

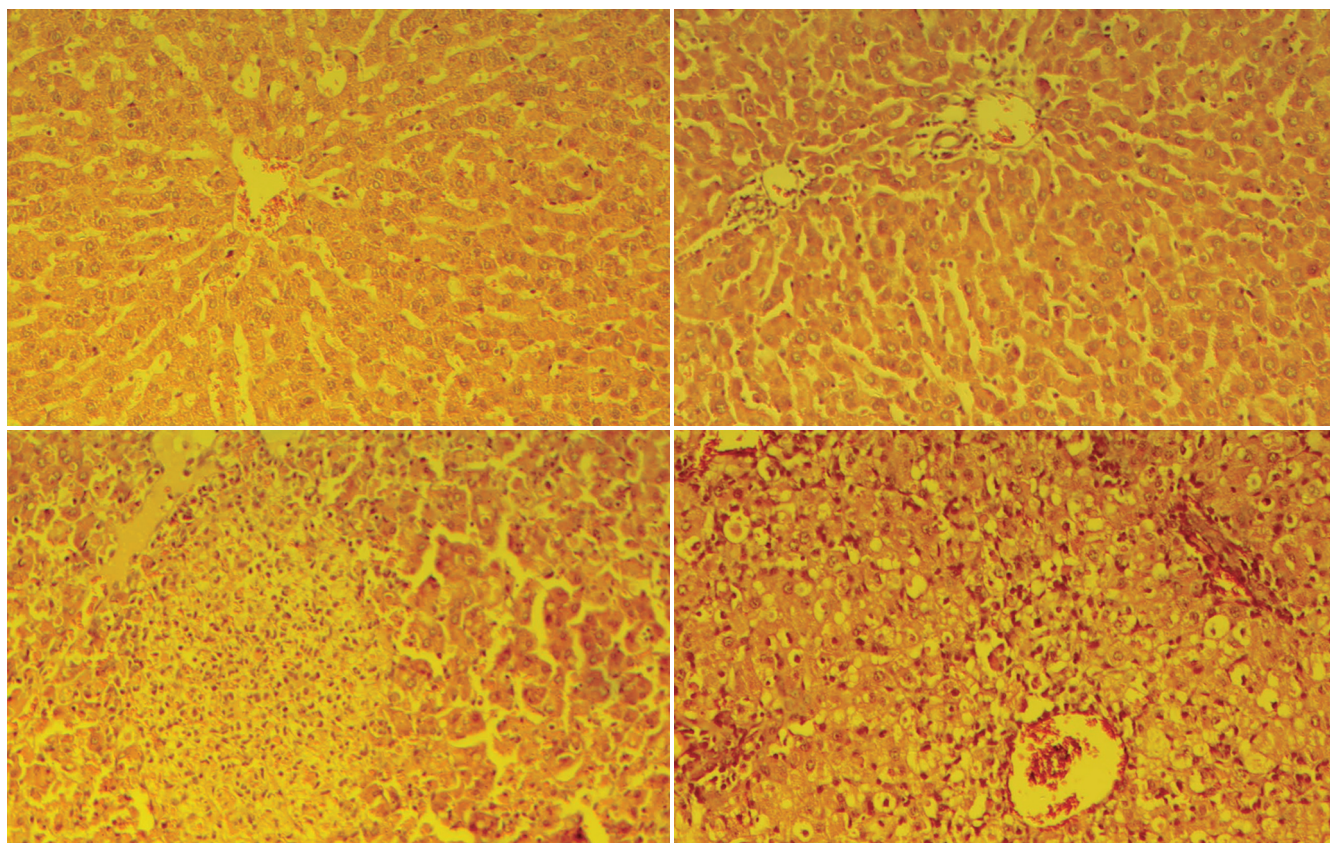
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006年1月8日 第14卷 第1期 (Volume 14 Number 1)



1 / 2006

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊,中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授 北京
黄象谦教授 天津
黄志强教授 北京
裘法祖教授 武汉
王宝恩教授 北京
危北海研究员 北京
吴孟超教授 上海
杨春波教授 福州
周殿元教授 广州

名誉总编辑

潘伯荣教授 西安

社长/总编辑

马连生 北京

副总编辑

陈士葆教授 上海
房殿春教授 重庆
姜洪池教授 哈尔滨
王苑本教授 天津
吴云林教授 上海
徐克成教授 广州
杨思凤教授 吉林
姚希贤教授 石家庄
岳茂兴教授 北京
张万岱教授 广州
周学文教授 沈阳

常务编委

程英升副教授 上海
高毅主任医师 广州
江学良副主任医师 上海
李岩教授 沈阳
刘连新教授 哈尔滨
吕宾教授 杭州
罗和生教授 武汉
聂青和副教授 西安
王小众教授 福州

编委

白爱平主治医师 广州
白文元教授 石家庄
白玉贤教授 哈尔滨

蔡淦教授 上海
曹洁副教授 上海
陈海龙教授 大连
陈红松研究员 北京
陈积圣教授 广州
陈建荣副教授 南通
陈立波副教授 武汉
陈凜教授 北京
陈其奎教授 广州
陈强谱教授 滨州
陈仕珠主任医师 西安
陈耀凯副教授 重庆
陈贻胜教授 福州
陈知水教授 武汉
陈治水主任医师 哈尔滨
陈祖林副教授 重庆
程爱国教授 唐山
程红岩教授 上海
迟宝荣教授 长春
崔云甫教授 哈尔滨
代文杰教授 哈尔滨
戴冬秋教授 沈阳
党双锁副教授 西安
邓长生教授 武汉
董蕾教授 西安
杜群研究员 广州
樊红副教授 南京
范建高教授 上海
范志宁主任医师 南京
房静远教授 上海
傅春彬主任医师 吉林
高成新教授 上海
高春芳研究员 上海
高峰教授 西安
高润平教授 长春
戈之铮教授 上海
龚国忠教授 长沙
龚建平教授 重庆
谷俊朝主任医师 北京
关玉盘教授 北京
管冬元副教授 上海
郭克建教授 沈阳
郭晓钟教授 沈阳
郭新宁教授 银川
韩天权教授 上海

郝俊鸣副主任医师 北京
何超教授 杭州
何裕隆教授 广州
何振平教授 重庆
洪天配教授 北京
侯晓华教授 武汉
黄恒青主任医师 福州
黄金华副教授 广州
黄晓东副主任医师 武汉
黄颖秋教授 本溪
黄裕新教授 西安
黄志勇副教授 武汉
季国忠副教授 南京
季加孚教授 北京
姜慧卿教授 石家庄
蒋龙元副教授 广州
金瑞教授 北京
匡安仁教授 成都
兰平教授 广州
蓝宇教授 北京
劳绍贤教授 广州
李定国教授 上海
李东辉教授 厦门
李方儒教授 天津
李国威教授 西安
李继强教授 上海
李靖副教授 重庆
李奇林教授 广州
李涛主治医师 北京
李晓宇主任医师 北京
李延青教授 济南
李永哲副研究员 北京
李玉民教授 兰州
李增山副教授 西安
李兆申教授 上海
李志霞教授 北京
李宗芳教授 西安
梁力建教授 广州
林勇讲师 上海
刘宝瑞教授 南京
刘冰熔教授 哈尔滨
刘成海研究员 上海
刘平教授 上海
刘杞教授 重庆
刘铁夫教授 哈尔滨

世界华人消化杂志®

编辑委员会

刘正穗教授	西安	孙学英教授	哈尔滨	严律南教授	成都
刘作金副教授	重庆	邵升副教授	哈尔滨	杨冬华教授	广州
龙致贤教授	北京	谭学瑞教授	汕头	杨广顺教授	上海
鲁华玉研究员	北京	汤展宏副教授	南宁	杨建勇教授	广州
陆才德教授	宁波	唐芙爱教授	郑州	杨林副研究员	广州
陆云飞教授	南宁	唐霓副研究员	重庆	杨维良教授	哈尔滨
禄韶英主治医师	西安	唐文富主治医师	成都	杨希山教授	广州
吕明德教授	广州	唐文皓副主任医师	上海	杨云生教授	北京
吕宁主任医师	北京	唐旭东主任医师	北京	姚登福教授	南通
吕云福教授	海口	唐志鹏副研究员	上海	姚树坤教授	石家庄
马大烈教授	上海	田素礼教授	哈尔滨	伊力亚尔·夏合丁教授	乌鲁木齐
茅爱武主任医师	上海	屠红副研究员	上海	阴赅宏研究员	北京
梅林教授	北京	万德森教授	广州	于红刚副教授	武汉
孟庆华教授	北京	万军教授	北京	于健春教授	北京
宁琴教授	武汉	汪波副主任医师	北京	于颖彦教授	上海
牛建昭教授	北京	王承党副教授	福州	郁宝铭教授	上海
潘林娜教授	哈尔滨	王春友教授	武汉	喻荣彬副教授	南京
潘兴华副主任医师	昆明	王广义教授	长春	张柏和教授	上海
潘秀珍教授	福州	王吉耀教授	上海	张方信主任医师	兰州
彭波副教授	西安	王鲁副教授	上海	张吉翔教授	南昌
彭吉润主任医师	北京	王效民教授	厦门	张锦生教授	上海
彭曦副研究员	重庆	王学美研究员	北京	张军教授	西安
彭心宇教授	石河子	王正康教授	北京	张青云研究员	北京
彭志海教授	上海	王志刚副主任医师	上海	张群华教授	上海
秦波教授	重庆	王忠裕教授	大连	张水军教授	郑州
秦成勇教授	济南	卫洪波教授	广州	张绪清副教授	重庆
秦环龙教授	上海	魏经国教授	西安	张学教授	北京
秦仁义教授	武汉	魏来教授	北京	张宗明教授	北京
卿三华教授	广州	闻勤生教授	西安	赵桂珍教授	沈阳
邱双健副教授	上海	吴德全教授	哈尔滨	赵景民教授	北京
任超世研究员	天津	吴建国教授	武汉	赵连三教授	成都
任建安教授	南京	吴君主任医师	贵阳	赵平副教授	上海
任建林教授	厦门	席启主任医师	大同	郑民华教授	上海
邵成浩讲师	上海	夏建川研究员	广州	智发朝教授	广州
邵先玉教授	泰安	向德兵讲师	重庆	周伯平教授	深圳
邵永孚教授	北京	肖恩华教授	长沙	周丁华主任医师	北京
沈洪教授	南京	谢晓华副教授	广州	周士胜教授	大连
沈琳副教授	北京	徐爱民副教授	上海	周霞秋教授	上海
沈薇教授	重庆	徐存拴教授	新乡	周晓东研究员	广州
施瑞华教授	南京	徐大华副主任医师	北京	朱春兰主任医师	哈尔滨
石统东副教授	重庆	徐德忠教授	西安	朱立元教授	深圳
宋振顺教授	西安	徐列明教授	上海	朱人敏教授	南京
孙诚谊教授	贵阳	徐小元教授	北京	邹小明教授	哈尔滨
孙家邦教授	北京	许玲副教授	上海	左国营副主任药师	昆明
孙秀发教授	武汉	许文燮教授	上海		

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ●

2006年1月8日 第14卷 第1期

(总第153期)

述 评	1 AP-1和肿瘤的关系研究进展 周长春, 刘芝华, 齐军
基础 研究	6 食管鳞癌细胞分化状态对内源性光敏剂PpIX产量的影响及对PDT的应答 汲振余, 赵立群, 杨观瑞, 薛乐勋, 索振河, Jahn M. Nesland, 彭迁 12 内毒素性急性肝损伤实验动物模型的建立 刘亮明, 邓欢, 张吉翔, 罗杰 19 L02细胞建立人鼠嵌合肝动物模型 林沪, 毛青, 王宇明, 蒋业贵, 邓国宏, 李俊刚, 刘国栋 25 苦参碱对大鼠供肝冷保存再灌注损伤中肝细胞凋亡及调控基因表达的影响 朱新华, 仇毓东, 史敏科, 丁义涛 29 大黄多糖对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮细胞和外周血中性粒细胞凋亡的影响 王志鹏, 张蓉, 刘莉, 梅其炳, 刘琳娜 35 丹参对重症急性胰腺炎内皮素-1 mRNA的影响 张莹, 石承先, 黄平, 任娟娟, 李玉祥 39 鼠反义转化生长因子 β I 型受体真核表达质粒的构建与鉴定 徐丽红, 郑勇, 周婷, 李睿, 陈莹 45 肝癌组织中脱- γ -羧基凝血酶原的测定及意义 袁联文, 唐伟, 周建平, 慕内雅敏 50 绿茶多酚对实验性酒精性肝损伤大鼠的治疗作用 周晓蓉, 龚作炯, 袁光金, 张频 57 经肝动脉灌注GRGDSP联合化疗栓塞治疗大鼠肝肿瘤的机制 尹君, 梁惠民, 钱骏, 夏凤, 王勇, 邓宪波, 王伟, 冯敢生 63 肠三叶因子对内毒素诱导幼鼠肠组织NO和MDA的作用 李军, 赵亚娟, 孙梅, 潘莉莉, 高红
文 献 综 述	68 基因表达谱芯片的数据分析 吴斌, 沈自尹 75 食管癌术后胃食管反流和胃排空延迟的相关因素及处理 吴仕光, 万桂玲, 李晓娟
研 究 快 报	79 奥曲肽对肝星状细胞收缩的影响 尹凤荣, 张晓岚, 王川 83 大肠癌中IGF-2蛋白的表达及相关性研究 段琼红, 吕美霞, 卢祖洵, 聂绍发 87 肝门阻断对大鼠肠道肌间神经丛内NOS阳性神经元的影响 张军明, 任艳华, 刘芬, 雷亚宁, 张婵, 钱旭 92 幽门螺杆菌VacA重组蛋白对SGC7901胃癌细胞的作用 段秀杰, 邵世和, 阚平, 王文凯 96 β -连环素在肝癌中的表达及其与cyclin D1表达的关系 曾建平, 易继林, 李兴睿, 杨志芳, 王从俊 100 整合素 β_1 和固生蛋白Tenascin共表达与肝癌浸润转移的关系 李兴睿, 郭悦青, 易继林 104 罗格列酮对大鼠溃疡性结肠炎肠黏膜NF- κ B, ICAM-1表达的影响 周静平, 邓长生
临 床 经 验	109 腹部外科脓毒症临床救治258例 岳茂兴, 李成林, 李学彪, 刘志国, 杨鹤鸣, 姜玉峰, 张诗琳
专 家 门 诊	114 未确定型结肠炎的诊断与治疗 江学良

附 录	116 世界华人消化杂志投稿须知 121 世界华人消化杂志2006-2008年编委会成员简介
致 谢	130 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	11 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知 24 国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知 34 消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛征文通知 49 更正与说明专栏 56 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知 74 专家门诊 78 《世界华人消化杂志》发表文章配发内容通知 91 我国科技论文总数连续三年世界第五 95 首届北京地坛感染病学术会议 108 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 113 2004年度中国科技论文统计结果 115 技法与经验 129 第一届全国临床营养支持学术会议通知
封面故事	刘亮明, 邓欢, 张吉翔, 罗杰. 内毒素性急性肝损伤实验动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2006;14(1):12-18 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/12.asp
国际会议	10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006 Canadian Digestive Disease Week Conference March 4-12, 2006 www.cag-acg.org XXX pan-american congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com

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
(旬刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2006-01-08
原刊名 新消化病学杂志

名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生
编辑部主任 张海宁 英文编辑 张海宁 管鑫妍
中文编辑 潘伯荣 张海宁 管鑫妍
电子编辑 张敏 张勇 李琪

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
E-mail: wjcd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
电话: 010-85381901
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, 北京市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: 010-85381901
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

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.

2006年版版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079 邮发代号 国外代号 国内定价 广告经营许可证
CN 14-1260/R 82-262 M 4481 每期24.00元 全年864.00元 1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

January 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 1

EDITORIAL	1 Advance in relationship between activator protein 1 and tumor <i>Zhou CC, Liu ZH, Qi J</i>
BASIC RESEARCH	6 Effects of differentiation of human esophageal cancer cells on 5-aminolevulinic acid-induced endogenous protoporphyrin IX production and photodynamic therapy <i>Ji ZY, Zhao LQ, Yang GR, Xue LX, Suo ZH, Nesland JM, Peng Q</i> 12 Establishment of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in rats <i>Liu LM, Deng H, Zhang JX, Luo J</i> 19 Establishment of an animal model of tolerant rats with chimeric human livers by human L02 hepatocytes <i>Lin H, Mao Q, Wang YM, Jiang YG, Deng GH, Li JG, Liu GD</i> 25 Effects of matrine on apoptosis of hepatocytes and expression of regulating gene during cold preservation and reperfusion injury in rat donor liver <i>Zhu XH, Qiu YD, Shi MK, Ding YT</i> 29 Effects of rhubarb polysaccharides on apoptosis of colonic epithelial cells and peripheral blood polymorphonuclear neutrophils in mice with ulcerative colitis <i>Wang ZP, Zhang R, Liu L, Mei QB, Liu LN</i> 35 Effect of <i>Salviae Miltiorrhizae</i> on expression of endothelin-1 mRNA in rats with severe acute pancreatitis <i>Zhang Y, Shi CX, Huang P, Ren JJ, Li YX</i> 39 Construction and identification of rat pcDNA3.1(+)-antisense T β RI eukaryotic expressing plasmid <i>Xu LH, Zheng Y, Zhou T, Li R, Chen Y</i> 45 Quantitative measurement of des- γ -carboxy-prothrombin in cancerous and non-cancerous liver tissue and its role in hepatocellular carcinoma <i>Yuan LW, Tang W, Zhou JP, Makuuchi M</i> 50 Effects of tea polyphenols on alcoholic liver injury in rats <i>Zhou XR, Gong ZJ, Yuan GJ, Zhang P</i> 57 Mechanism of transarterial administration of GRGDSP combined with chemoembolization for treating hepatic carcinoma in rats <i>Yin J, Liang HM, Qian J, Xia F, Wang Y, Deng XB, Wang W, Feng GS</i> 63 Effects of recombinant intestinal trefoil factor on endotoxin-induced expression of nitric oxide and malondialdehyde in intestinal tissues of infant rats <i>Li J, Zhao YJ, Sun M, Pan LL, Gao H</i>
REVIEW	68 Analysis of chip data from gene expression profile <i>Wu B, Shen ZY</i> 75 Relative factors and treatment of gastroesophageal reflux and gastric emptying delay after esophageal cancer operation <i>Wu SG, Wan GL, Li XJ</i>
RAPID COMMUNICATION	79 Effect of octreotide on contraction of rat hepatic stellate cell <i>Yin FR, Zhang XL, Wang C</i> 83 Expression and significance of insulin-like growth factor 2 protein in colorectal cancer <i>Duan QH, Lv MX, Lu ZX, Nie SF</i> 87 Effects of portal triad clamping on nitric oxide synthase positive neurons in myenteric plexus

	<p>of rat intestinal tract <i>Zhang JM, Ren YH, Liu F, Lei YN, Zhang C, Qian X</i></p> <p>92 Effect of recombinant VacA protein of <i>Helicobacter pylori</i> on gastric cancer cell line SGC7901 <i>Duan XJ, Shao SH, Wen P, Wang WK</i></p> <p>96 Expression of β-catenin in hepatocellular carcinoma and its relation with cyclin D1 expression <i>Zeng JP, Yi JL, Li XR, Yang ZF, Wang CJ</i></p> <p>100 Effect of integrinβ_1 and tenascin on invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma <i>Li XR, Guo YQ, Yi JL</i></p> <p>104 Effects of rosiglitazone on expression of NF-κB and ICAM-1 in rats with ulcerative colitis <i>Zhou JP, Deng CS</i></p>
CLINICAL PRACTICE	<p>109 Clinical treatment of severe sepsis in abdominal surgery: an analysis of 258 cases <i>Yue MX, Li CL, Li XB, Liu ZG, Yang HM, Jiang YF, Zhang SL</i></p>
EXPERT OUTPATIENT SERVICE	<p>114 Diagnosis and treatment of atypical colonitis <i>Jiang XL</i></p>
APPENDIX	<p>116 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>121 Brief introduction of 2006-2008 Editorial Board of World Chinese Journal of Digestology</p>
ACKNOWLEDGMENTS	<p>130 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Liu LM, Deng H, Zhang JX, Luo J.</i> Establishment of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in rats <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2006;14(1):12-18 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/12.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net</p> <p>Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006</p> <p>Canadian Digestive Disease Week Conference March 4-12, 2006 www.cag-acg.org</p> <p>XXX pan-American congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx</p> <p>World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com</p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date January 8, 2006

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation

PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wjgd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

AP-1 和肿瘤的关系研究进展

周长春, 刘芝华, 齐军

周长春, 齐军, 中国医学科学院 中国协和医科大学 肿瘤医院 检验科 北京市 100021

刘芝华, 中国医学科学院 中国协和医科大学 肿瘤研究所 北京市 100021

周长春, 男, 1978年生, 山东菏泽人, 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院肿瘤研究所临床检验诊断学研究生, 现从事食管癌方面的研究

通讯作者: 齐军, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里17号, 中国医学科学院, 中国协和医科大学, 肿瘤医院检验科. qijun5610@126.com
电话: 010-87788448 传真: 010-67762897

收稿日期: 2005-10-14 接受日期: 2005-10-31

摘要

转录因子AP-1(activator protein 1), 主要由Jun、Fos、ATF及JDP亚家族组成, 亚家族单体以同源或异源二聚体的形式结合DNA靶序列, 参与靶基因调节. 对基因修饰小鼠和细胞的研究表明, AP-1参与细胞的正常生长和癌性转化过程, 其在细胞中的作用取决于细胞类型、AP-1的组成和各组分的相对比例, 也与刺激的种类密切相关. AP-1的活性受多种核因子调节, 同时单体间也存在相互促进或拮抗作用. AP-1对各种刺激如应激、辐射或生长信号等作出生理或病理应答, 参与细胞的增殖、分化和转化等过程, 在肿瘤的形成、转移和侵袭中发挥重要作用, 已经有学者研究通过抑制AP-1活性来发展抗肿瘤药物.

关键词: AP-1; 转录因子; 肿瘤

周长春, 刘芝华, 齐军. AP-1和肿瘤的关系研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(1):1-5

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1.asp>

0 引言

转录因子AP-1(activator protein 1)二聚体由结构和功能相关的亚家族单体组成, 这些成员均含有进化保守的bZIP结构域, 不同的单体组合稳定性有所差别. AP-1蛋白对细胞因子、生长因子、感染或致癌刺激等生理或病理信号发生应答, 通过bZIP结构域的碱性区域与DNA序列结合, 调节基因的转录, 参与细胞的增殖、分化等过程. AP-1在肿瘤形成及发展过程中, 通过促进细胞增殖、抑制分化、促进肿瘤细胞的侵袭和转移等过程发挥作用.

1 AP-1简介

1.1 AP-1的结构和功能 亮氨酸拉链(leucine zipper)又称碱性拉链(bZIP), 见于多种转录因子, 是一种重要的结构模体, 首先发现于酵母转录因子Gcn4, 由C端的亮氨酸二聚化结合区和N端的碱性DNA结合区组成^[1,2]. 亮氨酸拉链蛋白间的结合具有特异性, 该特异性取决于蛋白的非亮氨酸残基^[3]. AP-1是亮氨酸拉链蛋白, 由Jun蛋白家族(Jun, Jun-B, Jun-D)^[4-6]、Fos蛋白家族(Fos, FosB, Fra-1, Fra-2)^[7]、ATF蛋白家族(ATF- α , ATF-2, ATF-3)及JDP蛋白家族(JDP-1, JDP-2)^[8]组成. 哺乳动物中AP-1的主要成分是Jun和Fos, 其中Jun的酵母同源物是Gcn4, 二者识别相同的DNA结合序列^[9], 该同源DNA结合序列为5'-TGAG/CTCA-3', 也称TPA应答元件(TPA response element, TRE)^[10]. Jun蛋白的结构高度同源, 但是表达模式和功能不同^[11-13], 其可形成同源二聚体, 主要与AP-1家族中的Fos和Fras结合形成更稳定的异源二聚体^[14], 也可与AP-1家族外的蛋白如CREB/ATF和Maf结合, 识别被称为CRE的序列(TGACGTCA)^[15-17]. 而Fos只能和Jun形成比较稳定的异源二聚体, Fos和Jun蛋白具有某些相同的功能, 有些功能则是各自特异的^[13,18,19]. 在不同细胞中AP-1的组成不同, 受到的调节不同, 其功能也有差异^[20-23].

1.2 AP-1的调节 AP-1蛋白之间及与其他蛋白的相互作用对其生物学作用是至关重要的^[24]. AP-1的活性调节是通过多方面来完成的. 其组分的差异表达, 是对其功能最基本的调节, 其他调节包括转录调节、翻译后调节、还有和癌蛋白及辅助蛋白的相互作用对AP-1活性的调节^[25]. 单独的Jun和Fos蛋白活化潜能显著不同, Jun, Fos和Fos-B是强活化子, Jun-B, Jun-D, Fra-1和Fra-2活化潜能较弱, Jun-B需要结合多个位点去激活基因的转录^[26,27]. 在某些情况下, 后者可与Jun、Fos或Fos-B形成非活化的异源二聚体, 通过竞争与AP-1位点的结合来抑制AP-1的活性. Jun N末端激酶(JNK)是丝裂原激活的蛋白激酶超家族(MAPK)成员, 有JNK1, JNK2, JNK3三种异

■背景资料

转录因子AP-1参与细胞的正常生长和癌性转化过程, 其在细胞中的作用取决于细胞类型、AP-1的组成和各组分的相对比例, 也和刺激的种类密切相关. AP-1对各种刺激如应激、辐射或生长信号等作出生理或病理应答, 参与细胞的增殖、分化和转化等过程, 在肿瘤的形成、转移和侵袭中发挥重要作用.

■ 研究前沿

对AP-1的研究热点和重点主要集中在AP-1对靶基因转录调控机制的研究。

构体^[28]。MAPK激活JNK,使JNK从细胞核易位到胞质,并使Jun磷酸化(磷酸化位点在Ser63和Ser73),从而增加其活化潜能。JNK也可磷酸化Jun-D和ATF-2。相比而言,调节Fos活性的磷酸酶还不清楚,潜在的磷酸酶是Fos相关激酶(Fos-related kinase, FRK)^[29]、核糖体S6激酶(ribosomal S6 kinase)^[30],但是这些激酶在控制Fos活性方面的重要性及功能还需阐明。

研究表明,AP-1成员之间存在着相互促进或拮抗作用,Jun-B激活IL-4的表达,促进Th0细胞到Th2细胞的分化,而Jun-D负性调节IL-4的产生及Th0细胞向Th2细胞的分化^[31];某些肿瘤抑制因子如menin可以通过和Jun-D结合后抑制其转录活性来抑制Jun-D的促生长作用^[25]。AP-1有多种通路可以调节P53的活性,但在某些情况下,P53也可诱导AP-1家族成员如Fos的表达^[32],表明P53和AP-1的活性可以互相调节。

2 AP-1与细胞增殖和分化

AP-1参与肝脏细胞、角化细胞、淋巴细胞及成骨细胞等的增殖和分化^[32,33]。在野生型小鼠中,Jun的诱导表达发生在新生小鼠的肝脏细胞,而且该时期的肝脏显著增大^[33,34],特异性剔除围产期小鼠肝脏细胞的Jun会致肝脏细胞增殖水平降低,或者发生肝脏部分切除后再生障碍^[35]。缺乏Jun的角化细胞发生严重的增殖缺陷,不仅可以通过EGFP或者HB-EGF来缓解,还可以通过其他自分泌或旁分泌生长因子如转化生长因子 α (TGF- α)、角化细胞生长因子(KGF)和GM-CSF来完成,表明AP-1可以通过自分泌和旁分泌方式来调节角化细胞增殖^[36,37]。

过表达Fos的转基因小鼠实验证明,AP-1家族主要是Fos家族在骨形成细胞中起重要作用,Fos的外源表达能够使cyclin D和cyclin E的表达失调和cyclin A/E CDK2的活性改变,加速S期的进入,促进骨源和软骨源的肿瘤形成,这暗示Fos在体内参与骨及软骨的形成^[38]。体内研究数据表明,Jun-B可以通过直接激活cyclin A的转录来促进成骨细胞和成软骨细胞生长^[39]。患骨骼石化症的动物Fos缺陷,缺乏破骨细胞,该病的表型可以通过Fra-1转基因部分缓解或者通过基因敲入技术得以彻底缓解,而在破骨细胞中Fra-1是Fos的靶基因,说明Fos也参与破骨细胞的形成。破骨细胞中Fos表达是通过NF- κ B受体活化子的配体(RANKL)结合其RANK受体后诱导的,这会募集TNF受体相关因子(TRAF)家族蛋白,后者能够

活化包括JNK在内的MAPK通路^[40]。在淋巴细胞的增殖和分化中,Jun-B和Jun-D具有双重功能,Jun-D缺失时,淋巴细胞的增殖得以加强^[31]。过表达Jun-B或Jun-D的转基因小鼠淋巴系来源的细胞对丝裂原刺激应答较弱^[31,41],过表达Jun-B的小鼠成纤维细胞增殖能力降低,而Jun-D缺陷的永生化成纤维细胞增殖增加^[27,42],说明Jun-B和Jun-D是细胞增殖的负调节因子。使用基因敲入及转基因互补的方法,用Jun-B替代Jun,逆转了增殖缺陷,在成纤维细胞中与Jun缺失相关的P53和cyclin D与p21^{Cip}的表达调节相拮抗^[43],表明在Jun缺失的情况下,Jun-B能够作为一个正性生长调节因子,其抗增殖活性需要形成具有生长抑制活性的Jun-Jun-B二聚体。Jun-D在初始及成熟成纤维细胞增殖中分别发挥促进和抑制作用,说明Jun-D在细胞增殖过程中的作用取决于细胞类型^[27,42]。

3 AP-1与细胞凋亡

AP-1家族中的Jun蛋白增强一些参与细胞应激诱导凋亡靶基因的转录激活。在Jun的促凋亡靶基因中,很多都编码FasL和肿瘤坏死因子 α (TNF- α),二者都有AP-1的结合位点。由Fos、Jun-D及Jun组成的AP-1二聚体与光诱导的视网膜细胞凋亡相关^[44]。Jun和Fos均结合人Fas启动子,其中Jun是Fas转录的强有力的活化因子,但是Fos削弱Jun介导的活化^[45]。由于FasL启动子区中的一转录抑制元件组成性结合Fos而不是Jun,所以Fos也可能负性调节FasL的表达。与Fos相比而言,FosB和Jun组成的复合物与TCR/CD3介导的对FasL表达的诱导及活化诱导的T细胞死亡(activation induced cell death, AICD)相关^[46]。小脑粒状神经元细胞在无生长因子存在时对凋亡的刺激依赖于JNK/Jun活性^[47],而且表达Jun负显性突变体的细胞Bim的表达降低,抑制线粒体细胞色素C的释放^[48],说明JNK/Jun活化在应激诱导的线粒体凋亡途径中发挥作用。神经系统细胞Jun缺失表达的突变鼠分析表明,运动神经元由于凋亡的减少会发生增生^[49]。Fos^{-/-} P53^{-/-}双敲除小鼠发生高增殖和侵袭性横纹肌肉瘤,该肿瘤在P53^{-/-}中很少见,在已建系的肿瘤细胞中再表达Fos可增强凋亡,这暗示Fos可与P53联合作用通过正性调节凋亡诱导基因或抑制存活基因来发挥抗肿瘤作用^[50]。

AP-1除了可以促进凋亡还可以抑制凋亡,例如Fos表达在海马红藻氨酸诱导的癫痫发作

中与神经细胞死亡成负相关^[57], 表明Fos蛋白在该环节中起抗凋亡作用。在鼠生长中的胎肝细胞中, Jun对预防凋亡是必须的, 而AP-1家族的其他成员如Fos、FosB和Jun-D并不是必须的。由于胎肝细胞需要Jun以使细胞存活, 而已分化肝细胞的细胞周期进展需要Jun, Jun在细胞中的确切功能取决于细胞的分化状态^[11]。在角化细胞和脊索细胞中, Jun缺失导致凋亡增强^[52]。在鼠成纤维细胞中Jun可通过抑制P53结合其靶基因p21^{Cip}的启动子区来调节P53的功能^[53], 最近表明JDP-2(新的AP-1成员)可通过抑制P53转录水平的表达来保护成纤维细胞对UV刺激引发的凋亡^[54], 这说明Jun-JDP-2二聚体的形成对在UV处理的成纤维细胞和其他种类细胞中削减P53的功能是至关重要的。

4 AP-1与肿瘤的侵袭和转移

AP-1调节的很多靶基因产物参与肿瘤细胞侵袭, 该过程需要降解细胞外基质成分以促使血管形成及细胞迁徙。AP-1中主要是c-Fos和Fos调节基质金属蛋白酶如MMP-3和MMP-1的表达^[55], 及尿激酶纤溶酶原活化物(uPA)系统蛋白酶的表达, 另外在成纤维细胞中Jun-B和c-Jun也通过活化增殖蛋白与血管生成因子的调节。AP-1同样调节MMP-1、MMP-3^[55]、MMP-2^[56]、CD44^[57]、组织蛋白酶L及MTS1^[58]等肿瘤转移相关因子。肿瘤侵袭和转移性生长的显著特点是形态上从上皮到间皮的转变和细胞极性的丧失^[59,60], Jun和Fos参与该过程, 且c-Fos在肿瘤形成的后期作用似乎更大些^[59]。

最近的研究表明, 很多药物的抗肿瘤活性, 是通过AP-1来实现的。Nobiletin(一种柑桔增味物)在HT-29人结肠直肠癌中通过降低AP-1的DNA结合活性下调MMP-7的表达^[61]; Ascochlorin(提取自真菌的抗肿瘤药物)通过ERK1/2信号通路抑制AP-1介导的基因表达, 抑制MMP-9的表达^[62]; 多酚介导的AP-1活性抑制可以通过阻止血管生成和肿瘤侵袭来延缓肿瘤的生长, 在几种动物试验中, 绿茶多酚已经表现出对肿瘤生长和转移的抑制作用^[63]。大豆中的染料木黄酮通过抑制NF- κ B和AP-1活性来抑制uPA的分泌, 进而抑制乳腺癌细胞的迁徙和浸润^[64]。人绒毛膜促性腺激素在乳腺癌MCF-7细胞中通过下调NF- κ B和AP-1来发挥抗增殖和抗侵袭作用, 从而在妊娠妇女中诱导保护作用^[65]。这些结果提示我们可以通过抑制AP-1, 进而抑制其调

节的侵袭和转移相关基因表达来发展抗肿瘤药物。

5 AP-1与细胞周期调控

Jun和Fos是在哺乳动物细胞中作为逆转录病毒癌蛋白的同源物被发现的, 而且生长因子和肿瘤促动子可以诱导AP-1活性, 这将AP-1同细胞生长控制和肿瘤形成联系起来^[53]。AP-1对细胞生长的控制似乎主要是由其其对细胞周期调控子如cyclin D、cyclin A、P53、p21^{Cip}、p16^{INK4a}和p19^{Arf}的调控来实现的^[66]。AP-1对细胞周期的促进或者抑制作用与细胞中AP-1各组分比例有关, 也取决于细胞类型及所处的微环境。在软骨细胞和成骨细胞中Jun-B和ATF-2调节cyclin A的表达, 而在软骨细胞中, Fos对细胞周期素A和E的表达是必须的^[33], 另外ATF-2在软骨细胞和成骨细胞中也参与对细胞周期素D1的调节。在乳腺癌细胞中阻断AP-1表达将抑制G1细胞周期素的表达, 导致细胞周期阻滞, 并降低CDK活性, 研究表明TAM67(C-Jun的负显性突变体)抑制乳腺癌细胞生长主要通过诱导P27等CDK的抑制物, 通过诱导参与G1-S期转化的细胞周期素的表达来实现的, 这为将来发展治疗的新药及乳腺癌的治疗奠定了基础^[67]。

AP-1参与肿瘤的形成、侵袭和转移等生物学过程, AP-1家族的不同成员在上述过程中存在交叉或者拮抗作用。目前对AP-1成员单独调控的靶基因了解还不多, 更多靶基因的发现将有助于研究AP-1在体内作用作用的精确机制, 也会为肿瘤治疗提供新的方向。

6 参考文献

- 1 Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 1988; 240: 1759-1764
- 2 Glover JN, Harrison SC. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 1995; 373: 257-261
- 3 Alber T. Structure of the leucine zipper. *Curr Opin Genet Dev* 1992; 2: 205-210
- 4 Ryder K, Lanahan A, Perez-Albuern E, Nathans D. jun-D: a third member of the jun gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 1500-1503
- 5 Hartl M, Hutchins JT, Vogt PK. The chicken junD gene and its product. *Oncogene* 1991; 6: 1623-1631
- 6 Hirai SI, Ryseck RP, Mechta F, Bravo R, Yaniv M. Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family. *EMBO J* 1989; 8: 1433-1439
- 7 Nishina H, Sato H, Suzuki T, Sato M, Iba H. Isolation and characterization of fra-2, an additional member of the fos gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3619-3623
- 8 Aronheim A, Zandi E, Hennemann H, Elledge SJ, Karin M. Isolation of an AP-1 repressor by a novel

■创新盘点

本文与其他相关文章的不同点在于本文注重AP-1在肿瘤的发生、发展过程中的作用。对近年来通过AP-1途径抑制肿瘤的报导进行了总结, 发现已经有学者通过调节AP-1活性来研究和发发展抗肿瘤药物。

■应用要点

本文对肿瘤发生发展过程各个阶段中涉及AP-1的方面进行了综述,使读者对AP-1在肿瘤发生过程中的作用和相关机制有一个初步的了解。

- method for detecting protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 3094-3102
- 9 Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072: 129-157
- 10 Angel P, Imagawa M, Chiu R, Stein B, Imbra RJ, Rahmsdorf HJ, Jonat C, Herrlich P, Karin M. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 1987; 49: 729-739
- 11 Mechta-Grigoriou F, Gerald D, Yaniv M. The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene* 2001; 20: 2378-2389
- 12 Johnson RS, van Lingen B, Papaioannou VE, Spiegelman BM. A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev* 1993; 7: 1309-1317
- 13 Thepot D, Weitzman JB, Barra J, Segretain D, Stinnakre MG, Babinet C, Yaniv M. Targeted disruption of the murine junD gene results in multiple defects in male reproductive function. *Development* 2000; 127: 143-153
- 14 Allegretto EA, Smeal T, Angel P, Spiegelman BM, Karin M. DNA-binding activity of Jun is increased through its interaction with Fos. *J Cell Biochem* 1990; 42: 193-206
- 15 Cohen DR, Ferreira PC, Gentz R, Franza BR Jr, Curran T. The product of a fos-related gene, fra-1, binds cooperatively to the AP-1 site with Jun: transcription factor AP-1 is comprised of multiple protein complexes. *Genes Dev* 1989; 3: 173-184
- 16 Chatton B, Bocco JL, Gaire M, Hauss C, Reimund B, Goetz J, Kedinger C. Transcriptional activation by the adenovirus larger E1a product is mediated by members of the cellular transcription factor ATF family which can directly associate with E1a. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 561-670
- 17 Hai T, Curran T. Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 3720-3724
- 18 Schorpp-Kistner M, Wang ZQ, Angel P, Wagner EF. JunB is essential for mammalian placentation. *EMBO J* 1999; 18: 934-948
- 19 Schreiber M, Wang ZQ, Jochum W, Fetka I, Elliott C, Wagner EF. Placental vascularisation requires the AP-1 component fra1. *Development* 2000; 127: 4937-4948
- 20 Kovary K, Bravo R. Existence of different Fos/Jun complexes during the G0-to-G1 transition and during exponential growth in mouse fibroblasts: differential role of Fos proteins. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 5015-5023
- 21 Lallemand D, Spyrou G, Yaniv M, Pfarr CM. Variations in Jun and Fos protein expression and AP-1 activity in cycling, resting and stimulated fibroblasts. *Oncogene* 1997; 14: 819-830
- 22 McCabe LR, Kockx M, Lian J, Stein J, Stein G. Selective expression of fos- and jun-related genes during osteoblast proliferation and differentiation. *Exp Cell Res* 1995; 218: 255-262
- 23 Sonnenberg JL, Macgregor-Leon PF, Curran T, Morgan JI. Dynamic alterations occur in the levels and composition of transcription factor AP-1 complexes after seizure. *Neuron* 1989; 3: 359-365
- 24 Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A. Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 2001; 20: 2476-2489
- 25 Agarwal SK, Guru SC, Heppner C, Erdos MR, Collins RM, Park SY, Saggar S, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Marx SJ, Burns AL. Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell* 1999; 96: 143-152
- 26 Deng T, Karin M. JunB differs from c-Jun in its DNA-binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev* 1993; 7: 479-490
- 27 Passegue E, Wagner EF. JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression. *EMBO J* 2000; 19: 2969-2979
- 28 Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103: 239-252
- 29 Deng T, Karin M. c-Fos transcriptional activity stimulated by H-Ras-activated protein kinase distinct from JNK and ERK. *Nature* 1994; 371: 171-175
- 30 Chen RH, Abate C, Blenis J. Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10952-10956
- 31 Meixner A, Karreth F, Kenner L, Wagner EF. JunD regulates lymphocyte proliferation and T helper cell cytokine expression. *EMBO J* 2004; 23: 1325-1335
- 32 Elkeles A, Juven-Gershon T, Israeli D, Wilder S, Zalcenstein A, Oren M. The c-fos proto-oncogene is a target for transactivation by the p53 tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 2594-2600
- 33 Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 2004; 117: 5965-5973
- 34 Eferl R, Sibilina M, Hilberg F, Fuchsichler A, Kufferath I, Guertl B, Zenz R, Wagner EF, Zatloukal K. Functions of c-Jun in liver and heart development. *J Cell Biol* 1999; 145: 1049-1061
- 35 Behrens A, Sibilina M, David JP, Mohle-Steinlein U, Tronche F, Schutz G, Wagner EF. Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J* 2002; 21: 1782-1790
- 36 Li G, Gustafson-Brown C, Hanks SK, Nason K, Arbeit JM, Pogliano K, Wisdom RM, Johnson RS. c-Jun is essential for organization of the epidermal leading edge. *Dev Cell* 2003; 4: 865-877
- 37 Zenz R, Scheuch H, Martin P, Frank C, Eferl R, Kenner L, Sibilina M, Wagner EF. c-Jun regulates eyelid closure and skin tumor development through EGFR signaling. *Dev Cell* 2003; 4: 879-889
- 38 Andrecht S, Kolbus A, Hartenstein B, Angel P, Schorpp-Kistner M. Cell cycle promoting activity of JunB through cyclin A activation. *J Biol Chem* 2002; 277: 35961-35968
- 39 Matsuo K, Owens JM, Tonko M, Elliott C, Chambers TJ, Wagner EF. Fos11 is a transcriptional target of c-Fos during osteoclast differentiation. *Nat Genet* 2000; 24: 184-187
- 40 Wagner EF. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: ii40-42
- 41 Szremska AP, Kenner L, Weisz E, Ott RG, Passegue E, Artwohl M, Freissmuth M, Stoxreiter R, Theussl HC, Parzer SB, Moriggl R, Wagner EF, Sexl V. JunB inhibits proliferation and transformation in B-lymphoid cells. *Blood* 2003; 102: 4159-4165
- 42 Weitzman JB, Fiette L, Matsuo K, Yaniv M. JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis. *Mol Cell* 2000; 6: 1109-1119
- 43 Passegue E, Jochum W, Behrens A, Ricci R, Wagner

- EF. JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation. *Nat Genet* 2002; 30: 158-166
- 44 Herdegen T, Skene P, Bahr M. The c-Jun transcription factor-bipotential mediator of neuronal death, survival and regeneration. *Trends Neurosci* 1997; 20: 227-231
- 45 Lasham A, Lindridge E, Rudert F, Onrust R, Watson J. Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene* 2000; 252: 1-13
- 46 Baumann S, Hess J, Eichhorst ST, Krueger A, Angel P, Krammer PH, Kirchhoff S. An unexpected role for FosB in activation-induced cell death of T cells. *Oncogene* 2003; 22: 1333-1339
- 47 Lei K, Nimnual A, Zong WX, Kennedy NJ, Flavell RA, Thompson CB, Bar-Sagi D, Davis RJ. The Bax subfamily of Bcl2-related proteins is essential for apoptotic signal transduction by c-Jun NH(2)-terminal kinase. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 4929-4942
- 48 Bouillet P, Strasser A. BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 2002; 115: 1567-1574
- 49 Raivich G, Bohatschek M, Da Costa C, Iwata O, Galiano M, Hristova M, Nateri AS, Makwana M, Riera-Sans L, Wolfer DP, Lipp HP, Aguzzi A, Wagner EF, Behrens A. The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron* 2004; 43: 57-67
- 50 Kalra N, Kumar V. c-Fos is a mediator of the c-myc-induced apoptotic signaling in serum-deprived hepatoma cells via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2004; 279: 25313-25319
- 51 Zhang J, Zhang D, McQuade JS, Behbehani M, Tsien JZ, Xu M. c-fos regulates neuronal excitability and survival. *Nat Genet* 2002; 30: 416-420
- 52 Behrens A, Haigh J, Mechta-Grigoriou F, Nagy A, Yaniv M, Wagner EF. Impaired intervertebral disc formation in the absence of Jun. *Development* 2003; 130: 103-109
- 53 Vogt PK. Jun, the oncoprotein. *Oncogene* 2001; 20: 2365-2377
- 54 Piu F, Aronheim A, Katz S, Karin M. AP-1 repressor protein JDP-2: inhibition of UV-mediated apoptosis through p53 down-regulation. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3012-3024
- 55 Hu E, Mueller E, Oliviero S, Papaioannou VE, Johnson R, Spiegelman BM. Targeted disruption of the c-fos gene demonstrates c-fos-dependent and -independent pathways for gene expression stimulated by growth factors or oncogenes. *EMBO J* 1994; 13: 3094-3103
- 56 Hong IK, Kim YM, Jeoung DI, Kim KC, Lee H. Tetraspanin CD9 induces MMP-2 expression by activating p38 MAPK, JNK and c-Jun pathways in human melanoma cells. *Exp Mol Med* 2005; 37: 230-239
- 57 Lamb RF, Hennigan RF, Turnbull K, Katsanakis KD, MacKenzie ED, Birnie GD, Ozanne BW. AP-1-mediated invasion requires increased expression of the hyaluronan receptor CD44. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 963-976
- 58 Hennigan RF, Hawker KL, Ozanne BW. Fos-transformation activates genes associated with invasion. *Oncogene* 1994; 9: 3591-3600
- 59 Reichmann E, Schwarz H, Deiner EM, Leitner I, Eilers M, Berger J, Busslinger M, Beug H. Activation of an inducible c-FosER fusion protein causes loss of epithelial polarity and triggers epithelial-fibroblastoid cell conversion. *Cell* 1992; 71: 1103-1116
- 60 Fialka I, Schwarz H, Reichmann E, Oft M, Busslinger M, Beug H. The estrogen-dependent c-JunER protein causes a reversible loss of mammary epithelial cell polarity involving a destabilization of adherens junctions. *J Cell Biol* 1996; 132: 1115-1132
- 61 Kawabata K, Murakami A, Ohigashi H. Nobiletin, a citrus flavonoid, down-regulates matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) expression in HT-29 human colorectal cancer cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69: 307-314
- 62 Hong S, Park KK, Magae J, Ando K, Lee TS, Kwon TK, Kwak JY, Kim CH, Chang YC. Ascochlorin inhibits matrix metalloproteinase-9 expression by suppressing activator protein-1-mediated gene expression through the ERK1/2 signaling pathway: inhibitory effects of ascochlorin on the invasion of renal carcinoma cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 25202-25209
- 63 McCarty MF. Polyphenol-mediated inhibition of AP-1 transactivating activity may slow cancer growth by impeding angiogenesis and tumor invasiveness. *Med Hypotheses* 1998; 50: 511-514
- 64 Valachovicova T, Slivova V, Bergman H, Shuherk J, Sliva D. Soy isoflavones suppress invasiveness of breast cancer cells by the inhibition of NF-kappaB/AP-1-dependent and -independent pathways. *Int J Oncol* 2004; 25: 1389-1395
- 65 Rao ChV, Li X, Manna SK, Lei ZM, Aggarwal BB. Human chorionic gonadotropin decreases proliferation and invasion of breast cancer MCF-7 cells by inhibiting NF-kappaB and AP-1 activation. *J Biol Chem* 2004; 279: 25503-25510
- 66 Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 859-868
- 67 Liu Y, Lu C, Shen Q, Munoz-Medellin D, Kim H, Brown PH. AP-1 blockade in breast cancer cells causes cell cycle arrest by suppressing G1 cyclin expression and reducing cyclin-dependent kinase activity. *Oncogene* 2004; 23: 8238-8246

■ 名词解释

MMP: 该酶家族中大多以无活性的前体分泌, 被细胞外蛋白酶切割后激活, 参与正常生理过程如胚胎发生、生殖和组织重塑, 也和关节炎和肿瘤的转移相关。

Cyclin: 其蛋白结构上存在能与CDK催化亚单位结合激活的特定结构域, 除了激活相应的CDK外, 还可加强CDK对特定底物的作用。

P53: 细胞生长周期中的负调控因子, 与细胞周期的调控、DNA修复、细胞分化、细胞凋亡等重要的生物学功能有关, p53基因的突变或缺失已经被证实是许多肿瘤发生的原因之一。

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

食管鳞癌细胞分化状态对内源性光敏剂 PpIX 产量的影响及对 PDT 的应答

汲振余, 赵立群, 杨观瑞, 薛乐勋, 索振河, Jahn M. Nesland, 彭迁

■背景资料

PDT是近20 a来应用于浅表肿瘤临床治疗的一种非手术替代疗法,在某些生物学性状如皮肤肿瘤和癌前病变的临床已成为常规性治疗措施,但在另一些领域仍是空白。影响PDT疗效的因素很多,除光敏剂、光及分子氧以外,肿瘤细胞的生物学性状以及某些凋亡相关基因的表达活性也可能影响PDT效果。理解PDT效应的确切机制及如何增强PDT临床治疗效果是当前PDT研究中的重点。以往的研究报道提示肿瘤细胞的不同分化状态能造成不同的细胞内光敏剂产生水平和累积水平,进而造成PDT效应的差异。本研究应用高、低分化的食管鳞癌细胞系,以ALA作为光敏剂,研究食管鳞癌细胞分化状态对内源性光敏剂PpIX产量的影响及对PDT的应答。

汲振余, 赵立群, 杨观瑞, 郑州大学医学院河南省医学科学研究所 河南省郑州市 450052

汲振余, 索振河, Jahn M. Nesland, 彭迁, 挪威国立肿瘤医院肿瘤研究所 奥斯陆 0310 挪威

薛乐勋, 郑州大学医学院分子医学重点实验室 河南省郑州市 450052

汲振余, 男, 1965-08-13生, 山东省莒南县人, 2003年郑州大学博士, 副研究员, 主要从事肿瘤分子生物学研究。

211工程重点建设项目, 教重办No. 2002-2

通讯作者: 杨观瑞, 450052, 河南省郑州市, 郑州大学医学院河南省医学科学研究所. yangguanrui@yahoo.com.cn

电话: 0371-66912679 传真: 0371-66912679

收稿日期: 2005-09-03 接受日期: 2005-09-30

Effects of differentiation of human esophageal cancer cells on 5-aminolevulinic acid-induced endogenous protoporphyrin IX production and photodynamic therapy

Zhen-Yu Ji, Li-Qun Zhao, Guan-Rui Yang, Le-Xun Xue, Zhen-He Suo, Jahn M. Nesland, Qian Peng

Zhen-Yu Ji, Li-Qun Zhao, Guan-Rui Yang, Henan Institute of Medical Sciences, Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Zhen-Yu Ji, Zhen-He Suo, Jahn M. Nesland, Qian Peng, the Norwegian Radium Hospital, University of Oslo, Oslo 0310, Norway

Le-Xun Xue, Key Laboratory of Molecular Medicine, Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China

Supported by the Key Item in "211 Project", EMC No. 2002-2
Correspondence to: Dr. Guan-Rui Yang, Institute of Medical Sciences, Medical College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China. yangguanrui@yahoo.com.cn

Received: 2005-09-03 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To explore the effects of differentiation on 5-aminolevulinic acid (5-ALA)-derived endogenous protoporphyrin IX (PpIX) production and photodynamic therapy (PDT) in human esophageal cancer.

METHODS: Well differentiated KYSE-450 and poorly differentiated KYSE-70 cell lines were used in this study. Intracellular PpIX production after incubation with various concentrations of

ALA was quantified with spectrofluorometry. Moreover, Cell survival after ALA-PDT with different light doses of red light (> 600 nm) and blue light (450 nm) was determined by MTS assay. The apoptosis of the cells after ALA-PDT were detected by flow cytometry with TdT staining as well as fluorescent microscopy with Hoechst 33342 staining.

RESULTS: KYSE-450 cells had a higher PpIX production than KYSE-70 did, and a significant difference was found when the ALA concentration was reached above 0.5 mmol/L (315.2 ± 88.3 vs 156.9 ± 79.2 , $P < 0.05$). However, the sensitivity of the well-differentiated cells to ALA-PDT was lower than that of the poorly-differentiated ones. Cell viability assay showed a significant difference between KYSE-450 and KYSE-70 cells when the red light of 3.6 J/cm^2 and blue light of 0.16 J/cm^2 were employed (red light: $88.0 \pm 7.4\%$ vs $25.2 \pm 4.9\%$, $P < 0.01$; blue light: $97.4\% \pm 7.3$ vs $40.8 \pm 4.2\%$, $P < 0.01$). The apoptotic rate of KYSE-450 cells (12.5%) was lower than that of KYSE-70 cells (23.2%), and necrosis was the main death style for both kinds of cells.

CONCLUSION: The differentiation of esophageal cancer cells can affect the synthesis and accumulation of ALA-induced endogenous PpIX. The efficacy of ALA-PDT don't just depended on the amount of intracellular PpIX, and the well-differentiated cells with more PpIX production are more resistant to ALA-PDT than the poorly-differentiated cells with less PpIX production.

Key Words: Esophageal cancer; Cell differentiation; Photodynamic therapy; Aminolevulinic acid; Protoporphyrin IX

Ji ZY, Zhao LQ, Yang GR, Xue LX, Suo ZH, Nesland JM, Peng Q. Effects of differentiation of human esophageal cancer cells on 5-aminolevulinic acid-induced endogenous protoporphyrin IX production and photodynamic therapy. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):6-11

摘要

目的: 研究食管癌细胞的分化状态对ALA产

生的内源性光敏剂PpIX累积水平的影响, 及对PDT的应答敏感程度.

方法: 以高分化食管鳞癌细胞KYSE-450和低分化食管鳞癌细胞KYSE-70为研究对象, 利用荧光分光光度法测定不同浓度ALA处理后细胞内PpIX的浓度; 分别使用不同剂量的红光和蓝光对细胞进行照射处理, MTS法测定PDT对细胞的光毒毒性; TdT-流式细胞法测定PDT诱导的凋亡水平, 并观察凋亡细胞的胞核形态.

结果: 高分化KYSE-450细胞比低分化KYSE-70细胞具有更强的PpIX合成或累积水平, 两者PpIX绝对浓度值在高于0.5 mmol/L ALA时差异显著(315.2 ± 88.3 vs 156.9 ± 79.2 , $P < 0.05$); 虽然高分化细胞PpIX产量高于低分化细胞, 但无论是红光PDT还是蓝光PDT, 其敏感性均明显差于低分化细胞, 光剂量为 3.6 J/cm^2 (红光)和 0.16 J/cm^2 (蓝光)时, 两者细胞存活率有极显著差异(88.0 ± 7.4 vs 25.2 ± 4.9 , 红光; 97.4 ± 7.3 vs 40.8 ± 4.2 , 蓝光; $P < 0.01$); KYSE-450凋亡率(12.5%)亦低于KYSE-70(23.2%), 细胞主要以坏死方式为主.

结论: 食管鳞癌细胞的分化影响了内源性光敏剂PpIX的细胞内水平; PDT效应并不单纯依赖于细胞内的光敏剂含量, 细胞的生物学特征如分化状态也影响了PDT的效果; 高分化细胞部分通过抑制凋亡抵制了PDT作用.

关键词: 食管癌; 细胞分化; 光动力学疗法; 氨基乙酰丙酸; 原卟啉IX

汲振余, 赵立群, 杨观瑞, 薛乐勋, 索振河, Jahn M. Nesland, 彭迁. 食管鳞癌细胞分化状态对内源性光敏剂PpIX产量的影响及对PDT的应答. 世界华人消化杂志 2006;14(1):6-11
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/6.asp>

0 引言

光动力学疗法(photodynamic therapy, PDT)用于浅表肿瘤的治疗已20 a^[1]. Photofrin, 5-氨基乙酰丙酸(5-ALA)和他的脂性衍生物(Metvix和Hexvix)及m-THPC(m-Tetra (hydroxyphenyl) chlorin, 商品名Foscan)已进入临床^[2-6]. PDT应用可以选择性存积于肿瘤细胞内的光敏剂, 经一定波长的可见光激发后, 产生单态氧($^1\text{O}_2$)和自由基等活性物质, 使生物大分子如蛋白质, 脂肪酸等产生不可逆氧化, 导致亚细胞结构与功能的损害, 引起细胞凋亡或坏死^[7-10]. 虽然以ALA为光敏剂前体物的PDT(ALA-PDT)已经用于食管癌及癌前病

变的, 但其具体杀伤机制还不十分清楚, 而且许多因素能影响PDT的效果. 这些因素除了光敏剂, 所选用的光及氧分子以外, 还包括肿瘤细胞的生物学性状和细胞内某些促/抑凋亡基因的表达活性等^[2,11]. 由于不同分化状态的肿瘤细胞内源性光敏剂原卟啉IX(protoporphyrin IX, PpIX)的合成过程中的一些代谢酶活性可存在差异, 因而有可能影响到光敏剂在肿瘤细胞内的水平, 并可能导致对PDT的不同反应^[12-14]. 我们应用高分化和低分化的食管鳞状细胞癌细胞系, 研究细胞内产生内源性光敏剂的效率及对PDT的应答水平, 以期临床提供指导.

1 材料和方法

1.1 材料 高分化食管鳞癌细胞KYSE-450和低分化食管鳞癌细胞KYSE-70由美国ATCC提供. 5-ALA和PpIX由PhotoCure ASA(挪威)提供. 荧光分光光度计为LS-5型(Perkin Elmer). PDT光辐射仪为PCI Biotech公司(挪威)生产. TdT酶为Roche公司生产, 链霉素-FITC荧光信号反应液为Amersham LifeScience产品. Bradford BCA蛋白质测定试剂盒购自Pierce公司. 流式细胞仪为BD FACSDiVa Option(BD Biosciences公司, 美国). 荧光显微镜为Nikon Eclips E800, 附带-60℃高分辨率CCD成像设备. MTS为Promega产品, RPMI 1640培养液及其他试剂均购自Sigma.

1.2 方法 生长至80%左右融合的KYSE-450和KYSE-70细胞用胰蛋白酶-EDTA消化, 接种 4×10^5 个细胞至6孔培养板, 37℃ 50 mL/L CO_2 培养箱培养过夜, 使细胞充分贴壁. 次日用含不同浓度ALA的无血清RPMI 1640液孵育4 h, PBS洗2次后加入卟啉抽提溶液(1 mol/L高氯酸/甲醇, 1:1)1 mL, 37℃孵育30 min后收获细胞, 1 400 r/min离心5 min, 荧光分光光度计测定上清液荧光光密度值(激发波长405 nm, 发射波长603 nm), 并加入适量已知浓度的PpIX标准, 使荧光光密度值增大至原来的1-1.5倍, 按此校正值计算PpIX浓度. 以上操作须避光进行, 所有试验均设3个平行孔, 至少2次重复试验. 使用Bradford方法(BCA试剂盒)测定蛋白质浓度, 细胞除不加ALA外, 其他处理方法同上. 细胞收获后2 800 r/min离心10 min, 细胞沉淀用100 μL 裂解液(含20 mmol/L Tris-HCl pH 7.2, 4 g/L SDS, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L EGTA, 10 mmol/L焦磷酸盐)悬浮, 冰上30 min后超声处理25 s, 按试剂盒说明操作, 计算总蛋白量.

■应用要点

该研究结果对解释不同临床患者的不同PDT疗效甚至预示PDT预后具有指导意义.

■ 相关报道

- 1 Ortel B, Chen N, Brissette J, Dotto GP, Maytin E, Hasan T. Differentiation-specific increase in ALA-induced protoporphyrin IX accumulation in primary mouse keratinocytes. *Br J Cancer* 1998; 77: 1744-1751
- 2 Krieg RC, Fickweiler S, Wolfbeis OS, Knuechel R. Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer *in vitro*. *Photochem Photobiol* 2000; 72: 226-233

1.2.1 PDT处理及细胞存活率测定 KYSE-450和KYSE-70细胞按 1.6×10^4 个细胞/孔接种到96孔培养板, 次日用含1 mmol/L ALA的无血清RPMI 1640液孵育细胞4 h后, 立即PDT处理. 为与临床一致, 我们采用可见红光(波长600 nm以上)照射, 光剂量设定0.45, 0.9, 1.8, 3.6, 7.2, 14.4 J/cm², 并设无光照射和无ALA空白对照. 处理完毕立即更换新鲜含100 mL/L小牛血清的培养液, 37°C 50 mL/L CO₂培养箱孵育24 h. 然后每孔加入MTS液20 μL, 37°C 1 h, 测定490 nm处的吸光度值. 所有试验均设6个平行孔, 至少重复2次. 以无ALA但用相同光剂量处理的对照孔设置为100%, 其他试验孔以此为对照计算细胞存活率(%). 蓝光PDT处理方法同上, 使用光剂量为0.08, 0.16, 0.32, 0.48 J/cm², 光波长为450 nm.

1.2.2 细胞凋亡的检测 TdT法测定细胞凋亡率. 接种 4×10^5 个细胞至6孔培养板, 1 mmol/L ALA处理4 h, 1.8 J/cm²光剂量PDT, 收获细胞, 纯甲醇固定, -20°C储存待测. 测前PBS洗涤, 离心, 细胞沉淀加入TdT反应液(含80 U TdT, 1.5 mmol/L CoCl₂, 0.5 nmol/L Biotin-16-dUTP, 0.1 mmol/L DTT)50 μL, 37°C孵育30 min. PBS洗涤后, 冰上加入链霉素-FITC荧光信号反应液(含50 g/L脱脂奶粉, 1 g/L Triton X-100), 冰上反应30 min. 用Triton X-100 PBS洗1次, 细胞沉淀用1 mL含1.5 mg/L Hoechst 33258的PBS悬浮, 流式细胞仪测定凋亡细胞. 试验设3个平行孔, 混合后上机检测. 利用Hoechst 33342染色法, 工作浓度4 mg/L, 染色时间10 min, 收获细胞, PBS洗涤1次后荧光显微镜观察细胞凋亡的形态.

2 结果

2.1 食管鳞癌细胞内PpIX浓度 细胞分别用0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 mmol/L ALA处理, 荧光分光光度计测得的PpIX荧光信号值, 按所加入的PpIX标准量换算成浓度, 然后除以细胞总蛋白量, 得出PpIX绝对浓度值(图1). 两种细胞均随ALA浓度的增加, 细胞内PpIX产量增大. 当ALA浓度达到1 mmol/L时, 细胞内PpIX浓度接近饱和, 缓慢进入平台期, 故以后的实验均使用1 mmol/L的ALA. 高分化食管鳞癌细胞KYSE-450与低分化KYSE-70相比具有更强的PpIX合成或积累能力(图1), 两者从0.5 mmol/L ALA浓度点开始就具有显著性差异(315.2 ± 88.3 vs 156.9 ± 79.2 , $P < 0.05$).

2.2 PpIX对不同分化状态细胞的光毒性作用 KYSE-450与KYSE-70细胞用1 mmol/L ALA处

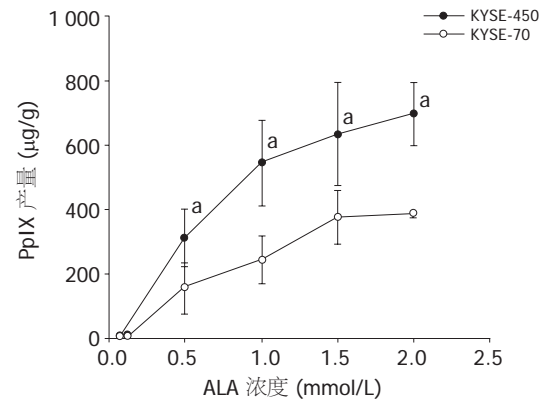


图1 不同分化状态食管鳞癌细胞PpIX的浓度. ^a $P < 0.05$ vs KYSE-70

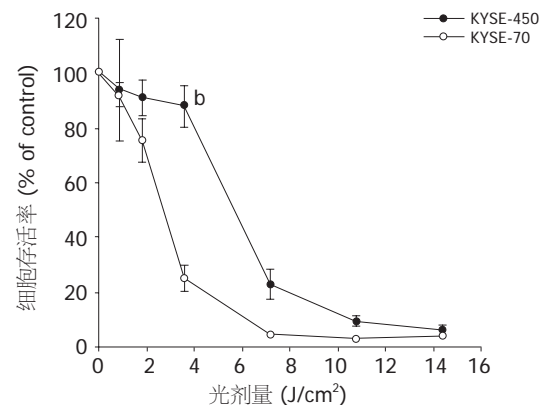


图2 红光PDT (>600 nm) 对食管鳞癌细胞的杀伤作用. ^b $P < 0.01$ vs KYSE-70

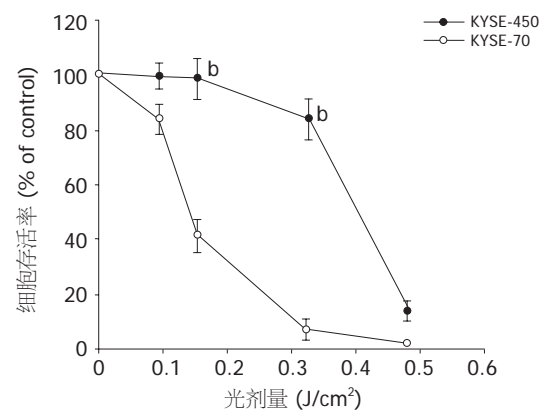


图3 蓝光PDT (450 nm) 对食管鳞癌细胞的杀伤作用. ^b $P < 0.01$ vs KYSE-70

理, 分别给予不同剂量的红光照射, 24 h后检测细胞存活率曲线. 虽然高分化KYSE-450细胞含有较高浓度的PpIX, 但对PDT反应迟钝. 相反具有低浓度PpIX的KYSE-70则对PDT更敏感. 当光剂量为3.6 J/cm²时, KYSE-450细胞存活率为88.0%, KYSE-70仅为25.2%, 两者差异显著(88.0 ± 7.4 vs 25.2 ± 4.9 , $P < 0.01$, 图2). 为进一步证实该实验结果, 我们应用不同剂量的蓝光照射, 也得到了相似的结果(97.4 ± 7.3 vs 40.8 ± 4.2 , $P < 0.01$, 图3).

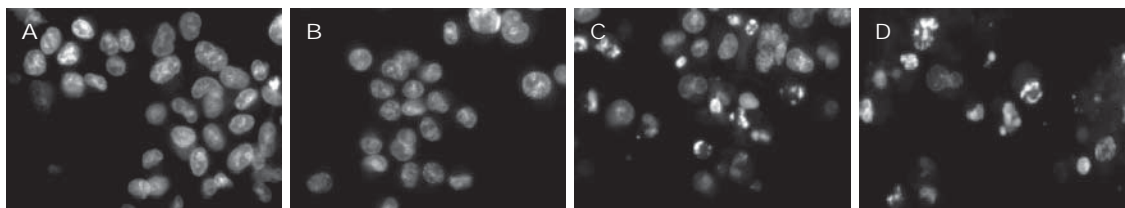


图4 凋亡细胞的Hoechst 33342染色结果. A: KYSE-450对照组; B: KYSE-70对照组; C: KYSE-450 PDT组; D: KYSE-70 PDT组.

2.3 细胞凋亡的检测结果 KYSE-450和KYSE-70分别使用的光剂量为 7.2 J/cm^2 和 3.6 J/cm^2 , 两者细胞死亡率均为75%左右. PDT后24 h KYSE-450细胞凋亡率为12.5%, KYSE-70为23.2%. 虽然低分化细胞的凋亡多于高分化细胞, 但两者主要以细胞坏死为主. PDT处理后24 h的细胞用Hoechst 33342染色, 荧光显微镜观察, 结果非凋亡细胞胞核染色均一, 凋亡细胞核明显凝集变亮, 呈边缘化或裂解. 显微镜下计数的细胞凋亡率基本与TdT法结果相符(图4).

3 讨论

5-ALA本身不具有光激活作用, 他是内源性光敏物质PpIX的前体. 细胞利用ALA合成血红素(heme)的过程中, 产生中间产物PpIX. 此合成步骤一部分在胞质, 一部分在线粒体内进行. 细胞内的ALA主要是由甘氨酸和琥珀酰辅酶A在ALA合成酶的催化下合成. ALA在胞质中经过胆色素原→尿卟啉→粪卟啉→原卟啉原III途径, 进入线粒体内形成PpIX, 最后在亚铁原卟啉合成酶(ferrochelatase)催化下成为血红素^[15-17]. 在血红素合成过程中存在两个限速步骤^[18], 第一个是ALA产生步骤, 受heme的反馈抑制. 当有外源性ALA存在的情况下则解除了这种反馈抑制, 促使代谢效率提高, 增强了PpIX的合成. 另外一个限速步骤是由PpIX生成heme的过程, 由限速酶亚铁原卟啉合成酶调控. 肿瘤细胞内这些代谢酶活性可存在差异, 结果造成PpIX在线粒体内的积累^[12]. 本结果显示, 高分化和低分化的食管鳞癌细胞当有外源性ALA存在的情况下, 均可显著提高细胞内PpIX的产量, 且细胞内PpIX浓度依赖于环境中ALA的浓度. 但两者PpIX的积累幅度却有明显差异, 高分化KYSE-450细胞能产生更高浓度的PpIX(图1). Ortel *et al*^[19]证实初级小鼠角质细胞(primary mouse keratinocyte)的分化能增强细胞内PpIX的合成, 与我们的实验结果相似. Krieg *et al*^[20]也发现高分化人膀胱癌细胞RT4 PpIX累积浓度也高于低分化的J82细

胞, 经测定细胞内亚铁原卟啉合成酶的活性, 发现RT4细胞远低于J82细胞, 说明高分化RT4细胞线粒体内由PpIX生成血红素的速率降低, 提示细胞分化状态影响了血红素代谢过程, 并影响到PpIX的胞内浓度. 由于PpIX在线粒体内合成, 细胞需要把PpIX的前体粪卟啉原III穿膜运输至线粒体内的PpIX合成位点, 此转运功能由线粒体外膜蛋白PBR(peripheral benzodiazepine receptor)承担^[21-23], 因而细胞中PBR蛋白表达水平的高低有可能决定了PpIX的合成效率或线粒体吸收结合光敏剂的能力. Morgan *et al*^[24]报道高分化的皮肤癌细胞具有高水平的PBR蛋白表达, 分化差的癌细胞和浸润型癌细胞PBR表达很低, 这也可能是造成高分化细胞积累较高浓度PpIX的原因之一. 本研究中食管鳞癌细胞KYSE-450和KYSE-70在PpIX积累能力的差别, 是因Heme代谢过程中酶活性的差异引起, 还是PBR水平不同而引起, 是需进一步阐明的问题.

既然高分化细胞含高浓度的PpIX, 应对PDT更加敏感. 理由是PDT产生的单态氧数量与光敏剂分子数目有关, 因而PDT的细胞毒性强度应与光敏剂浓度相关. 许多实验亦证实如此. 据文献报道在结肠腺癌细胞PpIX的产量为高分化细胞(CaCo2)>中分化细胞(HT29)>低分化细胞(SW480), PDT效果相应也是高分化细胞>中分化细胞>低分化细胞^[25]. Ortel *et al*^[26]用诱导剂诱导前列腺癌LNCaP细胞的分化能显著提高细胞内PpIX浓度, 并相应增强了PDT的杀伤作用. 但本研究中KYSE-450虽然PpIX产量高于KYSE-70, 但对PDT的应答明显差于KYSE-70细胞, 无论红光PDT还是蓝光PDT均有一致结果(图2, 3). 考虑到由ALA产生的内源性PpIX主要分布在线粒体^[27,28], 我们也探讨了外源性PpIX对PDT效应的影响. 外源性PpIX在细胞内成弥漫性分布, 完全不同于内源性PpIX的分布形式. 在同样的实验条件下, KYSE-450仍然比KYSE-70具有明显的抵御PDT的能力. 另外我们实验室发现高分化结肠腺癌细胞HCCP 2998

同行评价

选题比较新颖, 研究内容较重要, 研究提供了充足有意义的信息, 有一定的临床指导价值, 研究对象为食管鳞癌细胞, 符合伦理学要求.

PpIX产量也显著高于低分化结肠腺癌细胞Colo 205, 但PDT(蓝光, 波长405 nm)效果却相反, 与本实验结果相类似(Shahzidi *et al*), 提示PDT的光毒性效果不仅与PpIX积累能力有关, 还与细胞种类及其生物学特性相关. 肿瘤细胞在分化过程中, 有可能形成了某一种机制, 增强了抵抗PDT或其他放疗化疗的能力. 研究并确切了解这种机制有重要的实际临床意义. PDT对肿瘤细胞的杀伤作用大多是通过诱导凋亡与坏死两种机制的结合, 而非单一的凋亡或单一的坏死^[29]. PDT后癌细胞死亡是以凋亡为主还是以坏死为主, 与光敏剂的种类和剂量, 所用光的波长和剂量以及细胞种类和生物学特性等许多因素有关^[30]. 我们发现ALA-PDT诱导的食管鳞癌细胞KYSE-450和KYSE-70的细胞凋亡率分别是12.5%和23.2%(TdT法), 荧光显微镜下可发现胞核凝集及边缘化等典型的凋亡特征, 但多数细胞死亡方式为坏死. 尽管如此, 本实验条件下高分化KYSE-450细胞凋亡率低于低分化KYSE-70细胞的现象, 至少可提示高分化肿瘤细胞对PDT的抵御作用部分是通过抑制凋亡而产生, 增强细胞对凋亡的敏感性有可能部分改善癌细胞对PDT的应答.

4 参考文献

- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 889-905
- Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas)* 2003; 39: 1137-1150
- Yamaguchi S, Tsuda H, Takemori M, Nakata S, Nishimura S, Kawamura N, Hanioka K, Inoue T, Nishimura R. Photodynamic therapy for cervical intraepithelial neoplasia. *Oncology* 2005; 69: 110-116
- Morton CA. Methyl aminolevulinate (Metvix) photodynamic therapy - practical pearls. *J Dermatolog Treat* 2003; 14: 23-26
- Chen JY, Peng Q, Jodl HJ. Infrared spectral comparison of 5-aminolevulinic acid and its hexyl ester. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2003; 59: 2571-2576
- Mitra S, Foster TH. Photophysical parameters, photosensitizer retention and tissue optical properties completely account for the higher photodynamic efficacy of meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin vs Photofrin. *Photochem Photobiol* 2005; 81: 849-859
- Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem Photobiol* 1997; 65: 235-251
- Rancan F, Wiehe A, Nobel M, Senge MO, Omari SA, Bohm F, John M, Roder B. Influence of substitutions on asymmetric dihydroxychlorins with regard to intracellular uptake, subcellular localization and photosensitization of Jurkat cells. *J Photochem Photobiol B* 2005; 78: 17-28
- Schieke SM, von Montfort C, Buchczyk DP, Timmer A, Grether-Beck S, Krutmann J, Holbrook NJ, Klotz LO. Singlet oxygen-induced attenuation of growth factor signaling: possible role of ceramides. *Free Radic Res* 2004; 38: 729-737
- Du HY, Olivo M, Tan BK, Bay BH. Hypericin-mediated photodynamic therapy induces lipid peroxidation and necrosis in nasopharyngeal cancer. *Int J Oncol* 2003; 23: 1401-1405
- Moor AC. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2000; 57: 1-13
- Peng Q, Moan J, Warloe T, Iani V, Steen HB, Bjorseth A, Nesland JM. Build-up of esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin. *J Photochem Photobiol B* 1996; 34: 95-96
- Bhasin G, Kausar H, Athar M. Protoporphyrin-IX accumulation and cutaneous tumor regression in mice using a ferrochelatase inhibitor. *Cancer Lett* 2002; 187: 9-16
- Sauren M, Pirogova E, Cosic I. RRM analysis of protoporphyrinogen oxidase. *Australas Phys Eng Sci Med* 2004; 27: 174-179
- Friesen SA, Hjortland GO, Madsen SJ, Hirschberg H, Engebraten O, Nesland JM, Peng Q. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumors (review). *Int J Oncol* 2002; 21: 577-582
- Fukuda H, Casas A, Batlle A. Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 272-276
- Collaud S, Juzeniene A, Moan J, Lange N. On the selectivity of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX formation. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2004; 4: 301-316
- Tsai T, Hong RL, Tsai JC, Lou PJ, Ling IF, Chen CT. Effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 and MCF-7/ADR cells. *Lasers Surg Med* 2004; 34: 62-72
- Ortel B, Chen N, Brissette J, Dotto GP, Maytin E, Hasan T. Differentiation-specific increase in ALA-induced protoporphyrin IX accumulation in primary mouse keratinocytes. *Br J Cancer* 1998; 77: 1744-1751
- Krieg RC, Fickweiler S, Wolfbeis OS, Knuechel R. Cell-type specific protoporphyrin IX metabolism in human bladder cancer in vitro. *Photochem Photobiol* 2000; 72: 226-233
- Kessel D, Antolovich M, Smith KM. The role of the peripheral benzodiazepine receptor in the apoptotic response to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001; 74: 346-349
- Morris RL, Varnes ME, Kenney ME, Li YS, Azizuddin K, McEnery MW, Oleinick NL. The peripheral benzodiazepine receptor in photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Photochem Photobiol* 2002; 75: 652-661
- Dougherty TJ, Sumlin AB, Greco WR, Weishaupt KR, Vaughan LA, Pandey RK. The role of the peripheral benzodiazepine receptor in photodynamic activity of certain pyropheophorbide ether photosensitizers: albumin site II as a surrogate marker for activity. *Photochem Photobiol* 2002; 76: 91-97
- Morgan J, Oseroff AR, Cheney RT. Expression of the peripheral benzodiazepine receptor is decreased in skin cancers in comparison with normal skin. *Br J Dermatol* 2004; 151: 846-856

- 25 Krieg RC, Messmann H, Schlottmann K, Endlicher E, Seeger S, Scholmerich J, Knuechel R. Intracellular localization is a cofactor for the phototoxicity of protoporphyrin IX in the gastrointestinal tract: in vitro study. *Photochem Photobiol* 2003; 78: 393-399
- 26 Ortel B, Sharlin D, O'Donnell D, Sinha AK, Maytin EV, Hasan T. Differentiation enhances aminolevulinic acid-dependent photodynamic treatment of LNCaP prostate cancer cells. *Br J Cancer* 2002; 87: 1321-1327
- 27 Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, Nesland JM. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer* 1997; 79: 2282-2308
- 28 Gabeler EE, Sluiter W, van Hillegersberg R, Edixhoven A, Schoonderwoerd K, Stadius van Eps RG, van Urk H. Aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX pharmacokinetics in central and peripheral arteries of the rat. *Photochem Photobiol* 2003; 78: 82-87
- 29 Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* 2002; 1: 1-21
- 30 Peng Q, Warloe T, Moan J, Godal A, Apricena F, Giercksky KE, Nesland JM. Antitumor effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can be enhanced by the use of a low dose of photofrin in human tumor xenografts. *Cancer Res* 2001; 61: 5824-5832

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知

本刊讯 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议定于2006-03在广东省深圳市召开, 本次会议由中国中西医结合学会主办, 现将有关征文事项通知如下。

1 征文内容

本次会议的征文内容包括: (1)介绍结直肠肛门基础研究的新动态、新进展、新成果; (2)结直肠肛门肿瘤疾病的诊断及治疗的新技术、新成果, 直肠癌扩大根治术式和疗效, 中低位直肠癌保肛手术方法、适应证和效果, 肛管直肠癌会阴肛门重建术的术式、方法、效果; (3)中西医结合治疗结肠慢传输型、出口梗阻型及结肠、直肠、盆腔、盆底解剖生理功能异常等便秘疾病的诊断治疗方法、适应证、临床疗效和经验教训; (4)中西医结合治疗炎症性肠病的经验及手术方式选择; (5)中西医结合预防、治疗肛肠常见疾病的新方法、新经验; (6)采用中西医结合治疗结直肠肛门疾病的临床护理及造口护理的新方法、新经验; (7)肛门、结直肠损伤及异物处理的经验; (8)介绍国内外肛肠疾病检查、治疗的新器械、新设备、新药物。

2 征文要求

文章应有临床实用性, 基础研究应具有科学性和先进性; 全文4 000字以内, 要求寄打印稿(欢迎用软盘或电子信箱投稿), 并附500字以内的摘要一份, 关键词3-5个; 征文稿件请寄: (1)广东省公安边防总队医院(深圳武警医院)肛肠外科柯玮收, 邮编: 518029, 电话: 0755-82699768, 手机: 13714327555, Email: kwei1968@126.com; (2)深圳市第二人民医院肛肠科舒洪权收, 邮编: 518039, 电话: 0755-26250353, 手机: 13923803457, Email: ssshhhqq66@163.com。

3 其他

本次会议可授予国家级继续教育 I 类学分6分, 会议具体日期及详细地址另行通知。欢迎广大相关领域工作及研究人员参加。

内毒素性急性肝损伤实验动物模型的建立

刘亮明, 邓欢, 张吉翔, 罗杰

■背景资料

内毒素血症和肝脏疾病之间存在着互为因果、相互影响的关系, 并可能形成恶性循环, 对患者的生命安全产生很大威胁。所以, 打断该循环中的某个或某些链条, 阻止内毒素对肝脏的进一步损伤, 是急切需要我们解决的问题。但是迄今为止, 临床上尚缺乏特殊有效的手段治疗内毒素引起的肝损伤。抗生素的应用是无效的, LPS拮抗剂不仅价高, 而且并不能阻止肝脏病变的进一步发展。为了更好地解答这些问题, 需要我们对内毒素引起肝损伤的机制、疾病状态和进程有更为深刻的认识。建立适当的动物模型就是一个明智的选择。

刘亮明, 邓欢, 张吉翔, 罗杰, 南昌大学第二附属医院消化内科、江西省分子医学重点实验室 江西省南昌市 330006
刘亮明, 男, 1968-02-04生, 江西省瑞金市人, 汉族, 副主任医师, 副教授, 主要从事消化系疾病基因治疗的基础和临床研究。国家自然科学基金项目, No.30160032, No.30360037
江西省科委重点项目, No.200110300101, No.20041B0300300
通讯作者: 张吉翔, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院消化内科。jixiangz@tom.com
电话: 0791-6292706
收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-31

Establishment of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in rats

Liang-Ming Liu, Huan Deng, Ji-Xiang Zhang, Jie Luo

Liang-Ming Liu, Huan Deng, Ji-Xiang Zhang, Jie Luo, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University; Jiangxi Provincial Key Laboratory of Molecular Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30160032, No.30360037, and the Key Project of Science and Technology Committee of Jiangxi Province, China, No.200110300101, No.20041B0300300

Correspondence to: Ji-Xiang Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. jixiangz@tom.com

Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-10-31

Abstract

AIM: To study the lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in D-galactosamine (D-GalN) sensitized rats at a sub-lethal dose.

METHODS: Forty eight rats were randomly divided into three groups (16 for each). The rats in each group were further divided into model ($n = 8$) and control group ($n = 8$). The rats in the model group received intraperitoneal injections of LPS (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and D-GalN (300 mg/kg) in 1 mL stroke-physiological saline solution (SPSS), while the rats in the control group were treated with SPSS only. The tissue and blood samples were collected at 6, 24, and 48 h, respectively. The contents of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST) and total bilirubin (TBIL) were detected. The morphological changes were observed by hematoxylin and

eosin (HE) staining. The apoptosis of liver cells was detected by TUNEL assay, and the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin- 1β (IL- 1β), and *bax* gene were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Blood biochemical indicators, such as ALT, AST, and TBIL, were significantly higher in the model rats than those in the controls at 6 h, which reached the peak at 24 h, and sustained high levels at 48 h. By naked eyes, sporadic, punctiform and lamellar hemorrhagic spots were observed on the surface of swelling and pale liver with tenacious texture in the model rats. Congestion, piecemeal necrosis and infiltration of inflammatory cells appeared at 6 h, and cellular vacuolar degeneration, engorgement, focal necrosis and neutrophil infiltration were observed at 24 h. At 48 h, vacuolar degeneration appeared in a majority of liver cells, and structural disorder of liver lobule and spot necrosis were observed. The apoptotic indexes of the liver cells at 24 and 48 were $20.6 \pm 3.3\%$ and $21.2 \pm 5.7\%$, respectively ($P > 0.05$), whereas the apoptotic index was only $4.3 \pm 1.2\%$ at 6 h in the model rats. The percentage of apoptotic cells was 15.83% in the model rats, and 0.39% in controls ($P < 0.001$) at 24 h. In the model rats, the expression of TNF- α and IL- 1β were significantly up-regulated at all time points and reached the peak at 6 h. There was no expression of *bax* in the controls, but 6, 24, 48 h after LPS induction, the relative expression rates of *bax* were 0.193 ± 0.062 , 0.191 ± 0.043 , and 0.209 ± 0.031 , respectively.

CONCLUSION: LPS can induce acute liver injury in D-GalN-sensitized rats at a sub-lethal dose. Apoptosis is the important morphological feature in this process, which may be associated with LPS-induced *bax* expression.

Key Words: Lipopolysaccharide; Acute liver injury; Animal model; Apoptosis

Liu LM, Deng H, Zhang JX, Luo J. Establishment of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):12-18

摘要

目的: 探讨脂多糖(LPS)对D-半乳糖胺(D-GalN)致敏大鼠在亚致死剂量下的肝损伤作用.

方法: 48只大鼠随机分为三大组, 即6 h、24 h和48 h取材组, 每组各16只动物; 每个大组再分为两个小组, 即处理组和对照组, 各8只大鼠. 所有处理组大鼠均以LPS(50 μ g/kg)+D-GalN(300 mg/kg), 用1 mL无菌生理盐水溶解后腹腔内注射, 对照组大鼠仅腹腔内注射1 mL生理盐水. 在相应时间点, 采血查谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和胆红素(BIL); 肝组织常规固定, HE染色后光镜检查; 肝组织细胞凋亡的TUNEL分析采用多聚甲醛固定; 肝组织炎症细胞因子TNF- α 、IL-1 β 和细胞凋亡诱导基因*bax*的表达通过RT-PCR的方法检测.

结果: 所有处理组大鼠ALT、AST和TBIL在6 h内即显著升高, 24 h达到峰值, 48 h仍维持于高水平; 肝脏大体形态显示: 肝脏明显肿胀、失去正常红润光泽而略显苍白、表面见散在的点状及片状出血点、质地偏韧; HE染色可见药物处理6 h, 肝组织即呈现充血, 碎片状坏死和大量炎症细胞浸润. 24 h肝细胞开始空泡变性、肿胀, 并见大片坏死及中性粒细胞浸润. 48 h则多数肝细胞空泡状变性, 肝组织小叶结构紊乱, 点状坏死, 炎症细胞浸润较前减少. TUNEL分析显示, 对照组未见凋亡的肝细胞, 6 h处理组仅见少量凋亡细胞, 凋亡指数(AI)为 $4.3 \pm 1.2\%$, 24 h和48 h处理组肝组织内则见较多的凋亡细胞, AI分别为 $20.6 \pm 3.3\%$ 、 $21.2 \pm 5.7\%$, 但两者 $P > 0.05$; 24 h处理组凋亡细胞百分数为15.83%, 对照组凋亡细胞占0.39%, 两组间存在显著差异($P < 0.001$); 处理组各时间点TNF- α 、IL-1 β 的表达均较对照组显著升高, 其峰值出现于6 h. 对照组未见*bax*的表达, 而LPS的应用后6, 24, 48 h的相对表达率为 0.193 ± 0.062 、 0.191 ± 0.043 、 0.209 ± 0.031 .

结论: 亚致死剂量LPS可造成D-GalN致敏大鼠的急性肝损伤; 细胞凋亡是该急性损伤的重要病理形态学改变, 而凋亡的发生可能与LPS诱导*bax*的表达有关; 本模型是较理想的内毒素性急性肝损伤的实验动物模型.

关键词: 内毒素; 急性肝损伤; 动物模型; 凋亡

刘亮明, 邓欢, 张吉翔, 罗杰. 内毒素性急性肝损伤实验动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2006;14(1):12-18
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/12.asp>

0 引言

内毒素(endotoxin)是革兰氏阴性细菌细胞壁外层成分, 其主要化学物质并对人体产生毒性作用的成分是脂多糖(lipopolysaccharide, LPS). 休克、缺血-再灌注胃肠衰竭、创伤和严重烧伤等重症患者, 内毒素血症是很常见的. 肝硬化、急、慢性及重症肝炎等肝病患者, 由于胃肠屏障功能的降低和/或肝脏单核巨噬细胞系统特别是肝枯否细胞的损伤, 往往合并有肠源性内毒素血症. 韩德五^[6]在1995年就已经提出了肝功能衰竭的内毒素机制, 认为内毒素血症特别是肠源性内毒素血症是肝功能衰竭发生的物质基础. 目前虽然累积了大量LPS致肝损伤的证据, 但临床上尚缺乏特殊的有效治疗手段. 一个重要的理由可能在于LPS肝损伤动物模型建立有困难, 因为啮齿类动物大多对LPS存在抵抗^[24]. 既往采用大剂量LPS体内注射的方法, 因可造成包括肝脏在内的多脏器功能衰竭, 使肝损伤病理生理进程的深入研究存在一定困难, 而小剂量外源LPS的应用又往往难以达到理想的观察数据. 有研究^[3]证实, D-半乳糖胺(D-galactosamine, D-GalN)的应用能大大增加实验鼠对LPS的敏感性, 使LPS的动物致死效应增加2 500倍以上. 我们在该研究的基础上, 采用小剂量LPS/D-GalN处理动物建立实验模型.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康♂ Wistar大鼠, 体质量 200 ± 10 g, 由南昌大学医学院动物科学部提供.

1.1.2 动物饲养 依据文献[21,25], 实验前1 wk领取动物, 分笼饲养, 给予自由进食和饮水. 室温维持 25°C , 并每隔12 h开灯照明.

1.1.3 试剂 LPS和D-GalN购自美国Sigma公司; DeadEndTM Colorimetric TUNEL System购自美国Promega公司.

1.2 方法

1.2.1 动物处理方法 48只大鼠随机分为三大组, 即6 h、24 h和48 h取材组, 每组各16只; 每个大组再分为两个小组, 即处理组和对照组, 各8只. 所有处理组大鼠均以LPS(50 μ g/kg)+D-GalN(300 mg/kg), 用1 mL无菌生理盐水溶解后腹腔内注射, 对照组大鼠仅腹腔内注射1 mL生理盐水. 在相应时间点, 即6, 24和48 h采用麻醉处死动物, 从门静脉或下腔静脉采血查ALT、AST、BIL等; 迅速切取肝脏置预冷的PBS液中,

■ 研发前沿

细胞凋亡在急性肝损伤肝衰竭中的地位和作用机制及有效治疗方法的探讨.

■ 相关报道

- Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5939-5943
- Mignon A, Rouquet N, Fabre M, Martin S, Pages JC, Dhainaut JF, Kahn A, Briand P, Joulin V. LPS challenge in D-galactosamine-sensitized mice accounts for caspase-dependent fulminant hepatitis, not for septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1308-1315
- Liu D, Li C, Chen Y, Burnett C, Liu XY, Downs S, Collins RD, Hawiger J. Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2004; 279: 48434-48442

表 1 PCR引物序列及产物长度

基因	引物序列	产物长度 (bp)
TNF- α	正义: 5'-CTGGGCAGCGTTTATTCT-3'	249
	反义: 5'-TTGCTTCTTCCCTGTTCC-3'	
IL-1 β	正义: 5'-CCTTCTTTTCCCTCATCTTTG-3'	372
	反义: 5'-ACCGCTTTTCCATCTTCTTCT-3'	
bax	正义: 5'-GACACCTGAGCTGACCTTGG-3'	310
	反义: 5'-GAGGAAGTCCAGTGCCAGC-3'	
β -actin	正义: 5'-ACACTGTGCCCATCTACGAGG-3'	621
	反义: 5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3'	

剪成小块(约50-100 mg)置液氮以备RT-PCR检测; 固定备送光镜和TUNEL分析; 制备肝细胞悬液送流式细胞检测。

1.2.2 TUNEL分析 参照文献[26], 肝组织用40 g/L多聚甲醛固定后, 进行石蜡包埋、切片, 切片常规脱蜡、水化, 再用TUNEL检测试剂盒按说明书步骤进行。最后常规DAB显色, 苏木素复染, 中性树脂封固。计算凋亡指数并判定肝细胞凋亡程度: 细胞核呈棕褐色染色为阳性, 未染成棕褐色者为阴性。

1.2.3 RT-PCR 参照文献[27], 肝组织(50-100 mg)总RNA提取用TRIzol试剂(Invitrogen, USA)按操作说明进行。2 mg总RNA作为模板用于第一链cDNA的合成, 采用M-MLV RT kit(Promega, USA)试剂盒进行。PCR引物设计利用Primer Premier 5.0软件(Premier Biosoft, CA)设计完成。引物序列及产物长度见表1。反应条件为: TNF- α 、IL-1 β 和 β -actin: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C变性45 s, 55 $^{\circ}$ C退火45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 共38个循环; 最后总延伸72 $^{\circ}$ C 6 min。bax和 β -actin: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 45 s, 57 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共38个循环; 最后72 $^{\circ}$ C 6 min。

1.2.4 流式细胞术 制备细胞悬液, 按FITC-Annexin V Apoptosis Detection Kit操作, 对细胞进行Annexin V/PI双染, 通过双变量流式细胞仪检测细胞凋亡率。

统计学处理 实验数据以mean \pm SD表示, 组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 血生化检测结果 所有处理组动物血ALT、AST和TBIL在6 h内即呈现显著的升高, 24 h达到峰值, 48 h仍维持于高水平。但在48 h, ALT的水平较24 h已有显著的降低($P<0.01$)(表2)。

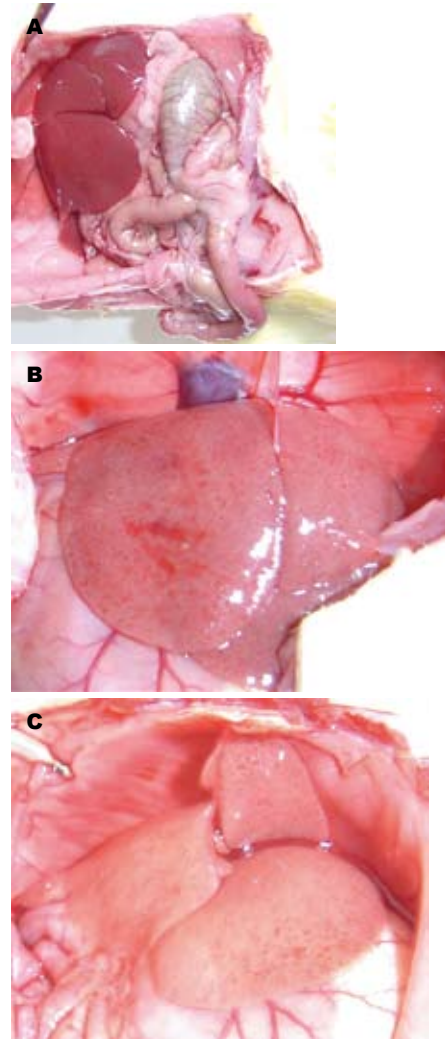


图 1 大鼠肝脏大体形态。A: 对照组; B: 24 h处理组; C: 48 h处理组。

2.2 肝大体形态学的改变 肉眼观察, 对照组肝脏形态正常, 被膜光整、色泽红润、质地柔软; 24 h和48 h处理组之肝脏则明显肿胀、失去正常红润光泽而略显苍白、表面见散在的点状及片状出血点、质地偏韧。48 h处理组片状出血更少见, 而更显苍白(图1)。

2.3 光镜检查结果 对照组肝组织, HE染色显示肝小叶结构完整, 无肝细胞变性坏死现象; 6 h处理组肝组织, 见少量充血, 碎片状坏死, 大量炎性细胞浸润; 24 h处理组切片, 肝组织结构尚存, 肝细胞肿胀, 部分细胞空泡变性, 并见大片灶状坏死, 其中可见多量中性粒细胞浸润; 48 h处理组切片, 肝组织小叶结构紊乱, 大部分肝细胞空泡状变性, 肝细胞肿胀, 体积增大, 肝细胞点状坏死, 间质有少量炎症细胞浸润(图2)。

2.4 细胞凋亡的TUNEL分析 对每组的不同时间点观察2张切片, 每张切片分析5个视野, 每

表 2 各组大鼠血ALT、AST和TBIL检测结果

组别	h	ALT (nkat/L)	AST (nkat/L)	TBIL ($\mu\text{mol/L}$)
对照组		1 102.2 \pm 53.4	5 292.2 \pm 626.3	9.4 \pm 1.2
处理组	6	6 656.6 \pm 1 386.1 ^b	10 589.5 \pm 1 873.7 ^b	15.8 \pm 6.7 ^b
	24	53 072.6 \pm 10 604.5 ^{bd}	67 250.9 \pm 15 748.1 ^{bd}	59.6 \pm 8.7 ^{bd}
	48	25 150.2 \pm 9 452.2 ^{bdf}	66 155.4 \pm 13 694.0 ^{bd}	58.8 \pm 10.1 ^{bd}

^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^d $P < 0.01$ vs 6 h组; ^f $P < 0.01$ vs 24 h组.

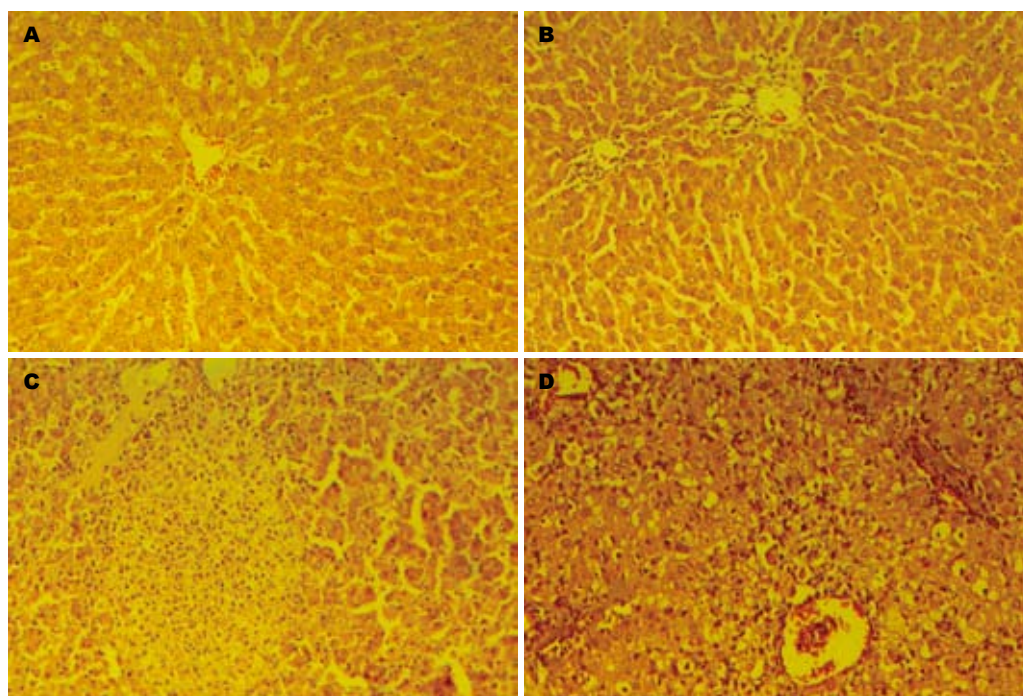


图 2 大鼠肝组织光镜检查结果 ($\times 200$). A: 对照组; B: 6 h处理组; C: 24 h处理组; D: 48 h处理组.

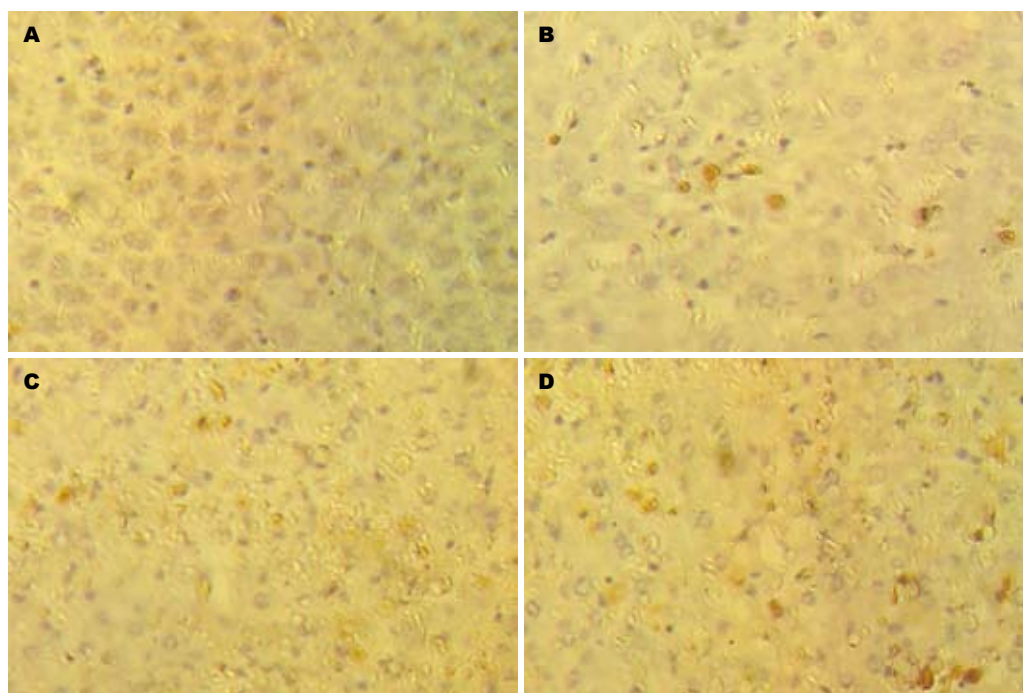


图 3 大鼠肝组织细胞凋亡的TUNEL分析结果 ($\times 200$). A: 对照组; B: 6 h处理组; C: 24 h处理组; D: 48 h处理组.

■ 创新盘点

- 1 亚致死剂量LPS/D-GalN的应用引起的动物急性肝衰竭, 是理想的内毒素性急性肝损伤动物模型.
- 2 细胞凋亡是该模型动物最主要的肝脏病理学改变.
- 3 肝细胞凋亡的机制可能与Bcl-2家族蛋白有关.

应用要点

1 内毒素性急性肝损伤肝衰竭机制、治疗方法的研究。

2 其他TNF- α 性肝衰竭作用机制及治疗的研究。

表3 各组大鼠TNF- α 、IL-1 β 和*bax* mRNA的相对表达率

组别	对照组	6 h	24 h	48 h
TNF- α	0.368 \pm 0.037	0.664 \pm 0.083 ^b	0.605 \pm 0.056 ^b	0.474 \pm 0.017 ^b
IL-1 β	0.043 \pm 0.004	0.701 \pm 0.061 ^b	0.407 \pm 0.038 ^b	0.389 \pm 0.045 ^b
<i>bax</i>	0	0.193 \pm 0.062 ^b	0.191 \pm 0.043 ^b	0.209 \pm 0.031 ^b

^b $P < 0.01$ vs 对照组。

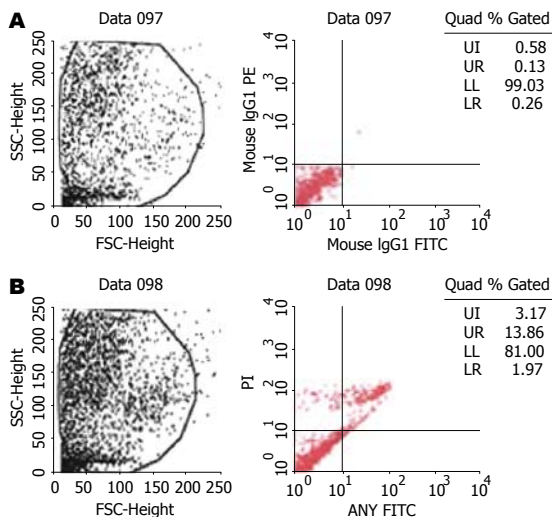


图4 24 h处理组大鼠细胞凋亡的流式细胞检查。A: 对照组; B: 24 h处理组。

个视野计数100个细胞核, 计算凋亡细胞百分比的均数, 即为凋亡指数(apoptotic index, AI)^[7]。显微镜下, 凋亡的肝细胞多表现为细胞皱缩(cell shrinkage)、染色质浓集(chromatin condensation), 细胞核呈棕褐色着色, 凋亡小体也呈阳性着色。对照组肝组织切片, 未见凋亡细胞; 6 h处理组, 肝组织内见少量凋亡细胞, AI为4.3 \pm 1.2%; 24 h和48 h处理组肝组织内则见较多的凋亡细胞, AI分别为20.6 \pm 3.3%、21.2 \pm 5.7%, 两者比较无统计学差异($P > 0.05$)(图3)。

2.5 流式细胞检查结果(图4) 24 h处理组: 凋亡细胞百分数(包括早期和晚期凋亡细胞)为15.83%、坏死细胞百分数为3.17%, 存活细胞百分数为81%; 对照组: 凋亡细胞占0.39%、坏死细胞占0.58%、正常存活细胞占99.03%。两组间存在显著差异($P < 0.001$)。

2.6 TNF- α 、IL-1 β 和*bax*的基因表达 处理组各时间点TNF- α 、IL-1 β 的表达均较对照组显著升高, 其峰值出现于6 h; 对照组未见*bax*的表达, 而LPS的应用则诱导了*bax*的表达(表3, 图5)。

3 讨论

内毒素主要是肠源性的。肠道是体内巨大的细

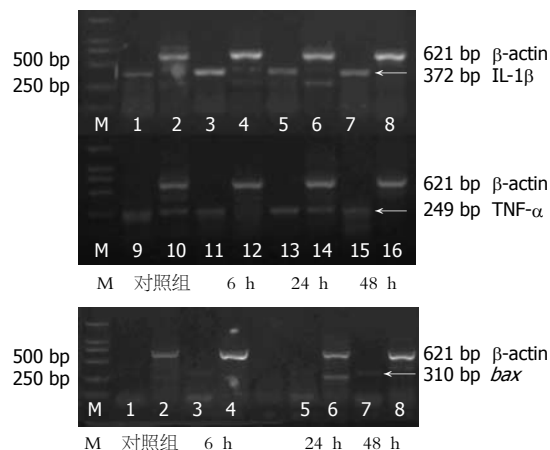


图5 各组大鼠TNF- α 、IL-1 β 和*bax* mRNA表达琼脂糖电泳凝胶图。

菌库, 其中定植着大量的革兰氏阴性细菌。革兰氏阴性细菌死亡细胞壁崩解或活菌以发泡形式释放LPS, 因而肠道内积存有大量的LPS。在正常情况下, 少量间歇进入门静脉的LPS, 被肝枯否细胞吞噬而清除。病理情况下, 肠黏膜吸收的LPS显著增加和/或肝枯否细胞功能低下, 引起肝脏的损伤性反应。LPS对肝脏的毒性影响主要有二: (1)促进肝星状细胞(HSCs)分泌多种炎症细胞因子, 如TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等^[8]。这些炎症因子特别是TNF- α 的作用可造成凋亡性肝细胞死亡及炎症细胞的浸润。浸润的炎细胞可进一步造成肝细胞的损伤, 形成恶性循环; (2)LPS可直接或通过炎症因子的作用破坏血管内皮细胞的完整性, 造成微血管损伤及微血栓的形成, 引起肝内出血和肝细胞的坏死^[5]。

由于啮齿类动物对LPS的低反应性, 因此我们利用D-GalN致敏大鼠。以往的研究证实^[3], D-GalN的单独应用, 并不会造成动物死亡, 也不会影响肝细胞的功能, 对血清内炎症细胞因子水平也不产生影响。D-GalN的主要作用在于耗竭肝细胞内UTP储备而大大增强LPS的肝毒性。Mignon *et al*^[4]研究发现, 动物经LPS/D-GalN处理后, 出现了典型暴发性肝衰竭的表现, 在10 h内100%动物死亡, 肝组织的病理学检查见死亡的肝细胞超过95%, 而其他脏器(心脏、脾脏和

肺)的组织学检查则未见任何损伤表现, 这提示LPS/D-GalN诱导的肝细胞损伤具有器官特异性. 其他作者用LPS/D-GalN处理实验鼠后, 也引起了动物爆发性肝衰竭, 6 h内即可见大片肝细胞凋亡及微血管损伤后的出血坏死表现, 但动物大多在6-12 h内即死亡^[5]. 这种极高的动物死亡率不利于肝损伤机制的探讨和药物治疗远期效应的研究. 目前认为一个理想的动物模型应该符合以下条件^[13]: 与人类疾病特征相似, 病变有一定的发展过程, 形成率高, 死亡率低, 重复性好, 造模简便易行. 因此, 我们采用亚致死剂量的LPS/D-GalN处理动物.

本实验中, LPS在6 h内即造成了D-GalN致敏大鼠发生急性肝损伤、肝功能衰竭; 24 h进入疾病进程的高峰期, 如血生化指标ALT、AST和TBIL达峰值, 肝内渗出、出血和肝细胞的坏死、凋亡显著增多; 48 h, ALT开始明显降低(可能与肝细胞膜开始修复有关), 肝内出血减少, 渗出有所吸收, 但肝内空泡变性明显增多(可能由于肝内缺血缺氧影响了正常肝细胞的能量代谢, 肝细胞内水分增多的结果). 另外, 我们还证实, 损伤鼠肝组织内炎性细胞因子TNF- α 和IL-1 β 的表达在损伤早期即显著增高并迅速达峰值(6 h内), 介导并启动了内毒素的肝损伤过程. 文献表明, LPS可激活Toll样受体4(Toll-like receptor-4, TLR4)^[20]. 作为一个先天性免疫系统的传感器(sensor), TLR4的激活促进了单核巨噬细胞系统, 特别是肝枯否细胞对TNF- α 等炎性细胞因子的大量分泌^[21]. TNF- α 是LPS诱导D-GalN致敏鼠肝损伤的关键性分子^[14-16,28], 在LPS性急性肝损伤和其他炎性细胞因子的产生中起中心作用^[17-19].

已知急性肝衰竭的发生是肝细胞的急性大量死亡不能为细胞增生所补偿的结果^[30]. 我们发现, 损伤肝组织肝细胞死亡的主要形式为坏死和凋亡. 其他的研究证实急性肝衰竭患者肝细胞的死亡表现亦为凋亡和坏死^[9], 并认为凋亡是其主要的病理改变. 对病毒性和内毒素等非病毒性损伤因子引起的肝损伤的研究也发现肝内呈现显著的细胞凋亡现象^[11]. 因此细胞凋亡在急性损伤性肝组织中具有普遍性意义. 人体肝组织学检查^[1]和动物实验^[2]均证实了凋亡在急性肝损伤、肝衰竭的细胞死亡中起重要作用. 现在认为, 肝细胞凋亡是肝衰竭分子机制中最重要的事件^[29]. 凋亡是肝细胞对各种损伤因子(包括内毒素)作用的第一个细胞反应^[2], 而坏死则往往出现于细胞凋亡之后^[10,31], 肝细胞的凋亡过

程对随之出现的肝细胞坏死的形成起着至关重要的作用^[10]. 所以对细胞凋亡机制的研究能够较深刻地揭示内毒素性急性肝损伤、肝衰竭的本质和规律. Bcl-2家族蛋白是细胞凋亡的重要调控因子^[23], 但在急性肝损伤中的作用的研究却较少. 我们证实了LPS可显著地诱导细胞凋亡通路中的关键基因**bax**的表达. **bax**的高表达可启动细胞凋亡的线粒体通路^[22], 并对内质网应激通路产生重要影响^[12]. 但LPS通过何种方式诱导**bax**的表达, **bax**又在多大程度上对肝损伤、肝细胞凋亡产生影响, 还需要作进一步的研究. 研究的关键仍然需要建立可靠的动物模型.

总之, 亚致死剂量LPS/D-GalN的应用所建立的动物模型符合以下内毒素性急性肝损伤的诊断标准: (1)内毒素引起; (2)急性肝衰竭表现; (3)炎性细胞因子主要是TNF- α 介导的肝损伤; (4)内毒素对肝内血管破坏所造成的肝内出血; (5)坏死和凋亡是主要的病理形态. 因而, 该模型为我们提供了一个与人类内毒素性急性肝损伤疾病进程与疾病状态相关的准确而可靠的平台.

4 参考文献

- 1 Kasahara I, Saitoh K, Nakamura K. Apoptosis in acute hepatic failure: histopathological study of human liver tissue using the tunnel method and immunohistochemistry. *J Med Dent Sci* 2000; 47: 167-175
- 2 Doggrel SA. Suramin: potential in acute liver failure. *Expert Opin Investig Drugs* 2004; 13: 1361-1363
- 3 Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5939-5943
- 4 Mignon A, Rouquet N, Fabre M, Martin S, Pages JC, Dhainaut JF, Kahn A, Briand P, Joulin V. LPS challenge in D-galactosamine-sensitized mice accounts for caspase-dependent fulminant hepatitis, not for septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1308-1315
- 5 Liu D, Li C, Chen Y, Burnett C, Liu XY, Downs S, Collins RD, Hawiger J. Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 2004; 279: 48434-48442
- 6 韩德五. 肝功能衰竭发病机制的研究——肠源性内毒素血症假说. *肝脏病杂志* 1995; 3: 134-136
- 7 Kondo T, Suda T, Fukuyama H, Adachi M, Nagata S. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat Med* 1997; 3: 409-413
- 8 Thirunavukkarasu C, Uemura T, Wang LF, Watkins SC, Gandhi CR. Normal rat hepatic stellate cells respond to endotoxin in LBP-independent manner to produce inhibitor(s) of DNA synthesis in hepatocytes. *J Cell Physiol* 2005; 204: 654-665
- 9 Riordan SM, Williams R. Mechanisms of hepatocyte injury, multiorgan failure, and prognostic criteria in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 203-215

■名词解释

- 1 内毒素: 是革兰氏阴性细菌细胞壁外层上的特有结构, 是重要的外源性致热原, 其主要的化学成份和产生毒性的主要物质是脂多糖(LPS).
- 2 肠源性内毒素血症: 是指由肠道来源的内毒素血症. 其主要的发病机制为: 肠道内毒素生成和摄取增多(肠道细菌移位); 肝脏对内毒素的清除功能减退等.
- 3 急性肝衰竭: 是指肝细胞在短期内大量死亡, 造成肝衰竭, 并且黄疸出现8 wk内发生中度以上的肝昏迷.

■同行评价

文章具有一定新颖性和可读性,达到国内先进水平.

- 10 Kobayashi M, Tsujitani S, Kurisu Y, Kaibara N. Bcl-2 and Bax expression for hepatocellular apoptosis in a murine endotoxin shock model. *Hepato-gastroenterology* 2002; 49: 1602-1606
- 11 Jaeschke H, Gujral JS, Bajt ML. Apoptosis and necrosis in liver disease. *Liver Int* 2004; 24: 85-89
- 12 Mathai JP, Germain M, Shore GC. BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. *J Biol Chem* 2005; 280: 23829-23836
- 13 孙敬方. 动物实验方法学. 第一版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 462-463
- 14 Morikawa A, Sugiyama T, Kato Y, Koide N, Jiang GZ, Takahashi K, Tamada Y, Yokochi T. Apoptotic cell death in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model. *Infect Immun* 1996; 64: 734-738
- 15 Denlinger LC, Garis KA, Sommer JA, Guadarrama AG, Proctor RA, Bertics PJ. Nuclear translocation of NF-kappaB in lipopolysaccharide-treated macrophages fails to correspond to endotoxicity: evidence suggesting a requirement for a gamma interferon-like signal. *Infect Immun* 1998; 66: 1638-1647
- 16 Morikawa A, Kato Y, Sugiyama T, Koide N, Chakravorty D, Yoshida 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
- 17 Nowak M, Gaines GC, Rosenberg J, Minter R, Bahjat FR, Rectenwald J, MacKay SL, Edwards CK 3rd, Moldawer LL. LPS-induced liver injury in D-galactosamine-sensitized mice requires secreted TNF-alpha and the TNF-p55 receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: R1202-R1209
- 18 Ksontini R, Colagiovanni DB, Josephs MD, Edwards CK 3rd, Tannahill CL, Solorzano CC, Norman J, Denham W, Clare-Salzler M, MacKay SL, Moldawer LL. Disparate roles for TNF-alpha and Fas ligand in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol* 1998; 160: 4082-4089
- 19 Solorzano CC, Ksontini R, Pruitt JH, Auffenberg T, Tannahill C, Galardy RE, Schultz GP, MacKay SL, Copeland EM 3rd, Moldawer LL. A matrix metalloproteinase inhibitor prevents processing of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and abrogates endotoxin-induced lethality. *Shock* 1997; 7: 427-431
- 20 Beutler B. Tlr4: central component of the sole mammalian LPS sensor. *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 20-26
- 21 Lang CH, Silvis C, Deshpande N, Nystrom G, Frost RA. Endotoxin stimulates *in vivo* expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, -6, and high-mobility-group protein-1 in skeletal muscle. *Shock* 2003; 19: 538-546
- 22 Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* 2003; 116: 4077-4085
- 23 Willis S, Day CL, Hinds MG, Huang DC. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. *J Cell Sci* 2003; 116: 4053-4056
- 24 Yan Liu X, Robinson D, Veach RA, Liu D, Timmons S, Collins RD, Hawiger J. Peptide-directed suppression of a pro-inflammatory cytokine response. *J Biol Chem* 2000; 275: 16774-16778
- 25 Tiegs G, Barsig J, Matiba B, Uhlig S, Wendel A. Potentiation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor of lipopolysaccharide toxicity in mice. *J Clin Invest* 1994; 93: 2616-2622
- 26 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493-501
- 27 Pan J, Xiang Q, Ball S. Use of a novel real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction method to study the effects of cytokines on cytochrome P450 mRNA expression in mouse liver. *Drug Metab Dispos* 2000; 28: 709-713
- 28 Kobayashi Y, Mori M, Naruto T, Kobayashi N, Sugai T, Imagawa T, Yokota S. Dynamic movement of cytochrome c from mitochondria into cytosol and peripheral circulation in massive hepatic cell injury. *Pediatr Int* 2004; 46: 685-692
- 29 Togo S, Kubota T, Matsuo K, Shimizu T, Momiyama N, Takeda K, Tanaka K, Endo I, Sekido H, Shimada H. Mechanism of liver failure after hepatectomy. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2004; 105: 658-663
- 30 Thomson RK, Arthur MJ. Mechanisms of liver cell damage and repair. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 949-955
- 31 Wang YM, Feng GH, Huang F, Li Y, Zhao GZ. Tumor necrosis factor-alpha, caspase-3 expression and hepatocyte apoptosis in fulminant hepatic failure. *Zhonghua Neike Zazhi* 2003; 42: 566-570

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

L02 细胞建立人鼠嵌合肝动物模型

林沪, 毛青, 王宇明, 蒋业贵, 邓国宏, 李俊刚, 刘国栋

林沪, 毛青, 王宇明, 蒋业贵, 邓国宏, 李俊刚, 刘国栋, 中国人民解放军第三军医大学西南医院感染病研究所 重庆市 400038

林沪, 男, 1970-01-08, 重庆市人, 汉族, 2003年第三军医大学西南医院感染病研究所硕士, 主治医师, 主要从事肝炎发病机制和病毒性肝炎动物模型的研究。

国家自然科学基金资助项目, No.30271173

通讯作者: 林沪, 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感染病研究所。linhu7018@yahoo.com.cn

电话: 023-65399064 传真: 023-68754475

收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-31

Establishment of an animal model of tolerant rats with chimeric human livers by human L02 hepatocytes

Hu Lin, Qing Mao, Yu-Ming Wang, Ye-Gui Jiang, Guo-Hong Deng, Jun-Gang Li, Guo-Dong Liu

Hu Lin, Qing Mao, Yu-Ming Wang, Ye-Gui Jiang, Guo-Hong Deng, Jun-Gang Li, Guo-Dong Liu, Institute of Infectious Disease, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30271173

Correspondence to: Hu Lin, Institution of Infectious Disease, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China. linhu7018@yahoo.com.cn
Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-10-31

Abstract

AIM: To investigate whether human L02 hepatocytes can survive after implantation to the normal, immunocompetent rats.

METHODS: Human L02 hepatocytes were injected into the peritoneal cavities of fetal Sprague Dawley rats to induce immune tolerance to human L02 hepatocytes. After DiI staining, the hepatocytes were implanted to the 2-week rats via the spleen. Immuno-fluorescent staining, SP immunohistochemistry, and DiI staining were used to detect human albumin and specific proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the rat liver. The distribution of human L02 hepatocytes was observed under fluorescent microscope.

RESULTS: Dynamic distribution of human L02 hepatocytes in the rat livers was observed from

1st to 10th week after implantation. Human albumin was detected at 2, 4, 6, and 8 wk, and the most content appeared at 4 wk. Specific human PCNA was detected in the rat livers from the 2nd to 6th week after implantation. There were the most PCNA positive cells at the 4th week.

CONCLUSION: Human L02 hepatocytes can survive for 10 wk and proliferate after implantation to the normal, immunocompetent rats.

Key Words: Chimeric liver; L02 hepatocytes; Animal model; Rats

Lin H, Mao Q, Wang YM, Jiang YG, Deng GH, Li JG, Liu GD. Establishment of an animal model of tolerant rats with chimeric human livers by human L02 hepatocytes. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):19-24

摘要

目的: 研究L02细胞移植到具有正常免疫活性的大鼠肝内的存活情况。

方法: SD大鼠出生前宫内腹腔注射正常人L02肝细胞, 诱导胎鼠对人L02肝细胞产生免疫耐受, 出生2 wk时经脾移植DiI染色后的人L02肝细胞, 建立人鼠嵌合肝动物模型。采用免疫荧光、SP免疫组化、DiI荧光示踪等方法, 分别检测人白蛋白、特异性人增殖细胞核抗原PCNA(proliferating cell nuclear antigen)以及在荧光显微镜下观察人L02肝细胞在鼠肝内的分布。

结果: 于移植后1, 2, 4, 6, 8, 10 wk在荧光显微镜下观察到人L02肝细胞在鼠肝内的动态分布; 移植后2, 4, 6, 8 wk大鼠均检测出人白蛋白, 4 wk时分泌最多; 移植后2, 4, 6 wk检测出特异性人增殖细胞核抗原PCNA, 以4 wk发现PCNA阳性细胞最多。

结论: 移植的人L02肝细胞在具有正常免疫活性的免疫耐受鼠体内能够存活、增殖, 并产生人白蛋白。

关键词: 嵌合肝; L02肝细胞; 动物模型; 大鼠

■背景资料

动物模型在了解和发展肝病学中发挥重要作用。人HBV的易感宿主只局限于人及黑猩猩等高级灵长类动物。黑猩猩、猕猴、长臂猿、树鼩等动物由于各种原因而受限。由于肝细胞移植的迅速发展, 人鼠嵌合肝动物模型日益成为热点。其受体可为免疫缺陷鼠或诱导免疫耐受鼠, 免疫缺陷鼠因不能应用于机体和病毒作用机制的研究而受限, 所以, 建立在正常免疫系统上的人鼠嵌合肝模型备受关注。

■ 研发前沿

肝细胞移植研究是当前最热门的研究课题,包括自体肝细胞、同种异体和异种肝细胞移植,相关技术发展迅速.肝细胞移植后会产生不同程度的排斥反应,异种肝细胞移植到有免疫活性的动物体内会因宿主免疫系统的T淋巴细胞激活和迟发性超敏反应而排斥供体细胞.动物在胚胎发育时期免疫系统尚未成熟,接触到外来抗原时,可能由于“T淋巴细胞克隆消除”的原因,会逐渐对这些抗原产生耐受,因此,先用人胎肝细胞诱导胎鼠对人肝细胞产生免疫耐受,再把人肝细胞移植到正常大鼠肝内,从而建立针对移植耐受的动物模型.

林沪,毛青,王宇明,蒋业贵,邓国宏,李俊刚,刘国栋. L02细胞建立人鼠嵌合肝动物模型. 世界华人消化杂志 2006;14(1):19-24

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/19.asp>

0 引言

肝炎病毒感染具有明显的种属特异性,其易感宿主局限于人及黑猩猩等高级灵长类动物,黑猩猩、猕猴、树鼩以及一些转基因动物模型等因为各种原因而限制了其应用^[1].肝细胞移植是当前最热门的研究课题,包括自体肝细胞、同种异体和异种肝细胞移植,相关技术发展迅速.人鼠嵌合肝是利用人肝细胞异种移植到受体鼠肝内建立的新型动物模型,解决了肝炎病毒感染的种属特异性问题,可应用于已知和未知肝炎病毒感染的研究.其受体可分为免疫缺陷小鼠^[2]或诱导免疫耐受大鼠^[3].我们采用宫内注射人L02肝细胞,诱导胎鼠对人L02肝细胞产生免疫耐受,出生后移植人L02肝细胞,从而建立人鼠嵌合肝动物模型.

1 材料和方法

1.1 材料 生育期SD大鼠6只,购自第三军医大学实验动物中心.交配后孕鼠单独关养.选择SD大鼠孕龄15-17 d,体质量250-300 g者为实验对象.SD孕鼠随机分2组,所产胎鼠各约30只:实验组胎鼠出生前经L02细胞诱导耐受,出生2 wk移植L02细胞;对照组胎鼠出生前经L02细胞诱导耐受,出生2 wk未移植L02肝细胞,以及正常生产的大鼠.人L02细胞属于人正常肝细胞,购自中国科学院上海细胞生物学研究所,液氮保存.实验前置于RPMI 1640培养液,加入胰酶酶解,移入离心管,加入PBS, 1 100 r/min,离心3 min,重复2次;重新混悬于培养液.于倒置相差显微镜下用血细胞计数板计算肝细胞的数量,台盼蓝拒染法计算胎肝细胞的存活率,超过80%的用于实验.

1.2 方法 诱导胎鼠免疫耐受.对孕龄15-17 d的SD大鼠进行乙醚吸入麻醉.碘复消毒皮肤,铺巾,自孕鼠腹白线逐层依次剪开,暴露子宫.用1 mL注射器将50 μ L人L02细胞培养液(含 1×10^8 个细胞)缓慢经孕鼠子宫壁注射到胎鼠腹腔内,逐层缝合孕鼠腹腔.至孕鼠自然生产. DiI荧光染色:用无水乙醇溶解DiI使浓度为1 mmol/L;用0.22 μ m的一次性过滤器过滤后,室温密闭避光保存;用时在1 mL细胞悬液中,加入5 μ L DiI 溶液,置37 $^{\circ}$ C 50 mL/L CO₂孵箱内孵育标记

40 min;将标记细胞进行离心, 1 100 r/min \times 3 min,共3次,弃去上清,每次均用37 $^{\circ}$ C预温PBS液重悬;经4 g/L台盼蓝染色计数后,用PBS液调整细胞浓度为 1.0×10^{12} /L;于荧光显微镜诺丹明滤片下进行荧光观察并照相后送移植.出生2 wk的实验组胎鼠,乙醚吸入麻醉,碘复消毒皮肤,铺巾,自孕鼠腹白线逐层依次剪开,暴露脾,自脾系膜缘进针,向脾体和脾尾方向,将100 μ L经DiI染色的L02细胞培养液缓慢注入,轻压注射点,防止出血和渗液. L02细胞移植后1 wk取标本,2 wk开始每2 wk取1次标本,每次每组取4只大鼠收集标本.大鼠在乙醚吸入麻醉下行肝部分切除术,新鲜肝组织送冰冻切片,在荧光显微镜诺丹明滤片下观察;部分组织用40 g/L中性福尔马林固定,送石蜡包埋切片做免疫组化染色.术后大鼠继续喂养.

1.2.1 DiI荧光示踪法 用DiI染色L02肝细胞后,移植前于荧光显微镜诺丹明滤片下观察; L02细胞移植后,大鼠取新鲜肝组织送冰冻切片,在荧光显微镜下观察.

1.2.2 免疫荧光检测肝组织人白蛋白 肝部分切除术获取新鲜肝组织,用冰冻切片4-8 μ m,室温放置30 min后,入4 $^{\circ}$ C丙酮固定10 min,37 $^{\circ}$ C下100 mL/L封闭血清孵育20 min以阻断非特异染色,滴加鼠抗人白蛋白单克隆抗体(Sigma公司,滴度1:400),37 $^{\circ}$ C孵育60 min或4 $^{\circ}$ C过夜,然后加荧光标记二抗(FITC标记山羊抗大鼠IgG,滴度1:100),37 $^{\circ}$ C暗室下孵育45 min.以上每步均用PBS洗涤.用900 mL/L缓冲甘油封片,荧光显微镜下用蓝色滤光片观察. PBS替代一抗作阴性对照.

1.2.3 检测肝组织特异性人PCNA 采用链霉菌亲生物素-过氧化酶法(SP法)免疫组织化学染色(PV-9000试剂盒,中山公司).肝部分切除术获取新鲜肝组织,用40 g/L中性福尔马林固定,石蜡包埋后切片,60 $^{\circ}$ C烤箱中烤1-2 h,脱蜡至水,加入含0.5 g/L的Triton \times 100的PBS室温下孵育5 min对细胞打孔,37 $^{\circ}$ C下30 mL/L过氧化氢孵育20 min阻断内源性过氧化物酶,特异性人增殖细胞核抗原单克隆抗体(Chemicon公司)4 $^{\circ}$ C过夜,然后加聚合物辅助剂和辣根酶标记羊抗鼠IgG多聚体.底物用DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片,光镜下观察. PBS替代一抗作阴性对照.

2 结果

若实验鼠太小,无法活体取肝组织且不易继续

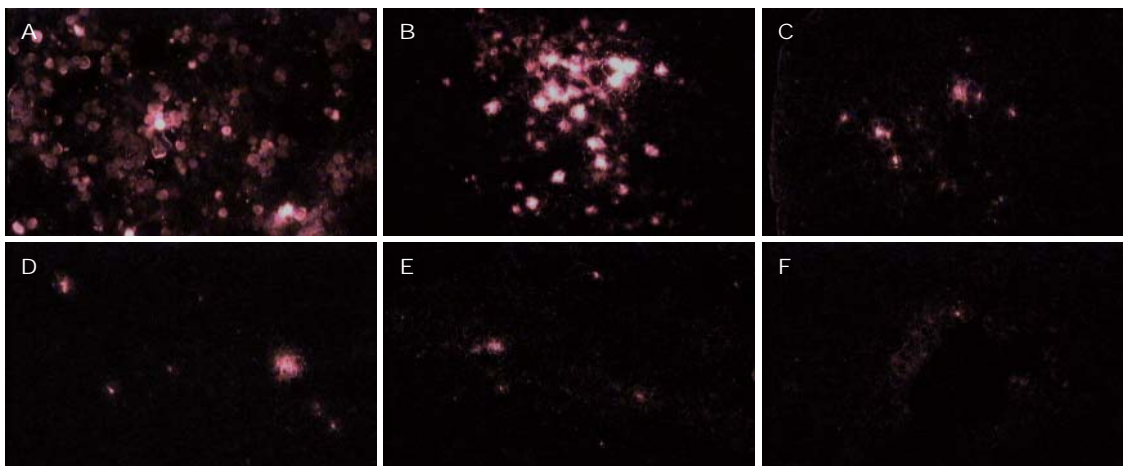


图 1 DiI染色L02细胞荧光图像 (×200). A: 培养皿中; B: 移植1 wk; C: 移植2 wk; D: 移植4 wk; E: 移植6 wk; F: 移植8 wk.

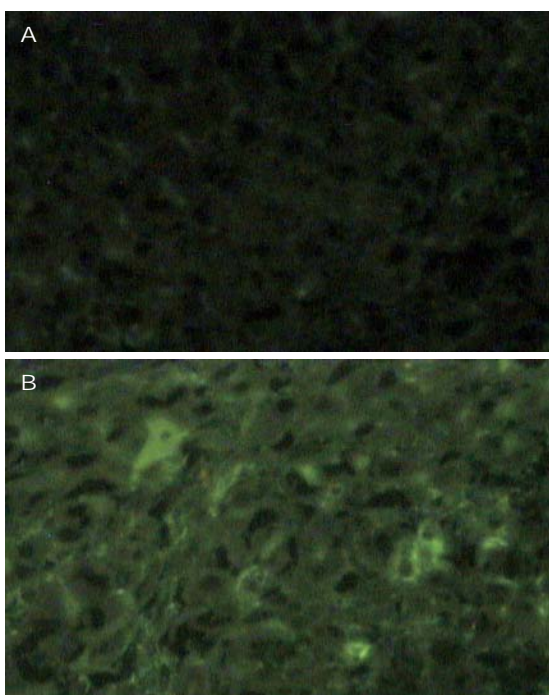


图 2 正常鼠和嵌合鼠肝组织的免疫荧光 (×400). A: 正常鼠肝组织; B: 移植4 wk嵌合鼠肝组织中胞质呈绿色的L02细胞.

喂养, 故在实验鼠出生2 wk时经脾移植L02细胞. 实验组1只大鼠因麻醉过量死亡; 对照组2只大鼠因麻醉过量死亡. 其余大鼠营养及生长状况良好.

DiI染色的阳性细胞在绿色滤光片下显示红色荧光, 细胞均匀着色呈圆形或椭圆形, 不能区分胞核与胞质. 实验组的4只实验大鼠1, 2, 4, 6, 8 wk均可检测出(图1), 10 wk有2只大鼠可见较微弱的荧光细胞, 其他2只均阴性, 4只大鼠12 wk均未再检出. DiI荧光示踪显示荧光细胞移植到大鼠肝后, 数目逐渐减少, 亮度逐渐减弱. 移植后1 wk的DiI荧光显示: 荧光染色区域较多,

有的区域密集分布, 荧光亮度大, 提示移植的L02肝细胞较多; 有的区域散在分布, 提示移植的L02肝细胞相对较少. 移植后2 wk和4 wk的DiI荧光显示: 荧光染色区域较多, 未见密集分布, 可见荧光散在分布. 移植后8 wk的DiI荧光显示: 荧光细胞较少, 可见少量荧光点状分布, 荧光亮度明显减弱. 对照组大鼠未见荧光L02细胞.

2.1 鼠肝组织中人白蛋白 FITC标记荧光二抗, 阳性细胞在蓝色滤光片下显示为绿色荧光. 与周围大鼠肝细胞界限清楚, 胞核未着色. 移植L02细胞后2 wk的大鼠肝组织中即能检测到合成人白蛋白的L02细胞; 实验组的4只实验大鼠2, 4, 6 wk均可检测出合成人白蛋白的L02细胞, 以4 wk发现绿色荧光细胞最多(图2); 8 wk有3只大鼠可见绿色荧光细胞, 1只为阴性. 4只大鼠10 wk均未再检出. 对照组的大鼠未能发现绿色荧光的L02细胞.

2.2 特异性人PCNA 特异性人PCNA阳性的细胞核DAB显色后为棕色. 移植L02细胞后2 wk的大鼠肝组织中能检测到特异性人PCNA; 实验组的4只实验大鼠2, 4, 6 wk均可连续检测出特异性人PCNA, 以4 wk发现PCNA阳性细胞最多(图3). 4只大鼠8 wk均未再检出. 对照组的大鼠未能发现细胞核为棕色的特异性人PCNA.

3 讨论

肝细胞移植后会产生不同程度的排斥反应, 异种肝细胞移植到有免疫活性的动物体内会因宿主免疫系统的T淋巴细胞激活和迟发性超敏反应而排斥供体细胞^[4], 为建立长期有效的动物模型, 可选用免疫缺陷鼠, 或在正常免疫系统上诱导针对移植物种特异耐受的老鼠. 但是, 因免疫系

■ 相关报道
为进一步了解相关内容, 可查阅近期国外报道的参考文献:

- 1 Mizuguchi T, Mitaka T, Katsuramaki T, Hirata K. Hepatocyte transplantation for total liver repopulation. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2005; 12: 378-385
- 2 Koenig S, Stoesser C, Krause P, Becker H, Markus PM. Liver repopulation after hepatocellular transplantation: integration and interaction of transplanted hepatocytes in the host. *Cell Transplant* 2005; 14: 31-40

■创新盘点

诱导免疫耐受的人鼠嵌合肝动物模型在国内报道较少,本研究进一步完善了对动物模型的检测手段,DiI示踪法动态显示了移植胎肝细胞在受体大鼠体内的生存及分布;PCNA检测了人肝细胞在嵌合肝中的增殖情况;免疫荧光对人肝组织白蛋白的检测,以上方法证明了L02细胞在具有正常免疫活性的人鼠嵌合肝内能够存活、增殖,并具有一定的生物学功能。

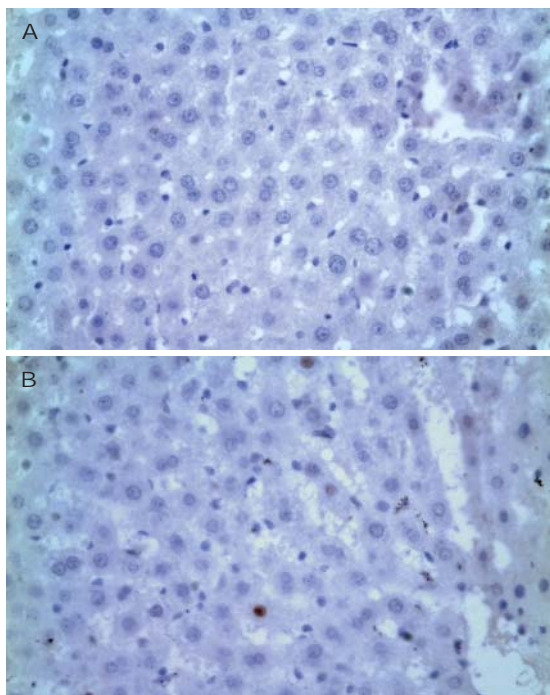


图3 正常鼠肝组织与嵌合鼠肝组织中的L02细胞($\times 400$)。A: 正常鼠肝组织; B: 移植4 wk嵌合鼠肝组织中胞核呈棕色的L02细胞。

统在肝炎病毒的发病机制中占重要地位,免疫缺陷小鼠杂交的紊乱及新生SCID小鼠较高的死亡率,使其操作较困难^[5],所以,免疫缺陷鼠因不能应用于机体和病毒作用机制的研究而受限^[6]。目前已有文献报道用宫内注射人造血干细胞的方法建立小鼠、绵羊等嵌合肝动物模型^[7-9],这类动物对于外源基因及其表达产物都产生了免疫耐受^[10-12]。国外近期有报道称生前胚胎免疫耐受的宿主可避免发生免疫排斥反应^[13],由于我们的人鼠嵌合肝模型建立在正常免疫系统上,嵌合于鼠肝细胞中的是正常人肝细胞,对多种肝炎致病因子易感,因此可利用人鼠嵌合肝模型进行已知和未知肝炎致病因子的研究。动物在胚胎发育时期免疫系统尚未成熟,接触到外来抗原时,可能由于“T淋巴细胞克隆消除”的原因^[14],会逐渐对这些抗原产生耐受,因此,先用人胎肝细胞诱导胎鼠对人肝细胞产生免疫耐受,再把人肝细胞移植到正常大鼠肝内,从而建立针对移植耐受的动物模型^[15]。Ouyang *et al*^[16]采用孕15-17 d大鼠宫内胚胎腹腔注射人胎肝细胞,出生后经脾移植人胎肝细胞,首次建立了人鼠嵌合肝模型,发现人白蛋白阳性持续6 wk,我们的实验结果与其一致。

应用标记技术,在荧光显微镜下移植肝细胞与受体肝细胞较易区别,能直观地监测移植

肝细胞的功能与转归、分布与存活。国内较少使用荧光染料DiI标记肝细胞进行示踪研究。DiI是一种亲脂性碳花青荧光染料,易嵌入生物膜内并在膜内作侧向扩散运动,或者通过胞饮作用进入胞质,从而标记整个细胞^[17]。DiI使用简便,染色速度快,一般只需1-20 min就可以使活体细胞均匀着色;对活体细胞无毒性,而且不从已标记的细胞转移到未标记的细胞,且荧光衰减慢^[18],因此,DiI是一种可靠的荧光染料。1986年Honig *et al*^[19]首先将DiI引入神经系统的研究,成功地显示了体外培养神经元的胞体和突起,此后,DiI被广泛应用于神经通路的发育研究。Soriano *et al*^[20]首先发现DiI亦可标记肝细胞,从肝实质中辨别出被移植的肝细胞。我们运用DiI对SD大鼠进行脾内肝细胞移植示踪观察,发现经DiI标记的肝细胞容易从宿主组织中辨认出来,荧光L02细胞移植到鼠肝后,数目逐渐减少,亮度逐渐减弱,移植8 wk的荧光亮度明显减弱,荧光点明显减少,可能因为细胞分裂,也可能意味着细胞死亡或其碎片为吞噬细胞吞噬。DiI动态显示了L02细胞的分布,该荧光剂显示时间较长,较好显示了L02细胞整合后的存活情况。同时,通过免疫组化观察发现,植入肝细胞还表达了合成白蛋白及增殖功能。该实验显示了DiI标记技术会因移植细胞增殖而造成荧光衰减,并在我所体外传代实验中证实,故该标记技术有待进行深入研究。

肝细胞的主要功能之一是合成白蛋白,所以白蛋白的合成是判断肝细胞功能非常敏感的指标,采用免疫组化技术从移植后2, 4, 6, 8 wk大鼠肝组织中检测出人白蛋白,而对对照组大鼠肝组织中无表达,证明L02细胞不仅在大鼠肝组织中存活,而且具有正常人肝细胞一定的生物学功能。特异性人增殖期细胞核抗原PCNA又称周期蛋白,是DNA聚合酶 δ 的一个亚基,在静止期细胞中,其量很少,G1晚期开始增加,S期达到高峰,G2-M明显下降^[21]。一般认为他可作为评价人移植肝细胞增殖状态的指标^[22]。我们从移植后2, 4, 6 wk大鼠肝组织中检出细胞核为棕色的PCNA阳性细胞,表明此期间嵌合鼠体内有处于增殖期的人肝细胞存在,说明PCNA单克隆抗体免疫组化研究方法简便,阳性结果肯定,用PCNA评价细胞的增殖状态具有实用性和可行性^[23]。

脾内肝细胞移植为效果比较确切的方法。肝细胞脾内植入后随即迁移到受体肝窦内,但

大约70%被门静脉血内的巨噬细胞清除, 残留的移植肝细胞在穿过肝窦内皮层时失去其细胞膜缝隙连接, 这些细胞合成血管内皮生长因子及获得细胞膜再生^[24], 在移植5 d后可观察到移植的肝细胞与宿主肝细胞间的缝隙连接及胆管样结构的重构, 意味着移植细胞成功整合需要5 d以上^[25]. 移植肝细胞与宿主肝整合后, 可表达出白蛋白、胆汁的代谢和酶等功能. 我们在第1周未能测出人白蛋白及特异性人PCNA, 而荧光示踪可见阳性, 提示移植L02细胞虽已转移并整合至鼠肝内, 但尚未具备合成白蛋白和增殖的功能. 我们证实用人L02细胞宫内诱导胎鼠产生免疫耐受, 出生后移植到实验鼠肝内, 可成功建立针对移植耐受的动物模型. 移植的L02细胞可以在嵌合鼠体内整合、增殖, 并具有一定的生物学功能. 通过不同时相点对4只实验鼠的检测, 发现人L02细胞在正常免疫活性的大鼠肝内存活未超过10 wk, 而国外报道其存活时间超过16 wk^[26]. 为提高移植肝细胞在宿主肝内的生存时间和比例, 有待进一步应用倒千里光碱^[27-29]等方法促进移植肝细胞的增殖, 从而建立长期有效的动物模型. 构建在正常免疫系统基础上的动物模型, 不再需要宿主的免疫缺陷或实施免疫抑制, 避免了免疫排斥的发生, 能够模拟病毒感染的全过程, 为进一步研究病毒性、代谢性肝病的发病机制、治疗药物及疫苗开发提供新的技术手段, 具有良好的前景与发展意义.

4 参考文献

- Dandri M, Burda MR, Gocht A, Torok E, Pollok JM, Rogler CE, Will H, Petersen J. Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepadnavirus infection and mouse liver repopulation after cryopreservation. *Hepatology* 2001; 34: 824-833
- Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, Douglas DN, Hao C, Rinfret A, Addison WR, Fischer KP, Churchill TA, Lakey JR, Tyrrell DL, Kneteman NM. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001; 7: 927-933
- Wu CH, Ouyang EC, Walton C, Wu GY. Human hepatocytes transplanted into genetically immunocompetent rats are susceptible to infection by hepatitis B virus *in situ*. *J Viral Hepat* 2001; 8: 111-119
- Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000; 174: 21-34
- Brass V, Blum HE, Moradpour D. Of mice and men: a small animal model of hepatitis C virus replication. *Hepatology* 2002; 35: 722-724
- Zhu Y, Yamamoto T, Cullen J, Saputelli J, Aldrich CE, Miller DS, Litwin S, Furman PA, Jilbert AR, Mason WS. Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J Virol* 2001; 75: 311-322
- Casal ML, Wolfe JH. In utero transplantation of fetal liver cells in the mucopolysaccharidosis type VII mouse results in low-level chimerism, but overexpression of beta-glucuronidase can delay onset of clinical signs. *Blood* 2001; 97: 1625-1634
- Huang SZ, Huang Y, Chen MJ, Zeng FY, Ren ZR, Zeng YT. Selection of in vitro produced, transgenic embryos by nested PCR for efficient production of transgenic goats. *Theriogenology* 2001; 56: 545-556
- Noia G, Pierelli L, Bonanno G, Monego G, Perillo A, Rutella S, Cavaliere AF, Straface G, Fortunato G, Cesari E, Scambia G, Terzano M, Iannace E, Zelano G, Michetti F, Leone G, Mancuso S. The intracoeleomic route: a new approach for in utero human cord blood stem cell transplantation. *Fetal Diagn Ther* 2004; 19: 13-22
- Tran ND, Porada CD, Zhao Y, Almeida-Porada G, Anderson WF, Zanjani ED. In utero transfer and expression of exogenous genes in sheep. *Exp Hematol* 2000; 28: 17-30
- Tran ND, Porada CD, Almeida-Porada G, Glimp HA, Anderson WF, Zanjani ED. Induction of stable prenatal tolerance to beta-galactosidase by in utero gene transfer into preimmune sheep fetuses. *Blood* 2001; 97: 3417-3423
- Porada CD, Park P, Almeida-Porada G, Zanjani ED. The sheep model of in utero gene therapy. *Fetal Diagn Ther* 2004; 19: 23-30
- Wu CH, Ouyang EC, Walton C, Wu GY. Liver cell transplantation - novel animal model for human hepatic viral infections. *Croat Med J* 2001; 42: 446-450
- Kim HB, Shaaban AF, Milner R, Fichter C, Flake AW. In utero bone marrow transplantation induces donor-specific tolerance by a combination of clonal deletion and clonal anergy. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 726-729
- Wu GY, Konishi M, Walton CM, Olive D, Hayashi K, Wu CH. A novel immunocompetent rat model of HCV infection and hepatitis. *Gastroenterology* 2005; 128: 1416-1423
- Ouyang EC, Wu CH, Walton C, Promrat K, Wu GY. Transplantation of human hepatocytes into tolerized genetically immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 324-330
- Gerashchenko BI, Howell RW. Flow cytometry as a strategy to study radiation-induced bystander effects in co-culture systems. *Cytometry A* 2003; 54: 1-7
- Zhou BJ, Zhong CP, Gu YD, Zhang XH, Liang CM, Wu CQ. Effects of hepatectomized rat serum on the transdifferentiation of adult rat bone marrow cells into hepatocyte-like cells. *Zhonghua Ganzhangbing Zazhi* 2004; 12: 730-733
- Honig MG, Hume RI. Fluorescent carbocyanine dyes allow living neurons of identified origin to be studied in long-term cultures. *J Cell Biol* 1986; 103: 171-187
- Soriano HE, Lewis D, Legner M, Brandt M, Baley P, Darlington G, Finegold M, Ledley FD. The use of DiI-marked hepatocytes to demonstrate orthotopic, intrahepatic engraftment following hepatocellular transplantation. *Transplantation* 1992; 54: 717-723
- Majka J, Burgers PM. The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2004; 78: 227-260
- Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and *in situ* hybridization for histo-

■应用要点

构建在正常免疫系统基础上的人鼠嵌合肝动物模型, 可用于已知和未知肝炎致病因子的研究, 为研究病毒感染免疫应答、致病机制、抗病毒治疗和开发强效疫苗提供良好的平台.

■名词解释

“人鼠嵌合肝”是利用人肝细胞异种移植方法建立的新型动物模型,是人肝细胞移植后在受体鼠体内形成的含有人和鼠两种肝细胞及其立体结构的混合肝。目前成功应用的是成年人肝细胞或胚胎肝细胞,受体为免疫缺陷小鼠或诱导免疫耐受大鼠。二者均能初步建立HBV感染的人鼠嵌合肝动物模型。

- ne mRNA. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 1681-1688
- 23 Zhou JM, Zhou JH, Deng ZH, Zheng H, Jiang HY, Cao HQ. Expression of survivin and proliferating cell nuclear antigen in human non-small cell lung cancer. *Zhongnan Daxue Xuebao Yixueban* 2005; 30: 544-548
- 24 Gupta S, Lee CD, Vemuru RP, Bhargava KK. 111Indium labeling of hepatocytes for analysis of short-term biodistribution of transplanted cells. *Hepatology* 1994; 19: 750-757
- 25 Koenig S, Stoesser C, Krause P, Becker H, Markus PM. Liver repopulation after hepatocellular transplantation: integration and interaction of transplanted hepatocytes in the host. *Cell Transplant* 2005; 14: 31-40
- 26 Wu CH, Ouyang EC, Walton C, Promrat K, Forouhar F, Wu GY. Hepatitis B virus infection of transplanted human hepatocytes causes a biochemical and histological hepatitis in immunocompetent rats. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 978-983
- 27 Laconi E, Laconi S. Principles of hepatocyte repopulation. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 433-438
- 28 Laconi S, Pillai S, Porcu PP, Shafritz DA, Pani P, Laconi E. Massive liver replacement by transplanted hepatocytes in the absence of exogenous growth stimuli in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 2001; 158: 771-777
- 29 Zheng YW, Ohkohchi N, Taniguchi H. Quantitative evaluation of long-term liver repopulation and the reconstitution of bile ductules after hepatocellular transplantation. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6176-6181

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

·消息·

国际肝胆胰协会中国分会第二届全国学术研讨会 暨第三届全国普通外科主任论坛第一轮通知

本刊讯 第二届国际肝胆胰协会中国分会学术会议将于2006-10在武汉举行。

在各方面的大力支持下,国际肝胆胰协会中国分会第一届学术研讨会已于2004-12在武汉成功举办,与会代表一千余人,中国人大副委员长吴阶平院士、国际肝胆胰前主席刘允怡教授、Jim Tooli教授,国际肝胆胰协会候任主席Büechler教授和欧洲肝胆胰协会主席Broelsch教授等亲自到会。会议受到国内外专家及到会代表的一致赞赏,并受到国际肝胆胰协会的通报好评,会议取得巨大成功。

第二届会议将邀请国外和国内著名专家做专题讲座,针对国际国内肝胆胰外科进展及近年来的热点、难点问题进行讨论;并交流诊治经验,推广新理论、新技术、新方法,了解国内外肝胆胰疾病诊断、治疗发展趋势;同时放映手术录像。大会热烈欢迎全国各地肝胆胰领域的内科、外科、影像科各级医师以及科研人员积极投稿和报名参加。

会议同时召开第三届全国普外科主任论坛,因此也欢迎从事医疗卫生管理的各级医院正、副院长及正、副主任积极投稿和报名参加。

本次会议已列入2006年国家继续医学教育项目,参会代表均授予国家级继续医学教育学分10分。

来稿要求:寄全文及500-800字论文摘要,同时寄论文的软盘一份或发电子邮件。以附件的形式发送至 chenxp@medmail.com.cn,也可将稿件打印后寄至:武汉市解放大道1095号,武汉华中科技大学附属同济医院肝胆胰外科研究所张志伟、黄志勇副教授(收),邮编:430030;联系电话:027-83662599。

苦参碱对大鼠供肝冷保存再灌注损伤中肝细胞凋亡及调控基因表达的影响

朱新华, 仇毓东, 史敏科, 丁义涛

朱新华, 仇毓东, 史敏科, 丁义涛, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008
朱新华, 男, 1975-10-18生, 江苏省南通市人, 汉族, 2003年南京大学博士, 主治医师, 主要从事肝脏移植及原发性肝癌的临床和基础研究工作。
江苏省中医药管理局资助项目, SZ9902
通讯作者: 仇毓东, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科. yudongqiu510@hotmail.com
电话: 025-83304616 传真: 025-83317016
收稿日期: 2005-08-29 接受日期: 2005-09-27

Effects of matrine on apoptosis of hepatocytes and expression of regulating gene during cold preservation and reperfusion injury in rat donor liver

Xin-Hua Zhu, Yu-Dong Qiu, Min-Ke Shi, Yi-Tao Ding

Xin-Hua Zhu, Yu-Dong Qiu, Min-Ke Shi, Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China
Supported by the Traditional Chinese Medicine Administration Bureau of Jiangsu Province, No SZ9902
Correspondence to: Dr. Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yudongqiu510@hotmail.com
Received: 2005-08-29 Accepted: 2005-09-27

Abstract

AIM: To investigate the effect of Matrine on the apoptosis of hepatocytes and expression of regulating gene during cold preservation and reperfusion injury in rat orthotopic liver transplantation (OLT).

METHODS: Eighty-four syngeneic SD rats were randomly divided into control, Matrine, and pseudo-treatment group. The rats in Matrine group were treated with low (40 mg/kg) and high dose (80 mg/kg) of Matrine, respectively. After the donor liver was preserved in Ringer's (LR) solution for 5 h, the orthotopic implantation was performed. Four and 24 h after reperfusion

of the portal vein, the serum and tissue samples were collected for analysis. The cell apoptosis was detected by TUNEL, and the expression of Fas-L and Bcl-2 protein were determined by flow cytometry. The histopathological changes were observed under light and electron microscope.

RESULTS: In comparison with that in the control group, the apoptosis index was significantly decreased in low and high dose Matrine treatment group (6.07 ± 1.68 , 6.17 ± 0.83 vs 14.87 ± 2.10 , $P < 0.01$), while the level of Bcl-2 expression was markedly elevated (59.32 ± 14.09 , 58.90 ± 16.70 vs 17.00 ± 8.01 , $P < 0.01$). The expression of FasL was not notably different between the control and Matrine group. The apoptosis index, Bcl-2 and FasL expression had no distinct difference between low and high dose treatment group either. The pathological changes of liver cells were severe in the control group, but they were obviously ameliorated in Matrine group.

CONCLUSION: Matrine can protect hepatocytes against apoptosis by inhibiting the Bcl-2 expression during cold preservation and reperfusion injury.

Key Words: Liver transplantation; Matrine; Reperfusion injury; Apoptosis; Rats

Zhu XH, Qiu YD, Shi MK, Ding YT. Effects of matrine on apoptosis of hepatocytes and expression of regulating gene during cold preservation and reperfusion injury in rat donor liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):25-28

摘要

目的: 探讨苦参碱对大鼠原位肝移植供肝冷保存再灌注损伤中肝细胞凋亡及调控基因表达的影响。

方法: 应用延长保存的大鼠原位肝移植模型, 大鼠84只随机分为对照组、低剂量苦参碱治疗组(40 mg/kg)、高剂量苦参碱治疗组(80 mg/kg)和假手术组, 将供肝在4℃林格液中保存5 h后植入受体, 各组大鼠于再灌注后4和

背景资料

临床广泛应用的苦参碱药理学结构明确, 在前期研究中已明确其对供肝冷保存再灌注损伤具有保护作用, 本文进一步探讨苦参碱对供肝冷保存再灌注中肝细胞凋亡的影响。

■ 研究前沿

供肝冷保存再灌注损伤及防治一直是肝移植领域的研究难点,其中肝细胞凋亡机制正成为研究热点。苦参碱免疫抑制、抗炎抗氧化等药理学作用在移植领域的应用越来越广泛。

24 h后取样。采用TUNEL法分别检测移植术后肝细胞凋亡,流式细胞仪检测凋亡相关基因Bcl-2, FasL蛋白的表达,光镜下观察移植肝脏病理形态学的改变。

结果:与对照组比较,苦参碱低、高剂量治疗组术后肝脏细胞凋亡指数显著降低($6.07 \pm 1.68, 6.17 \pm 0.83$ vs $14.87 \pm 2.10, P < 0.01$),肝组织Bcl-2表达增加($59.32 \pm 14.09, 58.90 \pm 16.70$ vs $17.00 \pm 8.01, P < 0.01$),但FasL表达量无显著差异($P > 0.05$),肝细胞凋亡指数、Bcl-2和FasL表达在苦参碱低、高剂量组间也无显著差异。对照组肝细胞损伤的病理表现相当严重,而治疗组的病理表现显著改善。

结论:苦参碱通过促进抑制凋亡基因Bcl-2的表达来抑制冷保存再灌注导致的肝细胞凋亡。

关键词:肝移植;苦参碱;再灌注损伤;凋亡;大鼠

朱新华,仇毓东,史敏科,丁义涛.苦参碱对大鼠供肝冷保存再灌注损伤中肝细胞凋亡及调控基因表达的影响.世界华人消化杂志 2006;14(1):25-28

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/25.asp>

0 引言

在原位肝移植过程中,供肝冷保存和门静脉阻断是两个不可避免的操作,故研究减轻移植肝脏的再灌注损伤具有重要意义。供肝冷保存再灌注损伤是一个由多因素参与的复杂的病理过程,其中肝细胞凋亡发挥着重要作用。苦参碱为中药苦参提取的有效成分,其基本结构为苦参次碱-15酮,具有抗炎抗氧化、免疫抑制、保肝等药理作用^[1,2],且无明显的毒副作用^[3]。苦参碱能显著抑制库氏细胞激活,降低血中肿瘤坏死因子和白介素-6水平^[4],这就表明苦参碱有可能对移植肝脏再灌注损伤有保护作用。我们采用大鼠原位肝移植模型,研究苦参碱对供肝冷保存再灌注中肝细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂健康SD大鼠84只(购自南京军区总医院动物实验中心),体质量200-220 g,随机分为对照组、小剂量治疗组、大剂量治疗组和假手术组。各组有大鼠12对。大鼠原位肝移植模型参照改良Kamada法^[5]进行。各组供肝取出后均置于4℃林格液中保存5 h再植入受体。受体门静脉阻断时间16-18 min。小剂量治疗组受体术前0.5 h ip苦参碱(购自广州明兴制药厂)40 mg/kg;

大剂量治疗组术前0.5 h ip苦参碱80 mg/kg;对照组同法注入生理盐水1 mL;假手术组方法同肝移植受体的肝脏游离,只是不作肝切除,目的是进行正常对照,以排除手术因素或肝动脉结扎对实验的影响。各组大鼠于再灌注后4和24 h分别取6只经下腔静脉取血4 mL,离心(4℃, 3 000 r/min)10 min后,取上清置于-70℃冰箱保存,采用全自动生化分析仪测定谷丙转氨酶(ALT)。同时于再灌注后4 h分别取肝中叶组织适量快速置于液氮及40 g/L中性甲醛中保存待测。

1.2 方法

1.2.1 TUNEL法检测肝细胞凋亡 肝组织石蜡切片厚4 μm,采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TUNEL)检测。按细胞凋亡检测试剂盒(购自北京中山生物制剂有限公司)操作说明进行操作。阳性细胞表现为细胞核呈棕黄色着色。每张切片光镜(20×15倍)观察10×500个细胞,计算每100个细胞中平均阳性细胞数,即凋亡指数(apoptosis index, AI)。

1.2.2 流式细胞仪检测Fas L蛋白表达 分别于再灌注后4 h取各组大鼠肝组织约0.5 g在平面皿上剪成碎块,置100目及260目铜/尼龙网上,以镊子夹持摩擦,同时用PBS洗下搓下的细胞,放入10 mL试管内,离心1 500 r/min, 5 min。去上清, PBS洗2次。调整细胞密度为 10^{12} /L,分2管,每管加细胞悬液20 μL,其中一管加Fas L-FITC标记抗体(鼠抗人),一管加IgG₁-FITC(羊抗鼠)阴性对照。室温避光30 min。上机前用标准荧光微球调整仪器,使变异系数在2.0%以内。上FAC Scan流式细胞仪后收集1 000个细胞,荧光强度以对数放大。光散射数据存入软盘。测试完后在计算机上用Cell Quest Plot软件(美国BD公司产)分析数据,由HP1200c/ps打印机打印结果。另一管加Bcl-2-FITC标记抗体(鼠抗人),一管加IgG-FITC(羊抗鼠)阴性对照。室温避光30 min,待检。FAC Scan流式细胞仪检测同上。

1.2.3 肝脏病理检查 再灌注后4 h处死大鼠,各取前叶肝组织石蜡切片厚4 μm, HE染色,光镜下观察肝脏组织的病理形态学变化。另取前叶1-2 mm见方肝组织放入4℃ 20 g/L戊二醛液中固定,经锇酸后固定,乙醇脱水,环氧树脂Epon 618包埋,用AO-E型超薄切片机超薄切片,铅铀双染,在JEM-1200EX型透射电镜下观察。

统计学处理 所有数据以mean±SD表示,采用SAS软件方差分析Student-Newman-Keuls法进行统计分析。

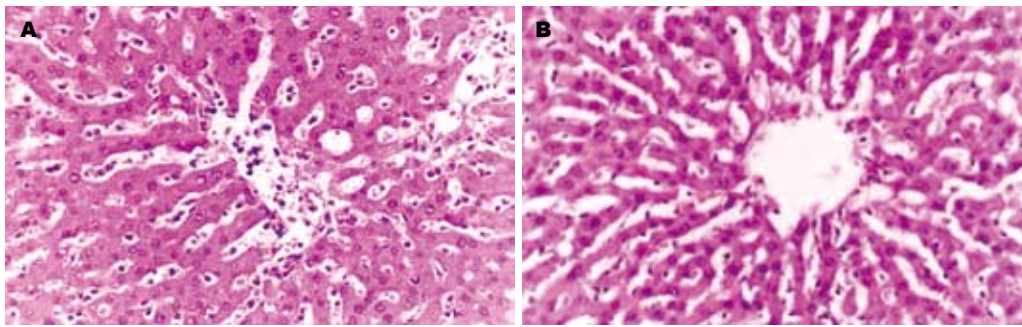


图1 光镜下大鼠肝组织病理变化(H&E × 200)。A: 对照组大鼠术后4 h肝窦内淤血、肝细胞灶性坏死、炎性细胞浸润及SEC肿胀脱落; B: 小剂量苦参碱治疗组大鼠术后4 h。

■ 相关报道

本文作者已在前期研究中发现苦参碱对供肝肝窦内皮细胞及枯否氏细胞的保护作用, 详见正文。

表1 大鼠原位肝移植术后血清ALT和细胞凋亡指数(AI)的变化(mean ± SD, n = 6)

分组	ALT (nkat/L)		AI
	4 h	24 h	
对照组	15 306.4 ± 4 856.0	13 262.7 ± 1 048.5	14.87 ± 2.10
小剂量治疗	8 385.0 ± 980.2 ^b	6 282.9 ± 985.2 ^b	6.07 ± 1.68 ^b
大剂量治疗	3 607.4 ± 825.2 ^{bc}	2 562.2 ± 348.4 ^{bd}	6.17 ± 0.83 ^b
假手术	1 080.2 ± 141.7	856.8 ± 93.4	1.20 ± 0.37

^bP<0.01 vs 对照组; ^cP<0.05, ^dP<0.01 vs 小剂量治疗组。

表2 大鼠原位肝移植术后肝组织Bcl-2和FasL的变化(mean ± SD, n = 6)

分组	Bcl-2 (%)	FasL (%)
对照组	17.00 ± 8.01	15.40 ± 6.65
小剂量治疗	59.32 ± 14.09 ^b	7.82 ± 2.28
大剂量治疗	58.90 ± 16.70 ^b	10.76 ± 5.42
假手术	38.18 ± 15.00	9.40 ± 3.65

^bP<0.01 vs 对照组。

2 结果

与假手术组比较, 治疗组和对照组移植术后ALT值均升高。两治疗组术后4 h和24 h的ALT值均显著低于对照组($P<0.01$), 且两治疗组间术后4 h和24 h的ALT值也有显著差异(分别为 $P<0.05$ 和 $P<0.01$, 表1)。

2.1 TUNEL法检测细胞凋亡情况 假手术组凋亡细胞极少, 而对照组再灌注后2 h可见较多散在的肝实质细胞凋亡, 亦可见少量染色阳性的肝窦内皮细胞。两治疗组凋亡的肝细胞明显减少, 其AI均显著降低($P<0.01$), 而两治疗组AI相比无显著差异(表1)。

2.2 肝组织Bcl-2、FasL的表达 与假手术组比较, 对照组移植术后Bcl-2表达减少, 而两治疗组表达增加。两治疗组术后Bcl-2表达较对照组显著增加($P<0.01$, 表2), 而两治疗组间比较无显著差异。与对照组比较, 两治疗组移植术后FasL表达

减少, 但统计学分析无显著差异($P>0.05$), 两治疗组间比较也无显著差异。

2.3 病理检查 光镜下假手术组肝组织结构基本正常, 对照组可见肝细胞灶性坏死, 伴大量中性粒细胞及单核细胞浸润, 肝窦内皮细胞受损, 与Disse间隙脱离, 库氏细胞增生明显(图1A)。小剂量治疗组可见少数肝细胞呈空泡变性, 无肝细胞坏死, 炎性细胞浸润明显减少, 库氏细胞大致正常(图1B)。大剂量治疗组形态学改变与小剂量治疗组相似。电镜下, 与假手术组相比较, 对照组肝细胞核皱缩, 染色质浓集, 线粒体肿胀, 嵴结构不清, 粗面内质网扩大成指状(图2A), Kupffer细胞明显活跃, 肝窦内皮细胞不连续, 高度肿胀; 治疗组肝细胞核圆居中, 线粒体和粗面内质网结构清晰(图2B), 肝窦内皮细胞基本完整, 未见明显肿胀。

3 讨论

现在认为肝细胞凋亡是供肝缺血再灌注损伤的一种表现形式^[6-8]。凋亡细胞呈胞核皱缩, 核染色质广泛浓缩、边集, 胞质浓缩但细胞器仍保持结构完整, 细胞膜形成多个芽突, 随后分裂为一个或多个有生物膜包被的特征性凋亡小体^[9]。各种损伤因素可以通过上调凋亡基因蛋白如Fas/FasL、Bax等的表达, 进而激活细胞内水解酶系引起钙离子大量内流, 引发线粒体膜通

■ 创新盘点

本研究在国内首次将苦参碱应用于防治供肝冷保存再灌注损伤的基础研究, 并且对作用机制进行深入探讨。

应用要点

苦参碱作为药物的单体成分,其化学结构及药理作用机制明确,副作用很小,并已制备出多种剂型供临床选用,临床应用前景较广泛。

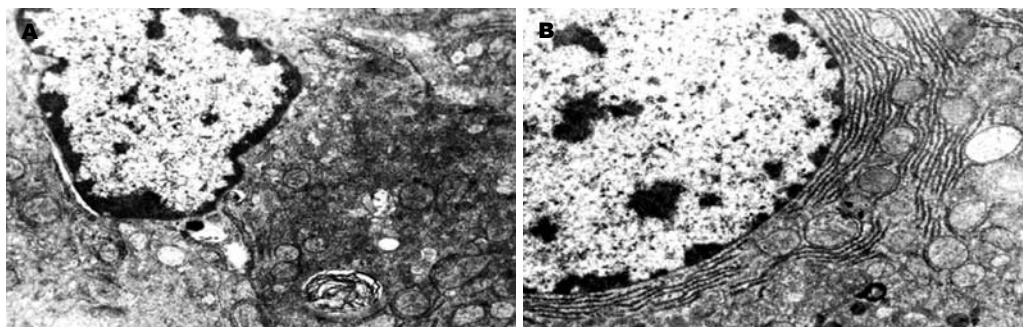


图 2 电镜下大鼠肝细胞微结构的变化 ($\times 6000$)。A: 对照组大鼠术后4 h肝细胞核不规则, 线粒体部分空泡化, 粗面内质网棒状, 可见髓鞘样结构; B: 小剂量苦参碱治疗组大鼠术后4 h肝细胞核圆居中, 粗面内质网发达, 线粒体圆形, 溶酶体散在。

透性增加和功能丧失,使其释放细胞色素C而最终导致细胞凋亡^[10]。细胞凋亡是肝细胞的死亡方式之一,过度凋亡可引起肝功能损害。我们采用TUNEL方法对各组大鼠移植术后的肝组织细胞凋亡情况进行研究。结果显示对照组移植术后肝组织内散在分布着核染色阳性细胞。电镜观察也进一步证实了供肝再灌注后存在核固缩、染色质聚集于细胞核边缘呈环状的凋亡肝细胞,个别细胞内可见凋亡特征性形态改变-凋亡小体。这就表明供肝冷保存再灌注后确实存在着明显的肝细胞凋亡情况。两苦参碱治疗组移植术后供肝凋亡细胞明显减少,凋亡指数AI显著降低,其肝脏形态学检测也发生相应的改善,表明苦参碱能有效减轻肝细胞凋亡。

Bilbao *et al*^[11]研究发现在缺血期通过腺病毒载体将**bcl-2**基因转染给供肝可明显减轻再灌注后肝细胞的凋亡和坏死,并可减少移植术后原发性移植肝无功能的发生率。我们发现**Bcl-2**基因蛋白在两苦参碱治疗组表达明显高于对照组,而两治疗组间表达无明显差异。这就表明苦参碱能促进**Bcl-2**蛋白的表达,从而抑制和减轻供肝冷保存再灌注所诱发的细胞凋亡。**Fas/FasL**是介导凋亡的细胞表面分子,其机制可能是**Fas**与其配体**FasL**结合从而转导凋亡信号进入靶细胞并激活caspase级联反应,诱导细胞凋亡。我们发现苦参碱治疗组并不能显著降低**FasL**蛋白的表达,这就提示苦参碱抑制肝细胞凋亡与**FasL**蛋白表达无明显关系。Huet *et al*^[10]认为**Fas/FasL**基因主要参与免疫排斥反应中的肝细胞凋亡。

总之,苦参碱可以通过促进抑制凋亡基因蛋白**Bcl-2**的表达等机制来抑制冷保存再灌注导致的肝细胞凋亡,从而减轻供肝细胞的再灌注损伤。苦参碱作为药物的单体成分,其化学结构及药理作用机制明确,副作用很小,并已制备出多

种剂型供临床选用,临床应用前景较广泛。

4 参考文献

- Zhang JP, Zhang M, Zhou JP, Liu FT, Zhou B, Xie WF, Guo C. Antifibrotic effects of matrine on *in vitro* and *in vivo* models of liver fibrosis in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 183-186
- Zhu X, Qiu Y, Shi M, Ding Y. Matrine protects sinusoidal endothelial cells from cold ischemia and reperfusion injury in rat orthotopic liver transplantation. *Ann Clin Lab Sci* 2003; 33: 216-225
- 叶明. 苦参碱注射液的药理研究. *广东医学* 1997; 18: 793-794
- Zhu XH, Qiu YD, Shen H, Shi MK, Ding YT. Effect of matrine on Kupffer cell activation in cold ischemia reperfusion injury of rat liver. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1112-1116
- 王轩, 杨甲梅, 严以群, 姚晓平, 吴孟超. 大鼠原位肝移植模型术式的改进. *中华实验外科杂志* 1997; 14: 59-60
- Carlucci F, Marinello E, Gerunda G, Neri D, Rosi F, Floccari F, Tabucchi A. Liver transplant: adenosine metabolism and apoptosis. *Nucleosides Nucleotides* 2004; 23: 1295-1299
- Mueller TH, Kienle K, Beham A, Geissler EK, Jauch KW, Rentsch M. Caspase 3 inhibition improves survival and reduces early graft injury after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 1267-1273
- Baskin-Bey ES, Canbay A, Bronk SF, Werneburg N, Guicciardi ME, Nyberg SL, Gores GJ. Cathepsin B inactivation attenuates hepatocyte apoptosis and liver damage in steatotic livers after cold ischemia-warm reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G396-402
- Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003; 18: 891-902
- Huet PM, Nagaoka MR, Desbiens G, Tarrab E, Brault A, Bralet MP, Bilodeau M. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology* 2004; 39: 1110-1119
- Bilbao G, Contreras JL, Eckhoff DE, Mikheeva G, Krasnykh V, Douglas JT, Thomas FT, Thomas JM, Curiel DT. Reduction of ischemia-reperfusion injury of the liver by *in vivo* adenovirus-mediated gene transfer of the antiapoptotic Bcl-2 gene. *Ann Surg* 1999; 230: 185-193

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

大黄多糖对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮细胞和外周血中性粒细胞凋亡的影响

王志鹏, 张蓉, 刘莉, 梅其炳, 刘琳娜

王志鹏, 张蓉, 刘莉, 梅其炳, 刘琳娜, 第四军医大学药理学教研室 陕西省西安市 710032

王志鹏, 1977-06-03生, 黑龙江省阿城市人, 汉族, 第四军医大学药理学教研室博士生, 主要从事中药药理学研究和新药安全性评价工作。

国家自然科学基金资助项目, No. 30300450

通讯作者: 梅其炳, 710032, 陕西省西安市, 第四军医大学药理学教研室. qbmei@fmmu.edu.cn

电话: 029-83374552 传真: 029-83374552

收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-31

Effects of rhubarb polysacchrides on apoptosis of colonic epithelial cells and peripheral blood polymorphonuclear neutrophils in mice with ulcerative colitis

Zhi-Peng Wang, Rong Zhang, Li Liu, Qi-Bing Mei, Lin-Na Liu

Zhi-Peng Wang, Rong Zhang, Li Liu, Qi-Bing Mei, Lin-Na Liu, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30300450

Correspondence to: Professor Qi-Bing Mei, Department of Pharmacology, School of Pharmacy, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. qbmei@fmmu.edu.cn

Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-10-31

Abstract

AIM: To investigate the effects of rhubarb polysacchrides (RP) on the apoptosis of colonic epithelial cells and peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN) in mice with ulcerative colitis, and to explore the mechanisms of RP in the treatment of ulcerative colitis.

METHODS: A mouse model of ulcerative colitis was induced with 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) by enema. The mice were divided into three groups: normal control, model, and RP treatment (400 mg/kg) group. TUNEL method was used to investigate the apoptosis of cells in colon, and the expression of Fas and FasL protein were measured by Western-blot. The level of Cas-

pase 3 expression was detected by immunohistochemistry. Meanwhile, flow cytometry was used to examine the apoptosis of PMN.

RESULTS: The apoptosis level of colonic epithelial cells was dramatically higher in the model mice than that in the normal controls, while the rate of PMN apoptosis was significantly lower in the former ($40.5 \pm 7.8\%$ vs $57.7 \pm 8.2\%$, $P < 0.01$). However, the apoptosis level of colonic epithelial cells in RP treated mice was markedly lower than that in the model group, while the rate of PMN apoptosis was notably higher in the former ($46.3 \pm 6.5\%$ vs $40.5 \pm 7.8\%$, $P < 0.01$). In model group, the expression of Caspase 3, Fas, and FasL protein were significantly increased in comparison with those in the normal controls, but 3 d after treatment with RP, the expression of Caspase 3, Fas, and FasL protein were remarkably decreased as compared with those in the model mice.

CONCLUSION: Rhubarb polysacchrides can protect the intestinal tract against ischemic inflammation by down-regulation of Caspase-3 expression, which leads to the inhibition of apoptosis induced by Fas/FasL pathway.

Key Words: Rhubarb polysaccharide; Apoptosis; Ulcerative colitis; Epithelial cell; Polymorphonuclear neutrophil

Wang ZP, Zhang R, Liu L, Mei QB, Liu LN. Effects of rhubarb polysacchrides on apoptosis of colonic epithelial cells and peripheral blood polymorphonuclear neutrophils in mice with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):29-34

摘要

目的: 观察了大黄多糖对溃疡性结肠炎(UC)小鼠结肠上皮细胞和外周血中性粒细胞(PMN)凋亡的影响, 进一步阐明大黄多糖治疗的机制。

方法: 用2, 4, 6-三硝基苯磺酸(TNBS)灌肠复

■背景资料

溃疡性结肠炎(UC)反复发作, 迁延不愈, 且发病率逐年升高。其机制尚未完全阐明, 目前公认, UC是一种自身免疫性疾病, 抗原提呈细胞(APC)、T细胞作为免疫细胞, 是肠道免疫反应的重要参与者, 一旦APC和T细胞"失控", 其自身的分化以及分泌细胞因子的功能出现异常, 将会引起肠道的高敏反应, 甚至是炎症, 导致肠道上皮细胞的破坏。因此, 目前的治疗方案主要是应用免疫抑制剂。但随之而来的不良反应也不容忽视。从传统的中草药中寻找高效低毒的有效成分来治疗UC成为近年来的研究热点。

■ 研究前沿

近来的研究表明,骨髓干细胞可促进非造血组织的损伤修复,且在肠道发现了骨髓来源的上皮细胞.据报道,应用粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)治疗UC有一定疗效,可能就是通过增加未成熟骨髓细胞进入外周血,诱导分化,促进肠道上皮细胞再生和修复来发挥作用.另据报道,骨髓移植配合大剂量免疫抑制剂可在减轻肠道炎症反应的同时,促进肠道上皮细胞修复.寻找既可以抑制肠道炎症,又可以促进肠道上皮细胞增殖与分化的新型疗法将成为未来的研究热点.

制小鼠UC模型,动物分为对照组、模型组、大黄多糖(400 mg/kg)治疗组. TUNEL法检测结肠上皮细胞凋亡,免疫组织化学方法观察Caspase 3表达情况, Western-blot法检测Fas、FasL蛋白表达,流式细胞仪测定PMN凋亡率变化.

结果: 模型组动物结肠上皮细胞凋亡均显著高于对照组,而PMN凋亡率则显著低于对照组($40.5 \pm 7.8\%$ vs $57.7 \pm 8.2\%$, $P < 0.01$); 大黄多糖治疗组结肠上皮细胞凋亡低于模型组,PMN凋亡率($46.3 \pm 6.5\%$)则明显高于模型组($P < 0.01$). 与对照组相比,模型组小鼠结肠上皮Caspase 3、Fas、FasL蛋白表达量明显增加; 大黄多糖治疗后, Caspase 3、Fas、FasL蛋白表达量显著减少, 低于模型组.

结论: 大黄多糖通过降低Caspase 3表达,从而抑制Fas/FasL途径引起的结肠上皮细胞的凋亡,同时增加PMN凋亡率,减少PMN向结肠的募集,从而减轻肠道局部免疫反应,起到治疗溃疡性结肠炎的作用.

关键词: 大黄多糖; 凋亡; 溃疡性结肠炎; 上皮细胞; 中性粒细胞

王志鹏, 张蓉, 刘莉, 梅其炳, 刘琳娜. 大黄多糖对溃疡性结肠炎小鼠结肠上皮细胞和外周血中性粒细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(1):29-34

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/29.asp>

0 引言

溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)的病程特点是慢性、迁延、反复发作,严重影响身体健康和生活质量.其病理表现为上皮表浅而广泛的缺失和固有层的炎症改变,结肠上皮细胞凋亡增多是导致结肠上皮层破坏的机制之一^[1-4].此外,外周血中性粒细胞(neutrophils, PMN)凋亡的抑制使PMN在血液循环和炎症部位的作用时间延长,并释放活性介质,加重炎症反应,进一步引起组织损伤^[5-7].这也是UC发病的又一个重要因素.

治疗UC的方法和药物很多^[8].据报道,中医药对UC的疗效较好.以大黄为主药的复方治疗溃疡性结肠炎疗效可达92%以上^[9].本室从唐古特大黄中提取、分离得到水溶性多糖.对其进行的研究表明,大黄多糖对2,4,6三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的大鼠溃疡性结肠炎具显著性疗效^[10].机制可能与其促进肠上皮细胞增殖、移

行、分化和抑制CD4⁺T细胞向肠道黏膜募集,减轻CD4⁺T细胞触发的肠道黏膜局部免疫反应有关^[11,12].然而,大黄多糖对结肠上皮细胞和PMN凋亡这些UC发病的重要机制是否有影响,尚无报道,为进一步探讨其治疗UC的机制,我们观察了大黄多糖对UC小鼠结肠上皮细胞和外周血PMN凋亡的影响,现报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级BALB/C小鼠购自第四军医大学实验动物中心. 2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)为Sigma公司产品; 凋亡检测试剂盒、Caspase 3多克隆抗体、Fas、FasL多克隆抗体、辣根标记的羊抗兔二抗、DAB染色剂均购自武汉博士德公司; 淋巴细胞分离液购自上海华精生物高科技有限公司. RPMI1640培养基购于美国GiBco公司,小牛血清产自杭州四季青生物工程公司.

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型复制 SPF级BALB/C小鼠24只(18-22 g),雌雄各半,随机分为对照组、模型组、治疗组.各组小鼠术前禁食24 h,自由饮水,造模时乙醚麻醉小鼠后用一直径2.0 mm,长约10 cm的硅胶管由肛门轻柔插入深约4 cm,模型组小鼠8只,以含150 g/L TNBS的380 mL/L乙醇溶液缓慢推入结肠(150 mg/kg),诱导UC形成.为确保注入之TNBS能够在大肠内弥散分布,注入后将大鼠尾巴提起,持续倒置30 S.并以生理盐水2 mL/只灌胃,1次/d. 大黄多糖治疗组小鼠8只, TNBS处理同上,并以大黄多糖400 mg/kg灌胃,1次/d,3 d后处死动物.

1.2.2 凋亡检测 模型组和治疗组动物选择病变局部肠段,对照组选择距肛门4 cm左右肠段,经40 g/L甲醛溶液固定,石蜡包埋. TUNEL法检测结肠上皮细胞凋亡按照试剂盒说明书操作.

Western-blot方法检测和Fas/FasL蛋白表达的变化.方法如下,结肠黏膜组织在缓冲液中匀浆(缓冲液含0.1 mol/L PBS, 0.2 mol/L Tris-HCL pH 8.0, 0.15 mol/L NaCl, 1 g/L NaN₃, 10 g/L Nonidet P-40, 1 g/L十二烷基磺酸钠, PMSF, 异丙醇, (H₂O), 冰浴10 min, 14 000 g离心15 min, 4℃. 取上清水煮变性后经120 g/L十二烷基磺酸钠一聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,电压120 EV,电泳2 h,然后转移至硝酸纤维素膜(NC膜),转移电压100 EV,转移2 h,5%脱脂奶粉37℃封闭1 h,封闭的硝酸纤维素膜经PBS-Tween缓冲液洗涤后,分别加入兔抗小鼠Caspase

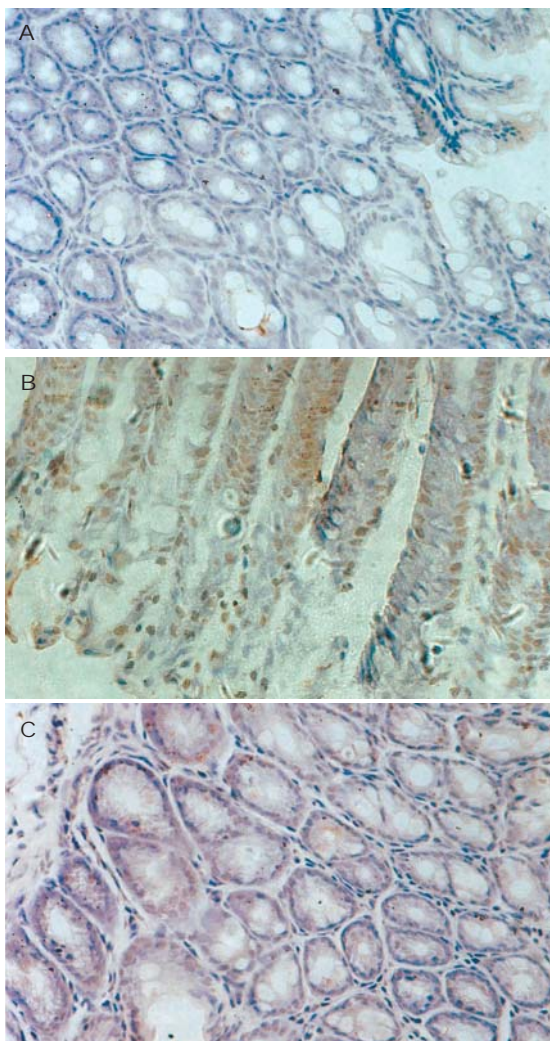


图1 大黄多糖对溃疡性结肠炎小鼠肠道上皮细胞凋亡的影响(×40)。A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组。

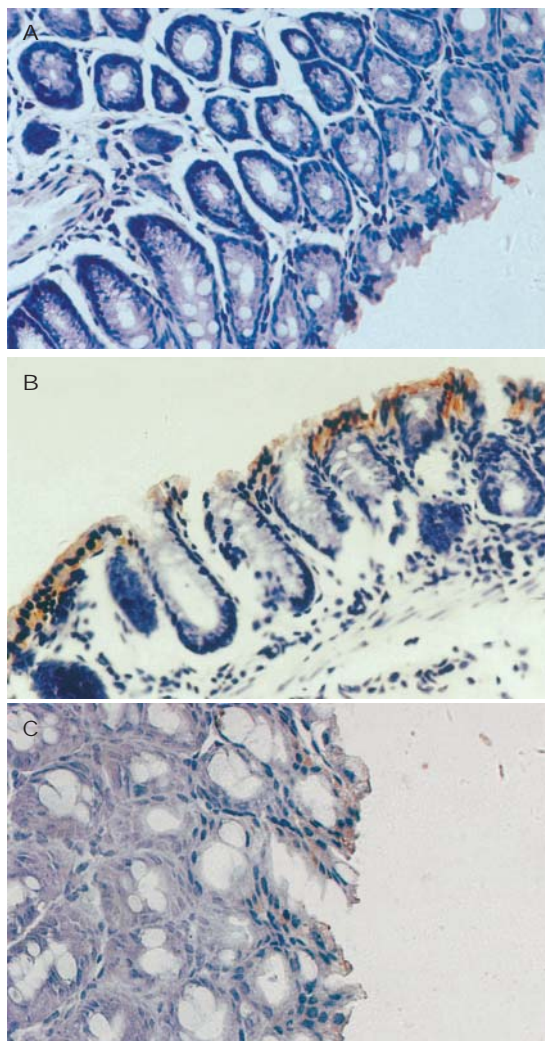


图2 大黄多糖对溃疡性结肠炎小鼠肠道上皮细胞Caspase 3表达的影响(×40)。A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组。

3和Fas/FasL多克隆抗体(1:200稀释), 4℃过夜, 充分洗涤后加入辣根标记的羊抗兔IgG二抗(1:500稀释), 室温孵育1.5 h, DAB染色。

免疫组织化学方法检测Caspase 3表达情况。步骤如下, 石蜡切片脱蜡至水, 30 mL/L过氧化氢室温10 min, 灭活过氧化物酶; 0.1 mol/L PBS充分洗涤后, 正常山羊血清室温封闭20 min; 加兔抗小鼠Caspase 3多克隆抗体4℃过夜; 0.1 mol/L PBS充分洗涤后, 加羊抗兔二抗室温20 min, 0.1 mol/L PBS充分洗涤后, SABC室温孵育20 min后, DAB显色。

流式细胞术检测PMN凋亡。用Hank's液洗细胞3次, 计数并调整细胞浓度。细胞经涂片染色分类见PMN纯度>90%, 台盼蓝染色活细胞比>95%。将分离的PMN悬于含100 mL/L FBS血清的RPMI1640培养液中, 并使细胞浓度为 $2 \times 10^9/L$, 于50 mL/L CO₂、37℃培养。于培养后24 h取细胞检测PMN凋亡。取培养后PMN用pH7.2 PBS洗

涤2次, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^9/L$ 。加入碘化丙啶(PI), 室温避光放置30 min, 上流式细胞仪进行DNA亚二倍体峰凋亡分析。

统计学处理 数据用mean±SD表示, 采用SPSS10.0 统计软件处理。两组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 结肠上皮细胞凋亡检测 应用TUNEL法检测结肠上皮细胞凋亡。结果表明, 对照组小鼠结肠黏膜上皮仅有少量凋亡细胞, 模型组动物结肠凋亡现象普遍, 大黄多糖400 mg/kg治疗组小鼠结肠上皮细胞凋亡较模型组明显减轻(图1)。

2.2 Caspase 3表达检测 免疫组织化学方法检测结肠上皮细胞Caspase 3表达情况。模型组动物结肠上皮细胞Caspase 3表达显著强于对照组(图2)。大黄多糖400 mg/kg治疗组小鼠结肠上皮细胞Caspase 3表达较模型组弱。

2.3 Fas/FasL蛋白检测 Western-blot方法检测结

■相关报道
1 Markus F. Neurath, Susetta Finotto, Laurie H. Glimcher. The role of Th1/Th2 polarization in mucosal immunity. *Nature medicine* 2002; 8: 567-732
2 Ryuichi Okamoto, Mamoru Watanabe. Cellular and Molecular Mechanisms of the Epithelial Repair in IBD. *Digestive Diseases and Sciences* 2005; 50: S34-S38

■ 创新盘点

本文应用大黄多糖治疗小鼠UC, 结果发现大黄多糖既可减少肠道上皮细胞凋亡, 又可增加外周血中性粒细胞的凋亡. 表明大黄多糖可以通过抑制肠道免疫反应和减少肠道上皮凋亡两个途径发挥治疗UC的作用.

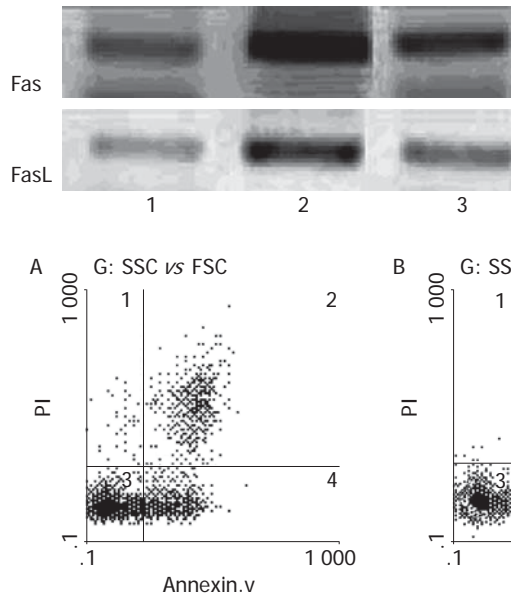


图3 大黄多糖对溃疡性结肠炎小鼠肠道上皮细胞Fas/FasL表达的影响. 1: 对照组; 2: 模型组; 3: 治疗组.

图4 大黄多糖对溃疡性结肠炎小鼠PMN凋亡率的影响. A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组.

肠上皮细胞Fas的结果表明, 与对照组相比, 模型组小鼠结肠上皮Fas、FasL蛋白表达量明显增加. 大黄多糖400 mg/kg治疗3 d后, 小鼠结肠上皮细胞Fas、FasL蛋白表达量显著减少, 低于模型组(图3).

2.4 PMN凋亡检测 应用流式细胞仪检测小鼠PMN凋亡率. 图4显示, 模型组小鼠PMN凋亡率 $40.5 \pm 7.8\%$ 明显低于对照组 $57.7 \pm 8.2\%$ ($P < 0.01$). 大黄多糖400 mg/kg治疗组PMN凋亡率 $46.3 \pm 6.5\%$ 则显著高于模型组小鼠 ($P < 0.01$).

3 讨论

UC是一种主要累及直肠、结肠黏膜的慢性非特异性炎症, 以腹痛、腹泻、黏液血便、里急后重为主要临床表现. 病程迁延不愈, 亦有发生癌变的可能性^[13-15]. 临床上至今没有特异性根治措施, 问题的关键是对其确切发病机制仍不清楚. 据报道, 参与UC发病机制的因素有免疫、遗传、环境、自由基损伤等^[16,17]. 有越来越多的证据提示, 细胞凋亡对于溃疡性结肠炎的组织损伤和免疫紊乱有着重要的影响^[18].

细胞凋亡是细胞接受刺激信号后一种主动的、由凋亡相关基因控制的细胞程序性死亡方式. 研究发现, 在溃疡性结肠炎的发病中, 包括了结肠上皮细胞的凋亡加速和炎症细胞的凋亡减慢两种病理性凋亡倾向, 两者同时存在是造成溃疡性结肠炎炎症持续的重要原因^[19,20]. 正常的结肠上皮细胞很少发生凋亡, 但当UC时, 凋亡的结肠上皮细胞明显增多. 活动期UC除肠腔上皮细

胞外, 病变处及邻近的非病变处隐窝上皮细胞凋亡增加, 从而使由上皮细胞构成的黏膜屏障破坏, 导致结肠黏膜的损伤和溃疡^[21]. 对这种结肠上皮细胞病理性凋亡倾向的研究, 主要集中在对Caspase 3和Fas/FasL介导途径的探讨^[22, 23]. Fas及其配体FasL是一对调节细胞凋亡的蛋白因子. FasL蛋白能与Fas特异性亲和, 激活Fas蛋白介导的信号通路^[24]. 在UC组织中, 不仅表达FasL的淋巴细胞和单核细胞数增多, 而且正常结肠上皮细胞对Fas诱导的凋亡高度敏感^[25]. Caspase 3属于Caspase超家族成员, 在Fas/FasL诱导的细胞凋亡过程中起着重要的作用. Caspase 3一经激活并导致底物裂解, 细胞凋亡将不可逆转地进行下去, 这样Caspase 3就成为细胞凋亡的重要标志^[26]. UC中肠道局部炎症损伤是其另一个重要病理改变, 大量炎症细胞浸润肠壁和持续活化是其主要特征, 而炎症细胞的凋亡减慢则是造成这种现象的重要原因. 随着对UC发病机制研究的深入, 各种炎症细胞的作用倍受重视^[27]. PMN生理情况下对机体的防御起着十分重要的作用, 但其内容物具有组织毒性及酶解基质蛋白的作用, 同时产生多种炎症介质, 如前列腺素、白三烯、血小板活化因子和活性氧介导和放大炎症反应. 因此PMN是炎症过程中引起组织损伤的重要细胞^[28]. 凋亡的中性粒细胞被巨噬细胞吞噬、清除, 一方面使PMN不释放内容物, 另一方面也缩短了PMN介导炎症反应的时间. 因此, 中性粒细胞凋亡是机体自我限制炎症反应的一种重要方式.

随着对UC研究的不断深入, 减少UC结肠上皮凋亡, 从而减轻肠黏膜的损伤, 以及诱导UC炎症细胞的凋亡, 进而减轻炎症反应, 将可能成为治疗UC的有效方法^[29-31], 从祖国医学宝库中筛选出具有针对性的中草药正是我们努力的方向. 大黄具有泻下攻积、清热泻火、活血化瘀之功效, 是用于胃肠道疾病的良药, 治疗UC取得较好的临床效果^[32]. 本实验室提取大黄水溶性成分多糖, 用于UC的治疗. 以往的研究表明, 大黄多糖对TNBS诱导的UC疗效显著, 呈现出良好的量效一依赖关系. 提示大黄多糖可能是大黄治疗UC的有效成分之一. 可通过促进肠上皮细胞的增殖、移行和分化促进肠黏膜的损伤修复. 此外, 抑制CD4⁺T细胞向肠道黏膜募集, 减轻CD4⁺T细胞触发的肠道黏膜局部免疫反应, 这可能是其治疗大鼠溃疡性结肠炎的机制之一. 我们的研究发现, 大黄多糖可显著减少UC小鼠结肠上皮细胞凋亡, 同时使Caspase 3、Fas、FasL蛋白表达降低. 因此, 我们推测, 大黄多糖可能通过抑制Caspase 3表达, 从而抑制Fas/FasL途径来阻遏结肠上皮细胞凋亡过程, 减少肠上皮细胞损伤, 增强肠黏膜屏障作用, 是其治疗UC的机制之一. 另外, 大黄多糖增加UC动物PMN凋亡率, 减轻其对结肠组织的浸润, 从而缓解结肠局部的炎症反应, 减轻肠道上皮细胞损伤和凋亡, 这可能是其治疗UC的另一个重要机制.

4 参考文献

- Jiang XL, Cui HF. An analysis of 10218 ulcerative colitis cases in China. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 158-161
- 何青雯, 陈耀明, 贾友兰, 李晓燕, 蒋海燕. 免疫复合物对溃疡性结肠炎的致病作用. *世界华人消化杂志* 1998; 6: 87
- Cui HF, Jiang XL. Treatment of corticosteroid-resistant ulcerative colitis with oral low molecular weight heparin. *World J Gastroenterol* 1999; 5: 448-450
- 陈少夫, 张卫卫, 王赫. 细胞凋亡与溃疡性结肠. *世界华人消化杂志*, 2002; 10: 431-432
- Brannigan AE, O'Connell PR, Hurley H, O'Neill A, Brady HR, Fitzpatrick JM, Watson RW. Neutrophil apoptosis is delayed in patients with inflammatory bowel disease. *Shock* 2000; 13: 361-366
- Kruidenier L, Kuiper I, Lamers CB, Verspaget HW. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants. *J Pathol* 2003; 201: 28-36
- Mallolas J, Esteve M, Rius E, Cabre E, Gassull MA. Antineutrophil antibodies associated with ulcerative colitis interact with the antigen(s) during the process of apoptosis. *Gut* 2000; 47: 74-78
- 秦成勇, 韩国庆. 溃疡性结肠炎氨基水杨酸类药物和皮质类固醇药物治疗. *世界华人消化杂志* 2000; 3: 338-339
- 郭松河, 李怀军. 复方大黄胶囊治疗慢性溃疡性结肠炎190例. *陕西中医* 1993; 14: 13
- 刘莉, 梅其炳, 王志鹏. 大黄多糖对TNBS诱导的结肠炎大鼠的保护作用. *中国中药杂志* 2003; 28: 246-249
- 刘琳娜, 刘莉, 王志鹏, 王汝涛, 张峰, 刘振国, 梅其炳. 唐古特大黄多糖促进肠上皮细胞的增殖、移行和分化. *中国药理学通报* 2005; 21: 486-489
- 刘莉, 王志鹏, 梅其炳, 李晨. 2, 4, 6-三硝基苯磺酸诱导的大鼠结肠炎CD4⁺T细胞增加. *中国病理生理杂志*. 2004; 20: 347-350
- Kirsner JB. Inflammatory bowel diseases: from the mystical to the cellular and now the molecular. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4127-4128
- Cao YB, Zhang JD, Diao YY, Yan L, Wang DJ, Jia XM, Gao PH, Cheng MH, Xu Z, Wang Y, Jiang YY. Effects of Changtai granules, a traditional compound Chinese medicine, on chronic trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3539-3543
- Katz S. Update in medical therapy of ulcerative colitis: newer concepts and therapies. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 557-569
- Freeman HJ. Collagenous mucosal inflammatory diseases of the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 2005; 129: 338-350
- Pardi DS. Microscopic colitis: an update. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 860-870
- Bu P, Keshavarzian A, Stone DD, Liu J, Le PT, Fisher S, Qiao L. Apoptosis: one of the mechanisms that maintains unresponsiveness of the intestinal mucosal immune system. *J Immunol* 2001; 166: 6399-6403
- Xia B, Yu YH, Guo QS, Li XY, Jiang L, Li J. Association of Fas-670 gene polymorphism with inflammatory bowel disease in Chinese patients. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 415-417
- Ohd JF, Wikstrom K, Sjolander A. Leukotrienes induce cell-survival signaling in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2000; 119: 1007-1018
- Vetuschi A, Latella G, Sferra R, Caprilli R, Gaudio E. Increased proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1447-1457
- Bregenholt S, Petersen TR, Claesson MH. The majority of lamina propria CD4(+) T-cells from scid mice with colitis undergo Fas-mediated apoptosis in vivo. *Immunol Lett* 2001; 78: 7-12
- Neurath MF, Finotto S, Fuss I, Boirivant M, Galle PR, Strober W. Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question. *Trends Immunol* 2001; 22: 21-26
- Suzuki A, Sugimura K, Ohtsuka K, Hasegawa K, Suzuki K, Ishizuka K, Mochizuki T, Honma T, Narisawa R, Asakura H. Fas/Fas ligand expression and characteristics of primed CD45RO⁺ T cells in the inflamed mucosa of ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35: 1278-1283
- Abreu-Martin MT, Palladino AA, Faris M, Carramanzana NM, Nel AE, Targan SR. Fas activates the JNK pathway in human colonic epithelial cells: lack of a direct role in apoptosis. *Am J Physiol* 1999; 276: G599-G605
- Jones SA, Butler RN, Sanderson IR, Wilson JW. The effect of specific caspase inhibitors on TNF-

■应用要点
大黄多糖通过多途径治疗UC, 疗效较好, 且未发现毒性反应, 可望开发成为一种治疗UC的新药.

■同行评价

本研究观察了小鼠溃疡性结肠炎模型经大黄多糖治疗后结肠上皮细胞和外周血中性粒细胞凋亡的变化,并初步探讨了其中可能的机制,是基于前期研究成果基础上的进一步深入研究,所采用的方法得当,数据明确,并得出一定的结论,对于中医药治疗溃疡性结肠炎机制的探讨有一定的意义。

- alpha and butyrate-induced apoptosis of intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 2004; 292: 29-39
- 27 Le'Negrate G, Selva E, Auberger P, Rossi B, Hofman P. Sustained polymorphonuclear leukocyte transmigration induces apoptosis in T84 intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 2000; 150: 1479-1488
- 28 Wu HG, Zhou LB, Shi DR, Liu SM, Liu HR, Zhang BM, Chen HP, Zhang LS. Morphological study on colonic pathology in ulcerative colitis treated by moxibustion. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 861-865
- 29 Mukoyama T, Kanbe T, Murai R, Murawaki Y, Shimomura T, Hashiguchi K, Saeki T, Ichiba M, Yoshida Y, Tanabe N, Kurimasa A, Harada K, Yashima K, Hisatome I, Ito H, Murawaki Y, Shiota G. Therapeutic effect of adenoviral-mediated hepatocyte growth factor gene administration on TNBS-induced colitis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 329: 1217-1224
- 30 Fedorak RN, Madsen KL. Probiotics and the management of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10: 286-299
- 31 Siegmund B, Sennello JA, Jones-Carson J, Gamboni-Robertson F, Lehr HA, Batra A, Fedke I, Zeitz M, Fantuzzi G. Leptin receptor expression on T lymphocytes modulates chronic intestinal inflammation in mice. *Gut* 2004; 53: 965-972
- 32 郭金生, 李忠海. 复方大黄胶囊治疗慢性溃疡性结肠炎190例. *中国肛肠病杂志* 2004; 24: 44

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛征文通知

本刊讯 《中华胃肠外科杂志》与浙江省人民医院定于2006-04-21/25在杭州共同举办“消化道肿瘤外科治疗专题”高级论坛,主要探讨消化道肿瘤手术治疗的有关问题,包括不同术式的选择及手术的规范化问题、腹腔镜下进行各种手术的选择及相关问题。为活跃学术论坛,促进消化道肿瘤外科治疗的发展,特向广大普外科工作者征稿。

1 会议具体内容

论坛的具体内容包括:(1)肝移植手术适应证及相关问题(黄洁夫主讲);(2)肝胆系统肿瘤手术的选择(郑树森主讲);(3)消化系统肿瘤的综合治疗(樊代明主讲);(4)胰腺肿瘤外科治疗进展(赵玉沛主讲);(5)胃癌的根治性手术(詹文华主讲);(6)腹腔镜下的胃癌根治术(余佩武主讲);(7)胃癌腹膜转移的外科治疗(朱正纲主讲);(8)低位直肠癌的保肛手术(汪建平主讲);(9)腹腔镜下的结直肠癌手术(郑民华主讲);(10)规范的TME手术及相关问题(顾晋主讲);(11)胃癌外科治疗的新进展(叶再元主讲)。

2 征文要求

内容应与消化道肿瘤(以胃肠道为主)外科治疗有关。采用word文档格式,字数3 500字符左右,摘要500字左右(宋体、小四号)。

3 文章投送形式

分两种:(1)电子邮件投稿:将征文以附件形式提交,注明“消化道肿瘤外科治疗2006年高级论坛”征文,文件名为会议名称加第一作者姓名;电子信箱:zhwcwk@21cn.com。(2)邮寄:打印稿用A4(附软盘),软盘请注明研讨题目、作者。

4 联系地址及截稿

截稿日期:2006-01-31(以当地邮戳为准)。联系地址:广州市中山二路58号(510080)中山大学附属第一医院《中华胃肠外科杂志》编辑部一室,电话:020-87335945。

丹参对重症急性胰腺炎内皮素-1 mRNA 的影响

张莹, 石承先, 黄平, 任娟娟, 李玉祥

张莹, 石承先, 任娟娟, 贵州省人民医院普通外科 贵州省贵阳市 550000

黄平, 李玉祥, 遵义医学院组胚教研室 贵州省遵义市 563003
张莹, 男, 1974-08-04生, 陕西省铜川市人, 汉族, 2003年第三军医大学肝胆外科博士, 医师, 主要从事肝移植和重症胰腺炎的研究。

贵州省优秀科技教育人才省长基金资助, 黔科教办No.2001-06
通讯作者: 石承先, 550000, 贵州省贵阳市中山东路83号, 贵州省人民医院普通外科. zhangyingdoc@163.com

收稿日期: 2005-9-28 接受日期: 2005-10-19

Effect of *Salviae Miltiorrhizae* on expression of endothelin-1 mRNA in rats with severe acute pancreatitis

Ying Zhang, Cheng-Xian Shi, Ping Huang, Juan-Juan Ren, Yu-Xiang Li

Ying Zhang, Cheng-Xian Shi, Juan-Juan Ren, Department of General Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550000, Guizhou Province, China
Ping Huang, Yu-Xiang Li, Department of Histology and Embryology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, Guizhou Province, China

Supported by the Nomarch Funds for Excellent Science and Technology Teachers of Guizhou Province, No. 2001-06
Correspondence to: Cheng-Xian Shi, Department of General Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550000, Guizhou Province, China. zhangyingdoc@163.com
Received: 2005-9-28 Accepted: 2005-10-19

Abstract

AIM: To investigate the expression of endothelin-1 (ET-1) mRNA in severe acute pancreatitis (SAP) as well as the effect of *Salviae Miltiorrhizae* (SM) on ET-1 mRNA expression in rats.

METHODS: Forty-five Wistar rats were randomly divided into 3 groups: model group (MG, $n = 15$), SM group (SMG, $n = 15$), and control group (CG, $n = 15$). Severe acute pancreatitis was induced by intraductal injection of 50 g/L sodium taurocholate (1.0 mL/kg) in MG and SMG. The rats in SMG were then treated with *Salviae Miltiorrhizae* [2 mL/(kg·d)]. Sham-operation was only performed in CG. The levels of ascites, serum ET-1 and amylase (AMY) were determined at 24 h. The expression of ET-1 mRNA was examined by *in situ* hybridization in pancreatic tissues. The pathological changes of the pancreas

were observed 24 h after modeling.

RESULTS: The levels of ascites and serum AMY in MG (9.87 ± 2.34 mL, 35.9 ± 5.93 μ kat/L) and SMG (5.27 ± 2.81 mL, 23.96 ± 5.56 μ kat/L) were markedly higher than those in CG (0 mL, 3.60 ± 0.62 μ kat/L, $P < 0.001$). The level of serum ET-1 in MG was significantly higher than that in SMG and CG (185.47 ± 20.80 ng/L vs 164.27 ± 18.53 ng/L, 72.90 ± 17.27 ng/L, $P < 0.05$, $P < 0.001$). ET-1 mRNA expression was notably higher in MG than that in SMG (28.22 ± 1.15 vs 23.81 ± 1.04 , $P < 0.001$). Pathological changes were obviously alleviated in SMG in comparison with those in MG (score: 10.45 ± 1.42 vs 12.05 ± 1.28 , $P < 0.05$).

CONCLUSION: Over-expression of ET-1 mRNA in pancreas plays an important role in SAP, and SM can inhibit the expression of ET-1 mRNA and alleviate the pancreatic injury.

Key Words: *Salviae Miltiorrhizae*; Severe acute pancreatitis; Endothelin-1; Rats

Zhang Y, Shi CX, Huang P, Ren JJ, Li YX. Effect of *Salviae Miltiorrhizae* on expression of endothelin-1 mRNA in rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):35-38

摘要

目的: 探讨内皮素-1(ET-1)在重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)胰腺中的表达对胰腺损伤的作用机制及丹参注射液对ET-1 mRNA表达的影响。

方法: Wistar大鼠45只, 随机等分为模型组、药物组和对照组。以50 g/L牛磺胆酸钠1 mL/kg经胰管内逆行注射复制SAP模型。药物组在建模后im丹参[2 mL/(kg·d)], 1次/6 h。对照组仅行假手术。各组动物在术后24 h测血淀粉酶、ET-1和腹水量。使用原位杂交和图象分析检测胰腺ET-1 mRNA的表达强度, 并观察胰腺的病理变化。

结果: 模型组血中淀粉酶和腹水量分别为 35.9 ± 5.93 μ kat/L和 9.87 ± 2.34 mL, 显著高于药物组的 23.96 ± 5.56 μ kat/L和 $5.27 \pm$

■背景资料

近年研究发现认为急性胰腺炎的发生和发展不一定或不完全取决于胰酶的消化, 而与循环因素有着极其重要的联系。目前的研究表明: 胰腺微循环紊乱贯穿于急性胰腺炎整个病程, 是其发病的始动因素之一, 胰腺的微循环障碍主要有血液和微血管两个方面的改变, 两者相互影响, 形成恶性循环, 导致胰腺缺血, 加重胰腺的病理变化, 并且局部微循环障碍的进一步加剧可促使急性胰腺炎由水肿性发展为出血坏死性。

■ 研究前沿

在重症急性胰腺炎早期血液流变学和微循环的改变先于血流动力学的改变,由于全血黏度、血浆黏度增高,使全身血液流动性降低,携带和运输氧的能力下降,常致全身炎症反应综合征(SIRS),并进一步加重胰腺损伤,甚至出现衰竭而致患者死亡。早期纠正全身血液流变学的改变对重症急性胰腺炎的转归有积极意义。本文以缩血管物质-内皮素-1(endothelin-1)为靶点,用丹参进行干预,重点探讨丹参对重症急性胰腺炎血液流变学的影响及治疗机制。

2.81 mL及对照组的 $3.60 \pm 0.62 \mu\text{kat/L}$ 和 0 mL ($P < 0.001$)。模型组血中ET-1为 $185.47 \pm 20.80 \text{ ng/L}$,高于药物组的 $164.27 \pm 18.53 \text{ ng/L}$ 和对照组的 $72.90 \pm 17.27 \text{ ng/L}$ ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。模型组和药物组胰腺ET-1 mRNA表达均增高,模型组显著高于药物组(28.22 ± 1.15 vs 23.81 ± 1.04 , $P < 0.001$)。模型组和药物组胰腺均有病理改变,但药物组较模型组减轻(评分: 10.45 ± 1.42 vs 12.05 ± 1.28 , $P < 0.05$)。

结论: SAP时胰腺ET-1 mRNA高表达导致ET-1过度生成并与胰腺损伤有关。丹参能抑制胰腺ET-1 mRNA的过度表达,从而对胰腺起保护作用。

关键词: 丹参; 重症急性胰腺炎; ET-1; 大鼠

张莹, 石承先, 黄平, 任娟娟, 李玉祥. 丹参对重症急性胰腺炎内皮素-1 mRNA的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(1):35-38
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/35.asp>

0 引言

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)起病急,变化快,病情复杂,其发病机制至今仍不清楚。传统胰酶消化学说已不能全面解释急性胰腺炎的发病机制。有研究提示,胰腺微循环紊乱是急性胰腺炎发生发展中的重要特征^[1-4]。ET-1是迄今为止最强的缩血管物质之一^[5-7],但在SAP胰腺中的表达与胰腺病理改变的关系不清楚,丹参作为常用的活血化淤药对其表达是否有影响,也值得探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 健康Wistar大鼠45只,体质量220-280 g(遵义医学院动物饲养中心提供)。牛磺胆酸钠(Sigma公司), ET-1 mRNA原位杂交试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), ET-1试剂盒(北京东亚免疫研究所产品), α 淀粉酶试剂盒(上海科华东菱诊断用品有限公司),丹参注射液(四川五粮液集团宜宾制药厂)。

1.2 方法 大鼠随机分为模型组($n = 15$),丹参组($n = 15$)和对照组($n = 15$)。模型组术前禁食12 h,禁水4 h。10 g/L戊巴比妥钠(25 mg/kg)ip麻醉。采用上腹壁正中切口入腹,寻及十二指肠及胰胆管,用一小动脉夹夹闭胆管近肝门端,4.5号针头经肠壁从十二指肠乳头刺入胰胆管约0.8 cm,以0.2 mL/min的速度向胰胆管内逆行推注50 g/L牛磺胆酸钠溶液(sodiumtaurocholate, Na-Tc),

1.0 mL/kg后压迫5 min,见胰腺出血坏死后去除小动脉夹关腹。丹参组复制SAP模型关腹时腹股沟肌肉内注射丹参注射液[2 mL/(kg·d)],1次/6 h,共4次。对照组仅开腹并轻轻触动十二指肠后关腹。模型组、对照组im 9 g/L氯化钠溶液,剂量、给药时间同丹参组。动物分笼饲养,自由进水。制模后24 h 10 g/L戊巴比妥钠ip(15 mg/kg)麻醉下经颈动脉插管采血并处死动物,取胰腺组织备检。采血样1 mL置于加有100 g/L EDTA二钠15 μL 和抑肽酶20 μL (3 334 nkat)的试管中混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 3 000 r/min离心10 min分离血清,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。检测方法按东亚免疫技术研究所提供的放免试剂盒说明书操作。颈动脉采血1 mL,加少许肝素混匀,2 500 r/min离心15 min,取血浆-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。全自动生化分析仪按淀粉酶(amyase, AMY)试剂盒说明书操作。开腹后用注射器抽尽腹水并计量。胰组织标本(1 cm \times 1 cm \times 0.5 cm)固定于40 g/L多聚甲醛溶液中(含1 g/L DEPC),常规脱水,石蜡包埋。石蜡切片厚度7 μm ,脱蜡至水;30 mL/L H₂O₂处理10 min;滴加30 mL/L柠檬酸新鲜稀释的蛋白酶,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化15 min,暴露mRNA核酸片段;预杂交3 h;每张切片滴加ET-1寡核苷酸探针原位杂交液20 μL ,原位杂交专用盖玻片覆盖,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中杂交2 h;杂交后依次用2 \times SSC, 0.5 \times SSC, 0.2 \times SSC洗涤;依次滴加封闭液(室温30 min)、鼠抗地高辛(37 $^{\circ}\text{C}$, 60 min)、生物素化SABC(37 $^{\circ}\text{C}$, 20 min);DAB显色10 min(DAB显色试剂盒为博士德公司产品)。阴性对照以PBS代替原位杂交液。ET-1 mRNA阳性表达的细胞胞质中出现棕黄色颗粒。应用Biomias99图象分析系统(四川大学图像图形研究所),在10 \times 20倍视野下,每张切片取50%组织测定积分吸光度表示阳性颗粒相对含量。

统计学处理 SPSS 10.0版统计软件处理数据,以mean \pm SD表示,组间比较用方差分析,两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 胰腺病理学 模型组开腹见淡红色或淡黄色腹水,量多,胃肠胀气明显。胰腺大片出血坏死,呈暗红色,表面及周围腹膜、系膜见皂化斑;肺表面高度充血,可见点状出血,胸腔内少量积液,呈血性;药物组见中少量腹水,呈淡红色或淡黄色,胃肠胀气较模型组轻;胰腺见片状出血坏死,呈暗红色,表面及周围腹膜、系膜可见皂化斑。对照组无腹水,腹内器官未见异常改变。光镜下

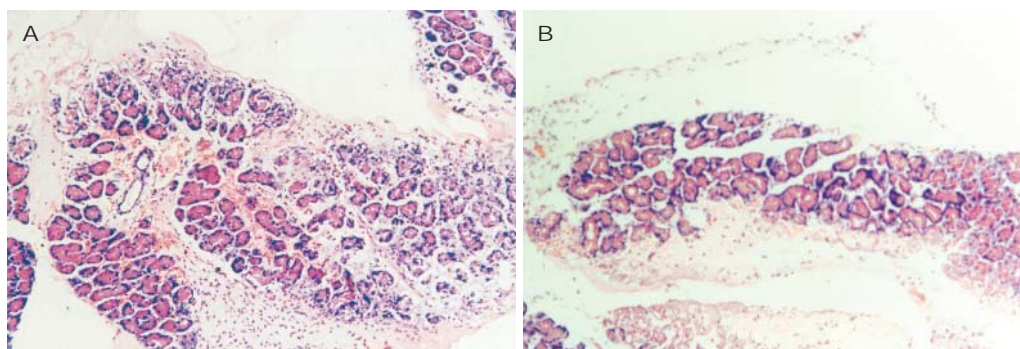


图 1 大鼠胰腺病理学变化 (HE × 100). A: 模型组; B: 丹参组.

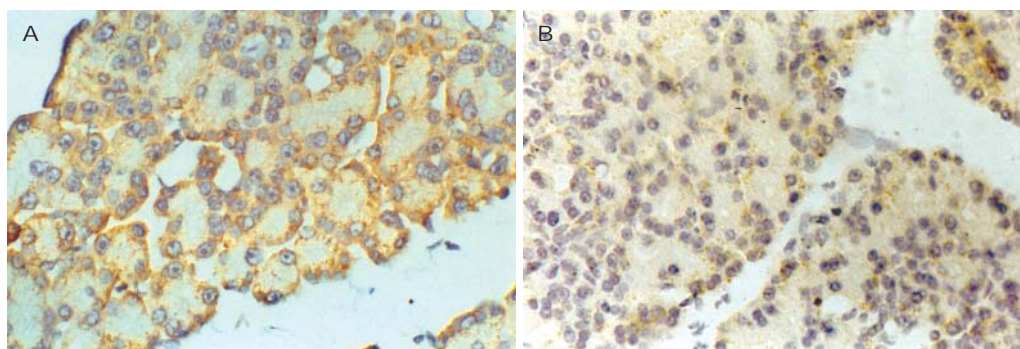


图 2 大鼠胰腺组织ET-1 mRNA表达 (原位杂交 × 400). A: 模型组; B: 丹参组.

■ 相关报道

- 1 刘建生, 张晓红, 付极. 急性胰腺炎时内皮素和一氧化氮变化及丹参治疗作用研究. 医师进修杂志 2003; 26: 21-22
- 2 王兴鹏, 王国良, 巫协宁. 急性胰腺炎血循环障碍的意义. 新消化病学杂志 1997; 5: 55
- 3 钟守先. 重症急性胰腺炎研究方向的几点建议. 中国普通外科杂志 2005; 14: 321-322

表 1 血ET-1、AMY和腹水量 (mean ± SD)

组别	ET-1 (ng/mL)	AMY (ukat/L)	腹水量 (mL)
模型组	185.47 ± 20.80	35.9 ± 5.93	9.87 ± 2.34
药物组	164.27 ± 18.53 ^b	23.96 ± 5.56 ^b	5.27 ± 2.81 ^b
对照组	72.90 ± 17.27 ^b	3.60 ± 0.62 ^b	0

^b $P < 0.01$ vs 模型组.

模型组胰腺小叶间质水肿明显, 叶间隔及小叶间隔弥漫性增宽, 部分小叶轮廓不清, 大片状出血和变性坏死, 毛细血管高度扩张, 血管周围、小叶间有大量粒细胞浸润(评分 12.05 ± 1.28 , 图1A). 药物组胰腺的病理改变较模型组轻, 主要表现在胰腺为片状出血, 粒细胞浸润少, 脂肪坏死较轻(评分 10.45 ± 1.42 , $P < 0.05$, 图1B). 对照组: 胰腺结构完整未见异常.

2.2 血浆ET-1, AMY和腹水变化 模型组和药物组大鼠血ET-1, AMY和腹水均显著高于对照组 ($P < 0.001$), 药物组的ET-1, AMY和腹水明显低于模型组 ($P < 0.01$, 表1).

2.3 ET-1 mRNA胰腺 对照组的胰腺偶见ET-1 mRNA表达, 模型组(图2A)、药物组(图2B)胰腺ET-1 mRNA于胞质中表达, 药物组显著低于模型组(积分吸光度: 28.22 ± 1.15 vs 23.81 ± 1.04 , $P < 0.001$).

3 讨论

胰腺微循环障碍在急性胰腺炎发病机制中的作用越来越受到重视^[2,3,8]. SAP发生发展过程中, 由于胰酶在腺泡中过早激活、过度的炎症反应产生大量的细胞因子和血管活性物质等可直接或间接引起局部血流量减少、血流速度降低、白细胞黏附、毛细血管通透性增加以及功能性毛细血管密度降低等造成微循环功能障碍^[9,10]. ET主要由血管内皮细胞释放, 具有强大的缩血管功能. 研究显示, ET-1能诱发微循环损害和腺泡细胞损伤^[11-14], 表明ET-1介导的微血管改变对胰腺炎的病理生理改变起重要作用. 我们研究发现, 模型组动物胰腺的ET-1 mRNA过度表达, 血液中ET-1水平亦较高, 淀粉酶和腹水量均升高, 胃肠胀气明显, 胰腺的病理改变也较重; 这种现象的机制可能是ET-1 mRNA过度表达, ET-1大量生成, 致胰腺微血管持续的痉挛, 从而导致胰腺缺血和局部微循环淤滞, 使微循环改变, 血栓形成, 大量渗出, 加重胰缺血并促使AP病情加重, 且这种病变可持续不断发展. 同时胰腺腺泡中存在ET-1受体, ET-1与其受体结合能促进钙离子大量内流, 损伤胰腺组织细胞, 各种酶及各种炎性介质和细胞因子等释放, 引起周身反应, 可造成全身病理改变, 很快出现全身性炎症反应

■创新亮点

本文应用丹参改善微循环的功效,明确丹参对缩血管物质ET-1 mRNA表达的影响,探讨重症急性胰腺炎早期胰腺微循环紊乱在胰腺炎的发生、发展中起重要作用,以及早期应用丹参对重症急性胰腺炎病情转归的影响。

综合征和多器官功能障碍综合征。

丹参是常用的活血化瘀药。实验表明,丹参注射液具有增加动物肠系膜微血管血流速度、抗凝和抗氧化作用。我们发现,使用丹参注射液的药物组动物,胰腺的ET-1 mRNA表达下调,血液中的ET-1水平相应下降,胃肠胀气及腹水量减少,胰腺病理改变亦减轻。这与使用ET-1受体阻断剂(ET-1-RA)后胰腺血流量改善、病情减轻实验一致^[8,15-17]。提示丹参能有效地减轻胰腺的病变更程度,保护胰腺组织,通过改善微循环,减少微血管痉挛及胰腺组织缺血缺氧,其作用机制之一可能是通过抑制SAP时ET-1 mRNA的过度表达,减少ET-1的生成,消除ET-1引起的不良影响,稳定毛细血管壁通透性,减少液体向组织间隙转移,显著提高胰腺毛细血管血流量,从而发挥其器官保护效应的作用。因此重症急性胰腺炎早期胰腺微循环紊乱在胰腺炎的发生、发展中起重要作用。早期应用丹参能降低胰腺ET-1 mRNA的过度表达,纠正胰腺微循环紊乱,有益于重症急性胰腺炎病情的转归。

4 参考文献

- 1 王兴鹏, 王国良, 巫协宁, 袁耀宗, 徐家裕. 急性胰腺炎血循环障碍的意义. *世界华人消化杂志* 1997; 5: 55-56
- 2 Schmidt J, Ebeling D, Ryschich E, Werner J, Gebhard MM, Klar E. Pancreatic capillary blood flow in an improved model of necrotizing pancreatitis in the rat. *J Surg Res* 2002; 106: 335-341
- 3 Zhou ZG, Chen YD, Sun W, Chen Z. Pancreatic microcirculatory impairment in experimental acute pancreatitis in rats. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 933-936
- 4 Dlugosz JW, Nowak K, Laszewicz W, Andrzejewska A, Wroblewski E. The effect of endothelin-1 receptor antagonists in acute experimental pancreatitis in the rats. *Exp Toxicol Pathol* 2003; 55: 137-145
- 5 Inoue K, Hirota M, Kimura Y, Kuwata K, Ohmuraya M, Ogawa M. Further evidence for endothelin as an important mediator of pancreatic and intestinal ischemia in severe acute pancreatitis. *Pancreas* 2003; 26: 218-223
- 6 Plusczyk T, Bersal B, Menger MD, Feifel G. Differential effects of ET-1, ET-2, and ET-3 on pancreatic microcirculation, tissue integrity, and inflammation.

■应用要点

重症急性胰腺炎早期存在微循环障碍,本研究采用丹参治疗,观察缩血管物质ET-1 mRNA的表达变化,以及胰腺病理变化和动物存活情况,有助于为临床提供重症急性胰腺炎较为有效的救治措施。

- 7 Foitzik T, Faulhaber J, Hotz HG, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin mediates local and systemic disease sequelae in severe experimental pancreatitis. *Pancreas* 2001; 22: 248-254
- 8 Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ, Foitzik T. Effect of endothelin and endothelin receptor blockade on capillary permeability in experimental pancreatitis. *Gut* 2000; 46: 390-394
- 9 von Dobschuetz E, Pahernik S, Hoffmann T, Kiefmann R, Heckel K, Messmer K, Mueller-Hoecker J, Dellian M. Dynamic intravital fluorescence microscopy—a novel method for the assessment of microvascular permeability in acute pancreatitis. *Microvasc Res* 2004; 67: 55-63
- 10 Strate T, Mann O, Kleinhans H, Schneider C, Knoefel WT, Yekebas E, Standl T, Bloechle C, Izbicki JR. Systemic intravenous infusion of bovine hemoglobin significantly reduces microcirculatory dysfunction in experimentally induced pancreatitis in the rat. *Ann Surg* 2003; 238: 765-771
- 11 Forgacs B, Eibl G, Wudel E, Franke J, Faulhaber J, Kahrau S, Buhr HJ, Foitzik T. RES function and liver microcirculation in the early stage of acute experimental pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 861-866
- 12 Farrant GJ, Abu-Zidan FM, Liu X, Delahunt B, Zwi LJ, Windsor JA. The impact of intestinal ischaemia-reperfusion on caerulein-induced oedematous experimental pancreatitis. *Eur Surg Res* 2003; 35: 395-400
- 13 Sakai Y, Masamune A, Satoh A, Nishihira J, Yamagawa T, Shimosegawa T. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2003; 124: 725-736
- 14 Jaworek J, Leja-Szpak A, Bonior J, Nawrot K, Tomaszewska R, Stachura J, Sendur R, Pawlik W, Brzozowski T, Konturek SJ. Protective effect of melatonin and its precursor L-tryptophan on acute pancreatitis induced by caerulein overstimulation or ischemia/reperfusion. *J Pineal Res* 2003; 34: 40-52
- 15 Kaska M, Pospisilova B, Slizova D. Pathomorphological changes in microcirculation of pancreas during experimental acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2000; 47: 1570-1574
- 16 Plusczyk T, Bersal B, Westermann S, Menger M, Feifel G. ET-1 induces pancreatitis-like microvascular deterioration and acinar cell injury. *J Surg Res* 1999; 85: 301-310
- 17 Andrzejewska A, Dlugosz JW. The endothelin-1 receptor antagonists ameliorate histology and ultrastructural alterations in the pancreas and decrease trypsinogen activation in severe taurocholate pancreatitis in rats. *Int J Exp Pathol* 2003; 84: 221-229

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

鼠反义转化生长因子 β I 型受体真核表达质粒的构建与鉴定

徐丽红, 郑勇, 周婷, 李睿, 陈莹

徐丽红, 郑勇, 李睿, 陈莹, 新疆石河子大学第一附属医院消化内科 新疆维吾尔自治区石河子市 832008
周婷, 新疆石河子大学第一附属医院中心实验室 新疆省石河子市 832008
徐丽红, 女, 1970-08生, 汉族, 新疆石河子大学石河子医学院内科学在读硕士, 主治医师, 主要从事肝纤维化方面的研究。
兵团博士资金资助项目, No.05JC08
通讯作者: 郑勇, 832002, 新疆维吾尔自治区石河子市, 新疆石河子大学第一附属医院消化内科. shzds-sh@xj.cninfo.net
收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-11-26

Construction and identification of rat pcDNA3.1(+)-antisense T β RI eukaryotic expressing plasmid

Li-Hong Xu, Yong Zheng, Ting Zhou, Rui Li, Ying Chen

Li-Hong Xu, Yong Zheng, Rui Li, Ying Chen, Department of Digestology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Ting Zhou, Center Laboratory, the First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
Supported by the Crops Foundation for the Doctor, No.05JC08
Correspondence to: Dr. Yong Zheng, Department of Digestology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832008, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China. shzds-sh@xj.cninfo.net
Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-11-26

Abstract

AIM: To construct rat pcDNA3.1(+)-antisense T β RI (transforming growth factor beta receptor I) eukaryotic expressing plasmid, and to provide the experimental foundation for intervening the pathogenesis and development of liver fibrosis through T β RI.

METHODS: TRIzol assay was performed to obtain the total RNA from the rat liver tissues. The integrality, concentration and purity of total RNA were detected by ultraviolet spectrophotometry and agarose electrophoresis. The fragment of T β RI cDNA was obtained by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and then amplified by nest PCR. CaCl₂ method was used to induce the susceptibility of cells. The eukaryotic expressing vector, at its multiple cloning sites, as well as the fragment

of T β RI, was digested by *Eco*R I and *Xho*I, and then, was purified and retrieved by agarose electrophoresis separation. pcDNA3.1(+)-antisense T β RI eukaryotic expressing plasmid was constructed by a directional inverted joins with the purified linear pcDNA3.1(+) and the purified fragment of T β RI. This recombinant plasmid was transfected into *E.coli* JM109 by means of heat shock. The recombinant was identified by restriction endonuclease digestion and DNA sequence analysis.

RESULTS: Agarose electrophoresis showed that the strips of 18S and 28S were integral. Furthermore, the luminosity of the 28S strip was twice as high as 18S strip. So the total RNA was considered to be in integrity. The ratio of A_{260}/A_{280} was 1.915 0, and the total RNA was considered to be in good purity. The concentration of total RNA was 770 mg/L. The two fragments digested from pcDNA3.1(+)-antisense T β RI by *Eco*R I and *Xho*I represented 5.3 kb and 432 bp after agarose electrophoresis, indicating the successful construction of pcDNA3.1(+)-antisense T β RI. Sequence analysis showed the same sequence as expected.

CONCLUSION: The pcDNA3.1(+)-antisense T β RI eukaryotic expressing plasmid is constructed successfully.

Key Words: Antisense; Plasmid; Transforming growth factor β receptor I; Liver fibrosis

Xu LH, Zheng Y, Zhou T, Li R, Chen Y. Construction and identification of rat pcDNA3.1(+)-antisense T β RI eukaryotic expressing plasmid. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):39-44

摘要

目的: 构建鼠反义转化生长因子 β I 型受体(T β RI)基因pcDNA3.1(+)真核表达质粒, 为进一步研究通过T β RI干预肝纤维化的发生发展提供实验基础。

方法: 将取冰冻保存的大鼠肝组织, 应用TRIzol法提取总RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性, 并用紫外分光核酸蛋白分析仪

■背景资料

肝纤维化形成过程受到众多细胞因子的调节, 目前认为最重要的细胞因子是PDGF(血小板衍化生长因子)和TGF- β (转化生长因子 β)。TGF- β 在肝纤维化的发生发展过程中不仅能促进ECM的合成增加, 而且能抑制ECM的降解。TGF- β 信号传导过程中活化的TGF- β 必须与相应的细胞膜受体结合, 才能将信号传递给TGF- β 家族的细胞内信号分子SMAD, 再将信号从细胞质传入到细胞核, 从而特异性的调节TGF- β 靶基因的表达, 调节HSC的转化和ECM的合成、降解。

■研究前沿

近年来利用阻断TGF- β 的信号通路干预肝纤维化的发生发展的实验性研究越来越多,越来越深入.不断的证明干扰TGF- β 的信号通路可有效的干预肝纤维化的发生发展.目前已有研究发现虽然绝大多数细胞都有T β R I、T β R II两种受体,但比例并不相同,对TGF- β 的反应性也大不相同.肝HSC活化后其细胞表面的T β R II显著减少,而T β R I增加或保持不变,并认为这可能是HSC活化后功能改变的部分原因.目前国内通过不同方法抑制T β R II的表达来延缓肝纤维化的进程的实验较多,而通过抑制T β R I的表达或通过调节T β R I、T β R II两种受体的比例来干预肝纤维化的发生发展的实验较少.

测定RNA浓度和纯度.使用一步法逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒获得目的基因T β R I cDNA片段,采用巢式PCR扩增T β R I基因片段.用CaCl₂法诱导感受态细胞.将真核表达载体pcDNA3.1(+)在多克隆位点处用EcoR I、XhoI I双酶切线性化,切胶纯化回收;T β R I基因片段双酶切后切胶纯化回收;将纯化回收的pcDNA3.1(+)线性化载体和T β R I基因片段定向及反向连接,构建以pcDNA3.1(+)为载体的反义T β R I基因真核表达质粒.转化JM109大肠杆菌.酶切证实的阳性克隆行测序分析.

结果:琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,见28S, 18S条带完整,而且28S条带亮度为18S的1倍左右,认为RNA完整性良好;并用紫外分光核酸蛋白分析仪测定RNA纯度 $A_{260}/A_{280} = 1.9150$,认为RNA纯度良好;RNA浓度为770 mg/L.阳性克隆质粒经双酶切后行10 g/L琼脂糖凝胶电泳在DNA Marker 430 bp和线性化纯化后pcDNA3.1(+), 5.3 kb附近可见两条明显条带,与所需目的片段大小相符,证实为阳性克隆,重组质粒构建成功. DNA测序结果与预期目的片段序列一致.

结论:鼠反义T β R I /pcDNA3.1(+)真核表达重组质粒构建成功.

关键词:反义;质粒;转化生长因子 β I型受体;肝纤维化

徐丽红, 郑勇, 周婷, 李睿, 陈莹. 鼠反义转化生长因子 β I型受体真核表达质粒的构建与鉴定. 世界华人消化杂志 2006;14(1):39-44

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/39.asp>

0 引言

在TGF- β 信号转导过程中活化的TGF- β 需与相应的细胞膜受体结合才能发挥作用.肝星形细胞(HSC)活化合成的细胞外基质(ECM)是肝纤维化时ECM的主要来源^[1,2].肝星形细胞活化后其细胞表面的T β R II显著减少,而T β R I增加或保持不变^[3].故推断T β R I的表达下调在延缓肝纤维化的过程中可能有潜在的更重要的作用.我们采用分子生物学方法构建鼠反义T β R I真核表达质粒,为通过抑制T β R I的表达干预肝纤维化的发生发展提供了实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料 肝组织为石河子大学第一附属医院中

心实验室-80℃冰冻保存的肝组织;pcDNA3.1(+)质粒为本课题组保留;限制性核酸内切酶EcoR I、XhoI I均购自美国Promega公司;大肠埃希菌JM109系石河子大学石河子医学院生化实验室所赠;Taq DNA多聚酶、UNIQ-10柱式PCR切胶回收试剂盒、UNIQ-10小剂量质粒抽提试剂盒、DEPC均购自上海Sangon公司;Triazol Reagent RNA分离液为美国Invitrogen公司的产品;逆转录PCR一步法试剂盒为德国Qiagen公司的产品;T4DNA连接酶、琼脂糖为加拿大BBI公司的产品;巢式PCR内、外引物两对,均由上海Sangon公司合成,序列为:外引物: F₁: 5'-ACAGGCGCAAACAGTGGCAG-3'; R₁: 5'-AGTCTCGTAGCACAAATGGTCC-3';内引物: F₂: 5'-TTCACCTCGAGAGTGGCAGCGGGACC-3'; R₂: 5'-CTACCGAATTCTGGACCATCAGCATAAG-3'.(黑体部分为添加的限制性内切酶XhoI I和EcoR I特异识别部分的核苷酸序列).

1.2 方法

1.2.1 巢式逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)获目的基因T β R I cDNA片段 肝组织中总RNA的提取,取冰冻肝组织,在组织切片机上切成5 μ m薄片,取10张放入0.1 mL/L DEPC水处理过的2.0的离心管中,然后加入4℃预冷的Trizol 1 mL,4℃冰箱放置1 h.加入4℃预冷的氯仿200 μ L,剧烈振荡后静置5 min,13 000 g 4℃离心15 min,取上清液,再次加入氯仿200 μ L,剧烈振荡后静置5 min,13 000 g 4℃离心15 min,取上清液加入等体积-20℃预冷异丙醇,轻轻混匀,置-20℃冰箱静置10 min,13 000 g 4℃离心25 min,倾倒入上清液,将沉淀用预冷、现配的750 mL/L酒精0.3 mL洗涤两次,每次洗涤后13 000 g 4℃离心5 min,第二次离心后倒去上清液,空气晾干10 min,即得RNA沉淀,用30 μ L 0.1 mL/L DEPC水处理过的无菌双蒸水溶解.15 g/L琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性,并用紫外分光核酸蛋白分析仪测定RNA浓度和纯度,-20℃保存RNA备用.

使用一步法RT-PCR试剂盒,反应体系:5 \times buffer 5.0 μ L、dNTP 1.0 μ L、引物F₁ 0.3 μ L、引物R₁ 0.3 μ L、Rnasein 0.1 μ L、Enzyme mixed 1.0 μ L、Rnase free water 15.3 μ L、RNA模板 2.0 μ L、总反应体积25 μ L.逆转录聚合酶链反应条件:(1)cDNA合成与预变性:50℃ 30 min,95℃ 15 min;(2)PCR扩增:94℃ 30 s,55℃ 45 s,72℃ 1 min,35个循环;(3)最后延伸:72℃ 10 min,产物

经10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测。

巢式PCR扩增T β R I基因片断: 反应体系50 μ L, 含: 无菌双蒸水38.2 μ L、10 \times buffer 4.9 μ L、10 mmol/L dNTP 0.9 μ L、引物F₂ 0.5 μ L、引物R₂ 0.5 μ L、25 mmol/L MgCl₂ 3.75 μ L、Taq DNA聚合酶0.25 μ L、RT-PCR产物1.0 μ L。PCR反应条件: (1)预变性: 95 $^{\circ}$ C 4 min; (2)PCR扩增: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35个循环; (3)最后延伸: 72 $^{\circ}$ C 10 min, 巢式PCR的扩增产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 反义T β R I /pcDNA3.1(+)-真核表达重组质粒的构建 (1)感受态细菌的制备: 从冻存大肠埃希菌JM109菌液中沾取少量菌液分别接种于Amp(-)和Amp(+)-LB固体培养基平皿上, 37 $^{\circ}$ C过夜, 从Amp(-)平皿中挑取单个菌落接种于LB培养液中, 37 $^{\circ}$ C振荡过夜(120 r/min), 再从中取0.5 mL菌液接种于50 mL LB培养基中, 37 $^{\circ}$ C剧烈振荡培养2 h(250 r/min), 用CaCl₂法诱导感受态细胞。(2)pcDNA3.1(+)载体与目的片断的连接: 真核表达载体pcDNA3.1(+)在多克隆位点处用EcoR I、XhoI I 双酶切线性化, 切胶纯化回收; T β R I 基因片断双酶切后切胶纯化回收; 将纯化回收的pcDNA3.1(+)线性化载体和T β R I 基因片段定向及反向连接, 重组后即T β R I /pcDNA3.1(+)-真核表达重组质粒。pcDNA3.1(+)酶切反应体系: 第一次酶切, 灭菌双蒸水13.4 μ L、BufferH 3 μ L、BSA 0.6 μ L、pcDNA3.1(+) 10 μ L、EcoR I 3 μ L, 总反应体积30 μ L, 反应条件: 37 $^{\circ}$ C水浴2 h; 行第二次酶切, 灭菌双蒸水9.4 μ L、BufferD 5 μ L、BSA 0.6 μ L、XhoI I 5 μ L, 总反应体积50 μ L, 反应条件: 37 $^{\circ}$ C水浴2 h。T β R I 基因片段酶切反应体系: 第一次酶切, 灭菌双蒸水5.2 μ L、BufferH 2.5 μ L、BSA 0.3 μ L、纯化回收的T β R I 基因片断15 μ L、EcoR I 2.0 μ L, 总反应体积25 μ L, 反应条件: 37 $^{\circ}$ C水浴2.5 h; 行第二次酶切, 灭菌双蒸水8.2 μ L、BufferD 2.5 μ L、BSA 0.3 μ L、XhoI I 4 μ L, 总反应体积30 μ L, 反应条件: 37 $^{\circ}$ C水浴2.5 h。应用T4DNA连接酶, 载体DNA与插入DNA比例为3:7:1, 分别做了22 $^{\circ}$ C连接2 h及14 $^{\circ}$ C连接过夜。(3)细菌转化: 取已连接的质粒DNA 5 μ L, 加入200 μ L感受态细菌中, 冰浴30 min, 42 $^{\circ}$ C水浴(热休克)90 s, 立即冰浴5 min, 将菌液移入装有预热至37 $^{\circ}$ C的800 μ L LB培养液的2 mL灭菌离心管中, 37 $^{\circ}$ C 120 r/min振荡1 h, 5 000 r/min离心1 min后, 弃上清

空白 产物 产物 Marker

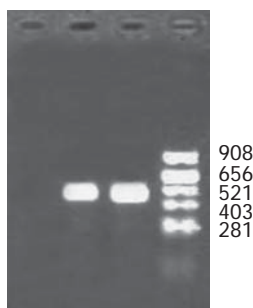


图1 经RT-PCR获得目的基因T β R I cDNA片段, 产物行10 g/L琼脂糖凝胶电泳的结果。

液800 μ L, 将剩余200 μ L菌液平铺于Amp(+)-LB平皿上, 37 $^{\circ}$ C恒温箱中平皿倒置培养16-20 h, 并同时设置阳性对照和阴性对照。

1.2.3 阳性克隆的筛选和鉴定 平皿培养16-20 h后, 快速连接体系及过夜连接体系培养基上均可见有散在的单个菌落, 随机挑选单个菌落, 接种于5 mL Amp(+)-LB培养液中, 37 $^{\circ}$ C 250 r/min振荡过夜。取出200 μ L菌液+甘油冷藏作保存菌种外, 其余菌液用小剂量质粒抽提试剂盒按说明书行小剂量质粒提取。取所得质粒5 μ L于10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 可见有质粒样双带, 认为是阳性克隆, 进一步作双酶切鉴定。取样本10 μ L用EcoR I和XhoI I 双酶切后各取10 μ L行10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果。酶切证实的阳性克隆, 做LB培养基穿刺培养后送上海Sangon公司测序。

2 结果

2.1 T β R I cDNA片段的获得与扩增 从鼠的肝组织中提取的总RNA, 电泳鉴定28S, 18S条带完整, 而且28S条带亮度为18S的1倍左右, 说明RNA无明显降解, 分光光度计测定 $A_{260}/A_{280} = 1.9150$, RNA浓度为770 mg/L。经巢式RT-PCR扩增后, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 在DNA Marker 440 bp附近可见明显条带, 与所需目的片段大小相符, 空白对照则无(图1)。

2.2 载体pcDNA3.1(+)-T β R I 基因片段的切胶纯化回收 真核表达载体pcDNA3.1(+)双酶切线性化后切胶纯化回收及T β R I 基因片断双酶切后切胶纯化回收均可见单一清晰目的条带(图2)。

2.3 阳性克隆的双酶切鉴定及测序结果 在Amp(+)-LB培养基平皿上随机挑取单个菌落, 经增菌, 抽取质粒经双酶切后行10 g/L琼脂糖凝

■创新盘点

由于反义技术是近十几年才发展起来的新技术, 目前构建反义真核表达质粒并通过反义技术干预和调控基因表达的相关报道并不多见。本实验应用巢式RT-PCR技术获得T β R I 基因片段, 其间采用嵌套引物策略, 采取巢式PCR技术进行两次扩增, 减少了非靶序列的扩增。用基因重组技术以pcDNA3.1(+)为载体构建反义T β R I 基因真核表达质粒。

■应用要点

构建鼠反义转化生长因子β I 型受体(TβR I)基因pcDNA3.1(+)-真核表达质粒,为进一步研究通过抑制TβR I 的表达或通过调节TβR I、TβR II 两种受体的比例来干预肝纤维化的发生发展提供实验基础.

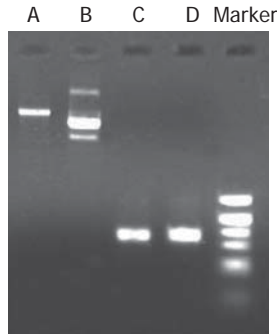


图 2 pcDNA3.1 (+) 及TβR I 基因片段经XhoI 和EcoR I 双酶切后切胶纯化回收后结果. A: pcDNA3.1(+)-双酶切线性化后切胶纯化回收; B: pcDNA3.1(+); C: 纯化的目的基因片段双酶切后切胶纯化回收; D: 纯化的目的基因片段.

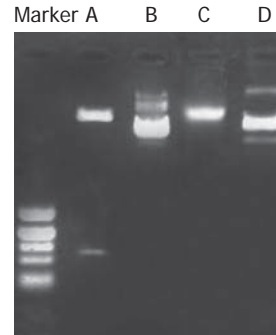


图 3 阳性克隆的双酶切鉴定结果. A: 酶切后反义TβR I /pcDNA3.1(+)-真核表达重组质粒; B: 反义TβR I /pcDNA3.1(+)-真核表达重组质粒; C: 纯化后线性pcDNA3.1(+); D: pcDNA3.1(+).



图 4 阳性克隆测序结果.

胶电泳在DNA Marker 430 bp和线性化纯化后pcDNA3.1(+)-附近可见两条明显条带,与所需目的片段大小相符,证实为阳性克隆(图3).由于F₂、R₂引物所带酶切位点与载体pcDNA3.1(+)-所带的酶切位点方向相反,故所得为反义TβR I

/pcDNA3.1(+)-真核表达重组质粒. 阳性克隆质粒测序结果(图4)经blast对照(Gene ID: 29591)完全一致.

3 讨论

3.1 TβR I 的研究对肝纤维化治疗的意义 TGF-β

是体内最有力分布最广泛的促纤维化介质, 其在体内的动态平衡的改变在肝纤维化的发生发展中发挥着重要作用^[4-8]. 不少实验表明血清TGF- β 1水平与肝纤维化指标和肝组织的病理关系具有相关性^[9-11]. 亦有大量的实验表明阻断TGF- β 信号传导能显著地抑制HSC的活化, 延缓肝纤维化的进程^[12-15]. 现TGF- β 信号传导过程已基本阐明, 活化的TGF- β 必须与相应的细胞膜受体结合才能发挥作用, 这些受体包括T β R I、T β R II、T β R III^[16,17], 而T β R I 是唯一的直接将信号传递到细胞内的受体^[18]. 近年来不同状态下细胞表面受体表达的不同和不同的受体表达对TGF- β 信号传导的影响的研究不断得到深入. 目前许多研究均提示传导过程中T β R I 型受体可通过对Smad辨认^[19-21]决定细胞内信号的特异性, 而这可能和细胞表面的endoglin受体表达变化有关^[22]. 亦有报道表明T β R I 型受体对内皮素(endothelin-1, ET-1)的表达有调节作用^[23,24], 而ET-1对肝损伤后纤维化的维持和门脉高压的形成具有重要的意义. Roulot *et al*^[3]发现虽然绝大多数细胞都有T β R I、T β R II 两种受体, 但比例并不相同, 对TGF- β 的反应性也大不相同, 如肝HSC活化后其细胞表面的T β R II 显著减少, 而T β R I 增加或保持不变, 并认为这可能是HSC活化后功能改变的部分原因. 目前国内外通过不同方法抑制T β R II 的表达来延缓肝纤维化的进程的实验较多^[25,15], 而通过抑制T β R I 的表达干预肝纤维化的发生发展的实验较少.

3.2 鼠反义T β R I /pcDNA3.1(+)-真核表达重组质粒的成功构建 鼠T β R I 基因定位于鼠5q22, 含有9个外显子, 全基因长度约5.3 kb. 反义RNA技术是根据核酸杂交原理, 借助基因重组技术, 将特异的反义基因连接到特定的表达载体上(质粒, 病毒), 转录出反义RNA与相应的mRNA形成双链, 从而在核酸复制、转录及翻译水平高度抑制靶基因的表达^[1]. 反义RNA作用机制包括与靶基因形成RNA:RNA二聚体, 阻止mRNA与核糖体的结合及移动抑制翻译或影响前体mRNA的加工, 这要求目的基因的选择最好从翻译起始点延伸0.5-3.0 kb长的片段, 而且互补于5'和3'非翻译区的序列往往有较好的效果^[26,27]; 或反义RNA结合启动子、操纵基因、弱化子及终止子单链抑制转录, 最终抑制靶基因表达. pcDNA3.1(+)-是一个由人类巨细胞病毒启动子控制转录起始的表达质粒, 含有T7、BGH启动子, 为RNA聚合酶附着作用提供了特

异性识别位点; 并含有高效增强子SV40, 为促进基因转染活性的顺式调控元件; 这样使其调控的基因可在哺乳动物细胞中获得稳定表达并在一定程度上保证了目的基因的稳定遗传. 此外, pcDNA3.1(+)-编码区还含有氨苄青霉素(Amp)抗性基因, 便于做阳性克隆筛选^[28-31]. 采用嵌套引物策略, 采取巢式PCR技术进行两次扩增, 可减少非靶序列的扩增. 根据这些理论, 我们选取pcDNA3.1(+)-作为载体, 从鼠肝组织中提取总RNA, 采用巢式RT-PCR技术扩增出约440 bp的T β R I 片段, 并将其插入到真核表达质粒pcDNA3.1(+)-中. 重组的质粒经酶切鉴定与预期值大小相符, 测序分析证实为T β R I 全长编码序列中的基因片段, 片段长度432 bp, 基因序列与GenBank发表的序列完全一致, 表明成功构建了鼠反义T β R I /pcDNA3.1(+)-真核表达重组质粒. 这一工作的完成, 为后续的将反义T β R I /pcDNA3.1(+)-真核表达重组质粒导入肝纤维化模型大鼠的体内研究其对肝纤维化的影响提供前提条件.

3.3 经验教训 在本次实验过程中, 就重组质粒构建过程中的连接步骤, 直接将双酶切线性化切胶纯化回收的真核表达载体pcDNA3.1(+)-片断与双酶切后切胶纯化回收的T β R I 基因片连接, 同时建立了不同比例的连接反应体系, 载体DNA:外源插入DNA摩尔比为: 3:1, 5:1, 7:1, 连接时间和温度选择了22 $^{\circ}$ C连接2 h及14 $^{\circ}$ C连接过夜, 最后均成功获得了重组子. 总结经验认为所得目的片段的浓度及载体浓度大于10 mg/L即可试行快速连接, 可有效提高实验的效率. 如目的片段的浓度较小, 则应行过夜连接, 实验中曾将目的片段连接到T载体, 再酶切纯化回收, 结果所得目的片段的浓度很低, 行快速连接未获成功, 过夜连接则获得重组子, 但实验周期延长. 在实验中同时建立不同比例的连接反应体系, 可有利于提高实验效率.

致谢: 本实验承蒙石河子大学第一附属医院中心实验室的杨军主任、周婷老师悉心指导和热忱帮助, 在此一并致谢.

4 参考文献

- 1 王吉耀主编. 现代肝病治疗-理论与进展. 第一版. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 179-186
- 2 Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation. *MedGenMed* 2002; 4: 27
- 3 Roulot D, Sevcsik AM, Coste T, Strosberg AD, Marullo S. Role of transforming growth factor beta type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis C and experimental fibrosis in rats.

■名词解释

反义RNA技术: 是根据核酸杂交原理, 借助基因重组技术, 将特异的反义基因连接到特定的表达载体上(质粒, 病毒), 转录出反义RNA与相应的mRNA形成双链, 从而在核酸复制、转录及翻译水平高度抑制靶基因的表达. TGF- β 受体: TGF- β 信号传导过程中活化的TGF- β 需与相应的细胞膜受体结合, 包括T β R I、T β R II、T β R III, 然后将信号传入到细胞内.

- Hepatology* 1999; 29: 1730-1738
- 4 Par A, Par G. Liver fibrosis: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Orv Hetil* 2005; 146: 3-13
 - 5 Lewindon PJ, Pereira TN, Hoskins AC, Bridle KR, Williamson RM, Shepherd RW, Ramm GA. The role of hepatic stellate cells and transforming growth factor-beta(1) in cystic fibrosis liver disease. *Am J Pathol* 2002; 160: 1705-1715
 - 6 Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004; 18: 816-827
 - 7 聂青和. 肝纤维化的逆转策略及研究现状. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1165-1174
 - 8 Wada W, Kuwano H, Hasegawa Y, Kojima I. The dependence of transforming growth factor-beta-induced collagen production on autocrine factor activin A in hepatic stellate cells. *Endocrinology* 2004; 145: 2753-2759
 - 9 刘芳, 王晓萌, 刘金星, 魏梅新. 慢性乙肝患者血清 TGF-beta1与肝组织病理和肝纤维组织定量的关系. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 528-531
 - 10 李清华, 秦成勇, 劳萍. 转化生长因子beta1在人肝纤维化组织中的表达及作用的探讨. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 103-105
 - 11 Date M, Matsuzaki K, Matsushita M, Tahashi Y, Furukawa F, Inoue K. Modulation of transforming growth factor beta function in hepatocytes and hepatic stellate cells in rat liver injury. *Gut* 2000; 46: 719-724
 - 12 周亚军, 殷冬梅, 陈宏山, 朱惠霞, 王新. 转化生长因子beta信号传导阻断对鼠肝星状细胞培养激活的影响. *中华肝脏病杂志* 2003; 11: 282-284
 - 13 Fernandez T, Amoroso S, Sharpe S, Jones GM, Bliskovski V, Kovalchuk A, Wakefield LM, Kim SJ, Potter M, Letterio JJ. Disruption of transforming growth factor beta signaling by a novel ligand-dependent mechanism. *J Exp Med* 2002; 195: 1247-1255
 - 14 徐新保, 冷希圣, 杨晓, 何振平. 阻断TGFbeta信号传导在减缓四氯化碳/乙醇诱导的小鼠肝细胞癌发展中的作用. *中华医学杂志* 2004; 84: 1122-1125
 - 15 George J, Roulot D, Koteliansky VE, Bissell DM. In vivo inhibition of rat stellate cell activation by soluble transforming growth factor beta type II receptor: a potential new therapy for hepatic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12719-12724
 - 16 Wells RG. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279: G845-G850
 - 17 Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000; 19: 1745-1754
 - 18 Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 2003; 425: 577-584
 - 19 Yakymovych I, Heldin CH, Souchelnytskyi S. Smad2 phosphorylation by type I receptor: contribution of arginine 462 and cysteine 463 In the C terminus of Smad2 for specificity. *J Biol Chem* 2004; 279: 35781-35787
 - 20 Huse M, Muir TW, Xu L, Chen YG, Kuriyan J, Massague J. The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *Mol Cell* 2001; 8: 671-682
 - 21 Callahan JF, Burgess JL, Fornwald JA, Gaster LM, Harling JD, Harrington FP, Heer J, Kwon C, Lehr R, Mathur A, Olson BA, Weinstock J, Laping NJ. Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5). *J Med Chem* 2002; 45: 999-1001
 - 22 Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, Gressner AM, Weiskirchen R. Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 3078-3087
 - 23 Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J* 2002; 21: 1743-1753
 - 24 Shao R, Shi Z, Gotwals PJ, Koteliansky VE, George J, Rockey DC. Cell and molecular regulation of endothelin-1 production during hepatic wound healing. *Mol Biol Cell* 2003; 14: 2327-2341
 - 25 汪玲, 胡国龄, 谭德明, 刘双虎. TGFbeta II型受体部分基因表达质粒对实验性大鼠肝纤维化的影响. *中华传染病杂志* 2002; 20: 168-171
 - 26 Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 2745-2752
 - 27 王波, 陈梅红. 反义技术研究进展. *中国生物工程杂志* 2004; 12: 43-47
 - 28 Fu RB, Wu PS, Song YF, Qiu J, Dai TY, Li JH, Xiu JC. Construction of eukaryotic expression vectors of two mutants of hypoxia-inducible factor-1 and their expressions in human microvascular endothelial cells. *Diyi Junyi Daxue Xuebao* 2005; 25: 1348-1351
 - 29 RenYue-Xin, 宋于刚, 陈学清, 智发朝, 钟世顺, 南清振, 武金宝, 崔忠林. pcDNA3.1(+)-MCP-1和pcDNA3.1(+)-Gro alpha真核表达质粒的构建及鉴定. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2623-2626
 - 30 Eickelberg O, Centrella M, Reiss M, Kashgarian M, Wells RG. Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J Biol Chem* 2002; 277: 823-829
 - 31 Han XC, Zhang H, Jia MK, Han G, Jiang WD. Expression of TIMP-3 Gene by Construction of a Eukaryotic Cell Expression Vector and Its Role in Reduction of Metastasis in a Human -Breast Cancer Cell Line. *Cell Mol Immunol* 2004; 1: 308-310

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

肝癌组织中脱- γ -羧基凝血酶原的测定及意义

袁联文, 唐伟, 周建平, 幕内雅敏

袁联文, 周建平, 中南大学湘雅二医院老年外科 湖南省长沙市 410011
唐伟, 幕内雅敏, 日本东京大学附属病院肝胆胰外科 日本东京 113-8655
袁联文, 男, 1971-10-23生, 湖南祁阳人, 汉族, 2003年中南大学湘雅医学院博士, 副教授, 主要从事消化道肿瘤研究。
通讯作者: 袁联文, 410011, 湖南省长沙市人民中路86号, 中南大学湘雅二医院老年外科. yuanlianwen1971@yahoo.com.cn.
电话: 0731-4129801
收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-28

Quantitative measurement of des- γ -carboxy-prothrombin in cancerous and non-cancerous liver tissue and its role in hepatocellular carcinoma

Lian-Wen Yuan, Wei Tang, Jiang-Ping Zhou, Masatoshi Makuuchi

Lian-Wen Yuan, Jiang-Ping Zhou, Department of Geriatrics Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China
Wei Tang, Masatoshi Makuuchi, Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the Affiliated Hospital, University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan
Correspondence to: Dr. Lian-Wen Yuan, Department of Geriatrics Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China. yuanlianwen1971@yahoo.com.cn
Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-10-28

Abstract

AIM: To measure the levels of des- γ -carboxy-prothrombin(DCP)in cancerous and non-cancerous liver tissues of hepatocellular carcinoma (HCC)quantitatively, and to investigate their roles in the elevated serum DCP and clinical significance.

METHODS: The levels of DCP in serum, cancerous and non-cancerous liver tissue samples prepared from 41 patients with a single HCC nodule were measured using an electro-chemiluminescence immunoassay (ECLIA).

RESULTS: The levels of DCP in HCC tissues ranged from 7.1 to 2098623.7 mAU/g tissue weight, with a median of 84447.7 mAU/g, and the levels of DCP in non-cancer tissues ranged from 0 to 23299.2 mAU/g tissue weight, with

a median of 888.1 mAU/g. The DCP levels in HCC tissue were significantly higher than those in non-cancer tissue (4 925.5 mAU/g vs 195.2 mAU/g, $P < 0.001$). The DCP levels in cell membranes were significantly higher than those in the cytoplasm ($P < 0.001$). The logarithm of serum DCP levels was correlated not only with that in HCC tissues ($P = 0.019$), but also with that in non-cancer tissues ($P = 0.020$). The logarithm of DCP levels in HCC tissues was correlated with that of DCP levels in non-cancer tissues ($P = 0.011$). The DCP levels in HCC tissues and non-cancer tissues with hepatitis C virus infection were significantly higher than those in the tissues without HCV infection, respectively (6 336.6 mAU/g vs 1 799.1 mAU/g, 248.0 mAU/g vs 102.5 mAU/g, both $P < 0.05$). The DCP levels in HCC tissues with portal vein invasion were significantly higher than those in HCC tissues without portal vein invasion ($P = 0.028$). The DCP levels in HCC tissues with hepatic vein invasion were markedly lower than those in HCC tissues without hepatic vein invasion ($P = 0.042$). Furthermore, the DCP levels in non-cancerous tissues with intrahepatic metastatic lesions were significantly higher than those in non-cancer tissues without intrahepatic metastatic lesions ($P = 0.023$).

CONCLUSION: The elevated serum DCP originates from HCC tissues and non-cancerous tissues. Tissue DCP may be a marker for the prognosis of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Des- γ -carboxy-prothrombin, Electro-chemiluminescence immunoassay

Yuan LW, Tang W, Zhou JP, Makuuchi M. Quantitative measurement of des- γ -carboxy-prothrombin in cancerous and non-cancerous liver tissue and its role in hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):45-49

摘要

目的: 定量分析癌组织和非癌组织脱- γ -羧基凝血酶原(DCP)的浓度, 探讨它们在血清DCP升高的作用及临床意义。

■背景资料

肝癌的诊断主要依靠影像学的发现和血清肿瘤标志物的检测。甲胎蛋白(AFP)是我国临床上最常用的一种肝癌肿瘤标志物, 近年来, 脱- γ -羧基凝血酶原(DCP)作为一种新的肿瘤标志物在肝癌中的应用价值已得到了证实。DCP的产生机制尚未完全明了。

■ 研发前沿

DCP亚型的解析以及DCP不同亚型的测定对肝脏恶性肿瘤的鉴别意义。

方法: 用电化学发光免疫分析法(ECLIA)定量测定41例肝癌患者血清、癌组织和非癌组织中DCP的含量。

结果: 癌组织DCP浓度平均为84 447.7(7.1-20 98 623.7)mAU/g, 非癌组织DCP浓度平均为888.1(0-23 299.2)mAU/g. 细胞膜上的DCP浓度明显高于细胞质中DCP浓度($P < 0.001$), 癌组织DCP浓度明显高于非癌组织(4 926.5 vs 195.2 mAU/g, $P < 0.001$). 血清DCP浓度对数与癌组织DCP浓度对数($P = 0.019$)、非癌组织DCP浓度对数($P = 0.020$)均存在明显相关性, 癌组织DCP浓度对数和非癌组织DCP浓度对数间也存在相关性($P = 0.011$). HCV感染的肝癌组癌组织和非癌组织DCP浓度均明显高于HCV感染阴性的肝癌组(6 336.6 vs 1 799.1 mAU/g, 248.0 vs 102.5 mAU/g, $P < 0.05$). 门脉浸润的肝癌组癌组织DCP浓度明显高于没有门脉浸润的肝癌组($P = 0.028$), 而肝静脉浸润组癌组织DCP浓度明显低于无肝静脉浸润组($P = 0.042$). 伴有肝内转移的肝癌组非癌组织DCP浓度明显高于无肝内转移的肝癌组($P = 0.023$).

结论: 癌组织产生过量DCP是肝癌血清DCP的主要来源, 是一预后标志物, 但肝癌血清DCP浓度是癌组织和非癌组织产生DCP浓度的整体表现。

关键词: 肝癌; 脱- γ -羧基凝血酶原; 电化学发光免疫分析法

袁联文, 唐伟, 周建平, 幕内雅敏. 肝癌组织中脱- γ -羧基凝血酶原的测定及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(1):45-49
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/45.asp>

0 引言

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一^[1-5]. 近年来, 血清肿瘤标志物及影像学的进步使肝癌的早期诊断率和长期生存率有了明显的提高. 脱- γ -羧基凝血酶原(Des- γ -carboxy-prothrombin, DCP), 又称异常凝血酶原, 作为肝癌血清标志物的临床价值已经得到了证实^[6-14]. 但肝癌产生DCP的机制尚未完全明了. 我们应用电化学发光免疫分析法定量测定了41例原发性肝癌患者的癌组织和非癌组织DCP产生情况, 以了解癌组织和非癌组织中DCP水平, 并探讨它们与血清DCP水平及肝癌临床病理因子间的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 原发性肝癌手术切除标本41例, 病理确

诊. 男33例, 女8例, 年龄43-78 (62.7 \pm 10.3)岁. 有病毒性肝炎感染的血清学证据38例(92.7%), 其中HBsAg阳性11例, HCV-Ab阳性31例, HBsAg和HCV-Ab均阳性4例. 背景肝显示肝硬化17例(41.6%). 高分化癌3例, 中分化癌34例, 低分化癌4例. I期肝癌6例, II期19例, III期14例, IV期2例. 所有的肝切除标本在切下后立刻分成癌组织和非癌组织置于-80℃冰箱中保存用作DCP分析. 0.2 mol/L Tris-HCl(pH = 8.0), 1 mol/L Tris-HCl(pH = 8.0), Triton X-100(和光纯药工业株式会社, 东京); Kubota 离心机(久保田商事株式会社, 东京); TLA-110型Beckman超高速离心机(Beckman Coulter株式会社, 东京); AE-6590型微量标本透析装置(Atto Corp, 东京); 536-03431透析膜(和光纯药工业株式会社, 东京); 电化学发光免疫分析测定试剂盒; 标准ECLIA自动测定装置(Picolumi 8220)(东京); Picolumi 8220 用反应管(Eisai Corp, 东京).

1.2 方法 -80℃的肝组织经流水解冻, 用生理盐水清洗3次以除尽组织中的血液, 4℃条件下手工将各组织标本捻成匀浆, 然后于20 mmol/L Tris-HCl(pH = 8.0)中4℃下震荡器上震荡24 h以充分溶解匀浆中蛋白质, 将上述混浊液于4℃离心机中12 000 g离心30 min, 再将上清液置于超高速离心机中4℃, 105 000 g离心60 min, 这时的上清液即为标本A. 将上述两步的沉淀物加入10 g/L Triton X-100、20 mmol/L Tris-HCl液中, 然后4℃下置于震荡器上震荡2 h以破坏细胞膜, 然后按上述两步离心, 取上清液于4℃, 20 mmol/L Tris-HCl液中透析除去Triton X-100后得到标本B. 肝组织DCP总量为标本A、B两者DCP量之和 (mAU/g). 脱- γ -羧基凝血酶原的测定[采用电化学发光免疫分析法(ECLIA)]按试剂盒操作要求进行。

统计学处理 应用SPSS11.0统计软件处理. 血清和组织DCP的浓度分别标出中位数、25和75分位值. 用Wilcoxon配对法检测癌组织和非癌组织DCP的浓度及胞质和细胞膜上DCP浓度间的差异. 用Mann-Whitney U法评价不同组间癌组织和非癌组织DCP的浓度的差别. 用Linear regression法评价癌组织、非癌组织和血清DCP浓度三者对数间的相互关系. $P < 0.05$ 为有显著差异。

2 结果

2.1 肝癌组织中DCP含量 41例肝癌组织和非癌组织中DCP含量, 每一组织标本的DCP总量为

表 1 肝癌组织DCP浓度 (mAU/g)与临床病理间的关系

因子	<i>n</i>	癌组织中位数 (25,75分位数)	非癌组织中位数 (25,75分位数)
HCV (+)	30	6 336.6 (1 720.1, 51 411.4) ^a	248.0 (111.4, 508.2) ^a
HCV (-)	11	1 799.1 (191.8, 5 765.7)	102.5 (23.5, 195.2)
门脉浸润 (+)	19	11 299.1 (1 978.3, 97 598.8) ^a	216.8 (100.8, 672.8)
门脉浸润 (-)	22	2 934.8 (320.9, 7 394.3)	167.9 (100.8, 327.1)
静脉浸润 (+)	6	455.3 (155.5, 5 592.6) ^a	90.1 (52.3, 169.4)
静脉浸润 (-)	35	5 331.8 (1 727.4, 50 854.8)	205.3 (102.5, 486.8)
肝内转移 (+)	14	14 324.9 (2 978.3, 107 598.8)	317.2 (100.8, 672.8) ^a
肝内转移 (-)	27	6 639.6 (1 800.8, 67 222.8)	101.8 (20.8, 172.8)

^a $P < 0.05$, 组内比。

胞质(标本A)和细胞膜(标本B)两部分的总和. 非癌组织中DCP为888.1(0-23 299.2) mAU/g, 25分位数、中位数值和75分位数分别为99.1、195.2和449.1 mAU/g. 癌组织中DCP浓度为84 448(7.1-2 098 623.7) mAU/g, 25分位数、中位数值和75分位数分别为953.6、4 925.5和42 009.2 mAU/g. 统计分析发现癌组织和非癌组织的细胞膜上DCP浓度均明显高于细胞质中DCP浓度(4 089.5 mAU/g vs 236.3, 152.4 mAU/g vs 20.8, $P < 0.001$), 癌组织DCP浓度明显高于非癌组织(4 925.5 mAU/g vs 195.2, $P < 0.001$). 癌组织和非癌组织中DCP浓度与HCV感染有关, 而与HBV感染无明显相关性, HCV感染组癌组织和非癌组织中DCP浓度均明显高于丙型肝炎病毒感染阴性组(6 336.6 mAU/g vs 1 799.1, 248.0 mAU/g vs 102.5, $P < 0.05$). 存在门脉浸润的肝癌组癌组织中DCP浓度明显高于无门脉浸润的肝癌组($P = 0.028$), 静脉浸润的肝癌组癌组织中DCP浓度明显低于无静脉浸润组($P = 0.042$), 但其他临床病理因子组间, 如性别、年龄、肿瘤直径、肿瘤分化、生长类型、包膜形成、包膜浸润、隔膜形成、胆管浸润、切缘癌浸润和TNM分级, 癌组织中DCP浓度无明显差异. 肝癌非癌组织中DCP浓度与隔膜形成、肝内转移有关, 即伴有肝内转移的肝癌组明显高于无肝内转移组($P = 0.023$). 其他临床病理因子组间非癌组织中DCP浓度无明显差异(表1).

2.2 肝癌组织与血清DCP浓度间的关系 血清DCP浓度的对数和癌组织DCP浓度对数间存在直线相关关系[$Pearson r = 0.364, P = 0.019$ (双侧)], 回归方程为 $y = 1.356 + 0.303x$ (y 代表血清DCP浓度对数, x 代表癌组织DCP浓度对数). 血清DCP浓度的对数和非癌组织DCP浓度对数间存在直线相关关系[$Pearson r = 0.362, P = 0.020$ (双侧)], 回归方程为

$y = 1.521 + 0.514x$ (y 代表血清DCP浓度对数, x 代表肝癌非癌组织DCP浓度对数). 癌组织DCP浓度对数和非癌组织DCP浓度对数间存在直线相关关系[$Pearson r = 0.395, P = 0.011$ (双侧)], 回归方程为 $y = 1.826 + 0.674x$ (y 代表癌组织DCP浓度对数, x 代表非癌组织DCP浓度对数), 血清DCP浓度的对数和肝组织总DCP浓度对数间存在直线相关关系[$Pearson r = 0.364, P = 0.016$ (双侧)], 回归方程为 $y = 1.254 + 0.331x$ (y 代表血清DCP浓度对数, x 代表肝组织总DCP浓度对数).

3 讨论

虽然有关血清DCP在肝癌中的测定情况及临床意义的研究有不少的报道^[6-15], 但关于肝癌癌组织和非癌组织DCP的定量测定及其临床意义的研究甚少. Ono *et al*^[16]首次测定了肝癌癌组织和非癌组织DCP的浓度, 报道肝癌癌组织中DCP的浓度明显高于非癌组织. Shimada *et al*^[17]2000年也研究了28例肝癌癌组织和非癌组织DCP的浓度, 重点探讨多中心发生的肝癌和非多中心发生的肝癌间的相互比较, 并认为组织DCP异常升高是肝细胞转化为肝癌细胞的一个早期事件. 我们为了避免多中心发生的肝癌中各肿瘤间相互影响, 选择了41例病理组织证实为单发性肝癌作为研究对象, 定性、定量的探讨肝癌癌组织和非癌组织DCP的浓度以及它们与血清DCP浓度、各临床病理因子间的相互关系. Fujioka *et al*^[18]认为组织DCP被肝癌细胞产生后, 先储存在细胞中一段时间然后再分泌到血液中. 我们发现癌细胞和非癌细胞细胞膜上的DCP浓度明显高于细胞质, 提示细胞膜可能是DCP的储存库, 癌细胞和非癌细胞产生DCP后, 大部分先储存在细胞膜上, 再进入血液. 我们发现肝癌癌组织DCP浓度也明显高于非癌组织, 和以前的研究

■ 创新盘点

以前的研究证实了肝癌细胞能产生大量DCP, 而忽视了癌周组织的作用. 本文发现癌周肝组织也与血清DCP升高有关, 肝癌患者血清DCP浓度是癌组织和非癌组织产生DCP浓度的整体表现.

■应用要点

DCP与AFP在评价肝癌上可相互补充,联合检测可提高肝癌的诊断率,特别是对早期肝癌的诊断。

结果相似^[16,19],且研究还显示血清DCP浓度和肝癌组织DCP浓度有相关性,这提示肝癌组织产生的DCP是血清DCP的主要来源。但部分肝癌组织DCP的浓度与血清DCP浓度关系相反,可能是由于这部分肝癌的细胞膜在转运DCP的过程中存在异常,这一点须进一步研究。同时非癌组织DCP浓度高低与癌组织DCP浓度存在明显相关性,说明非癌组织的DCP产生受到来自癌组织产生DCP高低影响。最可能的解释肝癌癌细胞在快速增殖过程中维生素K消耗增加造成非癌局部维生素K缺乏导致非癌肝组织产生DCP也增加^[20-22]。我们首次详细评价了非癌组织DCP浓度对血清DCP的影响,发现血清DCP的浓度也与非癌组织DCP浓度存在相关关系,虽然未发现非癌组织DCP浓度高于对照组,但非癌组织DCP浓度高的肝癌血清DCP阳性率很高。说明血清DCP不仅受到肝癌组织产生DCP的影响,也受非癌组织产生DCP的影响,它反映了肝脏整体产生DCP的情况。

肝癌一个重要的临床病理特点是常常伴随有肝炎病毒的感染^[23-28]。我们发现HBV感染组与未感染组之间癌组织和非癌组织DCP浓度均未见明显差异,HCV感染组癌组织和非癌组织DCP浓度明显高于未感染组。说明HCV感染与肝癌组织DCP的产生存在一定的关系,具体机制有待进一步研究。不同的背景肝中,肝硬化、慢性肝炎或纤维化和正常肝组织3组间癌组织和非癌组织DCP浓度均未见明显差异,说明组织DCP的产生与不同的背景肝无明显关系,而AFP常受肝硬化、慢性肝炎等疾病的影响,也可解释DCP对肝癌的特异性为什么高于AFP。门脉浸润和肝内转移是预测肝癌预后的重要临床病理指标^[23,29-31]。我们发现存在门脉浸润的肝癌组癌组织DCP浓度明显高于没有门脉浸润的肝癌组,而肝静脉浸润组肝癌组癌组织DCP浓度明显低于没有肝静脉浸润组,这提示能产生高浓度DCP的肝癌易发生门脉浸润,不易发生肝静脉的浸润,具体机制不详。Shimada *et al*^[17]研究发现多中心发生的肝癌组非癌组织DCP浓度明显高于非多中心发生的肝癌组,认为非癌组织DCP浓度是肝癌多中心发生的最重要预测指标之一。我们研究显示存在肝内转移的肝癌组非癌组织DCP浓度明显高于没有肝内转移的肝癌组,提示非癌组织DCP浓度的测定可以作为肝癌肝内转移的一个预测指标。基于上述研究结果,DCP产生异常可能是肝细胞转变为肝癌细胞过程中的一个早期事件,具体机制有待进一步研究。

5 参考文献

- 1 吴孟超,陈汉,沈锋.原发性肝癌的外科治疗5524例报告.中华外科杂志 2001; 6: 417-421
- 2 Zhou XD, Tang ZY, Yu Y, Ma ZC, Wu ZQ, Zhang BH. Cryohepatectomy for liver cancer: preliminary evaluation of reducing postoperative recurrence. *Zhonghua Waikao Zazhi* 2005; 43: 439-441
- 3 Sikander A, Sadashiv S, Ronald S, Milind J. Transarterial chemoembolization in a patient with recurrent hepatocellular carcinoma and portal vein thrombosis: a case report and review of the literature. *Am J Clin Oncol* 2005; 28: 638-639
- 4 钟洪才,方驰华,池达智.术中氩氦刀靶向冷冻损毁术治疗中晚期肝癌的并发症及其防治.世界华人消化杂志 2005; 13: 145-147
- 5 李淑兰,张丽萍,卢启明.老年原发性肝癌与乙丙型肝炎的关系.世界华人消化杂志 2005; 13: 137-138
- 6 袁联文,唐伟,李永国.幕内雅敏.肝癌中脱- γ -羧基凝血酶原的表达及意义.世界华人消化杂志 2004; 12: 1543-1545
- 7 Tang W, Kokudo N, Sugawara Y, Guo Q, Imamura H, Sano K, Karako H, Qu X, Nakata M, Makuuchi M. Des-gamma-carboxyprothrombin expression in cancer and/or non-cancer liver tissues: association with survival of patients with resectable hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2005; 13: 25-30
- 8 Suzuki M, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Nakanishi Y, Koike K, Takaki A, Shiratori Y. Des-gamma-carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2005; 280: 6409-6415
- 9 Dohmen K, Shigematsu H, Irie K, Ishibashi H. Clinical characteristics among patients with hepatocellular carcinoma according to the serum levels of alpha-fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin. *Hepato-gastroenterology* 2003; 50: 2072-2078
- 10 Nagaoka S, Yatsushashi H, Hamada H, Yano K, Matsumoto T, Daikoku M, Arisawa K, Ishibashi H, Koga M, Sata M, Yano M. The des-gamma-carboxy prothrombin index is a new prognostic indicator for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2003; 98: 2671-2677
- 11 Uehara S, Gotoh K, Handa H, Tomita H, Senshuu M. Distribution of the heterogeneity of des-gamma-carboxyprothrombin in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1545-1552
- 12 Wang CS, Lin CL, Lee HC, Chen KY, Chiang MF, Chen HS, Lin TJ, Liao LY. Usefulness of serum des-gamma-carboxy prothrombin in detection of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6115-6119
- 13 Suzuki M, Shiraha H, Fujikawa T, Takaoka N, Ueda N, Nakanishi Y, Koike K, Takaki A, Shiratori Y. Des-gamma-carboxy prothrombin is a potential autologous growth factor for hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2005; 280: 6409-6415
- 14 袁联文,唐伟,李永国,幕内雅敏.脱- γ -羧基凝血酶原:一种有用的血清肝癌标志物.中华普通外科杂志 2004; 8: 506
- 15 Igarashi H, Aoyagi Y, Suda T, Mita Y, Kawai K. Studies on the correlation among the fucosylation index, concentration of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin as prognostic indicators in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2003; 27: 280-288
- 16 Ono M, Ohta H, Ohhira M, Sekiya C, Namiki M.

- Measurement of immunoreactive prothrombin, des-gamma-carboxy prothrombin, and vitamin K in human liver tissues: overproduction of immunoreactive prothrombin in hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol* 1990; 85: 1149-1154
- 17 Shimada M, Yamashita Y, Hamatsu T, Hasegawa H, Utsunomiya T, Aishima S, Sugimachi K. The role of des-gamma-carboxy prothrombin levels in hepatocellular carcinoma and liver tissues. *Cancer Lett* 2000; 159: 87-94
- 18 Fujioka M, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M. Immunohistologic study on the expressions of alpha-fetoprotein and protein induced by vitamin K absence or antagonist II in surgically resected small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2001; 34: 1128-1134
- 19 Huisse MG, Leclercq M, Belghiti J, Flejou JF, Suttie JW, Bezeaud A, Stafford DW, Guillin MC. Mechanism of the abnormal vitamin K-dependent gamma-carboxylation process in human hepatocellular carcinomas. *Cancer* 1994; 74: 1533-1541
- 20 Miyakawa T, Kajiwara Y, Shirahata A, Okamoto K, Itoh H, Ohsato K. Vitamin K contents in liver tissue of hepatocellular carcinoma patients. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 68-74
- 21 Ono M, Ohta H, Ohhira M, Sekiya C, Namiki M. Measurement of immunoreactive prothrombin precursor and vitamin-K-dependent gamma-carboxylation in human hepatocellular carcinoma tissues: decreased carboxylation of prothrombin precursor as a cause of des-gamma-carboxyprothrombin synthesis. *Tumour Biol* 1990; 11: 319-326
- 22 Yamagata H, Nakanishi T, Furukawa M, Okuda H, Obata H. Levels of vitamin K, immunoreactive prothrombin, des-gamma-carboxy prothrombin and gamma-glutamyl carboxylase activity in hepatocellular carcinoma tissue. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10: 8-13
- 23 Ou DP, Yang LY, Huang GW, Tao YM, Ding X, Chang ZG. Clinical analysis of the risk factors for recurrence of HCC and its relationship with HBV. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2061-2066
- 24 Li K, Wang L, Cheng J, Lu YY, Zhang LX, Mu JS, Hong Y, Liu Y, Duan HJ, Wang G, Li L, Chen JM. Interaction between hepatitis C virus core protein and translin protein--a possible molecular mechanism for hepatocellular carcinoma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 300-303
- 25 王辉云, 严瑞琪, 吴秋良, 龙江斌, 梁启万. 人肝癌中 P16和CDK4基因的遗传变异及其与HBV感染之间的关系. *中华消化杂志* 1999; 19: 25-28
- 26 白莉, 毛高平, 曹传平, 张映辉. 肝癌切除术后转移过程中炎性递质的作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1507-1509
- 27 苏小康, 赵先明, 李锦清, 崔学教, 谢晓华, 杨海燕, 徐发彬. beta-catenin和Cyclin D1在肝癌肝内转移中的作用. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1362-1364
- 28 向光明, 钟森. 乙肝病毒基因组变异与肝细胞癌的关系研究进展. *国外医学. 病毒学分册* 2005; 12: 65-67
- 29 Koike Y, Nakagawa K, Shiratori Y, Shiina S, Imamura M, Sato S, Obi S, Teratani T, Hamamura K, Yoshida H, Omata M. Factors affecting the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma invading the portal vein--a retrospective analysis using 952 consecutive HCC patients. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 2035-2039
- 30 Imamura H, Matsuyama Y, Miyagawa Y, Ishida K, Shimada R, Miyagawa S, Makuuchi M, Kawasaki S. Prognostic significance of anatomical resection and des-gamma-carboxy prothrombin in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Surg* 1999; 86: 1032-1038
- 31 吴福生, 赵文和, 梁廷波, 任国平, 马志敏, 滕理送. 影响3 cm以下小肝癌患者术后生存因素的观察. *中华外科杂志* 2005; 9: 579-583

■名词解释

PCP: 正常凝血酶原羧基末端含10个羧化谷氨酸. 在维生素K缺乏, 使用维生素K拮抗剂(如Warfarin)或肝功能障碍等情况下, 10个Gla全部或部分以谷氨酸残基的形式出现在血液中, 即脱- γ -羧基凝血酶原(DCP), 又称为异常凝血酶原, 在日本被称为维生素缺乏或拮抗剂诱导蛋白(PIVKA-II).

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

● 消息 ●

更正与说明专栏

本刊讯 《世界华人消化杂志》为了对同行评议、编辑、校对、审读、文章价值等质量进行跟踪报道, 特设“更正与说明”固定专栏, 包括“事实纠错”、“文字更正”、“解释说明”三个子栏目, 不仅对前一期或近期出现的文字差错和事实错误进行更正, 就引发歧义或晦涩难懂之处做解释说明, 而且针对文章的学术水平等进行讨论. 在此, 我们热烈欢迎读者、作者、编委等积极审读《世界华人消化杂志》, 给更正与说明栏目投稿. 投稿者凭文章的编号, 可免费注册(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/new/39.doc>)使用中国生物医学基金论文摘要库3年. 中国生物医学基金论文摘要库(<http://www.wjgnet.com/cmfa/index.jsp>)收录了1994-2005年国内发表在1204种生物医学类期刊总计20万以上的论文摘要. 这些论文受国家、军队和省部级自然科学基金、杰出青年基金、重大计划项目基金资助, 内容丰富、数据准确, 体现了我国生物医学的发展历程、脉络和方向, 可为相关领域广大学者和研究人员了解并掌握当前研究动态、开辟新的研究领域提供思路.

经肝动脉灌注 GRGDSP 联合化疗栓塞治疗大鼠肝肿瘤的机制

尹君, 梁惠民, 钱骏, 夏风, 王勇, 邓宪波, 王伟, 冯敢生

尹君, 梁惠民, 钱骏, 夏风, 王勇, 邓宪波, 王伟, 冯敢生, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科 湖北省武汉市 430022

尹君, 男, 1970年生, 河南省信阳市人, 汉族, 2005年华南科技大学同济医学院硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤介入治疗研究。

通讯作者: 梁惠民, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院放射科. lianghuimin-email@126.com
电话: 027-62865377

收稿日期: 2005-10-06 接受日期: 2005-10-13

Mechanism of transarterial administration of GRGDSP combined with chemoembolization for treating hepatic carcinoma in rats

Jun Yin, Hui-Min Liang, Jun Qian, Feng Xia, Yong Wang, Xian-Bo Deng, Wei Wang, Gan-Sheng Feng

Jun Yin, Hui-Min Liang, Jun Qian, Feng Xia, Yong Wang, Xian-Bo Deng, Wei Wang, Gan-Sheng Feng, Department of Radiology, the Affiliated Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China
Correspondence to: Hui-Min Liang, Department of Radiology, the Affiliated Union Hospital of Tongji Medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei Province, China. lianghuimin-email@126.com

Received: 2005-10-06 Accepted: 2005-10-13

Abstract

AIM: To explore the initial mechanisms of transarterial administration of GRGDSP (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro) combined with transarterial chemoembolization (TACE) in the treatment of hepatic carcinoma in Wistar rats.

METHODS: The subcapsular implantation of a solid Walker-256 in the livers was carried out in 30 Wistar rats. The tumor volume V_1 was measured using magnetic resonance tomography (MRT) 12 d after the implantation. Then rats were designed into 3 groups. The rats in group A ($n = 10$) were treated with GRGDSP (250 μg) plus TACE. The rats in group B ($n = 10$) were only treated with TACE, and the ones in group C were treated with normal saline, serving as the controls. Another 12 d later, MRT were per-

formed again to determine the tumor volume V_2 and the value of V_2/V_1 was calculated. Pathological examination was performed to detect the necrosis and metastasis of carcinoma. The expression of von-Willebrand factor and Ki67 were evaluated in the tumor tissues by immunohistochemistry and optical density analysis.

RESULTS: In the survived 26 rats, the values of V_2/V_1 and Ki67 optical density in group A ($n = 9$), B ($n = 8$) and C ($n = 9$) were 4.4 ± 0.7 , 7.0 ± 1.1 , 13.0 ± 1.7 and 0.21 ± 0.04 , 0.30 ± 0.06 , 0.38 ± 0.05 respectively, and there were significant differences among 3 groups ($F = 112.97$, $P < 0.01$; $F = 25.81$, $P < 0.01$) and between either two groups ($P < 0.05$). The numbers of metastatic foci and the optical density of von-Willebrand factor in group A, B, and C were 4.89 ± 1.25 , 6.63 ± 1.60 , 7.22 ± 1.92 and 0.18 ± 0.02 , 0.22 ± 0.02 , 0.23 ± 0.02 , respectively, and there were significant differences among 3 groups ($F = 5.04$, $P < 0.05$; $F = 15.62$, $P < 0.01$), and between A and B ($P < 0.05$) as well as between A and C ($P < 0.05$). The rates of necrosis in group A, B, and C were $0.33 \pm 4.68\%$, $55.80 \pm 5.23\%$, and $32.56 \pm 4.84\%$, respectively, and significant differences were found among 3 groups ($F = 76.15$, $P < 0.01$), and between group A and C as well as between B and C ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Growth and intrahepatic metastasis can be significantly inhibited in implanted hepatic carcinoma of rat by transarterial administration of GRGDSP combined with TACE, and the mechanism may be related to GRGDSP's inhibition on the tumor angiogenesis and proliferation of tumor cells.

Key Words: Hepatic carcinoma; GRGDSP; Interventional; Transarterial chemoembolization

Yin J, Liang HM, Qian J, Xia F, Wang Y, Deng XB, Wang W, Feng GS. Mechanism of transarterial administration of GRGDSP combined with chemoembolization for treating hepatic carcinoma in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):57-62

摘要

目的: 探讨经肝动脉灌注GRGDSP(Gly-Arg-

■背景资料

经肝动脉化疗栓塞术(TACE)是目前被公认为治疗不可切除性肝癌的一种重要手段,但肝癌患者的生存期并未因此得到明显的延长,其主要原因之一是TACE术后残留的复发和转移;另一方面,肿瘤转移是肿瘤治疗学中的一个重要课题,有许多研究试图从肿瘤转移的各个步骤中阻断这一过程,其中RGD肽阻断肿瘤细胞黏附基底膜过程是目前研究一个热点。

■ 研究前沿

本文研究领域中的研究热点、重点是尝试解决TACE治疗肝癌中的转移问题,这一问题是在肝癌介入治疗中常见并且难以解决又似乎被忽视的问题,长期地制约着TACE这一治疗手段对肝癌治疗的远期疗效,也影响着肿瘤介入放射学的发展。

Gly-Asp-Ser-Pro)联合肝动脉化疗栓塞术治疗大鼠肝肿瘤生长与转移的机制。

方法: 成年♀Wistar大鼠30只制作为肝癌模型,随机分为:A组($n = 10$),即TACE+GRGDSP组;B组($n = 10$),即TACE组及C组($n = 10$),即生理盐水组。介入术前及术后12 d分别MRI检查计算肿瘤体积生长率 V_2/V_1 。术后行病理学检查计算肝肿瘤坏死率及转移情况,并采取免疫组化检测、吸光度分析von-Willebrand factor (VIII因子)和Ki67在肿瘤组织中的表达。

结果: 存活26只大鼠, V_2/V_1 值及Ki67阳性表达吸光度值(A, B, C组分别为 4.4 ± 0.7 , 7.0 ± 1.1 , 13.0 ± 1.7 ; 0.21 ± 0.05 , 0.30 ± 0.06 , 0.38 ± 0.04)比较: 总体均存在显著性差异($F = 112.97$, $P < 0.01$; $F = 25.81$, $P < 0.01$), A组低于B, C二组($P < 0.05$), B组亦低于C组($P < 0.05$); 肝内转移灶数及VIII因子阳性表达吸光度值(A, B, C组分别为 4.89 ± 1.25 , 6.63 ± 1.60 , 7.22 ± 1.92 ; 0.18 ± 0.02 , 0.22 ± 0.02 , 0.23 ± 0.02)比较, 总体均存在显著性差异($F = 5.04$, $P < 0.05$; $F = 15.62$, $P < 0.01$), 均为A组低于B, C组($P < 0.05$), 而B, C两组无显著性差异; 肿瘤坏死率(A, B, C组分别为 $60.33 \pm 4.68\%$, $55.80 \pm 5.23\%$, $32.56 \pm 4.84\%$)比较, 总体存在显著性差异($F = 76.15$, $P < 0.01$), A, B组间无显著性差异, 但均高于C组($P < 0.05$)。

结论: 经肝动脉灌注GRGDSP联合肝动脉化疗栓塞术治疗大鼠肝肿瘤具有显著抑制移植性肝肿瘤生长和肝内转移的作用, 其机制可能有GRGDSP抑制了肿瘤血管生成和肿瘤细胞的增生。

关键词: 肝癌; GRGDSP; 介入性; 肝动脉化疗栓塞术

尹君, 梁惠民, 钱骏, 夏风, 王勇, 邓宪波, 王伟, 冯敏生. 经肝动脉灌注GRGDSP联合化疗栓塞治疗大鼠肝肿瘤的机制. 世界华人消化杂志 2006;14(1):57-62

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/57.asp>

0 引言

目前经肝动脉化疗栓塞术(transarterial chemoembolization, TACE)被公认为治疗不可切除性肝癌的一种重要手段^[1], 但肝癌患者的5 a生存率并未因此得到明显的增加^[2,3], 其主要原因之一是TACE术后残癌的复发和转移。众所周知, 肿瘤转移是一个多步骤的复杂进展过程, 而肿瘤细胞在整合素的介导下黏附于正常组织基底膜是其浸润和转移的关键步骤。近年来, 针

对整合素的治疗正逐渐成为抑制肿瘤复发和转移的研究热点。我们建立大鼠肝癌模型, 评价经肝动脉灌注抑制整合素功能的生物肽——GRGDSP(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro), 并联合TACE治疗大鼠肝恶性肿瘤的疗效。

1 材料和方法

1.1 材料 受试动物为♀Wistar大鼠, 体质量 200 ± 20 g(华中科技大学同济医学院动物学部提供)。Walker-256瘤株购于上海医药工业研究院。磁共振仪为Magnetom Vision, 1.5 T, 德国Siemens公司生产。聚乙烯微导管(内径0.28 mm, 外径0.61 mm)为德国Heidelberg Wenzel公司生产。GRGDSP由美国Anaspec Inc公司生产, 购自深圳晶美生物工程公司。兔抗大鼠VIII因子购自美国Santa Cruz公司, 北京中山生物技术有限公司国内分装。兔抗人Ki67mAb由美国Zymed公司生产, 购自北京中山生物技术有限公司。光密度分析采用全自动彩色图像分析系统HMIAS-2000型(武汉千屏影像技术有限责任公司生产)。

1.2 方法

于1只大鼠胸部sc含 10^7 /L肿瘤细胞腹水0.5 mL, 1 wk后长出直径约2.0 cm左右的肿瘤结节。肝癌移植术参照文献[4]进行: 将携带母瘤动物处死后取出瘤结节, 选择新鲜活组织部分切取约 1.5 mm^3 的小瘤块, 植入另外30只大鼠肝左叶包膜下。移植术后12 d时, 行MRI测量肿瘤术前体积 V_1 。选择腕部小线圈, T1WI: SE序列, TR 450 ms, TE 12 ms; T2WI: TSE序列, TR 2 800 ms, TE 96 ms; 层厚2.0 mm, 矩阵 192×256 , 无间距横断面扫描。利用公式 $V = 0.5 \times d_1 \times d_2^2$ 计算肿瘤体积(d_1 : 肿瘤最大径, d_2 : 与之呈垂直方向的最小径)^[5] V_1 。将载瘤大鼠随机分为3组, 于解剖显微镜下经大鼠胃十二指肠动脉逆行插管至肝动脉并进行以下介入治疗方案: A组(GRGDSP+TACE, $n = 10$), 灌注GRGDSP 250 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ +MMC 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ +UFLP 50 μL +GF 25 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$; B组(单纯TACE, $n = 10$), 灌注MMC 50 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ +UFLP 50 μL +GF 25 $\mu\text{g}/25 \mu\text{L}$; C组(生理盐水组, $n = 10$), 灌注生理盐水0.2 mL。介入治疗12 d后, 再次行MRI检查, 测得肝肿瘤体积 V_2 , 并计算肿瘤治疗前后的体积变化 V_2/V_1 。

1.2.1 病理学检查 MRI复查后处死大鼠, 取出肿瘤组织及其后上方5 mm范围肝组织。先行大体观察计算肿瘤组织的坏死率(坏死最大切面

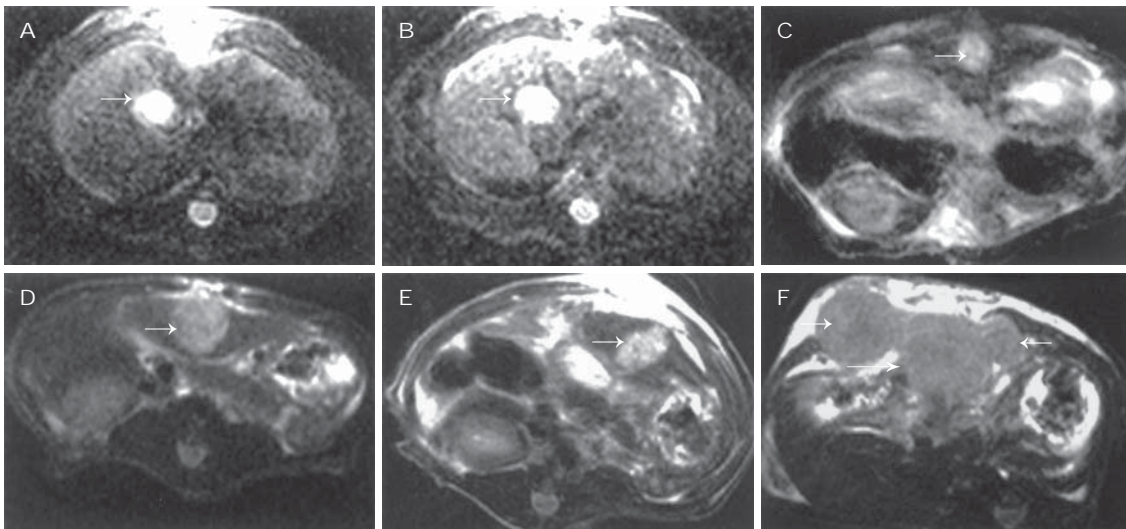


图1 大鼠肝肿瘤MRI T2WI表现. A: GRGDSP+TACE组. 介入治疗前肝左叶有一较小的类圆形高信号(5.7 mm×5.9 mm), 边界清晰(→); B: 介入治疗后肝肿瘤体积与治疗前相比稍有增大(7.8 mm×8.4 mm), 边界清楚, 未见出血、转移和腹水形成等(→); C: TACE组. 介入治疗前肝左叶有一较小的类圆形高信号(6.1 mm×6.3 mm), 边界清晰(→); D: 介入治疗后肝肿瘤体积明显增大(9.0 mm×9.3 mm)(→); E: 普通对照组. 介入治疗前肝左叶有一较小的类圆形高信号(6.1 mm×6.6 mm), 边界清晰(→); F: 介入治疗后肝肿瘤体积显著增大(13.6 mm×13.9 mm)(长→), 且肿瘤周围发现转移病灶(短→与←).

■ 相关报道

- 1 孙婧, 周信达, 刘银坤, 汤钊猷, 施建英, 鲍为华, 薛琼. 抗黏附药物对裸鼠人肝癌转移复发防治的实验研究. 中华消化杂志 2000; 20: 53-54
- 2 高进, 刘玉琴. 肿瘤侵袭转移研究百年回顾与思考. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 444-446

经线乘积占肿瘤最大切面经线乘积的比例), 再用40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 于各标本中央切片一张行HE染色. 光学显微镜(以下简称光镜)下寻找肝组织切片中所有转移灶, 并根据肿瘤细胞数目进行分级、计数(200倍光镜下). 分级标准参照文献[6], 即根据肿瘤细胞数进行: I级<25; 25<II级<50; 50<III级<100; IV级>100, 巨大转移灶IV级的倍数计算, 总转移灶数 = I级(结节数)×1+II级×2+III级×3+IV级×4.

1.2.2 免疫组织化学检查 采用链霉亲和素-生物素-酶复合物法(strept avidin-biotin complexes, SABC)行VIII因子免疫组化染色, 按试剂盒说明书步骤进行. VIII因子阳性表达为内皮细胞质呈棕黄色着色. 选取切片中阳性颗粒清晰、无非特异性背景着色、并能反映该切片染色强度的部位为代表性部位, 在200倍视野下测量阳性表达细胞的平均吸光度(A), 取其均值代表微血管密度(microvessel density, MVD)值. 采用S-P免疫组织化学方法(具体方法参照试剂的说明进行), 用PBS液代替一抗作阴性对照. Ki67阳性主要在细胞核着棕黄色或棕褐色, 其吸光度测量方法同MVD.

统计学处理 采用SPSS 12.0版本统计软件(Chicago, USA)对各组数据及其差异的显著性进行分析, $P<0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 影像学检查 除麻醉意外($n = 4$), 所有动物均

存活, 肝癌移植率为100%, MRI检查均发现肿瘤, 病灶在T1WI上呈均匀稍低信号, 在T2WI上呈均匀中-高信号, 边界较清晰. 存活大鼠肿瘤体积 V_1 与 V_2 分别为A组($n = 9$): $89.2 \pm 4.6 \text{ mm}^3$ 和 $394.8 \pm 54.1 \text{ mm}^3$; B组($n = 8$): $87.4 \pm 7.3 \text{ mm}^3$ 和 $609.4 \pm 106.9 \text{ mm}^3$; C组($n = 9$): $86.1 \pm 5.5 \text{ mm}^3$ 和 $1114.5 \pm 119.0 \text{ mm}^3$. 介入治疗后与治疗前肿瘤体积之比 V_2/V_1 分别为A组 4.4 ± 0.7 , B组 7.0 ± 1.1 , C组 13.0 ± 1.7 , V_2/V_1 有显著性差异($F = 112.97, P<0.01$), 各组间均有显著性差异($P<0.05$) (图1).

2.2 病理学检查结果 3组标本大体表现主要是不同程度的坏死和出血. A, B二组标本表面观呈均质鱼肉状, 切面观肿瘤中央区呈较大范围的坏死, 表现为灰黄色豆腐渣样改变, 伴有少量出血; C组标本出血较多, 坏死较轻, 表现为小片坏死区与存活肿瘤组织间隔存在, 直至肿瘤边缘. 光镜下A, B组肿瘤坏死呈凝固性, 表现为一片细颗粒状无结构样物质, 与存活肿瘤组织界限较为清楚, 坏死组织彻底崩解, 不见组织轮廓, 坏死率见表1; 但C组可见到部分轮廓可以识别的细胞结构. 介入治疗后各组瘤旁5 mm肝组织内转移灶数分别为A组 4.89 ± 1.25 , B组 6.63 ± 1.60 , C组 7.22 ± 1.92 ; 总体存在显著性差异($F = 5.04, P<0.05$), A组与B, C组间均存在显著性差异($P<0.05$), 而B, C两组间无显著性差异(图2).

2.3 免疫组化结果 VIII因子在肿瘤巢中表现为

■创新盘点

1 本文首次在介入放射学领域探讨肿瘤转移预防性治疗问题。

2 对抑制肿瘤转移疗效确切但在生物体内代谢较快而不稳定的RGD肽类药物,采取经肝动脉途径给药,是利用介入放射学的优势探讨该药恰当的给药途径。

3 比较了RGD肽对肿瘤生长的抑制作用,从新的理论角度探讨了对肿瘤介入治疗的机制。

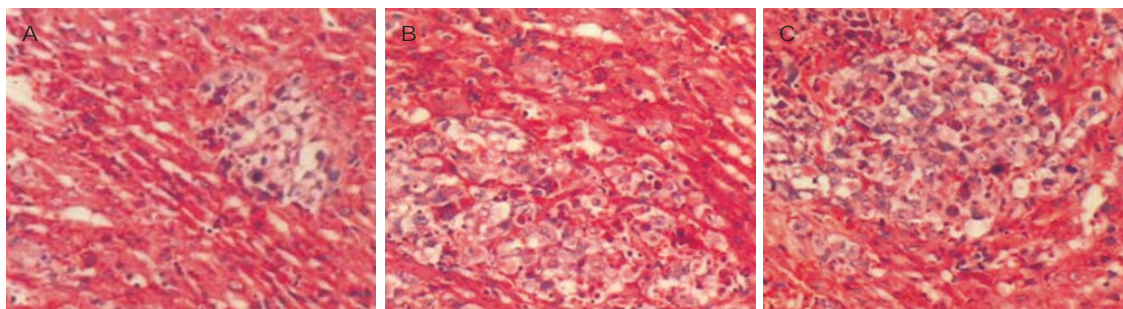


图2 大鼠肝肿瘤旁5 mm肝组织内转移灶(HE × 200)。A: 经GRGDSP联合TACE治疗后,肿瘤旁5 mm肝组织内转移灶, II级; B: 单纯TACE治疗后,肿瘤旁5 mm肝组织内转移灶,大量肿瘤细胞呈梭状排列于肝组织中, III级; C: 经灌注生理盐水后大量肿瘤细胞呈巢团状位于肝组织中, III级。

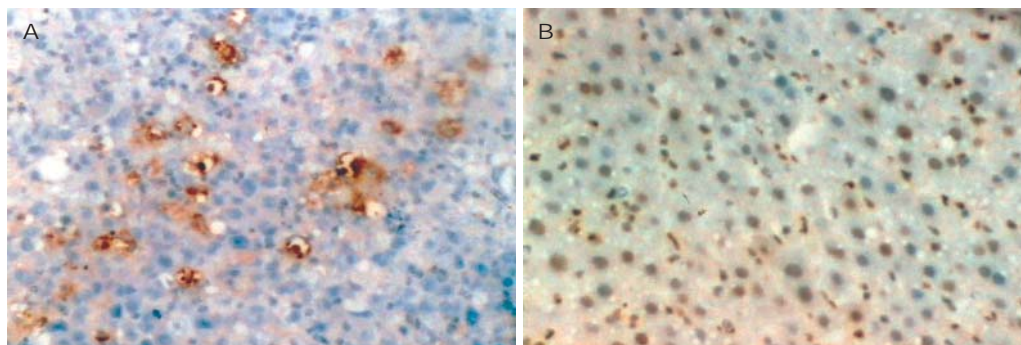


图3 GRGDSP联合TACE治疗后(SP × 200)。A: VIII因子阳性; B: Ki67阳性。

表1 各组肿瘤坏死率与VIII因子(MVD), Ki67阳性表达光密度(4, mean ± SD)

分组	n	肿瘤坏死率(%)	VIII因子(MVD)	Ki67
A组	9	60.33 ± 4.68	0.18 ± 0.02	0.21 ± 0.04
B组	8	55.80 ± 5.23 ^a	0.22 ± 0.02 ^a	0.30 ± 0.06 ^a
C组	8	32.56 ± 4.84 ^a	0.23 ± 0.02 ^a	0.38 ± 0.05 ^{ab}
F值		76.15	15.68	25.81
P值		<0.01	<0.01	<0.01

^aP<0.05 vs A组; ^bP<0.05 vs B组。

血管内皮细胞胞质棕黄至棕褐色,呈窦隙样不均匀分布,在正常肝窦处未见阳性表达,栓塞后于邻近坏死区残存瘤巢及纤维间隔内表达较为密集,而较远处阳性表达相对较低。Ki67阳性表达集中在瘤巢,表现为肿瘤细胞核棕黄至棕褐色,表达较均匀,但同样在邻近坏死区肿瘤组织中表达相对较高,见表1(图3)。

3 讨论

迄今为止, TACE是目前治疗不可切除性肝癌的首选方案,但术后肝肿瘤的转移和复发始终影响着介入治疗的疗效和患者的远期生存率。而肿瘤的浸润和转移是一个多步骤的复杂过程,包括: (1)肿瘤细胞表面的上皮黏连素

(E-cadherin)表达减少或异常,引起细胞间黏附力降低而脱黏附^[7]; (2)肿瘤细胞在其表面整合素介导下黏附于细胞外基质(extracellular matrix, ECM)^[8-10]; (3)细胞外基质在蛋白溶解酶(如基质金属蛋白酶, matrix metalloproteinase, MMPs)的作用下发生降解^[11]; (4)肿瘤细胞在趋化因子的作用下于基底膜缺损处移出。针对上述不同的环节进行阻断,都有可能预防肿瘤的浸润和转移。整合素为细胞表面的一类受体分子,基本功能是介导细胞间或细胞与ECM间的黏附,肿瘤细胞表面常有异常表达。在生理和病理过程中,他们调节细胞的生长、分化、迁移、增殖和凋亡、炎症反应、淋巴细胞归巢、血管生成及血栓形成等过程^[12],发挥着重要生物学功能;而在肿瘤生长和转移中又发挥着如下作用^[8-10,13,14]: (1)介导肝癌细胞黏附于细胞外基质成分,如纤维黏连蛋白、层黏连蛋白、玻璃黏连蛋白及胶原蛋白等; (2)介导趋化、迁移活性; (3)通过介导细胞-底物间的黏附抑制钙黏蛋白介导的肿瘤细胞间的黏附; (4)参与肿瘤血管生成(主要是通过 $\alpha_v\beta_3$)。其黏附功能是通过识别配体ECM中特异的RGD序列(Gly-Arg-Gly, 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸)并与之结合完成的,而RGD是广泛存在于ECM中并能够为整合素分子识别的最主要氨基

酸序列. 针对不同的整合素使用相应的单克隆抗体亦可起到抗肿瘤细胞黏附的作用, 但因易于在体内产生抗抗体, 不容易穿过血管壁到达作用部位^[15], 且整合素种类较多等因素, 某一单克隆抗体作用有限. RGD肽是含RGD序列的一类外源性生物肽, 能够与ECM中RGD序列竞争性结合整合素, 从而相应地抑制整合素介导的一系列功能^[16,17]. 因此, RGD肽可以看作是一种广谱的整合素拮抗剂.

但RGD也有不足之处: 在体内迅速经肾脏清除, 需要注射毫克剂量才能抑制动物实验中的肿瘤转移^[18,19]. 正因为如此, 此类药物多年来一直停留在实验阶段而未应用于临床, 针对这一问题, 国内外学者尝试了RGD肽的各种结合物如与聚乙二醇及脂质体结合, 以延长其在体内作用时间及增加稳定性^[19-21]. 我们利用介入化疗栓塞途径给药的优势(即提高局部药物浓度并延长作用时间), 采取经肝动脉灌注GRGDSP联合TACE, 既是在介入治疗肝癌肝内转移方面的一个尝试, 又是对RGD肽给药新途径的积极探索. GRGDSP作为一种人工合成的线性RGD肽, 具有抑制肿瘤细胞黏附、肿瘤血管内皮细胞的黏附和迁移的作用^[16,17,22-24], 研究^[25]表明, RGD肽在体外能够抑制Walker-256细胞对纤维母细胞周围ECM的黏附和迁移. 针对临床上TACE术后肿瘤易于复发转移的问题, 我们利用GRGDSP能抑制肿瘤转移的特点, 经肝动脉局部灌注GRGDSP, 使GRGDSP在肝肿瘤内局部药物浓度增高以增强其疗效, 同时结合临床上所常用的TACE介入治疗肝癌的方案, 以期产生协同作用而增强介入治疗大鼠肝恶性肿瘤的总体疗效. 实验结果显示: 经多种方案的介入治疗后, V2/V1值为A组 4.4 ± 0.7 , B组 7.0 ± 1.1 , C组 13.0 ± 1.7 , 各组间V2/V1均有显著性差异($P < 0.05$); 瘤周5 mm肝组织内转移灶数分别为A组 4.89 ± 1.25 , B组 6.63 ± 1.60 , C组 7.22 ± 1.92 ; A组与B, C组均存在显著性差异($P < 0.05$), 而B, C两组无显著性差异. 以上结果表明, 经肝动脉灌注GRGDSP联合TACE, 与单纯TACE和普通对照组相比, 能够显著减少肝内转移, 并能明显抑制大鼠移植性肝肿瘤的生长速度. 同时实验结果还表明, 单纯TACE与普通对照组相比, 可明显抑制肝肿瘤的生长, 并不能有效抑制肝肿瘤肝内转移.

肿瘤的生长和转移很大程度上取决于自身的增殖与坏死和凋亡的比例, 这些又与新生血管生成密切相关^[26]. TACE治疗原理是通过栓塞

血管使肿瘤坏死及化疗药诱导的增生抑制和凋亡增加. MVD是目前用以衡量肿瘤新生血管生成程度的常用指标, 在一定程度上间接预测残存肿瘤细胞的生存、生长、侵袭及转移能力; Ki67是细胞增生相关的细胞核抗原, 出现在细胞周期各活性阶段中, 如G1, S, G2, M期, 而不出现在G0期, 是反映被检测组织的生长分数的良好指标^[27], 在一定程度上间接预测残存肿瘤细胞的增殖活性. 实验结果显示, GRGDSP联合TACE组VIII因子(MVD)和Ki67吸光度较另两组显著减少($P < 0.05$), 而单纯TACE组较普通对照组显著减少了Ki67表达($P < 0.05$), VIII因子(MVD)吸光度无显著性差异, 即GRGDSP联合TACE组显著抑制了肿瘤组织血管生成和肿瘤细胞增殖, 而TACE组与普通对照组相比有显著抑制肿瘤细胞增殖的作用; 在肿瘤坏死方面, 联合治疗组与TACE组无明显差异, 但均高于普通对照组($P < 0.05$). 以上结果表明GRGDSP联合TACE抑制肿瘤转移, 原因可能有RGD肽抑制了肿瘤血管生成; 而抑制肿瘤生长的部分原因是抑制了肿瘤血管生成和残存肿瘤细胞的增殖活性. 说明经肝动脉灌注GRGDSP联合TACE方案是有效的RGD肽给药途径. 该方案抑制肿瘤血管生成和肿瘤细胞增殖可能是GRGDSP抑制了整合素的相关功能, 因为后者具有介导肿瘤血管生成、调节肿瘤细胞增生和抑制其凋亡的作用^[28-30]. 本实验证实经肝动脉灌注GRGDSP联合TACE治疗大鼠移植性肝肿瘤疗法的有效性和安全性, 同时具有抑制肿瘤转移和生长的作用, 其可能机制有抑制肿瘤血管生成和抑制肿瘤细胞增殖. 针对临床上接受介入治疗的肝癌患者后期肝内外转移的普遍现象, 该方案将有着深远的意义. 本实验方法具有广阔的临床应用前景, 有望成为肝癌综合介入治疗的一个新内容.

■应用要点

本文是介入放射学学科对治疗介入治疗肝癌肝内转移问题的初步探讨, 也是对抗肿瘤转移药RGD肽的最佳给药途径的一次有意义的尝试, 在理论上均具有开拓性价值. 如在临床实践中具有类似的作用, 则将大大提高肝癌患者的远期生存率, 也是对学科理论研究和临床发展的一大贡献.

4 参考文献

- 1 Qian J, Feng GS, Vogl T. Combined interventional therapies of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1885-1891
- 2 Ferrari FS, Stella A, Gambacorta D, Magnolfi F, Fantozzi F, Pasquinucci P, Civeli L, Pieraccini M. Treatment of large hepatocellular carcinoma: comparison between techniques and long term results. *Radiol Med (Torino)* 2004; 108: 356-371
- 3 Chen XM, Luo PF, Lin HH, Zhou ZJ, Shao PJ, Fu L, Li WK. Long-term result of combination of transcatheter arterial chemoembolization and percutaneous ethanol injection for treatment of hepatocellular carcinoma. *Ai Zheng* 2004; 23: 829-832
- 4 钱骏, 冯敢生, Jochen T, Philippe P, Peter H, Claus C. 同种移植大鼠肝细胞癌模型的建立及其磁共振表现.

■名词解释

TACE, 即transarterial chemoembolization, TACE, 经肝动脉化疗栓塞术。

GRGDSP, 即Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro, 甘氨酸-精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸-丝氨酸-脯氨酸。

■同行评价

肝癌是严重威胁人民生命健康的疾病之一, TACE是治疗失去手术机会肝癌患者的最主要介入治疗手段, 但是转移问题是其难以提高远期生存率的主要因素之一。本文采取TACE途径并联合灌注抗肿瘤转移药物GRGDSP, 通过病理检查证实了该法对大鼠肝肿瘤肝内转移的抑制作用, 同时发现了GRGDSP对肿瘤生长的抑制作用, 并从血管生成和肿瘤细胞增生方面探讨了TACE联合GRGDSP治疗肿瘤的机制。

- 中华放射学杂志 2002; 36: 455-458
- 5 Carlsson G, Gullberg B, Hafstrom L. Estimation of liver tumor volume using different formulas - an experimental study in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983; 105: 20-23
 - 6 刘虎, 叶胜龙, 薛琼, 李雁, 刘银坤, 汤钊猷. 大鼠肝癌自发肺转移裸鼠模型的建立. *中华实验外科杂志* 2004; 21: 101-102
 - 7 Shimoyama Y, Hirohashi S. Cadherin intercellular adhesion molecule in hepatocellular carcinomas: loss of E-cadherin expression in an undifferentiated carcinoma. *Cancer Lett* 1991; 57: 131-135
 - 8 Torimura T, Ueno T, Kin M, Ogata R, Inuzuka S, Sugawara H, Kurotatsu R, Shimada M, Yano H, Kojiro M, Tanikawa K, Sata M. Integrin alpha6beta1 plays a significant role in the attachment of hepatoma cells to laminin. *J Hepatol* 1999; 31: 734-740
 - 9 Masumoto A, Arao S, Otsuki M. Role of beta1 integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 1999; 29: 68-74
 - 10 Torimura T, Ueno T, Kin M, Harad R, Nakamura T, Sakamoto M, Kumashiro R, Yano H, Kojiro M, Sata M. Laminin deposition to type IV collagen enhances haptotaxis, chemokinesis, and adhesion of hepatoma cells through beta1-integrins. *J Hepatol* 2001; 35: 245-253
 - 11 Chenard MP, Lutz Y, Mechine-Neuville A, Stoll I, Bellocq JP, Rio MC, Basset P. Presence of high levels of MT1-MMP protein in fibroblastic cells of human invasive carcinomas. *Int J Cancer* 1999; 82: 208-212
 - 12 王桂兰, 陈莉. 整合素在肝癌研究中的意义. *临床肿瘤学杂志* 2004; 9: 325-330
 - 13 Genda T, Sakamoto M, Ichida T, Asakura H, Hirohashi S. Loss of cell-cell contact is induced by integrin-mediated cell-substratum adhesion in highly-motile and highly-metastatic hepatocellular carcinoma cells. *Lab Invest* 2000; 80: 387-394
 - 14 郑秀海, 王曙光, 喻智勇, 韩本立. 整合素 $\alpha v \beta 3$ 单克隆抗体对人胆管癌肿瘤血管生成的抑制作用. *中华实验外科杂志* 2002; 19: 396-398
 - 15 Molema G, de Leij LF, Meijer DK. Tumor vascular endothelium: barrier or target in tumor directed drug delivery and immunotherapy. *Pharm Res* 1997; 14: 2-10
 - 16 Tsuchiya Y, Sawada S, Tsukada K, Saiki I. A new pseudo-peptide of Arg-Gly-Asp (RGD) inhibits intrahepatic metastasis of orthotopically implanted murine hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2002; 20: 319-324
 - 17 Wu ZZ, Li P, Huang QP, Qin J, Xiao GH, Cai SX. Inhibition of adhesion of hepatocellular carcinoma cells to basement membrane components by receptor competition with RGD - or YIGSR-containing synthetic peptides. *Biorheology* 2003; 40: 489-502
 - 18 郑秀海, 董家鸿, 李前伟, 张广运, 王曙光. ^{125}I -RGD-4CY体内生物学分布与药物代谢动力学研究. *消化外科* 2004; 3: 443-445
 - 19 李占山, 周瑞华, 王莉莉, 周冀平. 含RGD基元多肽结合型长循环脂质体抗癌转移效果的研究. *中国药理学杂志* 2002; 37: 422-424
 - 20 Saiki I, Yoneda J, Igarashi Y, Aoki M, Kusunose N, Ono K, Azuma I. Antimetastatic activity of polymeric RGD peptides conjugated with poly(ethylene glycol). *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 558-565
 - 21 Oku N, Tokudome Y, Koike C, Nishikawa N, Mori H, Saiki I, Okada S. Liposomal Arg-Gly-Asp analogs effectively inhibit metastatic B16 melanoma colonization in murine lungs. *Life Sci* 1996; 58: 2263-2270
 - 22 Sheu JR, Lin CH, Peng HC, Huang TF. Triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide, inhibits the adhesion of tumor cells to matrix proteins via binding to multiple integrin receptors expressed on human hepatoma cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996; 213: 71-79
 - 23 Takayama T, Suzuki N, Narukawa M, Goldberg HA, Otsuka K, Ito K. Enamel matrix derivative is a potent inhibitor of breast cancer cell attachment to bone. *Life Sci* 2005; 76: 1211-1221
 - 24 Joshi P, Chung CY, Aukhil I, Erickson HP. Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-like terminal knob of tenascin. *J Cell Sci* 1993; 106: 389-400
 - 25 Madeja Z, Sroka J. Contact guidance of Walker carcinosarcoma cells by the underlying normal fibroblasts is inhibited by RGD-containing synthetic peptides. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; 40: 251-260
 - 26 Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol* 1993; 10: 302-313
 - 27 Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 2000; 182: 311-322
 - 28 Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, Yoshimura T, Matsuhashi S, Hisatomi A, Tadano J, Sakai T, Yamamoto K. Mechanism of beta 1-integrin-mediated hepatoma cell growth involves p27 and S-phase kinase-associated protein 2. *Hepatology* 2003; 38: 305-313
 - 29 Zhang H, Ozaki I, Mizuta T, Yoshimura T, Matsuhashi S, Eguchi Y, Yasutake T, Hisatomi A, Sakai T, Yamamoto K. Transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis is blocked by beta 1-integrin-mediated mitogen-activated protein kinase activation in human hepatoma cells. *Cancer Sci* 2004; 95: 878-886
 - 30 Buerkle MA, Pahernik SA, Sutter A, Jonczyk A, Messmer K, Dellian M. Inhibition of the alpha-nu integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumors *in vivo*. *Br J Cancer* 2002; 86: 788-795

电编 张敏 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

绿茶多酚对实验性酒精性肝损伤大鼠的治疗作用

周晓蓉, 龚作炯, 袁光金, 张频

■背景资料

近年来酒精性肝病发病率及死亡率在我国呈增长趋势, 已成为仅次于病毒性肝炎的第二大肝病病种。而内毒素血症是酒精性肝病的重要致病机制。

周晓蓉, 龚作炯, 袁光金, 张频, 武汉大学人民医院感染科 湖北省武汉市 430060

周晓蓉, 女, 1977-06-03生, 湖北黄石人, 汉族, 硕士在读, 主要从事慢性肝病的防治研究。

通讯作者: 周晓蓉, 430060, 湖北省武汉市, 武汉大学人民医院感染科, zhouxiaorong214@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-11-15 接受日期: 2005-12-02

Effects of tea polyphenols on alcoholic liver injury in rats

Xiao-Rong Zhou, Zuo-Jiong Gong, Guang-Jin Yuang, Pin Zhang

Xiao-Rong Zhou, Zuo-Jiong Gong, Guang-Jin Yuang, Pin Zhang, Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China
Correspondence to: Xiao-Rong Zhou, Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. zhouxiaorong214@yahoo.com.cn

Received: 2005-11-15 Accepted: 2005-12-02

Abstract

AIM: To investigate the effects of tea polyphenols (TP) and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on alcohol-induced liver injury in rats.

METHODS: Forty-eight Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control, model, TP treatment (100, 200 mg/kg), and EGCG treatment (50, 100 mg/kg) groups. Alcoholic liver injury was induced by ethanol plus 0.5 mL fish oil intragastrically for 5 wk. Liver injury was assessed by pathological examination and serum alanine aminotransferase (ALT) levels. The plasma endotoxin and serum tumor necrosis factor(TNF)- α , interleukin(IL)-1 and IL-18 levels were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression of CD14, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), TNF- α , IL-1 and IL-18 mRNA in the liver were detected by reverse transcription chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Chronic intragastric irrigation of alcohol plus fish oil resulted in the elevated serum ALT, fatty degeneration, focal necrosis and inflammatory cell infiltration in the liver of model rats. These changes were accompanied by

increased plasma endotoxin and serum TNF- α , IL-1, IL-18 levels ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The expression of CD14, LBP, TNF- α , IL-1, and IL-18 mRNA was also increased in the model rats. However, TP and EGCG treatment improved histological changes, and significantly decreased the levels of plasma endotoxin and serum TNF- α , IL-1, IL-18, as well as the expression of CD14, LBP, TNF- α , IL-1 and IL-18 mRNA ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Fatty degeneration was still observed in TP and EGCG treatment group, but focal necrosis and inflammatory cell infiltration disappeared.

CONCLUSION: TP and EGCG can protect liver against necrosis and inflammation induced by alcohol, and the mechanism may involve its effect on the reduction of plasma endotoxemia, and inhibition of Kupffer cell activity and proinflammatory cytokine expression and secretion.

Key Words: Alcoholic liver disease; Tea polyphenols; Epigallocatechin-3-gallate; Endotoxemia; Cytokine

Zhou XR, Gong ZJ, Yuan GJ, Zhang P. Effects of tea polyphenols on alcoholic liver injury in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):50-56

摘要

目的: 研究绿茶多酚及表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对大鼠酒精性肝损伤的治疗作用, 并探讨其作用机制。

方法: 将48只大鼠随机分为正常对照组、模型组、茶多酚治疗 I 组、II 组、EGCG治疗 I 组、II 组, 每组8只大鼠。以酒精+0.5 mL 鱼油灌胃制作酒精性肝病模型。茶多酚治疗 I、II 组另外分别给予200 mg/kg、100 mg/kg 茶多酚灌胃治疗, EGCG I、II 治疗组则分别给予100 mg/kg、50 mg/kg EGCG灌胃治疗。5 wk后处死大鼠, 观察各组大鼠肝脏病理变化, 并测定血清转氨酶及血浆内毒素水平, 采用ELISA法检测血清TNF- α 、IL-1、IL-18水平, 并应用RT-PCR方法检测大鼠肝组织CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18 mRNA的表达, 并应用图像分析系统对其进行半定量分析。

结果: 模型组大鼠肝组织表现肝细胞中度脂肪变性, 点状坏死, 炎性细胞浸润, 其血清ALT、TNF- α 、IL-1、IL-18及血浆内毒素水平与正常对照组相比, 显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 模型组肝组织CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18 mRNA的表达与对照组相比显著增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。茶多酚、EGCG高低剂量分别同时处理显著降低了酒精性肝损伤大鼠血清ALT、TNF- α 、IL-1、IL-18与血浆内毒素水平及肝组织CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18 mRNA的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肝组织仍可见肝细胞脂肪变性, 但未见坏死及炎性细胞浸润。

结论: 茶多酚及EGCG可减轻酒精性肝损伤大鼠肝脏的炎症与坏死, 其可能机制包括降低内毒素血症, 抑制Kupffer细胞活性与促炎细胞因子的表达与分泌。

关键词: 酒精性肝病; 茶多酚; EGCG; 内毒素血症; 细胞因子

周晓蓉, 龚作炯, 袁光金, 张频. 绿茶多酚对实验性酒精性肝损伤大鼠的治疗作用. 世界华人消化杂志. 2006;14(1):50-56
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/50.asp>

0 引言

许多研究证明内毒素是酒精性肝损伤的重要致病机制, 已知实验性及人酒精性肝损伤的内毒素浓度增加^[1,2], 内毒素通过与存在于Kupffer细胞膜上的受体CD14结合而激活Kupffer细胞, 从而促发信号级联反应, 合成和释放大量炎症介质, 从而导致肝损伤^[3,4]。因此, 防止内毒素血症是预防酒精性肝损伤的一个重要措施。绿茶中含有丰富的多酚化合物儿茶素, 表没食子酸没食子酸儿茶素(EGCG)是儿茶素的主要成分, 具有许多重要的生物功能, 如抗氧化, 抗炎等作用^[5,6]。文献报道绿茶可保护酒精性肝损伤^[7,8], 然而其机制尚未阐明。我们用鱼油加酒精灌胃制作大鼠酒精性肝损伤模型, 观察茶多酚及EGCG对酒精性肝损伤的影响, 以及对肝组织CD14、LBP、TNF- α 、IL-1及IL-18的表达与内毒素血症的影响, 从而探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF级SD大鼠由武汉大学医学院实验动物中心提供, 体质量 150 ± 10 g, ♀。560 mL/L酒精和鱼油购自武汉华联超市。茶多酚及EGCG(四川乐山茶叶有限公司), 肝功能试剂

盒(柏定生物工程有限公司)。大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白介素1(IL-1)、白介素18(IL-18)ELISA试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司, 内毒素定量检测试剂盒购自上海伊华临床医学科技公司。TrizoL试剂购自Invitrogen公司; 600 bp DNA ladder Marker购自TaKaRa生物技术有限公司; M-MLV逆转录酶及其缓冲液, 10 mmol/L dNTPS, oligo(dT)₁₈随机引物购自Promega公司; Taq DNA聚合酶及其缓冲液, 核糖核酸酶抑制剂(RNasin)购自Biostar公司; CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18及GAPDH的PCR引物由上海赛百盛公司合成。

1.2 方法

1.2.1 酒精性肝损伤大鼠模型的建立^[9]及药物干预 48只SD大鼠随机分为6组, 分别为正常对照组, 酒精性肝病模型组, 茶多酚治疗I组、II组, EGCG治疗I组、II组, 每组8只大鼠。大鼠在动物室普食喂养1 wk后开始实验。除正常对照组外, 其他大鼠每日予酒精+0.5 mL鱼油灌胃, 酒精剂量开始为6 g/kg, 1 wk内递增8 g/kg, 再维持4 wk, 正常对照组大鼠则灌等热量的葡萄糖+0.5 mL鱼油。茶多酚治疗I、II组及EGCG治疗I、II组另外再分别予以200 mg/kg及100 mg/kg茶多酚(溶于0.5 mL水)灌胃及100 mg/kg、50 mg/kg EGCG(溶于0.5 mL水)灌胃, 模型组仅灌等量水。实验过程中大鼠自由饮水, 进标准饮食, 所有大鼠于第5周末麻醉后处死, 腹主动脉取血, 采集血液标本, 部分血液(约1 mL)用无菌抗凝管收集, 部分血液分离血清-20℃保存。放血后, 立即剖腹取肝脏, 部分肝脏标本放于-70℃冻存用于做RT-PCR, 部分放入40 g/L甲醛固定用于组织病理学检测。

1.2.2 组织病理学检测 将肝组织标本, 剪成大小约0.5 cm×0.5 cm×0.3 cm, 放入40 g/L甲醛固定12-24 h, 然后脱水、透明, 石蜡包埋, 切片, 切成约5 μ m厚, HE染色, 评价肝组织的脂肪变性、炎症坏死等病理变化。

1.2.3 血清转氨酶与TNF- α 、IL-1、IL-18测定 血液凝固后, 1 000 r/min离心10 min, 于-20℃保存。血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)采用RA1000全自动生化分析仪(日本)测定。血清TNF- α 、IL-1、IL-18测定采用双抗体夹心ABC-ELISA法, 具体操作参照ELISA试剂盒说明书进行, 应用酶标仪在492 nm波长处测A值, 建立回归方程求标本血清中上述因子的浓度。

1.2.4 血浆内毒素测定 收集于肝素抗凝的无菌

■研究前沿
 绿茶多酚可以减轻酒精对肝脏的损伤, 本文着重研究绿茶多酚减轻酒精性肝损伤所涉及到的部分机制(内毒素、ALT、CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18)。

■相关报道

- 1 Baltaziak M, Skrzydlewska E, Sulik A, Famulski W, Koda M. Green tea as an antioxidant which protects against alcohol induced injury in rats - a histopathological examination. *Folia Morphol* 2004; 63: 123-126
- 2 Arteel GE, Uesugi T, Bevan LN, Gabele E, Wheeler MD, McKim SE, Thurman RG. Green tea extract protects against early alcohol-induced liver injury in rats. *Biol Chem* 2002; 383: 663-670

表 1 目标基因及内参引物序列及片段大小

基因	正义链	反义链	分子量大小
CD14	5'-CTTGTGCTGTTGCCTTTGA-3'	5'-CGTGTCCACACGCTTTAGAA-3'	214 bp
LBP	5'-GAGGCCTGAGTCTCTCCATCT-3'	5'-TCTGAGATGGCAAAGTAGACC-3'	553 bp
TNF- α	5'-GCCAATGGCATGGATCTCAAAG-3'	5'-CAGAGCAATGACTCCAAAGT-3'	357 bp
IL-1	5'-CAGGATGAGGACCCAAGCACC-3'	5'-CTGTGCAGACTCAAACCTCCAC-3'	444 bp
IL-18	5'-ACTGTACAACCGCAGTAATAC-3'	5'-AGTGAACATTACAGATTTATCCC-3'	437 bp
GAPDH	5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'	5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'	309 bp

表 2 各实验组大鼠(每组8只)血清ALT (nkat/L)、TNF- α (ng/L)、IL-1 (ng/L)、IL-18 (ng/L)水平及血浆内毒素($\times 10^3$ EU/L)水平(mean \pm SD)

组别	ALT	TNF- α	IL-1	IL-18	内毒素
对照组	1 002.20 \pm 116.36	3.80 \pm 0.31	3.10 \pm 0.06	41.95 \pm 0.09	0.08 \pm 0.01
模型组	2 729.71 \pm 659.30 ^b	14.60 \pm 0.09 ^b	3.53 \pm 0.14 ^a	45.94 \pm 1.88 ^a	0.31 \pm 0.10 ^b
茶多酚 I 组	1 234.41 \pm 368.57	3.70 \pm 0.40	3.10 \pm 0.05	42.49 \pm 1.62	0.14 \pm 0.01 ^c
茶多酚 II 组	1 194.57 \pm 111.02	3.90 \pm 0.18	3.14 \pm 0.03	41.64 \pm 0.82	0.17 \pm 0.01 ^{ac}
EGCG I 组	963.53 \pm 122.19	3.60 \pm 0.25	3.19 \pm 0.01	42.25 \pm 0.79	0.15 \pm 0.04 ^c
EGCG II 组	930.19 \pm 170.53	3.78 \pm 0.38	3.13 \pm 0.12	42.95 \pm 1.46	0.17 \pm 0.08 ^{ac}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.01$ vs 模型组.

试管的血液(约1 mL), 500 r/min离心5 min, 取0.1 mL血浆, 加入无热原生理盐水0.2 mL、Tris-HCl缓冲液0.2 mL混匀, 置于100°C水浴加热10 min去除潜在内毒素抑制剂, 然后3 000 r/min离心10 min, 取上清液检测. 具体操作参照试剂盒说明书进行, 于545 nm波长处测A值, 建立回归方程求标本中内毒素浓度.

1.2.5 RT-PCR检测肝组织CD14、TNF- α 、IL-1、IL-18表达 按Trizol试剂盒说明书的要求和方法从约50-100 mg冻存肝组织中提纯总RNA. RNA沉淀后, 用无RNase缓冲液溶解, 使用紫外分光光度计测定 A_{260} 和 A_{280} , 计算RNA的浓度和纯度.

cDNA采用下列方法从总RNA中合成. 2 μ g RNA加0.5 μ g oligo(dT)₁₅随机引物及DEPC处理水至总体积15 μ L 70°C孵育5 min, 随后在冰上迅速冷却. 然后依次加入5 μ L M-MLV缓冲液, 1.25 μ L dNTPS(10 mmol/L), Rnasin 25 U, 200 U M-MLV逆转录酶以及DEPC处理的水至总体积25 μ L. 反应在42°C中进行60 min, 随后85°C 5 min终止, 并于冰箱中4°C保存. 合成的cDNA用作PCR扩增的模板.

PCR反应体系包括: 10 \times Taq缓冲液5 μ L, dNTP(10 mmol/L)1 μ L, 基因特异性引物(表1, 正义链及反义链, 各25 μ mol/L)1 μ L, 2.0 U Taq DNA聚合酶及cDNA 1 μ L, 加水至总体积

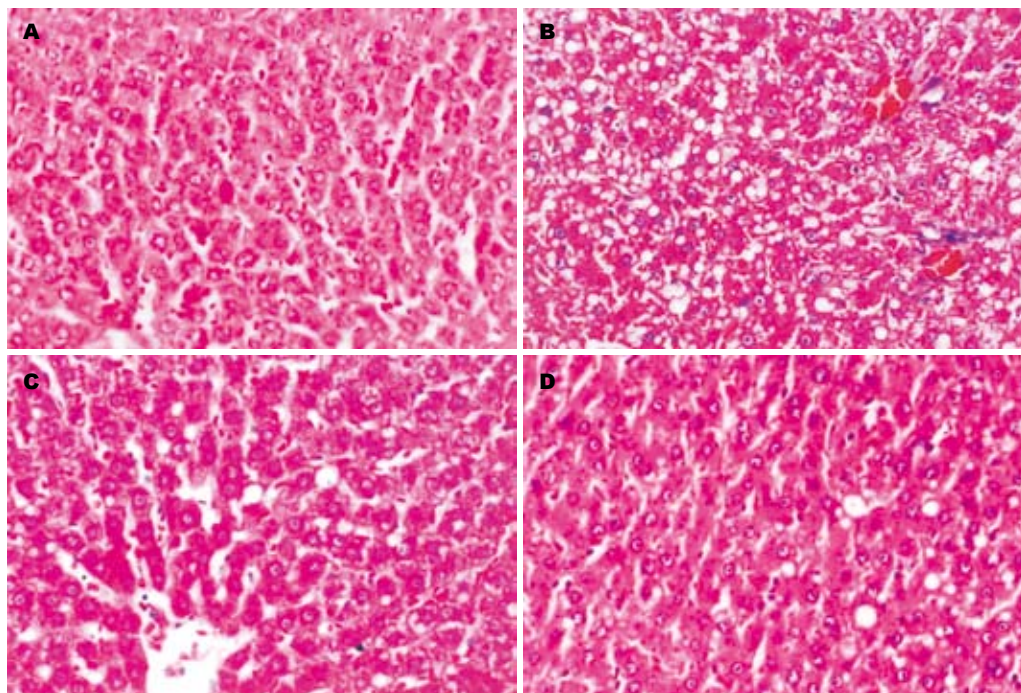
50 μ L. 反应过程如下: 初始94°C孵育3 min, 随后35个循环, 包括94°C变性45 s, 54°C或55°C退火45 s, 72°C延伸1 min, 最后在72°C延伸7 min. 为了保证用于PCR反应的cDNA量一致, 采用看家基因GAPDH作内参照. 将能获得等量的GAPDH PCR扩增产物的cDNA用作扩增目的产物. PCR后, 取产物5 μ L在20 g/L琼脂糖凝胶中电泳, 溴乙锭染色, 紫外光下观察. 采用法国VL凝胶成像及分析系统进行PCR产物半定量分析.

统计学处理 应用SPSS 11.5统计软件进行统计学分析, 计量资料以mean \pm SD表示, 进行方差齐性检验后采用单因素组间方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义.

2 结果

2.1 肝组织病理学变化 对照组肝脏肝小叶结构正常, 肝细胞条索排列规则有序, 偶见脂肪滴, 但未见炎症与坏死. 模型组肝脏肝小叶结构紊乱, 肝细胞中度脂肪变性, 少量呈点状坏死灶, 间质中有炎性细胞浸润. 四个治疗组较模型组肝组织仍见肝细胞脂肪变性, 但未见炎性细胞浸润及肝细胞坏死, 肝小叶结构正常(图1).

2.2 血清转氨酶及TNF- α 、IL-1、IL-18水平 模型组大鼠血清ALT值显著高于对照组及各治疗组($P < 0.01$), 各治疗组及对照组之间ALT水平差异无统计学意义($P > 0.05$). 模型组大鼠血



■创新盘点
有文献报道绿茶可减轻酒精性肝损伤,但未阐明其作用机制.本文研究了绿茶多酚对内毒素血症、ALT、CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18的影响,以探讨茶多酚的作用机制.

图 1 肝组织病理变化. A: 对照组; B: 模型组; C: 茶多酚治疗 I 组; D: EGCG 治疗 I 组.

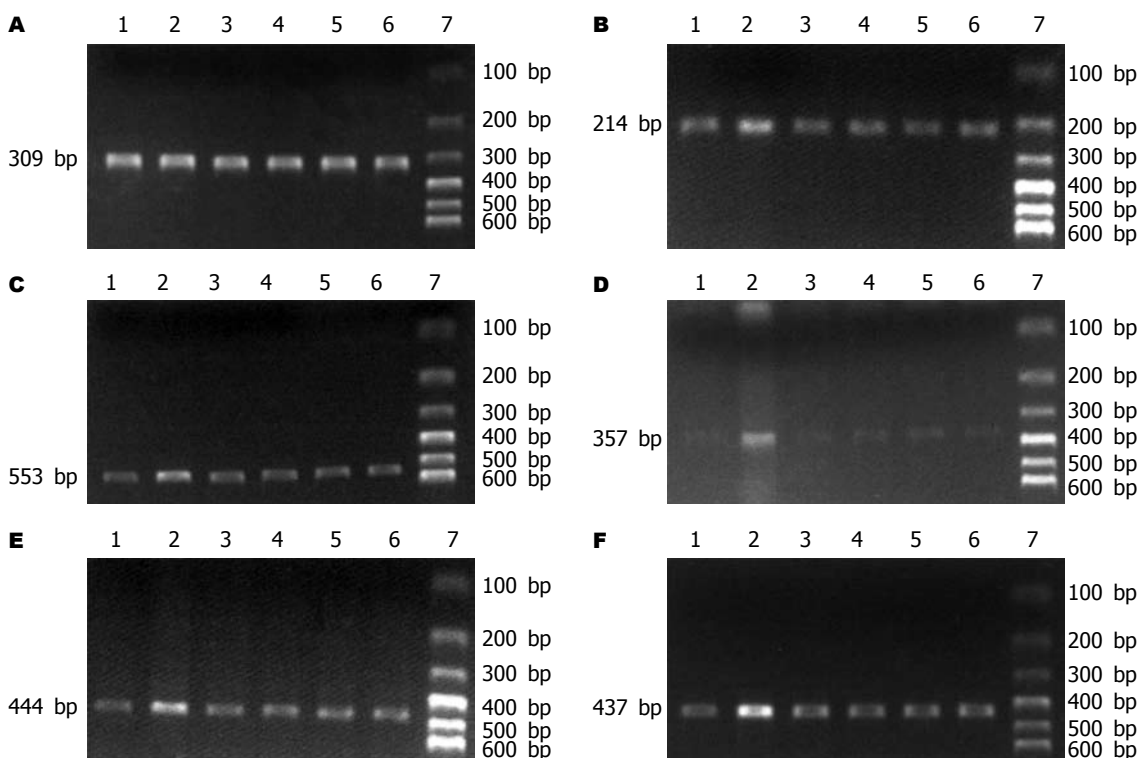


图 2 肝组织中mRNA表达. A: GAPDH; B: CD14; C: LBP; D: TNF- α ; E: IL-1; F: IL-18; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: 茶多酚治疗 I 组; 4: 茶多酚治疗 II 组; 5: EGCG 治疗 I 组; 6: EGCG 治疗 II 组; 7: Marker.

清TNF- α 、IL-1、IL-18高于对照组及各治疗组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),各治疗组之间及对照组TNF- α 、IL-1、IL-18水平差异无统计学意义($P > 0.05$)(表2).

2.3 血浆内毒素水平 所有组大鼠血浆均可检

测到内毒素,但慢性酒精灌胃后大鼠出现内毒素血症.对照组大鼠血浆内毒素水平为 $0.08 \pm 0.01 \times 10^3$ EU/L.酒精组大鼠血浆内毒素水平是 $0.31 \pm 0.05 \times 10^3$ EU/L,显著高于对照组(4倍升高)($P < 0.01$).各治疗组大鼠血浆内毒素水平与

应用要点

绿茶普遍存在于自然界,安全无毒副作用,具有抗氧化、抗炎作用,绿茶及其成份制剂作为一种肝细胞保护剂可在不久的将来应用于临床。

表 3 各组肝组织中mRNA表达水平的半定量分析 (mean ± SD)

组别	CD14	LBP	TNF- α	IL-1	IL-18
对照组	0.659 ± 0.082	0.591 ± 0.102	0.691 ± 0.034	0.683 ± 0.078	0.504 ± 0.082
模型组	1.007 ± 0.090 ^a	0.862 ± 0.029 ^a	1.016 ± 0.087 ^a	1.014 ± 0.080 ^a	1.124 ± 0.093 ^a
茶多酚 I 组	0.643 ± 0.064	0.645 ± 0.075	0.684 ± 0.078	0.694 ± 0.041	0.578 ± 0.102
茶多酚 II 组	0.677 ± 0.101	0.626 ± 0.021	0.732 ± 0.074	0.736 ± 0.070	0.563 ± 0.041
EGCG I 组	0.546 ± 0.096	0.626 ± 0.057	0.666 ± 0.081	0.704 ± 0.082	0.522 ± 0.099
EGCG II 组	0.698 ± 0.083	0.650 ± 0.081	0.662 ± 0.052	0.791 ± 0.053	0.597 ± 0.068

^a $P < 0.01$ vs 对照组。

酒精组相比明显下降($P < 0.01$),但茶多酚治疗 II 组、EGCG 治疗 II 组仍高于对照组($P < 0.05$),各治疗组间差异无显著性($P > 0.05$)(表 2)。

2.4 肝组织 CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18 mRNA 表达 对照组大鼠肝组织有微弱的 CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18 mRNA 表达,模型组大鼠肝组织 CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18 mRNA 表达水平明显增加($P < 0.01$)。高、低剂量茶多酚或 EGCG 同时治疗显著抑制了 CD14、TNF- α 、IL-1、IL-18 mRNA 的表达($P < 0.01$)(图 2,表 3)。

3 讨论

长期摄入酒精可引起肠源性内毒素血症^[10],本实验结果显示长期酒精灌胃大鼠其体内内毒素水平与对照组相比较显著升高($P < 0.01$)。内毒素不仅可以直接损害肝细胞,还与血浆中的内毒素结合蛋白(LBP)结合形成 LPS-LBP 复合物,该复合物通过与 Kupffer 细胞膜上的受体 CD14 结合激活该细胞。LBP 为肝脏合成的一种急性期血清蛋白,正常情况下合成很少,应激情况下合成明显增加, Su *et al*^[11] 发现 LBP、CD14 水平增高与酒精性肝损伤的程度有关, LBP 抑制肽通过抑制 LBP 可减少内毒素对巨噬细胞的激活^[12]。本研究结果显示酒精处理大鼠肝组织与对照组相比较其 LBP、CD14 表达明显增强,与其他报道相一致^[13,14]。Kupffer 细胞被激活后可合成和释放大致炎细胞因子如: TNF- α 、IL-1 等,同时也抑制了抗炎细胞因子如: IL-10、IL-4 的表达^[15],从而打破肝脏致炎与抗炎细胞因子之间的平衡,促进了肝损伤^[16]。IL-18 是新近发现的一种细胞因子,可诱导 Th₁ 细胞产生 TNF- α 、IL-1 等细胞因子^[17],在诱导炎症损伤方面具有十分重要的作用。Rana *et al*^[18] 用酒精干预大鼠,发现其肠组织 IL-18 表达增高, Takeuchi *et al*^[19] 用 IL-18 中和抗体处理大鼠可阻碍其缺血再灌注损伤。本研究 ELISA 结果显

示长期酒精灌胃大鼠血清 TNF- α 、IL-1、IL-18 水平升高,与对照组相比较有统计学意义; RT-PCR 结果亦显示,长期酒精处理大鼠与对照组相比较其肝组织 TNF- α 、IL-1、IL-18 mRNA 表达显著增强,肝组织细胞因子 mRNA 表达的变化与血浆细胞因子水平相平行,该结果与 Hill *et al*^[20] 的报道相一致。ALT 水平升高是肝细胞损伤的标志,与正常对照组相比较本实验模型组大鼠 ALT 水平显著升高。另外,肝组织病理观察发现模型组肝细胞呈中度脂肪变性,少量呈点状坏死灶,间质中有炎性细胞浸润。以上结果说明酒精处理大鼠后,内毒素血症激活 Kupffer 细胞释放一系列促炎细胞因子并抑制抗炎细胞因子表达,促进了肝损伤。

因此,防止内毒素血症、阻断枯否细胞激活、抑制促炎细胞因子的表达是预防酒精性肝损伤的重要策略。既往研究证明:通过饮食含乳酸杆菌食物或用多黏霉素 B 或新霉素等抗生素减少内毒素的生成,明显减轻了实验性酒精性肝病的严重程度^[21,22];封闭阻断 Kupffer 细胞阻断内毒素引发的信号级联,可在很大程度上阻断酒精性肝损伤的发生^[23,24];应用 TNF- α 抑制剂降低 TNF- α 水平可减轻酒精性肝损伤^[25,26]。以上药品可能具有其他毒副作用。绿茶是一类普遍存在于自然界的黄酮类物质,茶多酚是茶叶药效的主要活性成分,占茶叶干质量的 20-35%,其主要组分为儿茶素,占其总量的 80% 左右,其中 EGCG 含量最高,占儿茶素的 50% 左右^[27]。已有研究证实以绿茶为代表的传统饮料有利于人体健康^[28],绿茶萃取物具有许多重要的生物功能,如抗氧化,抗炎症等作用^[5,6],安全无明显毒副作用。据报道,EGCG 可抑制 LPS 诱导巨噬细胞系 RAW264.7 细胞或小鼠腹腔巨噬细胞的 TNF- α 的产生^[29], Dobrzynsk *et al*^[30] 发现绿茶减轻了酒精引起的肝细胞膜结构与功能的变化。本研究中,茶多酚及 EGCG 高、低剂量分别同时处理后,四

个治疗组大鼠与模型组相比较血浆内毒素水平明显降低, CD14、LBP、TNF- α 、IL-1、IL-18 mRNA的表达亦显著减弱, 血清细胞因子水平的变化与其mRNA的表达相一致, 纠正了酒精导致的致炎-抗炎细胞因子之间的平衡破坏, 防止了酒精性肝损伤, 表现为血清ALT水平下降、肝细胞坏死消失、炎症减轻, 与其他报道相一致^[7,10]。

总之, 本研究表明, 茶多酚及EGCG可减轻酒精性肝损伤, 其可能机制包括降低内毒素血症, 抑制Kupffer活性与促炎细胞因子的表达与分泌。

4 参考文献

- 1 Enomoto N, Ikejima K, Bradford B, Rivera C, Kono H, Brenner DA, Thurman RG. Alcohol causes both tolerance and sensitization of rat Kupffer cells via mechanisms dependent on endotoxin. *Gastroenterology* 1998; 115: 443-451
- 2 Urbaschek R, McCuskey RS, Rudi V, Becker KP, Stickel F, Urbaschek B, Seitz HK. Endotoxin, endotoxin-neutralizing-capacity, sCD14, sICAM-1, and cytokines in patients with various degrees of alcoholic liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 261-268
- 3 Thurman RG. II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol* 1998; 275: G605-G611
- 4 Wheeler MD. Endotoxin and Kupffer cell activation in alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 300-306
- 5 Higdon JV, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003; 43: 89-143
- 6 Tedeschi E, Suzuki H, Menegazzi M. Antiinflammatory action of EGCG, the main component of green tea, through STAT-1 inhibition. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 973: 435-437
- 7 Baltaziak M, Skrzydlewska E, Sulik A, Famulski W, Koda M. Green tea as an antioxidant which protects against alcohol induced injury in rats-a histopathological examination. *Folia Morphol* 2004; 63: 123-126
- 8 Arteel GE, Uesugi T, Bevan LN, Gabele E, Wheeler MD, McKim SE, Thurman RG. Green tea extract protects against early alcohol-induced liver injury in rats. *Biol Chem* 2002; 383: 663-670
- 9 Tsukamoto H, Reidelberger RD, French SW, Largman C. Long-term cannulation model for blood sampling and intragastric infusion in the rat. *Am J Physiol* 1984; 247: R595-R599
- 10 Bode C, Bode JC. Effect of alcohol consumption on the gut. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 575-592
- 11 Su GL, Rahemtulla A, Thomas P, Klein RD, Wang SC, Nanji AA. CD14 and lipopolysaccharide binding protein expression in a rat model of alcoholic liver disease. *Am J Pathol* 1998; 152: 841-849
- 12 Wu X, Qian G, Zhao Y, Xu D. LBP inhibitory peptide reduces endotoxin-induced macrophage activation and mortality. *Inflamm Res* 2005; 54: 451-457
- 13 Zuo G, He S, Liu C, Gong J. Expression of lipopolysaccharide binding protein and lipopolysaccharide receptor CD14 in experimental alcoholic liver disease. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2002; 10: 207-210
- 14 Dai LL, Gong JP, Zuo GQ, Wu CX, Shi YJ, Li XH,

- Peng Y, Deng W, Li SW, Liu CA. Synthesis of endotoxin receptor CD14 protein in Kupffer cells and its role in alcohol-induced liver disease. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 622-626
- 15 Ronis MJ, Butura A, Sampey BP, Shankar K, Prior RL, Korourian S, Albano E, Ingelman-Sundberg M, Petersen DR, Badger TM. Effects of N-acetylcysteine on ethanol-induced hepatotoxicity in rats fed via total enteral nutrition. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 619-630
- 16 Nanji AA, Jokelainen K, Rahemtulla A, Miao L, Fogt F, Matsumoto H, Tahan SR, Su GL. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat. *Hepatology* 1999; 30: 934-943
- 17 Neighbors M, Xu X, Barrat FJ, Ruuls SR, Churakova T, Debets R, Bazan JF, Kastelein RA, Abrams JS, O'Garra A. A critical role for interleukin 18 in primary and memory effector responses to *Listeria monocytogenes* that extends beyond its effects on Interferon gamma production. *J Exp Med* 2001; 194: 343-354
- 18 Rana SN, Li X, Chaudry IH, Bland KI, Choudhry MA. Inhibition of IL-18 reduces myeloperoxidase activity and prevents edema in intestine following alcohol and burn injury. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 719-728
- 19 Takeuchi D, Yoshidome H, Kato A, Ito H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Morita Y, Miyazaki M. Interleukin 18 causes hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing anti-inflammatory cytokine expression in mice. *Hepatology* 2004; 39: 699-710
- 20 Hill DB, D'Souza NB, Lee EY, Burikhanov R, Deaciuc IV, de Villiers WJ. A role for interleukin-10 in alcohol-induced liver sensitization to bacterial lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp Res* 2002; 26: 74-82
- 21 Adachi Y, Moore LE, Bradford BU, Gao W, Thurman RG. Antibiotics prevent liver injury in rats following long-term exposure to ethanol. *Gastroenterology* 1995; 108: 218-224
- 22 Nanji AA, Khettry U, Sadrzadeh SM. Lactobacillus feeding reduces endotoxemia and severity of experimental alcoholic liver (disease). *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 205: 243-247
- 23 Yin M, Bradford BU, Wheeler MD, Uesugi T, Froh M, Goyert SM, Thurman RG. Reduced early alcohol-induced liver injury in CD14-deficient mice. *J Immunol* 2001; 166: 4737-4742
- 24 Enomoto N, Takei Y, Hirose M, Ikejima K, Miwa H, Kitamura T, Sato N. Thalidomide prevents alcoholic liver injury in rats through suppression of Kupffer cell sensitization and TNF-alpha production. *Gastroenterology* 2002; 123: 291-300
- 25 Ponnappa BC, Israel Y, Aini M, Zhou F, Russ R, Cao QN, Hu Y, Rubin R. Inhibition of tumor necrosis factor alpha secretion and prevention of liver injury in ethanol-fed rats by antisense oligonucleotides. *Biochem Pharmacol* 2005; 69: 569-577
- 26 Ohata M, Suzuki H, Sakamoto K, Hashimoto K, Nakajima H, Yamauchi M, Hokkyo K, Yamada H, Toda G. Pioglitazone prevents acute liver injury induced by ethanol and lipopolysaccharide through the suppression of tumor necrosis factor-alpha. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28: 139S-144S
- 27 Mukhtar H, Ahmad N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1698S-1702S
- 28 Trevisanato SI, Kim YI. Tea and health. *Nutr Rev* 2000; 58: 1-10

■同行评价

文章较完整地评价了绿茶多酚对实验性酒精性肝损伤的治疗作用, 具有一定的创新之处。

- 29 Nanji AA, Miao L, Thomas P, Rahemtulla A, Khwaja S, Zhao S, Peters D, Tahan SR, Dannenberg AJ. Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat. *Gastroenterology* 1997; 112: 943-951
- 30 Dobrzynska I, Sniecinska A, Skrzydlewska E, Figaszewski Z. Green tea modulation of the biochemical and electric properties of rat liver cells that were affected by ethanol and aging. *Cell Mol Biol Lett* 2004; 9: 709-721

电编 张敏 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会征文通知

本刊讯 为了加快国内肝病学术交流、促进我国肝病学科的发展, 由中华医学会肝病学分会、中华肝脏病杂志编辑委员会主办的“第5届全国肝脏疾病学术研讨会”定于2006-05在辽宁省大连市召开。届时国内知名肝病专家将就国内外肝病研究的进展及热点问题进行继续教育讲座, 并授予参会代表国家级继续教育 I 类学分。现将征文通知公布如下:

1 征文内容

(1) 病毒性肝炎发病机制的研究进展; (2) 病毒性肝炎的治疗策略; (3) 乙型病毒性肝炎的长期治疗; (4) 丙型肝炎的抗病毒治疗; (5) 肝纤维化发病机制研究进展; (6) 肝纤维化的防治; (7) 肝硬化的规范化治疗; (8) 肝细胞癌的病因学研究进展; (9) 肝癌的发病机制研究进展; (10) 肝癌的早期诊断; (11) 肝癌的手术治疗及方案选择; (12) 肝癌的非手术治疗; (13) 肝癌的生物治疗; (14) 自身免疫性肝病的发病机制; (15) 自身免疫性肝病的诊断和治疗; (16) 肝移植后肝炎复发的诊断预防和治疗; (17) 生物人工肝的应用及进展; (18) 小儿自身免疫性肝病; (19) 肝肾综合征; (20) 肝功能衰竭; (21) 肝干细胞的研究进展及临床应用; (22) 脂肪肝及酒精性肝病; (23) 非酒精性脂肪性肝病。

2 征稿要求

参加会议论文要求全文(中文)及500字(词)左右中文摘要各一份, 应包括目的、材料与方法、结果、讨论, 并写清单位、作者姓名及邮编(请自留底稿, 恕不退稿)。凡已在全国性学术会议上或全国公开发行的刊物上发表过的论文, 不再受理。

3 论文寄至地址

400010, 重庆市渝中区临江路74号, 中华肝脏病杂志编辑部收。请在信封左下角注明“会议征文”。欢迎用软盘和电子邮件方式投稿。电子邮件地址: zhgz@vip.163.com。征文截稿日期: 2006-02-28(以邮戳为准)。

欢迎从事肝病临床和基础研究工作的医务人员及科研工作者踊跃投稿, 参加会议。

肠三叶因子对内毒素诱导幼鼠肠组织NO和MDA的作用

李军, 赵亚娟, 孙梅, 潘莉莉, 高红

李军, 赵亚娟, 孙梅, 中国医科大学第二临床学院儿科 辽宁省沈阳市 110004

潘莉莉, 中国医科大学第二临床学院中心实验室 辽宁省沈阳市 110004

高红, 卫生部小儿先天畸形重点实验室, 中国医科大学第二临床学院小儿外科 辽宁省沈阳市 110004

李军, 女, 1968-04生, 天津市人, 汉族, 2001年中国医科大学硕士, 副教授, 主要从事小儿消化系统疾病的研究。

通讯作者: 孙梅, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学第二临床学院儿科. sunm@cmu2h.com

电话: 024-83956503 传真: 024-83955509

收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-31

Effects of recombinant intestinal trefoil factor on endotoxin-induced expression of nitric oxide and malondialdehyde in intestinal tissues of infant rats

Jun Li, Ya-Juan Zhao, Mei Sun, Li-Li Pan, Hong Gao

Jun Li, Ya-Juan Zhao, Mei Sun, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Li-Li Pan, Central Laboratory, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Hong Gao, Key Laboratory of Health Ministry for Congenital Malformations, Department of Pediatric Surgery, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Mei Sun, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. sunm@cmu2h.com

Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-10-31

Abstract

AIM: To investigate the effects of recombinant intestinal trefoil factor (rITF) on the expression of nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA) induced by lipopolysaccharide (LPS) in infant rats.

METHODS: Ninety-six 10-day-old Wistar rats were divided into 3 groups. The rats in group A served as normal controls and were injected with normal saline (1 mL/kg) intraperitoneally. The rats in group B and C were intraperitoneally treated with LPS (1 mL/kg) and LPS (1 mL/kg) plus rITF (5 g/L, 0.1 mL), respectively. Intestinal tissues

were collected at 2, 6, 24, and 72 h for the examination of NO, MDA productions, iNOS mRNA expression and intestinal histological changes.

RESULTS: In comparison with group A, the NO and MDA contents were significantly increased in Group B and reached the peak 6 or 24 h after LPS administration (NO 24 h: 55.25 ± 7.30 vs 6.25 ± 2.05 , $P < 0.01$; MDA 6 h: 7.60 ± 1.14 vs 5.01 ± 0.74 , $P < 0.01$) respectively. As compared with group B, the NO were decreased in group C ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but still sustained a higher level than that in group A at 6 and 24 h, which attained normal at 72 h; the content of MDA were decreased than that in group B ($P < 0.01$) and had no discrepancy with that in group A ($P > 0.05$) at 6 and 24 h. iNOS mRNA was weakly expressed in group A, but significantly increased in group B at 6 and 24 h (1.17 ± 0.15 vs 0.31 ± 0.08 , $P < 0.01$; 1.24 ± 0.18 vs 0.30 ± 0.05 , $P < 0.01$). The expression of iNOS mRNA at 6 and 24 h in group C (0.91 ± 0.13 , 0.96 ± 0.15) was markedly decreased that that in group B ($P < 0.01$). The pathological changes in group C alleviated notably than those in group B.

CONCLUSION: LPS can induce the increase of NO, MDA and expression of iNOS mRNA in intestinal tissues of infant rats, and rITF can protect intestine against injury through decreasing the contents of NO and MDA and inhibiting the expression of iNOS mRNA.

Key Words: Intestine; Endotoxin; Intestinal trefoil factor; Nitric oxide; Malondialdehyde

Li J, Zhao YJ, Sun M, Pan LL, Gao H. Effects of recombinant intestinal trefoil factor on endotoxin-induced expression of nitric oxide and malondialdehyde in intestinal tissues of infant rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):63-67

摘要

目的: 探讨内毒素(LPS)致幼鼠肠组织NO、MDA的作用及基因重组肠三叶因子(recombinant intestinal trefoil factor, rITF)的保护作用。

■背景资料

由各种原因引起的感染性疾病是儿科常见疾病, 严重感染可引起多器官功能衰竭, 胃肠功能障碍被认为是始动因子, 发病与内毒素血症和肠屏障功能障碍密切相关, 常提示病情加重和预后不良。因此探讨炎症性肠损伤的发病机制, 寻求有效的治疗方法具有广泛的意义。

■ 研究前沿

肠三叶因子(ITF)是近年发现的新型表皮生长因子,具有促进细胞增殖与迁移,增强黏膜屏障作用,对肠黏膜具有保护和损伤后修复功能及抗凋亡作用.在成人多局限于烧伤及溃疡性结肠炎的研究,对新生小鼠缺血缺氧造成的坏死性小肠炎也有保护作用.

方法: Wistar幼鼠10日龄96只分为A组:生理盐水对照组, B组: LPS组, C组:LPS+rITF组, 每组32只. 以生理盐水(1 mL/kg), *EcoliO₅₅: B₅* (1 mL/kg)、5 g/L rITF(0.1 mL)ip后2, 6, 24, 72 h处死动物, 留取肠组织生化法检测NO, MDA含量, PCR法检测诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA表达, 同时作电镜观测肠组织超微结构变化.

结果: B组NO和MDA含量明显高于A组, LPS作用后6, 24 h达高峰(NO 24 h: 55.25 ± 7.30 vs 6.25 ± 2.05 , $P < 0.01$; MDA 6 h: 7.60 ± 1.14 vs 5.01 ± 0.74 , $P < 0.01$). C组NO和MDA含量明显降低, 其中6, 24 h组NO较B组下降, 但仍高于A组, 差异显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 至72 h基本降至正常; 6, 24 h组MDA含量较B组下降($P < 0.01$), 较A组无差异, 至72 h基本降至正常. iNOS mRNA在A组各时间点均有微弱的表达, 在B组6, 24 h时表达明显增强(1.17 ± 0.15 vs 0.31 ± 0.08 , $P < 0.01$; 1.24 ± 0.18 vs 0.30 ± 0.05 , $P < 0.01$), 较A组差异显著; 而C组2, 72 h iNOS mRNA微弱表达, 6, 24 h时表达明显减少(0.91 ± 0.13 , 0.96 ± 0.15), 较B组差异显著($P < 0.01$). B组超微结构改变明显, 而C组较B组超微结构有不同程度减轻.

结论: LPS可致幼鼠肠组织NO和MDA含量增加及诱导iNOS mRNA表达增加, rITF可抑制iNOS mRNA表达而减少NO含量, 同时降低MDA含量, 发挥对肠损伤的保护作用.

关键词: 肠; 内毒素; 肠三叶因子; 一氧化氮; 丙二醛

李军, 赵亚娟, 孙梅, 潘莉莉, 高红. 肠三叶因子对内毒素诱导幼鼠肠组织NO和MDA的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(1):63-67

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/63.asp>

0 引言

小儿胃肠功能障碍被认为是多器官功能衰竭的始动因子, 发病与内毒素血症和肠屏障功能密切相关, 常提示病情加重和预后不良. 而肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)是近年发现的新型表皮生长因子, 对肠黏膜屏障具有保护作用, 在胃肠道的损伤修复及胃肠的先天性免疫中有重要的作用^[1,2]. 近年来受到广泛关注, 但多局限于烧伤及溃疡性结肠炎的研究, 对幼鼠炎症性肠损伤是否有保护作用, 报道甚少. 我们应用内毒素致肠损伤, 探讨ITF的保护作用.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar幼鼠10日龄, 体质量18-30 g, 96只, 由中国医科大学第二临床医院动物室提供. 分为A组: 生理盐水组(1 mL/kg). B组: 内毒素组 *EcoliO₅₅: B₅*(LPS 1 mL/kg, Sigma公司, 用生理盐水配制成5 g/L). C组: 内毒素+三叶因子组(LPS 1 mL/kg+rITF 0.1 mL/只), rITF(基因重组小肠三叶因子rITF由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室提供). 每组32只. 三组幼鼠ip后放回母鼠笼内继续哺乳, 至2, 6, 24, 72 h分别断头处死动物, 留取近回盲部肠组织约1-2 cm放于25 g/L戊二醛中固定, 备作电镜检测, 其余肠组织放于-80℃液氮中保存, 以备生化法检测NO, MDA含量及PCR法检测iNOS mRNA表达.

1.2 方法 从液氮中取出肠组织立即称质量, 加入生理盐水后在冰浴中用超声波匀浆机充分匀浆, 以3 500 r/min 4℃离心, 制备100 g/L肠组织匀浆液; 采用生化方法检测肠组织匀浆液中NO, MDA含量. 采用考马斯亮兰法测定匀浆液中蛋白含量(g/L), 生化检测试剂盒均购于南京建成生物工程研究所, 按试剂盒说明操作进行检测. iNOS mRNA表达: 提取总RNA后行RT-PCR, 扩增产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳分析后, 紫外灯下观察RT-PCR产物并拍照, 用Kodak ID型凝胶成像系统输入计算机, 以该软件进行扩增产物的半定量分析. iNOS扩增片断为418 bp, 引物: 上游5-CTACCTACCTGGGGAACACCTGGGG-3; 下游5-GGAGGAGCTGATGGAGTAGTAGCGG-3; β -actin: 上游5-GATTGCTCAGGACATYYCTG-3; 下游5-GATTGCTCAGGACATTT-3. iNOS引物和内参照 β -actin引物均由上海博亚生物技术有限公司合成. 反转录和PCR扩增所需要的酶及其他试剂均购自日本TaKaRa公司. 常规行透射电镜观察肠组织超微结构变化.

统计学处理 所有数据以mean \pm SD表示, SPSS12.0统计软件进行方差分析, 组间比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 肉眼所见 B组动物在ip LPS后0.5 h即出现懒动, 随之出现口唇、皮毛青紫、呼吸急促、精神萎靡、吃奶少; 1-2 h出现腹泻, 腹胀明显, 至6 h上述症状明显加重, 成活鼠24 h观察其体质量不增或明显下降, 临床症状部分缓解. LPS后72 h观察青紫、呼吸状态好转, 部分体重可恢复至用

表1 幼鼠肠组织NO, MDA和iNOSmRNA的变化 (mean \pm SD, $n = 8$)

指标		2 h	6 h	24 h	72 h
NO ($\mu\text{mol/L}$)	A	4.50 \pm 0.93	5.75 \pm 1.67	6.25 \pm 2.05	5.25 \pm 1.16
	B	11.25 \pm 3.62	39.13 \pm 7.64 ^d	55.25 \pm 7.30 ^d	13.25 \pm 4.53
	C	9.25 \pm 2.25	30.88 \pm 5.19 ^{ad}	42.50 \pm 9.30 ^{db}	8.38 \pm 3.38
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	A	4.75 \pm 0.46	5.01 \pm 0.74	5.12 \pm 0.25	5.25 \pm 0.53
	B	5.18 \pm 0.54	7.60 \pm 1.14 ^d	7.34 \pm 1.23 ^d	5.55 \pm 0.77
	C	5.07 \pm 0.36	5.59 \pm 0.38 ^b	5.41 \pm 0.36 ^b	5.66 \pm 0.46
iNOSmRNA (iNOS/ β -actin 积分A比值)	A	0.31 \pm 0.09	0.31 \pm 0.08	0.30 \pm 0.05	0.29 \pm 0.04
	B	0.99 \pm 0.22 ^d	1.17 \pm 0.15 ^d	1.24 \pm 0.18 ^d	0.97 \pm 0.21 ^d
	C	0.31 \pm 0.11 ^b	0.91 \pm 0.13 ^{db}	0.96 \pm 0.15 ^{db}	0.29 \pm 0.05 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs B组; ^d $P < 0.01$ vs A组。

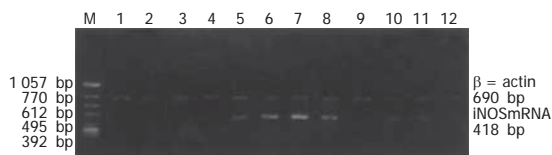


图1 肠组织iNOSmRNA表达扩增产物RT-PCR电泳. M: DNA Marker; 1: A2 h; 2: A6 h; 3: A24 h; 4: A72 h; 5: B2 h; 6: B6 h; 7: B24 h; 8: B72 h; 9: C2 h; 10: C6 h; 11: C24 h; 12: C72 h.

药前, 死亡率约20%. 而C组上述临床症状较B组轻, 而且出现的时间较B组晚, 体质量下降少或无明显下降, 死亡率约10%, A组鼠活泼、吃奶好、体质量增加明显, 无死亡。

B组动物在ip LPS后2 h可见肠管、肠系膜轻度充血肿胀, 6 h时可见充血肿胀明显, 有胃潴留, 部分肠管扩张, 肠腔内有出血; 24 h仍有胃潴留及肠管充血, 72 h上述症状有好转. C组以上症状较B组轻, A组无明显变化。

2.2 NO, MDA和iNOSmRNA含量 内毒素作用后2 h见NO明显增加, 致24 h达高峰, 72 h NO明显减少, 其中6, 24 h组NO含量较A组明显增加 ($P < 0.01$). C组较B组NO含量于6, 24 h明显减少 ($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$), 但仍高于A组 ($P < 0.01$), 至72 h下降与A, B组无差异(表1), B组肠组织MDA含量明显增加, 其中6, 24 h组较A组增加明显 ($P < 0.01$), 并于6 h达高峰, 72 h组下降较A组无差异; C组较B组MDA含量明显下降, 其中6, 24 h组差异显著 ($P < 0.01$), 72 h组下降较B组无差异(表1). iNOS mRNA在A组各时间点均有微弱的表达, B组各时间点iNOS mRNA表达较A组明显增强, 其中6, 24 h组较A组差异显著 ($P < 0.01$)(图1), 并于24 h表达最强. 而C组2, 72 h iNOS mRNA表达微弱; 6, 24 h时表达明显减少, 各时间点iNOSmRNA表达较B组差异显著 ($P < 0.01$)(表1).

■ 相关报道

在烧伤动物模型和新生鼠缺血缺氧模型中已证实ITF的保护作用. 敲除编码鼠ITF基因后, 小鼠由于肠道内缺乏ITF, 缺乏保护作用, 当饮用硫酸葡聚糖钠溶液时, 1/2死于结肠炎. 当给予口服重组ITF后肠黏膜损伤有明显减轻.

1 彭曦、汪士良、陶麟辉、王凤君、赵云、王裴. 肠三叶因子与严重烧伤后肠道损伤及修复关系. 第三军医大学学报 2000; 22: 1023-1025

2.3 电镜结果 正常肠上皮细胞可见肠绒毛排列整齐, 紧密连接完整, 内质网及线粒体清晰; 内毒素作用下线粒体呈空泡样改变, 微绒毛排列不整、部分断裂、缺失, 部分紧密连接增宽或断裂, 细胞核浓缩, 染色质边聚; 肠三叶因子组肠组织损伤较内毒素组减轻(图2).

3 讨论

感染是儿科常见病之一, 其危重症常伴发胃肠功能障碍, 发病机制与内毒素和肠黏膜屏障功能密切相关. 内毒素血症可通过缺氧、炎症介质释放、自由基增多使肠黏膜屏障受损, 大量细菌移位, 最终造成多器官功能衰竭, 甚至死亡^[3]. 我们应用内毒素(LPS)ip引起幼鼠腹泻、腹胀及肠管充血水肿等胃肠功能紊乱症状, 电镜下见肠组织线粒体空泡、微绒毛损伤、紧密连接断裂证明内毒素可引起肠损伤. 研究表明LPS能降低上皮细胞的抵抗力、促进细胞凋亡的产生并疏松紧密连接而增加上皮细胞通透性, 促进细菌移位, 损伤肠黏膜屏障, 引起肠炎症改变, 包括固有层水肿, 绒毛结构的丢失, 炎性细胞浸润^[4,5]. 在一定条件下还可激发细胞因子和其他炎性介质如TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-6的连锁反应, 引起全身各器官的损害^[6,7]. 炎症同时可引起组织缺血, 改变过氧化物酶体及线粒体内细胞色素氧化酶系统, 甚至改变一氧化氮合酶的活性而产生氧自由基, 同时消耗大量ATP. ATP不足使钙泵活性下降, 并阻碍呼吸链的传递, 介导质子过氧化反应, 促进氧自由基的形成, 进一步损伤细胞膜和结构^[8]. 而质子过氧化反应的最终产物MDA含量可间接反应组织氧自由基损害的程度.

我们的研究证明肠损伤时伴有NO、MDA升高, 同时iNOSmRNA表达增强, 在6, 24 h明

■创新盘点

本文的创新点,证明幼鼠内毒素作用下,其肠损伤与NO和MDA升高有一定的关系,而ITF可以降低NO和MDA的含量,证明ITF的保护作用是通过抑制NO和MDA的产生而实现的。

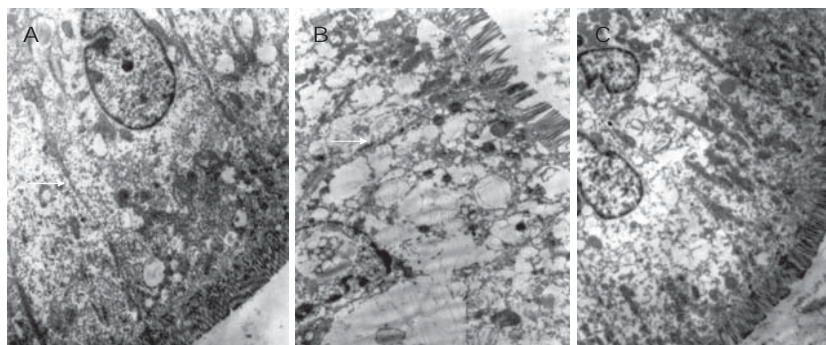


图2 肠组织超微结构变化(TEM × 5 000)。A: 正常肠上皮细胞绒毛排列整齐,紧密连接完整(→),结构完整;B: LPS作用下线粒体呈空泡样改变,微绒毛排列不整、部分断裂、缺失,部分密连接断裂(→),细胞核浓缩,染色质边聚;C: hITF作用下线粒体空泡样改变好转,微绒毛排列有好转,断裂、缺失减少。

显,电镜亦示明显损伤,证明NO、MDA升高与肠损伤有一定的关系。NO是由L-精氨酸在一氧化氮合酶(NOS)作用下生成的,其NOS分为三型,神经型(nNOS)、内皮型(eNOS)和诱导型(iNOS),前两者统称为结构型,能诱导产生少量NO,维持胃肠道的完整性,发挥生理作用^[9]。而在LPS, TNF- α , IL-1 β 等作用下iNOS基因表达明显,可诱导产生大量NO,产生致炎和对细胞的损伤作用^[10-13]。过量的NO又可影响多种免疫活性物质的形成,如TNF- α 、IL-1、IL-2等,引起局部和全身炎症反应,NO与O₂作用形成过氧化亚硝酸盐(peroxynitrite),可使蛋白质或酶失活,抑制呼吸链酶,破坏线粒体结构,启动质子过氧化反应,引起肠组织损伤,并使肠上皮细胞通透性增强^[14-18]。而抑制iNOS基因表达,从而可以抑制NO的大量产生,减轻组织及脏器损伤^[19,20]。在我们的研究中,由于iNOSmRNA的表达使NO生成增多,增强促炎性细胞因子的作用,使肠组织细胞线粒体空泡状,细胞间紧密连接不完整,肠绒毛受损。

ITF是三叶肽家族成员之一,由肠黏膜上皮杯状细胞分泌,广泛存在于胃肠道,能与黏液中黏蛋白结合,形成稳定的凝胶复合物,抵抗胃肠道胃酸,蛋白酶和机械损伤,从而增强了胃肠道黏膜屏障的防御能力^[21,22]。在胎龄20 d之后的鼠类及早产儿均有不同表达,在胃肠道的先天防御上起一定的作用^[23,24]。ITF可促进上皮细胞向损伤处的迁移,被认为是内源性具有抗凋亡特性的肽类物质^[25,26]。在肠道的自我保护和损伤后修复中占有重要地位。口服和皮下注射ITF能预防和治疗乙醇和消炎痛引起的大鼠胃溃疡使胃溃疡指数下降,并随剂量增加保护作用增强,且不影响胃酸分泌^[27,28]。在实验性结肠炎模型中,杯状细胞合成和分泌ITF,维持肠黏膜上皮细胞的完整性并于炎症时发挥其黏膜修复作用。敲

除编码鼠ITF基因后,小鼠由于肠道内缺乏ITF,缺乏保护作用,当饮用硫酸葡聚糖钠溶液时,1/2死于结肠炎,当给予口服重组ITF后肠黏膜损伤明显减轻^[29-31]。证明ITF对肠道损伤具有一定的保护作用^[32-34]。在我们的研究中给予外援性ITF可使肠组织损伤减轻,并能降低肠组织NO、MDA含量,同时降低iNOSmRNA表达,抑制了过量产生的NO、MDA对肠组织的毒性作用,电镜也同时观察到其线粒体、肠绒毛改变有好转,因此,hITF对内毒素作用肠损伤有一定的保护作用,与Giraud^[35]研究相似。

我们的研究证明基因重组ITF通过下调iNOSmRNA表达使NO生成减少,降低MDA的含量,降低内毒素作用下幼鼠肠组织的炎症反应,对肠黏膜损伤具有一定的防御作用,为预防重症感染患儿胃肠道损伤提供了理论基础。

4 参考文献

- 1 Viswanathan VK, Hecht G. Innate immunity and the gut. *Current Opinion in Gastroenterology* 2000; 16: 546-551
- 2 Mammen JMV, Matthews JB. Mucosal repair in the gastrointestinal tract. *Crit Care Med* 2003; 31: S532-S537
- 3 王茂贵. 小儿胃肠道特点、黏膜屏障与胃肠功能障碍. *中国实用儿科杂志* 2001; 16: 2-5
- 4 Qureshi FG, Leaphart C, Cetin S, Li J, Grishin A, Watkins S, Ford HR, Hackam DJ. Increased expression and function of integrins in enterocytes by endotoxin impairs epithelial restitution. *Gastroenterology* 2005; 128: 1012-1022
- 5 Alscher KT, Phang PT, McDonald TE, Walley KR. Enteral feeding decreases gut apoptosis, permeability, and lung inflammation during murine endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G569-576
- 6 Adams JK, Tepperman BL. Colonic production and expression of IL-4, IL-6, and IL-10 in neonatal suckling rats after LPS challenge. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G755-G762
- 7 Wischmeyer PE, Kahana M, Wolfson R, Ren H,

■应用要点

ITF作为新型表皮生长因子之一,对肠损伤有很好的保护作用,在炎症性肠损伤的治疗方面有很好的应用前景。

- Musch MM, Chang EB. Glutamine reduces cytokine release, organ damage, and mortality in a rat model of endotoxemia. *Shock* 2001; 16: 398-402
- 8 Meneshian A, Bulkley GB. The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation* 2002; 9: 161-175
- 9 Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med* 2000; 109: 150-158
- 10 Han X, Fink MP, Delude RL. Proinflammatory cytokines cause NO-dependent and-independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock* 2003; 19: 229-237
- 11 Chamulitrat W, Skrepnik NV, Spitzer JJ. Endotoxin-induced oxidative stress in the rat small intestine: role of nitric oxide. *Shock* 1996; 5: 217-222
- 12 Di Lorenzo M, Krantis A. Nitric oxide synthase isoenzyme activities in a premature piglet model of necrotizing enterocolitis: effects of nitrergic manipulation. *Pediatr Surg Int*. 2002; 18: 624-629
- 13 Nadler EP, Dickinson E, Knisely A, Zhang XR, Boyle P, Beer-Stolz D, Watkins SC, Ford HR. Expression of inducible nitric oxide synthase and interleukin-12 in experimental necrotizing enterocolitis. *J Surg Res*. 2000; 92 :71-77
- 14 Morin MJ, Karr SM, Faris RA, Gruppuso PA. Developmental variability in expression and regulation of inducible nitric oxide synthase in rat intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G552-G559
- 15 Hogaboam CM, Jacobson K, Collins SM, Blennerhassett MG. The selective beneficial effects of nitric oxide inhibition in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995; 268: G673-G684
- 16 Potoka DA, Nadler EP, Upperman JS, Ford HR. Role of nitric oxide and peroxynitrite in gut barrier failure. *World J Surg* 2002; 26: 806-811
- 17 Ford H, Watkins S, Reblock K, Rowe M. The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg* 1997; 32: 275-282
- 18 Forsythe RM, Xu DZ, Lu Q, Deitch EA. Lipopolysaccharide-induced enterocyte-derived nitric oxide induces intestinal monolayer permeability in an autocrine fashion. *Shock* 2002; 17: 180-184
- 19 Southey A, Tanaka S, Murakami T, Miyoshi H, Ishizuka T, Sugiura M, Kawashima K, Sugita T. Pathophysiological role of nitric oxide in rat experimental colitis. *Int J Immunopharmacol*. 1997; 19: 669-676
- 20 Unno N, Wang H, Menconi MJ, Tytgat SH, Larkin V, Smith M, Morin MJ, Chavez A, Hodin RA, Fink MP. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* 1997; 113: 1246-1257
- 21 Wong WM, Poulosom R, Wright NA. Trefoil peptides. *Gut* 1999; 44: 890-895
- 22 Renes IB, Verburg M, Van Nispen DJ, Taminiou JA, Buller HA, Dekker J, experimental colitis: alterations in carbonic anhydrase I, mucin MUC2, and trefoil factor 3 expression. *Int J Colorectal Dis* 2002; 17: 317-326
- 23 Lin J, Holzman IR, Jiang P, Babyatsky MW. Expression of intestinal trefoil factor in developing rat intestine. *Biol Neonate* 1999; 76: 92-97
- 24 Lin J, Nadroo AM, Chen W, Holzman IR, Fan QX, Babyatsky MW. Ontogeny and prenatal expression of trefoil factor 3/ITF in the human intestine. *Early Hum Dev* 2003; 71: 103-109
- 25 Podolsky DK. Mechanisms of regulatory peptide action in the gastrointestinal tract: trefoil peptides. *J Gastroenterol* 2000; 35: 67-74
- 26 Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000, 97; 2: 799-804
- 27 Babyatsky MW, deBeaumont M, Thim L, Podolsky DK. Oral trefoil peptides protect against ethanol and indomethacin-induced gastric injury in rats. *Gastroenterology* 1996; 110: 489-497
- 28 苏云鹏, 李令媛, 俞梅敏, 茹丙根. 基因重组小肠三叶因子预防和治理大鼠胃溃疡的研究. *药物生物技术* 2000; 7: 136-140
- 29 Renes IB, Verburg M, Van Nispen DJ, Buller HA, Dekker J, Einerhand AW. Distinct epithelial responses in experimental colitis: implications for ion uptake and mucosal protection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283 : G169-G179
- 30 Mashimo H, Wu DC, Podolsky DK, Fishman MC. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science* 1996; 274: 262-265
- 31 Marchbank T, Cox HM, Goodlad RA, Giraud AS, Moss SF, Poulosom R, Wright NA, Jankowski J, Playford RJ. Effect of ectopic expression of rat trefoil factor family 3 (intestinal trefoil factor) in the jejunum of transgenic mice. *J Biol Chem*. 2001; 76: 24088-24096
- 32 Marchbank T, Cox HM, Goodlad RA, Giraud AS, Moss SF, Poulosom R, Wright NA, Jankowski J, Playford RJ. Effect of ectopic expression of rat trefoil factor family 3 (intestinal trefoil factor) in the jejunum of transgenic mice. *J Biol Chem*. 2001; 76: 24088-24096
- 33 陈丽萍, 张丙宏, 李艳, 麦根荣, 刘仲熊. 肠三叶因子对新生鼠缺氧肠损伤模型及细胞介素8, 丙二醛的影响及其意义. *中华围产医学杂志*. 2003; 36: 306-309
- 34 Zhang BH, Yu HG, Sheng ZX, Luo HS, Yu JP. The therapeutic effect of recombinant human trefoil factor 3 on hypoxia-induced necrotizing enterocolitis in immature rat. *Regul Pept* 2003; 116: 53-60
- 35 Giraud AS, Pereira PM, Thim L, Parker LM, Judd LM. TFF-2 inhibits iNOS/NO in monocytes and nitrated protein in healing colon after colitis. *Peptides* 2004; 25: 803-809

■同行评价

本研究设计合理, 技术方法先进, 结果可靠, 结论可信, 为预防重症感染患儿胃肠道损伤提供了理论依据。

电编 李琪 编辑 潘伯荣 审读 张海宁

基因表达谱芯片的数据分析

吴斌, 沈自尹

■背景资料

基因芯片技术的出现为生命科学的研究带来了革命性的变化, 然而基因芯片技术产生的海量数据成为制约该技术应用瓶颈。了解基因芯片数据分析的研究进展对于正确应用该技术具有重要的意义。本文对基因芯片数据分析方法综述全面、系统, 最重要的是对每一种方法进行了评述。

吴斌, 沈自尹, 复旦大学华山医院中西医结合研究所 上海市 200040

国家自然科学基金资助项目, No. 90409001

通讯作者: 沈自尹, 200040, 上海市复旦大学华山医院中西医结合研究所。wuubin@yahoo.com.cn

电话: 021-62489999-6311

收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-12-02

摘要

基因芯片数据分析的目的就是从看似杂乱无序的数据中找出它固有的规律, 本文根据数据分析的目的, 从差异基因表达分析、聚类分析、判别分析以及其它分析等角度对芯片数据分析进行综述, 并对每一种方法的优缺点进行评述, 为正确选用基因芯片数据分析方法提供参考。

关键词: 基因芯片; 数据分析; 差异基因表达; 聚类分析; 判别分析

吴斌, 沈自尹. 基因表达谱芯片的数据分析. 世界华人消化杂志 2006; 14(1): 68-74

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/68.asp>

0 引言

基因芯片数据分析就是对从基因芯片高密度杂交点阵图中提取的杂交点荧光强度信号进行的定量分析, 通过有效数据的筛选和相关基因表达谱的聚类, 最终整合杂交点的生物学信息, 发现基因的表达谱与功能可能存在的联系。然而每次实验都产生海量数据, 如何解读芯片上成千上万个基因点的杂交信息, 将无机的信息数据与有机的生命活动联系起来, 阐释生命特征和规律以及基因的功能, 是生物信息学研究的重要课题^[1]。基因芯片的数据分析方法从机器学习的角度可分为监督分析和非监督分析, 假如分类还没有形成, 非监督分析和聚类方法是恰当的分析方法; 假如分类已经存在, 则监督分析和判别方法就比非监督分析和聚类方法更有效率。根据研究目的的不同^[2,3], 我们对基因芯片数据分析方法分类如下: (1)差异基因表达分析: 基因芯片可用于监测基因在不同组织样品中的表达差异, 例如在正常细胞和肿瘤细

胞中; (2)聚类分析: 分析基因或样本之间的相互关系, 使用的统计方法主要是聚类分析; (3)判别分析: 以某些在不同样品中表达差异显著的基因作为模版, 通过判别分析就可建立有效的疾病诊断方法。

1 差异基因表达分析(difference expression, DE)

对于使用参照实验设计进行的重复实验, 可以对2样本的基因表达数据进行差异基因表达分析, 具体方法包括倍数分析、*t*检验、方差分析等。

1.1 倍数变化(fold change, FC) 倍数分析是最早应用于基因芯片数据分析的方法^[4], 该方法是通过将基因芯片的ratio值从大到小排序, ratio是cy3/cy5的比值, 又称R/G值。一般0.5-2.0范围内的基因不存在显著表达差异, 该范围之外则认为基因的表达出现显著改变。由于实验条件的不同, 此阈值范围会根据可信区间应有所调整^[5,6]。处理后得到的信息再根据不同要求以各种形式输出, 如柱形图、饼形图、点图等。该方法的优点是需要的芯片少, 节约研究成本; 缺点是结论过于简单, 很难发现更高层次功能的线索; 除了有非常显著的倍数变化的基因外, 其它变化小的基因的可靠性就值得怀疑了; 这种方法对于预实验或实验初筛是可行的^[7]。此外倍数取值是任意的, 而且可能是不恰当的, 例如, 假如以2倍为标准筛选差异表达基因, 有可能没有1条入选, 结果敏感性为0, 同样也可能出现很多差异表达基因, 结果使人认为倍数筛选法是在盲目的推测^[8,9]。

1.2 *t*检验(*t*-test) 差异基因表达分析的另一种方法是*t*检验^[10], 当*t*超过根据可信度选择的标准时, 比较的两样本被认为存在着差异。但是*t*检验常常受到样本量的限制, 由于基因芯片成本昂贵, 重复实验又很费时, 小样本的基因芯片实验是很常见的, 但是小样本导致了不可信的变异估计。为了克服这种缺点, 研究者提出了调节性*t*检验(regularized *t*-test), 它是根据在基因表达水平和变异之间存在着相互关系, 相似的基因表达水平有着相似的变异这个经验, 应用贝叶斯条

件概率(贝叶斯定理)

$$P_i(A/B) = \frac{P_i(B/A)P_i(A)}{P_i(B)}$$

统计方法, 通过检测同一张芯片临近的其它基因表达水平, 可以对任何基因的变异程度估计进行弥补. 这种方法对于基因表达的标准差估计优于简单的 t -test和固定倍数分析法^[11].

1.3 方差分析(analysis of variance, ANOVA) 方差分析(ANOVA)又称变异数分析或 F 检验, 其目的是推断两组或多组资料的总体均数是否相同, 检验两个或多个样本均数的差异是否有统计学意义, 方差分析可用于差异基因表达研究^[12]. 方差分析需要参照实验设计, 参照样本常用多种细胞的mRNA混合而成, 由于所有的细胞同时表达的基因众多, 结果低表达基因在样本混合后就被稀释而减少了参照样本的代表性, 因此, 增加参照样本的细胞不会提高参照样本的代表性^[13].

方差分析能计算出哪些基因有统计差异, 但它没有对那些组之间有统计差异进行区分, 比如用单因素方差分析对A、B、C、D 4组进行分析, 对于某一个基因, 方差分析能够分析出A组与B、C、D组之间有差异, 但是B、C、D之间无统计学意义. 这就需要用到均值间的两两比较(post-hoc comparisons)检验, 该检验是对经方差分析后的基因进行下一水平更细节的分析^[14]. 即 t -检验只能用于检验两样本中均值是否存在显著性差异, 而两两比较技术考虑了多于2样本间均数的比较.

上述所有的参数分析方法必须平衡假阳性、假阴性错误^[15,16], 控制假阳性率有4种方法: (1)邦弗朗尼(Bonferroni)方法, 计算公式: Corrected P -value = P -value \times n (number of genes in test), 如果纠正 P 值仍小于错误率(如0.05), 则该基因将属于有表达差异的基因. (2)Bonferroni Step-down(Holm)法, 这种校正方法与邦弗朗尼很相似, 但没有前者严格. 主要思想如下: 每个基因的 P 值从低到高排序, Corrected P -value = P -value \times $n(n-1/n-2 \dots)$, 如果纠正 P 值仍小于错误率(如0.05), 则该基因将属于有表达差异的基因. (3)Westfall & Young参数法, 前面2种方法都是单独对 P 值进行纠正, 本方法通过同时对所有基因进行排序, 充分利用基因间的独立性进行 P 值纠正. 每个基因的 P 值是按原始资料的排序进行计算; 将资料划分为人工组和对照组而产生新的数据. 采用新数据计算所有基因的 P 值, 新 P 值再与以前的 P 值进行比较, 上述过程重复很多次, 最后计算出纠正 P 值. 如果纠正 P 值仍小于错

误率(如0.05), 则该基因将属于有表达差异的基因. (4)Benjamini & Hochberg假阳性率法, 该方法是4种方法中最不严谨的方法, 因此可能产生很多的假阳性和假阴性, 其方法如下: 首先对每一个基因的 P 值由小到大排序, 最大的 P 值保持不变, 其它基因按下列公式计算 P 值, Corrected P -value = P value \times $(n/n-1)$ 以此类推, 若 $P < 0.05$ 则为有差异基因.

上述前3种方法可概括为误差率判断族(family-wise error rate, FWER), 它的特点是允许很少的假阳性基因发生, 而假阳性率(false discovery rate, FDR)是允许一定率的假阳性基因发生. 总之, 假阳性率(FDR)在差异表达与控制假阳性率之间提供了一个好的平衡统计, Bonferroni是最严格的方法, 也是最保守的假阳性估计方法. Westfall & Young参数法是以基因的共同调节进行计算, 因此它的计算是很慢的, 对假阳性率的估计也是很保守的^[17,18].

1.4 非参数分析(nonparametric analysis) 由于微阵列数据存在 " 噪声 " 干扰而且不满足正态分布假设, 因此使用 t -检验和回归模型进行筛选的方法可能有风险. 非参数检验并不要求数据满足特殊分布的假设, 所以使用非参数方法对变量进行筛选虽然粗放, 但还是可行的^[19]. 目前用于基因表达谱数据分析的非参数方法除了传统的非参数 t -检验(nonparametric t -test)、Wilcoxon秩和检验(Wilcoxon rank sum test)等外^[20], 一些新的非参数方法也应用于基因表达谱数据的分析中, 如经验贝叶斯法(empirical Bayes method)^[21]、芯片显著性分析(significance analysis of microarray, SAM)^[22]、混合模型法(the mixture model method, MMM)^[23]等. 参数法的缺点是分析数据有假设检验, 比如改变样本中的变异可明显影响分析结果, 对同样数据的转换(如对数), 对其分析结果也有明显的影响. 非参数方法对于这种情况的发生更有效, 但是它对表达数据分析的敏感性不如参数方法.

1.5 回归分析(regression analysis) 目前使用的一些简单的参数分析方法是通过对数转换(如对数)来达到正态分布为假设前提的, 或者是估计的经验分布, 然而这二种方法对基因表达数据可能都是不合理的, 非参数方法忽视了数据的分布, 而参数方法又会误判数据的分布^[24,25]. 基因表达谱的回归分析是可以处理多个基因变量间线性依存关系的统计方法, 于是研究者们提出了使用回归分析基因表达谱数据, 如Li *et al*^[26]

■ 相关报道

1 吴斌, 林乔, 王米渠, 王建. 试论影响基因芯片实验设计的因素. 世界华人消化杂志. 2005; 13: 1206-1209

■同行评价

本文对基因表达芯片的数据分析方法进行了综述,并对差异基因表达分析、聚类分析及判别分析等方法的优缺点进行了评述,文章选取的文献较新颖,内容较全面、表达较准确,描述清晰、层次分明,可读性较好,反映了基因表达芯片数据分析方法的研究进展水平,对于如何选用数据分析方法具有较好的参考价值。

使用互变量(Cox)回归方法分析基因表达谱数据,用于患者的生存率预后;Huang *et al*^[27]将线性回归方法应用于肿瘤的分类研究中。

2 聚类分析(clustering analysis)

聚类分析的目的在于辨别在某些特性上相似的事物,并按这些特性将样本划分成若干类(群),使同类事物具有高度同质性,而不同类事物则有高度异质性。聚类分析是通过建立各种不同的数学模型,它把基于相似数据特征的变量或样本组合在一起,归为一个簇的基因在功能上可能相似或关联,从而找到未知基因的功能信息或已知基因的未知功能。但是由于使用数据转换、归一化等因素,导致对聚类分析结果的影响较大;此外,聚类只是为了寻求类,不管所聚的类别是否有意义^[28]。

2.1 分层聚类法(hierarchical clustering, HCL) 分层聚类是将n个样品各作为一类,计算n个样品两两之间的距离,构成距离矩阵,合并距离最近的两类为一新类,计算新类与当前各类的距离^[29]。再合并、计算,直至只有一类为止。分层聚类是第一个被应用于基因表达谱数据分析的聚类方法^[30],由于结果的可视化和基因间关系的明确表现,广泛地应用于基因表达谱的肿瘤亚型分类和生存率研究中^[31,32]。

2.2 K-均值聚类(K-means clustering, KMC) K-均值聚类是先选择初始凝聚点,根据欧氏距离系数,

$$d_{ab} = \left[\sum_{i=1}^n (x_i - y_i)^2 \right]^{1/2}$$

将每个样品归类,各类的重心代替初始凝聚点,根据欧氏距离将每个样品不断地归类,直至分类达到稳定。K-均值算法是采用误差平方和为准则函数的动态聚类方法,其计算快速,适合于大规模的数据计算^[33]。如D'ambrosio *et al*^[34]为了理解肥大细胞增生的分子机制和寻找其鉴定的分子标记,选取肥大细胞增生症患者和正常人的骨髓的单核细胞进行基因芯片实验,应用K-均值聚类和分层聚类得到同一类的10个基因,进一步分析鉴定出3个基因属于该疾病的候选标记基因。但是K-均值聚类也有不足之处,它对初始凝聚点比较敏感,如果初始凝聚点没有选择好就可能集合在标准功能值的局域极小值上。而另一个问题在于它是完全无结构的方法,聚类的结果是无组织的^[35]。

2.3 自组织映射图网络(self-organizing map clustering, SOM) 神经网络中邻近的各个神经元通过侧向交互作用彼此相互竞争,自适应地发展成检测不同信号的特殊检测器,这就是自组织特征映射

的含义。其基本原理是将多维数据输入成几何学节点,相似的数据模式聚成节点,相隔较近的节点组成相邻的类,从而使多维的数据模式聚成2维节点的自组织映射图。自组织映射图允许对类进行调整,属于监督类聚类^[36]。自组织映射图分类标准明确,优化的次序好于其它聚类法,在基因表达谱的数据分析中得到广泛的应用。如Covell *et al*^[37]认为多种肿瘤可能具有共同的基因表达谱,他们选取了14种肿瘤和正常对照组织进行基因表达谱研究,结果自组织图能完全将肿瘤和正常组织区分出来,自组织图对各种肿瘤的分辨率达到80%的准确性,其中对白血病、中枢神经系统肿瘤、黑色素瘤、子宫癌、淋巴瘤有很好的判别作用,对直肠癌、乳腺癌、肺癌的判别差。

2.4 双向聚类(two-way clustering, TWC) 基因表达谱常采用单向聚类法(one-way clustering),即要么以整个样本中特性相似的基因进聚类,或者以基因表达相似的样本进行聚类。对样本和基因同时进行聚类就是双向聚类法(two-way clustering)^[38],目前基因表达谱的数据分析常用的双向聚类有基因剃须(gene shaving, GS)和格子模型(plaid models)。基因剃须是通过基因的共同表达值或表达量来鉴定基因的亚类,基因表达谱分析方法常用监督进行聚类,没有考虑一个基因可能属于多个类。基因剃须对基因或样本进行分类既可以是监督的,也可以是非监督的。基因剃须近年逐渐被应用于基因表达谱的分析中,如Hastie *et al*^[39]使用基因剃须方法分析了B细胞淋巴瘤患者的基因表达谱,鉴定了一小类可用于生存率预后的基因。作者认为基因剃须方法是一种潜在有用的基因表达谱数据分析方法。Jiang *et al*^[40]使用了2种基因剃须方法筛选肺癌的标志基因,通过和正常组织的基因表达谱比较,分别筛选到13条和10条,其中5条是共同的。格子模型的目的是分析基因芯片数据可解释的生物结构,即基因或样本的亚类。各类之间可以进一步聚类,从而获得稳定的、有意义的分层结构^[41,42]。目前应用格子模型进行基因表达谱数据分析的实例还不多。

2.5 混合聚类法 所谓混合聚类就是先非监督(unsupervised)聚类再监督(supervised)聚类。其优点是可以整合多种聚类方法的优点,目前混合聚类受到越来越多研究者的关注,如由于基因芯片数据的复杂性和多维性,为利于基因表达谱数据的处理,有必要对复杂多维的原始数据进行简化处理,为了解决这个问题,Wang *et al*^[43]提

出了双水平分析, 即首先使用自组织图减少原始数据的多维性, 然后进行了K-均值和分层聚类以建立样本判别的基因表达模型. *Herrero et al*^[44]还论述如何将自组织图和分层聚类组合成一个优秀的工具用于基因表达谱的数据分析.

3 判别分析(discriminant analysis)

判别分析能够依据样本的某些特性, 以判别样本所属类型. 与聚类分析不同的是, 判别分析是用某种方法将研究对象分成若干类的前提下, 建立判别函数, 用以判定未知对象属于已知分类中的哪一类. 基因判别分析(有监督学习)是在已有数据的基础上建立分类器, 并利用所建立的分类器对未知样品的功能或状态进行预测^[45,46]. 目前使用的判别分析方法主要有: 支持向量机、决策树、贝叶斯分类、神经网络法等.

3.1 费希尔判别分析(fisher discriminant analysis, FDA) 费希尔判别分析是以线形函数为准则进行判别^[47], *Cho et al*^[48]应用费希尔判别方法分析肿瘤患者的基因表达谱资料以判别肿瘤的分型. 如*Dangond et al*^[49]将费希尔判别方法应用于计算肌萎缩侧索硬化病的基因表达谱研究中.

3.2 贝叶斯网络(bayesian networks) 也被称为因果网络(causal networks), 是描述数据变量之间依赖关系的一种图形模式, 是一种用来进行推理的模型. 贝叶斯网络为人们提供了一种方便的框架结构来表示因果关系, 这使得不确定性推理在逻辑上更为清晰、更好理解^[50]. 如*Imoto et al*^[51]结合贝叶斯网络和生物学知识进行基因表达谱数据的基因网络分析, 并以酿酒酵母的基因表达谱数据为例进行了论证. *Kim et al*^[52]将贝叶斯网络法应用于时间系列的基因表达谱数据的基因网络分析等.

3.3 支持向量机(support vector machines, SVMs) 支持向量机是数据挖掘中的一个新方法. 支持向量机能非常成功地处理回归问题(时间序列分析)和模式识别(分类问题、判别分析)等诸多问题, 它通过训练一种 " 分类器 " 来辨识与已知的共调控基因表达类型相似的新基因^[53-55]. 例如 *Williams et al*^[56]为了鉴定出肾母细胞瘤复发的基因表达谱模型, 研究了27例肾母细胞瘤患者的肿瘤组织, 其中13例2 a内复发, 对复发和未复发的肿瘤组织进行基因芯片实验, 并应用支持向量机对基因表达谱数据进行分析, 结果发现了一小类可能用于肿瘤预诊的基因.

3.4 决策树(decision trees) 决策树是一种常用于

预测模型的算法, 它通过将大量数据有目的的分类, 从中找到一些有价值的, 潜在的信息. 它的主要优点是描述简单, 分类速度快, 特别适合大规模的数据处理^[57]. *Dettling et al*^[58]比较了不同决策树算法对基因表达谱分析的影响. *Midendorf et al*^[59]应用决策树方法研究了简单生物的基因调节机制.

3.5 人工神经网络法(artificial neural network, ANN) ANN是一种应用类似于大脑神经突触联接的结构进行信息处理的数学模型. 在这一模型中, 大量的节点(或称 " 神经元 ", 或 " 单元 ") 之间相互联接构成网络, 即 " 神经网络 ", 以达到处理信息的目的. 其优势是运行分析时无需在心目中有何特定模型, 而且, 神经网络可以发现交互作用效果(如年龄和性别的组合效果)^[60]. *O'Neill et al*^[61]将神经网络法应用于淋巴瘤基因表达谱数据的分析, 该方法对淋巴瘤预后和诊断都具有较好的判别作用. *Sawa et al*^[62]对酵母属基因表达谱数据进行了欧氏距离、相关系数、相互信息和基于神经网络的聚类分析, 发现基于神经网络的聚类结果较前3种方法更为合理.

4 其他分析

4.1 主成分分析(principal component analysis, PCA) 在大规模基因表达数据的分析工作中, 由于组织样本例数远远小于所观察基因个数, 如果直接采用前述聚类分析可能产生较大误差, 故需要对聚类算法进行改进. 目前已经提出很多改进的聚类方法, 其中较为流行的方法是应用主成分分析方法对数据进行分析^[63,64]. 主成分分析的目的是要对多变量数据矩阵进行最佳综合简化. 使用的方法是寻找这些变量的线性组合—称之为主成分, 使这些主成分间不相关. 为了能用尽量少的主成分个数去反映原始变量间提供的变异信息, 要求各主成分的方差从大到小排列, 第一主成分最能反映数据间的差异. 主成分分析通过合并原来的维数得到更少的维数来表示对象, 同时要求新的维数必须尽可能地反映原有维数所反映的信息, 它有较少的信息丢失. 主成分分析有助于简化分析和多维数据的可视化^[65]. 如*Crescenzi et al*^[66]应用主成分分析对60个肿瘤细胞株的基因表达谱数据进行分析, 结果发现肿瘤分型相关的基因有1 375个, 主成分分析得到细胞运动等5个独立的成份. 主成分分析是把原来多个变量化为少数几个综合指标的一种

统计分析方法. 从数学角度来看, 这是一种降维处理技术. 而且使这些较少的综合指标既能尽量多地反映原来较多指标所反映的信息, 同时它们之间又是彼此独立的. 但是使用该方法可能导致一部分有用信息的丢失. 为此, Yeung *et al*^[67]采用两个真实数据集和三个模拟数据集作为实验材料, 对采用主成分分析方法所得出的聚类结果作了评估. 他们发现, 进行主成分处理后的聚类质量没有明显提高, 甚至有所降低. 基于以上研究结果, 他们不主张使用PCA方法进行聚类分析.

4.2 基因网络分析(gene network analysis) 基因表达分析包括3个层次^[68], 首先是单基因水平, 即比较对照组与实验组的每个基因是否存在表达差异, 这主要指差异基因表达分析; 其次是多基因水平, 如按照基因的共同功能、相互作用、共同表达等进行的聚类分析; 最后是系统水平, 即以基因网络形式解释和理解生命现象. 在生物体系中, 基因从来不是单独起作用的, 它们相互作用呈网络状, 因此从网络的观点分析基因表达谱数据必然会导致对生物系统的更高层次的理解, 目前研究者们已经开始了这方面的研究. 正如前述的各种聚类方法, 假如几个基因被聚类在同一组, 它们有可能是共同表达的基因或者是有同样的信号通路, 深入分析这些基因的增强子可能发现它们共同的调节元件, 从而揭示生物系统更高层次的网络^[69]. 另外应用目前已知全序列的模式生物(如酵母、结核分枝杆菌), 人们已研制出加载有他们全基因的芯片, 通过比较不同条件下(突变、基因敲出或设计时间系列)表达谱的变化, 再使用贝叶斯网络法等进行系统分析, 可揭示基因功能和调控网络^[70]. 此外还可从代谢等角度研究, 比如从新陈代谢分析基因表达的网络关系等.

总之, 基因芯片数据分析的方法众多, 随着研究的进展不断地有新的数学方法应用于芯片的数据分析中步研究.

5 参考文献

- 1 Reimers M. Statistical analysis of microarray data. *Addict Biol* 2005; 10: 23-35
- 2 Hackl H, Cabo FS, Sturn A, Wolkenhauer O, Trajanoski Z. Analysis of DNA microarray data. *Curr Top Med Chem* 2004; 4: 1357-1370
- 3 Leung YF, Cavalieri D. Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends Genet* 2003; 19: 649-659
- 4 Gerhold D, Lu M, Xu J, Austin C, Caskey CT, Rushmore T. Monitoring expression of genes involved in drug metabolism and toxicology using DNA microarrays. *Physiol Genomics* 2001; 5: 161-170
- 5 Mutch DM, Berger A, Mansourian R, Rytz A, Roberts MA. The limit fold change model: a practical approach for selecting differentially expressed genes from microarray data. *BMC Bioinformatics* 2002; 3: 17
- 6 Yang IV, Chen E, Hasseman JP, Liang W, Frank BC, Wang S, Sharov V, Saeed AI, White J, Li J, Lee NH, Yeatman TJ, Quackenbush J. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. *Genome Biol* 2002; 3: research0062
- 7 Black MA, Doerge RW. Calculation of the minimum number of replicate spots required for detection of significant gene expression fold change in microarray experiments. *Bioinformatics* 2002; 18: 1609-1616
- 8 Cui X, Churchill GA. Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genome Biol* 2003; 4: 210
- 9 Raraty MG, Murphy JA, McLoughlin E, Smith D, Criddle D, Sutton R. Mechanisms of acinar cell injury in acute pancreatitis. *Scand J Surg* 2005; 94: 89-96
- 10 Baldi P, Long AD. A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized *t*-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics* 2001; 17: 509-519
- 11 Long AD, Mangalam HJ, Chan BY, Tolleri L, Hatfield GW, Baldi P. Improved statistical inference from DNA microarray data using analysis of variance and a Bayesian statistical framework. Analysis of global gene expression in *Escherichia coli* K12. *J Biol Chem* 2001; 276: 19937-19944
- 12 Pavlidis P. Using ANOVA for gene selection from microarray studies of the nervous system. *Methods* 2003; 31: 282-289
- 13 Hatfield GW, Hung SP, Baldi P. Differential analysis of DNA microarray gene expression data. *Mol Microbiol* 2003; 47: 871-877
- 14 Pan KH, Lih CJ, Cohen SN. Analysis of DNA microarrays using algorithms that employ rule-based expert knowledge. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2118-2123
- 15 Aubert J, Bar-Hen A, Daudin J, Robin S. Correction: Determination of the differentially expressed genes in microarray experiments using local FDR. *BMC Bioinformatics* 2005; 6: 42
- 16 Pawitan Y, Murthy KR, Michiels S, Ploner A. Bias in the estimation of false discovery rate in microarray studies. *Bioinformatics* 2005; 21: 3865-3872
- 17 Pawitan Y, Michiels S, Koscielny S, Gusnanto A, Ploner A. False discovery rate, sensitivity and sample size for microarray studies. *Bioinformatics* 2005; 21: 3017-3024
- 18 Grant GR, Liu J, Stoekert CJ Jr. A practical false discovery rate approach to identifying patterns of differential expression in microarray data. *Bioinformatics* 2005; 21: 2684-2690
- 19 Zhao Y, Pan W. Modified nonparametric approaches to detecting differentially expressed genes in replicated microarray experiments. *Bioinformatics* 2003; 19: 1046-1054
- 20 Troyanskaya OG, Garber ME, Brown PO, Botstein D, Altman RB. Nonparametric methods for identifying differentially expressed genes in microarray data. *Bioinformatics* 2002; 18: 1454-1461
- 21 Efron B, Tibshirani R. Empirical bayes methods and false discovery rates for microarrays. *Genet Epidemiol* 2002; 23: 70-86
- 22 Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance

- analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5116-5121
- 23 Pan W, Lin J, Le CT. A mixture model approach to detecting differentially expressed genes with microarray data. *Funct Integr Genomics* 2003; 3: 117-124
- 24 Strimmer K. Modeling gene expression measurement error: a quasi-likelihood approach. *BMC Bioinformatics* 2003; 4: 10
- 25 Segal MR, Dahlquist KD, Conklin BR. Regression approaches for microarray data analysis. *J Comput Biol* 2003; 10: 961-980
- 26 Li H, Gui J. Partial Cox regression analysis for high-dimensional microarray gene expression data. *Bioinformatics* 2004; 20: 1208-1215
- 27 Huang X, Pan W. Linear regression and two-class classification with gene expression data. *Bioinformatics* 2003; 19: 2072-2078
- 28 Azuaje F. Clustering-based approaches to discovering and visualising microarray data patterns. *Brief Bioinform* 2003; 4: 31-42
- 29 Guess MJ, Wilson SB. Introduction to hierarchical clustering. *J Clin Neurophysiol* 2002; 19: 144-151
- 30 Levenstien MA, Yang Y, Ott J. Statistical significance for hierarchical clustering in genetic association and microarray expression studies. *BMC Bioinformatics* 2003; 4: 62
- 31 Bertucci F, Salas S, Eysteris S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Loriod B, Bachelart L, Montfort J, Victorero G, Viret F, Ollendorff V, Fert V, Giovaninni M, Delpero JR, Nguyen C, Viens P, Monges G, Birnbaum D, Houlgatte R. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 2004; 23: 1377-1391
- 32 Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lonning P, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10869-10874
- 33 Sherlock G. Analysis of large-scale gene expression data. *Brief Bioinform* 2001; 2: 350-362
- 34 D'ambrosio C, Akin C, Wu Y, Magnusson MK, Metcalfe DD. Gene expression analysis in mastocytosis reveals a highly consistent profile with candidate molecular markers. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 1162-1170
- 35 Steinley D. Local optima in K-means clustering: what you don't know may hurt you. *Psychol Methods* 2003; 8: 294-304
- 36 Toronen P, Kolehmainen M, Wong G, Castren E. Analysis of gene expression data using self-organizing maps. *FEBS Lett* 1999; 451: 142-146
- 37 Covell DG, Wallqvist A, Rabow AA, Thanki N. Molecular classification of cancer: unsupervised self-organizing map analysis of gene expression microarray data. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 317-332
- 38 Getz G, Levine E, Domany E. Coupled two-way clustering analysis of gene microarray data. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12079-12084
- 39 Hastie T, Tibshirani R, Eisen MB, Alizadeh A, Levy R, Staudt L, Chan WC, Botstein D, Brown P. 'Gene shaving' as a method for identifying distinct sets of genes with similar expression patterns. *Genome Biol* 2000; 1: RESEARCH0003
- 40 Jiang H, Deng Y, Chen HS, Tao L, Sha Q, Chen J, Tsai CJ, Zhang S. Joint analysis of two microarray gene-expression data sets to select lung adenocarcinoma marker genes. *BMC Bioinformatics* 2004; 5: 81
- 41 rats. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2162-2169
- 42 Lazzeroni L, Owen A. Plaid models for gene expression data. *Statistica Sinica* 2002; 12: 61-86
- 43 Plaid models, for microarrays and DNA expression Available from: URL: <http://www-stat.stanford.edu/~owen/plaid>
- 44 Wang J, Delabie J, Aasheim H, Smeland E, Myklebost O. Clustering of the SOM easily reveals distinct gene expression patterns: results of a re-analysis of lymphoma study. *BMC Bioinformatics* 2002; 3: 36
- 45 Herrero J, Dopazo J. Combining hierarchical clustering and self-organizing maps for exploratory analysis of gene expression patterns. *J Proteome Res* 2002; 1: 467-470
- 46 Tsai CA, Lee TC, Ho IC, Yang UC, Chen CH, Chen JJ. Multi-class clustering and prediction in the analysis of microarray data. *Math Biosci* 2005; 193: 79-100
- 47 Brock A, Huang S, Ingber DE. Identification of a distinct class of cytoskeleton-associated mRNAs using microarray technology. *BMC Cell Biol* 2003; 4: 6
- 48 Billings SA, Lee KL. Nonlinear fisher discriminant analysis using a minimum squared error cost function and the orthogonal least squares algorithm. *Neural Netw* 2002; 15: 263-270
- 49 Cho JH, Lee D, Park JH, Lee IB. Gene selection and classification from microarray data using kernel machine. *FEBS Lett* 2004; 571: 93-98
- 50 Dangond F, Hwang D, Camelo S, Pasinelli P, Frosch MP, Stephanopoulos G, Stephanopoulos G, Brown RH Jr, Gullans SR. Molecular signature of late-stage human ALS revealed by expression profiling of postmortem spinal cord gray matter. *Physiol Genomics* 2004; 16: 229-239
- 51 Friedman N, Linial M, Nachman I, Pe'er D. Using Bayesian networks to analyze expression data. *J Comput Biol* 2000; 7: 601-620
- 52 Imoto S, Higuchi T, Goto T, Tashiro K, Kuhara S, Miyano S. Combining microarrays and biological knowledge for estimating gene networks via bayesian networks. *J Bioinform Comput Biol* 2004; 2: 77-98
- 53 Kim SY, Imoto S, Miyano S. Inferring gene networks from time series microarray data using dynamic Bayesian networks. *Brief Bioinform* 2003; 4: 228-235
- 54 Furey TS, Cristianini N, Duffy N, Bednarski DW, Schummer M, Haussler D. Support vector machine classification and validation of cancer tissue samples using microarray expression data. *Bioinformatics* 2000; 16: 906-914
- 55 Buerstatte CR, Behar KL, Novotny EJ, Lai JC. Brain regional development of the activity of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 2000; 125: 139-145
- 56 Liu Y. Active learning with support vector machine applied to gene expression data for cancer classification. *J Chem Inf Comput Sci* 2004; 44: 1936-1941
- 57 Williams RD, Hing SN, Greer BT, Whiteford CC, Wei JS, Natrajan R, Kelsey A, Rogers S, Campbell C, Pritchard-Jones K, Khan J. Prognostic classification of relapsing favorable histology Wilms tumor using cDNA microarray expression profiling and support vector machines. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;

- 41: 65-79
- 57 Podgorelec V, Kokol P, Stiglic B, Rozman I. Decision trees: an overview and their use in medicine. *J Med Syst* 2002; 26: 445-463
- 58 Dettling M, Buhlmann P. Boosting for tumor classification with gene expression data. *Bioinformatics* 2003; 19: 1061-1069
- 59 Middendorf M, Kundaje A, Wiggins C, Freund Y, Leslie C. Predicting genetic regulatory response using classification. *Bioinformatics* 2004; 20 Suppl 1: I232-I240
- 60 Agatonovic-Kustrin S, Beresford R. Basic concepts of artificial neural network (ANN) modeling and its application in pharmaceutical research. *J Pharm Biomed Anal* 2000; 22: 717-727
- 61 O'Neill MC, Song L. Neural network analysis of lymphoma microarray data: prognosis and diagnosis near-perfect. *BMC Bioinformatics* 2003; 4: 13
- 62 Sawa T, Ohno-Machado L. A neural network-based similarity index for clustering DNA microarray data. *Comput Biol Med* 2003; 33: 1-15
- 63 Wang A, Gehan EA. Gene selection for microarray data analysis using principal component analysis. *Stat Med* 2005; 24: 2069-2087
- 64 Sharov AA, Dudekula DB, Ko MS. A web-based tool for principal component and significance analysis of microarray data. *Bioinformatics* 2005; 21: 2548-2549
- 65 Liu A, Zhang Y, Gehan E, Clarke R. Block principal component analysis with application to gene microarray data classification. *Stat Med* 2002; 21: 3465-3474
- 66 Crescenzi M, Giuliani A. The main biological determinants of tumor line taxonomy elucidated by a principal component analysis of microarray data. *FEBS Lett* 2001; 507: 114-118
- 67 Yeung KY, Ruzzo WL. Principal component analysis for clustering gene expression data. *Bioinformatics* 2001; 17: 763-774
- 68 Slonim DK. From patterns to pathways: gene expression data analysis comes of age. *Nat Genet* 2002; 32 Suppl: 502-508
- 69 Hudson ME, Quail PH. Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiol* 2003; 133: 1605-1616
- 70 Gutierrez-Rios RM, Rosenblueth DA, Loza JA, Huerta AM, Glasner JD, Blattner FR, Collado-Vides J. Regulatory network of Escherichia coli: consistency between literature knowledge and microarray profiles. *Genome Res* 2003; 13: 2435-2443

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

专家门诊

本刊讯 《世界华人消化杂志》特设“专家门诊”固定专栏为广大消化病患者搭建一个信息平台，邀请本刊编委为专栏撰稿，每期1-3个专家门诊。写作格式如下：

胃溃疡诊断和治疗

个人简介(附3.5 cm × 5 cm照片一张)

通信作者(包括邮政编码、工作单位、部门、科室、机构全称、地址、所在省市、E-mail)

0 引言; 1 诊断; 2 治疗; 3 特色; 4 门诊时间

食管癌术后胃食管反流和胃排空延迟的相关因素及处理

吴仕光, 万桂玲, 李晓娟

吴仕光, 泰山医学院附属医院肿瘤防治中心 山东省泰安市 271000

万桂玲, 李晓娟, 临沂市肿瘤医院 山东省临沂市 276000
通讯作者: 吴仕光, 271000, 山东省泰安市, 泰山医学院附属医院肿瘤防治中心. yuemx@ns.cetin.net.cn

电话: 0538-6236830

收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-31

摘要

随着高位食管胃吻合数量的不断增加, 食管癌术后出现胃食管反流和胃排空延迟已经成为食管外科的常见并发症, 也是影响食管癌患者术后生存质量的重要因素, 我们综合了近年来在此方面研究的大宗病例分析, 各种手术改进方法的对比, 现今食管癌临床病理学、生理学研究的基础理论以及近年来胃排空延迟治疗方面研究的新认识, 从术前、手术和术后的各个环节及病理、生理等角度, 分析了可能导致术后胃食管反流和胃排空延迟的各种相关因素, 并总结提出了相应的处理方法。

关键词: 食管癌; 术后; 胃食管反流; 胃排空延迟

吴仕光, 万桂玲, 李晓娟. 食管癌术后胃食管反流和胃排空延迟的相关因素及处理. 世界华人消化杂志 2006;14(1):75-78
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/75.asp>

0 引言

手术治疗食管癌可以取得较高的治愈率和生存率已经得到大家的公认. II-IV期的食管癌切除术后5-10 a的生存率分别为8-30%和5.2-24%, 对照放疗的5 a生存率在8-16%之间, 化疗的5 a生存率几乎为零^[1]. 而随着高位食管胃吻合数量的增加, 胃食管反流和胃排空延迟已成为食管癌术后的较常见的并发症^[2], 也是影响食管癌患者术后生存质量的重要因素. 多年来有关这方面的基础理论研究, 各种术式的改进, 以及各种经验总结的报道非常多, 大家各抒己见, 改进的方法也各有千秋, 但仍然没有很好地解决食管癌术后胃食管反流和胃排空延迟的问题, 综合近年来众家的意见及研究成果, 多集中在以下几个方面.

1 术后反流及胃排空延迟的原因

1.1 手术导致解剖关系的改变 食管癌根治术即意味着食管癌变位的切除和消化道的重建, 在病变的切除过程中, 正常食管的抗反流机制随即遭到根本的破坏, 贲门括约肌被切除, 膈肌脚对食管的"弹簧夹"^[3]作用被破坏, 胃上提入胸腔甚至颈部与近端食管相吻合, 剩余食管的缩短, 近端食管与胸胃之间成为一个共同腔等因素都直接导致了食管癌术后胃内容物随压力梯度自由涌入食管腔内, 出现反流症状. 手术导致的胃扭转、幽门机械性梗阻、肠粘连等原因引起的胸腔胃排空障碍, 再加上用力、咳嗽等胸腔压力增高的因素, 更会加重食管癌术后的反流.

1.2 食管癌手术前后胃食管反流及胃排空延迟和重建消化道的生理、病理变化 近年来涉及此方面的研究、报道非常多^[4-9]. 众家利用同位素技术、胃食管测压法、24 h胃食管pH监测和内窥镜胃黏膜活检等技术对食管癌手术前后胃食管反流及胃排空延迟和重建消化道的生理、病理变化进行研究, 结果可总结为以下几个方面: (1)食管癌患者术前、术后均存在食管酸性和碱性反流, 存在高胃动素血症, 胃肠及胆道动力低下, 排空延迟及食管下括约肌功能不良. (2)食管癌病变破坏了食管的完整性和功能的连续性, 影响了食管的廓清功能, 是导致术前反流的重要因素. (3)术后患者均存在胸胃对半固体食物排空延迟. 术前患者的胃排空较正常人已有明显损害, 术后排空较术前延迟更明显. (4)胸胃泌酸功能术后明显减低. (5)胸胃萎缩性胃炎的发病率明显增高. (6)术后出现胃食管反流是因为胃肠动力低下和排空延迟. (7)胸腔胃内的正压状态与胸腔负压形成压力差, 造成胃的张力过大而影响胃的排空. (8)术中胃体长时间的暴露, 灯光的照射, 温度的变化, 游离时对胃壁的牵拉揉搓、挤压, 使胃壁组织造成不同程度的损伤, 加上游离后胃血供减少, 造成术后短期的血运障碍都潜在的影响胃壁的张力. (9)空腹血清胃泌素浓度术后近期明显升高, 或明显低下. (10)大多数学者认为吻合口高压区有明显的

■背景资料

随着高位食管胃吻合数量的不断增加, 食管癌术后出现胃食管反流和胃排空延迟已经成为食管外科的常见并发症, 也是影响食管癌患者术后生存质量的重要因素, 近年来针对此方面的研究论文报道虽多, 但出发点不同, 研究角度各异, 意见不一, 甚至相互矛盾, 未能达成共识, 本文综合了近年来在此方面研究的大宗病例分析, 各种手术改进方法的对比, 现今食管癌临床病理学、生理学研究的基础理论以及近年来胃排空延迟治疗方面研究的新认识, 从术前、手术和术后的各个环节及病理、生理等角度, 分析了可能导致术后胃食管反流和胃排空延迟的各种相关因素, 并总结提出了相应的处理方法。

■ 研发前沿

目前此领域研究的热点、重点还是集中在手术及吻合方式的改进和术后胃食管反流及胃排空延迟的病理、生理变化两个方面,对选择何种术式才能更好的防治和避免出现术后胃食管反流及胃排空延迟同样存在着很多的争论。

抗反流作用,但也有学者认为吻合口的高压带不具备抗反流作用,高压区的产生是因为吻合口炎症、水肿、狭窄等因素引起,希望吻合口的压力能具有抗反流作用是一种误解^[10]。郑炜 *et al*^[11]通过监测术后患者消化间期胃窦、幽门、十二指肠移行性运动复合波(migrating motor complex, MMC)的变化观察到切断迷走神经及解剖位置改变后胃窦、幽门、十二指肠在消化间期仍然有其自身的运动形式,但其MMC周期的持续时间缩短,胃窦的MMC III相活动缺失的次数增多,收缩波平均振幅降低,使消化间期胃内未消化固体食物不易通过幽门排入十二指肠,并且胃窦MMC III相活动发生在幽门、十二指肠之后,这种不协调运动不利于胃内未消化固体食物的排空。吴仕光 *et al*^[12]通过对26例发生术后胃排空延迟患者的术前、术中及术后的对比和回顾观察,发现术后出现胃排空延迟的患者,术前均存在不同程度的慢性胃炎病史,术中发现患者的胃壁菲薄,张力低,弹性差,而且胃壁与周围的组织黏连较重,而且术后出现胃排空延迟后经胃镜检查发现胃黏膜病变加重,幽门口胆汁反流严重,因此说明患者术前既有的胃黏膜病变及术后的加重对术后胃排空延迟有影响作用。还有学者认为术后的胃排空延迟主要是对液体食物排空的延迟,而非半固体食物,或是两者都有^[13,14]。这一点也与术后排空延迟的患者胃内有大量液体潴流相吻合。

1.3 术后患者的体位对反流的影响 王其彰 *et al*^[15]通过24 h食管pH监测发现,患者术后平卧均有不同程度的反流,半卧位时则无异常反流。提倡患者术后应尽量保持半卧位,以减少反流。

2 术式的选择与术后反流和胃排空延迟

2.1 手术入路选择的差异 合理的术式应尽可能的满足病变切除的需求,淋巴结清扫彻底,手术安全性高,术后并发症少为基本要求。杜建伟 *et al*^[15]通过945例III-IV期胸中段食管癌各种手术入路的比较观察认为,经右胸后外侧切口行食管癌根治因为有较明显的显露优势,切除率高,吻合满意,所以吻合口瘘的发生率比左胸入路低,并且手术死亡率低,5 a生存率高。可作为中段食管癌的常规手术入路。但是作者没有进一步比较手术术式与胃排空延迟方面的关系。陈克能 *et al*^[16]则分析了左右胸入路手术治疗食管癌的优缺点,认为右胸入路手术后胃排空延迟的发生率高于左胸入路者(13/98与5/2 285),并认为右胸胃易在

幽门部形成成角畸形有关,游离的低动力胃在右胸内扩张会加重幽门成角。而王桂洪 *et al*^[17]还认为膈肌的食管裂孔处游离、扩张不充分造成的机械性卡压是形成右侧胸腔内食管胃吻合术后胃排空障碍的主要原因。

2.2 吻合口的位置 徐启明 *et al*^[18]提出,弓下食管胃吻合者术后反流明显多于弓上者,认为在重视吻合方式的同时要考虑吻合口的位置。而王永岗 *et al*^[19]总结了2 427例手术治疗的食管癌患者,术后出现恶心、呕吐胃内容物等症状的27例,认为发生反流与吻合口位置的关系为三切口颈部吻合的最高,二切口颈部吻合者次之,弓上吻合者再次,弓下吻合者最低,则又与徐启明 *et al*^[18]报告不符。赵云平 *et al*^[21]也认为胃排空障碍多见于高位食管胃吻合术后,以颈部吻合者多见。尽管没有大宗的资料分析比较左、右胸入路那种方式更易引起术后反流的参考,但是很多术者都倾向于左胸入路的术式和吻合口位置越低术后胃排空延迟发生率越低的观点。

2.3 胸胃的位置 通过24 h pH监测发现,同样是弓上吻合食管床组尽管未能减少反流次数,但反流量和反流持续时间均较胸内组显著降低^[3]。而且,食管床组胸胃被缝缩、固定,减少了胸内占位效应,会显著减轻进食量减少,饭后胸闷不适^[20]。

3 抗反流的各种术式的改进

多年来,各家都在通过对食管胃吻合方法的改进以期达到最佳的抗反流效果。邵令方 *et al*^[21]使用“食管胃吻合包埋缝缩法”和“食管置入吻合法”来增强吻合口的抗反流作用。“隧道式”食管胃吻合术,经多年的临床实践和食管压力及pH值检测,证明其抗反流作用良好。邱社祥 *et al*^[22]设计应用黏膜瓣式食管胃吻合术在术后经食管pH监测和内镜检查认为具有很好的抗食管反流作用。近年来,由于现代化吻合器械的应用,很多术者已放弃了手法吻合。徐启明 *et al*^[18]利用机械吻合法,通过胃底上提包埋吻合口及胃底悬调胸顶形成类似His角也取得了很好的效果。陈乾德 *et al*^[23]将带血管蒂的胸骨甲状肌、胸骨舌骨肌、肩胛舌骨肌远端折叠缝合环绕在颈部吻合口周围,使其形成三个生理性活瓣,可防止胃内容物反流。吻合术式虽不断更新,但仍然没有能根本解决问题的方法,甚至有人认为现行的吻合方式无抗反流作用。同时,很多学者针对患者术后经常出现的幽门梗阻,试图通过幽门成型来减轻患者的胃排空延迟以达到减轻反流的作用,但

此种方法并没有得到大家的认同, 很多的对比研究表明, 幽门成型术对抗反流无益, 且会增加十二指肠内容物向胃反流, 导致胆汁性胃炎, 进而加重胃排空延迟。

王大力 *et al*^[24]则是在食管癌根治术中通过保留迷走神经干以尽可能的保护患者术后的胃功能, 并通过对比观察认为, 保留神经组的胃排空指标、胃液量指标、术后呕吐、返酸等主要症状、血清胃泌素及术后24 h pH值检测结果等均较切断组有明显差异, 说明保留迷走神经干对术后的胃功能有保护作用, 有利于提高患者术后的生存质量。但是, 根治术中可保留迷走神经的病例并不多, 因此, 这种方法也不是一个根本的方法。

4 如何更有效的减轻食管癌术后的胃食管反流和胃排空延迟

通过以上诸相关因素的分析, 相对应的减轻食管癌术后胃食管反流和胃排空延迟的解决方法也就突出、集中在以下几个方面。

4.1 术中应认真、仔细, 注意重建消化道的解剖顺应性, 防止发生胃扭转, 游离胃窦部时应充分, 尽量松解幽门、十二指肠周围的黏连牵拉, 否则上提胃体时会造成胃窦、幽门成角畸形。

4.2 尽管吻合术式的改进不能最终解决食管癌术后反流的问题, 但是仍然不能完全忽视吻合口的活瓣式结构和His角的重建对抗反流的积极作用, 在采用机械吻合的时候, 也应该注意胃底对吻合口的包埋及胃底的悬吊, 尽量完成吻合口的活瓣式结构和His角的重建。

4.3 在保证手术彻底、安全的前提下, 术者可根据自己的经验、手术习惯和患者的具体情况选择手术入路、胸腔胃的位置, 尽可能的减少以上原因所致的胃排空延迟。

4.4 术中游离胃体时应注意操作轻柔, 尽量减少因胃壁的物理损伤而引起术后胃排空延迟。

4.5 胃管的留置时间 术后不要过早的拔除胃管, 食管癌术后迷走神经切断, 内脏神经被破坏, 出现胃动力低下; 胃蠕动缓慢、消失或胃扩张, 加上幽门痉挛、水肿、不能节律性开放, 拔除胃管过早, 而出现急性胃扩张、加重胃排空延迟^[9,25], 故建议胃管保留时间应持续到术后5-7 d。

4.6 术后饮食 术后进食以后, 要向患者解释出现反流的原因, 消除患者的心理压力, 鼓励患者进食。饮食应以清淡, 高热量饮食为主, 避免给以高渗、高脂肪饮食, 高渗、高脂肪饮食易导致胃

排空延迟。

4.7 注重胃排空延迟的治疗 针对胃排空延迟的治疗近年来研究的也很多, 全消化道动力药(普瑞博思)的应用, 以及和质子泵抑制剂(洛赛可)的联合应用, 对术后出现的胃排空延迟和胃食管反流可起到很好的改善作用, 并且针对防止幽门的胆汁反流和胃黏膜的保护都效果显著, 且优于与其他制酸剂的联合应用^[26], 因为质子泵抑制剂在制酸的同时对胃的其他分泌及动力等生理功能无抑制作用。红霉素也可作为一种胃动力药用于术后的胃排空延迟, 口服红霉素能显著改善迷走神经切断后的胃肠动力和排空障碍, 可使胃每分钟3次的低收缩波转变为阵发、密集的高、中幅波, 对胃肠内容物有协调地推动作用, 对去神经的胃产生巨体收缩波持续时间超过3 min^[27]并可通过增强胃窦收缩, 降低幽门阻力, 使幽门打开, 抑制幽门压力波群而加速胃排空^[28]。

5 参考文献

- 1 张汝刚. 食管癌外科的现状和发展. 中国肿瘤 1999; 8: 28
- 2 赵云平, 王如文, 蒋耀光, 马铮, 龚太乾. 食管胃吻合术后胃排空障碍探讨. 消化外科 2004; 3: 43-45
- 3 赵雍凡, 王资斌, 蒋光亮, 胡建昆. 切除食管癌两种消化道重建方式术后胃食管反流的对比观察. 中华胸心血管外科杂志 1999; 15: 135-137
- 4 罗南萍, 杨道理, 孙文杰, 卢兆桐. 食管贲门癌患者围手术期胃动素与胃泌素的动态观察. 肿瘤防治研究 1997; 24: 259-260
- 5 张灿斌, 徐中一, 齐宗华, 任桂花, 王建立, 赵元猛. 食管癌贲门癌根治术对胆汁成分的影响. 中华胸心血管外科杂志 1996; 12: 97-99
- 6 史念珂, 付国舟. 食管癌围手术期胃食管反流pH检测分析及探讨. 中华胸心血管外科 1999; 15: 132-134
- 7 王其彰, 王如然, 马立敏, 李顺宗, 李保庆, 王福顺, 张会军. 显示器用于检查食管癌切除术后胃排空. 中华外科杂志 2000; 38: 529-530
- 8 王永岗, 张汝刚, 张大为. 食管癌切除术后胸胃功能的研究. 中华肿瘤杂志 1997; 19: 385-388
- 9 卢兆桐, 孙桂武, 朱荣, 寇仁业, 李晓华, 邹志强, 李浩, 袁来, 隋刚. 食管贲门癌术后早期胸胃排空延迟的原因分析. 临床肿瘤学杂志 1998; 3: 57-58
- 10 王其彰, 刘俊峰, 赵新明, 雷建章, 从庆文, 李文起, 李保庆, 王福顺, 曹富民, 张小军, 张宏伟, 张宏磊. 食管胃吻合能否抗胃食管反流. 中华外科杂志 1999; 37: 71-73
- 11 郑炜, 周仑, 林培裘, 林若柏, 陈椿, 康明强, 林英. 食管癌切除术后胃窦幽门十二指肠运动的变化. 中华外科杂志 2002; 40: 511-514
- 12 吴仕光, 万桂岭, 葛来增, 袁恒兰, 李同飞. 食管癌患者胃黏膜病变与术后胃排空延迟. 世界华人消化杂志 2005; 13: 141-142
- 13 罗金燕. 胃排空的生理与临床概述. 中国实用儿科杂志 2000; 15: 395-396
- 14 王其彰, 张长保, 李保庆, 刘俊峰, 赵新明. 食管癌切除术后双相胃排空. 中华胸心血管外科杂志 1999; 15: 335-388
- 15 杜建伟, 方立德, 倪峰, 陈昭明, 陈彤宇, 钱文标. 食

■应用要点

本文的实际应用价值在于为大家总结提出针对食管癌术后出现胃食管反流及胃排空延迟的原因和怎样防止及避免乃至治疗方面的近年来的研究成果, 为临床工作提供指导。

- 管癌手术径路的比较分析. 中国癌症杂志 2001; 11: 52-54
- 16 陈克能, 师晓天, 冯瑞庆. 食管癌贲门癌的手术入路比较. 中华胸心血管外科杂志 1998; 14: 232-233
- 17 王桂洪, 李玉华, 伍青, 张文, 潘广新. 食管癌切除右胸内食管胃吻合术胃排空障碍的预防. 空军总医院学报 2003; 19: 232
- 18 徐启明, 孙玉鹗, 黄孝迈, 任婉玲, 李冬, 包新登. 食管癌切除术后重建食管的测压分析. 中华外科杂志 1995; 33: 173-175
- 19 王永岗, 张汝刚, 张大为. 27例食管癌切除术后胃排空障碍. 中华胸心血管外科杂志 1998; 14: 224-226
- 20 马胜军, 乔以泽, 尹刚, 邹胜鲁, 董铭锋, 张伟. 二切口与三切口食管癌切除胃代食管疗效及生活质量评价. 中国肿瘤临床与康复 1998; 5: 47-49
- 21 邵令方, 张毓德. 食管外科学. 第1版. 石家庄: 河北科学技术出版社 1987; 374-376
- 22 邱社祥, 毛跃, 蔡辉华, 邹育培, 杨殿才. 黏膜瓣式食管胃吻合术抗反流的食管动力学研究. 中华胃肠外科杂志 2005; 8: 196
- 23 陈乾德, 朱向国, 亓树国. 胸中上段食管癌切除术后防止反流的临床研究. 肿瘤防治研究 2001; 8: 301
- 24 王大力, 张汝刚, 孙克林, 程贵余, 王永岗. 保留或切断迷走神经干的食管癌切除术后胃消化功能的对比研究. 中华肿瘤杂志 2000; 22: 414-416
- 25 徐斌, 王克武. 食管癌贲门癌切除术后胃排空延迟分析. 现代中西医结合杂志 2002; 11: 633-634
- 26 彭秀兰. 洛赛克与雷尼替丁联合胃动力药治疗胃食管反流病110例疗效比较. 湖南医学 2000; 17: 424-425
- 27 宋爱琳, 王彤, 寇治民, 张玉怀. 贲门周围血管离断术后胃排空障碍的治疗. 中国普通外科杂志 2002; 11: 58-59
- 28 陈先祥. 影响胃排空的因素. 腹部外科 1998; 11: 275-276

电编 李琪 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界华人消化杂志》发表文章配发内容通知

本刊讯 从2006年开始,《世界华人消化杂志》将对述评、食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、基础研究、临床研究、前沿综述、研究快报、临床经验等主要栏目,每篇文章配发以下内容,请广大作者投稿前将以下内容补上.

(1)背景资料:简要、精确概括此文的相关背景,使读者更广泛的了解文章的相关知识,更深入的理解文章的意义.(2)研发前沿:简要介绍此文章研究领域中的研究热点、重点.(3)相关报道:为了方便读者对您文章有更深入的理解,或得到更系统,详实的相关知识,请您提供与您文章有关的其他发表的研究报道的文章出处、联接等,以方便读者进行更广泛的阅读.(4)创新盘点:总结、提炼此文章与其他相关、或类似文章、报道的不同点以及创新之处,以方便读者比较,并有重点的阅读您的文章.(5)应用要点:总结此文章在实际应用中的价值,或对应用的指导、改进作用,以及在将来应用中的前景.(6)名词解释:将文章中出现的,对文章的理解有重要意义,而大部分读者可能不太熟悉,或理解的不是很全面、准确,或者这些词在此文中的意思异于他处的名词给予简单、直白、明了的解释说明.(7)同行评论:编辑部将同行评议时审稿专家的意见中最能概括文章特点、价值、意义的词语、句子进行概括总结,使读者可以对文章有个比较客观的认识.以上各项表达用通俗易懂的1-3句话描述.(世界胃肠病学杂志社 2006-01-08)

奥曲肽对肝星状细胞收缩的影响

尹凤荣, 张晓岚, 王川

尹凤荣, 张晓岚, 河北医科大学第二医院消化内科 河北省石家庄市 050000
王川, 河北医科大学药理教研室 河北省石家庄市 050000
河北省卫生厅资助项目, No. 2004110
通讯作者: 张晓岚, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科. xiaolanzh@126.com
电话: 0311-87222951
收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-31

Effect of octreotide on contraction of rat hepatic stellate cell

Feng-Rong Yin, Xiao-Lan Zhang, Chuan Wang

Feng-Rong Yin, Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Chuan Wang, Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Supported by the Fund from Department of Health of Hebei Province, No. 2004110
Correspondence to: Dr. Xiao-Lan Zhang, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. xiaolanzh@126.com
Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-10-31

Abstract

AIM: To investigate the effects of octreotide (OCT) on the contraction of endothelin-1(ET-1)-stimulated hepatic stellate cell (HSC), and to explore the changes of intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$).

METHODS: The changes of fluorescence degree, cellular area, and the $[Ca^{2+}]_i$ that induced by OCT and ET-1 were observed by Fluo-3/AM method under confocal laser scanning microscope.

RESULTS: Low concentration of OCT (2.5 mg/L) had no significant effect on the contraction or the $[Ca^{2+}]_i$ in HSC. However, OCT at concentrations of 5.0 mg/L and 10.0 mg/L significantly reduced the $[Ca^{2+}]_i$ immediately with the rate of 36.59% and 39.13% at 10 min ($P < 0.05$), respectively, but it had little effect on the contraction of HSC. ET-1 (10^{-8} mol/L) caused a transitory marked increase of $[Ca^{2+}]_i$ in HSC, and a significant HSC

contraction. OCT at concentrations of 5.0 mg/L and 10.0 mg/L inhibited the ET-1-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase and cell contraction in HSC ($P < 0.05$).

CONCLUSION: OCT can reduce the concentration of $[Ca^{2+}]_i$ immediately, but have little effect on the contraction of HSC. OCT can inhibit the ET-1-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase and cell contraction in HSC.

Key Words: Octreotide; Endothelin-1; Hepatic stellate cell; Intracellular free calcium

Yin FR, Zhang XL, Wang C. Effect of octreotide on contraction of rat hepatic stellate cell. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):79-82

摘要

目的: 探讨奥曲肽(OCT)对内皮素-1(ET-1)刺激的肝星状细胞(HSC)收缩的影响, 以及此过程中胞质游离钙($[Ca^{2+}]_i$)的变化。

方法: 应用体外HSC培养技术, 借助激光共聚焦显微镜(LSCM), 采用第三代钙荧光探针 Fluo-3/AM观察OCT、ET-1介导的HSC $[Ca^{2+}]_i$ 荧光强度、细胞面积及最大长径的变化。

结果: 2.5 mg/L OCT对HSC内 Ca^{2+} 浓度及收缩无显著影响; 5.0 mg/L、10.0 mg/L组OCT能够即刻引起HSC内 Ca^{2+} 浓度显著下降, 10 min时下降率分别为36.59%、39.13%($P < 0.05$), 但对HSC收缩无显著影响。ET-1引起HSC内 Ca^{2+} 浓度短暂而明显的升高以及HSC显著的收缩。5.0 mg/L、10.0 mg/L组OCT能够抑制ET-1引起的HSC内 Ca^{2+} 浓度升高及收缩作用($P < 0.05$)。

结论: OCT可即刻引起HSC内 Ca^{2+} 浓度下降, 但对HSC收缩影响不大。OCT能够抑制ET-1引起的HSC收缩。

关键词: 奥曲肽; 内皮素-1; 肝星状细胞; 胞质游离钙

尹凤荣, 张晓岚, 王川. 奥曲肽对肝星状细胞收缩的影响. *世界华人消化杂志* 2006;14(1):79-82
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/79.asp>

背景资料

近来研究表明, HSCs同时参与肝脏微循环和门脉高压的调节, 活化的HSCs对许多血管活性物质具有收缩或舒张的功能。由于HSCs在肝纤维化及门脉高压中均发挥重要作用, 一般认为HSCs是防治慢性肝病的重要靶细胞。奥曲肽(octreotide)虽已应用于临床治疗门脉高压食管静脉曲张破裂出血多年, 但其作用机制尚不完全清楚。

■同行评价
研究符合伦理学
要求。

0 引言

近年研究表明,肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)活化后收缩能力增强,对许多血管活性物质具有收缩或舒张功能,参与了肝脏微循环的调节及门脉高压(portal hypertention, PHT)的形成^[1]。奥曲肽(octreotide, OCT)虽已应用于临床治疗PTH食管静脉曲张破裂出血多年,但其作用机制尚不完全清楚。我们应用激光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)技术,研究奥曲肽对活化的HSCs收缩能力的影响,旨在探讨奥曲肽治疗PTH并发症的可能机制,为奥曲肽的临床应用提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 RMPI-1640培养基为美国Gibco公司产品;内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自美国Sigma公司;奥曲肽为瑞士诺华制药有限公司产品;Fluo-3/AM购自美国Biotium公司。主要仪器有二氧化碳培养箱、激光共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscopy, LSCM)。

1.2 方法

1.2.1 细胞株的培养、细胞爬片 肝星状细胞株CFSC由美国Greenwel教授建株并惠赠,其表型为活化的HSCs。细胞置于含100 g/L胎牛血清的RMPI-1640培养液中,37℃ 50 mL/L CO₂条件下培养。将2 cm×2 cm盖玻片预先放置在35 mm培养皿内,细胞消化后以1.0×10⁴/mL的密度接种2 mL制备爬片,培养箱中孵育至细胞80%融合时,弃培养液,换不含胎牛血清的细胞培养液继续培养24 h,使细胞基本同步化于G₀期后再进行实验。

1.2.2 钙荧光探针的负载 钙荧光探针Fluo-3/AM用纯DMSO配成1 mmol/L的储备液,-20℃避光保存备用。实验前以37℃预温Hank's液1 mL取代原培养液,加入以DMSO溶解的Fluo-3/AM 5 μL,放回培养箱中避光孵育30 min。

1.2.3 LSCM检测HSCs[Ca²⁺]_i 将负载好的细胞爬片吸去负载液,再用Hank's液漂洗2次,将其用镊子裁剪成适宜大小,放置于倒置显微镜上的浴槽中,加入500 μL或1 mL Hank's液,放于LSCM的载物台上,调节焦距使图像清晰度达到最佳状态,选取生长良好的2-3个细胞处于最佳观察视野,激发波长488 nm,发射波长530 nm,40倍物镜,xyt扫描方式,计算机分析参数完全一致,对细胞进行连续动态扫描。根据细胞对药物反

应的预实验结果,扫描时间间隔5 s,用药后观察10 min,测量细胞长度、面积变化时观察时间延长至25 min,每组实验重复10次,每个被染细胞只用1次。ET-1终浓度为10⁻⁸ mol/L;奥曲肽终浓度分别为2.5, 5, 10 mg/L。

HSCs[Ca²⁺]_i的计算方法:利用LSCM所配备的计算与图像软件(Leica confocal software, TCS SP2)计算荧光强度相对值,荧光强度越大,[Ca²⁺]_i越高。[Ca²⁺]_i的变化用Fluo-3/AM与Ca²⁺结合后荧光强度变化百分数表示。

$$[\text{Ca}^{2+}]_i \text{ 荧光强度变化百分数}(\%) = (\text{F}-\text{F}_0)/\text{F}_0 \times 100\%$$

其中F为LSCM测量时整个细胞的平均荧光强度,F₀为用药前的[Ca²⁺]_i荧光强度。

1.2.4 HSCs收缩的测量 细胞收缩通过测量细胞长度(细胞的最长轴线)与细胞面积的改变来评估。在测细胞内Ca²⁺浓度时,利用激光共聚焦显微镜微尺,测量基础条件下和加入药物后单个细胞影像的长度、面积变化。测量结果用同一细胞相对于基础状态下长度、面积的百分变化表示。细胞长度、面积减少≥8%可认为收缩^[2]。

$$\text{面积(长度)变化的百分数}(\%) = [\text{S}_0(\text{L}_0) - \text{S}(\text{L})]/\text{S}_0(\text{L}_0) \times 100\%$$

其中S₀(L₀)为给药前的细胞面积(长度),S(L)为给药后的细胞面积(长度)。

统计学处理 数据均以均数±标准差(mean±SD)表示,利用SPSS 10.0软件进行统计分析。多组间均数差异性比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及q检验。P<0.05为有统计学意义。

2 结果

2.1 HSCs的Ca²⁺成像 LSCM下Ca²⁺成像的HSCs仍可见普通倒置显微镜下的形态特征,[Ca²⁺]_i浓度的高低由细胞被激发的荧光强弱表示,荧光强度越强表示[Ca²⁺]_i浓度越高,反之则越低。本实验HSCs与Fluo-3/AM孵育后,所有细胞均被染色,且各细胞间的荧光强度基本一致(图A1, A2)。

2.2 奥曲肽对HSCs内Ca²⁺浓度及收缩的影响 2.5 mg/L组奥曲肽对HSCs内Ca²⁺浓度、细胞面积及最大长度无显著影响。5.0, 10.0 mg/L组能够即刻引起HSCs内Ca²⁺浓度显著下降,10 min时分别下降36.59%和39.13%(P<0.05);对HSCs面积、长度则无显著影响(表1)。

2.3 ET-1对HSCs内Ca²⁺浓度及收缩的影响 ET-1能引起HSCs内[Ca²⁺]_i短暂而明显的升高,使得

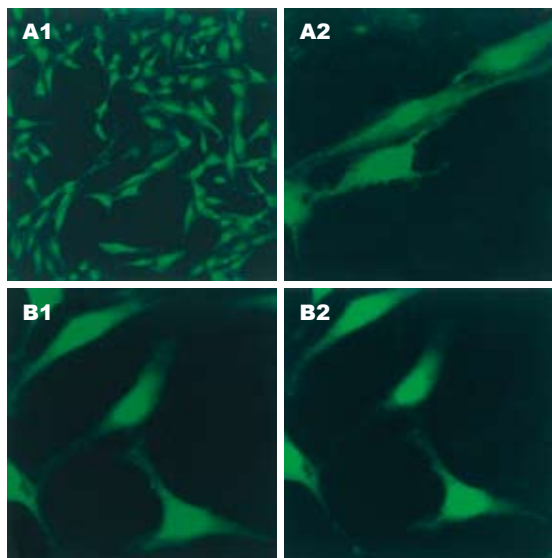


图 1 HSCs的Ca²⁺浓度变化和收缩. A: 负载Fluo-3的HSCs形态. A1: 1 zoom; A2: 4 zoom; B: HSCs的收缩. B1: 对照组; B2: ET-1刺激后2 min.

HSCs面积及最大直径显著减小(表2, 图B1, B2).

2.4 奥曲肽对ET-1刺激的HSCs收缩的影响 奥曲肽预先作用一段时间后, 再加入ET-1, 使得HSCs内[Ca²⁺]_i浓度峰值减低, 面积及最大长度变化减小(表2). 奥曲肽能够抑制ET-1对HSCs的收缩作用.

3 讨论

肝硬化PHT的主要并发症——食管、胃底静脉曲张破裂出血严重威胁着患者的生命. PHT由肝内血管阻力增加及门脉血流量增多引起, 其病理生理的始动因素是肝内血管阻力增加, 主要由压迫门静脉和中央静脉的纤维化瘢痕、再生结节组织结构变化引起. 过去几年的研究表明, 不仅组织结构变化等固定因素, 而且一些可变因素对肝内血管阻力增加也起一定作用: 肝内血管阻力可被某些药物降低20-30%, 说明肝内血管阻力是可调节的, 肝内血管阻力增加部分由肝内血管壁张力增加引起.

HSCs的特殊解剖部位及其具有的收缩和舒张特性, 决定了其对肝脏微循环的调节作用. 首先, HSCs位于窦内皮细胞形成的窦壁下Disse间隙, 多分支的细胞突起包绕着窦内皮细胞, 形成第二层窦壁, HSCs的立体分布和伸展足以覆盖整个肝窦微循环, 这种解剖位置使其有可能调节肝脏微循环. 其次, 活化的HSCs在超微结构上出现大量的收缩结构, 内质网增多增大, 微丝丰富, 出现黏着斑; 并且, 活化的HSCs表达α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle action, α-SMA)和结蛋白丝, 二者也存在于分支突起中, 三维

表 1 奥曲肽对HSCs内Ca²⁺浓度的影响 (mean ± SD)

分组 (μg/mL)	Ca ²⁺ 浓度	细胞面积变化百分数 (%)	细胞长度变化百分数 (%)
对照组	63.41 ± 8.09		
奥曲肽组			
2.5	56.19 ± 5.23	2.20 ± 1.23	4.32 ± 2.21
5.0	42.62 ± 6.54 ^a	5.96 ± 1.31	6.42 ± 1.30
10.0	40.21 ± 5.35 ^a	4.43 ± 1.52	7.25 ± 2.14

^aP<0.05 vs 对照组.

表 2 奥曲肽对ET-1刺激的HSCs Ca²⁺浓度和收缩的影响 (mean ± SD)

分组	Ca ²⁺ 浓度峰值	细胞面积变化百分数 (%)	细胞长度变化百分数 (%)
对照组	63.41 ± 8.09		
ET-1组 (10 ⁻⁸ mol/L)	135.97 ± 6.12	20.30 ± 5.21	20.52 ± 5.17
奥曲肽组 (μg/mL)			
2.5	130.34 ± 5.03	18.28 ± 6.12	18.40 ± 2.36
5.0	90.24 ± 5.63 ^b	12.08 ± 2.64 ^b	12.38 ± 5.20 ^b
10.0	85.72 ± 3.65 ^b	10.45 ± 1.72 ^b	12.45 ± 1.71 ^b

^bP<0.05 vs ET组.

结构和超显微结构特性类似于其他器官中调节血流量的外膜细胞, HSCs被认为在肝窦中发挥外膜细胞样作用. 再次, 研究证明, 活化的HSCs对多种血管活性物质, 如ET-1、血管紧张素II (angiotensin II, Ang II)、心房利钠肽(atrial natriuretic peptide, ANP)、一氧化氮(nitric oxide, NO)等产生收缩或舒张反应, 其中ET-1是最有效的, 也是研究最多的血管收缩因素^[1]. 肝硬化时, 肝窦内皮细胞(sinusoidal endothelial cell, SEC)合成NO、ET-1减少, 而活化的HSCs使NO、ET-1代偿性合成分泌不均衡, ET-1增加更为明显, 导致HSCs收缩性增强. 此种NO、ET-1生理平衡被破坏, 在肝硬化微循环障碍发生发展中具有重要作用^[3]. 由于ET-1特殊的病理作用及对HSCs显著的收缩效果, 所以, 我们仍选用其作为刺激因素.

研究表明, HSCs的活化过程伴随着细胞膜上L型电压依赖性Ca²⁺通道(L-type voltage-operated calcium channels, L-VOCC)的上调^[4], Ca²⁺信号途径与HSCs收缩密切相关^[2,5,6], 在HSCs的收缩调节中, Ca²⁺信号转导通路可能比rho信号通路发挥更大作用^[7]. 本次实验中, ET-1引起HSCs显著的收缩以及HSCs内的Ca²⁺浓度短暂而显著的升高, 与先前实验结果一致^[3].

奥曲肽为八肽生长抑素(somatostatin, SST)类似物, Corley *et al*^[8]进行的Meta分析表明, 在治疗食管静脉曲张出血方面, 无论是疗效还是安全性奥曲肽均优于加压素/特利加压素; 而且支持奥曲肽作为硬化剂/结扎疗法的辅助治疗。但奥曲肽降低PHT的作用机制尚不完全清楚。Escorsell *et al*^[9]就奥曲肽对血液动力学的影响进行了系列研究, 静脉注射奥曲肽可引起肝静脉压力梯度、奇静脉血流量快速降低, 但有关奥曲肽对HSCs收缩影响的细胞水平上的研究较少。

Ding *et al*^[10]发现奥曲肽能够降低HSCs内Ca²⁺浓度, 但不能阻断氯化钾、ET-1刺激的Ca²⁺浓度增加, 提示奥曲肽既不能阻断HSCs膜上L-VOCC, 也不能阻断HSCs膜上特异性ET-1受体。

本次研究同样发现奥曲肽能够即刻降低HSCs内Ca²⁺浓度, 5.0, 10.0 mg/L组分别降低了32.78%, 36.59%。但奥曲肽对HSCs面积及长度影响不大; 预先加入奥曲肽作用一定时间后, 抑制了ET-1对HSCs的收缩作用, 使得HSCs的Ca²⁺浓度、收缩面积、最大长度变化减小。

研究表明, 鼠HSCs活化后表达生长抑素受体(somatostatin receptors, SSTRs)1, 2, 3或2, 3, 5^[11,12]。而人类肝损伤后, HSCs膜上SSTRs亦上调, 来自人硬化肝脏的HSCs膜上1-5型SSTRs均有表达^[13]。并且SST能够通过SSTR1抑制ET-1刺激HSCs的收缩^[11]。奥曲肽对SSTR2, 3, 5均有亲和力^[14,15], 有可能通过HSCs膜上的SSTRs降低HSCs内Ca²⁺浓度, 从而抑制ET-1刺激的HSCs的收缩, 降低肝内阻力及门脉压力。

总之, 本次研究证实奥曲肽能够抑制ET-1引起的HSCs收缩作用, 这将为奥曲肽的临床应用提供新的理论依据。

4 参考文献

- 1 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, Geerts A. Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. *Gut* 2002; 50: 571-581
- 2 Bataller R, Nicolas JM, Gines P, Esteve A, Nieves Gorbic M, Garcia-Ramallo E, Pinzani M, Ros J, Jimenez W, Thomas AP, Arroyo V, Rodes J. Arginine vasopressin induces contraction and stimulates growth of cultured human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1997; 113: 615-624
- 3 Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Failli P, Ruocco C, Gentilini P. Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 1996; 110: 534-548
- 4 Bataller R, Gasull X, Gines P, Hellemans K, Gorbic MN, Nicolas JM, Sancho-Bru P, De Las Heras D, Gual A, Geerts A, Arroyo V, Rodes J. In vitro and in vivo activation of rat hepatic stellate cells results in de novo expression of L-type voltage-operated calcium channels. *Hepatology* 2001; 33: 956-962
- 5 Bataller R, Gines P, Nicolas JM, Gorbic MN, Garcia-Ramallo E, Gasull X, Bosch J, Arroyo V, Rodes J. Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2000; 118: 1149-1156
- 6 Bataller R, Nicolas JM, Ginees P, Gorbic MN, Garcia-Ramallo E, Lario S, Tobias E, Pinzani M, Thomas AP, Arroyo V, Rodes J. Contraction of human hepatic stellate cells activated in culture: a role for voltage-operated calcium channels. *J Hepatol* 1998; 29: 398-408
- 7 Yee HF Jr. Ca²⁺ and rho signaling pathways: two paths to hepatic stellate cell contraction. *Hepatology* 2001; 33: 1007-1008
- 8 Corley DA, Cello JP, Adkisson W, Ko WF, Kerlikowske K. Octreotide for acute esophageal variceal bleeding: a meta-analysis. *Gastroenterology* 2001; 120: 946-954
- 9 Escorsell A, Bandi JC, Andreu V, Moitinho E, Garcia-Pagan JC, Bosch J, Rodes J. Desensitization to the effects of intravenous octreotide in cirrhotic patients with portal hypertension. *Gastroenterology* 2001; 120: 161-169
- 10 Ding HG, Wang BE, Jia JD, Xia HX, Wong CY, Zhao CH, Xu YL. Effects of octreotide on expression of L-type voltage-operated calcium channels and on intracellular Ca²⁺ in activated hepatic stellate cells. *Chin Med J* 2004; 117: 913-916
- 11 Reynaert H, Vaeyens F, Qin H, Hellemans K, Chatterjee N, Winand D, Quartier E, Schuit F, Urbain D, Kumar U, Patel YC, Geerts A. Somatostatin suppresses endothelin-1-induced rat hepatic stellate cell contraction via somatostatin receptor subtype 1. *Gastroenterology* 2001; 121: 915-930
- 12 Song SH, Leng XS, Li T, Qin ZZ, Peng JR, Zhao L, Wei YH, Yu X. Expression of subtypes of somatostatin receptors in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1663-1665
- 13 Reynaert H, Rombouts K, Vandermonde A, Urbain D, Kumar U, Bioulac-Sage P, Pinzani M, Rosenbaum J, Geerts A. Expression of somatostatin receptors in normal and cirrhotic human liver and in hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004; 53: 1180-1189
- 14 Pawlikowski M, Melen-Mucha G. Perspectives of new potential therapeutic applications of somatostatin analogs. *Neuro Endocrinol Lett* 2003; 24: 21-27
- 15 Hofland LJ, Lamberts SW. Somatostatin receptors and disease: role of receptor subtypes. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1996; 10: 163-176

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

大肠癌中 IGF-2 蛋白的表达及相关性研究

段琼红, 吕美霞, 卢祖洵, 聂绍发

段琼红, 吕美霞, 聂绍发, 华中科技大学同济医学院流行病与卫生统计学系 湖北省武汉市 430030
卢祖洵, 华中科技大学同济医学院社会医学系 湖北省武汉市 430030
国家自然科学基金资助项目, No.30371239
通讯作者: 聂绍发, 430030, 武汉市航空路13号, 华中科技大学同济医学院流行病与卫生统计学系. sf_nie@mails.tjmu.edu.cn
电话: 027-83693763
收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-31

Expression and significance of insulin-like growth factor 2 protein in colorectal cancer

Qiong-Hong Duan, Mei-Xia Lv, Zu-Xun Lu, Shao-Fa Nie

Qiong-Hong Duan, Mei-Xia Lv, Shao-Fa Nie, Department of Epidemiology and Health Statistics, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Zu-Xun Lu, Department of Community Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30371239

Correspondence to: Professor Shao-Fa Nie, Department of Epidemiology and Health Statistics, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, 13 Hangkong Road, Wuhan 430030, Hubei Province, China. sf_nie@mails.tjmu.edu.cn
Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-10-31

Abstract

AIM: To explore the correlation of the expression of insulin-like growth factor 2 (IGF-2), Survivin, and c-Myc protein in colorectal cancer, and to clarify the role of IGF-2 in the occurrence and progression of colorectal cancer.

METHODS: The single and associated expression of IGF-2, Survivin, and c-Myc protein was detected by immunohistochemical SP method in the tissues of colorectal cancer and the marge of the excision part of the tumor.

RESULTS: The positive rate of IGF-2 was 27.3% in the cancer tissue, and 5.0% in the marge tissue. There was significant difference between them ($P < 0.05$). The positive expression of IGF-2 was significantly related with Duke's staging (A-B: 16.67% vs C-D: 83.32%), lymph metastasis

(without metastasis: 16.67% vs with metastasis: 83.33%) of colorectal cancer ($P < 0.01$), while it was not related with the following factors: the age and gender of the patients, degree of tumor differentiation, and size and location of the tumor. The expression of c-Myc and Survivin was not correlated with the expression of IGF-2 ($P > 0.05$).

CONCLUSION: The over-expression of IGF-2 promotes the carcinogenesis, progression, infiltration, and metastasis of the colorectal cancer, and it can be used as a marker in the prognosis of the colorectal cancer.

Key Words: Colorectal tumor; Insulin-like growth factor 2; c-Myc protein; Survivin; Immunohistochemistry

Duan QH, Lv MX, Lu ZX, Nie SF. Expression and significance of insulin-like growth factor 2 protein in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):83-86

摘要

目的: 观察结肠直肠癌中IGF-2、Survivin、c-Myc蛋白的表达情况, 探讨IGF-2、Survivin、c-Myc蛋白表达的相关性, 阐明IGF-2在大肠癌发生、发展中的作用。

方法: 应用免疫组化SP法分别检测大肠癌及其癌瘤手术切除的切缘组织中IGF-2、Survivin、c-Myc蛋白的单一及联合表达情况。

结果: IGF-2在大肠癌组织中的表达阳性率为27.3%, 在切缘组织中的表达阳性率为5.0%, 两者相比有显著性差异($P < 0.05$)。IGF-2表达阳性与Dukes分期(AB: 16.67% vs CD 83.32%)、淋巴转移(无16.67% vs 有83.33%)有关($P < 0.01$), 与患者年龄、性别、肿瘤分化程度、肿瘤大小、部位无明显相关性($P > 0.05$); Survivin、c-Myc表达阳性与IGF-2表达无明显相关($P > 0.05$)。

结论: IGF-2可成为预后判断的指标; IGF-2的过表达促进了结肠直肠癌的发生、发展、浸润和转移。

背景资料

IGF-2是一种非常强的有丝分裂原, 可促进多种细胞的增殖, 抑制细胞凋亡, 生存蛋白(Survivin)是凋亡抑制蛋白, 是具有抑制细胞凋亡和调节细胞分裂的双功能蛋白。c-Myc基因具有诱导增殖和细胞程序死亡的双相作用。研究发现, IGF-2, Survivin及c-Myc在多种肿瘤组织中存在过量表达, 与肿瘤的发生、发展有密切关系, 但缺乏关于三者关系的研究。

■创新盘点
首次研究了IGF-2、Survivin, c-Myc三者表达的相关性。

关键词: 大肠肿瘤; 胰岛素样生长因子-2; c-Myc; Survivin; 免疫组织化学

段琼红, 吕美霞, 卢祖洵, 聂绍发. 大肠癌中IGF-2蛋白的表达及相关性研究. 世界华人消化杂志 2006;14(1):83-86
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/83.asp>

0 引言

胰岛素样生长因子-2(insulin-like growth factor 2, IGF-2)是一种非常强的有丝分裂原,可促进多种细胞的增殖,抑制细胞凋亡^[1],生存蛋白(Survivin)是凋亡抑制蛋白(inhibition apoptosis protein, IAP)家族的新成员,是具有抑制细胞凋亡和调节细胞分裂的双功能蛋白^[2]. c-Myc基因具有诱导增殖和细胞程序死亡的双相作用^[3]. 研究发现,他们在多种肿瘤组织中存在过量表达,与肿瘤的发生、发展有密切关系^[4-6]. 我们通过观察结肠直肠癌中IGF-2蛋白、Survivin蛋白、c-Myc蛋白的表达情况,探寻IGF-2、Survivin、c-Myc三者表达的相关性,探讨IGF-2基因表达在大肠癌发生、发展过程中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 收集44例大肠癌组织和20例大肠癌手术切除的癌缘5 cm以上的切缘组织,分别来自武汉市一所综合性医院及一所肿瘤专科医院. 全部标本经福尔马林固定,石蜡包埋,常规连续切片,厚度4 μm,分别做HE及免疫组化染色. 包括男24例,女20例,平均年龄53.9岁. 结肠癌16例,直肠癌28例. 经病理诊断,组织学类型分为:腺癌38例(其中高分化腺癌11例,中分化腺癌17例,低分化腺癌10例),黏液腺癌4例,印戒细胞癌2例. 对肿瘤病理组织做出细胞学分级的诊断(Dukes分期)为A期5例; B期18例; C期17例; D期4例. 所有患者术前均未做放疗、化疗及免疫治疗. c-Myc鼠抗人单克隆抗体、Survivin兔抗人多克隆抗体、SP试剂盒购自北京中杉生物技术有限公司, IGF-2兔抗人多克隆抗体购自武汉博士德生物工程公司.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 免疫组化采用SP法. IGF-2、c-Myc和Survivin一抗浓度分别为1:150, 1:100, 1:100. 均采用微波抗原修复.

1.2.2 结果判断及半定量方法 每例每个指标取5个高倍视野(×400),通过HMIAS-2000型病理图文分析系统(同济千屏影像工程公司出品)处理,计数其肿瘤平均阳性细胞率. c-Myc阳性判

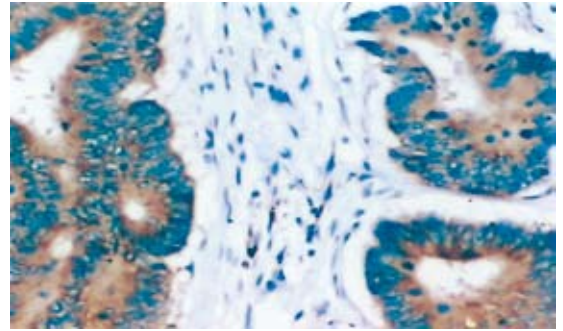


图1 IGF-2阳性物质在直肠、高分化腺癌组织中的表达与分布(SP×400).

断标准: 阳性细胞率<10%者或背景同阳性对照者为阴性标本,标本阳性细胞呈黄色或棕色,并且阳性细胞率≥10%为阳性标本^[7]. IGF-2阳性判断标准: 参考Peters *et al*^[5]的标准,取IGF-2阳性细胞率<5%者为阴性标本,≥5%为阳性标本. Survivin阳性判断标准: 参考Kawasaki *et al*^[8]报道的方法: 计数5个高倍视野,将平均阳性细胞率分为5类: 0, <5%; 1, 5%-25%; 2, 25%-50%; 3, 50%-75%; 4, >75%. 根据染色程度将阳性信号分为3类: 染色强度弱, 1分; 中等染色强度, 2分; 染色强度高, 3分; 染色强度×阳性细胞百分数为每个病例染色的综合记分,综合计分<1为表达阴性,反之判定为阳性.

统计学处理 阳性率差异比较用 χ^2 检验,相关分析采用kendall等级相关. $P<0.05$ 为显著差异, $P<0.01$ 为非常显著差异, $P>0.05$ 为无差异. 全部统计分析用SAS 8.10软件包完成.

2 结果

2.1 大肠癌组织及切缘组织中IGF-2表达及与临床病理的关系 镜下IGF-2主要定位于大肠癌细胞胞质,为棕黄色颗粒,呈异质性染色,少数细胞染色较强(图1). 作为对照,20例切缘组织阳性率为5.0%(1/20). 表1总结了44例大肠癌组织的IGF-2表达及其与临床病理的关系,结果显示44例大肠癌患者中IGF-2阳性表达12例,阳性率27.3%,与切缘组织相比,其差异具有显著性($P<0.05$). IGF-2表达与患者年龄、性别、肿瘤分化程度、肿瘤大小、部位无明显相关性($P>0.05$),与Dukes分期、淋巴转移显著相关($P<0.05$).

2.2 c-Myc的表达及其与IGF-2的关系 镜下c-Myc主要定位于大肠癌细胞胞核,为棕黄色颗粒,在癌组织中,c-Myc阳性细胞以弥漫性分布为主,少数也可为局灶性分布(图2). 免疫组织化学所

表 1 IGF-2、c-Myc表达与临床病理的关系

因素	<i>n</i>	IGF-2			c-Myc			
		- (%)	+ (%)	<i>P</i>	- (%)	+ (%)	<i>P</i>	
年龄	<60	35	26 (81.25)	9 (75.00)	0.647 1	18 (85.71)	17 (73.91)	0.332 4
	≥60	9	6 (18.75)	3 (25.00)		3 (14.29)	6 (26.09)	
性别	男	24	16 (50.00)	8 (66.67)	0.322 7	11 (52.38)	13 (56.52)	0.782 9
	女	20	16 (50.00)	4 (33.33)		10 (47.62)	10 (43.48)	
大小	≤3 cm	14	9 (28.13)	5 (41.67)	0.390 4	6 (28.57)	8 (34.78)	0.658 6
	>3 cm	30	23 (71.88)	7 (58.33)		15 (71.43)	15 (65.22)	
部位	直肠	28	19 (59.38)	9 (75.00)	0.337 3	12 (57.14)	16 (69.57)	0.392 2
	结肠	16	13 (40.63)	3 (25.00)		9 (42.86)	7 (30.43)	
分化程度	高	28	20 (62.50)	8 (66.67)	0.798 0	19 (90.48)	9 (39.13)	0.000 4
	低	16	12 (37.50)	4 (33.33)		2 (9.52)	14 (60.87)	
Dukes分期	AB	23	21 (65.63)	2 (16.67)	0.003 8	13 (61.90)	10 (43.48)	0.221 6
	CD	21	11 (34.38)	10 (83.32)		8 (38.10)	13 (56.52)	
淋巴转移	无	24	22 (68.75)	2 (16.67)	0.002 0	13 (61.90)	11 (47.83)	0.348 9
	有	20	10 (31.25)	10 (83.33)		8 (38.10)	12 (52.17)	

■研究前沿

环境因素通过体内IGF系统促进大肠癌的发生是大肠癌发病机制的新假说, IGF系统主要由IGF-1、IGF-2和IGFBP-3组成. IGF系统在大肠癌的发生、发展中的作用是目前的研究热点.

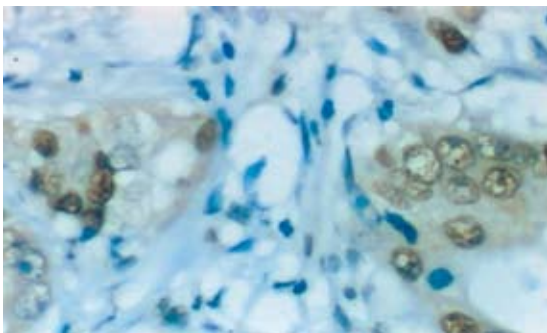


图 2 c-Myc阳性物质在直肠、低分化腺癌组织中的表达与分布 (SP × 400).

有空白对照及替代对照均为阴性. c-Myc在大肠癌组织中的阳性率为52.3%(23/44).

c-Myc表达与患者年龄、性别、肿瘤大小、部位、Dukes分期、淋巴转移无明显相关性($P>0.05$), 与肿瘤分化程度明显相关(表1). c-Myc表达阳性与IGF-2表达阳性无明显相关($P>0.05$)(表2).

2.3 Survivin的表达及其与IGF-2的关系 镜下Survivin主要定位于大肠癌细胞胞质, 为棕黄色颗粒, 呈异质性染色, 少数细胞染色较强. Survivin在大肠癌组织中的阳性率为63.6%. Survivin表达阳性与IGF-2表达阳性无明显相关($P>0.05$)(表2).

3 讨论

3.1 IGF-2, Survivin, c-Myc在结肠直肠癌中的作用 大肠癌为常见的恶性肿瘤之一. 在一些经济发达的欧美国家发病率甚高, 在亚非等发展中

表 2 c-Myc的表达及其与IGF-2的关系

		IGF-2		<i>r</i>	<i>P</i>
		+	-		
c-Myc	+	7	16	0.074 3	0.626 1
	-	5	16		
Survivin	+	9	19	0.144 7	0.342 8
	-	3	13		

国家的发病率相对较低. 大肠癌在我国恶性肿瘤中发病率占4-6位, 20世纪70年代以来, 我国某些地区, 尤其是大城市, 大肠癌的发病和死亡率有明显升高的趋势^[9].

流行病学和实验室研究证明, IGF(insulin like growth factor)系统在大肠癌的发生发展中起重要作用^[10-12]. IGF通过结合IGF-1或者IGF-2激活胞内一系列信号通道, 而作用于肿瘤细胞的生长和增殖. IGF-2基因位于第11号染色体短臂上, 其编码产生的IGF-2蛋白是一种分子量为7.5 ku的单链弱酸性多肽. 作为一种促生长因子, IGF-2在体内、体外都有很强的促进细胞分裂增殖的能力^[1]. 研究发现, 在人胎儿期IGF-2的含量远比成年期高, 且出生后IGF-2的表达仅局限于少数组织(如肝脏, 神经组织等)^[13], 这说明了IGF-2对组织、细胞的生长发育起着重要的调节作用.

Survivin是凋亡抑制蛋白家族的新成员, 结构独特, 仅含有一个杆状病毒凋亡抑制蛋白重复序列分子, 作用于各种凋亡通路末端效应分子, 是迄今发现的最强的凋亡抑制因子之一^[14].

■应用要点
IGF-2可成为预后
判断的指标。

c-Myc癌基因是原癌基因之一, 定位于人染色体8q²⁴, 主要产物是分子量为62 ku的磷蛋白, 简称P62^{c-Myc}[15,16]。该基因与细胞生长有关。

许多研究表明, 在多种肿瘤组织中均发现IGF-2, Survivin, c-Myc的表达异常增多。但他们在结肠直肠癌中表达情况及相关性尚不明确, 为此, 我们就他们在结肠直肠癌的表达做一分析。

3.2 IGF-2, Survivin, c-Myc在结肠直肠癌中的表达 IGF-2, Survivin, c-Myc蛋白的表达普遍存在于结肠直肠癌细胞中, 其阳性细胞率均显著高于切缘组织, 这说明IGF-2, Survivin, c-Myc的过表达在肿瘤中起着重要的作用。许多文献报道证实了这一点[6,14,17]。我们将他们与大肠癌临床病理特征相比较, 发现IGF-2与患者的年龄、肿瘤的部位、大小及分化程度均无关, 而与Dukes分期、淋巴转移有关, c-Myc表达只与肿瘤分化程度明显相关, Survivin表达只与患者的性别明显相关。三者的表达之间有无关联呢? 我们研究结果表明IGF-2与c-Myc、Survivin呈正相关, 但无统计学意义。这说明IGF-2蛋白过表达是大肠癌发生中的一种独立事件。

因此我们认为IGF-2的过表达促进了结肠直肠癌的发展、浸润和转移, IGF-2可成为预后判断的指标。

4 参考文献

- 1 Mohan S, Jennings JC, Linkhart TA, Baylink DJ. Isolation and purification of a low-molecular-weight skeletal growth factor from human bones. *Biochim Biophys Acta* 1986; 884: 234-242
- 2 LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG, MacKenzie AE. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 1998; 17: 3247-3259
- 3 Watson PH, Pon RT, Shiu RP. Inhibition of c-myc expression by phosphorothioate antisense oligonucleotide identifies a critical role for c-myc in the growth of human breast cancer. *Cancer Res* 1991;

- 51: 3996-4000
- 4 Xu AG, Li SG, Liu JH, Gan AH. Function of apoptosis and expression of the proteins Bcl-2, p53 and C-myc in the development of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2001; 7: 403-406
- 5 Peters G, Gongoll S, Langner C, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Ruschoff J, Kreipe H, von Wasielewski R. IGF-1R, IGF-1 and IGF-2 expression as potential prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Virchows Arch* 2003; 443: 139-145
- 6 Chen WC, Liu Q, Fu JX, Kang SY. Expression of survivin and its significance in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2886-2889
- 7 乔庆, 蔡力铭. 大肠腺癌组织Bcl-2和c-myc的表达意义. *第四军医大学学报* 2002; 23: 1955-1957
- 8 Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5071-5074
- 9 段琼红, 段纪俊, 杨念念. 2003-2011年武汉市大肠癌死亡趋势预测. *中国公共卫生* 2005; 21: 147-148
- 10 Werner H, LeRoith D. The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996; 68: 183-223
- 11 Duan QH, Wang ZG, Zhu GB, Lu ZX, Shi LY, Nie SF. Study on the relations between serum insulin-like growth factor-1, insulin-like growth factor binding protein-3 and colorectal cancer: a meta-analysis. *Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* 2005; 26: 132-134
- 12 Bustin SA, Jenkins PJ. The growth hormone-insulin-like growth factor-I axis and colorectal cancer. *Trends Mol Med* 2001; 7: 447-454
- 13 Berger A. Insulin-like growth factor and cognitive function. *BMJ* 2001; 322: 203
- 14 Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet* 2003; 362: 205-209
- 15 Neel BG, Jhanwar SC, Chaganti RS, Hayward WS. Two human c-onc genes are located on the long arm of chromosome 8. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 7842-7846
- 16 Ramsay G, Evan GI, Bishop JM. The protein encoded by the human proto-oncogene c-myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7742-7746
- 17 Kozma L, Kiss I, Szakall S, Ember I. Investigation of c-myc oncogene amplification in colorectal cancer. *Cancer Lett* 1994; 81: 165-169

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

肝门阻断对大鼠肠道肌间神经丛内 NOS 阳性神经元的影响

张军明, 任艳华, 刘芬, 雷亚宁, 张婵, 钱旭

张军明, 任艳华, 刘芬, 雷亚宁, 张婵, 钱旭, 温州医学院组织胚胎学教研室 浙江省温州市 325035
温州医学院科技发展基金资助项目, No. XNK04038
通讯作者: 张军明, 325035, 浙江省温州市, 温州医学院组织胚胎学教研室. wmczjm@wzmc.net
电话: 0577-86689967
收稿日期: 2005-11-15 接受日期: 2005-12-02

Effects of portal triad clamping on nitric oxide synthase positive neurons in myenteric plexus of rat intestinal tract

Jun-Ming Zhang, Yan-Hua Ren, Fen Liu, Ya-Ning Lei, Chan Zhang, Xu Qian

Jun Li, Ya-Juan Zhao, Mei Sun, Department of Pediatrics, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
Jun-Ming Zhang, Yan-Hua Ren, Fen Liu, Ya-Ning Lei, Chan Zhang, Xu Qian, Department of Histology and Embryology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China
Supported by the Technical Development Fund of Wenzhou Medical College, No. XNK04038
Correspondence to: Jun-Ming Zhang, Department of Histology and Embryology, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, Zhejiang Province, China. wmczjm@wzmc.net
Received: 2005-11-15 Accepted: 2005-12-02

Abstract

AIM: To explore the nervous mechanism of intestinal function disorder after portal triad clamping through observing the changes of nitric oxide synthase (NOS) positive neuron expression in myenteric plexus of rat intestinal tract.

METHODS: Sprague Dawley rats were divided into experimental groups (portal triad clamping 20, 40, and 60 min group) and the control group. Then the specimens of intestinal myenteric plexus of small intestines and colons were collected and stained by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) histochemistry.

RESULTS: In comparison with the control group, the numbers of NOS positive neurons of small intestinal (28.89 ± 5.49 , 32.22 ± 7.03 , $36.89 \pm$

8.58 vs 21.78 ± 4.56 , $P < 0.01$) and colonic (34.22 ± 8.82 , 39.39 ± 8.91 , 44.61 ± 9.94 vs 25.94 ± 5.59 , $P < 0.01$) myenteric plexus were significantly increased in the experimental groups, and the soma of NOS positive neurons were big and deeply stained. In the experimental groups, as compared with those in the 20 min group, the numbers of NOS positive neurons were significantly increased in the 60 min group (small intestine: 36.89 ± 8.58 vs 28.89 ± 5.49 ; colon: 44.61 ± 9.94 vs 34.22 ± 8.82 , $P < 0.05$), and the soma of NOS positive neurons were bigger and more deeply stained in the 60 min group than that in the 40 min group, but the nerve fibers between ganglions were fewer in 60 min and 40 min group.

CONCLUSION: Intestinal motor dysfunction resulting from portal triad clamping is related to the nervous damage of enteric nervous system.

Key Words: Portal triad clamping; Myenteric plexus; Nitric oxide synthase; Enteric nervous system; Rats

Zhang JM, Ren YH, Liu F, Lei YN, Zhang C, Qian X. Effects of portal triad clamping on nitric oxide synthase positive neurons in myenteric plexus of rat intestinal tract. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):87-91

摘要

目的: 研究肝门阻断后大鼠肠道肌间神经丛内一氧化氮合酶(NOS)神经元表达的变化, 以探讨肝门阻断对肠道功能影响的神经机制。

方法: SD大鼠分成实验组(根据阻断时间分为肝门阻断20 min组、40 min组及60 min组)和对照组, 取各组相同部位的小肠和结肠, 制作肠肌间神经丛标本行NADPH-d组化染色, 观察和比较各组NOS阳性神经元的分布密度和染色情况。

结果: 与对照组比较, 实验组小肠(28.89 ± 5.49 , 32.22 ± 7.03 , 36.89 ± 8.58 vs 21.78 ± 4.56 , $P < 0.01$)和结肠(34.22 ± 8.82 , 39.39 ± 8.91 , 44.61 ± 9.94 vs 25.94 ± 5.59 , $P < 0.01$)的肠肌间神经丛内NOS阳性神经元数量增多, 胞体大而

■背景资料

胃肠运动功能是消化道最重要的功能之一, 其调节机制非常复杂, 其中肠神经系统(ENS)起主要作用, 是消化管壁内的“微型脑”, ENS的NOS神经元释放的NO是胃肠道最主要的抑制性神经递质, 在胃肠功能方面起重要的调节作用。肝门阻断后可使肝脏及全身其他脏器产生一系列病理生理改变, 目前较多的研究多集中在肝门阻断后对肝脏的损伤, 而由于缺血再灌注损伤和血液动力学障碍所造成的肝外器官损伤的研究相对较少, 尤其是有关ENS的影响未见报道。因此探讨肝门阻断后NO神经的改变有非常积极的意义。

■ 创新盘点

本研究表明: 肝门阻断会造成ENS的NOS神经元的功能异常、及NO释放途径的障碍, 影响了术后肠道运动功能和内脏感觉功能的及时恢复, 导致相关并发症的发生, 这可能是肝脏外科手术后导致肠道功能障碍的神经机制。因此, 研究肝门阻断导致肠神经系统功能异常的机理, 可以提高对肝外科手术后肠道运动功能障碍的认识, 以便采取有效的方法来预防其发生和改善其症状。

染色深; 实验组之间比较, 肝门阻断60 min组的NOS阳性神经元数量多于肝门阻断20 min组(小肠: 36.89 ± 8.58 vs 28.89 ± 5.49 ; 结肠: 44.61 ± 9.94 vs 34.22 ± 8.82 , $P < 0.05$), 肝门阻断60 min组和40 min组的NOS阳性神经元胞体较大, 染色较深, 但节间束NOS阳性神经纤维稀少。

结论: 肝门阻断会影响或损伤肠神经系统的NO能神经, 这可能是术后肠道运动功能障碍发生的神经机制。

关键词: 肝门阻断; 肠肌间神经丛; 一氧化氮合酶; 肠神经系统; 大鼠

张军明, 任艳华, 刘芬, 雷亚宁, 张婵, 钱旭. 肝门阻断对大鼠肠道肌间神经丛内NOS阳性神经元的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14(1): 87-91

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/87.asp>

0 引言

大量研究表明, 一氧化氮合酶(NOS)广泛分布于胃肠道, 其产物一氧化氮(NO)是一种神经递质和信使分子, 具有多重生理功能, 在神经传导、胃肠保护、内分泌调节和宿主防御机制中起重要作用, 广泛参与胃肠生理功能^[1,2]. NO是以左旋精氨酸为底物, 由NOS催化生成, 还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸黄递酶(NADPH-d)组织化学方法是一种简单易行的显示NOS神经的有效方法^[3,4]. 肝门阻断是肝脏外科手术中常用的有效止血方法, 肝门阻断后可使肝脏及全身各脏器产生一系列病理生理改变, 在以往的研究中, 多集中在肝门阻断后对肝脏的损伤, 而由于缺血再灌注损伤和血液动力学障碍所造成的肝外多器官损伤的研究相对较少^[5-8], 尤其是有关肠神经系统(enteric nervous system, ENS)的影响未见报道. 我们应用NADPH-d组织化学技术, 观察肝门阻断后大鼠肠道肌间神经丛内NOS的变化, 来探讨肝脏外科手术后肠道运动功能障碍形成的神经机制。

1 材料和方法

1.1 材料 δ SD大鼠(温州医学院实验动物中心提供, 清洁级)24只, 质量165-202 g. 将大鼠随机分为对照组($n = 6$)和实验组($n = 18$), 实验前禁食16 h, 自由饮水. 实验组大鼠10 g/L水合氯醛(0.2 mL/100 g)腹腔注射麻醉后, 固定四肢, 无菌条件下取腹部正中切口约2 cm, 钝性分离肝门

十二指肠韧带, 用微型血管钳夹闭门静脉, 切口用无菌37℃湿润生理盐水纱布覆盖, 根据阻断时间分为肝门阻断20 min组、肝门阻断40 min组、肝门阻断60 min组, 每组6只; 正常对照组只游离肝门十二指肠韧带, 不阻断肝门。

1.2 方法

1.2.1 取材与制片 各组大鼠手术后, 按37℃ 9 g/L氯化钠溶液、4℃含10 g/L氯化钙的40 g/L甲醛液顺序心脏灌流固定, 迅速剖腹取距幽门约2 cm的一段长约3 cm的小肠(代表上消化道)和距回盲部2 cm的一段长约3 cm的结肠(代表下消化道), 用生理盐水冲去肠内容物, 用丝线结扎肠管两端, 肠腔内注入10 g/L氯化钙的40 g/L甲醛液使之稍扩张, 再置于该液4℃中固定约10 h后取出, 用0.01 mol/L PBS(pH7.4)冲洗, 切取标本的近端段肠管长约1 cm, 将一粗细合适的玻璃棒插入肠管, 然后用眼科镊子在肠系膜附着处沿肠管纵轴划痕, 用镊尖沿划痕轻轻剥离纵肌层(神经丛附着其上), 制成肌间神经丛铺片标本, 保存于0.01 mol/L PBS中待染; 标本的远端段做常规HE染色的切片。

1.2.2 NOS组织化学染色 NADPH-黄递酶(NADPH-diaphorase, NDP)组化染色^[9]基本过程如下: 将已经制作好的各组肠外纵肌全层铺片标本用0.01 mol/L PBS(pH7.4)漂洗3次后, 移入由0.1 mol/L PB(pH8.0)配制的新鲜孵育液中, 内含1 g/L β -NADPH(购自Sigma公司)、0.2 g/L氯化硝基四氮唑蓝(NBT)、3 g/L TritonX-100, 37℃孵育45 min, 0.01 mol/L PBS(pH7.4)洗3次, 贴片、铺平、牵拉率小于1:1.1, 晾干后逐级酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片. 设对照实验, 孵育液中不加入 β -NADPH。

1.2.3 结果观察 Olympus光学显微镜下观察: 肝门阻断后肠壁的组织学改变, 各组NOS阳性神经的染色强弱, 同时也计数每组标本18个200倍视野内NOS阳性神经元的数量, 以比较各组NOS阳性神经元的分布密度。

统计学处理 数据以mean \pm SD表示, 多组间比较采用完全随机设计方差分析, 进一步采用均数间两两比较的LSD法. SPSS10.0统计软件包计算机处理。

2 结果

2.1 各组肠道颜色和组化改变 实验组在肝门阻断前肠道颜色红润, 血流阻断后逐渐从红润变为紫红色, 并随阻断时间的延长, 颜色加深. HE

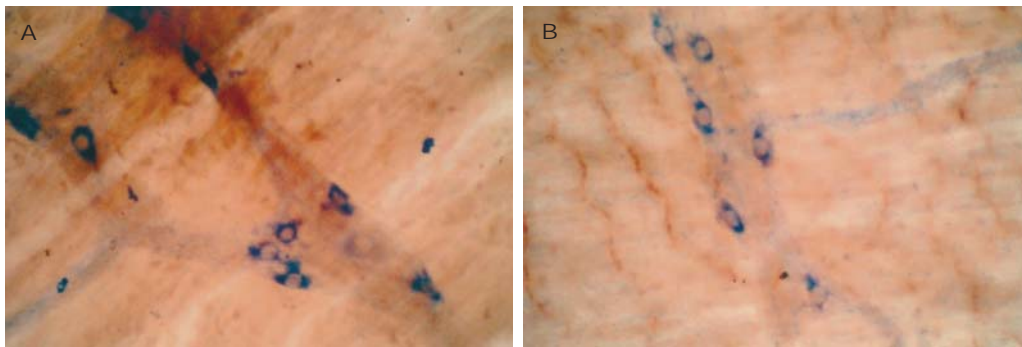


图1 正常对照组小肠肌间神经丛NOS的表达($\times 400$). A: 小肠肌间神经丛; B: 结肠肌间神经丛.

同行评价

本文探讨了肝门阻断在肠道运动功能障碍中的作用, 提出NOS水平的变化在肠道运动中起作用. 该研究对阐明肝外科手术中操作导致的术后胃肠运动功能障碍机制有参考价值.

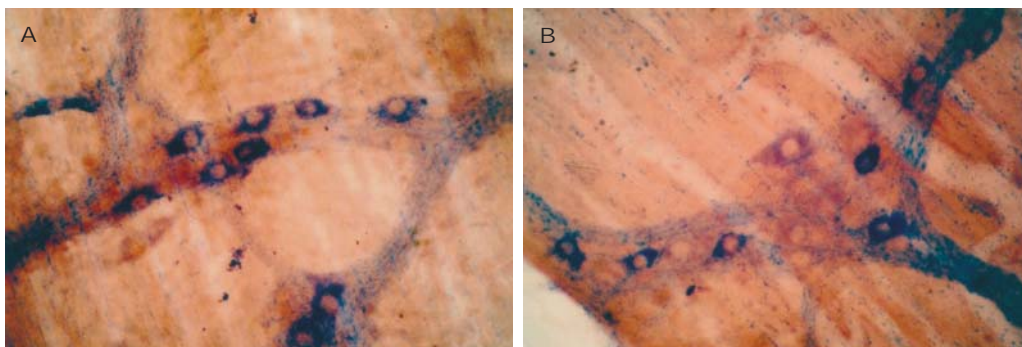


图2 肝门阻断20 min组NOS的表达($\times 400$). A: 小肠肌间神经丛; B: 结肠肌间神经丛.

染色的切片观察表明, 对照组为正常肠道管壁结构, 实验组肠壁各层有比较明显的淤血、出血, 小肠绒毛固有层水肿, 黏膜上皮有脱落坏死, 并随阻断时间的延长而加重.

2.2 各组大鼠的小肠和结肠的肌间神经丛NOS的染色情况 NADPH-d染色的阳性产物为蓝色沉淀, 阳性神经元胞质蓝色, 胞核不着色, 对照实验结果为阴性. 肌间神经丛由神经节、节间束及神经纤维纵横交织组成, 染色呈蓝色, 神经节多为星形、长带形或不规则形, 大小不等, 一般与纵肌相垂直, 呈网格状排列, NOS阳性神经元的胞体大小不等, 形态多样, 有卵圆形、梭形或不规则形. 正常对照组的小肠和结肠, 其壁内NOS阳性神经元体积较小, 节间束的NOS阳性神经纤维纤细而较清晰(图1A-B); 实验组中, 肝门阻断20 min组, 大鼠的肠肌间神经丛内NOS阳性神经元的胞体大而染色深, 节间束的NOS阳性神经纤维粗大而明显(图2A-B), 肝门阻断40 min组和60 min组的NOS阳性神经元的胞体较大, 染色较深, 但节间束NOS阳性神经纤维稀少, 使节间束变稀疏而不明显(图3A-B, 图4A-B).

2.3 各组大鼠的小肠和结肠肠壁内NOS阳性神经元分布密度 各实验组与对照组比较, 大鼠小肠和结肠壁内NOS神经元数量增多($P < 0.01$), 差异

表1 各组小肠和结肠的肠壁内NOS阳性神经元的分布密度(mean \pm SD)

组别	小肠 (个/200倍视野)	结肠 (个/200倍视野)
正常对照组	21.78 \pm 4.56	25.94 \pm 5.59
肝门阻断 20 min	28.89 \pm 5.49 ^b	34.22 \pm 8.82 ^b
肝门阻断 40 min	32.22 \pm 7.03 ^b	39.39 \pm 8.91 ^b
肝门阻断 60 min	36.89 \pm 8.58 ^{ab}	44.61 \pm 9.94 ^{ab}
F值	16.217	15.875

^a $P < 0.05$ vs 肝门阻断20 min组; ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

有统计学意义(表1); 各实验组比较, 随阻断时间延长, NOS阳性神经元数量呈增多趋势, 其中肝门阻断60 min组比肝门阻断20 min组增加明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$)(表1).

3 讨论

胃肠运动功能是消化道最重要的功能之一, 其调节机制非常复杂, 包括中枢神经系统的作用、肠神经系统的作用以及众多神经递质及神经调节物的调节, 其中ENS起主要作用. ENS的神经元相互连接形成独立的具有与脑和脊髓类似的整合和处理信息功能机制的神经系统, 自然选择在消化道进化形成了一个壁内的“微型脑”以就近控制和调节分布于数米长的胃肠道

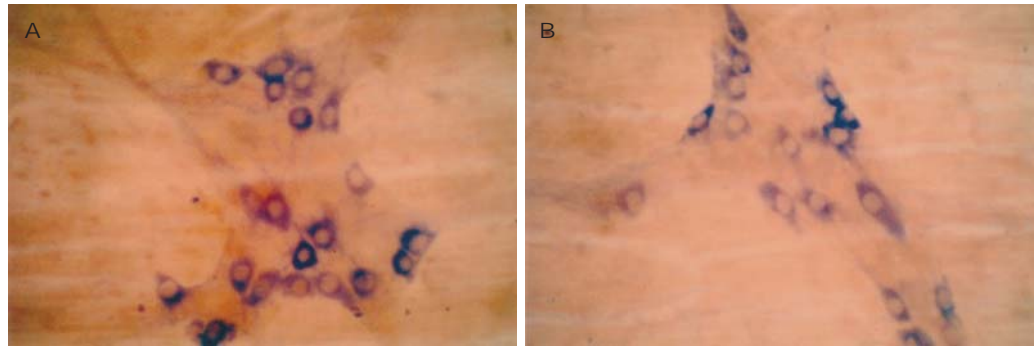


图3 肝门阻断40 min组NOS的表达($\times 400$)。A: 小肠肌间神经丛; B: 结肠肌间神经丛。

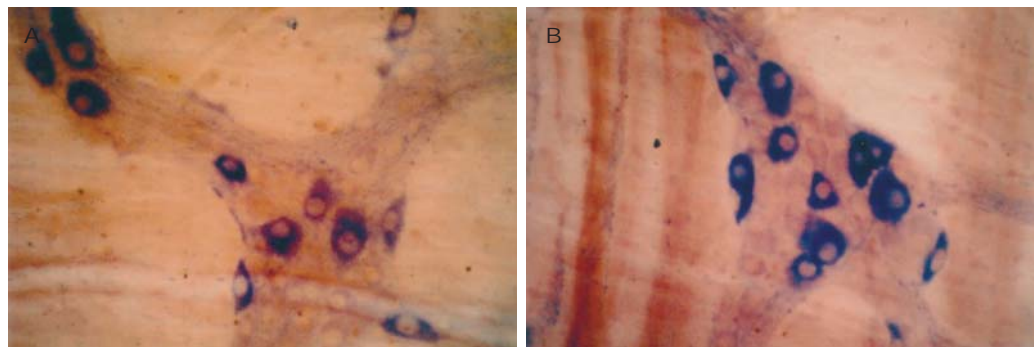


图4 肝门阻断60 min组NOS的表达($\times 400$)。A: 小肠肌间神经丛; B: 结肠肌间神经丛。

中的效应系统, 而不是将这些神经控制都交给中枢, ENS中的NOS神经元释放的NO是胃肠道最主要的抑制性神经递质, 能引起胃肠道平滑肌松弛, 参与调节胃肠运动功能和内脏感觉^[2,10,11]。研究表明, 肠动力疾病的肠壁内NOS神经的表达异常^[3,12], 能促进或改善肠道氮能神经功能的方法可以改善胃肠动力障碍的状况^[13,14], 胃壁肌间神经丛内NOS增多或过少均可导致明显的胃电节律失常^[15]。

肝门阻断可以减少肝脏外科手术中的出血, 但同时也会造成肝脏缺血和门静脉回流受阻所导致的内脏器官淤血, 肝门阻断对小肠的影响及其造成的肠源性毒物对机体的作用, 可使心、肝、肺、肾等多器官功能发生损害, 引起多器官系功能障碍和衰竭, 直接影响到术后效果及生存率, 由于肠道结构、功能及内容物的特殊性, 其与肝脏外科术后并发症的关系越来越受到重视^[16-18]。本实验的研究结果表明, 肝门阻断后导致的肠道淤血症状明显, 并随阻断时间的延长而逐渐加重, 肠壁的组织学改变与文献[8,18]报道一致。NOS是NO的合成酶, NDP组化染色是目前常用的显示NOS的方法, NOS活性增强则代表NO合成增加, 表明NO释放也增加, NO能神经兴奋性增高。结合本实验的研究结果, 肝门阻断后, 小肠和结肠壁内的NOS阳性神经元数量增多, 胞体增

大, 阳性表达增强, 说明肝门阻断会造成ENS的NOS神经元功能异常, 使肠道最主要的抑制性神经递质NO释放量大大增加, 发挥抑制性的功能增强, 而长时间的肝门阻断会造成NOS阳性神经纤维的数量减少, 提示NO释放途径受影响或损伤。

肝门阻断会造成ENS的NOS阳性神经元功能异常的可能机制是: 肝门阻断导致肠道淤血, 继而造成肠道缺血和缺氧的状态, 激发了ENS的氮能神经细胞大量合成和释放NO, NO能减少或清除氧自由基、抑制脂质过氧化反应, 抑制 Ca^{2+} 超载现象的发生而使黏膜损伤降低, 起一定的肠道保护作用^[1,19], 但持续的肠道淤血引起的缺氧和肠道代谢产物、毒素等的堆积, 尤其是过量的NO的持续释放^[20], 可能影响或损伤了NO能神经细胞的神经纤维, 导致其数量减少。因此, 肝门阻断会造成ENS的NOS神经元的功能异常、及NO释放途径的障碍, 影响了术后肠道运动功能和内脏感觉功能的及时恢复, 导致相关并发症的发生, 这可能是肝脏外科手术术后导致肠道功能障碍的神经机制。

4 参考文献

- 1 彭曦, 汪仕良. 一氧化氮合酶在胃肠道的分布规律及意义. 国外医学生理、病理科学与临床分册 1997; 17:

- 258-261
- 2 陈敏. 肠神经系统神经肽对免疫系统的作用. 国外医学内科学分册 2005; 32: 296-299
 - 3 王晓, 尹朝礼, 胡道松, 茹立强. 肠动力疾病结肠壁内NOS、AChE及SP阳性神经的分布. 中华消化杂志 1997; 17: 195-198
 - 4 吴红金, 林传友, 曹福元, 胡道松, 殷光甫, 茹立强. 大鼠肠道内NOS与AChE、VIP阳性神经元的分布关系研究. 中国组织化学与细胞化学杂志 2000; 9: 187-189
 - 5 Liu DL, Jeppsson B, Hakansson CH, Odselius R. Multiple-system organ damage resulting from prolonged hepatic inflow interruption. *Arch Surg* 1996; 131: 442-447
 - 6 阚彤, 杨甲梅, 童颖. 肝切除术术后急性肺损伤和呼吸窘迫综合征的诊治. 中华肝胆外科杂志 2005; 11: 130-131
 - 7 闫勇, 尹致良, 田伏洲, 李小军, 李广阔. 肝门阻断后细菌移位和门静脉血中内毒素变化的研究. 中国普通外科杂志 2000; 9: 39-41
 - 8 陈笑, 毛羽, 王植平. 常温下肝门阻断对大鼠小肠组织学和微循环的影响. 腹部外科 2003; 16: 55-58
 - 9 Dawson TM, Brecht DS, Fotuhi M, Hwang PM, Snyder SH. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7797-7801
 - 10 Guslandi M. Nitric oxide: an ubiquitous actor in the gastrointestinal tract. *Dig Dis* 1994; 12: 28-36
 - 11 乔伟丽, 闫长栋. 一氧化氮在小肠推进运动中的作用. 徐州医学院学报 2000; 20: 264-266
 - 12 穆标, 王邦茂, 刘之武, 黄乃霞, 刘文天. 一氧化氮能神经调节异常在腹泻型肠易激综合征患者中的作用. 中华消化杂志 2002; 22: 88-91
 - 13 朱金照, 许其增, 张志坚, 乐桥良. 白术对肝硬化大鼠胃动力和氮能神经分布的影响及意义. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1846-1848
 - 14 李瑞午, 李翠红, 郭莹, 葛文津, 夏立营. 针刺对大鼠胃肌间神经丛NO能神经元的影响. 上海针灸杂志 2002; 21: 40-42
 - 15 龙庆林, 王振华. 大鼠氮能神经与胃电节律失常的关系. 第四军医大学学报 2003; 24: 1572-1574
 - 16 刘鹏熙, 吕新生, 韩明. 肝门阻断对肠道影响的实验研究. 湖南医科大学学报 1998; 23: 146-248
 - 17 史洪涛, 桂先勇, 冷恩仁. 内毒素血症大鼠肠道NO、SP变化的实验研究. 中国急救医学 2000; 20: 703-704
 - 18 朱春富, 刘胜利, 徐皓, 黄海, 高毅明. 大鼠小肠淤血再灌注损伤的实验研究. 中国血液流变学杂志 2005; 15: 2000-2004
 - 19 贾长库, 陈玉强, 郑常杰, 张晓波, 王薇. 外源性NO在大鼠小肠缺血再灌注损伤中作用的实验研究. 中国现代普通外科进展 2001; 4: 31-36
 - 20 吴承堂, 黄祥成. 一氧化氮与肠道损伤. 中国普通外科杂志 1999; 8: 470-471

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

·消息·

我国科技论文总数连续三年世界第五

本刊讯 2004年度中国科技论文统计结果于2005-12-06在北京揭晓, 与上一年度相比, 我国科技论文SCI论文数增长15.2%, 论文被引用篇数和次数分别增长4.4%和4.3%。更可喜的是, 在过去十年间, 我国论文被引用数已排在世界第14位, 与上一年同一数据相比, 位次提高了4位。

据介绍, 2004年度《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP)共收录我国作者的论文111 356篇, 比上年增加93 352篇, 增长率为19.3%。我国科技论文占世界论文总数的6.3%, 较上年增加1.2%, 连续3年保持在世界第5位, 前4位国家是美国、日本、英国和德国。根据生物医学专家的建议, 今年在统计中新增加了美国《医学索引》(MEDLINE)检索系统, 该系统是当今较权威的生物医学文献检索系统, 我国大陆75种期刊被收录其中。

2004年度我国国内论文最多的学科仍是临床医学, 基础医学名列第六。国内被引用次数最多的学科也是临床医学, 基础医学名列第五。国际被引用论文篇数, 基础医学与临床医学名列第八和第九。由于综合大学并校, 高校论文产出前20位排名榜中已不见了医学院校, 但在MEDLINE收录的高等院校排名中, 仍可看到医学科技论文对综合大学论文排名的贡献。2004年排在SCI收录论文数第一的医疗机构是北京大学第一医院, 解放军总医院在国内论文被引用次数、国内论文数和国际国内论文总数三个统计项目中, 均名列医疗机构第一。

在同时公布的第四届中国百种杰出学术期刊中, 22种医药卫生类期刊榜上有名。[摘自《健康报(记者张荔子)》]

幽门螺杆菌 VacA 重组蛋白对 SGC7901 胃癌细胞的作用

段秀杰, 邵世和, 闻平, 王文凯

■背景资料

幽门螺杆菌与胃炎、胃溃疡、MALT淋巴瘤和胃癌等上消化道疾病有重要关系, 已被世界卫生组织列为胃癌第一类致癌原。*H. Pylori* 感染呈全球性分布, 其分泌的空泡毒素是 *H. Pylori* 主要致病毒素。空泡毒素基因在大肠杆菌中克隆及表达已成功, 但表达产物对 SGC7901 胃癌细胞的作用及其与 *H. Pylori* 提取空泡毒素活性比较国内未见报道。我们旨在研究表达产物对胃癌细胞的作用, 来探讨该融合蛋白的作用特性。

段秀杰, 闻平, 江苏大学附属医院检验科 江苏省镇江市 212001
邵世和, 江苏大学医学技术学院微生物教研室 江苏省镇江市 212001
王文凯, 北华大学研究生部 吉林省吉林市 132001
江苏省科技厅资助项目, No. BS2004021
江苏大学高级人才资助项目, No. JDG2004008
通讯作者: 邵世和, 212001, 江苏省镇江市, 江苏大学医学技术学院微生物教研室. ljxw1123@163.com
电话: 0511-2165735
收稿日期: 2005-10-22 接受日期: 2005-10-31

Effect of recombinant VacA protein of *Helicobacter pylori* on gastric cancer cell line SGC7901

Xiu-Jie Duan, Shi-He Shao, Ping Wen, Wen-Kai Wang

Xiu-Jie Duan, Ping Wen, Department of Clinical Laboratory, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China
Shi-He Shao, Department of Microbiology, Medical Technology College of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China
Wen-Kai Wang, Department of the Postgraduate, Beihua University, Jilin 132001, Jilin Province, China
Supported by the Project from Department of Science and Technology of Jiangsu Province, No. BS2004021, and the Fund for Senior Talent of Jiangsu University, No. JDG2004008
Correspondence to: Shi-He Shao, Department of Microbiology, Medical Technology College of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. ljxw1123@163.com
Received: 2005-10-22 Accepted: 2005-10-31

Abstract

AIM: To explore the effect of the recombinant protein expressed by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) VacA gene in *E. coli* on the gastric cancer cell line SGC7901.

METHODS: The engineered bacteria pET32a-VacA-E.coli BL21 (DE3) was cultured and analyzed. The isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was used to induce the expression of the recombinant protein. Then the purified protein was added into the gastric cancer cells, and the growth and morphological changes of the cell were observed by the inverted microscope and electron microscope.

RESULTS: The proliferation of the gastric cancer cells was inhibited after the recombinant protein was added. The effect of VacA was reduced or even failed. About 10%-20% SGC cells were lightly vacuolated, and only a few of them were severely vacuolated. The microvilli on the cell surface disappeared, and the volume of some cells was decreased. Apoptosis was induced by the recombinant VacA in some SGC cells.

CONCLUSION: The recombinant protein can inhibit the proliferation of gastric cancer cell, and the vacuolated effect becomes weakened and even fails.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Vacuolate cyto-toxin; Recombinant protein; Gastric cancer cell

Duan XJ, Shao SH, Wen P, Wang WK. Effect of recombinant VacA protein of *Helicobacter pylori* on gastric cancer cell line SGC7901. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):92-95

摘要

目的: 研究幽门螺杆菌空泡毒素(VacA)编码基因在大肠杆菌中的表达产物对SGC7901胃癌细胞的作用。

方法: 常规培养pET32a-vacA-E.coli BL21(DE3)工程菌株, IPTG诱导重组蛋白表达, 产物纯化后作用于胃癌细胞, 倒置显微镜及电镜等检测细胞生长情况。

结果: 重组蛋白作用于胃癌细胞后, 倒置显微镜下观察, 细胞生长受抑制, 其细胞空泡毒作用减弱甚至消失, 电镜下可见10%-20%左右细胞呈现轻度空泡变, 仅少数细胞空泡变明显, 细胞表面微绒毛消失, 少量细胞体积减小, 并出现了早期核着边固缩等凋亡改变。

结论: 重组VacA蛋白对胃癌细胞的生长具有抑制作用, 空泡毒作用减弱。

关键词: 幽门螺杆菌; 空泡毒素; 重组蛋白; 胃癌细胞

段秀杰, 邵世和, 闻平, 王文凯. 幽门螺杆菌VacA重组蛋

白对SGC7901胃癌细胞的作用. 世界华人消化杂志
2006;14(1):92-95
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/92.asp>

0 引言

幽门螺杆菌是上消化道疾病的主要致病菌, 它的感染不但与胃炎、胃溃疡及非溃疡性消化不良有关, 而且与MALT淋巴瘤和胃癌也有重要关系^[1-4], 已被世界卫生组织列为胃癌等肿瘤发生的相关致病菌^[5]. *H Pylori*人群感染率在50%以上, 感染呈全球性分布, 其分泌的空泡毒素(VacA)在*H Pylori*致病过程中起重要作用, 因其能使细胞发生空泡变性而得名. 空泡毒素基因在大肠杆菌中克隆及表达已获成功, 但表达产物对SGC7901胃癌细胞的作用国内未见报道. 我们旨在研究表达产物对胃癌细胞的作用, 来探讨该融合蛋白的作用特性.

1 材料和方法

1.1 材料 pET32a-vacA-*E.coli* BL21(DE3) 工程菌株由浙江大学微生物教研室严杰教授惠赠; SGC7901胃癌细胞购自吉林省肿瘤研究所; *H Pylori* NCTC11637标准菌株购自中国预防医学科学院流病研究所; 6XHis标记蛋白纯化试剂盒Ni-TEDTM购自Active Motif公司; RPMI1640培养粉购自Life Technologies公司. CO₂培养箱为美国FORMA公司产品; 电子显微镜为吉林大学基础医学院电镜室提供.

1.2 方法

1.2.1 重组蛋白表达及纯化 挑选含重组载体的单个菌落接种于盛有LB选择性培养基的5支试管中37℃培养至 $A_{600nm} = 0.4-0.6$ 时, 加入终浓度为0.5 mmol/L的IPTG^[6], 诱导pET32a-vacA-*E.coli* BL21(DE3)表达VacA, 4 h后离心收集菌体, 采用NTA亲和层析法原理用Ni-TEDTM试剂盒进行纯化.

1.2.2 *H Pylori*提取VacA与重组VacA对SGC7901胃癌细胞作用比较 *H Pylori*培养液中提取及纯化VacA常规培养*H Pylori*标准菌株, 培养滤液经半饱和硫酸铵沉淀后, 过SephadexG200柱, 收集具有VacA活性的色谱峰, PEG浓缩及微孔滤膜抽滤纯化.

1.2.3 二种VacA对SGC7901细胞作用比较 将纯化的二种VacA经0.22 μm滤膜抽滤后, 平行加入培养至对数生长期的SGC7901胃癌细胞中(细胞密度为 3×10^4 /瓶), 37℃ CO₂培养箱内培养, 倒置

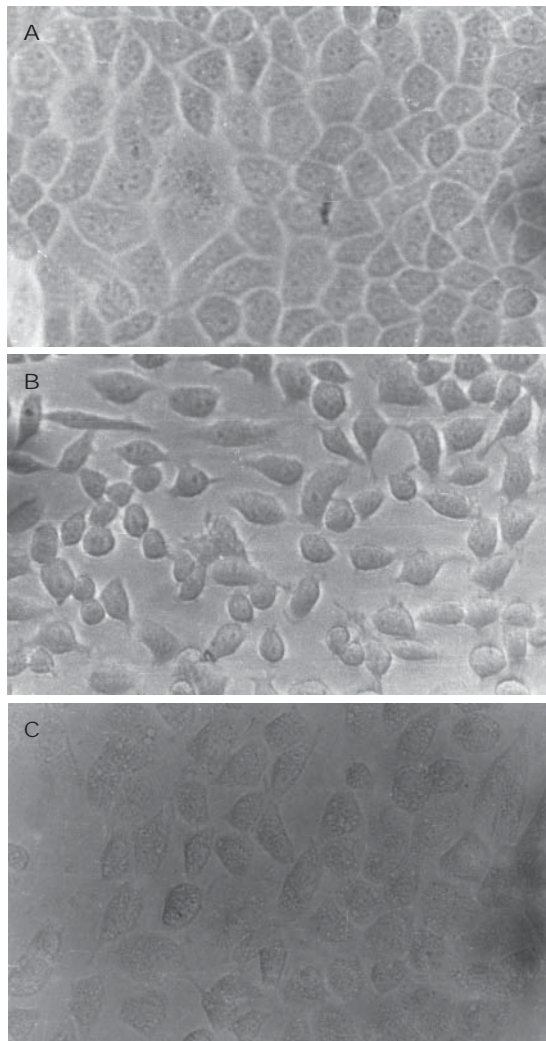


图1 重组VacA与从*H Pylori*提取VacA对SGC7901胃癌细胞作用($\times 40$). A: 正常对照SGC7901细胞; B: 重组VacA作用2 d SGC7901细胞; C: *H Pylori*提取VacA作用2 d SGC7901细胞.

显微镜下连续观察细胞生长状态.

1.2.4 电镜观察重组蛋白对SGC7901作用 将50、100、200、400 μL重组VacA分别加至4瓶培养至对数生长期的SGC7901细胞中(细胞密度为 3×10^4 /瓶), 培养2 d及3 d后用胰酶消化制成单个细胞悬液, 样本按常规方法制作病理切片, 电镜检测.

2 结果

2.1 重组VacA与*H Pylori*提取VacA对SGC7901胃癌细胞作用比较 重组VacA作用于胃癌细胞1 d后, 倒置显微镜下观察, 细胞状态无明显改变(图1A), 2 d后细胞分裂明显慢于正常对照组, 3 d后部分细胞开始脱离瓶壁, 与阴性对照比较, 细胞总数减少, 细胞形态不典型, 但未出现明显空泡变. 而由*H Pylori*培养液提取并纯化的VacA作用于胃癌细胞后1 d, 细胞开始出现镜下可见小空

■ 研发前沿

多年来幽门螺杆菌与各种胃部疾病的相关性以及幽门螺杆菌感染的根治一直是本研究领域的研究热点, 目前研究重点是找到合适的幽门螺杆菌蛋白抗原用以研制出特效的根除幽门螺杆菌感染的疫苗, 为人类的健康作贡献.

■ 创新盘点

本文是在总结和
应用国内外相关
专家的相关研究
基础上,将幽门螺
杆菌提取VacA和
重组VacA蛋白活
性加以比较,更深
入了解该重组蛋
白的抗原特性,为
幽门螺杆菌疫苗
的研制提供理论
基础。

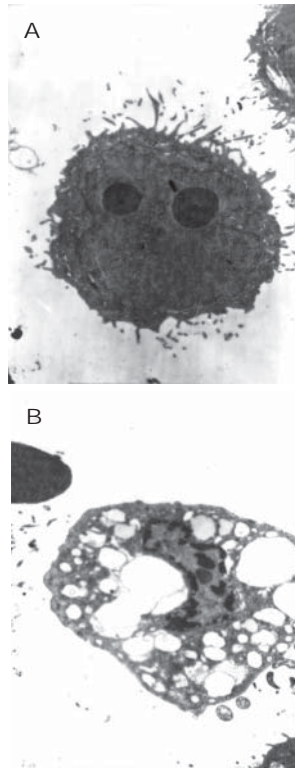


图2 重组VacA作用于SGC7901细胞电镜分析($\times 40$)。A: 阴性对照SGC7901细胞; B: 重组VacA作用3 d SGC7901细胞。

泡,以后空泡逐渐变大,融合成大空泡,3 d后部分细胞溶解死亡(图1BC)。

2.2 电镜结果 结果表明,重组VacA作用于SGC7901细胞后,10%-20%细胞胞质仅出现轻度的空泡样变性,3 d后少量细胞空泡毒作用稍明显,可见到少量胞核内染色质趋边凝聚凋亡细胞(图2)。

3 讨论

自从1982年Marshall和Warren从慢性活动性胃炎患者的胃黏膜中分离出*H Pylori*以来,*H Pylori*与胃肠道疾病和肠道外疾病之间的关系受到广泛关注^[7-9]。VacA是*H Pylori*重要致病因子之一,Supajatura *et al*^[10]研究表明,当*H Pylori*侵入机体引起胃黏膜内大量肥大细胞聚集,VacA可直接结合并激活肥大细胞,使其释放大炎症因子如TNF- α , IL, 巨噬细胞炎性蛋白等,为进一步诱发胃炎甚至胃癌成为可能。在体外,仅有50%-60% *H Pylori*能产生具有活性的VacA^[11],他能黏附于靶细胞,并被靶细胞吞噬,在细胞内表达而产生空泡作用,也有研究认为VacA可能是通过作用于细胞膜上的Na⁺-K⁺-ATP酶,影响离子间转运而引起细胞空泡样变性。有文献报道,VacA毒素能够抑制表皮生长因子与其受体的结合,从而引起酪氨酸磷酸化,扰乱了上皮细胞的信号传导,导

致上皮损害。Yuan *et al*^[12]研究表明,VacA能引起线粒体去极化,从而引起胃上皮细胞凋亡,影响或干扰细胞骨架各成份引起肌动蛋白重排,甚至使微管结构发生紊乱。本研究表明,从*H Pylori*提取的VacA能使细胞发生空泡变,而重组VacA空泡毒作用减弱甚至消失,这与国外的一些研究结果相吻合。Manetti *et al*^[13]也是利用*E.coli*表达重组VacA蛋白,但未能成功诱导HeLa细胞空泡化,其原因可能是由于重组蛋白在表达时,晶体结构折叠不完全从而失去部分空泡毒活性。Kuck *et al*^[14]利用在自然条件下表达并纯化的重组VacA作用于胃上皮细胞系AGS,发现其可以诱导细胞凋亡,但仍不能诱导空泡形成。Ye *et al*^[15]用携带vacA基因的质粒转染HeLa细胞后发现,在宿主细胞质内表达的VacA片段可诱导空泡形成,克服了体外重组蛋白的缺陷。我们认为,重组VacA蛋白空泡毒作用强弱是否与所作用的不同细胞株特性有关尚有待进一步研究。重组蛋白具有良好的抗原性,因此可以设想利用重组蛋白制作疫苗来预防和清除*H Pylori*感染,将是有效防治包括胃炎,胃溃疡在内的上消化道疾病的希望所在。本实验结果还表明,重组VacA虽然诱导细胞空泡变性作用减弱甚至消失,但可抑制癌细胞的生长。重组蛋白可在大肠杆菌中得到高效表达而且纯化方便,故为以后制作ELISA快速诊断试剂盒以及制备高效安全的疫苗奠定了基础。

4 参考文献

- 1 Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, Kamada T, Tanaka S, Uemura N, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. Clinicopathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B-cell lymphoma without a mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma component. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 734-739
- 2 Delchier JC, Lamarque D, Levy M, Tkoub EM, Copie-Bergman C, Deforges L, Chaumette MT, Haioun C. Helicobacter pylori and gastric lymphoma: high seroprevalence of CagA in diffuse large B-cell lymphoma but not in low-grade lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2324-2328
- 3 Morgner A, Miehle S, Fischbach W, Schmitt W, Muller-Hermelink H, Greiner A, Thiede C, Schetelig J, Neubauer A, Stolte M, Ehninger G, Bayerdorffer E. Complete remission of primary high-grade B-cell gastric lymphoma after cure of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2041-2048
- 4 庄小强, 林三仁. 幽门螺杆菌与胃癌的研究进展. *世界华人消化杂志* 2000; 2: 206-207
- 5 Saganuma M, Kurusu M, Okabe S, Sueoka N, Yoshida M, Wakatsuki Y, Fujiki H. *Helicobacter pylori*

- membrane protein 1: a new carcinogenic factor of *Helicobacter pylori*. *Cancer Res* 2001; 61: 6356-6359
- 6 严杰, 陈喆, 毛亚飞, 陈学军. 幽门螺杆菌空泡毒素基因克隆、表达及其重组蛋白免疫学特性的鉴定. *中华微生物学和免疫学杂志* 2003; 23: 109-110
- 7 Gocyk W, Niklinski T, Olechnowicz H, Duda A, Bielanski W, Konturek PC, Konturek SJ. *Helicobacter pylori*, gastrin and cyclooxygenase-2 in lung cancer. *Med Sci Monit* 2000; 6: 1085-1092
- 8 Tsai CJ, Huang TY. Relation of *Helicobacter pylori* infection and angiographically demonstrated coronary artery disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1227-1232
- 9 Dauden E, Jimenez-Alonso I, Garcia-Diez A. *Helicobacter pylori* and idiopathic chronic urticaria. *Int J Dermatol* 2000; 39: 446-452
- 10 Supajatura V, Ushio H, Wada A, Yahiro K, Okumura K, Ogawa H, Hirayama T, Ra C. Cutting edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines. *J Immunol* 2002; 168: 2603-2607
- 11 姜政, 黄爱龙, 陶小红, 王丕龙. 幽门螺杆菌疫苗研究进展. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1451-1456
- 12 Yuan JP, Li T, Shi XD, Hu BY, Yang GZ, Tong SQ, Guo XK. Deletion of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin gene by introduction of directed mutagenesis. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2251-2257
- 13 Manetti R, Massari P, Burrone D, de Bernard M, Marchini A, Olivieri R, Papini E, Montecucco C, Rappuoli R, Telford JL. *Helicobacter pylori* cytotoxin: importance of native conformation for induction of neutralizing antibodies. *Infect Immun* 1995; 63: 4476-4480
- 14 Kuck D, Kolmerer B, Iking-Konert C, Krammer PH, Stremmel W, Rudi J. Vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori* induces apoptosis in the human gastric epithelial cell line AGS. *Infect Immun* 2001; 69: 5080-5087
- 15 Ye D, Willhite DC, Blanke SR. Identification of the minimal intracellular vacuolating domain of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Biol Chem* 1999; 274: 9277-9282

■应用要点
通过研究表明,重组VacA蛋白对胃癌细胞的生长具有抑制作用,空泡毒作用减弱.该重组VacA蛋白具有良好的抗原性,可以作为幽门螺杆菌疫苗研制候选蛋白之一.

电编 李琪 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

● 消息 ●

首届北京地坛感染病学术会议

本刊讯 为庆祝建院60周年,北京地坛医院决定于2006-03-02/04在北京召开全国性的“首届北京地坛感染病学术会议”,预计全国的同行500人参加这次重要的会议.会议邀请了40余位我国德高望重、年富力强的感染病专家作专题学术讲演.

1 会议征稿内容

这次感染病学术会议征文的内容包括病毒性肝炎、HIV/AIDS、各种传染性疾病和感染性疾病,抗生素的合理使用,也包括新发/复燃的传染病.论文全文和摘要请发到电子信箱: cj@genetherapy.com.cn; 或hy@genetherapy.com.cn.

2 与会专家名单

首届北京地坛感染病学术会议邀请的专题报告专家(按照汉语拼音排序)有:白雪帆,陈智,陈志海,成军,段钟平,窦晓光,范小玲,高志良,郭利民,侯金林,贾继东,郎振为,李长青,李兰娟,李太生,李兴旺,刘沛,刘庄,伦文辉,毛羽,缪晓辉,穆毅,宁琴,牛俊奇,任红,施光峰,斯崇文,谭德明,唐红,唐小平,万谟彬,王风水,王福生,王贵强,王磊,王玲,王宇明,王宪波,魏红山,魏来,翁心华,谢青,谢雯,谢尧,邢卉春,徐道振,杨东亮,杨钧,袁正宏,赵红心,庄辉.

3 联系方式

首届北京地坛感染病学术会议组织委员会主席为成军教授.地址:北京市东城区安外大街地坛公园13号,邮编:100011;电话:010-64481639;传真:010-64481639. Email: cj@genetherapy.com.cn

欢迎全国感染病学界的各位专家和同仁来北京参加这次盛会.

β-连环素在肝癌中的表达及其与 cyclin D1 表达的关系

曾建平, 易继林, 李兴睿, 杨志芳, 王从俊

■背景资料

对肝癌的研究表明β-catenin存在广泛的基因突变和异常表达,然而异常表达的β-catenin如何通过下游通路发挥致瘤作用目前尚不清楚,本文通过评估β-catenin与cyclin D1表达关系为β-catenin涉及细胞周期与凋亡提供思路。

曾建平, 易继林, 李兴睿, 杨志芳, 王从俊, 华中科技大学同济医学院附属同济医院普通外科 湖北省武汉市 430030
通讯作者: 曾建平, 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通外科. zjpdoc@163.com
电话: 027-83663418
收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-09-30

Expression of β-catenin in hepatocellular carcinoma and its relation with cyclin D1 expression

Jian-Ping Zeng, Ji-Lin Yi, Xing-Rui Li, Zhi-Fang Yang, Cong-Jun Wang

Jian-Ping Zeng, Ji-Lin Yi, Xing-Rui Li, Zhi-Fang Yang, Cong-Jun Wang, Department of General Surgery, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Jian-Ping Zeng, Department of General Surgery, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. zjpdoc@163.com
Received: 2005-09-10 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To investigate the expression of β-catenin in hepatocellular carcinoma (HCC) and its effect on the expression of cyclin D1.

METHODS: The immunohistochemical SP staining technique was performed to detect the expression of β-catenin and cyclin D1 in 51 liver tissue samples, including 5 cases of normal liver, 8 cases of liver cirrhosis, and 38 cases of HCC.

RESULTS: In normal and cirrhotic liver, the weak expression of β-catenin was observed in the cell membrane. The aberrant expression of β-catenin, mainly located at the cell cytoplasm, was detected in 21 (55.2%) of the 38 HCC tissues and significantly higher in the tissues with poor differentiation and metastasis than that in the ones with well differentiation and non-metastasis. There was a significant correlation between the aberrant expression of β-catenin and the over expression of cyclin D1 ($P = 0.017$). Of the 38 HCC tissue samples, 13 were found aberrant

expression of β-catenin combined with positive expression of cyclin D1 (34%), and 15 were found normal expression of β-catenin combined with negative cyclin D1 expression (39%).

CONCLUSION: The aberrant expression of β-catenin is related with the progression and metastasis of HCC, and exhibits its effect mainly by the transactivation of cyclin D1 gene.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; β-catenin; Cyclin D1; Immunohistochemistry

Zeng JP, Yi JL, Li XR, Yang ZF, Wang CJ. Expression of β-catenin in hepatocellular carcinoma and its relation with cyclin D1 expression. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):96-99

摘要

目的: 探讨β-连环素(β-catenin)在肝癌中的表达及其对cyclin D1表达的影响。

方法: 采用免疫组织化学SP染色法检测38例肝细胞癌, 8例肝硬化以及5例正常肝组织中β-catenin和cyclin D1蛋白的表达水平。

结果: β-catenin在正常肝组织和肝硬化组织中呈微弱的膜表达。55.2%(21/38)的肝细胞癌组织β-catenin呈异常表达, 异常表达的β-catenin主要位于癌细胞胞质。低分化、有转移的肝癌其β-catenin异常表达率明显高于高分化、无转移的肝癌。β-catenin异常表达与cyclin D1过表达显著相关($P = 0.017$)。38例肝癌中13例(34%)显示β-catenin异常表达伴cyclin D1阳性染色, 15例(39%)显示β-catenin正常表达伴cyclin D1阴性染色。

结论: β-catenin的异常表达与肝癌的进展和转移有关。其机制可能是通过激活cyclin D1基因的表达, 促使肝细胞增殖和恶性转化而实现。

关键词: 肝细胞癌; β-catenin; Cyclin D1; 免疫组织化学

曾建平, 易继林, 李兴睿, 杨志芳, 王从俊. β-连环素在肝癌

中的表达及其与cyclin D1表达的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(1):96-99
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/96.asp>

0 引言

β -catenin是一种多功能胞内蛋白, 不仅参与细胞与细胞间的黏附, 而且能介导Wnt信号的胞内转导^[1]. 对肝癌的研究表明 β -catenin存在广泛的基因突变和异常表达^[2,3], 但是相关的作用机制目前尚不清楚. 近期对结直肠癌、乳腺癌细胞系的研究表明 β -catenin的致癌作用可能与cyclin D1的表达异常有关^[4,5]. 我们通过免疫组化方法检测38例肝癌组织中 β -catenin和cyclin D1蛋白的表达, 初步探讨了 β -catenin异常表达的临床意义及其对cyclin D1表达的影响.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源 随机选取同济医院肝胆外科1999-2000年住院患者手术切除后存档标本51例. 其中肝细胞癌38例, 男31例, 女7例. 平均年龄45.63岁. 分化程度按照Edmondson分级标准^[6] I-II级为低分化肝癌(12例), III-IV级为高分化肝癌(26例). 肿瘤直径 ≤ 5 cm者11例, >5 cm者27例, 平均直径11.7 cm, 均为单中心肝癌. 13例存在肿瘤转移(包括肝内转移、肝外转移和门静脉癌栓形成). 所有病例术前均未行放化疗. 对照组包括8例门脉性肝硬化组织和5例正常肝组织, 其中男9例, 女4例, 平均年龄44.8岁. 标本均经病理学证实, 采用40 g/L中性甲醛固定, 石蜡包埋, 连续4 μ m切片.

1.1.2 试剂 兔抗人 β -catenin单克隆抗体及兔抗人cyclin D1单克隆抗体均购自美国Neomarkers公司, SP试剂盒购自美国ZYMED公司

1.2 方法 采用免疫组化SP染色法, 染色步骤按说明书进行. β -catenin染色前行微波抗原修复, cyclin D1染色前行高温高压抗原修复. 切片以联苯二胺显色, 苏木素轻度复染. 磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照, β -catenin染色以肝内胆管上皮作为内部对照. β -catenin阳性染色呈棕黄色颗粒状, 以肝内胆管上皮细胞染色程度为强阳性染色(图1), 将胞质呈中度以上染色或可见胞核染色的细胞定义为阳性细胞. 每张切片随机选取4个高倍镜视野($\times 400$)并计数阳性细胞数, 如切片中 $\geq 50\%$ 的细胞出现以上胞质型改变或 $\geq 20\%$ 的细胞出现以上胞核型改变, 则

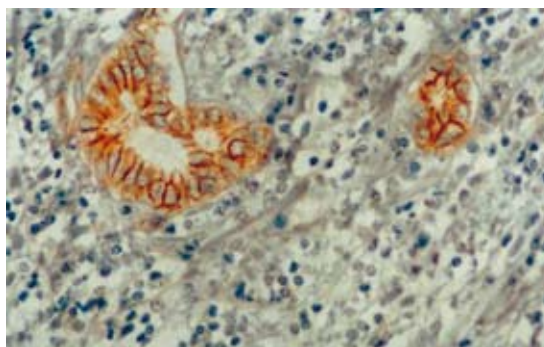


图1 汇管区小胆管强阳性膜表达(阳性对照).

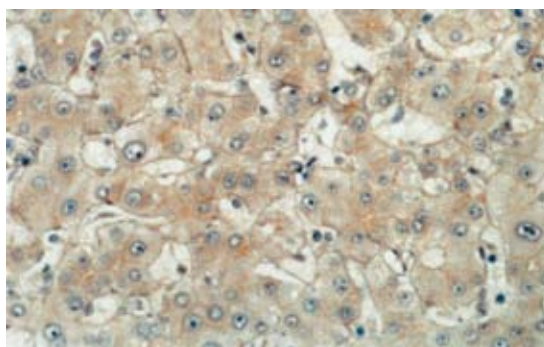


图2 正常肝组织 β -catenin呈弱的膜表达.

定义为 β -catenin异常表达, 否则为 β -catenin正常表达^[7]. cyclin D1染色以胞核染成棕黄色为阳性, 随机选取4个高倍镜视野并计数, 切片中阳性细胞率 $>5\%$ 为阳性病例.

统计学处理 采用 χ^2 检验或Fisher精确概率检验. $P < 0.05$ 认为有显著性差异.

2 结果

2.1 β -catenin在肝癌中的表达 正常肝组织内, 肝细胞可在胞膜的侧面(细胞与细胞的接触面)观察到弱的线型染色, 面向窦间隙的胞膜部分很少着色, 部分肝细胞同时可见微弱的胞质染色. 小叶内胆管上皮细胞可见明显的胞膜染色. 肝硬化组织染色分布与正常肝相似, 但均无明显的胞质和/或核染色(图2, 图3). 肝癌组织染色不同于正常肝和肝硬化组织. 38例肝癌组织中21例存在 β -catenin异常表达, 异常表达的 β -catenin主要位于癌细胞胞质, 部分细胞同时有核染色. 所有存在胞质积聚的癌细胞同时显示明显的胞膜染色(图4). β -catenin过表达与肿瘤分化程度和转移有关. 低分化、伴转移的肝癌其 β -catenin异常表达率明显高于高分化、无转移的肝癌(表1).

2.2 β -catenin与cyclin D1表达关系 cyclin D1阳性染色主要位于癌细胞核(图5, 图6), 38例HCC中15例cyclin D1染色呈阳性. 34%(15/38)的肝

■研究前沿

早期对于 β -catenin的研究主要集中于其介导的细胞黏附作用, 目前对其的研究热点在于 β -catenin基因突变和异常表达如何通过下游通路发挥致癌作用.

■创新盘点

本文的创新之处在于首次在肝癌中同时检测β-catenin与cyclin D1的表达, 将β-catenin作为信号通路分子与细胞周期结合, 试图解释其在肝癌中高基因突变与异常表达的致瘤机制。

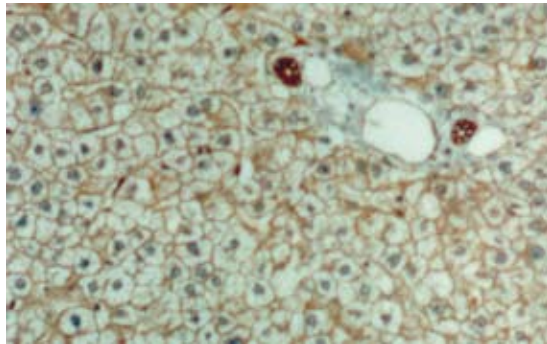


图 3 肝硬化组织β-catenin呈弱的膜和胞质表达, 小叶内胆管可见强的膜染色。

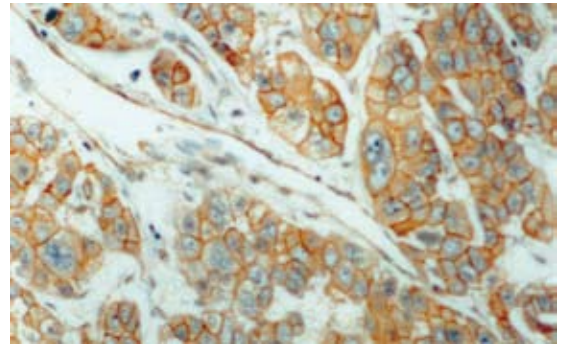


图 4 肝癌组织β-catenin呈增强的膜和胞质表达及部分核表达。

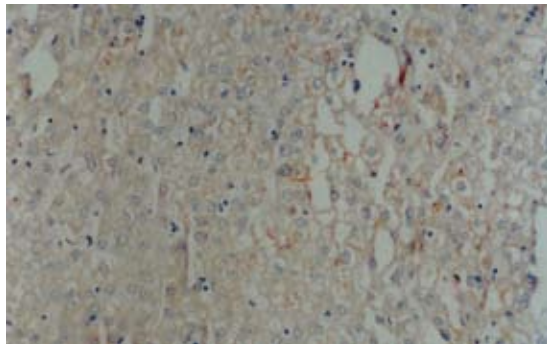


图 5 正常肝组织cyclin D1阴性表达。

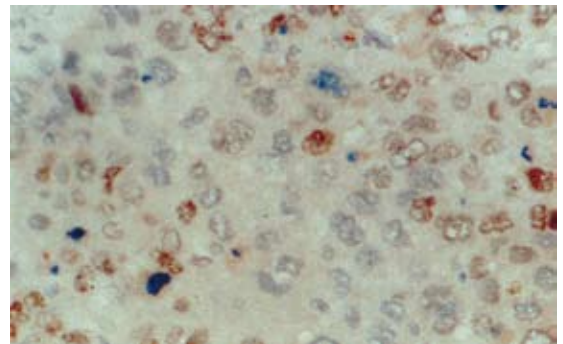


图 6 肝癌组织cyclin D1阳性核表达。

表 1 β-catenin表达与肝癌病理学特性的关系分析

病理学特性	n	β-catenin表达		P
		异常表达	正常表达	
分化程度				
高分化	12	3	9	
低分化	26	18	8	P<0.05
肿瘤大小				
≤5 cm	11	5	6	
>5 cm	27	16	11	P>0.05
肿瘤转移				
无	25	10	15	
有	13	11	2	P<0.05
AFP水平				
+	29	19	10	
-	9	2	7	P>0.05
血清HBsAg				
+	30	18	12	
-	8	3	5	P>0.05

表 2 β-catenin与cyclin D1的表达关系分析

β-catenin染色	cyclin D1染色		n
	阴性	阳性	
异常表达	8	13	21
正常表达	15	2	17
	23	15	38

癌表现为β-catenin异常表达伴cyclin D1阳性染色, 39%(23/38)的肝癌显示β-catenin正常表达伴cyclin D1阴性染色. 统计分析证实β-catenin异常表达与cyclin D1过表达显著相关(χ^2 检验, $P<0.05$) (表2).

3 讨论

Wnt信号是胚胎发育期的一种增殖信号, β-catenin是Wnt信号通路中一种关键的下游效应分子. 正常成熟细胞缺乏Wnt信号, 胞质内β-catenin大部分与细胞膜上的E-cadherin结合介导细胞间的初期识别和黏附, 小部分通过磷酸化降解, 因而胞内游离的β-catenin保持在较低水平. 多种机制如β-catenin基因突变、APC基因缺失等能形成异常的Wnt信号, 导致β-catenin在胞质和/或胞核中积聚, 积聚的β-catenin具有转录活性, 通过与Tcf/Lef因子家族成员结合, 激活启动子区包含Tcf/Lef结合位点的基因转录, 参与肿瘤发生^[1,8].

基于β-catenin的转录活性与其细胞内定位有关^[5], 我们在判断β-catenin的功能时主要以其在胞质和胞核中的表达水平为依据. 本实验中正常肝及肝硬化组织β-catenin染色主要位于肝细胞的胞膜侧面, 反映了β-catenin介导同型细胞

黏附的能力. 肝癌染色图谱则明显区别于正常肝及肝硬化组织, 55%的肝癌组织存在 β -catenin异常表达, 异常表达的 β -catenin主要显示胞质积聚, 显示癌细胞中 β -catenin具有较高的转录活性, 积聚的 β -catenin通过激活下游靶基因的转录参与了肝细胞的恶性转化以及肿瘤的进展. 与其他研究相比, 我们的研究在 β -catenin异常表达率上基本一致. 不同的是我们的研究中没有明显 β -catenin核型积聚. 多项研究^[9,10]证实 β -catenin核表达与其基因突变具有一致性, 而 β -catenin基因突变又与丙型肝炎感染密切相关. 因而所选病例的不同肝病背景可能是导致我们的实验结果中核型表达较低的原因.

临床病理学分析表明 β -catenin异常表达与肝癌病理分级和转移有关. 这与大多数学者在肝癌中的研究结果一致^[2,11]. Brabletz *et al*^[12]的研究证实 β -catenin能调节基质金属蛋白酶(MMPs)的转录. MMPs能分解细胞外基质, 促进恶性细胞的浸润性生长和转移^[13], 因而 β -catenin对肿瘤转移的影响可能与MMPs有关. 检测 β -catenin表达水平与分布对肝癌的恶性程度判断及预后的估计可能有一定价值.

重要的是我们证实 β -catenin异常表达与cyclin D1过表达存在一致性. 最近的体外研究发现cyclin D1基因启动子区存在一个Tcf结合位点^[5]. 基于 β -catenin异常表达(胞质或胞核积聚)与其转录活性的关系, 有理由认为积聚的 β -catenin能诱导cyclin D1基因的转录从而促进肝癌发生和进展. 以往的研究报导约22-58%的肝癌患者存在cyclin D1过表达^[14,15], 然而只有11-13%的病例存在cyclin D1基因的扩增^[16]. 我们的结果为这种基因-蛋白分离的现象提供一种新的解释, 即除基因扩增外, β -catenin异常表达所导致的cyclin D1基因转录活性升高可能也是cyclin D1蛋白过表达的原因之一.

总之, 本实验证实 β -catenin在肝癌中存在异常的胞质/核积聚. 异常表达的 β -catenin与肝癌的进展及转移有关, 其作用可能部分通过调节cyclin D1基因的表达实现. 进一步研究 β -catenin的作用机制对于肝癌的治疗具有重要意义.

4 参考文献

- Morin PJ. beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 1999; 21: 1021-1030
- Wong CM, Fan ST, Ng IO. beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer*

- 2001; 92: 136-145
- Miyoshi Y, Iwao K, Nagasawa Y, Aihara T, Sasaki Y, Imaoka S, Murata M, Shimano T, Nakamura Y. Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res* 1998; 58: 2524-2527
- Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398: 422-426
- Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, Pestell RG, Hung MC. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4262-4266
- EDMONDSON HA, STEINER PE. Primary carcinoma of the liver: a study of 100 cases among 48,900 necropsies. *Cancer* 1954; 7: 462-503
- Asayama Y, Taguchi Ki K, Aishima Si S, Nishi H, Masuda K, Tsuneyoshi M. The mode of tumour progression in combined hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma: an immunohistochemical analysis of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin. *Liver* 2002; 22: 43-50
- Hsu SC, Galceran J, Grosschedl R. Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 4807-4818
- Mao TL, Chu JS, Jeng YM, Lai PL, Hsu HC. Expression of mutant nuclear beta-catenin correlates with non-invasive hepatocellular carcinoma, absence of portal vein spread, and good prognosis. *J Pathol* 2001; 193: 95-101
- Huang H, Fujii H, Sankila A, Mahler-Araujo BM, Matsuda M, Cathomas G, Ohgaki H. Beta-catenin mutations are frequent in human hepatocellular carcinomas associated with hepatitis C virus infection. *Am J Pathol* 1999; 155: 1795-1801
- Endo K, Ueda T, Ueyama J, Ohta T, Terada T. Immunoreactive E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin proteins in hepatocellular carcinoma: relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, and patients' survival. *Hum Pathol* 2000; 31: 558-565
- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T. beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 1999; 155: 1033-1038
- Maatta M, Soini Y, Liakka A, Autio-Harmainen H. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, and membrane type 1-MMP in hepatocellular and pancreatic adenocarcinoma: implications for tumor progression and clinical prognosis. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2726-2734
- Ito Y, Matsuura N, Sakon M, Miyoshi E, Noda K, Takeda T, Umeshita K, Nagano H, Nakamori S, Dono K, Tsujimoto M, Nakahara M, Nakao K, Taniguchi N, Monden M. Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: p27 independently predicts the recurrence. *Hepatology* 1999; 30: 90-99
- Joo M, Kang YK, Kim MR, Lee HK, Jang JJ. Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Liver* 2001; 21: 89-95
- Nishida N, Fukuda Y, Komeda T, Kita R, Sando T, Furukawa M, Amenomori M, Shibagaki I, Nakao K, Ikenaga M. Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 3107-3110

■应用要点

阐明 β -catenin对细胞周期分子的作用将有助于解释 β -catenin致瘤机制, 为进一步开发针对 β -catenin的治疗提供思路.

整合素 β_1 和固生蛋白 Tenascin 共表达与肝癌浸润转移的关系

李兴睿, 郭悦青, 易继林

■背景资料

整合素是细胞膜表面最重要的特异黏附分子,介导了恶性肿瘤细胞和细胞外基质间的黏附,后者被认为是恶性肿瘤浸润转移的首要步骤.固生蛋白 Tenascin是细胞外基质中一种重要组成部分,也是整合素的主要配体之一.关于TN在肝癌中的表达及其与整合素的关系尚未见报道.

李兴睿, 郭悦青, 易继林, 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

通讯作者: 李兴睿, 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. lixingrui@sina.com

电话: 027-83663820

收稿日期: 2005-10-17 接受日期: 2005-10-24

Effect of integrin β_1 and tenascin on invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma

Xing-Rui Li, Yue-Qing Guo, Ji-Lin Yi

Xing-Rui Li, Yue-Qing Guo, Ji-Lin Yi, Department of General Surgery, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Xing-Rui Li, Department of General Surgery, the Affiliated Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. lixingrui@sina.com

Received: 2005-10-17 Accepted: 2005-10-24

Abstract

AIM: To explore the expression of Tenascin (TN) and integrin β_1 in hepatocellular carcinoma (HCC) and their effect on the invasion and metastasis of HCC.

METHODS: The expression of TN and integrin β_1 were detected in 42 HCC, 10 hepatic cirrhosis, and 7 normal liver tissues by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemical method, respectively. The relations of TN and integrin β_1 expression with the pathological features of HCC were evaluated.

RESULTS: The positive expression of integrin β_1 in HCC tissues was significantly higher than that in non-HCC tissues ($\chi^2 = 6.33, P < 0.05$). The expression of integrin β_1 in HCC with invasion of tumor envelop ($u = 3.06, P < 0.01$), Edmondson grades III-IV ($u = 3.78, P < 0.01$) and non-metastasis ($u = 3.65, P < 0.01$) was significantly higher than that in HCC with no tumor envelop invasion, Edmondson grades I - II, and tumor

metastasis. The expression of TN in HCC with Edmondson grades III-IV ($t = 2.467, P < 0.05$), invasion of tumor envelop ($t = 2.912, P < 0.01$), and metastasis ($t = 2.742, P < 0.01$) was significantly higher than that in HCC with Edmondson grades I - II, no tumor envelop invasion, and non-metastasis. The expression of TN in HCC with negative expression of integrin β_1 was significantly lower than that in HCC with positive and high positive expression of integrin β_1 ($t = 2.351, P < 0.05; t = 2.849, P < 0.01$).

CONCLUSION: TN and integrin β_1 may play a synergic role in the invasion and metastasis of HCC, and their expression can be used as important indexes in detecting the metastasis and invasion of HCC.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Tenascin; Integrin β_1 ; Metastasis

Li XR, Guo YQ, Yi JL. Effect of integrin β_1 and tenascin on invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):100-103

摘要

目的: 研究整合素 β_1 及其配体固生蛋白 Tenascin(TN)在肝细胞癌(HCC)中的表达,探讨TN和整合素 β_1 对HCC浸润转移的影响.

方法: 分别采用RT-PCR和免疫组织化学法检测42例HCC、10例肝硬化和7例正常肝组织内整合素 β_1 和TN的表达,观察其与HCC病理学特点之间的关系.

结果: 整合素 β_1 在HCC中的阳性表达率显著高于非肝癌组织($\chi^2 = 6.33, P < 0.05$);整合素 β_1 在有包膜侵犯组、病理分级III-IV组及有转移HCC中的表达水平明显高于无包膜侵犯组($u = 3.06, P < 0.01$)、病理分级I - II级组($u = 3.78, P < 0.01$)以及无转移组($u = 3.65, P < 0.01$);病理分级III-IV组、有包膜侵犯、有转移组的TN表达明显高于病理分级I - II级组($t = 2.467, P < 0.05$)、无包膜侵犯($t = 2.912, P < 0.01$)及无

转移组($t = 2.742, P < 0.01$); 整合素 β_1 阴性表达HCC中的TN表达水平明显低于整合素 β_1 阳性和强阳性表达HCC中的TN($t = 2.351, P < 0.05; t = 2.849, P < 0.01$).

结论: TN和整合素 β_1 可能协同参与了HCC的浸润和转移, 检测其表达可做判断HCC浸润转移的重要指标.

关键词: 肝细胞癌; 固生蛋白; 整合素 β_1 ; 转移

李兴睿, 郭悦青, 易继林. 整合素 β_1 和固生蛋白Tenascin共表达与肝癌浸润转移的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(1):100-103
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/100.asp

0 引言

近来研究发现, 肿瘤细胞表面整合素受体与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)黏附所致的肿瘤细胞游离出或通过基底膜的过程, 是恶性肿瘤浸润生长和远处转移的始动步骤^[1-3]. 固生蛋白Tenascin(TN)是ECM中一种具有独特六臂体结构的寡聚糖蛋白^[4-7], 也是整合素的重要配体之一. 目前, 关于肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)内TN和整合素的共表达情况尚未见报道, 我们通过分析TN和整合素 β_1 在肝癌组织内的共表达情况及其与临床病理学征象之间的关系, 探讨两者在肝癌浸润转移中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 所有病例均来自我院2001-01/2001-12期间住院手术患者. 肝癌患者42例, 其中男性30例, 女性12例, 平均年龄45.3岁(25-77岁), 均经手术后病理切片证实为肝细胞肝癌. 肝癌病理分级(Edmondson分级): I-II级20例, III-IV级22例; 肿瘤直径 ≤ 5 cm者13例, > 5 cm者29例, 均为单结节肝癌; 肿瘤包膜完整者18例, 有包膜侵犯者24例; 伴有转移者(包括肝外转移及门静脉癌栓)20例; 33例合并有肝硬化; 术前检查甲胎蛋白AFP阴性者(< 400 mg/L)11例, 阳性者31例. 另外选取10例门脉高压症肝硬化患者及7例肝外伤患者肝脏标本作为对照组, 其中男性10例, 女性7例, 平均年龄46.7岁(35-58岁). 标本离体后, 剔除出血、坏死组织, 切取等量组织, 置于 -70°C 保存备用.

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR检测TN mRNA表达 按TRIzol试剂盒(美国GIBCO/BRL公司)说明提取组织总RNA. 灭活DNA酶后, 取RNA 1 μg 、Oligo(dT) 2 μL 、

DEPC水补足20 μL , 混匀后 70°C 变性5 min, 置冰上5 min, 加入10 mmol/L dNTP 1 μL 、 $5 \times \text{RT}$ 缓冲液4 μL 、逆转录酶(AMV) 1 μL 、RNasin 1 μL 混匀后于 37°C 反应1 h, 95°C 5 min, 灭活逆转录酶. 选取 β -肌动蛋白(β -actin)为内参照物.

TN引物序列为: 上游5'-GAGATTTAGCCGTGTCTGAGGTTG-3'(4365-4389), 下游5'-AGGAGAGATTGAAGCTCTCG-3'(4665-4685)^[8]. 逆转录产物5 μL 加入反应管, 另加 $10 \times \text{PCR}$ 缓冲液5 μL 、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL 、Taq酶2 U、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 β -actin与TN引物各2 μL , 加水至50 μL . PCR扩增条件为: 95°C 5 min, 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 60 s, 共35个循环, 最后 72°C 延伸7 min. 扩增产物放于含EB的20 g/L琼脂糖凝胶中进行电泳, 紫外光下观察结果并拍照. 采用英国UVP公司的凝胶成像分析系统, 分析各电泳条带吸光度 A 峰值下面积积分, 将TN/ β -actin比值作为TN mRNA表达水平的相对参数.

1.2.2 免疫组织化学染色方法 组织标本均由我院病理科行病理诊断证实, 并行Edmondson分级. 采用免疫组织化学SP染色法检测整合素 β_1 的表达, 小鼠抗人整合素 β_1 单克隆抗体(CD29 Ab-3)为美国Neomarkers公司产品. 操作步骤按试剂盒说明书进行.

1.2.3 整合素 β_1 结果判定 整合素 β_1 阳性染色为细胞质内或细胞膜上棕黄色沉淀. 整合素 β_1 表达结果按照半定量分级为: 无细胞着色为表达阴性(-); 10%-30%细胞呈阳性反应为表达弱阳性(+); 30%-60%细胞呈阳性反应为表达中度阳性(++); $> 60\%$ 细胞呈阳性反应为表达强阳性(+++).

统计学处理 采用秩和检验、 χ^2 检验和 t 检验, 所有数据以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示.

2 结果

2.1 整合素 β_1 在不同肝脏组织内的表达 整合素 β_1 在正常肝脏、肝硬化和肝癌组织中的表达具有明显异质性. 肝癌组织中整合素 β_1 阳性表达率明显高于非肝癌组织($\chi^2 = 6.33, P < 0.05$). 在肝癌组织内, 整合素 β_1 的表达明显增强, 细胞膜表面和细胞质内均可见整合素 β_1 的表达(图1).

2.2 整合素 β_1 表达与HCC病理特征的关系 整合素 β_1 的表达水平在有包膜侵犯组、病理分级III-IV组及有转移组明显高于无包膜侵犯组、病理分级I-II级组和无转移组(表1), 但在不同肿瘤直径、不同AFP水平和是否合并肝硬化组间差异无统计学意义.

■ 研发前沿

整合素作为细胞膜表面最重要的特异黏附分子, 可和ECM中多种配体结合. 阐明整合素及其配体在肿瘤中的表达情况是目前肿瘤研究的热点之一, 干扰整合素与其配体的结合还有望成为未来抗肿瘤治疗的新方向.

■创新盘点

本文结果显示, TN和整合素 β_1 在肝癌组织中的表达明显高于正常肝组织及肝硬化组织, 随着肝癌恶性程度增高, TN和整合素 β_1 表达也越强, 但两者的表达与肝癌直径、AFP水平及肝硬化无关。此外, TN和整合素 β_1 的表达具有相关性, 两者可能协同参与了肝癌的浸润和转移。



图1 肝癌组织内整合素 β_1 的表达 (SP染色 $\times 400$)。

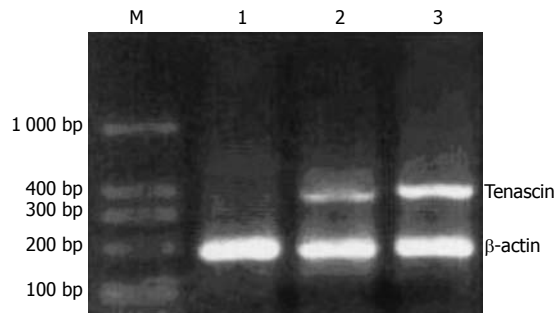


图2 RT-PCR检测TN mRNA表达。M: 标准DNA相对分子量; 1: 正常肝组织; 2: 肝硬化组织; 3: 肝癌组织。

2.3 TN在不同肝脏组织内的表达 TN在不同肝脏组织内的表达具有明显异质性。RT-PCR检测发现, 肝癌组织内TN mRNA表达量明显高于肝硬化组织和正常肝组织($t = 2.693, P < 0.01$; $t = 2.981, P < 0.01$) (表2, 图2)。

2.4 TN表达与HCC病理特征的关系 依照肝癌的病理分级、有无包膜侵犯和转移的不同, TN mRNA表达量有显著差异($t = 2.467, P < 0.05$; $t = 2.912, P < 0.01$; $t = 2.742, P < 0.01$); 但TN的表达在不同肿瘤直径、不同AFP水平及是否合并肝硬化组间差异无统计学意义。

2.5 TN与整合素 β_1 的相互关系 在肝癌组织内, 随着整合素 β_1 表达强度升高, TN的表达也相应增高。在整合素 β_1 阴性的肝癌组织内, TN mRNA表达量为 0.532 ± 0.18 , 明显低于整合素 β_1 表达呈阳性(0.643 ± 0.26)和强阳性(0.667 ± 0.21)的肝癌组织($t = 2.351, P < 0.05$; $t = 2.849, P < 0.01$)。

3 讨论

肿瘤的浸润转移是一个复杂的过程, 也是临床上治疗肿瘤失败的主要原因之一。恶性肿瘤细胞和ECM的黏附被认为是恶性肿瘤浸润转移的首要步骤, 其黏附是通过细胞膜表面的特异黏附分子介导的, 其中最重要的黏附分子为整合素家族^[1]。整合素是由 α 和 β 两个亚单位通过非共

表1 肝癌中整合素 β_1 表达与临床病理特征的关系

病理特征	n	半定量分级				χ^2 值	P值
		-	+	++	+++		
包膜侵犯							
有	24	1	6	12	5	3.06	$P < 0.01$
无	18	6	8	3	1		
病理分级							
III-IV	20	1	2	12	5	3.78	$P < 0.01$
I-II	22	6	11	5	0		
肿瘤转移							
有	20	0	4	11	5	3.65	$P < 0.01$
无	22	7	9	6	0		

表2 TN mRNA在不同肝脏组织内的表达

组织类型	n	TN/ β -actin
正常肝组织	7	0.021 ± 0.02
肝硬化组织	10	0.147 ± 0.11
肝癌组织	42	0.583 ± 0.24^b

^b $P < 0.01$ vs 肝硬化组织和正常肝组织。

价键结合形成的异二聚体跨膜糖蛋白, 其功能在于与相应配体结合介导细胞与基底膜、细胞与细胞间的黏附, 并通过传递特定信号或诱导基因的表达来控制细胞的存在或凋亡^[9]。TN是ECM中一种寡聚糖蛋白, 具有独特的六臂体结构, 其蛋白质序列中含有表皮生长因子(EGF)片段和III型纤维连结蛋白片段^[10,11], 也是整合素的重要配体之一。研究表明, TN在乳腺癌、口腔癌等许多恶性肿瘤中都有高表达, 在体外能诱导内皮细胞增殖, 在体内可促进肿瘤细胞扩散, 加速肿瘤侵袭性生长^[12-16]。目前关于TN在肝癌中的表达及其与整合素的关系尚未见报道。我们通过分析整合素 β_1 和配体TN在肝癌组织内的共表达情况及其与临床病理学征象之间的关系, 探讨两者在肝癌浸润转移中的作用。

本研究结果显示, TN和整合素 β_1 在肝癌组织中的表达明显高于正常肝组织及肝硬化组织。结合肝癌各种病理指标分析的结果显示, 随着肿瘤恶性程度增高, TN和整合素 β_1 表达也越强, 在低分化、有包膜侵犯及有转移的癌组织中, TN和整合素 β_1 的表达明显高于中高度分化、无包膜侵犯和无转移者, 但两者的表达与肿瘤直径、AFP水平及肝硬化无关。此外, 在肝癌组织内, 随着整合素 β_1 的表达强度升高, TN的表达也相应增高。在整合素 β_1 阴性的肝癌组织内, TN表达的灰度值明显高于整合素 β_1 表达呈阳性和

强阳性的肝癌组织,提示TN和整合素 β_1 的表达具有相关性,两者可能协同参与了肝癌的浸润和转移.由于TN是整合素的重要配体,我们推测,肝癌细胞可能通过其表面的整合素位点,识别并与配体TN结合,使得肝癌细胞与ECM黏附,从而释放基质金属酶等成分降解基质,溶解ECM,促使肿瘤细胞突破ECM向间质浸润,最终造成肿瘤转移.

由于整合素和TN的表达与肝癌的分化程度、有无包膜侵犯及有无转移密切相关,因此这两者可作为判断肝癌恶性程度和侵袭性的重要指标.明确整合素和TN在肝癌浸润转移中的作用,对于临床上治疗肝癌具有重要意义.调节整合素的表达与功能,改变肝癌细胞的黏附特性,封闭ECM中TN的整合素结合位点,可达到减少肝癌浸润和转移的目的.因此,干扰整合素和TN的结合有望成为肝癌治疗中的一个新方向.

4 参考文献

- 1 Prifti S, Zourab Y, Koumouridis A, Bohlmann M, Strowitzki T, Rabe T. Role of integrins in invasion of endometrial cancer cell lines. *Gynecol Oncol* 2002; 84: 12-20
- 2 Trikha M, Timar J, Zacharek A, Nemeth JA, Cai Y, Dome B, Somlai B, Raso E, Ladanyi A, Honn KV. Role for beta3 integrins in human melanoma growth and survival. *Int J Cancer* 2002; 101: 156-167
- 3 Charalabopoulos K, Mittari E, Karakosta A, Golias C, Batistatou A. Integrins adhesion molecules and some of their ligands in laryngeal cancer. *Exp Oncol* 2005; 27: 86-90
- 4 Adams M, Jones JL, Walker RA, Pringle JH, Bell SC. Changes in tenascin-C isoform expression in invasive and preinvasive breast disease. *Cancer Res* 2002; 62: 3289-3297
- 5 Pilch H, Schaffer U, Schlenger K, Lautz A, Tanner B, Hockel M, Knapstein PG. Expression of tenascin in human cervical cancer-association of tenascin expression with clinicopathological parameters. *Gynecol Oncol* 1999; 73: 415-421
- 6 Jang JH, Chung CP. Tenascin-C promotes cell survival by activation of Akt in human chondrosarcoma cell. *Cancer Lett* 2005; 229: 101-105
- 7 Leins A, Riva P, Lindstedt R, Davidoff MS, Mehraein P, Weis S. Expression of tenascin-C in various human brain tumors and its relevance for survival in patients with astrocytoma. *Cancer* 2003; 98: 2430-2439
- 8 Katenkamp K, Berndt A, Hindermann W, Wunderlich H, Haas KM, Borsi L, Zardi L, Kosmehl H. mRNA expression and protein distribution of the unspliced tenascin-C isoform in prostatic adenocarcinoma. *J Pathol* 2004; 203: 771-779
- 9 Hood JD, Cheresch DA. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 91-100
- 10 Ghert MA, Jung ST, Qi W, Harrelson JM, Erickson HP, Block JA, Scully SP. The clinical significance of tenascin-C splice variant expression in chondrosarcoma. *Oncology* 2001; 61: 306-314
- 11 Ghert MA, Qi WN, Erickson HP, Block JA, Scully SP. Tenascin-C splice variant adhesive/anti-adhesive effects on chondrosarcoma cell attachment to fibronectin. *Cell Struct Funct* 2001; 26: 179-187
- 12 Atula T, Hedstrom J, Finne P, Leivo I, Markkanen-Leppanen M, Haglund C. Tenascin-C expression and its prognostic significance in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2003; 23: 3051-3056
- 13 Maschler S, Grunert S, Danielopol A, Beug H, Wirl G. Enhanced tenascin-C expression and matrix deposition during Ras/TGF-beta-induced progression of mammary tumor cells. *Oncogene* 2004; 23: 3622-3633
- 14 Kalembeiyi I, Inada H, Nishiura R, Imanaka-Yoshida K, Sakakura T, Yoshida T. Tenascin-C upregulates matrix metalloproteinase-9 in breast cancer cells: direct and synergistic effects with transforming growth factor beta1. *Int J Cancer* 2003; 105: 53-60
- 15 Gazzaniga P, Nofroni I, Gandini O, Silvestri I, Frati L, Agliano AM, Gradilone A. Tenascin C and epidermal growth factor receptor as markers of circulating tumoral cells in bladder and colon cancer. *Oncol Rep* 2005; 14: 1199-1202
- 16 Ishiwata T, Takahashi K, Shimanuki Y, Ohashi R, Cui R, Takahashi F, Shimizu K, Miura K, Fukuchi Y. Serum tenascin-C as a potential predictive marker of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2005; 25: 489-495

■应用要点

本文结果提示整合素和其配体TN协同参与了肝癌的浸润和转移,为未来肝癌治疗提供了一个新方向.调调整合素的表达与功能,改变肝癌细胞的黏附特性,封闭细胞外基质中TN的整合素结合位点,干扰整合素和TN的结合,可达到减少肝癌浸润和转移的目的.

■同行评价

本文具有一定创新性,全文流畅,所得结论正确,具有一定临床参考价值.

电编 张敏 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

罗格列酮对大鼠溃疡性结肠炎肠黏膜NF- κ B, ICAM-1表达的影响

周静平, 邓长生

■背景资料

过氧化物酶体增殖物激活受体是一类配体活化的核转录因子, 与相应的配体(ligand)结合后可以调节靶基因的转录。主要有三个亚型: α , β , γ 。其中PPAR γ 与消化道的关系尤为密切。有大量体内体外实验研究表明, PPAR γ 在人和啮齿类动物的结肠上皮细胞中有丰富的表达, 其表达的缺失、减少与炎症性肠病密切相关。PPAR γ 配体可以调节过度放大的炎症级联反应, 其配体有望成为新一代治疗或辅助治疗IBD的药物。

周静平, 邓长生, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071

通讯作者: 邓长生, 430071, 湖北省武汉市武昌区东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科

电话: 027-87331114

收稿日期: 2005-10-25 接受日期: 2005-10-31

Effects of rosiglitazone on expression of NF- κ B and ICAM-1 in rats with ulcerative colitis

Jing-Ping Zhou, Chang-Sheng Deng

Jing-Ping Zhou, Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Correspondence to: Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, 169 Donghu Road, Wuchang District, Wuhan 430071, Hubei Province, China

Received: 2005-10-25 Accepted: 2005-10-31

Abstract

AIM: To investigate the effect of rosiglitazone on the expression of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the colon mucosa of rats with ulcerative colitis.

METHODS: The rat colitis model was induced by the combined enema of trinitrobenzene sulphonic acid (TNB) and ethanol. The experimental animals were randomly divided into six groups: normal group, model group, Sulfasalazine (SASP) group (100 mg/kg), and 3 rosiglitazone groups (2, 4, 8 mg/kg). The saline, SASP, and different concentrations of rosiglitazone were administered by gastric irrigation daily, respectively, from 24 h after the establishment of model to the end of experiment. The disease activity index (DAI) and colon mucosa damage index (CMDI) of the rats were observed and evaluated. The activity of myeloperoxidase (MPO) was measured by biochemical method. The expression of NF- κ Bp65 and ICAM-1 protein were detected by immunohistochemistry.

RESULTS: As compared with the normal group, the DAI, CMDI, and the activity of MPO in the colon tissues of the rats in the model group

were significantly increased (2.11 ± 1.29 vs 0.11 ± 0.17 ; 2.67 ± 0.82 vs 0.33 ± 0.52 ; 1.26 ± 0.36 U/g vs 0.27 ± 0.07 U/g; all $P < 0.01$). The expression of NF- κ Bp65 and ICAM-1 in the rat colon mucosa were significantly increased (0.7081 ± 0.0671 vs 0.2293 ± 0.0474 ; 0.4846 ± 0.0366 vs 0.1783 ± 0.0201 , both $P < 0.01$). The DAI, CMDI, and the activity of MPO in the 4 mg/kg and 8 mg/kg rosiglitazone group were significantly decreased (DAI: 1.11 ± 0.50 , 0.61 ± 0.25 vs 2.11 ± 1.29 , $P < 0.05$; CMDI: 1.67 ± 0.52 , 1.17 ± 0.75 vs 2.67 ± 0.82 , $P < 0.05$; 0.82 ± 0.13 , 0.51 ± 0.10 U/g vs 1.26 ± 0.36 U/g, $P < 0.01$) in comparison with those in the model group, and the expression of NF- κ B and ICAM-1 were also decreased (NF- κ B: 0.4544 ± 0.0379 , 0.2577 ± 0.0131 vs 0.7081 ± 0.0671 , $P < 0.01$; ICAM-1: 0.3854 ± 0.0277 , 0.2830 ± 0.0234 vs 0.4846 ± 0.0366 , $P < 0.01$). The expression of NF- κ Bp65 and ICAM-1 in rat colon mucosa was positively correlated ($r = 0.927$, $P < 0.01$), and the expression of ICAM-1 and the activity of MPO was also positively correlated with each other ($r = 0.580$, $P < 0.01$).

CONCLUSION: Rosiglitazone has protective effect against rat ulcerative colitis, and its mechanism may be related with the inhibition of the NF- κ B activation, reduction of the ICAM-1, and decreasing of neutrophil invasion.

Key Words: Ulcerative colitis; Rosiglitazone; Nuclear factor-kappa B; Intercellular adhesion molecule-1

Zhou JP, Deng CS. Effects of rosiglitazone on expression of NF- κ B and ICAM-1 in rats with ulcerative colitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):104-108

摘要

目的: 探讨罗格列酮对大鼠溃疡性结肠炎肠黏膜核转录因子- κ B(NF- κ B), 细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达的影响。

方法: 应用三硝基苯磺酸(TNB)/乙醇灌肠制备大鼠溃疡性结肠炎模型。实验设正常对照组, 模型对照组, 阳性药物组(柳氮磺吡啶SASP组, 100 mg/kg), 罗格列酮组(2, 4, 8 mg/kg), 每天灌胃给药1次, 给药时间从造模后第

2天开始至实验结束共8 d, 观察大鼠疾病活动指数(DAI)和结肠黏膜损伤指数(CMDI), 生化法检测大鼠结肠组织髓过氧化物酶(MPO)活性, 免疫组化法检测大鼠肠黏膜NF- κ Bp65和ICAM-1蛋白的表达。

结果: 与正常组相比, 模型组DAI、CMDI评分及结肠组织MPO活性明显升高(2.11 ± 1.29 vs 0.11 ± 0.17 , 2.67 ± 0.82 vs 0.33 ± 0.52 , 1.26 ± 0.36 U/g vs 0.27 ± 0.07 U/g, $P < 0.01$), 结肠黏膜NF- κ Bp65及ICAM-1表达明显增强(0.7081 ± 0.0671 vs 0.2293 ± 0.0474 ; 0.4846 ± 0.0366 vs 0.1783 ± 0.0201 , $P < 0.01$)。罗格列酮中、高剂量组DAI, CMDI评分及MPO活性较模型组有明显下降(DAI: 1.11 ± 0.50 , 0.61 ± 0.25 vs 2.11 ± 1.29 , $P < 0.05$; CMDI: 1.67 ± 0.52 , 1.17 ± 0.75 vs 2.67 ± 0.82 , $P < 0.05$; MPO: 0.82 ± 0.13 , 0.51 ± 0.10 U/g vs 1.26 ± 0.36 U/g, $P < 0.01$), NF- κ B及ICAM-1表达也有不同程度降低(NF- κ B: 0.4544 ± 0.0379 , 0.2577 ± 0.0131 vs 0.7081 ± 0.0671 , $P < 0.01$; ICAM-1: 0.3854 ± 0.0277 , 0.2830 ± 0.0234 vs 0.4846 ± 0.0366 , $P < 0.01$)。大鼠结肠黏膜NF- κ B的表达与ICAM-1表达呈正相关($r = 0.927$, $P < 0.01$), ICAM-1的表达与结肠组织MPO活性也呈正相关($r = 0.580$, $P < 0.01$)。

结论: 罗格列酮对大鼠溃疡性结肠炎有保护作用, 其作用机制可能与抑制NF- κ B活化, 减少黏附分子ICAM-1产生以及降低中性粒细胞浸润有关。

关键词: 溃疡性结肠炎; 罗格列酮; 核转录因子- κ B; 细胞间黏附分子-1

周静平, 邓长生. 罗格列酮对大鼠溃疡性结肠炎肠黏膜NF- κ B, ICAM-1表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(1):104-108
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/104.asp>

0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD), 是一组慢性非特异肠道炎症疾病, 在我国, UC较CD常见, 且发病率有增高趋势, 该病病程长, 易反复发作. 过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)是一类核转录因子受体, 主要有三个亚型: α , β , γ . 有研究表明^[1], 结肠上皮细胞有大量PPAR γ 表达, 其在维持正常

肠道生理和免疫功能方面发挥作用. 噻唑烷酮类(TZD)药是PPAR γ 的合成配体, 包括罗格列酮, 吡格列酮, 曲格列酮等, 已作为新一代治疗糖尿病的药物广泛用于临床. 新近研究表明该类药具有抗炎, 调节免疫反应作用, 在一些动物炎症模型中表现良好的抗炎效应^[2-4]. 我们在建立三硝基苯磺酸(TNB)大鼠UC基础上, 从罗格列酮对核转录因子- κ B (NF- κ B), 细胞间黏附分子-1(ICAM-1)表达调控的角度, 探讨罗格列酮的抗炎机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Sprague-Dawley(SD)大鼠36只, δ , 体质量 200 ± 20 g, 购于武汉大学医学院实验动物中心, 室温, 光照周期12 h: 12 h条件饲养。

1.1.2 主要试剂与仪器 TNB购自Sigma公司, 马来酸罗格列酮片(商品名: 文迪雅)葛兰素史克公司出品, 柳氮磺吡啶(SASP)上海三维制药有限公司产品, 兔抗鼠NF- κ Bp65单克隆抗体, ICAM-1兔抗鼠多克隆抗体及SP试剂盒均购自北京中山试剂公司, HPIAS2000型图像分析软件(同济千屏影像工程公司), MPO试剂盒购自南京建成生物研究所, 其它试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 实验模型建立及分组 应用TNB/乙醇方法制备大鼠溃疡性结肠炎模型. 实验前禁食24 h, 自由饮水, 10% (v/v)水合氯醛腹腔麻醉(300 mg/kg), 将TNB溶于500 mL/L乙醇至终浓度100 g/L, 取塑料导管一根, 术前石蜡油润滑, 从大鼠肛门中插入深度约8 cm, 缓慢推注TNB/乙醇溶液, 每只大鼠约0.3 mL. 实验设正常对照组、模型对照组、阳性药物对照组(SASP组, 100 mg/kg)、罗格列酮组(2, 4, 8 mg/kg). 每组6只, 每天灌胃给药一次, 给药时间从造模后第2天至实验结束共8 d, 模型对照组给予生理盐水灌胃, 每日观察大鼠一般状况及粪便性状, 记录评分, 评分标准采用疾病活动指数(DAI)(表1)。

1.2.2 标本收集 实验结束后, 水合氯醛麻醉大鼠, 将其仰卧固定于手术台, 腹部正中切口, 分离结肠组织(从肛门至盲肠约8 cm), 沿肠系膜纵轴剪开, 冰生理盐水冲洗干净, 肉眼观察大体形态并进行评分, 评分标准采用结肠黏膜损伤指数(CMDI)^[5]. 取病变最明显处组织置于40 g/L中性甲醛溶液固定, 常规石蜡包埋, 连续2 μ m切片, HE染色, 光镜下观察组织学改变, 同时免疫组化

■ 研究前沿

对于噻唑烷(TZD)类药物(如罗格列酮, 曲格列酮等)有调节免疫反应的新特点得到一些学者的认可, 但其具体机制仍有待进一步探索, 目前多数研究集中于该类物质对某些信号转导机制的干扰方面, 如NF- κ B, STAT(signal transducer and activator of transcription, 信号转导及转录激活因子), AP-1(activator protein-1, 激活蛋白-1), 研究比较充分的是对NF- κ B的影响, 他可抑制I κ B的蛋白磷酸化降解, 进而阻止NF- κ B的激活. 还有研究提示TZD类药物还可以通过非PPAR的途径来调节免疫反应。

■创新盘点

我们所查阅的文献多以小鼠为实验对象,我们采用了SD大鼠,同样得到了满意的实验效果.结果分析中对ICAM-1表达和MPO(髓过氧化物酶)活性的相关性做了统计学分析,认为黏附分子的表达影响炎症细胞的浸润,从实验的角度上证实了黏附分子对炎症细胞趋化,渗出,浸润所起的关键作用.

表1 DAI评分表

记分	体质量下降	大便秘状	便血
0	无	正常	阴
1	1-5	-	-
2	6-10	半稀便	隐血(+)
3	11-15	-	-
4	>15	稀便	肉眼血便

DAI = (体质量下降分数+大便秘状分数+便血分数)/3

SP法检测NF- κ Bp65和ICAM-1的表达;另取一部分组织迅速置于-80℃冰箱冻存,留做生化法检测MPO活性.

1.2.3 免疫组化染色 (1)石蜡切片脱蜡至水(2)30 mL/L H₂O₂室温孵10 min. (3)将组织切片浸入组织抗原修复液(枸橼酸钠液pH6.0)中,置入微波内进行修复(温度98℃)2 min. (4)室温放凉,PBS洗3次,每次3 min,滴正常小牛血清,室温作用20 min. (5)倾去血清,滴加相应一抗,37℃孵育2 h. (6)PBS洗3次,每次3 min,滴加生物素标记的二抗,37℃孵育30 min. (7)PBS洗3次,每次3 min,辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素,37℃孵育30 min. (8)PBS洗3次,每次3 min. (9)DAB显色液显色,显微镜下控制显色时间. (10)苏木素复染,脱水,透明,封片. PBS液代替一抗作为阴性对照.

1.2.4 切片观察及结果判定 NF- κ B阳性表达为细胞核内和(或)胞质呈现棕黄色颗粒, ICAM-1阳性表达为胞膜和(或)胞质内呈现棕黄色颗粒. 每张切片选10个400倍视野,采用全自动图像分析仪与HPIAS-2 000图像分析软件,扫描记录阳性细胞吸光度值,取其平均值作为此切片NF- κ B或ICAM-1的相对含量.

1.2.5 MPO检测 按试剂盒说明书要求操作.

统计学处理 数据以mean±SD表示. 采用SPSS10.0统计软件进行分析,两组间比较用单因素方差分析,两变量间相关关系用直线相关分析.

2 结果

2.1 大鼠一般状况 造模后第2天,大鼠出现腹泻,解黄色稀便、半稀便或血便,粪便隐血试验(+),精神倦怠,活动进食减少. SASP和罗格列酮中、高剂量组一般情况及消化道症状好于模型组,DAI评分明显降低($P<0.05$),但两组之间差异无显著性($P>0.05$)(表2).

2.2 大体形态及组织病理改变 模型组不同程度充血、水肿、糜烂及出血,浅小溃疡形成,病变

以结肠下段最明显,并向上连续发展,CMDI评分显著高于正常组($P<0.05$);镜下黏膜及黏膜下层血管高度扩张充血,大量炎细胞浸润,以中性粒细胞为主. 罗格列酮中、高剂量组与SASP可显著改善肠黏膜充血、水肿、糜烂,降低CMDI评分;镜下黏膜及黏膜浅层仅有少量中性粒细胞、淋巴细胞浸润.

2.3 罗格列酮对大鼠肠黏膜NF- κ B及ICAM-1表达的影响 正常组少见NF- κ B表达阳性的细胞,模型组中可见大量肠上皮细胞及炎性细胞表达NF- κ B,差异有显著性($P<0.01$),罗格列酮组(4 mg/kg, 8 mg/kg)NF- κ B表达低于模型组($P<0.01$);表达ICAM-1的阳性细胞为上皮细胞、黏膜及黏膜下血管内皮细胞、炎细胞,模型组表达也明显高于正常组($P<0.01$),不同剂量罗格列酮处理后,ICAM-1表达降低,差异有显著性($P<0.01$)(表2). 大鼠肠黏膜NF- κ B的表达与ICAM-1的表达呈显著的正相关($r = 0.927, P<0.01$)

2.4 罗格列酮对MPO的影响 模型组肠黏膜MPO活性明显高于正常组($P<0.01$),罗格列酮各组 and SASP组均可下调MPO活性,罗格列酮组有一定剂量效应关系. 肠黏膜MPO活性与ICAM-1的表达呈正相关($r = 0.580, P<0.01$).

3 讨论

TNB/乙醇大鼠溃疡性结肠炎是较成熟的UC动物模型,广泛用于临床药物筛选和发病机制的研究,其基本原理在于乙醇破坏肠黏膜屏障,作为半抗原的TNB与肠组织蛋白结合形成完全抗原,诱发机体产生免疫反应,产生肠道一系列炎症表现. 本实验建立大鼠UC急性期,造模第2天出现腹泻、血便,肠黏膜充血水肿,糜烂浅溃疡形成,模型组DAI和CMDI评分显著高于正常组,镜下可见黏膜浅层血管扩张充血,伴有大量中性粒细胞,淋巴细胞、巨噬细胞浸润,表明模型复制成功.

PPAR γ 属于核受体超家族成员,是一类配体激活的转录因子,主要表达于脂肪细胞,参与脂肪代谢和糖代谢. 近年来有研究表明,在人和啮齿类动物的结肠上皮细胞PPAR γ 也有丰富的表达,其表达的缺失或较少与一些慢性炎症性疾病有关. 有研究表明^[6],UC患者结肠黏膜PPAR γ mRNA和蛋白水平低于正常人;在TNB诱导的小鼠结肠炎中^[7],PPAR γ +/-杂合子小鼠比野生型(PPAR γ +/)表现更强的易感性. PPAR γ 的合成配体罗格列酮、吡格列酮等不仅具有降血糖

表2 罗格列酮对大鼠DAI、CMDI、肠黏膜MPO活性和NF-κB、ICAM-1表达的影响 (n = 6, mean ± SD)

组别	剂量 (mg/kg)	DAI	CMDI	MPO (u/g)	NF-κB	ICAM-1
正常组	-	0.11 ± 0.17	0.33 ± 0.52	0.27 ± 0.07	0.229 3 ± 0.047 4	0.178 3 ± 0.020 1
模型组	-	2.11 ± 1.29 ^d	2.67 ± 0.82 ^d	1.26 ± 0.36 ^d	0.708 1 ± 0.067 1 ^d	0.484 6 ± 0.036 6 ^d
罗格列酮组	2	1.94 ± 0.57	2.00 ± 0.63	0.93 ± 0.11 ^a	0.667 3 ± 0.024 9	0.444 9 ± 0.014 4 ^a
	4	1.11 ± 0.50 ^a	1.67 ± 0.52 ^a	0.82 ± 0.13 ^b	0.454 4 ± 0.037 9 ^b	0.385 4 ± 0.027 7 ^b
	8	0.61 ± 0.25 ^a	1.17 ± 0.75 ^a	0.51 ± 0.10 ^b	0.357 7 ± 0.013 1 ^b	0.283 0 ± 0.023 4 ^b
SASP组	100	1.00 ± 0.60 ^b	1.50 ± 0.55 ^b	0.59 ± 0.12 ^b	0.378 2 ± 0.026 8 ^b	0.258 0 ± 0.054 0 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 模型组; ^dP<0.01 vs 正常组.

作用, 而且在胃肠道慢性炎症性疾病如IBD中的积极作用也越来越受到重视^[8-10]. PPAR γ 及其配体的抗炎、调节免疫反应的具体分子机制目前尚未明, 一些研究^[11-13]表明, 该受体激活后可干扰某些信号传导通路如NF- κ B, STAT AP-1等, 影响基因上游水平信号分子的相互作用, 而这些信号分子及传导通路是调节炎症前介质的关键因素.

NF- κ B是一种分布和作用均十分广泛的真核细胞转录因子, 因最先发现于B细胞免疫球蛋白轻链上而得名, 被激活后可调节多种细胞因子、炎症介质、酶、黏附分子的表达. 在细胞静息状态下, NF- κ B与其抑制蛋白I κ B家族成员结合, 以复合物形式存在于胞浆中. 当细胞受活化刺激(IFN- γ 、IL-1、细菌、病毒、射线等)后, I κ B磷酸化降解, NF- κ B与I κ B解离, 从胞质移位到胞核, 通过自身核定位序列与相应的靶序列结合, 调节目的基因表达, 发挥转录调节作用. 有研究^[14]表明, 人IBD和小鼠UC模型中, 肠黏膜NF- κ B的转录活性增强, 提示NF- κ B的激活与IBD的发病相关. 本研究结果显示模型组NF- κ B表达明显增强, 表明NF- κ B被大量激活, 而罗格列酮在一定剂量范围内降低NF- κ B表达. 可通过抑制NF- κ B激活减轻炎症反应.

本实验中, 模型组ICAM-1表达也比正常组显著增强, 而罗格列酮可下调ICAM-1表达, 同时我们还观察到模型组中大鼠肠黏膜NF- κ B与ICAM-1的表达呈显著正相关, 说明ICAM-1的表达与NF- κ B的激活密切相关. ICAM-1在白细胞跨内皮迁移和免疫细胞激活方面发挥重要作用, 与IBD关系密切^[15]. 最近有研究^[16,17]表明, PPAR γ 激活剂曲格列酮, 在一定剂量范围内可抑制肿瘤坏死因子- α (TNF- α)诱导的内皮细胞黏膜地址素(MAdCAM-1)、ICAM-1等黏附分子的表达; 抗ICAM-1抗体和ICAM-1反义核苷酸在IBD动物实验中有良好抗炎作用.

MPO是主要存在于中性粒细胞中的一种酶,

其活性高低反应了中性粒细胞浸润程度. 本实验中, 模型组肠黏膜组织MPO活性显著高于正常组, 罗格列酮各剂量组均可降低肠黏膜MPO活性. 模型组中ICAM-1的表达与结肠组织MPO活性呈正相关, 由此推测中性粒细胞的浸润程度与内皮细胞、炎性细胞黏附分子的表达有关, 降低黏附分子的表达有助于减少炎性细胞的浸润.

总之, 本实验中, 罗格列酮可显著改善大鼠结肠炎症状, 其作用机制可能与抑制NF- κ B激活, 减少ICAM-1表达, 减轻炎细胞浸润有关, 本研究也为该药抗炎、调节免疫反应的临床应用价值提供了一定理论依据.

4 参考文献

- Lefebvre AM, Paulweber B, Fajas L, Woods J, McCrory C, Colombel JF, Najib J, Fruchart JC, Datz C, Vidal H, Desreumaux P, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrin* 1999; 162: 331-340
- Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Maffia P, Patel NSA, Paola RD, Ialenti A, Genovese T, Hatterjee PK, Rosa MD, Caputi AP, Thiemermann C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator activated receptor- γ , reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004; 483:79-93
- Nakajima A, Wada K, Miki H, Kubota N, Nakajima N, Terauchi Y, Ohnishi S, Saubermann LJ, Kadowaki T, Blumaerg RS, Nagai R, Matsushashi N. Endogenous PPAR γ mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology* 2001; 120: 460-469
- Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi Y, Kadowaki T, Aburatani H, Matsushashi N, Nagai R, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 330-339
- 邓长生, 夏冰, 陈德基, 周燕, 龚玲玲, 高志清. 超氧化物歧化酶对大鼠乙酸性结肠炎黏膜的保护作用. *中国病理生理杂志* 1994; 10: 23-26
- Dubuquoy L, Jansson EA, Deeb S, Rakotobe S, Karoui M, Colombel JF, Auwerx J, Pettersson S, Desreumaux P. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2003; 124: 1265-1276
- Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur

■应用要点

这个实验是我对“老药新用”的一种尝试, TZD类药物已作为比较成熟的药物用于2型糖尿病的治疗, 如果有更多更成熟的前期研究和后期临床试验证明该类药物对IBD也有效, 那么他也将为越来越多的IBD患者提供福音.

■同行评价

本文研究了大鼠溃疡性结肠炎模型经罗格列酮治疗后肠黏膜NF-B、ICAM-1表达的变化及MPO活性的变化,课题设计对于研究溃疡性结肠炎发病机制和相应的治疗有一定意义。

- M, Englaro W, Schooljans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx J. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid x receptor(RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR) heterodimer: a basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001; 193: 827-838
- 8 Wada K, Nakajima A, Blumberg RS. PPAR and inflammatory bowel disease: a new therapeutic target for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Trends Mol Med* 2001; 7: 329-331
- 9 Wu GD. Is there a role for PPAR gamma in IBD? Yes, no, maybe. *Gastroenterology* 2003; 124: 1538-1542
- 10 Auwerx J. Nuclear receptors. I. PPAR gamma in the gastrointestinal tract: gain or pain? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 282: G581-G585
- 11 Su CG, Wen XM, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keibaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD. A novel therapy for colitis utilizing PPAR- γ ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999; 104: 383-389
- 12 Lastra CA, Sanchez-Fidalgo S, illegas I, Motilva V. New pharmacological perspectives and therapeutic potential of PPAR- γ agonists. *Curr Pharmac Des* 2004; 10: 3505-3524
- 13 Bailey ST, Ghosh S. 'PPAR'ing ways with inflammation. *Nat Immunol* 2005; 6: 966-967
- 14 Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor κ B in inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 477-484
- 15 马锋振, 马洪升. 炎症性肠病炎症过程中ICAM-1的表达及作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1014-1016
- 16 Sasaki M, Jordan P, Welbourne T, Minagar A, Joh T, Itoh M, Elrod JW, Alexander, JS. Troglitazone, a PPAR- γ activator prevents endothelial cell adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion mediated by TNF- α . *BMC Physiol* 2005; 5: 3
- 17 Assche G, Rutgeerts P. Antiadhesion molecule therapy in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8: 291-300

电编 李琪 编辑 菅鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》

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

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期8, 18, 28日, 页码160, 月价72.00, 年价864元. 欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅. 联系地址: 100023 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社. 联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

腹部外科脓毒症临床救治258例

岳茂兴, 李成林, 李学彪, 刘志国, 杨鹤鸣, 姜玉峰, 张诗琳

岳茂兴, 李成林, 李学彪, 刘志国, 杨鹤鸣, 姜玉峰, 张诗琳, 中国人民解放军第306医院腹部外科中心 北京市 100101
总装备部卫生局重点科研课题资金资助项目, No. 9521086
通讯作者: 岳茂兴, 100101, 北京市朝阳区安翔北路九号, 中国人民解放军第306医院腹部外科中心. yuemx@ns.cetin.net.cn
电话: 010-66354546-0
收稿日期: 2005-09-10 接受日期: 2005-9-30

Clinical treatment of severe sepsis in abdominal surgery: an analysis of 258 cases

Mao-Xing Yue, Cheng-Lin Li, Xue-Biao Li, Zhi-Guo Liu, He-Ming Yang, Yu-Feng Jiang, Shi-Lin Zhang

Mao-Xing Yue, Cheng-Lin Li, Xue-Biao Li, Zhi-Guo Liu, He-Ming Yang, Yu-Feng Jiang, Shi-Lin Zhang, Abdominal Surgical Center of the 306th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100101, China
Supported by the Key Program Foundation of Public Health Bureau of the General Reserve Department of Chinese PLA, No.9521086
Correspondence to: Mao-Xing Yue, Abdominal Surgical Center of the 306th Hospital of Chinese PLA, 9 Anxiangbei Road, Chaoyang District, Beijing 100101, China. yuemx@ns.cetin.net.cn
Received: 2005-09-10 Accepted: 2005-09-30

Abstract

AIM: To explore a compositive treatment for reducing the mortality rate of the severe sepsis in abdominal surgery.

METHODS: While general treatment was performed, 14 concrete measures were carried out in accordance with the following factors: inflammatory mediator, bacteria, extoxin and endotoxin, dysfunction of microcirculation, immunity, nutrition, metabolism, basic diseases, and the function of organs. The combination of high dosage of anisodaminum and dexamethason was used in the short-term treatment. The nutrition support was used according to different stages of multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Jiedu Guben Tang* was orally administrated to regulate the imbalance of immunity and the inflammatory mediators.

RESULTS: A total of 30 patients were died in the 258 patients, and the mortality rate was 11.62%.

CONCLUSION: The new compositive treatment can significantly reduce the mortality of severe sepsis in abdominal surgery.

Key Words: Severe sepsis; Mortality; Surgery; Compositive treatment; Nutrition support

Yue MX, Li CL, Li XB, Liu ZG, Yang HM, Jiang YF, Zhang SL. Clinical treatment of severe sepsis in abdominal surgery: an anlysis of 258 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(1):109-113

摘要

目的: 探索降低腹部外科脓毒症患者病死率的具体综合治疗措施。

方法: 整体治疗时, 在“炎症介质、细菌、内外毒素、微循环、免疫功能、营养代谢、基础疾病、脏器功能”等方面进行兼顾和并治, 相应实施14条具体治疗措施。提出了短程山莨菪碱联用地塞米松为主的综合救治方案; 提出并应用“分阶段代谢营养支持”治疗, 减少严重并发症的发生率; 采用自制的“解毒固本汤”配合治疗, 以改善免疫紊乱状态、调控炎症介质等。

结果: 本组腹部外科脓毒症258例患者, 总计死亡30例, 死亡率为11.62%。

结论: 采用综合救治新对策能降低腹部外科脓毒症的死亡率。

关键词: 脓毒症; 死亡率; 外科手术; 综合救治; 营养代谢支持

岳茂兴, 李成林, 李学彪, 刘志国, 杨鹤鸣, 姜玉峰, 张诗琳. 腹部外科脓毒症临床救治258例. *世界华人消化杂志* 2006;14(1):109-113
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/109.asp>

0 引言

外科脓毒症几乎都与创伤、失血、休克、感染、脓毒症或其他急性应激状态有关, 且多伴有全身炎症反应综合征(SIRS), 严重者发生多器

■背景资料

外科脓毒症是目前国内外医学界研究的热点和难点, 尽管现代外科治疗手段日新月异, 但近20年外科脓毒症的死亡率并未见明显降低, 因此努力提高外科脓毒症的诊断和救治水平已是当务之急。2002-10, 欧洲危重病医学会(ESICM)、危重病医学会(SCCM)和国际脓毒症论坛提出了巴塞罗那宣言, 共同呼吁采取措施, 争取在今后5年内将脓毒症的死亡率降低25%。

号转导过程, 其中TLR2和TLR4的作用尤为显著. 目前已证实, 丝裂素活化蛋白激酶、JAKs激酶/信号转导和转录激活子、核因子- κ B等信号通路均与受体的活化有关. 细菌及其毒素等均可引起免疫与炎性细胞内上述通路的活化, 在细胞生理和病理反应中发挥着重要调控作用. 外科脓毒症常伴有凝血功能的异常改变, 而出现弥漫性血管内凝血(DIC)则被认为是外科感染严重程度的标志. 人们注意到凝血系统对感染的发病过程具有重要影响, 它与炎症反应相互促进, 共同构成SIRS/脓毒症发生、发展中的关键因素. 抑制异常凝血反应可以影响炎症和脓毒症的病理进程, 具有一定的治疗效果. 重组人体活化蛋白C的国际性多中心临床试验已经初步发现可以明显降低严重感染患者的死亡率^[11-13].

近年来, 随着人类基因组研究的不断深入, 人们逐渐认识到遗传学机制的差异性是许多疾病发生、发展中内因的物质基础. 有资料证实, 基因多态性(基因组序列上的变异)是决定人体对应激打击易感性与耐受性、临床表型多样性及药物治疗反应差异性的重要因素. 目前, 通过对创伤后并发严重感染并发症患者重要炎症介质基因型分析, 发现TNF、白介素(IL)-1及其受体拮抗剂(IL-1ra)、IL-10、CD14、Toll样受体、人白细胞抗原(HLA)等均存在基因多态性, 这可能为感染易感人群的早期识别、预后分析和基因治疗提供新的理论依据^[1]. 业已明确, 外科脓毒症的发生与发展涉及机体多个系统功能改变, 不仅仅与炎症失控相关, 还牵涉到神经系统、内分泌调节、免疫系统、凝血系统等以及它们之间的相互作用. 内分泌系统是其中关键的影响因素之一, 通过调节内分泌系统功能可以间接的对机体的其他方面进行调控, 从而达到治疗严重并发症的目的^[14-17].

3.2 脓毒症治疗指南与我国中西医结合治疗特色相融合十分重要 国际上脓毒症治疗指南是建立在循证医学基础提出的, 具有一定的合理性和可操作性, 而我国的中西医结合治疗特色也有一定的效果, 二者有机地结合起来, 可使治疗效果更佳. 治疗指南中提出的早期复苏, 抗生素治疗, 液体治疗, 评估和控制感染灶, 糖皮质激素的应用, 血糖控制, 肾脏替代治疗等等, 在临床治疗中有指导意义. 我们在本组患者的治疗中体会到 " 抗生素、外科手术及引流、营养代谢支持和加强监护治疗 " 是处理腹腔严重脓毒症的四大支柱. 其预防性治疗措施的关键是清除和控制引起败

血症的炎症, 感染和脓肿, 早期应用抗生素虽可防止脓肿的形成, 但一旦发现脓肿应立即切开引流或穿刺置管引流. 然而这种能导致MODS的感染灶, 只有在少数的情况下可以单靠抗生素逆转, 挽救这类患者唯一的可能性是设法找到化脓灶并给予彻底引流^[18].

3.3 采用序贯性抗生素治疗外科脓毒症 序贯性抗生素治疗包括三个给药阶段: (1)在取得培养及药敏报告前, 应按照经验性抗生素方案给药, 抗生素的应用应该能覆盖引起感染的所有致病菌, 采用对肝、肾功能影响极小的抗生素, 如抗厌氧菌的甲硝唑或替硝唑和抗需氧菌的第三代头孢菌素, 对腹腔严重感染的致病菌特别有效. (2)经3-4 d取得药敏报告后, 应选用针对性更强的抗生素治疗以取得最佳的疗效, 并需预防二重感染的发生. (3)在抗生素治疗后5-7 d, 患者情况明显好转, 可开始考虑改换口服治疗, 以巩固疗效. 这与指南中提出的治疗方案基本是一致的. 本组258例腹部外科脓症患者采用序贯性抗生素治疗169例, 死亡17例, 死亡率为10.05%. 常规治疗组89例, 死亡13例, 死亡率为14.60%. 两组经 t 检验, 差异有显著性意义($P<0.01$).

3.4 从阻断全身炎症反应来防治外科脓毒症 国际上多项采用单纯拮抗炎症介质等临床试验相继失败, 有的甚至显示有害作用. 动物实验研究与临床试验大相径庭的结果值得反思, 暴露了人们对复杂机体反应过程认识的局限性和片面性. 这是因为体内众多炎症介质与细胞相互作用构成极其复杂的 " 系统工程 ", 它们在机体炎症反应和免疫调节中具有多方向性协同或拮抗效应. 因此, 有必要从调节全身炎症反应及免疫机能等方面入手来探索防治外科脓毒症的新途径. 而传统中医中药, 如通里攻下加清热解毒, 活血化瘀、通腑清肠之法, 方药采用大承气汤、大陷胸汤、桃红承气汤等加减临床验证有较好的疗效. 临床和实验证实, 传统中医中药具有多途径、多靶点、多环节发挥治疗作用的特点, 但需要应用循证医学的理论和方法进行验证. 我们在临床救治中采用自己研制的 " 解毒固本冲剂 ". 成分及用量: 黄连15 g、栀子15 g、黄芩15 g、柴胡15 g、生地15 g、甘草15 g、连翘15 g、牛蒡子15 g、玄参15 g、僵蚕15 g、知母15 g、羌活15 g、荆芥15 g、防风15 g、大黄8 g等, 3次/d口服. 取得了满意的治疗效果. 临床和实验证实, 它具有多途径、多靶点、多环节发挥治疗作用的特点^[19].

3.5 采用分阶段代谢营养支持及免疫营养支持治

■创新盘点

首次提出山茱萸碱联用地塞米松结合外科手术的中西医结合新疗法应用于腹部外科脓毒症的救治, 二者联用得当, 能促进改善微循环及抗体克作用, 能扼止危重状态进展, 为紧急手术和下一步的治疗赢得时间. 采用中药黄连、黄芩、柴胡、人参、大黄为主的 " 解毒固本汤 " 配合治疗, 调理了全身炎症反应, 改善免疫紊乱状态. 提出和应用了分阶段代谢营养支持治疗方法, 降低了严重并发症的发生率, 提高了腹部外科危重症的救治成功率.

■应用要点

本文指出“抗生素、外科手术及引流、营养代谢支持和加强监护治疗”是处理腹腔严重脓毒症的四大支柱。其预防性治疗措施的关键是清除和控制引起败血症的炎症、感染和脓肿，早期应用抗生素虽可防止脓肿的形成，但一旦发现脓肿应立即切开引流或穿刺置管引流。然而这种能导致MODS的感染灶，只有在少数情况下可以单靠抗生素逆转，挽救这类患者唯一的可能性是设法找到化脓灶并给予彻底引流。

疗 外科脓毒症患者的代谢功能改变和所谓特殊代谢底物的失衡，可能是影响预后的关键所在。所以，采用分阶段代谢营养支持及免疫营养支持治疗，补充谷氨酰胺能降低外科脓症患者感染的发生率，强化胰岛素治疗，严格控制危重患者血糖水平在正常水平则可以使危重患者的死亡率降低34%，血行性感染发生率降低46%。完全的代谢营养支持治疗能保护和支撑器官的功能，能推进各种代谢通路，使患者的高分解代谢得到逆转，这对其他综合治疗措施的施行有着重要的临床意义。我们采用分阶段代谢营养支持治疗^[6]。(1)第一阶段即患者处于高度应激状态、有效循环量、水盐电解质平衡得到初步处理后，但胃肠功能仍处在明显障碍时，应采用完全的胃肠外营养(TPN)，患者每日应该从中心静脉或周围静脉注入TPN营养液，人体白蛋白强化治疗对提高机体的免疫能力有一定帮助，应积极加以补充。(2)第二阶段即病情有缓解，胃肠道功能有明显恢复时，可肠内、肠外营养同时进行，其配方应合理组合，肠内营养可给予易于消化和吸收的要素饮食，如能全素、安素、爱伦多等。(3)第三阶段即病情得到完全控制，胃肠道功能完全恢复时，逐步过渡直至全部应用肠内营养。代谢支持的重点是尽可能保持正氮平衡，而非普通的热量供给。MODS时较为特殊的代谢特点主要是一方面机体处在代谢紊乱及营养素利用障碍状态，急需给予补充；另一方面由于多器官功能障碍时，不能有效地利用营养素及排出代谢产物。对此应采用分阶段代谢营养支持治疗。

3.6 短程山莨菪碱联用地塞米松为主的综合救治方案 (1)山莨菪碱: 0.33 mg/(kg·次); 3/d. 地塞米松: 0.33 mg/(kg·次); 3/d. 也可在去除病因并积极支持各主要器官功能基础上，联合大剂量应用地塞米松(40 mg/8 h)、654-2(20 mg/8 h)连续3 d. 它有扼止危重状态进展，促进症状缓解，为紧急手术和下一步的治疗赢得时间，改善微循环及良好的降温、抗毒、抗炎、抗休克作用，对重要脏器无损伤作用。降低了死亡率。研究证实山莨菪碱联用地塞米松是通过增加微循环内灌注量和微循环内微粒移动的数量及扩张微血管而达到改善组织氧供、改善微循环及减少微血栓形成的目的^[20]。小剂量较长时间补充外源性糖皮质激素有助于脓毒性休克的恢复，有可能降低死亡率。由于氯化可的松注射液中含500 mL/L的乙醇，可影响中枢神经系统功能和血流动力学，加重肝解毒负担，在外科脓毒症并发MODS时宜少用。

腹部外科脓毒症救治中的综合治疗至关重要，其综合治疗措施在实际抢救过程中要根据具体情况，根据患者的个体差异，适当调整用药剂量和顺序，以便获得最佳救治效果。综合治疗措施并不等于各种治疗方法的简单叠加，而是考虑和注意到了各种治疗方法疗效的互补性，从而避免了疗效的拮抗和毒副作用的叠加。本治疗措施兼顾了腹腔严重脓毒症致MODS患者的“炎性介质、细菌、内外毒素、微循环障碍、免疫功能失调、营养代谢紊乱、基础疾病、脏器功能”八个主要方面，相应实施14条具体治疗措施，为临床综合治疗腹部外科脓毒症患者提供了一条途径。腹部外科脓毒症治疗困难，死亡率高，治疗的关键应该是^[21,22]：一是要针对原发疾病进行有效的治疗，二是要努力调控过度的炎性反应及异常的免疫反应，三是要积极治疗内毒素血症，四是要对慢性基础疾病进行有效的调控。

总之，腹部外科脓毒症(特别是脓毒症和MODS等严重并发症)是制约外科救治水平进一步提高的难题，加强对腹部外科脓毒症的防治研究，降低他的病死率是新世纪的呼唤。

4 参考文献

- 1 岳茂兴. 山莨菪碱联用地塞米松治疗腹部外科疾病并发MODS临床研究的操作方案. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1566-1568
- 2 岳茂兴, 李成林, 赵尔增, 李新元, 李学彪, 冯凯, 张诗琳, 薛亮, 张连春, 罗放, 王新明, 张圭显. 山莨菪碱及地塞米松对MODS时微循环及免疫病理学改变的实验研究. 中华外科杂志 1997; 35: 392-396
- 3 岳茂兴, 李学彪, 张连春, 杨鹤鸣, 姜玉峰, 李建忠. 腹部外科疾病并发MODS患者109例的救治研究. 世界华人消化杂志 1999; 7: 815-816
- 4 岳茂兴. 胃肠道功能障碍及衰竭的诊断和治疗. 世界华人消化杂志 2002; 6: 135-138
- 5 岳茂兴, 李学彪, 张连春, 杨鹤鸣, 姜玉峰, 李建忠. 降低腹部外科疾病并发多脏器功能障碍综合征患者病死率的临床救治研究. 世界华人消化杂志 2000; 12: 624-625
- 6 岳茂兴. 腹部外科疾病并发MODS的代谢特点及分阶段营养支持治疗. 中国危重病急救医学杂志 2003; 15: 29-31
- 7 岳茂兴, 李成林, 张连春, 李学彪, 张圭显, 张诗琳. 短程大剂量山莨菪碱及地塞米松救治外科危重病人186例. 解放军医学 1996; 21: 401-403
- 8 姚咏明, 盛志勇. 我国创伤脓毒症基础研究新进展. 中华创伤杂志 2003; 19: 9-12
- 9 Hu S, Sheng ZY, Zhou BT. Study on delay two phase multiple organ dysfunction syndrome. *Chin Med J* 1998; 111: 101-108
- 10 岳茂兴, 杨志焕, 夏亚东. 建立冲击伤复合液体火箭推进剂中毒模型的实验研究. 中华创伤杂志 2001; 17: 431
- 11 姚咏明, 盛志勇. 重视对脓毒症本质的探讨. 中华急诊医学杂志 2005; 14: 185-186
- 12 Poole GV, Muakkass FF, Griswold JA. The role of

- infection in outcome of multiple organ failure. *Am Surg.* 1993;59:727
- 13 Cobb JP, O'Keefe GE. Injury research in the genomic era. *Lancet* 2004; 363: 2076-2083
- 14 Dellinger PR, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving sepsis campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2004; 32: 858- 873
- 15 Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344: 699-709
- 16 Keh D, Sprung CL. Use of corticosteroid therapy in patients with sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004; 32: S527-S533
- 17 Chaudry IH, Hubbard WJ, Schwacha MG. Alterations in mitochondrial function following shock. *Shock* 2005; 23: 1-6
- 18 岳茂兴, 李成林, 李学彪. 腹部外科疾病并发MODS的临床救治研究. *中华急诊医学杂志* 2001; 10: 133-136
- 19 姜玉峰, 岳茂兴. 解毒固本汤对CLP大鼠TNF、IL-2及病理形态学的影响. *中国中西医结合学会急救医学杂志* 2000; 59: 39-41
- 20 岳茂兴, 刘志国, 刘保池, 赵新健, 杨永丰, 程连房, 谢晓华, 路小光, 化楠, 李建忠. 山莨菪碱联用地塞米松治疗腹部外科疾病并发MODS 119例的临床研究. *中华急诊医学杂志* 2005; 14: 836-838
- 21 Yue MX. A new combined therapy to 15 patients with multiple organ failure in abdominal-surgery. *China Natl J New Gastroenrol* 1996; 2: 6-8
- 22 岳茂兴. 腹腔严重感染致MODS的临床救治新对策. *世界华人消化杂志* 2003;12:298-299

■同行评价
有实际应用价值.

电编 李琪 编辑 管鑫妍 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

·消息·

2004年度中国科技论文统计结果

自1987年以来, 中国科学技术信息研究所一直承担着中国科技人员在国内外发表论文数量和影响的统计分析工作. 2005年的科技论文与引文统计工作现已完成.

国际论文数据主要取自国际上颇具影响的检索工具:《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP), 今年新增增加了对美国《医学索引》(MEDLINE)的统计分析. 同时首次对SSCI收录的社会科学论文进行了总体统计.

国内论文数据取自中国科学技术信息研究所研制的《中国科技论文与引文数据库》(CSTPCD), 该数据库2004年度收录的中国科技论文统计源期刊共1608种.

美国《医学索引(Index Medicus/MEDLINE)》创刊于1879年, 由美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)编辑出版, 收录世界70多个国家和地区, 40余种文字的4800种生物医学及相关学科期刊, 是当今世界较权威的生物医学文献检索系统, 收录文献反映了全球生物医学领域较高水平的研究成果. 该系统有较为严格的选刊程序和标准, 我国大陆目前有75种期刊被该系统收录. 2004年该系统共收录中国论文18962篇.

2004年SCI收录的中国大陆论文中, 国际合作产生的论文为11963篇, 占我国发表论文总数的20.8%, 所占比例比2003年减少了2.8个百分点; 我国作者为第一作者的国际合著论文6599篇, 合作伙伴涉及71个国家(地区); 其他国家作者为第一作者、我国作者参与工作的国际合著论文为5364篇, 合作伙伴涉及64个国家(地区).

2004年我国科技人员在国内科技期刊上共发表论文309952篇, 比2003年增加35514篇, 增长12.9%; 海外作者在我国刊物上发表论文1472篇, 比2003年增加278篇.

未确定型结肠炎的诊断与治疗

江学良



江学良, 男, 医学博士, 科技部科技期刊评审专家, 中英国国际炎症性肠病研究中心负责人, 济南军区优秀青年科技干部。《溃疡性结肠炎》和《溃疡性结肠炎现代诊疗手册》主编, 溃疡性结肠炎网(<http://www.chinaibd.com.cn>)首席医学专家, 《世界华人消化杂志》、《中华腹部疾病杂志》、《家庭用药》等8家杂志共同主编和常务编委, 在《World Journal of Gastroenterology》等杂志发表论文50余篇, 主要研究方向为溃疡性结肠炎和消化内镜, 获军队及省部级科技成果奖6项, 在国内建立了溃疡性结肠炎研究协作中心、患者康复俱乐部和免费的专家会诊信箱(jiangxueliang678@126.com), 并与英国牛津大学合作成立了中英国国际炎症性肠病中心。

通讯作者: 江学良, 250031, 山东省济南市师范路25号, 济南军区总医院消化科, jiangxueliang678@126.com
收稿日期: 2005-12-22 接受日期: 2006-01-06

0 引言

未确定型结肠炎在临床实践中并不少见, 该型结肠炎既不同于溃疡性结肠炎和克罗恩病, 也不同于临床上常见的慢性感染性结肠炎。但由于目前还没有一个统一的标准, 诊断和治疗很不规范, 有的将其归于溃疡性结肠炎或克罗恩病, 有的按慢性感染性腹泻治疗。我们根据自己的实践, 提出了未确定型结肠炎的诊断和治疗建议, 供参考。

1 概念

未确定型结肠炎是指原因不明的非特异性结肠炎症性病变, 但不包括溃疡性结肠炎、克罗恩病、嗜酸性结肠炎、显微镜下结肠炎、一过性结肠炎、孤立性直肠溃疡、白塞病等相对独立的疾病。由于原因不明是一个相对的和暂时的概念, 因此, 未确定型结肠炎可能是一类疾病, 在目前阶段, 尚没有一个统一的标准。

2 诊断

同溃疡性结肠炎一样, 本病的诊断首先必须排除一切原因明确的结肠炎症性病变, 应用甲硝唑、吡哌酸、黄连素等药物治疗无效, 同时具有以下表现:

2.1 临床表现 患者可以有腹痛、腹泻、大便次数或/和性状改变, 包括大便带黏液, 甚至有脓血, 伴或不伴里急后重感, 但一般没有发热等症状。

2.2 肠镜表现 黏膜可呈弥漫性或局灶性充血水

肿, 血管纹理模糊, 反光增强, 黏膜脆弱, 易出血, 伴或不伴糜烂, 但无溃疡。

2.3 组织学表现 黏膜固有层中有炎症细胞浸润, 主要以单核细胞(包括淋巴细胞)为主, 中性粒细胞较少, 伴或不伴隐窝上皮受累, 但无隐窝脓肿形成。

2.4 其他检查 大便检查: 常规及特殊培养连续3次阴性, 溶组织阿米巴滋养体及病毒学检查阴性, 多次粪便集卵检查阴性。白细胞计数基本正常, 自身免疫性抗体检查阴性。

3 鉴别诊断

本病病因不明, 缺乏特异性诊断指标, 所以在作出诊断前, 必须排除与其症状相关的疾病。因此, 鉴别诊断在本病的诊断中十分重要。需与本型结肠炎鉴别的肠道疾病很多, 现将比较常见的疾病鉴别简述如下:

3.1 感染因素引起的结肠炎 除了比较常见的慢性细菌性痢疾、病毒性肠炎、沙门菌结肠炎、大肠杆菌性肠炎、肠道真菌病、肠结核、肠道寄生虫病(结肠血吸虫病、肠阿米巴病)外, 还需排除一些少见的感染性肠炎, 特别对应用甲硝唑、吡哌酸、黄连素等药物治疗有效的结肠炎, 尤其需要排除感染性因素。

3.2 非特异性结肠炎症性病变 主要与溃疡性结肠炎、克罗恩病、胶原性结肠炎(结肠黏膜上皮出现胶原性带状沉积物)、嗜酸性结肠炎、显微镜下结肠炎(临床上有慢性腹泻, X线钡剂灌肠和结肠镜检查无异常改变, 仅在显微镜下发现肠黏膜固有层内有非特异性炎性细胞浸润)、一过性结肠炎(又称自限性结肠炎)、白塞病等相鉴别。

3.3 特异性非感染性结肠炎症性病变 如继发于血管灌注不足所致的炎症缺血性结肠炎、结肠梗阻时的结肠炎等。

3.4 与动力学障碍有关的炎症 如憩室炎、孤立性直肠溃疡等。

3.5 治疗性介入治疗措施所致的炎症 如放射性照射、灌肠与缓泻剂、药物性、移植物抗宿主

病、造口前肠炎等。

3.6 其他 尚应与肠易激综合征、大肠癌、结肠息肉病、代谢性疾病(如溶血-尿毒症综合征)等病鉴别。

4 对症治疗

4.1 止痛药物 若以白天疼痛为主,大便次数基本正常,给罗通定30-60 mg,3次/d,若以夜间或晨起疼痛为主,则可在睡觉前服罗通定60 mg.若腹痛为阵发性绞痛伴腹泻,可给予莨菪片10 mg,3次/日,若患者同时伴有烦躁、焦虑、夜间睡眠差,可加用谷维素10 mg,3次/d.

4.2 止泻药物 若腹泻症状不严重,则不需用药,如果腹泻次数较多,影响生活质量,可短期应用易蒙停等药物。

5 特色治疗

主要采用非特异性抗炎治疗,可给予新型5-氨基水杨酸前体药物,如巴柳氮钠口服,Lg,2次/d,我

们应用巴柳氮钠治疗8例经对症治疗无效的患者,临床症状均明显缓解,4-8 wk为一疗程,症状缓解后停药观察.反复发作的病例可给予维持治疗。

该型结肠炎一般预后良好,但要注意随访,尤其是反复发作或疗效不好的患者,有的可以发展为典型的溃疡性结肠炎或克罗恩病,有的则为其他原因引起的结肠炎症性病变。

总之,未确定型结肠炎是指原因不明的非特异性结肠炎症性病变(不包括溃疡性结肠炎和克罗恩病).该型结肠炎的诊断强调排除性和综合性的原则,治疗方面可给予对症治疗和非特异性抗炎治疗(如5-氨基水杨酸类药物巴柳氮钠口服,2 g/d),中医中药也有较好疗效.预后一般较好,但要注意随访。

6 门诊时间

特需门诊、专家会诊和视频会诊请通过以下专家会诊信箱预约:jiangxueliang678@126.com

电编 李琪 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

技法与经验

本刊讯《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏,及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验.我们热烈欢迎各位作者踊跃投稿,免费刊登彩色照片.写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法 1.1 原理; 1.2 适应证; 1.3 器材准备; 1.4 步骤; 1.5 实例

2 结果

3 讨论 3.1 并发症; 3.2 优点和缺点; 3.3 经验与技巧

4 参考文献

世界华人消化杂志投稿须知

《世界华人消化杂志》为保证期刊的学术质量,对所有来稿均进行同行评议,是一份被中国科技论文统计源核心期刊、中文核心期刊要目总览收录的学术类期刊。

1 投稿总则

1.1 性质 世界华人消化杂志®, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 大16开, 旬刊, 每期160页, 定价24元, 全年864元, 邮发代号82-262, 由世界胃肠病学杂志社出版。世界华人消化杂志主要报道消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化病理、消化预防医学、消化护理、消化医学、影像消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化诊断指南、消化治疗指南、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。世界华人消化杂志被国际权威检索系统美国《化学文摘》(Chemical Abstracts, CA)、荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBase/Excerpta Medica, EM)》和俄罗斯《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》收录。国内为中国科技论文统计与分析(科技部列选为中国科技论文统计源期刊)、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国学术期刊文摘、中国生物医学文献光盘数据库、中文科技资料目录医药卫生、解放军医学图书馆CMCC系统、中国医学文摘外科学分册(英文版)、中国医学文摘内科学分册(英文版)收录。2005年版中国科技期刊引证报告:《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位。《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01。世界华人消化杂志荣获2001、2003年度百种中国杰出学术期刊称号。

1.2 栏目 述评, 食管癌, 胃癌, 肝癌, 病毒性肝炎, 大肠癌, 幽门螺杆菌, 基础研究, 临床研究, 焦点论坛, 文献综述, 研究快报, 临床经验, 病例报告, 会议纪要。文稿应具科学性、先进性、可读性及实用性, 重点突出, 文字简练, 数据可靠, 写作规范, 表达准确。专家述评4 000字以内, 研究原著6 000字以内, 焦点论坛4 000字以内, 文献综

述6 000字以内, 研究快报4 000字以内, 临床经验1 800字以内, 病例报告800字以内。

2 撰稿要求

2.1 总体标准 文稿撰写应遵照国家标准GB7713科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式, GB6447文摘编写规则, GB7714文后参考文献著录规则, GB/T 3179科学技术期刊编排格式等要求; 同时遵照国际医学期刊编辑委员会(International Committee of Medical Journal Editors)制定的《生物医学期刊投稿的统一要求(第5版)》(Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals)。见: *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47。

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

2.3 外文字符 注意大小写正斜体与上下角标。

静脉注射iv, 肌肉注射im, 腹腔注射ip, 皮下注射sc, 脑室注射icv, 动脉注射ia, 口服po, 灌胃ig.s(秒)不能写成S, kg不能写成Kg, mL不能写成ML, lcpm(应写为1/min)÷E%(仪器效率)÷60=Bq, pH不能写PH或P^H, *H pylori*不能写成HP, $T_{1/2}$ 不能写成tl/2或T₂¹, Vmax不能Vmax, μ 不写为英文u. 需排斜体的外文字, 用斜体表示. 如生物学中拉丁学名的属名与种名, 包括亚属、亚种、变种. 如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*), *Ilex pubescens* Hook, et Arn.var.*glaber* Chang(命名者勿划横线); 常数K; 一些统计学符号(如样本数n, 均数mean, 标准差SD, F检验, t检验和概率P, 相关系数r); 化学名中标明取代位的元素、旋光性和构型符号(如N, O, P, S, d, l)如n-(normal, 正), N-(nitrogen, 氮), o-(ortho, 邻), O-(oxygen, 氧, 习惯不译), d-(dextro, 右旋), p-(para, 对), 例如n-butyl acetate(醋酸正丁酯), N-methylacetanilide(N-甲基乙酰苯胺), o-cresol(邻甲酚), 3-O-methyl-adrenaline(3-O-甲基肾上腺素), d-amphetamine(右旋苯丙胺), l-dopa(左旋多巴), p-aminosalicylic acid(对氨基水杨酸). 拉丁字及缩写in vitro, in vivo, in situ; Ibid, et al, po, vs; 用外文字母代表的物理量, 如m(质量), V(体积), F(力), p(压力), W(功), v(速度), Q(热量), E(电场强度), S(面积), t(时间), z(酶活性, kat), t(摄氏温度, °C), D(吸收剂量, Gy), A(放射性活度, Bq), ρ (密度, 体积质量, g/L), c(浓度, mol/L), ϕ (体积分数, mL/L), w(质量分数, mg/g), b(质量摩尔浓度, mol/g), l(长度), b(宽度), h(高度), d(厚度), R(半径), D(直径), T_{max} , C_{max} , Vd, $T_{1/2}$ CI等. 基因符号通常用小写斜体, 如ras, c-myc; 基因产物用大写正体, 如P16蛋白.

2.4 计量单位 采用国际单位制并遵照有关国家标准, GB3100-3102-93量和单位. 原来的“分子量”应改为物质的相对分子质量. 如30 kD改为M_r 30 000(M大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用分子质量, 其单位是ku, “原子量”应改为相对原子质量, 即A_r(A大写斜体, r小写正体, 下角标); 也可采用原子质量, 其单位是u(小写正体). 计量单位在+、-、±及-后列出. 如37.6±1.2°C, 45.6±24岁, 56.4±0.5 d. 3.56±0.27 pg/ml 应为3.56±0.27 ng/L, 131.6±0.4 mmol/L, t=28.4±0.2°C. BP用kPa, RBC数用×10¹²/L, WBC数用×10⁹/L, WBC构成比用0.00表示, Hb用g/L. M_r明确的体内物质以mmol/L, nmol/L或mmol/L表示, 不明确者用g/L表示. 1 M硫酸, 改

为1 mol/L硫酸, 1 N硫酸, 改为0.5 mol/L硫酸. 长10 cm, 宽6 cm, 高4 cm, 应写成10 cm×6 cm×4 cm. 生化指标一律采用法定计量单位表示, 例如, 血液中的总蛋白、清蛋白、球蛋白、脂蛋白、血红蛋白、总脂用g/L, 免疫球蛋白用mg/L; 葡萄糖、钾、尿素、尿素氮、CO₂结合力、乳酸、磷酸、胆固醇、胆固醇酯、三酰甘油、钠、钙、镁、非蛋白氮、氯化物; 胆红素、蛋白结合碘、肌酸、肌酐、铁、铅、抗坏血酸、尿胆元、氨、维生素A、维生素E、维生素B₁、维生素B₂、维生素B₆、尿酸; 氢化可的松(皮质醇)、肾上腺素、汞、孕酮、甲状腺素、睾酮、叶酸用nmol/L; 胰岛素、雌二醇、促肾上腺皮质激素、维生素B₁₂用pmol/L. 年龄的单位有日龄、周龄、月龄和岁. 例如, 1秒, 1 s; 2分钟, 2 min; 3小时, 3 h; 4天, 4 d; 5周, 5 wk; 6月, 6 mo; 七年, 7 a; 雌性♀, 雄性♂, 酶活性国际单位IU=16.67 nkat, 对数log, 紫外uv, 百分比%, 升L, 尽量把1×10³ g与5×10⁷ g之类改成1 mg与0.5 mg, hr改成h, 重量γ改成mg, 长度m改成mm. 国际代号不用于无数值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)t检验用小写t; (2)F检验用英文大写F; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写r; (5)自由度用希文小写g; (6)样本数用英文小写n; (7)概率用英文斜体大写P. 在统计学处理中在文字叙述时平均数±标准差表示为mean±SD, 平均数±标准误为mean±SE. 统计学显著性用^aP<0.05, ^bP<0.01(P>0.05不注). 如同一表中另有一套P值, 则^cP<0.05, ^dP<0.01; 第三套为^eP<0.05, ^fP<0.01等.

2.6 数字用法 遵照国家标准GB/T 15835-1995出版物上数字用法的规定, 作为汉语词素者采用汉字数字, 如二氧化碳、十二指肠、三倍

《世界华人消化杂志》为中国科技论文统计源核心期刊(国家科技部, 2003年)和中文核心期刊要目总览(北京大学图书馆, 2004年版)收录的学术期刊. 世界胃肠病学杂志社, 100023, 北京市2345信箱辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wjcd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

World Journal of Gastroenterology 自2005-01-01起为周刊发行, 每月7、14、21、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-261. WJG出版的模式为开放存取+印刷版. 免费通过<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>获取, 即: 阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

体、四联球菌、五四运动、星期六等. 统计学数字采用阿拉伯数字, 如1 000-1 500 kg, 3.5 ± 0.5 mmol/L等. 测量的数据不能超过其测量仪器的精密度, 例如6 347意指6 000分之一的精密度. 任何一个数字, 只允许最后一位有误差, 前面的位数不应有误差. 在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差, 一般以SD的1/3来定位数, 例如3 614.5 \pm 420.8 g, SD的1/3达一百多g, 平均数波动在百位数, 故应写成 3.6 ± 0.4 kg, 过多的位数并无意义. 又如 8.4 ± 0.27 cm, 其SD/3=0.09 cm, 达小数点后第2位, 故平均数也应补到小数点后第2位. 有效位数以后的数字是无效的, 应该舍. 末尾数字, 小于5则舍, 大于5则进, 如恰等于5, 则前一位数逢奇则进, 逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍. 末尾时只可1次完成, 不得多次完成. 例如23.48, 若不要小数点, 则应成23, 而不应该23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24. 年月日采用全数字表达法, 请按国家标准GB/T 7408-94书写. 如1985年4月12日, 可写作1985-04-12; 1985年4月, 写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止, 写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止, 写作1985-04-12/06-16, 上午8时写作08:00, 下午4时半写作16:30. 百分数的有效位数根据分母来定: 分母 ≤ 100 , 百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq 1 000$, 百分数到小数点后1位; 余类推. 小数点前后的阿拉伯数字, 每3位间空1/4阿拉伯数字距离, 如1 486 800.475 65. 完整的阿位伯数字不移行!

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

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容, 鲜明而有特色, 阿拉伯数字不宜开头, 不用副题名, 一般20个字左右, 最好不超过26个字. 避免用“的研究”或“的观察”等非特定词.

3.2 作者 论文署名作者不宜过多, 一般不超过8人, 主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者, 对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中. 作者署名的次序按贡献大小排列, 多作者时姓名间用逗号, 如是单名, 则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格).

3.3 单位 作者后写单位的全称空1格后再写省市及邮政编码. 格式如: 张旭晨, 梅立新, 承德医学院病理教研室 河北省承德市 067000

3.4 第一作者简介 格式如: 张旭晨, 男, 1966-02-26生, 河北省定县人, 汉族. 1994年北京中医药大学硕士, 讲师. 主要从事消化系统疾病的病理研究.

3.5 基金资助项目 格式如: 国家自然科学基金资助项目, No.30224801

3.6 通讯作者 格式如: 通讯作者: 马连生, 030001, 山西省太原市双塔西街77号, 太原消化病研治中心. wjgd@wjgnet.com

电话: 0351-4078656 传真: 0351-4086337

收稿日期: 接受日期:

3.7 英文摘要

题名 文章的题名应言简意赅, 方便检索, 英文题名以不超过10个实词为宜, 应与中文题名一致.

作者 署名一般不超过8人. 作者姓名汉语拼音拼写法规定为: 先名, 后姓; 首字母大写, 双名之间用半字线“-”分开, 多作者时姓名间加逗号. 格式如: “潘伯荣”的汉语拼写法为“Bo-Rong Pan”.

单位 先写作者, 后写单位的全称及省市邮政编码. 例如: Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China

基金资助项目 格式如: Supported by National Natural Science Foundation of China, No.30224801

通讯作者 格式如: Correspondence to: Dr. Lian-Sheng Ma, Taiyuan Research and Treatment Center for Digestive Diseases, 77 Shuangta Xijie, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China. wjgd@wjgnet.com

收稿及接受日期 格式如: Received: Accepted:

摘要 包括目的、方法、结果、结论(AMRAC格式), 书写要求与中文摘要一致. 格式如下:

Abstract

AIM:

METHODS:

RESULTS:

CONCLUSION:

Zhang XC, Gao RF, Li BQ, Ma LS, Mei LX, Wu YZ, Liu FQ, Liao ZL. Effects of Weixibao nizhuanwan on gastric precancerous lesions 300 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14:

3.8 中文摘要 必须在300字左右,内容应包括目的(应阐明研究的背景和设想、目的),方法(必须包括材料或对象,应描述课题的基本设计,双盲、单盲还是开放性,使用什么方法,如何进行分组和对照,数据的精确程度,研究对象选择条件与标准是否遵循随机化、齐同化的原则,对照组匹配的特征,如研究对象是患者,应阐明其临床表现,诊断标准,如何筛选分组,有多少例进行过随访,有多少例因出现不良反应而中途停止研究),结果(应列出主要结果,包括主要数据,有什么新发现,说明其价值和局限,叙述要真实、准确、具体,所列数据经用何种统计学方法处理;应给出结果的置信区间和统计学显著性检验的确切值;概率写 P ,后应写出相应显著性检验值),结论(全文总结,准确无误的观点及价值),中文摘要格式如下:

摘要

目的:

方法:

结果:

结论:

张旭晨,高瑞丰,李炳庆,马连生,梅立新,吴玉珍,刘凤芹,廖振林.胃细胞逆转丸治疗胃癌前期病变300例. *世界华人消化杂志* 2006;14:

3.9 正文标题层次为 0引言;1 材料和方法,1.1 材料,1.2 方法;2 结果;3 讨论;4 参考文献.序号一律左顶格写,后空1格写标题;2级标题后空1格接正文.正文内序号连排用(1), (2), (3).

0 引言 应包括该研究的目的和该研究与其他相关研究的关系.

1 材料和方法 应尽量简短,但应让其他有经验的研究者能够重复该实验.对新的方法应该详细描述,以前发表过的方法引用参考文献即可,有关文献中或试剂手册中的方法的改进仅描述改进之处即可.

2 结果 实验结果应合理采用图表和文字表示,在结果中应避免讨论.

3 讨论 要简明,应集中对所得的结果做出解释

而不是重复叙述,也不应是大量文献的回顾.

图表 图表的数量要精选.表应有表序和表题,并有足够具有自明性的信息,使读者不查阅正文即可理解该表的内容.表内每一栏均应有表头,表内非公知通用缩写应在表注中说明,表格一律使用三线表(不用竖线),在正文中该出现的地方应注出.图应有图序、图题和图注,以使其容易被读者理解,所有的图应在正文中该出现的地方注出.同一个主题内容的彩色图、黑白图、线条图,统一用一个注解分别叙述.如:图1 萎缩性胃炎治疗前后病理变化. A: …; B: …; C: …; D: …; E: …; F: …; G: … . 曲线图可按●、○、■、□、▲、△顺序使用标准的符号.统计学显著性用:^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ ($P>0.05$ 不注).如同一表中另有一套 P 值,则^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;第3套为^e $P<0.05$,^f $P<0.01$. P 值后注明何种检验及其具体数字,如 $P<0.01$, $t = 4.56$ vs 对照组等,注在表的左下方.表内采用阿拉伯数字,共同的计量单位符号应注在表的右上方,表内个位数、小数点、±、-应上下对齐.“空白”表示无此项或未测,“-”代表阴性未发现,不能用同左、同上等.表图勿与正文内容重复.表图的标目尽量用 t/min , $c/(\text{mol/L})$, p/kPa , V/mL , $t/^\circ\text{C}$ 表达.黑白图请附黑白照片,并考入磁盘内;彩色图请提供冲洗的彩色照片,请不要提供计算机打印的照片.彩色图片大小 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$,必须使用双面胶条粘贴在正文内,不能使用浆糊粘贴.

致谢 致谢后加冒号,排在讨论后及参考文献前,左齐.

4 参考文献 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序.提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码.文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码.如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7].文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8].所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准,引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达,请附引用文献网上摘要打印件,包括PMID编号(摘要的左下方).按顺序编号装订,并考入磁盘内.在引用参考文献页码末尾注明PMID编号;无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者,请附首页复印件).期刊:序号,作者(列出全

《世界华人消化杂志》自2006-01-01起为旬刊发行,每月8、18、28日出版.北京报刊发行局发行,邮发代号:82-262.《世界华人消化杂志》出版的模式为开放存取+印刷版.免费通过<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>获取,即:阅读、下载、复制、打印和检索论文的全文.

World Journal of Gastroenterology 创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27 国科发信字(95)225号批准国内外公开发行. 1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号.

体作者). 文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页. 参考文献格式如下:

1 Ma LS, Pan BR. Strengthen international academic exchange and promote development of gastroenterology. *World J Gastroenterol* 1998; 4: 1 [PMID: 11819215]

2 马连生, 潘伯荣, 马景云. 世界胃肠病学杂志英文版的现状. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 855-863

3 Lam SK. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S, eds. *Ulcer disease: investigation and basis for therapy*. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450

4 尚克中, 陈九如. *胃肠道造影原理与诊断*. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1995: 382-385

4 投稿须知

4.1 投稿信件 来稿包括所有作者签名的作者投稿函. 内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)可建议熟悉该专业的审稿人或因利益冲突而不适宜审阅该稿的审稿人姓名; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版出版权转让给本刊编辑部, 所有来稿均需接受同行审阅.

4.2 审稿过程 所有来稿均经2位同行专家的严格评审, 所有审稿人的姓名对作者通常是保密的. 投稿时, 作者可以提出要求回避的同行专家名单, 也可以推荐2位非本单位的审稿人, 尤其是本刊编委会成员. 审稿过程大约需要1 mo.

4.3 录用 来稿经本刊编辑部初审、2位同行专家评审, 将评审后的稿件分为优先发表、可以发表、修改后发表、修改后再审、退稿等项处理. 录用稿件作者需交纳发表费, 发表后可获得2本样刊及20套单行本(稿酬).

4.4 修改时间 来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿寄回给作者自行修改. 当原稿退还作者修改时, 作者必须于1 mo内将修改后的稿件及软盘寄回编辑部; 逾期寄回的, 作重新投稿处理.

4.5 版权 本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负. 作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期): 起止页码. 如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有. 编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》、《中文生物医学期刊/会议文献数据库》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录.

4.6 投稿清单 (1)投稿函; (2)第1部分(题名及作者, 作者及单位, 第1作者简介, 基金资助项目, 通讯作者Email, 电话, 传真, 收稿日期, 接受日期); (3)第2部分英文摘要; (4)第3部分中文摘要; (5)第4部分(0引言, 1 材料和方法, 1.1 材料, 1.2 方法, 统计学处理, 2 结果, 3 讨论, 致谢, 4 参考文献); (6)文章配发内容, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价. 分条将各项(100字左右)内容用通俗易懂的1-3句话描述.

4.7 投稿地址 在线投稿: <http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>. 邮局寄送(已在线提交的稿件不必再寄): 请将打印的稿件一式2份(附高质量的图)、存有全文(文字、图表)的磁盘和其他信息(全部文件的清单, 各文件的名称、格式和使用平台等)寄往: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社.

世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
郎辛庄北路58号院怡寿园1066号
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
Email: wcjd@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>

世界华人消化杂志2006-2008年编委会成员简介

- 1 白爱平, 主治医师, 博士, 510080, 广东省广州市中山二路, 中山大学附属第一医院消化内科
- 2 白文元, 教授, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化内科
- 3 白玉贤, 教授, 博士, 内科教研室主任、内二科主任, 150081, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路150号, 黑龙江省哈尔滨医科大学附属肿瘤医院内二科
- 4 蔡淦, 教授, 内科督导, 200021, 上海市普安路185号, 上海曙光医院蔡淦工作室
- 5 曹洁, 副教授, 博士, 200433, 上海市翔殷路800号, 第二军医大学微生物学教研室
- 6 陈海龙, 教授, 博士, 副院长, 116011, 辽宁省大连市西岗区中山路222号, 大连医科大学附属第一医院院办
- 7 陈红松, 副研究员, 博士, 副主任, 100044, 北京市西直门南大街11号, 人民医院肝病研究所
- 8 陈积圣, 教授, 博士, 510120, 广州市沿江西路107号, 中山大学孙逸仙纪念医院肝胆外科
- 9 陈建荣, 副教授, 副院, 226001, 江苏省南通市孩儿巷北路6号, 南通大学第二附属医院急诊医学中心
- 10 陈可冀, 教授, 100091, 北京市, 北京西苑医院内科
- 11 陈立波, 副教授, 博士, 科副主任, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科中心
- 12 陈凇, 教授, 行政副主任 硕士, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院普通外科
- 13 陈其奎, 教授, 博士, 科副主任, 510120, 广东省广州市沿江西路107号, 中山大学附属第二医院消化内科
- 14 陈强谱, 教授, 硕士, 科主任, 256603, 山东省滨州市黄河二路661号, 滨州医学院附属医院肝胆外科
- 15 陈士葆, 教授, 200003, 上海凤阳路415号, 上海第二军医大学长征医院消化内科
- 16 陈仕珠, 主任医师, 科主任, 710054, 陕西省西安市友谊东路269号, 解放军第四五一医院感染科
- 17 陈耀凯, 副教授, 博士, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩正街29号, 第三军医大学西南医院全军感染病研究所
- 18 陈贻胜, 教授, 科主任, 350001, 福建省福州市东街134号, 福建省立医院消化内科
- 19 陈知水, 教授, 博士, 临床部副主任, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院器官移植研究所
- 20 陈治水, 主任医师, 科主任, 150080, 哈尔滨市南岗区学府路45号, 解放军第二一一医院中医科
- 21 陈祖林, 副教授, 博士, 400037, 重庆市新桥, 第三军医大学新桥医院普通外科
- 22 程爱国, 教授, 系主任, 附属医院常务副院长, 附属路南分院院长, 063000, 河北省唐山市建设南路75号, 华北煤炭医学院临床医学系
- 23 程红岩, 教授, 硕士, 科主任, 200438, 上海市长海路225号, 第二军医大学东方肝胆外科医院影像诊疗科
- 24 程英升, 副教授, 博士, 科教处处长, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院放射科、上海交通大学影像医学研究所
- 25 迟宝荣, 教授, 吉林大学第一医院学位委员会主任, 130021, 吉林省长春市新民大街1号, 吉林大学第一医院消化内科
- 26 崔云甫, 教授, 博士, 科副主任, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学第二附属医院普外一科
- 27 代文杰, 教授, 博士, 科主任, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外二科
- 28 戴冬秋, 教授, 博士, 科副主任, 110001, 辽宁省沈阳市和平区南京北街155号, 中国

World Journal of Gastroenterology 由世界胃肠病学杂志社出版, 自2005-01-01起改为周刊发行. 每月7、14、21、28日出版. 北京报刊发行局发行, 邮发代号: 82-261, 全年定价2400元.

World Journal of Gastroenterology 荣获我国期刊界的最高政府奖项—第二和第三届国家期刊奖百种重点期刊, 2001年入选中国期刊方阵“双百”期刊。2002-10-11第一次获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助(项目批准号: 30224801), 资助期限2年, 资助强度为每年8万元。2003年度获第二届中国百种杰出学术期刊。2004年度第二次获得国家自然科学基金重点学术期刊专项基金资助(项目批准号: 30424812), 资助期限2年, 资助强度为24万元。

- 29 医科大学附属第一医院肿瘤外科
党双锁, 副教授, 博士, 科主任, 710004, 陕西省西安市西五路157号, 西安交通大学第二医院感染科
- 30 邓长生, 教授, 原任武汉大学中南医院科教院长, 430071, 湖北省武汉市东湖路169号, 武汉大学中南医院消化内科
- 31 董蕾, 教授, 硕士, 科主任, 710004, 陕西省西安市西五路157号, 西安交通大学第二附属医院消化内科
- 32 杜群, 副研究员, 硕士, 510405, 广东省广州市机场路12号, 广州中医药大学脾胃研究所药理室
- 33 樊红, 副教授, 博士, 210009, 江苏省南京市鼓楼区丁家桥87号, 东南大学医学院, 发育与疾病相关基因教育部重点实验室, 东南大学基础医学院, 遗传与发育生物学系
- 34 范建高, 教授, 博士, 科主任, 脂肪肝诊治中心主任, 200080, 上海市上海交通大学附属第一人民医院消化内科/脂肪肝诊治中心
- 35 范志宁, 主任医师, 博士, 内镜中心主任, 南京医科大学研究所所长, 210011, 江苏省南京市南京医科大学第二附属医院内镜中心
- 36 房殿春, 教授, 博士, 科主任, 400038, 重庆市, 第三军医大学西南医院消化科
- 37 房静远, 教授, 博士, 所长, 200001, 上海市山东中路145号, 仁济医院消化病研究所
- 38 傅春彬, 主任医师, 科主任, 132021, 吉林省吉林市, 吉化集团公司总医院一院消化内科
- 39 高成新, 教授, 200030, 上海市淮海西路241号, 上海市胸科医院胸外科
- 40 高春芳, 研究员, 博士, 科副主任, 200003, 上海市凤阳路415号, 第二军医大学附属长征医院全军医学免疫诊断中心/实验诊断科
- 41 高峰, 副主任, 博士, 教授, 710032, 陕西省西安市长乐西路17号, 第四军医大学生理学教研室
- 42 高润平, 教授, 博士, 留美博士后科学家, 130021, 吉林省长春市新民大街1号, 吉林大学第一医院肝病科
- 43 高毅, 主任医师, 博士, 科副主任, 510282, 广东省广州市海珠区工业大道253号, 南方医科大学珠江医院肝胆外科
- 44 戈之铮, 教授, 博士, 科副主任, 200001, 上海市山东中路145号, 上海交通大学医学院附属仁济医院消化科
- 45 龚国忠, 教授, 博士, 科主任, 410011, 湖南省长沙市人民中路139号, 中南大学湘雅二医院肝病研究中心
- 46 龚建平, 教授, 博士, 科主任、重庆市微创外科中心主任, 400010, 重庆市渝中区临江路74号, 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科
- 47 谷俊朝, 主任医师, 博士, 国外医学外科学分册编辑部主任, 100050, 北京市永安路95号, 首都医科大学附属北京友谊医院普外科
- 48 关玉盘, 教授, 消化科首席专家, 100020, 北京朝阳区白家庄路8号, 首都医科大学附属北京朝阳医院消化科
- 49 管冬元, 副教授, 博士, 201203, 上海市浦东新区蔡伦路1200号, 上海中医药大学基础医学院实验中医教研室
- 50 郭克建, 教授, 博士, 科主任, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院外科
- 51 郭晓钟, 教授, 博士, 科主任, 110016, 辽宁省沈阳市沈河区文化路83号, 沈阳军区总医院消化内科
- 52 郭新宁, 教授, 科主任, 750004, 宁夏回族自治区银川市胜利南街78号, 宁夏医学院附属医院消化科
- 53 韩天权, 教授, 博士, 副所长, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科、上海消化外科研究所
- 54 郝俊鸣, 副主任医师, 科主任, 100068, 北京市丰台区角门北路10号, 中国康复研究中心北京博爱医院功能检查科
- 55 何超, 教授, 硕士, 院长, 310016, 浙江省杭州市庆春东路3号, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院
- 56 何裕隆, 教授, 博士, 外科主任、胃肠胰腺专科主任, 510080, 广东省广州市中山二路58号, 中山大学附属第一医院胃肠胰腺外科
- 57 何振平, 教授, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩29号, 第三军医大学西南医院全

- 58 军肝胆外科研究所、解放军西南肝胆外科医院
洪天配, 教授, 博士, 科主任, 100083, 北京市海淀区花园北路49号, 北京大学第三医院内分泌科
- 59 侯晓华, 教授, 博士, 科主任, 430022, 湖北省武汉市汉口解放大道1277号, 武汉华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科
- 60 黄恒青, 主任医师, 科主任, 350003, 福建省福州市鼓楼区湖东支路13号, 福建省第二人民医院消化内科
- 61 黄金华, 副教授, 硕士, 科秘书, 510060, 广东省广州市东风东路651号, 中山大学肿瘤医院影像介入科
- 62 黄象谦, 教授, 300052, 天津市鞍山道154号, 天津医科大学总医院消化科
- 63 黄晓东, 副主任医师, 硕士, 科主任, 430014, 湖北省武汉市江岸区胜利街26号, 湖北省武汉市中心医院消化内科
- 64 黄颖秋, 教授, 硕士, 科主任, 117000, 辽宁省本溪市平山区人民路29号, 本溪钢铁(集团)有限责任公司总医院消化内科, 中国医科大学第五临床学院
- 65 黄裕新, 教授, 科主任, 710038, 陕西省西安市, 第四军医大学唐都医院消化内科
- 66 黄志强, 教授, 所长, 100853, 北京复兴路28号, 中国人民解放军总医院全军肝胆外科研究所
- 67 黄志勇, 副教授, 博士, 普外研究室副主任, 430030, 湖北省武汉市解放大道95号, 华中科技大学同济医学院普外科
- 68 季国忠, 副教授, 博士, 副院长, 210011, 江苏省南京市下关区姜家园121号, 南京医科大学第二附属医院消化科
- 69 季加孚, 教授, 硕士, 科主任, 100036, 北京市海淀区阜成路52号, 北京大学临床肿瘤医院北京肿瘤医院外科
- 70 江学良, 副主任医师, 博士, 200433, 上海市, 第二军医大学长海医院消化科
- 71 姜洪池, 教授, 博士, 科主任, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科
- 72 姜慧卿, 教授, 博士, 科主任, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院消化科
- 73 蒋龙元, 副教授, 硕士, 科副主任, 510120, 广东省广州市沿江西路107号, 中山大学附属第二医院急诊科
- 74 金瑞, 教授, 科主任, 100069, 北京右外头条8号, 首都医科大学附属北京佑安医院消化科
- 75 匡安仁, 教授, 硕士, 科主任, 610041, 四川省成都国学巷37号, 四川大学华西医院核医学科
- 76 兰平, 教授, 博士, 科主任, 510080, 广东省广州市中山二路58号, 中山大学附属第一医院胃肠胰外科
- 77 蓝宇, 教授, 硕士, 科主任, 100035, 北京西城区新街口东街31号, 北京积水潭医院消化科
- 78 劳绍贤, 教授, 510405, 广东省广州市机场路12号大院, 广州中医药大学脾胃研究所
- 79 李定国, 教授, 博士, 科主任, 200092, 上海市控江路1665号, 上海交通大学医学院(原上海第二医科大学)附属新华医院消化内科
- 80 李东辉, 教授, 博士, 科副主任, 361005, 福建省厦门市, 厦门大学医学院抗癌研究中心
- 81 李方儒, 教授, 科主任, 300100, 天津市南开开区三纬路122号, 天津市南开医院(天津市中西医结合医院)内科
- 82 李国威, 教授, 西安市外科学会主任委员, 710004, 陕西省西安市西五路157号, 西安交通大学医学院第二附属医院普通外科
- 83 李继强, 教授, 200001, 上海市山东中路145号, 上海交通大学附属仁济医院, 上海市消化疾病研究所
- 84 李靖, 副教授, 博士, 科副主任, 400037, 重庆市沙坪坝区新桥正街2号, 第三军医大学附属新桥医院肝胆外科
- 85 李奇林, 教授, 硕士, 科主任, 510282, 广东省广州市工业大道253号, 南方医科大学附属珠江医院急诊部
- 86 李涛, 主治医师, 博士, 100044, 北京市西城区西直门南大街11号, 北京大学人民医院肝胆外科
- 87 李晓宇, 主任医师, 硕士, 副院长, 100049, 北京市海淀区玉泉路15号, 北京航天中心医院
- 88 李延青, 教授, 博士, 科主任, 250012, 山东济南文化西路107号, 山东大学齐鲁医院

《世界华人消化杂志》创刊于1993-01-15, 原刊名《新消化病学杂志》, 1999-03-25经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为《世界华人消化杂志》, 国科发财字[1999] 071号, 国内统一刊号 CN 14-1260/R, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内外公开发行的综合性消化病学类学术期刊, 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001071号。

美国《医学索引(Index Medicus/MEDLINE)》创刊于1879年,由美国国立医学图书馆(National Library of Medicine)编经出版,收录世界70多个国家和地区,40余种文字的4 800种生物医学及相关学科期刊,是当今世界较权威的生物医学文献检索系统,收录文献反映了全球生物医学领域较高水平的研究成果.该系统有较为严格的选刊程序和标准,我国大陆目前有75种期刊被该系统收录.2004年该系统共收录中国论文18 962篇.

2004年SCI收录的中国大陆论文中,国际合作产生的论文为11 963篇,占我国发表论文总数的20.8%,所占比例比2003年减少了2.8个百分点;我国作者为第一作者的国际合著论文6 599篇,合作伙伴涉及71个国家(地区);其他国家作者为第一作者、我国作者参与工作的国际合著论文为5 364篇,合作伙伴涉及64个国家(地区).

2004年我国科技人员在国内外科技期刊上共发表论文309 952篇,比2003年增加35 514篇,增长12.9%;海外作者在我国刊物上发表论文1 472篇,比2003年增加278篇.

- 消化科
- 89 李岩,教授,博士,科主任,110004,辽宁省沈阳市和平区三好街36号,中国医科大学附属第二医院消化内科
- 90 李永哲,副研究员,100730,北京市,中国医学科学院、中国协和医科大学北京协和医院检验科
- 91 李玉民,教授,博士,副院长,730000,甘肃省兰州市东岗西路1号,兰州大学第一医院
- 92 李增山,副教授,博士,710032,陕西省西安市长乐西路17号,第四军医大学病理教研室
- 93 李兆申,教授,硕士,科主任,200433,上海市杨浦区长海路174号,第二军医大学附属长海医院消化内科
- 94 李志霞,教授,100730,北京市东城区东交民巷1号,首都医科大学附属北京同仁医院普外科
- 95 李宗芳,教授,博士,西安交通大学肝胆研究所副所长,710004,陕西省西安市西五路157号,西安交通大学医学院第二附属医院干部病房外科
- 96 梁力建,教授,外科,510080,广东省广州市中山二路58号,中山大学附属第一医院肝胆外科
- 97 林勇,讲师,博士,200003,上海市凤阳路415号,上海长征医院消化内科
- 98 刘宝瑞,教授,博士,主任,210008,江苏省南京市中山路321号,南京大学医学院附属鼓楼医院肿瘤中心
- 99 刘冰熔,教授,博士,科主任,150086,黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号,黑龙江省哈尔滨医科大学附属第二临床医院消化内科
- 100 刘成海,研究员,博士,副所长、实验室主任,201203,上海市浦东新区张衡路528号,上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝病研究所
- 101 刘连新,教授,博士,科副主任,150001,黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号,哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科三病房
- 102 刘平,教授,博士,副校长,201203,上海市蔡伦路1200号,上海中医药大学
- 103 刘杞,教授,硕士,400010,重庆市渝中区临江路74号,重庆医科大学病毒性肝炎研
- 究所
- 104 刘铁夫,教授,主任,150001,黑龙江省哈尔滨市南岗区颐园街37号,哈尔滨医科大学附属四院消化病诊疗中心
- 105 刘正稳,教授,博士,医务部主任,710061,陕西省西安市南郊健康路1号,西安交通大学医学院第一附属医院医务部
- 106 刘作金,副教授,博士,重庆市肝胆外科重点实验室副主任,400010,重庆市渝中区临江路74号,重庆医科大学附属第二医院肝胆外科
- 107 龙致贤,教授,世界中医药学会联合会副主席副秘书长兼司库,100029,北京市三环东路11号,北京中医药大学
- 108 鲁华玉,研究员,100850,北京市太平路27号,军事医学科学院放射医学研究所
- 109 陆才德,教授,博士,科主任,315040,浙江省宁波市兴宁路57号,宁波市医疗中心李惠利医院外一科(肝胆外科)
- 110 陆云飞,教授,硕士,科主任,530021,广西壮族自治区南宁市,广西医科大学第一附属医院胃肠外科
- 111 禄韶英,主治医师,博士,710061,陕西省西安市小寨健康路1号,西安交通大学医学院第一附属医院普外科11病区
- 112 吕宾,教授,硕士,副院长,310006,浙江省杭州市邮电路54号,浙江中医学院附属医院(浙江省中医院、浙江省东方医院)消化科
- 113 吕明德,教授,博士,主任,510080,广东省广州市中山二路58号,中山大学附属第一医院
- 114 吕宁,主任医师,科副主任,100021,北京市朝阳区潘家园南里17号,中国医学科学院\中国协和医科大学\肿瘤医院肿瘤医院病理科
- 115 吕云福,教授,硕士,科主任,570311,海南省海口市秀英区秀华路19号,海南省人民医院外一科
- 116 马大烈,教授,科副主任,200433,上海市长海路174号,上海第二军医大学长海医院病理科
- 117 茅爱武,主任医师,硕士,科主任,200050,上海市长宁区愚园路786号,上海同仁医院介入诊疗中心
- 118 梅林,教授,博士,100083,北京市海淀区学

- 院路38号, 北京大学医学部生理学与病理生理学系神经调节和消化内分泌研究室
- 119 孟庆华, 教授, 科主任, 100069, 北京右安门外西头条8号, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病四科
- 120 聂青和, 副教授, 博士, 科副主任, 710038, 陕西省西安市灞桥区, 第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心、传染病科
- 121 宁琴, 教授, 博士, 科副主任, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 同济医院感染科
- 122 牛建昭, 教授, 硕士, 主任, 100029, 北京市朝阳区北三环东路11号, 北京中医药大学
- 123 潘伯荣, 教授, 博士, 710032, 陕西省西安市市长乐西路175号, 第四军医大学第一附属医院(西京医院)肿瘤科
- 124 潘林娜, 教授, 主任, 150040, 黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路150号, 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院(黑龙江省肿瘤医院)腔镜室
- 125 潘兴华, 副主任医师, 博士, 科副主任, 650032, 云南省昆明市大观路212号, 成都军区昆明总医院病理实验科
- 126 潘秀珍, 教授, 名誉院长, 350001, 福建省福州市东街134号, 福建省立医院消化研究室
- 127 彭波, 副教授, 科主任, 710061, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第一附属医院急救医学中心
- 128 彭吉润, 主任医师, 博士, 100044, 北京市西城区西直门南大街11号, 北京大学人民医院肝胆外科中心
- 129 彭曦, 副研究员, 博士, 400038, 重庆市西南医院烧伤研究所
- 130 彭心宇, 教授, 硕士, 副院长, 832008, 新疆维吾尔自治区石河子北二路, 石河子大学医学院附属第一医院
- 131 彭志海, 教授, 博士, 副院长, 200080, 上海市武进路85号, 上海交通大学附属第一人民医院普外科
- 132 秦波, 教授, 博士, 400010, 重庆市渝中区临江路74号, 重庆医科大学附属第二医院感染病科
- 133 秦成勇, 教授, 博士, 副院长, 250021, 山东省济南市经五路纬七路324号, 山东省立医院
- 134 秦环龙, 教授, 博士, 副院长, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院外科
- 135 秦仁义, 教授, 博士, 科副主任, 430030, 湖北省武汉市解放大道1095号, 华中科技大学同济医学院附属同济医院外科
- 136 卿三华, 教授, 博士, 510515, 广东省广州市广州大道北段1838号, 南方医科大学南方医院普外科
- 137 邱双健, 副教授, 博士, 200032, 上海市医学院路136号, 复旦大学附属中山医院肝癌研究所、肝肿瘤外科
- 138 裘法祖, 教授, 博士, 院士, 430030, 武汉航空路, 华中科技大学同济医学院
- 139 任超世, 研究员, 300192, 天津市南开区白堤路236号, 中国医学科学院生物医学工程研究所
- 140 任建安, 教授, 博士, 210002, 江苏省南京市中山东路305号, 南京军区南京总医院全军普通外科研究所
- 141 任建林, 教授, 博士, 科主任, 361004, 福建省厦门市湖滨南路201号, 厦门大学附属中山医院消化内科
- 142 邵成浩, 讲师, 博士, 200433, 上海市长海路174号, 长海医院普外科
- 143 邵先玉, 教授, 科主任, 271000, 山东省泰安市泰山大街706号, 泰山医学院附属医院消化内科
- 144 邵永孚, 教授, 首席专家, 100021, 北京市朝阳区潘家园南里17号, 中国医学科学院肿瘤医院腹部肿瘤外科
- 145 沈洪, 教授, 博士, 科主任, 210029, 江苏省南京市汉中路155号, 南京中医药大学附属医院江苏省中医院消化科
- 146 沈琳, 副教授, 硕士, 科主任, 100036, 北京市海淀区阜成路52号, 北京肿瘤医院消化内科
- 147 沈薇, 教授, 硕士, 科主任, 400010, 重庆市渝中区临江路78号, 重庆医科大学附属第二医院消化内科
- 148 施瑞华, 教授, 博士, 科主任, 210029, 江苏省南京市广州路300号, 南京医科大学第一附属医院消化科
- 149 石统东, 副教授, 博士, 400010, 重庆市渝中区临江路76号, 重庆医科大学附属第二医院感染病科
- 150 宋振顺, 教授, 博士, 科副主任, 710032, 陕

2004年度中国科技论文排行榜揭晓: 上海交通大学医学院

12月6日, 中国科技信息研究所在北京国际会议中心举行第十三届中国科技论文统计结果发布会. 我院(原上海第二医科大学)在《SCIE》科学引文索引被收录论文共158篇(全文80篇, 居全国高等院校第83位, 今年起按全文数排位), 论文数比上年度增长10.4%; 其中《SCI》收录医学论文数125篇(居医学学科高产机构第6位); 《EI》工程索引被收录论文6篇(居全国高等院校第214位); 《ISTP》科学技术会议索引收录82篇(居全国高等院校第45位); 《MEDLINE》美国医学索引被收录论文805篇(居全国高等院校第

3位, 今年开始收录), 其中附属第九人民医院被收录论文348篇, 居全国医疗机构第1位; 国际论文被引证83篇, 253次(居全国高等院校第49位); 附属瑞金医院沈志祥1997年发表在BLOOD上的论文累计被引417次, 居全国单篇论文被引用数较多的作者第6位; 陈国强1997年发表在BLOOD上的论文累计被引248次, 居全国单篇论文被引用数较多的作者第8位。在1608种中国科技论文统计源期刊中(中国科技核心期刊), 我院2004年共被收录发表的论文2488篇(居全国高等院校第19位), 论文数比上年度增长26.3%; 国内科技论文被引用4482次(居全国高等院校第18位), 比上年度增长51.3%。

- 西省西安市长乐西路15号, 西京医院肝胆外科
- 151 孙诚谊, 教授, 博士, 副院长, 550001, 贵州省贵阳市北京路4号, 贵阳医学院附属医院
- 152 孙家邦, 教授, 首都医科大学外科学系主任, 100053, 北京市宣武区长椿街45号, 首都医科大学宣武医院普外科
- 153 孙秀发, 教授, 430030, 湖北省武汉市航空路13号, 华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系
- 154 孙学英, 教授, 博士, 科副主任, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街23号, 哈尔滨医科大学第一附属医院黑龙江省肝胆外科中心
- 155 邵升, 副教授, 博士, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路194号, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科
- 156 谭学瑞, 教授, 博士, 院长, 515041, 广东省汕头市市长平路57号, 汕大医学院第一附属医院
- 157 汤展宏, 副教授, 博士, 副主任, 530021, 广西南宁市双拥路6号, 广西医科大学第一附属医院危重症中心外科ICU
- 158 唐芙爱, 教授, 科主任, 450014, 河南省郑州市经八路2号, 郑州大学第二附属医院消化科
- 159 唐霓, 副研究员, 博士, 400016, 重庆市渝中区医学院路1号, 重庆医科大学病毒性肝炎研究所教育部感染性疾病分子生物学重点实验室
- 160 唐文富, 主治医师, 硕士, 610041, 四川省成都市外南国学巷37号, 四川大学华西医院中西医结合科
- 161 唐文皓, 副主任医师, 博士, 科副主任, 200040, 上海市延安西路221号, 上海市华东医院普外科
- 162 唐旭东, 主任医师, 博士, 副院长, 100091, 北京市海淀区西苑操场1号, 中国中医科学院西苑医院
- 163 唐志鹏, 副研究员, 博士, 科主任, 200032, 上海市宛平南路725号, 上海中医药大学附属龙华医院消化内科
- 164 田素礼, 教授, 博士, 科主任, 150086, 黑龙江省哈尔滨市学府路246号, 黑龙江省哈尔滨市哈尔滨医科大学附属第二临床医院普外三科
- 165 屠红, 副研究员, 博士, 200032, 上海市斜土路2200弄25号, 上海市肿瘤研究所分子诊断室
- 166 万德森, 教授, 科主任, 广东省广州市东风东路651号, 510060, 中山大学肿瘤防治中心腹科
- 167 万军, 教授, 硕士, 科副主任, 100853, 北京复兴路28号, 解放军总医院南楼老年消化科
- 168 汪波副, 主任医师, 博士, 科副主任, 100034, 北京西城区西什库大街八号, 北京大学第一医院急诊科
- 169 王宝恩, 教授, 名誉院长, 100050, 北京市宣武区永安路95号, 首都医科大学附属北京友谊医院
- 170 王承党, 副教授, 博士, 科主任, 350005, 福建省福州市茶亭茶中路20号, 福建医科大学附属第一医院消化内科
- 171 王春友, 教授, 硕士, 科主任, 430022, 湖北省武汉市解放大道1277号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院胰腺外科中心
- 172 王广义, 教授, 博士, 科主任, 130021, 吉林省长春市朝阳区新民大街71号, 吉林大学第一医药普外科
- 173 王吉耀, 教授, 双硕士, 科主任, 200032, 上海市枫林路180号, 中山医院消化科
- 174 王鲁, 副教授, 博士, 200032, 上海市医学院路136号, 复旦大学附属中山医院肝外科, 复旦大学肝癌研究所
- 175 王小众, 教授, 博士, 副院长, 350001, 福建省福州市新权路29号, 福建医科大学附属协和医院消化内科
- 176 王效民, 教授, 博士, 院长, 361004, 福建省厦门市湖滨南路209号, 厦门大学附属中山医院
- 177 王学美, 研究员, 博士, 主任, 100034, 北京市西城区西什库大街8号, 北京大学第一医院中西医结合研究室
- 178 王苑本, 教授, 300191, 天津市水上公园路14号, 中国人民解放军271医院, 北京军区消化道疾病防治中心
- 179 王正康, 教授, 100029, 北京市北京中日友好医院普外科
- 180 王志刚, 副主任医师, 博士, 200233, 上海市宜山路600号, 上海市第六人民医院普外科
- 181 王忠裕, 教授, 博士, 科主任, 116011, 辽宁

- 省大连市中山路222号,大连医科大学附属第一医院普通外科二科
- 182 危北海,研究员,100010,北京市东城区美术馆后街23号,首都医科大学附属北京中医药大学
- 183 卫洪波,教授,博士,科主任,510630,广东省广州市天河区天河路600号,中山大学附属第三医院胃肠外科
- 184 魏经国,教授,710038,陕西省西安市灞桥区新寺路1号,第四军医大学唐都医院放射科
- 185 魏来,教授,博士,所长,100044,北京市西直门南大街11号,北京大学人民医院肝病研究所
- 186 闻勤生,教授,博士,科主任,710038,陕西省西安市,第四军医大学唐都医院消化内科
- 187 吴德全,教授,双硕士,科主任,150086,黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号,黑龙江省哈尔滨医科大学附属二院普外一科
- 188 吴建国,教授,博士,主任,430072,湖北省武汉市武昌区,武汉大学生命科学院病毒学国家重点实验室
- 189 吴君,主任医师,科副主任,550004,贵州省贵阳市,贵阳医学院附属医院感染科
- 190 吴孟超,教授,院长,200438,上海市长海路225号,第二军医大学东方肝胆外科医院
- 191 吴云林,教授,博士,科主任,200025,上海市瑞金二路197号,上海交通大学医学院附属瑞金医院消化科
- 192 席启,主任医师,科主任,037006,山西省大同市,中国人民解放军山西大同第三二二医院胸外科
- 193 夏建川,研究员,博士,510060,广东省广州市东风东路651号,中山大学肿瘤防治中心生物治疗研究室
- 194 向德兵,讲师,博士,400042,重庆市中国人民解放军第三军医大学大坪医院肿瘤中心
- 195 肖恩华,教授,博士,主任,410011,湖南省长沙市人民中路139号,中南大学湘雅二医院放射教研室
- 196 谢晓华,副教授,双硕士,科副主任,510405,广东省广州市机场路16号,广州中医药大学第一附属医院三外科
- 197 徐爱民,副教授,博士,科副主任,200438,上海市长海路225号,第二军医大学附属肝胆外科医院放射诊疗科
- 198 徐存拴,教授,博士,副校长,453007,河南省新乡市建设路46号,河南师范大学
- 199 徐大华,副主任医师,科副主任,100053,北京宣武区长椿街45号,首都医科大学宣武医院普外科
- 200 徐德忠,教授,710032,陕西省西安市,第四军医大学流行病学教研室
- 201 徐克成,教授,院长,518052,广东省广州市新港西路167号,广州复大肿瘤医院院长室
- 202 徐列明,教授,博士,科主任,200021,上海市浦东张江高科技园区张衡路528号,上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科
- 203 徐小元,教授,硕士,科副主任,100034,北京市西城区西什库大街8号,北京大学第一医院感染疾病科
- 204 许玲,副教授,博士,副主任,200003,上海市凤阳路415号,第二军医大学长征医院中医科
- 205 许文燮,教授,博士,200240,上海东川路800号,上海交通大学生命科学院生物工程学
- 206 严律南,教授,博士,科主任,610041,四川省成都市国学巷37号,四川大学华西医院普外科
- 207 杨春波,主任中医师,名誉院长,350003,福建省福州市湖东支路13号,福建省第二人民医院中医脾胃研究室
- 208 杨冬华,教授,博士,院长,510630,广东省广州市,暨南大学附属第一医院
- 209 杨广顺,教授,博士,科主任,200438,上海市长海路225号,上海东方肝胆外科医院胆道二科
- 210 杨建勇,教授,博士,科主任,510080,广东省广州中山二路58号,中山大学附属第一医院放射科
- 211 杨林,副研究员,博士,实验中心副主任,510630,广东省广州市天河路600号,中山大学附属第三医院感染病科
- 212 杨思凤,教授,博士,主任,132011,吉林省吉林市越山路340号,解放军第222医院沈阳军区溃疡病治疗中心
- 213 杨维良,教授,150086,黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号,哈尔滨医科大学附属第二医院普外四科

中国国际科技论文数量连续3年保持世界第5位

新华网北京12月6日(记者邹声文、卫敏丽)报到2004年度中国科技论文大盘点6日揭晓。统计结果显示,2004年我国科技论文占世界论文总数的6.3%。按照国际论文数量排序,自2002年以来,我国始终保持在世界第5位,位于我国之前的4个国家为:美国、日本、英国和德国。据中国科学技术信息研究所发布的《2004年度中国科技论文统计结果》显示,2004年《科学引文索引》(SCI)、《工程索引》(EI)和《科学技术会议录索引》(ISTP)收录的,在作者机构中含有“中华人民共和国”的论文共111 356篇,比2003年增长19.3%。

2004年我国科技论文“单项”成绩也值得关注. 主要反映基础研究状况的SCI所收录的中国论文为57 377篇, 比2003年增长15.2%, 论文数排位超过法国, 排世界第5位, 比上一年进步1位. 反映工程科学研究情况的EI收录期刊论文中, 中国论文为33 500篇, 比2003年增长34%, 排世界第2位, 仅落后于美国. ISTP2004年共收录我国发表的科技会议论文20 479篇, 比2003年增长10.3%, 世界排位第5, 与上一年相比也进步了1位. 与往年相比, 中国科学技术信息研究所今年新增了对美国《医学索引》(MEDLINE)的统计分析, 同时首次对SSCI收录的社会科学论文进行了总体统计.

- 214 杨希山, 教授, 博士, 执行院长, 510725, 广东省广州黄埔区石化路239号, 广州亿仁医院
- 215 杨云生, 教授, 博士, 科主任, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院消化科
- 216 姚登福, 教授, 博士, 科主任, 226001, 江苏省南通市西寺路20号, 南通大学附属医院分子医学中心
- 217 姚树坤, 教授, 博士, 副厅长, 050011, 河北省石家庄市健康路12号, 河北医科大学第四医院消化内科
- 218 姚希贤, 教授, 主任, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学附属医院第二医院消化内科
- 219 伊力亚尔·夏合丁, 教授, 博士, 科副主任, 830054, 新疆乌鲁木齐市鲤鱼山路1号, 新疆医科大学第一附属医院胸外科
- 220 阴赅宏, 研究员, 博士, 科研处处长, 100050, 北京市宣武区永安路95号, 首都医科大学附属北京友谊医院感染暨急救医学科
- 221 于红刚, 副教授, 博士, 科副主任, 430060, 湖北省武汉市武昌解放路238, 武汉大学人民医院消化内科
- 222 于健春, 教授, 博士, 科副主任, 100730, 北京市东城区帅府园1号, 中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院外科
- 223 于颖彦, 教授, 博士, 主任, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海交通大学医学院附属瑞金医院器官移植中心病理室
- 224 郁宝铭, 教授, 科主任, 200135, 上海市漕宝路八号, 上海市第八人民医院结直肠中心
- 225 喻荣彬, 副教授, 博士, 科副主任, 210029, 江苏省南京市汉中路140号, 南京医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系
- 226 岳茂兴, 教授, 100101, 北京市朝阳区安翔北路九号, 中国人民解放军第306医院腹部外科中心
- 227 张柏和, 教授, 博士, 科主任, 200438, 上海市长海路225号, 第二军医大学附属东方肝胆外科医院胆道外科
- 228 张方信, 主任医师, 博士, 科主任, 730050, 甘肃省兰州市小西湖西街98号, 兰州军区兰州总医院消化科
- 229 张吉翔, 教授, 博士, 副院长, 330006, 江西省南昌市民德路1号, 南昌大学第二附属医院
- 230 张锦生, 教授, 博士, 200032, 上海市徐汇区医学院路138号, 复旦大学上海医学院病理学系
- 231 张军, 教授, 博士, 院长, 710004, 陕西省西安市西五路157号, 西安交通大学医学院第二附属医院消化内科
- 232 张青云, 研究员, 博士, 主任, 100036, 北京市海淀区阜成路52号, 北京大学临床肿瘤医院北京肿瘤医院检验科
- 233 张群华, 教授, 硕士, 科副主任, 200040, 上海市乌鲁木齐中路12号, 复旦大学附属华山医院外科
- 234 张水军, 教授, 博士, 副院长, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院普通外科
- 235 张万岱, 教授, 主编, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医院《现代消化及介入诊疗》编辑部
- 236 张绪清, 副教授, 博士, 科副主任, 400038, 重庆市沙坪坝区高滩岩, 第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所
- 237 张学, 教授, 博士, 主任, 100005, 北京市东单三条五号, 中国协和医科大学基础医学院医学遗传学系
- 238 张宗明, 教授, 博士, 副院长, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院消化医学中心
- 239 赵桂珍, 教授, 博士, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学第二附属医院感染科
- 240 赵景民, 教授, 博士, 科主任, 100039, 北京市西四环中路100号, 解放军第302医院病理科
- 241 赵连三, 教授, 硕士, 主任, 610041, 四川省成都国学巷37号, 四川大学华西医院感染病中心
- 242 赵平, 副教授, 博士, 200433, 上海市翔殷路800号, 第二军医大学微生物学教研室
- 243 郑民华, 教授, 博士, 副院长, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海瑞金医院外科
- 244 智发朝, 教授, 博士, 科副主任, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医院消化内科
- 245 周伯平, 教授, 博士, 院长, 518020, 广东省深圳市罗湖区布心路2019号, 深圳市东湖

- 医院
- 246 周殿元, 教授, 名誉所长, 510515, 广东省广州市广州大道北1838号, 南方医科大学南方医院消化内科研究所
- 247 周丁华, 主任医师, 博士, 科主任, 100088, 北京市西城区新街口外大街16号, 解放军二炮总医院普外科
- 248 周士胜, 教授, 博士, 主任, 16622, 辽宁省大连市经济技术开发区, 大连大学医学院医学研究中心
- 249 周霞秋, 教授, 重型肝炎研究室主任, 200025, 上海市瑞金二路197号, 上海瑞金医院感染科
- 250 周晓东, 研究员, 博士, 主任, 510120, 广东省广州市越秀区沿江西路107号, 中山大学附属二院医学研究中心
- 251 周学文, 教授, 110032, 辽宁省沈阳市皇姑区北陵大街33号, 辽宁中医学院附属医院消化内科
- 252 朱春兰, 主任医师, 硕士, 科主任, 150001, 黑龙江省哈尔滨市南岗区果戈里大街405号, 黑龙江省医院附属消化病医院消化二科
- 253 朱立元, 教授, 博士, 科主任, 518036, 广东省深圳市福田区莲花路1120号, 北京大学深圳医院普外科
- 254 朱人敏, 教授, 博士, 科主任, 210002, 江苏省南京市, 南京军区南京总医院消化内科
- 255 邹小明, 教授, 博士, 科主任, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区保健路256号, 哈尔滨医科大学附属第二医院普外二科
- 255 左国营, 副主任药师, 博士, 650032, 云南省昆明市大观路212号, 成都军区昆明总医院药剂科
- 《世界华人消化杂志》的总被引频次为3 353, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第8位, 内科医学类, 28种期刊的第2位. 《世界华人消化杂志》的影响因子为1.769, 位居1 608种中国科技论文统计源期刊的第14位, 内科医学类, 28种期刊的第2位. 《世界华人消化杂志》的即年指标0.211, 他引总引比0.30, 地区分布数28, 基金论文比0.43, 国际论文比0.01.

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

·消息·

第一届全国临床营养支持学术会议通知

经中华医学会外科学分会批准, “第十届全国临床营养支持学术会议”将于2006-05在上海召开. 本次会议由中华医学会外科学分会营养支持学组主办、复旦大学附属中山医院承办, 主要内容为临床营养支持领域的基础和临床实践总结. 现将征文要求通知如下:

1 征文要求

请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要邮寄到上海市医学院路136号, 上海中山医院外科吴国豪收, 邮编: 200032; 同时请用Email将论文全文及摘要发送到prowugh@yahoo.com.cn, 注明上海中山医院外科吴国豪收. 征文请自留底稿, 恕不退稿.

2 截稿日期

征文截止日期: 2006-03-15.

本次会议举行优秀论文评奖活动, 欢迎踊跃投稿. 会议向正式代表颁布中华医学会继续教育学分.

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿),我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力,提高了《世界华人消化杂志》的学术质量,在此表示衷心感谢!

陈海龙 教授
大连医科大学附属第一医院

陈士葆 教授
第二军医大学长征医院消化内科

陈仕珠 主任医师
解放军第451医院

陈耀凯 副教授
重庆第三军医大学西南医院全军感染病研究所

董蕾 教授
西安交通大学第二医院消化内科

胡以平 教授
上海第二军医大学细胞生物学教研室

来茂德 教授
浙江大学医学院病理学教研室

李增山 副教授
西安第四军医大学病理教研室

林菊生 教授
华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所

林勇 讲师
上海第二军医大学附属长征医院消化内科

刘连新 教授
哈尔滨医科大学附属第一医院普通外科

刘银坤 教授
上海复旦大学附属中山医院肝癌研究所

牛建昭 教授
北京中医药大学

潘秀珍 教授
福建省立医院消化内科

邱双健 副教授
上海复旦大学附属中山医院

孙秀发 教授
华中科技大学同济医学院营养与食品卫生学教研室

孙志伟 副研究员
军事医学科学院生物工程研究所

谭学瑞 教授
广东省汕头市长平路57号

向德兵 讲师
重庆第三军医大学大坪医院野战外科研究所病理科

徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

徐小元 教授
北大医院感染科

许洪卫 教授
上海市第十人民医院

于颖彦 教授
上海第二医科大学附属瑞金医院消化外科研究所

喻荣彬 副教授
南京医科大学流行病与卫生统计学系

张锦生 教授
上海复旦大学上海医学院病理学系

张万岱 教授
第一军医大学南方医院全军消化内科研究所

张宗明 教授
清华大学第一医院院长办公室

钟鸣 研究员
广西民族医药研究所

周学文 教授
辽宁中医学院附属医院中医诊断教研室