29:287-291
- 26 Roukos DH. Current advances and changes in treatment strategy may improve survival and quality of life in patients with potentially curable gastric cancer. *Ann Surg Oncol* 1999;6:46-56
- 27 Maruyama K, Sasako M, Kinoshita T, Sano T, Katai H, Okajima K. Pancreas-preserving total gastrectomy for proximal gastric cancer. *World J Surg* 1995;19:532-536
- 28 Skoropad V, Berdov B, Zagrebin V. Concentrated preoperative radiotherapy for resectable gastric cancer: 20 years follow-up of a randomized trial. *J Surg Oncol* 2002;80:72-78
- 29 Pinto-De-Sousa J, David L, Seixas M, Pimenta A. Clinicopathologic profiles and prognosis of gastric carcinomas from the cardia, fundus/body and antrum. *Dig Surg* 2001;18:102-110

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 •

萎缩性胃炎临床证型分类研究

朱方石, 姒健敏, 王良静

朱方石, 姒健敏, 王良静, 浙江大学医学院邵逸夫临床医学研究所
浙江省杭州市 310016
浙江省科技厅自然科学基金资助课题, No.G20011025
项目负责人: 姒健敏, 310016, 浙江省杭州市庆春东路3号, 浙江大学医学院邵逸夫临床医学研究所. sjm@163.net
收稿日期: 2002-12-24 接受日期: 2003-01-08

摘要

目的: 探讨萎缩性胃炎(CAG)中医证型分布的主次, 确定相应的治则治法, 为制定CAG辨证分型客观标准提供框架结构和依据。

方法: 检索近4a的医学期刊, 收集含辨证分型具体病例数据的论文53篇中确诊CAG病例9995例, 总结、比较分析CAG中医证型的构成比。

结果: CAG临床常见证型依次为肝胃不和型、气滞血瘀型、肝胃郁热型、脾胃湿热型、脾胃虚弱型和胃阴不足型等6种。

结论: 上述6种证型反应了CAG的病变机制, 临床治疗以健脾益气为基本大法, 根据病情证候择选其他治法。

朱方石, 姒健敏, 王良静. 萎缩性胃炎临床证型分类研究. 世界华人消化杂志 2003;11(6):844-846

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/844.asp>

0 引言

萎缩性胃炎(CAG)是胃癌前状态中最常见的一种, 转癌率达4-12%, 迄今尚无特效药物, 而中医辨证分型论治显示了一定的优势和潜力, 但综观文献及报道资料显示, 分型方法繁多而弥散, 且缺乏统一客观的微观定性和定量指标, 因而各地治疗经验缺乏可比性。为确定CAG中医临床证型构成分布和主次, 以制定相应的治疗大法, 并为进一步寻求和制定CAG辨证分型的客观标准提供框架结构, 我们对近4a公开报道的9995例CAG

患者进行了临床证型的分类研究, 现将结果报道如下:

1 材料和方法

1.1 材料 本研究搜集文献报道确诊的CAG患者9995例, 明确性别的8799例, 其中男5576例, 女3223例, 性别不详1196例, 年龄17-71岁, 平均年龄因各文献报道的均数不一难以明确, 不同年龄段具体病例数据因各统计、划分方法不一, 亦难以统计; 中医证型名称涉及71种之多。

1.2 方法

1.2.1 文献检索 网络检索和光盘检索了1999-01/2002-08中文期刊网及中国生物医学数据库所收录有关中医药研究CAG的学术论文610篇(个案、护理类除外), 查阅了139种学术刊物(其中中医药79种、现代医/药学54种及中西医结合6种), 摘取了含临床证型分类具体病例统计数据的论文53篇; 刊物出版地覆盖27个省、市、自治区。

1.2.2 证型归纳 文献载录不同名称临床证型种类达71种, 独立证型52种、兼夹证型19种; 将52种独立证型按异名同类及主症、次症、苔、脉的描述进行归纳, 以执简驭繁, 总结出一般证型9种共9563例, 少见和偶见证型10种共170例, 再将10种少见和偶见证型与19种兼夹证型的262例合称其他证型共432例, 分成10个证型组进行构成比比较。

统计学处理 运用同组中2个构成比的 χ^2 检验法^[1], 分析各证型组构成比的差异。

2 结果

2.1 9995例CAG临床证型构成分布 表1显示, 9995例CAG中, 构成比居于前3位、超过16%的依次为肝胃不和、气滞血瘀、肝胃郁热型; 低于前3型而超过

10 % 是脾胃湿热、脾胃虚弱和胃阴不足型, 低于 10 % 的证型依次分别是其他证型、气虚血瘀、气阴两虚和肝脾不和型. 可以看出CAG 的一般证型按构成比高低依次为上述9种, 但由于其他证型组是由29种少见、偶见和兼夹证型的组合, 故不能作为一般证型.

表1 9995例CAG临床证型构成分布

组号	证型	n	构成比 %
1	肝胃不和	2 088	20.89
2	气滞血瘀	1 680	16.81
3	肝胃郁热	1 652	16.53
4	脾胃湿热	1 330	13.31
5	脾胃虚弱	1 272	12.73
6	胃阴不足	1 058	10.58
7	气虚血瘀	192	1.92
8	气阴两虚	150	1.50
9	肝脾不和	141	1.41
10	其他证型	432	4.32
	合计	9 995	100.00

2.2 9种证型组构成比的两两比较 表2显示, 第1组(肝胃不和型)、第2组(气滞血瘀型)、第3组(肝胃郁热型)、第4组(脾胃湿热型)、第5组(脾胃虚弱型)和第6组(胃阴不足型)构成比均明显高于第7组(气虚血瘀型)、第8组(气阴两虚型)、第9组(肝脾不和型)($P < 0.01$ 或 0.05); 而第1组与第4、5、6组及第2、3组与第6组间比较亦有显著性差别($P < 0.05$ 或 0.01); 其余各证型组间比较无统计学意义($P > 0.05$). 可见, 前6种证型组的构成比显然高于后3种证型组, 故可将前6组视为CAG常见证型, 尤以第1、2组证型最为多见. 可以看出, 9995例CAG中常见证型依次为肝胃不和型、气滞血瘀型、肝胃郁热型、脾胃湿热型、脾胃虚弱型和胃阴不足型.

表2 9种一般证型组构成比的两两比较

比较组	χ^2	P	比较组	χ^2	P	比较组	χ^2	P
1和2	44.18	>0.05	2和7	1 182.77	<0.01	4和8	940.81	<0.01
1和3	50.45	>0.05	2和8	1 279.18	<0.01	4和9	961.06	<0.01
1和4	168.10	<0.01	2和9	1 300.67	<0.01	5和6	19.65	>0.05
1和5	198.17	<0.01	3和4	36.77	>0.05	5和7	796.72	<0.01
1和6	337.22	<0.01	3和5	55.03	>0.05	5和8	885.29	<0.01
1和7	1 576.67	<0.01	3和6	130.20	<0.05	5和9	905.28	<0.01
1和8	1 678.21	<0.01	3和7	1 155.97	<0.01	6和7	599.97	<0.05
1和9	1 700.68	<0.01	3和8	1 251.94	<0.01	6和8	682.50	<0.01
2和3	0.24	>0.05	3和9	1 273.35	<0.01	6和9	701.33	<0.01
2和4	40.70	>0.05	4和5	1.29	>0.05	7和8	5.16	>0.05
2和5	56.39	>0.05	4和6	30.98	>0.05	7和9	7.81	>0.05
2和6	141.30	<0.01	4和7	850.88	<0.01	8和9	0.28	>0.05

3 讨论

通过对9995例CAG中医证型构成分布的结果来看, 临床常见证型按构成比的高低依次为肝胃不和型、气滞血瘀型、肝胃郁热型、脾胃湿热型、脾胃虚弱型和胃阴不足型. 这一结果与1989-11南昌·中国中西医结合研究会消化系统疾病专业委员会制定的“慢性胃炎中西医结合诊断、辨证标准”^[2]和中国中医药学会内科学会1994-12发表的“慢性萎缩性胃炎·分型论治”的分型方案^[3]大致相近, 但在个别证型和排列顺序上有所出入, 并存在着差别. 1989年标准分别为肝胃不和型、脾胃虚弱(包括虚寒)型、脾胃湿热型、胃阴不足型、和胃络瘀血型5型; 而1994年方案分别为脾胃虚寒型、脾胃湿热型、脾胃阴虚型、肝胃不和型和瘀血阻络型等5型. 本结果表明, 现行CAG辨证分型标准尚不完全符合临床实际, 有待进一步完善或修订. 我们认为, 本研究结果为日后探讨和制定CAG辨证分型的客观标准提供了新的框架结构和理论依据.

从本研究结果的6种常见证型的构成比来看, 肝胃不和型居首, 占20.89%; 气滞血瘀型(或称胃络瘀血/瘀血阻络型, 1989、1994年标准)居于第二, 占16.81%. 我们认为, 肝胃不和是CAG整个病理过程中最为常见的标象, 临床常见胃脘胀痛、嗳气频频、嘈杂泛酸、胸闷易烦等症, 而此类症候群往往多为CAG患者最为常见之主诉, 故有人倡导“肝胃同治是为治疗CAG的主导思想, 治疗以疏肝和胃化浊降逆为主”^[4]; 而气滞血瘀型构成比的升高与瘀血阻滞胃络贯穿整个病程的病理机制有关, 不少研究表明, 瘀血与胃黏膜腺体萎缩有关, 胃镜下胃黏膜的花斑样改变、血管扭曲、血管壁显露、黏膜色暗或灰暗、表面凹凸不平或呈结节样隆起均为瘀血证的病理微观征象^[5,6]. 至于肝胃郁热型列居第三, 而既往二次制定的标准方案中并无对此型的表述, 其原因尚不清楚, 是否由于该型所出现的临床症状易与排列第四的脾胃湿热型相混淆尚待进一步研究探讨, 但我们分析认为, 该二型构成比相对较高多与Hp感染有关, 该二型

区别可能在于前者重在肝胃,热乃郁而生热, Hp 感染病势相对重而病程短,而后者重在脾胃,热乃湿困所起, Hp 感染病势相对轻而病程缠绵.此外,脾胃虚弱型构成比排列第五,这一结果似乎与“脾虚是CAG的基本病理改变”^[7]和“脾胃虚弱既为病理基础又为病理后果的恶性循环”^[8]的经典理论存在着冲突,似乎该型比例应居于前列,然笔者认为,正是在脾胃虚弱的基础上,导致了肝胃不和、肝胃郁热、脾胃湿热等标象,复因肝失疏泄、胃失和降、郁热或湿热损气伤正,而又导致脾胃虚弱,故在患者就诊时多因标象而主诉,从而使该型比率相对偏低.至于胃阴不足型我们考虑多为多种证型的病理转归,故慢性患者,长期表现为口干咽燥、嘈杂、便干、舌红少津、苔少或光剥、脉细数等阴伤证候和胃镜下胃黏膜变薄、干燥、黏液减少及胃黏膜肠上皮化生、异型增生等病理表现^[9,2].另外,气虚血瘀、气阴两虚、肝脾不和以及其他兼夹证型构成比的偏低,只能认为是在CAG某一病理过程中短暂或较少出现的病理状况.

我们认为,上述6种常见证型,一定程度上反映了CAG的病理变化过程及其机制,由于该病病本正虚,在脾胃虚弱的基础上,由于饮食、情志、湿热等致病因素的影响下,导致了肝气横逆犯胃、气滞血瘀、郁而生热或湿热困遏,复又伤阴耗气,或由阴及阳的病

理改变,这一本虚标实而复又伤正的恶性循环,形成了病情反复迁延、病势缠绵的病症特点.本结果提示我们,临证治疗CAG,在辨证立法严谨的基础上,须十分注重健脾益气的治则治法,健脾益气为其基本大法,在胃炎活动或症状明显时,尚须根据病情,择选疏肝和胃、理气行瘀、清胃泄肝、化湿清热等辨治方法,必要时虚实同治,标本兼顾.此外,该6种证型的框架结构为制定新的辨证方案提供了理论基础和依据.

4 参考文献

- 1 黄正南.同组中两个构成比的统计检验.中华预防医学杂志 1983;17:289-291
- 2 周建中,陈泽民,危北海.慢性胃炎中西医结合诊断、辨证和疗效标准(试行方案).中西医结合杂志 1990;10:318-319
- 3 王永炎,张天,李迪臣,杨明均,晁恩祥.临床中医内科学(下册).第1版.北京:北京出版社,1994:1773-1775
- 4 扈国杰,李佃贵.李佃贵治疗慢性萎缩性胃炎经验.实用中医药杂志 2002;18:40
- 5 孙茂峰,王茵萍,范刚启,林绍庚,吴旭.关于活血化瘀对慢性萎缩性胃炎胃壁屏障作用的探讨.中国中西医结合杂志 2000;29:554-556
- 6 王爱云,单兆伟.慢性萎缩性胃炎从瘀血论治.中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:290-291
- 7 刘冬梅.“治萎独取阳明”与慢性萎缩性胃炎的健脾治疗.山东中医药大学学报 2002;26:7-9
- 8 赵凌杰,柳凤兰.浅议慢性萎缩性胃炎的中医证治特点.四川中医 2002;20:16-17
- 9 王天龙.辨证结合辨病治疗慢性萎缩性胃炎80例.江苏中医 1998;19:25

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 •

叶酸对胃癌前细胞凋亡的影响

曹大中,刘顺英,赵建学

曹大中,刘顺英,东南大学附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009
赵建学,江苏省中医院消化科 江苏省南京市 210029
铁道部基金资助课题, No. J98Z034
项目负责人:曹大中,210009,江苏省南京市,东南大学附属中大医院消化科.
bnj5326447@jlonline.com
收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-29

摘要

目的:研究叶酸对胃癌前细胞凋亡的影响.

方法:胃镜下活检,病理证实癌前病变患者38例(结肠型肠上皮化生18例和轻、中度非典型增生20例),癌前病变组织经胃蛋白酶消化液消化成单个细胞后,采用PI单染法和Annexin V FITC/PI双参数染色法用流式细胞仪检测细胞凋亡率.将癌前病变患者随机分为治疗组19例,对照组19例(每组包括结肠型肠上皮化生9例和轻、中度非典型增生10例),治疗组给予叶酸10 mg,3次/d,治疗3 mo,对照组给予硫酸铝1.0 g,3次/d,治疗3 mo,治疗结束

后复查组织细胞凋亡率.

结果:治疗组治疗后细胞凋亡率增高($P < 0.05$),对照组治疗后细胞凋亡率无明显变化($P > 0.05$).

结论:叶酸具有诱导胃癌前病变细胞凋亡的作用.

曹大中,刘顺英,赵建学.叶酸对胃癌前细胞凋亡的影响.世界华人消化杂志 2003;11(6):846-848

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/846.asp>

0 引言

胃癌癌前病变(包括胃黏膜肠化与不典型增生)是容易发展为胃癌的胃黏膜病理变化,其转化与逆转近年来渐受关注,对此进行研究,不仅有利于明确胃癌的发生规律,而且对胃癌的早期诊断及干预胃癌发生药物的选择均有重要临床意义.叶酸与癌前病变的关系也是目前较受关注

的问题之一。有研究提示叶酸治疗对萎缩性胃炎具有逆转作用^[1],也有研究提示叶酸治疗可以影响胃癌组织细胞的凋亡^[2]。我们的研究目的主要是观察叶酸治疗对胃癌前病变组织细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 标本均由东南大学附属中大医院胃镜室 1999-10/2000-12 胃镜检查时采集,并经病理证实。取材部位为胃窦距幽门 2 cm 处,共选择胃癌癌前病变病例 38 例(结肠型肠上皮化生 18 例,轻、中度非典型增生 20 例)。叶酸为常州制药厂生产,每片 5 mg。5 g/L 胃蛋白酶由华美公司生产。Triton-X-100 由美国进口分装。Annexin V FITC/PI kit 系法国 IMMUNOTECH 公司产品。流式细胞仪(flow cytometry, FCM),型号 FACSCalibur,美国 B-D 公司。

1.2 方法

1.2.1 流式细胞仪检测细胞凋亡 将癌前病变组织加入已配制的 pH1.5 含 5 g/L 胃蛋白酶 4 mL 的蛋白消化液中,37 °C 孵育 30 min,消化期间,每隔 5 min 悬浮振荡 1 次,消化后加入生理盐水 10 mL 终止消化,1 500 rpm × 5 min,以 300 目筛网滤除未消化的组织碎片,弃上清,再加 5 mL 生理盐水漂洗 2 次,红细胞计数板计数,加入冰冷的 700 mL/L 乙醇调整细胞密度为 10^7 - 10^9 /L 并固定。(1)流式细胞仪检测细胞 DNA 倍体及细胞增生周期:取上述细胞液 800 rpm × 5 min,弃上清,加入冰冷的 0.1 mol/L PBS 液洗涤,800 rpm × 5 min,弃上清,加 10 g/L Triton-X-100 摇匀后静置 10 min,1 500 rpm × 5 min,弃上清。加 0.1 g/L RNA 酶消化 10 min,1 500 rpm × 5 min,弃上清。加 0.05 g/L PI 染色 15 min,用 300 目丝网过滤后即可上机分析。CellQuest 软件采集样本后,用 ModfitLT 软件进行分析。(2)流式细胞仪双染法检测细胞凋亡:取上述细胞液 4 °C 500 rpm × 5 min,弃上清,加入冰冷的 0.1 mol/L PBS 液洗涤,4 °C 500 rpm × 5 min,弃上清,加结合缓冲液至细胞为 10^5 - 10^6 /mL,取上述细胞液 490 μL,加入 5 μL 已稀释 Annexin V FITC 溶液和 5 μL 已溶解的 PI,轻轻振动,4 °C 避光孵育 10 min,上机检测,每份样本计数 10 000 个细胞。

1.2.2 分组 将 38 例癌前病变患者随机分为治疗组和对照组各 19 例(每组含胃黏膜结肠型肠上皮化生 9 例和轻、中度非典型增生 10 例),治疗组男 13 例,女 6 例,年龄 50 ± 7 岁。对照组男 14 例,女 5 例,年龄 49 ± 9 岁。治疗组给予叶酸 10 mg,3 次/d × 3 mo,对照组给予黏膜保护剂硫糖铝 1.0 g,3 次/d × 3 mo,复查组织细胞凋亡的变化,进行统计学处理(复查时依据治疗前取活组织时的录相准确定位)。

统计学处理 分组实验比较采用 t 检验计算,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流式细胞仪 PI 单染法检测细胞凋亡 凋亡细胞 DNA 荧光强度降低, DNA 组方图显示,在 G0/G1 峰前出现一个小于 DNA 二倍体含量的小峰,即亚二倍体峰,又称细胞凋亡峰(AP 峰),根据 AP 峰面积可直接分析得出凋亡细胞的百分率。统计结果见表 1。

表 1 流式细胞仪单染法检测治疗前后细胞凋亡率 AI($\bar{x} \pm s$)

	分组	治疗前	治疗后
治疗组	轻中度胃黏膜非典型增生组	6.19±2.82	6.78±2.15 ^a
	结肠型肠上皮化生组	6.17±2.39	6.74±2.21 ^a
对照组	轻中度胃黏膜非典型增生组	6.27±3.24	6.23±2.70 ^b
	结肠型肠上皮化生组	6.24±2.29	6.17±3.17 ^b

^a $P < 0.01$, ^b $P > 0.05$ vs 相应治疗前。

2.2 流式细胞仪双染法检测细胞凋亡 表 2。

表 2 流式细胞仪双染法检测治疗前后细胞凋亡 AI($\bar{x} \pm s$)

	分组	治疗前	治疗后
治疗组	轻中度胃黏膜非典型增生组	16.22±3.801	21.00±4.610 ^a
	结肠型肠上皮化生组	16.84±2.805	21.87±4.823 ^a
对照组	轻中度胃黏膜非典型增生组	15.1±2.52	15.7±2.56 ^b
	结肠型肠上皮化生组	14.9±2.59	15.0±2.44 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P > 0.05$ vs 相应治疗前。

3 讨论

细胞凋亡是细胞分化与发育过程中,受一系列基因调控而发生的具有特征性形态和生化改变的细胞死亡过程,正常情况下,其与细胞增生基本保持平衡,以维持机体的相对稳定。正常胃黏膜中,凋亡细胞位于黏膜表层,形成“凋亡细胞带”,增生细胞位于小凹腺颈部,形成“增生细胞带”。这种分布特点反映了胃黏膜上皮自腺颈部向表层逐渐成熟、衰老、死亡的过程^[3,4]。胃癌及癌前病变存在着细胞增生和凋亡的失调^[5]。目前认为从慢性浅表性胃炎、萎缩性胃炎、肠上皮化生及不典型增生到胃癌的发展过程是肠型胃癌发生的基本规律^[4]。胃黏膜细胞凋亡减少,生成期延长,细胞大量堆积是胃癌发生的病理基础。胃黏膜细胞病变从轻度不典型增生、重度不典型增生、早期胃癌到进展期胃癌,细胞凋亡逐渐受到抑制,细胞凋亡受抑制越明显,恶性程度越高^[6]。因此抑制细胞过度增生、促进细胞凋亡是防止胃黏膜癌变的一种重要方法。胃癌发生过程中有血清叶酸水平降低。叶酸干预慢性萎缩性胃炎患者半年后,其萎缩、肠化和炎症均有明显改善^[7]。叶酸对胃癌细胞凋亡的实验研究显示,叶酸对胃癌细胞有明显的促凋亡作用^[2]。

本研究采用流式细胞仪单染法及双参数染色法检测细胞凋亡,虽其结果不同,但是经叶酸治疗后,胃癌

前病变细胞凋亡率均明显增加,而对照组无明显变化,表明叶酸治疗对胃癌前病变胃黏膜细胞的凋亡有明显的促进作用.这与既往的叶酸对萎缩性胃炎具有逆转作用的报道在一定程度上是相符的^[1],这为我们使用叶酸防止胃癌前病变向胃癌转变进一步提供了依据.但是其作用机制及部位尚不明确.既往的研究认为叶酸防止肿瘤的机制包括维持DNA甲基化状态^[6]和抑制鸟氨酸脱羧酶^[9]的活性,而叶酸干预细胞凋亡与上述机制有何内在联系尚不清楚.

DNA甲基化的生物学意义在于对基因表达的限制,甲基可关闭基因复活的开关,叶酸主要是参与供甲基过程以维持DNA甲基化状态.已知细胞凋亡与许多癌基因的表达密切相关,凋亡基因家族(bcl-2^[10], bax^[11], c-myc^[12], Fas^[13], FasL^[14]等)的异常-激活凋亡基因的丢失或抑制凋亡基因的过度表达,都可导致凋亡与增生的平衡破坏.有研究发现羟基喜树碱诱导胃癌细胞凋亡时有p53和bcl-2基因的蛋白和mRNA表达下调^[15].那么,叶酸与凋亡基因关系如何?即叶酸能否通过对DNA甲基化的影响而改变凋亡基因的表达,从而影响胃癌前状态细胞凋亡,并且叶酸是否还会通过其他途径而影响细胞凋亡,有待于我们今后进一步深入研究.

4 参考文献

1 周连鸿,施尧,江绍基,萧树东,吴裕忻,吴云林,袁耀宗,翟祖康,王秀

玲,宗春华,马菊珍,汪敏,鲍继柱,张金龙. 叶酸及硒酵母对慢性胃炎的萎缩、肠化及非典型增生的疗效观察. 中华消化杂志 1993;13:217-219

2 房静远,萧树东,童菊芳,陈向荣. 叶酸对胃癌细胞凋亡的影响. 中华消化杂志 1999;19:79-81

3 Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995;19(Suppl 1):S37-43

4 Fuchs CS, Mager RJ. Gastric carcinoma. *New Engl J Med* 1995;333:32-41

5 郭玉庆,朱兆华,黎锦芳. 流式细胞术分析胃癌及癌前病变中细胞凋亡与增生. 世界华人消化杂志 2000;8:983-987

6 许岸高,李韶光,刘集鸿,浓剑刚,姜泊,甘爱华. 胃癌癌前病变变化与细胞凋亡增生的关系. 中华医学杂志 1999;79:185-186

7 房静远,朱舜时,萧树东,李蓉蓉,施尧,江绍基,周怡和,夏德凰,金冠球,谢宇野. 叶酸阻断胃癌机制的初步研究. 中华医学杂志 1997;77:546-547

8 Fang JY, Xiao SD, Zhu SS, Yuan TM, Qiu DK, Jiang SJ. Relationship of plasma folic acid and status of DNA methylation in human gastric cancer. *J Gastroenterol* 1997;32:171-175

9 Nensey YM, Arlow FL, Majumdar AP. Aging increased responsiveness of colorectal mucosa to Carcinogen stimulation and protective role of folic acid. *Dig Dis Sci* 1995;40:396-404

10 刘海峰,刘为纹,房殿春,门荣甫. bcl-2蛋白在胃癌组织中的表达和意义. 肿瘤防治研究 1997;24:269

11 刘海峰,刘为纹,房殿春,杨仕明,汪荣春. 胃癌前组织和胃癌中Bax基因表达及其与细胞凋亡的关系. 世界华人消化杂志 2000;8:665-668

12 李雪莉,郝远瑞,邹建湘,杨金花,耿建华. C-myc, Bcl-2与胃癌生物学行为和细胞凋亡. 世界华人消化杂志 1997;5:773-774

13 刘海峰,刘为纹,房殿春,门荣甫. Fas抗原在胃癌组织中的表达及其与细胞凋亡的关系. 第三军医大学学报 1998;20:9

14 刘海峰,刘为纹,房殿春,门荣甫,王振华. 胃癌前病变及胃癌中细胞凋亡及其与FasL表达的关系. 世界华人消化杂志 1999;7:561-563

15 涂水平,江石湖,谭继宏,钟捷,乔敏敏,蒋晓华,章永平,袁耀宗,吴云林,吴裕忻. 羟基喜树碱诱导胃癌细胞凋亡的作用机制初步研究. 中华消化杂志 2001;21:274-277

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 •

短肠综合征的远期并发症 4例

周伟,江志伟,姜军,朱维铭,张佃良,李宁,黎介寿

周伟,江志伟,姜军,朱维铭,张佃良,李宁,黎介寿,南京大学医学院临床学院南京军区南京总医院 江苏省南京市 210002

项目负责人:江志伟,210002,江苏省南京市,南京大学医学院临床学院 南京军区南京总医院. nuzw@sohu.com

收稿日期:2002-12-24 接受日期:2003-01-08

摘要

目的:探讨短肠综合征患者远期并发症的处理方法.

方法:对4例短肠综合征合并远期并发症患者分别给予相应的治疗和预防措施. 并发症包括:泌尿系统结石,肾功能衰竭,骨质疏松,胆囊结石,肝脏脂肪变性, D-乳酸酸中毒.

结果:4例患者的并发症均得到不同程度的缓解.

结论:随着营养支持手段的进展,短肠综合征患者生存期逐渐延长,远期并发症相对增加.因此应该强调积极的早期预

防和有效的治疗措施.

周伟,江志伟,姜军,朱维铭,张佃良,李宁,黎介寿. 短肠综合征的远期并发症 4例. 世界华人消化杂志 2003;11(6):848-850

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/848.asp>

0 引言

短肠综合征主要是由于小肠大部分切除后引起的一系列临床病征,主要表现为腹泻和严重的营养障碍.随着对其代谢变化认识的深入,全肠外营养(TPN)和肠道康复治疗的逐渐成熟,不少短肠综合征患者得以长期存活,患者的远期并发症也得到越来越多的重视.这里报道了我科营养支持病区1a内收治的4例伴有不同并发症的短肠综合征患者的诊治情况.

1 材料和方法

1.1 材料 南京军区南京总医院普外科 2001-10/2002-06 收治的短肠综合征患者 4 例. 年龄 14-44 岁, 其中 3 例因小肠系膜扭转, 1 例由于外伤后腹腔感染伴肠系膜血栓行小肠大部分切除术, 残余小肠长度 20-40 cm. 术后 1-6 a 出现了不同的并发症: 泌尿系统结石, 慢性肾衰, 骨质疏松, 胆囊结石, 肝脏脂肪变性和 D- 乳酸酸中毒(表 1).

1.2 方法 患者入院后, 针对不同的并发症给予相应的治疗和预防措施(表 2).

2 结果

4 例患者的并发症均得到不同程度的缓解(表 2).

3 讨论

正常成人小肠解剖长度为 5.5-6.5 m, 切除小肠达到或超过 50 %, 即可出现显著的吸收不良症状, 切除 75 % 以上或成人小肠少于 100 cm 即可出现严重的短肠综合征. 短肠综合征急性期主要是由于大量腹泻而导致严重的机体内环境的紊乱; 适应期则主要表现为营养不良; 除超短肠患者常需要长时间的静脉营养支持外, 大多数患者在稳定期可以通过肠内营养或口服饮食维持营养状态.

随着营养支持技术的发展, 短肠患者的长期生存状况明显改善, 但随之而来的是远期并发症的出现. 临床常见的是由于营养吸收障碍所引起的疾病, 如: 脂溶性维生素的吸收不良, 维生素 B12 缺乏引起的巨细胞性贫血, 铁吸收障碍导致的缺铁性贫血等. 我们所报道的 4 例患者分别出现了: (1) 泌尿道结石(1 例); (2) 骨质疏松(例 1、4); (3)、胆道结石(例 2); (4)、脂肪肝(例 2); (5)、酸中毒(例 3).

3.1 泌尿系统结石 短肠综合征患者泌尿系统结石主要为草酸钙结石. 食物中的草酸在十二指肠碱性环境中形成多种草酸盐, 其中主要为几乎不溶于水的草酸钙, 因此正常人饮食中大部分草酸盐不被吸收. 回肠大量切除后, 打断了胆盐的肠肝循环, 引起胆盐缺乏, 影响脂肪消化吸收. 肠腔内脂肪酸比草酸对钙更具有亲和力, 所以草酸钙形成减少, 转而形成易溶于水的草酸盐. 草酸吸收增加, 尿中草酸盐浓度也随之增加. 当尿中草酸和钙达到饱和时, 析出沉淀, 逐渐形成草酸钙结石^[1]. 草酸结石的预防可以通过控制脂肪泻, 增加补液量, 碱化尿液, 增加钙的摄入, 以及减少含草酸高的食物的摄入, 如豆类、菠菜、咖啡、巧克力等^[2]. 一旦形成结石, 可以给予冲击波碎石和排石治疗. 少数患者最终发展为肾功能衰

表 1 患者一般资料

病例	性别	年龄	原发病	残余小肠	并发症	发生时间
1	男	44 岁	小肠系膜扭转	30-40 cm	双肾结石 骨质疏松	术后 2 a 术后 2 a
2	男	40 岁	外伤后腹腔感染	30-40 cm	胆囊结石 肝脏脂肪变性	术后 1 a 术后 1 a
3	男	14 岁	小肠系膜扭转	20-30 cm	D- 乳酸酸中毒	术后 1 a
4	男	31 岁	小肠系膜扭转	30-40 cm	双肾输尿管结石 慢性肾衰	术后 1 a 术后 6 a

表 2 各并发症的治疗及预防

并发症	治疗方法	治疗结果	预防措施
泌尿系统结石	体外冲击波碎石	结石减少 肾功能改善	减少草酸盐的摄入控制脂肪泻 增加补液量
骨质疏松	补充维生素 D 和钙剂	骨痛缓解 X 片提示骨密度增加	控制脂肪泻 控制脂肪泻 适当补充维生素 D 和钙剂
胆囊结石	合理应用抗生素 口服思美泰	未再出现急性发作	尽可能恢复肠内营养 外源性胆囊收缩素
肝脏脂肪变性	减少营养液中糖的含量	目前肝功能正常 肝脏病理待查	调整营养液配比
D- 乳酸酸中毒	NaHCO ₃ 纠正酸中毒	随访未再出现酸中毒	减少碳水化合物的摄入 重建肠道菌群
慢性肾衰	血液透析 肾移植(小肠大部切除后 13 a)	暂时缓解症状 肾功能恢复正常	及时去除尿路结石

竭, 需要血液透析或肾脏移植。

3.2 骨质疏松 由于短肠患者脂肪吸收不良, 肠腔大量脂肪酸与钙结合形成不溶于水的钙盐, 妨碍了钙的吸收, 同时短肠患者维生素D的吸收障碍也进一步减少了钙的吸收。血钙降低, 又引起甲状旁腺功能代偿性亢进, 加剧骨骼脱钙和骨质疏松。对此种患者应控制脂肪泻, 减少草酸盐的摄入, 补充钙剂和维生素D^[1,3]。

3.3 胆道结石 长期肠外营养时肠道处于休息状态, 胆囊收缩素和其他肠道激素的合成受到抑制, 胆汁流动的改变以及胆囊的排空功能障碍引起胆汁淤滞和胆囊结石形成^[4,5]。此外, 回肠胆盐吸收减少, 体内胆盐池减少, 胆汁成分随之发生改变, 也导致更多的胆固醇在胆汁中沉淀。如有可能, 尽早给予肠内营养, 恢复正常的胆道动力学, 是预防胆道结石的最好方法^[6]。外源性胆囊收缩素或给予脉冲性的氨基酸同样可以刺激胆囊收缩, 改善胆汁的流动, 预防胆囊结石的产生^[7]。有学者建议, 肠外营养时间>30 d, 即必须定期B超检查胆囊^[8]。如果患者一般情况良好预期生存期较长, 还可以行预防性胆囊切除术^[9]。药物治疗可以口服熊去氧胆酸(UDCA)或思美泰(腺苷蛋氨酸)^[10]。

3.4 脂肪肝 主要是静脉营养中碳水化合物的给予不当, 引起肝脏脂肪和糖原堆积所导致^[11]。临床表现为肝肿大和转氨酶的升高, 病理可以发现肝细胞脂肪浸润^[12]。此类患者可以通过减少热卡的摄入逆转脂肪肝。病例2患者病理提示为肝脏中央静脉周围肝细胞脂肪变性, 尚未出现转氨酶升高, 所以可以通过调整静脉营养的量和配比逆转。我们已经将其葡萄糖供给量控制在3 g/(kg·d), 糖脂比为5:5, 目前患者肝功能正常。

3.5 D-乳酸酸中毒 短肠综合征患者发生的酸中毒一般认为是D-乳酸酸中毒, 在临床上比较少见。可能的病因是由于患者进食大量碳水化合物后, 碳水化合物吸收障碍而在结肠中堆积, 结肠菌群将碳水化合物酵解产生的丙酮酸转变成D-乳酸并回收入血。其实肠道内的细菌不仅产生D-乳酸, 同样也产生L-乳酸, 只不过由于人体内缺乏D-乳酸代谢的特异性酶, 而且肾脏清除率较低, 所以容易在体内蓄积^[13,14]。另外, 最近发现某些细菌能产生一种外消旋酶将L-乳酸转变成D-乳酸。D-乳酸酸中毒除一般代谢性酸中毒的相关症状外, 主要表现为反复发作的神经系统症状, 如注意力不集中、思维混乱、讲话含糊等。实验室检查可见血浆阴离子间隙增大,

但L-乳酸浓度正常。患者停止进食后, 酸中毒能很快消失。临床主要的预防措施是减少碳水化合物的摄入量, 还可以口服抗生素, 辅助重建肠道菌群。治疗上对症给予NaHCO₃纠正酸中毒^[15]。

近年短肠患者的生存期得到明显的延长, 其远期并发症也成为影响生存质量的主要因素。营养缺乏类的并发症相对容易解决, 其他并发症, 如骨质疏松、胆道结石、泌尿道结石, 一旦发生, 很难治愈, 最终可能导致多发性骨折, 肝肾功能障碍。因此应强调积极的早期预防, 并寻找有效的治疗方法。

4 参考文献

- 1 李宁. 短肠综合征的远期并发症: 骨质疏松、尿路结石(附2例报告). 肠内肠外营养 1996;3:155-156
- 2 Bihl G, Meyers A. Recurrent renal stone disease-advances in pathogenesis and clinical management. *Lancet* 2001;358:651-656
- 3 Foldes J, Rimon B, Muggia-Sullam M, Gimmon Z, Leichter I, Steinberg R, Menczel J, Freund HR. Progressive bone loss during long-term home total parenteral nutrition. *J Parenter Enteral Nutr* 1990;14:139-142
- 4 Candusso M, Faraguna D, Sperli D, Dodaro N. Outcome and quality of life in paediatric home parenteral nutrition. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002;5:309-314
- 5 Teitelbaum DH, Tracy T. Parenteral nutrition-associated cholestasis. *Semin Pediatr Surg* 2001;10:72-80
- 6 Cohen IT, Meunier KM, Hirsh MP. The effects of enteral stimulation on gallbladder bile during total parenteral nutrition in the neonatal piglet. *J Pediatr Surg* 1990;25:163-167
- 7 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:G173-178
- 8 King DR, Ginn-Pease ME, Lloyd TV, Hoffman J, Hohenbrink K. Parenteral nutrition with associated cholelithiasis: another iatrogenic disease of infants and children. *J Pediatr Surg* 1987;22:593-596
- 9 Thompson JS. The role of prophylactic cholecystectomy in the short-bowel syndrome. *Arch Surg* 1996;131:556-559
- 10 Beau P, Labat-Labourdette J, Ingrand P, Beauchant M. Is ursodeoxycholic acid an effective therapy for total parenteral nutrition-related liver disease? *J Hepatol* 1994;20:240-244
- 11 Kelly DA. Liver complications of pediatric parenteral nutrition-epidemiology. *Nutrition* 1998;14:153-157
- 12 Zeuzem S. Gut-liver axis. *Int J Colorectal Dis* 2000;15:59-82
- 13 Haschke-Becher E, Baumgartner M, Bachmann C. Assay of D-lactate in urine of infants and children with reference values taking into account data below detection limit. *Clin Chim Acta* 2000;298:99-109
- 14 Vella A, Farrugia G. D-lactic acidosis: pathologic consequence of saprophytism. *Mayo Clin Proc* 1998;73:451-456
- 15 Zhang DL, Jiang ZW, Jiang J, Cao B, Li JS. D-lactic acidosis secondary to short bowel syndrome. *Postg Med J* 2003;79:110-112

幽门螺杆菌感染与慢性肝病的临床关系

焦建中, 聂青和, 赵春林, 吴永胜, 文绍先, 吴 群

焦建中, 赵春林, 吴永胜, 吴群, 中国人民解放军解放军第一医院
甘肃省兰州市 730030
聂青和, 西安第四军医大学唐都医院 陕西省西安市 710038
文绍先, 兰州军区机关第二门诊部 甘肃省兰州市 730010
项目负责人: 焦建中, 730030, 甘肃省兰州市小稍门外2号, 中国人民解放军解放军第一医院.
电话: 0931-8974338
收稿日期: 2003-01-15 接受日期: 2003-02-06

摘要

目的: 研究慢性肝病患者中 Hp 感染状况以及对肝性脑病、上消化道出血、肝源性溃疡及肝纤维化的影响。

方法: 慢性肝病 150 例, 采用 ELISA 法检测 HBV-M 及抗 HCV; PCR 法查 HBV-DNA, HCV-RNA; 采用放免法进行肝纤维化检测; 金标法查 Hp-cagA; ^{14}C 尿素呼气试验采用 HTY1001 Hp 测试仪, 如 $\geq 0.1 \text{ dpm/mol CO}_2$ 判定为有 Hp 活动性感染; 血氨采用比色法; 胃镜下取胃窦及胃体黏膜组织 2 块, 行 HP 的组织学涂片检查。选 71 例 Hp 感染的慢性肝病高氨血症患者, 分治疗组和对照组, 治疗组 39 例, 给予枸橼酸铋钾、克拉霉素及替硝唑进行根除治疗。对照组 32 例用乳果糖治疗。

结果: Hp 在慢性肝病中的感染率(47.3%)明显高于对照组(25%, $P < 0.01$)。Hp 阳性组中肝性脑病为 46.5%, 进行 Hp 根除治疗后, 治疗组血氨下降明显优于对照组($P < 0.05$)。Hp 阳性组中上消化道出血为 39.4%, Hp 阴性组中上消化道出血为 13.9%; 非静脉曲张破裂出血 Hp 阳性率(84.6%, 22/26 例) 高于静脉曲张破裂出血的 Hp 阳性率(33.3%, 13/39 例; $P < 0.05$)。肝源性溃疡组 Hp 的感染率为 69.2%(27/39 例)与非肝源性溃疡组比较有显著性差异($P < 0.05$)。在慢性肝病组中 Hp 阳性者血清 HA、LN 及 IV-C 的发生率较阴性者明显增高。

结论: 慢性肝病中 Hp 阳性率明显增高; 肝性脑病、上消化道出血、肝源性溃疡及肝纤维化的发生与 Hp 感染有关。

焦建中, 聂青和, 赵春林, 吴永胜, 文绍先, 吴群. 幽门螺杆菌感染与慢性肝病的临床关系. 世界华人消化杂志 2003;11(6):851-853

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/851.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是慢性胃炎的重要病原菌与许多胃外疾病的发生发展有关。在慢性肝病中尤其是在肝硬化和肝癌时胃黏膜 Hp 感染率明显增高(81.3-93.2%)。慢性肝病中, 特别是在肝性脑病, 高氨血症、上消化道出血中的作用已引起了广泛的关注。但也有认为 Hp 感染与肝性脑病、消化道出血和门脉高

压性胃病无明显关联, 对肝硬化并有 Hp 感染者不需作常规 Hp 根除治疗。对慢性肝病并有 Hp 感染者是否进行 Hp 根除治疗是临床待解决的问题。现将我们对 Hp 感染与肝脏相关性疾病的临床研究报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 我科 2000-02/2002-10 住院的慢性病毒性肝炎或肝炎肝硬化患者共 150 例。男 123 例, 女 27 例, 年龄 18-62(平均 48)岁。正常对照组为健康查体者, 男 42 例, 女 18 例, 年龄 22-62 岁, (平均 46)岁。胃镜检查对照组为健康查体者, 共 80 例, 男 52 例, 女 28 例, 年龄 22-62(平均 46)岁。诊断符合 2000-09 西安第十次全国病毒性肝炎及肝炎学术会议制定《病毒性肝炎防治方案》诊断标准^[1]。所有病例未进行过抗 Hp 治疗, 亦无使用免疫制剂史。

1.2 方法 血清 Hp-CagA 抗体检测采用金标法。试剂盒采用美国 LifeSign™ CagA 快速检测试剂盒。操作步骤按说明书进行。 ^{14}C 尿素呼气试验由我院消化科检测。 ^{14}C 尿素呼气试验药盒购自深圳市海得威生物科技有限公司, 采用该公司 HTY1001 Hp 测试仪, 按说明书操作, 如 $\geq 0.1 \text{ dpm/mol CO}_2$ 判定为有 Hp 活动性感染。血氨由我院中心实验室检测, 血氨测试仪为波兰 KONE IN-STRUMENTS 产品, 血氨采用比色法。肝纤维化检查采用放免法, 试剂盒由上海海军医学研究所提供。胃镜下取胃窦及胃体黏膜组织 2 块, 行 Hp 的组织学涂片检查, 阳性者示有 Hp 感染。胃黏膜组织涂片检查, 将胃黏膜组织黏膜面均匀涂于玻片上, 经自然干燥石炭酸复红染色等处理后, 在油镜下观察, 根据 Hp 的形态学特征进行检测和分析。食管胃底静脉曲张参照 3 分法, 分为轻度、中度及重度。

统计学处理 各组类间均数比较采用 t 检验, 计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

共发现慢性肝病中 Hp 感染者 71 例(47.3%), 正常对照组 15 例(25.0%), 慢性肝病中 Hp 感染率明显高于对照组, χ^2 检验有显著性差异($P < 0.01$)。在 71 例 Hp 阳性者中, 肝性脑病 33 例(46.5%), 上消化道出血 28 例(39.4%), 胆系感染 19 例(26.8%), 自发性腹膜炎 23 例(32.4%), 肝肾综合征 16 例(22.5%)。Hp 阳性患者中抗 HCV(+)者 35/71 (49.3%), HBsAg(+)者 27/71 例(38%), 病原未分型者 9/71 例(12.7%)。HBV-DNA, HCV-RNA 病毒复制指标阳性率在 Hp 感染组为 69%(49/71), 明显高于无 Hp 感染组

的16.5%(13/79 $P < 0.05$). 肝功化验Hp阳性组与阴性组两组间对比有显著性差异($P < 0.01$, 表1). 选Hp感染的慢性肝病患者71例, 分治疗组和对照组, 治疗组39例, 给予枸橼酸铋钾, 克拉霉素及替硝唑进行根除治疗. 对照组32例用乳果糖治疗. Hp根除治疗后血氨下降($168 \pm 78 \rightarrow 97 \pm 72 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$; $160 \pm 74 \rightarrow 128 \pm 77 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$). 治疗组 ^{14}C 呼气试验检测Hp阴性率为87.2%(34/39), 对照组 ^{14}C 呼气试验检测Hp阴性率为12.5%(4/32), 两组比较有显著性差异($P < 0.01$). 血氨 $>180 \mu\text{mol/L}$ 的患者17例进行了Hp根除治疗观察, 治疗组9例, 对照组8例, 进行根除治疗后治疗组血氨降至正常, 无肝性脑病发生的为66.6%(6/9例), 对照组为37.5%(3/8例). 两组比较具有显著性差异($P < 0.05$).

表1 Hp-CagA抗体阳性者与阴性者肝功能改变的比较($\bar{x} \pm s$)

Hp-CagA 抗体	<i>n</i>	TBil ($\mu\text{mol/L}$)	ALT($\mu\text{kat/L}$)	AST($\mu\text{kat/L}$)
阳性组	71	379 ± 205^a	4.1 ± 3.7^a	219 ± 263^a
阴性组	79	181 ± 176	1.4 ± 1.5	93 ± 127

$^aP < 0.01$.

本组共39/150(26%)例并发上消化道出血, 呕血并黑便27例, 黑便12例. Hp阳性组出血率为39.4%(28/71), 阴性组出血率为13.9%(11/79), 两组出血率比较有显著性差异($P < 0.05$). 39例出血者中Hp阳性占71.8%(28/39例), 阴性占28.2%(11/39例). 二者比较有显著性差异($P < 0.01$). 肝炎肝硬化中HU 26.0%(39/150例), Hp的阳性率为69.2%(27/39例); 对照组中消化性溃疡7.5%(6/80例), Hp的阳性率为28.6%(2/7例). 两组间对比有显著性差异($P < 0.01$). 肝炎肝硬化伴HU组Hp的感染率为69.2%(27/39例); 肝炎肝硬化不伴HU组Hp的感染率为30.6%(34/111例)与HU组比较有显著性差异($P < 0.05$). 在39例出血者中, 静脉曲张破裂出血占33.3%(13/39例), Hp阳性者53.9%(7/13例); 非静脉曲张破裂出血占66.7%(26/39例), Hp阳性者为84.6%(22/26例). 二者比较有显著性差异($P < 0.05$). 非静脉曲张破裂出血中, 肝硬化并消化性溃疡34.6%(9/26例), 胃黏膜活动性出血65.4%(17/26例). 结果提示: 在非静脉曲张破裂出血中HU、胃黏膜

病变的Hp阳性者上消化道出血较阴性者明显增多. Hp感染是上消化道出血的一个重要因素. 在HU食管胃底静脉曲张轻度、中度和重度之间Hp感染率无明显差异. HU中食管胃底静脉曲张与Hp阳性率的关系(表2).

表2 HU中食管胃底静脉曲张与Hp感染的比较

食管胃底静脉曲张	<i>n</i> (%)	Hp阳性 <i>n</i> (%)
HU中食管胃底静脉曲张	29/39(74.4)	18/29(62.1)
轻度	8/29(27.6)	5/8(62.5)
中度	11/29(37.9)	7/11(63.6)
重度	10/29(34.5)	6/10(60.0)

在慢性肝病组中Hp阳性者血清HA、LN及IV-C的发生率较阴性者明显增高(表3).

3 讨论

近年已有Hp引起肝细胞损伤^[2]、高血氨、肝性脑病及上消化道出血^[3]的报道. Hp在高氨血症、肝性脑病及上消化道出血中的作用已引起了关注. Hp感染可明显影响血氨水平, 而根除治疗能有效降低血氨, 但也有认为Hp感染与肝性脑病, 上消化道出血及门静脉高压性胃病无明显关联, 对肝硬化并有Hp感染者不需作常规Hp根除治疗. Hp感染与高氨血症、肝性脑病、上消化道出血、肝源性溃疡及肝纤维化有无关联, 是否进行常规的HP根除治疗是慢性肝病治疗中的一个新课题, 也是一个待解决的问题. 本结果表明Hp阳性者上消化道出血和HU的发生率较阴性者明显增多; Hp感染是上消化道出血和HU的主要发病因素之一; 在非静脉曲张破裂出血, 肝硬化并消化性溃疡以及胃黏膜活动性出血中Hp感染是一个不容忽视的因素. 慢性肝病患者并有Hp感染时, 血氨水平明显增高; 进行Hp根除治疗后可降低血氨; 结果还表明Hp感染与肝纤维化的发生有关. 慢性肝病特别是在肝硬化时, 机体处于免疫耐受或免疫损伤状态, 胃黏膜的防御机制减退, 易致Hp感染和胃黏膜糜烂出血, 同时由于肠道菌群的变化, 不利于Hp的清除, 而使Hp的感染率增高. 肝硬化门脉高压患者常伴有高胃泌素血症, 胃泌素有扩张门脉、增加门脉血流量的作用, 门脉血流及门脉压力增

表3 慢性肝病Hp感染与血清HA、LN及IV-C检测($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)

分组	<i>n</i>	慢性肝病 Hp 阳性组			<i>n</i>	慢性肝病 Hp 阴性组		
		HA	LN	IV -C		HA	LN	IV -C
慢性肝炎中度	14	140 ± 79^a	143 ± 55^a	73 ± 41^a	18	83 ± 43	102 ± 13	61 ± 48
慢性肝炎重度	11	274 ± 106^a	187 ± 93^a	203 ± 80^a	23	110 ± 60	148 ± 50	102 ± 48
肝硬化活动期	42	499 ± 171^a	412 ± 294^a	295 ± 144^a	43	190 ± 60	249 ± 51	183 ± 55
慢性重症肝炎	4	467 ± 138	379 ± 261	263 ± 112	5	387 ± 70	326 ± 146	239 ± 125

$^aP < 0.05$, vs Hp 阴性组.

加,可导致食管胃底静脉曲张破裂出血。Hp最显著的生物学特征之一是可以产生尿素酶分解尿素,在细菌周围形成“氨云”,使血氨增加,加之Hp的肝细胞毒作用,可加重肝损伤,诱发高血氨症及肝性脑病。Quero, Miyaji, 范学工 et al^[2], 焦建中 et al^[3]的研究结论表明:慢性肝病患者伴有Hp感染时可以引起高血氨、肝性脑病及消化道出血症,而Hp的根除治疗,可降低血氨水平,预防肝性脑病及上消化道出血的发生。本文结果与上述报道一致。本文研究结果提示:(1)慢性肝病患者Hp感染率与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$),并随着病情的加重而增加;(2)慢性肝病Hp阳性者并发症明显增多,尤以肝性脑病和消化道出血为突出;(3)在乙、丙型慢性肝病患者中Hp感染率高,可能与肝病患者的免疫耐受或免疫损伤状态有关;(4)对慢性肝病患者根除Hp有助于防止高氨血症、肝性脑病和消

化道出血的发生;(5)Hp感染与肝源性溃疡和消化道出血的发生有关;(6)Hp感染时,血清HA、LN及IV-C水平增高,与肝纤维化的发生有关。因此,在治疗慢性肝病时对Hp阳性者应及时作Hp的根除治疗,对改善肝功能,预防肝性脑病、上消化道出血、肝源性溃疡及肝纤维化的发生有重要的临床意义。对慢性肝病并有Hp感染的患者根除治疗可作为预防和治疗慢性肝病并发症的措施之一。

4 参考文献

- 1 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订:病毒性肝炎防治方案. 中华传染病杂志 2001;19:56-62
- 2 范学工,邹益友,阳惠湘,李铁刚,任培上,胡国龄. 慢性乙型病毒性肝炎的幽门螺杆菌感染. 华人消化杂志 1998;6:673-674
- 3 焦建中,赵春林,杜波,吴永胜,葛勤利,陈官培. 慢性肝病中幽门螺杆菌感染与上消化道出血的分析研究. 西北国防医学杂志 2002;23:380-381

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 •

内支架术与腔内近距放射治疗联合应用治疗晚期食管癌 8 例

申宝忠,于友涛

申宝忠,于友涛,黑龙江省肿瘤医院放射科 黑龙江省哈尔滨市 150040
项目负责人:申宝忠,150040,黑龙江省哈尔滨市哈平路150号,黑龙江省肿瘤医院放射科. baozhongshen@hotmail.com
电话:6677580-2135
收稿日期:2002-10-07 接受日期:2002-10-27

摘要

目的:研究晚期食管癌金属支架置入后的腔内近距放射治疗。

方法:8例晚期食管癌患者,5例为梗阻症状,3例合并食管气管瘘。放置金属支架8个,支架放置4-7d后行后装机食管内照射,剂量400 cGY/次,共3次,总剂量1200 cGY。

结果:8例患者均一次放置支架成功。内照射治疗后,患者生存期14-22 mo,(平均生存期17 mo),在8例患者中,整个生存期内未发生内生性再狭窄。

结论:内支架术与腔内近距放射治疗联合应用可有效地提高生存期,并减少再狭窄的发生。

申宝忠,于友涛. 内支架术与腔内近距放射治疗联合应用治疗晚期食管癌8例. 世界华人消化杂志 2003;11(6):853-854
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/853.asp>

0 引言

腔内近距放射治疗是一种较为有效的治疗食管癌的方法。

法。晚期的食管癌性阻塞及食管瘘是食管癌的严重并发症,直接危及患者生命^[1],为腔内近距放射治疗的禁忌证。应用覆膜食管内支架扩张病变狭窄段及闭塞食管瘘道是一种有效的保守姑息疗法,可明显改善梗阻症状,提高患者生存质量,使晚期梗阻患者经口进食,从而使患者的生存期得以延长,为目前较为广泛应用的方法^[2,3]。我们应用覆膜内支架结合腔内近距放射治疗的方法治疗晚期食管癌^[4-6],克服了腔内近距放射治疗的禁忌证,取得了较满意的近期疗效。

1 材料和方法

1.1 材料 食管癌患者8例,男6例,女2例,年龄(58-85岁),食管镜检病理为鳞癌7例,腺癌1例。食管钡剂造影及泛影葡胺造影示病变狭窄段长度6-12 cm,平均8 cm,管腔狭窄在2 mm以下,进流质食物困难2 wk以上。5例有梗阻症状;3例合并食管气管瘘;7例体检未发现远处转移;1例有单侧肺转移。

1.2 方法

1.2.1 支架放置 应用进口或国产镍钛记忆合金网状覆膜内支架,直径2 cm,长度8 cm,10 cm,12 cm,单或双端喇叭口,支架外表面被覆硅胶膜。术前1 d口服庆大霉素注射液10万u,4-5次,术前2 h禁食水,根据

食管造影所示的狭窄长度,选择适当长度的内支架,在经口腔导丝引导下,应用导管导丝法,由食管内支架输送器将内支架放置于狭窄病变处释放.使支架上下端超过肿瘤狭窄部位上下端各1-2 cm,置放支架,支架置入后,嘱患者适量饮用温水,使支架充分复张.支架置入后1 wk,复查上消化道钡透,观察支架通畅情况,并拍摄X光平片,确定支架的位置,测量支架的长度和宽度,确定参考点,设定照射剂量,做出相应的剂量曲线.

1.2.2 后装机食管内照射 支架放置4-7 d后行内照射,将球囊导管置入病变处,注入空气使球囊扩张,定位于病变部位支架内,透视下明确球囊定位,点片.根据已测量确定参考点为标记,进行照射.剂量400 cGY/次,共3次,总剂量1 200 cGY.

2 结果

8例患者均一次放置支架成功,并准确定位.所用8根支架,其中国产支架5根(8 cm两根,10 cm两根,12 cm一根);进口支架3根(10 cm两根,8 cm一根),支架均膨胀良好.内支架放置后,8例患者造影剂均能顺利通过,3例食管瘘口即刻被封闭.术后患者即可顺利饮水,4 h后即可进半流食.4 d后复查食管透视,造影剂通过良好,支架无移位,吞咽无困难,进食正常,食管瘘口闭合.内支架放置后,3例患者有胸骨后异物感,并有疼痛感,症状在4-6 d内消失.内照射治疗后,患者生存期14-22 mo,平均生存期17 mo.在8例患者中,整个生存期内未发生内生性再狭窄.

3 讨论

食管内支架配合腔内近距离放射治疗,有效地解决了腔内治疗的禁忌证,并很好地解决了支架置入后再狭窄的问题.(1)食管内支架的置入快速有效地改善了晚期食管癌患者的生存质量.患者可经口自主进食,营养水平及体质状态均有较明显的提高,有效地阻断了食管气管瘘.患者进食、饮水呛咳等症状完全消失,给患者较大的心理安慰,起到了缓解患者心理压力的作用.(2)扩大了腔内近距离放射治疗的适应证,将原有的禁忌证变成了适应证,支架置入后,狭窄段扩张,可较顺利的通过近距离放射治疗的施源器及放射源,使患者的生存期有较明显的提高^[7,9,11-15].(3)我们治疗的8例患者生在存期内未发生再狭窄,与我们所作未行近距内照射的食管内支架置入术的患者比较(再狭窄率5%),明显减少了再狭窄的发生^[8-10].近距内照射解决了肿瘤生长过快产生支架再阻塞的问题,减少了患者的痛苦,提高了生存质量.支架放

置后行造影点片,测量内支架扩张的宽度;并以内支架支开的食管宽度及内置球囊管径为计算依据,确定参考点,设计出合理的内照射剂量曲线.通过剂量曲线对比可以看到,内支架撑开后,内照射食管黏膜照射剂量降低、剂量梯度均匀并梯度较小,从而保护了食管黏膜,对食管黏膜及表面肿瘤的过度生长起有效的抑制作用,并使病变中心区达到治疗量.实验证明,当照射源与金属支架距离大于5 mm时,金属内支架对射线的折射,衍射可以忽略不计.通过本临床研究,我们认为,内支架术与腔内近距放射治疗联合应用治疗晚期食管癌是较为有效的方法.

4 参考文献

- 1 李小璘,齐勇. 支架加放疗对晚期食管癌的疗效观察. 中国肿瘤临床 2000;27:627-628
- 2 Knyrim K, Wagner HJ, Bethge N, Keymling M, Vakil N. A controlled trial of an expansile metal stent for palliation of esophageal obstruction due to inoperable cancer. *Neng J Med* 1993;329:1302-1303
- 3 Nelson DB, Axelrad AM, Fleischer DE, Kozares RA, Silvis SE, Freeman ML, Benjamin SB. Silicone-covered Wallstent prototypes for palliation of malignant esophageal obstruction and digestive-respiratory fistulas. *Gastrointest Endosc* 1997;45:31-37
- 4 冯崇元. 晚期食管癌内支架术后放射治疗. 中国肿瘤临床 2000;27:362-363
- 5 张庆凡,陆雪华,徐旭东. 自膨式金属内支架在食管狭窄中的应用. 中国医学影像学杂志 1996;4:72
- 6 Funami Y, Tokumoto N, Miyauchi H, Kuga K, Sato S. Improvement of oral ingestion in patients with inoperable esophageal cancer treated with radiotherapy, chemotherapy and insertion of a self-expanding nitinol stent. *Dis Esophagus* 1999;12:289-292
- 7 Bethge N, Sommer A, Vakil N. Treatment of esophageal fistulas with a new polyurethane-covered, self-expanding mesh stent: a prospective study. *Am J Gastroenterol* 1995;90:2143-2146
- 8 Schoeffl R, Winkelbauer F, Haefner M, Poetzi R, Gangl A, Lamm J. Two cases of fractured esophageal nitinol stents. *Endoscopy* 1996;28:518-520
- 9 吴艳环,王立平,钟燕,任建林,王林. 内镜置入支架并腔内单程照射治疗晚期食管癌狭窄. 中华消化内镜杂志 1999;16:198-200
- 10 戴云龙,杜炜,李健,孟萌,杨艳霞. 食管支架放置后放射治疗晚期食管癌的疗效探讨. 中华消化内镜杂志 1999;16:221
- 11 Olsen E, Thyregard R, Kill J. Esophagoileal expanding stent in the management of patients with nonresectable malignant esophageal or cardiac neoplasm: a prospective study. *Endoscopy* 2001;1:3-6
- 12 Williamson JF, Li Z. Monte Carlo aided dosimetry of the microelectron pulsed and high dose-rate 192Ir sources. *Med Phys* 1995;22:809-819
- 13 Ciesielski B, Reinstein LE, Wielopolski L, Meek A. Dose enhancement in buildup region by lead, aluminum and lucite absorbers for 15 MVP photon beam. *Med Phys* 1989;16:609-613
- 14 Kawrakow I. Accurate condensed history Monte Carlo simulation of electron transport. I. EGSnrc, the new EGS4 version. *Med Phys* 2000;27:485-498
- 15 Knyrim K, Wagner HJ, Bethge N, Keymling M, Vakil N. A controlled trial of an expansile metal stent for palliation of esophageal obstruction due to inoperable cancer. *N Engl J Med* 1993;329:1302-1307

• 临床经验 •

组织黏合剂 Histoacryl 治疗胃静脉曲张活动性出血的疗效

曾黎明,陈村龙,智发朝

曾黎明,广东医学院第三附属医院消化内科 广东省茂名市 525011
陈村龙,智发朝,中国人民解放军第一军医大学南方医院消化内科
广东省广州市 510515
项目负责人:曾黎明,525011,广东省茂名市,广东医学院第三附属医院消化内科. zliming@21cn.com
电话:0668-2242811 传真:0668-246084
收稿日期:2002-01-04 接受日期:2002-02-06

摘要

目的:观察内镜下组织黏合剂Histoacryl曲张静脉内注射对胃静脉曲张活动性出血的疗效。

方法:把42例经紧急胃镜确诊为胃静脉曲张活动性出血的患者随机分成两组,分别接受内镜曲张静脉内注射Histoacryl和三腔两囊管填塞压迫止血治疗,治疗期间观察两组患者止血时间、止血率、再出血率、输血率、手术率、死亡率等情况。

结果:两组患者的止血时间分别为 3.8 ± 1.3 h、 13.6 ± 8.7 h,有显著性差异($P < 0.05$);止血率分别为 100 % (22/22)、90.0 % (18/20),差异无显著性($P > 0.05$);再出血率分别为 4.5 % (1/22)、40.0 % (8/20),有显著差异($P < 0.05$);输血率分别为 50.0 % (11/22)、80.0 % (16/20),有显著性差异($P < 0.05$);手术率分别为 4.5 % (1/22)、50.0 % (10/20),有显著性差异($P < 0.05$);死亡率分别为 0 (0/22)、25.0 % (5/20),有显著性差异($P < 0.05$)。

结论:内镜下Histoacryl曲张静脉内注射比三腔两囊管填塞压迫止血更快,疗效更好。

曾黎明,陈村龙,智发朝. 组织黏合剂 Histoacryl 治疗胃静脉曲张活动性出血的疗效. 世界华人消化杂志 2003;11(6):855-856

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/855.asp>

0 引言

胃静脉曲张(GV)出血较食管静脉曲张出血更为凶险,而内镜下常用的治疗方法对GV出血的疗效不如食管静脉曲张出血好.近年国内开始采用内镜下Histoacryl曲张静脉内注射治疗GV出血,取得了较好疗效,但对其疗效随机对照的研究报道不多.我们对内镜下Histoacryl曲张静脉内注射与三腔两囊管压迫对GV出血的疗效开展了临床研究。

1 材料和方法

1.1 材料 2000-04/2001-09 我科经紧急胃镜检查确诊为GV出血的患者42例,男32例,女10例;年龄26-63岁.所有患者均以呕血和/或黑便为主诉,其中肝炎后肝硬化37例,原发性肝癌5例。

1.2 方法 以上患者随机分成两组,分别采用以下治疗:

(1)第一组22例,男17例,女5例;年龄30-63岁,平均51.7岁.彻底洗胃紧急胃镜确诊后当即用Histoacryl作曲张静脉内注射,具体方法按中华消化内镜学会食管胃底静脉曲张内镜下诊断治疗规范试行方案^[1]操作.注射后内镜下观察出血停止即结束治疗,置入胃管以便观察止血情况.(2)第二组20例,男15例,女5例,年龄26-58岁,平均49.3岁.紧急胃镜确诊后即插入三腔两囊管填塞压迫止血,止血后24 h放出胃囊空气,置管观察,观察24 h无出血即拔管.两组病例均联用施他宁,首剂用250 μ g 静脉推注,然后以250 μ g/h持续静脉滴注72 h.输血、补液、抑酸剂等其他治疗措施两组相同.血红蛋白低于70 g/L为输血指征.治疗期间观察患者一般情况、生命体征、呕血、胃管抽出液颜色等情况,记录患者止血时间、止血率、再出血率、输血率、手术率、死亡率等.疗效判定:(1)止血指标:胃管抽出液清亮,无血性液体,生命体征平稳,血红蛋白稳定.(2)急诊止血率:治疗后72 h内止血为有效,72 h后仍未止血者为无效.无效者行手术或TIPSS治疗,均作为手术率.(3)再出血判定:治疗期间止血后7 d内又出现呕血、黑便、胃管抽出血性液体、生命体征不稳定,经胃镜检查证实为胃曲张静脉再出血者.再出血者均行手术或TIPSS治疗,计为手术率。

统计学处理 两组间率的比较 χ^2 检验;两组间量的比较采用t检验。

2 结果

两组病例的止血时间、止血率、再出血率、输血率、手术率、死亡率见表1. Histoacryl治疗组患者的止血时间较三腔两囊管治疗组短,止血率无明显差异,再出血率、输血率、手术率、死亡率均较对照组低.可见Histoacryl治疗组疗效明显高于三腔两囊管治疗组。

表1 两组患者治疗结果比较(% , $\bar{x} \pm s$)

项目	Histoacryl 治疗组	三腔两囊管治疗组
n	22	20
止血时间(h)	3.8 ± 1.3^a	13.6 ± 8.7
止血率	22(100.0)	18(90.0)
再出血率	1(4.5) ^a	8(40.0)
输血率	11(50.0) ^a	16(80.0)
手术率	1(4.5) ^a	10(50.0)
死亡率	0(0%) ^a	5(25.0)

^a $P < 0.05$, vs 三腔两囊管治疗组。

3 讨论

组织黏合剂 Histoacryl(德国产)化名学 N-丁基-2-氰丙烯酸盐,是一种水样固化物,与血液接触数秒钟后即产生聚合固化。经内镜注射入曲张静脉,可有效地闭塞血管和控制曲张静脉出血。吴云林 et al 曾对 10 例食管或胃静脉曲张出血三腔管压迫无效者,行紧急洗胃后注射 Histoacryl 均获成功止血,且无严重并发症^[2]。本组治疗 22 例,急诊止血率为 100 % (22/22),与国外文献^[3]报道相仿。止血时间平均 3.8 h,止血迅速,减少了失血量;再出血率低 4.5 % (1/22),从而大大降低了手术率及死亡率。本组 Histoacryl 注射治疗后有 3 例患者诉胸骨后或剑突下疼痛,但可耐受,无需特殊处理;1 例注射止血后腹水较前明显增多,原因不明;1 例出现低热,2 d 后消失;由于 Histoacryl 快速固化,未发生类似硬化剂注射治疗后针孔渗血不止现象。文献报道, Histoacryl 联用碘化油注射后曾即时产生脑动脉卒中以及其他并发症^[3]。本组治疗未出现类似的严重并发症,可能采用改良的“三明治”法^[2]及注意排除注射导管中的空气有助于减少栓

塞并发症。彻底洗胃并保持视野清晰、准确穿刺出血静脉是治疗成功的关键。操作者与助手的配合也很重要,这可以减少或避免并发症和不必要的器械损坏。

研究表明,内镜下 Histoacryl 注射治疗 GV 出血止血迅速、急诊止血率高、再出血率低、疗效确切、安全性高且患者耐受性好。目前认为,组织胶注射为胃底静脉曲张活动性出血治疗的首选方法,而且是唯一可选择的有效治疗方法^[4]。他以最小的创伤取得了明显的止血效果,值得临床推广使用。

4 参考文献

- 1 中华消化内镜学会. 食管胃底静脉曲张内镜下诊断和治疗规范试行方案. 中华消化内镜杂志 2000;17:198-199
- 2 吴云林,钟捷,孙蕴伟,马天乐,蒋伟. 组织黏合剂 Histoacryl 治疗消化道急性出血. 中华消化内镜杂志 1998;15:90-91
- 3 Yamamoto M, Suzuki H. Endoscopic treatment for esophago-gastric varices current status in Japan. *Hepato Gastroenterol* 1997;44:637-648
- 4 李兆申,许国铭. 食管静脉曲张出血介入的治疗. 新消化病学杂志 1996;4:573-574

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 •

肝病患者血清肿瘤坏死因子 α 水平变化

徐学刚,张美稀,董惠芳,杨协珍,金树根,陈建杰,王灵台

徐学刚,启东市人民医院 江苏省启东市 226200
张美稀,平阳县中医院 浙江省平阳县 325400
董惠芳,杨协珍,金树根,陈建杰,王灵台,上海中医药大学附属曙光医院 上海市 200021
项目负责人:徐学刚,226200,江苏省启东市人民医院.
电话:0513-3315686
收稿日期:2002-11-14 接受日期:2002-12-07

摘要

目的:通过观察肝病患者血清肿瘤坏死因子 α 变化来分析其在肝脏损伤诊治应用中的临床意义

方法:采用 ELISA 法来检测肝病患者血清肿瘤坏死因子 α 水平。

结果:肝病患者血清 TNF α 水平上升,而以伴细菌感染的失代偿期肝硬化患者上升最为显著。相关分析发现,血清 TNF α 上升与急性肝损伤(ALT、AST、AKP、GGT)指标无明显相关性,与免疫细胞激活和慢性炎症指标(PBMC 活化、 γ 球蛋白、IgG、IgA、CIC)和肝纤维化(HA)及肝再生(AFP)正相关,而与肝合成指标(白蛋白、前白蛋白、总胆固醇、甘油三酯、载脂蛋白 E)和血象(粒细胞、红细胞、血小板)和免疫应激/消耗指标(淋巴细胞 CD4+CD28+、 α 2 球蛋白、 β 球蛋白、补体 C3)负相关。

结论:血清 TNF α 在肝病的诊治应用意义有限,主要反映受内毒素等毒素刺激网状内皮系统致其激活的程度,不宜应用于肝损伤程度和治疗效果的评定。

徐学刚,张美稀,董惠芳,杨协珍,金树根,陈建杰,王灵台. 肝病患者血清肿瘤坏死因子 α 水平变化. 世界华人消化杂志 2003;11(6):856-858

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/856.asp>

0 引言

肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 最早认为是单核巨噬细胞产生的一炎性细胞因子,因与肿瘤患者消瘦密切相关,以前曾被作为恶液质(cachexia)因子。TNF α 通过其胞膜受体 TNF α R I 和 TNF α R II 发挥其生物学效应。既往大量临床和实验研究表明,肝炎等肝脏疾病患者肝内有大量 TNF α 产生并参与肝损伤的病理发生发展,与肝炎和肝硬化及肝癌发生发展密切相关^[1-6]。为明确 TNF α 在不同类型肝脏疾病中的病理作用,为防治与 TNF α 密切相关肝损伤的治疗策略的制订提供合适的诊断和治疗效果评判用指标,我们采用 ELISA 法检测了 50 例肝病患者外周血浆肿瘤坏死因子 α 水平,兹报告如下并就其临床意义予以评价。

1 材料和方法

1.1 材料 本院肝科门诊和住院肝病患者 48 例, 男 35 例, 女 13 例, 年龄 27-73(37 ± 22)岁, 其中急性肝炎 8 例, 慢性乙型肝炎活动期 12 例, 慢性乙型肝炎静止/缓解期 11 例, 肝炎后肝硬化活动期 11 例, 恶性肿瘤 6 例(原发性肝癌 3 例, 胃肠肿瘤肝转移 3 例); 对照组 8 例, 男 5 例, 女 3 例, 年龄 25-54(36 ± 19)岁, 系来院门诊体检并排除心、肝、肾等重大疾患的正常健康人。

1.2 方法 (1)常规肝科检测项目:包括血常规、肝功能、免疫球蛋白、补体、血脂、透明质酸(HA)和 TNF α 等, 其中 TNF α 采用 ELISA 法, 试剂盒采用博力公司提供的(美国 RND SYSTEMS)进口分装试剂盒; (2)血液外周血单个核细胞胞膜 CDs 的流式细胞仪检测: 包括 CD4

(FITC)、CD8(FITC)、CD28(PE)、CD25(FITC)、CD45RA(FITC)、CD45RO(FITC)单染法测定, 采用美国 COULTER 公司的流式细胞仪(EPICS-XL 型)和专供荧光标记小鼠抗人 CDs 流式仪检测试剂(其中检测 CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD45RA、CD45RO 小鼠单抗克隆号分别是 UCHT1、13B8.2、B9.11、B1.49.9、CD28.8、ALB11、UCH1), 由专人进行外周血单个核细胞胞膜 CDs 检测。

统计学处理 数据采用微机全部输入 SPSS 数据库, 计量资料齐性检验后进行方差分析和两两比较及相关性分析。

2 结果

2.1 肝病患者血清 TNF α 水平变化 见表 1

表 1 肝病患者血清 TNF α 水平变化($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

	急性肝炎	活动期慢乙肝	静止期慢乙肝	活动期肝硬化	原发性肝癌	对照组
TNF α	9.7 ± 5.66^a	19.3 ± 21.02^a	12.2 ± 1.15^a	393.3 ± 319.52	17.4 ± 14.76^a	6.2 ± 3.21^a

^aP < 0.01 vs 活动期肝硬化, 其中活动性肝硬化组中伴明显细菌感染者其血清 TNF α 均 > 500 pg/ml。

2.2 活动期肝硬化血清 TNF α 水平变化的特异性分析 见表 2。

表 2 活动期肝硬化血清 TNF α 水平变化的特异性分析

组别与项目	活动期肝硬化特异性
血清 TNF α ≥ 50 pg/ml	87.5 %
血清 TNF α ≥ 100 pg/ml	100 %

2.3 与血清 TNF α 水平变化与正相关的有关指标 包括 γ 球蛋白(γ -globulin R = 0.700, P < 0.01)、淋巴细胞 CD4+(R = 0.250, P < 0.05)、单核细胞 CD4+(R = 0.490, P < 0.01)、单核细胞 CD8+ (R = 0.534, P < 0.01)、粒细胞 CD8+(R = 0.443, P < 0.02)、淋巴细胞 CD45RA(R = 0.247, P < 0.05)、单核细胞 CD45RA+(R = 0.549, P < 0.01)、单核细胞 CD45RO+(R = 0.517, P < 0.01)、粒细胞 CD25+(R = 0.319, P < 0.05)、CD45Ra/CD45RO(R = 0.251, P < 0.05)、淋巴细胞(R = 0.401, P < 0.01)、IgG(R = 0.469, P < 0.01)、IgA(R = 0.441, P < 0.01)、CIC(R = 0.407, P = 0.05)、透明质酸(HA, R = 0.343, P < 0.05)、甲胎蛋白(AFP, R = 0.798, P < 0.01)等。

2.4 与血清 TNF α 水平变化负相关的有关指标 包括白蛋白(Albumin, R = -0.574, P < 0.01)、前白蛋白(PA, R = -0.237, P < 0.05)、 α 2 球蛋白(α 2-globulin, R = -0.459, P < 0.05)、 β 球蛋白(β -globulin, R = -0.341, P > 0.05)、淋巴细胞 CD4+CD28+(R = -0.553, P < 0.01)、粒细胞(G, R = -0.385, P < 0.01)、红细胞(RBC, R = -0.655, P < 0.01)、血小板(PLT, R = -0.651, P < 0.01)、补体 C3(C3, R = -0.451, P < 0.01)、总胆固醇(T chol, R = -0.356, P > 0.05)、

甘油三酯(TG, R = -0.348, P > 0.05)、载脂蛋白 E(APOE, R = -0.544, P < 0.01)等。

3 讨论

我们采用 ELISA 法检测血清 TNF α , 发现肝病患者血清 TNF α 水平上升, 而以伴细菌感染的失代偿期肝硬化患者上升最为显著。相关分析发现, 血清 TNF α 上升与急性肝损伤(ALT、AST、AKP、GGT)指标无明显相关性, 与免疫细胞激活和慢性炎症指标(PBMC 活化、 γ 球蛋白、IgG、IgA、CIC)和肝纤维化(HA)及肝再生(AFP)正相关, 而与肝合成指标(白蛋白、前白蛋白、总胆固醇、甘油三酯、载脂蛋白 E)和血象(粒细胞、红细胞、血小板)和免疫应激/消耗指标(淋巴细胞 CD4+CD28+、 α 2 球蛋白、 β 球蛋白、补体 C3)负相关。

既往大量研究结果表明, 肝脏疾病时多伴有外周血液中 TNF α 水平的升高, 与肝脏炎症活动尤其内毒素血症密切相关^[7]。虽然最近有研究发现 T 淋巴细胞如 CD4+ 和 CD8+CTL 及 HBx 蛋白诱导的肝细胞均亦产生 TNF α , 我们的检测结果发现只有伴有细菌感染的失代偿期肝硬化患者上升最为显著, 说明内毒素刺激单核巨噬细胞致 TNF α 大量释放入血是血清 TNF α 上升的主要原因^[8,9]。

血清 TNF α 变化与急性肝损伤指标无明显相关性的原因, 我们认为与可溶性(soluble)TNF α (sTNF α)相比, 膜型 TNF α (membrane-type TNF α , mtTNF α)或与 TNF 家族成员中其他成分如 FAS、CD40-L、TRAIL 等与肝损伤关系更密切^[10], 此一现象在动物实验中免疫性肝损伤的治疗干预中肝损伤改善时而血清 TNF α 不显改善所证实^[11], 而阻止 mtTNF α 向 sTNF α 转化的金属蛋白

酶抑制剂在有效降低血清 TNF α 水平同时却加重肝损伤^[12], 更说明肝内 mtTNF α 增加才是肝损伤的主要原因, 而 TNF α 拮抗剂对急性移植物抗宿主病防治效果不如其对慢性移植物抗宿主病的防治效果^[13,14], TNF α 对实验性肿瘤的促进作用等现象均进一步表明 TNF α 在慢性组织病变尤其是癌变过程中有促进作用^[15-18], 更进一步证实血清 TNF α 不是一个良好的反映肝损伤指标。虽然阻抑 mtTNF α 向 sTNF α 转化的药物干预不利于肝损伤, 但阻抑 mtTNF α 表达的治疗方法能有效地防治重症肝衰竭而降低其死亡率^[19-21]。

血清 TNF α 与慢性炎症中的纤维化及再生等有关指标的良好相关性, 说明 TNF α 参与慢性炎症中纤维化和再生事件过程, 因而阻抑 mtTNF α 表达或 TNFR 表达(即拮抗 TNF α 效应)的药物如酞胺哌啶酮(沙利度胺, thalidomide)、糖皮质激素(glucocorticoids)、己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)、秋水仙碱(colchicine)、 β 受体阻滞剂(β receptor blocker)、山莨菪碱(654-2)、腺苷(adenosine)及各种天然和合成抗氧化剂(antioxidants)等均有助于肝脏等慢性组织病变如肝纤维化、门脉高压、肝硬化、肝癌的防治, 目前已有大量实验研究证实阻抑 TNF α 表达或拮抗 TNF α 效应能有效防治肝纤维化和门脉高压及肝癌^[21-24], 而免疫治疗肝纤维化病变致血清 TNF α 升高, 再次说明血清 TNF α 不是一个良好的反映肝损伤指标^[25]。因此我们认为血清 TNF α 在肝病的诊治应用意义有限, 主要反映网状内皮系统受内毒素(及外毒素?)等刺激, 用于肝损伤程度和治疗效果的评定似欠妥当。

4 参考文献

- 杨镇, 刘能银, 李大鹏, 裴法祖. 四氯化碳、血吸虫病和肝炎病毒所致的肝细胞死亡的模式. 同济医科大学学报 1999;28:313-316
- 杨镇, 刘仁则, 杨榕光, 蔡红娇. 肿瘤坏死因子 α 在急性血吸虫病小鼠肝脏表达的免疫组化观察. 中华实验外科杂志 1996;13:131-132
- 王新, 陈岳祥, 许才斌, 赵国宁, 黄裕新, 王庆莉. 肿瘤坏死因子 α 与人肝纤维化关系的研究. 华人消化杂志 1998;6:106-108
- 唐望先, 杜荔青, 张文英, 陈春莲. 大部分肝切除后肝再生中 TNF α 、IL-6 作用的研究. 中国组织化学与细胞化学杂志 1998;7:306-309
- 太光平, 汪仕良, 王裴, 陈渝, 刘昕, 王桂珍, 章波, 黎鳌. IL-10 基因转染对小鼠炎症递质产生的抑制作用. 中华创伤杂志 1999;15:271-274
- 王立赞, 高继发, 王保生, 朱凡河, 叶健, 毛庆波, 王旭. 内毒素休克肝脏肿瘤坏死因子 α 表达的免疫组织化学研究. 济宁医学院学报 1998;21:1-4
- 孔庆胜, 孔令斌, 刘祖华. 不同临床类型乙型肝炎血清 TNF 活性比较. 世界华人消化杂志 1999;7:625-626
- Matsumura S, Yamamoto K, Shimada N, Okano N, Okamoto R, Suzuki T, Hakoda T, Mizuno M, Higashi T, Tsuji T. High frequency of circulating HBcAg-specific CD8 T cells in hepatitis B infection: a flow cytometric analysis. Clin Exp Immunol 2001;124:435-444
- Lara-Pezzi E, Majano PL, Gomez-Gonzalo M, Garcia-Monzon C, Moreno-Otero R, Levrero M, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus X protein up-regulates tumor necrosis factor alpha gene expression in hepatocytes. Hepatology 1998;28:1013-1021
- Kusters S, Tiegs G, Alexopoulou L, Pasparakis M, Douni E, Kunstle G, Bluethmann H, Wendel A, Pfizenmaier K, Kollias G, Grell M. In vivo evidence for a functional role of both Tumor necrosis factor(TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. Eur J Immunol 1997;27:2870-2875
- Schumann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, van Rooijen N, Tiegs G. Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. Am J Pathol 2000;157:1671-1683
- Solorzano CC, Ksontini R, Pruitt JH, Hess PJ, Edwards PD, Kaibara A, Abouhamze A, Auffenberg T, Galaray RE, Vauthey JN, Copeland EM 3rd, Edwards CK 3rd, Lauwers GY, Clare-Salzler M, MacKay SL, Moldawer LL, Lazarus DD. Involvement of 26-kDa cell-associated TNF-alpha in experimental hepatitis and exacerbation of liver injury with a matrix metalloproteinase inhibitor. J Immunol 1997;158:414-419
- McCarthy DM, Kanfer EJ, Barrett AJ. Thalidomide for the therapy of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. Biomed Pharmacother 1989;43:693-697
- Mehta P, Kedar A, Graham-Pole J, Skoda-Smith S, Wingard JR. Thalidomide in children undergoing bone marrow transplantation: series at a single institution and review of the literature. Pediatrics 1999;103:e44
- Huang C, Li J, Ma WY, Dong Z. JNK activation is required for JB6 cell transformation induced by tumor necrosis factor-alpha but not by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. J Biol Chem 1999;274:29672-29676
- Takada Y, Hachiya M, Osawa Y, Hasegawa Y, Ando K, Kobayashi Y, Akashi M. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced apoptosis is mediated by tumor necrosis factor alpha in human monocytic U937 cells. J Biol Chem 1999;274:28286-28292
- Suganuma M, Okabe S, Marino MW, Sakai A, Sueoka E, Fujiki H. Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in tumor promotion as revealed by TNF-alpha-deficient mice. Cancer Res 1999;59:4516-4518
- Moore RJ, Owens DM, Stamp G, Arnott C, Burke F, East N, Holdsworth H, Turner L, Rollins B, Pasparakis M, Kollias G, Balkwill F. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. Nat Med 1999;5:828-831
- 王立赞, 王保生, 高继发, 毛庆波, 朱凡河, 叶建. 地塞米松、噻庚啶和山莨菪碱对 LPS 诱导大鼠肝脏 TNF α 表达的影响. 中国组织化学与细胞化学杂志 1999;8:452-455
- 刘树人, 郑茉莉, 李灼亮, 余宙耀, 陆汉明. 反应停对急性肝衰竭的预防作用. 胃肠病学和肝病杂志 2000;9:39-41
- 刘树人, 郑茉莉, 李灼亮, 余宙耀, 陆汉明. 反应停对大鼠急性肝功能衰竭的保护作用. 中华内科杂志 1999;38:688-690
- 贺永文, 朱传武, 曾令兰, 高勇, 罗端德. TNF- α 及其拮抗剂对血吸虫病小鼠的 TGF- β 1 和 III 型胶原的影响. 中国寄生虫病防治杂志 2000;13:48-51
- 王建华, 蔡同年, 范跃祖, 高萍, 楼丽广, 冉瑞琼. 酞胺哌啶酮对大鼠门脉高压血流动力学影响. 上海铁道大学学报 1999;20:15-17
- 龙爱华, 苏立稳, 聂广. 蚤莲合剂对大鼠肝癌前病变的影响. 中国实验方剂学杂志 1999;5:18-20
- 贾乐文, 张大成, 李春梅, 牟希亚. 绿脓杆菌 MSHA 菌苗对肝纤维化大鼠血清 TNF 的影响. 胃肠病学和肝病杂志 2000;9:22-23

尼美舒利引起肝脏损害 14 例

关 英,徐 峰,胡 莲,周甘平

关英,徐峰,胡莲,中国人民解放军第一军医大学珠江医院临床药理科 广东省广州市 510280
周甘平,湛江市中心人民医院药剂科 广东省湛江市 528475
项目负责人:徐峰,510280,广东省广州市,中国人民解放军第一军医大学珠江医院临床药理科. andrewfxu@sina.com.cn
电话:020-61643555 传真:020-61643899
收稿日期:2003-01-04 接受日期:2003-01-14

摘要

目的:调查有关应用尼美舒利引起肝脏损害的病例报道,促进尼美舒利的合理用药.

方法:通过《中国生物医学文献数据库》及《美国国立医学图书馆网站》(Pub Med)检索尼美舒利引起肝脏损害的病例报道并进行分析整理.

结果:全球共有14例与应用尼美舒利有关的引起严重的肝损害病例报道,其中女12例(85.71%),男2例(14.29%);13例出现黄疸(92.86%),6例死亡(42.86%);2例有后遗症(14.29%),不合理用药3例(21.43%).因果关系评估:肯定3例,很可能7例,可能3例,可疑1例.

结论:尼美舒利有极高的致严重肝损害用药风险,建议应用尼美舒利应遵循下列原则:(1)肝脏损害患者禁用尼美舒利.(2)避免与有肝损害的药物联合应用.(3)长期应用尼美舒利的患者应定期检查肝功指标,必要时应及时停止使用.

关英,徐峰,胡莲,周甘平. 尼美舒利引起肝脏损害 14 例. 世界华人消化杂志 2003;11(6):859-860

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/859.asp>

0 引言

尼美舒利是1985年在意大利上市的新一代的非甾体抗炎镇痛药物^[1],选择性地抑制环氧氧化酶-2(COX-2),抑制炎症过程所有递质,抑制组胺的释放,临床上用于风湿痛、外伤痛、癌症疼痛等.尼美舒利因消化道副作用比较小而被临床广泛接受.近年来全球已有多起与应用尼美舒利有关的重度肝脏损害的报道,本文拟对全球因应用尼美舒利有关而造成肝损害的文献报道进行前瞻性调查,并对合理性用药进行初步评价.

1 材料和方法

1.1 材料 检索1996/2002《中国生物医学文献数据库》及《美国国立医学图书馆网站》(MEDLINE/PubMed)有关尼美舒利引起肝脏损害的文献.调查的文献来自以下几个国家:西班牙、爱尔兰、土耳其、中国、比利时、瑞士、美国等.

1.2 方法 建立表格,按照统一的调查内容对尼美舒利引起肝损害的报道逐项进行登记,包括患者年龄、性别、原患疾病、用药剂量、给药途径、服药天数、用药原因、合并用药、治疗结果、临床诊断、肝损害程度、转归等.因果关系评估方法:药物不良反应因果关系评价按我国卫生部药物不良反应监测中心颁布的标准分为肯定、很可能、可能及可疑4级标准及Van Steenberg et al^[2]采用的法国国际会议上达成共识的评分标准:即药物不良反应因果关系评分结果:>8分为肯定,6-8分为很可能,3-5分为可能,<3分为可疑.不良反应转归按其治疗的进程及结局分治愈、好转、有后遗症和因药物不良反应死亡4项.

2 结果

2.1 一般情况 患者年龄22-81岁,平均年龄57.7岁,女12例(85.71%),男2例(14.29%),用药剂量分别为100 mg/d、200 mg/d,全部为口服给药,用药天数最少有1 d(200 mg/d),最多229 d,平均用药60.2 d.用药原因包括:慢性腰痛2例、慢性关节炎2例、膝关节炎2例、类风湿性关节炎1例、关节痛2例,胶原病1例、胰腺癌1例、手外伤1例,变形性骨炎1例,未注明用药原因1例.所有患者否认曾患有肝炎、输血、酗酒、吸毒、吸烟、药物过敏等^[2-7].

2.2 合并用药情况 14例肝损害病例的报道中三例合并用药情况分别如下:病例1^[3]:22岁女性,因右手指骨外伤恢复期伤口感染服用尼美舒利200 mg/d,合并应用洛美沙星(200 mg/d)和三七总苷(150 mg/d).病例2^[4]:58岁女性,因患慢性腰痛服用尼美舒利200 mg/d,合并应用妊马雌酮(conjugated oestrogens).病例3^[5]:57岁女性,因患慢性腰痛服用尼美舒利100 mg/d合并应用兰索拉唑(20 mg/d)和奥沙西泮(每晚15 mg).上述3例中2例被诊断为:尼美舒利致暴发性肝衰竭并死亡,1例被诊断为药物性肝炎并有后遗症.

2.3 肝损害出现的时间、临床表现、临床诊断 14例服用尼美舒利后出现肝损害患者的临床症状都发生在用药1 wk以后^[2-7],主要临床症状依出现先后顺序包括:皮疹、恶心、呕吐、皮肤黄染.生化指标显示:肝功能异常,AST、ALT持续增高等.影像学检查结果有:胆囊壁增厚、胆汁淤积、肝脏表面不规则.组织学检查结果有:肝细胞坏死、外周小动脉桥坏死等.无心血管疾病、呼吸系统疾病的临床表现.临床诊断分别为:急性肝炎^[2]、药物性肝炎^[3]、暴发性肝衰竭^[4]、重症肝损害^[5]、重症肝炎^[6],急性胆汁淤积型肝炎^[7]等.

2.4 因果关系评估及转归^[2,3,5] 肯定3例,很可能7例,可能3例,可疑1例。其中6例死亡(42.86%),2例有后遗症(14.29%),6例恢复正常(42.86%)。不合理用药3例(21.43%)。

3 讨论

非甾体类抗炎药物系指化学结构中不含有甾体母核的一类具有解热镇痛抗炎作用的药物,解热作用通过抑制环氧合酶从而抑制PGE大量释放,纠正发热状态时热敏神经元感受温热的阈值上调,使体温调节中枢调定点恢复正常值达到降温;镇痛作用是通过抑制PG的合成,阻断PG的致痛作用及增敏作用而镇痛。这一类药物包括有:水杨酸类、苯胺类、吡唑酮类、吲哚美辛和硫茛酸、灭酸类、丙酸类、昔康类等^[8],由于消化系统及肝损害(每年5/10万)^[7]等方面副作用比较大,限制了他们的使用。

尼美舒利化学名4-硝基-2-苯氧基甲磺酰苯胺,选择性抑制环氧合酶-2,其突出的优点是较少的消化系统不良反应,肝损害发生率很低,约1/100万^[9],因而被广泛地应用于炎症性疼痛的治疗。

然而本次关于尼美舒利引起肝脏损害病例报告调查的结果显示:应用尼美舒利可能会引起严重的肝损害。调研结果显示有以下三个特点:(1)女性为多数(85.71%);(2)肝损害严重(40%死亡);(3)21.43%与合并应用有潜在的肝损害药物有关。

尼美舒利引起肝损害作用机制目前不清楚,推测可能是非特异性反应、药物代谢动力学参数及分子结构因素的影响^[2,3,6,7];人们正在探索尼美舒利引起肝损害的分子作用机制^[9,10]。Mingatto et al^[11]初步证明:尼美舒利可导致离体大鼠肝细胞损害,这种作用可能基于线粒体失偶联使ATP产生减少^[11]。

虽然尼美舒利造成的肝损害发生率很低,但由于其危害的程度十分严重,已造成了药源性疾病^[2-7],西班牙的药物警戒系统已经向医生发出警告:医生应该警惕尼美舒利引起药物性肝炎的可能性,一旦有可疑问题要及时停药^[12]。2002-05,西班牙、土耳其、爱尔兰已将该药物由市场撤出^[13]。

近年来药物性肝炎的报道逐渐增加,据统计,至少有1000多种药物可引起药物性肝炎^[14],引起药物性肝炎的因素很多,其中有药物本身因素、个体差异、疾病本身、药物相互作用、药物代谢动力学参数、合理用药、食物因素等。有些药物致药物性肝炎可以达到50%。及时发现并报道药物性肝炎对促进合理用药、保证药品安全有效、减少药源性疾病的发生意义重大。

我国对尼美舒利药物不良反应报道较少,可能有以下几个原因:(1)没有。(2)不重视。(3)发现与药物有关的肝损害,由于药物应用较多,不好下结论。(4)许多医院没有ADR监测专职人员。(5)从事ADR监测工作的专业人员的水平。笔者建议对尼美舒利的不良反应做大量本前瞻性的临床观察,指导合理用药。

我国ADR报告制度启动比较发达国家晚30a,至今只有14a的工作经验,临床对ADR报告重视不够,个别医疗单位在评职称过程中忽视或歧视ADR个案报道,误导医务人员追逐名利,急功近利,使许多医务人员放弃报道ADR个案报道,因此失去很多宝贵的临床资料。

本次调查结果提示应用尼美舒利确实存在潜在的严重肝损害的风险,相信这个数字还会增加。建议应用尼美舒利应遵循下列原则:(1)肝脏损害患者禁用尼美舒利。(2)应用尼美舒利应避免与有潜在肝损害的药物联合应用。(3)长期应用尼美舒利的患者应定期检查肝功指标,必要时应及时停止使用。

4 参考文献

- 1 丁长海,徐叔云,梅俏,徐建华,王金凯,李常玉,魏伟,孙桂华. 尼美舒利和萘普生随机双盲对照治疗类风湿关节炎. 中国临床药理学杂志 1998;15:9-13
- 2 Van Steenberg W, Peeters P, De Bondt J, Staessen D, Buscher H, Laporta T, Roskams T, Desmet V. Nimesulide-induced acute hepatitis: evidence from six cases. *J Hepatol* 1998;29:135-141
- 3 关英,徐峰. 洛美沙星、尼美舒利和三七总苷合用引起肝脏损害. 药物不良反应杂志 2002;4:129
- 4 McCormick PA, Kennedy F, Curry M, Traynor O. COX 2 inhibitor and fulminant hepatic failure. *The Lancet* 1999;353:40-41
- 5 Merlani G, Fox M, Oehen HP, Cathomas G, Renner EL, Fattinger K, Schneemann M, Kullak-Ublick GA. Fatal hepatotoxicity secondary to nimesulide. *Eur J Clin Pharmacol* 2001;57:321-326
- 6 Andrade RJ, Lucena MI, Fernandez MC, Gonzalez M. Fatal hepatitis associated with nimesulide. *J Hepatol* 2000;32:174
- 7 Romero-Gomez M, Nevado Santos M, Otero Fernandez MA, Fovelo MJ, Suarez-Garcia E, Castro Fernandez M. Acute cholestatic hepatitis induced by nimesulide. *Liver* 1999;19:164-165
- 8 竺心影. 药理学. 第3版. 北京:人民卫生出版社, 1987:121-129
- 9 Boelsterli UA. Mechanisms of NSAID-induced hepatotoxicity: focus on nimesulide. *Drug Saf* 2002;25:633-648
- 10 田耕,于皆平,罗和生,余保平,李建英. 环氧合酶-2在急性肝损害中的作用机制. 世界华人消化杂志 2002;10:24-27
- 11 Mingatto FE, Rodrigues T, Pigoso AA, Uyemura SA, Curti C, Santos AC. The critical role of mitochondrial energetic impairment in the toxicity of nimesulide to hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:601-607
- 12 Macia MA, Carvajal A, del Pozo JG, Vera E, del Pino A. Hepatotoxicity associated with nimesulide: data from the Spanish Pharmacovigilance system. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:596-597
- 13 褚燕君. 腺苷蛋氨酸治疗药物性肝炎19例. 世界华人消化杂志 2001;9:1344-1345
- 14 刘静,韩志友,韩修武,管德林,高居忠. 思美泰治疗环孢素肝中毒15例. 世界华人消化杂志 2001;9:602-603

• 临床经验 •

脾脏体积、脾静脉血流及血细胞计数在门静脉高压症分期中的意义

王秀艳,游晓功,施宝民,穆庆岭,吴泰璜

王秀艳, 山东省立医院超声诊疗中心, 山东大学临床医学学院
山东省济南市 250021
游晓功, 泰安市卫校 山东省泰安市 271000
施宝民, 穆庆岭, 吴泰璜, 山东省立医院普外科 山东省济南市 250021
山东省医药卫生青年基金课题, No.1999CA2BJBA1
项目负责人: 王秀艳, 250021, 山东省济南市经五路324号, 山东省立医院超声
诊疗中心, 山东大学临床医学学院. wangxiuy87@yahoo.com
电话: 0531-7938911-2530 传真: 0531-7937741
收稿日期: 2002-11-29 接受日期: 2002-12-26

摘要

目的: 研究脾脏体积、脾静脉血流以及外周血血细胞计数与不同肝功能分级的相关性, 从而揭示他们在门静脉高压症临床分期中的意义。

方法: 彩色多普勒超声测定40例肝硬化门静脉高压症患者脾脏体积、脾静脉及门静脉血流速度和血管内径, 并进行外周血细胞计数和Child分级, 研究各项指标之间的相关性和不同肝功能分级之间的差异。

结果: 脾静脉内径、脾静脉血流速度、门静脉血流速度和外周血WBC计数在Child分级三组间的差异有显著性, 而门静脉内径、外周血RBC、PLT计数在三组之间的差异均无显著性。脾静脉内径和脾静脉血流速度呈负相关($r = -0.43$), 与门静脉流速也呈负相关($r = -0.330$)。WBC与脾静脉流速呈正相关($r = 0.353$), 与门静脉血流速度呈正相关($r = 0.393$)。脾脏体积与HB呈负相关($r = -0.620$), 与PLT呈负相关($r = -0.834$)。PLT与HB呈正相关($r = 0.583$)。

结论: Child分级与反映脾功能亢进程度的指标外周血细胞计数无明显相关; 门静脉高压症的分期应该参照肝功能和脾功能两方面。

王秀艳, 游晓功, 施宝民, 穆庆岭, 吴泰璜. 脾脏体积、脾静脉血流及血细胞计数在门静脉高压症分期中的意义. 世界华人消化杂志 2003;11(6):861-862
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/861.asp>

0 引言

随着肝脏纤维化的不断加剧, 最终导致门静脉高压症和肝功能失代偿。其中一个重要的病理生理学变化就是脾脏肿大伴脾功能亢进, 在一定程度上影响着该病的进展和预后^[1,2]。研究脾脏体积、脾静脉血流及血细胞计数与门静脉血流动力学指标在不同肝功能分级的相关性, 从而可以确立脾脏的有关改变在判断门静脉高压症病程进展和分期中的重要作用。

1 材料和方法

1.1 材料 丹麦产BK3535彩色多普勒超声诊断仪, 频

率3.5 HZ。实验组为经过临床和病理证实的肝炎后肝硬化门静脉高压症患者40名(1997-7/1999-12期间共收集47例, 符合条件者40例), 男31例, 女9例。平均年龄45岁(18-65岁)。对照组为同期获得的健康查体者20例, 均无肝、心、肾病史, 肝功能正常。两组之间性别年龄无显著性差异。Child分级采用改良Child-Pugh分级法。

1.2 方法 患者禁饮食8 h, 平卧位, 安静呼吸。规定条件下, 同一人操作, 测定前均不知患者肝功能分级情况。取样位置在门静脉主干距离门静脉左右分支处1-2 cm、脾静脉位于脾门处2 cm。取样容积以接近血管内径为佳, 声束与血流方向的夹角控制在60°以内。每个取样位置反复测定至出现静脉的典型多普勒频谱为止, 此时屏气, 取一个心动周期, 测定平均血流速度。结果计算: 血流量 = 平均血流速度 × 血管截面积。观察指标: 平均血流速度, 血管内径, 血流量。脾门处测定脾脏最大长径、横径及厚度, 三者的乘积再乘以0.6, 作为脾脏体积的估计值。研究脾脏体积、脾静脉内径和流速、血细胞计数、门静脉血流速度、门静脉内径在不同肝功能Child-Pugh分级之间的差异和各指标之间的相关程度。

统计学方法 采用SPSS10.0统计软件包, 单因素方差分析及相关分析, 计算各测量值之间的差异。P < 0.05为差异有显著性。

2 结果

不同Child分级间, 只有脾静脉内径、脾静脉血流速度、门静脉血流速度和外周血WBC计数在三组间的差异有显著性, 随着Child分级的加深, 脾静脉内径逐渐加大, 脾静脉血流速度、门静脉血流速度以及外周血WBC计数逐渐变小; 而门静脉内径、外周血RBC、PLT计数在三组之间的差异均无显著性(表1)。脾静脉内径和

表1 不同Child分级间各指标单因素方差分析结果

指标	F 值	P 值
脾静脉内径	4.832	0.014
脾静脉流速度	4.873	0.013
脾脏体积	4.136	0.024
门静脉内径	0.656	0.525
门静脉流速度	16.193	<0.001
WBC	5.286	0.010
HB	1.746	0.189
PLT	1.935	0.159

脾静脉血流速度呈负相关, $r = -0.43$, $P < 0.01$. 脾静脉内径与门静脉流速也呈负相关, $r = -0.330$, $P < 0.05$. 脾脏体积与门静脉内径呈负相关, $r = 0.081$, $P = 0.618$, 无统计学意义. 脾静脉流速与 WBC 呈正相关, $r = 0.353$, $P < 0.05$. 门静脉血流速度与 WBC 呈正相关, $r = 0.393$, $P < 0.05$. 脾脏体积与 HB 呈负相关, $r = -0.620$, $P < 0.001$. 脾脏体积与 PLT 呈负相关, $r = -0.834$, $P < 0.001$. PLT 与 HB 呈正相关, $r = 0.583$, $P < 0.0001$.

3 讨论

肝硬化门静脉高压症的门静脉血流动力学改变已经得到较为系统研究, 彩色多普勒超声业已成为判断其病程和评价其疗效的最常用方法. 不同 Child 分级和不同手术处理后门静脉系的血流速度和血流量的改变, 已经基本上达成了共识. 但是关于脾脏体积、外周血细胞计数、脾静脉及门静脉血流速度和流量在不同 Child 分级改变的研究不多, 他们之间的相关程度也未得到较详尽阐明.

3.1 Child 分级与脾功能亢进分级 脾肿大是肝硬化门静脉高压症的重要特征之一, 发生率大约在 6-92% 之间^[2]. 脾肿大致使脾功能亢进的主要后果就是血细胞单系或三系的减少, 伴或不伴有骨髓的增生活跃. 这与脾脏血池增大、滤血作用加强以及许多的体液因子改变有关^[3]. 本组资料证实, 门静脉高压时, 脾脏体积与外周血 HB、PLT 呈负相关, 脾脏体积越大, 外周血 HB 和 PLT 越少, 说明脾脏体积是判断脾功能亢进的重要指标之一. 但是外周血 WBC 却与之无相关性, 与以往的研究结果不符^[3], 可能与病例选择的不同有关.

本研究同时证实, 尽管脾脏体积在不同 Child 分级下的差异具有显著性, 却与门静脉和脾静脉内径、门静脉和脾静脉血流速度无明显相关性, 表明门静脉高压症时脾脏体积增大的原因不单纯与门静脉系的血流动力学改变有关, 很可能与机体网状内皮系统的增生、脾脏的纤维化等原因更有关系^[4]. Piscaglia 比较了 124 例肝硬化脾肿大和 39 例血液病引起的脾肿大, 结果证明, 脾动脉阻力指数和门静脉血流速度两组之间有显著性差异. 门静脉高压症患者脾动脉阻力指数增高, 而门静脉血流速度则降低^[5]. Bolognesi 报道, 肝硬变患者在进行肝移植术后门静脉血流量立即得到增加, 2 a 后恢复正常; 而脾肿大随访到 4 a 一直存在, 与门静脉血流量具有相关性^[6]. 通过肝脏活检对其进行纤维化程度分级, 可以分成 4 级, 许洪伟 et al^[7] 发现肝脏纤维化程度越高, 脾脏体积越大, 外周血三系均减少. 同时证明了脾功能亢进的程度可以由脾脏体积、外周血细胞的变化来反映.

另一方面, 目前最常用的判断门静脉高压症进程的 Child 分级系统, 并不能完全反映其特征之一. 脾功

能亢进的程度. 所以评价门静脉高压症的临床分期, 单纯靠 Child 系统是不够的. 我国 1984 年曾提出自己的肝功能分期标准, 但并不是指门静脉高压症本身的分期, 所以也未纳入脾功能亢进的指标^[8].

本组结果还显示, 在不同 Child 分级状态下, 门静脉内径、外周血 RBC、PLT 计数在三组之间的差异均无显著性. 表明门静脉内径在肝脏纤维化、肝功能下降的进程中, 不存在特征性的变化, 不能作为其临床分期的依据之一. 与其他研究结果一致^[5]. 反映脾功能亢进程度的外周血 HB、PLT 在不同 Child 分级中的差异无显著性, 再一次证明 Child 分级与脾功能亢进的程度无明显相关性.

3.2 门静脉高压症的临床分期 门静脉高压症涉及到全身血流动力学和多个脏器功能的改变, 对其进行较为准确而又全面的临床分期是比较困难的. 传统上依据 Warren 分期法, 采取不同方法测定全肝血流量、肝动脉血流量和门静脉血流量, 对门静脉高压症进行血流动力学分期, 但也没有考虑脾功能亢进的情况. 实际上, 门静脉高压症患者脾脏会发生许多血管组织学、生理学、免疫学等方面的改变, 脾肿大不仅是门静脉高压作用的结果, 同时也是重要的促进因素^[6]. 而且, 门静脉高压症手术治疗的主要目的是降低门静脉压力、防治食管静脉曲张破裂大出血和纠正脾肿大、脾功能亢进, 因此, 如果更准确地对其进行临床分期, 应当照顾到肝功能和脾功能两个方面. 而反映脾功能亢进程度的脾脏体积和外周血细胞计数, 也应当成为门静脉高压症临床分期中所参照的重要指标.

4 参考文献

- 1 Macias-Rodriguez MA, Rendon-Unceta P, Martinez-Sierra MC, Teyssiere-Blas I, Diaz-Garcia F, Martin-Herrera L. Prognostic usefulness of ultrasonographic signs of portal hypertension in patients with child-pugh stage A liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3595-3600
- 2 Mutchnick MG, Lerner E, Conn HO. Effect of portacaval anastomosis on hypersplenism. *Dig Dis Sci* 1980;25:929-936
- 3 Shah SH, Hayes PC, Allan PL, Nicoll J, Finlayson ND. Measurement of spleen size and its relation to hypersplenism and portal hemodynamics in portal hypertension due to hepatic cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 1996;91:2580-2583
- 4 Bolognesi M, Merkel C, Sacerdoti D, Nava V, Gatta A. Role of spleen enlargement in cirrhosis with portal hypertension. *Dig Liver Dis* 2002;34:144-150
- 5 Bolognesi M, Sacerdoti D, Bombonato G, Merkel C, Sartori G, Merenda R, Nava V, Angeli P, Feltracco P, Gatta A. Change in portal flow after liver transplantation: effect on hepatic arterial resistance indices and role of spleen size. *Hepatology* 2002;35:601-608
- 6 谢冬英, 谢仕斌, 李勇忠, 姚春澜, 姚集鲁. 肝纤维化与门静脉、脾静脉直径、脾脏大小及血细胞计数的关系. *中华消化杂志* 2000;20:308-310
- 7 许洪伟, 朱菊人, 孙成刚, 万昭海, 陆伟军. 肝硬化患者门静脉系统血流动力学研究的临床价值. *中华肝病杂志* 2000;8:55
- 8 施宝民, 杨镇. 门静脉高压症患者脾内血管病变及其发病机制的研究. *中华医学杂志* 2000;80:196-198

大连地区糖尿病患者与健康成年人肠内菌群的比较

孙艳,刘波,赵静玫,王海岩,徐和利,李雪驼

孙艳,刘波,赵静玫,王海岩,徐和利,李雪驼,中国科学院大连化学物理研究所生化工程室 辽宁省大连市 116023
项目负责人:李雪驼,116023,辽宁省大连市中山路457号,中国科学院大连化学物理研究所生化工程室. lixt@dicp.ac.cn
电话:0411-4379066 传真:0411-4691570
收稿日期:2002-11-19 接受日期:2002-12-18

摘要

目的:比较10例Ⅱ型糖尿病患者和6名健康成年人的肠内菌群.

方法:分析检测志愿者粪便中菌群、腐败物质、生化指标、pH值和含水率等相关数据.

结果:糖尿病患者肠内居统治地位的是非有益菌,肠内有益菌显著减少,有害菌比例升高,腐败物质明显高于健康成年人,患者粪便的含水率和pH值都偏低.

结论:糖尿病患者肠道菌群紊乱,易发生便秘,免疫力低下.

孙艳,刘波,赵静玫,王海岩,徐和利,李雪驼. 大连地区糖尿病患者与健康成年人肠内菌群的比较. 世界华人消化杂志 2003;11(6):863-865

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/863.asp>

0 引言

糖尿病在国内乃至世界发病率均较高,至今还没有根治的方法.但随着研究的深化,普遍认为糖尿病并非单一疾病,而是一组临床综合征群.因此从各个方面研究糖尿病,糖尿病与心血管、肾脏、神经系统等疾病目前都成为热点.糖尿病是一种营养代谢性疾病,其代谢特点是分解代谢大于合成代谢.

作为宿主肠内的正常微生物优势菌群成员的有益菌(乳杆菌和双歧杆菌等),直接参与机体生物防御屏障的构成,并可以调整菌群失调,使宿主恢复生态平衡,起到生物拮抗作用.同时,肠内微生物群也包括致病性类型菌(即有害菌,包括韦氏梭菌、葡萄球菌、变形杆菌等),可引起宿主发病,会引起毒素增加和自身感染(包括皮肤、黏膜、脏器及血行感染).还存在中间性类型细菌(大肠杆菌、链球菌和韦荣球菌),具有潜在的有害性,可导致腐败物质、致癌物和毒素的增加,会带来各种不良影响,促使宿主各器官功能退化.

肠内菌群对各种物质的代谢也是分解代谢,与糖尿病的代谢特征相似,二者必然会相互影响.然而目前我国在糖尿病患者肠内菌群的变化、肠内菌群和糖尿病各阶段的相互关系等领域还未有人涉及.我们在此做了相关的调查和研究,希望能够对糖尿病和微生态领域的研究都有所促进.

1 材料和方法

1.1 材料 BL培养基,EG培养基,CW培养基,DHL培养基,PDA培养基,购自日本制药株式会社;TS培养基(BBL).试验观察对象:(1)实验组:年龄40-50岁,体重70-80 kg,病史2 a左右,血糖7-14 mmol/L的Ⅱ型糖尿病患者,共10例.(2)对照组:年龄介于40-50岁,体重70-80 kg的健康成年人,共6例.

1.2 方法

1.2.1 样本采集 在患者清晨排便后取新鲜粪便100 g装入洁净小瓶,冷藏保存,送实验室,5 h内进行分离培养.共采集样品4次.

在第一次采集患者粪便样品同时采集患者血液和尿液等样品,用仪器进行鉴定.

1.2.2 肠内菌群的测定方法 (1)稀释方法:称取新鲜粪便1 g,加入到9 mL无菌生理盐水中,旋涡震荡,然后递倍稀释至 10^{-7} ,取0.5 mL稀释液滴入干燥的平板中,采用涂布法进行培养.(2)培养:TS培养基进行需氧培养,BL培养基进行厌氧培养,具体培养方法见本实验室相关文章^[1].(3)菌形鉴定:根据不同的菌落特征,做菌落计数,进行统计.镜检观察与特征培养基确定细菌种类.

1.2.3 测定新鲜粪便的pH值和水分,见文献[1-4]

1.2.4 粪便中腐败物质的测定 (1)患者粪便中氮含量的测定:将患者粪便准确称取,加入一定比例的100 g/L NaCl(pH2.5)的酸性溶液,迅速振摇,离心(4 000 rpm)后过滤,浸提液中加入相应的柠檬酸钠溶液、苯酚溶液、次氯酸钠溶液,混匀.放置稳定后,在640 nm处测定吸光值,计算样品浓度.(2)患者粪便中硫化物的测定:将患者粪便准确称取,加入一定比例的纯水,0.22 g/mL乙酸锌溶液及1 mol/L NaOH溶液,摇床振摇,当有沉淀物凝聚下沉后,过滤,并用纯水洗涤滤纸和沉淀物,加碘溶液和浓HCl.在暗处放置10 min后,用硫代硫酸钠滴定过量的碘,计算硫化物的浓度.

2 结果

2.1 糖尿病患者与健康成年人肠内菌群的比较 10例实验观察对象,肠内菌群特征比较一致.糖尿病患者肠道内的总菌数(9.34 ± 0.37)较正常健康人(10.21 ± 0.56)显著降低,其中占健康成年人60%的拟杆菌下降到15%左右,致使其他类型的菌所占比例上升.糖尿病患者的肠内菌群中占优势的是大肠杆菌等有害或潜在有害的细菌.糖尿病患者肠道内双歧杆菌和酵母菌等有益菌的绝对数量比健康人肠道内的绝对数量要显著性减少.糖尿

病患者肠道内大肠杆菌和链球菌等无益的常住菌的数量基本与健康成年人持平,在肠道内处于优势地位(表1)。

表1 大连地区糖尿病患者与健康成年人肠道菌群的数量对比

细菌种类	菌数的对数值	
	糖尿病患者	健康成年人
Total Bacteria	9.34±0.37 ^a	10.21±5.56
Bifidobacteria	8.26±0.64 (80) ^b	9.01±0.13 (100)
Bacteroidaceae	8.51±0.80 (100)	10.01±0.11 (100)
Lactobacilli	6.97±0.15 (60)	5.45±1.12 (80)
Peptococcaeae	8.64 (20)	9.78±2.31 (80)
Clostridia lecithinase positive	7.77±0.97 (100)	6.45±2.21 (80)
Clostridia lecithinase negative	8.41±0.70 (60)	8.78±1.42 (100)
Enterobacteriaceae	8.83±0.88 (100)	8.89±1.14 (100)
Streptococci	8.38±0.87 (100)	8.87±0.27 (80)
Bacillus	8.02±0.49 (60)	5.42±3.59 (20)
Yeast	2.15 (20)	4.24±0.12 (30)

a: 每克粪便中含有菌数的对数平均值±标准偏差(log₁₀(CFU/g)±s)。

b: 检出率(%)

2.2 糖尿病患者与健康成年人的粪便 pH 值和含水率的比较 糖尿病患者粪便的 pH 值为 6.00±0.50,与健康人有显著性差异。糖尿病患者的粪便的含水率也比健康成年人显著降低(表2)。

2.3 糖尿病患者与健康成年人的肠内腐败物质的比较 糖尿病患者粪便中典型的腐败物质硫化物和氨均较健康成年人为高,存在差异显著(表2)。

表2 糖尿病患者与健康成年人肠道内 pH、水分、氨和硫化物的比较($\bar{x} \pm s$)

分析项目	糖尿病患者	健康成年人
PH	6.00±0.50	6.40±0.40
水分 %	75.48±9.72	79.28±5.40
硫化物(μ g/g)	11.46±2.07	8.03±1.28
氨(μ g/g)	459.00±39.52	348.21±40.40

2.4 糖尿病患者的生化指标及其与肠内细菌数量的相关

性 生化指标中(表3)与其肠道内菌群的相关性较大的为尿糖与乳杆菌的相关系数为 -0.93,血沉与双歧杆菌的相关系数为 -0.97.而乳杆菌与各项生化指标的相关性均较大.其他指标之间的相关性均为 0.8 以下,即基本无直接相关意义,暂时不在我们的探讨范围内,但仍是需要进一步探索的问题。

表3 10 例糖尿病患者的生化指标($\bar{x} \pm s$)

生化指标	数值	生化指标	数值
K(mmol/L)	4.20±0.26	Na(mmol/L)	143.30±3.89
Cl(mmol/L)	101.50±2.51	Ca(mmol/L)	2.35±0.07
P(mmol/L)	1.31±0.13	BUN(mmol/L)	5.24±0.11
Cr(mmol/L)	93.78±6.15	UA(mmol/L)	0.27±0.04
Tch(mmol/L)	4.97±1.08	TG(mmol/L)	1.99±0.64
HDL-C(g/L)	0.52±0.08	Glu(mmol/L)	8.86±3.11
全血黏度值 1(mPas)	4.90±0.26	全血黏度值 2(mPas)	5.44±0.30
全血黏度值 3(mPas)	6.82±0.40	全血黏度值 4(mPas)	10.20±0.68
血浆黏度值(mPas)	1.58±0.11	ESR 血沉(mm/h)	5.30±3.86
红细胞压积(1/l)	0.50±0.03	纤维蛋白原(g/l)	2.78±0.19
NIT	均为 ‘-’	血液 pH	5.35±0.41
Glu(mg/dl)	‘-’ - ‘+3’	PRO(mg/dL)	多为 ‘-’
BLD(mg/dl)	均为 ‘-’	KET(mg/dL)	多为 ‘-’
BIL(mg/dl)	均为 ‘-’	URO(mg/dL)	均为 ‘+-’
年龄	40-50 岁	病史	1-2 a
体重(kg)	75.89±6.64	血压(低压)(mmHg)	80-100
血压(高压)(mmHg)	120-135	备注	10 例中有 2 例吸烟

3 讨论

上述数据显示,糖尿病患者肠道内的总菌数明显少于正常健康人,各种菌所占比例也存在很大的差别,主要原因可能是患者长期服用各种药物,对肠道内正常菌群造成破坏.肠道菌群的紊乱会对患者正常的消化代谢、营养吸收产生关键性的影响,不利于患者的正常生活和疾病的改善。

糖尿病患者的双歧杆菌等菌的绝对值比健康成年人显著降低.乳杆菌和双歧杆菌都是典型的有益菌,又都对糖尿病患者的生化指标所反映的病情有反相关作用.说明肠道内的有益菌是和糖尿病患者的病情密切相关的,无论从治标还是治本的角度都应该重视他们的存在与活动。

糖尿病患者的腐败梭菌等有害菌占总菌数比例过高,相应地肠内腐败物质和毒素亦显著增加,这造成了患者的代谢负担过重.有害菌数量超出正常水平还会引起自身感染(包括皮肤、黏膜、脏器及血行的感染);感染是糖尿病的发病因之一,也是糖尿病的伴随症,如果能够降低有害菌的数量,对糖尿病患者的病情和正常生活都有益处。

糖尿病患者的粪便酸度很高,是体液酸度较高的直接反映,说明患者免疫力低下;患者的粪便中含水率过低,易导致便秘.这些都是肠道内正常菌群紊乱的表现.

乳糖与乳杆菌的数量基本成反相关,血沉与双歧杆菌也为反相关,证明了乳杆菌、双歧杆菌等有益菌对促进营养吸收的益处,乳杆菌等微生物的活动会增加血液中糖的利用;有益菌增加,则有害菌相应减少,对感染和炎症都有抑制作用.

因此,糖尿病患者应该在使用降糖药物的同时,通过调整肠内菌群来巩固和提高疗效,增强免疫力.建议摄入一些功能性乳制品,海洋食品等改善和恢复肠道

内的正常微生物群.他们可以增加代谢,排出毒素,促进营养吸收,对于糖尿病的营养代谢失衡有潜在的益处.

4 参考文献

- 1 李雪松,邱华,殷素兰,王新艳,刘军,刘红延. 双歧杆菌奶粉对幼儿肠道内环境影响. 中国微生态学杂志 2000;12:180-183
- 2 Shimizu M. Modulation of intestinal functions by food substances. *Nahrung* 1999;43:154-158
- 3 Thulesen J, Hartmann B, Holst JJ, Poulsen SS. Diabetic intestinal growth adaptation and glucagon-like peptide 2 in the rat: effects of dietary fiber. *Gut* 1999;45:672-678
- 4 Kawanishi K, Tada S, Kajikawa T, Ishida T. Lactate metabolism and lactic acidosis. *Rinsho Byori* 1998;46:804-812

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 •

影像学检查对肝门部胆管癌进展范围评价的临床价值

张国梁,韦 斌,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
韦斌,西安市第四医院消化内科 陕西省西安市 710004
项目负责人:张国梁,150001,黑龙江省哈尔滨市,黑龙江省医院附属消化病医院.
收稿日期:2002-12-24 接受日期:2003-01-08

摘要

目的:研究各种影像学检查对肝门部胆管癌进展范围评价的临床价值.

方法:对150例(79例手术治疗)肝门部胆管癌进行各种影像学检查,观察肿瘤的浸润范围,肝转移和血管侵袭的诊断符合率.

结果:综合各种影像学检查对肝门部淋巴结、肝脏转移、门静脉侵袭、肝动脉侵袭的诊断符合率分别为84%、70%、90%、47%,对其分型诊断符合率为100%.

结论:综合各种影像学检查,能够很好地评价肝门部胆管癌的进展范围,从而指导临床医师采用手术或非手术引流治疗.

张国梁,韦斌,朱春兰,任旭. 影像学检查对肝门部胆管癌进展范围评价的临床价值. 世界华人消化杂志 2003;11(6):865-867

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/865.asp>

0 引言

肝门部胆管癌约占肝外胆道肿瘤的58-75%,患者就诊时往往已出现严重的梗阻性黄疸,有时还合并严重的胆管炎,病情较重,预后极差,手术切除率极低.因此,通过影像学检查,对肝门部胆管癌进展范围进行评估,是

对其治疗的关键,从而决定手术或非手术引流治疗.

1 材料和方法

1.1 材料 全组150例患者中男89例,女61例,年龄35-89岁,平均56.1岁,患者均有不同程度的黄疸,部分患者尚有发烧、腹痛、恶心、呕吐、消瘦等症状.全部患者均行超声(电脑彩超仪)、螺旋CT和(或)MRI、经内镜逆行胰胆管造影(ERCP)和(或)经皮肝胆管造影术(PTC)影像学检查,结合临床表现(部分经手术或胆管刷检病理证实)诊断为肝门部胆管癌.

1.2 方法 所有患者均行超声(电脑彩超仪)、螺旋CT和(或)MRI、ERCP和(或)PTC,部分患者行三维螺旋CT血管造影(CTA)检查.ERCP检查时,对于肝门部胆管狭窄中断者,首先将引导导丝越过狭窄中断部位,再将ERCP造影导管沿导丝越过狭窄中断部位,送至肝内胆管造影.本组患者导丝均能越过狭窄中断部位.ERCP未成功者,也可选择MRCP.PTC适应证:左右肝管离断者;ERCP未成功或胆管显影不佳者;胃十二指肠部位手术或行胆道分流术,其正常逆行插管途径打断者.通过各种影像学检查,对肝门部胆管癌进行分型和进展范围评价(肝门部淋巴结、肝转移、血管侵袭等).肝门部胆管癌分型:按Bismuth所建议的分型方法^[1],判断胆管受累范围,Ⅰ型:肿瘤位于肝总管,但未侵犯分叉部及左右肝管;Ⅱ型:肿瘤自肝总管侵犯左、右肝管分叉部;Ⅲ型:肿瘤自肝总管侵犯单侧一级肝管分支(Ⅲa型:侵犯右肝管;Ⅲb型:侵犯左肝管);Ⅳ型:肿瘤同时侵犯肝总管和左右肝管.

2 结果

2.1 影像分型 I型20例, II型28例, III型46例(其中III a 19例, III b 27例), IV型56例, 77例行PTC. 造影表现为肝内胆管扩张, 胆管呈线样, 不规则狭窄, 不规则阻塞、中断, 充盈缺损及受压移位. 超声、CT和(或)MRI均显示不同程度肝内胆管扩张, 除分型外, 且可对肝门淋巴结、肝内转移、血管侵袭进行评价. 79例手术患者影像学分型与术中分型完全相符, 符合率达100%. 79例手术患者影像学检查评价肿瘤进展范围与术中符合情况见表1、2、3.

表1 超声对肝门部胆管癌进展范围评价(79例)

	超声观察	手术结果	符合率
肝门肿块	71	79	89 %
肝门部淋巴结	13	32	41 %
肝脏转移	8	20	40 %
门静脉侵袭	26	31	81 %
肝动脉侵袭	6	19	31 %

表2 CT和(或)MRI对肝门部胆管癌进展范围评价(79例)

CT 和(或)MRI	手术结果	符合率	
肝门肿块	68	79	86 %
肝门部转移	24	32	75 %
肝脏转移	13	20	65 %
门静脉侵袭	27	31	87 %
肝动脉侵袭	7	19	37 %

表3 综合各种影像学检查对肝门部胆管癌进展范围评价(79例)

	影像学检查	手术结果	符合率
肝门肿块	79	79	100 %
肝门部淋巴结	27	32	84 %
肝脏转移	14	20	70 %
门静脉侵袭	28	31	90 %
肝动脉侵袭	9	19	47 %

2.2 治疗 血管侵袭常是肝门部胆管癌不能切除的主要原因 III a型手术切除率极低, IV型基本失去手术切除机会. 手术选择: I型、II型、III b型无肝转移及血管侵袭, 或虽然有肝转移及血管侵袭, 但相对年轻, 全身状态尚可, 无严重凝血机制障碍, 心肺、肝肾功能尚好; III a型和IV型无肝转移及血管侵袭, 且相对年轻, 全身状态尚可, 心肺、肝肾功能尚好, 凝血机制尚可. 术前预测肿瘤近端上方胆管至其二级分支长度大于1.0 cm. 本组150例中79例行手术治疗, 其中根治性切除44例, 占56%, 姑息性切除25例, 占32%, 非切除10例, 占12%, 行胆肠吻合或内外引流. 非手术引流治疗选择: I型、II型、III b型有肝转移和血管侵袭且高龄、全身状态差, 严重凝血机制障碍, 心肺功能差; III a型和

IV型伴肝转移及血管侵袭; 各型虽无肝转移和血管侵袭, 但高龄、全身状态差, 凝血机制差, 心肺功能差, 难以耐受手术. 非手术引流治疗包括: 内镜下胆管塑料支架引流术(ERBD)、内镜下胆管金属支架引流术(EBMSD)、经皮肝穿刺胆道引流术(PTCD). 本组150例中71例行非手术引流治疗.

3 讨论

肝门部胆管癌治疗方法的选择及预后与肿瘤的分型、进展范围密切相关. 通过各种影像学检查, 对肿瘤的进展范围进行评价, 估计有效切除率, 能够很好地指导临床医师采用手术或非手术引流治疗, 从而提高手术切除率, 降低开腹探查而无法切除例数, 减少不必要的创伤, 降低手术死亡率.

肝门区固有的解剖因素和肝门部胆管癌的生物学特性表明明确治疗前分型和进展范围对选择治疗有重要意义. Bismuth分型法, 是目前常用的肝门部胆管癌分型方法, 对治疗方案有一定的参考价值. 我们认为ERCP结合PTC对肝门部胆管癌能准确分型, 应强调同时左、右肝管全部造影, 对左右肝管离断, 肝内胆管显影不满意者, 必须同时行PTC, 了解一级以上胆管分支及分叉部情况. 本组150例ERCP时, 对胆管狭窄中断者, 引导导丝均能越过狭窄中断部, 从而引导ERCP导管越过狭窄中断部位进行造影. 但对于左右肝管离断者, 必须配合一侧PTC, 有时甚至肝右叶的前、后段肝管分支也呈分隔现象等, 需要选择性的多处穿刺才能显示肝内胆管的全貌. 本组79例手术患者影像分型与术中分型符合率为100%. PTC后行PTCD, 能迅速减黄, 解决胆道梗阻和感染, 使肝功能和一般状态得到恢复, 同时起到很好的治疗作用.

以往认为超声很少能显示胆管肿物, 但近年来诊断率不断提高. 解丽梅 et al^[2]报道超声对肝门部肿物、肝脏转移、门脉侵袭、肝动脉侵袭的诊断符合率分别为87%、33%、80%和20%, 何婉媛 et al^[3]报道超声对肝门部肿块、肝转移、门脉侵袭的符合率分别为91%、35%、90%, 本组79例手术患者超声对肝门部肿物、肝转移、门静脉侵袭、肝动脉侵袭的符合率分别为89%、40%、81%、31%.

CT和MRI检查, 通过系列的肝门部的体层扫描, 可以系统地了解肝门部以上的胆管扩张情况, 肝左、右叶有无程度不等的增大或萎缩. 可发现肝内有无肿瘤蔓延, 肝动脉、门静脉是否受侵, 对肿瘤能否切除的估计有重要价值.

既往曾有CT对血管浸润诊断的报道, 自从螺旋CT应用于临床以来, 其应用价值得到了很大提高, 且有三维螺旋CT血管造影(CTA)代替血管造影的报告. 本组10例行CTA, 血管浸润诊断符合率达90%.

综合各种影像学检查预测肝门部胆管癌的进展范围, 国内外尚未见报道. 本组综合各种影像学检查对79例手

术患者肝门肿块、肝门部淋巴结、肝脏转移、门静脉侵袭、肝动脉侵袭的诊断符合率分别为100%、84%、70%、90%和47%。

日本学者^[4]主张PTC后使用经皮经肝胆道镜检查(PTCS)来评估胆管受累范围,符合率达78%。本组8例行PTCS,我们体会PTCS检查前需建立窦道,15 d后才能行PTCS,建立窦道时有一定的创伤和痛苦,要求一定的技术和设备,且影像学的符合率已很高,因此,PTCS广泛应用受到一定的限制。

本组150例肝门部胆管癌经各种影像学检查综合评价进展范围,评估手术的可能性79例行手术治疗,根治性切除率达56%,姑息性切除率达32%,71例行非手术引流治疗,取得了十分满意的疗效,提高了手术切除

率,降低了不能切除的剖腹探查例数,值得临床推广。

总之,综合各种影像学检查能够很好地评价肝门部胆管癌的进展范围,可以很好地指导临床医师采用手术或非手术引流治疗。

4 参考文献

- 1 Bismuth H, Castaing D, Tranynor O. Resection or palliation: priority of surgery in the treatment of hilar cancer. *World J Surg* 1998;12:39-47
- 2 解丽梅,张铭璜,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;10:341-343
- 3 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;16:113-117
- 4 坂本英至,二村雄次,神谷顺一,近藤哲,柳野正人,宫地正彦,金井道夫,上坂克彦. 肝门部胆管癌に対する胆管上流侧切除范围-PTBD造影およびPTCSによる进展范围诊断. *日消外会志* 1997;30:2069-2073

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 •

分离培养在Hp感染诊断中的重要地位

史济经,闵海阳,王青,杨慧芳,王洪涛,张振华

史济经,闵海阳,上海市江湾医院消化内科 上海市 200434
王青,上海市江湾医院检验科 上海市 200434
杨慧芳,上海市江湾医院病理科 上海市 200434
王洪涛,张振华,上海第二医科大学微生物教研室 上海市 200025
项目负责人:史济经,200434,上海市江湾医院消化内科. sjjih@163.com
电话:021-65422593-2118 传真:021-65317833
收稿日期:2002-08-24 接受日期:2002-10-03

摘要

目的:对三种常用幽门螺杆菌感染诊断方法(细菌分离培养、快速尿素酶试验、病理组织切片)进行比较。

方法:对312例胃部不适患者的胃窦部活检组织分别使用以上三种方法检测幽门螺杆菌,然后进行阳性检出率的比较。

结果:细菌分离培养、快速尿素酶试验、病理切片的Hp检出率分别为60.26%,69.23%及46.15%。快速尿素酶试验、病理切片与细菌分离培养的不符合率分别为14.1%和25.6%。

结论:同其他两种方法相比,细菌分离培养是一种特异性高,敏感性强,技术设备要求不高,价廉的好方法。

史济经,闵海阳,王青,杨慧芳,王洪涛,张振华. 分离培养在Hp感染诊断中的重要地位. *世界华人消化杂志* 2003;11(6):867-869

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/867.asp>

0 引言

大量研究表明幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是胃十二指肠疾病的重要致病因子。目前,用于Hp感染的诊断方法多种多样,有的虽好,但不易普及^[1];有的虽

然简便,但尚存在较大缺点^[2-4]。2000年发表的专家对Hp若干问题的共识意见(以下简称“共识意见”)提出了对Hp感染的“科研诊断标准”和“临床诊断标准”。我们对分离培养和其他两种常用的Hp感染诊断方法进行了比较分析。

1 材料和方法

1.1 材料 2000-03/09因胃部不适而来医院做胃镜检查者312例,其中男198例,女114例,年龄范围12-81岁,平均48.4岁,记录其一般资料、主要症状及体征,还包括询问前2 wk内的用药情况。对每例进行电子胃镜检查(GIF240),在胃窦部距幽门2-3 cm处取五块活检标本。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离培养 从胃窦部距幽门2 cm处取活检组织2块,接种于同一块Hp选择性血平板(HPSBP)左右两侧,置于专门设计的微需氧罐^[5],37℃条件下培养3-4 d,根据菌落特征,涂片镜检、尿素酶、触酶、氧化酶试验鉴定Hp菌。

1.2.2 快速尿素酶试验(RUT) 从患者胃窦部取活检组织一块,立即放入自制的尿素酶试剂中(半固体)观察颜色变化,2 h内变玫瑰红色者为阳性,不变色者为阴性。若制剂本身已从橙黄色变为橙红色即弃之不用。

1.2.3 病理组织切片(SEC) 从胃窦部取活组织一块,常规固定、包埋、切片,0.25%碱性复红染色,镜检下观察Hp,以典型螺旋状形态作为阳性标准;在其邻近处另取一块组织送常规病理检查。

统计学处理 对实验结果用McNemar方法检验。

2 结果

2.1 三种不同方法 Hp 检出率(表 1)

表 1 三种不同方法 Hp 总检出率 $n(\%)$

	n	阳性数	阴性数
分离培养(一块)	312	188	124
尿素酶试验	312	216	96
病理切片	312	144	168

 $\chi^2=38.43$ DF=2 P <0.01.
表 2 312 例中近期未用抗菌药物分离培养检出情况 $n(\%)$

	胃炎	胃溃疡	十二指肠溃疡	胃癌
分离(+)	37	24	56	2
培养(-)	52	10	8	7

 $\chi^2=39.903$ DF=3 P <0.01.

2.2 近期未用抗菌药物分离培养的检出情况 312 例患者中, 2 wk 内未经抗 Hp 药物治疗 196 例, 一块活检组织分离培养阳性 119 例, 检出率为 60.71%, 其中十二指肠溃疡的 Hp 阳性率最高(表 2).

2.3 分离培养与其他两种方法的比较 312 例患者中以分离培养为金标准与其他两种试验分别比较(按“国内共识”中的“临床标准”)(表 3 a 和表 3 b).

表 3a 分离培养和 RUT 比较 $n(\%)$

分离培养	n	RUT	
		阳性	阴性
阳性	188	180	8(2.57) ^a
阴性	124	36(11.54) ^a	88

 $\chi^2=19.1136$ DF=1 P <0.01(McNemar 检验)
a 阳性或阴性不相符率 = 阳性或阴性不相符数 / 总检查数 $\times 100\%$

表 3b 分离培养和 SEC 比较

分离培养	n	SEC	
		阳性	阴性
阳性	188	126	62(19.87)
阴性	124	18(5.77)	106

 $\chi^2=23.1125$ DF=1 P <0.01(McNemar 检验).

2.4 分离培养和 SEC - RUT 的比较 以“国内共识”的“科研诊断标准”为依据把病理 - 快速尿素酶(SEC-RUT)的共同结果与分离培养相比较所呈现的阳性与阴性不符合程度(表 4a, 表 4b).

表 4a 分离培养和 SEC-RUT 比较 $n(\%)$

分离培养	n	SEC-RUT	
		阳性	阴性
一块活检 阳性	188	124	64(20.5)
阴性	124	15(0.05)	109

 $\chi^2=29.2$ DF=1 P <0.01(McNemar 检验).
表 4b 分离培养和 SEC-RUT 比较 $n(\%)$

分离培养	n	SEC-RUT	
		阳性	阴性
二块活检 阳性	201	133	68(21.8)
阴性	111	6(0.02)	105

 $\chi^2=56.3$ DF=1 P <0.01(McNemar 检验)

3 讨论

3.1 从三种 Hp 感染诊断方法的总检出率已初步可以看出以分离培养作为 Hp 感染诊断的金标准的重要性. 100 a 来人们已经用分离培养的方法发现了大多数人类感染性疾病的病原体(包括 Hp), 并把他确认为临床诊断这些病原体感染的主要依据(即金标准). 可是为什么迄今人们未能把分离培养直接用于 Hp 感染的临床诊断呢? 20 a 前用分离培养的方法发现了 Hp, 由于 Hp 是一种微需氧菌与大多数人类常见的需氧菌或厌氧菌的病原菌不一样, 因此没有非常成熟的分离培养方法, 当时的方法有: 自动控制的三气培养箱、抽气换气法、培养盒 + 产气袋等, 由于这些方法不能稳定地提供 Hp 生长所需的微环境^[6], 检出率一直较低, 只能达到 30% 左右, 因此 1980 年代中期国外有些学者开始另辟蹊径. 根据 Hp 普遍具有尿素酶和形态上有螺旋样弯曲的特征, 分别开始用快速尿素酶试验(RUN)和病理切片(SEC)找 Hp 两种方法代替分离培养方法用于临床诊断, 不久又发展了多种同位素示踪方法以显示尿素酶的存在^[7-9]. 由于这些检测方法非常简便, 而使临床逐渐放弃了用分离培养方法诊断 Hp 感染的努力. 进一步甚至反客为主地发展到争论究竟应以呼气试验还是以取活检方法(包括分离培养, 病理切片、直接涂片找菌和快速尿素酶试验)作为金标准的问题^[8]. 直到上世纪末, 国内在一些专家的积极推动下, 把国外流行的做法未经自己的实验检验, 主观的整理成国内“临床诊断标准”和“科研诊断标准”的共识^[8]. 这就造成了更加可怕的后果, 使有关的临床工作者有可能不自觉的误入歧途.

近年来我们采用上海第二医科大学微生物教研室设计的培养罐及提供的培养基, 经 3-4 d 培养后, Hp 检出率高达 60.3%, 与本试验 RUT 及 SEC 两种方法相比检出率介于其间(RUT 检出率为 69.2%, SEC 检出率为 46.2%), 使分离培养取得了良好的效果. 我们知道尿素酶试验可测定尿素酶的作用, 可是尿素酶并不是 Hp 所独有. 现已

知道消化道中至少有 400 种以上的细菌, 其中除 Hp 以外, 至少有一、二十种以上常见的细菌可以产生尿素酶^[10], 因此 RUT 产生假阳性是不可避免的. 另外尿素酶是一个蛋白质分子, 少量分子的尿素酶决不可能使现有的 RUT 试剂在一定时间内产生肉眼能见的反应^[10]. 因此也不可避免地产生假阴性. 病理切片找菌, 尚无明确的诊断 Hp 的具体标准. 按推理来讲, 只可能有两个标准. (1)按 Hp 典型形态确定, 但因为药物作用等原因发生形态变异或因为切片的位置、方向不妥, 就很容易发生漏诊. (2)若把 Hp 的杆形和圆球形变异也包括进去, 就不可避免地要把消化道许多杆菌和球菌都包括进去了. 根据上述原因, 我们可知 RUT 与 SEC 是仅凭活检中 Hp 的一个因素判定 Hp. 而分离培养却是至少依据下列多种因素判定的. (1)在特定的适于 Hp 生长的环境下生长的纯种活菌, 且具有典型菌落. (2)这一纯种活菌兼有尿素酶作用和 Hp 典型形态两方面的特征. 而且标本中只要有一个活菌存在, 在合适的培养条件下, 经过数天培养, 即能繁殖成一个肉眼可见的具有典型特征的菌落. 因此他既不会产生假阳性, 又是诊断 Hp 最敏感的方法.

3.2 以分离培养作金标准, 明显地证明了 RUT 与 SEC 方法的不符合程度 表 3a、3b 用方差法比较了 RUT 与 SEC 对分离培养的不符合程度. 用 McNemar 检验 P 值均为 <0.01. 本实验中 RUT 是自制的, 判定结果时间为 2 h, 所得结果假阳性率为 11.54 % (76/312), 假阴性率为 2.56 % (8/312), 对分离培养的总不符合率为 14.10 % (44/312), 总符合率为 85.89 % (268/312). 而 SEC 是在电镜下根据典型形态判定的, 所得结果假阳性率为 5.77 % (18/312), 假阴性率为 19.87 % (62/312), 对分离培养的总不符合率为 25.64 % (80/312), 总符合率为 74.36 % (232/312). 由此可见, RUT 受酶作用有关的因素及个人对判断标准的认识程度等的影响很大. 本文用方差法比较, 明显地显示出了 SEC 与 RUT 的弱点. 其结果示于表 1、表 2, 与分离培养的总检出率相呼应.

3.3 其他方法的两两组合并不能从根本上改变 RUT 与 SEC 对分离培养的不符合程度 表 4a、4b 显示了 SEC 与 RUT 两两组合与分离培养相比较的结果, 表 4 a 显示了

一块活检作分离培养与 SEC 与 RUT 两两组合相比, 用 McNemar 检验 P 值均为 <0.01. 阳性不符合率为 4.80 % (15/312), 阴性不符合率为 20.51 % (64/312), 总不符合率为 25.32 % (74/312), 总符合率为 74.69 % (233/312). 在表 4a 中 SEC-RUT 用的是两块活检标本, 而分离培养用的是一块活检标本. 为了更合理的比较, 表 4b 均用两块活检标本进行比较, 经 McNemar 检验 P 值仍 <0.01, 但是总不符合率下降了 1.6 %, 达到了 23.71 %. 从本试验资料来看, 其他方法的两两组合并不能从根本上改变 RUT 与 SEC 对分离培养的不符合程度.

总之, 本文初步在 312 例胃、十二指肠疾病患者中用一种比较成功的方法分离培养与目前临床常用的 RUT 与 SEC 及其两两组合进行比较, 发现后者总符合率仅为 74.36-85.90 %, 不符合率高达 14.10-25.64 %. 其造成的误诊、误治的后果是相当严重的, 间接还造成大量医疗资源的浪费和相关科研结论的失实. 尽管我们这一数据不是绝对的, 在不同的医院中因不同的患者人群组成的差异会有一定的变化, 但总的趋势是可以肯定的. 只要 Hp 感染是胃及十二指肠疾病的主要致病菌, 我们就不能放弃把分离培养技术逐步应用于临床的努力.

4 参考文献

- 1 刘厚钰. 幽门螺杆菌感染检测的选择. 中华消化杂志 1998;18:259
- 2 范学工, 夏华向. 幽门螺杆菌感染 - 基础和临床. 第 1 版. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1998:131-136
- 3 范学工, 夏华向. 幽门螺杆菌感染 - 基础和临床. 第 1 版. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1998:136-148
- 4 中华医学会消化病学分会. 幽门螺杆菌若干问题的共识意见. 中华消化杂志 2000;20:117-118
- 5 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 修订版. 北京: 中国科学技术出版社, 2002:323-326
- 6 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 修订版. 北京: 中国科学技术出版社, 2002:28-46
- 7 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 修订版. 北京: 中国科学技术出版社, 2002:279-283
- 8 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 修订版. 北京: 中国科学技术出版社, 2002:284-289
- 9 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 修订版. 北京: 中国科学技术出版社, 2002:290-294
- 10 史肖云, 张振华. 分离培养诊断 Hp 感染的价值. 世界华人消化杂志 2001;9:563-565

HBV 感染者 HBV DNA 与抗原抗体标志物的关系

陈雪娟,李 刚,刘淑芳,陈文思,李桂侠

陈雪娟,李刚,刘淑芳,陈文思,李桂侠,中山大学附属第三医院传染病学
广东省广州市 510630
广东省教育厅“千百十工程”优秀人才培养基金项目资助, No. Q02034
广东省科技攻关项目资助, No.2km05302s
项目负责人:李刚,510630,广东省广州市天河路600号,中山大学附属第三医
院传染病学. ligangzh@pub.guangzhou.gd.cn
电话:85516867-2019
收稿日期:2002-12-08 接受日期:2002-12-25

摘要

目的:了解乙型肝炎病毒(HBV)感染者HBV DNA与抗原抗体标志物的关系及评价HBV DNA检测的临床应用价值。

方法:应用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)技术检测1474例HBV感染者血清HBV DNA,同时采用酶联免疫吸附试验(ELISA)技术检测HBsAg、抗HBs、HBeAg、抗HBe、抗HBc。

结果:603例HBsAg、HBeAg、抗HBc阳性标本中,HBV DNA阳性520例(86.2%);465例HBsAg、抗HBe、抗HBc阳性标本中,HBV DNA阳性163例(35.1%);216例HBsAg、抗HBc阳性标本中,HBV DNA阳性88例(40.7%);26例单项抗HBc阳性标本中HBV DNA阳性3例(11.5%)。

结论:HBV DNA检测可填补抗原抗体标志物检测的不足,对临床诊断具有重要价值。

陈雪娟,李刚,刘淑芳,陈文思,李桂侠. HBV感染者HBV DNA与抗原抗体标志物的关系. 世界华人消化杂志 2003;11(6):870-871

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/870.asp>

0 引言

乙型肝炎是世界上最常见的传染病之一,在我国发病率高,危害大^[1-3]。目前HBV感染的实验诊断主要采用ELISA法检测抗原抗体,同时,随着抗病毒药物的开发和逐渐普及应用,HBV DNA的检测越来越受到重视,HBV DNA是HBV存在的最直接的证据,亦是HBV复制和具有传染性的标志。采用荧光定量PCR(FQ-PCR)法检测HBV DNA,具有很高的敏感性、特异性和重复性,克服了常规PCR法只定性不定量及存在假阳性的缺点^[4-6]。本文采用荧光定量PCR法检测了1474例HBV感染者血清HBV DNA,同时用ELISA法测定免疫学标志(HBVM),结果报告如下:

1 材料和方法

1.1 材料 本院传染科门诊及住院患者,共1474例,男1036例,女438例,年龄4-82岁。急性乙型肝炎64例,慢性乙型肝炎566例,慢性乙型肝炎病毒携带者

638例,肝炎肝硬化42例,健康体检及其他肝病者164例,诊断符合2000年(西安)第十次全国病毒性肝炎及肝病学术会议修订的病毒性肝炎诊断标准。

1.2 方法 HBV DNA荧光定量试剂盒由广州中山大学达安基因诊断中心提供,原理与方法见文献[4],正常参考值为 1×10^3 拷贝/mL,所用仪器为PE5700自动荧光PCR仪(美国PE公司),乙型肝炎病毒血清学标志(HBV-M)ELISA试剂盒由北京万泰试剂公司提供,检测过程按说明操作。

2 结果

急性乙型肝炎64例,血清HBV DNA阳性者59例,阳性率92.2%,慢性乙型肝炎566例,HBV DNA阳性330例,阳性率58.3%;慢性乙型肝炎病毒携带者638例,HBV DNA阳性366例,阳性率57.3%;肝炎肝硬化42例,HBV DNA阳性39例,阳性率92.8%;健康体检者及其他肝病患者164例,HBV DNA阳性9例,阳性率5.4%。FQ-PCR检测血清HBV DNA与酶免疫吸附检测HBV-M结果比较见表1。

表1 FQ-PCR定量检测HBV DNA与ELISA测定HBV-M结果比较

	HBsAg	HBeAg	HBcAb	HBsAb	HBeAb	n	HBV DNA(+)(n(%))
1	+	+	+	-	-	603	520(86.2)
2	+	-	+	-	+	465	163(35.1)
3	+	+	-	-	-	19	18(94.2)
4	+	-	+	-	-	216	88(40.7)
5	+	-	-	-	+	5	3(60)
6	-	-	+	+	+	20	1(5)
7	-	-	+	+	-	27	1(3.7)
8	-	-	+	-	+	24	2(8.0)
9	-	-	-	+	+	1	0(0)
10	-	-	-	+	-	56	2(3.57)
11	-	-	+	-	-	26	3(11.5)
12	+	+	+	+	-	2	2(100)
13	-	-	-	-	-	10	0(0)
合计						1474	803

3 讨论

采用ELISA法检测HBV-M在临床上多年来已得到广泛应用,在诊断HBV感染中起了很大作用。HBeAg是病毒复制和具有传染性的标志,HBeAg的存在与HBV DNA检出率具有很好的相关性^[7-11]。本文检测HBsAg和HBeAg阳性者624例,HBV DNA阳性540例,阳性

率86.5%，而HBsAg阳性，HBeAg阴性，HBeAb阳性470例，HBV DNA阳性166例，阳性率35.3%。HBeAg阳性的HBV DNA明显高于阴性的标本，二者比较具有统计学差异。因此，当没有条件开展FQ-PCR技术检测HBV DNA时，ELISA法检测HBV-M仍有很大意义。模式HBsAg、HBeAg、HBcAb阳性603例，HBV DNA检测阳性率为86.2%，而模式HBsAg、HBeAb、HBcAb阳性465例，HBV DNA阳性率为35.1%，这说明并不是所有“大三阳”的患者HBV都处于复制期具有传染性，也不是所有“小三阳”的患者HBV都无复制，所以，要准确知道患者是否处于复制期，最准确的方法还是检测HBV DNA。HBsAg阴性仍不能排除HBV的复制，本文调查发现在164例HBsAg、HBeAg均阴性标本中，9例检出HBV DNA阳性，证实了HBsAg阴性者仍有可能存在HBV感染。另外还发现在56例仅HBsAb阳性的标本中，HBV DNA阳性2例，占3.6%，过去认为HBsAb存在即表示患者康复并且有免疫力，目前有学者认为极少数HBV感染者，即使血清中HBsAg向HBsAb转换后，HBV DNA复制仍可持续存在，或感染了HBV S区变异株，提示HBsAb阳性仍有必要检测HBV DNA，只有血清中产生了HBsAb，同时HBV DNA阴性，才能说明病毒已不存在^[12-18]。

HBsAg和HBeAg均阳性而HBV DNA阴性的情况，有资料研究表明可能有以下原因。(1)干扰素或拉米夫定等治疗后病毒复制受抑制。(2)PCR所用引物相应的DNA序列发生突变，此引物与突变DNA不能配对结合。(3)病毒DNA整合于宿主肝细胞染色体而血中游离HBV DNA很少或缺乏。

4 参考文献

- 1 胡军,郭文,郑明媚. 荧光定量聚合酶链反应检测血清HBV DNA及临床应用价值. 广州医药 2001;32:63-64
- 2 王平忠,张中伟,周永兴,白雪帆. 定量PCR检测慢性乙型肝炎患者HBV-DNA及其意义. 世界华人消化杂志 2000;8:755-758
- 3 张树林,李义方. 乙型肝炎血清学标志临床意义的再认识. 国外医学流行病学传染病分册 1993;20:57
- 4 程钢,何蕴韶,周新宇. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒. 中华医学检验杂志 1999;22:135
- 5 刘敬忠,谭淑珍,吴燕,何蕴韶,肖白,周艳,雷箴,闫梅,邵伟. 荧光定量聚合酶链反应检测乙型肝炎病毒DNA. 中华微生物学和免疫学杂志 2001;21:690-692
- 6 施红,王福生. 影响HBV感染慢性化的宿主因素及其在乙型肝炎防治中的意义. 世界华人消化杂志 2001;9:66-69
- 7 游晶,孔蕾,庄林,李惠萍,卢绍蓉,曹云峰. 急性病毒性肝炎2116例血清病原学分析. 世界华人消化杂志 1999;7:636-637
- 8 严家春,马勇,陈文笔,孙新华,裴波. 乙型肝炎肝窦病变的免疫组织化学及电镜观察. 世界华人消化杂志 1999;7:943-947
- 9 郭晏海,任峰玲,闫小君,苏成芝. 分级定量PCR检测血清HBVDNA. 世界华人消化杂志 1999;7:49-51
- 10 王平忠,周永兴. 乙型肝炎病毒血清学标志物与DNA检测结果的对比分析. 世界华人消化杂志 1999;7:918-919
- 11 田华,王淑琴,高建英,王宁. FQ-PCR检测乙型肝炎患者血清HBV DNA. 上海医学检验杂志 2001;16:363-364
- 12 黄燕萍,王宇明. 荧光定量PCR与普通PCR检测HBV DNA的对照分析. 第三军医大学学报 2001;23:992-993
- 13 周平,张木森,蔡庆,陈友纯,李晓娟,于建国,关键,刘春灵. PCR检测HBV感染者血清HBV DNA的临床意义. 华人消化杂志 1998;6:263-264
- 14 吴晓蔓,郭海波,列海涛. HBV-DNA定量和定性聚合酶链反应及其临床实用性的探讨. 临床肝胆病杂志 2000;16:226-227
- 15 曹红卫,卫国,冯文曦,龚小云,郑江. 乙肝病毒DNA荧光定量PCR检测及其意义. 第三军医大学学报 2001;23:866-868
- 16 袁静,马为民,周伯平,徐六妹,王火生, Tam JS. 荧光定量聚合酶链反应与分支链DNA信号扩增法检测血清HBV DNA的比较. 广东医学 2000;21:838-839
- 17 潘锦荣,蒋文智,张行. 荧光定量PCR技术动态观察乙肝患者血清中HBV变化的意义. 中国实验诊断学 2001;5:264
- 18 迟宝荣,孟祥伟,李波,姜薇. PCR检测582例HBV DNA对肝病诊断的临床意义. 临床肝胆病杂志 1994;10:35-36

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 •

乙型肝炎肝组织中细胞间黏附分子-1及Fas的表达及意义

张闽峰,郑瑞丹,孟家榕,郭以河,林福地

张闽峰,郑瑞丹,孟家榕,郭以河,林福地,第一七五医院病理科
福建省漳州市 363000
项目负责人:张闽峰,363000,福建省漳州市第一七五医院病理科.
zhengruidan@163.net
电话:0596-2936361-75815
收稿日期:2002-11-29 接受日期:2002-12-26

摘要

目的:为了探讨细胞黏附分子-1(ICAM-1)及Fas在乙型肝炎肝组织中的表达与肝细胞损伤及凋亡的关系。

方法:应用免疫组化SP法,检测106例慢性乙型肝炎,20例无症状携带者(ASC),10例正常肝组织标本内ICAM-1

及Fas表达情况。

结果:正常人和ASC肝细胞无ICAM-1和Fas表达。CHB106例中,轻度(G1-2)47例ICAM-1强表达,占25.5%(12/47);中重度(G3-4)59例强表达,占74.5%(44/59)。Fas在重度慢性肝炎肝细胞中强表达占91.3%(21/23),提示中重度慢性肝炎肝细胞表达较轻度慢性肝炎显著增强($P < 0.01$)。肝损害越严重,坏死越明显,肝细胞ICAM-1及Fas的表达越强。

结论:乙型肝炎组织中ICAM-1表达有助于淋巴细胞向肝组织内浸润,与肝细胞损伤有关,提示Fas在重症肝炎时

有介导细胞凋亡的作用。

张闽峰,郑瑞丹,孟家榕,郭以河,林福地. 乙型肝炎肝组织中细胞间黏附分子-1及Fas的表达及意义. 世界华人消化杂志 2003;11(6):871-873

http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/871.asp

0 引言

近年来, ICAM-1在肝内表达以及Fas在重症肝炎发病因素与乙型肝炎发病的关系, 引起人们的广泛关注^[1-8]. 本文观察了ICAM-1及Fas在肝组织中的表达, 并对其表达程度与肝脏炎症活动的关系进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 106例乙型肝炎标本为1998-2002年本院住院患者肝穿组织. 男性74例, 女性32例, 年龄12-67岁, 平均36岁. 肝炎分型参照2000年肝炎分类方案标准^[9]. 106例乙型肝炎根据肝组织病理改变程度分为: (1)轻度慢性肝炎(G1-2)47例; (2)中度慢性肝炎(G3)36例; (3)重度慢性肝炎(G4)23例, 无症状携带者(ASC)20例, 正常对照组10例为本科留档正常肝组织尸检标本. 试剂: 鼠抗人ICAM-1单克隆抗体及Fas单克隆抗体为深圳晶美公司产品, SP法试剂盒和DAB显色试剂盒为福州迈新生物技术开发公司产品。

1.2 方法 免疫组化主要步骤: (1)切片脱蜡至蒸馏水; (2)1 g/L胰蛋白酶消化切片10 min; (3)30 ml/L H₂O₂作用5 min; (4)滴加正常血清30 min; (5)滴加一抗4℃温育过夜; (6)滴加二抗37℃温箱30 min; (7)滴加LSAB复合物37℃温箱30 min, 以上各步均以PBS洗; (8)DAB显色、复染、封片. 对照设置: (1)实验阳性片为阳性对照; (2)不加一抗为阴性对照. 结果判断: 肝细胞膜及肝细胞质有棕黄色颗粒为阳性. 染色强度分级: 无着色为(-), 肝细胞着色<25%为(+), 着色25-49%为(++), 着色>50%为(+++).

统计学处理 秩和检验。

2 结果

2.1 肝细胞ICAM-1表达 慢性乙型肝炎患者肝组织内肝细胞出现不同程度ICAM-1表达. 阳性表达位于肝细胞膜上, 有的伴有胞质着色. 阳性细胞多分布在汇管区周围, 肝小叶内炎细胞浸润区和坏死灶内. 正常人和ASC肝细胞无ICAM-1表达. 根据ICAM-1染色程度及肝脏炎症病理分级可以看出, CHB106例中7例无ICAM-1表达的肝组织均为轻度慢性肝炎, 99例有ICAM-1表达的肝组织随肝脏炎症病理分级的增加而加重, 其中ICAM-1表达呈明显增强趋势($P < 0.01$, 表1).

2.2 肝细胞Fas表达 CHB106例中阳性细胞主要为肝细胞, 亦有淋巴细胞. 阳性表达位于肝细胞膜上, 部分伴有胞质着色, 阳性细胞主要分布在碎屑样坏死区, 偶在坏死灶边缘. 肝组织中Fas表达的程度与炎症病理分级一致. 正常肝组织和ASC无表达; G1、G2无

表达或弱表达, G3、G4随肝脏炎症病理分级加重, 其表达增强. 重度慢性肝炎患者肝组织Fas表达显著强于中、轻度患者($P < 0.01$, 表1).

表1 乙型肝炎患者肝细胞ICAM-1与Fas的表达

炎症分级	n	ICAM-1				Fas			
		-	+	++	+++	-	+	++	+++
G1-2	47	7	28	10	2	32	13	2	0
G3	36	0	12	18	6	0	24	12	0
G4	23	0	3	11	9	0	2	7	14
合计	106	7	43	39	17	32	39	21	14

3 讨论

在乙型肝炎的发病机制中, 细胞毒T淋巴细胞(CTL)对肝细胞损伤起重要作用, ICAM-1是T细胞与靶细胞有效作用的一种黏附分子^[9-11]. ICAM-1表达增强有利于淋巴细胞黏附于血管内皮并向肝组织中浸润, 而淋巴细胞由血管内向组织中浸润是导致乙型肝炎肝组织免疫损伤过程中极其重要的一步. 本组结果显示: 10例正常对照肝细胞及20例ASC肝细胞均无表达。

CHB106例患者肝组织切片中, 除7例轻度慢性肝炎肝细胞ICAM-1表达阴性外, 其余99例肝细胞有不同程度表达. ICAM-1表达++和+++的56例中44例为中度以上CHB(78.5%); 研究中发现, 肝细胞中ICAM-1表达随着病变程度加重表达增强, 阳性表达多位于汇管区周围、坏死灶区, 常伴有炎细胞浸润, 其结果与国内报道相符^[12,13]. 因此, 说明了ICAM-1抗原在肝细胞膜上的表达在介导乙型肝炎肝细胞损伤中起重要作用, 与乙型肝炎发病有关。

乙型肝炎的肝细胞炎症主要是CTL介导的细胞毒效应^[14-17]. 也可以是基于Fas凋亡^[18,19], Fas是组织细胞表面转导凋亡信号的膜分子, 肝细胞可以被乙型肝炎病毒(HBV)感染激发而强表达^[20-22]. 本组结果显示, Fas表达和肝细胞损伤的程度与CHB轻、中、重分型一致. CHB106例G1-2; 47例中无表达或弱表达45例占95.7%, G3的36例中强表达12例占33.3%, G4的23例中强表达21例占91.3%, 本研究发现, 肝组织中重型CHB中Fas表达相当广泛, Fas阳性细胞多在碎屑样坏死区, 与文献中将碎屑样坏死归类于凋亡表现一致^[23].

本组结果表明, ICAM-1与Fas的表达多位于汇管区周围及碎屑样坏死区, 符合HBV的传染过程. CTL也可经病毒抗原激活, 凋亡同样开始于汇管区. 研究发现, 乙型肝炎患者肝损害组织坏死越严重, 其肝细胞ICAM-1及Fas的表达越强, 说明二者在介导乙型肝炎肝细胞坏死中均起重要作用^[24-26]. 提示ICAM-1与Fas的检测可作为反映肝损害和肝组织炎症坏死程度的指标之一, 为探讨乙型肝炎的免疫发病机制起重要作用。

4 参考文献

- 1 Rivero M, Crespo J, Fabrega E, Casafont F, Mayorga M, Gomez-Fleitas M, Pons-Romero F. Apoptosis mediated by the Fas system in the fulminant hepatitis by hepatitis B virus. *J Viral Hepat* 2002;9:107-113
- 2 Terradillos O, de La Coste A, Pollicino T, Neuveut C, Sitterlin D, Lecoer H, Gougeon ML, Kahn A, Buendia MA. The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas apoptosis in the liver. *Oncogene* 2002;21:377-386
- 3 Volpes R, van den Oord JJ, Desmet VJ. Hepatic expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in viral hepatitis B. *Hepatology* 1990;12:148-154
- 4 Satoh S, Nussler AK, Liu ZZ, Thomson AW. Proinflammatory cytokines and endotoxin stimulate ICAM-1 gene expression and secretion by normal human hepatocytes. *Immunology* 1994;82:571-576
- 5 Doi T, Yamada G, Mizuno M, Tsuji T. Immunohistochemical study of the distribution of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 in chronic type B hepatitis. *J Gastroenterol* 1994;29:164-171
- 6 Chu CM, Liaw YF. Coexpression of intercellular adhesion molecule-1 and class I major histocompatibility complex antigens on hepatocyte membrane in chronic viral hepatitis. *J Clin Pathol* 1993; 46:1004-1008
- 7 Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, Palazzetti B, Alvarez-Miller L, Muscara M, del Soldato P, Sanpaolo L, Wallace JL, Morelli A. A NO-releasing derivative of acetaminophen spares the liver by acting at several checkpoints in the Fas pathway. *Br J Pharmacol* 2002;135:589-599
- 8 陈紫榕. 病毒性肝炎. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:78-81
- 9 尹洪竹, 刘金星. 细胞间黏附分子-1与病毒性肝炎关系的研究进展. *临床肝胆病杂志* 2000;16:78-79
- 10 Garcia-Monzon C, Garcia-Buey L, Garcia-Sanchez A, Pajares JM, Moreno-Otero R. Down-regulation of intercellular adhesion molecule 1 on hepatocytes in viral chronic hepatitis treated with interferon alfa-2b. *Gastroenterology* 1993;105:462-469
- 11 Horiike N, Onji M, Kumon I, Kanaoka M, Michitaka K, Ohta Y. Intercellular adhesion molecule-1 expression on the hepatocyte membrane of patients with chronic hepatitis B and C. *Liver* 1993;13:10-14
- 12 余永胜, 潘沛恩, 侯英勇, 张瑞云, 张琴冈. 细胞间黏附分子-1在乙型肝炎中的表达及意义. *中华传染病杂志* 1996;14:134
- 13 张绪清, 顾长海. 乙型肝炎肝组织细胞间黏附分子-1表达. *中华肝脏病杂志* 1998;6:206
- 14 Lee MO, Choi YH, Shin EC, Kang HJ, Kim YM, Jeong SY, Seong JK, Yu DY, Cho H, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol* 2002;37:380-386
- 15 Ibuki N, Yamamoto K, Yabushita K, Okano N, Okamoto R, Shimada N, Hakoda T, Mizuno M, Higashi T, Tsuji T. In situ expression of Granzyme B and Fas-ligand in the liver of viral hepatitis. *Liver* 2002;22:198-204
- 16 Lee MO, Kang HJ, Cho H, Shin EC, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of the Nur77 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:1162-1168
- 17 Tsai SL. Soluble Fas modulates interferon responsiveness. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:958-959
- 18 骆抗生, 何海棠, 朱幼芙, 章康. 慢性乙型肝炎肝细胞 Fas 表达和 DNA 损伤. *中华内科杂志* 1996;35:750
- 19 Shin EC, Choi YH, Kim JS, Kim SJ, Park JH. Expression patterns of cytokines and chemokines genes in human hepatoma cells. *Yonsei Med J* 2002;43:657-664
- 20 Pan J, Duan LX, Sun BS, Feitelson MA. Hepatitis B virus X protein protects against anti-Fas-mediated apoptosis in human liver cells by inducing NF-kappa B. *J Gen Virol* 2001;82(Pt1):171-182
- 21 Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Tibbles LA, Woodgett JR, Penninger J, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem* 2001;276:8328-8340
- 22 Tagashira M, Yamamoto K, Fujio K, Nagano T, Okamoto R, Ibuki N, Yabushita K, Matsumura S, Okano N, Tsuji T. Expression of perforin and Fas ligand mRNA in the liver of viral hepatitis. *J Clin Immunol* 2000;20:347-353
- 23 Patel T, Groes GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology* 1995;21:1725-1741
- 24 Lian Z, Liu J, Pan J, Satioglu Tufan NL, Zhu M, Arbuthnot P, Kew M, Clayton MM, Feitelson MA. A cellular gene up-regulated by hepatitis B virus-encoded X antigen promotes hepatocellular growth and survival. *Hepatology* 2001;34:146-57
- 25 Shin EC, Ahn JM, Kim CH, Choi Y, Ahn YS, Kim H, Kim SJ, Park JH. IFN-gamma induces cell death in human hepatoma cells through a TRAIL/death receptor-mediated apoptotic pathway. *Int J Cancer* 2001;93:262-268
- 26 Liu DX. A new hypothesis of pathogenetic mechanism of viral hepatitis B and C. *Med Hypotheses* 2001;56:405-408

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 •

轮状病毒全身感染对肝胆胰的影响

姚英民, 李 宁, 欧巧群

姚英民, 李宁, 欧巧群, 中国人民解放军第一军医大学南方医院儿科
广东省广州市 510515
项目负责人: 姚英民, 510515, 广东省广州市, 中国人民解放军第一军医大学南方医院儿科. ningli_cn@hotmail.com
电话: 020-85141888-87300 传真: 020-61641927
收稿日期: 2002-11-19 接受日期: 2002-12-02

摘要

目的: 进一步了解轮状病毒(RV)全身扩散后对肝、胆、胰的影响, 为指导临床的早期诊断与治疗提供有价值参考。

方法: 观察 RV 胃肠炎患儿肝、胆、胰损伤的临床表现和化验变化; 采用光镜、电镜观察 RV 胃肠炎死亡患儿, 人类 RV 感染小鼠模型的组织病理变化, 采用原位 PCR 技术获取肝、胆、胰组织 RV 感染的直接证据。

结果: RV 胃肠炎患儿肝酶 ALT、AST 分别升高者占 36.59 % 和 78.05 %, 2 项均显著升高者占 7.32 %; 胰淀粉酶显著增高 1 例, 胆指标均在正常范围内。光镜下 RV 胃肠炎死亡患儿肝细胞浊肿, 明显脂肪变性, RV 感染小鼠肝窦血管扩

张充血、灶性坏死,汇管区和小叶内淋巴细胞、浆细胞浸润,胆道充血,胰腺无明显异常.电镜下RV感染小鼠肝细胞中存在大量脂滴和空泡,肝脏线粒体凝集病变明显,毛细胆管明显扩张,微绒毛脱落.原位PCR结果:RV胃肠炎死亡患儿肠、肝呈阳性,RV感染小鼠胆管上皮细胞和腺体,肝细胞膜、胞质以及枯否细胞胞质,胰腺细胞呈阳性显色.

结论:人类RV一旦扩散至全身后,对肝、胆、胰可造成不同程度的损伤.

姚英民,李宁,欧巧群.轮状病毒全身感染对肝胆胰的影响.世界华人消化杂志 2003;11(6):873-875

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/873.asp>

0 引言

轮状病毒(RV)是世界范围内急性感染腹泻病的主要病原体之一,每年有数亿人感染此病,死亡人数达80万之多.近年来,RV也可侵犯全身多个器官,已引起了人们的广泛关注^[1-3].我们试图从RV胃肠炎患儿临床表现和化验检查中获取RV感染肠道外消化器官肝胆胰的临床证据;采用光镜、电镜观察RV胃肠炎死亡患儿,人类RV感染小鼠模型组织的病理变化,采用原位PCR技术获取RV感染肝胆胰组织的直接证据.为进一步了解RV对肠外消化器官与组织的影响,为指导临床的早期诊断与治疗提供有价值参考.

1 材料和方法

1.1 材料 RV感染高峰期来我院就诊的急性腹泻患儿41例,年龄6mo-2岁,临床表现符合儿科学(第四版)关于急性RV胃肠炎的诊断标准,粪便经ELISA检测RV阳性.采取患儿静脉血,检测血清谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、胰淀粉酶、直接胆红素、间接胆红素、总胆汁酸水平.ALT和AST ≥ 3 倍正常值为明显升高.其他指标 \geq 正常值2倍为明显升高.同时观察肠外消化器官损伤的临床表现.在RV肠炎流行期,2例死亡的RV肠炎患儿,例1,患儿粪便ELISA检测RV++,未检出其他病原菌,在脑脊液、肺组织研磨上清和腹水中以PCR方法检出RV.例2,患儿粪便ELISA检测RV+++.

1.2 人类RV感染新生小鼠 (1)RV来源:RV流行高峰期腹泻患儿临床表现符合急性RV胃肠炎的诊断标准,粪便RV抗原ELISA检测++++,PAGE电泳图形与RV Wa株相同.3份患儿新鲜粪便混合,-37℃冻存过夜,4000 rpm离心30 min,取上清,加2倍生理盐水稀释,测pH值为6.9,加青霉素、链霉素各200 U/ml 4℃孵育过夜,0.22 μ m微孔滤膜过滤.取少量过滤粪上清细菌培养,未发现细菌生长^[5]. (2)实验动物:新生清洁级昆明乳鼠,妊娠晚期购回.新生鼠自然娩出,共32只,雌雄各半,3日龄,体重3.5-4.0 g,平均3.8 g.试验前大便轮状病毒ELISA和PAGE电泳均为阴性. (3)RV接种

小鼠:A组:8只小鼠灌胃RV悬液0.4 ml;B组:8只小鼠腹腔注射RV悬液0.4 mL;C组:8只小鼠灌胃生理盐水0.4 mL作为对照组;D组:8只小鼠腹腔注射生理盐水0.4 mL作为对照组.接种后第3天猝死小鼠.

1.3 光镜下观察RV胃肠炎死亡患儿病理变化,光镜、电镜下观察接种RV后d3猝死小鼠的病理变化.

1.4 原位RT-PCR间接法 检测RV腹泻高峰期死亡的2例婴儿尸体解剖存档肝、胆、胰腺石蜡标本.阳性对照:RV感染的MA104细胞;阴性对照:RV感染死亡患儿组织标本RT-PCR反应不加MO-MLV逆转录酶;1例同年龄组非RV感染死亡患儿的组织石蜡标本;空白对照:杂交液中不加探针.杂交探针:A组RV Gene9的51-392 bp之间的序列,地高辛标记.PCR扩增片断:A组RV Gene9的51-392 bp之间.具体方法见文献[4].

2 结果

2.1 肝胆胰血液检验结果 急性RV胃肠炎患儿ALT值、AST值分别升高者占36.59%和78.05%,2项均升高者占34.15%,2项均显著升高者占7.32%,胰淀粉酶1例显著增高,胆指标在正常范围内.

2.2 RV感染后组织病理改变 光镜下,RV胃肠炎患儿肝呈小叶-弥漫性脂肪变性,肝细胞浊肿-明显变性,胞质内颗粒形成,肝窦受压变窄,胆、胰无明显异常.腹腔注射组小鼠肝窦血管扩张充血、部分肝细胞浊肿,灶性坏死,肝细胞内有脂滴,汇管区和小叶内淋巴细胞、浆细胞浸润,胆道充血.其他组小鼠脏器未见异常改变.电镜下,腹腔注射组小鼠肝细胞中存在大量脂滴和空泡,细胞之间淋巴细胞,浆细胞浸润显著,粗面内质网扩张,肝脏线粒体肿胀-凝集病变明显,轮廓不清,细胞核固缩-崩解,嵴膜模糊不清,部分毛细胆管明显扩张,微绒毛脱落.

2.3 各脏器RV原位PCR结果 第1例患儿小肠,第2例患儿小肠、肝脏呈阳性.腹腔注射组乳鼠小肠绒毛和肠腺细胞质,胆管上皮细胞和腺体,肝脏细胞膜、胞质以及枯否细胞质,胰腺细胞呈阳性显色.其他组呈阴性.

3 讨论

RV胃肠炎引起一过性肝酶升高,甚至可在人类的肝细胞内复制,引起RV肝炎已被人们关注^[6,7].本文临床研究与动物实验均证实RV具有嗜肝组织的特性.在RV胃肠炎患儿中约30%肝酶升高,显著升高者约占7%左右.其中1例证实RV病毒血症小儿,出现明显高脂血症和脂肪肝,2例RV胃肠炎死亡小儿,可见肝细胞浊肿及明显脂肪变性.镜下证实人类RV感染小鼠,除肝脏的炎症改变外,肝细胞中存在大量脂滴和空泡,由此提示RV所致肝脏损伤如同丙型肝炎一样也具有肝脏脂肪变的病理特征^[8].此外,肝脏超微结构也显示线粒体病变尤为显著,推测RV侵犯肝脏后可能主要影响肝细胞能量代谢的场所,导致能量代谢紊乱,此点恰与某些

病毒所致以急性脑病合并肝脂肪变性,以器官线粒体受损组织学改变为特点的瑞氏(Reye)综合征有某些相似之处。

经消化道接种 RV 后一般不易造成肠道外感染,或肠道外感染的脏器少,程度较轻。经腹腔接种, RV 通过腹膜以及腹腔内的血管和淋巴系统直接转移到靶器官,相当于模拟 RV 已穿过肠道屏障,人为地造成了 RV 病毒血症后,肠道外感染的情况。近来,国外采用此方法建立 RV 所致的胆汁淤积,先天性肝外胆管闭锁动物模型,证实 RV 是导致这一病理改变的最佳病原体之一^[9,10]。在国外也发现小婴儿先天性胆道闭锁与 RV 感染有关。我们在急性 RV 胃肠炎患儿中未发现 RV 引起胆道病变的病例,但我们动物实验证实人类 RV 可以引起新生小鼠胆管病变,由此推测 RV 嗜胆细胞可能具有一定的年龄限制。最近的研究有力的支持了我们的推测,他们发现胆道闭锁除与病毒数量有关外, RV 引起先天性胆道闭锁,一般发生在生后 12 h 内新生动物,此后新生儿不易发生,考虑可能与免疫有关^[11]。

最近国外研究证明, RV 可以在胰腺细胞内生长^[12], RV 的基因序列与人类胰岛某部分组织的抗原决定簇高度相似, RV 感染可触发或加重遗传易感儿胰岛的自身免疫,导致 I 型糖尿病的发生^[13]。也有 RV 引起急性胰腺炎以及胰高血糖素升高的报道^[14]。我们的初步调查显示约 1.6 % 患儿可出现胰淀粉酶明显升高且伴有腹痛。我们的动物实验也首次证实人类 RV 可以侵犯新生小鼠的胰腺,进一步证实人类 RV 具有嗜胰腺组织的特性。这对将胰腺也列为 RV 全身感染的监测对象,以及对胰腺受损患儿的远期追踪观察提供了有价值的参考资料。

总之,一旦 RV 有机会扩散至全身,肝,胆,胰都可能不同程度的受累。认识这种可能性,对此保持一定的警惕性,在 RV 腹泻病程中及时诊断这些并发

症,尤其某些具有致死性的并发症,早期预防,早期诊断,及时调整治疗方案。合理处理治疗矛盾,对于提高危重症 RV 感染的治愈率,减少死亡率都具有重要的意义。

4 参考文献

- 1 Mossel EC, Ramig RF. Rotavirus genome segment 7 (NSP3) is a determinant of extraintestinal spread in the neonatal mouse. *J Virol* 2002;76:6502-6509
- 2 Morrison C, Gilson T, Nuovo GJ. Histologic distribution of fatal rotaviral infection: an immunohistochemical and reverse transcriptase in situ polymerase chain reaction analysis. *Hum Pathol* 2001;32:216-221
- 3 李宁,姚英民. 轮状病毒多系统感染二例分析. 中华儿科杂志 2002;40:141-143
- 4 李宁,张素娟,姚英民. 间接原位 RT-PCR 方法检测组织中轮状病毒. 临床与实验病理学杂志 2001;17: 82-83
- 5 施新猷. 现代医学实验动物学. 第 1 版. 北京:人民军医出版社, 2000:540.
- 6 McMaster P, Hunt R, Wojtulewicz J, Wilcken B. An unusual cause of hepatitis. *J Paediatr Child Health* 2001;37:587-588
- 7 欧巧群,李宁,姚英民,张传仓. 轮状病毒致肝功能损害及其和病毒血症的初步探讨. 世界华人消化杂志 2001;9:476-477
- 8 成军. 慢性丙型肝炎肝脏脂肪变的机制及其意义. 世界华人消化杂志 2002;10:999-1003
- 9 Petersen C, Kuske M, Bruns E, Biermanns D, Wussow PV, Mildenerger H. Progress in developing animal models for biliary atresia. *Eur J Pediatr Surg* 1998;8:137-141
- 10 Petersen C, Grasshoff S, Luciano L. Diverse morphology of biliary atresia in an animal model. *J Hepatol* 1998;28:603-607
- 11 Czech-Schmidt G, Verhagen W, Szavay P, Leonhardt J, Petersen C. Immunological gap in the infectious animal model for biliary atresia. *J Surg Res* 2001;101:62-67
- 12 Coulson BS, Witterick PD, Tan Y, Hewish MJ, Mountford JN, Harrison LC, Honeyman MC. Growth of rotaviruses in primary pancreatic cells. *J Virol* 2002;76:9537-9544
- 13 Gellert SA, Goldwater PN, Steele CE, Couper JJ, Tait BD, Colman PG, Harrison LC. Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes* 2000;49:1319-1324
- 14 姚英民,欧巧群,李宁. 轮状病毒肠炎患儿胰高血糖素的变化. 世界华人消化杂志 2001;9:112-113

胆源性胰腺炎手术治疗 58 例

黄建勇,马清涌,马建新

黄建勇,马清涌,马建新,西安交通大学第一医院肝胆外科 陕西省西安市 710061
项目负责人:黄建勇,710061,陕西省西安市健康路 1 号,西安交通大学第一医院肝胆外科. huangjianyong@etang.com
收稿日期:2002-12-05 接受日期:2003-01-02

摘要

目的:探讨胆源性胰腺炎(GP)的手术治疗时机和治疗方案。

方法:回顾分析我院 1994-12/2001-12 收治经手术治疗的胆

源性胰腺炎患者 58 例,统计分析并发症发生及死亡情况。

结果:早期手术组和延期手术组并发症发生率分别为 29.17 % 和 8.82 %,死亡率分别为 25 % 和 0。两组比较有显著性差异。早期手术组同延期手术组比较,并发症发生率和死亡率明显增高。

结论:轻型胆源性胰腺炎首先保守治疗,病情缓解后延期手

术,重型胆源性胰腺炎采用延期手术与个体化治疗相结合的原则.若有胆道梗阻、胆管炎或出现坏死感染者应急诊手术.

黄建勇,马清涌,马建新.胆源性胰腺炎手术治疗58例.世界华人消化杂志 2003;11(6):875-877

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/875.asp>

0 引言

急性胆源性胰腺炎在我国占急性胰腺炎总数的一半以上.对胆源性胰腺炎(GP)的手术治疗时机和手术指征的把握一直处于争议之中^[1,2].从急性胰腺炎发病机制考虑,应遵循“个体化治疗,延期手术”的原则,同时应考虑是否有胆道梗阻、胆管炎,以确定最佳手术时机和手术方法,减少并发症的发生率和死亡率,提高胆源性胰腺炎的治疗效果.

1 材料和方法

1.1 材料 1994-12/2001-12 我院共收治136例胆源性胰腺炎,其中58例经手术治疗,男28例,女30例,平均年龄52.5岁(23-86岁),重症胆源性胰腺炎均经手术和CT证实为胰腺坏死.诊断符合2000年杭州第八届全国胰腺外科学术研讨会的临床诊断及分级标准^[2].诊断标准:(1)胆绞痛病史;(2)上腹部压痛、肌紧张、反跳痛;(3)血、尿淀粉酶明显升高;(4)血清总胆红素>40 U/L或AKP>225 U/L或ALT>75 U/L;(5)B超、CT检查提示胆道结石并梗阻,胆总管扩张和重症急性胰腺炎.

1.2 方法 根据手术时间分为早期手术组和延期手术组,并分析并发症的发生率和死亡率.早期手术组:入院后72 h内手术24例,其中男10例,女14例,平均年龄54.6岁(23-89岁),5例出现重症急性胆管炎表现.手术时机的选择:依照个体化治疗的方案,胆源性胰腺炎有胆道梗阻、化脓性胆管炎或出现坏死感染的急诊手术.手术方式:胆囊切除或胆囊造瘘、胆道探查取石、胆总管“T”管引流、胰包膜切开引流、胰坏死组织清除,坏死范围广、感染严重者行胃造瘘及空肠造瘘,胰周腹膜后病灶清除区放置有效的灌洗引流.延期手术组:在严密监视下行非手术治疗,使症状控制,病情稳定6-8 wk后手术治疗34例,其中男16例,女28例,平均年龄53.5岁.非手术治疗方法采用综合治疗:(1)补充血容量,纠正血液动力学异常,纠正水电解质紊乱,应用低分子右旋糖酐、复方丹参等,改善微循环;(2)禁饮食,持续胃肠减压,减轻胃肠道负担,减少消化液分泌;(3)早期应用糖皮质激素,提高应激能力,抑制各种炎症递质,减轻全身炎症反应综合征;(4)应用能透过胰腺屏障的广谱抗生素,防止感染;(5)应用善得定,施他宁抑制胰液分泌;(6)抑制胃酸分泌,防止应激溃疡发生;(7)对高龄、有慢性心肺疾病,要加强各脏器功能监测,常规血气分析,防止ARDS,MODS等.手术方式:胆囊切除术,根据术前B超与临床检查及术中胆总管探查情况决定是否行胆总管切开取石或术中经胆囊管行胆总管纤

维胆道镜检查取石术,胰腺一般不行特殊处理.

统计学处理 采用 χ^2 检验

2 结果

本组病例早期手术与延期手术的手术时机选择和胆源性胰腺炎并发症发生率及死亡率之间的关系见表1,从表中可看出早期手术组与延期手术组的并发症发生率分别为29.17%和8.82%,死亡率分别为25%和0.延期手术组的并发症发生率和死亡率均低于早期手术组,两组相比差异均有显著性($P < 0.05$).

表1 手术时机的选择与GP并发症发生率及死亡率之间的关系

分组	<i>n</i>	并发症发生率	死亡率
早期手术组	24	7(29.17%)	6(25%)
延期手术组	34	3(8.82%) ^a	0(0)

^a $P < 0.05$ vs 延期手术组.

3 讨论

胆源性胰腺炎的手术时机选择和手术指征:对重症急性胰腺炎的治疗方法:原则上保守,若病情恶化则手术^[3].对于急性重症胆源性胰腺炎的总体治疗原则,国内主要以张圣道教授为代表的胰腺炎个体化治疗方案^[4].胆源性胰腺炎病因明确,治疗效果相对较好,但仍有一定的死亡率,主要出现于发病早期,多为合并急性化脓性胆管炎而出现休克、感染、多脏器功能衰竭者,因此对胆源性胰腺炎有胆道梗阻或化脓性胆管炎应行急诊手术,引流胆道,减小胆道压力,去除病因.对于胰周浸润局限、无腹水和迅速发生多器官功能障碍的极个别暴发型患者,可避开主胰管沿胰腺长轴较浅切开胰腺体尾部实质2-3 mm,这样可以释放出生物毒性物质,减轻限制性的消极作用所带来的全身病变的严重程度^[5].对非梗阻性胆源性胰腺炎应选择非手术治疗,如果发生坏死感染再转手术治疗,否则在胰腺炎痊愈后同一次住院期间再行胆囊切除手术以去除复发原因^[6].由于急性胰腺炎早期大量炎症递质的释放,导致全身炎症反应综合征,机体生理功能紊乱、抵抗力低下,对急性反应期的急性胰腺炎手术只会加重对机体的打击,加剧全身炎症反应,增加手术死亡率^[7].特别对高龄、合并有多脏器功能不全、难以耐受手术的患者,早期急诊手术加重病情发展,术后可能出现多脏器功能衰竭等,并发症的发生率和死亡率也很高.本组早期手术组并发症发生率29.17%,死亡率25%,明显高于延期手术组.对于延期手术时间,有学者提出在发病2 wk后^[8].有人认为在胰腺炎恢复3 mo后行胆道结石手术,但这样会在此期间有结石梗阻再发急性胰腺炎可能,增加了风险性.Sargen et al^[9]认为胆源性胰腺炎应在病情缓解后4 wk内应手术取出结石,否则易再次复发,住院时间延长.因此,结合实际情况,在病情缓解后6-8 wk内即应手术治疗,防

止胰腺炎再次复发。

对重症胆源性胰腺炎、有大量腹水、病情发展快的、出现多脏器功能不全、不能耐受手术的患者，内镜联合腹腔灌洗治疗具有安全有效、创伤小、恢复快、并发症少的优点，可在一定程度上替代外科手术治疗^[10]。对重症急性胰腺炎有胆道梗阻和胆道感染且病情严重者，在入院24 h内行EST，解除胆道梗阻，降低了胰管压力，阻止病情进一步发展，为择期手术创造条件。胆源性胰腺炎在发病后48 h内行ERCP加取石术可降低胆红素、淀粉酶、脂肪酶、术后病情减轻并防止症状复发^[11-13]。对入院时APACHE-II记分 ≤ 8 的轻型胆源性胰腺炎，主张在急性发作缓解后手术治疗，APACHE-II记分 ≥ 8 的重型胆源性胰腺炎主张延期与个体化相结合的处理原则，首先积极非手术治疗，为延期手术治疗创造有利条件，急性发作缓解后择期手术^[1]。随着微创技术的发展，对胆源性胰腺炎的处理采用ERCP加EST及随后的腹腔镜胆囊切除术比开放手术更安全有效，减少不必要的胆总管探查，降低并发症发生率和死亡率^[14]。

4 参考文献

- 1 秦仁义, 邹声泉, 吴在德, 裘法祖. 胆源性胰腺炎手术时机的探讨. 中华外科杂志 1998;36:149-151
- 2 中华医学会外科学分会胰腺外科学组. 重症急性胰腺炎诊疗草案. 中华普通外科杂志 2001;16:699-701
- 3 黄志强. 半个世纪以来肝、胆、胰外科的发展. 中华外科杂志 2001;39:9-16
- 4 张圣道. 重症急性胰腺炎的现代诊断与治疗观点. 肝胆胰外科杂志 1999;11:57
- 5 李军成, 吴浩荣, 田斌. 重症急性胰腺炎外科治疗有关的认识进展. 世界华人消化杂志 2001;9:212-216
- 6 雷若庆, 袁祖荣, 韩天权, 汤耀卿, 王建承, 蒋渝, 张圣道. 重症急性胰腺炎的手术治疗探讨. 中华普通外科杂志 2001;16:647-649
- 7 严律南. 重症急性胰腺炎的治疗观点: 非手术、手术、个体化? 中国实用外科杂志 2001;21:21
- 8 刘续宝, 严律南, 张肇达. 重症急性胰腺炎435例的手术治疗时机和指征探讨. 中华普通外科杂志 2000;15:277-279
- 9 Sargen K, Kingsnorth AN. Management of gallstone pancreatitis: effects of deviation from clinical guidelines. JOP 2001;2:317-322
- 10 李玉民, 李汛, 周文策, 石斌, 李世雄, 何登瀛, 曹农, 芦国芳, 李琼. 内镜联合腹腔灌洗治疗早期急性重症胆源性胰腺炎. 中华普通外科杂志 2001;16:650-652
- 11 Dominguez Fernandez E, Suchan KL, Gerke B, Rossner E, Post S, Manegold BC. Results of emergency ERCP in the treatment of acute biliary pancreatitis. Zentralbl Chir 2002;127:786-790
- 12 Gislason H, Vetthus M, Horn A, Hoem D, Sondenaa K, Soreide O, Viste A, Andren-Sandberg A. Endoscopic sphincterotomy in acute gallstone pancreatitis: a prospective study of the late outcome. Eur J Surg 2001;167:204-208
- 13 Kaw M, Al-Antably Y, Kaw P. Management of gallstone pancreatitis: cholecystectomy or ERCP and endoscopic sphincterotomy. Gastrointest Endosc 2002;56:61-65
- 14 Ricci F, Castaldini G, de Manzoni G, Borzellino G, Rodella L, Kind R, Cordiano C. Treatment of gallstone pancreatitis: six-year experience in a single center. World J Surg 2002;26:85-90

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 •

良性肝病患者血清 AFP 升高的临床意义

程天霞

程天霞, 肥东县人民医院传染科 安徽省肥东县 231600
项目负责人: 程天霞, 231600, 安徽省肥东县撮镇路8号, 肥东县人民医院传染科. chengys@sh163.net
收稿日期: 2002-10-18 接受日期: 2003-02-26

摘要

目的: 探讨良性肝病患者血清AFP升高的临床意义。

方法: AFP和SF(血清铁蛋白)测定均采用放免法, 肝癌特异性蛋白(PHC SP)用酶标法检测, 谷丙转氨酶(ALT)和 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)测定用常规方法。

结果: 急性肝炎12例PHC SP阴性; 慢性肝炎轻度1例PHC SP阳性, 11例PHC SP阴性; 慢性肝炎中、重度2例PHC SP阳性, 24例PHC SP阴性; 肝硬化5例PHC SP阳性, 23例PHC SP阴性; 原发性肝癌48例PHC SP阳性, 6例PHC SP阴性。良恶性肝病组间PHC SP阳性率比较有显著性差异($P < 0.01$)。

结论: AFP明显升高而不能确诊的肝病患者, 应进一步通过

其他血清学方法进行鉴别, 单用某一种血清学方法都有一定的局限性, 多种方法联合检测有利于良恶性肝病的鉴别。

程天霞. 良性肝病患者血清AFP升高的临床意义. 世界华人消化杂志 2003; 11(6):877-879

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/877.asp>

0 引言

甲胎球蛋白(AFP)在原发性肝癌(PHC)诊断, 尤其是早期诊断中有着重要价值^[1,2], 临床上部分急、慢性病毒性肝炎及肝硬化患者血清AFP明显高于正常。本文对AFP升高的各型良性肝病患者的临床资料进行分析, 以探讨良性肝病患者AFP升高的机制及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料 根据1995年北京病毒性肝炎学术会议修订标准, 选择AFP $>400 \mu\text{g/L}$ 者78例, 其中急性病毒性肝炎12例(甲型肝炎8例, 戊型肝炎4例), 慢性肝炎轻

度 12 例(乙型肝炎 10 例, 丙型肝炎 2 例), 慢性肝炎中、重度 26 例(乙型肝炎 24 例, 乙丙型肝炎混合感染 2 例), 肝炎肝硬化 28 例.男 46 例, 女 32 例, 年龄 15-67 岁, 平均 42.5 岁. PHC 54 例(均经组织病理学证实). 全部病例均随访 1 a 以上, 最长达 4 a, 并排除生殖细胞瘤和消化道肿瘤.

1.2 方法 AFP 和 SF(血清铁蛋白)测定均采用放免法, 肝癌特异性蛋白(PHC SP)用酶标法检测, 谷丙转氨酶(ALT)和 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)测定用常规方法.

统计处理 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 二样本均数间的比较用 t 检验, 二样本率的比较用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 良恶性肝病患者血清 ALT、 γ -GT、SF 含量见表 1

表 1 良恶性肝病患者血清 ALT、 γ -GT、SF 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	ALT(单位)	γ -GT(单位)	SF(单位)
急性肝炎	12	174 \pm 120 ^a	96 \pm 62	417 \pm 190
慢性肝炎轻度	12	84 \pm 76	41 \pm 27 ^a	304 \pm 302 ^a
慢性肝炎中、重度	26	143 \pm 112 ^a	104 \pm 61	460 \pm 301
肝硬化	28	62 \pm 60	47 \pm 31 ^a	316 \pm 373
原发性肝癌	54	58 \pm 42	114 \pm 70	504 \pm 147

^a $P < 0.01$ vs 原发性肝癌组.

2.2 良恶性肝病患者血清 PHC SP 阳性率比较 将急性肝炎、慢性肝炎、肝硬化病例归为良性肝病组, 其 PHC SP 阳性率为 10.25%, 而 PHC 组阳性率为 88.89%. 良恶性肝病组间 PHC SP 阳性率比较有显著性差异($P < 0.01$, 表 2).

表 2 良恶性肝病患者血清 PHC SP 检测结果

组别	<i>n</i>	PHCSP(+)	PHCSP(-)
急性肝炎	12	0	12
慢性肝炎轻度	12	1	11
慢性肝炎中、重度	26	2	24
肝硬化	28	5	23
原发性肝癌	54	48	6

2.3 肝病患者 AFP 及病情变化的 1 a 随访 随访 54 例 PHC 患者, 仅 4 例存活, 2 例 AFP $> 400 \mu\text{g/L}$, 1 例为 $254 \mu\text{g/L}$, 1 例 $< 20 \mu\text{g/L}$. 而良性肝病组仅 4 例死亡(均系肝硬化病例, 2 例消化道大出血; 2 例肝昏迷). 急性肝炎和慢性肝炎轻度患者 AFP 均降至正常; 慢性肝炎中、重度患者中 1 例 $> 400 \mu\text{g/L}$, 其余均 $< 20 \mu\text{g/L}$; 28 例肝硬化患者中有 2 例高于正常, 1 例 $> 400 \mu\text{g/L}$, 1 例为 $170 \mu\text{g/L}$.

3 讨论

AFP 是人胚胎时期肝细胞和卵黄囊细胞产生(胃肠道黏膜

也可产生)的一种特殊糖蛋白. 业已查明^[3-7], 人类 AFP 基因位于 4q^[11-18], 其表达受多种因素影响, 胎儿肝细胞中 AFP 基因处于激活状态, 出生后 AFP 基因处于封闭状态, 停止表达. 而 PHC 增生的肝细胞及生殖细胞, 基因被激活, 产生大量 AFP. 临床对 AFP $> 400 \mu\text{g/L}$ 的病例高度怀疑 PHC, 但我们也常发现部分良性肝病患者, 尽管其 AFP $> 400 \mu\text{g/L}$, 其 AFP 持续时间可达 6-12 mo, 但临床预后呈良性经过, 经随访 1-4 a 后未见恶变.

本文显示 PHC 患者 ALT 升高不显著, 而 γ -GT 升高较为明显, 但缺乏特异性, 如慢性肝炎中、重度病例也可升高. 过去认为 AFP 浓度随 ALT 消长而变化, 但本人看到有些病例, 尽管 ALT、 γ -GT、总胆红素已恢复正常, 其 AFP 仍居高不下. 本人认为这种情况系肝炎及肝硬化病程中, 一方面部分肝细胞发生炎症、坏死, 另一方面肝细胞也在不断地修复增生, 增生的肝细胞中 AFP 基因被激活. 本文有 2 例抢救成功的慢性重型肝炎病例, 其病程中出现血清 AFP 升高, 而一些治疗效果不佳的重型肝炎病例, 其 AFP 升高不明显, 甚至不升高, 提示某些良性肝病患者 AFP 升高是因肝细胞修复增生所致. 一旦肝细胞修复完成, AFP 逐渐恢复正常. 实验中显示良性肝病组患者 PHC SP 阳性率(10.25%)明显低于 PHC 组(88.89%), 且 PHC 组 SF 水平显著高于良性肝病组($P < 0.01$), 说明 PHC SP 与 SF 在良恶性肝病的鉴别中有重要参考价值, 与文献[8-18]报道相符.

总之, 对于 AFP 明显升高而不能确诊的肝病患者, 应进一步通过其他血清学方法进行鉴别, 单用任何一种血清学方法都有一定的局限性, 多种方法联合检测有利于良恶性肝病的鉴别, 对防止误诊有重要的临床意义.

4 考文献

- 1 成军, 杨守纯. 现代肝炎病毒分子生物学. 第 1 版. 北京: 人民军医出版社, 1997: 86-198
- 2 严家春, 马景云, 潘伯荣, 马连生. 中国病毒性乙型肝炎的研究. 世界华人消化杂志 2001;9:611-616
- 3 严家春, 陈文笔, 马勇, 刘健虎, 孙新华, 徐长江. 乙型肝炎肝组织血管病变组织及免疫组织化学的研究. 世界华人消化杂志 2000;8:1205-1210
- 4 王小众, 陶其敏. 乙型肝炎 X 基因与肝癌. 世界华人消化杂志 1999;7:1063-1064
- 5 Fang JN, Jin CJ, Cui LH, Quan ZY, Choi BY, Ki MR, Park HB. A comparative study on serologic profiles of virus hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:107-110
- 6 You J, Zhuang L, Tang BZ, Yang WB, Ding SY, Li W, Wu RX, Zhang HL, Zhang YM, Yan SM, Zhang L. A randomized controlled clinical trial on the treatment of Thymosin $\alpha 1$ versus interferon- α in patients with hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2001;7:411-414
- 7 Zhao LS, Qin S, Zhou TY, Tang H, Liu L, Lei BJ. DNA-based vaccination induces humoral and cellular immune responses against hepatitis B virus surface antigen in mice without activation of C-myc. *World J Gastroenterol* 2000;6:239-243
- 8 Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-KB in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7:340-344
- 9 Wang FS, Xing LH, Liu MX, Zhu CL, Liu HG, Wang HF, Lei ZY. Dysfunction of peripheral blood dendritic cells from patients with chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2001;7:537-541
- 10 Cao XY, Liu J, Lian ZR, Clayton M, Hu JL, Zhu MH, Fan DM,

- Feitelson M. Differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma induced by woodchuck hepatitis B virus in mice. *World J Gastroenterol* 2001;7:575-578
- 11 任星峰,葛娅,杨群,赵南涛. 慢性乙型肝炎肝脂肪变性的组织学特点. *世界华人消化杂志* 2003;11:106-107
- 12 李谨革,聂青和,黄长形. 抗乙型肝炎病毒核酶的研究进展. *世界华人消化杂志* 2003;11:238-241
- 13 李刚,舒欣,马会慧,陈伟,陈文思,陈青,江元森,姚集鲁. 基因芯片技术检测 HBV HCV 及 HBV YMDD 变异株. *世界华人消化杂志* 2003;11:178-181
- 14 苏勤,张伟,刘节,王淑芳,Takegoshi K, Schröder CH. 乙型肝炎病毒慢性感染者血清中不同类型病毒转录体的检测及其意义. *世界华人消化杂志* 2003;11:134-143
- 15 马小超,屠曾宏. 细胞色素 P450 在药源性肝损伤中的作用. *世界华人消化杂志* 2003;11:338-341
- 16 王颖,周卓,王学清. 肝硬化患者血中一氧化氮及降钙素基因相关肽改变的初步研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:358-359
- 17 Han HL, Lang ZW. Changes in serum and histology of patients with chronic hepatitis B after interferon alpha-2b treatment. *World J Gastroenterol* 2003;9:117-121
- 18 Qin LX, Tang ZY. Hepatocellular carcinoma with obstructive jaundice: diagnosis, treatment and prognosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:385-391

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 •

经皮肝穿刺胆道引流治疗外伤后胆瘘

汪邵平,霍 枫,张玉新,裴世强

汪邵平,霍枫,张玉新,裴世强,广州军区总医院普通外科 广东省广州市 510010
项目负责人:汪邵平,510010,广东省广州市流花路 111 号,广州军区总医院普外科.victorwsp@163.net
电话:020-36224648 传真:020-36222203
收稿日期:2002-12-05 接受日期:2003-01-18

摘要

目的:探讨一条简单、有效治疗顽固性胆瘘的途径。

方法:7 例顽固性胆瘘尝试行经皮肝穿刺胆道引流术(PTCD),对胆道进行外引流。

结果:2 例置管失败,5 例成功实施 PTCD 后,造影发现 3 例伴肝门部、胆总管狭窄。置管引流后,经瘘管流出的胆汁量从 200-600 mL/d 降为 60-180 mL/d,无并发症,胆瘘平均愈合时间 11.4 d。8 例保守治疗的胆瘘患者中,1 例死亡,余 7 例平均病程 49.8 d。

结论:PTCD 操作简单、安全,是治疗外伤后顽固性胆瘘的重要措施。

汪邵平,霍枫,张玉新,裴世强. 经皮肝穿刺胆道引流治疗外伤后胆瘘. *世界华人消化杂志* 2003;11(6):879-880
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/879.asp>

0 引言

对肝外伤后胆瘘,临床处理较棘手,我们采用经皮肝穿刺胆道引流术(percutaneous trans-hepatic cholangiography and drainage, PTCD)治疗胆瘘,疗效满意,报告如下:

1 材料和方法

1.1 材料 对我院 1997/2002 收治的 7 例外伤后顽固性胆瘘患者实施经皮肝穿刺胆道引流术,成功 5 例。其中

男 4 例,女 1 例,平均年龄 34.3 岁。腹腔镜胆囊切除术后 1 例,肝部分切除术后 1 例,中央型肝裂伤(Ⅲ级以上)行“肝修补、肝填充止血”术后 3 例。对照组为近 10 a 我院保守治疗的 8 例胆瘘患者。

1.2 方法 根据受伤部位及在控制感染后经引流管造影,可大体明确胆瘘部位。选右腋中线 7-10 肋间为穿刺点,穿刺针朝向 12 胸椎平行前进至距其 2 cm 处后停止前进,缓慢退针,顺利抽吸到胆汁后注入造影剂造影。若胆瘘在左半肝胆管,则将患者侧卧位,多方向透视下于前入路肋缘下选定穿刺点穿刺造影。根据造影结果选择一条邻近胆瘘部位的大胆道,确定第二穿刺点。局麻后切开皮肤,将套管针(16-23G)插入目标胆管。抽吸套管,若有胆汁表明套管端已进入胆管内,否则轻微调整套管位置或重新穿刺。经套管引入 J 头软导丝后拔除套管,扩张器扩张穿刺通道后,置入 5-8F 普通导管沿胆总管方向插向十二指肠。将超强导丝置入换软性导丝后,拔除普通导管,换入带侧孔的引流导管并固定于腹壁皮肤。若发现胆道狭窄,则在换入引流导管前置入球囊导管逐步扩张狭窄胆道,或将置入器沿导丝插入狭窄部位,放置记忆镍钛合金胆道支架后再次造影,了解梗阻改善情况,术后定期冲洗导管。

2 结果

成功置管行 PTCD 术 5 例,其中胆道造影发现近肝门部胆管狭窄 3 例。术前腹腔引流管胆汁引流量 200-600 mL/d,术后降为 60-180 mL/d。PTCD 导管胆汁引流量 80-170 mL/d。术后胆瘘均愈合,平均愈合时间 11.4 d,胆瘘愈合后拔除引流导管,无并发症。保守治疗 8 例患者中,1 例全身衰竭死亡,7 例治愈,平均病程 49.8 d,PTCD 术后无腹腔出血、血气胸等并发症。

3 讨论

肝外伤或肝胆手术后由于创面小胆管未结扎、迷走小胆管损伤等原因,可有少量胆汁样液漏至腹腔,一般会逐渐减少,数日内消失,引流及时就不会引起严重后果.临床所谓“胆瘘”是指胆汁引出量大($>150\text{ mL/d}$),且无减少趋势,经久不愈这种情况其形成原因包括:(1)外伤、手术时肝创面遗漏较大的胆管支未结扎^[1];(2)创伤后感染,肝脓肿、膈下脓肿形成,腐蚀邻近胆管;(3)胆囊切除时损伤右肝管、迷走胆管或胆囊管结扎松脱;(4)T管误拔、早拔,或压迫胆总管壁坏死漏胆;(5)胆肠吻合张力大,血运差,吻合口愈合不佳.(6)近肝门部胆管、胆总管存在狭窄.

胆瘘的治疗一般有3种方法:(1)保守治疗,包括充分引流、营养支持、应用抗生素、生长抑素等.大部分胆瘘患者因此而获治愈^[2].但这种治疗的时间往往长达数月,患者在漫长病程中可因各种感染、胆汁丢失,营养障碍而不断衰竭,危及生命.本组8例中即有1例死亡.余7例平均病程长达49.8 d.若存在胆管狭窄因素或大胆管横断伤,则很难通过保守治疗治愈^[3].(2)开腹手术,包括病灶切除、胆肠吻合、T管引流等术式.患者多已遭受严重创伤,一般情况差,往往无法耐受,使再次手术风险大,且有再发胆瘘的可能^[1].目前,除伴发腹腔巨大脓肿外,开腹手术已较少用.(3)十二指肠乳头切开(endoscopic sphincterotomy, EST)+鼻胆管引流术.通过侧视式十二指肠镜电刀切开Oddi括约肌,同时胆总管内置入鼻胆管行胆汁外引流或置入导管内引流. Bose et al^[4] 2001年报道应用此法治疗20例外伤后胆瘘患者,疗效满意.国内孙志为 et al^[5]有类似报道.但该方法费用昂贵,设备、技术要求高,在我国基层医院尚无法开展.部分患者无法耐受内镜,以及可导致急性胰腺炎、穿孔等并发症都是该方法的局限性.

PTCD是指经皮肝穿刺途径置放胆道引流导管,达到胆道引流的作用,主要用于胆道梗阻的减黄治疗^[6].用于治疗胆瘘是基于如下理由:一方面,使胆汁顺利地经导管流至体外或十二指肠,从而使胆汁经瘘道丢失量大大减少,减少对瘘管的刺激,有利于瘘管的闭合.另

一方面,对顽固性胆瘘而言,往往伴有胆道狭窄,通过造影可及时发现狭窄部位,并应用扩张导管扩张胆道,引流导管支撑或置放胆道支架,使胆汁流出途径通畅后,胆道压力降低,胆瘘愈合的可能性大大提高. Kromer et al^[7] 1996年报道应用PTCD治疗8例胆瘘疗效满意. Hunt (97年)则对3例胆瘘患者通过PTC造影后直接放入微型钢圈栓塞胆瘘的胆管支均获成功^[8].我们对保守治疗后胆瘘量无减少趋势的7例顽固性胆瘘患者试用PTCD,成功置管5例.对有胆道梗阻、肝内胆管扩张的患者,PTCD成功率高,但本组4例胆管无明显扩张的患者,通过反复穿刺,亦有2例成功置管.术后患者胆瘘量明显减少,均在2 wk左右治愈,病程较保守治疗大大缩短.

PTCD操作相对简单,创伤小,在我国已有长期、广泛的应用基础.对没有条件开展ERCP、EST的基层医院,以及无法耐受消化道内镜的部分顽固性胆瘘患者,通过PTCD可诊治胆道狭窄,减少胆瘘量,加快胆瘘愈合进程,值得推荐.

4 参考文献

- 1 Sugiyama M, Izumisato Y, Abe N, Yamaguchi Y, Yamato T, Masaki T, Mori T, Atomi Y. Endoscopic biliary stenting for treatment of bile leakage after hepatic resection. *Hepatogastroenterology* 2001;48:1579-1581
- 2 Shahrudin MD, Noori SM. Biloma and biliary fistula associated with hepatorrhaphy for liver injury. *Hepatogastroenterology* 1997;44:519-521
- 3 Sharma AK. External biliary fistula. *Trop Gastroenterol* 2001; 22:163-168
- 4 Bose SM, Mazumdar A, Singh V. The role of endoscopic procedures in the management of postcholecystectomy and post-traumatic biliary leak. *Surg Today* 2001;31:45-50
- 5 孙志为,付德庄,莫一我,金焰,朱秀芳,乔欧,张新俊. 内镜鼻胆胰管负压引流治疗术后胆瘘和胰瘘. *世界华人消化杂志* 1999;7:361-362
- 6 黄洁夫. 腹部外科学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:472-473
- 7 Kromer MU, Maier M, Benz CA, Martin WR, Adamek HE, Kohler B, Riemann JF. Bile duct stenoses and leakage after cholecystectomy: endoscopic diagnosis, therapy and treatment outcome. *Z Gastroenterol* 1996;34:167-172
- 8 Hunt JA, Gallagher PJ, Heintze SW, Waugh R, Shiel GR. Percutaneous microcoil embolization of intraperitoneal intrahepatic and extrahepatic biliary fistulas. *Aust N Z J Surg* 1997;67:424-427



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

