

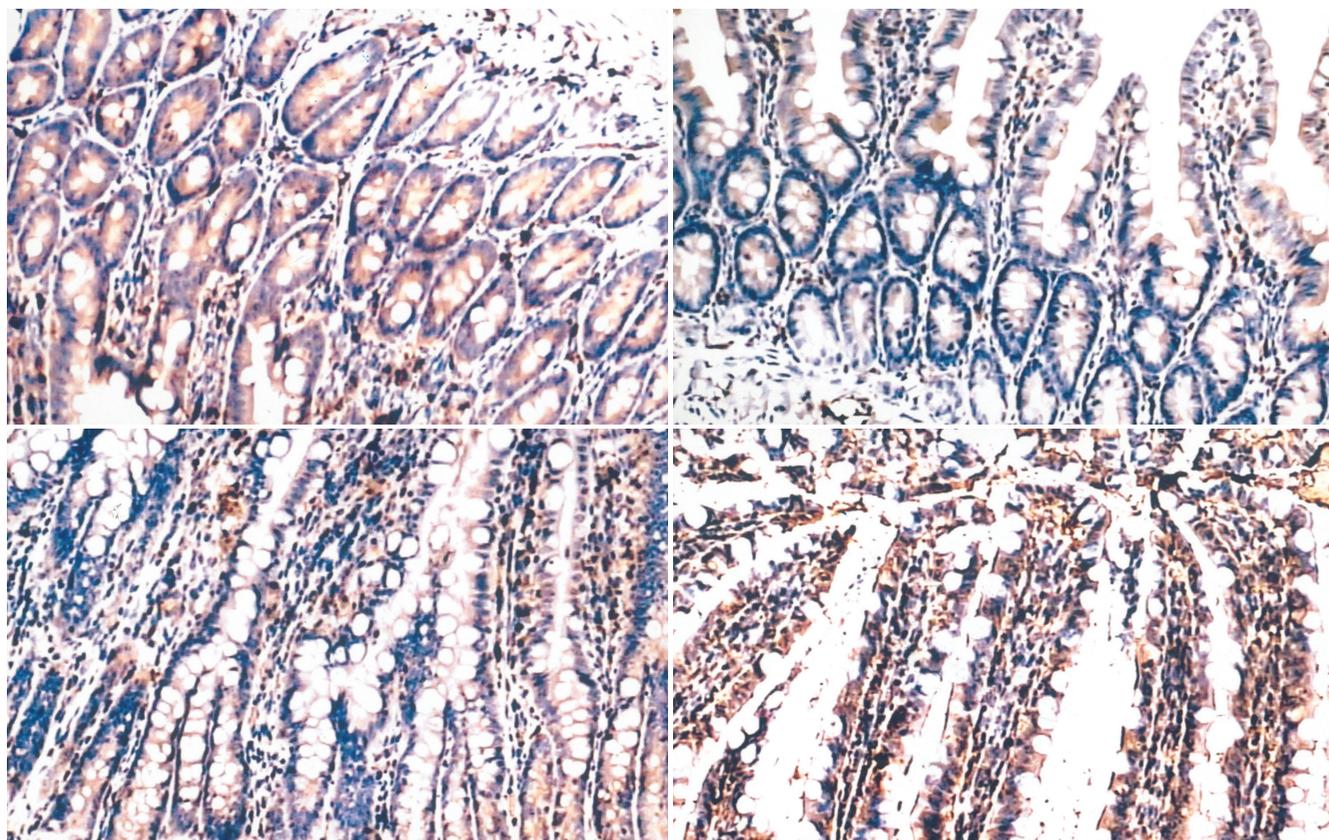
ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

世界华人消化杂志

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006年4月8日 第14卷 第10期 (Volume 14 Number 10)



10 / 2006

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

2006-01-01/2008-12-31

wcjd@wjgnet.com www.wjgnet.com

总顾问

陈可冀教授 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

马连生教授 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
陈卫昌教授 苏州
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

世界华人消化杂志®

编辑委员会

刘铁夫教授	哈尔滨	孙学英教授	哈尔滨	许亚平副教授	镇江
刘正稳教授	西安	邵升副教授	哈尔滨	严律南教授	成都
刘作金副教授	重庆	谭学瑞教授	汕头	杨冬华教授	广州
龙致贤教授	北京	唐采白副教授	徐州	杨广顺教授	上海
鲁华玉研究员	北京	唐芙爱教授	郑州	杨建勇教授	广州
陆才德教授	宁波	唐霓副研究员	重庆	杨林副研究员	广州
陆云飞教授	南宁	唐文富主治医师	成都	杨维良教授	哈尔滨
禄韶英主治医师	西安	唐文皓副主任医师	上海	杨希山教授	广州
吕明德教授	广州	唐旭东主任医师	北京	杨云生教授	北京
吕宁主任医师	北京	汤展宏副教授	南宁	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	万军教授	北京	于红刚副教授	武汉
孟庆华教授	北京	汪波副主任医师	北京	于健春教授	北京
宁琴教授	武汉	汪思应教授	安徽	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
欧希龙副教授	南京	王春友教授	武汉	喻荣彬副教授	南京
潘林娜教授	哈尔滨	王广义教授	长春	张柏和教授	上海
潘兴华副主任医师	昆明	王吉耀教授	上海	张方信主任医师	兰州
潘秀珍教授	福州	王鲁副教授	上海	张吉翔教授	南昌
彭波副教授	西安	王效民教授	厦门	张锦生教授	上海
彭吉润主任医师	北京	王学美研究员	北京	张军教授	西安
彭曦副研究员	重庆	王正康教授	北京	张青云研究员	北京
彭心宇教授	石河子	王志刚副主任医师	上海	张群华教授	上海
彭志海教授	上海	王忠裕教授	大连	张水军教授	郑州
秦波教授	重庆	卫洪波教授	广州	张绪清副教授	重庆
秦成勇教授	济南	魏经国教授	西安	张学教授	北京
秦环龙教授	上海	魏来教授	北京	张宗明教授	北京
钱建民教授	上海	闻勤生教授	西安	赵桂珍教授	沈阳
秦仁义教授	武汉	吴德全教授	哈尔滨	赵景民教授	北京
卿三华教授	广州	吴建国教授	武汉	赵连三教授	成都
邱双健副教授	上海	吴君主任医师	贵阳	赵平副教授	上海
任超世研究员	天津	吴萍主任医师	徐州	郑民华教授	上海
任建安教授	南京	席启主任医师	大同	智发朝教授	广州
任建林教授	厦门	夏建川研究员	广州	周伯平教授	深圳
邵成浩讲师	上海	向德兵讲师	重庆	周丁华主任医师	北京
邵先玉教授	泰安	肖恩华教授	长沙	周国雄主任医师	南通
邵永孚教授	北京	谢晓华副教授	广州	周士胜教授	大连
沈洪教授	南京	徐爱民副教授	上海	周霞秋教授	上海
沈琳副教授	北京	许春舫主任医师	苏州	周晓东研究员	广州
沈薇教授	重庆	徐存拴教授	新乡	朱春兰主任医师	哈尔滨
施瑞华教授	南京	徐大华副主任医师	北京	朱立元教授	深圳
石统东副教授	重庆	徐德忠教授	西安	朱人敏教授	南京
宋振顺教授	西安	徐列明教授	上海	邹小明教授	哈尔滨
孙诚谊教授	贵阳	徐小元教授	北京	左国营副主任药师	昆明
孙家邦教授	北京	许玲副教授	上海		
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4月8日 第14卷 第10期 (总第162期)

述 评	939 中国肝癌肝移植的现状与展望 陈知水, 王海灏
基础研究	942 DNA损伤诱导胃癌细胞端粒酶活性和TRF2表达增高 宁寒冰, 李继昌, 刘志国, 樊代明 947 EGF中介的NF- κ B及细胞外基质降解酶与胆管癌细胞侵袭相关性 孔凡民, 刘小方, 李航宇, 隋春阳, 李昱骥, 张浩, 郭仁宣 953 益生菌及肠内外营养对重症急性胰腺炎大鼠肠道黏附分子及免疫屏障的影响 杨建军, 耿翔, 高志光, 秦环龙 958 玻璃化法冷冻保存对人胚胰岛的影响 赵松, 付英梅, 刘连新, 迟月明, 李秀芬
临床研究	963 HBV感染者人类白细胞 I, II 类抗原等位基因多态性分析 张淑云, 李迪, 谷鸿喜, 李兴库, 金茜, 刘伟, 杜博, 卢滨
文献综述	969 肝纤维化中转录因子的调控作用 龙云, 唐红 973 肠道大豆异黄酮降解菌研究进展 张逊, 姚文, 朱伟云 979 鸟氨酸脱羧酶的生理病理特点及其药物研究概况 迟莉, 李茹柳, 陈蔚文
研究快报	985 针刺血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞磷脂酶C γ -1活性的影响 杨宗保, 严洁, 邹晓平, 易受乡, 常小荣, 林亚萍, 唐森 989 逆转录病毒载体介导的端粒酶抑制基因促进肝癌细胞凋亡 马进财, 刘吉勇, 刘绍玲 993 壳聚糖体外抗幽门螺杆菌的作用及其影响因素 郑铁生, 王亚娜, 宗爱萍 997 中药泻心汤对大鼠胃排空和胃肠激素的影响 刘晓霓, 牛欣, 司银楚, 金秀东 1001 细菌感染对微波行兔保脾术后NF- κ Bp65表达的影响 鞠新华, 张宇, 姜伟国, 夏振龙
临床经验	1004 胃癌多基因甲基化状态分析 赵成海, 张宁, 卜献民, 李岩, 张海鹏 1008 肝硬化患者腹水感染致病菌菌谱变化与药敏分析 丁熠, 陈金联, 朱金水 1012 细菌性痢疾与肠易激综合征相关性分析 肖海刚, 郭津生 1015 直肠癌C-erbB-2、nm23蛋白表达与预后的关系 高凤兰 1019 共病致大肠癌漏诊情况分析55例 刘剑君, 詹俊, 赖林, 刘建平 1022 进展期胃癌合并幽门梗阻内镜治疗103例 滕进波, 张宏博 1027 导丝技术在ERCP操作中的应用技巧 唐采白, 胡兵, 郭召军

附 录	1030 世界华人消化杂志投稿须知 1035 世界华人消化杂志作者、读者、编委反馈信息
致 谢	1036 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	946 第十五次全国中西医结合肝病学术会议 952 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通知 957 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议 962 更正与说明专栏、专家门诊 978 第十一届全国普通外科学术会议征文通知 992 第十八届全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议 996 第十届全军普通外科学术会议征文通知 1007 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》、第二届全国小肠疾病学术会议 1014 NERD及相关疾病国际研讨会 1026 第十一届全国胰腺外科学术研讨会征文、2006广州肝病防治研究新进展学术报告会
封面故事	杨建军, 耿翔, 高志光, 秦环龙. 益生菌及肠内外营养对重症急性胰腺炎大鼠肠道黏附分子及免疫屏障的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(10):953-957 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/953.asp
国际会议	Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006 Annual Postgraduate Course May 25-26, 2006 www.asge.org/education World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com 7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference

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 2006-04-08
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
中文编辑 潘伯荣 张海宁
电子编辑 张敏 李琪 韩江燕
本期审读 王瑾晖

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

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年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262

国外代号 M 4481

国内定价 每期24.00元 全年864.00元

广告经营许可证
1401004000050

World Chinese Journal of Digestology

April 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 10

EDITORIAL	939 Advance in liver transplantation for liver cancer <i>Chen ZS, Wang HH</i>
BASIC RESEARCH	942 DNA damage increases telomerase activity and mRNA expression of telomeric repeat binding factor 2 in gastric cancer cells <i>Ning HB, Li JC, Liu ZG, Fan DM</i> 947 Correlations of epidermal growth factor-mediated nuclear factor-kappa B and matrix proteinase activity with invasions of cholangiocarcinoma cells <i>Kong FM, Liu XF, Li HY, Sui CY, Li YJ, Zhang H, Guo RX</i> 953 Effects of probiotics and enteral and parenteral nutrition on intestinal mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and immune barrier of rats with severe acute pancreatitis <i>Yang JJ, Geng X, Gao ZG, Qin HL</i> 958 Cryopreservation of human fetal islets by vitrification <i>Zhao S, Fu YM, Liu LX, Chi YM, Li XF</i>
CLINICAL RESEARCH	963 Analysis of polymorphism of human leukocyte antigen Class I and II alleles in patients with hepatitis B virus infection <i>Zhang SY, Li D, Gu HX, Li XK, Jin X, Liu W, Du B, Lu B</i>
REVIEW	969 Role of transcription factor in regulation and control of liver cirrhosis <i>Long Y, Tang H</i> 973 Research progress in intestinal bacteria for metabolizing soybean isoflavones <i>Zhang X, Yao W, Zhu WY</i> 979 Current status of pathophysiological characteristics of ornithine decarboxylase and its related drugs <i>Chi L, Li RL, Chen WW</i>
RAPID COMMUNICATION	985 Effect of acupuncture serum on activity of phospholipase C γ -1 in gastric mucosal cells of rats with gastric ulcer <i>Yang ZB, Yan J, Zou XP, Yi SX, Chang XR, Lin YP, Tang S</i> 989 Apoptosis of BEL-7402 cell line mediated by retroviral vector containing antisense human telomerase RNA <i>Ma JC, Liu JY, Liu SL</i> 993 <i>In vitro</i> action of chitosan against <i>Helicobacter pylori</i> and its influential factors <i>Zheng TS, Wang YN, Zong AP</i> 997 Influence of <i>Xiexin decoction</i> on gastric emptying and gastrointestinal hormones in rats <i>Liu XN, Niu X, Jin XD, Si YC</i> 1001 Influence of bacterial infection on expression of nuclear factor-kappa B p65 after spleen-preservation operation in rabbits using microwave coagulation <i>Ju XH, Zhang Y, Jiang WG, Xia ZL</i>
CLINICAL PRACTICE	1004 Detection of multiple gene methylation in gastric cancer <i>Zhao CH, Zhang N, Bu XM, Li Y, Zhang HP</i>

	<p>1008 Bacterial spectrum changes and analysis of antibiotic sensitivity in ascitic infection patients with hepatic cirrhosis <i>Ding Y, Chen JL, Zhu JS</i></p> <p>1012 An analysis of relationship between bacterial dysentery and irritable bowel syndrome <i>Xiao HG, Guo JS</i></p> <p>1015 Correlations of C-erbB-2 and nm23 protein expression with prognosis of rectal cancer <i>Gao FL</i></p> <p>1019 Missed diagnosis for colorectal carcinoma due to comorbidity: Analysis of 55 cases <i>Liu JJ, Zhan J, Lai L, Liu JP</i></p> <p>1022 Endoscopic therapy for progressive gastric cancer complicated with obstruction of pylorus: analysis of 103 cases <i>Teng JB, Zhang HB</i></p> <p>1027 Application of wire technique in endoscopic retrograde cholangiopancreatography <i>Tang CB, Hu B, Guo ZJ</i></p>
APPENDIX	<p>1030 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p> <p>1035 Feedback information from authors, readers and editorial board of World Chinese Journal of Digestology</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>1036 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Yang JJ, Geng X, Gao ZG, Qin HL.</i> Effects of probiotics and enteral and parenteral nutrition on intestinal mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and immune barrier of rats with severe acute pancreatitis. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2006;14(10):953-957 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/953.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>Easl 2006 - The 41st Annual Meeting April 26-30, 2006</p> <p>Annual Postgraduate Course May 25-26, 2006 www.asge.org/education</p> <p>World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com</p> <p>7th World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association September 3-7, 2006 convention@edinburgh.org www.edinburgh.org/conference</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 April 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

中国肝癌肝移植的现状与展望

陈知水, 王海灏

陈知水, 王海灏, 华中科技大学同济医学院附属同济医院器官移植研究所 湖北省武汉市 430030
陈知水, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为实体器官移植和多器官联合移植。
通讯作者: 王海灏, 430030, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院器官移植研究所。
william_whh@medmail.com.cn
电话: 027-83662592 传真: 027-83662892
收稿日期: 2006-03-15 接受日期: 2006-03-25

摘要

肝癌行肝移植治疗的指征、效果和相关问题一直存在争论, 国际上已经有数个通用的肝癌肝移植标准, 如Milan标准、Pittsburgh标准、UCSF标准等等, 中国的移植学家们也在纷纷探讨适合中国的肝癌肝移植标准。本文收集并分析近年来国内外的文献, 结合本移植中心460例肝移植的病例, 对肝癌的分期标准、晚期肝癌行肝移植的指征进行了探讨, 笔者认为影响我国肝癌肝移植的主要因素有: 供肝的来源、术后乙肝及肿瘤的复发及相关社会因素等。

关键词: 肝移植; 分期标准; 指征

陈知水, 王海灏. 中国肝癌肝移植的现状与展望. 世界华人消化杂志 2006;14(10):939-941
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/939.asp>

0 引言

中国是乙肝、肝硬化和原发性肝癌的高发区, 我国原发性肝癌的患者总数已经高达全球的40%-50%, 全球每年新发病例的一半以上在我国^[1]。据中华医学会器官移植分会统计, 至2005年底, 全国累计施行肝移植手术近6000例, 其中肝癌肝移植约占40%左右。本文就我国开展肝癌肝移植的现状作一介绍, 并对其前景进行展望。

1 国际现行肝移植标准

目前已经公认, 肝移植是治疗肝脏良性终末期疾病的有效手段, 但肝癌患者是否适宜行肝移植手术尚存有争论。欧美国家早期曾热衷于肝癌肝移植, 后来发现肝癌肝移植后复发率高, 因而逐步摸索并制定出了目前国际上通用的Milan

标准, 及其他数个标准。按此标准选择肝癌病例行肝移植手术, 其术后长期生存率与良性肝脏疾病肝移植相似。

1.1 Milan标准^[2] (1)单个肿瘤直径 ≤ 5 cm; (2)小癌灶 ≤ 3 个, 每个直径 ≤ 3 cm; (3)无肝内大血管浸润; (4)无肝外转移。该标准制定于1996年, 是目前国际上较常用的肝癌肝移植选择标准。

1.2 Pittsburgh标准^[3] 2000年美国肝肿瘤研究组(American liver tumor study group)Marsh *et al*改良TNM分期, 也称为Pittsburgh标准(表1), 根据血管侵犯、肝叶分布、肿瘤大小、淋巴结受累及远处转移情况将肝癌分为I、II、IIIA、IIIB、IVA、IVB6期, I-IIIB符合肝移植标准, 而IVA和IVB则被排除在肝移植之外。

1.3 UCSF标准^[4] 2002年美国加州旧金山大学(UCSF)标准实际上是对Milan标准的拓展: 单个肿瘤直径 ≤ 6.5 cm, 或多发肿瘤数目 ≤ 3 个且每个肿瘤直径均 ≤ 4.5 cm, 所有肿瘤直径总和 ≤ 8 cm; 肿瘤无血管、淋巴结侵犯和肝外转移。

1.4 UNOS标准^[5] 2002-02, 美国器官分配网络(United Network for Organ Sharing, UNOS)根据改良TNM分期分配供肝, 基于终末期肝病(model for end-stage liver disease, MELD)评分系统将凝血时间[国际标准(INR)]、血浆肌酐、总胆红素输入公式: MELD评分 = $10[0.957 \times \log \text{肌酐清除率}(\text{mg/dL}) + 0.378 \times \log \text{总胆红素}(\text{mg/dL}) + 1.120 \times \log \text{INR} + 0.643]$ 。评分可分为6-40, 评分越高肝病越重, 供肝分配越优先。T1期肿瘤给予MELD评分24分, T2期29分, 等待供肝时间每延长3 mo加分1次(如肿瘤生长超过T2期标准则剔除)。具体标准见(表2)。

2 我国肝癌肝移植的争论

我国对肝癌患者行肝移植治疗的争论由来已久, 最大的争论集中在什么是适合我国国情的肝癌肝移植标准。我国由于开展肝移植较晚, 大量的肝癌患者施行了肝脏肿瘤切除手术。目前小肝癌(≤ 5 cm)行手术切除后5 a生存率可达60%-70%, 大肝癌亦可达30%-40%, 手术数量及

■背景资料

中国是乙肝、肝硬化和原发性肝癌的高发区, 至2005年底, 全国累计施行肝移植手术近6000例, 其中肝癌肝移植约占40%左右。国际上已经有数个通用的肝癌肝移植标准, 如Milan标准、Pittsburgh标准、UCSF标准等, 但我国仍无较统一的标准。我国每年开展大量的肝癌肝移植手术, 因无明确的适应证选择标准, 对大量晚期肝癌患者施行手术, 不仅无较大的治疗价值, 而且会浪费珍贵的供肝资源, 使亟待移植的良性疾病患者和早期肝癌患者失去手术机会。

■创新盘点

按肿瘤的大小、数量和侵犯范围将肝癌分为3期: I期(早期)肿瘤大小在5 cm以内, 伴明显的肝硬化; II期(中期)肿瘤大于5 cm或多个, 但局限于肝内, 无门静脉癌栓; III期(晚期)有门静脉癌栓或局部侵犯与转移。I期应视为肝移植的绝对适应证; II期肝癌患者可考虑行肝移植治疗; III期不宜行肝移植。

应用要点

进入21世纪后,由于供体的来源的相对紧张和移植医生对肝癌肝移植适应证认识的提高,大肝癌、晚期肝癌患者,特别是伴有肝外转移的患者行肝移植手术被大幅“缩水”。目前在国内外权威的几家大移植中心均把是否出现门静脉主干癌栓作为衡量晚期肝癌能否行肝移植的最后底线。

表 1 Pittsburgh改良TNM分期标准

分期	血管侵犯	受累肝叶	肿瘤大小 (cm)	淋巴结受累	远处转移	移植适应证
I	无或有微血管侵犯	不限	≤2	无	无	是
II	微血管侵犯	单叶	>2	无	无	是
III A	无	双叶	>2	无	无	是
III B	微血管侵犯	双叶	>2	无	无	是
IVA	大血管侵犯	不限	不限	无	无	否
IVB	不限	不限	不限	任一出现阳性		否

表 2 UNOS标准

分期	肿瘤数	肿瘤大小 (cm)	移植适应证
T1	单个	≤1.9	是
T2	单个或2-3个	2-5 均≤3	是
T3	单个或2-3个	>5 至少1个>3	否
T4a	≥4个	不限	否
T4b	有大血管侵犯	肿瘤大小及数目不限	否

手术效果均优于欧美国家^[6]。若按Milan标准,在我国肝癌患者均可行肝切除,且5 a生存率并不低于肝移植。因此我国学者对肝癌肝移植进行了大量深入细致的探索,以期找到符合我国国情的肝癌肝移植标准,目前尚缺乏大样本多中心的报道。樊嘉 *et al*^[7]认为,UCSF标准可能是比较符合我国国情的肝癌肝移植筛选标准,并考虑到目前我国的具体情况,在UCSF标准基础上适当放宽至将多发肿瘤数目由≤3个扩大到5个,将微血管癌栓或局限于单侧的静脉小分支癌栓也列入适应证。由于我国肝癌患者绝大部分均伴有乙肝肝硬化,且肝功能失代偿非常常见,因此对因肝功能失代偿而无法行肝脏肿瘤切除手术者行肝移植手术是众所公认的;另外,因肿瘤位置靠近大血管或不易切除的小肝癌也是肝移植的适应证。

我中心10余年来共施行了460例肝移植,其中肝癌患者占48.2%,我们按肿瘤的大小、数量和侵犯范围将肝癌分为三期: I期(早期)肿瘤大小在5 cm以内,伴明显的肝硬化; II期(中期)肿瘤大于5 cm或多个,但局限于肝内,无门静脉癌栓; III期(晚期)有门静脉癌栓或局部侵犯与转移。经研究发现, I期肝癌患者肝移植后有良好的存活率和肿瘤根治率,应视为肝移植的绝对适应证; II期肝癌患者肝移植后配合化疗,也可以明显延长患者的寿命,生活质量得以改善,部分患者还可获得较长时间的存活,因此也不失为一种治疗方法,可考虑行肝移植治疗; III期肝癌

患者肝移植的效果差,且费用昂贵,不宜提倡^[8]。

我国目前肝癌肝移植另一大的争论是对于晚期肝癌,特别是手术已经无法切除者或切除后再次甚至多次复发者,是否作为肝移植的适应证。由于我国早年开展肝移植手术时片面追求移植病例的数量和围手术期的效果,而忽视了对肝移植后长期效果的追求,我国在2000年以前开展的肝移植病例有50%以上为肝癌患者,甚至是晚期肝癌患者。这些移植手术获得了相当理想的围手术期效果和1 a生存率,但绝大多数患者在1 a左右时间内发生了肝癌复发,并不久死亡。进入21世纪后,由于供体的来源的相对紧张和移植医生对肝癌肝移植适应证认识的提高,国内各大移植中心不约而同的对肝移植由早期的追求数量上的提高改为追求质量上的进步。于是大肝癌、晚期肝癌患者,特别是伴有肝外转移的患者行肝移植手术被大幅“缩水”,甚至出现过被某些移植中心完全叫停的情况。目前在国内外权威的几家大移植中心均把是否出现门静脉主干癌栓作为衡量晚期肝癌能否行肝移植的最后底线。

3 影响我国肝癌肝移植发展的因素

3.1 供体的因素 由于我国的特殊国情,在1990-1999年相对于器官移植受体而言,器官供体来源相对充足,器官移植医生的注意力主要集中在手术能否进行及围手术期的恢复上,而忽视了肝移植适应证的选择问题。近几年,由于我国法律体制的不断完善和器官移植在全国各地的蓬勃开展,供体来源日趋紧张,而要求行器官移植的等待名单却不断增多,移植医生们不得不进行慎重的选择,于是更多的供肝被移植给了良性疾病的患者或早期肝癌患者。

3.2 移植后乙肝复发的因素 我国的肝癌多由乙肝演变而来,患者行肝移植手术治疗后,由于服用大量的免疫抑制药物,乙肝复发率极高,复发

后往往比正常情况更易进展至肝硬化. 有文献报道, 由于肝移植术后乙肝复发, 某些患者在术后第1 a就出现了亚急性肝衰竭, 成为影响肝移植术后长期存活率和预后的重要问题^[9-10]. 目前国内针对肝移植术后乙肝复发最常用的方法是长期服用拉米扶定联合乙肝免疫球蛋白注射治疗, 虽然已有多篇报道, 但仍缺乏大样本多中心的权威论证.

3.3 移植后肿瘤复发的因素 肝癌肝移植术后, 由于机体处于免疫抑制状态, 肿瘤复发的可能性大大增加, 这在大肝癌或晚期肝癌中更容易发生, 因此肝癌肝移植的远期预后更增加了不可预见性.

3.4 社会因素 目前人们对器官移植的认识尚存有相当大的不足, 中国传统观念认为“身体发肤受之父母, 不可言弃”, 于是相当多的患者在患病早期很难接受移植的治疗方案, 常常在“病入膏肓”时才抱定最后一丝希望来行移植手术, 而此时病情往往已经突破适应证的底线了. 另外在我国, 由于社会医疗保险体系的不健全, 大部分患者无法独立承担进行肝移植的巨额医疗费用, 经济因素也成为了制约器官移植大力发展的另一大瓶颈.

4 我国肝癌肝移植的展望

我国肝癌占全球肝癌的一半以上, 全球每年54.1万新发肝癌患者中有31.8万发生在中国^[11], 随着我国医疗保险体系的不断完善, 我国拥有世界上最大的移植受者群, 如何早期制定出符合我国国情的肝癌肝移植分期标准和手术适应证是当务之急. 对肿瘤生物学特性和移植免疫学的不断深入了解和研究, 将有助于移植科学家们制定出更合理的肝癌肝移植适应证标准. 新型的免疫抑制剂西罗莫司(Sirolimus)的问世已经在谋求将移植后免疫抑制作用和抗肿瘤作用统一的可能性, 这也给世界各国移植学家们提供了一个新的研究思路, 将来是否可能将移植后免疫抑制与抗肿瘤、抗肝炎病毒等作用有机的结合起来, 是一个诱人的设想和广阔的研究领域.

今后10 a内, 由于移植受体的不断扩大和移植供体来源的相当紧缺, 成人活体间肝移植的开展已经成为一种必然的趋势, 并将在一定程

度上缓解供体短缺的状况. 而对肝癌患者, 接受成人供肝的条件势必更为严格, 这也将成为我国移植学家们探讨的一个热点.

随着各项器官移植数量的不断积累, 我国目前已经成为仅次于美国的世界第二移植大国, 相信在全国器官移植工作者的不断努力下, 我国的各项移植成绩包括肝癌肝移植的效果都将步入国际先进行列, 而肝移植作为迄今为止最有效的肝癌治疗手段将得到进一步的发展.

5 参考文献

- 1 Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Qin LX, Sun HC, Ye QH, Wang L, Zhou J, Qiu SJ, Li Y, Ji XN, Liu H, Xia JL, Wu ZQ, Fan J, Ma ZC, Zhou XD, Lin ZY, Liu KD. A decade's studies on metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 187-196
- 2 Mazzaferro V, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 693-699
- 3 Marsh JW, Dvorchik I, Bonham CA, Iwatsuki S. Is the pathologic TNM staging system for patients with hepatoma predictive of outcome? *Cancer* 2000; 88: 538-543
- 4 Yao FY, Ferrell L, Bass NM, Watson JJ, Bacchetti P, Venook A, Ascher NL, Roberts JP. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: expansion of the tumor size limits does not adversely impact survival. *Hepatology* 2001; 33: 1394-1403
- 5 Sharma P, Balan V, Hernandez JL, Harper AM, Edwards EB, Rodriguez-Luna H, Byrne T, Vargas HE, Mulligan D, Rakela J, Wiesner RH. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: the MELD impact. *Liver Transpl* 2004; 10: 36-41
- 6 陈孝平. 原发性肝癌肝切除治疗现状. *临床外科杂志* 1996; 4: 303-304
- 7 樊嘉, 徐泱, 周俭. 肝癌患者肝移植适应证的选择. *中华医学杂志* 2005; 85: 1662-1664.
- 8 陈知水, 曾凡军, 明长生, 张伟杰, 林正斌, 魏来, 蒋继贫, 朱学海, 刘敦贵, 唐莉, 陈忠华, 夏穗生. 肝癌患者接受肝移植的价值评估. *中华器官移植杂志* 2004; 1: 8-9
- 9 Grellier L, Mutimer D, Ahmed M, Brown D, Burroughs AK, Rolles K, McMaster P, Beranek P, Kennedy F, Kibbler H, McPhillips P, Elias E, Dusheiko G. Lamivudine prophylaxis against reinfection in liver transplantation for hepatitis B cirrhosis. *Lancet* 1996; 348: 1212-1215
- 10 Poterucha JJ, Wiesner RH. Liver transplantation and hepatitis B. *Ann Intern Med* 1997; 126: 805-807
- 11 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001; 94: 153-156

■同行评价

文章收集并分析了近年来国内外文献, 结合个人有关临床经验, 对肝癌的分期标准、晚期肝癌行肝移植的指征进行了探讨, 提出了有创造性的学术观点, 对规范我国肝癌肝移植适应证具有重要参考价值. 文章有较好的科学性和可读性, 有一定的学术意义.

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

DNA损伤诱导胃癌细胞端粒酶活性和TRF2表达增高

宁寒冰, 李继昌, 刘志国, 樊代明

■背景资料

端粒及端粒相关因子与DNA损伤的关系是端粒功能研究的一个热点, 而DNA损伤修复抑制也正在成为肿瘤治疗的新靶点。我们的研究首次发现: 端粒酶和TRF2参与化疗药引起的胃癌细胞DNA损伤反应, 从而为肿瘤的治疗提供了新的思路。

宁寒冰, 李继昌, 郑州大学第一附属医院消化内科 河南省郑州市 450052
刘志国, 樊代明, 国家肿瘤生物学重点实验室, 第四军医大学西京医院全军消化病研究所 陕西省西安市 710032
宁寒冰, 郑州大学医学院博士生, 主要从事消化道肿瘤的研究, 国家自然科学基金资助项目, No. 30400016
通讯作者: 刘志国, 710032, 陕西省西安市长乐西路15号, 第四军医大学西京医院消化病研究所. liuzhiguo@fmmu.edu.cn
电话: 029-84775229
收稿日期: 2006-01-03 接受日期: 2006-01-25

DNA damage increases telomerase activity and mRNA expression of telomeric repeat binding factor 2 in gastric cancer cells

Han-Bing Ning, Ji-Chang Li, Zhi-Guo Liu, Dai-Ming Fan

Han-Bing Ning, Ji-Chang Li, Department of Digestive Diseases, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China
Zhi-Guo Liu, Dai-Ming Fan, State Key Laboratory of Cancer Biology, Institute of Digestive Diseases, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi Province, China
Supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 30400016
Correspondence to: Zhi-Guo Liu, Institute of digestive disease, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, 15 West Changle Road, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. liuzhiguo@fmmu.edu.cn
Received: 2006-01-03 Accepted: 2006-01-25

Abstract

AIM: To investigate the possible involvement of telomerase and telomeric repeat binding factors (TRF1 and TRF2) in chemotherapeutic agents-induced DNA damage responses in gastric cancer cells.

METHODS: Gastric cancer cell line SGC7901 and MKN28 were treated with various concentrations of etoposide for 3, 6, 12, 24 and 36 h. Telomerase activity was measured by real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol (RTQ-TRAP) assay. The expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA was detected by real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of TRF1 and TRF2 were detected

by Western blot and real time RT-PCR at protein and mRNA level, respectively.

RESULTS: Telomerase activity and TRF2 mRNA expression were up-regulated at the early stage of drug treatment in both cell lines ($P < 0.05$). The expression of TRF1 mRNA was also increased, but it was not significant ($P > 0.05$). The increase of telomerase activity was independent on hTERT mRNA levels, and TRF2 was significantly increased both in protein and mRNA levels ($P < 0.05$). The up-regulation was in a drug dose-dependent manner.

CONCLUSION: Telomerase activity and TRF2 expression is possibly involved in the responses of gastric cancer cells to DNA-damaging drugs.

Key Words: Telomerase; TRF1; TRF2; Gastric carcinoma; DNA damage

Ning HB, Li JC, Liu ZG, Fan DM. DNA damage increases telomerase activity and mRNA expression of telomeric repeat binding factor 2 in gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10):942-946

摘要

目的: 检测在化疗药引起胃癌细胞DNA损伤过程中端粒酶、TRF1和TRF2的表达。

方法: 用不同浓度足叶乙贰处理胃癌细胞SGC7901和MKN28, 分别在3, 6, 12, 24和36 h进行检测。采用实时定量TRAP分析检测端粒酶活性; 用实时RT-PCR检测hTERT mRNA表达; 用Western blot和实时RT-PCR检测TRF1和TRF2表达。

结果: 两种细胞端粒酶活性及TRF2 mRNA表达均在药物处理的早期明显增高($P < 0.05$), 且显示明显的药物浓度依赖性($P < 0.05$); TRF1表达稍增高, 但无统计学意义($P > 0.05$)。hTERT mRNA表达无明显改变($P > 0.05$)。TRF2表达在蛋白和mRNA水平均增高($P < 0.05$)。

结论: 端粒酶和TRF2参与化疗药引起的胃癌细胞DNA损伤反应。

关键词: 端粒酶; 端粒重复序列结合因子1; 端粒重复序列结合因子2; 胃癌; DNA损伤反应

宁寒冰, 李继昌, 刘志国, 樊代明. DNA损伤诱导胃癌细胞端粒酶活性和TRF2表达增高. 世界华人消化杂志 2006;14(10):942-946
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/942.asp>

0 引言

足叶乙甙(etoposide)是临床常用的肿瘤化疗药物, 主要作用机制为抑制DNA拓扑异构酶, 导致DNA双链断裂^[1]. 端粒是位于染色体末端的DNA-蛋白结构, 由TTAGGG重复序列和大量的端粒结合蛋白组成^[2]. 其中端粒重复序列结合因子(TRF1和TRF2)是两个主要的端粒结合蛋白, 维持端粒的正常结构和功能^[3]. 最新研究发现TRF2能够抑制ATM依赖的DNA损伤反应, 是通用的DNA损伤修复因子^[4]. 我们检测了在胃癌细胞中, etoposide引起的端粒酶、TRF1和TRF2表达的改变, 探讨其在肿瘤对化疗药反应中的可能意义.

1 材料和方法

1.1 材料 RPMI 1640培养基购自GIBCO公司; 抗TRF1、TRF2、 β -actin抗体分别购自Imgenex、Upstate、Sigma公司; 足叶乙甙为Sigma公司产品; SYBR Green I为Applied Biosystems公司产品. 人胃癌细胞系SGC7901和MKN28均由第四军医大学全军消化病研究所保存. 分别用2 mg/L, 20 mg/L, 200 mg/L, 1 000 mg/L etoposide处理细胞, 在3, 6, 12, 24和36 h进行检测.

1.2 方法 采用SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时TRAP, 反应体系包括: 0.25 μ g细胞提取物, 1 \times SYBR Green I 缓冲液, dNTP各2.5 mmol/L, 15 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L EGTA, 0.2 μ g T4基因蛋白, 1 U AmpliTaq Gold聚合酶, 0.1 μ g TS引物(5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3')和0.1 μ g ACX引物[5'-GCGCGG(CTTACC)₃CTA ACC-3']. PCR反应采用ABI Prism 7700序列检测系统: 25 $^{\circ}$ C延伸20 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min灭活端粒酶, 以95 $^{\circ}$ C 20 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s循环40次. 以梯度稀释的293细胞提取物制作标准曲线, 未用药SGC7901测量值的平均值设定为100%, 比较获得其他样品的相对值. 收获细胞, 三去污裂解液提取细胞总蛋白, Bradford法进行蛋白定量. 120 g/L SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白, 将蛋白条带转移至硝酸纤维膜上, 50 g/L脱

脂奶粉封闭后分别与TRF1, TRF2, β -actin抗体及HRP标记的相应二抗孵育, ECL法显色, Western blot检测蛋白表达. 采用探针法进行实时RT-PCR, 上海生工的RNA抽提试剂盒提取总RNA, 根据SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen)操作说明进行逆转录反应. PCR反应采用ABI Prism 7700序列检测系统, 引物和探针参照文献[5]. 反应体系包括: 1 \times TaqMan缓冲液, 3.5 mmol/L MgCl₂, dNTP各200 μ mol/L, 400 μ mol/L dUTP, 200 nmol/L引物, 80 nmol/L探针, 0.625 U AmpliTaq Gold聚合酶. 95 $^{\circ}$ C预变性10 min, 以95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min循环40次. 从质粒AdTRF2^[21]分离出mycTRF2 cDNA片段, 梯度稀释后制作标准曲线, 未用药SGC7901测量值的平均值设定为100%, 比较获得其他样品的相对值.

统计学处理 采用SPSS 13.0统计学软件, 进行ANOVA和GLM repeated measures分析.

2 结果

2.1 端粒酶活性改变 用不同浓度的etoposide处理, 分别在3, 6, 12, 24和36 h检测端粒酶活性. 与未处理组相比, 两种细胞的端粒酶活性在药物处理后3, 6和12 h升高($P < 0.05$), 其后下降; 具有一定程度的药物浓度依赖性($P < 0.05$), 但药物诱导的端粒酶活性增高在两种细胞间无显著差别(图1). 实时RT-PCR检测hTERT mRNA表达无明显改变($P > 0.05$, 图2). 1 000 mg/L etoposide处理组在3 h后由于死亡细胞过多, 无法进行检测.

2.2 TRF1和TRF2表达 分别用Western blot和实时RT-PCR检测药物处理后TRF1和TRF2蛋白水平和mRNA水平的表达. TRF2蛋白在药物处理后24 h或36 h时增加(图3). TRF2 mRNA的增高出现在药物处理后的早期, 在24 h和36 h下降, 其中3 h时表达最高; 而且有明显的药物浓度依赖性. 部分高剂量处理组由于死亡细胞过多而无法进行检测. 药物诱导的TRF2 mRNA增高在两种细胞间无显著差别($P > 0.05$, 图4). 药物处理后TRF1表达稍增高, 但无统计学意义($P > 0.05$).

3 讨论

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 化疗仍为其主要的治疗手段, 但由于存在耐药性和毒副作用, 效果不尽人意. 因此迫切需要寻求新的治疗途径. 大部分的化疗药物通过损伤DNA发挥作用, 而有效的DNA修复是肿瘤细胞对治疗产生

■同行评价

本研究利用TR-AP、Real time PCR 和Western blot等方法检测了胃癌细胞DNA损伤过程中端粒酶活性、hTERT mRNA表达和TRF1和TRF2表达等指标, 采用的方法较先进, 设计合理, 论述清晰有据, 研究结果对于阐释端粒酶和TRF在化疗药引起胃癌细胞DNA损伤反应过程中的作用有一定意义.

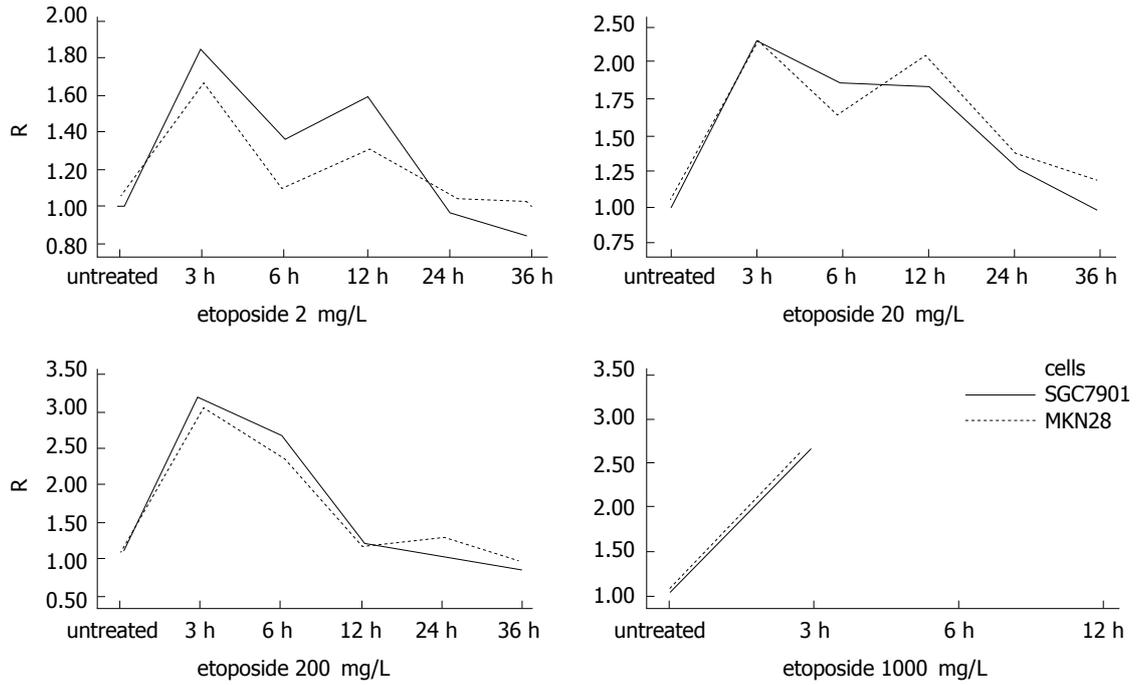


图 1 etoposide处理后的端粒酶活性(实时定量TRAP分析).

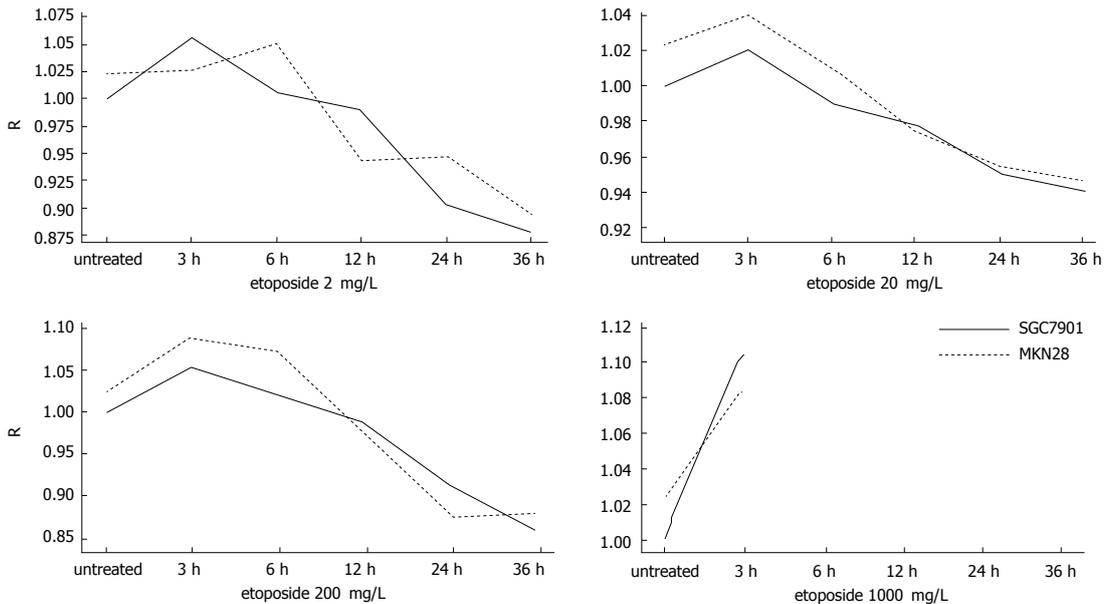


图 2 etoposide处理后hTERT mRNA在胃癌细胞的表达(实时RT-PCR).

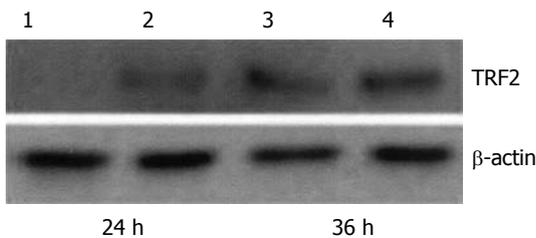


图 3 etoposide处理后TRF2在胃癌细胞的表达(Western blot). 1: MKN28; 2: SGC7901; 3: MKN28; 4: SGC7901.

耐受的重要原因^[6]. 因此, 抑制DNA修复是提高DNA损伤类治疗方式效果的有效方法, 最近已有一些抑制DNA修复蛋白的药物如MGMT抑制

剂, PARP抑制剂, 甲氧胺等进入临床试验^[7-9], 在与化疗或放疗的联合使用中显示了良好的前景. 不久的将来, DNA损伤修复抑制很可能成为肿

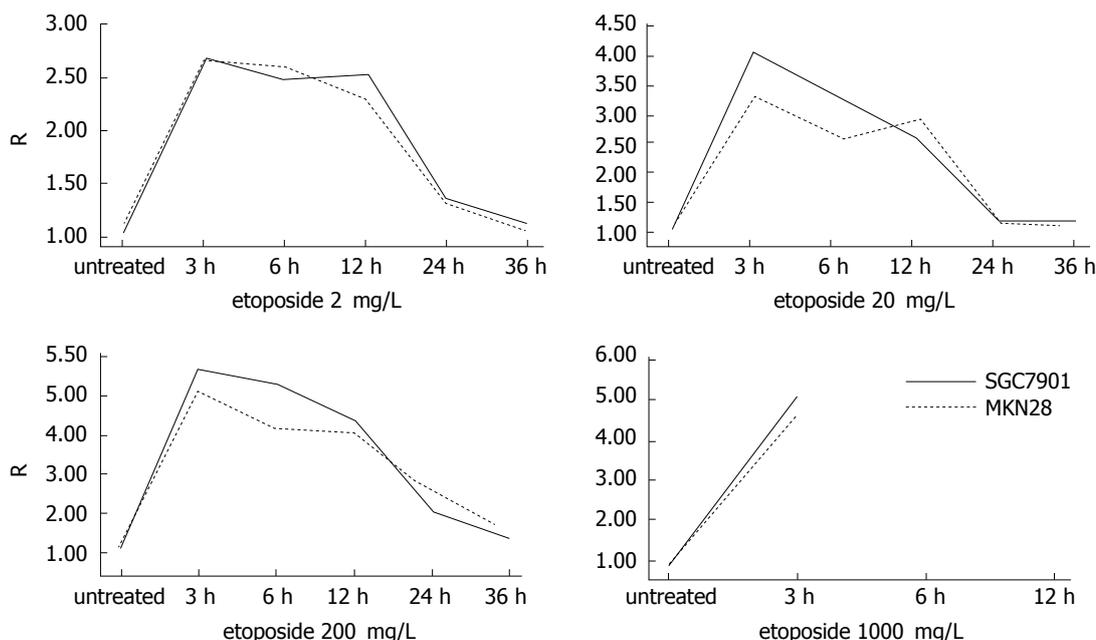


图 4 etoposide处理后TRF2 mRNA在胃癌细胞的表达(实时RT-PCR).

瘤常规治疗的一部分^[10].

由六个端粒结合蛋白TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1和Rap1组成的复合体起着保护端粒的作用, 被称为是遮蔽蛋白^[11]. 遮蔽蛋白其中的3个亚单位TRF1、TRF2和POT1直接识别TTAGGG序列, 与其他3个亚单位TIN2、TPP1、Rap1相互作用, 使细胞可以区分端粒结构和DNA损伤^[12-14]. 没有遮蔽蛋白的保护, DNA损伤监测系统可能会启动DNA损伤修复途径加工处理染色体末端^[15]. 许多DNA修复因子如Ku, WRN, Mre11复合体等都能够端粒被检测到^[16-18]. 以前的研究认为这些DNA修复因子是与遮蔽蛋白相互作用, 重塑端粒DNA结构, 保护端粒, 使之不被降解, 不引发DNA损伤反应^[19]. 但最近的研究显示了药物或射线引起的DNA损伤能使TRF2表达增高, 或同时伴有端粒酶活性增高, 是DNA损伤反应的早期事件^[5]. Bradshaw *et al*^[20]的研究中, 射线可以导致成纤维细胞TRF2表达瞬时增高, 并且出现于DNA损伤反应的早期; 当TRF2过表达时能抑制ATM依赖的DNA损伤反应^[21]. 在端粒, TRF2与DSBs修复的蛋白如Ku, DNA PKcs, ERCC1/XPC, WRN等有相互作用^[22-23]; TRF2还能与ATM直接作用^[24]. 抑制端粒酶活性会使肿瘤细胞对DNA损伤敏感性增高, 易于凋亡, 也被认为与DNA损伤修复相关^[25]. 因此, 端粒酶或端粒结合蛋白也有DNA修复功能, 可能是细胞用于保护端粒的古老而通用的DNA修复因子^[4]. 我们的研究中, 用不同浓度的etoposide

处理胃癌细胞, 分别在3, 6, 12, 24和36 h检测端粒酶活性和TRF1、TRF2表达, 发现细胞端粒酶活性及TRF2 mRNA表达在药物处理后均明显增高, 且显示明显的药物浓度依赖性; TRF1表达稍增高, 但无统计学意义; hTERT为端粒酶蛋白亚单位, 实时RT-PCR检测hTERT mRNA表达无明显改变, 提示端粒酶活性改变可能通过转录后机制^[26]. 与TRF2 mRNA表达不同, TRF2蛋白水平的增高出现较晚, 可能与DNA损伤反应无关, 而与细胞周期或凋亡等相关^[5].

我们的研究结果提示: 端粒酶和TRF2参与化疗药物引起的胃癌细胞DNA损伤反应, 为肿瘤的治疗提供了新的思路. 但端粒酶和TRF2是否与肿瘤对化疗的耐受性相关, 我们将通过进一步的实验证实.

4 参考文献

- 1 Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multi-drug resistance of tumor cells. *Biochemistry* 2000; 65: 95-106
- 2 Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J Biol Chem* 2004; 279: 51338-51342
- 3 Wang RC, Smogorzewska A, de Lange T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* 2004; 119: 355-368
- 4 Wright WE, Shay JW. Telomere-binding factors and general DNA repair. *Nat Genet* 2005; 37: 116-118
- 5 Klapper W, Qian W, Schulte C, Parwaresch R. DNA damage transiently increases TRF2 mRNA expression and telomerase activity. *Leukemia* 2003; 17: 2007-2015
- 6 Gatti L, Zunino F. Overview of tumor cell chemore-

- istance mechanisms. *Methods Mol Med* 2005; 111: 127-148
- 7 Tserng KY, Ingalls ST, Boczek EM, Spiro TP, Li X, Majka S, Gerson SL, Willson JK, Hoppel CL. Pharmacokinetics of O6-benzylguanine (NSC 637037) and its metabolite, 8-oxo-O6-benzylguanine. *J Clin Pharmacol* 2003; 43: 881-893
- 8 Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7265-7279
- 9 Liu L, Gerson SL. Therapeutic impact of methoxyamine: blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway. *Curr Opin Investig Drugs* 2004; 5: 623-627
- 10 Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev* 2005; 31: 603-617
- 11 de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005; 19: 2100-2110
- 12 Houghtaling BR, Cuttonaro L, Chang W, Smith S. A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2. *Curr Biol* 2004; 14: 1621-1631
- 13 Court R, Chapman L, Fairall L, Rhodes D. How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures. *EMBO Rep* 2005; 6: 39-45
- 14 van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998; 92: 401-413
- 15 de Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 2002; 21: 532-540
- 16 Zhu XD, Kuster B, Mann M, Petrini JH, de Lange T. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* 2000; 25: 347-352
- 17 Slijepcevic P, Al-Wahiby S. Telomere biology: integrating chromosomal end protection with DNA damage response. *Chromosoma* 2005; 114: 275-285
- 18 Hu JS, Feng H, Zeng W, Lin GX, Xi XG. Solution structure of a multifunctional DNA- and protein-binding motif of human Werner syndrome protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18379-18384
- 19 Takai H, Smogorzewska A, de Lange T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 2003; 13: 1549-1556
- 20 Bradshaw PS, Stavropoulos DJ, Meyn MS. Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nat Genet* 2005; 37: 193-197
- 21 Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 1999; 283: 1321-1325
- 22 Opresko PL, von Kobbe C, Laine JP, Harrigan J, Hickson ID, Bohr VA. Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem* 2002; 277: 41110-41119
- 23 Song K, Jung D, Jung Y, Lee SG, Lee I. Interaction of human Ku70 with TRF2. *FEBS Lett* 2000; 481: 81-85
- 24 Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, Bakkenist C, Kastan MB, Petrini JH, de Lange T. The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol* 2004; 2: E240
- 25 Lee KH, Rudolph KL, Ju YJ, Greenberg RA, Cannizzaro L, Chin L, Weiler SR, DePinho RA. Telomere dysfunction alters the chemotherapeutic profile of transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3381-3386
- 26 Yi X, Shay JW, Wright WE. Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 4818-4825

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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

• 消息 •

第十五次全国中西医结合肝病学术会议

本刊讯 第十五次全国中西医结合肝病学术会议将于2006-09在天津举行, 现将征文通知公布如下:

1 截稿日期

2006-06-15截稿

2 联系方式

上海中医药大学 胡义扬; 邮编: 201203

EGF中介的 NF- κ B 及细胞外基质降解酶与胆管癌细胞侵袭相关性

孔凡民, 刘小方, 李航宇, 隋春阳, 李昱骥, 张浩, 郭仁宣

孔凡民, 李航宇, 李昱骥, 张浩, 郭仁宣, 中国医科大学附属第一医院普外科 辽宁省沈阳市 110001
刘小方, 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院肝胆外科 山东省烟台市 264000
孔凡民, 1990年中国医科大学学士, 2001年博士, 副教授, 主要从事肝胆方面研究。
辽宁省教育厅高等学校科学研究项目 No. 05L510
通讯作者: 孔凡民, 110001, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属第一医院普外科, kong_fanmin@yahoo.com.cn
电话: 024-83283336
收稿日期: 2006-01-10 接受日期: 2006-02-08

Correlations of epidermal growth factor-mediated nuclear factor-kappa B and matrix proteinase activity with invasions of cholangiocarcinoma cells

Fan-Min Kong, Xiao-Fang Liu, Hang-Yu Li, Chun-Yang Sui, Yu-Ji Li, Hao Zhang, Ren-Xuan Guo

Fan-Min Kong, Hang-Yu Li, Chun-Yang Sui, Yu-Ji Li, Hao Zhang, Ren-Xuan Guo, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China
Xiao-fang Liu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Yantai Yuhuangding Hospital of Qingdao University Medical College, Yantai 264000, Shandong Province, China

Supported by Scientific Research Project for higher education of Liaoning Province, No. 05L510
Correspondence to: Dr. Fan-Min Kong, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China. kong_fanmin@yahoo.com.cn
Received: 2006-01-10 Accepted: 2006-02-08

Abstract

AIM: To explore the mechanism of epidermal growth factor (EGF) in the promotion of human cholangiocarcinoma cell invasion.

METHODS: Invasion assay and cell proliferation assay were performed in human cholangiocarcinoma cell line HuCCT1 treated with different concentrations of EGF. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to detect the expression of ma-

trix metalloproteinases (MMPs), urokinase type plasminogen activator (uPA) and plasminogen activator inhibitor (PAI-1) in HuCCT1 cells. The activity of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) was determined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). After pretreatment with pyrrolidine dithiocarbamate or ibuprofen, the invasion of HuCCT1 cells was observed.

RESULTS: EGF treatment resulted in increased invasions of HuCCT1 cells in a dose-dependent manner (cell number as EGF at 10, 100 μ g/L vs 0 μ g/L: 35.4 ± 6.2 , 57.2 ± 7.6 vs 16.3 ± 3.1 ; $t = 4.77$, $P = 0.009$; $t = 8.63$, $P = 0.001$, respectively). However, EGF did not affect the proliferation in HuCCT1 cells. RT-PCR and Western blot showed that EGF dramatically increased the expression of MMP-9, uPA and PAI-1 mRNA and protein in HuCCT1 cells, but it did not change the expression of MMP-2. The activity of NF- κ B was significantly increased after EGF treatment, while EGF-induced invasion of HuCCT1 cells was markedly inhibited by pretreatment with PDTC or ibuprofen (cell number: 46.6 ± 4.6 vs 62.3 ± 5.2 , $t = 3.168$, $P = 0.037$; 35.3 ± 5.4 vs 62.3 ± 5.2 , $t = 6.30$, $P = 0.003$).

CONCLUSION: EGF promotes the invasion of human cholangiocarcinoma cells, and the up-regulation of MMP-9, uPA, PAI-1 and NF- κ B activity is involved in this process.

Key Words: Epidermal growth factor; Matrix metalloproteinases; Urokinase type plasminogen activator; Plasminogen activator inhibitor; Nuclear factor-kappa B; Cholangiocarcinoma; Invasion

Kong FM, Liu XF, Li HY, Sui CY, Li YJ, Zhang H, Guo RX. Correlations of epidermal growth factor-mediated nuclear factor-kappa B and matrix proteinase activity with invasions of cholangiocarcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10):947-952

摘要

目的: 探讨表皮生长因子(EGF)诱导胆管癌细胞侵袭力的相关机制。

■ 创新盘点

EGF诱导胆管癌细胞侵袭力的机制不明, 相关报道甚少。本文首次证明EGF能够通过促进NF- κ B活性信号传导路径, 激活MMP-9, uPA和PAI-1等蛋白水解酶而增强胆管癌细胞的侵袭力。

■应用要点

本文结果表明NF- κ B抑制剂能够抑制EGF所诱导的胆管癌细胞侵袭力,具有临床应用价值。

方法: 检测胆管癌细胞株HuCCT1在EGF不同浓度下的细胞侵袭力及细胞增殖情况;采用RT-PCR及Western blot分析方法,检测基质金属蛋白酶(MMPs)、尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)、纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1)在不同EGF浓度下的基因和蛋白表达;采用凝胶电泳迁移率试验(EMSA)检测核转录因子(nuclear factor kappa B, NF- κ B)在不同EGF浓度下的活性;并用NF- κ B的抑制剂PDTC和布洛芬(ibuprofen)预先处理HuCCT1胆管癌细胞后,检测其对HuCCT1胆管癌细胞侵袭力的影响。

结果: 随着EGF浓度的增加,胆管癌细胞株HuCCT1侵袭细胞数也随之增加,具有明显的浓度依赖性(EGF 10, 100 μ g/L vs 0 μ g/L: 35.4 \pm 6.2 vs 16.3 \pm 3.1, $t = 4.77$, $P = 0.009$; 57.2 \pm 7.6 vs 16.3 \pm 3.1, $t = 8.63$, $P = 0.001$), 而EGF浓度的变化对HuCCT1细胞的增殖无明显影响。EGF明显上调HuCCT1细胞中MMP-9、uPA和PAI-1的mRNA和蛋白表达水平, MMP-2不受影响。随着EGF浓度的增加, NF- κ B的活化明显增强; PDTC和布洛芬明显抑制EGF诱导的HuCCT1细胞侵袭力(46.6 \pm 4.6 vs 62.3 \pm 5.2, $t = 3.168$, $P = 0.037$; 35.3 \pm 5.4 vs 62.3 \pm 5.2, $t = 6.30$, $P = 0.003$)。

结论: EGF能够增强胆管癌细胞的侵袭力,其增强的侵袭力可能是通过NF- κ B信号传导途径, 激活MMP-9, uPA和PAI-1等蛋白水解酶而实现的。

关键词: 表皮生长因子; 基质金属蛋白酶; 尿激酶型纤溶酶原激活剂; 纤溶酶原激活物抑制剂; 核转录因子- κ B; 胆管癌; 侵袭

孔凡民, 刘小方, 李航宇, 隋春阳, 李昱曩, 张浩, 郭仁宣. EGF中介的NF- κ B及细胞外基质降解酶与胆管癌细胞侵袭的相关性. 世界华人消化杂志 2006;14(10):947-952
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/947.asp>

0 引言

胆管癌是以浸润性生长为其病理学特征, 其早期向邻近组织侵袭和转移是导致手术难以切除、预后差的主要原因。表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和EGF受体(EGF receptor)在胆管癌组织中高表达, 并且与胆管癌发展相关^[1-3], 暗示EGF可能刺激胆管癌细胞的侵袭, 促进其发展。但是, EGF促进胆管癌细胞侵袭的分子机制还不十分清楚。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)、

尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase type plasminogen activator, uPA)和纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor, PAI-1)能够降解基底膜及细胞外基质(ECM), 而使肿瘤细胞穿过基底膜保护, 侵入周边组织, 其在肿瘤细胞侵袭过程中起决定作用。核转录因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)是转录调节蛋白质家族的一员, 能够激活、调节MMPs、uPA和PAI-1的转录, 促进细胞侵袭和转移^[4-7]。我们在人胆管癌HuCCT1细胞株中, 研究EGF对HuCCT1细胞侵袭力、NF- κ B活性、MMP-2、MMP-9、uPA及PAI-1蛋白表达的调节, 探讨EGF促进胆管癌细胞侵袭增强的相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料 HuCCT1细胞株由日本佐贺大学医学部外科教研室惠赠。细胞用含100 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养基, 置于50 mL/L CO₂, 37°C条件下培养传代。血清与RPMI 1640培养基均为美国GIBCO公司产品。EGF购于Biomedical Technologies Inc. (Stoughton, MA)。

1.2 方法 体外侵袭力检测在细胞培养器中进行, 培养器中含有过滤器, 孔径大小为8.0 μ m, 其表面覆盖一层基膜, 浓度为250 μ g/cm², 室温下过夜干燥。HuCCT1细胞经不同浓度EGF处理24 h后, 用PBS溶液冲洗2次, 加到培养器的上层, 细胞数为1 \times 10¹⁰/L。DMEM作为诱导剂加入下层。经过16 h孵育后, 取出过滤器, 用甲醛固定, 然后用棉签把上层细胞完全擦掉, Gimza染色。最后, 在光镜下计数从上层移到下层的肿瘤细胞数。将5个视野的平均细胞数定义为肿瘤细胞的侵袭力。HuCCT1细胞在EGF作用下的生长由WST-1增殖检测试剂盒测定(Takara, Kyoto, Japan), 方法参照说明书。另用组织裂解液(Pierce公司)裂解细胞, 然后用蛋白分析试剂盒(Bio-Rad, Hercules, CA)进行蛋白定量。SDS-PAGE胶分离蛋白质, 于4°C转移到硝酸纤维膜上。经TBS浸泡10 min后, 用50 g/L脱脂奶粉TBS封闭1 h; TBS漂洗, 加入一抗室温孵育1 h后TBS 5 min漂洗3次, 加入二抗室温孵育1 h后TBS洗膜后ECL显色压片。细胞总RNA的提取采用Trizol总RNA提取试剂盒(invitrogen公司)。电泳鉴定RNA质量并在260 nm测其吸光度值。所有引物均经GenBank查询为目前已知基因特异性引物序列。MMP-2: Sense 5'-ATGGCAAGGAG-TACAACAGC-3', Antisense 5'-GCTGGTG-

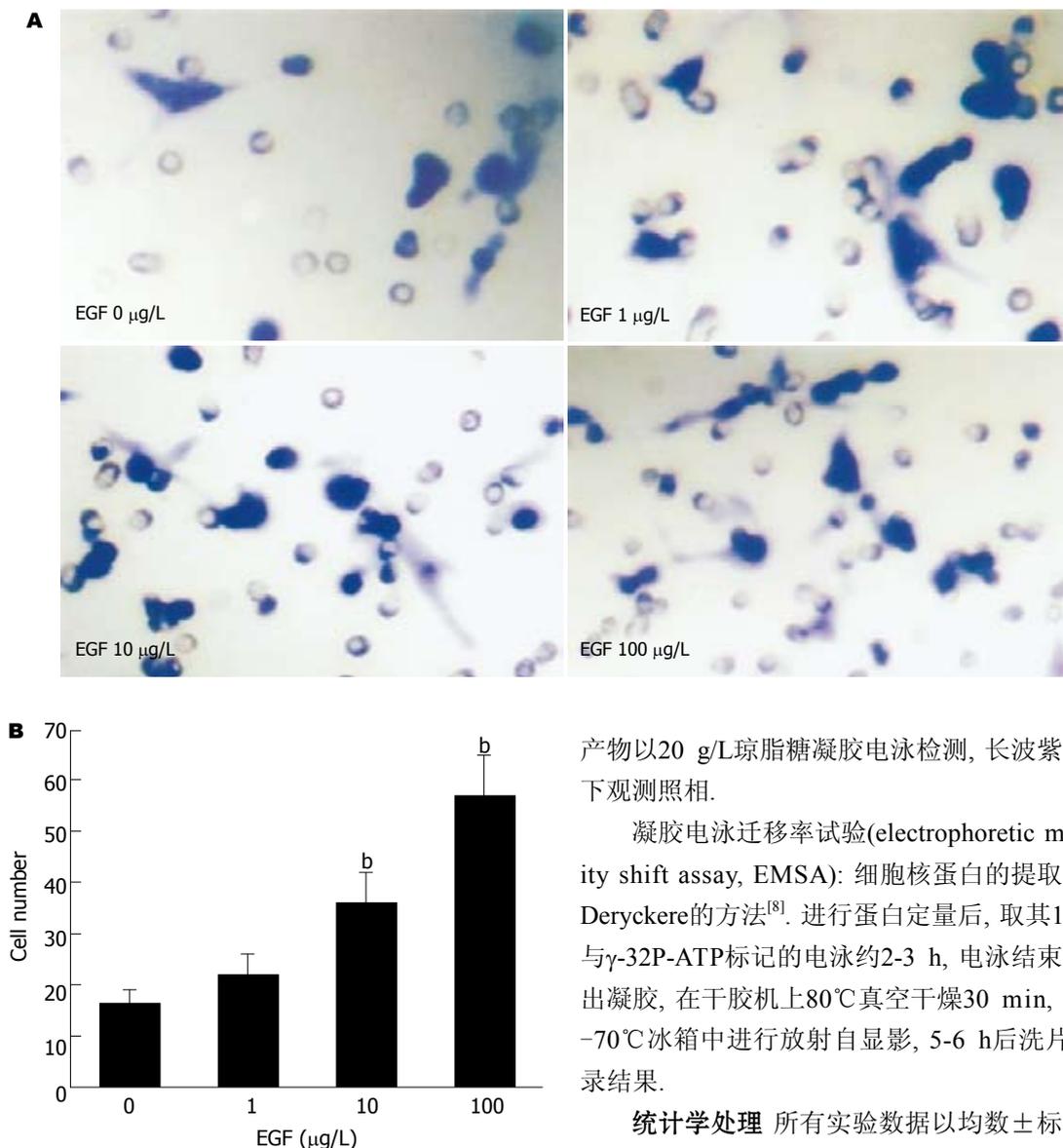


图1 EGF对HuCCT1细胞侵袭力的影响. A: 染色细胞为穿过孔眼的侵袭细胞, 随着EGF浓度的增加, 侵袭的细胞渐多; B: 5个视野的平均侵袭细胞数, $P < 0.01$.

CAGCTTCATATT-3', 377 bp; MMP-9: Sense 5'-TGGGCTACGTGACCTATGACAT-3', Antisense 5'-GCC CAGCCACCTCCACTCCTC-3', 172 bp; uPA: Sense 5'-AGAATTCACCACCATCGAGA-3', Antisense 5'-ATCAGCTTCACAACAGTCAT-3', 474 bp; PAI-1: Sense 5'-ATGGGATTCAA-GATTGATGA-3', Antisense 5'-TCAGTATAGTT-GAACTTGTT-3', 452 bp; GAPDH: Sense 5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3', Antisense 5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTC-CACC-3', 593 bp. 按第1链合成试剂盒说明进行逆转录. PCR扩增条件: 变性95°C 1 min, 退火55°C 1 min, 延伸72°C 1 min, 循环25-30次. PCR

产物以20 g/L琼脂糖凝胶电泳检测, 长波紫外灯下观测照相.

凝胶电泳迁移率试验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA): 细胞核蛋白的提取参照Deryckere的方法^[8]. 进行蛋白定量后, 取其10 μg与 γ -32P-ATP标记的电泳约2-3 h, 电泳结束后取出凝胶, 在干胶机上80°C真空干燥30 min, 置于-70°C冰箱中进行放射自显影, 5-6 h后洗片, 记录结果.

统计学处理 所有实验数据以均数±标准差表示, 组间比较采用 t 检验.

2 结果

随着EGF浓度的增加, HuCCT1侵袭细胞数也随之增加, 具有明显的浓度依赖性(图1). 然而, EGF浓度的变化对HuCCT1细胞的增殖无明显影响, 表明EGF能够促进HuCCT1细胞的侵袭能力. EGF明显上调MMP-9、uPA和PAI-1 mRNA和蛋白表达水平(图2), 而MMP-2未见受影响. 随着EGF浓度的增加, NF- κ B的活化明显增强(图3), 表明NF- κ B的活化很可能参与EGF诱导的HuCCT1细胞侵袭. 我们预先用NF- κ B抑制物PDTC(pyrrrolidine dithiocarbamate)和ibuprofen分别处理HuCCT1细胞2 h. 结果显示, PDTC和ibuprofen明显抑制EGF诱导的HuCCT1细胞侵袭力(图4), 表明NF- κ B与EGF诱导HuCCT1细胞侵袭密切相关.

■ 同行评价

本研究为胆管癌细胞株体外侵袭力及机制的探讨性研究, 显示了EGF浓度增加与HuCCT1侵袭力增强相关, 但细胞增殖情况无改变, 而EGF能显著提高胆管癌细胞中MMPa, MMP-9, uPA和PAI-1的表达, 并提高NF- κ B的活性, 在用NF- κ B抑制物预处理后, EGF导致的细胞侵袭力未被完全抑制, 从而得出EGF可增强胆管癌细胞的侵袭力, 其部分可能是通过NF- κ B信号传导途径激活MMP-9, uPA和PAI-1等蛋白水解酶实现的结论. 本研究内容与结论有新意, 为深入研究提供了依据.

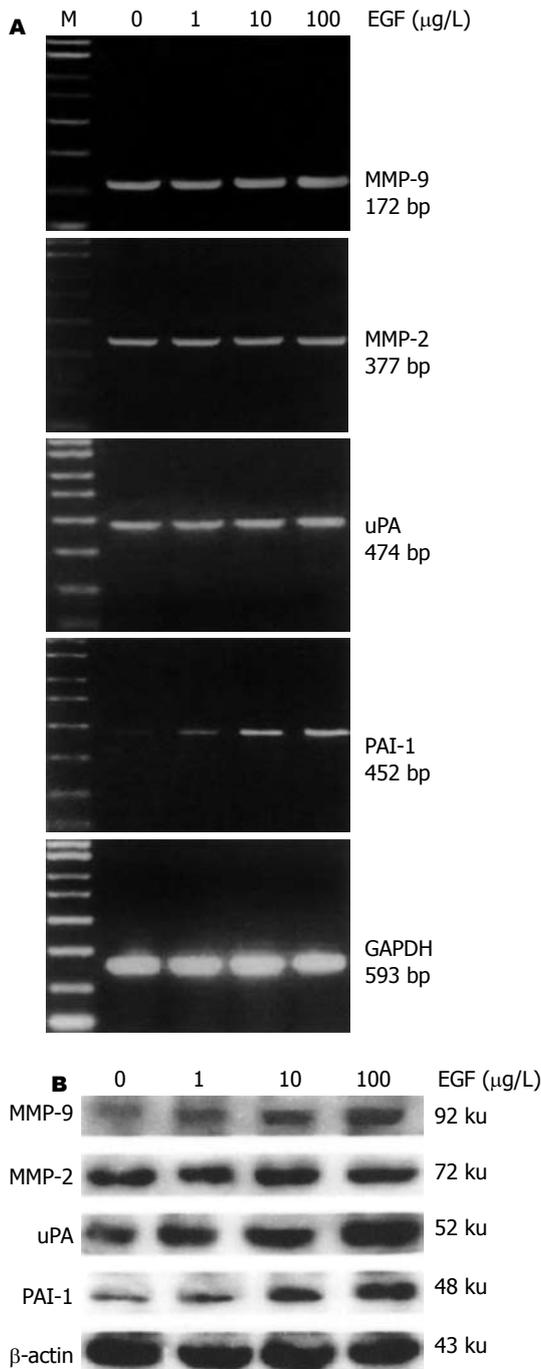


图 2 EGF对HuCCT1细胞MMP-9, MMP-2, uPA和PAI-1表达的影响. A: RT-PCR; B: Western blot.

3 讨论

肿瘤侵袭是一个多阶段过程, 包括细胞增殖、吸附、运动及不同阶段酶的分泌^[9]. 在这个侵袭过程中, 细胞外基质酶解起关键作用. 许多蛋白水解酶, 包括基质金属蛋白酶MMPs, uPA、纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor, PAI-1), 参与这个过程. MMP家族, 特别是MMP-2和MMP-9, 不仅能降解基底膜, 并且也能降解细胞外基质, 而使肿瘤细胞穿过基

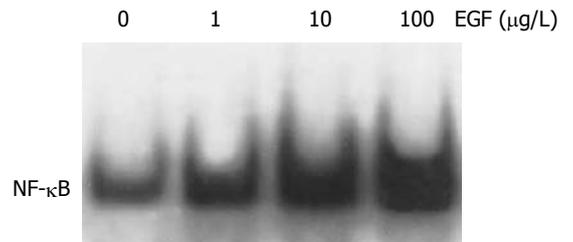


图 3 EGF对NF-κB活性的影响.

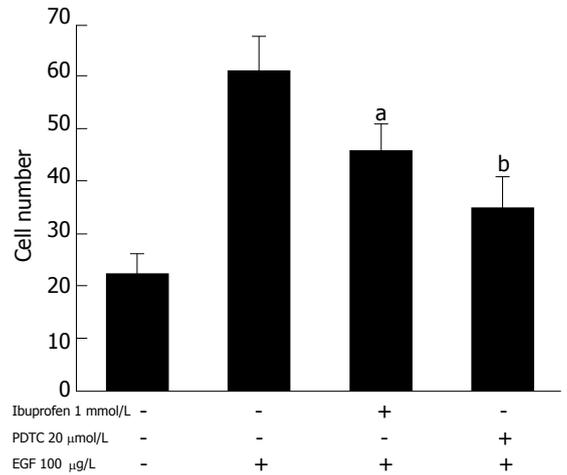


图 4 NF-κB抑制物对EGF诱导的HuCCT1细胞侵袭力的影响. ^aP<0.05, ^bP<0.01.

底膜保护, 侵入周边组织, 其在肿瘤细胞侵袭过程中起重要作用^[10-14]. uPA催化纤维蛋白溶酶原转化为纤维蛋白溶酶, 直接降解细胞外基质蛋白, 同时激活MMP-2和MMP-9, 促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[15]. PAI-1是uPA的一种抑制剂, 一方面他与uPA/uPAR形成复合物, 从而抑制纤溶酶系统的活性. 另一方面, 细胞对这种复合物产生内吞效应, 使uPA在溶酶体内降解, uPAR再循环到细胞表面, 这不但调节uPA的活性, 而且也调节uPAR在细胞表面位置的变化, 适应细胞移出过程中细胞表面uPA介导的蛋白溶解活动浓度集中和活性区域变化的需要, 从而促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[16-21]. 我们的结果显示, 随着EGF浓度的增加, HuCCT1的侵袭细胞数逐渐增加, 而增殖情况无明显改变. 可见, EGF能够增强HuCCT1细胞的侵袭力, 并且EGF促进胆管癌细胞侵袭不是由细胞增殖引起的. 而单独肿瘤细胞运动的改变不能引起有效的邻近组织侵袭, 所以, EGF促进胆管癌细胞侵袭一定存在其他机制, 其可能是由细胞外基质酶解引起的. 我们将不同浓度的EGF加入HuCCT1细胞培养基中, 从mRNA和蛋白两个水平检测EGF不同浓度下HuCCT1细胞中MMP2, MMP-9, uPA和PAI-1

的表达情况, 发现EGF显著提高HuCCT1细胞中MMP-9, uPA和PAI-1的表达, 而MMP2未受影响. 表明EGF增强HuCCT1细胞的侵袭力是通过提高MMP-9、uPA和PAI-1的表达实现的.

NF- κ B是调节转录因子. 正常情况下, NF- κ B存在于细胞质中, 与抑制蛋白单体 I κ B结合而无活性. 当受到细胞外刺激作用, NF- κ B与 I κ B分离, NF- κ B复合体进入细胞核, 与特定包含 κ B的靶基因结合, 调节与细胞应答相关的基因表达, 包括肿瘤细胞侵袭和转移, 如MMP-9, MMP-2, uPA和PAI-1^[22-23]. 许多研究表明, NF- κ B信号传导通路在肿瘤的浸润转移过程中发挥重要的作用, 特别是它能够调控MMP-9, uPA和PAI-1蛋白的表达^[24-27]. 本结果显示, EGF可以提高NF- κ B的活性. 提示EGF激活MMP-9, uPA和PAI-1, 增强HuCCT1细胞的侵袭力可能是通过NF- κ B信号传导通路实现的. 为了进一步证实由EGF引起的肿瘤侵袭上调可能是通过增加NF- κ B的活性实现的, 我们用NF- κ B抑制剂做细胞侵袭力检测, 发现用NF- κ B的抑制物PDTC和ibuprofen预处理HuCCT1细胞后, EGF导致的细胞侵袭力明显受到抑制, 但EGF导致的细胞侵袭力没有完全被抑制. 这说明EGF对细胞侵袭的刺激效应与NF- κ B活性有关, EGF激活MMP-9, uPA和PAI-1, 增强HuCCT1细胞的侵袭力可能一部分是通过NF- κ B信号传导通路实现的. 通过本实验研究, 明确了EGF促进胆管癌细胞侵袭的分子机制, 为胆管癌侵袭、转移的预防、治疗提供理论依据.

4 参考文献

- Han C, Wu T. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 promotes human cholangiocarcinoma cell growth and invasion through EP1 receptor-mediated activation of the epidermal growth factor receptor and Akt. *J Biol Chem* 2005; 280: 24053-24063
- Yoon JH, Gwak GY, Lee HS, Bronk SF, Werneburg NW, Gores GJ. Enhanced epidermal growth factor receptor activation in human cholangiocarcinoma cells. *J Hepatol* 2004; 41: 808-814
- Werneburg NW, Yoon JH, Higuchi H, Gores GJ. Bile acids activate EGF receptor via a TGF- α -dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G31-G36
- Sato H, Seiki M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 1993; 8: 395-405
- Reuning U, Wilhelm O, Nishiguchi T, Guerrini L, Blasi F, Graeff H, Schmitt M. Inhibition of NF- κ B-Rel A expression by antisense oligodeoxynucleotides suppresses synthesis of urokinase-type plasminogen activator (uPA) but not its inhibitor PAI-1. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 3887-3893
- Huang S, Robinson JB, Deguzman A, Bucana CD, Fidler IJ. Blockade of nuclear factor- κ B signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8. *Cancer Res* 2000; 60: 5334-5339
- 陈贵, 于颖彦, 谢岳林, 尹浩然, 朱正纲. NF- κ B上调VEGF表达影响胃癌预后. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1275-1277
- Slomiany BA, Kelly MM, Kurtz DT. Extraction of nuclear proteins with increased DNA binding activity. *Biotechniques* 2000; 28: 938-942
- Price JT, Bonovich MT, Kohn EC. The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1997; 32: 175-253
- Westermarck J, Kahari VM. Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J* 1999; 13: 781-792
- Leeman MF, Curran S, Murray GI. New insights into the roles of matrix metalloproteinases in colorectal cancer development and progression. *J Pathol* 2003; 201: 528-534
- Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1999; 20: 749-755
- Mysliwiec AG, Ornstein DL. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2002; 1: 208-219
- Jo Chae K, Rha SY, Oh BK, Koo JS, Kim YJ, Choi J, Park C, Park YN. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in intraductal and nonintraductal growth type of cholangiocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 68-75
- 张诚. uPA/uPAR研究进展. *国外医学·生理、病理科学与临床分册* 2004; 24: 352-354
- Czekay RP, Loskutoff DJ. Unexpected role of plasminogen activator inhibitor 1 in cell adhesion and detachment. *Exp Biol Med(Maywood)* 2004; 229: 1090-1096
- Andreasen PA, Egelund R, Petersen HH. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57: 25-40
- 秦蓉, 盛霞, 吴继锋, 王道斌. 胃癌组织中uPA系统及VEGF表达与侵袭转移的关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 706-710
- 杨雁灵, 窦科峰, 李开宗. 肝细胞肝癌UPAR和VEGF表达与浸润转移的关系. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 381-383
- Li P, Gao Y, Ji Z, Zhang X, Xu Q, Li G, Guo Z, Zheng B, Guo X. Role of urokinase plasminogen activator and its receptor in metastasis and invasion of neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2004; 39: 1512-1519
- Konno H, Abe J, Kaneko T, Baba M, Shoji A, Sunayama K, Kamiya K, Tanaka T, Suzuki S, Nakamura S, Urano T. Urokinase receptor and vascular endothelial growth factor are synergistically associated with the liver metastasis of colorectal cancer. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 516-523
- Ghosh S, Karin M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* 2002; 109: S81-S96
- Zandi E, Karin M. Bridging the gap: composition,

- regulation, and physiological function of the IkappaB kinase complex. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4547-4551
- 24 Yoo HG, Shin BA, Park JS, Lee KH, Chay KO, Yang SY, Ahn BW, Jung YD. IL-1beta induces MMP-9 via reactive oxygen species and NF-kappaB in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 251-256
- 25 Okamoto T, Valacchi G, Gohil K, Akaike T, van der Vliet A. S-nitrosothiols inhibit cytokine-mediated induction of matrix metalloproteinase-9 in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27: 463-473
- 26 Sanceau J, Boyd DD, Seiki M, Bauvois B. Interferons inhibit tumor necrosis factor-alpha-mediated matrix metalloproteinase-9 activation via interferon regulatory factor-1 binding competition with NF-kappa B. *J Biol Chem* 2002; 277: 35766-35775
- 27 Hozumi A, Nishimura Y, Nishiuma T, Kotani Y, Yokoyama M. Induction of MMP-9 in normal human bronchial epithelial cells by TNF-alpha via NF-kappa B-mediated pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L1444-L1452

电编 李琪 编辑 潘伯荣

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.

益生菌及肠内外营养对重症急性胰腺炎大鼠肠道黏附分子及免疫屏障的影响

杨建军, 耿翔, 高志光, 秦环龙

杨建军, 耿翔, 高志光, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院普外科 上海市 200233
杨建军, 医学硕士, 主要从事普通外科研究工作。
上海交通大学昂立基金资助项目, No. KJ200501
通讯作者: 秦环龙, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院普外科. hlqin@sjtu.edu.cn
电话: 021-64942226 传真: 021-64368920
收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-03-03

Effects of probiotics and enteral and parenteral nutrition on intestinal mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and immune barrier of rats with severe acute pancreatitis

Jian-Jun Yang, Xiang Geng, Zhi-Guang Gao, Huan-Long Qin

Jian-Jun Yang, Xiang Geng, Zhi-Guang Gao, Huan-Long Qin, Department of General Surgery, the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China
Supported by Angli Fund of Shanghai Jiaotong University, No. KJ200501
Correspondence to: Huan-Long Qin, Department of General Surgery, the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. hlqin@sjtu.edu.cn
Received: 2006-02-06 Accepted: 2006-03-03

Abstract

AIM: To investigate the effects of probiotics and enteral and parenteral nutrition (EN and PN) on peyer's patch, intestinal mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) and immune barrier of rats with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: SAP model was established in 30 Sprague Dawley (SD) rats via biliary and pancreatic duct using sodium taurocholate and then were averagely divided into 3 groups: PN group, PN + EN group, and PN + EN + probiotics group. Twenty-four hours after modeling, the rats in each group were treated with the corresponding

methods for 6 days. The nutrition support in the 3 groups was isonitrogenic and isocaloric. At the 7th day, all the rats were sacrificed. The expression of CD4, CD8, MAdCAM-1 and IgA in the terminal ileum mucosa and peyer's patch were measured by immunohistochemistry. Vena cava blood and homogenated tissues of liver, lung and mesenteric lymph nodes were cultured to determine bacterial translocations.

RESULTS: The levels of CD4 and CD8 T cells, and the expression of MAdCAM-1 and IgA in the terminal ileum mucosa and peyer's node were significantly higher in PN + EN and PN + EN + probiotics group than those in PN group ($P < 0.05$). The level of CD8 T cells and the expression of MAdCAM-1 were markedly higher in PN + EN + probiotics group than those in PN + EN group ($P < 0.05$). Bacterial translocations and mortality appeared in PN group with higher rates (70.2%, 75.6%) in comparison with those in PN + EN + probiotics (27.5%, 50.0%) and PN + EN group (30.5%, 52.4%) ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). But there were no significant differences between PN + EN and PN + EN + probiotics group.

CONCLUSION: EN can increase the expression of CD4, CD8, MAdCAM-1 and IgA in the terminal ileum mucosa and peyer's patch, reduce bacterial translocations, and improve the survival rate in SAP. This effect becomes more obvious when EN is combined with probiotics. Probiotics seem to have litter effect in the protection of intestinal immune barrier.

Key Words: Probiotics; Enteral nutrition; Severe acute pancreatitis; Intestinal mucosal addressin cell adhesion molecule-1

Yang JJ, Geng X, Gao ZG, Qin HL. Effects of probiotics and enteral and parenteral nutrition on intestinal mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and immune barrier of rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10):953-957

■背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)是最易发生肠屏障功能受损的重症疾病之一,而肠道是机体最大的免疫器官,肠免疫屏障对预防肠源性感染发挥重要作用。近年来,已有少数研究报告益生菌、肠内营养在改善SAP肠道微生态及细菌易位和减少内源性感染方面取得了初步结果,但深入、详细的机制尚不清楚。因此采用益生菌及肠内外营养对SAP肠道黏附分子及免疫屏障进行研究,具有一定的临床指导意义。

■研发前沿

益生菌、肠内营养对SAP肠屏障的保护作用;肠道黏附分子及淋巴细胞归巢在SAP时的变化。

■创新盘点

本文对SAP时肠道黏膜地址素细胞黏附分子-1(MAdCAM-1)进行研究,并初步探讨了SAP时MAdCAM-1对肠免疫屏障的影响。

摘要

目的: 观察益生菌及肠外、肠内营养对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠肠道黏附分子MAdCAM-1及免疫屏障的影响。

方法: 经胆胰管逆行注射50 g/L牛磺胆酸钠制作SAP模型24 h后,分别给予肠外营养(PN组),肠外+肠内营养(PN+EN组),肠外+肠内营养+益生菌(益生菌组),持续6 d,7 d时处死,检测腹腔脏器组织菌群易位率,免疫组化法测定末端回肠和Peyer结MAdCAM-1, CD4, CD8, IgA。

结果: 益生菌组、PN+EN组CD4、CD8 T细胞数量及IgA, MAdCAM-1表达高于PN组($P<0.05$); 益生菌组Peyer结MAdCAM-1, CD8表达高于PN+EN组($P<0.05$)。PN组菌群易位率(70.2%)、7 d死亡率(75.6%)高于益生菌组(27.5%, 50.0%)、PN+EN组(30.5%, 52.4%)($P<0.01$ 或 $P<0.05$),但后两组间差异无显著性意义。

结论: EN能增加MAdCAM-1表达,提高SAP时肠免疫屏障,减少菌群易位,提高生存率。加用益生菌后总体改善不明显。

关键词: 益生菌; 肠内营养; MAdCAM-1; 重症急性胰腺炎

杨建军, 耿翔, 高志光, 秦环龙. 益生菌及肠内外营养对重症急性胰腺炎大鼠肠道黏附分子及免疫屏障的影响. 世界华人消化杂志, 2006;14(10):953-957

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/953.asp>

0 引言

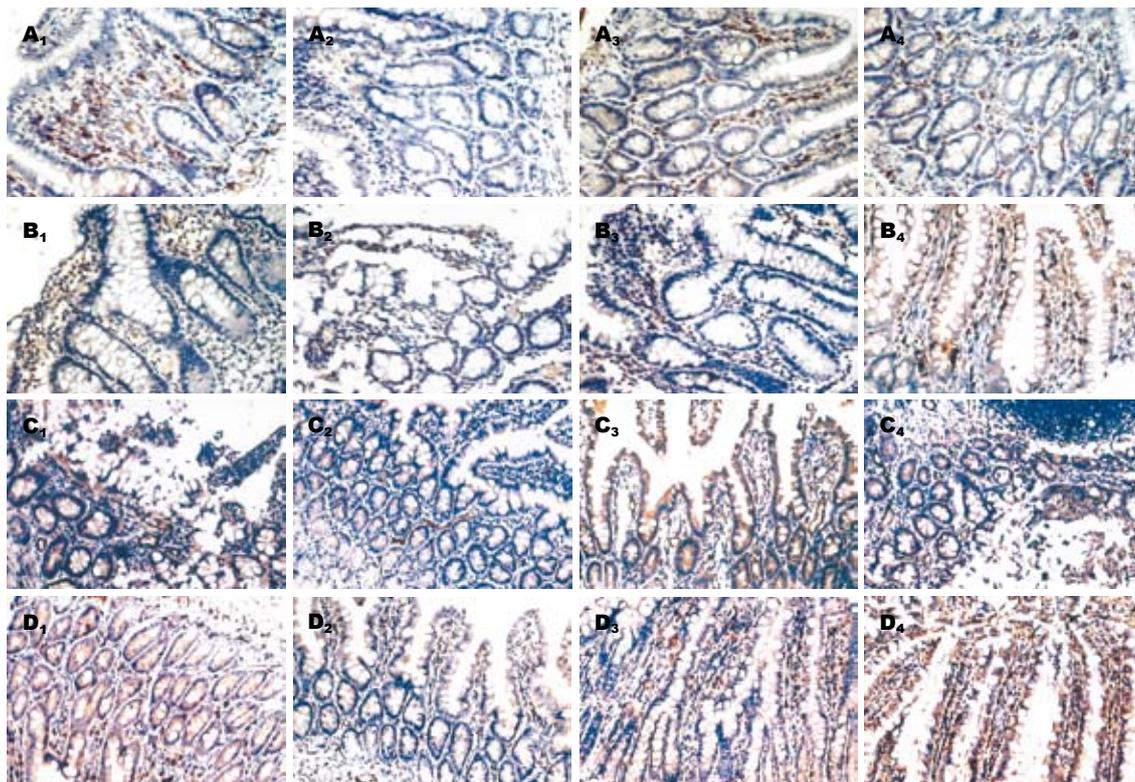
重症急性胰腺炎(SAP)由于病程长、病情重,易发生肠屏障功能障碍,导致肠道菌群或内毒素易位,从而影响预后。近年,采用益生菌及肠内营养来保护SAP时肠屏障功能逐渐受到学者关注,并取得初步肯定的意见。本研究对SAP大鼠实施益生菌及肠外、肠内营养,观察他们对肠道黏膜地址素细胞黏附分子-1(MAdCAM-1)表达及免疫屏障的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD大鼠(复旦大学医学院动物中心提供,清洁级); 50 g/L牛磺胆酸钠(Sigma公司); 益生菌(上海交通大学昂立生命技术研究所提供,主要成分为植物乳杆菌及其代谢产物,活性为 10^6 cfu/mL); 200 g/L Intralipid(SSPC); 85 g/L复

方氨基酸(Novamin, SSPC); 水乐维他(SSPC); 安达美(SSPC); 百普素(Nutricia公司); 山羊抗大鼠MAdCAM-1多克隆抗体(Santa Cruz公司); 小鼠抗大鼠IgA多克隆抗体(Santa Cruz公司); 小鼠抗大鼠CD4、CD8单抗(Serotec公司); 二抗为Envision(即用型, Dako公司); 电动玻璃匀浆仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); 心脑血管浸出液(Oxid公司)。选择♂ SD大鼠82只,体质量250-300 g。禁食不禁水12 h, 20 g/L盐酸氯胺酮(100 mg/kg)ip麻醉后,将大鼠固定于仰卧位,颈部和腹部去毛,1 g/L新洁而灭酞消毒,按Aho法^[1]建立SAP模型,正中切口打开腹腔,于十二指肠内侧找到片状分布的胰腺及胆管,将4.5号针头经系膜对侧肠壁逆行插入胆管,结扎胆管末端和针头,无创血管夹夹闭肝门处胆管,均匀缓慢推注50 g/L牛磺胆酸钠(1 mL/kg),推注时间约5 min, 10 min后松开血管夹和结扎线,8字缝合肠壁处穿刺点。在距盲肠约40 cm小肠处荷包埋入另一硅胶管,外径为12 mm,并将其沿腹壁皮下潜行至颈背部肩胛间引出,经该管给予肠内营养液及益生菌。旁正中切口剪开颈部皮肤,钝性分离出颈外静脉,经颈外静脉置入外径为12 mm的硅胶管,皮下隧道潜行至颈背部引出,经该管给予肠外营养液。颈外静脉插管及空肠造瘘管穿过螺旋式弹簧圈与我们自行设计的360°旋转式输液装置相连接^[2]。肠外营养液及肠内营养液以微量输液泵24 h均匀输入。

1.2 方法 将实验动物随机分为3组,造模成功后前24 h均给予生理盐水2 mL/h,肠外营养组(PN组): 2-6 d给予PN支持,肠外营养+肠内营养组(PN+EN组): 2-6 d给予PN+EN支持,益生菌组: 2-6 d给予PN+EN支持,同时经空肠造瘘管滴入益生菌10 mL/d。实验组均于第7 d处死取末端回肠组织进行免疫组化。正常对照组同样予以颈外静脉插管,禁食不禁水24 h处死,取末端回肠组织进行免疫组化。PN液均采用500 g/L GS、200 g/L Intralipid、复方氨基酸(Novamin)作为基本营养成分,各组均等氮、等热量,每天提供非氮热量1 003 kJ/kg(约240 kCal/kg),供氮459 mg,加入RI比例为糖(g): 胰岛素(U)=4: 1,维生素和微量元素由水乐维他和安达美,肠内营养由短肽标准型高能营养多聚合剂(百普素)。PN组热氮量100%由PN液提供,微量输液泵保持输液速度约33 mL/h, 80 mL/d静脉输入。PN+EN组,80%的热氮量由PN提供,64 mL/d静脉输入,20%由EN提供,百普素用温水按1 g:



■应用要点
对探讨益生菌、肠内营养对SAP时肠屏障的保护机制,具有一定意义.为临床SAP应用益生菌、肠内营养提供一定理论依据.

图 1 末端回肠黏膜免疫组化图片. A: CD4; B: CD8; C: MAdCAM-1; D: IgA. A₁, B₁, C₁, D₁: 正常对照组; A₂, B₂, C₂, D₂: PN组; A₃, B₃, C₃, D₃: PN+EN组; A₄, B₄, C₄, D₄: 益生菌组.

4 mL稀释成16 mL,再用生理盐水将后者以1:2稀释至24 mL,1 mL/h经空肠造瘘管滴入,每日EN供能200.6 kJ/kg(48 kCal/kg).益生菌组在前组的基础上经空肠造瘘管分三次滴入益生菌10 mL/d. PN液配方(含量/L): 500 g/L Glucose: 330 mL; 85 g/L Novamin: 450 mL; 200 g/L Intralipid: 170 mL; 水乐维他: 10 mL; 安达美: 10 mL; 100 g/L KCl: 10 mL; 100 g/L NaCl: 10 mL; RI: 40 U; 肝素: 400 U; 非蛋白热卡: 4350 kJ; 总氮量: 5740 mg. 观察大鼠一般情况、反应灵敏度、活动度及死亡情况. 所有组织标本用100 g/L中性缓冲甲醛固定; 采用石蜡包埋,5 μm厚连续切片,经脱腊、水化及0.01 mol/L(pH 6.0)柠檬酸盐缓冲液抗原修复后滴加抗体. 一抗分别为山羊抗大鼠MAdCAM-1多克隆抗体,小鼠抗大鼠IgA多克隆抗体,小鼠抗大鼠CD4, CD8单抗(Serotec 公司),二抗为Envision. 阴性对照: 用PBS代替一抗. 0.4 g/L DAB+0.3 mL/L H₂O₂显色8 min左右,镜下控制显色程度,即时终止; 水洗3 min,复染(苏木素衬染30 s,水洗,盐酸乙醇蓝化2 s,水洗,微波蓝化),常规树脂封片; 阳性为棕黄色或棕褐色,并呈颗粒状,背景呈紫蓝色. 使用HPIAS 1000高清晰度彩色图文病理报告分析系统,光密度法测定每视野相应

细胞CD4, CD8, MAdCAM-1, IgA密度,并计算阳性显色面积占测量窗内的百分比. 取腔静脉血1 mL,肠系膜淋巴组织、肝脏中叶、肺脏右叶组织匀浆后分别倒入心脑浸出液管中35℃增菌培养,18-24 h后置于伊红美蓝平板35℃培养,18-24 h后计数鉴定. 菌群易位率 = 培养阳性的样本数/检测的总样本数×100%.

统计学处理 所得数据用mean±SD表示,采用SAS6.12软件包进行χ²检验、方差分析, P<0.05认为有统计学意义.

2 结果

实验组大鼠造模24 h后均出现不同程度萎靡不振,对外界刺激反应度下降,其中以PN组最为明显. 益生菌组死亡率明显低于PN组(50.0% vs 75.6%, P<0.05), PN+EN组(52.4%)与PN组相比差异无统计学意义,但总体优于PN组. PN+EN组与益生菌组相比差异无统计学意义.

2.1 菌群易位率 PN+EN组、益生菌组低于PN组(70.2%),其中益生菌组最低(27.5%, P<0.01), PN+EN组(30.5%)与益生菌组相比差异无统计学意义.

2.2 末端回肠黏膜免疫组化 实验组CD4, CD8, MadCAM-1, IgA表达均低于正常对照组

■名词解释

肠道相关淋巴组织(GALT):按解剖及功能分为诱导部位和效应部位,前者主要为Peyer淋巴结,后者主要为肠固有层和上皮内淋巴细胞。幼稚淋巴细胞于Peyer淋巴结处接触抗原,增殖、成熟、分化为效应或记忆淋巴细胞,后者返回血流进而归巢到肠固有层、上皮内等效应部位发挥免疫作用。

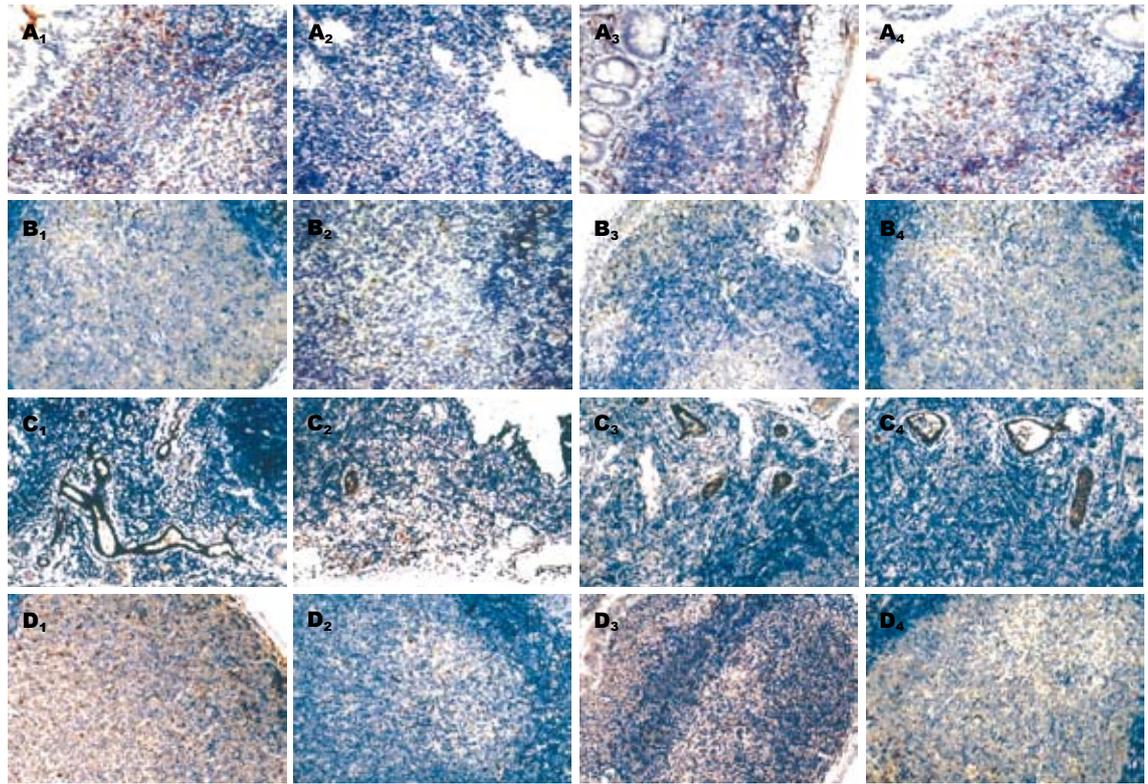


图2 Peyer结免疫组化图片. A: CD4; B: CD8; C: MAdCAM-1; D: IgA. A₁, B₁, C₁, D₁: 正常对照组; A₂, B₂, C₂, D₂: PN组; A₃, B₃, C₃, D₃: PN+EN组; A₄, B₄, C₄, D₄: 益生菌组.

($P<0.05$). 其中PN组低于PN+EN组、益生菌组($P<0.05$), 而后两组间比较差异无统计学意义, 但总体上益生菌组数值高于PN+EN组(图1).

2.3 Peyer结免疫组化 实验组CD4, CD8, MadCAM-1, IgA表达均低于正常对照组($P<0.05$). PN组CD4、IgA表达低于PN+EN组、益生菌组($P<0.05$), 而后两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$), 但总体上益生菌组数值高于PN+EN组. PN组CD8, MAdCAM-1表达低于PN+EN组($P<0.05$), 后者又低于益生菌组($P<0.05$)(图2).

3 讨论

重症急性胰腺炎易造成肠屏障功能受损, 导致肠道菌群或内毒素易位, 继发感染和炎症介质的过度激活, 发生系统炎症反应乃至多器官功能衰竭. 因此, 维护SAP时的肠屏障功能尤其是免疫屏障显得更加重要. 近年来对SAP患者采用EN或益生菌日渐增多, 不少研究认为EN或益生菌能够减少SAP感染性并发症和降低死亡率, 改善预后^[3-6]. 而就益生菌及EN对SAP肠免疫屏障尤其是黏附分子影响的研究尚不多. 黏附分子MAdCAM-1是肠道淋巴细胞归巢的主要地址素, 正常情况下选择性表达于肠黏膜固有层和Peyer结高内皮静脉(HEV)的内皮细胞, 对淋

巴细胞向肠道的定向迁移以及肠免疫屏障的维护起重要作用^[7]. 不同的营养途径对肠黏膜免疫屏障有重要影响. 有研究发现予以禁食鼠TPN 24 h后, Peyer结的MAdCAM-1表达即明显下降, 并且肠相关淋巴结(GALT)细胞数量明显减少; 而恢复EN 12 h后, MAdCAM-1表达和GALT细胞数量又开始逐渐上升. 因此有学者认为EN能够提高MAdCAM-1的表达, 维持GALT细胞数量, 此外EN还能刺激Th2细胞因子IL-4、IL-10生成, 而后者与B细胞的增殖、分化及IgA的合成分泌密切相关^[8-9]. 临床亦发现术前接受EN的结肠癌患者末端回肠GALT细胞数量明显高于TPN者^[10]. 动物实验中有报道EN联合使用益生菌能够减轻急性胰腺炎(AP)的病理评分^[11]. 临床亦发现益生菌能够减少AP的继发感染率^[6].

我们发现SAP大鼠PN 1 wk后, 出现Peyer结、肠黏膜MAdCAM-1表达下降, 并伴有GALT萎缩, CD4、CD8 T细胞数量减少, IgA分泌降低. 而PN+EN组或益生菌组MAdCAM-1表达明显优于PN组, CD4, CD8 T细胞数量及IgA表达亦高于PN组. 益生菌组总体水平高于PN+EN组, 尤其是Peyer结MAdCAM-1、CD8表达高于PN+EN组($P<0.05$). 提示SAP大鼠在PN期间地址素MAdCAM-1表达下降, 引起T、B等

淋巴细胞肠道归巢减少, 继而导致肠黏膜免疫屏障功能下降, 而EN、益生菌能够改善地址素MAdCAM-1表达, 促进肠道淋巴细胞归巢及淋巴组织的增生, 从而对肠免疫屏障具有维护作用. 从腹腔脏器细菌易位率和死亡率分析, PN组细菌易位率和死亡率明显升高, PN+EN组第7 d死亡率较PN组无统计学意义($P=0.064$), 但总体有下降趋势, 而益生菌组死亡率明显优于PN组($P<0.05$). 此外, 使用EN或益生菌后细菌易位率都有明显改善. 但益生菌组与PN+EN组细菌易位率及死亡率相比差异无统计学意义.

本实验表明, EN能够提高肠黏膜MAdCAM-1表达, 增加CD4, CD8细胞数量及IgA的分泌, 从而增强肠黏膜免疫屏障, 对预防SAP肠源性感染发挥重要作用. 加用益生菌后虽总体改善不明显, 但Peyer结MAdCAM-1, CD8表达高于PN+EN组. 如提高益生菌使用剂量、时间或加用其他治疗SAP方法, 可能会得到意想不到的效果.

4 参考文献

- 1 Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416
- 2 沈通一, 秦环龙, 佟大年. 肠外肠内营养对腹腔感染大鼠肠上皮紧密连接和屏障功能的影响. *中华普通外科杂志* 2005; 20: 174-176
- 3 Qin HL, Su ZD, Hu LG, Ding ZX, Lin QT. Effect of early intrajejunal nutrition on pancreatic pathological features and gut barrier function in dogs with acute pancreatitis. *Clin Nutr* 2002; 21: 469-473
- 4 Louie BE, Noseworthy T, Hailey D, Gramlich LM, Jacobs P, Warnock GL. 2004 MacLean-Mueller prize enteral or parenteral nutrition for severe pancreatitis: a randomized controlled trial and health technology assessment. *Can J Surg* 2005; 48: 298-306
- 5 Mangiante G, Colucci G, Canepari P, Bassi C, Nicoli N, Casaril A, Marinello P, Signoretto C, Bengmark S. Lactobacillus plantarum reduces infection of pancreatic necrosis in experimental acute pancreatitis. *Dig Surg* 2001; 18: 47-50
- 6 Olah A, Belagyi T, Issekutz A, Gamal ME, Bengmark S. Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89: 1103-1107
- 7 Fujimori H, Miura S, Koseki S, Hokari R, Komoto S, Hara Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Ishii H. Intravital observation of adhesion of lamina propria lymphocytes to microvessels of small intestine in mice. *Gastroenterology* 2002; 122: 734-744
- 8 Ikeda S, Kudsk KA, Fukatsu K, Johnson CD, Le T, Reese S, Zarzaur BL. Enteral feeding preserves mucosal immunity despite *in vivo* MAdCAM-1 blockade of lymphocyte homing. *Ann Surg* 2003; 237: 677-685
- 9 Genton L, Kudsk KA, Reese SR, Ikeda S. Enteral feeding preserves gut Th-2 cytokines despite mucosal cellular adhesion molecule-1 blockade. *JPEN* 2005; 29: 44-47
- 10 Okamoto K, Fukatsu K, Ueno C, Shinto E, Hashiguchi Y, Nagayoshi H, Hiraide H, Mochizuki H. T lymphocyte numbers in human gut associated lymphoid tissue are reduced without enteral nutrition. *JPEN* 2005; 29: 56-58
- 11 Muftuoglu MA, Isikgor S, Tosun S, Saglam A. Effects of probiotics on the severity of experimental acute pancreatitis. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60: 464-468

■同行评价

重症急性胰腺炎是临床上病死率高的疾病之一, 该文章从基础着手, 建立SAP动物模型, 研究益生菌及不同营养途径对SAP肠黏附分子及免疫屏障的影响, 设计具有一定的科学性, 结论具有一定的说服力.

电编 李琪 编辑 潘伯荣

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

•消息•

第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议

本刊讯 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议将于2006-08在哈尔滨举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文3 000字及摘要800字各1份, 电脑打印(附软盘), 2006-06-15截稿.

2 联系方式

哈尔滨市哈尔滨医科大学二院消化内科 刘冰熔 教授, 电话: 13313695959.

玻璃化法冷冻保存对人胚胰岛的影响

赵松, 付英梅, 刘连新, 迟月明, 李秀芬

■背景资料

胰岛细胞移植是替代胰岛素治疗糖尿病代谢紊乱的有效手段, 但细胞来源不足的问题严重限制了该疗法在临床的应用。目前我国具有一定的胚胎胰岛细胞来源, 为有效利用这一资源, 我们尝试用改良的玻璃化快速降温法对人胚胰岛细胞冷冻保存, 取得较好效果。

赵松, 刘连新, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科 黑龙江省哈尔滨市 150001
付英梅, 哈尔滨医科大学微生物教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086
迟月明, 哈尔滨医科大学电镜中心 黑龙江省哈尔滨市 150086
李秀芬, 黑龙江省电力医院 黑龙江省哈尔滨市 150040
赵松, 2000年哈尔滨医科大学外科学硕士, 主治医师, 主要从事细胞移植、肝脾外科研究。
黑龙江省卫生厅资助项目, No. 2005-206
通讯作者: 刘连新, 150001, 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. liulianxin@medmail.com.cn
电话: 0451-53643849-5885 传真: 0451-53658828
收稿日期: 2006-02-20 接受日期: 2006-03-02

Cryopreservation of human fetal islets by vitrification

Song Zhao, Ying-Mei Fu, Lian-Xin Liu, Yue-Ming Chi, Xiu-Fen Li

Song Zhao, Lian-Xin Liu, Department of General Surgery, the First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Ying-Mei Fu, Department of Medical Microbiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Yue-Ming Chi, Electron Microscope Center, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Xiu-Fen Li, Provincial Electric Power Hospital, Harbin 150040, Heilongjiang Province, China

Supported by the Fund from Health Department of Heilongjiang Province, No. 2005-206

Correspondence to: Lian-Xin Liu, Department of General Surgery, the First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. liulianxin@medmail.com.cn

Received: 2006-02-20 Accepted: 2006-03-02

Abstract

AIM: To evaluate the efficiency of cryopreservation of human fetal islets using vitrification.

METHODS: Pancreatic islets of 18-28 week-fetus died from water bag were harvested by collagenase digestion. Islets were cultured and cryopreserved by computer-programmed slow freezing and vitrification, respectively. The morphology and ultrastructure of the thawed islets were studied in the two groups. The function of the thawed islets was assessed by glucose-stimulated release of insulin, which was measured

by radioimmunoassay. The expression of insulin mRNA in the thawed islets was detected by reversed transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: Morphological studies of the thawed islets demonstrated that both cryopreservation methods retained the integrity of islets. Secretory granule and mitochondria in beta cells were abundant. Analysis of basal insulin secretion and the stimulation release in the two groups showed no significant difference from pro-cryopreservation (both $P > 0.05$).

CONCLUSION: The integrity and function of islets can be retained by vitrification, whose efficiency has no significant difference from that of computer-programmed slow freezing.

Key Words: Islets; Cryopreservation; Vitrification

Zhao S, Fu YM, Liu LX, Chi YM, Li XF. Cryopreservation of human fetal islets by vitrification. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10):958-962

摘要

目的: 观察玻璃化法对人胚胰岛冻存复苏后形态功能的影响。

方法: 取胎龄18-28 wk中期水囊引产死胎, 用胶原酶分离胰岛后, 分别采用传统微机程控缓慢降温和玻璃化超快速降温方法冷冻保存胰岛, 复苏后, 从胰岛形态、超微结构、胰岛素分泌功能方面比较两种冻存方法的效果。

结果: 两种方法冷冻保存的胰岛, 复苏后形态保持完整, 电镜下胰岛B细胞分泌颗粒和线粒体丰富, 线粒体嵴规整, 胰岛素释放试验中, 二者的胰岛素水平与冻存前无明显差异 ($P > 0.05$), 胰岛素基因表达水平与冻存前相似。

结论: 玻璃化法冷冻保存胰岛能够维持细胞的正常结构和功能, 其冷冻效果与微机程控缓慢降温相比无明显差别。

关键词: 胰岛; 玻璃化; 冷冻保存

赵松, 付英梅, 刘连新, 迟月明, 李秀芬. 玻璃化法冷冻保存对人胚胰岛的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(10):958-962
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/958.asp>

0 引言

我国糖尿病的发病率逐年上升, 胰岛移植对于纠正 I 型糖尿病患者代谢紊乱是有效的, 甚至可以达到停用胰岛素的目的^[1]. 但由于供体来源的不足, 大大限制了胰岛细胞移植在临床应用和发展. 胎儿组织免疫原性较成人低、再生能力强, 因而成为建立胰岛库的理想组织来源. 在细胞的冷冻保存上, 微机程控降温法能够精确地控制降温速率, 但其昂贵的冷冻仪器和繁杂的操作步骤, 限制了在基层医院的应用, 使得大量细胞资源被浪费. 因而, 探求一种操作简便、经济可靠、冷冻效果良好的冻存方法, 有利于开展大范围的细胞收集和保存工作, 更好地利用我国胚胎细胞资源.

玻璃化冷冻技术的基本原理是高浓度的冷冻保护剂溶液经急速降温后, 由液态转化为外形似玻璃状的非晶体化固体状态, 高浓度的冷冻保护剂和超快速的冷冻速率, 消除了细胞内和细胞外溶液冰晶的形成, 减少了冷冻损伤. 1985年, 玻璃化冷冻鼠胚胎首次获得成功^[2]. 目前, 玻璃化冷冻保存细胞已成功应用于卵母细胞、血细胞及胚胎, 对角膜、皮肤、血管等亦有报道^[3-6]. 但对以胰岛为代表的内分泌腺细胞的玻璃化保存未有涉及. 本研究在此方面进行了尝试, 报道如下.

1 材料和方法

1.1 材料 胎龄18-28 wk中期水囊引产死胎31例, 由哈尔滨市各大医院妇产科提供, 胎儿死亡时间不超过4 h, 胎儿无畸形及传染病. V型胶原酶、DMSO、聚乙二醇、乙酰胺、海藻糖、台盼蓝等购自Sigma公司; Hanks液、RPMI 1640等为Gibco公司产品; 培养瓶、离心管、冻存管等为Invitrogen公司产品. 胎儿娩出后, 热缺血时间1-2 h内, 或冷缺血时间6 h内, 在严格无菌条件下取材: 于无菌冰上解剖, 将胰腺组织剪成1-2 mm³大小的碎块, 加入0.5 g/L V型胶原酶消化20 min, 用冰冷Hanks液终止消化, 120目无菌不锈钢网过滤, 收集于含200 mL/L胎牛血清的RPMI 1640完全培养液中, 于37℃含50 mL/L二氧化碳的培养箱中培养3-4 d.

1.2 方法 胰岛的冷冻保存: (1)微机程控降温法. 培养3-4 d的胰岛移入含100 g/L DMSO、200 mL/L胎牛血清的RPMI 1640冻存液中, 于4℃冰箱平衡30 min后移入预先设定好降温程序的微机程控降温仪冷冻室内, 进入慢速降温程序: 以1℃/min降温, 于相变区间加大液氮输入量以阻止相变发生, 保持平稳降温的速率曲线. 程序运行结束后, 迅速将冻存管投入液氮保存. (2)玻璃化降温法. 玻璃化冻存液参照文献[3]和[7]的方法改良而成, 由含200 mL/L胎牛血清的RPMI 1640完全培养液与二甲基亚砷(DMSO)、牛血清白蛋白、聚乙二醇、乙酰胺、海藻糖等按一定比例混合而成. 培养3-4 d的胰岛依次在50%、75%、85%、95%的玻璃化冻存液中冷平衡8-10 min后转入100%玻璃化冻存液中冷平衡20 min, 迅速投入液氮中保存. 复温. 取出冻存管, 迅速投入37℃恒温水浴箱中, 不时摇动, 在2 min内使其完全融化, 加入含200 mL/L胎牛血清的RPMI 1640培养液中培养. 冻存前后每天在倒置相差显微镜下观察细胞形态和生活状态并拍摄照片. 分别收集冻存前后生活细胞, 经30 mL/L戊二醛固定后, 透射电镜下观察细胞超微结构. 定期留取冻存前后培养细胞的培养液, 借助于全自动生化分析仪测定培养液中相应胰岛素水平, 同时作胰岛素释放试验. RT-PCR法检测胰岛素表达. 用美国Gibco公司Trizol试剂提取不同实验阶段胰岛细胞总RNA, cDNA合成采用Promega公司逆转录试剂盒, 操作按说明书进行. 根据GenBank人胰岛素基因mRNA(序列号BT006808)序列设计引物: 上游5'GCCTTTGTGAACCAACACCTG3', 下游5'GTTGCAGTAGTTC TCCAGCTG3', 扩增产物大小为261 bp. G3PDH上游引物为5'ACCACAGTCCATGCCATCAC3', 下游引物为5'CTGCTTACCACCTTCTT3', 扩增产物大小268 bp. PCR产物用12 g/L琼脂糖凝胶电泳检测.

统计学处理 所得数据以mean±SD表示, 采用SPSS 11.0软件进行统计学分析.

2 结果

培养初期的胰岛近于球形, 立体感很强, 胰岛体积及形态差异较大, 组成胰岛的细胞完整, 轮廓清晰; 胰岛间分布多量游离外分泌腺细胞(图1A). 玻璃化和微机程控降温法冷冻保存的胰岛, 复苏后在胰岛形态和结构上无差别. 胰岛近于球

■应用要点

本文所采用玻璃化法冷冻保存人胚胰岛, 无需昂贵和复杂的设备, 便于在基层推广, 对充分利用胚胎胰岛细胞来源, 建立细胞库具有实际意义.

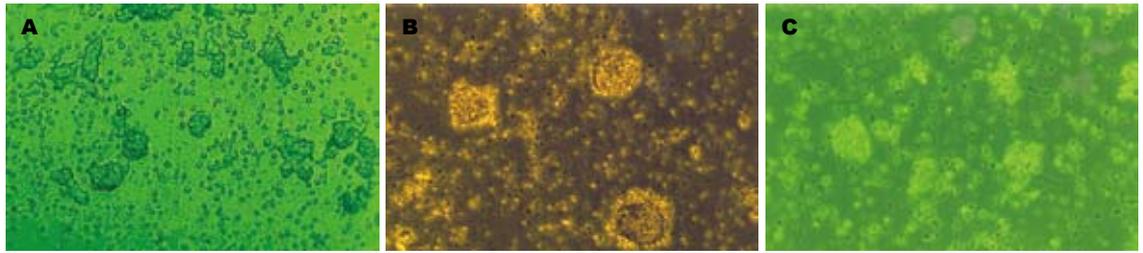


图 1 胰岛细胞冷冻前后形态学观察. A: 冻存前培养2 d胰岛($\times 100$); B: 玻璃化冷冻保存复苏后培养2 d($\times 200$); C: 微机程控降温冷冻复苏后培养2 d($\times 200$).

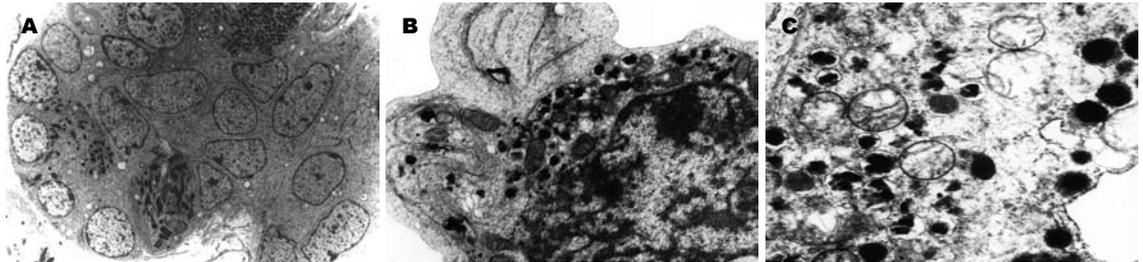


图 2 胰岛细胞超微结构TEM. A: 冻存前($\times 4000$); B: 玻璃化冷冻保存复苏后2 d胰岛B细胞($\times 24\ 000$); C: 微机程控缓慢降温保存复苏后2 d($\times 48\ 000$).

形, 形态完整, 胰岛间分布多量游离细胞及细胞残片(图1B-C). 高倍镜下, 胰岛结构清晰, 内外层细胞均可见完整胞膜和清晰的细胞核.

2.1 胰岛细胞透射电镜观察 冷冻前B细胞胞质内含有大量胰岛素分泌颗粒, 颗粒内含有高电子密度的不规则形的致密结晶小体, 与胰岛A细胞的球形分泌颗粒对比鲜明(图2A). 经两种方法冻存复苏后的人胚胰岛B细胞胞质内胰岛素分泌颗粒和线粒体丰富, 线粒体嵴规整呈平行排列(图2B-C).

2.2 冷冻前后培养液胰岛素水平 冻存前, 玻璃化组和微机程控降温组培养液胰岛素水平无显著性差异(4.2 ± 0.4 vs 4.1 ± 0.5 $\mu\text{U}/(\text{islet}\cdot\text{h})$, $t = 1.706$, $P > 0.05$), 两组间的胰岛素水平在复苏后2 d(4.1 ± 1.3 vs 3.9 ± 1.0 $\mu\text{U}/(\text{islet}\cdot\text{h})$, $t = 0.475$, $P > 0.05$)和4 d亦无明显差异(3.9 ± 0.5 vs 3.8 ± 0.6 $\mu\text{U}/(\text{islet}\cdot\text{h})$, $t = 0.998$, $P > 0.05$).

2.3 胰岛素释放试验 在25 mmol/L葡萄糖刺激条件下, 玻璃化和微机程控组胰岛细胞在胰岛素释放上无显著性差异($t = 1.367$, $P > 0.05$), 两组细胞在冻存前后亦无明显差异 [$t_{(\text{冻前:程控})} = 0.48$, $P > 0.05$; $t_{(\text{冻前:玻璃})} = 0.31$, $P > 0.05$, 图3].

2.4 冷冻保存胰岛细胞中胰岛素基因mRNA的表达 玻璃化冷冻降温和微机程控降温的胰岛细胞复苏后, 于复苏2, 4, 6, 8 d均显示胰岛素mRNA的表达, 凝胶电泳图上显示的表达量与冻存前无明显不同(图4).

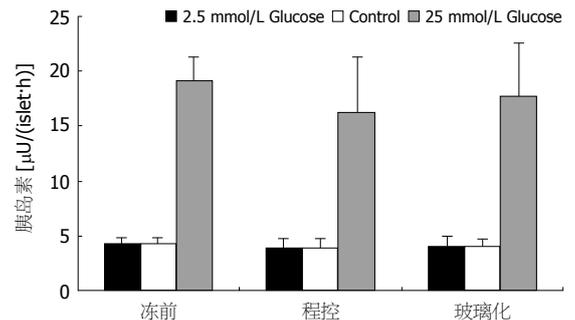


图 3 胰岛素释放试验.

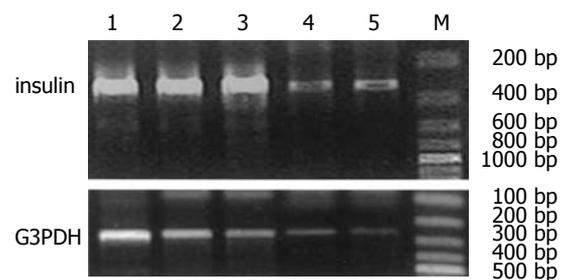


图 4 RT-PCR检测胰岛细胞insulin基因的表达. 1: 冻存前; 2: 微机程控冷冻复苏后2 d; 3: 玻璃化冷冻复苏2 d; 4: 微机程控复苏后8 d; 5: 玻璃化冷冻复苏后8 d; M: 200 bp和100 bp DNA ladder; G3PDH基因扩增为内对照.

3 讨论

近年来, 胰岛移植治疗糖尿病取得了突破性的进展, 然而这种新方法一般需要至少从2-3人的供体胰腺中分离胰岛, 供体的缺乏制约了胰岛移植的广泛应用^[8-9], 因此, 建立胰岛细胞库是解

决此问题的重要途径. 目前, 制约细胞库发展的技术环节仍然是冷冻过程中对细胞的损伤问题^[10], 在这一过程中, 冷冻降温速度和冷冻保护剂的效能是起决定作用的两大因素^[11]. 缓慢降温是目前冻存内分泌腺细胞较为流行的降温方法, 由微机程控降温设备控制的冷冻方法, 降温过程平稳而准确, 并可流程化操作^[12]. 但缓慢冷冻过程中, 由于细胞外液的水分不断结晶, 未冻的游离水减少, 造成细胞内外渗透压不等, 使得大量的水分由细胞内向细胞外渗出, 逐渐导致细胞内渗透压升高, 造成“溶质性损伤”的负反应^[13-14].

“玻璃化”是一个物理学上的概念, 是指水或溶液快速降温达到或低于-100~-110℃的温度范围时, 形成一种高黏度的介于液态和固态之间、非晶体的、透明的玻璃态^[15]. 玻璃化冷冻技术是快速冷冻与高浓度冷冻保护剂相结合的结果, 由于冷却速度很快, 以至于在低温时形成了透明的玻璃状固体, 冷却过程中黏度很高却没有冰晶形成, 因而避免了冷冻过程中形成的冰晶对细胞脂质膜及细胞骨架结构的损伤, 并保留了细胞内外液体正常的分子和离子分布. 我们测得数据中玻璃化冷冻与微机程控缓慢冷冻之间在统计学上虽然无显著差异, 但玻璃化的数值均比缓慢冷冻稍高, 说明玻璃化冷冻保存胰岛细胞, 能够完好地保持细胞的正常生理活性, 能够用于胰岛细胞的冷冻保存. 但是, 不同的玻璃化方案会对其效果产生不同的影响, 对于同一种组织细胞, 冷冻保护剂的浓度和种类是最重要一个影响因素^[16]. 冬天的青蛙被冷冻得硬如岩石, 但到春暖花开时还能奇迹般的复活并充满活力, 秘密在于其细胞内存在的大量多糖类物质. 受自然界的启发, 目前常用冷冻保护剂主要分两大类: 其中多糖类(蔗糖、海藻糖)及聚乙二醇、BSA、Percoll等大分子物质多用作细胞外冷冻保护剂^[17]; 细胞内冷冻保护剂主要是二甲基亚砷、乙二醇、丙三醇等具有良好穿透性的小分子物质^[18-19]. 我们吸取前人经验, 采用二甲基亚砷、聚乙二醇、海藻糖、乙酰胺配置玻璃化冷冻保护液, 以四步平衡法玻璃化快速冷冻, 复苏后经对胰岛细胞mRNA及培养液中胰岛素的检测表明, 玻璃化冷冻后胰岛细胞分泌功能未受影响. 结果提示此种冷冻保护剂的选择对胰岛的玻璃化冷冻具有良好效果.

我们证明, 玻璃化保存胰岛可以达到微机冷冻保存的冻存效果, 即可避免或减轻冷冻损

伤, 又可以长期保存细胞的理想状态. 与常规的慢速冷冻法相比, 玻璃化冷冻可在0℃以上的温度下直接操作, 并且不需要昂贵的冷冻仪器和复杂的操控程序, 因而具有操作简单、快速、经济等优点, 是便于普及的一种候选技术. 其进一步的完善并推广, 对于胰岛细胞库的建立必将起到重大作用.

4 参考文献

- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-238
- Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature* 1985; 313: 573-575
- Zhou CQ, Mai QY, Li T, Zhuang GL. Cryopreservation of human embryonic stem cells by vitrification. *Chin Med J* 2004; 117: 1050-1055
- Pegg DE. The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. *Hum Fertil* 2005; 8: 231-239
- 林戈, 陆长富, 龚斐, 肖红梅, 周虹, 卢光琇. 人类胚胎超快速冷冻保存的初步研究. *中华妇产科杂志* 2001; 36: 753
- Song YC, Hagen PO, Lightfoot FG, Taylor MJ, Smith AC, Brockbank KG. *In vivo* evaluation of the effects of a new ice-free cryopreservation process on autologous vascular grafts. *J Invest Surg* 2000; 13: 279-288
- 邓华丽, 黄国宁, 王亚平. 人卵与胚胎玻璃化冷冻技术. *实用妇产科杂志* 2005; 21: 20-23
- 宋振顺, 安家泽. 胰腺干细胞及其治疗糖尿病的研究进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1052-1054
- Larson-Wadd K, Belani KG. Pancreas and islet cell transplantation. *Anesthesiol Clin North America* 2004; 22: 663-674
- Egli RJ, Sckell A, Fraitzl CR, Felix R, Ganz R, Hofstetter W, Leunig M. Cryopreservation with dimethyl sulfoxide sustains partially the biological function of osteochondral tissue. *Bone* 2003; 33: 352-361
- Lakey JR, Rajotte RV, Fedorow CA, Taylor MJ. Islet cryopreservation using intracellular preservation solutions. *Cell Transplant* 2001; 10: 583-589
- Miyamoto M, Balamurugan AN, Nozawa Y, Sakurai T, Xu B, Yoshimura S, Tanaka T, Tohyama T, Miyakoshi J, Inoue K. Development of a cryopreservation procedure employing a freezer bag for pancreatic islets using a newly developed cryoprotectant. *Cell Transplant* 2001; 10: 363-371
- Matsumoto S, Matsusita M, Morita T, Kamachi H, Tsukiyama S, Furukawa Y, Koshida S, Tachibana Y, Nishimura S, Todo S. Effects of synthetic antifreeze glycoprotein analogue on islet cell survival and function during cryopreservation. *Cryobiology* 2006; 52: 90-98
- Dahl SL, Chen Z, Solan AK, Brockbank KG, Niklason LE, Song YC. Feasibility of vitrification as a storage method for tissue-engineered blood vessels. *Tissue Eng* 2006; 12: 291-300
- Song YC, Chen ZZ, Mukherjee N, Lightfoot FG, Taylor

- MJ, Brockbank KG, Sambanis A. Vitrification of tissue engineered pancreatic substitute. *Trans-plant Proc* 2005; 37: 253-255
- 16 Arata T, Okitsu T, Fukazawa T, Ikeda H, Kobayashi K, Yong C, Kosaka Y, Narushima M, Matsuoka J, Yamamoto I, Tanaka N, Lakey JR, Kobayashi N. Maintenance of glucose-sensitive insulin secretion of cryopreserved human islets with University of Wisconsin solution and ascorbic acid-2 glucoside. *Artif Organs* 2004; 28: 529-536
- 17 Tian XH, Xue WJ, Ding XM, Pang XL, Teng Y, Tian PX, Feng XS. Small intestinal submucosa improves islet survival and function during in vitro culture. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7378-7383
- 18 Wowk B, Leitl E, Rasch CM, Mesbah-Karimi N, Harris SB, Fahy GM. Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology* 2000; 40: 228-236
- 19 Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil Steril* 2002; 78: 449-454

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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.

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,欢迎副主任医师以上的消化内科、普通外科专家为专栏撰稿(附单位介绍信),免收出版费,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

HBV感染者人类白细胞 I, II 类抗原等位基因多态性分析

张淑云, 李迪, 谷鸿喜, 李兴库, 金茜, 刘伟, 杜博, 卢滨

张淑云, 李迪, 谷鸿喜, 哈尔滨医科大学微生物学教研室 黑龙江省哈尔滨市 150086
张淑云, 李兴库, 金茜, 刘伟, 杜博, 卢滨, 哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心 黑龙江省哈尔滨市 150086
张淑云, 1993年哈尔滨医科大学硕士, 2003级博士生, 副主任医师, 副教授, 主要从事临床分子病毒学研究和临床基因诊断工作。
黑龙江省自然科学基金资助项目, No. D0307
黑龙江省卫生厅课题基金资助项目, No. 2005-311
高等学校博士学科点专项科研基金, No. 20050226002
通讯作者: 谷鸿喜, 150086, 哈尔滨市南岗区保健路157号, 哈尔滨医科大学微生物学教研室. hxgu2432@163.com
电话: 0451-86605743 传真: 0451-86685122
收稿日期: 2006-02-27 接受日期: 2006-03-06

Analysis of polymorphism of human leukocyte antigen Class I and II alleles in patients with hepatitis B virus infection

Shu-Yun Zhang, Di Li, Hong-Xi Gu, Xing-Ku Li, Xi Jin, Wei Liu, Bo Du, Bin Lu

Shu-Yun Zhang, Di Li, Hong-Xi Gu, Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Shu-Yun Zhang, Xing-Ku Li, Xi Jin, Wei Liu, Bo Du, Bin Lu, Research Center of the second affiliated hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China

Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D0307; the Foundation of Health Department of Heilongjiang Province, No. 2005-311; and Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education, No. 20050226002

Correspondence to: Hong-Xi Gu, Department of Microbiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. hxgu2432@163.com

Received: 2006-02-27 Accepted: 2006-03-06

Abstract

AIM: To investigate the polymorphism of human leukocyte antigen (HLA) Class I and II alleles in patients with hepatitis B virus (HBV) infection, and to explore the correlations of HBV infection with HLA-A, B, DRB1 allelic frequencies.

METHODS: The polymerase chain reaction-sequence-specific primer (PCR-SSP) technique was used to determine the frequencies of HLA-A, B, DRB1 alleles in 61 patients with chronic hepatitis B (CHB), 30 recovered people from HBV infection and 40 healthy bone marrow donors (normal controls) in Heilongjiang province.

RESULTS: The allelic frequencies of HLA-DRB1*12 in CHB patients were markedly higher than those in the normal controls and recovered patients (0.230 vs 0.075, $P = 0.004$, $OR = 3.674$, 95% CI: 1.445-9.338; 0.230 vs 0.063, $P = 0.004$, $OR = 4.468$, 95% CI: 1.492-13.377), but the allelic frequencies of HLA-B*35 and DRB1*13 were markedly lower (0.066 vs 0.163, $P = 0.027$, $OR = 0.362$, 95% CI: 0.143-0.918; 0.016 vs 0.008, $P = 0.017$, $OR = 0.174$, 95% CI: 0.035-0.859). The allele frequencies of HLA-B*51 and A*02 in the recovered patients were significantly higher than those in the normal controls (0.125 vs 0.025, $P = 0.019$, $OR = 5.587$, 95% CI: 1.139-27.027) and CHB patients (0.221 vs 0.360, $P = 0.044$, $OR = 0.507$, 95% CI: 0.260-0.986), respectively. The frequencies of HLA-A*69 and B*56 were markedly lower in the CHB patients than those in the normal controls (0.000 vs 0.037, $P = 0.031$; 0.000 vs 0.037, $P = 0.031$). The allelic frequency of HLA-A*02 was significantly higher in CHB patients than that in the recovered patients ($P = 0.044$), and the frequency of HLA-B*51 was markedly higher in the recovered patients than that in the controls ($P = 0.019$).

CONCLUSION: HLA-DRB1*12 is highly associated with the susceptibility of patients to HBV infection and viral persistence. HLA-B*51 and A*02 are closely associated with the susceptibility to HBV infection and viral clearance. HLA-B*35, DRB1*13, B*56 and A*69 are associated with the protection against HBV infection.

Key Words: Hepatitis B virus; Infection; Human leukocyte antigen; Alleles; Polymeric chain reaction-sequence-specific primer

Zhang SY, Li D, Gu HX, Li XK, Jin X, Liu W, Du B, Lu B. Analysis of polymorphism of human leukocyte antigen Class I and II alleles in patients with hepatitis B virus infection. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10):963-968

摘要

目的: 分析HBV感染者体内病毒持续和清除与HLA-A, B, DRB1各位点等位基因分布频率的关系。

背景资料

目前对HBV的病毒学、HBV感染和免疫等都有了较深刻的认识,并发展了有效的乙肝疫苗。但HBV感染仍然是全球性的健康问题。HBV易发生持续感染的机制尚需深入研究。目前的研究表明,HBV持续感染的形成除了与病毒、宿主免疫和共感染等因素密切相关外,宿主遗传因素也起很大作用。HLA多态性作为宿主免疫遗传因素倍受关注,但研究尚处于起步阶段。

■研究前沿

与HBV疫苗注射反应性、HBV易感性及病毒持续或清除,以及干扰素治疗反应性等相关的HLA等位基因、单倍型或连锁基因的发现是目前研究的热点。

方法: 采用序列特异性引物-聚合酶链式反应(PCR-SSP)技术,对61例慢性乙型肝炎患者(CHB)、32例HBV感染后病毒清除者(感染恢复组)和40例骨髓移植供者(正常组)的外周血白细胞,进行人类白细胞抗原等位基因(HLA-A, B, DRB1)分型检测。

结果: 在慢性乙型肝炎组, HLA-DRB1*12等位基因分布频率较正常组(0.230 vs 0.075, $P = 0.004$, $OR = 3.674$, 95%CI: 1.445-9.338)和HBV感染恢复组(0.230 vs 0.063, $P = 0.004$, $OR = 4.468$, 95%CI: 1.492-13.377)均显著增高, HLA-B*35, DRB1*13则显著降低(0.066 vs 0.163, $P = 0.027$, $OR = 0.362$, 95%CI: 0.143-0.918; 0.016 vs 0.008, $P = 0.017$, $OR = 0.174$, 95%CI: 0.035-0.859); HLA-A*69, B*56也显著降低(均0.000 vs 0.037, $P = 0.031$)。HLA-A*02等位基因分布频率在慢性肝炎组与HBV感染恢复组比较显著降低($P = 0.044$)。HLA-B*51在感染恢复组与正常组比较显著增高($P = 0.019$)。

结论: 机体对HBV易感性和病毒持续或清除与HLA等位基因多态性相关。HLA-DRB1*12可能既为易感性位点,又能促进病毒的持续感染; HLA-B*51, A*02可能为易感性位点,但感染后易清除病毒; HLA-DRB1*13可能是抗HBV感染的保护性基因; HLA-B*35, B*56和A*69在中国北方汉族人可能也为抗HBV感染的保护性基因。

关键词: 乙型肝炎病毒; 感染; 人类白细胞抗原; 等位基因; PCR-SSP

张淑云, 李迪, 谷鸿喜, 李兴库, 金茜, 刘伟, 杜博, 卢滨. HBV感染者人类白细胞 I, II 类抗原等位基因多态性分析. 世界华人消化杂志 2006;14(10):963-968
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/963.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(HBV)感染可引起隐性感染、急性感染和慢性感染。在成人HBV感染后,90%-95%能从隐性感染或急性感染中恢复,称为HBV感染恢复者或自然免疫者,5%-10%感染者不能彻底清除病毒而成为慢性HBV感染者(CHB),其中有20%-30%和5%又可发展为肝硬化和原发性肝癌,使HBV慢性感染成为威胁人类健康的主要疾病之一^[1-2]。目前,导致HBV感染后不同临床转归的原因尚未完全清楚,但在病毒感染性疾病中机体的免疫因素起着关键的

作用^[3-5]。在人体的免疫系统中,人类白细胞抗原(HLA)处于中心地位。病毒感染后,HLA I, II类抗原可分别将内源性和外源性病毒抗原呈递给CD4⁺, CD8⁺细胞,使机体产生针对该病毒的特异性免疫,特别是有效的CTL对清除病毒起决定性作用。HLA是人类基因组中最具多态性的一类基因,作为遗传因素与许多疾病的易感性相关,所以HLA作为免疫遗传因素在HBV感染、免疫和治疗中备受关注^[6-10]。国内外的研究表明,HLA等位基因在乙肝疫苗的有无应答^[11-15]、乙肝病毒的清除或持续^[15-17]、对干扰素治疗反应^[17-19]、以及肝硬化等^[20]的发生上都有优势位点。为深入探讨HBV感染与HLA多态性的关系,本研究我国对北方地区HBV感染者HLA-A, B, DRB1等位基因多态性进行了检测和分析。

1 材料和方法

1.1 材料 2004-10/2005-11就诊于哈医大二院的慢性乙型肝炎患者61例,男44例,女17例,年龄18-63(平均42岁),诊断符合第10次全国病毒性肝炎及肝病学术会议讨论修订的诊断标准^[21],均为无血缘关系的黑龙江地区汉族人,排除免疫性疾病和共感染因素;并收集本地区未注射乙肝疫苗,但HBsAb和HBcAb阳性的健康者32例,为HBV自然感染恢复组。以无血缘关系、HBV各项指标均阴性的移植供者40例作为正常对照组。HLA-A, B, DRB1等位基因的检测试剂由Biotest, Landsteinerstr提供。

1.2 方法 HLA-A, B, DRB1等位基因采用序列特异性引物/聚合酶链式反应(PCR-SSP)技术检测;基因组DNA提取、PCR反应和琼脂糖凝胶电泳按Biotest ABDR SSPtray试剂盒说明进行;通过凝胶成像分析系统记录电泳结果;用试剂盒提供的软件进行HLA等位基因判断。该试剂盒可检测HLA A*01-A*80等位基因44个, B*07-B*83等位基因163个和DRB1*01-DRB1*16等位基因43个。等位基因分布频率(AF)采用直接计数法。

统计学处理 $AF \geq 0.010$ 的等位基因纳入统计分析;组间等位基因分布频率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义;关联度用优势比(Odds ratio, OR)反映,并计算其95%可信区间(95%CI)。数据处理采用SPSS 10.0统计软件完成。

2 结果

一份基因组DNA HLA-A, B, DRB1等位基因的PCR产物,20 g/L琼脂糖凝胶电泳结果见图

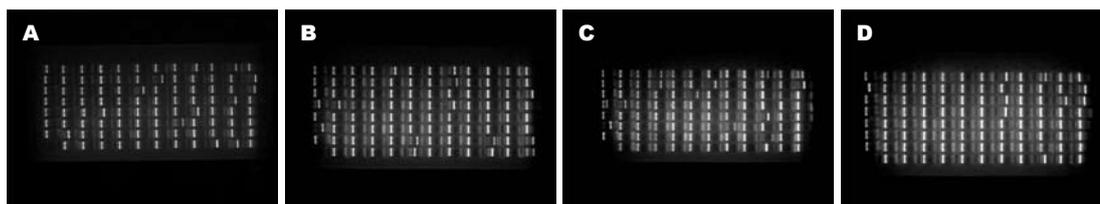


图 1 HLA-A, B, DRB1等位基因电泳图. A: HLA-A*26/A*30, B*13/B*40, DRB1*07/DRB1*11; B: HLA-A*02/A*11, B*35/B*55, DRB1*01/DRB1*14; C: HLA-A*02/A*11, B*15/B*40, DRB1*15/DRB1*04; D: HLA-A*24, B*54, DRB1*04/DRB1*12.

1. 以各位点等位基因分布频率 $AF \geq 0.100$ 为优势位点. 在正常组中以HLA-A*02, 11, 03(0.213, 0.113和0.113); B*13, 35, 40(0.100, 0.163和0.100); DRB1*07, 09, 15(0.138, 0.113和0.113)为优势位点. 在HBV感染恢复组中以HLA-A*02, 11, 24(0.360, 0.109和0.125); B*40, 46, 51(0.125, 0.109和0.125); DRB1*04, 09, 15(0.109, 0.156和0.125)为优势位点. 在慢性乙型肝炎组中以HLA-A*02, 11, 24(0.221, 0.123和0.148); B*13, 40(0.172和0.172); DRB1*07, 09, 12, 15(0.139, 0.148, 0.230和0.107)为优势位点(表1).

2.1 慢性乙型肝炎各位点等位基因分布 在慢性乙型肝炎组HLA-DRB1*12等位基因分布频率明显增高, 与正常组比较差异显著(0.230 vs 0.075, $P = 0.004$, $OR = 3.674$, 95% CI = 1.445-9.338); HLA-B*13, 15, 40和51也增高, 但与正常组比较没有统计学差异. HLA-B*35, DRB1*13则降低, 与正常组比较差异显著(分别为0.066 vs 0.163, $P = 0.027$, $OR = 0.362$, 95% CI = 0.143-0.918和0.016 vs 0.008, $P = 0.017$, $OR = 0.174$, 95% CI = 0.035-0.859); HLA-A*69, B*56与正常组比较也降低, 且差异显著(均为0.000 vs 0.037, $P = 0.031$). 两组中其他位点等位基因分布频率未见差异(表2).

2.2 HBV感染恢复组各位点等位基因分布 在感染恢复组HLA-B*51等位基因分布频率较高, 与正常组比较差异显著(0.125 vs 0.025, $P = 0.019$, $OR = 5.587$, 95% CI = 1.139-27.027); HLA-A*02在感染恢复组分布频率也较高, 与正常组比较 P 值显示临界值(0.360 vs 0.213, $P = 0.051$, $OR = 2.079$, 95% CI = 0.992-4.367); HLA-B*15和DRB1*04也增高, 而HLA-A*69; B*27, 35; DRB1*07, 13则降低, 但均没有统计学意义. 两组中其他位点等位基因分布频率未见差异(表3).

2.3 慢性乙型肝炎组与HBV感染恢复组各位点等位基因分布 HLA-A*02在两组中均有较高的分布频率, 但二者仍存在统计学差异, 前组明显

低于后组(0.221 vs 0.360, $P = 0.044$, $OR = 0.507$, 95% CI = 0.260-0.986); HLA-DRB1*12等位基因分布频率在慢性乙型肝炎组明显增高, 与恢复组比较差异显著(0.230 vs 0.063, $P = 0.004$, $OR = 4.468$, 95% CI = 1.492-13.377); HLA-A*31, B*13, DRB1*07也增高; HLA-A*29; B*46, 51, 56; DRB1*14, 16降低, 但没有统计学差异. 两组中其他位点等位基因分布频率未见差异(表4).

3 讨论

人类白细胞抗原(HLA)是人类主要组织相容性抗原(MHC), 在免疫应答过程中起重要作用. 编码HLA的基因又称HLA复合体, 其定位于人第6号染色体短臂上(6p21.3), 全长约4 000 kb, 占人类整个基因组的1/3 000. 依据编码分子的不同特性而分成三类基因区, 分别称为 I, II, III类基因. HLA复合体是迄今所知的人类最具多态性基因系统, 与许多疾病的遗传易感性相关, 并有种族和地域差异. 本研究检测了HLA I类抗原等位基因HLA A*01-A*80、B*07-B*83和HLA II类抗原等位基因HLA DRB1*01-DRB1*16, 通过对三组人群中各等位基因分布频率变化的比较, 分析HBV感染和HBV感染后病毒持续或清除与HLA某些等位基因分布的相关性. 结果显示, HLA-DRB1*12等位基因的分布频率在正常组($AF = 0.075$)和感染恢复组($AF = 0.063$)都不是很高, 但在慢性乙型肝炎组则有意义地增高(0.230 vs 0.075, $P = 0.004$ 和0.230 vs 0.063, $P = 0.004$), 与Wu *et al*^[22]和林菊生 *et al*^[20]分别对台湾和湖北等地区汉族人研究报道的结果相一致, 提示携带HLA-DRB1*12等位基因者不仅对HBV易感, 而且易于产生病毒持续感染. 但也有不同的报道. 如浙江地区的研究报道是HLA-DRB1*09增高, 而HLA-DRB1*12则降低^[23].

在本研究中, HLA-A*02等位基因分布频率在慢性肝炎组($AF = 0.221$)、感染恢复组($AF =$

■创新盘点

通过61例CHB患者、32例感染后恢复者和40例移植供体对照研究HLA-ABDRB1等位基因多态性与HBV易感性及病毒持续或清除的关系, 发现HLA-DRB1*12等位基因与HBV易感性呈正相关, 且与HBV持续感染相关; 而HLA-B*35、DRB1*13、B*56和A*69等位基因与HBV易感性呈负相关; HLA-A*02可能易促进机体清除病毒. 这些等位基因的变化可能体现黑龙江地区的特点.

■应用要点

本文为进一步深入研究病毒因素和宿主免疫遗传因素共同对HBV持续感染的作用机制奠定工作基础,并为临床判断HBV感染的转归和预后,开展个体化治疗等提供理论和实验依据。

表 1 HBV感染各组HLA-A, B, DRB1各位点等位基因分布情况

HLA Alleles	Total		CHB		Recovered Group		Normal Group		
	n = 133	AF'	n = 61	AF'	n = 32	AF'	n = 40	AF'	
A	01	13	0.049	4	0.033	2	0.031	7	0.088
	02	67	0.252	27	0.221	23	0.360	17	0.213
	03	21	0.079	8	0.066	4	0.063	9	0.113
	11	31	0.117	15	0.123	7	0.109	9	0.113
	24	33	0.124	18	0.148	8	0.125	7	0.088
	26	8	0.030	5	0.041	1	0.016	2	0.025
	29	3	0.011	0	0.000	1	0.016	2	0.025
	30	17	0.064	9	0.074	3	0.047	5	0.063
	31	13	0.049	8	0.066	1	0.016	4	0.050
	32	5	0.019	3	0.025	1	0.016	1	0.013
	33	19	0.071	10	0.082	4	0.063	5	0.063
	68	6	0.023	3	0.025	1	0.016	2	0.025
	69	3	0.011	0	0.000	0	0.000	3	0.037
B	07	8	0.030	4	0.033	2	0.031	2	0.025
	13	34	0.128	21	0.172	5	0.078	8	0.100
	15	21	0.079	11	0.090	6	0.094	4	0.050
	27	5	0.019	1	0.008	0	0.000	4	0.050
	35	26	0.098	8	0.066	5	0.078	13	0.163
	37	3	0.011	1	0.008	0	0.000	2	0.025
	38	5	0.019	2	0.016	1	0.016	2	0.025
	40	37	0.139	21	0.172	8	0.125	8	0.100
	44	16	0.060	9	0.074	4	0.063	3	0.037
	46	20	0.075	6	0.049	7	0.109	7	0.088
	48	9	0.034	3	0.025	3	0.047	3	0.037
	51	18	0.068	8	0.066	8	0.125	2	0.025
	52	8	0.030	4	0.033	1	0.016	3	0.037
	55	7	0.026	3	0.025	2	0.031	2	0.025
	56	4	0.015	0	0.000	1	0.016	3	0.037
57	4	0.015	3	0.025	0	0.000	1	0.013	
58	10	0.036	4	0.033	2	0.031	4	0.050	
DRB1	01	10	0.036	4	0.033	2	0.031	4	0.050
	03	7	0.026	3	0.025	3	0.047	1	0.013
	04	21	0.079	10	0.082	7	0.109	4	0.050
	07	32	0.120	17	0.139	4	0.063	11	0.138
	08	18	0.068	8	0.066	5	0.078	5	0.063
	09	37	0.139	18	0.148	10	0.156	9	0.113
	11	17	0.064	7	0.057	4	0.063	6	0.075
	12	38	0.143	28	0.230	4	0.063	6	0.075
	13	10	0.036	2	0.016	1	0.016	7	0.088
	14	15	0.056	4	0.033	6	0.094	5	0.063
	15	30	0.113	13	0.107	8	0.125	9	0.113
	16	5	0.019	1	0.008	3	0.047	1	0.013

'AF': 等位基因分布频率。

0.360)和正常组(AF = 0.213)三组中均较高,但在感染恢复组明显增高,与慢性肝炎组相比差异显著($P = 0.044$),与正常组比较为临界增高($P = 0.051$),提示该位点可能与HBV易感性呈正相关,但易促进机体清除病毒。HLA-B*51等位基因分布频率在正常组较低(AF = 0.025),但在感染恢复组(AF = 0.125)与慢性肝炎组(AF = 0.066)均较高,尤其在感染恢复组与正常组比

较有明显差异(0.125 vs 0.025, $P = 0.019$),提示HLA-B*51可能与HLA-A*02有类似的作用,但国内外均未见有关于两等位基因分布频率差异的报道。HLA-B*35在许多研究报道中为HBV易感性位点,并促进病毒感染持续存在^[10,22],但在我们的研究中发现该位点在慢性肝炎组分布频率为0.066,在感染恢复组分布频率为0.078,均较正常组(AF = 0.163)明显低,尤以慢性肝炎组

表 2 慢性乙型肝炎HLA-A, B, DRB1各位点等位基因分布频率

HLA Alleles	CHB		Normal Group		χ^2	P	OR	95% CI	
	n = 61	AF ^a	n = 40	AF ^a					
A	01	4	0.033	7	0.088	2.809	0.094	0.354	0.100-1.250
	29	0	0.000	2	0.025	3.081	0.079	0.000	-
	69	0	0.000	3	0.037	4.644	0.031	0.000	-
B	13	21	0.172	8	0.100	2.045	0.153	1.871	0.785-4.460
	15	11	0.090	3	0.037	2.078	0.149	2.544	0.687-9.420
	27	1	0.008	4	0.050	3.498	0.061	0.157	0.017-1.431
	35	8	0.066	13	0.163	4.873	0.027	0.362	0.143-0.918
	40	21	0.172	8	0.100	2.045	0.153	1.871	0.785-4.460
	51	8	0.066	2	0.025	1.690	0.194	2.737	0.566-13.235
DRB1	56	0	0.000	3	0.037	4.644	0.031	0.000	-
	12	28	0.230	6	0.075	8.240	0.004	3.674	1.445-9.338
	13	2	0.016	7	0.088	5.739	0.017	0.174	0.035-0.859

^aAF: 等位基因分布频率; OR: 优势比; 95% CI: 95%可信区间。

表 3 HBV感染恢复组HLA-A, B, DRB1各位点等位基因分布频率

HLA Alleles	Recovered Group		Normal Group		χ^2	P	OR	95% CI	
	n = 32	AF ^a	n = 40	AF ^a					
A	01	2	0.031	7	0.088	1.920	0.166	0.336	0.067-1.678
	02	23	0.360	17	0.213	3.823	0.051	2.079	0.992-4.367
	69	0	0.000	3	0.037	2.451	0.117	0.000	-
B	15	6	0.094	3	0.037	1.920	0.166	2.653	0.637-11.111
	27	0	0.000	4	0.050	3.291	0.070	0.000	-
	35	5	0.078	13	0.163	2.314	0.128	0.437	0.147-1.299
	51	8	0.125	2	0.025	5.502	0.019	5.587	1.139-27.027
DRB1	04	7	0.109	4	0.050	1.777	0.183	2.333	0.652-8.355
	07	4	0.063	11	0.138	2.143	0.143	0.418	0.127-1.382
	13	1	0.016	7	0.088	3.501	0.061	0.166	0.020-1.832

^aAF: 等位基因分布频率; OR: 优势比; 95% CI: 95%可信区间。

表 4 慢性乙型肝炎组与HBV感染恢复组HLA-A, B, DRB1各位点等位基因分布频率差异

HLA Alleles	CHB		Recovered Group		χ^2	P	OR	95% CI	
	n = 61	AF ^a	n = 32	AF ^a					
A	02	27	0.221	23	0.360	4.071	0.044	0.507	0.260-0.986
	29	0	0.000	1	0.016	1.917	0.166	0.000	-
	31	8	0.066	1	0.016	2.275	0.132	4.421	0.541-36.157
B	13	21	0.172	5	0.078	3.085	0.079	2.453	0.879-6.851
	46	6	0.049	7	0.109	2.340	0.126	0.421	0.135-1.311
	51	8	0.066	8	0.125	1.886	0.170	0.491	0.175-1.377
	56	0	0.000	1	0.016	1.917	0.166	0.000	-
DRB1	07	17	0.139	4	0.063	2.475	0.116	2.429	0.781-7.551
	12	28	0.230	4	0.063	8.220	0.004	4.468	1.492-13.377
	14	4	0.033	6	0.094	3.067	0.080	0.328	0.089-1.207
	16	1	0.008	3	0.047	2.984	0.084	0.168	0.017-1.650

^aAF: 等位基因分布频率; OR: 优势比; 95% CI: 95%可信区间。

同行评价

本文通过采用已商业化的PCR-SSP试剂盒, 对HLA I/II类抗原基因的多态性在慢性乙型肝炎、HBV病毒清除者及正常对照这三组进行了初步探索性研究, 研究结果具有一定新意, 对于具有不同HLA遗传背景的患者HBV感染及其转归具有一定理论价值。

差异显著(0.066 vs 0.163, $P = 0.027$, $OR = 0.362$, 95% CI = 0.143-0.918). 推断HLA-B*35在中国北方汉族人可能为HBV非易感性基因. 关于HLA-DRB1*13, 在本研究的慢性肝炎组和感染恢复组分布频率均为0.016, 也均较正常组($AF = 0.088$)为低, 尤其在慢性感染组差异显著($P = 0.017$), 与许多报道相一致, 可能是HBV慢性感染的抗性基因^[24-25]. 另外, HLA-B*56、A*69也可能有与HLA-DRB1*13相类似的作用, 尚需要大样本的研究.

我们只分析了单一基因位点与HBV感染以及HBV感染后病毒持续或清除的相关性, 虽然发现一些有意义的相关位点, 但尚需继续扩大样本量, 继续深入地在HLA基因表达水平、不同HLA表型的作用, 以及HLA单体型或HLA连锁的扩展单体型等方面进行研究.

4 参考文献

- 谷鸿喜, 陈锦英. 医学微生物学. 第1版. 北京: 北京大学医学出版社, 2003: 324-329
- Tran TT, Martin P. Hepatitis B: epidemiology and natural history. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 255-266
- 金奇. 医学分子病毒学. 第1版. 北京: 科学出版社, 2001: 52-57
- Pumpens P, Grens E, Nassal M. Molecular epidemiology and immunology of hepatitis B virus infection - an update. *Intervirology* 2002; 45: 218-232
- Alatrakchi N, Koziel MJ. Antiviral T-cell responses and therapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39: 631-634
- 钱毅, 章廉, 周祎, 侯金林. HLA-DRB1*07与慢性乙肝患者Th1/Th2因子表达水平的相关性. *中国免疫学杂志* 2003; 19: 206-208
- 刘建平, 林辉, 宋建勇. 乙型肝炎病毒感染者HLA-DRB基因分型及其相关性研究. *第三军医大学学报* 2000; 22: 354-356
- Thio CL, Thomas DL, Karacki P, Gao X, Marti D, Kaslow RA, Goedert JJ, Hilgartner M, Strathdee SA, Duggal P, O'Brien SJ, Astemborski J, Carrington M. Comprehensive analysis of class I and class II HLA antigens and chronic hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 12083-12087
- Wang FS. Current status and prospects of studies on human genetic alleles associated with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 641-644
- Kacprzak-Bergman I, Nowakowska B. Influence of genetic factors on the susceptibility to HBV infection, its clinical pictures, and responsiveness to HBV vaccination. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2005; 53: 139-142
- Wang C, Tang J, Song W, Lobashevsky E, Wilson CM, Kaslow RA. HLA and cytokine gene polymorphisms are independently associated with responses to hepatitis B vaccination. *Hepatology* 2004; 39: 978-988
- 李明月, 李荣成, 黄尚志, 龚健, 曾宪嘉, 李燕萍, 陆明, 李辉. 乙型肝炎疫苗免疫不应答与HLA基因单体型的相关性研究. *中华预防医学杂志* 2002; 36: 180-183
- 刘蓬勃, 徐慧文, 王学良, 李辉, 庄贵华, 乌正赓, 张孔来. 乙肝疫苗接种无、弱应答与遗传因素关系. *第四军医大学学报* 2000; 21: 30-33
- 涂正坤, 吴雄文, 刘敏, 姜晓丹, 杨志章, 吴锋, 龚非力, 赵修竹. 湖北汉族人群对乙肝疫苗免疫应答能力与HLA-DRB1的等位基因相关性的研究. *免疫学杂志* 2000; 16: 45-47
- Godkin A, Davenport M, Hill AV. Molecular analysis of HLA class II associations with hepatitis B virus clearance and vaccine nonresponsiveness. *Hepatology* 2005; 41: 1383-1390
- 蒋业贵, 王宇明. 乙型肝炎患者人类白细胞抗原-DRB1、-DQA1、-DQB1等位基因多态性分析. *中华流行病学杂志* 2004; 25: 337-340
- Han YN, Yang JL, Zheng SG, Tang Q, Zhu W. Relationship of human leukocyte antigen class II genes with the susceptibility to hepatitis B virus infection and the response to interferon in HBV-infected patients. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5721-5724
- 钱毅, 章廉, 侯金林. 慢性乙型肝炎病毒感染者干扰素治疗无应答与HLA-DRB1*07的相关性. *免疫学杂志* 2000; 18: 371-374
- Chu RH, Ma LX, Wang G, Shao LH. Influence of HLA-DRB1 alleles and HBV genotypes on interferon-alpha therapy for chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 4753-4757
- 林菊生, 程元桥, 田德英, 廖家志, 刘南植, 熊平, 梁扩寰. HLA-DRB₁和肿瘤坏死因子 α 基因多态性与肝硬化的遗传易感性. *中华内科杂志* 2002; 41: 818-821
- 中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订. 病毒性肝炎防治方案. *中华传染病杂志* 2001; 19: 56-62
- Wu YF, Wang LY, Lee TD, Lin HH, Hu CT, Cheng ML, Lo SY. HLA phenotypes and outcomes of hepatitis B virus infection in Taiwan. *J Med Virol* 2004; 72: 17-25
- 陈湖光, 蒋国法, 孟雪琴, 马亦林, 刘克洲. 乙型肝炎病毒感染者人类白细胞抗原的检测. *中华传染病杂志* 2002; 20: 164-167
- Hohler T, Gerken G, Notghi A, Lubjuhn R, Taheri H, Protzer U, Lohr HF, Schneider PM, Meyer zum Buschenfelde KH, Rittner C. HLA-DRB1*1301 and *1302 protect against chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1997; 26: 503-507
- Thursz MR, Kwiatkowski D, Allsopp CE, Greenwood BM, Thomas HC, Hill AV. Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia. *N Engl J Med* 1995; 332: 1065-1069

电编 张敏 编辑 潘伯荣

肝纤维化中转录因子的调控作用

龙云, 唐红

龙云, 唐红, 四川大学华西医院感染性疾病中心, 生物治疗国家重点实验室(四川大学)感染病分子生物学研究室 四川省成都市 610041
国家杰出青年基金资助项目, No.30325036
通讯作者: 唐红, 610041, 四川省成都市, 四川大学华西医院感染性疾病中心, 生物治疗国家重点实验室(四川大学)感染病分子生物学研究室. htang6198@hotmail.com
电话: 028-85422647
收稿日期: 2006-03-11 接受日期: 2006-03-25

摘要

肝纤维化是继发于各种形式的慢性肝损伤之后的组织修复过程中的代偿反应, 他也是慢性肝病发展为肝硬化的必经病理过程. 各种病因所引起的慢性肝病绝大多数都有肝纤维化, 其中25%-40%最终发展为肝硬化乃至肝癌. 因此, 肝纤维化的发生机制成为目前慢性肝病的研究热点之一. 肝纤维化的形成是一个多因素、多细胞参与的复杂过程, 涉及多种细胞因子和蛋白成分表达的改变, 而基因转录水平的调控可能在影响其表达中起到了关键作用. 现就几种重要的转录因子在肝纤维化发生、发展过程中的可能调控作用作一综述.

关键词: 肝纤维化; 转录; 调控

龙云, 唐红. 肝纤维化中转录因子的调控作用. 世界华人消化杂志 2006;14(10):969-972

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/969.asp>

0 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis)是肝脏损伤持续存在、组织发生修复时细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)合成与降解失衡而引起的病理改变. 肝星状细胞(hepatic satellite cell, HSC)的激活和增生是肝纤维化发生的核心环节. 正常时HSC呈静止状态, 不合成或仅合成少量基质; 但在肝组织损伤时HSC出现增生并转变为成肌纤维细胞, 此即为激活或转化的HSC. 激活的HSC的生物合成功能发生了很大的改变, 使ECM(尤其是纤维性胶原 I 和III)的合成大大增加, 最终引起肝纤维化的发生^[1-3]. 肝脏内细胞—细胞、细胞—基质、基质—递质间的相互作用, 构成

了复杂的网络系统, 参与肝纤维化的发生及发展. 一些关键的转录因子表达和/或活性的长期改变, 对细胞中基因的表达具有重要的调控作用, 因此精确控制其活性显得尤为重要. 哺乳动物细胞的基因转录受转录因子和位于启动子或增强子的特定DNA序列之间的相互作用所调节. 转录因子与相应位点相结合, 通过与RNA聚合酶II和基本转录复合物相互作用, 对基因转录产生正性或负性影响. 细胞刺激物可以通过细胞内信号传导途径调控转录因子的活性, 从而改变细胞的基因表达. 在长期受损的肝脏, 多种转录因子参与了调控生成大量ECM蛋白以进行纤维性修复的过程, 而这种反应的持续存在导致了肝纤维化的致病状态^[4].

1 转录因子在肝纤维化中的调控作用

1.1 NF- κ B NF- κ B(核因子- κ B)由Rel蛋白家族(p65, p50, p52, c-Rel, 和RelB)的同型或异型二聚体组成. 经典的NF- κ B复合体(p65 : p50异二聚体)是由细胞因子、丝裂原等刺激哺乳动物细胞而产生的^[5-6]. 近年来众多研究发现NF- κ B有抗凋亡作用. 活化的NF- κ B可能通过抑制下游的c-Jun氨基端激酶(JNK)和c-Jun/AP-1的激活而阻断TNF诱导的肝细胞凋亡^[7]. 而在肝纤维化早期, 肝细胞坏死是由于毒素阻断了NF- κ B依赖的保护基因上调, 从而增加了肝细胞对TNF毒性的敏感性所致^[8]. 除了抑制肝细胞凋亡以外, NF- κ B对HSC也有抗凋亡作用, 并且还可以促进其增生^[9]. 实验发现静息状态下和新鲜分离的HSC核内缺乏NF- κ B, 而激活的HSC中出现了NF- κ B的核转位活性, 同时有诸如细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM-1)、IL-6等基因的表达, 表明NF- κ B可能参与了HSC激活的调节^[10]. 激活的HSC如何调节NF- κ B活性到达高水平, 这一作用机制目前仍不清楚, 有研究表明可能与I κ B- α (NF- κ B抑制剂)在胞浆和胞核表达的持久下降有关. 这是因为, 激活的HSC表达一种高度磷酸化形式的I κ B- β , 他和I κ B- α 竞争与

■背景资料

肝纤维化是从慢性肝损伤到肝硬化的一个动态的可逆的病变, 其特点是由于细胞外基质生成和降解不平衡而导致ECM成分在肝内的过量沉积, 而肝星状细胞的增生和激活被认为是肝纤维化发生的中心环节. 肝纤维化的形成是一个多因素、多细胞参与的复杂过程, 涉及多种细胞因子和蛋白成分表达的改变, 而基因转录水平的调控可能在影响其表达中起到了关键作用.

■研发前沿

肝纤维化的发生机制是目前慢性肝病的研究热点之一. 此文重点就几种重要的转录因子对细胞外基质的生成或降解、肝星状细胞的激活以及各种致纤维介质的表达的可能调控作用作一总结.

■ 创新盘点

目前,人们对肝纤维化的研究和认识都取得了重大的进展,但是各种致纤维化因子的详细的细胞内信号传导过程及基因调控机制尚不十分清楚.此文综述了几种重要的转录因子在肝纤维化中的可能调控作用,为今后探索安全、有效及特异性高的肝纤维化防治方案提供了理论依据.

NF- κ B的结合位点,使I κ B- α 的抑制作用减弱,从而使NF- κ B维持在转录激活状态.当处于启动阶段的HSC受到细胞因子、有丝分裂原和CD40配体的刺激后,NF- κ B的活性还可以迅速增高,促使HSC中的NF- κ B反应元件,如ICAM-1、环氧合酶2(COX2)、IL-6及IL-8等基因转录表达增强,其表达产物可以触发或加剧肝脏炎症反应,并通过单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、自由基、转化生长因子- β (TGF- β)等炎症介质进一步激活NF- κ B,促进HSC增生并维持其活化,使ECM生成不断增多,最终形成肝纤维化.除此以外,NF- κ B还可以促使枯否细胞(KC)分泌大量炎症介质,参与肝脏炎症反应^[11-12].

综上所述,NF- κ B在肝纤维化过程中一方面形成“炎性瀑布”,造成肝脏损伤;另一方面促进HSC的增生、活化,并且抑制其凋亡,从而推进了肝纤维化的进程.

1.2 Kruppel样转录因子 Kruppel样转录因子家族的共同结构特征是包含三个Kruppel样锌指结构,他们具有DNA结合特性,GC富集序列和相关的GT或CACCC盒是其识别位点.这个转录因子超家族不但可以特异地调节包括管家基因在内的所有基因的表达,而且还可以调控组织特异性基因的转录^[13].激活的HSC至少表达Kruppel样转录因子家族的三个成员,即KLF6、SP-1和BTEB1,他们都有调节I型胶原基因转录的能力^[14],而刺激I型胶原表达的结果就是造成ECM的沉积,从而引起肝纤维化的发生.KLF6除了可以刺激I型胶原基因转录外,还是TGF- β 1通路的关键成分的调节者,而TGF- β 1是目前已知的最重要的致纤维化因子,因此KLF6在肝纤维化的发生过程中可能起到了重要作用^[4].实验表明,SP-1对I型胶原的转录调节作用可能与激活的HSC的I型胶原基因启动子上的两个GC富集区(FP1和FP2)相关.SP-1的过表达可以增强启动子的活性,从而促进I型胶原基因表达,而FP1和FP2的变异可导致启动子的活性降低^[4].此外,SP-1和SP-3的过表达还可以抑制基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的转录,从而抑制了基质的降解^[15].BTEB1是经由不同于FP1和FP2的GC富集序列来调控乙醛诱导的 α_1 (I)型胶原基因转录的,这个序列位于远离基因转录起始位点上游的一个区域(从-1484到-1476).BTEB1是AP-1的靶基因,乙醛处理的HSC诱导BTEB1表达是通过激活JNK和增加AP-1的活性来实现的

^[14,16],因此,活化HSC的转录因子的表达也受其他转录因子调控.

1.3 AP-1 AP-1(活化蛋白-1)至少由一个Jun蛋白家族(c-Jun、JunB和JunD)组成,与其他Jun蛋白或相关的Fos家族形成同二聚体或异二聚体^[4].AP-1二聚体与一回文DNA序列(TGAC/GTCA)结合可以刺激转录,而该序列主要存在于控制细胞生长、分裂、分化及命运的基因启动子区^[17].静止的HSC缺少AP-1活性,但在激活过程中产生了AP-1持久活性.有研究表明AP-1在调节胶原和胶原酶的基因表达中起重要的作用.JunD蛋白是AP-1二聚体的一个重要元素,他可以与激活的HSC中的其他转录因子共同作用,诱导TIMP-1(基质金属蛋白酶抑制物)和IL-6的基因表达.TIMP-1表达增强可以抑制ECM的降解,促进其沉积;IL-6可以通过促进肝脏炎症反应的方式加速肝纤维化的形成^[2,4].乙醛终产物、细胞因子和纤维连接蛋白等通过激活MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)和JNK,刺激了激活的HSC中AP-1的活性,使c-Jun同二聚体和/或c-Jun:Fos异二聚体的表达增强,而后两者都是MMP3和MMP1/13的转录调节物,可以抑制其表达,进而抑制了基质的降解^[14,20-21].因此,AP-1的表达或活性的改变影响了肝脏中ECM的组成,从而参与了肝纤维化的发生过程.

1.4 PPAR γ PPAR γ (过氧化物酶体增生物激活的受体)是类固醇/甲状腺激素核受体家族的成员之一.他们可在体内和体外调节基因转录和细胞分化,激活的HSC表达PPAR γ 减少,表明HSC激活和含有多个PPAR γ 反应元件的启动子活性下降有关^[22-23].有实验表明,15-脱氧 $\Delta^{12,14}$ -前列腺素J₂(15dPGJ₂)是PPAR γ 的一种激动剂,也是PPAR γ 的天然配体,可以抑制HSC激活的一些表型特征,包括HSC的增生、迁移、 α -平滑肌动蛋白(α -SMA)的表达等^[4],提示PPAR γ 可能具有抑制HSC激活的作用.另有学者发现,PPAR γ 的另一种配体——匹格列酮,可以在肝纤维化早期抑制肝脏炎症反应和HSC的激活、抑制TNF- α 水平的增加以及阻止 α -SMA和 α_1 (I)型胶原的表达^[22],而姜黄可以通过诱导PPAR γ 基因表达而抑制HSC的增生^[23].这些实验结果都提示了PPAR γ 在维持HSC静止状态方面起重要作用,这为今后抗纤维化治疗提供了可能的新靶点.

1.5 C/EBP C/EBP(CCAAT/增强子结合蛋白)家族成员由保守的DNA结合区和亮氨酸锌指组

成, N末端有激活或抑制转录的不同区域. C/EBP家族的某些成员参与了 $\alpha_1(I)$ 型胶原基因表达的调节. 一方面, 实验发现细胞内过氧化物(如 H_2O_2)可以刺激C/EBP亚型P35的表达, 促使其与位于I型胶原基因启动子的-378到-345区结合, 从而促进I型胶原基因表达. 另一方面, 有研究显示, TNF- α 诱导的 $\alpha_1(I)$ 型胶原基因转录水平的下调也涉及C/EBP因子与启动子-378到-345区的作用. TNF- α 刺激C/EBP亚型P20与C/EBP-6的结合, 而二者都是 $\alpha_1(I)$ 型胶原基因转录的抑制物, 进而抑制了I型胶原基因的表达. 因此, C/EBP家族对于 $\alpha_1(I)$ 型胶原基因表达可能具有双重调节作用^[4].

1.6 E-box转录因子和c-myb E-box因子包括一个CANNTG序列和bHLH转录因子家族的结合单位. bHLH蛋白分为两类: 普遍存在的A型和特异表达于某种组织的B型, 他们均对细胞的生长和分化具有调节作用. 肌蛋白转录因子(MyoD)就是一类B型bHLH蛋白, 近来研究发现人和小鼠的激活的HSC中表达MyoD, 表明他可能参与了HSC的某些特性. E-box因子是甘露糖-6-磷酸盐/LGF II (M6P/IGF II R)基因的调节者, 后者可以在细胞表面与致纤维化因子TGF- β 结合继而激活TGF- β . 这也表明, E-box因子在肝纤维化进程中可能起到了重要作用. c-myb是myb蛋白相关家族的原型, 他是多个基因的转录调节者. 有研究表明c-myb不仅可以刺激 α -SMA启动子的活性, 并且对内源性 α -SMA的基因表达也有促进作用^[4], 而 α -SMA的表达正是激活的HSC的形态学特征之一, 提示c-myb可能参与HSC的激活过程.

1.7 Smad 哺乳动物的Smad蛋白分为3类: R-Smads(receptor-regulated Smads), 包括介导BMP信号的Smad 1, 5, 8和介导TGF- β s/activins信号的Smad 2, 3; Co-Smads(common-mediator Smads)为Smad 4; I-Smads(inhibitory Smads), 包括Smad 6, 7. Smad通路(smud pathway)是目前公认的介导TGF- β 致纤维化作用的主要通路之一, 他将TGF- β 超家族胞外信号, 经跨膜受体传递到核内. Smad通路分几个步骤进行: 活化的I型受体磷酸化胞内R-Smads C-末端丝氨酸残基, 磷酸化的R-Smads从受体上解离, 与Co-Smads结合形成异二聚体, 该复合物移入核内, 与致纤维化因子TGF- β 的基因特定DNA序列结合, 启动或调控其基因转录^[24], 从而参与肝纤维化的进程.

1.8 MEF2 MEF2(肌细胞增强子2)是一种主要存在于肌细胞的转录因子, 近来研究发现他也存在于肝脏, 并且其表达及活性增加可能激活HSC, 而激活的逆转与MEF2蛋白水平的下降相平行, 这主要依赖P38MAPK途径而非细胞外信号调节激酶途径. 从功能上讲, MEF2可以大大增加 α -SMA的表达, 提高I型胶原启动子的活性及刺激HSC的增生. 因此, MEF2可能在肝纤维化的发生, 发展中发挥着重要作用^[25].

1.9 其他转录因子 除了上述几种重要的转录因子以外, 还有人发现ZNF267(锌指蛋白267)和NF-Y(核因子-Y)可以抑制MMP-10的基因表达和启动子活性, 进而通过抑制基质降解而致纤维化^[26]. 另外, Ets-1(Ets转录因子家族成员之一)可以抑制包括TIMP-1基因表达在内的多个基因表达, 在HSC激活过程中其水平是下降的^[4]. 这些已有的实验结果表明许多转录因子都可能参与了肝纤维化的基因水平调控.

总之, 肝纤维化中的基因转录调控是复杂的. 然而, 一些转录因子(如JunD、KLF6、PPAR α 等)能单独有助于转录调节HSC的激活、基质蛋白的合成及降解等, 最终可能绘制出启动肝纤维化的主要转录途径. 因此, 开展作用于转录因子、细胞因子等小分子物质治疗和针对有关基因的基因治疗将可能成为今后抗纤维化治疗的主要方向.

■应用要点

本文通过阐释转录因子对肝纤维化中各成分的可能调控作用, 为开展作用于细胞因子受体、信号分子、转录因子等小分子物质治疗和针对有关基因的基因治疗研究提供理论依据以及可能靶点.

2 参考文献

- 1 Kato J, Sato Y, Inui N, Nakano Y, Takimoto R, Takada K, Kobune M, Kuroiwa G, Miyake S, Kohgo Y, Niitsu Y. Ethanol induces transforming growth factor- α expression in hepatocytes, leading to stimulation of collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27: 585-635
- 2 Li J, Hu W, Baldassare JJ, Bora PS, Chen S, Poulos JE, O'Neill R, Britton RS, Bacon BR. The ethanol metabolite, linolenic acid ethyl ester, stimulates mitogen-activated protein kinase and cyclin signaling in hepatic stellate cells. *Life Sci* 2003; 73: 1083-1096
- 3 Proell V, Mikula M, Fuchs E, Mikulits W. The plasticity of p19 ARF null hepatic stellate cells and the dynamics of activation. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1744: 76-87
- 4 Mann DA, Smart DE. Transcriptional regulation of hepatic stellate cell activation. *Gut* 2002; 50: 891-896
- 5 Baldwin AS Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 649-683
- 6 Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:

■同行评价

本文作者就一些调节HSC介导肝纤维化发生学的转录因子作了介绍。内容新颖,具有实际意义。

- 225-260
- 7 Liu H, Lo CR, Czaja MJ. NF-kappaB inhibition sensitizes hepatocytes to TNF-induced apoptosis through a sustained activation of JNK and c-Jun. *Hepatology* 2002; 35: 772-778
 - 8 Xu Y, Bialik S, Jones BE, Iimuro Y, Kitsis RN, Srinivasan A, Brenner DA, Czaja MJ. NF-kappaB inactivation converts a hepatocyte cell line TNF-alpha response from proliferation to apoptosis. *Am J Physiol* 1998; 275: C1058-C1066
 - 9 Schwabe RF, Schnabl B, Kweon YO, Brenner DA. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells. *J Immunol* 2001; 166: 6812-6819
 - 10 Hellerbrand C, Jobin C, Iimuro Y, Licato L, Sartor RB, Brenner DA. Inhibition of NFkappaB in activated rat hepatic stellate cells by proteasome inhibitors and an IkappaB super-repressor. *Hepatology* 1998; 27: 1285-1295
 - 11 Purohit V, Russo D, Salin M. Role of iron in alcoholic liver disease: introduction and summary of the symposium. *Alcohol* 2003; 30: 93-97
 - 12 Okada K, Marubayashi S, Fukuma K, Yamada K, Dohi K. Effect of the 21-aminosteroid on nuclear factor-kappa B activation of Kupffer cells in endotoxin shock. *Surgery* 2000; 127: 79-86
 - 13 Turner J, Crossley M. Mammalian Kruppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 236-240
 - 14 Chen A, Davis BH. The DNA binding protein BTEB mediates acetaldehyde-induced, jun N-terminal kinase-dependent alpha1(I)collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2818-2826
 - 15 Takahra T, Smart DE, Oakley F, Mann DA. Induction of myofibroblast MMP-9 transcription in three-dimensional collagen I gel cultures: regulation by NF-kappaB, AP-1 and Sp1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 353-363
 - 16 Chen A, Davis BH. UV irradiation activates JNK and increases alpha1(I)collagen gene expression in rat hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 158-164
 - 17 Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001; 20: 2390-2400
 - 18 Newberry EP, Willis D, Latifi T, Boudreaux JM, Towler DA. Fibroblast growth factor receptor signaling activates the human interstitial collagenase promoter via the bipartite Ets-AP1 element. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 1129-1144
 - 19 Solis-Herruzo JA, Rippe RA, Schrum LW, de La Torre P, Garcia I, Jeffrey JJ, Munoz-Yague T, Brenner DA. Interleukin-6 increases rat metalloproteinase-13 gene expression through stimulation of activator protein 1 transcription factor in cultured fibroblasts. *J Biol Chem* 1999; 274: 30919-30926
 - 20 Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 2000; 49: 497-505
 - 21 Miyahara T, Schrum L, Rippe R, Xiong S, Yee HF Jr, Motomura K, Anania FA, Willson TM, Tsukamoto H. Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *J Biol Chem* 2000; 275: 35715-35722
 - 22 Kon K, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Pioglitazone prevents early-phase hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 55-61
 - 23 Xu J, Fu Y, Chen A. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to the inhibitory effects of curcumin on rat hepatic stellate cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G20-G30
 - 24 Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J* 2000; 19: 1745-1754
 - 25 Wang X, Tang X, Gong X, Albanis E, Friedman SL, Mao Z. Regulation of hepatic stellate cell activation and growth by transcription factor myocyte enhancer factor 2. *Gastroenterology* 2004; 127: 1174-1188
 - 26 Hu K, Fink M, Froh M, Gabele E, Hellerbrand C, Muhlbauer M, Wiest R, Scholmerich J, Schnabl B. Characterization of the human zinc finger protein 267 promoter: essential role of nuclear factor Y. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1729: 14-23

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

肠道大豆异黄酮降解菌研究进展

张逊, 姚文, 朱伟云

张逊, 姚文, 朱伟云, 南京农业大学动物科技学院消化道微生物研究室 江苏省南京市 210095
国家重点基础研究发展973项目资助课题, No. 2004CB117500-4
通讯作者: 姚文, 210095, 江苏省南京市, 南京农业大学动物科技学院消化道微生物研究室. yaowen67jp@yahoo.com
电话: 025-84395523
收稿日期: 2005-12-01 接受日期: 2005-12-31

摘要

大豆及其加工制品不仅是人类植物性蛋白食品的主要来源, 更是畜禽饲料蛋白质的首要来源. 目前, 一方面我国是饲料蛋白资源严重短缺的国家, 年大豆需求量的60%以上依赖于进口; 另一方面大豆中的一些抗营养因子和活性物质的存在方式(如以糖甙形式存在的大豆异黄酮)却不利于动物的消化吸收, 难以发挥其调节宿主生理功能的作用. 因此, 对这些抗营养因子进行转化从而提高大豆及其加工制品的营养价值已经成为共识, 尤其是分离筛选针对不同抗营养因子的特异降解细菌日渐受到研究者的关注. 本文综述了大豆异黄酮的种类、化学结构及其在动物生理中的特殊作用, 尤其是肠道细菌在大豆异黄酮代谢中的关键作用以及目前降解大豆异黄酮细菌菌株的分离筛选情况.

关键词: 大豆异黄酮; 肠道细菌; 降解

张逊, 姚文, 朱伟云. 肠道大豆异黄酮降解菌研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(10):973-978
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/973.asp>

0 引言

哺乳动物的食物中有很多天然成分不能被动物自身消化酶降解, 但却能被其消化道中的微生物利用. 这些成分不仅可以刺激其降解菌的生长, 使其降解菌成为肠道中的优势菌群, 而且其代谢产物还具有多种生物活性, 对哺乳动物的健康和生长有良好的促进作用. 大豆异黄酮就是这类天然活性物质中的一种. 目前, 在人类健康食谱中, 豆制品是不可或缺的组成部分; 而在动物生产上, 大豆及其加工制品是蛋白质饲料的主要来源. 因此研究哺乳动物肠道细菌对大

豆异黄酮的降解机制, 筛选高效的大豆异黄酮降解菌, 可以充分发挥大豆中天然大豆异黄酮的保健和促生长功能, 从而提升大豆及大豆制品的经济附加值.

1 大豆异黄酮

1.1 大豆异黄酮的种类和化学结构 大豆异黄酮是大豆及其加工制品中存在的一类异黄酮类植物雌激素(soybean isoflavones)(图1, 表1), 其中含量占优势的是大豆黄酮和染料木素两种. 这些异黄酮类化合物在天然大豆中的主要存在方式为结合了糖基的糖苷大豆异黄酮, 即糖苷大豆黄酮(daidzin)和糖苷染料木素(genistin).

1.2 已经发现的生理作用 在植物中, 糖苷大豆异黄酮是植物吸引固氮菌的信号传递分子^[1]. 在哺乳动物体内, 糖苷形式的大豆异黄酮没有生理活性, 而去除糖基配体后形成的大豆黄酮苷元(daidzein)和染料木素苷元(genistein)及其代谢产物均是弱雌激素样活性物质(图2), 当体内雌激素水平较低时他们可以直接与细胞膜上的雌激素受体结合表现出弱雌激素活性, 而当体内雌激素水平较高时则可以与内源雌激素竞争受体表现出抗雌激素活性^[2].

大豆异黄酮具有多种生物学功能, 从1980年起, 大量医学研究表明, 大豆异黄酮除与雌激素受体结合, 从而有效地预防骨质疏松、乳腺癌、子宫内膜癌外, 还能与雄激素受体结合减少前列腺癌的发生, 并具有抗氧化活性、抗溶血活性和抗真菌活性等^[3-5]. 在动物生产上, 国内外大量研究表明大豆异黄酮可以促进雄性动物生长, 增强机体免疫, 改善动物产品品质, 提高生产性能^[6-12].

2 大豆异黄酮在哺乳动物体内的代谢

摄入哺乳动物体内的糖苷形式的大豆异黄酮, 不能直接经小肠壁吸收. 有少量的糖苷形式的大豆异黄酮可在小肠中被水解去除糖基, 游离苷元可被小肠吸收. 未吸收的大豆异黄酮可被肠道细菌降解, 高压液相色谱分析

■背景资料

大豆及其加工制品不仅是人类植物性蛋白食品的主要来源, 更是畜禽饲料蛋白质的首要来源. 目前, 一方面我国是饲料蛋白资源严重短缺的国家, 年大豆需求量的60%以上依赖于进口; 另一方面大豆中的一些抗营养因子和活性物质的存在方式(如以糖甙形式存在的大豆异黄酮)却不利于动物的消化吸收, 难以发挥其调节宿主生理功能的作用. 因此, 采用一定的技术手段对这些抗营养因子进行转化从而提高大豆及其加工制品的营养价值已经成为共识. 近来筛选针对不同抗营养因子的特异降解细菌备受研究者的关注.

■ 研发前沿

研究动物肠道大豆异黄酮降解菌对提高大豆发酵产品品质及其经济附加值,对改善宿主动物健康、提高其生产性能等均有着显著的意义。目前已分离到的大豆异黄酮降解菌大多来源于人肠道,研究也大多停留在体外阶段。在体条件下大豆异黄酮降解菌如何作用,相应细菌在其他动物肠道的分布及作用等方面的研究几乎还是空白。

表 1 大豆异黄酮的种类和结构

异黄酮种类	名称	R ₁	R ₂	R ₃
游离型苷元	daidzein	H	H	-
	glycilein	OCH ₃	H	-
	genistein	H	OH	-
结合型糖苷	daidzin	H	H	H
	glycilin	H	OCH ₃	H
	genistin	OH	H	H
	6''-o-acetyldaizidin	H	H	COCH ₃
	6''-o-acetylglycilin	H	OCH ₃	COCH ₃
	6''-o-acetylgenistin	OH	H	COCH ₃
	6''-o-malonyldaizidin	H	H	COCH ₂ COOH
	6''-o-malonylglycilin	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH
	6''-o-malonylgenistin	OH	H	COCH ₂ COOH
	6''-o-succinyldaizidin	H	H	COCH ₂ CH ₂ COOH
	6''-o-succinylglycilin	H	OCH ₃	COCH ₂ CH ₂ COOH
	6''-o-succinylgenistin	OH	H	COCH ₂ CH ₂ COOH

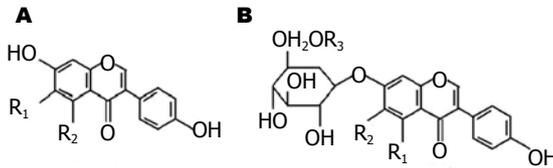


图 1 大豆异黄酮苷元和大豆异黄酮糖苷结构式。A: 大豆异黄酮苷元; B: 大豆异黄酮糖苷。

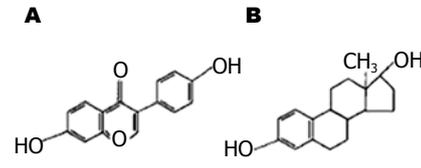


图 2 大豆异黄酮和17-β雌二醇的结构比较。A: 大豆异黄酮; B: 17-β雌二醇。

结果表明,极少数的大豆异黄酮苷元可以直接被胃肠黏膜吸收,约5%-20%大豆异黄酮苷元受微生物作用开环形成O-脱甲基安哥拉紫檀素(O-demethylangolensin, O-DMA);约70%的大豆异黄酮苷元被微生物还原为双氢大豆异黄酮苷元(dihydrodaidzein, DHD),最后形成稳定的雌马酚(equol)被胃肠黏膜吸收^[13-20]。雌马酚只能由肠道细菌特异性产生^[21-22],与大豆异黄酮苷元相比,雌马酚与雌激素受体结合的亲和力、抗氧化活性、抗前列腺癌作用更强^[23-30],而在血浆中的清除速度更慢^[31]。因此大豆异黄酮的生物活性更多的是由其代谢终产物雌马酚来实现的。

3 肠道细菌在大豆异黄酮体内代谢中的作用

对无菌动物和抗生素处理动物的研究表明,结肠细菌在大豆异黄酮的体内代谢过程中起着关键性的作用^[19-22]。动物肠道内的真杆菌属(*Eubacterium*)^[32],丁酸梭菌属(*Butyrivibrio*)^[33],乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)^[34]和梭菌属(*Clostridium*)^[35]的一些细菌在大豆异黄酮苷元(Daidzein)的降解过程中起着重要作用,其中对一些人类菌株已经进行了分离鉴定。

大豆异黄酮降解菌中研究较为系统的是真杆菌属。九十年代以来,德国Blaut领导的小组系统研究报道了一株来自人的真杆菌*Eubacterium ramulus*可在体外彻底降解染料木素和部分降解大豆异黄酮^[36-41],并且根据该菌的16S rRNA全序列设计了用于检测该菌的寡核苷酸探针,并应用此探针研究了*Eubacterium ramulus*在人肠道中的分布情况,以及食物中的大豆异黄酮对人肠道中*Eubacterium ramulus*的刺激作用。结果表明,人肠道来源的*Eubacterium ramulus*能够降解大豆异黄酮,大豆异黄酮也能刺激人肠道固有*Eubacterium ramulus*的生长,但是外源*Eubacterium ramulus*在人肠道内能否存活、存活规律及其作用机制等的研究仍十分匮乏。

最新研究表明不同人体内大豆异黄酮降解菌的组成有很大差异,仅有1/3至1/2的被调查个体能将大豆异黄酮降解为雌马酚^[19,42-48]。目前人用的大豆异黄酮制品都为豆科植物来源的纯提取物,不仅得率低、价格昂贵,而且可能正是由于不同人群体内大豆异黄酮降解菌组成的差异导致了临床应用效果的差异,限制了大豆异黄酮制品的应用。因此对肠道大豆异黄酮降解菌

的研究不仅可阐明大豆异黄酮在体内降解和发挥生理作用的形式及过程, 而且可为拓展大豆异黄酮可应用人群乃至应用方式提供新的思路和方法。

大豆及其加工产品不仅是人类植物性蛋白食品的主要来源, 更是家畜的首要蛋白质饲料来源。我国目前人畜所需的大豆已不能自给, 据中国海关公布的数据, 2003年中国进口大豆达到2074万吨, 年大豆需求量的60%以上依赖于进口。一方面畜牧业对大豆的依赖愈来愈强, 另一方面大豆中的一些抗营养因子和活性物质的存在方式(如大豆异黄酮以糖甙形式存在)却不利于动物的消化吸收, 不利于发挥其调节宿主动物功能的作用。因此预处理大豆(如发酵等)以提高大豆的利用效率已成共识, 但目前大豆发酵所用菌株多为青贮用乳酸菌, 对改善适口性有帮助, 但就提高大豆发酵产品品质和动物利用效率方面意义不大。因此研究动物肠道大豆异黄酮降解菌对提高大豆发酵产品品质及其经济附加值, 对改善宿主动物健康、提高其生产性能等均有着显著的意义, 而目前这方面的研究相对于人肠道大豆异黄酮降解菌而言几乎是空白。我们近年来在这方面做了一些探索性的研究, Yao *et al*^[49]体外初步研究了大豆异黄酮对哺乳仔猪肠道乳酸杆菌菌群结构及其乳酸产生能力的影响。结果表明大豆异黄酮没有改变体外培养条件下哺乳仔猪乳酸杆菌菌群结构, 但显著增加了培养体系中乳酸杆菌的数量, 并显著提高了培养体系中乳酸的浓度。这说明在哺乳仔猪肠道内存在着能被大豆异黄酮刺激生长的乳酸杆菌菌株, 其机制有待进一步研究。

4 肠道大豆异黄酮降解菌菌株的筛选情况

在肠道大豆异黄酮降解菌菌株的筛选方面, 韩国光州科学研究院的的Hor-Gil Hur和比利时根特大学的Karel Decroos领导的团队各自做了较系统的研究。Hur *et al*^[50]通过对人粪样中细菌进行分离培养, 发现大肠杆菌HGH21和革兰氏阳性菌株HGH6可将糖苷大豆异黄酮和糖苷染料木素降解为糖基配体, 大豆异黄酮苷元和染料木素苷元。在厌氧条件下, HGH6可以进一步将大豆异黄酮苷元和染料木素苷元转化为双氢大豆异黄酮苷元和双氢染料木素苷元。HGH6可以将异黄酮C-2和C-3之间的双键转化为单键, 但却无法转化黄酮类物质apigenin和chrysin中相似的

键。HGH6也不能进一步的转化双氢大豆异黄酮苷元和双氢染料木素苷元。Hur *et al*^[51]的进一步研究发现一株命名为HGH136的革兰氏阳性厌氧细菌, 可以将大豆异黄酮苷元的C-环切除以产生O-DMA, 经分离鉴定属于梭菌属。Wang *et al*^[52]从人粪样中分离出一株棒状革兰氏阳性厌氧细菌(命名为Julong732), 具有在厌氧条件下将双氢大豆异黄酮苷元转化为S-雌马酚的能力。但其不能从大豆异黄酮苷元、四氢大豆异黄酮苷元或脱氢雌马酚直接转化成雌马酚。推测该菌应该是在双氢大豆异黄酮苷元的厌氧代谢中起作用, 但在含双氢大豆异黄酮苷元的细菌培养物中却检测不到。在含有外消旋混合双氢大豆异黄酮苷元的细菌培养基中使用手性固定相高效液相色谱只能洗提出一种代谢产物, S-雌马酚。另外Julong732不具有能将R-雌马酚转化为S-雌马酚(或反向转化)的消旋酶。通过测序比对发现, Julong732的全16S rRNA基因序列(1429 bp)与Eggerthella hongkongensis HKU10具有92.8%的相似性。Decroos *et al*^[34]以四位志愿者的粪样为接种物, 体外研究人粪源微生物降解大豆异黄酮苷元的情况。结果表明仅两位志愿者的粪源微生物具有降解大豆异黄酮苷元的能力, 终产物分别为双氢大豆异黄酮苷元和O-DMA, 双氢大豆异黄酮苷元和雌马酚。分子指纹分析技术(DGGE)研究表明其中只有三株细菌可以被纯培养, 分别是黏膜乳杆菌EPI2, 粪链球菌EPI1, Finegoldia magna EPI3, 但这些细菌在纯培养中不能产生雌马酚。结果同时表明氢气以及丁酸、丙酸等结肠中碳水化合物微生物发酵终产物可以提高混合培养中雌马酚的产量; 而添加果寡糖后, 雌马酚的产生被抑制; 当把该混合培养物接种到原来不能产生雌马酚个体的粪样中时, 可以在培养物中检测到雌马酚。

5 讨论

通过以上的研究表明, 在体内糖苷大豆异黄酮首先被 β -葡萄糖苷酶作用去除糖基生成大豆异黄酮苷元(第一步), 大豆异黄酮苷元进一步的代谢途径如图3所示, 先加氢形成双氢大豆异黄酮苷元(第二步), 然后通过C-环开环形成O-DMA(第三步A)或是通过去酮形成雌马酚(第三步B)。

在已经进行的菌株分离尝试中, 分离出了特异单菌株可以完成第一步(HGH21, HGH6), 第二步(HGH6), 第三步A(HGH136), 第三步

■ 相关报道

2000年, Hur *et al*通过对人粪样中细菌进行分离培养, 发现大肠杆菌HGH21和革兰氏阳性菌株HGH6可将糖苷大豆异黄酮和糖苷染料木素降解为糖基配体, 大豆异黄酮苷元和染料木素苷元。在厌氧条件下, HGH6可以进一步将大豆异黄酮苷元和染料木素苷元转化为双氢大豆异黄酮苷元和双氢染料木素苷元。2005年, Wang *et al*从人粪样中分离出一株棒状革兰氏阳性厌氧细菌(命名为Julong732), 具有在厌氧条件下将双氢大豆异黄酮苷元转化为S-雌马酚的能力。2005年, Decroos *et al*以人粪样为接种物, 分离出的粪源微生物具有降解大豆异黄酮苷元的能力, 终产物分别为双氢大豆异黄酮苷元和O-DMA, 双氢大豆异黄酮苷元和雌马酚。

■ 创新盘点

本文综述了目前世界范围内分离筛选肠道大豆异黄酮降解菌的进展情况。已分离到的大豆异黄酮降解菌大多来源于人肠道, 研究也大多停留在体外阶段。在体条件下大豆异黄酮降解菌如何作用以及大豆异黄酮降解菌在其他动物肠道的分布和作用等方面的研究几乎还是空白。

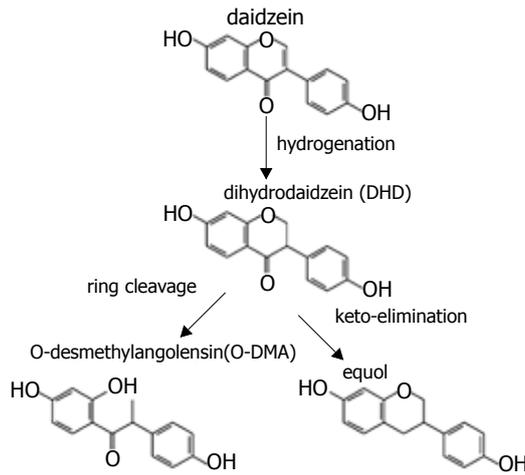


图 3 大豆黄酮苷元的代谢途径。

B(Julong732). 而Decroos *et al*[34]报道中的混合菌株可以分别完成第二步+第三步A或第二步+第三步B的过程。

总之, 大豆异黄酮降解菌对大豆异黄酮在宿主体内的降解和利用起着关键的作用, 那么在体内进行大豆异黄酮降解过程是否必须是混合菌株? 从进化的角度考虑应是如此, 各种细菌在动物肠道中形成流动但相对稳定的微生态体系, 能够最大程度地利用彼此的代谢产物完成自己的生理过程, 形成共栖关系。但不能排除有单一菌株能够完成从糖苷大豆黄酮生成雌马酚的整个过程这种可能, 这需要进一步通过菌株筛选实验来验证。同时目前已分离到的大豆异黄酮降解菌大多来源于人肠道, 研究也大多停留在体外阶段。在体条件下大豆异黄酮降解菌如何协同作用, 以及在其他动物肠道的分布及作用等方面的研究几乎还是空白, 有待于进一步的研究。

6 参考文献

- 1 Debelles F, Moulin L, Mangin B, Denarie J, Boivin C. Nod genes and Nod signals and the evolution of the Rhizobium legume symbiosis. *Acta Biochim Pol* 2001; 48: 359-365
- 2 Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. Clinical review 92: Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 297-303
- 3 Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 2000; 55: 481-504
- 4 Beck V, Rohr U, Jungbauer A. Phytoestrogens derived from red clover: an alternative to estrogen replacement therapy? *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 94: 499-518
- 5 Magee PJ, Rowland IR. Phyto-oestrogens, their mechanism of action: current evidence for a role in breast and prostate cancer. *Br J Nutr* 2004; 91:

- 6 513-531
- 6 程忠刚, 林映才, 余德谦, 蒋守群. 大豆黄酮对肥育猪生产性能的影响及其作用机制探讨. *动物营养学报* 2005; 17: 30-34
- 7 孟婷, 韩正康, 王国杰. 大豆黄酮对初产蛋鸡生产性能和血清生理生化指标的影响. *中国家禽* 2002; 24: 13-14
- 8 Payne RL, Bidner TD, Southern LL, Geaghan JP. Effects of dietary soy isoflavones on growth, carcass traits, and meat quality in growing-finishing pigs. *J Anim Sci* 2001; 79: 1230-1239
- 9 Zarkadas LN, Wiseman J. Influence of processing of full fat soya beans included in diets for piglets. I. Performance. *Animal Feed Science and Technology* 2005; 118: 109-119
- 10 Zarkadas LN, Wiseman J. Influence of processing of full fat soya beans included in diets for piglets. II. Digestibility and intestinal morphology. *Animal Feed Science and Technology* 2005; 118: 121-137
- 11 Greiner LL, Stahly TS, Stabel TJ. The effect of dietary soy genistein on pig growth and viral replication during a viral challenge. *J Anim Sci* 2001; 79: 1272-1279
- 12 Greiner LL, Stahly TS, Stabel TJ. The effect of dietary soy daidzein on pig growth and viral replication during a viral challenge. *J Anim Sci* 2001; 79: 3113-3119
- 13 Cassidy A, Brown JE, Hawdon A, Faughnan MS, King LJ, Millward J, Zimmer-Nechemias L, Wolfe B, Setchell KD. Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *J Nutr* 2006; 136: 45-51
- 14 Day AJ, Canada FJ, Diaz JC, Kroon PA, Mclauchlan R, Faulds CB, Plumb GW, Morgan MR, Williamson G. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* 2000; 468: 166-170
- 15 Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, Waring M, Nelson C. A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 54: 167-184
- 16 Heinonen S, Wahala K, Adlercreutz H. Identification of isoflavone metabolites dihydro-daidzein, dihydrogenistein, 6'-OH-O-dma, and cis-4-OH-equol in human urine by gas chromatography-mass spectrometry using authentic reference compounds. *Anal Biochem* 1999; 274: 211-219
- 17 Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 447-453
- 18 Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* 1998; 436: 71-75
- 19 Rafii F, Davis C, Park M, Heinze TM, Beger RD. Variations in metabolism of the soy isoflavonoid daidzein by human intestinal microfloras from different individuals. *Arch Microbiol* 2003; 180: 11-16
- 20 Rafii F, Hotchkiss C, Heinze TM, Park M. Meta-

- bolism of daidzein by intestinal bacteria from rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Comp Med* 2004; 54: 165-169
- 21 Bowey E, Adlercreutz H, Rowland I. Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats. *Food Chem Toxicol* 2003; 41: 631-636
- 22 Rowland I, Wiseman H, Sanders T, Adlercreutz H, Bowey E. Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: role of the gut microflora. *Biochem Soc Trans* 1999; 27: 304-308
- 23 Kostelac D, Rechkemmer G, Briviba K. Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors alpha and beta to the estrogen response element. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 7632-7635
- 24 Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG, Katzenellenbogen JA. Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg Med Chem* 2004; 12: 1559-1567
- 25 Mitchell JH, Gardner PT, McPhail DB, Morrice PC, Collins AR, Duthie GG. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems. *Arch Biochem Biophys* 1998; 360: 142-148
- 26 Brown NM, Setchell KD. Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Lab Invest* 2001; 81: 735-747
- 27 Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull* 2001; 24: 351-356
- 28 Morito K, Aomori T, Hirose T, Kinjo J, Hasegawa J, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y. Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (II). *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 48-52
- 29 Hodgson, J. M. , Croft, K. D. , Puddey, I. B. , Mori, T. A. & Beilin, L. J. Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit in vitro lipoprotein oxidation in serum. *J. Nutr. Biochem* 1996; 7: 664-669
- 30 Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch Biochem Biophys* 1998; 356: 133-141
- 31 Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 2002; 132: 3577-3584
- 32 Schneider H, Schwiertz A, Collins MD, Blaut M. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Arch Microbiol* 1999; 171: 81-91
- 33 Krishnamurthy HG, Cheng KJ, Jones GA, Simpson FJ, Watkin JE. Identification of products produced by the anaerobic degradation of rutin and related flavonoids by *Butyrivibrio* sp. C3. *Can J Microbiol* 1970; 16: 759-767
- 34 Decroos K, Vanhemmens S, Cattoir S, Boon N, Verstraete W. Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions. *Arch Microbiol* 2005; 183: 45-55
- 35 Schoefer L, Mohan R, Schwiertz A, Braune A, Blaut M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 5849-5854
- 36 Schneider H, Blaut M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Eubacterium ramulus*. *Arch Microbiol* 2000; 173: 71-75
- 37 Schneider H, Simmering R, Hartmann L, Pforte H, Blaut M. Degradation of quercetin-3-glucoside in gnotobiotic rats associated with human intestinal bacteria. *J Appl Microbiol* 2000; 89: 1027-1037
- 38 Schoefer L, Braune A, Blaut M. A fluorescence quenching test for the detection of flavonoid transformation. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 204: 277-280
- 39 Schoefer L, Mohan R, Braune A, Birringer M, Blaut M. Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 208: 197-202
- 40 Simmering R, Kleessen B, Blaut M. Quantification of the flavonoid-degrading bacterium *Eubacterium ramulus* in human fecal samples with a species-specific oligonucleotide hybridization probe. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 3705-3709
- 41 Simmering R, Pforte H, Jacobasch G, Blaut M. The growth of the flavonoid-degrading intestinal bacterium, *Eubacterium ramulus*, is stimulated by dietary flavonoids *in vivo*. *FEMS Microbiology Ecology* 2002; 40: 243-248
- 42 Kelly GE, Joannou GE, Reeder AY, Nelson C, Waring MA. The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995; 208: 40-43
- 43 Karr SC, Lampe JW, Hutchins AM, Slavin JL. Urinary isoflavonoid excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy-protein consumption. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 46-51
- 44 Lampe JW, Karr SC, Hutchins AM, Slavin JL. Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217: 335-339
- 45 Rowland IR, Wiseman H, Sanders TA, Adlercreutz H, Bowey EA. Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora. *Nutr Cancer* 2000; 36: 27-32
- 46 Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* 2001; 131: 1362S-1375S
- 47 Akaza H, Miyanaga N, Takashima N, Naito S, Hirao Y, Tsukamoto T, Fujioka T, Mori M, Kim WJ, Song JM, Pantuck AJ. Comparisons of percent equol producers between prostate cancer patients and controls: case-controlled studies of isoflavones in Japanese, Korean and American residents. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34: 86-89
- 48 Meyer BJ, Larkin TA, Owen AJ, Astheimer LB, Tapsell LC, Howe PR. Limited lipid-lowering effects of regular consumption of whole soybean

■名词解释

大豆异黄酮(soy-bean isoflavones): 大豆及其加工制品中存在的一类异黄酮类植物雌激素, 其中含量占优势的是大豆黄酮和染料木素两种。这些异黄酮类化合物在天然大豆中的主要存在方式为结合了糖基的糖苷大豆异黄酮, 即糖苷大豆黄酮(daidzin)和糖苷染料木素(genistin)

- foods. *Ann Nutr Metab* 2004; 48: 67-78
- 49 Yao W, Zhu WY, Han ZK, Willims BA, Akkermans ADL, Tamminga S. Daidzein increased the density but not the composition of the Lactobacillus community in piglet digesta during in vitro fermentation as revealed by DGGE and dilution PCR. *Reprod. Nutr Dev.* 2004; 44(Suppl. 1) S17
- 50 Hur HG, Lay JO Jr, Beger RD, Freeman JP, Rafii F. Isolation of human intestinal bacteria metabolizing the natural isoflavone glycosides daidzin and genistin. *Arch Microbiol* 2000; 174: 422-428
- 51 Hur HG, Beger RD, Heinze TM, Lay JO Jr, Freeman JP, Dore J, Rafii F. Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein. *Arch Microbiol* 2002; 178: 8-12
- 52 Wang XL, Hur HG, Lee JH, Kim KT, Kim SI. Enantioselective synthesis of S-equol from dihydro-daidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 214-219

电编 韩江燕 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·

第十一届全国普通外科学术会议征文通知

本刊讯 中华普通外科杂志编辑部将于2006-07下旬在内蒙古呼和浩特市召开“第十一届全国普通外科学术会议”。本次会议将围绕普通外科手术并发症与外科再手术的主题就普通外科临床与基础研究、外科并发症、以及外科再手术等问题进行研讨。会议邀请国内外著名外科专家,对热点问题做专题演讲,参会代表进行学术交流、经验介绍和开展讨论。

1 征文内容

征文内容包括: (1)腹部外科手术并发症和外科再手术经验; (2)普通外科的新进展、新诊断、新技术、新方法、新手术、新经验; (3)临床研究、基础研究、实验研究; 手术适应证、禁忌证问题; (4)腹腔镜手术; (5)肿瘤的放化疗; (6)手术并发症和再手术的营养支持; (7)手术并发症和再手术的护理等。

2 征文要求

征文要求包括: (1)请将未公开发表的论文全文以及800字以内的中文摘要各1份,并附拷贝软盘,寄到100034,北京西城区阜内大街133号 齐老师 收; 联系电话: 010-66168321转3126, 010-66164704。 (2)来稿请注明单位、作者姓名、邮编及联系电话(请自留底稿,恕不退稿),请在信封左下角注明“普外会议征文”字样。参会代表将获得国家级继续医学教育一类学分。 (3)截稿日期: 2006-06-30。

鸟氨酸脱羧酶的生理病理特点及其药物研究概况

迟莉, 李茹柳, 陈蔚文

迟莉, 李茹柳, 陈蔚文, 广州中医药大学脾胃研究所 广东省广州市 510405

国家中医药管理局资助课题, No. 2000-j-p-25

上海市教育委员会E-研究院建设计划项目

通讯作者: 陈蔚文, 510405, 广东省广州市机场路12号, 广州中医药大学脾胃研究所. piwei@gzhtcm.edu.cn

电话: 020-36585444 传真: 020-36586563

收稿日期: 2006-01-03 接受日期: 2006-01-25

摘要

鸟氨酸脱羧酶(ornithine decarboxylase, ODC)是多胺代谢中的关键酶, 广泛存在于人体和动物各组织细胞内, 其中对肠细胞的增生、移行和分化起重要作用. 机体调节因素比较复杂. 在黏膜损伤性疾病及某些癌前病变等细胞大量增生的病理情况下ODC的表达发生改变, 可以作为这些疾病分期、预后及药物作用靶点或疗效的指标. 寻找对ODC有作用的药物对于治疗其相关疾病是非常有意义的.

关键词: 鸟氨酸脱羧酶; 多胺; 研究进展

迟莉, 李茹柳, 陈蔚文. 鸟氨酸脱羧酶的生理病理特点及其药物研究概况. 世界华人消化杂志 2006;14(10):979-984

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/979.asp>

0 引言

鸟氨酸脱羧酶(ODC)是多胺合成过程中的第一个调节酶, 多胺是细胞增生、分化和移行的基础性物质, 起关键作用, 因此ODC对细胞的生长具有重要调节作用. 从这个角度讲ODC对生物体的生长和组织损伤后的修复具有非常意义. ODC的体内外调节因素较复杂, 对此进行全面论述的报道较少, 本文将着重从机体和药物对ODC在生理病理条件下的影响等进行多方面综述.

1 鸟氨酸脱羧酶的生物特性

细胞内的L-精氨酸在精氨酸酶的作用下催化生成L-鸟氨酸, 后者在ODC的作用下脱羧基生成腐胺. 腐胺是精胺和精胺的前体, 腐胺、精胺和精胺又合称为多胺. ODC和S-腺苷基蛋氨酸脱羧酶和N¹-乙酰基转移酶一起控制着多胺的代谢^[1].

ODC广泛存在于动物各组织细胞内, 细胞

质和细胞核中都能发现他的存在, 其存在部位与细胞的种类和状态有关. ODC蛋白含量约占细胞可溶性蛋白总量的0.016%^[1].

ODC极不稳定, 可被多种无机离子灭活, 半衰期短, 仅10-20 min, 易受外界因素的影响, 在生长旺盛的组织中活性较高, 并对生长刺激因素有非常迅速的反应性, 其超常转化率和迅速反应性对快速应答外界刺激具有非常重要的意义^[2]. 有研究发现, 将小鼠ODC的C端氨基酸与其快速转换有关的PEST序列(即含脯氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸的氨基酸序列)截去后, 其对刺激因素的反应性显著下降, 从而认为ODC快速转换率对其迅速反应性起关键作用^[3].

ODC蛋白是由两个分子量各为 M_r 50 000左右的亚基组成的二聚体^[4]. ODC基因包括ODC1和ODC2, 各自定位于不同的染色体. ODC1位于2p25处, ODC2位于7q31处. ODC1普遍存在于生物体内, 是主要的功能基因; 而ODC2仅存在于人体, 是伪基因, 无明确功能. ODC1基因全长 M_r 7 100, 由12个长短各异的外显子和11个内含子共同组成^[5]. ODC的适宜pH范围较宽, 最适pH在7.0-7.8之间, 他们作用于L-鸟氨酸的 K_m 值各不相同, 但抗原性却完全相同^[6].

ODC的降解主要靠体内产生的抗酶(AZ, antizyme)完成. 抗酶由Heller *et al*^[7]在1976年于大鼠肝脏的几个培养细胞株中首次发现. 抗酶并不抑制ODC的合成, 而是与ODC结合生成ODC抗酶复合物, 通过26S蛋白酶体促使ODC的凋亡^[8]. 抗酶家族目前所知包括抗酶1、抗酶2、抗酶3和抗酶4四种同系物, 均可受抗酶抑制剂的调节, 他可使ODC抗酶复合物释放ODC而重新释放活性^[9-10]. 多胺可通过促使AZ核糖体框架移位促进AZ mRNA翻译而诱导AZ合成^[11], 从而降低ODC活性.

2 鸟氨酸脱羧酶的调控因素

2.1 促进因素 ODC在机体内的调节机制很复杂, 受多种因素的影响, 目前较多报道对ODC有促进作用的因素有以下几种.

■背景资料

多胺(精胺、精胺及其前体腐胺)是细胞增生所必需的, 多胺生物合成在控制细胞生长中起着重要作用. 细胞内多胺的浓度与细胞的生长状态有关, 尤其取决于鸟氨酸脱羧酶的激活或抑制, 他是影响多胺生物合成的第一步关键酶, 能催化细胞内鸟氨酸转化成多胺.

■ 研发前沿

鸟氨酸脱羧酶的活性、蛋白表达和核酸表达往往预示着细胞增生或修复的趋势,因此很多研究者以此来作为炎症性疾病如食管炎、结肠炎等病变严重程度或药物疗效的一个指标。

2.1.1 表皮生长因子(EGF) EGF可以与细胞膜上的表皮生长因子受体结合,激活特异性蛋白激酶C,引起一系列的生化反应,从而发挥生物学效应.其生化效应包括提高ODC活性,使细胞或组织合成腐胺增加,并使细胞发生有丝分裂,促进上皮细胞增生^[12]. Bauske *et al*^[13]发现在Caco-2细胞上用EGF可以使ODC的活性在几分钟内开始增加,3 h增加到最高.给大鼠注射EGF也可以在12 h后提高ODC的活性,并且能解除过氧化物引起的ODC活性的抑制^[14].

2.1.2 氨基酸 氨基酸是构成生物体蛋白质的基本单位,各种氨基酸对ODC的作用也引起诸多研究者的兴趣,但对其作用有不同看法. Minami *et al*^[15]根据其在大鼠活体上的观察结果认为几乎所有的氨基酸都能提高大鼠肠道和肝脏ODC活性,以甘氨酸和半胱氨酸最有效.而Kandil *et al*^[16-17]报道只有部分氨基酸如D-甘露醇、甘氨酸、L-天冬酰胺、L-丝氨酸、谷氨酰胺及他们的异构体能在结肠上皮细胞及结肠癌细胞株上促使ODC活性增加;而D-甲硫氨酸、L-赖氨酸、L-天冬氨酸或L-谷氨酸、L-苯丙氨酸则效果不明显或无效;L-精氨酸和L-半胱氨酸还对ODC活性有抑制作用.表皮生长因子和谷氨酰胺在这方面有较好的协同作用^[18]. Chabanon *et al*^[19]在Caco-2细胞上发现,加入的氨基酸剂量与诱导的ODC蛋白、ODC活性有剂量依赖关系,而对ODC mRNA几乎没有影响,因此推测氨基酸对ODC的作用主要在翻译而不是转录阶段.

2.1.3 胃泌素(gastrin) 胃泌素通过他的G-蛋白配体受体以ras-MAPK途径诱导*c-fos*和*c-jun*基因的转录,由此促进ODC mRNA的翻译^[20].研究发现胃泌素在IEC-6细胞及大鼠活体上都能显著增加ODC活性,本实验室也证实了在IEC-6细胞上五肽胃泌素可以增加ODC mRNA和ODC活性^[21-23].

2.1.4 胆囊收缩素(CCK) CCK是一种广泛应用的对胰脏有潜在营养作用的物质.细胞和动物实验可以发现CCK对胰脏ODC活性、mRNA和蛋白表达都有显著促进作用,表明从翻译到转录水平CCK都是一种有效的ODC促进剂.一些可以促进CCK分泌的物质如大豆胰蛋白酶抑制剂(SBTI)、胆囊收缩素连接肽及CCK的同型体(CCK-LP)雨蛙肽(caerulein)等也有促进ODC的作用^[24-27]. CCK和胃泌素有协同作用,有人认为这是由于他们有共同的胆囊收缩素-胃泌素受体(CCK-G receptor)^[28-29].

2.1.5 雄激素 雄激素可以诱导ODC的分泌,因此 δ 鼠体内的ODC活性大大高于 η 鼠.某些雄激素可以明显促进大鼠ODC的分泌,如给出生21 d的大鼠注射丙酸睾酮有很强地提高ODC活性的作用^[30], η 鼠增加幅度高于 δ 鼠,甚至可以观察到在短时间内提高70倍^[14]. Bettuzzi *et al*^[31]则检测到阉割7 d的 δ 鼠ODC水平降低40%,反证了睾酮可以促进ODC分泌.

2.1.6 精氨酸酶 L-精氨酸在精氨酸酶的作用下合成L-鸟氨酸,L-鸟氨酸是ODC的底物,因此应用精氨酸酶可使ODC的活性和蛋白表达升高.也有实验表明在溃疡性结肠炎大鼠上应用精氨酸酶的抑制剂S-(2-boronoethyl)-L-cysteine可以明显看到ODC活性下降,蛋白减少,大鼠黏膜增生减少^[32-33],反证了精氨酸酶的作用.

2.1.7 血管活性肠肽(VIP) VIP是一种在胃肠道广泛分布的神经肽,被认为是一种潜在的细胞生长和分化的调节物质. VIP通过与细胞膜上广泛分布的VIP受体结合,经G-蛋白介导途径引起细胞内cAMP水平的变化,调节ODC的增生或抑制,但这种调控效应尚无定论^[34-36]. Yu *et al*^[34]发现在人结肠癌细胞株LoVo上10-10 000 pmol/L浓度的VIP可以促进ODC活性及升高ODC mRNA表达,而100 nmol/L以上的浓度却能抑制ODC活性,可能VIP除了cAMP还存在另一种可以抑制细胞生长的第二信使. Gamet *et al*^[35]报道20 mol/L的VIP可促进HT细胞内ODC活性提高,而当无牛血清培养情况下则不能促进细胞增生.单独应用VIP可以显著提高ODC活性,从而提高大鼠肿瘤的发生率,应用ODC抑制剂1,3-二氨基丙胺(DAP)可以减弱这种作用^[36],也证实对ODC的作用是VIP的一个作用途径.

2.1.8 蛋白激酶(PKC) PKC和ODC是目前比较公认的两个癌标志物,PKC被认为是TPA(12-O-十四烷酰佛波醋酸酯-13)等促癌物作用的主要细胞膜受体,TPA等促癌物广泛的生物活性是通过PKC介导的. ODC因为对细胞的增生分化有重要影响也是肿瘤增生的一个关键物质,因此两者之间是否存在相关性也成为研究的热点.目前多数研究认为PKC的活化可以介导或者激活ODC的活化过程,引起ODC蛋白和ODC mRNA 表达的改变.有研究^[37]表明在人内皮细胞上应用PKC的抑制剂白屈菜赤碱(chelerythrine)可以完全抑制ODC活性,而PKC的活化剂脂磷(酸)聚糖也能上调ODC活性^[2].但也有学者认为两者之间不存在相关性^[38-39].

2.2 抑制因素

2.2.1 多胺的负反馈调节作用 ODC的催化产物是多胺(包括腐胺、精脞和精胺), 这三种多胺可以诱导ODC抗酶的形成, 对ODC有负反馈调节的作用. 研究表明腐胺可抑制由天冬酰胺或牛血清诱导的小肠隐窝干细胞ODC活性的上升^[40-41]. 在自主产生的三种多胺中, Seely *et al*^[42]认为精脞最有效, 而腐胺效果最差. 而更多的体外实验表明精胺可以最有效地抑制ODC而精脞次之^[17,43-44]. 多胺虽可抑制ODC活性但仍可促进胃肠黏膜的修复, 当用ODC的特异性和不可逆性抑制剂二氟甲基鸟氨酸(DFMO)耗竭内源性多胺时, 小肠黏膜细胞内多胺水平显著下降, 黏膜细胞的生长和溃疡愈合也受到抑制. 如果同时使用外源性多胺如腐胺、精胺和精脞, 尽管ODC活性完全抑制, 但未影响黏膜生长和溃疡愈合. 说明多胺可以阻断DFMO引起的小肠黏膜生长的抑制, 促进胃肠黏膜修复, 是生理和病理条件下胃肠黏膜生长的重要刺激剂.

2.2.2 一氧化氮(NO) NO抑制细胞增生主要通过两个途径: 一方面NO和L-鸟氨酸都以精氨酸为前体, 因此NO的生成能竞争性地抑制多胺合成; 另一方面NO本身的氧化性可导致细胞毒性. 细胞和动物实验均证实应用NO的某些供体如硝普钠^[45]或者直接应用S-亚硝基半胱氨酸、S-亚硝基谷胱甘肽形式的NO^[46]等可以直接抑制ODC的活性. 因此有学者认为可以在NO的供体中找到与DFMO同样有效的药物^[33].

2.2.3 促胰液素(secretin) IEC-6细胞及大鼠活体实验均表明单独应用任何剂量的促胰液素对ODC都不起作用, 但适当剂量的促胰液素可以完全阻抑由胃泌素引起的大鼠盲肠、结肠或IEC-6细胞内ODC活性及ODC mRNA上升^[22,47]. 促胰液素对由表皮生长因子、缩胆囊素、禁食后重喂养^[48]引起的ODC活性增加则没有抑制作用. 表明促胰液素主要是通过抑制胃泌素而抑制ODC. 缩胆囊素和促胰液素合用能使ODC活性升高, 作用速度快、幅度大, 但消逝也快^[49].

3 鸟氨酸脱羧酶在胃肠道疾病中的作用

ODC与肠细胞增生和分化密切相关, 正常肠黏膜组织中ODC几乎没有表达, 细胞增生时ODC活性升高, 含量上升, 催化更多的鸟氨酸合成多胺以促进细胞增生分化, 因此ODC的活性和含量是肠黏膜细胞增生状态的一个标志^[32,50].

3.1 在黏膜损伤性疾病中的变化 黏膜损伤后

ODC会通过大量表达来促进细胞的增生、分化和移行, 因此可以作为黏膜损伤程度及修复效果的一个标志. Pillai *et al*^[50]发现儿童炎症性肠病患者结肠内ODC活性比正常人升高, 且感染程度越高ODC活性越高, 应用糖皮质激素治疗病情好转后, ODC活性降低. 这与本实验室的初步研究结果类似.

但也有学者得出了相反的结论. 有人^[51]研究了ODC在炎症性肠病不同分期中的变化情况, 结果发现在所有炎症性肠病患者病变部位和非病变部位ODC的含量都低于正常对照组; 程度严重的克隆氏病患者ODC含量比中等程度的病人明显降低; 中等程度和重度病变的溃疡性结肠炎患者中, 病变部位的ODC都明显低于非病变部位^[52]. 肠大部分切除后的患者往往会出现营养吸收障碍, 称为短肠综合征. Segovia-Silvestre *et al*^[53]发现短肠综合征结肠造口术患者结肠ODC活性和mRNA水平均明显降低.

出现这种差异, 我们推测和疾病的愈合趋势有关, ODC大量表达时细胞有增生的基础, 往往可以迅速愈合. Obayashi *et al*^[51]发现溃疡性结肠炎活动期病人ODC活性和ODC mRNA都低于溃疡愈合期的病人和正常对照组. 这就是溃疡活动期病人愈合的趋势不如愈合期病人的原因. 但具体ODC变化在黏膜损伤性疾病中所代表的意义, 需要更多的证据来证实.

3.2 在癌前病变中的变化 细胞的过度增生可造成癌变, 因此细胞增生的限速酶ODC对于检测细胞增生状态是非常敏感的, 目前很多研究都把ODC作为检测疾病癌前病变的重要指标. 研究表明有癌前病变趋向的炎症性肠病和Barrett's食管炎患者多数存在ODC活性增加, ODC mRNA含量升高的情况^[54-55]. Brabender *et al*^[54-55]发现ODC mRNA的水平随Barrett's食管炎相关性腺癌发生的进程而升高, 由此认为ODC mRNA可作为隐匿性腺癌发生的一个诊断标准. 利用ODC在疾病中的变化可以通过定期检测病人相关组织的ODC表达以监控有无癌变趋势.

ODC和多胺参与正常细胞生长和分化的调控, 是细胞增生所必需的. ODC过表达与肿瘤细胞转化、增生、浸润、转移及血管生成都有密切的关系, 因此更多的研究把ODC表达作为肿瘤生长的一个标志物.

4 影响鸟氨酸脱羧酶的药物研究

由于ODC是黏膜损伤后修复的关键酶, 也是肿

■创新盘点

国内有关鸟氨酸脱羧酶的研究多集中在其对肿瘤的作用方面, 有关综述也多集中在肿瘤方面, 而涉及其对组织损伤后修复的作用方面的论述比较少, 本文主要从这个角度对ODC的影响因素等进行了综述.

■应用要点

因为在肿瘤生长中的重要作用, ODC在研究中经常是作为肿瘤生长的标志物。此外寻找对鸟氨酸脱羧酶有适当作用, 可以促进细胞生长而不会过度增生导致肿瘤的药物对于治疗组织损伤如黏膜损伤性疾病是有意义的。

瘤生长的一个标志物, 因此寻找对ODC有显著作用的药物很有意义。

4.1 对ODC有抑制作用的药物往往认为有可能抗肿瘤, 很多目前应用的抗肿瘤药物也有抑制ODC的作用。较多报道抑制ODC物质包括以下几种:

4.1.1 二氟甲基鸟氨酸(DFMO) DFMO已成为公认的最有效的ODC特异性抑制剂。他同鸟氨酸的结构类似, 可作为ODC的底物进行脱羧反应, 导致ODC发生不可逆的结构改变, 活性丧失。但是该物质具有一定的毒副作用, 临床用量远不能达到有效的血药浓度, 所以目前还不能在临床得到广泛应用^[2]。

4.1.2 1,3-二氨基连苯胺(DAP) DAP是腐胺的同型物, 可能这是其抑制ODC表达从而抑制或治疗肿瘤的一个原因。近年来已经在很多肿瘤动物模型如BBN诱导的膀胱癌、MNNG诱导的胃癌、AOM导致的结肠癌上得到验证, 1%-3%的浓度口服就可较好地降低ODC活性、mRNA和蛋白表达, 从而抑制肿瘤, 而且没有严重的毒副作用发生, 被认为是一种较具潜力的肿瘤治疗物^[36,56-57]。

4.1.3 雷帕霉素(rapamycin)作为一种免疫抑制剂可以抑制ODC mRNA的翻译过程, 有学者认为是因为他失活了ODC mRNA翻译过程中信号转导途径P70 S6激酶^[58], 并且也可以阻抑翻译过程中的4E-BP1的磷酸化^[20], 同时也发现雷帕霉素不能完全阻止ODC mRNA的翻译, 也可能是因为除了P70 S6还有别的信号转导途径^[59]。但还没有报道雷帕霉素对癌症的治疗效果。

4.1.4 茶多酚 1990年以来, 茶的提取物茶多酚良好的抗癌效果引起了国际上的广泛关注。饮用或者直接擦涂茶多酚对TPA(12-O-十四烷酰佛波醋酸酯-13)或者uvB(紫外线B光谱)诱导的多种癌症如前列腺癌、皮肤癌等的ODC活性、mRNA和蛋白表达都有显著的降低, 也有较好的预防作用。Gupta *et al*^[60]研究发现茶多酚对前列腺癌细胞中用睾酮诱发的ODC活性上升有很好的抑制作用, 说明茶多酚对ODC有特异性的抑制作用, 可能是他阻滞了ODC mRNA翻译的信号转导途径^[61-62]。

4.1.5 很多植物药的提取物如 β -胡萝卜素、越桔植物提取物、沙姜中的肉桂酸乙酯化合物、葡萄籽原花都可以降低癌组织或者细胞中ODC含量, 从而对恶性肿瘤有一定的抑制作用。

4.2 黏膜损伤后修复是通过细胞的增生分化来完成的, 而ODC又在很大程度上影响着细胞的增生分化过程, 促进细胞分化和适度增生的药物有利于黏膜损伤疾病的治疗, 本实验室近年来进行了这方面的药物研究。

我们采用化学提取方法得到党参、白术、黄芪及甘草有效部位。发现其中一些部位可促进IEC-6细胞增生、诱导细胞分化、促进细胞迁移、提高ODC蛋白、ODC mRNA表达水平、ODC活性和腐胺含量^[23,63-69]。表明益气健脾中药以不同化学有效组分的物质形式, 可通过鸟氨酸脱羧酶和多胺机制促进小肠隐窝细胞增生、迁移、分化, 其有效组分的配伍运用可协同增强药效。研究成果阐述了健脾益气中药促进胃肠黏膜上皮修复药理作用可能的靶细胞、靶分子及其主要作用物质基础, 对“健脾益气”治法方药的肠上皮细胞药理研究有理论指导意义。

总之, 鸟氨酸脱羧酶作为细胞增生的限速酶, 在肿瘤方面的作用得到比较广泛的研究, 被认为是肿瘤分期及疗效的重要指标。但其在胃肠道疾病中尤其是肠黏膜损伤性等疾病中的作用尚未得到广泛的研究, 有关药物作用的机制研究比较少, 利用其体内外的调控因素寻找对ODC有特异性作用的药物, 把ODC作为药物作用靶点值得深入研究。

5 参考文献

- 1 Schipper RG, Verhofstad AA. Distribution patterns of ornithine decarboxylase in cells and tissues: facts, problems, and postulates. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 1143-1160
- 2 Tsuji T, Todd R, Meyer C, McBride J, Liao PH, Huang MF, Chou MY, Donoff RB, Wong DT. Reduction of ornithine decarboxylase antizyme (ODC-Az) level in the 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Oncogene* 1998; 16: 3379-3385
- 3 Ghoda L, van Daalen Wetters T, Macrae M, Ascherman D, Coffino P. Prevention of rapid intracellular degradation of ODC by a carboxyl-terminal truncation. *Science* 1989; 243: 1493-1495
- 4 Haddox MK, Russell DH. Ornithine decarboxylase from calf liver. Purification and properties. *Biochemistry* 1981; 20: 6721-6729
- 5 Radford DM, Nakai H, Eddy RL, Haley LL, Byers MG, Henry WM, Lawrence DD, Porter CW, Shows TB. Two chromosomal locations for human ornithine decarboxylase gene sequences and elevated expression in colorectal neoplasia. *Cancer Res* 1990; 50: 6146-6153
- 6 Kritsi ZI, Theoharides TC, Baumgarten A, Bondy PK, Canellakis ZN. Affinity chromatography with specific antibody increases activity and retains antigenicity of ornithine decarboxylase. *Prep Biochem* 1982; 12: 445-460

- 7 Heller JS, Fong WF, Canellakis ES. Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 1858-1862
- 8 Choi KS, Suh YH, Kim WH, Lee TH, Jung MH. Stable siRNA-mediated silencing of antizyme inhibitor: regulation of ornithine decarboxylase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328: 206-212
- 9 Mangold U, Leberer E. Regulation of all members of the antizyme family by antizyme inhibitor. *Biochem J* 2005; 385: 21-28
- 10 Coffino P. Antizyme, a mediator of ubiquitin-independent proteasomal degradation. *Biochimie* 2001; 83: 319-323
- 11 Palanimurugan R, Scheel H, Hofmann K, Dohmen RJ. Polyamines regulate their synthesis by inducing expression and blocking degradation of ODC antizyme. *EMBO J* 2004; 23: 4857-4867
- 12 Ostrowski J, Wojciechowski K, Konturek SJ, Butruk E. Inhibitory effect of EGF on secretory response of rat parietal cells is associated with an induction of ODC. *Am J Physiol* 1993; 264: C1428-C1433
- 13 Bauske R, Milovic V, Turchanowa L, Stein J. EGF-stimulated polyamine accumulation in the colon carcinoma cell line, Caco-2. *Digestion* 2000; 61: 230-236
- 14 Svechnikov K, Ritzen EM, Holst M. Androgen and estrogen stimulation of ornithine decarboxylase activity in mouse kidney. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 75: 329-333
- 15 Minami H, Miyamoto K, Fujii Y, Nakabou Y, Hagi-hira H. Induction of intestinal ornithine decarboxylase by single amino acid feeding. *J Biochem (Tokyo)* 1985; 98: 133-139
- 16 Kandil HM, Argenzio RA, Chen W, Berschneider HM, Stiles AD, Westwick JK, Rippe RA, Brenner DA, Rhoads JM. L-glutamine and L-asparagine stimulate ODC activity and proliferation in a porcine jejunal enterocyte line. *Am J Physiol* 1995; 269: G591-G599
- 17 Stefanelli C, Bonavita F, Stanic I, Mignani M, Facchini A, Pignatti C, Flamigni F, Caldarera CM. Spermine causes caspase activation in leukaemia cells. *FEBS Lett* 1998; 437: 233-236
- 18 Ray RM, Viar MJ, Patel TB, Johnson LR. Interaction of asparagine and EGF in the regulation of ornithine decarboxylase in IEC-6 cells. *Am J Physiol* 1999; 276: G773-G780
- 19 Chabanon H, Aubel C, Larvaron P, Villard C, Carraro V, Brachet P. Ornithine decarboxylase activity is inhibited by the polyamine precursor amino acids at the protein stability level in Caco-2 cells. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1723: 74-81
- 20 Pyronnet S, Gingras AC, Bouisson M, Kowalski-Chauvel A, Seva C, Vaysse N, Sonenberg N, Pradayrol L. Gastrin induces phosphorylation of eIF4E binding protein 1 and translation initiation of ornithine decarboxylase mRNA. *Oncogene* 1998; 16: 2219-2227
- 21 Chabanon H, Persson L, Wallace HM, Ferrara M, Brachet P. Increased translation efficiency and antizyme-dependent stabilization of ornithine decarboxylase in amino acid-supplemented human colon adenocarcinoma cells, Caco-2. *Biochem J* 2000; 348: 401-408
- 22 Wang JY, McCormack SA, Viar MJ, Johnson LR. Secretin inhibits induction of ornithine decarboxylase activity by gastrin in duodenal mucosa and IEC-6 cells. *Am J Physiol* 1994; 267: G276-G284
- 23 Zhang ZL, Chen WW. Proliferation of intestinal crypt cells by gastrin-induced ornithine decarboxylase. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 183-187
- 24 Rosewicz S, Riecken EO. Cholecystokinin as a regulator of rat pancreatic gene expression. *Z Gastroenterol Verh* 1991; 26: 299-301
- 25 Haarstad H, Winnberg A, Petersen H. Effects of a cholecystokinin-like peptide on DNA and polyamine synthesis in the rat pancreas. *Scand J Gastroenterol* 1985; 20: 530-538
- 26 Morisset J, Sarfati P, Grondin G. Immunocytochemical demonstration of ornithine decarboxylase in the rat exocrine pancreas using the protein A-gold technique. *Can J Physiol Pharmacol* 1986; 64: 444-448
- 27 Loser C, Cleffmann U, Alves F, Folsch UR, Creutzfeldt W. Ornithine decarboxylase and polyamine biosynthesis in pancreatic adaptation. *Adv Exp Med Biol* 1988; 250: 379-388
- 28 Scemama JL, De Vries L, Pradayrol L, Seva C, Tronchere H, Vaysse N. Cholecystokinin and gastrin peptides stimulate ODC activity in a rat pancreatic cell line. *Am J Physiol* 1989; 256: G846-G850
- 29 Seva C, Scemama JL, Pradayrol L, Sarfati PD, Vaysse N. Coupling of pancreatic gastrin/cholecystokinin-B (G/CCKB) receptors to phospholipase C and protein kinase C in AR4-2J tumoral cells. *Regul Pept* 1994; 52: 31-38
- 30 Sanchez-Capelo A, Tejada F, Ruzafa C, Cremades A, Penafiel R. Postnatal exposure to androgens alters renal ornithine decarboxylase ontogeny and abolishes renal sexual dimorphism in mice. *Biol Neonate* 1999; 76: 72-83
- 31 Bettuzzi S, Strocchi P, Davalli P, Marinelli M, Furci L, Corti A. Androgen responsiveness and intrarenal localization of transcripts coding for the enzymes of polyamine metabolism in the mouse. *Biochem Cell Biol* 2001; 79: 133-40
- 32 Gobert AP, Cheng Y, Akhtar M, Mersey BD, Blumberg DR, Cross RK, Chaturvedi R, Drachenberg CB, Boucher JL, Hacker A, Casero RA Jr, Wilson KT. Protective role of arginase in a mouse model of colitis. *J Immunol* 2004; 173: 2109-2117
- 33 Ignarro LJ, Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Wu G, del Soldato P. Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4202-4208
- 34 Yu D, Seitz PK, Selvanayagam P, Rajaraman S, Townsend CM Jr, Cooper CW. Effects of vasoactive intestinal peptide on adenosine 3',5'-monophosphate, ornithine decarboxylase, and cell growth in a human colon cell line. *Endocrinology* 1992; 131: 1188-1194
- 35 Gamet L, Cazenave Y, Trocheris V, Denis-Pouxviel C, Murat JC. Involvement of ornithine decarboxylase in the control of proliferation of the HT29 human colon cancer cell line. Effect of vasoactive intestinal peptide on enzyme activity. *Int J Cancer* 1991; 47: 633-638
- 36 Tatsuta M, Iishi H, Baba M, Yamamoto R, Uehara H, Nakaizumi A. Attenuation of vasoactive intestinal peptide enhancement of colon carcinogenesis by ornithine decarboxylase inhibitor. *Cancer Lett* 1995; 93: 219-225

■ 名词解释

益气健脾: 益气健脾是补气养血和健运脾胃的方法, 是中医治疗脾气虚证的根本法则。

- 37 Pintus G, Tadolini B, Maioli M, Posadino AM, Bennardini F, Bettuzzi S, Ventura C. Heparin inhibits phorbol ester-induced ornithine decarboxylase gene expression in endothelial cells. *FEBS Lett* 1998; 423: 98-104
- 38 Nickel KP, Belury MA. Inositol hexaphosphate reduces 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced ornithine decarboxylase independent of protein kinase C isoform expression in keratinocytes. *Cancer Lett* 1999; 140: 105-111
- 39 Voskas D, Kim M, Hurta RA. Platelet-derived growth factor mediated altered expression and regulation of ornithine decarboxylase in H-ras-transformed cell lines. *Cell Signal* 2001; 13: 401-409
- 40 Ginty DD, Marlowe M, Pekala PH, Seidel ER. Multiple pathways for the regulation of ornithine decarboxylase in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 1990; 258: G454-G460
- 41 Iwami K, Wang JY, Jain R, McCormack S, Johnson LR. Intestinal ornithine decarboxylase: half-life and regulation by putrescine. *Am J Physiol* 1990; 258: G308-G315
- 42 Seely JE, Pegg AE. Effect of 1,3-diaminopropane on ornithine decarboxylase enzyme protein in thioacetamide-treated rat liver. *Biochem J* 1983; 216: 701-707
- 43 Yuan Q, Ray RM, Viar MJ, Johnson LR. Polyamine regulation of ornithine decarboxylase and its anti-growth in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G130-G138
- 44 Shah N, Thomas T, Shirahata A, Sigal LH, Thomas TJ. Activation of nuclear factor kappaB by polyamines in breast cancer cells. *Biochemistry* 1999; 38: 14763-14774
- 45 Pignatti C, Tantini B, Stefanelli C, Giordano E, Bonavita F, Clo C, Caldarera CM. Nitric oxide mediates either proliferation or cell death in cardiomyocytes. Involvement of polyamines. *Amino Acids* 1999; 16: 181-190
- 46 Bauer PM, Fukuto JM, Buga GM, Pegg AE, Ignarro LJ. Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase by S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 355-358
- 47 Johnson LR, Wang P, Haddox K. Ornithine decarboxylase in large bowel mucosa: regulation by gastrin, secretin and EGF. *J Physiol Pharmacol* 1992; 43: 33-41
- 48 Haarstad H, Petersen H. The effects of graded doses of a cholecystokinin-like peptide with and without secretin on pancreatic growth and synthesis of RNA and polyamines in rats. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 907-915
- 49 Haarstad H, Petersen H. Short- and long-term effects of secretin and a cholecystokinin-like peptide on pancreatic growth and synthesis of RNA and polyamines. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24: 721-732
- 50 Pillai RB, Tolia V, Rabah R, Simpson PM, Vijesurier R, Lin CH. Increased colonic ornithine decarboxylase activity in inflammatory bowel disease in children. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 1565-1570
- 51 Obayashi M, Matsui-Yuasa I, Matsumoto T, Kitano A, Kobayashi K, Otani S. Polyamine metabolism in colonic mucosa from patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 736-740
- 52 Ricci G, Stabellini G, Bersani G, Marangoni G, Fabbrì P, Gentili G, Alvisi V. Ornithine decarboxylase in colonic mucosa from patients with moderate or severe Crohn's disease and ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11: 903-904
- 53 Segovia-Silvestre T, Pita AM, Vilar L, Venereo Y, Orta X, Farriol M. Intestinal ornithine decarboxylase in short bowel syndrome patients with oral diet. *Clin Nutr* 2001; 20: 171-175
- 54 Brabender J, Lord RV, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Uetake H, Kawakami K, Park JM, Salonga D, Peters JH, DeMeester TR, Holscher AH, Danenberg PV. Upregulation of ornithine decarboxylase mRNA expression in Barrett's esophagus and Barrett's-associated adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg* 2001; 5: 174-181
- 55 Garewal H, Ramsey L, Sharma P, Kraus K, Sampliner R, Fass R. Biomarker studies in reversed Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1999; 94: 2829-2833
- 56 Salim EI, Wanibuchi H, Morimura K, Kim S, Yano Y, Yamamoto S, Fukushima S. Inhibitory effects of 1,3-diaminopropane, an ornithine decarboxylase inhibitor, on rat two-stage urinary bladder carcinogenesis initiated by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine. *Carcinogenesis* 2000; 21: 195-203
- 57 Iishi H, Tatsuta M, Baba M, Yano H, Sakai N, Uehara H, Nakaizumi A. Ornithine decarboxylase inhibitor lessens the rat gastric carcinogenesis enhancement caused by tyrosine methyl ester. *Int J Cancer* 1997; 73: 113-116
- 58 Flamigni F, Marmiroli S, Capanni C, Stefanelli C, Guarnieri C, Caldarera CM. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for the induction of ornithine decarboxylase in leukemia cells stimulated to growth. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 239: 729-733
- 59 Seidel ER, Ragan VL. Inhibition by rapamycin of ornithine decarboxylase and epithelial cell proliferation in intestinal IEC-6 cells in culture. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 571-574
- 60 Gupta S, Ahmad N, Mohan RR, Husain MM, Mukhtar H. Prostate cancer chemoprevention by green tea: *in vitro* and *in vivo* inhibition of testosterone-mediated induction of ornithine decarboxylase. *Cancer Res* 1999; 59: 2115-2120
- 61 Bachrach U, Wang YC. Cancer therapy and prevention by green tea: role of ornithine decarboxylase. *Amino Acids* 2002; 22: 1-13
- 62 Qi L, Han C. The antioxidative mechanisms of tea polyphenols in inhibiting tumor promotion by TPA. *Weisheng Yanjiu* 1998; 27: 50-52
- 63 张子理, 陈蔚文. 黄芪注射液通过激活鸟氨酸脱羧酶促进IEC-6细胞分化的研究. *中国中西医结合杂志* 2002; 22: 439-443
- 64 张子理, 陈蔚文. 黄芪注射液和白术提取部位对小肠上皮细胞迁移的影响. *中草药* 2002; 33: 912-915
- 65 张子理, 陈蔚文. 党参、黄芪、白术提取物配伍应用对小肠上皮细胞增生的影响. *广州中医药大学学报* 2002; 19: 137-140
- 66 陈蔚文, 张子理. 党参白术提取物分别和合用诱导IEC-6细胞增生分化的作用. *中国药理学通报* 2002; 18: 241-244
- 67 张子理, 陈蔚文. 党参、黄芪、白术、甘草提取部位对小肠上皮细胞增生的影响. *中药药理与临床* 2002; 18: 10-12
- 68 Zhang Z, Chen W. Plating densities, alpha-difluoromethylornithine effects and time dependence on the proliferation of IEC-6 cells. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115: 518-520
- 69 Wang Z, Chen WW, Li RL, Wen B, Sun JB. Effect of gastrin on differentiation of rat intestinal epithelial cells *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1786-1790

针刺血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞磷脂酶C γ -1活性的影响

杨宗保, 严洁, 邹晓平, 易受乡, 常小荣, 林亚萍, 唐森

杨宗保, 严洁, 邹晓平, 易受乡, 常小荣, 林亚萍, 唐森, 湖南中医药大学针灸推拿学院 湖南省长沙市 410007
国家自然科学基金重大研究项目, No. 90209023
通讯作者: 严洁, 410007, 湖南省长沙市韶山中路113号, 湖南中医药大学针灸推拿学院, yj5381159@yahoo.com.cn
电话: 0731-5381159 传真: 0731-5381159
收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-02-18

Effect of acupuncture serum on activity of phospholipase C γ -1 in gastric mucosal cells of rats with gastric ulcer

Zong-Bao Yang, Jie Yan, Xiao-Ping Zou, Shou-Xiang Yi, Xiao-Rong Chang, Ya-Ping Lin, Sen Tang

Zong-Bao Yang, Jie Yan, Xiao-Ping Zou, Shou-Xiang Yi, Xiao-Rong Chang, Ya-Ping Lin, Sen Tang, Department of Acupuncture and Moxibustion, HuNan College of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 90209023

Correspondence to: Jie Yan, Department of Acupuncture and Moxibustion, HuNan College of Traditional Chinese Medicine, 113 Shaoshan Middle Road, Changsha 410007, China. yj5381159@yahoo.com.cn

Received: 2006-02-13 Accepted: 2006-02-18

Abstract

AIM: To observe the activity of phospholipase C γ -1 (PLC γ -1) in gastric mucosal cells of rats with gastric ulcer after treatment with acupuncture serum.

METHODS: Sixty rats were randomly divided into model serum (MS) group, gastric meridian serum (GMS) group, gallbladder meridian serum (GBMS) group, GMS plus PD153035 group and GBMS plus PD153035 group. Rat model of gastric ulcer was established by water immersion and restrained stress methods, and the gastric mucosal cells were separated by pronase digestion and then incubated by serum and inhibitor of epidermal growth factor receptor PD153035, respectively. The activity of PLC γ -1 in gastric mucosal cells was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: In comparison with that in MS

group (6.5 ± 0.3 nkat/g), the acupuncture serum in GMS group had a tendency to improve the activity of PLC γ -1 (13.0 ± 7.5 nkat/g) in gastric mucosal cells ($P = 0.01$), and this tendency existed in GBMS group (7.2 ± 1.8 nkat/g) but with no significant difference ($P > 0.05$). The activity of PLC γ -1 was also significantly higher in GMS group than that in GBMS group (7.2 ± 1.8 nkat/g, $P = 0.02$) or GMS plus PD153035 group (7.4 ± 2.7 nkat/g, $P = 0.02$).

CONCLUSION: The serum after acupuncture gastric meridian can stimulate the PLC γ -1 activity in gastric mucous cells, and there is specific correlation of meridian and internal organ.

Key Words: Acupuncture; Serum; Gastric ulcer; Gastric mucosal cell; Phospholipase C γ -1

Yang ZB, Yan J, Zou XP, Yi SX, Chang XR, Lin YP, Tang S. Effect of acupuncture serum on activity of phospholipase C γ -1 in gastric mucosal cells of rats with gastric ulcer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10):985-988

摘要

目的: 观察针刺胃经穴后的血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞磷脂酶C γ -1(PLC γ -1)活性的影响。

方法: 大鼠60只随机分为溃疡血清组、胃经血清组、胆经血清组、胃经血清+PD153035组和胆经血清+PD153035组, 采用水浸束缚法制作胃溃疡模型, 利用链霉蛋白酶消化法分离胃黏膜细胞, 分别用表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂PD153035和血清孵育胃黏膜细胞, 应用酶联免疫吸附(ELISA)法检测PLC γ -1活性。

结果: 胃经血清组(13.0 ± 7.5 nkat/g)大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性与溃疡血清组(6.5 ± 0.3 nkat/g)比较有显著性差异($P = 0.01$); 胃经血清组大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性与胆经血清组(7.2 ± 1.8 nkat/g)比较有显著性差异($P = 0.02$); 胃经血清组大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性与胃经血清+PD153035组(7.4 ± 2.7 nkat/g)比较有显著性差异($P = 0.02$)。

■背景资料

细胞信号转导在介导细胞的分裂和增殖过程中起着重要的作用。胃黏膜损伤是一种常见的病理过程, 针刺对其有很好的修复作用, 利用针刺血清学方法、动物实验等手段研究针刺参与胃黏膜损伤修复的信号转导机制是一种很重要的研究方法。

■研发前沿

表皮生长因子受体在介导胃黏膜损伤修复过程中具有重要作用, 关于表皮生长因子受体后的信号转导机制已成为目前细胞生物学的前沿和热点。

■创新盘点

本文采用针刺血清学的研究方法,发现针刺胃经穴后的血清能刺激胃黏膜细胞中PLC γ -1的活化,并且存在经脉-脏腑的特异性联系。

■应用要点

本实验研究结果提示针刺胃经穴后提取的血清能明显增强胃黏膜细胞PLC γ -1的活性,说明针刺胃经穴对胃黏膜损伤的修复的确有体液机制的参与,其特异相关活性物质有待从蛋白质组学角度作进一步深入研究。

结论: 针刺胃经穴后的血清能刺激胃黏膜细胞中PLC γ -1的活化,并且存在经脉-脏腑的特异性联系。

关键词: 针刺; 血清; 胃溃疡; 胃黏膜细胞; PLC γ -1

杨宗保, 严洁, 邹晓平, 易受乡, 常小荣, 林亚萍, 唐森. 针刺血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞磷脂酶C γ -1活性的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(10):985-988

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/985.asp>

0 引言

针刺疗法是祖国医学的传统治疗方法之一,其历史可追溯到三千多年前,近年来在西方发达国家作为一种补充替代疗法而备受人们青睐^[1-3]。经脉与脏腑相关是针刺理论中的重要内容之一,我们以往研究表明足阳明胃经与胃特异相关,针刺胃经上的“四白”穴、“足三里”穴,“梁门”穴对胃的运动、分泌以及胃黏膜损伤修复皆有明显的调节作用^[4],并且发现针刺胃经穴后所激发的经气可促使机体内脑肠肽类物质的释放,该效应物质作为细胞外信号分子作用于胃黏膜细胞,诱导细胞膜上EGFR及受体后信号转导通路的活化,最终导致细胞的生长和分裂^[5]。然而目前对针刺参与胃黏膜细胞分裂和增殖的信号转导机制仍未完全明了,细胞磷脂酶C γ -1(PLC γ -1)作为EGF受体后信号转导通路中的信号分子是否参与了针刺对胃黏膜损伤修复的信号转导过程,国内外尚未有报道,值得做进一步研究,我们拟借助针刺血清的研究方法^[6],观察针刺胃经穴后血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1的影响,以便为更深入揭示针刺作用的体液机制及其信号转导机制奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠,雌雄不限,200-230 g,购自湖南农业大学实验动物中心。链霉蛋白酶(pronase)和DTT购自Merk公司;BSA购自Biosharp公司;DMEM购自Hyclone公司;Trypan blue购自Biomedicals公司;其他试剂均为市售化学纯;Elx800自动酶标仪(Bio-Tek Instruments, Inc);HEPES和PLC γ -1免疫测定试剂盒购自BIOSOURCE公司;缓冲液A(mmol/L: 0.5 NaH₂PO₄, 1.0 Na₂HPO₄, 20.0 NaHCO₃, 80.0 NaCl, 5.0 KCl, 50.0 HEPES, 11.0 glucose, 20 g/L BSA, 2.0 EDTA, pH 7.4);缓冲液B(mmol/L: 0.5 NaH₂PO₄, 1.0 Na₂HPO₄, 20.0 NaHCO₃, 80.0 NaCl,

5.0 KCl, 50.0 HEPES, 11.0 glucose, 10 g/L BSA, 1.0 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, pH 7.4);缓冲液C(mmol/L: 80.0 NaCl, 0.5 NaH₂PO₄, 1.0 Na₂HPO₄, 20.0 NaHCO₃, 5.0 KCl, 50.0 HEPES, 11.0 glucose, 1 g/L BSA, 1.0 CaCl₂, 1.5 MgCl₂, 1.0 DTT, pH 7.4);MAP消化酶: pronase溶于缓冲液A(MA)中,浓度为1 g/L,临用前配置。细胞抽提缓冲液(mmol/L: 10 Tris, pH 7.4, 100 NaCl, 1 EDTA, 1 EGTA, 1 NaF, 20 Na₄P₂O₇, 2 Na₃VO₄, 10 g/L Triton X-100, 100 mL/L glycerol, 1 g/L SDS, 5 g/L deoxycholate, 1.0 PMSF)。血清制备及处理^[7]:将各组大鼠按照试验程序要求处理后行颈动脉取血,移入离心管中,37℃下静置2 h,用离心机2 500 r/min离心10 min,用吸管小心吸取血清,将同组血清混合,过滤除菌,EP管分装,-20℃冻存。试验时将胃黏膜细胞悬浮液与10 μ mol/L PD153035共同孵育30 min,然后将1:10稀释度的血清在37℃下与胃黏膜细胞共同孵育30 min后观察血清对细胞效应的影响^[8-9]。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及分组 动物模型拟采用目前较成熟的水浸束缚法^[10],实验动物造模前禁食不断水24 h,将大白鼠固定于木板上,将动物直立浸于23±1℃的恒温水槽中,液面保持在胸骨剑突水平,浸泡10 h。将60只大鼠随机分为溃疡血清组、胃经血清组、胆经血清组、胃经血清+PD153035组和胆经血清+PD153035组。每组皆随机选4只作为血清供体,另8只作为血清受体,胃经血清组由四白、梁门、足三里三个穴位组成,胆经血清组由阳白、日月、阳陵泉三个穴位组成,取穴采用华兴邦动物穴位谱并结合模拟人体经穴法^[11]进行。大鼠:足三里:膝关节后外侧,在腓骨小头下约5 mm处;梁门:腹正中线与乳头线之间的中线上,脐上4寸;四白:眶下缘正中;阳白:眶上缘正中;日月:锁骨中线上,第七肋骨下缘;阳陵泉:腓骨小头下方凹陷处。电针刺激用G6805型电针仪,疏密波,电针频率疏波4 Hz,密波20 Hz,强度以肌肉或针柄微颤为度,电针时间30 min。

1.2.2 大鼠胃黏膜细胞分离 采用链霉蛋白酶消化法分离胃黏膜细胞^[12],试验大鼠100 g/L乌拉坦10 mL/kg腹腔麻醉后,在剑突及以下3 cm作动物手术切口,用手术刀片切开腹腔,找到胃后在贲门和胃体部、幽门和胃窦部分别结扎,将胃取出,生理盐水冲洗,在胃底做一小切口,用玻璃棒将胃翻转,用生理盐水清洗掉胃内容物和血

迹, 用纸将胃黏液擦干, 用注射器将消化酶注入胃袋, 每胃2.5 mL, 在胃底和胃体之间结扎, 将胃袋放入缓冲液A中, 37℃水浴消化90 min, 水浴振荡速度150次/min, 在30 min和60 min时换1次新鲜的缓冲液A. 整个过程缓冲液A中皆充以950 mL/L O₂+50 mL/L CO₂. 消化结束后将胃袋放入缓冲液B, 在室温下用磁力搅拌器轻轻搅拌60 min. 打下的细胞每10 min收集1次, 过200目筛, 3 000 r/min, 离心5 min, 沉淀用缓冲液C洗2次, 每次3 000 r/min, 离心5 min, 最后沉淀用移液枪充分吸打, 并用无血清的DMEM培养基悬浮, 使成单个游离胃黏膜细胞, 将细胞调至10⁹/L, 此为胃黏膜细胞悬浮液.

1.2.3 指标检测 将处理好的胃黏膜细胞用冰冷的PBS洗2次, 去掉上清液, 收集细胞沉淀物, 在冰上将细胞沉淀物溶解于细胞抽提缓冲液中30 min, 每隔10 min用涡流器震动1次(每1×10⁶个胃黏膜细胞加0.1 mL细胞抽提液), 然后将细胞抽提物移入超微离心管中, 在4℃下以13 000 g速度离心10 min, Lowry法测定膜蛋白含量. 0孔加100 μ L “标准稀释缓冲溶液”, 空白孔不加样, 标准液、质控和样本各加100 μ L到相应孔内, 加样前样本用“标准稀释缓冲溶液”10倍稀释(10 μ L样本+90 μ L “标准稀释缓冲溶液”), 加样后轻敲酶标板边缘使充分混匀, 黏上密封膜后在室温(20-25℃)下孵育2 h, 弃孔内液体, 吸水纸上拍干, 洗板液洗4次, 吸水纸上拍干洗板液后每孔加入“抗PLC γ -1抗体溶液”(空白孔不加), 轻敲酶标板边缘使充分混匀, 黏上密封膜后在室温(20-25℃)下孵育1 h, 弃孔内液体, 吸水纸上拍干, 洗板液洗4次, 吸水纸上拍干洗板液后每孔加入100 μ L “抗兔IgG辣根过氧化物酶抗体工作液”(空白孔不加), 黏上密封膜后在室温(20-25℃)下孵育30 min, 弃孔内液体, 吸水纸上拍干, 洗板液洗4次, 吸水纸上拍干洗板液后每孔加入100 μ L “显色原液”(注: 加入后的液体将慢慢变蓝), 黏上密封膜后在室温(20-25℃)下避光孵育30 min, 每孔加入100 μ L终止液终止显色反应, 轻敲酶标板边缘使混匀, 此时孔内液体由蓝变黄色, 以空白孔作为对照孔(“清零”)在酶标仪上读取吸光度值(加入终止液后2 h内读取吸光度值为最佳). 计算机自动拟合四参数曲线并计算样本内PLC γ -1浓度.

统计学处理 所有数据均以mean \pm SD表示, 采用SPSS 11.5统计软件进行单因素方差分析, 组间比较若方差齐时选择LSD法, 方差不齐时选

表1 各组大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性比较(mean \pm SD)

分组	PLC γ -1活性(nkat/g)
溃疡血清	6.5 \pm 0.3 ^a
胃经血清	13.0 \pm 7.5
胆经血清	7.2 \pm 1.8 ^a
胃经血清+PD153035	7.4 \pm 2.7 ^a
胆经血清+PD153035	5.5 \pm 0.3

^aP<0.05 vs 胃经血清组.

择Dunnnett T₃法进行方差分析和两两比较.

2 结果

大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性 胃经血清组大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性与溃疡血清组比较有显著性差异($P = 0.01 < 0.05$); 胃经血清组大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性与胆经血清组比较有显著性差异($P = 0.02 < 0.05$); 胃经血清组大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性与胃经血清+PD153035组比较有显著性差异($P = 0.02 < 0.05$) (表1).

以上结果提示: 针刺胃经穴后提取的血清能明显提高胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性, 经PD153035阻断EGF受体后其活性皆减退, 说明针刺后激发的经气可提高PLC γ -1的活性; 并且发现针刺胃经穴提取的血清与针刺胆经穴后提取的血清更加明显的增强PLC γ -1的活性, 说明经穴脏腑确实存在一定的特异性联系.

3 讨论

胃黏膜保护是指胃黏膜长期暴露于腔内各种理化因素的广泛变化而不受损伤的一种防御机制. 参与黏膜防御的各种因素被看成是一个相互联系相互作用的网络体系, 美国Wallow将此网络体系分成5级, 第一级包括分泌到胃腔内的各种具有防御功能的物质; 第二级是指黏膜上皮细胞之间形成的紧密连接能显著抵抗氢离子的逆向扩散, 上皮一旦受损还能进行快速重建与修复; 第三级为黏膜的微循环; 第四级是指黏膜的免疫系统; 最后一级则是黏膜损伤时, 上皮和腺体的修复和生长. 以往临床资料表明针刺足阳明经穴能增强胃黏膜的保护机制, 对胃肠疾病有很好的疗效, 实验研究显示针刺胃经穴位对胃电, 胃运动, 胃分泌, 胃黏膜血流量等均有明显调整作用, 并对胃黏膜损伤有很好的修复作用, 并且认为针刺对胃黏膜保护和修复效应与GAS, MTL, CCK, SP, VIP, SS等脑肠肽密切相关^[13-15].

■名词解释

针刺血清: 是指从针刺处理后的人或动物体上采集到的血清, 作为效应物质加入到另一个反应系统中, 同在体或离体器官、组织、细胞或分子等靶目标接触, 通过他们的功能或形态学的改变, 直接地观察针刺处理后产生的效应. 这比仅以症状体征的变化来评估针刺治疗的作用, 无论在观念或方法上都是, 一种重要的进步, 已引起了医药界人士的广泛关注.

■同行评价

本文探讨了针刺血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性的影响, 题目准确, 内容较先进, 设计合理, 结论可靠.

近年报道表皮生长因子受体(EGFR)在介导胃黏膜损伤修复过程中起着非常重要的作用, EGFR属于跨膜受体酪氨酸蛋白激酶家族, 他广泛分布于人体的上皮细胞膜上, 其信号可介导细胞的代谢、增殖、分化和迁移等生命现象^[16]. 很多研究表明在胃黏膜损伤修复中有EGFR的高度表达, 对胃黏膜的保护及其损伤的修复有很重要的作用^[17], 故EGFR及其下游信号转导通路及胃黏膜损伤修复的关系日益受到人们的关注与重视, 其效应是配体与EGFR结合可引起erbB家族成员内部二聚体受体复合物的形成, 激活该受体的酪氨酸蛋白激酶, 结合一个ATP分子, 启动一系列级联反应, 与下游含有SH2和PTB区域的信号分子(如PLC γ -1)结合, 并进一步激活IP $_3$ /Ca $^{2+}$ 和DG/PKC双信号系统以及Ras信号通路, 导致受体本身及细胞内酪氨酸残基的磷酸化, 从而引起细胞的分裂增殖^[18]. 针刺对胃黏膜损伤修复的信号转导机制是否通过EGFR介导PLC γ -1活化并进一步激活IP $_3$ /Ca $^{2+}$ 和DG/PKC双信号系统以及Ras信号通路目前尚未完全明了, 本试验结果提示针刺胃经穴后提取的血清能明显提高胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1活性, 经PD153035阻断EGF受体后其活性皆减退, 说明针刺胃经穴在胃黏膜损伤的修复过程中的确有体液机制的参与, 并且针刺胃经穴后所激发的经气可能通过EGR受体介导PLC γ -1活化并进一步激活IP $_3$ /Ca $^{2+}$ 和DG/PKC双信号转导通路, 从而诱导胃黏膜细胞的增殖; 本研究还发现针刺对照点后提取的血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1的表达明显弱于针刺胃经穴提取的血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1的表达, 但高于正常血清对胃溃疡大鼠胃黏膜细胞PLC γ -1的表达, 说明经穴脏腑确实存在一定的特异性联系, 其血清中存在的相关物质基础及其作用机制有待作进一步研究.

4 参考文献

- Sherman KJ, Cherkin DC, Eisenberg DM, Erro J, Hrbek A, Deyo RA. The practice of acupuncture: who are the providers and what do they do? *Ann Fam Med* 2005; 3: 151-158
- Eisenberg DM, Cohen MH, Hrbek A, Grayzel J, Van Rompay MI, Cooper RA. Credentialing complementary and alternative medical providers. *Ann Intern Med* 2002; 137: 965-973
- Lu W. Acupuncture for side effects of chemoradiation therapy in cancer patients. *Semin Oncol Nurs* 2005; 21: 190-195
- Yue ZH, Yan J, Chang XR, Lin YP, Yi SX, Cao XP, Shen J. Effects of cake-separated moxibustion on ultrastructures of endothelial cells of aorta in the rabbit of hyperlipemia. *Zhongguo Zhenjiu* 2005; 25: 64-67
- 张泓, 易受乡, 严洁, 常小荣, 刘玉群, 林亚平, 邓元江. 电针足三阳经穴对家兔脑肠肽类物质影响的比较研究. *中国临床康复* 2004; 8: 2290-2291
- 马淑兰, 杨永清, 崔龙萍, 张英英, 王宇. 针刺血清对高嗜酸粒细胞血症大鼠外周嗜酸粒细胞数目的影响. *针刺研究* 2002; 27: 145-148
- 杨永清, 崔龙萍, 马淑兰, 陈汉平, 王宇, 金明明. 过敏性哮喘大鼠针刺血清的抗哮喘作用. *上海针灸杂志* 2002; 21: 42-43
- 李建玲, 易红, 冯雪萍, 陈主初, 肖志强. 大鼠胃黏膜细胞EGFR通过ERK-1/2信号转导通路激活AP-1. *中国医师杂志* 2003; 5: 1170-1172
- 李瑞午, 张静龄, 郭莹, 李翠红. 针刺血清对体外培养神经细胞内钙离子浓度的影响. *中西医结合学报* 2004; 2: 453-455
- 聂时南, 李兆申, 湛先保, 许国铭, 屠振兴, 龚燕芳, 满晓华. 乳癌相关肽在应激诱导的胃黏膜损伤中的修复作用. *胃肠病学* 2002; 7: 14-17
- Lin WZ, Wang P. *Shiyan Zhenjiu Xue*. 1th edition. Shanghai: Shanghai Science and technology Publishing Press, 1999: 280-290
- 乔伟丽, 张咏梅, 阎长栋, 王琳. 改良的大鼠胃黏膜壁细胞分离方法. *徐州医学院学报* 2004; 24: 242-243
- 易受乡, 阳仁达, 严洁, 常小荣, 林亚平. 针刺对胃黏膜损伤家兔表皮生长因子、生长抑素及生长抑素受体基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1721-1723
- 李江山, 严洁, 常小荣. 电针足阳明经穴对家兔胃运动和胃动素的影响. *中国中医基础医学杂志* 2004; 10: 36-39
- 常小荣, 严洁, 林亚平, 易受乡, 刘辉. 针刺足阳明经穴对健康人血浆胃动素及胃泌素含量的影响. *中国中西医结合消化杂志* 2001; 9: 69-70
- Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1S-13S
- Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2958-2970
- Ford AC, Grandis JR. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. *Head Neck* 2003; 25: 67-73

电编 张敏 编辑 潘伯荣

逆转录病毒载体介导的端粒酶抑制基因促进肝癌细胞凋亡

马进财, 刘吉勇, 刘绍玲

马进财, 刘吉勇, 山东大学山东省立医院消化科 山东省济南市 250021
刘绍玲, 山东省医学影像学研究所 山东省济南市 250021
山东省医药卫生科研项目, No. CAIDBA3
通讯作者: 刘吉勇, 250021, 山东省济南市经五路324号, 山东省立医院消化科. mjcmjc@126.com
收稿日期: 2006-01-19 接受日期: 2006-01-24

Apoptosis of BEL-7402 cell line mediated by retroviral vector containing antisense human telomerase RNA

Jin-Cai Ma, Ji-Yong Liu, Shao-Ling Liu

Jin-Cai Ma, Ji-Yong Liu, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital of Shandong University, Jinan 250021, Shandong Province, China
Shao-Ling Liu, Shandong Provincial Medical Image Research Institute, Jinan 250021, Shandong Province, China
Correspondence to: Ji-Yong Liu, Department of Gastroenterology, Shandong Provincial Hospital of Shandong University, 324 Jingwu Road, Jinan 250021, Shandong Province, China. mjcmjc@126.com
Received: 2006-01-19 Accepted: 2006-01-24

Abstract

AIM: To investigate the apoptosis-inducing effect of retroviral vector containing antisense human telomerase RNA (hTR) on hepatocellular carcinoma (HCC) cell line BEL-7402.

METHODS: The complete virus was obtained by importing the sense and antisense hTR into the PT67 cell line with electroporation. Bel-7402 cell line was then transfected with the virus. The therapeutic effect was evaluated by cell growth curve. MTT assay and flow cytometry were used to investigate the apoptosis of BEL-7402 cells.

RESULTS: After transfection with retroviral vector, the growth of BEL-7402 cells was obviously inhibited. The apoptotic rate was significantly higher in the cells transfected with antisense hTR than that in the cells transfected with sense hTR and normal saline controls ($61.32\% \pm 2.24\%$ vs $23.02\% \pm 2.13\%$, $4.11\% \pm 1.00\%$, $P < 0.01$), and the apoptotic rate was more significant when the antisense hTR-transfected cells were treated with 5-FU ($71.71\% \pm 2.53\%$).

CONCLUSION: hTR can induce significant apoptosis of BEL-7402 cell line, and it plays a synergic role with 5-FU.

Key Words: Recombinant retroviral vector; Gene therapy; Hepatocellular cancer; Antisense human telomerase RNA

Ma JC, Liu JY, Liu SL. Apoptosis of BEL-7402 cell line mediated by retroviral vector containing antisense human telomerase RNA. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10):989-992

摘要

目的: 探讨逆转录病毒载体介导的反义端粒酶抑制基因对肝癌细胞系BEL-7402的凋亡诱导作用。

方法: 用电穿孔的方法把正、反义端粒酶抑制基因导入包装细胞, 包装出完整的病毒, 用此病毒感染肝癌细胞系BEL-7402, 绘制细胞生长曲线来研究其抗肿瘤疗效。应用MTT、流式细胞术研究细胞凋亡情况。

结果: 肿瘤细胞感染逆转录病毒后, 肿瘤生长受到明显抑制, 转染反义hTR病毒组BEL-7402细胞凋亡率显著高于转染正义hTR病毒和生理盐水组($61.32\% \pm 2.24\%$ vs $23.02\% \pm 2.13\%$, $4.11\% \pm 1.00\%$, $P < 0.01$), 转染反义hTR与5-FU联用细胞凋亡率更高, 为 $71.71\% \pm 2.53\%$ 。

结论: 反义端粒酶抑制基因能明显抑制肿瘤细胞的体外生长, 与抗肿瘤药物5-FU有协同作用, 联合用药可以增强疗效, 具有明显抗肿瘤作用。

关键词: 重组逆转录病毒载体; 基因疗法; 肝细胞癌; 反义hTR

马进财, 刘吉勇, 刘绍玲. 逆转录病毒载体介导的端粒酶抑制基因促进肝癌细胞凋亡. *世界华人消化杂志* 2006;14(10):989-992
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/989.asp>

0 引言

原发性肝癌为我国常见的恶性肿瘤之一, 也是

■背景资料

目前肝癌的治疗仍以手术切除为首选的治疗方案, 但手术切除的突出问题是术后的复发率高, 手术切除率低, 加上绝大多数患者在确诊时已属临床中晚期, 失去了手术治疗的机会。肝癌的基因治疗作为一种新的治疗方法, 越来越受到重视。

■ 研发前沿

在正常细胞恶变过程中, 癌基因激活或抑癌基因失活激活了端粒酶, 使染色体端粒稳定地维持在一定长度, 从而使癌细胞得以持续增殖. 因此端粒酶不但成为一种新的肿瘤标志物, 而且也成为肿瘤基因治疗的新理想靶点.

我国恶性肿瘤防治研究的重点. 肿瘤是细胞“增生性疾病”, 更是细胞死亡异常的疾病. 肿瘤细胞凋亡调控对于肿瘤的发生、发展有着极其重要的作用, 为人们认识和防治包括肝癌在内的恶性肿瘤及其他重大疾病指出了新的方向. 而端粒及端粒酶的发现更为肝癌的治疗增添了新的途径. 反义核酸技术特异性的封闭靶基因序列, 可从分子水平上抑制病毒基因的复制、转录和翻译, 从而达到抗病毒的目的. 我们旨在探讨反义端粒酶抑制基因诱导肝癌细胞凋亡, 抑制端粒酶活性, 从而抑制肝癌细胞的生长, 为肝癌基因治疗提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 包装细胞系PT67细胞购自上海中科院细胞库, NIH3T3购自山东医学科学院. 人肝癌细胞系BEL7402为本实验室常规保存. 含有新霉素磷酸转移酶II (NeoR)重组逆转录病毒载体pLXSN由本实验室常规保存. pLXSN-hTR-EcoRI和pLXSN-hTR-BamHI质粒由刘吉勇教授构建^[1]. PT67和NIH3T3细胞分别用含200 mL/L, 100 mL/L小牛血清的HG-DMEM培养液增殖, 维持液为含20 mL/L小牛血清的HG-DMEM培养液. 超速冷冻离心机, 为Beckman Coulter公司产品.

1.1.2 试剂 HG-DMEM、RPMI-1640、G418购自Gibco公司. 小牛血清购自杭州四季青公司. Annexin V、溴化内锭(PI)为美国Sigma公司产品.

1.2 方法

1.2.1 包装重组病毒 pLXSN-hTR-EcoRI和pLXSN-hTR-BamHI质粒用电穿孔的方法分别导入包装细胞系PT67细胞中. 分别将电转后的PT67细胞接种在24孔板上, 50 mL/L CO₂, 37℃孵箱中孵育24 h. 待细胞长到50%铺满时加入含有G418浓度为300 μg/mL HG-DMEM培养液培养2 wk, 挑选阳性克隆用HG-DMEM培养液培养.

1.2.2 病毒原液提取和滴度测定 待G418抗性PT67细胞长至近满瓶时提取培养液, 用0.45 μm的滤器进行过滤, 滤液在4℃ 20 000 g离心2 h, 离心管置于冰浴条件下, 1 mL/L完全营养液回悬沉淀, 回悬时使用同一吸管以避免损失, 约每15 min吹打一次, 避免产生气泡. 用pLXSN-hTR-EcoRI和pLXSN-hTR-BamHI质粒转染得到的病毒上清分别称为正义hTR病毒和反

义hTR病毒. 感染前24 h将NIH3T3细胞按1×10⁵/孔接种6孔板, 过夜. 感染当天, 移去培养液, 加入低血清的培养液1 mL, 分别加入两种方法浓缩的病毒上清以及浓缩以前的病毒上清各10 μL, 50 μL, 100 μL, 每种浓度各种两孔, 再加入800 mg/L的polybrene储液至终浓度8 mg/L. 37℃感染2-3 h, 加入低血清培养液3 mL将polybrene稀释至2 mg/L, 培养48 h. 用选择培养液1:4分传NIH3T3细胞, 培养3 d. 用含G418最小致死剂量400 mg/L的选择培养液, 共培养7-10 d后. 待克隆扩散前进行克隆计数. 按RCFU/mL = 克隆数/病毒原液体积来计算病毒滴度.

1.2.3 重组病毒感染BEL7402细胞及基因转导鉴定 感染前24 h将BEL7402细胞按1×10⁵/孔接种6孔板, 过夜. 感染当天, 移去培养液, 加入低血清的培养液1 mL, 分别加入浓缩的病毒上清100 μL, 再加入800 mg/L的polybrene储液至终浓度8 mg/L. 37℃感染2-3 h, 加入低血清培养液3 mL将polybrene稀释至2 mg/L, 继续培养. 选感染3 d的BEL7402细胞常规方法提取DNA, 进行PCR扩增及凝胶电泳, 如果BEL7402感染了重组逆转录病毒, 则在相应的区域出现条带.

1.2.4 细胞生长曲线 BEL7402细胞按1×10⁵/孔接种6孔板, 分别加反义hTR病毒+5-FU、反义hTR病毒、5-FU、正义hTR病毒+5-FU、正义hTR病毒和生理盐水. 各组分别命名为A、B、C、D、E、F组, 以下分组方法相同. 在第1, 3, 5, 7天分别取各组细胞以4 g/L台盼蓝拒染的方法计数活细胞, 绘出生长曲线, 并按下列公式计算细胞生长抑制率. 细胞生长抑制率 = (对照组细胞数-处理组细胞数)/对照组细胞数×100%.

1.2.5 MTT对细胞增殖凋亡的检测 BEL7402细胞按1×10³/孔接种96孔板, 于24, 48, 72 h分别加入反义hTR病毒、5-FU、反义hTR病毒+5-FU、正义hTR病毒+5-FU、正义hTR病毒和生理盐水, 每组5个复孔. 于24, 48, 72 h分别加MTT 20 μL, 37℃孵育4 h后终止培养, 吸净上清, 每孔加SDS 200 μL振荡10 min, 使结晶充分溶解. 490 nm酶联免疫检测仪测吸光值.

1.2.6 流式细胞仪对细胞凋亡的检测 BEL7402细胞按1×10⁵/孔接种6孔板, 细胞长至50%铺满时分别加反义hTR病毒、5-FU、反义hTR病毒+5-FU、正义hTR病毒+5-FU、正义hTR病毒和生理盐水. 72 h进行流式细胞检测. 采用Annexin V加溴化内锭(PI)双染分析方法. 具体操作步骤

1 2 3 4

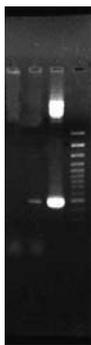


图 1 PCR凝胶电泳图谱. 1: 阴性对照; 2: 逆转录病毒感染的细胞; 3: 阳性对照; 4: 100 b DNA ladder Marker.

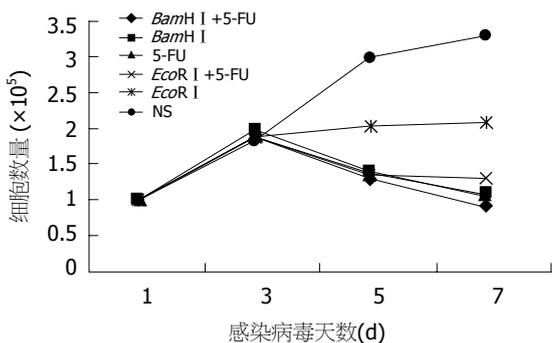


图 2 感染病毒后肝癌细胞BEL7402生长曲线.

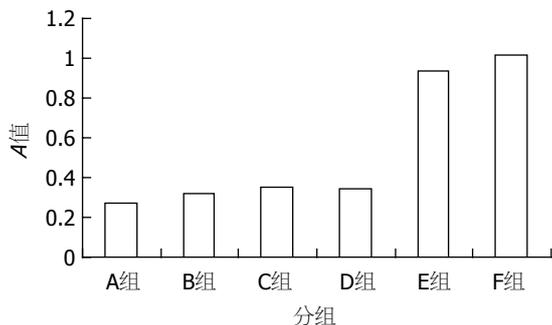


图 3 MTT检测病毒感染后肝癌细胞BEL7402生长抑制情况.

按说明书进行, 染色后Annexin V 阳性加PI阴性者为凋亡细胞. 流式细胞仪检测凋亡率.

2 结果

2.1 病毒滴度及基因转导鉴定(图1) 浓缩逆转录病毒滴度为 0.95×10^6 . 目的基因片段为490 bp, 加上基因载体上的引物片段50 bp共540 bp. 从图1可以看出阴性对照在540 bp处没有条带, 说明其不含有目的基因. 而逆转录病毒感染的细胞、阳性对照在540 bp处有条带, 说明病毒感染的细胞含有目的基因.

2.2 细胞生长曲线及细胞生长抑制率 从表1细胞生长抑制率可以看出随时间延长, 细胞生长抑制率逐渐增大, A组最明显(表1), 生长曲线见图2.

表 1 细胞生长抑制率

分组	时间		
	3 d	5 d	7 d
A组	-0.022	0.567	0.727
B组	-0.076	0.533	0.679
C组	-0.027	0.54	0.67
D组	-0.021	0.547	0.6
E组	-0.021	0.32	0.36
F组			

表 2 流式细胞检测结果 (mean \pm SD, %)

分组	凋亡细胞比率
A组	71.71 \pm 2.53
B组	61.32 \pm 2.24
C组	36.82 \pm 2.42
D组	36.46 \pm 1.71
E组	23.02 \pm 2.13
F组	4.11 \pm 1.00

■应用要点

反义hTR与5-FU联合用药, 可以提高疗效, 相应减少5-FU的用量, 降低其毒副作用, 对于治疗肝癌有一定价值.

2.3 MTT检测结果 MTT检测病毒感染后肝癌细胞BEL7402生长抑制情况, 发现各组生长中A组生长抑制最明显(图3).

2.4 流式细胞检测结果 除C、D两组之间外, 其余各组之间 $P < 0.01$, 有显著差异(表2).

3 讨论

端粒酶是由小分子RNA和蛋白质组成的一种特殊核糖核蛋白逆转录酶. 人端粒酶包括3个组分: 端粒酶RNA(human telomerase RNA, hTR)、端粒酶相关蛋白(telomerase-associated protein, TEP I)和端粒酶催化亚单位(telomerase catalytic subunit, hTERT). 端粒酶以自身hTR为模板, 逆转录合成端粒, 端粒是染色体末端的保护性结构, 为一段高度重复的碱基序列, 其作用是维持染色体的稳定性和完整性, 防止染色体断裂和重组.

绝大多数正常体细胞端粒酶呈阴性, 端粒在细胞分裂过程中逐渐缩短, 使细胞进入衰老状态, 即第一死亡期(M1期), 细胞停止分裂而死亡, 若细胞被病毒感染或抑癌基因突变, 则可越过M1期继续分裂, 端粒渐缩短直至达到关键阈值, 即第二死亡期(M2期), 绝大多数细胞死亡, 极少数细胞在此阶段激活端粒酶使端粒功能恢复, 细胞永生化和发展成为肿瘤细胞. 端粒酶通过维持端粒长度, 在细胞衰老、永生化和癌变

过程中发挥重要作用. 他的表达水平与恶性肿瘤的发生、发展和预后密切相关, 因此已成为新的肿瘤标志物和治疗靶点. 在绝大多数恶性肿瘤细胞中高表达, 他通过延长端粒而维持肿瘤细胞的持续增殖能力. 因此, 端粒酶不但成为一种新的肿瘤标志物, 而且也成为肿瘤基因治疗的新理想靶点.

由于反义核酸技术特异性封闭靶基因序列, 可以从复制、转录和翻译水平发挥作用, 具有高稳定性和特异性. 因而在基因调控及治疗中备受重视. 研究报道hTR的反义核酸可以抑制端粒酶的活性, 从而抑制肿瘤细胞的增殖生长^[2-3]. 已有文献报道反义hTR对乳腺癌、宫颈癌、胃癌和结直肠癌等多种肿瘤细胞有抑制作用^[4-7]. 有研究表明, 以hTR为靶目标的反义基因治疗能抑制端粒酶活性并进一步诱导肿瘤细胞凋亡^[8-9].

本研究发现反义hTR抑制肿瘤细胞生长, 引起细胞凋亡具有时间依赖性^[7]. 肿瘤细胞在其端粒酶受到抑制后仍需经过一些细胞分裂周期才出现凋亡. 推测可能由于端粒酶活性被抑制后需经过一段时间大量消耗的端粒无法补充才导致细胞死亡. 这与Feng *et al*^[5]报道的用反义hTR转染人Hela细胞增殖23-26个周期以后细胞开始死亡结果较接近. 反义hTR与5-FU有明显的协同作用, 联合用药, 可以提高疗效, 同时可以相应

减少5-FU的用量, 减少其毒副作用. 反义hTR治疗肝癌具有潜在的临床应用价值.

4 参考文献

- 1 王丛笑, 刘吉勇, 赵跃然, 焦玉莲, 马春燕, 杨崇美. 正反义人端粒酶RNA组分(hTR)逆转录病毒真核表达载体的构建. 中国肿瘤生物治疗杂志 2005; 12: 51
- 2 Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 787-791
- 3 Kushner DM, Paranjape JM, Bandyopadhyay B, Cramer H, Leaman DW, Kennedy AW, Silverman RH, Cowell JK. 2-5A antisense directed against telomerase RNA produces apoptosis in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* 2000; 76: 183-192
- 4 Bisoffi M, Chakerian AE, Fore ML, Bryant JE, Hernandez JP, Moyzis RK, Griffith JK. Inhibition of human telomerase by a retrovirus expressing telomeric antisense RNA. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1242-1249
- 5 Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269: 1236-1241
- 6 张晓伟, 童坦君. 端粒酶反义腺病毒载体对乳腺癌细胞MCF-7端粒酶的抑制作用. 中华病理学杂志 2000; 29: 188-191
- 7 王智勇, 徐文怀, 田凤军, 王振军, 吕英谦, 鞠晓明, 朱静. 反义人类端粒酶RNA逆转录病毒载体构建及其对结直肠癌细胞的抑制作用. 中华胃肠外科杂志 2003; 6: 36-39
- 8 谢万灼, 林茂芳. 端粒酶RNA的反义寡核苷酸诱导白血病细胞凋亡的研究. 中华血液学杂志 2001; 22: 245-248
- 9 陈拥军, 朱正纲, 冯润华, 李建芳, 刘炳亚, 尹浩然. 反义人端粒酶RNA组分基因对胃癌细胞端粒酶活性的影响. 消化外科 2002; 1: 185-189

电编 张敏 编辑 王瑾晖

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

·消息·

第十八届全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议

本刊讯 第十八届全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议将于2006-08在哈尔滨举行, 现将征文通知如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文(3000字), 结构性摘要(1000字), 电脑打印(附软盘)或E-mail, 2006-05-31截稿.

2 联系方式

哈尔滨市南岗区学府路45号解放军第211医院中医科 孙旗立; 邮编: 150080; 电话: 0451-57752440; E-mail: 211zyke@163.com.

壳聚糖体外抗幽门螺杆菌的作用及其影响因素

郑铁生, 王亚娜, 宗爱萍

郑铁生, 江苏大学医学技术学院 江苏省镇江市 212001
王亚娜, 宗爱萍, 镇江科力生物技术有限公司 江苏省镇江市 212001
高校基金资助项目, No. 2291270004
通讯作者: 郑铁生, 212001, 江苏省镇江市东吴路2号, 江苏大学医学技术学院. jsdxzts@163.com
电话: 0511-5039779 传真: 0511-4438079
收稿日期: 2006-01-25 接受日期: 2006-02-13

In vitro action of chitosan against *Helicobacter pylori* and its influential factors

Tie-Sheng Zheng, Ya-Na Wang, Ai-Ping Zong

Tie-Sheng Zheng, College of Medical Science Technology, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Ya-Na Wang, Ai-Ping Zong, Zhenjiang Koly Biology-Technology Cooperation Limited, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Supported by the Fund for Higher Education, No. 2291270004

Correspondence to: Tie-Sheng Zheng, College of Medical Science Technology, Jiangsu University, 2 Dongwu Road, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China. jsdxzts@163.com

Received: 2006-01-25 Accepted: 2006-02-13

Abstract

AIM: To investigate the *in vitro* action of the chitosans against *Helicobacter pylori* and its influential factor.

METHODS: Stiletto method was used to examine the inhibitory effect of chitosans at different concentrations and pH values on three strains of *H pylori*, including SSI and two other strains isolated from patients. Bacteriostatic test was performed to explore the molecular weight and metal ion on the bacteriostatic activity of chitosans against *H pylori*.

RESULTS: Chitosans had inhibitory effect on all the three kinds of *H pylori* strains, and the effects were not significantly different between the three strains ($P > 0.05$). Within the scopes of pH8.5-5.5, the action of chitosan on *H pylori* strengthened with the lowering of the pH value ($P < 0.01$). Chitosans at different concentrations

had marked difference in suppressing *H pylori* ($P < 0.01$), and the action reached the peak when it is at 40 g/L. As the chitosans weighted less than 400 000 u, the bacteriostatic activity increased first and then decreased, and the chitosan weighing 10-200 000 u had the strongest action, lasting 134 h. The bacteriostatic activity of chitosans decreased with the increase of Na^+ and Mg^{2+} concentrations.

CONCLUSION: Chitosan has inhibitory action against *H pylori in vitro*, and the action is strengthened in acid condition. The weight of chitosans and the concentrations of metal ion can affect the bacteriostatic activity of the chitosans.

Key Words: Chitosan; *Helicobacter pylori*; Bacteriostatic activity

Zheng TS, Wang YN, Zong AP. *In vitro* action of chitosan against *Helicobacter pylori* and its influential factors. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10): 993-996

摘要

目的: 研究壳聚糖在体外抗幽门螺杆菌的作用及其影响因素, 为临床应用壳聚糖治疗胃病提供实验依据。

方法: 采用打孔法检测不同浓度和不同pH值壳聚糖对*H pylori*标准菌株SSI和两株患者体内分离出的*H pylori*菌株的抑菌作用。并采用抑菌试验探讨不同分子量壳聚糖及金属离子对壳聚糖抗*H pylori*作用的影响。

结果: 壳聚糖对3种*H pylori*菌株均有抑菌作用, 且在3株不同*H pylori*菌株间无差异($P > 0.05$); 在pH8.5-5.5范围内, 随着pH值降低, 壳聚糖的抗*H pylori*作用增强($P < 0.01$); 不同浓度的壳聚糖对*H pylori*的抑菌作用有非常显著差异($P < 0.01$), 在40 g/L时达高峰。壳聚糖分子量在400 ku以内, 随着分子质量的升高, 其抑菌活性为先升高后降低。分子质量为10-200 ku的抗*H pylori*作用最强, 抑菌时间长达134 h。NaCl、MgCl₂等金属离子对壳聚糖的抗*H pylori*作用有影响, 且随浓度的增大, 其

背景资料

壳聚糖(chitosan, CTS)是作者从地壳产龙虾壳中提取出的甲壳素经脱乙酰基的产物。这种碱性氨基多糖, 具有天然抗菌活性, 且抗菌广谱, 但对*H pylori*的抑制作用, 未见报道。

■ 研发前沿

*H pylori*与消化系统疾病的关系十分密切,但其耐药菌株的出现使该病的治疗十分困难,是困扰消化内科医生的一个现实问题。因此,探讨治疗*H pylori*新的药物,已成为目前的研究热点。作者应用壳聚糖进行体外抑制*H pylori*实验,取得了较好效果,值得进一步探讨。

抑菌百分率下降。

结论:壳聚糖在体外对*H pylori*有抑菌作用,并且此作用在酸性条件下明显加强。不同分子量壳聚糖及金属离子对壳聚糖抗*H pylori*作用有影响。

关键词:壳聚糖;幽门螺杆菌;抑菌作用

郑铁生, 王亚娜, 宗爱萍. 壳聚糖体外抗幽门螺杆菌的作用及其影响因素. 世界华人消化杂志 2006;14(10):993-996

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/993.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H pylori*)是人类常见的致病菌,他的感染不但与B型胃炎和消化性溃疡的发生密切相关^[1],而且与非溃疡性消化不良,淋巴组织(MALT)淋巴瘤和胃癌等也有重要关系^[2-3]。其致病物质有尿素酶、细胞相关毒素、空泡毒素(VacA)和cag致病岛(cag pathogenicity island, cag PAI)等^[4-5]。在我国胃病是一种严重危害人民健康的常见病、多发病,因此,寻找抗*H pylori*药物,防治各种类型胃病具有重要意义。壳聚糖是一个来源丰富、无毒、可吸收降解的天然氨基葡聚糖,具有广谱的抗菌性能。近年来国内外学者研究发现壳聚糖可抑制大肠杆菌、沙门菌属、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、李斯特单核细胞增生菌、小肠结肠炎耶尔森菌、链球菌、霍乱弧菌、志贺痢疾杆菌、产气单胞菌属及某些真菌的生长^[6-7]。但对*H pylori*抑制作用的报道较少,为此本文研究了壳聚糖体外抗幽门螺杆菌的作用,并对其影响因素作了探讨,为临床应用壳聚糖治疗胃病提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 *H pylori*标准菌株 为Sydney Strain I(SS1)*H pylori*标准菌株,江苏大学医学技术学院提供。从十二指肠溃疡患者(*H pylori*_D)和胃溃疡患者(*H pylori*_G)胃窦黏膜分离出的*H pylori*菌两株,由江苏大学附属医院提供。

1.1.2 培养基 空肠弯曲菌选择性琼脂培养基、营养琼脂培养基,由江苏大学附属医院提供。

1.1.3 壳聚糖 不同分子量壳聚糖(M_r 为1-40.2万),脱乙酰度80%-90%,由镇江科力生物技术有限公司提供。

1.2 方法

表 1 不同浓度壳聚糖在不同pH下对*H pylori*的抑菌环($n = 3$, mean \pm SD)

壳聚糖 (g/L)	pH5.5	pH6.5	pH8.5
0	1.42 \pm 0.32	0	0
10	3.32 \pm 0.15	2.15 \pm 0.12	0
20	9.28 \pm 0.22	7.16 \pm 0.16	0
30	14.91 \pm 0.25	11.91 \pm 0.10	1.93 \pm 0.16
40	16.88 \pm 0.26	14.35 \pm 0.13	2.36 \pm 0.27
50	16.86 \pm 0.31	14.33 \pm 0.11	2.42 \pm 0.23
P值	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$

3种pH值之间比较 $P < 0.01$ 。

表 2 不同浓度壳聚糖在pH5.5时对3株*H pylori*的抑菌环($n = 3$, mean \pm SD)

壳聚糖 (g/L)	SSI	<i>H pylori</i> _D	<i>H pylori</i> _G
0	1.56 \pm 0.25	1.33 \pm 1.8	1.46 \pm 0.28
10	3.28 \pm 0.27	3.26 \pm 0.23	3.29 \pm 0.21
20	9.26 \pm 0.34	9.31 \pm 0.28	9.27 \pm 0.42
30	15.6 \pm 0.45	15.1 \pm 0.52	15.3 \pm 0.38
40	16.9 \pm 0.28	16.3 \pm 0.56	16.4 \pm 0.32
50	16.8 \pm 0.29	16.7 \pm 0.16	16.5 \pm 0.36
P值	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$

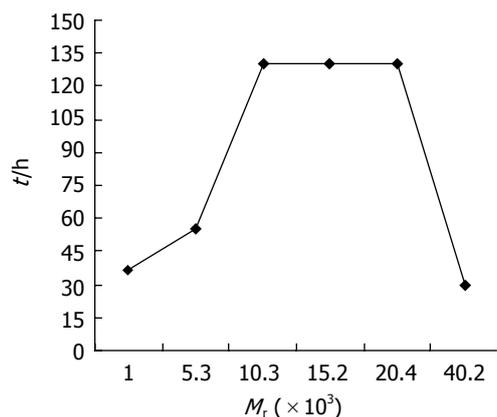
1.2.1 细菌培养 将SSI *H pylori*菌株和患者体内分离出的*H pylori*菌株接种在含75 mL/L无菌羊血的培养基上,微需氧条件下(50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂、850 mL/L N₂),37℃培养3 d后,用布氏肉汤洗脱细菌并收集配成含*H pylori*菌 4×10^{12} /L的布氏肉汤。

1.2.2 抑菌试验方法 取直径9 cm培养皿,培养基厚约6 mm,取含*H pylori*菌 4×10^{12} /L的布氏肉汤*H pylori*菌液0.5 mL,均匀涂布于培养基上,待干燥后,采用打孔法在培养基上打直径4 mm孔,分别向各孔加入壳聚糖试验溶液,加入量为加平每孔,对照孔分别加入含相应浓度乙酸的蒸馏水。培养3 d,测量抑菌环直径,每一浓度做3个孔,取平均值。

1.2.3 壳聚糖抑菌试验 称取壳聚糖(M_r 10.3万)干粉适量,分别溶于含10 mL/L、20 mL/L冰乙酸和不含冰乙酸的灭菌蒸馏水中,壳聚糖的浓度分别为10 g/L、20 g/L、30 g/L、40 g/L、50 g/L。pH分别为8.5、6.5和5.5。放置24 h,待壳聚糖完全溶解后按上述方法试验。另取pH5.5的不同浓度壳聚糖溶液,对上述3株*H pylori*菌悬液用本文方法试验。

2 结果

2.1 不同浓度壳聚糖在不同pH值下的抗*H pylori*

图1 不同分子质量壳聚糖对*H pylori*作用的影响。

作用(表1,2) 壳聚糖在pH5.5时对3株*H pylori*菌株的抑菌作用无差异($P>0.05$). 但不同pH值的壳聚糖溶液的抑菌作用有显著差异($P<0.01$), 进一步行 q 检验发现, 各组之间也有非常显著的差异($P<0.01$), 随着pH值的降低, 壳聚糖的抑菌作用增强. 同样不同浓度的壳聚糖溶液的抑菌作用也有非常显著差异($P<0.01$), 进一步行 q 检验发现, 在pH为6.5和5.5的壳聚糖溶液中浓度为20 g/L、30 g/L、40 g/L的各组之间均有显著性差异($P<0.01$), 随着浓度的增加, 壳聚糖的抑菌作用增强, 但40 g/L以后, 浓度增加, 抑菌作用不再增加($P>0.05$).

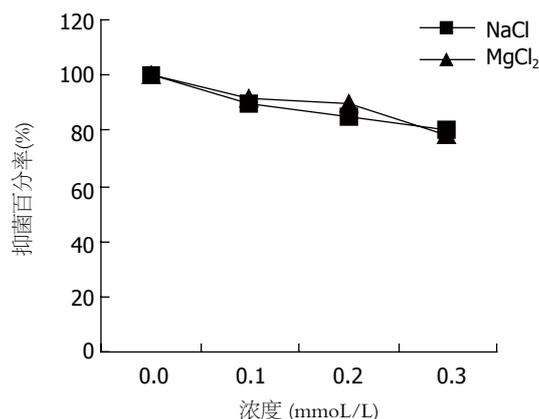
2.2 壳聚糖抗*H pylori*作用的影响因素

2.2.1 不同分子质量壳聚糖对*H pylori*作用的影响

各取 M_r 为1万、5.3万、10.3万、20.4万、40.2万壳聚糖(脱乙酰度为80%-90%)1 g, 溶于1 mL/L乙酸, 且用1 mol/L NaOH溶液或1 mL/L乙酸调至pH5.5(用pH计检测), 定容到100 mL, 分别得不同分子质量的10 g/L壳聚糖溶液. 取此液1 mL, 分别加入熔化并冷却至40℃的营养琼脂培养基(pH 6.0)9 mL, 摇匀凝固制成双碟平板, 使壳聚糖的最终浓度为1 g/L, 然后划线接种*H pylori*菌, 将平板置于37℃恒温箱培养, 分别在19、38、62、86、110、134 h观察菌生长情况, 从是否长菌和抑菌时间上判断抑菌活性的强弱. 由(图1)说明, M_r 在40万以内, 随着壳聚糖分子质量的升高, 壳聚糖的抑菌活性为先升高后降低. M_r 为10-20万时抗*H pylori*作用最强, 抑菌时间长达134 h.

2.2.2 金属离子对壳聚糖抗*H pylori*作用的影响

在pH5.5的40 g/L壳聚糖溶液中分别加入NaCl(A.R)、MgCl₂(A.R), 使其浓度为0.1、0.2、

图2 金属离子对壳聚糖抗*H pylori*作用的影响。

0.3 mmol/L, 作用1 h, 对*H pylori*做抑菌试验. 方法是取等量的菌悬液与待测样品溶液, 置恒温摇床上150 r/min下培养1 h, 混合均匀取一定量混合液在营养琼脂培养基上涂布均匀, 置恒温培养箱中37℃下培养24-48 h, 取出观察各个平板上的细菌生长情况. 计算抑菌百分率, 同时做空白和乙酸(pH 5.5)对照. 由(图2)可知, NaCl、MgCl₂等金属离子对壳聚糖的抗*H pylori*作用有影响, 且随浓度的增大, 其抑菌百分率下降.

3 讨论

壳聚糖抑菌作用的研究是近几年才开展的, 已有报道他对许多细菌和真菌有抑制作用^[7]. 本研究发现壳聚糖无论是对*H pylori*的标准菌株, 还是对从临床患者体内分离出的*H pylori*菌株均有一定抑制作用, 提示他对*H pylori*菌有普遍的抑菌作用. 壳聚糖体外对*H pylori*的抑菌作用, 在酸性条件下明显加强, pH为8.5时, 其抑菌作用很弱, pH6.5时抑菌作用增强, 当*H pylori*为5.5时其抑菌作用最强. 同样壳聚糖的抑菌作用也需要一定的浓度, 在酸性条件下从20 g/L到40 g/L随着浓度的增加抑菌作用增强, 但浓度增加到40 g/L以后, 抑菌作用不再增强, 当浓度为30 g/L时抑菌环直径已达15 mm, 表明壳聚糖在pH5.5时, 浓度为30-40 g/L时在体外对*H pylori*菌有较好的抑菌作用(表1,2). 本试验结果还表明, 壳聚糖的抑菌作用与分子质量的大小有关. 低分子质量壳聚糖有一定杀菌作用, 是因为分子质量小, 容易进入细胞壁的空隙结构内, 干扰细胞的新陈代谢, 达到杀菌目的. 高分子质量壳聚糖具有较强的抑菌作用, M_r 为10-20万的壳聚糖抗*H pylori*作用最强, 抑菌时间长达134 h(图1). 其抗

■ 创新盘点

本研究发现壳聚糖在体外对*H pylori*有明显的抑制作用, 且在酸性条件下(pH5.5)明显加强; 不同分子质量壳聚糖对*H pylori*的抑制作用有影响, M_r 在10-20万的壳聚糖抗*H pylori*作用最强; NaCl、MgCl₂等金属离子对壳聚糖的抗*H pylori*作用有影响, 且随着浓度的增加, 其抑菌百分率下降.

■应用要点

壳聚糖对*H pylori*有明显抑制作用,且在酸性条件下抑菌效果最好,尤其适应胃内的酸性环境,为临床应用壳聚糖治疗*H pylori*引发的胃病提供了依据。

菌性能可能源于抗菌基团-NH₄⁺,且高分子质量壳聚糖具有成膜特性,能在细胞表面形成足够致密的膜。但NaCl、MgCl₂等金属离子对壳聚糖的抗*H pylori*作用有影响,且随浓度的增大,其抑菌百分率下降(图2),应用时需注意。

*H pylori*在体外虽然对多种抗菌药物敏感,但在体内任何一种药物对*H pylori*的根除率均不高,抗菌药不能耐受胃内的酸性环境是其原因之一。壳聚糖在酸性条件下能更好地发挥抗菌作用,他的抗菌机制可能为多聚阳离子与细菌表面的阴离子交联,从而改变细菌膜的渗透性。他除了具有抗菌作用外,还有中和胃酸^[8]、增强抗菌药作用、调节免疫功能^[9]等功效。壳聚糖抑制*H pylori*生长的机理目前尚不清楚,有待于进一步研究。

4 参考文献

- 1 Le'Negrato G, Ricci V, Hofman V, Mograbi B, Hofman P, Rossi B. Epithelial intestinal cell apoptosis induced by *Helicobacter pylori* depends on expression of the cag pathogenicity island phenotype. *Infect Immun* 2001; 69: 5001-5009
- 2 Morgner A, Lehn N, Andersen LP, Thiede C, Bennedsen M, Trebesius K, Neubauer B, Neubauer A, Stolte M, Bayerdorffer E. *Helicobacter heilmannii*-associated primary gastric low-grade MALT lymphoma: complete remission after curing the infection. *Gastroenterology* 2000; 118: 821-828
- 3 Hiyama T, Haruma K, Kitadai Y, Kitadia Y, Masuda H, Miyamoto M, Ito M, Kamada T, Tanaka S, Uemura N, Yoshihara M, Sumii K, Shimamoto F, Chayama K. Clinic pathological features of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: a comparison with diffuse large B cell lymphoma component. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 734-739
- 4 Backert S, Schwarz T, Miehlke S, Kirsch C, Sommer C, Kwok T, Gerhard M, Goebel U, Lehn N, Koenig W, Meyer T. Functional analysis of the cag pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from patients with gastritis, peptic ulcer, and gastric cancer. *J Infect Immun* 2004; 72: 1043-1056
- 5 王华, 邵世和, 李良菊. 幽门螺杆菌cag致病岛的研究进展. *江苏大学学报(医学版)* 2005; 15: 173-177
- 6 湛学军, 熊远珍, 柳喆, 谢大泽. 羧甲基壳聚糖银的合成及抑菌实验的研究. *中国生化药物杂志* 2001; 22: 142-144
- 7 刘碧源, 高仕英. 壳聚糖及其衍生物的抗微生物活性研究进展. *中国生化药物杂志* 2003; 24: 268-270
- 8 万瑞香, 隋忠国, 曹玉. 壳聚糖抑酸功效研究. *海洋科学* 2001; 25: 8-9
- 9 吕中明, 石根勇, 陈新霞, 凌宝银, 张惠菊, 胡启之. 壳聚糖免疫调节作用的研究. *实用预防医学* 2001; 8: 330-332

电编 李琪 编辑 王瑾晖

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

·消息·

第十届全军普通外科学术会议征文通知

本刊讯 由解放军普通外科专业委员会主办,南京军区福州总医院承办的“第十届全军普通外科学术会议”拟定于2006-07在福州举行.会议采用院士论坛、专题报告等形式,对普通外科近年来的新技术、新方法及发展趋势进行介绍和讨论.欢迎军内外普通外科医师参加会议.

1 征文内容

有关普通外科疾病的诊断、治疗的基础和临床研究及护理内容.

2 征稿要求

- 2.1 要求中文全文(4000字以内)及摘要(500字以内)各1份.稿件请寄软盘(Word 格式),欢迎用电子邮件方式投稿.
- 2.2 来稿请注明单位、作者姓名、邮编及联系电话(请自留底稿,恕不退稿),请在信封左下角注明“会议征文”字样.
- 2.3 来稿请寄: 邮编: 350025 福建省福州市西二球路156号 南京军区福州总医院普通外科 王烈收. 电子邮件地址: www.fzptwk@public.fz.fj.cn 传真: 0591-83796855, 电话: 0591-24937077, 军线: 0611-97077, 959770.

中药泻心汤对大鼠胃排空和胃肠激素的影响

刘晓霓, 牛欣, 司银楚, 金秀东

刘晓霓, 金秀东, 牡丹江医学院生理教研室 牡丹江市 157011
牛欣, 北京中医药大学生理教研室 北京市 100029
司银楚, 北京中医药大学解剖教研室 北京市 100029
通讯作者: 刘晓霓, 157011, 牡丹江市通乡路3号, 牡丹江医学院
生理教研室. lxnixm@126.com
电话: 010-6582156-3384
收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-03-13

Influence of *Xiexin decoction* on gastric emptying and gastrointestinal hormones in rats

Xiao-Ni Liu, Xin Niu, Yin-Chu Si, Xiu-Dong Jin

Xiao-Ni Liu, Xiu-Dong Jin, Department of Physiology, Mudanjiang Medical College, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China
Xin Niu, Department of Physiology, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China
Yin-Chu Si, Department of Anatomy, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China
Correspondence to: Xiao-Ni Liu, Department of Physiology, Mudanjiang Medical College, 3 Tongxiang Road, Mudanjiang 157011, Heilongjiang Province, China. lxnixm@126.com
Received: 2006-02-06 Accepted: 2006-03-13

Abstract

AIM: To observe the effect of *Banxia* (BX), *Shengjiang* (SJ) and *Gancao* (GC) *Xiexin decoction* on the gastric evacuation and secretion of gastrointestinal hormones.

METHODS: Sixty rats were randomly and averagely divided into control group, BX, SJ and GC group. The rats in BX, SJ, and GC group were treated with the decoctions of BX, SJ, and GC respectively [5.67, 7.42, 5.36 g/(kg·d)]. Gastric residue was observed in all the rats with a marker of dextran blue-2000 to determine the capacity of gastric emptying. The levels of gastrointestinal hormones, including vasoactive intestinal peptide (VIP), substance P (SP), somatostatin (SS), gastrin (GAS), and motilin (MTL), in rat blood were measured by radioimmunoassay.

RESULTS: In comparison with that in the normal controls (99.9% ± 32.2%), gastric residue decreased significantly in BX group (66.1% ± 21.1%, $P = 0.014$) and increased significantly in SJ group (141.8% ± 21.1%, $P = 0.012$), while it didn't change notably in GC group. The levels of VIP and SP were markedly lower in BX group than those in the normal controls (348.1 ± 102.5 ng/L vs 445.8 ± 101.9 ng/L, $P = 0.032$; 47.0 ± 15.2 ng/L vs 63.0 ± 14.7 ng/L, $P = 0.011$). The levels of SS was markedly higher in BX and SJ group than those in the controls (562.3 ± 149.7, 553.9 ± 98.9 ng/L vs 461.7 ± 77.0 ng/L, $P = 0.014$ and $P = 0.023$, respectively). The levels of GAS and MTL were obviously higher in SJ (70.7 ± 11.9 ng/L, $P = 0.011$; 205.0 ± 22.0 ng/L, $P = 0.001$) and GC group (79.7 ± 9.3 ng/L, $P = 0.001$; 205.1 ± 43.1 ng/L, $P = 0.014$) than those in the controls (56.0 ± 11.5 ng/L; 162.6 ± 19.5 ng/L).

CONCLUSION: Three decoctions have different effects on the gastric motility and secretion of gastrointestinal hormones.

Key Words: Gastric evacuation; Gastrointestinal hormone; *Xiexin decoction*

Liu XN, Niu X, Jin XD, Si YC. Influence of *Xiexin decoction* on gastric emptying and gastrointestinal hormones in rats *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006; 14(10): 997-1000

摘要

目的: 观察半夏泻心汤(BX)、生姜泻心汤(SJ)和甘草泻心汤(GC)对大鼠胃排空及胃肠激素的影响。

方法: 60只SD大鼠随机分为正常对照组($n = 15$)、半夏泻心汤组($n = 15$)、生姜泻心汤组($n = 15$)和甘草泻心汤组($n = 15$), 大鼠连续灌胃7 d, 半夏、生姜和甘草泻心汤组给药量分别为 5.67, 7.42, 5.36 g/(kg·d); 通过测定大鼠胃内标记物—葡聚糖蓝的相对残留率来观察胃排空能力; 采用放射免疫学的方法测定大鼠血中胃肠激素的含量。

■背景资料

类方是在一个方剂的基础上, 通过药味或药量的变化而演变产生的一组在功能主治上既有联系又有差异的方剂群。现代学者认为, 研究一组类方的化学变化及其作用环节、靶点的本质变化规律, 将为揭示复方配伍规律的科学内涵提供可能的理论和方法学基础。本文以半夏、生姜和甘草泻心汤为研究对象, 观察三类方对胃运动及其胃肠激素的影响, 为其功能主治差异提供实验理论依据。

结果:与正常对照组(99.9% ± 32.2%)相比,半夏泻心汤组(66.1% ± 21.1%, $P = 0.014$)胃内色素相对残留率明显减少,生姜泻心汤组(141.8% ± 21.07%, $P = 0.012$)胃内色素相对残留率明显增加,甘草泻心汤胃排空作用不明显.与正常对照组相比,半夏泻心汤组的血管活性肠肽(VIP)、P物质(SP)水平下降显著(348.1 ± 102.5 ng/L vs 445.8 ± 101.9 ng/L, $P = 0.032$; 47.0 ± 15.2 ng/L vs 63.0 ± 14.7 ng/L, $P = 0.011$);半夏、生姜泻心汤组生长激素(SS)水平明显升高(562.3 ± 149.7 , 553.9 ± 98.9 ng/L vs 461.7 ± 77.0 ng/L, $P = 0.014$ 和 $P = 0.023$);生姜、甘草泻心汤组胃泌素(GAS)水平(70.7 ± 11.9 , 79.7 ± 9.3 ng/L vs 56.0 ± 11.5 ng/L, $P = 0.011$ 和 $P = 0.001$)、胃动素(MTL)水平(205.0 ± 22.0 , 205.1 ± 43.1 ng/L vs 162.6 ± 19.5 ng/L, $P = 0.001$ 和 $P = 0.014$)显著升高.

结论:三泻心汤对大鼠胃排空及胃肠激素的影响存在差异,可能是三方功能主治差异的原因之一.

关键词:胃排空;胃肠激素;泻心汤

刘晓霓,牛欣,司银楚,金秀东.中药泻心汤对大鼠胃排空和胃肠激素的影响.世界华人消化杂志 2006;14(10):997-1000
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/997.asp>

0 引言

半夏泻心汤、生姜泻心汤和甘草泻心汤出自东汉著名医学家张仲景所撰《伤寒论》,由半夏、黄芩、黄连、炙甘草、干姜、生姜、人参、大枣8味药组成,是辛开苦降、调和脾胃阴阳的代表方剂.3方组方相似,皆为治疗痞满证脾胃病的有效良方,但临床主治却有所不同,由于痞满证与胃运动障碍有相似之处,且众多的研究资料证实3方具有调节胃肠运动的功效,故我们观察3方对大鼠胃排空及胃肠激素的影响,从而为3方功能主治差异提供客观实验依据.

1 材料和方法

1.1 材料 健康SD大鼠,雌雄兼用,12周龄,200-220 g,由北京维通利华实验动物中心提供.葡聚糖蓝-2000购自Pharmacia公司;EDTA、抑肽酶、胃动素放免试剂盒、胃泌素放免试剂盒由解放军总医院科技发展中心东亚放免所提供;血管活性肠肽放免试剂盒、P物质放免试剂盒、生长抑素放免试剂盒由北京海科锐生物技

表1 三方药味配比(g)

方名	生姜	半夏	干姜	黄芩	黄连	党参	大枣	甘草
半夏泻心汤	0	9.0	7.6	7.6	2.5	7.6	6.8	7.6
生姜泻心汤	12.6	10.7	3.0	9.0	3.0	9.0	8.0	9.0
甘草泻心汤	0	8.1	6.8	6.8	2.3	6.8	6.1	9.0

术中心提供;三泻心汤干膏由北京中医药大学中药教研室制备(表1).WFZ 800-D2型紫外可见分光光度计(北京第二光学仪器厂);TGL-16G型冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);N-682B型r计数仪(中科院上海原子能研究所).

1.2 方法 60只大鼠随机分为正常对照组、半夏泻心汤BX组、生姜泻心汤SJ组、甘草泻心汤GC组4组.大鼠连续灌药7 d,剂量为人用量7倍,对照组按同等剂量给自来水.实验前,禁食不禁水24 h,末次灌药后1 h,灌入20 g/L的葡聚糖蓝-2000 0.5 mL,经20 min后,开腹取出胃,沿胃大弯剪开,将胃内色素残留物充分洗于4 mL去离子水中,4000 r/min离心15 min,取上清液,用WFZ 800-D2型紫外可见分光光度计在620 nm波长测吸光度即为胃内色素残留量吸光度,求出各样本吸光度与对照组吸光度均值的百分比即为各样本的胃内色素相对残留率.各样本相对胃内残留率(%) = 各样本的胃内色素残留吸光度/对照组胃内色素残留吸光度均值.腹主动脉采血5 mL,4 mL置入预先用60 μL 100 g/L EDTA和80 μL抑肽酶抗凝的试管中,颠倒混匀后静置,1 mL放入无任何抗凝剂的试管中,均静置1 h,4000 r/min离心15 min,分离出血浆和血清,-20℃保存备用.胃肠激素测定参考试剂盒说明.

统计学处理:数据以mean ± SD差表示,应用SPSS 10.0软件,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)的方法进行统计.

2 结果

与正常对照组相比(99.9% ± 32.3%),半夏泻心汤组(66.1% ± 21.1%)大鼠胃内色素相对残留率减少($P < 0.05$);生姜泻心汤组(141.8% ± 21.1%)大鼠胃内色素相对残留率增加($P < 0.05$);甘草泻心汤组(88.7% ± 35.1%)大鼠胃内色素相对残留率与对照组相比,无显著性差异,但有下降的趋势;与半夏泻心汤组相比,生姜泻心汤组大鼠胃内色素相对残留率明显增加($P < 0.01$);与生姜泻心汤组相比,甘草泻心汤组大鼠胃内色素相对

表 2 半夏、生姜和甘草泻心汤对大鼠血中胃肠激素的影响 ($n = 15$, mean \pm SD, ng/L)

分组	MTL	GAS	VIP	SP	SS
对照	162.6 \pm 19.5	56.0 \pm 11.5	445.8 \pm 101.9	63.0 \pm 14.7	461.7 \pm 77.0
BX	179.1 \pm 17.5	58.5 \pm 9.6	348.1 \pm 102.5 ^a	47.0 \pm 15.2 ^a	562.3 \pm 149.7 ^a
SJ	205.0 \pm 22.0 ^{bd}	70.7 \pm 11.9 ^{ac}	489.3 \pm 154.8 ^d	53.8 \pm 20.8	553.9 \pm 98.9 ^a
GC	205.1 \pm 43.1 ^a	79.7 \pm 9.3 ^{bd}	457.3 \pm 119.0 ^c	61.5 \pm 14.8 ^c	530.5 \pm 93.7

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs BX.

残留率明显减少($P < 0.01$). 与正常对照组相比, 半夏、生姜、甘草泻心汤3组胃动素水平均有所升高, 但生姜泻心汤组和甘草泻心汤组升高显著($P < 0.01$ 和 0.05); 三泻心汤组间胃动素水平相比, 生姜泻心汤组较半夏泻心汤组升高明显($P < 0.01$, 表2). 与正常对照组相比, 半夏、生姜、甘草泻心汤3组胃泌素水平均有所升高, 但生姜泻心汤组和甘草泻心汤组升高显著($P < 0.05$ 和 0.01); 三泻心汤组间胃泌素水平相比, 生姜泻心汤组和甘草泻心汤组较半夏泻心汤组升高明显($P < 0.05$ 和 0.01 , 表2). 与正常对照组相比, 半夏泻心汤组的血管活性肠肽水平下降显著($P < 0.05$); 生姜泻心汤组和甘草泻心汤组变化不明显; 三泻心汤组间血管活性肠肽水平相比, 生姜泻心汤组和甘草泻心汤组较半夏泻心汤组升高明显($P < 0.01$ 和 0.05 , 表2). 与正常对照组相比, 半夏泻心汤组的P物质水平下降显著($P < 0.05$); 三泻心汤组间P物质水平相比, 甘草泻心汤组较半夏泻心汤组升高明显($P < 0.05$, 表2). 与正常对照组相比, 半夏、生姜泻心汤组生长抑素水平均有所升高($P < 0.05$, 表2).

3 讨论

半夏泻心汤、生姜泻心汤和甘草泻心汤三方主证虽然有所不同, 但皆治心下痞满之证, 这与现代医学中消化系统疾病中的胃排空延迟有相似之处. 故本研究采用胃运动作为研究三方的切入点. 现代临床研究表明, 半夏泻心汤对呕吐、腹泻、便秘、消化不良、胃节律紊乱等消化系统疾病具有明显疗效, 提示该方对胃肠动力功能具有调节作用. 很多动物实验也证实, 半夏泻心汤有调节胃肠功能的作用^[1]. 生姜泻心汤和甘草泻心汤虽然动物实验报道较少, 但临床也有治疗幽门不全梗阻、腹泻、结肠炎、肠道激惹征的报道, 提示此二方也有调节胃肠运动的作用^[2-7]. 我们以胃内色素相对残留率为指标, 观察三方对大鼠胃排空作用的影响. 结果显示, 半夏

泻心汤有促进胃排空的作用, 与高景泰 *et al*^[8]的研究结果一致. 生姜泻心汤和甘草泻心汤对胃排空作用的实验报道未见, 本实验结果显示生姜泻心汤对胃排空有抑制作用, 甘草泻心汤胃排空作用不明显, 但有促进的趋势. 三方药味基本相同, 只是药量有所加减, 但对胃排空的作用各不相同, 可能正是由于这种量的差异使得三方有效的化学成分发生改变, 进而作用于机体的具体生物环节和靶点也可能随之发生变化. 是否半夏和甘草泻心汤消“痞”作用是通过不同程度的促进胃运动, 而生姜泻心汤是通过其他途径(如促进消化)来消“痞”的, 有待于进一步研究证实. 胃肠激素是调节胃运动的主要因素之一. 半夏泻心汤、生姜泻心汤及甘草泻心汤对胃肠激素影响的报道不多, 在半夏泻心汤拆方研究中发现, 半夏泻心汤拆方各组及全方组均可降低胃溃疡模型大鼠血中胃泌素的水平^[9]. 观察半夏泻心汤、生姜泻心汤和甘草泻心汤对反流性食管炎大鼠下丘脑、回肠和血中NT的影响, 发现调控体内NT的合成与分泌可能是三方治疗反流性食管炎的机制之一^[10]. 说明三方可以通过调节体内的激素水平的变化而影响机体的某些生物学特性, 我们通过观察大鼠血中与几种胃肠运动有关的激素水平的变化, 进而分析三方影响胃运动的差异的可能机制. 胃动素(motilin, MTL)是由22个氨基酸组成的多肽, 主要分布于十二指肠、上段空肠, 由M细胞分泌. 胃动素对激发和调节消化间期III相收缩起着直接的作用, 可诱发强烈收缩和小肠明显的分节运动, 加速胃的固体和液体排空^[11-12]. P物质(substance P, SP)是由11个氨基酸残基组成的多肽, 主要分布于胃肠及脑组织. P物质在外周对胃肠道纵肌和环肌有双重收缩效应, 具有促进胃肠平滑肌收缩作用, 但在中枢却对胃肠运动起抑制作用^[13]. 生长抑素(somatostatin, SS)是由Brazeau在1974年从羊的下丘脑提取物中发现的, 在胃和结肠广泛存在. SS主要生理作用是

抑制胃肠运动及各种胃肠激素的释放^[14]。血管活性肠肽(vasoactive intestinal peptide, VIP)系由28个氨基酸残基组成,由D1细胞分泌。其主要作用是使胃肠舒张及胃肠括约肌舒张^[15-16]。胃泌素(gastrin, GAS)主要由胃窦及小肠黏膜的G细胞分泌,对消化系统除刺激胃酸分泌外,还有营养促进胃肠运动的作用^[17]。本实验结果显示,三方对五种胃肠激素的影响有所不同。半夏泻心汤可以使大鼠血中血管活性肠肽水平下降、P物质水平下降、生长激素水平升高。生姜泻心汤可以使胃动素水平升高,胃泌素水平升高,生长抑素水平升高。甘草泻心汤可以使胃动素水平升高,胃泌素水平升高。这些结果提示三方对胃运动影响的差异是由于三方对胃运动影响机制的生物学作用靶点有所不同,这也可能是三方功能主治有所差异的原因之一。我们还发现三方对胃排空和胃肠激素影响的结果并不平行,如半夏泻心汤促进胃排空,但其使血中的胃动素水平下降;生姜泻心汤抑制胃排空,但生姜泻心汤组大鼠血中的胃动素却升高。由于激素要与组织上相应的受体结合才能发挥作用,血中激素含量是否能代表其在组织中的作用大小,是否三方还可以通过影响受体的表达进而实现其对胃肠运动的调节还有待于进一步的研究。

4 参考文献

- 1 张胜,吴春福,陈立江,车轶. 半夏泻心汤药理研究最新进展. 中国中药杂志 2001; 26: 437-438

- 2 牛久旺. 生姜泻心汤加减治疗肠易激综合征34例. 中国中医急症 2005; 14: 99
- 3 高艳青,司银楚,刘晓霓,骆庆峰,牛欣. 生姜泻心汤防治大鼠反流性食管炎的作用机制探讨. 北京中医药大学学报 2004; 27: 47-49
- 4 周红三. 生姜泻心汤加味治疗小儿腹泻56例. 四川中医 2002; 20: 52
- 5 刘雪梅. 生姜泻心汤治疗急性胃肠炎157例. 四川中医 2005; 23: 36-37
- 6 朱豫珊. 甘草泻心汤治疗急性胃肠炎200例. 湖南中医学院学报 2002; 4: 51
- 7 万志成. 甘草泻心汤加减治疗肠道激惹征23例. 新中医 1994; 9: 25
- 8 高景泰,沃艳,潘洋,郑晓光,王伟明,战玉晶,柳阳明. 半夏泻心颗粒剂改善胃动力实验研究. 黑龙江医药科技 2001; 24: 17-18
- 9 王庆国,李宇航,赵琰,李丽娜,钟相根. 半夏泻心汤及其拆方对正常大鼠胃肠运动功能的影响. 北京中医药大学学报 2001; 24: 19-21
- 10 刘晓霓,高艳青,司银楚,牛欣. 半夏泻心汤及其类方对反流性食管炎大鼠神经降压素的影响. 放射免疫学杂志 2003; 16: 215-217
- 11 王志刚,刘凤林. 胃动素受体的研究进展. 国外医学·药学分册 2001; 28: 344-347
- 12 Depoortere I. Motilin and motilin receptors: characterization and functional significance. *Verh K Acad Geneesk Belg* 2001; 63: 511-529
- 13 熊观瀛. P物质与肠易激惹征. 国外医学·内分泌分册 2003; 30: 245-248
- 14 Corleto VD, Weber HC, Jensen RT. Expression of somatostatin receptor subtypes on guinea pig gastric and colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1999; 277: G235-G244
- 15 施斌. 血管活性肠肽与消化道运动. 国外医学·消化系统疾病分册 2000; 20: 146-149
- 16 王玲,周吕. 脑肠肽对胃肠平滑肌细胞动力调节的信号转导机制. 基础医学与临床 1999; 19: 122-125
- 17 孙凤莲,宋于刚,程蔚,赵彤. 大鼠胃溃疡及自愈过程中胃泌素、生长抑素与G、D细胞变化关系的实验研究. 中华消化杂志 2002; 22: 57-58

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

■创新亮点

本研究通过微波行兔脾部分切除手术,细菌注射后观察和免疫组化检测脾NF- κ Bp65计数指数表达以及与对照组比较提示,微波对脾脏损伤在短期内可修复,从而为微波在保脾手术的应用提供了依据。

鞠新华, 张宇, 姜卫国, 夏振龙. 细菌感染对微波行兔保脾术后NF- κ Bp65表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(10):1001-1003

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1001.asp>

0 引言

脾切除术是外科治疗重要和有效的手段,常见于外伤性脾破裂、血液系统疾病、造血系统疾病、门静脉高压症引起脾功能亢进和脾脏疾病的治疗^[1].近年来,随着对脾功能的深入理解,脾部分切除术、脾次全切除术、脾裂口缝合术、脾动脉栓塞术和自体脾移植术等保脾手术逐渐受到人们重视^[2-4].脾部分切除术多见外伤性脾破裂或部分脾良性疾病以及血液、造血系统疾病引起脾功能亢进^[5-6].脾次全切除术除了适合以上疾病,部分为门静脉高压症^[7-8].微波行肝、肾、肺等手术已在临床获得较广泛应用^[9-11],然而脾脏手术较少见^[12].我们在外伤性脾破裂微波行保脾手术的基础上,开展微波固化行兔脾部分切除术的实验研究.通过手术后静脉注射细菌检测NF- κ Bp65表达,探讨微波保脾手术对脾功能影响及意义.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 健康日本大耳白兔18只,体质量2100-2700 g,雄雌不分,随机分为2组:假拟手术组6只与实验组12只,即微波行脾部分切除手术组.动物由中国医科大学第二临床学院动物实验中心提供并负责饲养.

1.1.2 试剂、菌株和仪器 NF- κ Bp65单克隆抗体购自北京中山生物公司,免疫组化SP、DAB试剂盒购自福建迈新公司.细菌肺炎链球菌为临床分离株.仪器为大连理工大学电子工程系研制微波止血机WGZ-2型,微波频率为2 450 MHz,采用植入天线,每次作用时间为20-30 s.

1.2 方法

1.2.1 动物实验方法 手术日晨禁食水,手术区备皮.200 g/L乌拉坦(5 mL/kg) ip麻醉.皮肤常规无菌消毒,采用上腹正中切口和无菌手术操作技术.实验组显露腹腔后结扎、离断拟切除侧脾韧带与血管,并于脾中下极处行微波固化,凝固带中间切除部分脾脏.保留的脾脏约占全脾的2/3.脾残端固化处大网膜覆盖.假拟手术组切开腹壁及腹膜后,再分别缝合腹壁各层组织.为预防术后感染的发生,青霉素400 000 U/d im,连用3 d.手术1 mo后,5 \times 10⁷肺炎链球菌悬浮液

■应用要点

微波固化行保脾手术,手术操作简单、止血迅速可靠、术后并发症少.除了用于外伤性脾破裂和脾脏良性肿瘤等疾病外,也可应用于血液、造血系统以及门静脉高压症等脾功能亢进等疾病的临床治疗,具有良好的临床应用前景.

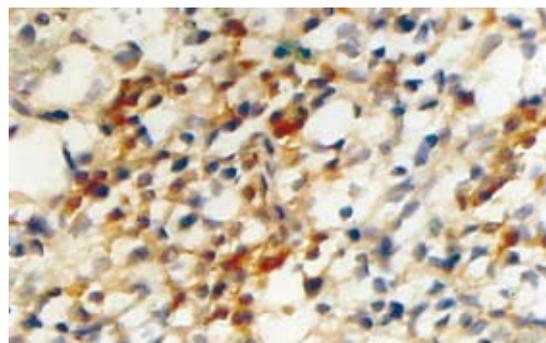


图1 脾窦细胞NF- κ Bp65阳性表达(\times 400).

0.1 mL/kg iv, 观察48 h后将动物处死.切取脾脏标本,测定质量,常规用苏木素和伊红(HE)染色,行病理学检查.

1.2.2 免疫组化检测 标本经福尔马林固定,石蜡包埋,连续切片厚5 μ m.行免疫组化SP法染色.常规切片脱蜡至水,单克隆抗体进行抗原修复.过氧化物孵育和山羊免疫血清孵育后,滴加NF- κ Bp65一抗,再分别加相应的二抗,滴加SP复合物.经DAB显色后用苏木素稍衬染、脱水、透明、封片.同时用PBS代替NF- κ Bp65单克隆抗体染色作空白对照.实验结果评定: NF- κ Bp65指数的测定标准为每例切片计数5个高倍视野(\times 400),每一视野数100个细胞中NF- κ Bp65阳性细胞数,取均值表示计分指数.

统计学处理 采用 χ^2 检验分析. $P < 0.05$ 为统计学具有显著性差异.

2 结果

手术1 mo经静脉注射肺炎链球菌48 h,实验组与假拟手术组均无死亡.微波行脾部分切除术后残留的脾脏颜色及血运良好,断端被网膜包裹.脾脏质量分别为2.043 \pm 0.62 g和2.051 \pm 0.46 g,组间无显著性差异($P > 0.05$).显微镜下见微波固化的脾残端呈纤维化.NF- κ Bp65阳性细胞染色呈棕黄色,主要分布在胞质或胞核内(图1).NF- κ Bp65表达计分指数在实验组与假拟手术组分别为21.03 \pm 5.76和18.22 \pm 3.18,实验组NF- κ Bp65表达计分指数略高于假拟手术组,但无显著性差异($P > 0.05$).

3 讨论

NF- κ Bp65是一种多功能转录因子,在细胞信号传导中参与特异基因的转录调节,是炎症因子基因表达的关键转录因子之一.作为具有多项调节作用的蛋白质,他通过细胞因子、炎症介质、黏附分子等的转录过程控制生物合成.在各种刺激

因素作用下, 激活的 NF- κ Bp65 参与机体的免疫应答、炎症反应、细胞增殖和相关基因凋亡^[13-14]. TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子、DNA 损害和外源性刺激使 NF- κ Bp65 激活. 而地塞米松、蛋白酶等能够抑制 NF- κ Bp65 活性^[15]. 脾脏是细胞因子来源的重要场所. 组织损伤时致炎介质、TNF、IL-1、IL-6 等释放, 活化的 NF- κ Bp65 发生核内转移, 导致淋巴细胞增殖.

脾切除术后脓毒症是切脾手术的一种严重并发症. 最多见的致病菌是肺炎链球菌. 他通过高分子多糖体的荚膜侵袭而致病. 细菌毒素激活巨噬细胞, 使炎性介质释放增加. 脾脏作为机体的免疫器官, 在细菌感染中对内源性介质起调控作用. 脾切除术后循环中的毒素滞留量显著增加, 肝枯否细胞吞噬能力下降, 脾巨噬细胞成为毒素清除的主要器官. 在细菌的刺激作用下, 促进多种免疫细胞的分化、增殖以及细胞因子的释放. 细菌感染机体清除自由基的能力减弱. 脾切除术后组织对介导的炎症反应敏感性增强, 合成和分泌 TNF- α 水平也升高. 诱发促炎性因子大量产生, 过量的 TNF- α 造成组织的损害. NF- κ Bp65 可调节 TNF- α 基因转录或翻译, 阻止脾切除术后细菌毒素的攻击. 有报道, 烧伤后 NF- κ Bp65 和脾细胞分属的增殖活性存在差异性调节. NF- κ Bp65 的调节可能与烧伤后脾细胞的增殖变化相关^[16]. 我们采用微波固化止血行免脾部分切除, 微波辐射的热效应使组织产生凝固性坏死, 脾断面的毛细血管形成血栓, 手术止血迅速, 操作简单, 减少了术中和术后脾创面的出血. 此外由于手术保留大部分脾脏, 术后残留脾组织代偿性增生, 提高抗感染免疫功能.

本组实验组与假拟手术组细菌注射 48 h 均无动物死亡. 而我们以前的报告, 在相同实验条件下, 全脾切除组有 50% 动物死亡^[17]. 此外, NF- κ Bp65 表达计分指数在以上两组间无显著性差异, 实验组 NF- κ Bp65 表达接近正常对照. 微波固化炎症反应对脾功能有一定损害, NF- κ Bp65 调控使组织细胞增殖与修复. NF- κ Bp65 的低表达说明保脾手术后增强了对肺炎链球菌的耐受力, 减轻了炎性介质的组织损伤. 以上提示, 微波行免保脾手术在短期可修复脾功能, 是一种有价值的治疗方法.

4 参考文献

1 吴在德. 外科学. 第5版. 北京: 人民卫生出版社, 2000:

- 661-663
- 2 Basso N, Silecchia G, Raparelli L, Pizzuto G, Picconi T. Laparoscopic splenectomy for ruptured spleen: lessons learned from a case. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2003; 13: 109-112
- 3 Zhang H, Chen J, Kaiser GM, Mapudengo O, Zhang J, Exton MS, Song E. The value of partial splenic autotransplantation in patients with portal hypertension: a prospective randomized study. *Arch Surg* 2002; 137: 89-93
- 4 Sandler SG. The spleen and splenectomy in immune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol* 2000; 37: 10-12
- 5 Xu JG, Yang SQ. Diagnosis and treatment of traumatic splenic rupture in children: report of 70 cases. *Diyi Junyi Daxue Xuebao* 2005; 25: 589-590
- 6 Rice HE, Oldham KT, Hillery CA, Skinner MA, O'Hara SM, Ware RE. Clinical and hematologic benefits of partial splenectomy for congenital hemolytic anemias in children. *Ann Surg* 2003; 237: 281-288
- 7 Li E, Zhao L, Zhu L, Lin A, Ge L, Wang F, Shi B. Treating portal hypertension by subtotal splenectomy with retroperitoneal splenic transposition and devascularization: clinical study. *Zhonghua Waikexue* 1998; 36: 333-335, 371
- 8 Petroianu A, Resende V, da Silva RG. Late postoperative follow-up of patients undergoing subtotal splenectomy. *Clinics* 2005; 60: 473-478
- 9 Chen XP, Huang ZY. Surgical treatment of hepatocellular carcinoma in China: surgical techniques, indications, and outcomes. *Langenbecks Arch Surg* 2005; 390: 259-265
- 10 Tacke J, Mahnken AH, Gunther RW. Percutaneous thermal ablation of renal neoplasms. *Rofo* 2005; 177: 1631-1640
- 11 Feng W, Liu W, Li C, Li Z, Li R, Liu F, Zhai B, Shi J, Shi G. Percutaneous microwave coagulation therapy for lung cancer. *Zhonghua Zhongliu Xue* 2002; 24: 388-390
- 12 光岡晋太郎, 阪上賢一, 常光洋輔, 池田秀明, 田中公章. 微波固化治疗腹部损伤(肝损伤、脾损伤)有效2例. *临床外科* 2002; 57: 515-518
- 13 Wulczyn FG, Krappmann D, Scheiderei C. The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 1996; 74: 749-769
- 14 Samson SL, Mémet S, Vosshenrich CAJ, Colucci F, Richard O, Naliaye D, Israel A, Santo JPD. Combined deficiency in I κ B α and I κ B β reveals a critical window of NF- κ B activity in natural killer cell differentiation. *Blood* 2004; 103: 4573-4580
- 15 Zhang N, Ahsan MH, Zhu L, Sambucetti LC, Purchio AF, West DB. NF-kappaB and not the MAPK signaling pathway regulates GADD45beta expression during acute inflammation. *J Biol Chem* 2005; 280: 21400-21408
- 16 Phan HH, Cho K, Nelson HA, Shin S, Jeong J, Greenhalgh DG. Downregulation of NF-kappaB activity associated with alteration in proliferative response in the spleen after burn injury. *Shock* 2005; 23: 73-79
- 17 鞠新华, 孙继梅, 魏林, 刘勇, 张激扬, 夏振龙. 细菌廓清功能在免微波保脾手术的实验研究. *中华医院感染学杂志* 2004; 14: 855-856

■名词解释

脾切除术后脓毒症(postsplenectomy sepsis syndrome): 在上世纪初, 人们发现脾切除术后, 易发生肺炎链球菌败血症, 特别是儿童发生率较高. 因其发病突然, 病情凶险, 如不及时治疗, 常导致死亡. 死亡率高达 50%-70%. 1969 年, Diamond 将由于创伤行脾切除术后偶然发生严重败血症综合征的特征称为脾切除术后暴发性感染, 也有人称为脾切除术后脓毒症.

电编 李琪 编辑 王瑾晖

胃癌多基因甲基化状态分析

赵成海, 张宁, 卜献民, 李岩, 张海鹏

■背景资料

近年来, 遗传表型改变在胃癌发病机制中的作用日益受到重视。众多研究发现, 抑癌基因启动子内出现甲基化导致该基因表达沉默是部分胃癌发病的重要途径之一。

赵成海, 张宁, 张海鹏, 中国医科大学病理生理教研室 辽宁省沈阳市 110001

卜献民, 中国医科大学附属二院普通外科 辽宁省沈阳市 110004

李岩, 中国医科大学附属二院消化内科 辽宁省沈阳市 110004
通讯作者: 张海鹏, 110001, 沈阳市和平区北二马路92号, 中国医科大学病理生理教研室. zhanghp@hotmail.com

电话: 024-23256666-5291

收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-03-07

Detection of multiple gene methylation in gastric cancer

Cheng-Hai Zhao, Ning Zhang, Xian-Min Bu, Yan Li, Hai-Peng Zhang

Cheng-Hai Zhao, Ning Zhang, Hai-Peng Zhang, Department of Pathophysiology, China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Xian-Min Bu, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Yan Li, Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Hai-Peng Zhang, Department of Pathophysiology, China Medical University, Bei'er Road, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. zhanghp@hotmail.com

Received: 2006-02-13 Accepted: 2006-03-07

Abstract

AIM: To determine the methylation status of p16, hMLH1, E-cadherin and RUNX3 genes in gastric cancer.

METHODS: DNA in gastric cancer, cancer-adjacent tissues and normal gastric mucosa was extracted by saturated sodium chloride (NaCl) solution. The methylation status of p16, hMLH1, E-cadherin and RUNX3 genes were detected by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP).

RESULTS: Methylations of E-cadherin and RUNX3 were found in 38.9% and 16.7% normal gastric mucosa, respectively. Methylations of p16 and hMLH1 were not observed in any normal gastric mucosa. The frequencies of p16, hMLH1, E-cadherin and RUNX3 methylations were 8.3%, 4.2%, 54.2% and 29.2%, respectively,

in cancer-adjacent tissues, and 33.3%, 20.8%, 70.8% and 54.2%, respectively, in gastric cancer. Methylations of two or more genes were found in 66.7% gastric cancer, which was significantly higher than that in cancer-adjacent tissues ($\chi^2 = 4.09, P < 0.05$) and normal gastric mucosa (5.6%, $\chi^2 = 15.94, P < 0.01$). Methylations were also significantly different between cancer-adjacent tissues and normal gastric mucosa ($\chi^2 = 4.16, P < 0.05$). None of the above gene mythylation was detected in 5 gastric cancer tissues.

CONCLUSION: Multiple gene methylation is an early event in some gastric cancers and it plays an important role in the development of these gastric cancers.

Key Words: Gastric cancer; Methylation; HMLH1; p16; E-cadherin; RUNX3

Zhao CH, Zhang N, Bu XM, Li Y, Zhang HP. Detection of multiple gene methylation in gastric cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10):1004-1007

摘要

目的: 检测胃癌组织中 p16, hMLH1, E-cadherin 和 RUNX3 基因甲基化状态, 探讨多基因甲基化在胃癌发病中的作用。

方法: 采用饱和氯化钠法提取肿瘤组织、癌旁组织及正常胃黏膜组织 DNA。采用甲基化特异 PCR 对上述基因甲基化状态进行分析。

结果: 在正常胃黏膜组织中, 38.9% 存在 E-cadherin 甲基化, 16.7% 存在 RUNX3 甲基化, 没有发现 p16 和 hMLH1 甲基化; 在癌旁组织中, p16、hMLH1、E-cadherin 和 RUNX3 甲基化频率分别为 8.3%、4.2%、54.2% 和 29.2%; 在胃癌组织中, 上述基因甲基化频率分别为 33.3%、20.8%、0.8% 和 54.2%。66.7% 胃癌被检出存在 2 个或 2 个以上基因甲基化, 明显高于癌旁组织 (37.5%, $\chi^2 = 4.09, P < 0.05$) 和正常胃黏膜组织 (5.6%, $\chi^2 = 15.94, P < 0.01$), 而癌旁组织则高于正常胃黏膜组织 ($\chi^2 = 4.16, P < 0.05$)。有 5 例胃癌没有检出任何一种基因甲基化。

结论: 多基因甲基化是部分胃癌发展过程中一种早期事件, 提示多基因甲基化在这部分胃癌的发病中起重要作用。

关键词: 胃癌; 甲基化; p16; hMLH1; E-cadherin; RUNX3

赵成海, 张宁, 卜献民, 李岩, 张海鹏. 胃癌多基因甲基化状态分析. 世界华人消化杂志 2006;14(10):1004-1007
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1004.asp

0 引言

抑癌基因启动子内CpG岛出现异常甲基化常导致其表达丧失或减少, 从而诱导肿瘤发生. 作为一种临床常见肿瘤, 部分胃癌的发病机制亦与此有关. 早期的研究多集中在孤立的单一基因上^[1-3], 随着更多基因异常甲基化不断被报道出来, 提示胃癌中存在多种基因甲基化现象. 在此, 我们同时对基因p16, hMLH1, E-cadherin和RUNX3在胃癌中的甲基化状态进行研究, 以探讨多基因甲基化在胃癌发病机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌及相应的癌旁组织各24例, 胃正常组织18例, 均来自于中国医科大学附属第一及第二医院. 癌旁组织在肿瘤中心5 cm以外获取. 标本获取后即冷冻于液氮之中, 并保存在-80℃条件下备用. 采用HE染色确定肿瘤标本主要由肿瘤组织构成, 有肿瘤细胞浸润的癌旁组织和有炎性反应的胃正常组织标本均被排除于研究之外.

1.2 方法 采用饱和氯化钠法提取肿瘤组织、癌旁组织及正常胃黏膜组织DNA. 采用GENMED基因甲基化检测试剂盒(上海杰美公司)对p16, hMLH1, E-cadherin和RUNX3进行甲基化特异性PCR(MSP)检测. 实验步骤主要包括转化实验(将未甲基化的胞嘧啶转变成尿嘧啶)和甲基化特异性PCR两个步骤, 具体参见其产品说明书. 各基因MSP分析引物序列: p16: 5'-TTATTAGAGGG TGGGGCGGATVGC-3'(正义), 5'-GACCCCGA ACCGCGACCGTAA-3'(反义); hMLH1: 5'-TATA TCGTTCGTAGTATTCGTGT-3'(正义), 5'-TCCG ACCCGAATAAACCCAA-3'(反义); E-cadherin: 5'-TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT-3'(正义), 5'-TAACTAAAAATTCACCTACCGAC-3'(反义); RUNX3: 5'-TTACGAGGGGCGGTTCGTACGCG GG-3'(正义), 5'-AAAACGACCGACGCGAACG

表1 胃癌组织中多基因甲基化状态

编号	p16	hMLH1	E-cadherin	RUNX3	n
1	-	-	-	-	5
2	-	-	+	+	7
3	+	-	+	+	2
4	-	-	+	-	2
5	-	+	-	+	2
6	+	-	+	-	3
7	+	+	+	+	3

■ 创新盘点

本文探讨多种抑癌基因同时甲基化在胃癌发病中的作用. 结果提示胃癌发病是多种基因发生改变共同作用的结果.

CCTCC-3'(反义).

统计学处理 采用 χ^2 检验进行数据分析, $P<0.05$ 为差异显著.

2 结果

只有E-cadherin和RUNX3在正常胃组织中被检出存在甲基化现象, 分别为7例(38.9%)和3例(16.7%); 在癌旁组织中, p16, hMLH1, E-cadherin和RUNX3甲基化频率依次为8.3%, 4.2%, 54.2%和29.2%; 在胃癌组织中上述基因甲基化频率依次为33.3%, 20.8%, 70.8%和54.2%. 66.7%(16/24), 胃癌被检出存在2个或2个以上基因甲基化, 明显高于癌旁组织(9/24, 37.5%, $\chi^2=4.09$, $P<0.05$)和正常胃黏膜组织(1/18, 5.6%, $\chi^2=15.94$, $P<0.01$), 而癌旁组织则高于正常胃黏膜组织($\chi^2=4.16$, $P<0.05$). 5例胃癌没有检出任何一种基因甲基化(表1).

3 讨论

DNA甲基化作为一种生化修饰过程, 主要指在DNA甲基化转移酶(DNMT1, DNMT2, DNMT3)作用下, 胞嘧啶第五位碳原子上被加上一个甲基基团^[4]. 通常情况下, DNA甲基化发生在CpG重复序列中. DNA甲基化常导致基因转录抑制, 其机制可能与以下两个因素有关: (1)胞嘧啶甲基化可能阻止转录因子与他们识别部位中的CpG序列结合; (2)这种转录抑制可能与两种蛋白质复合体(MeCP1和MeCP2)有关. 这两种蛋白质复合体能够特异性地与发生甲基化的CpG序列结合, 从而阻止转录因子与后者结合^[5]. 近年来, 遗传表型改变在肿瘤发病机制中的作用日益受到重视. 抑癌基因启动子内CpG岛甲基化而导致该基因表达改变已成为肿瘤发病机制一条重要途径. 胃癌作为一种常见的肿瘤, 亦被发现存在抑癌基因启动子甲基化现象. 其中发现较早, 比较重要的基因有p16^[6], hMLH1^[7]及E-cadherin^[8]. 作

为一种CDK的抑制物, p16基因表达改变参与了多数肿瘤的发病过程. 但与其他肿瘤不同的是, 在胃癌中p16表达改变并不是由于基因突变或缺失引起^[9], 而主要由于启动子甲基化导致^[1,6]. 错配修复基因hMLH1生殖系突变在遗传性非息肉病性结直肠癌(HNPCC)发病中起到重要作用^[10], 但类似于p16, 在胃癌组织中该基因的突变频率很低. 众多的研究显示, hMLH1启动子甲基化导致其表达改变及微卫星不稳定(MSI)现象是部分胃癌一个重要的特征^[2,7]. E-cadherin则与前述两种基因不同, 其突变和甲基化在胃癌中都比较常见. 但其突变主要限于弥散型胃癌, 在其他组织类型的胃癌中则较为少见^[11]. 此后一系列基因在胃癌组织中被探测出存在甲基化现象, 包括APC^[12], MGMT^[13], RUNX3^[14], CHFR^[15], HRK^[16]等. 这些证据表明, 胃癌是一种易发甲基化的肿瘤, 多种基因甲基化参与了胃癌的发病过程. 因此单一基因的研究显然无法全面、准确地分析抑癌基因启动子甲基化在胃癌发病机制中的作用.

基于一些结直肠癌的研究, 学者提出了CpG岛甲基化表型(CIMP)这一概念^[17], 指出在部分结直肠癌中, 多基因甲基化是其发病的重要机制. 在我们所检测的4种基因中, 66.7%的患者存在两个或两个以上基因甲基化现象, 此结果提示CIMP亦可能是胃癌重要的发病途径之一. 值得注意的是, 在研究中我们同时发现有5例患者没有检出甲基化现象, 提示CIMP没有参与这部分胃癌的发病过程. 研究结果显示, 胃癌组织中多基因甲基化频率显著高于癌旁组织及正常胃黏膜组织, 而癌旁组织又高于正常胃黏膜组织, 提示基因甲基化是胃癌形成过程中的一个早期事件, 其对于胃癌的早期诊断具有重要意义. 当然, 要分析CIMP在胃癌发病机制中的作用, 需对更多基因进行研究和筛选. 同时对CIMP阳性胃癌的临床特征进行分析, 以探讨多基因甲基化研究在胃癌早期诊断、治疗及预后等方面的作用.

4 参考文献

- 1 Shim YH, Kang GH, Ro JY. Correlation of p16 hypermethylation with p16 protein loss in sporadic gastric carcinomas. *Lab Invest* 2000; 80: 689-695
- 2 Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 159-164

- 3 Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H, Wiesner G, Ferguson K, Eng C, Park JG, Kim SJ, Markowitz S. Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet* 2000; 26: 16-17
- 4 Ahmad I, Rao DN. Chemistry and biology of DNA methyltransferases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1996; 31: 361-380
- 5 Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 226-231
- 6 Tsujie M, Yamamoto H, Tomita N, Sugita Y, Ohue M, Sakita I, Tamaki Y, Sekimoto M, Doki Y, Inoue M, Matsuura N, Monden T, Shiozaki H, Monden M. Expression of tumor suppressor gene p16(INK4) products in primary gastric cancer. *Oncology* 2000; 58: 126-136
- 7 Fleisher AS, Esteller M, Wang S, Tamura G, Suzuki H, Yin J, Zou TT, Abraham JM, Kong D, Smolinski KN, Shi YQ, Rhyu MG, Powell SM, James SP, Wilson KT, Herman JG, Meltzer SJ. Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59: 1090-1095
- 8 Machado JC, Oliveira C, Carvalho R, Soares P, Bex G, Caldas C, Seruca R, Carneiro F, Sobrinho-Simoes M. E-cadherin gene (CDH1) promoter methylation as the second hit in sporadic diffuse gastric carcinoma. *Oncogene* 2001; 20: 1525-1528
- 9 Lee YY, Kang SH, Seo JY, Jung CW, Lee KU, Choe KJ, Kim BK, Kim NK, Koeffler HP, Bang YJ. Alterations of p16INK4A and p15INK4B genes in gastric carcinomas. *Cancer* 1997; 80: 1889-1896
- 10 Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368: 258-261
- 11 Becker KF, Atkinson MJ, Reich U, Becker I, Nekarda H, Siewert JR, Hofler H. E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas. *Cancer Res* 1994; 54: 3845-3852
- 12 Tsuchiya T, Tamura G, Sato K, Endoh Y, Sakata K, Jin Z, Motoyama T, Usuba O, Kimura W, Nishizuka S, Wilson KT, James SP, Yin J, Fleisher AS, Zou T, Silverberg SG, Kong D, Meltzer SJ. Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. *Oncogene* 2000; 19: 3642-3646
- 13 Oue N, Shigeishi H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Kuraoka K, Ito R, Yasui W. Promoter hypermethylation of MGMT is associated with protein loss in gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2001; 93: 805-809
- 14 Li QL, Ito K, Sakakura C, Fukamachi H, Inoue K, Chi XZ, Lee KY, Nomura S, Lee CW, Han SB, Kim HM, Kim WJ, Yamamoto H, Yamashita N, Yano T, Ikeda T, Itohara S, Inazawa J, Abe T, Hagiwara A, Yamagishi H, Ooe A, Kaneda A, Sugimura T, Ushijima T, Bae SC, Ito Y. Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 2002; 109: 113-124
- 15 Satoh A, Toyota M, Itoh F, Sasaki Y, Suzuki H, Ogi K, Kikuchi T, Mita H, Yamashita T, Kojima T, Kusano M, Fujita M, Hosokawa M, Endo T, Tokino T, Imai K. Epigenetic inactivation of CHFR and sensitivity to microtubule inhibitors in gastric cancer. *Cancer Res*

- 2003; 63: 8606-8613
- 16 Obata T, Toyota M, Satoh A, Sasaki Y, Ogi K, Akino K, Suzuki H, Murai M, Kikuchi T, Mita H, Itoh F, Issa JP, Tokino T, Imai K. Identification of HRK as a target of epigenetic inactivation in colorectal and gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 6410-6418
- 17 Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8681-8686

电编 张敏 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 •

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(Cheical 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, 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: wjcd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com.

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

• 消息 •

第二届全国小肠疾病学术会议

本刊讯 第二届全国小肠疾病学术会议将于2006-08-23/27在太原举行, 现将征文通知如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文, 结构性摘要(1000字), 电脑打印(附软盘)或E-mail, 2006-04-31截稿.

2 联系方式

山西省太原市双塔东街29号山西省人民医院内镜中心 陈星; 邮编: 030012; 电话: 0351-4960028; E-mail: senj29@163.com.

肝硬化患者腹水感染致病菌菌谱变化与药敏分析

丁熠, 陈金联, 朱金水

■背景资料

肝硬化腹水感染是临床常见病, 发病机制受多种因素作用。对8 a的肝硬化腹水患者住院患者的资料进行回顾性分析、对比和归纳, 致病细菌谱有很大变化, 近几年出现厌阳菌、真菌感染, 值得临床医务人员注意。抗生素耐药也很明显。腹水常规、涂片或血培养的阳性率低。

丁熠, 安徽省铜陵县人民医院内科 安徽省铜陵市 244000
陈金联, 朱金水, 上海交通大学附属第六人民医院消化内科
上海市 200233
通讯作者: 丁熠, 244000, 安徽省铜陵市, 安徽省铜陵县人民医
院内科. tongdingyi@126.com
电话: 0562-8810213
收稿日期: 2005-09-09 接受日期: 2005-09-30

Bacterial spectrum changes and analysis of antibiotic sensitivity in ascitic infection patients with hepatic cirrhosis

Yi Ding, Jin-Lian Chen, Jin-Shui Zhu

Yi Ding, Department of Internal Medicine, People's Hospital of Tongling County, Tongling 24400, Anhui Province, China

Jin-Lian Chen, Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Correspondence to: Yi Ding, Department of Internal Medicine, People's Hospital of Tongling County, Tongling 24400, Anhui Province, China. tongdingyi@126.com

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

Abstract

AIM: To observe and analyze the changes of bacterial spectrum and antibiotic sensitivity in ascitic infection patients with liver cirrhosis.

METHODS: The clinical data of ascitic infection patients with liver cirrhosis at Child-Pugh stage B and C were analyzed retrospectively and comparatively.

RESULTS: The gram-negative bacilli covered the largest percentage in the patients at Child-Pugh stage B and C, and colon bacteria were the most common pathogenic factors, the percentages of which were 45.8% and 60.3%, respectively. The sensitivities of gentamycin, amikacin, and ampicillin to colon bacteria were 88.9%, 91.1% and 44.4%, respectively, during the period from the year 1997 to 2000, and those decreased to 35.2%, 39.8%, and 26.1%, respectively, during the period from the year 2001 to 2004. The sensitivity of cephalosporin to colon bacteria was 81.8% during the period of 2001 to 2004. However, the infections of fungicides and anaerobes

were found increasing from 2001 to 2004.

CONCLUSION: Preventive adoption of antibiotics in the treatment of ascitic infection patients with liver cirrhosis must be based on the results of bacterium culture and antibiotic sensitivity test.

Key Words: Ascitic infection; Hepatic cirrhosis; Pathogenic bacteria; Antibiotic sensitivity

Ding Y, Chen JL, Zhu JS. Bacterial spectrum changes and analysis of antibiotic sensitivity in ascitic infection patients with hepatic cirrhosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10):1008-1011

摘要

目的: 探讨肝硬化腹水感染致病菌变化及细菌对抗生素敏感性的变化。

方法: 对处于Child-Pugh分级B、C阶段肝硬化腹水感染患者临床数据进行回顾性分析。

结果: 两个阶段的主要致病菌仍是革兰氏阴性杆菌, 两个时期, 致病菌仍以大肠杆菌为主, 分别占45.8%和60.3%。但1997-2000年的大肠杆菌药敏中庆大霉素敏感率达88.9%、丁胺卡那霉素敏感率达91.1%、氨苄青敏感性达44.4%, 2001-2004年中分别下降到35.2%、39.8%、26.1%。2001-2004年大肠杆菌对头孢类敏感性达81.8%以上。近年来菌谱及其耐药性发生变化, 厌氧菌和真菌感染呈上升趋势。

结论: 针对肝硬化腹水, 预防性应用抗生素, 为了避免耐药菌的产生, 应依据腹水培养和药敏试验结果, 从而提高临床疗效。

关键词: 肝硬化; 腹水感染; 致病菌; 药敏

丁熠, 陈金联, 朱金水. 肝硬化患者腹水感染致病菌菌谱变化与药敏分析. *世界华人消化杂志* 2006;14(10):1008-1011
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1008.asp>

0 引言

肝硬化患者后期顽固性腹水是肝硬化患者常见

表1 1997-2000, 98例35株致病菌体外抗生素药敏情况 n (%)

致病菌	株数	构成比	庆大霉素	丁胺卡那	氨苄青霉素	氧哌嗪	左氧氟沙星	头孢唑啉	头孢三嗪
大肠杆菌	45	45.8%	40 (88.9)	41 (91.1)	30 (44.4)	16 (35.6)	20 (44.4)	31 (68.9)	43 (96.5)
克雷伯菌	18	18.4%	5 (27.8)	6 (33.3)	3 (16.7)	4 (22.2)	5 (27.8)	12 (66.6)	16 (88.9)
变形杆菌	3	3.2%	1 (33.3)	1 (33.3)	0 (0)	1 (33.3)	1 (33.3)	2 (66.6)	3 (100)
其他杆菌	4	4.0%	—	—	—	—	—	—	—
链球菌	13	13.2%	6 (46.2)	7 (38.9)	8 (61.5)	6 (46.2)	2 (15.3)	12 (92.3)	12 (92.3)
肠球菌	8	8.2%	3 (37.5)	4 (50)	5 (62.5)	4 (50)	2 (25)	7 (87.5)	7 (87.5)
葡萄球菌	7	7.2%	6 (85.7)	6 (85.7)	5 (71.4)	4 (51.7)	3 (42.9)	6 (85)	7 (100)

0前为例数, 0内为敏感例数占总例数的百分比, “—”表示未作统计。

的症状,可并发自发性腹膜炎。门诊的肝硬化患者合并自发性腹膜炎发生率约3.5%,而住院的肝硬化患者发生率约10%-30%^[1]。腹水进行细菌培养+药敏检查,可以指导临床治疗。我们回顾过去8 a肝硬化腹水患者的细菌培养+药敏结果,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 1997-2004,本院消化科住院的肝硬化腹水患者按时间顺序分两个阶段,即1997-01/2000-12为第一阶段,2001-01/2004-12为第二阶段。

1.2 方法 肝硬化患者肝功能按Child-Pugh方法分级,选取两个阶段为B级或C级患者,各组患者的临床表现、生化指标、细菌学检查和影像学结果均符合1998年全国腹水学术会议制定的肝硬化并发(SBP)诊断标准。其中第一阶段共有98例,男50例,女48例,平均52.7岁,肝炎后肝硬化伴腹水78例(80%),酒精性9例(9%),心源性4例(4%),血吸虫性3例(3%),其他4例(4%);第二阶段共有146例,男87例,女59例,平均55.4岁,肝炎后肝硬化伴腹水110例(75%),酒精性18例(12%),心源性7例(5%),血吸虫性3例(2%),其他14例(8%)。两组患者的年龄、性别、临床表现均无明显差异。均由医生严格消毒抽取腹水10 mL,注入无菌血培养瓶。细菌鉴定按WHO推荐K-B法进行。细菌培养用上海复兴公司FORTUN2000细菌培养仪。所用MH培养和药敏纸片由杭州无知微生物试剂有限公司提供。

统计学处理 所得数据采用陈述性描述与 χ^2 检验,用SPASSY 10.0软件进行分析。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 1997-2000肝硬化腹水感染致病菌革兰氏阴性杆菌占71.2%,这与国内外文献报道基本相符。

其中大肠杆菌占45.8%,其他包括几个比例很少致病菌革兰氏阴性杆菌占4%,没有统计;革兰氏阳性菌占28.2%,比例最高为链球菌占13.2%。大肠杆菌对庆大霉素敏感率为88.9%、丁胺卡那91.1%、大肠杆菌对氨苄青霉素的敏感率为44.4%。革兰氏阳性菌中,链球菌对头孢类较敏感,其中头孢唑啉敏感率达92.3%以上,头孢三嗪敏感率达92.3%(表1)。

2.2 2001-2004肝硬化腹水感染致病菌革兰氏阴性杆菌占76.8%,其中大肠杆菌占60.3%,其他包括几个比例很少致病菌革兰氏阴性杆菌占3.4%,没有统计;革兰氏阳性菌占18.4%,比例最高为链球菌占11.6%。大肠杆菌对庆大霉素敏感率为35.2%、丁胺卡那39.8%、大肠杆菌的对氨苄青霉素敏感率为26.1%。大肠杆菌对庆大霉素、丁胺卡那、氨苄青霉素敏感性下降明显,对头孢三代敏感率仍保持在80.0%以上,尤其对头孢哌酮/舒巴坦敏感率在90%以上,可能该抗生素对内酰胺酶稳定,对染色体介导酶和质粒介导头孢菌素酶稳定,对头孢哌酮/舒巴坦,碳青霉烯类均敏感在95%以上。在表2中出现厌氧菌4株(2.7%)和真菌3株(2.1%)感染的病例。厌氧菌对氨苄青霉素敏感率25%,对头孢三代敏感率仍保持在75.0%以上。

2.3 1997-2000大肠杆菌占45.8%,2001-2004大肠杆菌占60.3%,两者有比较明显的差异,其他致病菌比率见表3。

2.4 大肠杆菌,克雷伯菌,葡萄球菌对庆大霉素、丁胺卡那霉素敏感率在1997/2001与2001-2004两阶段内有显著性差异,其他细菌抗生素敏感性见表4。

3 讨论

肝硬化患者由于脾功能亢进,机体免疫力下降,肠黏膜屏障功能下降,门体静脉间侧支循环建

■创新盘点

本文不仅分析致病菌菌谱和药敏有很大变化,而且在讨论中分析导致致病菌变化原因,提出如何提高致病菌阳性率诊断的方法。

应用要点

致病菌以大肠杆菌为主, 近来出现厌氧菌、真菌感染, 提醒临床医务人员需要注意。预防性治疗以第三代头孢为主。经验应用氨苄西林+氨基甙类、阿莫西林+克拉维酸, 第二代头孢或第三代头孢+阿莫西林/克拉维酸。提倡腹水培养和药敏试验后, 针对性应用抗生素。

表 2 2001-2004, 146例46株致病菌体外抗生素药敏情况 n (%)

致病菌	株数	构成比	庆大霉素	丁胺卡那	氨苄青霉素	环丙沙星	头孢三嗪	头孢哌酮	泰能
大肠杆菌	88	60.3%	31 (35.2)	36 (39.8)	23 (26.1)	53 (60.2)	72 (81.8)	80 (91)	86 (97.7)
克雷伯菌	19	13.1%	4 (21.1)	6 (31.5)	6 (31.5)	8 (42.1)	13 (68.4)	16 (84.2)	18 (94.7)
其他肠杆菌	5	3.4%	—	—	—	—	—	—	—
葡萄球菌	10	6.8%	5 (50)	5 (50)	6 (60)	2 (20)	6 (60)	8 (80)	9 (90)
链球菌	17	11.6%	3 (17.6)	10 (58.2)	7 (41.4)	2 (11.8)	13 (76.5)	15 (88.2)	16 (94.1)
厌氧菌	4	2.7%	0 (0)	0 (0)	1 (25)	0 (0)	3 (75)	3 (75%)	4 (100)
真菌	3	2.1%	—	—	—	—	—	—	—

(0)前为例数, (0)内为敏感例数占总例数的百分比, “—”表示未作统计。

表 3 1997-2000与2001-2004主要致病菌构成比较 (%)

时间	大肠杆菌	克雷伯菌	链球菌	肠球菌	葡萄球菌	厌氧菌	真菌
1997-2000	45.8	18.4	13.2	8.2	7.2	0	0
2001-2004	60.3 ^a	13.1 ^b	11.6 ^b	0	6.8 ^b	2.7	2.1

^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$ vs 1997-2000

表 4 1997-2000与2001-2004主要致病菌药敏试验敏感率比较 (%)

致病菌	庆大霉素		丁胺卡那		氨苄青霉素		头孢三嗪	
	1997-2000	2001-2004	1997-2000	2001-2004	1997-2000	2001-2004	1997-2000	2001-2004
2001-2004								
大肠杆菌	88.9	35.2 ^a	91.1	39.8 ^a	44.4	26.1	96.5	81.8
克雷伯菌	27.8	21.1 ^b	33.3	31.5	16.7	31.5	66.6	68.4
葡萄球菌	85.7	50.0 ^a	57.0	50.0 ^b	71.4	60.0	85.0	90.0

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

立, 发生自发性腹膜炎的几率为3%-8%^[1]。腹腔感染多为院内获得性感染, 如不能及时诊断和治疗, 会迅速发展成感染性休克和肾功能衰竭, 是导致患者死亡的直接原因^[2]。SBP患者腹水与肠道细菌潜在体生物特征有关^[3], 另有研究报道腹水感染与肠道通透性改变有关^[4]。据多数文献报导, 肝硬化腹水感染大多以大肠杆菌为主^[5]。这与本文报告相近。

1997-2000与2001-2004这两个阶段, 致病菌仍以大肠杆菌为主, 占45.8%和60.3%。1997-2000的大肠杆菌药敏中庆大霉素敏感率达88.9%、丁胺卡那敏感率达91.1%、氨苄青霉素敏感性达44.4%, 2001-2004中分别下降到35.2%、39.8%、26.1%。2001-2004大肠杆菌对头孢类敏感性达81.8%以上。这与目前大量应用抗生素, 尤其以滥用抗生素产生耐药有关, 认为对临床上肝硬化出现腹水, 尤其出现顽固性腹水应作腹水培养+药敏试验, 有助于提高肝硬化

腹水临床疗效。腹水常规或涂片的阳性率极低, 用血培养瓶在抗生素应用之前能提高阳性率。目前, 国内外已开展PCR方法, 扩展细菌的16SrR基因, 病原菌的阳性率达90%以上^[6-7]。

预防性治疗肝硬化腹水感染时, 经验应用氨苄西林+氨基甙类、阿莫西林+克拉维酸, 第二代头孢或第三代头孢+阿莫西林/克拉维酸。有人认为服用喹诺酮类2次/wk, 连用2 wk, 达不到预防作用^[8]。但1次/wk, 连用半年, 能降低SBP发生率^[9]。目前多以第三代头孢为一线用药, 疗程要足, 至少要8 d^[10]。

特别需要注意的是2001-2004期间肝硬化腹水培养中出现的需氧菌、厌氧菌和真菌感染, 这需要区别继发性腹膜炎而非仅仅考虑SBP诊断。Evans对门诊无症状肝硬化腹水患者腹水与住院肝硬化腹水培养后, 结果有明显差异^[11]。腹水总蛋白小于10 g/L患者SBP发生率是腹水总蛋白大于10 g/L患者的6倍^[12]。也有文献报道, 腹

水总蛋白 <10 g/L患者SBP发生率为 >10 g/L患者的10倍。现在认为, 结合腹水中腹水总蛋白大于 10 g/L、葡萄糖 <2.7 mmol/L、LDH >225 U/L或高于血LDH上限, 常提示肠穿孔所致的继发性腹膜炎^[13]。多次腹腔穿刺术、锁骨下静脉置管可引发医源性院内感染, 不适当的预防性抗生素的应用扰乱了肠道内正常菌群, 促进了某些致病菌, 如真菌、绿脓杆菌等生长繁殖, 从而成为优势菌, 这可能与近年来腹腔真菌感染有关^[5]。2001-2004真菌感染者, 其为介入术和深静脉置管术后, 故临床应引起重视。并发其他病应用激素也可导致真菌^[14]。同时可并发结核性腹膜炎^[15]。如腹水蛋白 >25 g/L或者白细胞 $>0.25 \times 10^9$ /L、PMN $<25\%$, 应考虑结核性腹膜炎可能, 需进一步检查, 如结核杆菌涂片或培养阳性, 腹水ADA/血清ADA >1 , 这有助于结核性腹膜炎的诊断。如腹水中CEA升高及腹水纤维连接蛋白(Pn) >57 mg/L, 应考虑到恶性腹水可能, 需进一步检查, 排除恶性腹水^[16]。

总之, 肝硬化腹水感染临床表现不典型, 致病菌仍以革兰氏阴性杆菌为主, 但致病菌菌谱已发生变化, 临床药敏已发生明显变化。对临床上肝硬化腹水患者出现不明原因发热、腹痛、对治疗不敏感, 尤其对治疗不敏感的顽固性腹水应及时进行腹水培养+药敏试验, 可以提高治疗效果, 改善患者生存质量。

4 参考文献

- 1 陈灏珠. 实用内科学. 第11版. 北京: 人民卫生出版社, 2004; 1854-1855
- 2 张斌, 万谟彬, 王灵台. 肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎发病机制研究进展. 国外医学·生理、病理科学与临床分册 2003; 23: 103-105
- 3 王瑞玲, 梁后杰, 刘俊康, 徐启旺. 自发性细菌性腹膜炎腹水中肠道细菌潜在生物特性的研究. 中华医院感染学杂志 2002; 12: 816-825
- 4 郭长青, 黄宏春, 李继昌, 宁寒冰. 肝硬化自发性腹水感染患者肠通透性检测的临床意义. 中华内科杂志 2004; 43: 530-531
- 5 韩春云, 李桂珍. 30例肝硬化患者腹腔感染病原菌及药敏分析. 实用肝脏病杂志 2003; 6: 98
- 6 Such J, Frances R, Munoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, Rodriguez-Valera F, Pascual S, Sola-Vera J, Carnicer F, Uceda F, Palazon JM, Perez-Mateo M. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology* 2002; 36: 135-141
- 7 Frances R, Benlloch S, Zapater P, Gonzalez JM, Lozano B, Munoz C, Pascual S, Casellas JA, Uceda F, Palazon JM, Carnicer F, Perez-Mateo M, Such J. A sequential study of serum bacterial DNA in patients with advanced cirrhosis and ascites. *Hepatology* 2004; 39: 484-491
- 8 Terg R, Llano K, Cobas SM, Brotto C, Barrios A, Levi D, Wasen W, Bartellini MA. Effects of oral ciprofloxacin on aerobic gram-negative fecal flora in patients with cirrhosis: results of short- and long-term administration, with daily and weekly dosages. *J Hepatol* 1998; 29: 437-442
- 9 杨大明, 孟宪镛. 医院感染自发性细菌性腹膜炎危险因素探讨. 中华医院感染学杂志 2001; 11: 417-419
- 10 贾杰. 肝硬化腹腔感染的治疗. 临床肝胆病杂志 2004; 20: 6-7
- 11 Evans LT, Kim WR, Poterucha JJ, Kamath PS. Spontaneous bacterial peritonitis in asymptomatic outpatients with cirrhotic ascites. *Hepatology* 2003; 37: 897-901
- 12 李易, 韩盛玺. 肝硬化自发性细菌性腹膜炎易患因素分析. 临床消化病杂志 2001; 13: 184-185
- 13 Wu SS, Lin OS, Chen YY, Hwang KL, Soon MS, Keeffe EB. Ascitic fluid carcinoembryonic antigen and alkaline phosphatase levels for the differentiation of primary from secondary bacterial peritonitis with intestinal perforation. *J Hepatol* 2001; 34: 215-221
- 14 苏尊玮, 王仁明, 黄兴清. 腹水真菌感染2例报道. 中国肝脏病杂志 2000; 8: 281
- 15 房红梅, 姚冬梅, 姚希贤. 肝硬化并发继发感染. 中国全科医学 2003; 6: 455-456
- 16 袁春, 连建奇, 黄长彤, 叶进. 肝硬化合并自发性细菌性腹膜炎诊断现状及研究进展. 国外医学·流行病学、传染病学分册 2004; 31: 361-364

■名词解释

潜在生物(CGC): 细菌在一定条件下, 可能出现短小杆菌和纤细状菌两种形态交替而致的宏观波动生长, 呈现潜生序变化的生物。

电编 张敏 编辑 张海宁

细菌性痢疾与肠易激综合征相关性分析

肖海刚, 郭津生

■背景资料

近几年国际、国内对IBS致病因素进行了更为广泛的研究, 众说纷纭, 许多专家、学者提出了肠道感染后引发的IBS, 即pIBS。本文作者在临床工作实践中, 亦发现一部分pIBS患者, 参照相关文献, 结合实际病例, 进行临床病例分析, 并将结果付诸于文。

肖海刚, 江苏省建湖县第三人民医院消化内科 江苏省建湖县 224700

郭津生, 复旦大学附属中山医院消化内科 上海市 200032

通讯作者: 肖海刚, 224700, 江苏省建湖县第三人民医院消化内科. xhg680808@126.com

电话: 0515-6268446

收稿日期: 2005-11-23 接受日期: 2005-12-17

An analysis of relationship between bacterial dysentery and irritable bowel syndrome

Hai-Gang Xiao, Jin-Sheng Guo

Hai-Gang Xiao, Department of Internal Medicine, the Third People's Hospital of Jianhu County, Jianhu 224700, Jiangsu Province, China

Jin-Sheng Guo, Department of Internal Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Correspondence to: Hai-Gang Xiao, Department of Internal Medicine, the Third People's Hospital of Jianhu County, Jianhu 224700, Jiangsu Province, China. xhg680808@126.com

Received: 2005-11-23 Accepted: 2005-12-17

Abstract

AIM: To investigate the relationship between previous dysenteric infection and the development of irritable bowel syndrome (IBS).

METHODS: Ninety-eight patients diagnosed with IBS in the Third People's Hospital of Jianhu County from September, 2003 to October, 2005 were investigated. Of these patients, 22 cases who had previous history of bacterial dysentery were selected and their clinical data, including the gender, age, the types of dysentery (acute or chronic episode), and the forms of IBS (diarrhea predominant, constipation predominant, or their combinations), were analyzed.

RESULTS: Of the 22 cases of IBS patients with dysenteric history, the female (68.2%, $n = 15$) covered a markedly higher percentage than the male (31.8%, $n = 7$). The number of cases within 31-45 years old (68.2%, $n = 15$) were more than the other two age groups, i.e., 10-30 years old (13.6%, $n = 3$) and above 45 years old (18.2%, $n = 4$). Most of the 22 patients (81.8%, $n = 18$) were

with a history of acute dysentery, rather than chronic type (18.2%, $n = 4$). The ratios of patients with diarrhea predominant, constipation predominant and the combination of diarrhea and constipation were 63.6% (14/22), 27.3% (6/22), and 9.1% (2/22), respectively.

CONCLUSION: There exists a relationship between bacterial dysentery and IBS, especially in the diarrhea form of IBS patients. Female patients at middle age with a history of acute dysentery are more susceptible to IBS.

Key Words: Irritable bowel syndrome; Bacteria dysentery; Relationship

Hai-Gang Xiao, Jin-Sheng Guo. An analysis of the relationship between bacterial dysentery and irritable bowel syndrome. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10):1012-1014

摘要

目的: 探讨细菌性痢疾与肠易激综合征(IBS)的相关性。

方法: 通过对建湖县第三人民医院2003-09/2005-10确诊为IBS的98例患者中曾患细菌性痢疾的22例患者进行性别、年龄、痢疾的类型(急性与慢性)及IBS类型(腹泻型、便秘型、混合型)等资料相关性分析及相对应比较。

结果: 在有菌痢病史的22例IBS患者中, 女性($n = 15$, 68.2%)明显多于男性($n = 7$, 31.8%); 31-35岁($n = 15$, 68.2%)多于10-30岁($n = 3$, 13.6%)及45岁以上($n = 4$, 18.2%); 急性菌痢($n = 18$, 81.8%)明显多于慢性菌痢($n = 4$, 18.2%); 腹泻型($n = 14$, 63.6%)、便秘型($n = 6$, 27.3%)及混合型($n = 2$, 9.1%)中, 以腹泻型为主。

结论: 细菌性痢疾与IBS有相关性。与菌痢相关的IBS患者中, 以腹泻型为主, 女性、中年、急性菌痢患者与IBS更具有相关性。

关键词: 肠易激综合征; 细菌性痢疾; 相关性

肖海刚, 郭津生. 细菌性痢疾与肠易激综合征相关性分析. 世界华人消化杂志 2006;14(10):1012-1014
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1012.asp>

0 引言

肠易激综合征(irritable bowel syndrome, IBS)是一种以腹痛或腹部不适伴排便习惯改变为特征的功能性肠病, 病因和发病机制迄今仍不明确. 流行病学研究发现大多数急性肠道感染缓解后会发生慢性、持续性的胃肠功能异常症状, 即所谓的感染后IBS(post-infection IBS, pIBS). 潘国宗 *et al*^[1]对北京地区人群(2500名)IBS流行病学调查, 结果显示, 有痢疾病史的人患IBS的比例高($OR=3.00, P<0.001$), 这一结果支持感染后IBS的假说, 但目前对感染后IBS本质的认识还很欠缺, 也没有合适的动物模型来验证其发病假说. 为进一步探讨其间的相关性, 作者对2003-09/2005-10在建湖县第三人民医院确诊的98例IBS患者的相关资料进行回顾性分析如下.

1 材料和方法

1.1 材料 在建湖县第三人民医院2003-09/2005-10就诊IBS患者98例. 女67例(68.4%), 男31例(31.6%); 年龄10-62(平均40.2)岁; 病程5 mo-6(平均3.6)a; 菌痢治愈与确诊为IBS的间隔时间为3-16(平均6.8)mo; 与菌痢有关者22例(32.4%), 其他原因(包括其他感染者)46例(67.6%). 在确诊患过菌痢的患者22例中, 女15例(68.2%), 男7例(31.8%); 年龄10-58(平均38.8)岁; 10-30岁为第1组3例(13.6%), 31-45岁为第2组15例(68.2%), 45岁以上为第3组4例(18.2%); IBS病程5 mo-5.2(平均3.2)a; IBS分类中, 腹泻型14例(63.6%), 便秘型6例(27.3%), 混合型2例(9.1%); 急性菌痢18例(81.8%), 慢性菌痢4例(18.2%).

1.2 方法 IBS患者参照罗马II的诊断标准而诊断, 分为腹泻型、便秘型、混合型3种. 菌痢的诊断结合其病史、临床表现、体征、病程、及实验室检查而诊断. 按照病程分为急性与慢性菌痢2种(急性菌痢病程迁延超过2 mo而病情未愈者为慢性菌痢). 将患过菌痢的22例pIBS患者分别以性别(男、女)、年龄(No.1为第1组: 年龄10-30岁; No.2为第2组: 年龄31-45岁; No.3为第3组: 年龄45岁以上)、菌痢类型(急性与慢性菌痢)为依据, 进行分组. 并观察分析各组患者的各自构成比及各自在腹泻型、便秘型、混合型IBS中所占比例. 通过统计学处理, 进行相对应

表1 pIBS患者22例的各种情况比较

分组	性别		年龄(岁)			菌痢类型	
	男	女	10-30	31-45	45以上	急性	慢性
构成比(%)	31.8	68.2	13.6	68.2	18.2	81.8	18.2
腹泻型(n)	5	9	2	10	2	12	2
便秘型(n)	2	4	0	5	1	5	1
混合型(n)	0	2	1	0	1	1	1

比较, 以期寻找出之间的差异性.

统计学处理 采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性.

2 结果

pIBS22例中女性(68.2%)明显高于男性(31.8%); 急性菌痢(81.8%)明显高于慢性菌痢(18.2%). 年龄构成中, 以31-45岁组患者较其他两组患病率高($P<0.05$), 而10-30岁组与45岁以上组比较没有统计学差异($P>0.05$). pIBS以腹泻型为主, 且与其他两组比较有显著差异($P<0.01$). 混合型占的比例最少(表1).

3 讨论

最近亚洲动力俱乐部9个国家12个中心对门诊1012例患者问卷调查(按罗马II标准)表明: 在功能性消化疾病中, IBS占359例(35.4%), 便秘94例(9.3%), 仅次于功能性消化不良(43.0%), 分别列为第2、3位^[2]. 各地研究的报道显示IBS是一种世界范围内的疾病. 可见IBS是发病率较高且危及人们生活质量的一类疾病. 尽管1999年罗马II的诊断标准对IBS的诊断在国际、国内有了较统一的认识与规范, 但目前IBS的病因和发病机制仍还不十分清楚. 最初认为IBS是肠道平滑肌功能障碍和内脏痛觉过敏, 逐渐发展到现在的脑-肠轴学说, 多种因素参与了IBS的发生与发展, 如精神心理因素^[3]、遗传因素、感染、药物、食物、季节因素、神经和内分泌及消化道激素(包括催乳素、CCK、运动素、VIP、前列腺素、生长抑素、P物质及5-羟色胺3等)等. 有研究表明约1/3的IBS患者在患病前曾有急性胃肠道感染史. 对病原体已被清除和黏膜炎症消退后发生的IBS样症状, 称之为感染后IBS. 即pIBS. McKendrick *et al*^[4]报道38例沙门菌肠炎患者治愈1 a后仍有12例存在肠功能紊乱. Neal *et al*^[5]前瞻性调查了1994-07/1994-12经微生物检查证实的544例细菌性胃肠炎患者胃肠病症的发病率和发生IBS的相对危险性, 发现在386例完成调

查的感染性胃肠炎患者中, 6 mo后有1/4的患者报告有持续的排便习惯改变, 即所谓的“痢疾后肠功能紊乱”, 结果也说明胃肠道感染确实可引起IBS. 结合本分析结果, 作者认为肠道感染, 尤其是细菌性痢疾与IBS更有相关性. 其机制除了与肠道感染对肠黏膜上皮屏障的破坏作用(包括病原体的侵袭、肠道感染与肥大细胞的关系、肠道感染与炎性介质)及肠道感染对神经的影响(毒素、脑-肠轴的影响)^[6]外, 亦可能与肠道菌群的失调、抗生素的使用等方面有关. 此方面国外有过相关的类似报道^[7].

我们认为, 细菌性痢疾与肠易激综合征(IBS)有较明显的相关性, 这与有关报道较近似^[1,4]. 与菌痢相关的pIBS好发年龄以中年患者较明显, 这与国内诸多报道较一致, 而美国则以45-64岁发病率最高^[8], 这可能是地区性差异等原因所致. 同时显示其相关的pIBS以女性、急性起病、腹泻型为主, 这可能与女性心理素质较低, 易出现焦虑和抑郁; 急性起病者存在对急性肠道炎症的持续炎症反应及各种胃肠激素炎症因子使肠黏膜通透性增高等诸多因素有关. 这些亦与国外的相关报道较一致^[9-10]. 由于本文病例样本不大, 故未能对pIBS与菌痢的其他方面相关性进一步研究. 总之, 在pIBS诱因中, 肠道感染, 尤其细菌性痢疾是一个非常重要的危险因素. 值得一提的是广大医务工作者在诊治菌痢时, 要前瞻性的考虑到其较远的相关疾病, 如pIBS. 至于如何尽量避免此类疾病诱发pIBS及如何进一步

治疗, 这还有待于各位专家、同仁的进一步研究.

4 参考文献

- 1 潘国宗. 肠易激综合征-诊断、流行病学、病理生理及病因探讨. 潘国宗, 王宝恩, 于中麟. 第一届中国消化系疾病学术周专题报告文选. 现代消化病学进展. 北京: 北京医科大学中国协和医学院联合出版社, 1997: 259-273
- 2 许国铭. 加强对肠易激综合征病因与治疗的研究. 中华内科杂志 2003; 42: 73
- 3 Kay L, Jorgensen T, Jensen KH. The epidemiology of irritable bowel syndrome in a random population: prevalence, incidence, natural history and risk factors. *J Intern Med* 1994; 236: 23-30
- 4 McKendrick MW, Read NW. Irritable bowel syndrome-post salmonella infection. *J Infect* 1994; 29: 1-3
- 5 Neal KR, Hebden J, Spiller R. Prevalence of gastrointestinal symptoms six months after bacterial gastroenteritis and risk factors for development of the irritable bowel syndrome: postal survey of patients. *BMJ* 1997; 314: 779-782
- 6 刘新光. 肠易激综合征与肠道感染. 胃肠病学, 2003; 8
- 7 Anand AC, Reddy PS, Saiprasad GS, Kher SK. Does non-dysenteric intestinal amoebiasis exist? *Lancet* 1997; 349: 89-92
- 8 Sandler RS. Epidemiology of irritable bowel syndrome in the United States. *Gastroenterology* 1990; 99: 409-415
- 9 Jarrett ME, Burr RL, Cain KC, Hertig V, Weisman P, Heitkemper MM. Anxiety and depression are related to autonomic nervous system function in women with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 386-394
- 10 Neal KR, Barker L, Spiller RC. Prognosis in post-infective irritable bowel syndrome: a six year follow up study. *Gut* 2002; 51: 410-413

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 •

NERD及相关疾病国际研讨会

本刊讯 NERD及相关疾病国际研讨会将于2006-08在三亚举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文和结构式摘要800字, 电脑打印附软盘或E-mail, 2006-06-15截稿.

2 联系方式

北京市鼓楼大街41号中国医学论坛报社 张莉; 邮编: 100009; 电话: 010-64002844; E-mail: NERD@gisummit.com

直肠癌C-erbB-2、nm23蛋白表达与预后的关系

高凤兰

高凤兰, 漯河医学高等专科学校病理教研室、病理研究中心
河南省漯河市 462000
通讯作者: 高凤兰, 462000, 河南省漯河市大学路148号, 漯河医学高等专科学校病理教研室. lhyzgao@126.com
电话: 0395-2924144 传真: 0395-2931578
收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-03-07

Correlations of C-erbB-2 and nm23 protein expression with prognosis of rectal cancer

Feng-Lan Gao

Feng-Lan Gao, Department of Pathology, Luohe Medical School, Luohe 462000, Henan Province, China
Correspondence to: Feng-Lan Gao, Department of Pathology, Luohe Medical School, 148 Daxue Road, Luohe 462000, Henan Province, China. lhyzgao@126.com
Received: 2006-02-13 Accepted: 2006-03-07

Abstract

AIM: To investigate the correlations of C-erbB-2, nm23 protein expression with the invasion and metastasis of rectal cancer.

METHODS: The expression of C-erbB-2 and nm23 protein in the specimens of rectal cancer ($n = 85$) was detected by immunohistochemistry and their correlations with the prognosis were analyzed, respectively.

RESULTS: The total positive rate of nm23 expression in rectal cancer was 78.8% (67/85). The expression nm23 was significantly higher in Duke's stage A (80.9%) than that in stage C (42.3%) or D (27.7%) ($P < 0.05$), but similar to that in stage B (75.0%) ($P > 0.05$). The total positive rate of C-erbB-2 expression was 80% (68/85) and high expression rate was 54.1% (46/85). It was inversely correlated to nm23 expression. The expression of C-erbB-2 expression was significantly higher in Duke's stage D (77.7%) than that in stage A (28.5%) or B (30.0%) ($P < 0.05$), but similar to that in stage C (76.9%) ($P > 0.05$). High level of nm23 was more commonly expressed in well-differentiated adenocarcinoma (80%) than that in poorly differentiated one (25.0%), and areolar cancer (10.5%) ($P < 0.05$),

but similar to that in moderately differentiated adenocarcinoma (71.49%) ($P > 0.05$). High level of C-erbB-2 was more commonly expressed poorly differentiated adenocarcinoma (81.2%) and areolar cancer (78.9%) than that in moderately differentiated (40%) and well differentiated one (26.6%) ($P < 0.05$). Both expression of C-erbB-2 and nm23 were not significantly different between poorly differentiated adenocarcinoma and areolar cancer ($P > 0.05$). In 41 of 85 patients after treatment for more than five years, high expression rates of nm23 and C-erbB-2 were 73.1% and 31.7%, respectively, while in the rest of 85 patients who survived less than five years, high expression rates of nm23 and C-erbB-2 were 34.1% and 84.1%, respectively.

CONCLUSION: The expression of nm23 is in significant negative correlation with C-erbB-2. High level of C-erbB-2 expression is associated with the invasion and metastasis of rectal cancer. High expression of C-erbB-2 and low expression of nm23 suggest a poor prognosis.

Key Words: Rectal cancer; C-erbB-2; nm23; Relationship; Prognosis

Gao FL. Correlations of C-erbB-2 and nm23 protein expression with prognosis of rectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10):1015-1018

摘要

目的: 探讨直肠癌C-erbB-2和nm23蛋白的表达及其与肿瘤浸润和转移的关系。

方法: 采用免疫组化方法检测85例直肠癌标本中C-erbB-2和nm23蛋白的表达, 并对其相关性及其与预后的关系进行分析。

结果: 在直肠癌85例中, nm23表达阳性率78.8%。按Duke's分期, A期高表达率80.9%明显高于C期42.3%和D期27.7% ($P < 0.05$), 与B期75%相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。C-erbB-2阳性率80%, 与nm23表达相反, D期高表达率77.7%明显高于A期28.5%和B期30% ($P < 0.05$), 与C期76.9%相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。

背景资料

直肠癌是一种常见的恶性肿瘤, 其发病率和死亡率呈逐年上升趋势, 提高大肠癌长期生存率的关键是早期诊断, 并准确地判断预后。近来的研究资料表明, 肿瘤相关基因的激活、转移抑制基因的功能丧失是肿瘤转移的主要原因, 本文旨在探讨nm23及C-erbB-2这两种蛋白在直肠癌中的表达、与肿瘤组织浸润、转移的关系及其相关性, 为直肠癌患者判断预后提供参考依据。

■创新盘点

本文较为全面的观察了nm23及C-erbB-2的表达与直肠癌患者的预后的关系,提出了nm23与C-erbB-2的表达呈负相关的观点,且nm23的低表达与C-erbB-2的高表达提示患者预后不佳,生存时间明显缩短。

nm23高表达率为80%,明显高于低分化腺癌25%和黏液癌10.5%($P<0.05$),与中分化腺癌71.5%相比差异无显著性($P>0.05$)。在低分化腺癌C-erbB-2高表达率为81.2%,黏液癌78.9%,明显高于中分化腺癌40%、高分化腺癌26.6%($P<0.05$),低分化癌、黏液癌二者相比差异无显著性($P>0.05$)。在术后生存5 a以上的41例患者中,nm23高表达率73.1%,C-erbB-2高表达率31.7%,44例术后生存5 a以下者,nm23高表达率34.1%,C-erbB-2高表达率84.1%。

结论: nm23与C-erbB-2蛋白表达呈明显的负相关;C-erbB-2高表达主要见于直肠癌Duke's的C、D期,提示与直肠癌浸润、转移有明显关系,nm23的低表达与C-erbB-2高表达者预后不良。

关键词: 直肠癌; nm23; C-erbB-2; 相关性; 预后

高凤兰. 直肠癌C-erbB-2、nm23蛋白表达与预后的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(10):1015-1018
http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1015.asp

0 引言

肿瘤的浸润与转移是一个多基因调控、多步骤、多阶段演进的过程,其中肿瘤细胞的异常增生是肿瘤浸润与转移的基础,肿瘤黏附性改变和运动能力增强及细胞外基质的降解是侵袭转移的条件^[1]。C-erbB-2也称为Her-2或Neu基因。与上皮生长因子受体(EGFR)非常相似,具有酪氨酸磷酸激酶活性,C-erbB-2过度表达可刺激肿瘤细胞恶性生长^[2],在乳腺癌中的过度表达的意义研究较多,但在直肠癌组织中的表达研究较少。nm23(non-metastasis23)基因为一重要的转移抑制基因,在不同肿瘤中表达不一致,我们探讨这2种蛋白在直肠癌中的表达、与肿瘤组织浸润、转移的关系及其相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 选择1999/2003漯河医学高等专科学校病理检验研究中心手术切除归档标本蜡块85例,随访资料完整,经HE染色病理复诊证实。Dukes A期21例, B期20例, C期26例, D期18例(均有肝转移)^[3];组织学类型及分化程度:高分化腺癌15例,中分化腺癌35例,低分化腺癌16例,黏液腺癌19例;术后生存时间 ≥ 5 a组41例, < 5 a组44例;男56例,女29例;平均年龄53.7(37-78)岁。C-erbB-2兔抗人mAb(CB11),为Zymed公司产

品、nm23鼠抗人mAb;免疫组化EnVision试剂盒购自Dako公司。

1.2 方法 采用EnVision法。(1)人直肠癌肿瘤标本石蜡连续切片4 μm 厚脱蜡至水;(2)抗原热修复处理,入Citrate缓冲液(0.01 mol/L, pH 6.0),微波(MW)中火煮沸10 min;(3)蒸溜水洗后,入30 mL/L过氧化氢5 min;(4)蒸溜水洗后,再经TBS缓冲液洗,加入一抗体C-erbB-2, nm23孵育30 min;(5)经TBS缓冲液冲洗3次,每次2 min;加入EnVision孵育30 min;(6)经TBS液冲洗3次,每次2 min;加DAB显色;(7)蒸溜水洗后,苏木素复染, TBS代替一抗作阴性对照,以已知阳性组织作阳性对照。C-erbB-2阳性表达为胞质和/或胞膜着色, nm23基因蛋白阳性表达主要是胞质着色,呈棕黄色颗粒状,偶尔可见胞核着色。其表达强度根据高倍镜下5个视野着色细胞所占比例均值进行分级:每例通常观察200个细胞,凡病变细胞未着色和着色细胞数 $< 25\%$ 为阴性(-), $25\% - 40\%$ 弱阳性(+), $41\% - 60\%$ 为阳性(++), $> 60\%$ 为强阳性(+++);(++)、(+++)均归为高表达^[3]。

统计学处理 结果行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 nm23及C-erbB-2表达与直肠癌Dukes分期 在85例直肠癌中nm23表达阳性率78.8%,高表达率56.5%。A期高表达率80.9%明显高于C期42.3%和D期27.7%($P<0.05$),与B期75.0%相比差异无显著性($P>0.05$)。C-erbB-2阳性率80.0%,高表达率54.1%,与nm23表达相反,D期高表达率77.7%明显高于A期28.5%和B期30%($P<0.05$),与C期76.9%相比差异无显著性($P>0.05$,表1)。

2.2 nm23及C-erbB-2表达与直肠癌组织学类型 在高分化腺癌nm23高表达率为80.0%,明显高于低分化腺癌25.0%和黏液癌10.5%($P<0.05$),与中分化腺癌71.5%相比差异无显著性($P>0.05$)。C-erbB-2高表达率在低分化腺癌为81.2%,黏液癌78.9%,明显高于中分化腺癌40.0%、高分化腺癌26.6%($P<0.05$),低分化癌和黏液癌二者相比差异无显著性($P>0.05$,表2)。在术后生存5 a以上的41例患者中,nm23高表达率73.1%,C-erbB-2高表达率31.7%,44例术后生存5 a以下者,nm23高表达率34.1%,C-erbB-2高表达率84.1%(表2)。

2.3 nm23及C-erbB-2蛋白阳性表达的相互关系 85例直肠癌中,nm23表达阳性67例(78.8%),其中轻度表达19例,中度表达26例,高度表达22例,

应用要点
对 nm-23 和 C-erbB-2 蛋白检测
可用来判断直肠癌
患者的预后.

表 1 直肠癌nm23及C-erbB-2表达与Dukes分期的关系 *n* (%)

Dukes 分期	<i>n</i>	nm23					C-erbB-2				
		-	+	++	+++	高表达	-	+	++	+++	高表达
A	21	1	3	9	8	17 (80.9) ^a	8	7	5	1	6 (28.5) ^a
B	20	2	3	8	7	15 (75.0)	8	6	4	2	6 (30.0)
C	26	8	7	7	4	11 (42.3)	2	4	12	8	20 (76.9)
D	18	7	6	2	3	5 (27.7)	1	3	5	9	14 (77.7)

^a*P*<0.05 vs C, D组.

表 2 nm23及C-erbB-2蛋白阳性表达与直肠癌病理组织类型与术后生存的关系 *n* (%)

组织学类型 与术后生存	<i>n</i>	nm23					C-erbB-2				
		-	+	++	+++	高表达	-	+	++	+++	高表达
高分化腺癌	15	1	2	5	7	12 (80.0)	6	5	3	1	4 (26.6)
中分化腺癌	35	2	3	17	13	30 (85.7) ^a	8	13	12	2	14 (40.0) ^a
低分化腺癌	16	7	5	3	1	4 (25.0) ^a	1	2	5	8	13 (81.2) ^a
黏液癌	19	8	9	1	1	2 (10.5) ^a	2	2	6	9	15 (78.9) ^a
≥5 a	41	2	9	11	19	30 (73.2) ^c	14	16	10	1	11 (26.8) ^c
<5 a	44	16	10	15	3	18 (40.9)	3	6	16	19	35 (79.5)

^a*P*<0.05 vs 高分化腺癌; ^c*P*<0.05 vs < 5 a.

表 3 nm23及C-erbB-2表达的相互关系 *n* (%)

nm23	<i>n</i>	C-erbB-2			
		-	+	++	+++
阴性	18	0	1 (11.1)	5 (27.8)	11 (61.1)
阳性	67	17 (25.4)	21 (31.3)	21 (31.3)	9 (13.4)
合计	85	17 (20.0)	22 (25.9) ^a	26 (30.6) ^a	20 (23.5) ^a

^a*P*<0.05 vs nm23阳性.

18例表达阴性. C-erbB-2表达阳性68例(80%), 其中轻度表达22例, 中度表达26例, 高度表达20例, 17例阴性表达, nm23及C-erbB-2表达的相互关系见表3.

3 讨论

直肠癌是一种常见的恶性肿瘤, 近年来发病率有升高趋势, 其浸润转移是非常复杂的过程. 近来的研究资料表明, 肿瘤相关基因的激活、转移抑制基因的功能丧失是肿瘤转移的主要原因, 人类肿瘤中, 受诸多癌基因与抑癌基因的控制, C-erbB-2位于17号染色体长臂, 编码一种具有酪氨酸蛋白激酶活性的物质, 即p185糖蛋白. 该基因扩增或过表达出现于某些肿瘤组织中, 参与肿瘤的发生和发展过程, 并与患者预后有关^[2], C-erbB-2与EGFR具有高度同源性, 两者在肿瘤的发生和生物学行为等方面可能存在协同作

用^[5-7], 已有报道C-erbB-2或EGFR的表达与肿瘤的浸润和转移有关^[8-9]. Kapitanovic *et al*^[10]用免疫组化法检测151例大肠癌患者C-erbB-2基因, 发现细胞核内C-erbB-2表达与生存期短密切相关, 所有患者均呈阳性表达. 但强阳性者只占43%. Kay *et al*^[11]观察164例Dukes B期大肠癌患者, 发现33.5%的患者肿瘤细胞染色质阳性, 并认为是预后差的标志物, 5 a生存率以47%对C-erbB-2阴性者的77%. 对293例未分化大肠癌的研究认为, C-erbB-2染色是一种独立的预后标志物. 本结果显示: 85例直肠癌中C-erbB-2阳性率80.0%(68/85), 高表达率54.1%(46/85), 按Dukes分期, 以C、D期表达率较高, 在术后生存5 a以上的41例患者中, C-erbB-2高表达率31.7%, 44例术后生存5 a以下者, C-erbB-2高表达率84.1%, 与文献[12]报道相似, 说明C-erbB-2的高表达可以促进肿瘤细胞的浸润与转移, 预后不佳.

nm23基因是1988年Steeg *et al*^[13]从K1735鼠黑色素瘤细胞系分离出来的一种与恶性肿瘤转移有关的基因. 他在低转移细胞株中的表达程度是高转移细胞株的10倍. nm23基因产物为核苷酸二磷酸激酶(NDPK), 此酶通过调节细胞内信号传递、分化等代谢过程, 影响微管、微丝等细胞骨架蛋白的生物活性而发挥生长抑制的负性调节作用. 人类的nm23基因有两个亚型, 即

■名词解释

1 C-erbB-2: 也称为Her-2或Neu基因. 与上皮生长因子受体(EGFR)非常相似, 具有酪氨酸磷酸激酶活性. C-erbB-2过度表达可刺激肿瘤细胞恶性生长.

2 nm23: 是1988年Steeg *et al*从K1735鼠黑色素瘤细胞系分离出来的一种与恶性肿瘤转移有关的基因. 他在低转移细胞株中的表达程度是高转移细胞株的10倍. nm23基因产物为核苷酸二磷酸激酶(NDPK), 此酶通过调节细胞内信号传递、分化等代谢过程, 影响微管、微丝等细胞骨架蛋白的生物活性而发挥生长抑制的负性调节作用. 人类的nm23基因有两个亚型, 即nm23-H1和nm23-H2. 且受两个独立系统所调节, 前者似乎与癌转移的关系更为密切.

nm23-H1和nm23-H2. 且受两个独立系统所调节, 前者似乎与癌转移的关系更为密切. Wang *et al*^[14]用Southern印迹法及RT-PCR技术发现20例大肠癌患者中, 8例有淋巴结及远处转移者中4例有等位基因缺失或突变. 12例无转移者无上述变化. nm23-H1等位基因缺失与低分化程度密切相关, 且生存期短. Tomic *et al*^[15]报道大肠癌组织中nm23阳性率为71.6%. 其低表达与淋巴结转移有关($P<0.05$). 本结果显示, nm23的表达与C-erbB-2的表达正相反, 85例直肠癌中nm23表达阳性率78.8%(67/85), 高表达率56.5%(48/85). 按Dukes分期, 以A, B期表达率较高, 在术后生存5 a以上的41例患者中, nm23高表达率73.1%, 44例术后生存5 a以下者, nm23高表达率34.1%. nm23与C-erbB-2的表达呈明显的负相关性, 且均与组织学类型有关.

从nm23基因表达和预后及生存期来看, 两组5 a生存率不同的患者nm23表达有显著性差异($P<0.025$). nm23高表达比nm23低表达患者预后好. 这说明nm23基因不但可以作为判断转移的标志基因, 而且还有助于判断患者的预后, 这与nm23基因转移抑制作用是相一致的^[16-17]. nm23基因蛋白低表达和C-erbB-2基因蛋白高表达者预后较差.

4 参考文献

- 1 王喜梅, 孙雷, 张朝, 郑仁恕, 王乃玉, 冯晓海, 张众. EGFR、COX-2及P63蛋白表达与甲状腺乳头状癌侵袭转移的关系. 临床与实验病理学杂志 2004; 20: 191-194
- 2 李玉林, 叶诸榕, 龚守良. 分子病理学. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 207
- 3 许沈华, 倪型灏, 凌雨田, 张谷, 朱赤红, 刘祥麟. 食管癌细胞中c-erbB-2与P-gP表达的相关性. 临床与实验病理学杂志 2004; 20: 203-205
- 4 Sirotkovic-Skerlev M, Krizanac S, Kapitanovic S, Husnjak K, Unusic J, Pavelic K. Expression of c-myc, erbB-2, p53 and nm23-H1 gene product in

benign and malignant breast lesions: coexpression and correlation with clinicopathologic parameters. *Exp Mol Pathol* 2005; 79: 42-50

- 5 王青, 吴金生, 高德明, 赖大年, 马庆久. EGF受体和转化生长因子alpha-mRNA在人大肠癌组织的表达意义. 世界华人消化杂志 1999; 7: 590-592
- 6 张建兵, 陈莉, 韩枋, 于兰, 何松, 周建云. c-erbB-2过表达、nm23低表达与结直肠癌预后不良的关系. 中华病理学杂志 2003; 32: 115
- 7 许天文, 陈道达, 郑勇斌, 连彦军. C-erbB-2, nm23蛋白表达与结直肠癌浸润转移的相关性. 华中科技大学学报(医学版) 2005; 34: 214-216
- 8 曲娴, 刘建平, 曲宏, 孙红霞. 大肠癌C-erbB-2和EGFR的表达意义. 世界华人消化杂志 2001; 9: 838-839
- 9 McKay JA, Loane JF, Ross VG, Ameyaw MM, Murray GI, Cassidy J, McLeod HL. c-erbB-2 is not a major factor in the development of colorectal cancer. *Br J Cancer* 2002; 86: 568-573
- 10 Kapitanovic S, Cacev T, Berkovic M, Popovic-Hadzija M, Radošević S, Seiwerth S, Spaventi S, Pavelic K, Spaventi R. nm23-H1 expression and loss of heterozygosity in colon adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1312-1318
- 11 Kay EW, Mulcahy H, Walsh CB, Leader M, O'Donoghue D. Cytoplasmic c-erbB-2 protein expression correlates with survival in Dukes' B colorectal carcinoma. *Histopathology* 1994; 25: 455-461
- 12 侯振江, 张丽华. 基因标志物与大肠癌预后. 中国肛肠病杂志 2005; 25: 456-458
- 13 Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgerirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 200-204
- 14 Wang HM, Rajagopal S, Chakrabarty S. Inhibition of human colon cancer malignant cell behavior and growth by antisense epidermal growth factor receptor expression vector. *Anticancer Res* 1998; 18: 2297-2300
- 15 Tomic S, Ilic Forko J, Babic D, Sundov D, Kuret S, Andelinovic S. c-erbB-2, p53, and nm23 proteins as prognostic factors in patients with epithelial ovarian carcinoma. *Croat Med J* 2003; 44: 429-434
- 16 Brenner AS, Thebo JS, Senagore AJ, Duepre HJ, Gramlich T, Ormsby A, Lavery IC, Fazio VW. Analysis of both NM23-h1 and NM23-H2 expression identifies "at-risk" patients with colorectal cancer. *Am Surg* 2003; 69: 203-208
- 17 Freije JM, MacDonald NJ, Steeg PS. Nm23 and tumour metastasis: basic and translational advances. *Biochem Soc Symp* 1998; 63: 261-271

电编 张敏 编辑 潘伯荣

共病致大肠癌漏诊情况分析55例

刘剑君, 詹俊, 赖林, 刘建平

刘剑君, 湖南省新化县人民医院内科 湖南省新化县 417600
詹俊, 赖林, 刘建平, 中山大学附属第二医院消化内科 广东省广州市 510120
通讯作者: 詹俊, 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. championliu@tom.com.
电话: 020-81332598 传真: 020-81332244
收稿日期: 2006-01-20 接受日期: 2006-02-09

摘要

目的: 总结共病状态下大肠癌漏诊的具体原因。

方法: 回顾性分析55例漏诊大肠癌的临床资料, 对率的比较采用卡方检验。

结果: 被漏诊的疾病中, 大肠癌合并痔疮18例, 合并消化性溃疡10例, 合并结直肠息肉7例, 合并急性阑尾炎5例, 合并缺铁性贫血5例, 合并慢性胆囊炎4例, 合并溃疡性结肠炎3例, 合并慢性盆腔炎2例, 合并阑尾周围脓肿1例。

结论: 不少临床医师拘泥于“一因论”的思维模式而忽视了共病的存在, 这是导致共病状态下大肠癌漏诊的主要原因。

关键词: 共病; 大肠癌; 误诊

刘剑君, 詹俊, 赖林, 刘建平. 共病致大肠癌漏诊情况分析55例. 世界华人消化杂志 2006;14(10):1019-1021
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1019.asp>

0 引言

大肠癌属于误漏诊率较高的疾病, 文献报道其误漏诊率在30.2%-52.4%^[1-3], 关于误漏诊原因分析的临床报道已很多, 但对因为共病(comorbidity)存在而导致大肠癌漏诊这一因素重视不够, 事实上, 与患者主要症状相关的某些伴随疾病的先行确诊常使大肠癌这个重要疾病被掩盖或忽视, 随后针对伴随疾病的治疗更加延误了大肠癌的早期诊治, 故此类误诊虽只属于漏误诊断而非完全诊断错误^[4], 但更应引起临床医生的重视。

1 材料和方法

1.1 材料 选取2000-08/2004-08本院肠镜室电子

结肠镜检查出的临床资料较齐全的原发性大肠癌576例(均有术后病理或活检病理结果, 其中结肠癌324例, 直肠癌231例, 多原发癌21例), 男306例, 女270例。青年组(<40岁)61例, 中年组(40岁≤年龄<60岁)189例, 老年组(≥60岁)326例。

1.2 方法 漏诊标准包括^[4-6]: 在根据相关症状确诊了伴随疾病后, 有下列情况之一者: (1)第1个伴随疾病确诊后超过1 mo; (2)超过3次门诊就诊仍未诊断大肠癌者; (3)针对相关症状, 经过1次住院检查治疗, 出院时仍未诊断大肠癌者; (4)经1项特殊检查(结肠镜或X线钡剂灌肠造影)仍未发现病变者。

统计学处理 运用数理统计方法对各种漏诊的具体情况分别进行归纳、统计和分析, 对两个率的比较采用四格表卡方检验, 对多个率的比较采用R×C表卡方检验。全部统计资料在SPSS11.5统计软件上进行。

2 结果

576例原发性大肠癌中临床共误漏诊大肠癌213例(结肠癌124例, 直肠癌89例), 其中因共病导致漏诊55例(结肠癌31例, 直肠癌24例), 占本组全部误漏诊病例的25.9%(55/213)。55例中男32例, 漏诊率10.46%(32/306), 女23例, 漏诊率8.52%(23/270), 经四格表卡方检验, 二组之间的漏诊率无显著性差异。其中青年组漏诊率13.1%(8/61), 中年组漏诊率7.9%(15/189), 老年组漏诊率9.8%(32/326), 经R×C表卡方检验, 三组之间的漏诊率无显著性差异。共病状态下结肠癌漏诊率9.57%(31/324), 直肠癌漏诊率10.4%(24/231), 经四格表卡方检验, 二组之间的漏诊率无显著性差异(表1)。

被漏诊的疾病中, 大肠癌合并痔疮者18例, 合并消化性溃疡10例, 合并结直肠息肉7例, 合并急性阑尾炎5例, 合并缺铁性贫血5例, 合并慢性胆囊炎4例, 合并溃疡性结肠炎3例, 合并慢性盆腔炎2例, 合并阑尾周围脓肿1例。

临床上主要表现为右腹痛或包块者12例, 表现为剑突下规律性疼痛者9例, 解黑便或潜血试

■背景资料

消化内镜技术在近20 a有飞跃式的进展, 放大电子肠镜的出现和染色内镜技术的应用使得大肠癌的早期发现率大为提高。然而, 临床上大肠癌的误诊率仍居高不下, 主要原因仍归结于医师的主观失误, 其中对“共病”的忽视, 常使次要的某些相关疾病倒得到了明确诊断, 但是大肠癌却被遗漏了。

■创新盘点

在众多关于大肠癌误漏诊原因分析的文献中, 均对因为共病存在而导致大肠癌漏诊这一因素重视不够。本文特别提到, 因共病而漏诊的病例约占全部误漏诊大肠癌病例的1/4-1/3, 进一步指出了拘泥于“一因论”的思维模式, 忽视了共病的存在, 是导致共病状态下大肠癌漏诊的主要原因。

■应用要点

因为次要疾病的先行确诊常使大肠癌这个重要疾病被遗漏,而针对次要疾病的治疗更加延误了大肠癌的诊治,其带来的后果是严重的。本文呼吁临床医生重视共病存在,并抓住主要病因,从而减少大肠癌的误诊。

表 1 共病状态下大肠癌漏诊率的比较

		漏诊	未漏诊	合计	漏诊率	P值
		n	n	n	%	
性别	男	32	274	306	10.46	0.429 ($\chi^2 = 0.624$)
	女	23	247	270	8.52	
年龄	青年	8	53	61	13.11	0.474 ($\chi^2 = 1.494$)
	中年	15	174	189	7.94	
	老年	32	294	326	9.82	
部位	结肠	31	293	324	9.57	0.749 ($\chi^2 = 0.102$)
	直肠	24	207	231	10.39	

验阳性者23例,仅大便性状改变者(便秘或腹泻或二者交替)8例,首发贫血者3例。外院漏诊36例,占65.5%;本院漏诊19例,占34.5%。漏诊时间1-6 mo 31例,7-12 mo 14例,1-2 a 8例,2 a以上2例。

3 讨论

3.1 共病对大肠癌的影响 共病的概念来源于美国耶鲁大学Feinstein^[7]的《慢性疾病中的共病在治疗前的分类》的研究报告,是指某个个体在一段特定的时间内(或终生)同时存在多于一种疾病的情况。众所周知,某些共病存在可改变大肠癌生物学特性及预后,如2型糖尿病可导致大肠癌发病率上升^[8],某些共病如充血性心衰、消化性溃疡、糖尿病等可引起大肠癌分布于大肠近端的概率上升,且近端较远端大肠癌Dukes分期更高,预后更差^[9-10]。而与消化道症状相关的共病如痔疮、消化性溃疡、缺铁性贫血、急性阑尾炎、大肠息肉、胆囊炎、慢性盆腔炎等的存在则容易让主诊医生只对其中某一种疾病作出诊断并治疗,而遗漏了同时存在的大肠癌。文献报道^[2]因共病而漏诊的病例占全部误漏诊大肠癌病例的32.8%(42/128),本组25.9%(55/213)的结果与其较为相近。本研究结果进一步显示:共病状态下大肠癌漏诊率与患者性别、年龄和肿瘤部位无关。

3.2 共病状态下大肠癌漏诊的具体原因

3.2.1 把无痛性新鲜便血当作痔疮的特征性表现 尤其是对那些被肛肠科医师诊断为痔疮的患者,主诊医师更容易因为满足于痔疮的诊断而忽略结肠疾病。文献^[11]报道合并痔疮使大肠癌的漏诊率达26.7%,本研究中漏诊率达32.7%,居共病中的首位。然而,粪便带新鲜血不仅是痔疮的主要症状,也是直肠息肉的主要临床表现,亦为大肠癌的症状之一。故对于便血患者而言,如同时有低热、消瘦、贫血等全身症状,或年龄超

过50岁,应考虑结直肠肿瘤。

3.2.2 对黑便或粪便潜血试验阳性者单纯考虑上消化道疾病 以大肠癌合并消化性溃疡者为例,漏诊的10例患者中,青年组2例,中年组1例,老年组7例。均以上腹痛为主要临床表现,粪便潜血试验阳性,胃镜证实消化性溃疡,遂予常规制酸护胃治疗,然而4-6 wk后腹痛症状无好转,粪便潜血试验持续阳性,最后行结肠镜检查确诊大肠癌。这10例患者不仅漏诊,而且重复误诊,6例曾误诊慢性胃肠炎,3例误诊为痔疮,1例误诊为慢性盆腔炎。我院曾报道^[6]因合并消化性溃疡漏诊8例右半结肠癌,占全部误漏诊右半结肠癌的8.4%(8/95),本组资料显示因此类共病所致的漏诊占全部误漏诊大肠癌的4.7%(10/213)。文献统计247例老年便血患者,发现大肠癌为最常见病因,占52.2%(129/247)^[12],故对有此报警症状者不能忽略大肠癌的可能。

3.2.3 对青年人结肠癌认识不足 我国大肠癌发病年龄较欧美国家提前近10 a,且青年人结肠癌临床表现不典型,恶性程度高,手术切除率低,预后差^[13-14]。其误漏诊率有文献报道高达80.8%(42/52)^[15]。如果片面认为中老年人易患大肠癌,自然容易漏诊。

3.2.4 将急性阑尾炎作为一个单纯的急症来处理 部分急诊手术医师忽略了回盲部肿瘤因生长压迫或继发感染而导致阑尾炎的情况,满足于术中探查证实的阑尾炎性改变,忽略了患者急性阑尾炎发作前的病史,术中未进一步探查回盲部及升结肠。本研究中5例患者都是阑尾切除术后肠道症状不缓解而行腹部CT或肠镜检查而发现的。

3.2.5 部分消化专科医生未强调全结肠镜检查 本研究中有7例合并结直肠息肉、3例合并溃疡性结肠炎的患者,均为外院行结肠镜检时满足于已发现的病变而未达到回盲部者,结果忽略同时存在于右半结肠的病变。

3.2.6 非消化专科医师对缺铁性贫血的病因认识不足 其中1例女性患者,初期考虑缺铁性贫血病因为月经过多所致,在妇产科门诊排除了子宫肌瘤等妇科疾病,按缺铁性贫血治疗。然而患者贫血症状逐渐加重,后就诊于血液科,发现肝脏多发占位,转至肝胆外科,再申请电子肠镜检查方发现回盲部癌。

3.2.7 将右上腹痛症状单纯归结于已确诊的肝胆疾患 其中4例有明确慢性胆囊炎、胆囊结石病史,但患者近期腹痛症状有别于既往典型胆绞痛

■名词解释

一因论:“一因论”与“偶因论”和“多因论”组成“原因论”的三个理论,一因论包括差别原因论、连续原因论、最终原因论三个子项目。由于语言和理性本身的要求,一因论往往是一个健全理论的着眼点,不能将其简单解为“唯一原因论”。

表现, 主诊医师忽略新的症状, 未及时申请粪便潜血试验和肠镜检查, 直至消瘦和低热等全身症状出现后才行肠镜检查确诊。

3.3 减少大肠癌漏诊的注意事项

3.3.1 不能满足于基本疾病的明确, 还要警惕潜在的危重疾病 事实上, 任何检查方法都有可能造成大肠癌的漏诊, 不能仅凭一次检查结果阴性而否定大肠癌的诊断。比如强调直肠指诊的同时不能单纯依赖直肠指诊, 对可疑病例应多次复查大便潜血, 查癌胚抗原并申请全结肠镜检查。

3.3.2 建立循证医学的科学思维模式, 避免因经验性思维、片面性思维、静止性思维、反逻辑性思维带来的诊断思维偏差 因共病导致的漏诊, 相当部分是因为在疾病的诊断思维模式上, 不少医师拘泥于“一因论”的思维模式而忽视了共病的可能, 对共病的认识不足导致有时诊断出来的仅仅是居次要地位的疾病, 而占主导地位的疾病却被遗漏。

3.3.3 应推广在自然人群中筛查大肠癌的序贯粪潜血试验 每年1次的筛查可明显降低大肠癌的漏诊率, 减少发病率, 提高大肠癌患者的长期存活率^[16-18], 对50岁以上人群更是必要和有益的^[19-20]。此外, 对50岁以上人群有不能满意解释的消化道报警症状患者应强调全结肠镜检查。

4 参考文献

- 1 王世和, 梁海清, 祝莹. 大肠癌误诊155例分析. 中华全科医师杂志 2004; 3: 388-389
- 2 单礼成, 孙力勇, 陈中, 陈伟. 大肠癌128例漏误诊原因分析. 中国实用外科杂志 2002; 22: 173
- 3 刘恩芹. 大肠癌40例误诊分析. 新医学 2004; 35: 624-625
- 4 刘振华, 陈晓红. 误诊学. 第1版. 山东: 山东科学技术出版社, 1993: 6-12
- 5 张亚力, 张振书, 杨希山. 大肠癌的基础与临床. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1999: 151-157
- 6 陈为宪, 钟英强. 右半结肠癌95例误诊与漏诊分析. 新医学 2003; 34: 77-79
- 7 Feinstein AR. The pretherapeutic classification of comorbidity in chronic disease. *J chronic Dis* 1970; 23:

455-468

- 8 Hu FB, Manson JE, Liu S, Hunter D, Colditz GA, Michels KB, Speizer FE, Giovannucci E. Prospective study of adult onset diabetes mellitus (type 2) and risk of colorectal cancer in women. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 542-547
- 9 Gonzalez EC, Roetzheim RG, Ferrante JM, Campbell R. Predictors of proximal vs. distal colorectal cancers. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 251-258
- 10 Takada H, Ohsawa T, Iwamoto S, Yoshida R, Nakano M, Imada S, Yoshioka K, Okuno M, Masuya Y, Hasegawa K, Kamano N, Hioki K, Muto T, Koyama Y. Changing site distribution of colorectal cancer in Japan. *Dis Colon Rectum* 2002; 45: 1249-1254
- 11 刘树佳, 王彤, 陈祥洪. 大肠癌误诊与漏诊120例临床分析. 大肠肛门病外科杂志 2003; 9: 158-160
- 12 陈安海, 王红, 赵逵, 熊弦, 刘同英. 老年便血患者247例内镜检查结果分析. 中华老年医学杂志 2003; 22: 313
- 13 谢正勇, 卿三华. 国人青年结直肠癌解剖部位分布及临床病理特点. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1511-1514
- 14 Qing SH, Rao KY, Jiang HY, Wexner SD. Racial differences in the anatomical distribution of colorectal cancer: a study of differences between American and Chinese patients. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 721-725
- 15 陈安海, 李劲鸿, 赵逵, 赵廷智, 闫鸿. 青年人大肠癌临床分析. 中华消化杂志 2003; 23: 434
- 16 李世荣, 田素丽, 武子涛. 序贯粪隐血试验在自然人群连续性大肠癌普查中的应用. 世界华人消化杂志 2004; 12: 137-139
- 17 Jorgensen OD, Kronborg O, Fenger C. A randomised study of screening for colorectal cancer using faecal occult blood testing: results after 13 years and seven biennial screening rounds. *Gut* 2002; 50: 29-32
- 18 Niv Y, Lev-El M, Fraser G, Abuksis G, Tamir A. Protective effect of faecal occult blood test screening for colorectal cancer: worse prognosis for screening refusers. *Gut* 2002; 50: 33-37
- 19 Levin B, Smith RA, Feldman GE, Colditz GA, Fletcher RH, Nadel M, Rothenberger DA, Schroy PS 3rd, Vernon SW, Wender R. Promoting early detection tests for colorectal carcinoma and adenomatous polyps: a framework for action: the strategic plan of the National Colorectal Cancer Roundtable. *Cancer* 2002; 95: 1618-1628
- 20 Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D, Kirk L, Litin S, Simmang C. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003; 124: 544-560

同行评价

大肠癌的误诊、漏诊是一临床常见问题, 应引起关注。本文分析了该院576例原发性大肠癌中临床共误漏诊大肠癌213例, 其中因共病导致漏诊55例, 对临床治疗有一定指导意义。

电编 李琪 编辑 张海宁

进展期胃癌合并幽门梗阻内镜治疗103例

滕进波, 张宏博

■背景资料

进展期胃癌内镜下治疗是丧失手术时机胃癌综合治疗的重要方面。镜下各种治疗手段的不同选择和组合直接关系到患者生存期的延长和生存质量的提高。目前, 国内在这一领域的研究既不系统也不充分。内镜下联合化疗药物局部注射、微波烧灼病灶以及梗阻部位放置支架的治疗有利于发挥各手段之所长, 是具有积极创新意义的姑息治疗。

滕进波, 陕西省勉县医院消化内科 724200
张宏博, 第四军医大学附属西京医院消化内科 710032
通讯作者: 滕进波, 724200, 陕西省勉县和平路112号, 勉县医院消化内科. teng20000128@126.com
电话: 0916-3219777 传真: 0916-3232218
收稿日期: 2006-01-22 接受日期: 2006-02-13

摘要

目的: 探讨进展期胃癌合并幽门梗阻内镜治疗的方法及其疗效。

方法: 103例进展期胃癌合并幽门梗阻患者, 按就诊顺序随机分为4组进行内镜下治疗。A组内镜下局部注射化疗药物; B组内镜下微波消融治疗; C组内镜下微波消融治疗加局部注射化疗药物; D组内镜下微波消融治疗加局部注射化疗药物后4 wk放置金属内支架。另选择同期拒绝任何治疗的患者25例作为对照组。

结果: D组内镜治疗的显效率为84.62%, 较B、C两组的33.33%和44.44%明显提高($P < 0.01$); 同时, D组内镜治疗后半年, 幽门再梗阻发生率为38.46%, 显著低于A、B、C三组的88.46%、79.17%、59.26%($P < 0.01$)。D组患者半年, 或1 a的生存率明显提高, 中位生存期达9.37 mo, 其生存情况好于其他各组患者。

结论: 内镜下微波消融加局部注射化疗药物, 并放置金属内支架是一种治疗进展期胃癌合并幽门梗阻积极的姑息疗法, 能明显提高患者的生存质量, 延长其生存时间。

关键词: 胃癌; 幽门梗阻; 内镜; 支架; 微波; 化疗; 局部

滕进波, 张宏博 进展期胃癌合并幽门梗阻内镜治疗103例. 世界华人消化杂志 2006;14(10):1022-1026
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1022.asp>

0 引言

进展期胃癌合并幽门梗阻引起的临床症状表现为恶心、呕吐、腹胀及进食困难, 患者的身体状况和生活质量明显下降。外科手术是传统的治疗方法, 但由于患者的体质情况较差, 且常伴

有严重的并发症, 往往失去手术根治的机会。而与外科胃肠短路或胃肠造瘘等改道手术相比, 进展期胃癌合并幽门梗阻的内镜治疗具有损伤小、耐受性好、病死率低、住院时间短等优点, 是一种能缓解胃肠道梗阻症状的姑息性治疗方法, 同样可明显改善患者的临床症状。然而, 内镜治疗后的幽门再梗阻问题仍未获得解决。为此, 我们在通常内镜下局部注射化疗药物、微波消融治疗的基础上, 放置金属内支架, 以探讨内镜下治疗进展期胃癌合并幽门梗阻更为合理、有效的方案, 进一步延长临床症状的缓解期, 改善患者的生存质量。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 对象选择 选择2000-2005门诊或住院经内镜检查, 病理确诊的进展期胃癌合并幽门梗阻病例, 并具备下列条件之一者纳入临床各研究组。(1)术前B超、CT、MRI等或体检明确有远处转移, 不能行根治性手术, 且患者及家属拒绝开腹手术。(2)既往开腹术中发现肿瘤广泛浸润胃壁, 无法行胃肠吻合短路术或短路术易发生吻合口漏。(3)全身情况极差, 经短期营养治疗无效, 或伴有严重的心肺等内科疾患, 不能耐受开腹手术。各研究组共有患者103例, 其中男61例, 女42例。年龄分布46-75岁之间, 平均年龄51.6±18.5岁。

1.1.2 诊断标准 (1)癌灶浸润深度超过胃黏膜下层。(2)上腹饱胀, 规律性呕吐, 吐物腐臭, 量多, 有宿食。(3)营养不良, 消瘦, 贫血。可有脱水征, 上腹可见胃型及胃蠕动波, 有振水音。(4)X线钡餐检查见胃腔大, 有多量潴留物, 幽门管变细, 形态不规则, 或十二指肠球部变形, 排空迟缓。(5)长期呕吐者可伴血钾、血氯、血浆蛋白及红细胞、血红蛋白的降低。(6)经内镜下治疗, 患者再次出现上述症状与体征为治疗后再梗阻。

1.1.3 临床分组 按就诊顺序随机分为A、B、C和D四组。局部化疗组(A组): 26例, 其中男16

例, 女10例, 平均年龄 49.8 ± 15.1 岁. 内镜下局部注射化疗药物; 微波治疗组(B组): 24例, 其中男14例, 女10例, 平均年龄 50.7 ± 19.3 岁. 内镜下微波消融治疗; 内镜下局部化疗+微波治疗组(C组): 27例, 其中男16例, 女11例, 平均年龄 52.9 ± 15.2 岁, 内镜下局部注射化疗药物联合微波消融治疗. 内镜下局部化疗+微波治疗+内支架组(D组): 26例, 其中男15例, 女11例, 平均年龄 51.8 ± 14.3 岁. 内镜下局部注射化疗药物联合微波消融治疗后4 wk放置金属内支架. 另选择同期拒绝任何治疗的患者25例作为对照组, 其中男15例, 女10例, 其平均年龄 50.9 ± 13.2 . 各组患者在年龄、疾病分期等方面具有可比性.

1.1.4 主要试剂与仪器 (1)日本奥林巴氏EVIS-XQ240电子胃镜. (2)美国Wilson-Cook公司VINF-23型注射针(3)国产微波治疗仪, 频率2450 Hz, 输出电流0-200 mA. (4)南京微创公司记忆合金网状支架. (5)局部注射用化疗药物: 5-氟尿嘧啶、丝裂霉素.

1.2 方法

1.2.1 内镜下局部注射化疗 经内镜活检孔插入VINF-23型注射针, 以幽门口方向为中心, 分别沿12、2、4、6、8、10点钟方向, 每点每次注射2 mL化疗药物混合液(5-氟尿嘧啶500 mg/20 mL、丝裂霉素8 mg、利多卡因5 mL、肾上腺素1 mg加生理盐水25 mL混合成的50 mL). 对于病变较大者(>3.5 cm), 在周围不规则隆起处放射状注射化疗药物, 每点2 mL. 注射后常规静脉滴注50 g/L葡萄糖注射液500 mL加西咪替丁0.6 g.

1.2.2 内镜下微波治疗 在常规胃镜检查后, 由胃镜活检孔插入微波治疗探头, 根据肿瘤部位大小和形态选择适当的功率, 对隆起性病灶, 先用80-100 mA将导线对准肿瘤的顶部及底部烧灼, 见其呈白色退出, 对于环形狭窄型将导线插入病灶下端用60-80 mA由远至近“熨烫法”及“多部位灼法”, 对于管腔狭窄明显结合上下提插法使其表面污物去除, 管腔扩大, 局部呈现灰白色时退出.

1.2.3 内镜下放置支架 用胃镜插至梗阻近端, 通过镜身工作通道插入造影导管, 对着狭窄处注入380 g/L泛影葡胺造影剂, X光透视下了解狭窄段范围. 插入超滑导丝通过狭窄段, 造影导管在导丝的导引下达到空肠, 抽出超滑导丝, 沿导

管进入超硬导丝至空肠, 分别退出导管和内镜. 根据狭窄段情况选择合适长度的金属支架, 释放后支架两端必须超过狭窄段2-3 cm. 如狭窄段为3 cm, 则需7-8 cm支架. 本组选用的支架为国产记忆合金网状内支架, 长度6-12 cm, 最大直径2 cm. 将装有支架的推送器沿超硬导丝送至狭窄段, 在X光透视下根据残留造影剂确定部位, 最后释放支架.

1.2.4 内镜下治疗要点 (1)常规缓慢推入内镜后, 仔细观察梗阻程度及管腔狭窄情况, 尽可能将内镜插至狭窄部位远端, 如果失败, 亦尽可能将微波导线插至病灶的最下方, 对隆起性病灶直接加压插入病灶中央部位烧灼, 使肿瘤组织凝固或炭化, 清除坏死物. (2)扩张管腔, 而后插入注射针, 于病灶基底部及四周, 由下而上分6-8点注入化疗药物. 一般每周1次, 2次为1疗程. 间歇1 mo, 可再行第2疗程治疗. (3)经上述2疗程局部微波及化疗后, 病灶组织往往由“软”变“硬”, 管腔出现“疤痕”化现象, 要在镜下插入导丝至肠腔, 采用Savary锥形硅胶或气囊扩张器进行扩张治疗, 而后放置金属内支架以防再梗阻.

1.2.5 疗效判定 患者内镜治疗后症状消失分为5级: 0级为能进普食, I级为能进软食, II级为能进半流质, III级为能进流质, IV级为完全梗阻不能进食. 进展期胃癌合并幽门梗阻内镜治疗的疗效分为: (1)显效(CR): 症状消失达0级或I级, 可测肿瘤完全消失, 疗效稳定超过1 mo, 未出现新病变. (2)有效(PR): 症状明显好转达II级, 可测肿瘤长径乘最大横径缩小50%以上, 持续不少于1 mo, 未出现新病变; (3)微效(MR): 症状好转达III级, 可测肿瘤两径乘积缩小25%-50%者, 可持续4 wk, 未出现新病变. (4)无效(NR): 症状无好转或恶化, 评级为IV级, 可测肿瘤缩小不及25%或增大, 有新发病变, 病情恶化或死亡.

1.2.6 术后处理与随访 内镜治疗术后24 h内禁食, 并给予持续胃肠减压治疗, 可以根据患者幽门狭窄程度、病变范围、胃肠减压引流物的总量和患者自觉症状情况不同, 分别给予口服制酸药、止痛、全身支持和其他对症治疗. 患者接受治疗24 h后如果引流物较少, 则可以进食无渣流质, 并在48 h后可根据情况进食流体食物和半流体食物. 放置支架的患者嘱少食纤维素多、质硬食物, 宜细嚼, 以免食物堵塞支架. 每周在内镜治疗前首先了解幽门大小和胃内

表 1 各组患者内镜下治疗后症状改善情况

分组	<i>n</i>	CR <i>n</i> (%)	PR <i>n</i> (%)	MR <i>n</i> (%)	NR <i>n</i> (%)
对照组	25	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (4.00)	24 (96.00)
A组	26	5 (19.23)	6 (23.08)	10 (38.46)	5 (19.23)
B组	24	8 (33.33 ^d)	10 (41.67)	5 (20.83)	1 (4.17)
C组	27	12 (44.44 ^d)	10 (37.04)	5 (18.52)	0 (0.00)
D组	26	22 (84.62 ^b)	4 (15.38)	0 (0.00)	0 (0.00)

^b*P*<0.01 vs B、C组; ^d*P*<0.01 vs A组.

表 2 内镜下放置支架对患者生存情况的影响

分组	<i>n</i>	半年再梗阻率 <i>n</i> (%)	半年生存率 <i>n</i> (%)	1 a再梗阻率 <i>n</i> (%)	1 a生存率 (%)	中位生存期 (mo)
对照组	25/25	25 (100.00)	0/25 (00.00)	0/0 (00.00)	0/0 (00.00)	1.21
A组	22/26	26 (88.46)	3/36 (11.54)	3/3 (100.00)	0/0 (00.00)	2.73
B组	19/24	24 (79.17)	7/24 (29.17)	7/9 (77.77)	2/9 (22.22)	3.13
C组	16/27	27 (59.26 ^b)	11/27 (40.74 ^b)	7/12 (75.00)	4/12 (33.33)	5.16
D组	10/26	26 (38.46 ^d)	17/26 (65.54 ^d)	9/17 (52.94)	8/17 (47.06)	9.37

^b*P*<0.01 vs A、B、C组; ^d*P*<0.01 vs A、B组.

病变范围. 登记随访观察患者自觉症状和检查结果, 并观察患者术中出血、穿孔等并发症, 术后恶心、呕吐、呕血、黑便、上腹部疼痛、反酸、烧心等症状.

统计学处理 采用SASSP 10.0分析软件对收集到的数据进行处理. 计量资料用mean±SD表示, 组间差异比较用*t*检验. 计数资料以百分率表示, 组间差异比较用 χ^2 检验.

2 结果

2.1 各组患者内镜下治疗后症状改善情况 有57例患者术中出现局部出血, 经胃镜下止血有效, 术后未再次发生消化道的出血. 无消化道感染、胃肠道破裂等并发症的发生, 所有患者均能耐受内镜操作. 其中, 内镜下局部注射化疗药物联合微波消融治疗, 4 wk后同时放置内支架组, 在疗程结束后1 mo患者的临床症状改善最为明显, CR率显著高于其他各组, 组间差异有统计学意义(*P*<0.01, 表1). 单纯内镜下局部注射化疗药物组其患者临床症状改善并不明显.

2.2 内镜下放置支架对患者生存情况的影响 D组26例患者支架均1次置入成功, 技术成功率100%. 其中有5例分别于治疗后的2 mo左右死于心脏病、肺感染、消化道大出血等伴发疾病. 治疗后3 mo观察D组存活的患者, 21例行内镜

检查, 7例见支架上缘出现黏膜颗粒状增生, 病理证实为炎症及黏膜增生, 有2例进食降级患者; 治疗后6 mo, 又有4例患者死亡. 观察17例患者, 8例出现不同程度的进食降级, 其中2例由0级降为II级, 3例由I级降为II级, 3例由II级降为III级. 支架近端查到肿瘤细胞5例. 术后6, 12 mo生存率分别为65.54%(17/26), 47.06%(8/17). 其中, 因癌灶广泛转移或恶液质死亡15例, 目前D组病例仍存活8例. 中位生存期为9.3 mo. 6例在手术后出现再梗阻, 引起梗阻的原因为肉芽组织增生和肿瘤组织生长, X线摄片没有发现金属支架移位. 治疗后定期随访1 a, D组患者的生存情况明显好于其他各组(表2)

3 讨论

3.1 进展期胃癌合并幽门梗阻的治疗 幽门梗阻是进展期胃癌常见的并发症, 绝大多数患者已有肿瘤细胞的远处转移, 临床上手术切除机会明显减少^[1]. 目前, 外科手术仍是治疗进展期胃癌合并幽门梗阻最有效的办法^[2]. 手术应遵循根治性、安全性、功能性三项顺序的原则. 对于腹腔有种植性转移、胃癌直接侵犯邻近器官, 或有肝、肺、锁骨上淋巴结转移, 估计不能行根治性切除者, 只要全身条件许可应尽量做姑息性胃大部切除术. 对于不适宜行姑息性切除

的病例,为了解除梗阻、缓解症状,传统的方法是行胃肠短路手术或胃、肠造瘘术。但是,此时患者往往全身条件极差,常伴有较严重的并发症,不能耐受手术或者不愿手术,只能靠胃肠减压和静脉营养维持生命。然而,对于这些失去手术机会的患者,内镜下的积极姑息治疗却为其提供了改善生存质量,延长生命的可能,有一定的临床实用价值^[3]。幽门梗阻会促使胃癌扩散转移,梗阻时间越长,发生扩散转移的可能性就越大。同时,幽门梗阻还可使患者进食减少,不能有效消化吸收食物和水分,导致其营养状态极差,病情可迅速恶化。总之,伴幽门梗阻进展期胃癌的治疗,首选考虑的应该是解除梗阻,改善营养状态。

3.2 内镜下微波加局部注射化疗药物的疗效 内镜下局部注射化疗药物对癌肿选择性高,药物可直接作用于癌细胞,使癌细胞DNA解聚,同时会阻碍DNA复制,影响DNA生物合成,对RNA产生抑制作用,控制癌细胞分裂增殖^[4]。另外,有研究^[5]表明恶性肿瘤细胞经微波辐射加热至41-45℃时,肿瘤细胞的DNA复制, RNA转录和蛋白质合成可被微波抑制和破坏。同时,肿瘤细胞染色体受到破坏,有丝分裂受阻,肿瘤细胞增殖停止。经微波烧灼后的肿瘤组织还可释放出变性肿瘤蛋白,刺激机体免疫系统,提高人体细胞及体液免疫功能,对残留癌细胞、转移癌细胞起抑制作用^[6]。但本研究结果显示,单纯的内镜下微波照射,或局部注射化疗药物对进展期胃癌合并幽门梗阻患者恶心、呕吐、进食困难等症状的疗效有限,患者远期再梗阻率可达80%左右。

我们主张采用内镜下微波加局部注射治疗进展期胃癌合并幽门梗阻,这样不仅能迅速解除患者不能进食的痛苦,提高其生活质量,而且还能使远期再梗阻率呈明显下降趋势。C组的半年再梗阻率为59.26%,显著低于A组和B组的88.46%和79.17%。在微波治疗中,由于癌组织在黏膜表面形成高低不平的结节,表面溃烂,组织脆且易出血,因此治疗中一定要准确定位,掌握电流强度和时限,常用电流强度80 mA,每次治疗的总秒数控制在150±50 s,在微波电极离开病变部位后方可断电,以免造成出血和穿孔。内镜下化疗药物注射应以多点为宜,尽量选择在

癌肿或溃疡边缘,不可在溃疡底部注射。注射角度约为45°,不能与胃壁垂直成90°,以免把药液注入胃壁肌层内,造成坏死穿孔。注射深度要大于5 mm,过浅会使注射的药液外溢,但过深也可导致穿孔。局部化疗对微波治疗后癌组织的杀伤起到协同作用。

3.3 金属支架放置在内镜下治疗中的作用 我们的研究还显示进展期胃癌合并幽门梗阻经内镜下微波加局部注射化疗药物后,患者近期梗阻症状改善明显,但仍有较高的远期再梗阻率,其1 a生存率也仅为30%左右,中位生存期不超过半年。金属内支架的置入是当前解决消化道恶性梗阻简单而有效的非手术方法^[7],能延缓消化道再狭窄的发生,从而延长患者生命。本研究中D组患者的中位生存期达9.37 mo,较C组明显延长,金属内支架的放置对改善患者的生存质量效果显著,是一种积极的姑息治疗手段。研究中对预计能存活3 mo以上的患者用覆膜内支架,否则就用普通网状支架。支架的长度可根据病变长度作出调整,覆膜支架长度大于病变2 cm,可较长时间保持病变部位管腔通畅,普通支架长度大于病变4 cm^[8]。在施行内支架置入术时,应注意先行胃肠减压,必要时高渗盐水洗胃,减少水肿。通过内镜插管,还应待超滑导丝通过狭窄段后,再跟进导管。切忌导管直接插入狭窄段,造成穿孔。内镜直视下放置支架的优点在于能边释放边观察,保证了一次性释放,定位准确,释放安全。更为理想的支架其覆膜中应附有5-Fu或紫杉醇粒子^[9],药物通过覆膜持续释放,直接作用于肿瘤部位,药物的靶向性和有效性会因此得以提高。相信,载药支架若能应用于进展期胃癌合并幽门梗阻的治疗,患者的生存质量和生存期将会有进一步的改善。

4 参考文献

- 1 Ti TK. Surgical management of gastric cancer--a personal series of 160 cases. *Ann Acad Med Singapore* 1993; 22: 146-150
- 2 许恒利. 胃癌并幽门梗阻46例外科治疗体会. *广西医学* 1997; 19: 740-742
- 3 Nash CL, Gerdes H. Methods of palliation of esophageal and gastric cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2002; 11: 459-83, xiii
- 4 刘晓敏, 梁朝毅, 唐建光, 颜丽萍. 内镜下综合治疗进展期胃癌的临床疗效观察. *广西医科大学学报* 2003; 20: 732-733
- 5 孔宪忠. 进展期胃癌的内镜治疗. *陕西肿瘤杂志* 2000; 8: 1-6

- 6 陆星华. 现代胃肠病学. 第1版; 北京: 科学出版社, 1994; 545-549
- 7 Bartelsman JF, Bruno MJ, Jensema AJ, Haringsma J, Reeders JW, Tytgat GN. Palliation of patients with esophagogastric neoplasms by insertion of a covered expandable modified Gianturco-Z endoprosthesis: experiences in 153 patients. *Gastrointest Endosc* 2000; 51: 134-138
- 8 林含舜, 曹美萍, 李军苗. 金属内支架置入治疗胃幽门恶性狭窄. *介入放射学杂志* 2005; 14: 79-80
- 9 林常青, 孟祥文, 张进. 药物涂层支架的研究进展. *临床医药实践杂志* 2004; 13: 883-886

电编 韩江燕 编辑 王瑾晖

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

·消息·

第十一届全国胰腺外科学术研讨会征文

本刊讯 中华医学会外科学分会胰腺外科学组定于2006-09-08/11日在西部高原城市青海省西宁市举行第十届全国胰腺外科学术研讨会, 届时将邀请全国普外科百位知名专家到会就胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范进行专题讨论, 欢迎全国普外科同仁参加此次研讨会, 共同商定我国胰腺癌和急性胰腺炎的诊治规范。

1 投稿及联系事项

北京协和医院基本外科 李丽君. 截稿日期: 2006-06-30.

2 通信地址

北京市东城区王府井大街帅府园1号, 邮编: 100730. 联系电话: 010-65296021, 010-65296016; 传真: 010-65296021.

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

·消息·

2006广州肝病防治研究新进展学术报告会

本刊讯 2006广州肝病防治研究新进展学术报告会将于2006-07-01/05在广州举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

要求摘要和正文各一份, 并附软盘或寄到电子信箱.

2 联系方式

广州市广州大道北1838号南文医科大学南方医院消化病研究所 (510515), 白岚 教授 收. 电话: 020-61641658; E-mail: gdsgzbxh@163.com

导丝技术在ERCP操作中的应用技巧

唐采白, 胡兵, 郭召军

唐采白, 胡兵, 郭召军, 徐州医学院第二附属医院消化科 江苏省徐州市 221006
通讯作者: 唐采白, 221006, 江苏省徐州市, 徐州市煤建路32号, 徐州医学院第二附属医院消化科. caibai_tang@yahoo.com.cn
电话: 0516-85326632 传真: 0516-85326115
收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-21

摘要

目的: 探讨导丝技术在ERCP操作中的应用技巧。

方法: 随机选取需要进行ERCP手术操作的不同病因的126例患者, 对乳头插入困难者采用导丝引导插管; 运用直接插入法、借助导管法、借助切开刀法、借助球囊法、导丝头端塑形法进行胆管的选择性插管; 调整导丝的位置和角度使其通过胆管的狭窄段; 采用“对吻法”对已行T管插管或PTC术的患者进行插管。

结果: 使用ERCP导丝新技术, 胰腺炎的发生率为3.96%(5/126), 而使用常规的ERCP技术发生率为8.0%(16/150), 胰腺炎并发症明显下降($t = 1.94, P < 0.05$)。使用导丝新技术对不同疾病的126例完成的造影成功率为96.0%, 治疗成功率为91.3%, 而使用常规的ERCP技术150例造影成功率、治疗成功率分别为86.0%(129/150)、79.3%(119/150), 提示造影成功率和治疗成功率均有明显提高($t = 2.28, P < 0.01; t = 2.79, P < 0.01$)。巧妙地运用导丝技术可以起到提高乳头插管成功率、导管超选进入目标胆管、通过胰胆管狭窄或梗阻部位等作用, 还可以采用对吻法导丝技术使难度较大的ERCP操作得以完成。

结论: 有意识地、巧妙地运用导丝技术可以提高ERCP操作成功率、降低并发症的发生率。

关键词: 导丝; ERCP; 胰腺炎; 新技术

唐采白, 胡兵, 郭召军. 导丝技术在ERCP操作中的应用技巧. 世界华人消化杂志 2006;14(10):1027-1029
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1027.asp>

0 引言

内镜逆行胰胆管造影术(endoscopic retrograde

cholangiopancreatography, ERCP)已广泛被应用到胰胆疾病诊断和治疗中。在ERCP操作中常常使用导丝技术进行各种器械的交换, 随着导丝的制造工艺不断完善和品种的增加, 巧妙地运用导丝技术可以起到超选进入目标胆管、通过胰胆管狭窄或梗阻部位等作用, 还可以采用“对吻法”导丝技术使难度较大的ERCP操作得以完成。

1 材料和方法

1.1 材料 ERCP中无法使用造影导管或弓型切开刀按常规方法完成选择性胆总管或胰管插管者; 因胆管内多为结石、胆管狭窄需行胆汁内引流或外引流者; 常规方法不能完成选择性左肝管或右肝管插管者。

本组126例患者, 男57例, 女69例, 年龄35-77岁, 其中胆总管结石86例(含11例为胆囊切除术的胆总管残余结石), 胆管癌15例, 壶腹癌6例, 胆总管下段炎性狭窄6例, 胰头癌致胆管梗阻5例, 急性胰腺炎3例, 肝癌致胆管梗阻3例, 腹腔镜下胆囊切除术后胆漏2例。Baston公司、生产封塑绝缘导丝、亲水性超滑导丝, 导丝的长度为400-480 cm, 直径为0.635-0.89 mm(0.025-0.035 in)。

1.2 方法

1.2.1 乳头插入的技巧 乳头的解剖差异很大, 部分开口小(如颗粒型开口)很难插入, 有的因上段胆管梗阻或术后放胆管T型管壶腹部的通道已“废用”多时, 亦造成插入困难。此时传统导管插管方法失败后, 可采用导丝引导, 一般选用亲水超滑导丝, 依据乳头的形态和胆管、胰管的纵轴方向, 将导管前端对准可能的胆总管或胰管开口(左上方11点位为胆总管开口, 右下方的5点位为胰管开口), 在内镜及X线监视下导丝往返轻插, 并配合导管方向的改变(也可用弓型切开刀通过调节切开刀的张力来改变导管的插入方向), 当顺利插入4-5 cm时一般选择性胰管或胆管插入成功。

1.2.2 肝内胆管选择性插管的技巧 胆管结石、

■应用要点

巧妙地运用导丝技术可以起到提高乳头插管成功率、导管超选进入目标胆管、通过胰胆管狭窄或梗阻部位、降低并发症的发生率等作用, 还可以采用对吻法导丝技术使难度较大的ERCP操作得以完成。

■同行评价

导丝技术在ERCP操作中的应用越来越多,在临床工作中有较大的意义。

胆管肿瘤以及肝门部肿瘤常常引起胆管一级分枝及其以上部位的梗阻,这种情况手术成功率较低,进行取石或胆汁的内外引流可消除黄疸、提高患者的生活质量,这些内镜下的治疗完成,前提是超选到目标胆管,而超选的关键是导丝的插入,我们使用以下几种方法使成功率不断提高:(1)直接插入法;(2)借助导管法,包括普通造影导管和特殊导管(如Olympus公司生产的可改变方向的导管);(3)借助切开刀法;(4)借助球囊法;(5)导丝头端塑形法(将导丝头端略作顺时针或逆时针旋转或用消毒镊子将导丝头端塑成钩型等)。

1.2.3 通过狭窄胆管的技巧 当导丝越过狭窄段,可以进行狭窄段的扩张进而行胆汁的内、外引流治疗。首先透视下寻找狭窄下端的裂口位置,调整导管(包括气囊导管、切开刀等)、导丝的位置及两者之间的距离,导丝对准裂口后将导丝推进,必要时拌动导丝或按顺、逆时针方向捻动推进导丝。

1.2.4 对吻法的应用 对吻法是指导丝与导管的对吻,用在常规乳头插管失败时,而患者已行T管插管或PTC术后,将导丝从T管或PTC管的体外端插入,透视监视导丝前端使其沿胆管达壶腹部,当在内镜下见到导丝自乳头露出2-3 mm时,用导管靠近并力图使之套住导丝(此时应调整导管的角度使两者在同一轴线上),一旦导丝进入导管内助手再推进导丝4-5 cm,遂将导管在导丝的引导下插入乳头以及胆总管内,这样借助导管与导丝的对吻完成插管。

1.2.5 导丝在内镜下置放内支架的应用 在内镜下置放胆管支架或胰管支架时宜选用0.035 in的导丝,这种导丝有一定的强度利于支架的支撑与置入,即使因狭窄明显或插管困难起初选用的是0.025 in的导丝,在完成插管或扩张后仍应换用0.035 in的导丝,其次在置放塑料支架时,应注意推进推送管前将固定导丝的旋钮旋紧,使导丝不能移动、滑脱,以便完成支架的顺利置入。

2 结果

使用导丝新技术对不同疾病的126例完成的造影成功率为96.0%,治疗成功率为91.3%(指完成取石或完成胆汁引流),而使用常规的ERCP技术150例(数量、年龄、性别及病种构成均大致相同)其造影成功率、治疗成功率分别为86.0%(129/150)、79.3%(119/150),提示造影

表1 ERCP技术对不同疾病完成的造影成功率和治疗成功率 % (n/n)

病种	造影成功率	治疗成功率
胆总管结石	100.0 (86/86)	96.5 (83/86)
胆管癌	93.3 (14/15)	80.0 (12/15)
壶腹癌	100.0 (6/6)	83.3 (5/6)
胆总管下端炎性狭窄	83.3 (5/6)	83.3 (5/6)
胰头癌	80.0 (4/5)	80.0 (4/5)
肝癌致胆管梗阻	66.7 (2/3)	66.7 (2/3)
腹腔镜下胆囊切除	66.7 (2/3)	66.7 (2/3)
术后胆漏	100.0 (2/2)	100.0 (2/2)
总例数	96.0 (121/126)	91.3 (115/126)

成功率和治疗成功率均有明显提高(^at = 2.28, ^aP < 0.01; ^bt = 2.79, ^bP < 0.01)见表1. 使用ERCP导丝新技术胰腺炎的发生率为3.96%(5/126),而使用常规的ERCP技术发生率为8.0%(16/150),胰腺炎并发症明显下降(^ct = 1.94, ^cP < 0.05).

3 讨论

ERCP及其相关技术(如内镜下乳头切开、内镜下取石术和鼻-胆引流管置放术和胆管内支架的置入技术),已成为胰胆疾病治疗的主要手段之一,使无数的阻塞性黄疸患者胰腺疾病患者得到明确的诊断和有效的治疗. 但该操作技术有一定难度和风险,充分应用导丝新技术使得造影成功率和治疗成功率的提高说明导丝技术在ERCP操作中的重要作用. 乳头插入困难在ERCP操作中经常遇到,反复地插管至其水肿和损伤后易发生胰腺炎. 使用导丝探路技术可以避免过量胰管内注射造影剂,预防胰腺炎^[1]. 我们在使用探路技术后,胰腺炎的发生率由8.0%下降到3.96%. 其具体做法是:先用标准导管或切开刀常规插管,如透视下见其头端上行超过十二指肠镜上方,说明成功插入胆管. 如果不能深插或向右侧行走,再进行3-4次方向调整,如插管仍不成功,此时不要注射造影剂,而改用导丝探路引导插管. 其方法是:将导丝穿入导管或切开刀内,并使导丝外露导管头端2-3 mm(不宜太长,以便利于保持一定的插入力度),同时术者与助手密切配合,助手配合术者调节导管、镜身的不同深度与角度等动作反复轻轻试插,由于导丝前端的亲水性、柔韧性,较单纯使用造影导管容易插管成功,一旦导丝进入3-4 cm,导管立即跟进便插管成功. 所以我们基本上摒弃了注射造影剂来判断胰管拟或胆管的方法,提高了成功率,降低了

并发症的发生率.

Catalano *et al*^[2]新近提出采用经胰管乳头括约肌预切开法(transpancreatic pre-cut sphincterotomy)完成难度较大的ERCP, 其成功率(29/29)明显高于传统的针刀预切开法(26/34), 发生胰腺炎的例数明显下降(由6/34降至1/29). 在经胰管乳头括约肌预切开法中强调运用导丝插入代替注入造影剂, 同时导丝与切开刀的良好配合使切开刀导管保持一定的深度和角度.

对吻法插管是指导丝与导管的对吻, 用在常规乳头插管失败时. 适应症是已行胆管T型管插管手术或PTC术的而未能完成胆汁引流, 或者虽完成胆汁引流而准备将外引流改为内引流的患者. 方法是将导丝从T管或PTC管的体外端插入, 透视监视导丝前端使其沿胆管达壶腹部, 当在内镜见到导丝自乳头露出约2-3 mm时, 用导管靠近并力图使之套住导丝(此时应调整导管的角度使两者在同一轴线上), 一旦导丝进入导管内助手使再推进导丝4-5 cm, 遂将导管在导丝的引导下插入乳头以及胆总管内, 这样借助与导丝的对吻完成了插管. 操作中应增加一名助手, 并先进行T型管消毒、操作区域的铺巾等, 在无茵条件下进行; 最好术前半小时静脉滴注抗菌药物预防感染. 对吻法插管成功后往往可以进行胆管残余结石取出术或将胆汁外引流改为胆汁内引流, 有利于疾病的彻底治疗或生命质量的提高.

在选择性插管中应强调的是将导丝与造影导管、导丝与切开刀、导丝与球囊导管应巧

妙地配合使用, 在超选插管中要利用导丝的弯曲性、可折叠性等特点, 调节导丝与导管的距离、切开刀钢丝的张力大小、球囊的不同插入深度, 使导丝直接进入目标胆管, 也可以多插进一段导丝使其反弹折叠成圈、成勾, 往往能进入目标胆管^[3].

超声探测导丝定位辅助ERCP术已应运而生, 已有报道^[4]运用该技术为不宜搬动的病重患者在ICU室成功地实施了ERCP, 这是在运用导丝技术的基础上利用导丝特殊的物理性能而开展的一项新技术, 使更多的危重患者能接受ERCP的诊断治疗. 所以导丝技术在ERCP操作越来越广泛, 并不断有新的操作方法出现.

我们体会到有意识地充分应用导丝技术、摸索使用导丝的技巧, 可以提高ERCP操作成功率、缩短操作时间、减少患者痛苦以及降低并发症的发生率.

4 参考文献

- 1 王永光. 消化内镜治疗学. 第1版. 西安: 陕西科学技术出版社, 1998: 119-120
- 2 Catalano MF, Linder JD, Geenen JE. Endoscopic transpancreatic papillary septotomy for inaccessible obstructed bile ducts: Comparison with standard pre-cut papillotomy. *Gastrointest Endosc* 2004; 60: 557-561
- 3 王书智, 胡冰. 导丝在经内镜逆行胰胆管操作中应用技巧的探讨. *中华消化内镜杂志* 2004; 21: 39-40
- 4 Stavropoulos S, Larghi A, Verna E, Stevens P. Therapeutic endoscopic retrograde cholangiopancreatography without fluoroscopy in four critically ill patients using wire-guided intraductal ultrasound. *Endoscopy* 2005; 37: 389-392

电编 张敏 编辑 潘伯荣

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T₂, 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(mmHg), 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 μ mol/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1×10⁻³ g与5×10⁻⁷ 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字的文句中, 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 ν ; (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信箱邮幸庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@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 ≤ 1000 , 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). 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.

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. wcyj@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,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 $7.5\text{ cm}\times 4.5\text{ cm}$, 必须使用双面胶条黏贴在正文内, 不能使用浆糊黏贴.

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码号.

《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.

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部分为题名及作者, 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部分为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.

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>

世界华人消化杂志作者、读者、编委反馈信息

编者按 世界华人消化杂志自创刊已有14 a历史,目前已经发展成为旬刊。2006年本刊开辟了“海宁信箱”专栏,旨在促使形成作者、读者、编者互动的局面,适应我国消化病事业的飞速发展,创办高质量的学术期刊,进一步活跃学术界。本专栏面向作者、读者、以及编委征集反馈信息,希望借用大家的力量来引导杂志向更高的质量迈进。反馈信息包括对杂志的总体评价、事实纠错、文字更正、解释说明,编辑部会如实地将这些信息以公开或匿名的方式刊登在每期的固定位置。反馈信息可以通过Email发送至h.n.zhang@wjgnet.com,也可以发送手机短信至13146145159。

1 反馈信息

1.1 2006年14卷第4期总体上讲文章的创新性、前瞻性和科学性均很强,其中每篇文章注解的背景资料、研发前沿、创新盘点及同行评价简明扼要,区别于其他期刊,是本刊的一大创新,有助于读者提纲挈领地了解文章精髓。但有一建议,贵刊在研究快报栏目中安排的是两篇论著体的文章,让人觉得与版块内容欠符。在此版

块应报道一些短小精悍的消化系统疾病学科方面最新基础及临床研究,类似短讯一样的摘要类文章,否则与基础研究和临床经验两版块有重复之嫌。(陈治水 主任医师,解放军第211医院中医科)

1.2 2006年14卷第6期总体感觉良好,但是建议将综述性文章配发内容中取消创新盘点,因为通常只有原创性研究报道才存在“创新”,综述性文章只综述了别人的创新,自身不存在创新。另外,本期专家门诊过于简单,虽然格式上有要求,但内容过简。(王小众 教授,福建医科大学附属协和医院消化内科)

编辑回应

首先,对所有关注和支持本刊的读者、作者、以及编委表示衷心感谢,对他们的批评和建议我们一定虚心接受。我们保证在以后的工作中一定加强监督、规范工作流程,不断提高杂志的质量。其次,有了这些高度敬业、严肃对待学术的读者、作者、以及编委,我们有信心将本刊进一步推向更高的发展领域。

2006年,《世界华人消化杂志》在线办公系统将正式开通,从投稿到出版所有环节一律在网上实现,将会大大缩短从投稿到出版的时间。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 <http://www.wjgnet.com/wcjd/index.jsp>

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!

张宗明 教授
清华大学第一附属医院消化医学中心

何振平 教授
第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所、解放军西南肝胆外科医院

韩天权 教授
上海交通大学医学院附属瑞金医院外科、上海消化外科研究所

郭晓钟 教授
沈阳军区总医院消化内科

李增山 副教授
第四军医大学病理教研室

王学美 研究员,
北京大学第一医院中西医结合研究室

高春芳 研究员
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

唐文富 主治医师
四川大学华西医院中西医结合科

高润平 教授
吉林大学第一医院肝病科

董蕾 教授
西安交通大学第二附属医院消化内科

任建林 教授
厦门大学附属中山医院消化内科

季加孚 教授
北京大学临床肿瘤学院北京肿瘤医院外科

张绪清 副教授
第三军医大学附属西南医院全军感染病研究所

李晓宇 主任医师
航天中心医院 院办

程英升 副教授
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

禄韶英 主治医师
西安交通大学医学院第一附属医院普外科

陆云飞 教授
广西医科大学第一附属医院胃肠外科

李宗芳 教授
西安交通大学医学院第二附属医院干部病房外科

彭曦 副研究员
重庆市西南医院烧伤研究所

杨希山 教授
广东省广州市大道北云景花园

刘连新 教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院普通外科三病房

邵升 副教授
哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科

卿三华 教授
南方医科大学南方医院普外科

徐列明 教授
上海中医药大学附属曙光医院(东部)肝二科

吕明德 教授
中山大学附属第一医院

邵成浩 讲师
长海医院普外科

陈红松 副研究员
人民医院肝病研究所

许玲 副教授
第二军医大学长征医院中医科

朱立元 教授
北京大学深圳医院普外科

陈其奎 教授
中山大学附属第二医院消化内科

李国威 教授
陕西省西安市西五路157号

陈治水 主任医师
解放军第二一一医院中医科

李延青 教授
山东大学齐鲁医院消化科