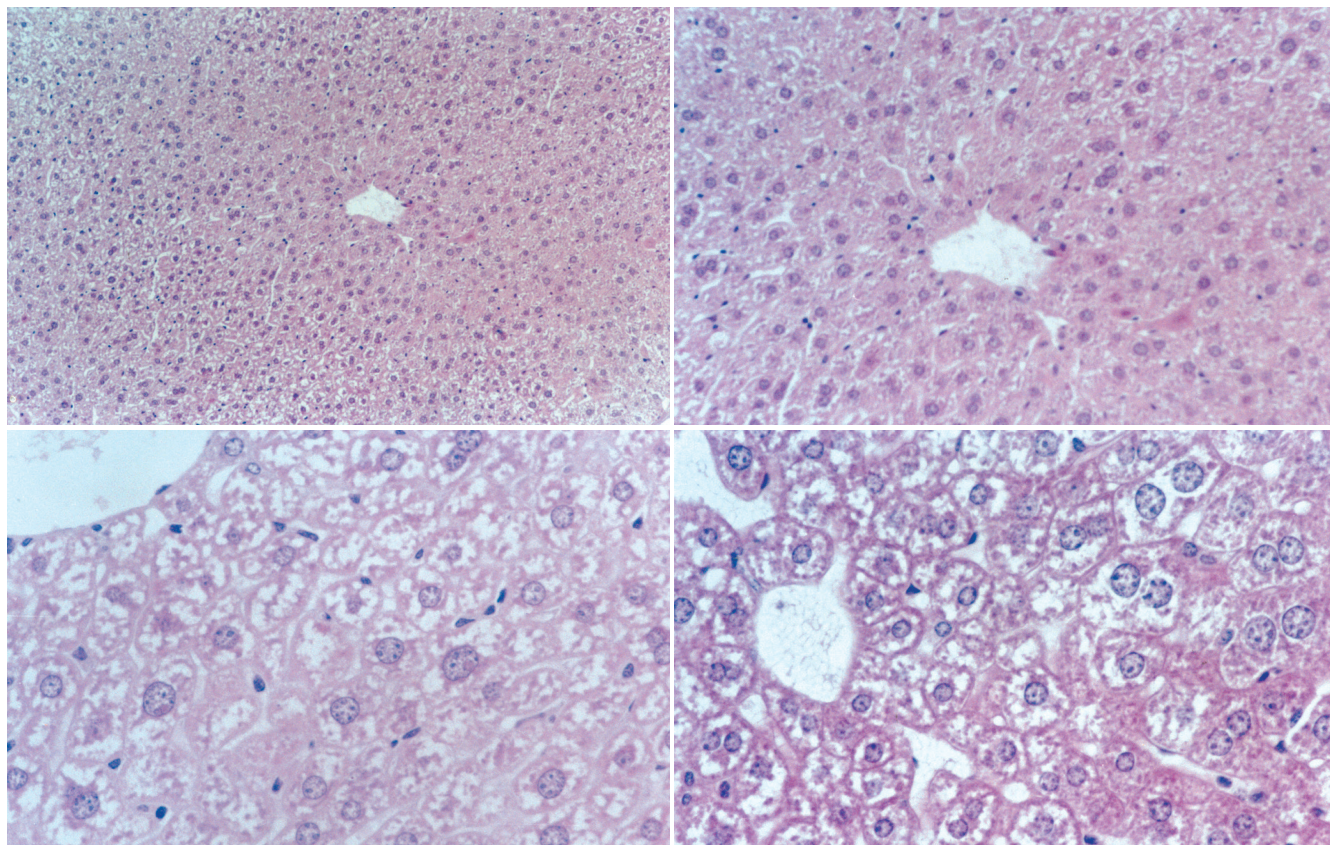


世界华人消化杂志

WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2006 年 5 月 18 日 第 14 卷 第 14 期 (Volume 14 Number 14)



14 / 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
陈红松副研究员	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
陈凇教授	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
杜群副研究员	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 5 月 18 日 第 14 卷 第 14 期 (总第166期)

述 评

1339 临床试验所需样本量之管见

张学中, 谭学瑞, 潘红星

基 础 研 究

1341 感染幽门螺杆菌小鼠肝组织Cyclin D1和PCNA的表达

田雪飞, 范学工, 黄燕, 张艳, 朱才

1346 高灵敏化学发光法体外HBV转录与复制水平的检测体系

何芳, 唐红, 刘丽, 刘凤君, 王甦, 周陶友, 赵连三, 刘聪

1352 丹参酮 II A对肝癌SMMC-7721细胞COX-2表达的影响

徐俊丽, 和水祥, 陈静宏, 符寒, 赵刚, 王艳丽, 任牡丹

1357 人自身抗原CYP2D6 285 bp基因片段克隆、真核表达及免疫性鉴定

王文凯, 李永哲, 刘国振

1362 rAAV-AFP转染人外周血单核细胞来源树突状细胞增强免疫刺激功能

梁政, 罗荣城, 尤长宣, 郑航

1367 实时荧光定量PCR方法检测幼兔粪便双歧杆菌的实验研究

陈津津, 蔡威

1372 一种新的阿片肽对小鼠脑和小肠组织阿片受体和肽转运载体基因的影响

韩飞, 施用晖, 乐国伟, 郑建良, 刘勇

1377 孤啡肽对大鼠体内外结肠动力的影响

李海燕, 李得香, 严祥, 彭淑英, 崔琳, 曹菊梅

1382 环氧合酶-2对人肝癌细胞增殖和凋亡的调节作用

杨震, 秦成勇, 朱菊人, 任万华, 王旻

临 床 研 究

1388 食管癌组织环氧化酶-2的表达与血管生成的关系

产松苗, 欧希龙, 孙为豪, 陈国胜, 颜芳, 邵耘, 许海尘, 薛绮萍

文 献 综 述

1394 细胞角蛋白20检测在大肠癌微转移中的临床意义

熊兵红, 程勇, 王严庆

研 究 快 报

1403 四氯化碳诱导兔肝硬化模型的动态研究

李栋, 张乐玲, 侯怀水, 时庆, 沈柏均

1408 门静脉和尾静脉注入小鼠骨髓干细胞向肝脏迁移的比较

穆丽雅, 韩明子, 祁金锋

1412 A型肉毒毒素腹腔注射对大鼠小肠通过速度及胆碱酯酶和P物质表达的影响

韩辉, 刘庆森, 刘文徽

临 床 经 验

1416 多基因甲基化在胰腺癌发病机制中的作用

卜献民, 赵成海, 张宁, 王巍, 李岩, 戴显伟

1420 经颈内静脉肝内门体分流术治疗肝硬化门脉高压症56例

秦建平, 蒋明德, 曾维政, 邓旦, 徐辉, 吴晓玲, 汪庆华, 顾明

1425 慢性乙型肝炎病毒感染免疫耐受期患者的临床病理特征

邢汉前, 辛绍杰, 张欣, 陈黎明, 赵景民, 游绍莉, 赵军, 王岩

1430 慢性胰腺炎213例的临床特点

吴杰, 贾业贵, 陈时, 李红燕, 余卫中, 张勇, 甘洪颖

	1433 急性结石性胆囊炎腹腔镜手术252例 钟华, 张宗明, 宿砚明
病例报告	1437 乙状结肠憩室穿孔误诊1例 丁文生
附录	1439 世界华人消化杂志投稿须知
致谢	1444 致谢世界华人消化杂志编委
消息	1340 2006广州肝病防治研究新进展学术报告会 1356 第十八届全国中西医结合防治消化系统疾病学术会议 1366 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 1371 专家门诊、技法与经验 1376 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会 1387 第十五次全国中西医结合肝病学术会议 1393 肠屏障功能障碍的基础与临床会议 1402 第十一届全国胰腺外科学术研讨会征文 1407 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 1415 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议 1419 2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知 1424 NERD及相关疾病国际研讨会 1429 第十一届全国普通外科学术会议征文通知 1436 第十届全军普通外科学术会议征文通知 1438 中华消化学会全国第二届炎症性肠病学术会议
封面故事	穆丽雅, 韩明子, 祁金锋. 门静脉和尾静脉注入小鼠骨髓干细胞向肝脏迁移的比较. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1408-1411 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1408.asp
国际会议	XXX pan-American congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de enfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(旬刊)

创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2006-05-18
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: wjgd@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

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

May 2006 Contents in Brief Volume 14 Number 14

EDITORIAL	<p>1339 Discussions on sample size in clinical experiments <i>Zhang XZ, Tan XR, Pan HX</i></p>
BASIC RESEARCH	<p>1341 Expression of Cyclin D1, proliferating cell nuclear antigen in liver of C57BL/6 mice infected with <i>Helicobacter pylori</i> <i>Tian XF, Fan XG, Huang Y, Zhang Y, Zhu C</i></p> <p>1346 Establishment of a highly sensitive chemiluminescent detection system for analysis of hepatitis B virus transcription and replication level <i>in vitro</i> <i>He F, Tang H, Liu L, Liu FJ, Wang S, Zhou TY, Zhao LS, Liu C</i></p> <p>1352 Effect of tanshinone II A on COX-2 expression in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 <i>Xu JL, He SX, Chen JH, Fu H, Zhao G, Wang YL, Reng MD</i></p> <p>1357 Gene cloning and fusion expression of immunodominant epitope of human autoantigen cytochrome P450 2D6 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Wang WK, Li YZ, Liu GZ</i></p> <p>1362 Infection of rAAV-AFP enhances immunostimulatory effect of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells <i>Liang Z, Luo RC, You CX, Zheng H</i></p> <p>1367 Real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in fecal samples from infant rabbits <i>Chen JJ, Cai W</i></p> <p>1372 Effect of a new opioid peptide on opioid receptor and peptide transporter gene of brain and small intestinal tissues in mice <i>Han F, Shi YH, Le GW, Zheng JL, Liu Y</i></p> <p>1377 Effects of orphanin FQ on colonic motility of rats <i>Li HY, Li DX, Yan X, Peng SY, Cui L, Cao JM</i></p> <p>1382 Modulatory roles of cyclooxygenase-2 in proliferation and apoptosis of hepatocarcinoma cells <i>Yang Z, Qin CY, Zhu JR, Ren WH, Wang M</i></p>
CLINICAL RESEARCH	<p>1388 Expression of cyclooxygenase-2 in esophageal carcinoma and its correlation with angiogenesis <i>Chan SM, Ou XL, Sun WH, Chen GS, Yan F, Shao Y, Xu HC, Xue QP</i></p>
REVIEW	<p>1394 Significances of detection for cytokeratin 20 in micro-metastasis of colorectal cancer <i>Xiong BH, Cheng Y, Wang YQ</i></p>
RAPID COMMUNICATION	<p>1403 Dynamic changes of liver in cirrhosis model of rabbits <i>Li D, Zhang LL, Hou HS, Shi Q, Shen BJ</i></p> <p>1408 Comparison between numbers of bone marrow stem cells migrated to liver after infusion into portal vein and caudal vein <i>Mu LY, Han MZ, Qi JF</i></p> <p>1412 Effects of intraperitoneal injection of botulinum toxin A on passage velocity in small intestine and expression of acetylcholinesterase and substance P in rats <i>Han H, Liu QS, Liu WH</i></p>

CLINICAL PRACTICE	<p>1416 Role of multiple genes methylation in pancreatic carcinogenesis <i>Bu XM, Zhao CH, Zhang N, Wang W, Li Y, Dai XW</i></p> <p>1420 Transjugular intrahepatic portosystemic shunt in treatment of 56 patients with cirrhosis and portal hypertension <i>Qin JP, Jiang MD, Zeng WZ, Deng D, Xu H, Wu XL, Wang QH, Gu M</i></p> <p>1425 Clinical status and hepatic pathology of patients with chronic hepatitis B virus infection in immune tolerant phase <i>Xing HQ, Xin SJ, Zhang X, Chen LM, Zhao JM, You SL, Zhao J, Wang Y</i></p> <p>1430 Clinical characteristics of 213 patients with chronic pancreatitis <i>Wu J, Jia YG, Chen S, Li HY, Yu WZ, Zhang Y, Gan HY</i></p> <p>1433 Laparoscopic cholecystectomy for acute calculous cholecystitis: an analysis of 252 cases <i>Zhong H, Zhang ZM, Su YM</i></p>
CASE REPORT	<p>1437 Missed diagnosis for perforation of sigmoid flexure: one case analysis <i>Ding WS</i></p>
APPENDIX	<p>1439 Instructions to authors of World Chinese Journal of Digestology</p>
ACKNOWLEDGMENT	<p>1444 Acknowledgments to reviewers of World Chinese Journal of Digestology</p>
COVER	<p><i>Mu LY, Han MZ, Qi JF.</i> Comparison between numbers of bone marrow stem cells migrated to liver after infusion into portal vein and caudal vein. <i>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</i> 2006;14(14):1408-1411 http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1408.asp</p>
INTERNATIONAL MEETINGS	<p>XXX pan-American congress of digestive diseases XXX congreso panamericano de anfermedades digestivas November 25-December 1, 2006 amg@gastro.org.mx www.gastro.org.mx</p> <p>World Congress on Gastrointestinal Cancer June 14-17, 2006 c.chase@imedex.com</p>

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

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date May 18, 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: wjcd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2006 by The WJG Press

临床试验所需样本量之管见

张学中, 谭学瑞, 潘红星

张学中, 北京高血压联盟研究所 北京市 100039
谭学瑞, 潘红星, 汕头大学医学院第一附属医院 广东省汕头市 515041

张学中, 1963年毕业于清华大学工程物理系, 工学学士, 研究员, 教授, 博士生导师, 主要从事医学统计学方面的研究。

国家自然科学基金资助, No. 30271158

通讯作者: 谭学瑞, 515041, 广东省汕头市市长平路57号, 汕头大学医学院第一附属医院. tanxuerui@vip.sina.com

电话: 0754-8258290-3455 传真: 0754-8611690

收稿日期: 2006-03-14 接受日期: 2006-04-16

摘要

本讨论了我国有关部门关于临床试验样本量规定中的2个问题, 提出下列看法和理解: 对 I - III 期临床试验的样本量应该规定上、下限, IV 期临床试验的样本量可不加限定。

关键词: 临床试验; 样本数; 样本量; 效应大小

张学中, 谭学瑞, 潘红星. 临床试验所需样本量之管见. 世界华人消化杂志 2006; 14(14): 1339-1340

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1339.asp>

0 引言

在我国, 不论1999年发布的《药品临床试验管理规范》, 2002年发布的《药品注册管理办法》(试行), 还是2005年发布的《药品注册管理办法》, 都对临床试验的样本量做了规定, 他们是一致的: (1) 临床试验的样本量应当符合统计学要求和最低样本量要求; (2) 临床试验的最低样本量在试验组的要求是: I 期为20-30例, II 期为100例, III 期为300例, IV 期为2000例. 对于这种规定, 孙瑞元 *et al*^[1]曾介绍过, Hsiao *et al*^[2]也提出了一些观点和意见. 本文的讨论不仅仅局限于统计学问题, 而主要是从临床试验的原则^[3]来综合考虑, 讨论临床试验所需样本量的3个问题。

1 I 期临床试验的样本量界限

我国关于 I 期临床试验的样本量是规定有上、下限的, 且与国外在数值上似乎是一致的. 但对这一数值的理解却有出入(表1)。

我国规定的范围比国外小, 但这是一模糊的最小例数. 也就是说, 该规定容许有更多的例

表 1 I 期临床试验的样本量

制定者	样本量大小	例数的说明
我国	20-30	此为最小例数
欧盟	20-50	建议的例数范围
美国	20-80	建议的例数范围

表 2 II、III 期临床试验的样本量

试验分期	制定者	样本量	例数的说明
II期	我国	>100	此为最小例数
II期	欧盟	100-500	建议的例数范围
II期	美国	100-300	建议的例数范围
III期	我国	>300	此为最小例数
III期	欧盟	500-5000	建议的例数范围
III期	美国	300-3000	建议的例数范围

■背景资料

临床试验样本量的确定是至关重要的, 但国内外规定及文献建议不尽一致, 需要正确理解. 临床试验样本量的规定不只是统计学问题, 更重要的是要符合临床试验的原则. 以往规定或文献强调加大样本可得出显著的统计学结论, 不一定有实际意义。

数. 而且没有上限的限制. 由于 I 期临床试验是在药理实验室的工作和动物实验之后首次过渡到人体的试验, 所以, 一定要精心设计^[4]. 选择适当研究总体, 控制随机误差, 达到一定的预计效应大小等^[5], 使受试对象数的上限不能太大. 如果一种新药只有很小的效益, 仅靠加大样本而得出非常显著的统计学结论, 是没有实际意义的. 根据赫尔辛基宣言精神, 为维护受试者权益, 应规定出受试者的上限. 又因为有些 I 期临床试验是在健康志愿者中进行的, 所以, 例数不宜太多, 最好称为样本数, 而不是病例数。

2 II、III 期临床试验应有上限

我国关于 II 期和 III 期临床试验的样本量的规定是没有上限的, 与国外在数值上的比较见表2. II 期和 III 期试验的目的不单是要确认哪个药或疗法有效, 而主要的是要求他的有效性应达到一定程度^[6], 即在设计样本量的大小时, 要让临床试验的处理效应足够大, 从而限制了样本量的大小, 因而样本要有上限. 如果只是靠把样本加大到“足够大”才能得到统计学上的显著差别, 这种药物及其临床试验是不应被批准的. 另一个制定临床试验上限的原因是, 从保护受试者权益出发, 在批准上市前, 对参与试验的样本量应有限制, 使受影响的人数尽量少。

■创新盘点

对 I - III 期临床试验的样本量应该规定上、下限, IV 期临床试验样本量可不加限定。

■名词解释

I型错误:即某药物或疗法事实上无效而试验后判为有效的错误。

为了科学估算样本量,需要对I型错误的概率和把握度以及试验的效应大小作出假设,这些往往是因问题而异的。文献中的建议也各有所异^[7-12],例如,按预试验或已往的数据,由极差D,估计标准差SD,有人用 $SD = 1/4D$,有人用 $SD = 1/6D$,因而得出不同估计结果。面对诸多不确定的选择,规定适当范围是合理的。

3 IV期临床试验的样本量可不作规定

IV期临床试验是在药品上市后进行的,这类试验因目的不同,所需样本量也会有很大差异。如果是为了了解可能会出现罕见的副作用,样本量可能会相当大。如果与某种标准疗法比较,要达到一定把握度,所需样本量也会大些。这时候应该认真估算,算出样本量可能达数万。但也有例外的情况,在特定地区、对特定疾病的疗效做简单对比的试验,对于全是已上市的药物,不要求较大样本也是容许的。国外IV期临床试验的批准权限和赞助者都与前三期不同。我国规定IV期临床试验样本量最小大于2000,似乎没考虑到他与前三期的不同之处。既然是已经

上市的药品,其包括样本量的各种规定就可放宽,甚至对样本量不作规定,如国外那样。

4 参考文献

- 1 孙瑞元,王学融,李玉红. 新药临床研究的例数估算问题. 中国临床药理学杂志 1999; 8: 559-561
- 2 Hsiao CF, Xu JZ, Liu JP. A two-stage design for bridging studies. *J Biopharm Stat* 2005; 15: 75-83
- 3 谭学瑞,张学中. 临床试验刍议. 世界华人消化杂志 2005; 13: 2173-2178
- 4 Ensign LG, Gehan EA, Kamen DS, Thall PF. An optimal three-stage design for phase II clinical trials. *Stat Med* 1994; 13: 1727-1736
- 5 Logan BR. Optimal two-stage randomized phase II clinical trials. *Clin Trials* 2005; 2: 5-12
- 6 Stallard N. Approximately optimal designs for phase II clinical studies. *J Biopharm Stat* 1998; 8: 469-487
- 7 郑青山,孙瑞元,陈志扬. 临床两组药物等效判断方法及其辨析. 中国临床药理学与治疗学 2002; 7: 559-561
- 8 刘玉秀,姚晨,陈峰,陈启光,苏炳华. 非劣性/等效性试验的样本含量估计及把握度分析. 中国卫生统计 2004; 21: 31-35
- 9 赵国龙,王曙炎. 多中心两组临床试验所需样本量的测定. 中国医院统计 2003; 10: 27-29
- 10 李大庆,李颢,王志萍,李会庆. 基因与疾病研究的样本量计算方法. 中国公共卫生 2004; 20: 886-887
- 11 谷红梅,李康. 诊断试验ROC参数估计双正态样本量估计方法探讨. 中国卫生统计 2006; 23: 2-4

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 •

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

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.

感染幽门螺杆菌小鼠肝组织Cyclin D1和PCNA的表达

田雪飞, 范学工, 黄燕, 张艳, 朱才

田雪飞, 范学工, 黄燕, 张艳, 朱才, 中南大学湘雅医院传染科 湖南省长沙市 410008

田雪飞, 2001年湖南中医药大学博士, 2002年中南大学湘雅医院博士后流动站, 副教授, 主要从事幽门螺杆菌方面的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271171

国家教育部骨干教师基金资助项目, No. 教技司2000-65

湖南省自然科学基金资助项目, No. 01jyy2114

湖南省卫生厅科研基金资助项目, No. 00022

通讯作者: 范学工, 410008, 湖南省长沙市湘雅路87号, 中南大学湘雅医院传染科. xgfan@hotmail.com

电话: 0731-4327392 传真: 0731-4327332

收稿日期: 2005-11-15 接受日期: 2005-11-26

Expression of Cyclin D1, proliferating cell nuclear antigen in liver of C57BL/6 mice infected with *Helicobacter pylori*

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

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

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271171; Teacher Foundation from the National Ministry of Education, No. 2000-65; the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 01jyy2114; and the Scientific Research Foundation from Health Bureau of Hunan Province, No. 00022

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

Received: 2005-11-15 Accepted: 2005-11-26

Abstract

AIM: To detect the expression of Cyclin D1 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in liver tissues of C57BL/6 mice infected with *H. pylori* by oral inoculation.

METHODS: Thirty C57BL/6 strain mice, used as experiment animal, were orally inoculated with *H. pylori* SS1 strain and fed in laminar flow cabinets for 8 mo. *H. pylori* 16S rRNA in liver was examined by nested polymerase chain reaction (PCR), and then mRNA and protein were extracted from the positive liver tissues. The mRNA and protein expression of Cyclin D1 and

PCNA were detected by reverse transcription PCR (RT-PCR) and Western blot, respectively.

RESULTS: Six of fifteen liver tissues were positive for *H. pylori* 16S rRNA after examination of nested PCR. Sequencing results of 16S rRNA PCR products showed the 100% homogeneity with cultured *H. pylori* from gastric mucosa and inoculated *H. pylori* SS1. The mRNA expression of Cyclin D1 and PCNA in liver of C57BL/6 mice infected with *H. pylori* were significantly increased in comparison with those in the controls (0.78 ± 0.13 vs 0.66 ± 0.03 , $P < 0.05$; 0.86 ± 0.17 vs 0.56 ± 0.24 , $P < 0.01$), and the protein expression of PCNA was also increased (1.16 ± 0.40 vs 0.64 ± 0.11 , $P < 0.05$). Although the expression of Cyclin D1 protein had an increased tendency, it was not significantly different from those in the controls ($P > 0.05$).

CONCLUSION: *H. pylori* inoculated orally can arrive at liver, and induce increased expression of Cyclin D1 and PCNA.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Proliferating cell nuclear antigen; Cyclin D1; Hepatocellular carcinoma; Mice

Tian XF, Fan XG, Huang Y, Zhang Y, Zhu C. Expression of Cyclin D1, proliferating cell nuclear antigen in liver of C57BL/6 mice infected with *Helicobacter pylori*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1341-1345

摘要

目的: 探讨经口接种制作的幽门螺杆菌(*H. pylori*)小鼠感染模型*H. pylori*对肝组织Cyclin D1和PCNA表达的影响。

方法: C57BL/6小鼠30只经口感染接种*H. pylori*悉尼株(SS1), 置层流柜中饲养8 mo. 用巢式PCR检测肝组织中*H. pylori* 16S rRNA, 并提取阳性样本的mRNA与蛋白, 用RT-PCR、Western blot等方法检测小鼠肝组织癌基因Cyclin D1和PCNA mRNA及蛋白表达变化。

结果: 巢式PCR检测15只小鼠肝组织中*H. pylori* DNA, 有6只16S rRNA基因为阳性, 测

■背景资料

肝细胞癌是最常见的恶性肿瘤之一。除病毒性肝炎、黄曲霉素、寄生虫感染等因素以外, 还有部分肝癌患者发病原因不明。近年来, 已有少数研究报告在肝组织内观察到螺杆菌状细菌并检测出*H. pylori* DNA, 动物实验结果也显示*H. pylori*可经口接种到达肝脏, 但*H. pylori*是否为诱导肝癌的直接因素及深入的机制尚不清楚, 因此通过动物实验观察经口接种*H. pylori*小鼠肝组织cyclin D1和PCNA的表达, 以进一步明确*H. pylori*与肝癌发生的关系。

■研究前沿
作为 I 类致癌因
子的 *H pylori* 可能
诱导肝癌的发生。

序结果经序列分析后显示与胃黏膜分离培养细菌、接种细菌同源性100%。肝组织内有 *H pylori* 定植的6只感染小鼠肝组织Cyclin D1和PCNA mRNA表达升高(0.78 ± 0.13 vs 0.66 ± 0.03 , $P < 0.05$; 0.86 ± 0.17 vs 0.56 ± 0.24 , $P < 0.01$)。Western blot结果显示, Cyclin D1蛋白表达有增高趋势, 但与对照组比较无显著性差异; PCNA蛋白表达增高, 与对照组比较有显著性差异(1.16 ± 0.40 vs 0.64 ± 0.11 , $P < 0.05$)。

结论: 经口接种 *H pylori* 可达小鼠肝脏, 使 Cyclin D1 和 PCNA 表达增强。

关键词: 幽门螺杆菌; 肝细胞癌; PCNA; Cyclin D1; 小鼠

田雪飞, 范学工, 黄燕, 张艳, 朱才. 感染幽门螺杆菌小鼠肝组织Cyclin D1和PCNA的表达. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1341-1345

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1341.asp>

0 引言

H pylori 作为胃癌和胃淋巴瘤的致病因素已为许多研究所确定, 但在肝癌的发生、发展中是否也起作用, 目前仍在研究之中。研究发现肝癌患者肝组织内存在 *H pylori* 感染^[1-5]。但 *H pylori* 定植于肝脏, 是否能作为独立的致病因素引起肝细胞病变, 甚至促进肝癌的发生? 我们已观察到经口接种的 *H pylori* 可到达小鼠肝脏, 并能作为独立的致病因素引起肝脏炎症反应^[6], 本研究中, 我们通过检测经口感染 *H pylori* 的 C57BL/6 小鼠肝组织细胞周期素 D1 (cyclin D1)、增生细胞核抗原 (PCNA) 表达的变化, 更进一步探讨 *H pylori* 与肝癌发展之间的可能关系。

1 材料和方法

1.1 材料 C57BL/6 小鼠(清洁级)30只, 6-8周龄, ♂, 体质量25-30 g, 购自上海实验动物中心, 随机分为实验组(经口接种感染 *H pylori*, 20只)与对照组(未接种 *H pylori*, 10只)。 *H pylori* 使用悉尼株 (SS1), 培养按我室建立方法进行^[7]。蛋白酶K购自丹麦Dako公司; 逆转录试剂购自Promega公司; Trizol购自Omega公司; PCR相关试剂为大连宝生物工程有限公司产品; 兔抗小鼠Cyclin D1、PCNA、actin多克隆抗体, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗均购自美国SantCruz公司; PVDF膜购自美国Pierce公司; ECL增强化学发光试剂盒购自美国Amersham公司。 *H pylori* 感染小鼠模型

参照我室建立方法进行^[5]。饲养8 mo时处死, 取肝组织入液氮保存。

1.2 方法 部分肝组织提取细菌DNA用于巢式PCR检测 *H pylori* 16S rRNA基因^[1], 其引物序列: 外引物: 上游5'-GCT ATG ACG GGT ATC C-3', 下游5'-ACT TCA CCC CAG TCG CTG-3', 扩增片段1200 bp, 55℃退火1.5 min, 72℃延伸2 min; 内引物: 上游5'-GAC ACG GTC CAG ACT CCT A-3', 下游5'-TGG CTG ATT TGC GAT TA-3', 扩增片段1020 bp, 52℃ 1.5 min, 72℃ 2 min。PCR产物纯化后基因测序, 大连宝生物工程有限公司完成。实验组选取肝组织 *H pylori* 16S rRNA基因阳性的小鼠提取肝组织总RNA及蛋白。总RNA提取按Trizol试剂盒说明进行, 紫外分光光度计测定总RNA浓度与纯度, -70℃保存备用。逆转录取总RNA 2 μL, 10 mmol/L Oligo dT 1 μL, 用DEPC水补至总体积12 μL, 70℃ 5 min, 冰上骤冷后加入5×buffer 4 μL, 20 mU/L RNA酶抑制剂1 μL, 10 mmol/L dNTP 2 μL, 200 mU/L M-MLV 1 μL, 37℃反应60 min, 94℃灭活5 min。PCR引物根据GenBank中小鼠Cyclin D1, PCNA, β-actin cDNA序列进行设计(表1)。取PCR产物5 μL在15 g/L 琼脂糖凝胶上电泳(含0.5 mg/L 溴化乙锭)。肝组织蛋白提取: 100 mg肝组织, 加入组织蛋白提取裂解液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 1 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L β-ME, 10 g/L NP-40, 1 g/L SDS, 5 mmol/L DTT, 10 mmol/L PMSF) 200 μL匀浆, DTT与PMSF临用前加入, 冰上放置30 min裂解, 最大功率脉冲超声粉碎30 s, 13 000 r/min离心30 min, 取上清液分装, Bradford法测定蛋白浓度, Western blot检测Cyclin D1和PCNA的表达。PCR及Western blot条带应用Eagle Eye II 图像分析处理系统分析结果。

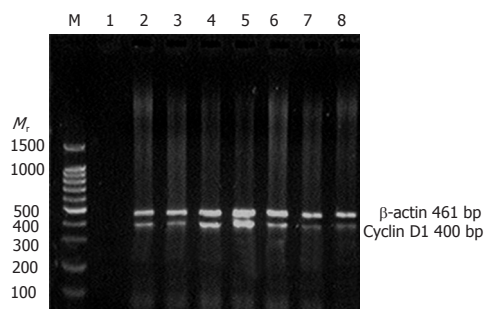
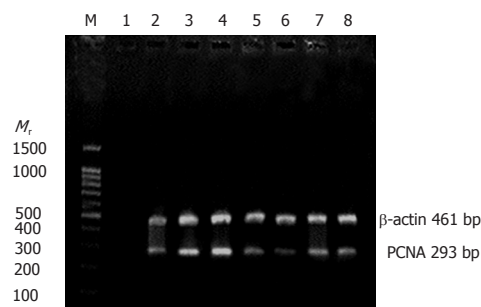
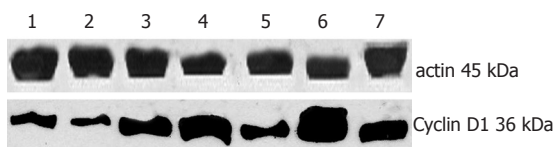
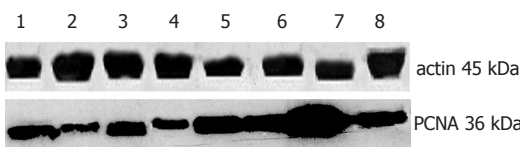
统计学处理 实验数据用mean±SD表示, 两组间样本先进行F方差齐性检验, 方差齐用两样本等方差t检验, 方差不齐用两样本异方差t检验。全部数据经SPSS 10.0大型统计软件包处理, $P < 0.05$ 为统计学上差异有显著性。

2 结果

2.1 肝组织 *H pylori* 16S rRNA基因 实验组20只小鼠造模灌胃过程中死亡2只, 2 mo时为观察 *H pylori* 胃内定植情况处死3只, 剩余15只, 饲养8 mo时处死。结果在15例中6例16S rRNA,

表 1 PCR引物序列、反应条件及扩增的目的片段大小

基因	引物序列	PCR反应条件	目的片段大小
Cyclin D1	GAGAAGTTGTGCATCTACAC GAAGGGCTTCAACTGTTCC	94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35 cycles	400 bp
PCNA	AACCTGGAATCCCAGAACA AGACAGTGGAGTGGCTTTT	94℃ 1 min, 55℃ 45 s, 72℃ 45 s, 35 cycles	293 bp
β-actin	GCTGTCCCTGTATGCCTCT GGTCTTTACGGATGTCAACG		461 bp

图 1 RT-PCR扩增小鼠肝组织Cyclin D1基因表达. M: M_r 标准; 1: 阴性对照; 2-5: 肝组织*H. pylori*基因检测阳性实验组样本; 6-8: 对照组样本.图 3 RT-PCR扩增小鼠肝组织PCNA基因表达结果. M: M_r 标准; 1: 阴性对照; 2-5: 肝组织*H. pylori*基因检测阳性实验组样本; 6-8: 对照组样本.图 2 Western blot检测小鼠肝组织Cyclin D1蛋白表达. 1, 2: 对照组; 3-7: 肝组织*H. pylori*基因检测阳性实验组样本.图 4 Western blot检测小鼠肝组织PCNA蛋白表达. 1-3: 对照组样本; 4-8: 肝组织*H. pylori*基因检测阳性实验组样本.

26 kDa, *cagA*以及*vacA*基因全部为阳性, 阳性率40%; 对照组无一例阳性. 取2例阳性小鼠肝组织的*H. pylori* 16S rRNA PCR产物测序, 与胃黏膜分离培养以及接种*H. pylori*的16S rRNA PCR产物测序结果进行同源比较, 3者的同源性为100%.

2.2 肝组织Cyclin D1 mRNA和蛋白表达 根据Cyclin D1及β-actin基因PCR扩增条带凝胶电泳后照相扫描图像分析结果, 发现与对照组比较, 肝组织内检测到*H. pylori*基因的6例实验组小鼠肝组织Cyclin D1 mRNA在感染8 mo时表达升高($P<0.05$, 图1). 采用Western blot方法观察肝组织Cyclin D1蛋白表达, 结果虽然6例小鼠肝组织Cyclin D1蛋白表达有增高趋势, 但与对照组比较无显著性差异(图2, 表2).

2.3 肝组织PCNA mRNA和蛋白表达 根据PCNA及β-actin基因PCR扩增条带凝胶电泳后照相扫描图像分析结果, 与对照组比较, 肝组织内检测到*H. pylori*基因的6例实验组小鼠肝组织PCNA

表 2 C57BL/6小鼠肝组织Cyclin D1, PCNA mRNA与蛋白表达 (mean ± SD, $n = 6$)

分组	mRNA表达 ¹		蛋白表达 ²	
	Cyclin D1	PCNA	Cyclin D1	PCNA
实验组	0.78 ± 0.13 ^a	0.86 ± 0.17 ^b	1.07 ± 0.57	1.16 ± 0.40 ^a
对照组	0.66 ± 0.03	0.56 ± 0.24	0.77 ± 0.26	0.64 ± 0.11

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组. ¹基因的相对表达水平等于该基因RT-PCR产物电泳条带的密度/β-actin RT-PCR产物电泳条带的密度; ²蛋白的相对表达水平等于该蛋白Western blot条带的吸光度/actin条带的吸光度.

mRNA在感染8 mo时表达升高($P<0.01$, 图3). 采用Western blot方法观察肝组织PCNA蛋白表达, 与对照组比较有显著性差异($P<0.05$, 图4, 表2).

3 讨论

*H. pylori*与人胃外疾病的关系已引起相关领域学者们的兴趣和重视, *H. pylori*在冠心病患者冠状

■创新盘点

本文对经口接种*H. pylori*的C57BL/6小鼠8 mo时肝组织Cyclin D1和PCNA表达进行研究, 初步探讨了*H. pylori*对肝癌相关基因的影响.

■名词解释

巢式PCR: 设计两对引物, 一对引物扩增稍长片段(外引物), 在这一扩增范围内再设计一对引物(内引物), 扩增的产物是以第一对引物的产物稀释100到1000倍后为模板再行扩增的PCR方法, 可提高PCR的特异性和灵敏度。

动脉的粥样斑块^[8-9]、胆管癌患者的胆囊^[10-12]及肝癌患者的肝组织^[1-5]中不断被发现。作为I类致癌因子的*H pylori*与胃癌的发生关系密切, 与其他器官肿瘤的发生是否也存在一定联系? 我们前期的研究已从肝癌组织病理切片中观察到弯曲杆状细菌存在^[13], 并且从肝癌患者石蜡包埋及新鲜肝组织中均扩增出螺杆菌16S rRNA基因, 测序及同源比较显示与*H pylori*有99%-100%的同源性^[1-2]。表明*H pylori*肝组织感染与肝癌发生之间存在联系。在本研究中, 我们在经口接种感染*H pylori*的C57BL/6小鼠肝组织中用巢式PCR方法扩增*H pylori* 16S rRNA基因, 15例中6例阳性(阳性率40%), 与胃组织培养出的*H pylori*及接种的原始菌株PCR产物测序结果进行同源比较, 三者同源性达100%, 证实小鼠肝组织中检测到的*H pylori*与接种*H pylori*为同一细菌。因此我们认为, 经口接种的*H pylori*可通过某种途径到达小鼠肝组织。

前期研究中, 我们已观察了*H pylori*对体外HepG2细胞的细胞毒作用以及对癌基因Cyclin D1和PCNA的影响, 初步结果发现*H pylori*有明显的致肝细胞病变作用^[14-15], 并能使HepG₂细胞的上述癌基因mRNA及蛋白表达升高^[16-17]。经口接种的*H pylori*可到达C57BL/6小鼠肝脏, 主要分布在肝脏中央小静脉与肝血窦内, 并出现以淋巴细胞浸润为主的炎症浸润^[18]。McCahey^[19]观察了腹腔注射*H pylori*的小鼠肝组织的病理变化, 结果发现接种3 d后肝组织就开始出现以淋巴细胞浸润为主的炎症病灶。有学者甚至观察到1例经口接种感染*H pylori*的C57BL/6小鼠23 mo后诱导出肝癌^[20]。为进一步了解*H pylori*感染在肝癌发生中的可能作用, 我们检测了感染*H pylori* C57BL/6小鼠8 mo时肝组织中Cyclin D1和PCNA的mRNA与蛋白表达变化。Cyclin D1是细胞周期G1/S期监控点重要的正向调控因子, 与细胞周期素依赖的蛋白激酶4(CDK4)结合并激活CDK4, 从而催化视网膜母细胞瘤蛋白(RB蛋白)磷酸化使细胞从G1期进入S期^[21-24], 在进展期肝癌中发现有Cyclin D1的过量表达, 提示Cyclin D1的过量表达与肝癌进展有关^[25-26]。PCNA是细胞周期G1/S相合成的细胞核蛋白, 与细胞增殖活性有关^[27-29], 与肝癌的发生、分化、大小、侵袭、复发和预后等均密切相关^[30-31]。我们发现, *H pylori*感染小鼠8 mo时肝组织PCNA mRNA与蛋白表达均增加, Cyclin D1 mRNA表达增加, 而蛋白表达则只呈现增高趋势, 出现这

一现象的原因我们推测*H pylori*作为外来刺激因素, 首先引起PCNA的表达增加, 而随时间的迁延, 进而引起Cyclin D1的表达增加。由于Cyclin D1和PCNA基因在肿瘤发生、发展中的重要作用, 因此我们认为*H pylori*在肝癌的发展中可能起一定作用。遗憾的是我们未能从肝组织中观察到肝癌或癌前增生性变化, 可能与感染时间或病理切片的取样位置有关, 但进一步将通过更长程的体外动物实验以明确*H pylori*能否诱导肝癌或癌前增生性病变, 以确定*H pylori*是否为肝癌发病的潜在诱发因素。

4 参考文献

- 1 Fan XG, Peng XN, Huang Y, Yakoob J, Wang ZM, Chen YP. Helicobacter species ribosomal DNA recovered from the liver tissue of chinese patients with primary hepatocellular carcinoma. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1555-1557
- 2 黄燕, 范学工, 陈永平, 李宁, 汤立军. 肝癌组织中螺杆菌16S rRNA基因的检测. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 877-882
- 3 Ito K, Nakamura M, Toda G, Negishi M, Torii A, Ohno T. Potential role of *Helicobacter pylori* in hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Med* 2004; 13: 221-227
- 4 Pellicano R, Mazzaferro V, Grigioni WF, Cutufia MA, Fagoonee S, Silengo L, Rizzetto M, Ponzetto A. Helicobacter species sequences in liver samples from patients with and without hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 598-601
- 5 Verhoef C, Pot RG, de Man RA, Zondervan PE, Kuipers EJ, IJzermans JN, Kusters JG. Detection of identical Helicobacter DNA in the stomach and in the non-cirrhotic liver of patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 1171-1174
- 6 彭小宁, 范学工, 黄燕, 王志明, 陈永平. 螺杆菌感染与肝癌关系的研究. *世界华人消化杂志* 2002; 10: 902-906
- 7 田雪飞, 范学工, 张艳, 黄燕. C₅₇BL/6小鼠幽门螺杆菌感染动物模型的建立. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1313-1316
- 8 Kowalski M, Rees W, Konturek PC, Grove R, Scheffold T, Meixner H, Brunec M, Franz N, Konturek JW, Pieniazek P, Hahn EG, Konturek SJ, Thale J, Warnecke H. Detection of *Helicobacter pylori* specific DNA in human atheromatous coronary arteries and its association to prior myocardial infarction and unstable angina. *Dig Liver Dis* 2002; 34: 398-402
- 9 Pulkowski G, Majer M, Budzynski J, Swiatkowski M. Gastroesophageal reflux disease and coronary heart disease-coexistence or athological relationship? *Pol Merkuriusz Lek* 2006; 20: 104-108
- 10 Silva CP, Pereira-Lima JC, Oliveira AG, Guerra JB, Marques DL, Sarmanho L, Cabral MM, Queiroz DM. Association of the presence of Helicobacter in gallbladder tissue with cholelithiasis and cholecystitis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5615-5618
- 11 Maurer KJ, Rogers AB, Ge Z, Wiese AJ, Carey MC, Fox JG. *Helicobacter pylori* and cholesterol gallstone formation in C57L/J mice: a prospective study.

- Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; 290: G175-G182
- 12 Abayli B, Colakoglu S, Serin M, Erdogan S, Isiksal YF, Tuncer I, Koksall F, Demiryurek H. *Helicobacter pylori* in the etiology of cholesterol gallstones. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 134-137
- 13 范学工, 周建华. 肝脏细菌感染, 肝癌的又一个病因. 世界华人消化杂志 2001; 9: 449-450
- 14 陈仁, 范学工, 李宁, 黄燕, 陈朝晖. cagA(+)幽门螺杆菌体外诱导肝细胞凋亡的观察. 中国人兽共患病杂志 2003; 19: 69-71
- 15 陈仁, 范学工, 黄燕, 李宁, 陈朝晖. 幽门螺杆菌对肝癌细胞HepG2的体外细胞毒作用. 癌症 2004; 23: 44-49
- 16 张艳, 范学工, 田雪飞, 黄燕. 幽门螺杆菌对肝细胞系HepG2 cyclin D1 PCNA mRNA表达的影响. 世界华人消化杂志 2004; 12: 93-96
- 17 Zhang Y, Fan XG, Chen R, Xiao ZQ, Feng XP, Tian XF, Chen ZH. Comparative proteome analysis of untreated and *Helicobacter pylori*-treated HepG2. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 3485-3489
- 18 田雪飞, 范学工, 付春燕, 黄燕, 朱才. 幽门螺杆菌致肝脏病变的动物实验观察. 中华肝病杂志 2005; 13: 780-783
- 19 McAtthey SN, Shomer NH, Schrenzel MD, Whary MT, Taylor NS, Fox JG. Colonization and tissue tropism of *Helicobacter pylori* and a novel urease-negative *Helicobacter* species in ICR mice are independent of route of exposure. *Helicobacter* 1999; 4: 249-259
- 20 Wang X, Willen R, Svensson M, Ljungh A, Wadstrom T. Two-year follow-up of *Helicobacter pylori* infection in C57BL/6 and Balb/cA mice. *APMIS* 2003; 111: 514-522
- 21 Li YJ, Wei ZM, Meng YX, Ji XR. Beta-catenin up-regulates the expression of cyclinD1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer: relationships with carcinogenesis and metastasis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2117-2123
- 22 Dimova I, Zaharieva B, Raicheva S, Milev I, Dimitrov R, Doganov N, Aleksandrov M, Todorov T, Toncheva D. Association of CyclinD1 copy number changes with histological type in ovarian tumors. *Acta Oncol* 2004; 43: 675-679
- 23 Koroleva OA, Tomlinson M, Parinyapong P, Sakvarelidze L, Leader D, Shaw P, Doonan JH. CycD1, a putative G1 cyclin from *Antirrhinum majus*, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 phases. *Plant Cell* 2004; 16: 2364-2379
- 24 Jones CD, Darnell KH, Warnke RA, Zehnder JL. CyclinD1/CyclinD3 ratio by real-time PCR improves specificity for the diagnosis of mantle cell lymphoma. *J Mol Diagn* 2004; 6: 84-89
- 25 Anna CH, Iida M, Sills RC, Devereux TR. Expression of potential beta-catenin targets, cyclin D1, c-Jun, c-Myc, E-cadherin, and EGFR in chemically induced hepatocellular neoplasms from B6C3F1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 190: 135-145
- 26 Joo M, Lee HK, Kang YK. Expression of beta-catenin in hepatocellular carcinoma in relation to tumor cell proliferation and cyclin D1 expression. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 211-217
- 27 Maes L, Kalala JP, Cornelissen M, De Ridder L. PCNA, Ki-67 and hTERT in residual benign meningiomas. *In Vivo* 2006; 20: 271-275
- 28 Watts FZ. Sumoylation of PCNA: Wrestling with recombination at stalled replication forks. *DNA Repair (Amst)* 2006; 5: 399-403
- 29 Arias EE, Walter JC. PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 84-90
- 30 Saftoiu A, Ciurea T, Georgescu C, Banita M, Comanescu V, Rogoveanu I, Gorunescu F, Georgescu I. Immunohistochemical assessment of proliferating cell nuclear antigen in primary hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules. *J Cell Mol Med* 2003; 7: 436-446
- 31 Xiao EH, Li JQ, Huang JF. Effects of p53 on apoptosis and proliferation of hepatocellular carcinoma cells treated with transcatheter arterial chemoembolization. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 190-194

■同行评价

本文从分子水平探讨了*H pylori*感染与肝癌发生的相关性, 对于深入研究肝癌与*H pylori*感染有理论意义和指导价值。

电编 张敏 编辑 潘伯荣

高灵敏化学发光法体外HBV转录与复制水平的检测体系

何芳, 唐红, 刘丽, 刘凤君, 王甦, 周陶友, 赵连三, 刘聪

■背景资料

建立稳定的体外HBV转录与复制水平检测体系是研究HBV转录与复制调控机制的前提。目前常用方法是以同位素标记探针进行Northern及Southern杂交。尽管同位素法的敏感性和特异性都较高, 但存在放射性等缺点, 因此很有必要发展非同位素法。

何芳, 唐红, 刘丽, 刘凤君, 王甦, 周陶友, 赵连三, 刘聪, 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; 四川省感染性疾病分子生物学重点实验室 四川省成都市 610041
何芳, 2001年四川大学博士, 讲师, 主要从事病毒性肝炎的基础与临床研究。

国家杰出青年科学基金资助项目, No. 30325036

四川省应用基础研究项目, No. 04JY029-002-7

通讯作者: 唐红, 610041, 四川省成都市国学巷37号, 四川大学华西医院感染性疾病中心. htang6198@hotmail.com
电话: 028-85422647 传真: 028-85422113

收稿日期: 2006-03-14 接受日期: 2006-03-24

Establishment of a highly sensitive chemiluminescent detection system for analysis of hepatitis B virus transcription and replication level *in vitro*

Fang He, Hong Tang, Li Liu, Feng-Jun Liu, Su Wang, Tao-You Zhou, Lian-San Zhao, Cong Liu

Fang He, Hong Tang, Li Liu, Feng-Jun Liu, Su Wang, Tao-You Zhou, Lian-San Zhao, Cong Liu, Center of Infectious Diseases, West China Hospital of Sichuan University; Division of Molecular Biology of Infectious Diseases, National Key Laboratory of Biotherapy; Sichuan Provincial Key Laboratory of Molecular Biology of Infectious Diseases, Chengdu 610041, Sichuan Province, China
Supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars, No. 30325036, and the Applied Basic Research Programs of Sichuan Province, China, No. 04JY029-002-7

Correspondence to: Professor Hong Tang, Center of Infectious Diseases, West China Hospital, Sichuan University, 37 Guoxue Xiang, Chengdu 610041, Sichuan Province, China. htang6198@hotmail.com

Received: 2006-03-14 Accepted: 2006-03-24

Abstract

AIM: To establish a stable and highly sensitive chemiluminescent detection system for analysis of hepatitis B virus (HBV) transcription and replication level *in vitro*.

METHODS: Human hepatoma cell line HepG2 and HepG2.2.15, a HepG2 cell line with HBV transcription and replication, were collected after being cultured for 3 d and then divided equally. Total RNA of the cells and HBV replication intermediates were extracted and analyzed

by Northern and Southern blot hybridization, respectively, while digoxigenin labeled HBV recombinant plasmid pHBV4.1 was used as the probe of the hybridizations. The results of the hybridizations were detected by chemiluminescent detection system. Thereafter pHBV4.1 was diluted into a series of multi-stage differential log-rank concentrations, and analyzed by dot blot hybridization along with Northern and Southern blot hybridization, which were used as the internal controls.

RESULTS: High levels of HBV specific transcripts (3.5 kb and 2.4/2.1 kb mRNA) and HBV replication intermediate DNAs were detected by Northern and Southern hybridization analysis, respectively, in the HepG2.2.15 cells. No HBV specific transcripts or HBV replication intermediate DNAs were found in the HepG2 cells. Positive dot signals detected in the internal controls were weakened as the decrease of pHBV4.1 concentration. The sensitivity of the chemiluminescent detection system of the Northern and Southern hybridization analysis was 1 pg of the target nucleotides according to the internal controls, which was almost equal to that of isotope detection system. Similar results were obtained after the whole procedures were repeated for more than three times.

CONCLUSION: A stable and highly sensitive chemiluminescent detection system for analysis of HBV transcription and replication level *in vitro* is successfully established.

Key Words: Hepatitis B virus; Transcription; Replication; Chemiluminescent; Detection

He F, Tang H, Liu L, Liu FJ, Wang S, Zhou TY, Zhao LS, Liu C. Establishment of a highly sensitive chemiluminescent detection system for analysis of hepatitis B virus transcription and replication level *in vitro*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1346-1351

摘要

目的: 建立一套稳定的化学发光法体外HBV转录与复制水平检测体系。

方法: 将人肝癌细胞株HepG2和可产生复制型HBV颗粒的HepG2.2.15细胞培养3 d, 收集细胞均分为两份, 分别抽提细胞总RNA和HBV复制中间体DNA. 以地高辛标记的HBV重组质粒pHBV4.1作为探针, 分别进行Northern及Southern吸印杂交, 以化学发光法检测杂交结果. 将pHBV4.1以对数级差稀释后分别点样于尼龙膜用作内标, 同时进行杂交及检测.

结果: HepG2.2.15细胞提取物中检测出较强的HBV转录产物: 3.5 kb, 2.4/2.1 kb HBV mRNA的信号, 及较强的HBV复制产物: HBV复制中间体DNA的信号. HepG2细胞提取物检测结果均为阴性. 内标检测信号强度随点样浓度逐渐递减而减弱, 检测的灵敏度可达到1 pg, 接近同位素法检测的敏感度. 整个实验重复3次以上结果均相似.

结论: 成功建立了一套稳定的高灵敏化学发光法体外转录与复制水平检测体系.

关键词: 乙型肝炎病毒; 转录; 复制; 化学发光法; 检测

何芳, 唐红, 刘丽, 刘凤君, 王甦, 周陶友, 赵连三, 刘聪. 高灵敏化学发光法体外HBV转录与复制水平的检测体系. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1346-1351

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1346.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是嗜肝DNA病毒, 在细胞内通过逆转录机制进行复制, 转录与复制是HBV生活周期中极为重要的环节, 但目前对其调控机制尚不完全清楚, 这也是目前研究的难点与热点之一^[1-6]. 建立一套稳定的体外HBV转录与复制水平检测体系是研究HBV的转录与复制调控机制的前提. 目前常用的也是经典的方法是: Northern及Southern印迹后与同位素标记探针杂交, 然后通过检测放射信号的强弱判断目的核苷酸的含量^[7-13]. 尽管同位素法的敏感性和特异性都较高, 但存在半衰期短、对人体和环境有较高的危害性, 对实验设备和人员均有较高的要求等缺点, 因此很有必要发展非同位素法^[14]. 同时, 由于HBV复制中间体DNA及mRNA的抽提较为困难, 因此建立稳定的高灵敏非同位素法检测体系显得十分重要. 我们将同位素标记探针改为地高辛标记探针, 以化学发光法检测Northern及Southern吸印杂交结果, 建立了一套稳定的高灵敏化学发光法体

外HBV转录与复制水平检测体系.

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株HepG2和稳定转染复制型HBV重组质粒的HepG2.2.15细胞株是目前常用的研究HBV转录与复制的细胞株及抗HBV药物筛选细胞模型^[15-20], 由四川大学华西医院感染性疾病分子生物学研究室保存. HBV DNA重组质粒pHBV4.1由本研究室提供. RPMI 1640培养基干粉、G418、Trizol和Tris碱购自Invitrogen公司; HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid]、焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)、MOPS和去离子甲酰胺(formamide, deionized)等购自Amresco公司; 胰蛋白酶、NP-40、DNase I、Pronase、tRNA和鲑精DNA(Herring test DNA)购自Sigma公司; 化学发光检测试剂盒(DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids)和地高辛标记试剂DIG-High Prime购自Roche公司. 按常规方法在直径10 cm的培养皿中传代培养HepG2.2.15细胞和HepG2细胞. HepG2.2.15细胞采用含有100 mL/L小牛血清、10 mmol/L HEPES、5000 U/L青霉素、链霉素和380 mg/L G418的RPMI 1640培养基在37℃, 50 mL/L CO₂条件下培养, 每2 d换液1次, 4 d传代. HepG2细胞培养条件除培养基不含G418以外, 其他均与HepG2.2.15细胞相同.

1.2 方法 将HepG2.2.15细胞和HepG2细胞培养3 d, 收集细胞均分为两份, 分别用于细胞总RNA和HBV复制中间体DNA抽提. 细胞总RNA抽提采用Trizol, 方法按试剂盒说明书进行. 储存于-20℃待用. 以地高辛标记试剂DIG-High Prime分别标记HBV表达质粒pHBV4.1和3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)表达质粒pGAPDH, 分别命名为DIG-pHBV4.1和DIG-phGAPDH, 方法按试剂盒说明书进行.

1.2.1 Northern法检测HBV mRNA 将10 μg细胞总RNA以10 g/L琼脂糖甲醛变性凝胶电泳后, 毛细管法(Capillary Blotting)转印至尼龙膜, 转印后紫外交联每面3 min, 4℃保存待用. 将转印膜片及1条内标同时在42℃预杂交[预杂交液: 5 × SSC, 500 mL/L formamide (deionized), 1 g/L N-lauroylsarcosine, 0.2 g/L SDS, 20 g/L blocking solution, 鱼精DNA 0.02 g/L (100℃, 10 min)] 2-4 h, 随后将地高辛标记探针DIG-pHBV4.1和DIG-phGAPDH 100℃变性10 min, 加入预热杂

■ 研发前沿

目前为止, 由于HBV复制中间体DNA及mRNA在细胞中的含量很少, 抽提较为困难, 尚未见有人报道采用以地高辛、生物素或荧光素标记探针的非同位素法检测体系检测HBV的转录与复制水平. 其他非同位素方法主要是RT-PCR等, 但由于PCR方法是将目的基因片段扩增后进行检测, 并非直接检测HBV复制中间体DNA及mRNA, 且由于其敏感性极高, 易出现假阳性, 故在国外文献中极少采用此类方法.

■创新盘点

以同位素标记探针进行Northern及Southern杂交有探针半衰期短、有放射性等缺陷,对实验室设备和操作人员均有较高的要求。本文以地高辛标记探针建立了一套高灵敏化学发光法体外HBV转录与复制水平检测体系,其灵敏度与同位素检测法相似,且结果稳定,背景低。

交液中42℃杂交过夜。以DIG-phGAPDH同时进行Northern吸印杂交,其目的是以GAPDH RNA作为RNA检测的内对照。

1.2.2 Southern法检测HBV复制中间体DNA
HepG2.2.15细胞和HepG2细胞的DNA样品预处理: 30 μ L DNA+1.5 μ L RNase (DNase-free, 20 mg/L)+0.9 μ L 10 g/L SDS+1 μ L 10 g/L tRNA, 37℃ 15 min。加10 \times DNA上样缓冲液4 μ L, 混匀后以10 g/L琼脂糖凝胶电泳。电泳完成后0.25 mol/L HCl浸泡凝胶10-15 min, 变性液(1.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L NaOH)浸泡凝胶30 min, 复性液(3.0 mol/L NaCl, 0.5 mol/L Tris. HCl, pH 7.5)浸泡凝胶30 min; 毛细管法转印尼龙膜, 转印后紫外交联, 每面3 min, 干燥后, 4℃保存待用。将转印膜片及1条内标同时在65℃预杂交[预杂交液: 5 \times SSC, 10 g/L N-lauroylsarcosine, 0.2 g/L SDS, 10 g/L blocking solution, 鱼精DNA 0.02 g/L (100℃, 10 min)] 2-4 h, 随后将地高辛标记探针DIG-pHBV4.1 100℃变性10 min, 加入预热杂交液中65℃杂交过夜。

1.2.3 化学发光法检测Northern及Southern法结果 方法按试剂盒操作说明进行, 但稍作改进。吸印杂交后洗膜: 2 \times SSC/1 g/L SDS, 室温洗膜5 min 2次; 0.1 \times SSC/1 g/L SDS, 65℃洗膜15 min 2次。洗液[0.1 mol/L Maleic acid, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.5, 3 mL/L Tween 20]室温浸泡膜片1-5 min, 封闭液[10 g/L blocking reagent溶于(0.1 mol/L Maleic acid, 0.15 mol/L NaCl, pH 7.5)]封闭1 h, 按1:10 000稀释抗-地高辛-Ap于封闭液中, 室温作用1 h, 洗液洗膜20 min 2次; 检测液[0.1 mol/L Tris. HCl, 0.1 mol/L NaCl, pH 9.5]浸泡2-5 min; 膜放入杂交袋中, 加入CSPD(disodium 3-(4-methoxyspiro{1, 2-dioxethane-3, 2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1.3, 7]decan}-4-yl)phenylphosphate)稀释液(将原液按1:100稀释于检测液)室温作用5 min, 挤出多余液体, 密封杂交袋, 37℃作用5-15 min以加强荧光反应, X线胶片曝光显影保存结果。

2 结果

2.1 细胞总RNA及HBV复制中间体DNA的提取结果 紫外分光光度计分析定量所提取的细胞总RNA, A_{260}/A_{280} 比值显示在1.8-1.9之间, 提示所提取的RNA纯度较好, 10 cm培养皿1/2细胞的

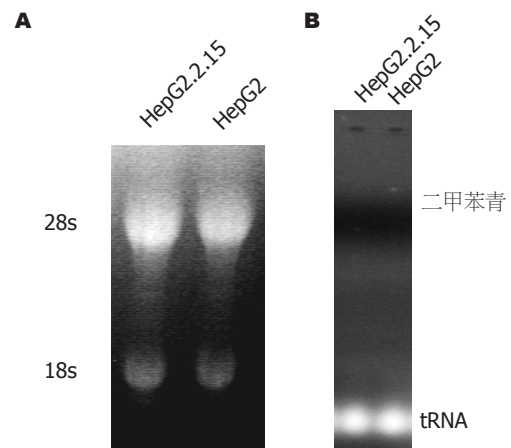


图1 细胞总RNA及HBV复制中间体DNA电泳。A: 10 g/L琼脂糖甲醛变性凝胶电泳总RNA, 10 μ g/孔; B: HBV复制中间体DNA含量很少, 10 g/L琼脂糖凝胶电泳后位于二甲苯青和tRNA之间, 但肉眼难以分辨。

总RNA产量在25 μ g左右。10 g/L琼脂糖甲醛变性凝胶电泳后, 可见清晰的28s和18s RNA条带(图1A)。由于细胞中HBV复制中间体DNA总含量很少, 经10 g/L琼脂糖凝胶电泳后肉眼难以分辨, 而上样缓冲液中染料二甲苯青在5-14 g/L琼脂糖凝胶中的泳动速率与长约4 kb的双链线状DNA相同^[14], 故可用tRNA和二甲苯青在凝胶中的位置判断HBV复制中间体DNA(≤ 3.2 kb)的位置(图1B), 以便截取适当大小的凝胶用于转膜。

2.2 Northern法检出HepG2.2.15细胞中HBV RNA转录 通过Northern法后化学发光法检测, 结果发现HepG2.2.15细胞中检测出有较强的HBV转录产物3.5 kb、2.1/2.4 kb的HBV mRNA的信号, 也即HepG2.2.15细胞中有较高水平的HBV转录产物产生, 与我们既往以pHBV4.1转染HepG2细胞后用同位素法检测的结果相似, 也与其他文献报道同位素方法检测结果一致^[5-8, 21-24]。而HepG2细胞提取物中未检测到HBV转录产物的信号(图2A)。内标检测结果为: 1000, 100, 10及1 μ g/L的pHBV4.1样品点样处均检出阳性斑点信号, 其强度随样品浓度逐渐递减而减弱, 0.1 μ g/L pHBV4.1及TE样品点样处未检出阳性斑点信号(图2B)。本研究中HepG2.2.15细胞和HepG2细胞样品中GAPDH RNA经Northern法检测含量相似, 无明显差异。

2.3 Southern法检出HepG2.2.15细胞HBV DNA复制 通过Southern法后化学发光法检测, 结果发现HepG2.2.15细胞中检测出有较强的HBV复制中间体DNA信号, 与我们既往以pHBV4.1转染

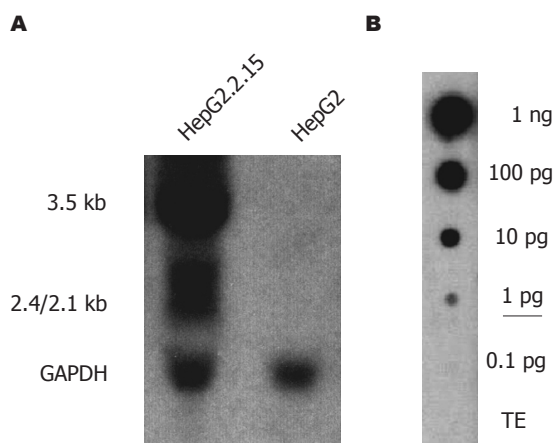


图 2 Northern法后以化学发光法检测. A: HepG2.2.15细胞中的HBV mRNA检测; B: 内标pHBV4.1 1 μg/L检测.

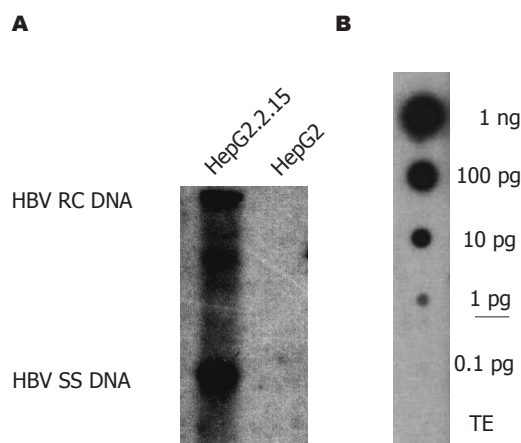


图 3 Southern法后以化学发光法检测. A: HepG2.2.15细胞中的HBV复制中间体DNA检测; B: 内标pHBV4.1 1 μg/L检测.

应用要点

建立稳定的高灵敏化学发光法体外HBV转录与复制水平检测体系能够满足体外检测HBV的转录与复制水平的实验研究需要, 如: HBV转录与复制调控机制的研究和抗HBV药物的筛选等, 更重要的是避免了同位素操作的危害, 操作方便, 便于推广应用.

HepG2细胞后用同位素法检测的结果相似, 也与其他与文献报道同位素方法检测结果一致^[5-8,22-24]. 而HepG2细胞提取物中未检测到HBV复制中间体DNA的信号(图3A). 内标检测结果为: 1000, 100, 10及1 μg/L的pHBV4.1样品点样处均检出阳性斑点信号, 其强度随样品浓度逐渐递减而减弱, 0.1 μg/L pHBV4.1及TE样品点样处未检出阳性斑点信号(图3B).

经3次以上重复检测HepG2.2.15细胞中HBV转录与复制水平其结果均相似, 同时检测结果也有良好的背景, 接近同位素法的低背景.

3 讨论

Northern与Southern法均是研究基因转录与复制常用的方法, 分别用于检测待测样品中特定的RNA和DNA的量与分子大小, 并可推出目的基因的表达程度, 具有较高的敏感性与特异性^[14]. 故现有检测HBV转录与复制水平的方法中最常用的即是: 以Northern法直接检测细胞中提取的HBV转录产物及以Southern法直接检测细胞中提取的HBV复制中间体DNA^[5-8,21-24].

目前Southern和Northern法中多是采用同位素探针, 如最常用的是: ³²P. 虽然³²P标记的探针有较高的灵敏度, 可检出固定在膜上的微量靶DNA(<1 pg), 但同位素也有其固有的一些缺陷, 如: 同位素的半衰期短(³²P的半衰期只有14.3 d), 购买后需尽快标记探针, 并且通常需要标记探针后立即使用, 以免信号衰减; 有放射性可能造成操作人员的身体伤害、可能造成环境污染, 故对实验室设备和操作人员均有较高的要求^[14]. 为替代同位素方法, 目前已发展有多种非同位

素方法, 如采用地高辛、生物素或荧光素标记探针, 通过桥联反应显色或发光. 其中化学发光法的灵敏度已达到可在Southern法中检测出约1 pg的靶DNA, 接近同位素法的灵敏度^[14]. 但目前为止, 由于HBV复制中间体DNA及mRNA在细胞中的含量很少, 抽提较为困难, 尚未见有人报道采用以地高辛、生物素或荧光素标记探针的非同位素法检测体系检测HBV的转录与复制水平. 目前虽有采用其他非同位素方法包括: RT-PCR等检测体系检测HBV的复制水平^[25-28], 但由于PCR方法是将目的基因片段扩增后进行检测, 并非直接检测HBV复制中间体DNA, 且由于其敏感性极高, 易出现假阳性^[14], 故在国外文献中极少采用此类方法检测HBV的转录与复制水平.

我们首次将高灵敏化学发光法引入HBV转录与复制水平检测体系, 并获得成功. 由于地高辛标记探针比生物素或荧光素标记探针稳定且检测结果的背景更低, 并且CSPD是现有的最灵敏的化学发光底物之一^[14], 因此我们将同位素标记探针改为地高辛标记探针, 通过与特异性的抗地高辛-碱性磷酸酶(Anti-Digoxin-AP)结合后, 催化CSPD, 产生荧光, 使X-线胶片曝光而记录结果. 本系统中发光反应可持续1-3 d, 期间可多次曝光X-线胶片, 便于获得最佳图片. 由于我们将实验中封闭和洗涤膜片的时间均进行了延长, 使实验结果的背景大为降低, 同时每次操作均严格遵守实验程序规定的各种条件如温度和时间, 使得本系统获得较高的重复性和稳定性. HepG2细胞是人肝癌细胞株. HepG2.2.15细胞是由2个头尾相连的HBV全基因组DNA重组质粒稳定转染HepG2细胞而成, 可在体外转录并

■名词解释

HBV 转录与复制: HBV 基因组全长 3.2 kb, 具有 4 个启动子和 2 个增强子, 分别调控 3.5, 2.4, 2.1 和 0.7 kb HBV mRNA 的转录, 进而编码合成 HBcAg、HBeAg、DNA 多聚酶、HBsAg 及 HBxAg. 3.5 kb mRNA 作为前基因组 RNA 也是病毒逆转录复制的模板, 在 HBV DNA 多聚酶催化下逆转录合成负链 HBV DNA, 然后再以负链 DNA 为模板合成正链 HBV DNA, 最终形成子代的不完全双链环状 DNA. 转录与复制是 HBV 生活周期中极为重要的环节.

复制 HBV, 是体外研究 HBV 转录与复制的良好模型, 也是常用细胞模型^[15-22,29-30]. 因此, 我们将 HepG2.2.15 细胞作为阳性标本来源, 而将未转染任何 HBV 表达质粒的 HepG2 细胞作为阴性标本来源.

HBV 的转录产物包括: 3.5, 2.4, 2.1 和 0.7 kb 的 mRNA. 其中 3.5 kb mRNA 作为前基因组 RNA (pregenomic RNA), 是病毒逆转录复制的模板. 通常 3.5 和 2.4, 2.1 kb mRNA 的含量较高, 而 0.7 kb mRNA 的含量较低, 同时由于 2.4, 2.1 kb mRNA 的分子量十分接近, 故检测后往往表现为明显的 3.5 kb 和 2.4/2.1 kb mRNA 两条带, 0.7 kb mRNA 条带极弱或显示不清楚^[5-8,21-24]. 我们通过 Northern 法后化学发光法检测杂交结果发现, HepG2.2.15 细胞中检测出有较强的 HBV 转录产物 3.5, 2.4/2.1 kb 的 HBV mRNA 的信号, 也即 HepG2.2.15 细胞中有较高水平的 HBV 转录产物产生, 而 HepG2 细胞提取物中未检测到 HBV 转录产物 (图 2A), 与文献报道一致^[21-22,30]. HBV DNA 的合成过程是边包装边复制的过程, 期间会产生不同大小的 DNA, 其全长为 3.2 kb, 在凝胶电泳及 Southern 法后表现为 3.2 kb 以下的拖带, 其中主要是松弛环状的双链 DNA (relaxed circular DNA, rcDNA) 和单链 DNA (single-stranded DNA, ssDNA)^[1-2,5-8,30]. 我们通过 Southern 法后化学发光法检测杂交结果发现 HepG2.2.15 细胞中检测出有较强的 HBV 复制中间体 DNA 信号, 表现为拖带, 而 HepG2 细胞提取物 HBV 复制中间体 DNA 检测结果为阴性 (图 3A), 与文献报道一致^[22,29-30].

内标检测结果发现发光信号强度随 HBV 表达质粒 pHBV4.1 的点样浓度逐渐递减而逐渐减弱, 但 pHBV4.1 样品浓度低至 1 μ g/L 时仍能检出明显的阳性斑点信号, 提示本体系检测的灵敏度可达到 1 pg, 接近同位素法检测的灵敏度 (图 2B, 3B). 同时检测结果的背景亦较低, 接近同位素法的低背景. 经 3 次以上重复检测 HepG2.2.15 细胞中 HBV 转录与复制水平其结果均相似, 提示本检测系统具有良好的稳定性, 适用于体外检测 HBV 转录与复制水平的实验研究. 事实上, 我们已将本检测体系用于体内实验研究, 将复制型 HBV 重组质粒 pHBV4.1 注入小鼠体内制成 HBV 体内短期复制模型, 取小鼠肝脏组织用本检测体系同样可以检测出 HBV 转录产物, 即 3.5, 2.1/2.4 kb 的 HBV mRNA 和 HBV 复制中间体 DNA, 其信号的强度同样也接近同位素法的检

测结果, 检测结果的背景亦较低 (结果未出示, 待发表), 此结果进一步证实了本检测系统的稳定性.

总之, 在既往用同位素标记探针进行体外 HBV 转录与复制水平检测的工作基础上, 将同位素标记探针改为地高辛标记探针, 以化学发光法检测 Northern 和 Southern 法结果, 由此建立了一套高灵敏化学发光法体外乙型肝炎病毒转录与复制水平检测体系, 其灵敏度与同位素检测方法的灵敏度相似, 且结果稳定, 背景低, 能够满足体外检测 HBV 的转录与复制水平的实验研究需要, 如: HBV 转录与复制调控机制的研究和抗 HBV 药物的筛选等, 更重要的是本检测体系避免了同位素操作的危害, 操作方便, 便于推广应用.

4 参考文献

- 1 Lee JY, Locarnini S. Hepatitis B virus: pathogenesis, viral intermediates, and viral replication. *Clin Liver Dis* 2004; 8: 301-320
- 2 Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 2004; 350: 1118-1129
- 3 Melegari M, Wolf SK, Schneider RJ. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J Virol* 2005; 79: 9810-9820
- 4 Uprichard SL, Wieland SF, Althage A, Chisari FV. Transcriptional and posttranscriptional control of hepatitis B virus gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 1310-1315
- 5 Tang H, Banks KE, Anderson AL, McLachlan A. Hepatitis B virus transcription and replication. *Drug News Perspect* 2001; 14: 325-334
- 6 Tang H, McLachlan A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 1841-1846
- 7 Wang S, Tang H, He F, Liu L, Huang FJ, Zhou TY, Zhao LS. On the role of liver-enriched transcription factors in regulating HBV transcription and replication. *Sichuan Daxue Xuebao Yixueban* 2006; 37: 35-39
- 8 Tang H, Delgermaa L, Huang F, Oishi N, Liu L, He F, Zhao L, Murakami S. The transcriptional transactivation function of HBx protein is important for its augmentation role in hepatitis B virus replication. *J Virol* 2005; 79: 5548-5556
- 9 Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, Chisari FV. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication *in vivo*. *J Virol* 2005; 79: 7269-7272
- 10 Robek MD, Boyd BS, Wieland SF, Chisari FV. Signal transduction pathways that inhibit hepatitis B virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 1743-1747
- 11 Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Activated intrahepatic antigen-presenting cells inhibit hepatitis B virus replication in the liver of transgenic mice. *J Immunol* 2002; 169: 5188-5195
- 12 Kimura K, Kakimi K, Wieland S, Guidotti LG, Chisari FV. Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Virol* 2002; 76: 10702-10707

- 13 Tang H, McLachlan A. Mechanisms of inhibition of nuclear hormone receptor-dependent hepatitis B virus replication by hepatocyte nuclear factor 3beta. *J Virol* 2002; 76: 8572-8581
- 14 Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 5.1-5.13; 8.1-8.17; 9.1-9.81
- 15 Ren X, Luo G, Xie Z, Zhou L, Kong X, Xu A. Inhibition of multiple gene expression and virus replication of HBV by stable RNA interference in 2.2.15 cells. *J Hepatol* 2006; 44: 663-670
- 16 Ren XR, Zhou LJ, Luo GB, Lin B, Xu A. Inhibition of hepatitis B virus replication in 2.2.15 cells by expressed shRNA. *J Viral Hepat* 2005; 12: 236-242
- 17 Iyer RP, Jin Y, Roland A, Morrey JD, Mounir S, Korba B. Phosphorothioate di- and trinucleotides as a novel class of anti-hepatitis B virus agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2199-2205
- 18 Semaine W, Johar M, Tyrrell DL, Kumar R, Agrawal B. Inhibition of hepatitis B virus (HBV) replication by pyrimidines bearing an acyclic moiety: effect on wild-type and mutant HBV. *J Med Chem* 2006; 49: 2049-2054
- 19 Tang H, Raney AK, McLachlan A. Replication of the wild type and a natural hepatitis B virus nucleocapsid promoter variant is differentially regulated by nuclear hormone receptors in cell culture. *J Virol* 2001; 75: 8937-8948
- 20 Qian ZK, Xuan BQ, Min TS, Xu JF, Li L, Huang WD. Cost-effective method of siRNA preparation and its application to inhibit hepatitis B virus replication in HepG2 cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1297-1302
- 21 Giladi H, Ketzinil-Gilad M, Rivkin L, Felig Y, Nussbaum O, Galun E. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther* 2003; 8: 769-776
- 22 Tang N, Huang AL, Zhang BQ, Yan G, Xiang MQ, Pu D, Guo H. Construction of recombinant eukaryotic expression plasmid containing 1.3-fold-overlength genome of HBV and its expression in HepG2 cells. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2003; 11: 464-466
- 23 McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, Wieland SF, Marion PL, Kay MA. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 639-644
- 24 Lu X, Tran T, Simsek E, Block TM. The alkylated imino sugar, n-(n-Nonyl)-deoxygalactonojirimycin, reduces the amount of hepatitis B virus nucleocapsid in tissue culture. *J Virol* 2003; 77: 11933-11940
- 25 Wu Y, Huang AL, Tang N, Zhang BQ, Lu NF. RNA interference inhibits replication and expression of hepatitis B virus in mice. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 630-634
- 26 Liu J, Li YH, Ding J, Gong WD, Xue CF, Zhao Y, Huang YX. Quantifying anti-HBV effect of targeted ribonuclease by real-time fluorescent PCR. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2883-2885
- 27 崔敏, 刘志红, 朱丽晶, 陈惠萍, 曾彩虹, 周虹, 黎磊石. 乙型肝炎病毒感染肾炎患者肾组织病毒抗原和复制中间体的检测及其意义. *肾脏病与透析肾移植杂志* 2004; 13: 301-308, 325
- 28 张凯宇, 蔡艳俊, 王峰, 许昶, 吕美德. 乙肝患者外周血单个核细胞中乙肝病毒复制中间体RNA与乙肝病毒DNA相关性的研究. *临床肝胆病杂志* 2001; 17: 149-151
- 29 Sells MA, Chen ML, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 1005-1009
- 30 Sells MA, Zelent AZ, Shvartsman M, Acs G. Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J Virol* 1988; 62: 2836-2844

■同行评价

本文用非同位素化学发光法建立了Southern, Northern blot方法, 检测HBV的复制和转录水平, 从其灵敏度分析, 已接近同位素方法, 该实验设计合理, 方法表述详而不繁, 结果明确, 令人信服. 对研究HBV和筛选抗HBV的药物有相当的借鉴意义.

电编 张敏 编辑 潘伯荣

丹参酮 II A对肝癌SMMC-7721细胞COX-2表达的影响

徐俊丽, 和水祥, 陈静宏, 符寒, 赵刚, 王艳丽, 任牡丹

■背景资料

研究表明, 肿瘤的发生不仅与肿瘤细胞增殖加快有关, 而且与肿瘤细胞死亡受抑制密切相关。诱导肿瘤细胞凋亡是一条有效的肿瘤治疗途径, 比杀伤肿瘤细胞的治疗有明显的优越性, 寻求高效低毒的肿瘤细胞凋亡诱导剂已成为目前肿瘤治疗的研究热点。

徐俊丽, 和水祥, 符寒, 赵刚, 王艳丽, 任牡丹, 西安交通大学医学院第一附属医院消化内科 陕西省西安市 710061
陈静宏, 西安交通大学医学院病原微生物与寄生虫系 陕西省西安市 710061
徐俊丽, 西安交通大学医学院2004级硕士生, 主要从事慢性肝病的基础与临床研究。

陕西省中医局科研基金项目, No. 2001-040
通讯作者: 和水祥, 710061, 陕西省西安市雁塔西路277号, 西安交通大学医学院第一附属医院消化内科. hesx123@163.net

电话: 029-85322401 传真: 029-85323560
收稿日期: 2006-01-03 接受日期: 2006-03-29

Effect of tanshinone II A on COX-2 expression in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721

Jun-Li Xu, Shui-Xiang He, Jing-Hong Chen, Han Fu, Gang Zhao, Yan-Li Wang, Mu-Dan Ren

Jun-Li Xu, Shui-Xiang He, Han Fu, Gang Zhao, Yan-Li Wang, Mu-Dan Ren, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University Medical College, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China
Jing-Hong Chen, Department of Microorganism and Parasitology, Xi'an Jiaotong University Medical College, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China

Supported by Scientific Research Foundation of Shaanxi Traditional Chinese Medicine Office, No. 2001-040

Correspondence to: Dr. Shui-Xiang He, 710061, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University Medical College, 277 Yanta West Road, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China. hesx123@163.net

Received: 2006-01-03 Accepted: 2006-03-29

Abstract

AIM: To observe the effect of Tanshinone II A on the proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 and its mechanism.

METHODS: The human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 cultured *in vitro* was treated with different concentrations (final 0.5 mg/L) Tanshinone II A. The proliferation of the cells was measured by MTT assay, and the apoptosis of the cells was investigated by flow cytometry and transmission electron microscopy (TEM). The expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2) was detected by immunocytochemistry. The levels of prostaglandin E₂ (PGE₂) in medium

were measured by radioimmunoassay.

RESULTS: Tanshinone II A inhibited the growth of SMMC-7721 cells in a dose-dependent manner. The inhibitory rate reached the peak (69.3%) after 0.5 mg/L Tanshinone II A was used for 48 h, which was significantly higher than that in the controls ($P < 0.01$). Typical features of apoptosis as cell shrinkage, nuclear chromatin condensation, fragmentation, and the formation of apoptotic bodies was found by TEM in the cells treated with Tanshinone II A. FCM analysis showed the apoptotic rates for 24, 48 and 72 h were $7.45\% \pm 0.33\%$, $6.59\% \pm 0.45\%$, and $4.78\% \pm 1.05\%$, respectively, when 5 mg/L Tanshinone II A was used, which were markedly higher than those in the controls (all $P < 0.01$). Both the expression of COX-2 ($P < 0.01$) and the production of PGE₂ ($40.18 \pm 1.37 \mu\text{g/L}$ vs $75.31 \pm 1.64 \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$) were decreased significantly after Tanshinone II A treatment as compared with those in the controls.

CONCLUSION: Tanshinone II A inhibits the proliferation and increases the apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 by down-regulation of COX-2 protein expression.

Key Words: Tanshinone; Cyclooxygenase-2; Hepatocellular carcinoma; Apoptosis

Xu JL, He SX, Chen JH, Fu H, Zhao G, Wang YL, Reng MD. Effect of tanshinone II A on COX-2 expression in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1352-1356

摘要

目的: 观察丹参酮 II A对肝癌SMMC-7721细胞生长和凋亡的影响及其作用机制。

方法: 体外培养肝癌SMMC-7721细胞株, 经丹参酮 II A(终浓度0.5 mg/L)作用后, 采用四唑盐(MTT)比色法检测细胞增殖, 透射电镜观察细胞凋亡, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 免疫细胞化学SABC法检测COX-2蛋白表达, 放射免疫法检测前列腺素E₂(PGE₂)含量。

结果: 丹参酮 II A 对肝癌细胞的生长有明显的抑制作用, 并呈剂量依赖性. 以 0.5 mg/L 作用终浓度抑制作用最明显, 其 48 h 的抑制率为 69.3%, 与对照组相比差异有显著性 ($P < 0.01$). 电镜下观察, 丹参酮 II A 作用后肝癌细胞表现为细胞皱缩、核染色质浓缩、核碎裂以及凋亡小体形成等凋亡特征性的形态改变. 5 mg/L 丹参酮 II A 作用后, 随着时间的延长, 凋亡率逐渐升高, 48 h 达到高峰, 随后逐渐下降 (24, 48, 72 h 凋亡率分别为 $7.45\% \pm 0.33\%$ 、 $6.59\% \pm 0.45\%$ 、 $4.78\% \pm 1.05\%$), 与对照组比较, 各处理组都有显著性差异 (均 $P < 0.01$), 丹参酮作用组肝癌细胞 COX-2 表达明显减少, 其培养液中 PGE_2 的产生量下降, 与对照组相比差异均有显著性 ($P < 0.01$).

结论: 丹参酮 II A 可能是通过下调 COX-2 mRNA 的表达水平发挥其对肝癌细胞生长抑制及促进凋亡作用.

关键词: 丹参酮; 环氧合酶-2; 肝癌细胞; 凋亡

徐俊丽, 和水祥, 陈静宏, 符寒, 赵刚, 王艳丽, 任牡丹. 丹参酮 II A 对肝癌 SMMC-7721 细胞 COX-2 表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1352-1356
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1352.asp>

0 引言

丹参是常用的活血化瘀中药之一, 神农本草经记载丹参可破症除瘀. 近年研究表明, 丹参的有效成分丹参酮 II A 可通过杀伤肿瘤细胞, 诱导分化和凋亡等途径发挥其抑癌作用^[1], 但具体作用机制仍不清楚. 我们观察了丹参酮 II A 对肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及其对 COX-2 表达的影响, 进一步探讨其抗肿瘤机制.

1 材料和方法

1.1 材料 丹参酮 II A 系由中国药物制品检定所提供的化学标准品, 溶解于二甲亚砜 (DMSO, 终浓度为 0.2 g/L) 中 4℃ 冷藏备用. RPMI 1640 培养液, 小牛血清购自 Gibco 公司, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购自 Sigma 公司; 尼美舒利 (Nimesulide) 购自美国 Sigma 公司, DMSO 溶解, 4℃ 冷藏备用; COX-2 鼠抗人 mAb (工作浓度为 1:80) 及免疫细胞化学 SABC 试剂盒 (即用型) 均购自北京中山生物技术中心; PGE_2 放射免疫试剂盒购于武汉博士德试剂公司; 酶标仪为 Sigma 公司产品; FACSCalibur 购自美国 BD 公司. 人肝癌细胞株 (SMMC-7721) 由西安交通大学医学院第一附

属医院临床分子实验中心陈威主任惠赠, 用含 150 mL/L 小牛血清, 50 U/L 青霉素和 50 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养液, 37℃ 恒温, 50 mL/L CO_2 密闭传代培养.

1.2 方法 将丹参酮 II A 配制成 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10 mg/L 不同浓度, 以 0 mg/L 为阴性对照组, 并设终浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 尼美舒利为阳性对照组^[2], 其余为处理组, 实验根据 MTT 结果选取最佳作用浓度的丹参酮 II A 处理肝癌细胞.

1.2.1 MTT 比色法检测 SMMC-7721 的增殖 传一代培养的 SMMC-7721 以 150 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 制备细胞悬液 $2 \times 10^8/\text{L}$, 接种于 96 孔板, 每孔 200 μL , 生长 24 h 后, 随机分 8 组, 每组 6 复孔, 1-7 组加入丹参酮 II A 终浓度分别为 0 (空白对照组), 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10 mg/L 的培养液, 第 8 组加入 300 $\mu\text{mol/L}$ 尼美舒利作为对照组, 分别作用 24, 48, 72 h 后每孔加新配置的 5 g/L MTT 贮存液 20 μL 继续孵育 4 h 后, 弃上清并每孔加 150 μL 二甲基亚砜溶解细胞内结晶, 酶标 490 nm 波长测定吸光度 (A) 值. 抑制率 = (对照孔 A_{490} - 实验孔 A_{490}) / 对照孔 $A_{490} \times 100\%$.

1.2.2 透射电镜观察 收集处于对数生长期的细胞, 接种于 T-25 培养瓶内, 随机分 3 组加药 (根据细胞毒性试验, 选用丹参酮 II A 0.5 mg/L 作为处理组, 0 mg/L 为阴性对照组, 300 $\mu\text{mol/L}$ 尼美舒利为阳性对照组), 每组各 6 瓶细胞. 药物处理细胞 48 h 后, 胰蛋白酶消化细胞, 置于 EP 管中, 2000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 4℃ 预冷的 20 g/L 戊二醛固定 2 h, PBS 液清洗, 再用 10 g/L 锇酸固定 30 min PBS 液洗, 梯度乙醇脱水, 环氧树脂包埋, 超薄切片机切片, 醋酸铀和枸橼酸铅双色, 透射电子显微镜下观察并摄影.

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 收集经浓度为 5 mg/L 丹参酮 II A 处理 0, 24, 48, 72 h 后的细胞, 用 2.5 g/L 的胰酶消化后制成单细胞悬液, 1500-2000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沿管壁缓慢加入 700 mL/L 预冷 (-20℃) 乙醇固定, 4℃ 保存 12 h. 上机检测前 RNA 酶消化, 再加入 PI 染色液, 4℃ 避光 30 min. 采用 FACScort 流式细胞仪对样品进行检测, 每次计细胞数 20 000 个, 激发波长 488 nm, 分析软件 CellQuest 计算凋亡率.

1.2.4 免疫细胞化学染色 以胰蛋白酶消化对数生长期 SMMC-7721 细胞, 制成单细胞悬液, 接种在预先放置盖玻片的 24 孔板上, 随机分 3 组加药 (0, 0.5 mg/L 浓度的丹参酮 II A 组, 300 $\mu\text{mol/L}$ 尼美舒利组), 每组各 5 瓶细胞. 置 37℃ 培养箱中,

■ 研发前沿

目前研究证实 COX-2 在肿瘤的发生、发展过程中起了十分重要的作用, 他的激活是肿瘤发生的早期事件, 且与肿瘤的分级有关, 有促进肿瘤侵袭和转移的潜能, 而抑制或阻断 COX-2 的表达, 有助于抑制肿瘤生长, 减弱其侵袭力, 从而降低消化道肿瘤的发生率. 凋亡基因 COX-2 表达状态与肝癌的形成与转归关系密切, 可作为评价抗癌药物疗效及其作用机制的理想指标.

■ 相关报道

袁淑兰 *et al* 研究报道丹参酮杀伤肿瘤细胞、诱导其分化和凋亡等途径发挥其抑癌作用. 张必翔 *et al* 研究发现选择性 COX-2 抑制剂尼美舒利能够诱导肝癌细胞 HepG₂ 细胞凋亡, 说明凋亡基因 COX-2 表达状态与肝癌的形成与转归关系密切, 可作为评价抗癌药物疗效及其作用机制的理想指标.

■ 创新盘点

本试验采用免疫细胞化学法观察0.5 mg/L丹参酮II A处理肝癌细胞后COX-2表达情况,与对照组相比明显下调,其催化产物前列腺素E₂的释放水平亦明显下降,与对照组比较差异均有显著性($P<0.01$),考虑丹参酮可能是间接作用于COX-2,下调其表达水平,影响前列腺素E₂释放,发挥肿瘤抑制和凋亡作用。

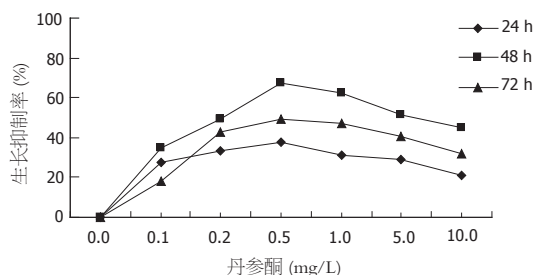


图1 丹参酮抑制SMMC-7721生长。^b $P<0.01$ vs 对照组。

48 h后取出,用PBS清洗,40 g/L多聚甲醛固定10 min后取出自然干燥, -20℃冰箱保存。采用SABC法免疫细胞化学染色,光学显微镜观察。结果判断:全面观察每张切片COX-2定位于细胞质和细胞膜,阳性细胞染色呈棕褐色或棕黄色为阳性,随机选择10个具有代表意义的高倍视野,每个视野计数100个细胞中的阳性细胞数,取平均数作为结果。其中无阳性细胞为(-),阳性细胞数<25%为(+), 25%-55%为(++), >55%为(+++);染色阴性计0分;淡黄色计1分;棕黄色计2分;棕褐色计3分。两种积分相加,积分为0-1分,表示阴性(-);积分为2-3分,表示阳性(+);积分为4-5分,表示阳性(++);积分为6-7分,表示阳性(+++). +视为低表达, ++, +++视为高表达^[3], 计算阳性细胞百分比。

1.2.5 PGE₂的含量测定采用丹参酮对SMMC-7721细胞分泌前列腺素E₂的能力的影响来反映他对COX-2活性的影响。取对数生长期细胞,随机分3组加药(0, 0.5 mg/L浓度的丹参酮II A组, 300 μmol/L尼美舒利组),每组各6瓶细胞。培养48 h后收集上清,存于-20℃备用。取上述细胞培养上清按PGE₂放射免疫试剂盒说明测定PGE₂。

统计学处理 所有实验数据均采用mean±SD表示,用SPSS 11.0软件进行t检验。

2 结果

2.1 丹参酮II A对细胞生长的影响 不同浓度丹参酮II A作用细胞后,细胞生长受到不同程度的抑制,这一抑制作用随丹参酮II A浓度的变化而变化;组间两两均有非常显著性差异($P<0.01$),并且浓度与抑制率间呈现明显的依赖效应(图1)。

2.2 透射电镜观察 未加药的肝癌细胞,细胞核较大,有凹陷,畸形核或分叶核,染色质均匀,细胞表面有毛细状突起(图2A)。给予0.5 mg/L丹参酮II A后,细胞体积缩小,表面出现粗大的突起,细胞器肿胀,核固缩,染色质边集于核膜下,形成新月形小体,核膜消失或突起呈小泡样,核质浓

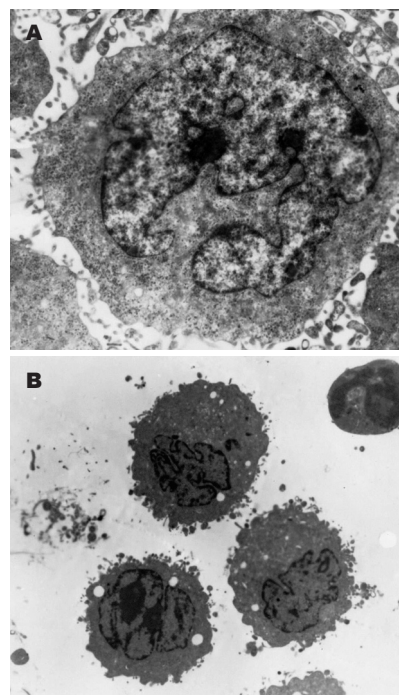


图2 肝癌细胞凋亡超微结构。A: 未加药组 (×5000); B: 丹参酮组 (×3000)。

表1 5 mg/L丹参酮诱导SMMC-7721细胞的凋亡率 (mean±SD)

时间 (h)	凋亡率 (%)
0	1.71 ± 0.06
24	7.45 ± 0.33 ^b
48	6.59 ± 0.45 ^d
72	4.78 ± 1.05 ^f

^b $P<0.01$, ^d $P<0.01$, ^f $P<0.01$ vs 对照组。

缩,发生碎裂,形成凋亡小体,呈早中期的凋亡表现的细胞数明显增多(图2B)。300 μmol/L尼美舒利组除可见凋亡细胞外,还可以见到部分细胞胀大,细胞器肿胀、破坏,辨认不清,细胞核破碎等细胞死亡征象。

2.3 流式细胞术检测丹参酮对SMMC-7721细胞凋亡的影响 FCM定量显示,5 mg/L丹参酮II A作用后,随着时间的延长,凋亡细胞增多,48 h的凋亡率达到最高值,随后逐渐下降,与对照组比较,各处理组都有显著性差异($P<0.01$,表1)。

2.4 SMMC-7721细胞中COX-2的表达 COX-2主要定位于肝癌细胞的胞质,棕黄色颗粒分布于整个胞质或沿核膜周边呈线状分布间质细胞染色差异较大,不计入阳性计数。在0.5 mg/L丹参酮II A组高表达率为73.3%, +++比例较大(图3B)。未加药组(图3A)和尼美舒利组(图3C)高

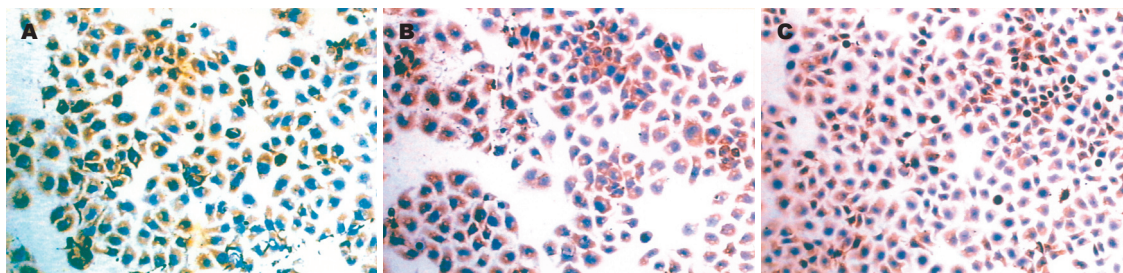


图3 SMMC-7721细胞COX-2的表达SABC法. A: 未加药组; B: 丹参酮组; C: 尼美舒利组.

■应用要点

随着对丹参酮 II A抗癌机制的不断深入研究, 将作为一种植物成分的新型抗癌类药物, 应用于临床治疗.

表2 不同处理组SMMC-7721细胞COX-2表达情况

分组	COX-2表达强度				高表达率 (%)
	-	+	++	+++	
未加药	0	3	6	6	80.0
尼美舒利	0	5	3	7	66.7 ^b
丹参酮	1	3	5	6	73.3 ^d

^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.01$ vs 对照组.

表达率分别为80.0%和66.7%, 差异有显著意义($P < 0.01$, 表2).

2.5 丹参酮 II A对SMMC-7721细胞COX-2活性的影响 处理组的PGE₂释放水平, 其值为40.18 ± 1.37 μg/L, 与阴性对照组(75.31 ± 1.64 μg/L)及阳性对照组(51.67 ± 4.37 μg/L)相比, 差异有显著性($P < 0.001$). 说明丹参酮 II A处理后的肝癌细胞COX-2的活性下降, 导致其催化产物PGE₂释放水平下降.

3 讨论

现代医学研究表明, 肿瘤的发生不仅与肿瘤细胞增殖加快有关, 而且与肿瘤细胞死亡受抑制密切相关. 1972年Kerr *et al*^[4]首先提出细胞凋亡的概念以来, 随着对凋亡分子机制的逐步认识, 人们发现细胞凋亡抑制是肿瘤形成的一个共同的重要事件, 诱导肿瘤细胞凋亡是一条有效的肿瘤治疗途径. 比杀伤肿瘤细胞的治疗有明显的优越性, 故寻求高效低毒的肿瘤细胞凋亡诱导剂已成为目前肿瘤治疗的研究热点. 丹参酮 II A是从活血化瘀中药丹参中提取的有效成分, 有研究表明, 丹参酮 II A具有较强的抗癌活性^[5]. 袁淑兰 *et al*^[6]研究报告, 丹参酮杀伤肿瘤细胞, 诱导其分化和凋亡等途径发挥其抑癌作用. 本结果显示, 用不同浓度丹参酮 II A作用于人肝癌细胞后, 对其生长增殖具有较强抑制作用, 且与浓度呈明显的依赖效应. 用0.5 mg/L丹参酮 II

A处理人肝癌细胞48 h后透射电镜观察, 可见细胞体积缩小、核固缩、染色质边聚及凋亡小体形成等凋亡早中期形态学变化, 进一步证实丹参酮 II A可诱导人肝癌细胞凋亡.

研究表明, 肝癌的发生、发展与多种凋亡相关基因有关. COX-2是花生四烯酸代谢过程中的限速酶, 不但在结直肠癌有较高水平的表达, 而且在人类的其他许多肿瘤组织中也有表达, 如胃癌、肺癌、食管癌、乳腺癌、胰腺癌、胆囊癌等^[7-10]. 目前研究证实, COX-2在肿瘤的发生、发展过程中起了十分重要的作用^[11], 他的激活是肿瘤发生的早期事件, 且与肿瘤的分级有关, 有促进肿瘤侵袭和转移的潜能^[12], 而抑制或阻断COX-2的表达, 有助于抑制肿瘤生长, 减弱其侵袭力, 从而降低消化道肿瘤的发病率^[13]. 张必翔 *et al*^[14]研究发现, 选择性COX-2抑制剂尼美舒利能够诱导肝癌细胞HepG₂细胞凋亡, 说明凋亡基因COX-2表达状态与肝癌的形成与转归关系密切, 可作为评价抗癌药物疗效及其作用机制的理想指标. 我们发现0.5 mg/L丹参酮 II A处理肝癌细胞后COX-2表达明显下调, 其催化产物前列腺素E₂的释放水平亦明显下降, 与对照组比较差异均有显著性($P < 0.01$), 说明丹参酮 II A可以抑制肝癌细胞COX-2的表达并降低其活性. 同时电镜下及流式细胞术可以观察典型的细胞凋亡征象. 以上结果提示, 丹参酮 II A可能是通过下调COX-2 mRNA的表达, 发挥其对肝癌细胞生长抑制及促进凋亡作用的. 但是300 μmol/L尼美舒利作用组, COX-2表达率较丹参酮组下降, 且前列腺素E₂释放水平亦低于作用组, 考虑为尼美舒利直接选择性阻断或抑制了COX-2的活性, 而丹参酮可能是间接作用于COX-2, 下调其表达水平, 影响前列腺素E₂释放, 发挥肿瘤抑制和凋亡作用^[15]. 因此丹参酮 II A作为一种植物成分的新型抗癌类药物, 其具体的作用机制值得进一步探讨.

■名词解释

丹参酮: 活血化淤中药丹参的有效成分, 为一组脂溶性菲醌类成分。包括丹参酮 I、丹参酮 II A、丹参酮 II B、隐丹参酮、二氢丹参酮等。他们通过杀伤肿瘤细胞, 诱导其分化和凋亡等途径发挥其抑癌作用。

4 参考文献

- 1 Mosaddik MA. *In vitro* cytotoxicity of tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge against P388 lymphocytic leukemia cells. *Phytomedicine* 2003; 10: 682-685
- 2 田耕, 于皆平. 尼美舒利对肝癌SMMC-7721细胞增殖、凋亡的干预作用. 武汉大学学报(医学版) 2002; 23: 37-39
- 3 Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 7555-7559
- 4 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257
- 5 Wu WL, Chang WL, Chen CF. Cytotoxic activities of tanshinones against human carcinoma cell lines. *Am J Chin Med* 1991; 19: 207-216
- 6 袁淑兰, 王修杰, 魏于全. 丹参酮抗肿瘤作用及其机制的研究. 癌症 2003; 22: 1363-1366
- 7 Saukkonen K, Nieminen O, van Rees B, Vilkkilä S, Harkonen M, Juhola M, Mecklin JP, Sipponen P, Ristimäki A. Expression of cyclooxygenase-2 in dysplasia of the stomach and in intestinal-type gastric adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1923-1931
- 8 Souza RF, Shewmake K, Beer DG, Cryer B, Spechler SJ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5767-5772
- 9 Singh B, Lucci A. Role of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *J Surg Res* 2002; 108: 173-179
- 10 Kasper HU, Wolf H, Drebbler U, Wolf HK, Kern MA. Expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in pancreatic adenocarcinoma: correlation with microvessel density. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1918-1922
- 11 武爱文. COX-2与肿瘤的关系. 中国肿瘤临床 2002; 29: 603-606
- 12 Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sasatomi K, Harada M, Kusaba T, Tanaka M, Kimura R, Nakashima Y, Nakashima O, Kojiro M, Kurohiji T, Sata M. Expression of cyclooxygenase-2 in human hepatocellular carcinoma: relevance to tumor dedifferentiation. *Hepatology* 1999; 29: 688-696
- 13 冯莉, 江晓华, 吴云林. 环氧化酶在消化道肿瘤转化过程中的表达及其抑制剂的化学预防作用. 上海医学 2004; 27: 788-790
- 14 张必翔, 陈孝平, 张万广, 余红平, 朱虹, 罗顺峰, 王其, 吴在德, 裘法祖. 选择性COX-2抑制剂Nimesulide对肝肿瘤细胞HepG2增殖与凋亡的影响. 中华实验外科杂志 2004; 21: 430-432
- 15 Cianchi F, Cortesini C, Fantappie O, Messerini L, Sardi I, Lasagna N, Perna F, Fabbroni V, Di Felice A, Perigli G, Mazzanti R, Masini E. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2694-2704

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 •

第十八届全国中西医结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, 现将征文通知公布如下:

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

人自身抗原CYP2D6 285 bp基因片段克隆、真核表达及免疫性鉴定

王文凯, 李永哲, 刘国振

王文凯, 李永哲, 中国医学科学院中国协和医科大学 北京协和医院检验科 北京市 100730

刘国振, 中国科学院北京华大基因研究中心 北京市 101300
王文凯, 2003年北华大学医学院硕士研究生, 主要从事自身免疫性疾病研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30471617

国家863计划重大专项基金资助项目, No. 2002AARZ2011

通讯作者: 李永哲, 100730, 北京市, 中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院检验科. yongzhelipumch@yahoo.com.cn

电话: 010-65295416 传真: 010-65295416

收稿日期: 2006-01-11 接受日期: 2006-02-21

Gene cloning and fusion expression of immunodominant epitope of human autoantigen cytochrome P450 2D6 in *Saccharomyces cerevisiae*

Wen-Kai Wang, Yong-Zhe Li, Guo-Zhen Liu

Wen-Kai Wang, Yong-Zhe Li, Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, PUMC & CAMS, Beijing 100730, China

Guo-Zhen Liu, Huada Genomics Research Center, Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China

Supported by National Science Foundation of China, No. 30471617, and the Key Special Foundation of National 863 Project, No. 2002AARZ2011

Correspondence to: Yong-Zhe Li, Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, PUMC & CAMS, Beijing 100730, China. yongzhelipumch@yahoo.com.cn

Received: 2006-01-11 Accepted: 2006-02-21

Abstract

AIM: To clone and express immunodominant epitope of human autoantigen cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) in *Saccharomyces Cerevisiae*, and establish a new assay for detecting autoantibody LKM-1.

METHODS: We obtained CYP2D6 DNA fragment by polymerase chain reaction (PCR), using total liver cDNA library as the template. The PCR products were recombined into pEGH expression vector to construct the high efficiency recombinant expression vector in *Saccharomyces Cerevisiae* Y258. The positive clones were identified by PCR and induced by galactose.

Glutathione-Sepharose 4B was used for purification of recombinant CYP2D6 protein. The expression products were analyzed by SDS-PAGE and Western blot as well as by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS).

RESULTS: The PCR product was about 290 bp in size, which was in accordance with the predicted 285 bp. The pEGH-CYP2D6 positive clone produced a $M_{37\ 000}$ fusion protein, which was confirmed to have natural immunogenicity of human autoantigen CYP2D6 by SDS-PAGE and Western blot, and MALDI-TOF-MS showed that it also had high similarity with CYP2D6 protein.

CONCLUSION: The immunodominant epitope of human autoantigen CYP2D6 is successfully cloned and expressed in *Saccharomyces Cerevisiae*, which lays a foundation for a new method of autoantibody detection in autoimmune hepatitis.

Key Words: Autoantigen; Gene fusion; Cytochrome P450 2D6; Epitope

Wang WK, Li YZ, Liu GZ. Gene cloning and fusion expression of immunodominant epitope of human autoantigen cytochrome P450 2D6 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1357-1361

摘要

目的: 真核表达人自身抗原细胞色素P450 2D6(CYP2D6)显性表位285 bp基因片段, 获得具免疫学活性的纯化重组蛋白, 为自身免疫性肝炎抗体的检测提供特异性抗原。

方法: 以肝脏的cDNA混合文库为模板作PCR, 将PCR产物与真核表达载体pEGH共同转化酿酒酵母Y258, 碱裂解法进行质粒制备, PCR扩增鉴定。表达载体构建成功后, 在半乳糖的诱导下表达产生重组融合蛋白, 利用GST亲和层析法进行纯化。然后对其产物进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和蛋白质印迹法(WB)及蛋白质质谱学(MALDI-TOF)检测。

■背景资料

AIH是一类以自身免疫反应为基础, 以高丙种球蛋白血症、高血清自身抗体为特征的肝脏炎症性疾病。抗1型肝肾微粒体(LKM-1)抗体是2型AIH的标志自身抗体, 对其疾病的诊断具有重要价值。

■研究前沿

目前研究重点是生产出合适的、具有抗原活性的CYP2D6蛋白抗原,以开发出自身抗体检测诊断试剂盒。

结果: PCR产物约290 bp,与预期285 bp接近。pEGH-CYP2D6重组阳性克隆PCR鉴定与预期大小接近, SDS-PAGE和WB结果显示,融合蛋白 M_r 37 000,具有天然人自身抗原CYP2D6的免疫原性。质谱蛋白肽指纹数据通过Mascot在人类蛋白质数据库中分析比对,与CYP2D6蛋白同源性最高。

结论: 成功克隆表达人自身抗原CYP2D6的显性表位,为建立新的自身免疫性肝炎抗体检测方法奠定了基础。

关键词: 自身抗原; 融合基因; 细胞色素P450 2D6; 显性表位

王文凯, 李永哲, 刘国振. 人自身抗原CYP2D6 285 bp基因片段克隆、真核表达及免疫性鉴定. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1357-1361

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1357.asp>

0 引言

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是一种病因不明的肝脏坏死性炎症性病变^[1-2],以女性多见。临床上以高丙种球蛋白血症,血清中可检测出多种自身抗体、病理表现为肝脏汇管区碎屑样坏死、免疫抑制治疗有效为特征^[3-5]。AIH的发生与HLA DR3、HLA DR4相关,其病因、发病机制至今尚不清楚。血清自身抗体是AIH的重要特征之一,也是AIH诊断和分型的必备条件。AIH被分为二种主要的类型: 1型AIH和2型AIH^[6-8]。1型AIH的特点是血清中的自身抗体主要为抗平滑肌抗体(SMA)和/或抗核抗体(ANA)。抗中性粒细胞胞质抗体(ANCA)、抗去唾液酸糖蛋白受体(ASGP-R)抗体、抗可溶性肝抗原或肝-胰(SLA/LP)抗体对ANA/SMA均为阴性的AIH的诊断很有帮助。2型AIH的特点是血清中的自身抗体主要为抗1型肝肾微粒体(LKM-1)抗体和/或抗肝细胞溶质蛋白(LC1)抗体。2型AIH患者血清中的抗LKM-1抗体的主要靶抗原已被鉴定为CYP2D6。已证实的CYP2D6在肝细胞膜上的表达提示抗LKM-1抗体的肝脏损伤的致病作用^[9-11]。CYP2D6抗原决定簇的氨基酸序列是D-P-A-Q-P-P-R-D^[12]。我们采用分子生物学方法,于国内首次成功地用真核细胞表达了一个含有上述8个氨基酸的核心序列的免疫显性表位,旨在为抗CYP2D6抗体的检测提供特异性抗原,为AIH特异性临床诊断提供有效

工具。

1 材料和方法

1.1 材料 pEGH为真核表达载体,用于PCR产物的克隆,带有gal1-10操纵子,半乳糖诱导宿主菌Y258的GST的表达,从而表达外源基因; pEGH表达的带有GST的融合蛋白,可以特异地与Immobilized Glutathione(固相化谷胱甘肽,即Glutathione-Sepharose 4B)的介质(beads)亲和从而达到分离的目的。pEGH质粒由北京华大基因公司提供。酵母Y258用于感受态细胞的制备及质粒的转化,同时也用于蛋白质的表达,该菌株用于高效表达克隆于含有gal1-10启动子的pEGH表达载体的基因。酵母Y258由北京华大基因公司提供。限制性内切酶(*Xba*I、*Hind*III)购自NEB公司; Taq酶购自TaKaRa公司; 1 kb DNA ladder M_r 标准品和低 M_r 蛋白标准品购自北京天为时代科技有限公司; 预混合蛋白标准购自纽英伦生物技术(北京)有限公司; 引物由北京华大基因公司合成; ImmulisaTM抗LKM-1抗体检测试剂盒为美国IMMCO公司产品; CYP2D6标准血清由德国欧蒙医学试验诊断股份公司惠赠; 辣根过氧化物酶标记兔抗人IgG为Sigma公司产品; 酵母提取物、蛋白胨购自英国Oxoid公司; 棉子糖、半乳糖、丙稀酰胺、N-N亚甲基丙烯酰胺购自美国Sigma公司; Glutathione-Sepharose 4B购自美国Amersham公司; 还原性谷胱甘肽购自北京经科宏达公司; 其余常规化学试剂均为分析纯。PTC-100TM Programmable Thermal Controler (MJ Research, Inc), Centrifuge 5810R (Eppendorf公司), SORVALL fresco(索福/贺利公司), DYY-1118型稳压稳流电泳仪(北京六一仪器厂), 752一紫外光栅分光光度计(上海分析仪器厂), Trans Blot SD半干电转印仪(美国Bio-Rad公司)。根据美国NCBI基因库中核酸数据库的CYP2D6基因序列和借助计算机辅助分析,分别在CYP2D6的免疫显性表位(编码CYP2D6蛋白质的第257-351之间氨基酸)的两侧自行设计引物,上游引物: 5' *gcacccatcaccatcaccgtggtggtgagcacagg atgacctggg* 3', 下游引物: 5' *aggcagatcgtcagtcagtcagatagaagcctggtcaccatctctg* 3'(带下划线的斜体为通用引物,用于在酿酒酵母细胞内基因片段与载体的同源重组)。

1.2 方法 PCR条件: 94℃预变性4 min, 94℃30 s, 58℃30 s, 72℃2 min, 35个循环, 72℃延伸10 min。PCR结束后,离心片刻。然后取PCR产

物5 μL 进行10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测. 用乙醇沉淀法纯化PCR产物和被 $Xba\text{I}$ 、 $Hind\text{III}$ 双酶切的pEGH载体共同转化感受态酿酒酵母Y258, 酵母Y258有损伤修复体系, 无需连接酶, 在酵母细胞内线性目的基因与线性载体可自动环化连接, 进行同源重组. 酵母Y258感受态的制备采用醋酸锂方法. 转化阳性克隆30 $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h, 可在营养缺陷型SC-Ura-/glucose固体培养基上得到直径1-2 mm的单克隆菌落. 参照《分子克隆实验指南(第3版)》的方法, 对阳性菌落提质粒进行质粒PCR验证. 从质粒PCR验证正确的克隆的保菌液中取菌在Yeast平板划线培养48 h, 得到2 mm左右的单克隆菌落. 挑2 mm左右的单克隆菌落加到SC-ura/raffinose液体培养基, 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养至 $A_{600\text{nm}} = 0.6-0.8$ 后, 加入半乳糖至终浓度为2 g/L, 30 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜. 收集菌液应用Glutathione-Sepharose 4B进行亲和纯化. 取2 \times loading buffer 5 μL 和蛋白样品15 μL , 用PCR仪100 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 min, 然后行SDS-PAGE电泳, 考马斯亮蓝R250染色. 蛋白质印迹法(WB)检测: 利用半干电转移仪将SDS-PAGE凝胶上的蛋白质转移至硝酸纤维素膜上, 50 g/L脱脂奶粉为封闭试剂, 一抗为自身免疫抗原的标准血清, 二抗为辣根过氧化物酶标记兔抗人IgG, 在DAB、 H_2O_2 下显色. 目的蛋白条带的鉴定: 采用胶内酶切, MALDI-TOF-MS测定PMF, Mascot数据库搜索鉴定. ELISA检测: 用包被液1:100稀释重组蛋白, 包被酶标板, 经封闭后分别加入待检血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, 洗3次后加入二抗, 再孵育及洗涤后, 加A和B显色液各一滴, 37 $^{\circ}\text{C}$ 显色15 min后, 加终止液终止反应, 酶标仪630 nm处测其A值.

统计学处理 用SPSS 11.0统计分析软件分析, 组间率的比较用 χ^2 检验.

2 结果

CYP2D6的免疫显性表位基因扩增产物经电泳分析显示, 有1条约290 bp扩增条带, 其大小与预期285 bp相符(图1). 通过PCR方法从人类肝脏cDNA文库中扩增出CYP2D6相应的目的基因片段, 与真核表达载体pEGH一同通过化学方法转入酵母细胞Y258进行同源重组, 利用pEGH的Ura的合成基因, 进行阳性克隆的筛选, 经过30 $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h, 得到直径1-2 mm的单克隆菌落, 如图2. 经过30 $^{\circ}\text{C}$ 培养转化重组体48 h, 在平板上出现几十个白色小菌落, 可能是阳性克

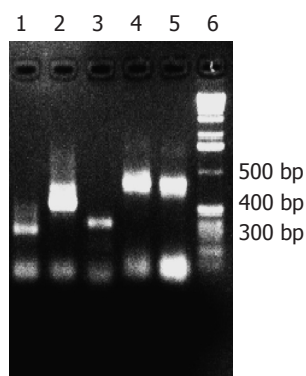


图1 CYP2D6基因目的片段PCR扩增产物电泳图. 1: 目的基因片段; 2-5: 其他基因片段; 6: 1 kb DNA ladder (100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 1600 bp).

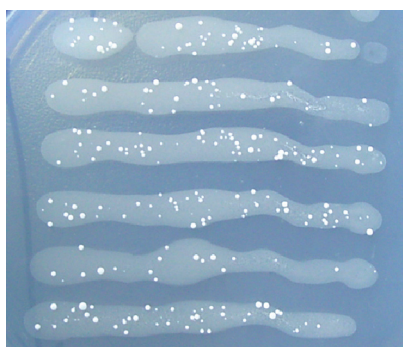


图2 转化阳性克隆的菌落照片. 白色菌落: 转化阳性克隆经过30 $^{\circ}\text{C}$ 培养48 h, 得到直径1-2 mm的单克隆菌落.

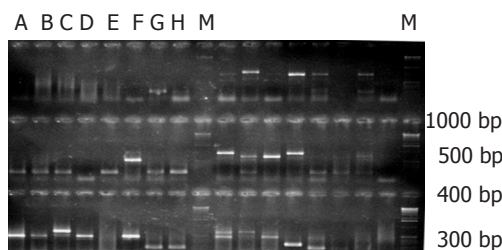


图3 pEGH-CYP2D6重组质粒PCR电泳图. A-H: 质粒PCR扩增产物; C: 目的基因片段与载体pEGH重组正确的PCR扩增产物; M: 1 kb DNA ladder (100, 200, 300, 400, 500, 1000, 1500, 1600 bp).

隆, 尚需进一步鉴定. 从这些克隆中提取质粒后进行质粒PCR验证. 阳性克隆能扩增出目的基因片段, 而阴性对照pEGH质粒则扩增不出目的片段. 质粒PCR产物经10 g/L琼脂糖凝胶电泳, 可见符合预期长度的目的基因. 目的基因片段与载体pEGH正确连接的克隆质粒PCR可得到485 bp(因质粒PCR使用的是针对载体的通用引物, 故多出200 bp)的片段(图3). 融合蛋白SDS-PAGE分析: 100 g/L SDS-PAGE显示, 酿酒酵母Y258感受态细胞经转化目的基因与载体pEGH

■创新盘点

本文是在总结和应用国内外相关研究的基础上, 将CYP2D6蛋白的优势片段首次采用酿酒酵母Y258用真核表达方法生产出特异、具抗原活性的重组抗原, 为自身免疫性肝炎的诊断提供物质基础.

■应用要点

通过研究表明, CYP2D6优势片段的重组蛋白具有良好的抗原性、特异性, 可以作为抗1型肝肾微粒体(LKM-1)抗体检测的底物。

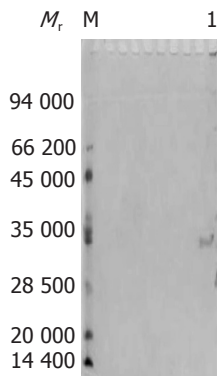


图4 GST-CYP2D6显性表位融合蛋白的SDS-PAGE.

M: 蛋白质 M_r 标准 (14 400, 20 000, 28 500, 35 000, 45 000, 66 200, 94 000); 1: 目的基因片段与GST(M_r 26 800)基因融合表达的纯化后蛋白质(M_r 37 300), 目的蛋白 M_r 大小为10 500, 融合蛋白 M_r 大小为37 300.

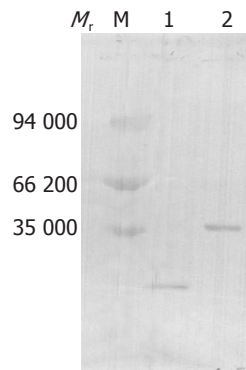


图5 融合蛋白的WB.

1: 含pEGH空载体的酿酒酵母Y258菌液半乳糖诱导纯化; 2: 含pEGH-CYP2D6重组质粒的酿酒酵母Y258菌液半乳糖诱导纯化后, 在相应37 000出现单一条带; M: 蛋白质标准带.

后, 经30℃培养和半乳糖的诱导及Glutathione-Sepharose 4B的纯化, 得到只有一条带的 M_r 约为37 000的融合蛋白(图4). 用蛋白质印迹法对融合蛋白进行分析, 结果显示pEGH-CYP2D6重组质粒诱导表达了一条 M_r 约37 000的仅能被抗CYP2D6标准血清识别的特异性蛋白条带(图5). MALDI-TOF质谱蛋白质鉴定结果: 蛋白质酶解纯化样品加入 α -氰-4-羟基肉桂酸基质作用, 点样于质谱上样板, 用MALDI-TOF质谱仪(北京华大基因公司)分析采集蛋白质肽指纹图数据. 质谱蛋白肽指纹数据通过Mascot在人类蛋白质数据库中分析比对. 分析比对结果为蛋白条带经质谱鉴定为CYP2D6蛋白. ELISA检测结果: 应用重组CYP2D6的免疫显性表位序列分别对抗LKM-1抗体阳性的2型AIH患者和对照组血清进行ELISA检测, 26个抗LKM-1抗体阳性血清中25个血清识别了目的蛋白, 而健康人对照组无一例阳性. 抗LKM-1抗体阳性的2型AIH组抗LKM-1抗体阳性率与正常对照组比较, 差异具有统计学意义($P < 0.05$).

3 讨论

在临床实践中, 由于大部分AIH患者对抗炎和免疫抑制治疗反应良好, 故识别、鉴定AIH是极为重要的. 此外, 有关骨髓造血干细胞和骨髓间质细胞的最新研究可能为AIH患者提供替代治疗方法^[13]. 抗LKM-1抗体是2型AIH标记抗体^[5,14]. 2型AIH患者血清中的抗LKM-1抗体的主要靶抗原已被鉴定为CYP2D6. 最近证实的CYP2D6在肝细胞膜上的表达提示抗LKM-1抗体具有肝脏损伤的致病作用. CYP2D6的抗原表位定位研究已发现至少4个不同的线性表位^[12,15]. CYP2D6最具免疫显性的表位是257-269和321-351号氨基酸, 他们在2型AIH患者中大约分别呈70%和50%的阳性率^[12,15]. 由373-389和410-429号氨基

酸组成的两个不常见的表位也在一些患者中被抗LKM-1抗体识别^[15]. 近来, Klein *et al*^[16]和Kerker *et al*^[17]报道了CYP2D6另一个免疫显性表位(193-212号氨基酸), 他们报道的在2型AIH患者中阳性率分别为70%和93%. 2005年Imaoka *et al*^[18]报道了CYP2D6的一个新的表位(1-146号氨基酸), 为空间构象依赖性的表位.

目前临床检测抗LKM-1抗体的方法主要是间接免疫荧光法(IIF)和酶联免疫吸附法(ELISA)^[19-26]. 在应用IIF方法中, 对IIF着染的鉴定有一定的主观性, 因对结果的解释可能在不同工作日之间、不同观察者之间、新老组织切片之间而有所不同. 随着抗LKM-1抗体的特异性抗原逐渐被发现及纯化, 抗原特异性ELISA检测方法得到了迅速推广. 目前的ELISA法用于包被的抗原是原核表达CYP2D6. 原核表达的CYP2D6蛋白缺乏天然蛋白的糖基化修饰, 也没有翻译后的加工, 所以可能影响活性, 原核表达的蛋白主要在包涵体中, 纯化和复性没有很好的解决方法, 所以我们构建了CYP2D6免疫显性表位的酿酒酵母的真核表达系统. 我们以人肝cDNA混合文库为模板, 用特异引物克隆出相应的目的基因, 经分离纯化及与载体pEGH共转化酵母Y258, 构建了表达性质粒pEGH/CYP2D6, 并在真核细胞中得到表达, 最后经SDS-PAGE电泳和WB鉴定, 结果表明该重组融合蛋白 M_r 约为37 000(他是由26 000的GST和11 000的CYP2D6部分组成), 具有天然人自身抗原CYP2D6的免疫原性. 能为部分自身免疫性肝炎患者血清所特异识别, 为建立新的自身免疫性肝炎抗体检测方法奠定了基础.

4 参考文献

- 1 Berdal JE, Ebbesen J, Rydning A. Incidence and prevalence of autoimmune liver diseases. *Tidsskr Nor Lægeforen* 1998; 118: 4517-4519
- 2 Boberg KM, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud

- N, Stiris M, Bell H. Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33: 99-103
- 3 Manns MP, Strassburg CP. Autoimmune hepatitis: clinical challenges. *Gastroenterology* 2001; 120: 1502-1517
- 4 Czaja AJ. Drug therapy in the management of type 1 autoimmune hepatitis. *Drugs* 1999; 57: 49-68
- 5 Obermayer-Straub P, Strassburg CP, Manns MP. Autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 2000; 32: 181-197
- 6 Mizutani T, Shinoda M, Tanaka Y, Kuno T, Hattori A, Usui T, Kuno N, Osaka T. Autoantibodies against CYP2D6 and other drug-metabolizing enzymes in autoimmune hepatitis type 2. *Drug Metab Rev* 2005; 37: 235-252
- 7 Ballot E, Homberg JC, Johanet C. Antibodies to soluble liver antigen: an additional marker in type 1 auto-immune hepatitis. *J Hepatol* 2000; 33: 208-215
- 8 Zachou K, Rigopoulou E, Dalekos GN. Autoantibodies and autoantigens in autoimmune hepatitis: important tools in clinical practice and to study pathogenesis of the disease. *J Autoimmune Dis* 2004; 1: 2
- 9 Dalekos GN, Wedemeyer H, Obermayer-Straub P, Kayser A, Barut A, Frank H, Manns MP. Epitope mapping of cytochrome P4502D6 autoantigen in patients with chronic hepatitis C during alpha-interferon treatment. *J Hepatol* 1999; 30: 366-375
- 10 Loeper J, Louerat-Oriou B, Duport C, Pompon D. Yeast expressed cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) exposed on the external face of plasma membrane is functionally competent. *Mol Pharmacol* 1998; 54: 8-13
- 11 Muratori L, Parola M, Ripalti A, Robino G, Muratori P, Bellomo G, Carini R, Lenzi M, Landini MP, Albano E, Bianchi FB. Liver/kidney microsomal antibody type 1 targets CYP2D6 on hepatocyte plasma membrane. *Gut* 2000; 46: 553-561
- 12 Manns MP, Griffin KJ, Sullivan KF, Johnson EF. LKM-1 autoantibodies recognize a short linear sequence in P450IID6, a cytochrome P-450 monooxygenase. *J Clin Invest* 1991; 88: 1370-1378
- 13 Kyriakou DS, Alexandrakis MG, Zachou K, Passam F, Stathakis NE, Dalekos GN. Hemopoietic progenitor cells and bone marrow stromal cells in patients with autoimmune hepatitis type 1 and primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2003; 39: 679-685
- 14 Czaja AJ, Homburger HA. Autoantibodies in liver disease. *Gastroenterology* 2001; 120: 239-249
- 15 Yamamoto AM, Cresteil D, Boniface O, Clerc FF, Alvarez F. Identification and analysis of cytochrome P450IID6 antigenic sites recognized by anti-liver-kidney microsome type-1 antibodies (LKM1). *Eur J Immunol* 1993; 23: 1105-1111
- 16 Klein R, Zanger UM, Berg T, Hopf U, Berg PA. Overlapping but distinct specificities of anti-liver-kidney microsome antibodies in autoimmune hepatitis type II and hepatitis C revealed by recombinant native CYP2D6 and novel peptide epitopes. *Clin Exp Immunol* 1999; 118: 290-297
- 17 Kerkar N, Choudhuri K, Ma Y, Mahmoud A, Bogdanos DP, Muratori L, Bianchi F, Williams R, Mieli-Vergani G, Vergani D. Cytochrome P4502D6(193-212): a new immunodominant epitope and target of virus/self cross-reactivity in liver kidney microsomal autoantibody type 1-positive liver disease. *J Immunol* 2003; 170: 1481-1489
- 18 Imaoka S, Obata N, Hiroi T, Osada-Oka M, Hara R, Nishiguchi S, Funae Y. A new epitope of CYP2D6 recognized by liver kidney microsomal autoantibody from japanese patients with autoimmune hepatitis. *Biol Pharm Bull* 2005; 28: 2240-2243
- 19 Bakker-Jonges LE, ter Borg PC, van Buuren HR, Hooijkaas H. A retrospective study on the role of antibodies against soluble liver antigen (anti-SLA antibodies) and other autoantibodies in the diagnostics of autoimmune hepatitis. *Ned Tijdschr Geneesk* 2006; 150: 490-494
- 20 Guidi M, Muratori P, Granito A, Muratori L, Pappas G, Bianchi FB. Significance of non-organ-specific autoantibodies in HCV-related chronic hepatitis. *Recenti Prog Med* 2005; 96: 589-593
- 21 Monti V, Aghemo A, Rumi MG, Donato MF, Del Ninno E, Colombo M. The prevalence, clinical features and response to antiviral therapy of patients with chronic hepatitis C who are seropositive for liver-kidney microsome type 1 antibodies. *Antivir Ther* 2005; 10: 715-720
- 22 Diamantis I, Boumpas DT. Autoimmune hepatitis: evolving concepts. *Autoimmun Rev* 2004; 3: 207-214
- 23 Dalekos GN, Obermayer-Straub P, Bartels M, Maeda T, Kayser A, Braun S, Loges S, Schmidt E, Gershwin ME, Manns MP. Cytochrome P450 2A6: a new hepatic autoantigen in patients with chronic hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 2003; 39: 800-806
- 24 Dalekos GN, Zachou K, Liaskos C, Gatselis N. Autoantibodies and defined target autoantigens in autoimmune hepatitis: an overview. *Eur J Intern Med* 2002; 13: 293-303
- 25 Kitazawa E, Igarashi T, Kawaguchi N, Matsushima H, Kawashima Y, Hankins RW, Miyakawa H. Differences in anti-LKM-1 autoantibody immunoreactivity to CYP2D6 antigenic sites between hepatitis C virus-negative and -positive patients. *J Autoimmun* 2001; 17: 243-249
- 26 Miyakawa H, Kitazawa E, Kikuchi K, Fujikawa H, Kawaguchi N, Abe K, Matsushita M, Matsushima H, Igarashi T, Hankins RW, Kako M. Immunoreactivity to various human cytochrome P450 proteins of sera from patients with autoimmune hepatitis, chronic hepatitis B, and chronic hepatitis C. *Autoimmunity* 2000; 33: 23-32

电编 张敏 编辑 潘伯荣

rAAV-AFP转染人外周血单核细胞来源树突状细胞增强免疫刺激功能

梁政, 罗荣城, 尤长宣, 郑航

■背景资料

DC细胞是一类极强的MHC携带细胞, 是体内最强的抗原呈递细胞, 在抗肿瘤免疫方面发挥重要作用, 重组腺相关病毒近来被认为是具有前景的DC治疗抗原载体。

梁政, 罗荣城, 尤长宣, 郑航, 南方医科大学南方医院肿瘤中心 广东省广州市 510515

梁政, 2005年南方医科大学硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤生物治疗的研究。

广东省自然科学基金资助项目, No. 037050

通讯作者: 罗荣城, 510515, 广东省广州市, 南方医科大学南方医院肿瘤中心. center@nfhcc.com

电话: 020-87640966

收稿日期: 2006-03-18 接受日期: 2006-04-12

Infection of rAAV-AFP enhances immunostimulatory effect of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells

Zheng Liang, Rong-Cheng Luo, Chang-Xuan You, Hang Zheng

Zheng Liang, Rong-Cheng Luo, Chang-Xuan You, Hang Zheng, Cancer Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province, No. 037050

Correspondence to: Professor Rong-Cheng Luo, Cancer Center, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. center@nfhcc.com

Received: 2006-03-18 Accepted: 2006-04-12

Abstract

AIM: To study the immunostimulatory effect of rAAV-AFP (recombinant adeno-associated virus expressing α -fetoprotein antigen) transfection on dendritic cells (DCs) derived from human peripheral blood monocytes.

METHODS: Newly isolated dendritic cells were infected with rAAV-AFP. The percentage of viable DCs was observed by trypan blue exclusion every 24 h. After transfection, the alterations of surface markers on mature DCs, including CD80, CD86, CD83, CD40, CD1a, HLA-DR and α -fetoprotein (AFP), were detected by flow cytometry. Meanwhile, ^3H -thymidine incorporation method was used to measure the capacity of T-cell proliferation before and after transfection.

The specific killing activity of T cells was evaluated by MTT assay.

RESULTS: About 77.7% mature DCs expressed AFP protein. The viable DCs percentages and surface marker expression showed no significant changes after transfection ($P > 0.05$). Transfected DCs still had strong potential of stimulating the proliferation of T lymphatic cells, and there was no significant difference between transfected and non-transfected group ($P > 0.05$). Transfected DCs were capable of inducing specific killing effect on the target cells, and the activity was significantly higher than those in the non-transfected cells when the DCs and T cells were mixed at the ratios of 80:1, 40:1, and 20:1 (35.5 ± 5.5 vs 20.6 ± 4.7 ; 28.7 ± 3.6 vs 15.3 ± 2.5 ; 16.2 ± 2.8 vs 9.6 ± 1.8 ; all $P < 0.01$).

CONCLUSION: AFP gene, which is carried by recombinant adeno-associated virus, can be transferred into DCs with high efficiency. The function of mature DCs is not affected significantly by AFP transfection.

Key Words: Recombinant adeno-associated virus; Alpha fetoprotein; Dendritic cells; Gene transfection; Hepatocellular carcinoma

Liang Z, Luo RC, You CX, Zheng H. Infection of rAAV-AFP enhances immunostimulatory effect of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1362-1366

摘要

目的: 探讨表达甲胎蛋白抗原的重组腺相关病毒rAAV-AFP转染对人外周血单核细胞来源树突状细胞(DC)免疫刺激功能的影响。

方法: 用rAAV-AFP转染新分离的DC; 苔盼蓝拒染法检测每天的活细胞比率; 流式细胞仪检测DC表面分子CD80, CD86, CD83, CD40, CD1a, HLA-DR及AFP的表达; 并用 ^3H -TdR掺入法检测转染前后DC刺激自体淋巴细胞增殖能力; MTT法检测DC诱导T细胞的杀伤活性。

结果: 成熟DC 77.7%表达AFP蛋白; 转染对活细胞百分率和成熟DC表型无影响, 与未转染组无显著差异($P>0.05$); 转染后DC仍保持较强的刺激自体淋巴细胞增殖的能力, 与未转染组也无显著性差异($P>0.05$), 并且可诱导出特异性杀伤, 效应细胞和靶细胞为80:1, 40:1, 20:1时, 与未转染组相比均有显著差异(35.5 ± 5.5 vs 20.6 ± 4.7 ; 28.7 ± 3.6 vs 15.3 ± 2.5 ; 16.2 ± 2.8 vs 9.6 ± 1.8 ; 均 $P<0.01$).

结论: rAAV可负载AFP基因在DC中表达, rAAV-AFP转染DC对其功能无明显影响, 免疫功能更强.

关键词: 重组腺相关病毒; 甲胎蛋白; 树突状细胞; 基因转染; 肝细胞癌

梁政, 罗荣斌, 尤长宣, 郑航. rAAV-AFP转染人外周血单核细胞来源树突状细胞增强免疫刺激功能. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1362-1366

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1362.asp>

0 引言

肝细胞癌(HCC)作为一种常见的恶性肿瘤每年夺走超过100万人的生命. 近年来随着分子生物学及免疫学理论技术迅猛发展, 生物治疗模式以其低风险及应用的普遍性越发受到重视, 树突状细胞(DC)因处于免疫应答核心地位而成为热点. 甲胎蛋白(AFP)是由胚胎卵黄囊和胎肝合成, 出生后血中AFP水平迅速下降, 至成年时几乎难以检测, 在2/3的HCC患者的血清中有升高. 已有文献报道, AFP在体内能抑制宿主免疫系统^[1], 通过对肿瘤坏死因子(TNF)家族及其受体系统的调节, 在逃避免疫监视中也发挥作用^[2], 间接促进肿瘤的生长; 此外, 体外实验还证实, AFP直接促进部分肿瘤细胞的生长^[3-4]. 重组腺相关病毒(rAAV)近来被认为是最有前景的DC治疗抗原载体. 我们采用rAAV-AFP转染DC, 为优化基因转染DC治疗HCC提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料 AIM-V培养液、RPMI 1640培养液和T细胞尼龙毛柱购自Invitrogen公司; 重组人白介素-2(rhIL-2)购自北京瑞得合通公司; 重组人粒细胞巨嗜细胞集落刺激因子(rhGM-CSF)购自罗氏公司; 重组人白介素-4(rhIL-4)购自Promega公司; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)购自解放军军事医学科学院; 人AB血清购自广州血站; PE/FITC标记的鼠抗人CD80, CD86, CD83,

CD40, CD1a, HLA-DR, IgG1购自深圳晶美公司; FITC标记的鼠抗人AFP由美国Liu Yong教授惠赠; ^3H -TdR购自中国科学院上海原子核研究所; Ficoll (1077 g/L)淋巴细胞分离液购自天津市灏洋公司; 丝裂霉素C购自日本Kyowa Hakko公司; Bel-7402细胞株由本中心保存; 流式细胞仪源于美国Becton Dickinson FACSCalibur; 液闪计数器为美国Backman公司产品; 病毒rAAV-AFP由美国阿肯色大学医学院基因治疗中心提供, 病毒滴度(拷贝数)为 1×10^{13} 个病毒颗粒/L. DC的诱导采取已建立的方法^[5]并做部分改进, 简述如下: 取健康志愿者外周血常规分离获得单个核细胞以AIM-V无血清培养液悬浮后, 加入6孔板(每孔2.5 mL), 在37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中温浴4 h, 分别获得贴壁与非贴壁细胞, 贴壁细胞每孔加入rhGM-CSF, 终浓度为 8×10^5 U/L, AIM-V无血清培养液2.5 mL, 随后加入终浓度为 1×10^{11} 个病毒颗粒/L的rAAV-AFP为rAAV-AFP-DC组, 并另设一组不加rAAV-AFP组为N-rAAV-AFP-DC组, 12 h后洗去载体病毒, 加入同上的完全培养液, 培养3 d半量换液, 加入IL-4, 终浓度 1×10^6 U/L, 第5天全量换液, 第6天加入TNF- α , 终浓度20 $\mu\text{g/L}$, 7 d DC细胞成熟.

1.2 方法

1.2.1 rAAV-AFP对DC生长的作用 收集培养过程中的DC, 以倒置显微镜观察, 每天均以苔盼蓝拒染法计数总的细胞数与活细胞数, 计算出活DC比率.

1.2.2 流式细胞仪分析成熟DC的表型 收集培养7 d的DC, 计数, 细胞悬液浓度应 $\geq 10^5$, 分别取细胞悬液500 μL 加入各测定管中, 用PE或FITC标记的抗体4℃孵育40 min, PBS洗2次, 送流式细胞仪上检测rAAV-AFP感染DC前体的效率及CD80, CD86, CD83, CD40, CD1a, HLA-DR的表达.

1.2.3 混合淋巴细胞反应(MLR) 取上述外周血分离非贴壁细胞置培养瓶中, 用含终浓度 2×10^5 U/L的rhIL-2, 100 mL/L人AB血清的RPMI 1640培养液于37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养. 待DC成熟后, 将非贴壁细胞加在37℃预温的尼龙毛上, 37℃, 50 mL/L CO₂孵育30 min后, 经预温的RPMI 1640轻轻洗出细胞, 所获细胞作为T细胞备用. 分别取培养7 d的rAAV-AFP-DC组以及培养同样长时间N-rAAV-AFP-DC组用25 mg/L的丝裂霉素C在37℃孵育45 min, PBS液洗3次, 用AIM-V培养基悬浮. 分别以 2×10^4 /孔、1

■ 研发前沿

基因疫苗因其明确的靶向性, 稳定的产量估计会成为DC疫苗发展的方向, 利用病毒载体介导基因转移, 以其高效和良好的靶向性已成为基因治疗中应用最广泛的方法.

■创新盘点

目前以AFP作为肝癌基因治疗和免疫治疗靶点的DC疫苗中,国内尚无使用腺相关病毒载体的报道。

表 1 DC表型的FACS分析 (% , mean \pm SD, $n = 5$)

DC	CD83	CD86	CD80	CD40	CD1a	HLA-DR
rAAV-AFP-DC	6.90 \pm 2.90	87.72 \pm 6.00	6.97 \pm 2.65	37.21 \pm 9.60	41.22 \pm 6.50	89.02 \pm 8.04
N-rAAV-AFP-DC	7.65 \pm 3.21	90.75 \pm 3.51	7.29 \pm 2.03	40.12 \pm 6.86	43.06 \pm 10.97	88.88 \pm 6.29

$\times 10^4$ /孔、 5×10^3 /孔和 2.5×10^3 /孔,将DC加入96孔板中,每组各3个复孔,每孔再加入自体T细胞 1×10^5 细胞/孔,终体积为200 μ L, 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂培养96 h. 终止培养前18 h加入³H-TdR, 终浓度为37 MBq/L, 同时设淋巴细胞对照组及本底组. 收集细胞, 液闪计数器检测dpm值, 并计算刺激指数SI, $SI = (\text{实验组dpm值} - \text{本底组dpm值}) / (\text{对照组dpm值} - \text{本底组dpm值})$, 结果用3孔均值表示。

1.2.4 CTL杀伤效应的测定 AFP高表达的Bel-7402细胞株为靶细胞, 将自体T淋巴细胞分两组, 按20:1分别加入25 mg/L的丝裂霉素C处理后的两组DC混合培养4 d作为效应细胞, 然后将靶细胞分别接种在96孔培养板(均为 1×10^4 个/孔), 效应细胞和靶细胞按80:1, 40:1, 20:1, 10:1分别与两组效应细胞混合, 每个比例5复孔. 37 $^{\circ}$ C, 50 mL/L CO₂培养箱中温浴12 h后加入终浓度为0.5 mg/L MTT, 继续孵育6 h, 每孔加盐酸化异丙醇100 μ L, 静置5 min后酶标仪测570 nm波长的A值. 杀伤率% = $[1 - \text{实验孔A值} / (\text{T细胞A值} + \text{靶细胞A值})] \times 100\%$, 取平均值。

统计学处理 采用SPSS 10.0统计软件包进行处理, 数据以mean \pm SD表示, 用 χ^2 检验、t检验判断差别的显著性。

2 结果

2.1 DC的形态学观察和计数 倒置显微镜下, rAAV-AFP-DC组仍保持典型DC生长过程的变化, 培养初可见多数圆形贴壁细胞, 培养3 d后观察到细胞表面伸出毛刺样突起, 细胞数目明显增多, 体积增大, 呈集落样生长, 培养7 d后, 集落分散, 细胞悬浮生长, 分布较均匀, 可见典型的树枝状突起, 并与N-rAAV-AFP-DC组的活细胞比率之间无显著性差异($P > 0.05$, 图1)。

2.2 rAAV-AFP感染DC前体的效率 流式细胞仪分析rAAV-AFP感染DC前体细胞后, AFP阳性细胞率为77.7%, 此结果也说明AFP在DC前体细胞内表达良好。

2.3 成熟DC的表型分析 FACS分别检测两组DC表面分子的表达, 可见转染rAAV-AFP后对成熟

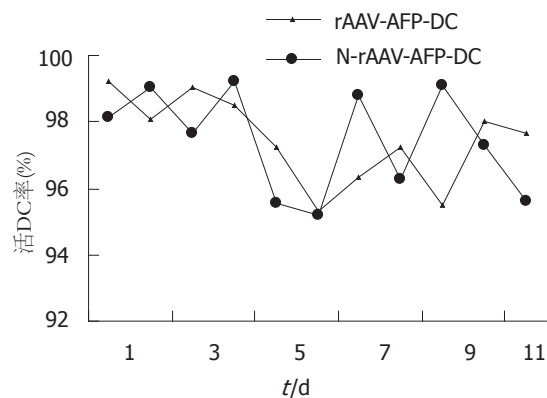


图 1 rAAV-AFP对活DC百分率的影响。

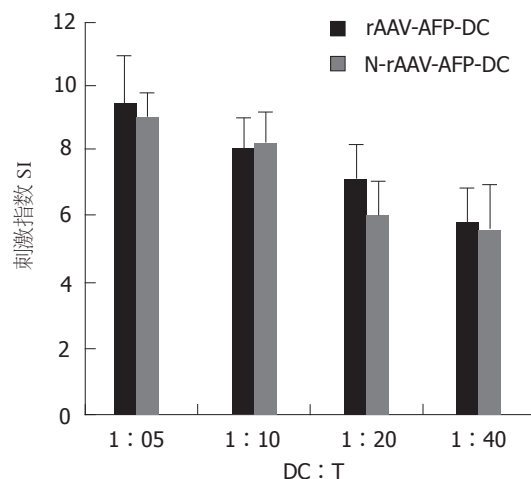


图 2 成熟DC转染rAAV-AFP体外激发自体T细胞增殖情况。

DC表型无影响($P > 0.05$, 表1)。

2.4 MLR测定 rAAV-AFP-DC组与N-rAAV-AFP-DC组之间SI值无显著性差异($P > 0.05$, 图2), 仍保持较强的刺激自体T细胞增殖的能力。

2.5 CTL活性检测 在针对Bel-7402细胞株的杀伤实验中, rAAV-AFP-DC组与N-rAAV-AFP-DC组之间在效靶比为80:1, 40:1, 20:1时CTL活性差异有显著性($P < 0.01$, 表2)。

3 讨论

树突状细胞(DC)由于处于免疫应答核心地位, 近年来受到广泛关注. 目前对肝细胞癌(HCC)肿瘤特异性抗原还不了解, 所以在如何提高DC递呈肝癌相关性抗原的效率成为亟待解决的问题。

■应用要点

本文为rAAV-AFP转染DC的进一步研究提供了可行性依据, 也为最终用于临床提供重要参考。

表 2 DC诱导的CTL活性 (% , mean \pm SD, $n = 5$)

DC	效靶比			
	80 : 1	40 : 1	20 : 1	10 : 1
rAAV-AFP-DC	35.5 \pm 5.5 ^b	28.7 \pm 3.6 ^b	16.2 \pm 2.8 ^b	10.5 \pm 2.3
N-rAAV-AFP-DC	20.6 \pm 4.7	15.3 \pm 2.5	9.6 \pm 1.8	9.3 \pm 2.7

^b $P < 0.01$ vs N-rAAV-AFP-DC组.

人们对AFP与HCC之间关系作了基础和临床研究后, 认为AFP是肝癌细胞特异性表达的, 或由正在发生突变的肝细胞表达的^[6]. 由于AFP在抗肿瘤过程中的负面作用, 致使以AFP结构本身作为肝癌生物治疗靶点的设想, 一直未能付诸实施, Vollmer *et al*^[7]发现个体发育中T细胞库内对人类AFP的特异性CTL克隆并未清除, 适当条件或方法可使之激活, 所以AFP可成为HCC特异性免疫治疗的靶抗原. 利用自体肝癌细胞抗原致敏DC, 由AFP筛选出的抗原肽以及以痘苗病毒为载体负载AFP的肿瘤疫苗, 均可强有力的诱发T细胞免疫反应^[8-10]. 基因转染DC的方法因其明确的靶向性, 稳定的产量估计会成为DC疫苗发展的方向. AFP-cDNA真核表达载体转染人类和小鼠DC的研究已取得了明确的进展^[11-12]. 基因转移载体的选择上, 除了要求抗原基因能成功转移外, 还要能长期稳定表达. 相比较而言, 利用病毒载体介导编码基抗原修饰DC细胞因具有能持续表达、提供更广谱MHC限制性表位的优势而更受到青睐. 重组腺相关病毒(rAAV)载体是介导基因转移和基因治疗常用的载体系统之一, 他以其位点特异性的整合能力、自然缺陷以及无致病原性, 被认为是最有前景的DC治疗抗原载体. 此外, 在与腺病毒载体比较中, 他表现出了既无自身免疫原性^[13], 转染效率又不低于前者的优势^[14].

Liu *et al*^[15]以rAAV携带乳腺癌肿瘤抗原BA46, 在DC表面获得良好表达, 明确证实已整合到DC染色体上, 并诱导出强大而特异的CTL效应, 结果令人鼓舞. 我们将靶向性比较明确的AFP抗原基因转染体外诱导扩增的DC, 并使DC将抗原递呈给初始T细胞, 旨在了解负载AFP的rAAV转染DC后是否仍能保持原有的形态、表型和刺激自体T细胞增殖的能力. 实验结果显示, 77.7%的DC能表达AFP蛋白, 说明rAAV能够高效介导AFP抗原基因在DC中的表达. 转染后成熟的DC表面特征性分子表达率保持较高水平, 仍保持较强的刺激淋巴细胞增殖的能力, 并且

成熟DC转染前后形态无改变, 也无明显免疫抑制及自身细胞毒作用. AFP抗原基因转染的DC诱导的CTL效应显著高于对照组. 以上均提示以AFP为靶抗原, DC通过rAAV载体转染治疗AFP相关性肿瘤的可行性.

4 参考文献

- 1 Semeniuk DJ, Boismenu R, Tam J, Weissenhofer W, Murgita RA. Evidence that immunosuppression is an intrinsic property of the alpha-fetoprotein molecule. *Adv Exp Med Biol* 1995; 383: 255-269
- 2 Ozoren N, El-Deiry WS. Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 135-147
- 3 Dudich E, Semenkova L, Gorbatoeva E, Dudich I, Khromykh L, Tatulov E, Grechko G, Sukhikh G. Growth-regulative activity of human alpha-fetoprotein for different types of tumor and normal cells. *Tumour Biol* 1998; 19: 30-40
- 4 王兴旺, 胥彬. 甲胎蛋白对H-22腹水肝癌小鼠脾淋巴细胞增殖的影响. *上海免疫学杂志* 1995; 15: 327-329
- 5 Liu Y, Chiriva-Internati M, Grizzi F, Salati E, Roman JJ, Lim S, Hermonat PL. Rapid induction of cytotoxic T-cell response against cervical cancer cells by human papillomavirus type 16 E6 antigen gene delivery into human dendritic cells by an adeno-associated virus vector. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 948-957
- 6 贺平, 刘彬彬, 叶胜龙, 汤钊猷. 人肝癌、癌旁组织中AFPmRNA的差异性分析. *中国肿瘤生物治疗杂志* 1998; 5: 163-166
- 7 Vollmer CM Jr, Eilber FC, Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Koh A, Montejo LD, Lee MC, Andrews KJ, McBride WH, Glaspy JA, Economou JS. Alpha-fetoprotein-specific genetic immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1999; 59: 3064-3067
- 8 谢裕安, 罗小玲, 梁安民, 匡志鹏, 吴继宁. 肝癌细胞抗原致敏树突状细胞体外诱导特异性细胞毒T淋巴细胞. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1479-1481
- 9 Butterfield LH, Meng WS, Koh A, Vollmer CM, Ribas A, Dissette VB, Faull K, Glaspy JA, McBride WH, Economou JS. T cell responses to HLA-A*0201-restricted peptides derived from human alpha fetoprotein. *J Immunol* 2001; 166: 5300-5308
- 10 Grimm CF, Ortmann D, Mohr L, Michalak S, Krohne TU, Meckel S, Eisele S, Encke J, Blum HE, Geissler M. Mouse alpha-fetoprotein-specific DNA-based immunotherapy of hepatocellular carcinoma leads to tumor regression in mice. *Gastroenterology* 2000; 119: 1104-1112
- 11 张利旺, 张红梅, 贾军, 任军. 以AFP为靶点的肝癌树突状细胞免疫治疗的实验研究. *现代肿瘤医学* 2005;

■名词解释

重组腺相关病毒(rAAV): 一种活病毒载体, 具有稳定表达、定点整合、安全性较高, 且不表达任何病毒自身蛋白基因等优势, 是介导基因转移和基因治疗常用的载体系统之一, 他因其位点特异性的整合能力、自然缺陷以及无致病原性, 被认为是最有前景的DC治疗抗原载体.

■同行评价

本文采用rAAV-AFP(表达甲胎蛋白抗原的重组腺相关病毒)转染人外周血单核细胞来源树突状细胞(DC), 并检测转染对成熟DC表型、DC的刺激自体淋巴细胞增殖的能力以及CTL反应的影响, 有一定学术及实用价值.

- 13: 736-739
- 12 Zeng B, Lu FG, Liu XW, Yang DY, Fang WY, Wang J, Liao AJ, Shi W. Construction of eukaryotic expression vector of mouse alpha-fetoprotein cDNA and its expression in dendritic cells and in vitro antitumor effect on hepatoma. *Aizheng* 2005; 24: 1332-1337
- 13 Zaiss AK, Liu Q, Bowen GP, Wong NC, Bartlett JS, Muruve DA. Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* 2002; 76: 4580-4590
- 14 Enger PO, Thorsen F, Lonning PE, Bjerkvig R, Hoover F. Adeno-associated viral vectors penetrate human solid tumor tissue *in vivo* more effectively than adenoviral vectors. *Hum Gene Ther* 2002; 13: 1115-1125
- 15 Liu Y, Chiriva-Internati M, You C, Luo R, You H, Prasad CK, Grizzi F, Cobos E, Klimberg VS, Kay H, Mehta JL, Hermonat PL. Use and specificity of breast cancer antigen/milk protein BA46 for generating anti-self-cytotoxic T lymphocytes by recombinant adeno-associated virus-based gene loading of dendritic cells. *Cancer Gene Ther* 2005; 12: 304-312

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 •

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。

实时荧光定量PCR方法检测幼兔粪便双歧杆菌的实验研究

陈津津, 蔡威

陈津津, 蔡威, 上海交通大学医学院附属新华医院临床营养中心 上海市 200092

陈津津, 2004年上海交通大学医学院博士生, 主治医师, 主要从事胃肠道微生态的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271350

通讯作者: 蔡威, 200092, 上海市控江路1665号, 上海交通大学医学院附属新华医院临床营养中心. caiw204@yahoo.com.cn

电话: 021-65790000

收稿日期: 2006-03-10 接受日期: 2006-03-24

Real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in fecal samples from infant rabbits

Jin-Jin Chen, Wei Cai

Jin-Jin Chen, Wei Cai, Center of Clinical Nutrition, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271350

Correspondence to: Dr. Wei Cai, Center of Clinical Nutrition, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, 1665 Kongjiang Road, Shanghai 200092, China. caiw204@yahoo.com.cn

Received: 2006-03-10 Accepted: 2006-03-24

Abstract

AIM: To quantitatively detect the bifidobacteria in the fecal samples from infant rabbits by real-time quantitative polymerase chain reaction (RTQ-PCR).

METHODS: Genus-specific primer of bifidobacteria was designed for 16S rDNA-targeted PCR. The standard curve of RTQ-PCR was generated from a grade-dilution of plasmid DNA which was cloned from PCR products and spectroscopically quantified. Bacterial genome DNA in fecal samples was extracted from the bifidobacteria-fed rabbits and the controls for analysis by RTQ-PCR, respectively.

RESULTS: Bifidobacteria was positive in both groups of rabbit fecal samples. The level of bifidobacteria in the bifidobacteria-fed rabbits was significantly higher than that in the control

group (logarithm for the numbers of bifidobacteria per 0.05 g feces: 6.37 ± 0.58 vs 5.18 ± 0.98 , $P = 0.004$).

CONCLUSION: Real-time quantitative PCR can accurately quantify the bifidobacteria in fecal samples from infant rabbits.

Key Words: Real-time quantitative polymerase chain reaction; Bifidobacteria; Feces

Chen JJ, Cai W. Real-Time Quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in fecal samples from infant rabbits. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1367-1371

摘要

目的: 应用实时荧光定量PCR技术对实验幼兔粪便内双歧杆菌进行定量分析。

方法: 依据双歧杆菌16S rDNA序列设计属特异性引物, 以常规PCR产物经克隆后的质粒DNA为标准品, 经光谱定量、梯度稀释后制备标准曲线。抽提正常对照组和双歧杆菌喂饲组幼兔粪便内的细菌基因组DNA, 用实时荧光定量PCR技术定量分析样品中双歧杆菌数量。

结果: 两组幼兔粪便内双歧杆菌测定结果均成阳性, 双歧杆菌喂饲组0.05 g湿粪内菌量的对数值较对照组显著升高(6.37 ± 0.58 vs 5.18 ± 0.98 , $P = 0.004$)。

结论: 实时荧光定量PCR方法可正确定量实验兔粪便内双歧杆菌数量。

关键词: 实时荧光定量PCR; 双歧杆菌; 粪便

陈津津, 蔡威. 实时荧光定量PCR方法检测幼兔粪便双歧杆菌的实验研究. *世界华人消化杂志* 2006;14(14):1367-1371

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1367.asp>

0 引言

双歧杆菌(Bifidobacteria)作为恒温动物肠道内

■背景资料

双歧杆菌(Bifidobacterium)是最重要的益生菌之一, 对肠道内或食品中的双歧杆菌进行准确地定量分析, 对于医疗卫生和营养保健方面的研究具有重要意义。由于双歧杆菌属专性厌氧菌, 离体后迅速死亡, 传统培养计数法存在送检及培养条件苛刻, 培养存活率低, 计数不准确, 因此目前应用分子生物学技术对其进行定量分析成为该研究领域的热点。实时荧光定量PCR技术(real-time quantitative PCR, real-time Q-PCR)利用细菌基因组的核酸序列为鉴别基础, 不受上述条件的限制, 为双歧杆菌的定量检测提供了新的途径。本文首先尝试将这一技术用于实验幼兔粪便内双歧杆菌的定量分析, 为后续研究的开展和临床应用进行了有益地探索。

■同行评价

双歧杆菌由于参与构成宿主微生态系统,发挥维持微生态平衡、免疫调节、营养等多方面的生理作用,其在肠道内的总数量反应了机体肠道微生态状况和机体的健康状况。因此对肠道内或食品中的双歧杆菌进行准确地定量分析,对于医疗卫生和营养保健方面的研究具有重要意义。本文,选题明确,方法可靠,书写规范,所引用的参考文献较新。该文内容有一定的科学参考价值和可读性,对双歧杆菌的临床检测具有一定的应用价值。

重要的原籍菌群,发挥着维持微生态平衡、生物拮抗、免疫调节、营养等多方面的生理作用。对肠道内或食品中的双歧杆菌进行准确地定量分析,对于医疗卫生和营养保健方面的研究具有重要意义。由于双歧杆菌属于专性厌氧菌,其送检条件苛刻、培养难度大、存活率低,检测结果受细菌离体时间、外界环境因素和培养基性能的影响大,计数结果往往不能真实反映肠道内的菌群数量,因而长期以来难以成为临床常规检测项目。尤其在实验动物的研究中由于不能精确把握其肠道排泄时间,难以实现对含菌粪便的即排即检,使定量分析难以进行。实时荧光定量PCR技术(real-time quantitative PCR, real-time Q-PCR)利用细菌基因组的核酸序列为鉴别基础,不受上述条件的限制,为双歧杆菌的定量检测提供了新的途径。本文首先尝试将这一技术用于实验幼兔粪便内双歧杆菌的定量分析,为后续研究的开展和临床应用进行了初步的摸索。

1 材料和方法

1.1 材料 双歧杆菌冻干菌粉为青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*),乳杆菌冻干菌粉为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),来自上海交通大学生物医药研究所,大肠杆菌菌株来自本院细菌室。分别取青春双歧杆菌冻干菌粉0.05 g、植物乳杆菌冻干菌粉0.05 g、大肠杆菌菌株培养液1 mL,用Takara细菌基因组DNA小量纯化试剂盒(Takara MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit, 大连宝生物公司)抽提细菌基因组DNA,于-20℃保存。

1.2 方法

1.2.1 PCR引物对设计 参照Malinen *et al*^[1]报道依据双歧杆菌16S rDNA基因序列设计的双歧杆菌属特异性PCR扩增引物对(genium-specific primers),并在BLAST基因库(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)内比对引物序列的特异性,上下游引物序列见表1,引物对由中国科学院闪晶生物有限公司合成。

1.2.2 引物对特异性检测 取菌株基因组DNA抽提液进行常规PCR反应: 50 μL标准PCR反应体系, 10×PCR Buffer 5 μL, 25 mmol/L Mg²⁺ 3 μL, 10 mmol/L dNTPs 1 μL, 25 μmol/L上下游引物各1 μL, DNA模板1 μL, 5 U/μL Taq DNA Polymerase(Promega)0.5 μL, ddH₂O 37.5 μL。反应条件: 94℃变性3 min; 循环35次: 94℃变性40 s,

表 1 双歧杆菌16S rDNA PCR扩增引物对

引物对	序列 (5'-3')	定位	长度 (bp)
Bifido5'	GATTCTGGCTCAGGATGAACG	Im26	21
Bifido3'	CGGGTGCTT ¹ CCCACCTTTCATG	Im3	21

¹代表次黄嘌呤核苷,可与A、G、C、T任何碱基配对。

55℃退火20 s, 72℃延伸1 min 15 s; 72℃延伸5 min。所有常规PCR反应于PTC-100™ Programmable Thermal Controller(MJ Research INC.)上进行。用11 g/L的琼脂糖凝胶电泳分析PCR扩增产物,以DNA Marker DL2000(Takara)为分子量标准,在1428 bp处应显示扩增物区带。

1.2.3 外标准品制备 将双歧杆菌的PCR产物经割胶回收后作为目的DNA片段,与pGEM-T载体(Promega)连接,转化*E.coli* DH5α感受态细胞,克隆后分离质粒DNA,用紫外分光光度计在260 nm测A值,换算双歧杆菌外标准品的拷贝数为8.321 23×10¹⁶/L,用于制作标准曲线。

1.2.4 标准曲线制作 将外标准品做10倍系列稀释,使其形成10¹³-10⁸拷贝/L;按下列条件进行实时荧光定量PCR反应,反应体系20 μL: 10×PCR Buffer 2 μL, 25 mmol/L Mg²⁺ 2 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 25 mmol/L上下游引物各0.25 μL, DNA模板1 μL, 5 U/μL Taq酶(Promega)0.25 μL, 20×SYBR Green I 0.5 μL, ddH₂O 13.25 μL。反应条件: 95℃变性3 min; 循环40次: 95℃变性40 s, 61℃退火25 s, 72℃延伸1 min 20 s; 融解95℃ 0 s(20℃/s), 70℃ 15 s(20℃/s), 95℃ 0 s(0.1℃/s), 冷却40℃ 30 s(20℃/s),所有实时荧光定量PCR反应在LightCycler(Roche)上进行。

1.2.5 实验对象 20只2周龄的新西兰幼兔随机分成正常对照组10只、双歧杆菌喂饲组10只,正常对照组予正常兔食饲养7 d,双歧杆菌喂饲组除同步正常兔食饲养7 d外,每日经胃管注入丽珠肠乐溶液1 mL(1粒)/只(丽珠肠乐为丽珠医药集团股份有限公司产品,每粒胶囊含青春双歧杆菌活菌0.5×10⁸)。

1.2.6 样品采集 实验第8天从实验兔的粪便收集器内收集少量新鲜粪便,于4℃保存,样品采集24 h内抽提粪便内细菌基因组DNA。

1.2.7 样品处理 称取0.05 g湿粪,用Takara细菌基因组DNA小量纯化试剂盒(Takara MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit)抽提粪便

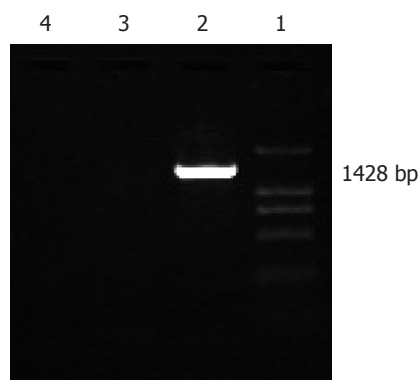


图1 菌株电泳图。1: Marker; 2: 双歧杆菌; 3: 乳杆菌; 4: 大肠杆菌。

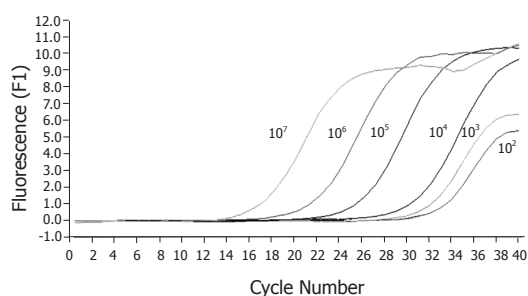


图2 10^7 – 10^2 拷贝的模板循环数与荧光强度关系图。

内所有细菌基因组DNA, 于 -20°C 保存。

1.2.8 样品检测 将待测样品DNA抽提液按与标准曲线制备时相同的反应体系和反应条件进行实时荧光定量PCR反应, 每次实验都设阴性对照和标准品校正, 每个样品都做3个平行复孔, 以保证实验数据的有效性。

统计学处理 样品定量数据导入SPSS10.0软件, 计量资料结果以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用 t 检验比较组间差别。以 $P < 0.05$ 作为有统计学差异的标准。

2 结果

2.1 PCR产物鉴定 用11 g/L的琼脂糖凝胶电泳分析菌株基因组DNA常规PCR扩增产物, 以DNA Marker DL2000 (Takara)为分子量标准, 双歧杆菌菌株基因组DNA在1428 bp处显示了单一扩增物区带(图1), 与相关文献[1]报道吻合, 而乳杆菌和大肠杆菌基因组DNA未见扩增物区带。

2.2 扩增曲线与灵敏性 利用梯度稀释的外标准品做阳性模板进行实时荧光定量PCR反应, 可得到 10^7 – 10^2 个拷贝的模板循环数与荧光强度关系图(图2), 其中横坐标代表PCR反应的循环数(cycle number), 纵坐标代表DNA双链与SYBRGreen荧光染料结合后的荧光强度(F1), 从图中可以看

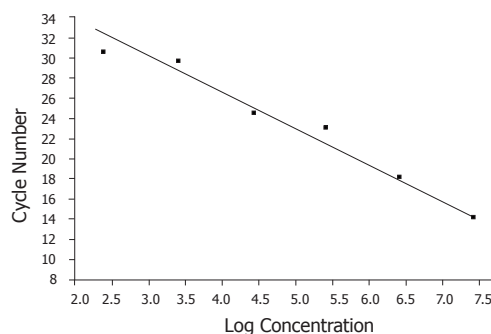


图3 双歧杆菌标准曲线图。

表2 实验兔粪便内双歧杆菌数量及检验结果

	LG (菌数/0.05 g湿粪) mean \pm SD	P值
正常对照组	5.18 \pm 0.98	0.004
双歧杆菌喂饲组	6.37 \pm 0.58	

出不同拷贝数的模板随循环数的增加, 其荧光强度逐渐增强, 在经过一段指数扩增期后曲线趋于平行, 即出现“平台效应”, 指数扩增期模板拷贝数与荧光累积值的一一对应关系形成了双歧杆菌定量的基础。从扩增曲线图可见至少100个菌仍有特征性曲线生长, 说明该实时荧光定量PCR检测双歧杆菌具有较好的敏感性。

2.3 标准曲线(图3) 以不同拷贝数的阳性模板的对数为横坐标, 以PCR反应过程中到达荧光阈值的初始循环数(C_t)为纵坐标得到双歧杆菌的标准曲线, 为待测样品的双歧杆菌定量提供了定量检测的参照标准。

2.4 溶解曲线(图4)与假阳性 阳性模板在实时荧光定量PCR反应的后期, 产物经融解、冷却后得到溶解曲线, 可见融解曲线成单峰, 说明扩增产物单一, 与SYBRGreen荧光染料结合的为目标DNA片段, 较好地避免了定量检测过程中假阳性结果的出现。

2.5 样品双歧杆菌的定量结果 每份样品所含拷贝数都可通过 C_t 值与标准曲线比较得到, 实时荧光定量PCR仪LightCycler可通过微机内的Light-CyclerSoftware处理直接给出定量结果。两组实验兔粪便内双歧杆菌定量结果见表2, 可见正常对照组和双歧杆菌喂饲组粪便内双歧杆菌含量存在显著的统计学差异。

3 讨论

传统的双歧杆菌检测方法是基于细菌的形态学、生理学和生物化学特征, 在特殊培养基上

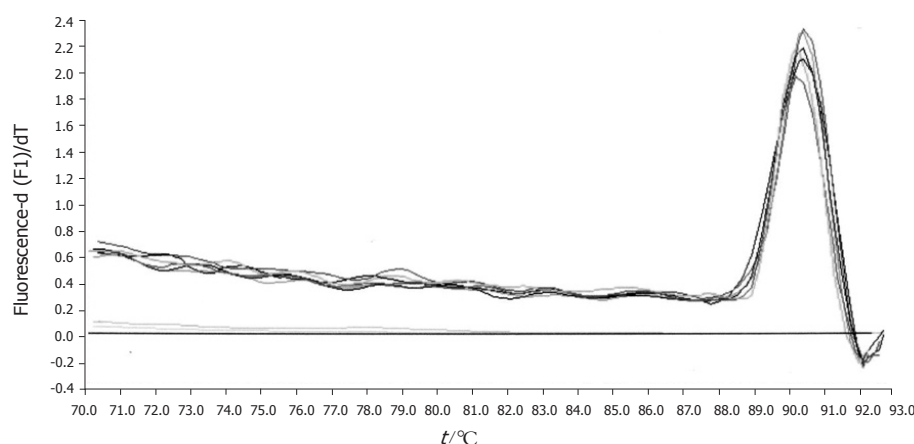


图4 扩增产物溶解曲线图。

经厌氧培养、菌落计数来实现的,其过程易受细菌离体时间、外界环境因素、培养基性能和非特异性菌落混杂等多种因素影响,检测失败率高,结果缺乏稳定性和可靠性,且费时费力,计数不精确,属半定量检测。而实时荧光定量PCR技术是以双歧杆菌16S rDNA编码基因特异区的核酸序列为鉴别基础,设计引物,经PCR扩增,扩增产物与荧光染料结合,再通过荧光信号的测定实现实时定量分析的。其融会了PCR的灵敏性和光谱技术定量精确的优点,使定量分析结果更精确、敏感、省时,同时具有较好的重复性^[2]。不仅避免了传统检测方法的缺陷,而且由于PCR扩增和产物分析的全过程均在单管封闭条件下进行,并由微机控制,消除了产物污染,提高了检测效率。

本实验采用实时荧光定量PCR技术对实验幼兔粪便内的双歧杆菌进行检测,实时荧光定量PCR反应条件的选择和优化对于反应成功与否非常关键。其中荧光染料SYBRGreen I的使用浓度是非常关键的因素,如果SYBRGreen I的浓度过低会使荧光信号的变化降低,这意味着低拷贝的样品可能无法检出,而SYBRGreen I在高浓度时,又将抑制PCR反应,降低PCR反应效率,通过对浓度递减的方法确定SYBRGreen I在该体系中的最佳终浓度为 $0.5\times$,从以梯度稀释的外标准品为模板所做的扩增曲线可见少至100个菌仍有阳性曲线生长,即灵敏度可达 10^2 个菌。同时由于SYBRGreen I与DNA双链呈非特异性结合,为减少引物二聚体双链与SYBRGreen I结合而产生的假阳性结果,实验将退火温度通过递增的方式最终确定为 61°C ,并通过融解曲线分析验证了产物的单一性。

标准曲线是样品定量的参照标准,而外标准品浓度的精确测定是标准曲线制作的基础,也是精确定量的关键。既往采用常规PCR产物直接梯度稀释的方法虽然简便但存在不准确、不稳定的缺点,本实验是将常规PCR产物克隆到载体上,然后提出质粒,经浓度测量和拷贝数换算,实现了准确定量,且模板稳定性高,可较长时间保存,这对实时荧光定量PCR每次检测样品时,均需有已知浓度模板做校正参考,显然是有利的,同时也利于标准曲线的重复性检验。

本实验利用实时荧光定量PCR技术对两组新西兰幼兔粪便中的双歧杆菌进行了定量分析,初步发现在常温有氧环境下收集的非新鲜粪便,其双歧杆菌检测结果均成阳性,说明利用实时荧光定量PCR技术对实验动物肠道内双歧杆菌进行定量分析是可行的。比较双歧杆菌喂饲组和正常对照组发现,喂饲双歧杆菌后其肠道内双歧杆菌数量较正常对照组有升高,两者差异具有显著的统计学意义,为动物造模后的干预性研究提供了实验依据。

实时荧光定量PCR技术实现了对双歧杆菌等难培养菌的实时定量分析,为进一步研究实验动物和人肠道菌群的组成及其动态变化^[3-4]提供了有效的检测手段,具有较好的实验研究和临床应用的前景。

致谢: 上海交通大学生命科学技术学院杭晓敏博士为本研究所需的纯化冻干菌粉提供了诸多帮助。

4 参考文献

- 1 Malinen E, Kassinen A, Rinttilä T, Palva A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes

- in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 2003; 149: 269-277
- 2 Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M, de Vos WM. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 504-513
- 3 Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Variation in human intestinal microbiota with age. *Dig Liver Dis* 2002; 34 Suppl 2: S12-S18
- 4 McCracken VJ, Simpson JM, Mackie RI, Gaskins HR. Molecular ecological analysis of dietary and antibiotic-induced alterations of the mouse intestinal microbiota. *J Nutr* 2001; 131: 1862-1870

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 •

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

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

• 消息 •

技法与经验

本刊讯 《世界华人消化杂志》2006年设置“技法与经验”专栏, 及时报道微创、内镜下治疗消化病新的技术和方法及成熟的经验. 我们热烈欢迎各位作者踊跃投稿, 免费刊登照片. 写作格式如下:

结肠镜下黏膜剥离切除术

0 引言

1 技术方法: 1.1 原理; 1.2 适应证; 1.3 器材准备; 1.4 步骤; 1.5 实例

2 结果

3 讨论: 3.1 并发症; 3.2 优点和缺点; 3.3 经验与技巧

4 参考文献

一种新的阿片肽对小鼠脑和小肠组织阿片受体和肽转运载体基因的影响

韩飞, 施用晖, 乐国伟, 郑建良, 刘勇

■背景资料

许多研究表明, 神经内分泌和免疫系统之间存在着紧密的联系。神经肽是一类生物活性多肽, 在神经内分泌与免疫调节中起重要的作用, 而阿片肽是在免疫功能调节中研究较多的神经肽。一些体外、体内实验结果显示阿片肽具有免疫调节作用, 包括影响淋巴细胞的增殖反应、抗体的产生、T细胞的转化、NK细胞活性以及巨噬细胞活性和粒细胞的趋化性等。但是, 由阿片肽诱导产生的一系列免疫系统变化的机制现在还不清楚。我们从基因转录水平, 研究一种新阿片肽对小鼠组织阿片受体和肽转运载体的影响, 以期探讨阿片肽的作用机制。

韩飞, 施用晖, 乐国伟, 郑建良, 刘勇, 江南大学食品学院, 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏省无锡市 214036

韩飞, 博士, 现在国家粮食局科学研究院工作, 主要从事粮食营养与安全研究。

中央级科研院所基础性工作专项资金重点资助项目, No. 2100DEA 20022

通讯作者: 乐国伟, 214036, 江苏无锡市惠河路170号, 江南大学食品学院营养与生物技术教研室. lgw@sytu.edu.cn

电话: 0510-5869236

收稿日期: 2005-03-18 接受日期: 2005-10-09

Effect of a new opioid peptide on opioid receptor and peptide transporter gene of brain and small intestinal tissues in mice

Fei Han, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le, Jian-Liang Zheng, Yong Liu

Fei Han, Yong-Hui Shi, Guo-Wei Le, Jian-Liang Zheng, Yong Liu, Food Science and Technology School; Key Laboratory of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, Jiangsu Province, China

Supported by the Special Fund for the Key Project of Central Academy Basic Research, No. 2100DEA 20022

Correspondence to: Guo-Wei Le, Food Science and Technology School, Department of Biotechnology, Southern Yangtze University, Huihe Road 170, Wuxi 214036, Jiangsu province, China. lgw@sytu.edu.cn

Received: 2005-03-18 Accepted: 2005-10-09

Abstract

AIM: To investigate the effect of a new opioid peptide, YPFPGPIRYG, on the opioid receptor and peptide transporter gene of brain and small intestinal tissues via gastrointestinal tracts at transcription level.

METHODS: Twenty-four mice were randomly divided into opioid group ($n = 12$) and control group ($n = 12$), which were fed with 8×10^{-7} mol/L YPFPGPIRYG and double distilled water, respectively, for 2 wk. The total RNA was extracted from the brain and small intestinal tissues of mice for the detection of μ -, δ -opioid receptor and peptide transporters PepT1 gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

RESULTS: In the brain and small intestinal tissues, μ - and δ -opioid receptor transcripts were detected, while peptide transporter PepT1 was only found to be expressed in the small intestine. In comparison with those in the controls, the expression of μ - and δ -opioid receptor were significantly enhanced in the small intestine ($P < 0.05$), but not in the brain, and PepT1 gene expression was not changed in the intestinal tissues of mice treated with YPFPGPIRYG.

CONCLUSION: Opioid receptor expression has tissue specificity. The immunomodulatory effects of opioid YPFPGPIRYG do not attribute to the interaction with the opioid receptors in central nervous system (CNS), but with δ - and μ -opioid receptor in small intestine.

Key Words: Opioid peptide; Mice; Brain; Small intestine; Opioid receptor; Peptide transporters; Gene transcription

Han F, Shi YH, Le GW, Zheng JL, Liu Y. Effect of a new opioid peptide on opioid receptor and peptide transporter gene of brain and small intestinal tissues in mice. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1372-1376

摘要

目的: 从转录水平研究一种新的外源阿片肽 YPFPGPIRYG经胃肠道途径对小鼠脑组织和小肠组织阿片受体和肽转运载体基因的影响。

方法: 24只小鼠随机分为阿片肽样品组($n = 12$)和对照组($n = 12$), 在饮水中分别添加浓度为 8×10^{-7} mol/L的阿片肽样品 YPFPGPIRYG 和双蒸水(空白对照组), 小鼠连续饮用2 wk. 提取受试小鼠脑组织和小肠组织的总RNA, RT-PCR检测 μ 阿片受体、 δ 阿片受体和肽转运载体PepT1 mRNA的变化情况。

结果: 小鼠的脑组织中同时有 μ 阿片受体和 δ 阿片受体mRNA的表达, 但阿片肽组小鼠与对照组相比, 脑组织中 μ 阿片受体和 δ 阿片受体mRNA的丰度没有变化; 小鼠的小肠中同时有

μ 阿片受体、 δ 阿片受体和肽转运载体PepT1 mRNA的表达, 且阿片肽组小鼠小肠中的 μ 阿片受体和 δ 阿片受体mRNA的表达与对照组相比明显上调($P<0.05$), 而肽转运载体PepT1 mRNA的丰度与对照组相比没有差异。

结论: 小鼠组织中不同阿片受体的表达存在明显的组织特异性, 阿片肽YPFPGPIRYG对小鼠的生理调节不是通过与中枢神经系统上的阿片受体结合发挥作用, 其可能与小肠上的 δ 和 μ 阿片受体结合发挥作用。

关键词: 新阿片肽; 小鼠; 脑; 小肠组织; 阿片受体; 肽转运载体; 基因转录

韩飞, 施用晖, 乐国伟, 郑建良, 刘勇. 一种新的阿片肽对小鼠脑和小肠组织阿片受体和肽转运载体基因的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1372-1376

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1372.asp>

0 引言

许多研究表明, 神经内分泌和免疫系统之间存在着紧密的联系^[1-2]. 神经肽是一类生物活性多肽, 在神经内分泌与免疫调节中起重要的作用, 而阿片肽是在免疫功能调节中研究较多的神经肽. 一些体外、体内实验结果显示阿片肽具有免疫调节作用, 包括影响淋巴细胞的增殖反应、抗体的产生、T细胞的转化、NK细胞活性以及巨噬细胞活性和粒细胞的趋化性等^[3-4]. 但是, 由阿片肽诱导产生的一系列免疫系统变化的机制现在还不清楚. 阿片肽在体内存在相应的阿片受体, 阿片受体属于G蛋白耦联受体, 已发现的受体种类可以分为 μ 、 δ 、 κ 三大类型. 外源阿片肽作为一种小肽, 能否以完整的小分子肽形式吸收入血进而发挥他的免疫调节作用? 肽若完整吸收, 需穿越两个膜屏障, 一是肠上皮细胞的刷状缘膜, 另一个是肠上皮细胞的基底膜. 现已知小肽能借助刷状缘膜上的肽转运载体PepT1进入肠上皮细胞^[5]. PepT1是低亲和力/高容量的肽载体, 主要在消化道中表达, 在肾脏中也有微弱的表达^[6]. 通过纳酪酮阻断实验证明, 阿片肽对免疫系统的调节作用涉及 μ 、 δ 和 κ 阿片受体^[2]. 一些研究结果表明, 在一般情况下, μ 受体激动剂, 如吗啡, 有明显的免疫抑制作用, 而 δ 受体激动剂却有免疫刺激作用^[7], 而且关于 κ 阿片受体与免疫相关的证据较少^[8], 因此我们从基因转录水平, 利用RT-PCR方法, 研究一种新的外源阿片肽经胃肠道途径对小鼠体内脑和

小肠组织的 μ 受体, δ 受体以及肽转运载体PepT1 mRNA丰度变化的影响情况, 以期探讨阿片肽对小鼠生理调节的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 4-5周龄健康 δ 昆明种小白鼠(14-18 g), 由江苏省试验动物中心提供. 阿片肽样品(YPFPGPIRYG)为基因工程毕赤酵母发酵后, 经分离纯化获得^[9]. 逆转录酶M-MLV, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, RNA酶抑制剂(40 MU/L), 无RNA酶的DNA酶, Promega公司产品; Taq DNA多聚酶, Trizol试剂, BBI公司产品; PCR标准, 华美生物工程公司产品; 琼脂糖, Sigma公司产品; DEPC(焦碳酸二乙酯), Amresco公司产品; RT-PCR引物, 上海捷信思基因技术有限公司合成。

1.2 方法 24只小鼠, 随机分为两组, 每组12只, 分别为对照组和阿片肽样品组, 自由采食并控制饮水量, 每天按5 mL/只提供饮水, 每日早晨8:00添水, 且样品组饮水中加入阿片肽样品YPFPGPIRYG(浓度为 8×10^{-7} mol/L), 小鼠连续饮用2 wk. 室温25℃, 常规光照. 给药剂量依据: 在预备实验中发现, 当以上述剂量给小鼠饮水中添加阿片肽样品时, 小鼠开始出现明显的免疫反应(以脾脏T淋巴细胞的增殖反应作为考察指标)($P<0.05$), 数据略。

Trizol试剂提取受试小鼠脑和小肠组织的总RNA, 紫外可见分光光度计对RNA进行定量, RT-PCR检测 μ 阿片受体、 δ 阿片受体和肽转运载体PepT1 mRNA的表达. PCR引物设计采用oligo6.0: μ 阿片受体引物: 上游引物(P1): 5' TGGTC GTGGC TGTAT TTATT 3', 下游引物(P2): 5' CGATT GTGGA GGAAG TTGG 3', 202 bp; δ 阿片受体引物: P1: 5' ACATT GCTGT CTGCC ATCCT 3', P2: 5' GGCTG CGGTC CTTCT CCTT 3', 327 bp; 肽转运载体PepT1引物: P1: 5' CCAAA GGCAG TCCAA GAT 3', P2: 5' GCAAT GACCT CCAGA ACAA 3', 324 bp; actin-specific(肌动蛋白引物): P1: 5' GAGGG AAATC GTGCG TGAC 3', P2: 5' GCTGG AAGGT GGACA GTGAG 3', 447 bp. 总RNA的提取和纯化: 分别取对照组和实验组100-200 mg的脑组织和小肠, 放入装有预冷的1 mL Trizol的匀浆器中, 在冰浴中充分匀浆, 然后转入1.5 mL离心管中, 冰水中静置5 min, 加入0.2 mL CCl_4 , 剧烈振荡混匀, 冰水中静置5 min, 12 000 r/min离心30 s, 取上层水相于一

■研发前沿
阿片肽对免疫系统的调节作用; 新型阿片肽类药物的研发等。

■创新盘点

YPFPGPIRYG为一种新阿片肽;本文初步探讨阿片肽对小鼠生理调节的变化机制。

新的1.5 mL离心管中,加入0.5 mL异丙醇,混匀后-20℃静置30 min, 8000 r/min离心10 min,弃上清,沉淀用750 mL/L乙醇洗涤后, 8000 r/min离心30 s,弃去上清,室温放置,晾干30 min。加入50 μL的DEPC水, 75℃水浴10-15 min,使RNA溶解,即得总RNA提取液。

1.2.1 逆转录反应 在一0.5 mL离心管中加入如下试剂:总RNA, 5 μg; Rnasin (40 MU/L) 0.5 μL; 20 μmol/L Oligo (dT) 4 μL。75℃水浴5 min, 37℃水浴10 min,使局部双螺旋破坏,再加入如下试剂: Rnasin (40 MU/L) 0.5 μL; 5×RT缓冲液 5 μL; dNTPs (10 mmol/L) 2 μL; M-MLV逆转录酶(200 MU/L) 1 μL,加DEPC处理水使反应体系体积为25 μL,手指轻弹使溶液混合, 37℃水浴50 min。95℃, 5 min终止反应,稍离心,置于冰上立即进行PCR扩增或-20℃保存。

1.2.2 PCR反应 在一0.5 mL无菌的Eppendorf管中加入如下试剂: 10×PCR Buffer (含15 mmol/L MgCl₂) 5 μL; dNTPs (10 mmol/L) 1 μL; Actin引物, μ阿片受体引物(或δ阿片受体引物或PepT1引物)各10 μL(每种引物浓度为100 pmol/L); cDNA 2 μL; TaqDNA聚合酶(5 MU/L) 0.5 μL,加无菌双蒸水使总体积为50 μL,然后加液体石蜡30 μL,覆盖于上述混合液上。PCR反应条件: 94℃变性2 min; 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 27个循环; 72℃延伸10 min;产物-20℃保存。

1.2.3 凝胶电泳 PCR产物采用EB染色,每个加样孔上样量为6 μL (5 μL PCR产物+1 μL上样缓冲液)。琼脂糖凝胶浓度为1.5 g/L,电泳缓冲液为TBE。电压121 V,电流102 mA,电泳时间为50 min。拍照用生物凝胶显像系统(Biolmaging systems)。定量分析软件用Image Acquisition和Analysis Software.Ver.45。

统计学处理 应用SAS统计软件进行统计处理。

2 结果

2.1 小鼠的脑组织和小肠μ阿片受体RT-PCR结果 小鼠的脑组织中检测到有μ阿片受体mRNA的表达,饮水中添加阿片肽与对照组相比,μ阿片受体mRNA的表达没有变化(图1)。小鼠的小肠中检测到有μ阿片受体mRNA的表达。饮水中添加阿片肽与对照组相比,小鼠的小肠中μ阿片受体mRNA的表达明显增强($P<0.01$)(图2)。

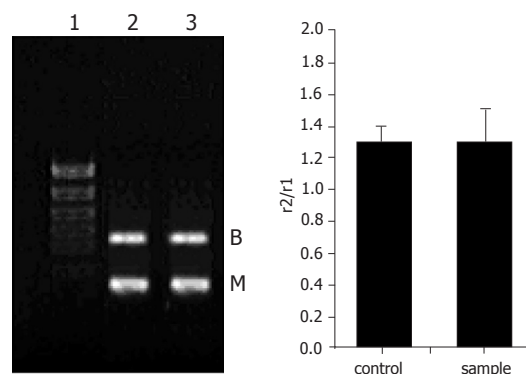


图1 小鼠脑组织μ阿片受体和actin PCR扩增结果。1: PCR Marker; 2: 对照组; 3: 阿片肽样品组; B: actin; M: μ阿片受体; r1: actin; r2: μ阿片受体; r2/r1即指μ阿片受体mRNA在小鼠脑组织中相对于actin的表达量。

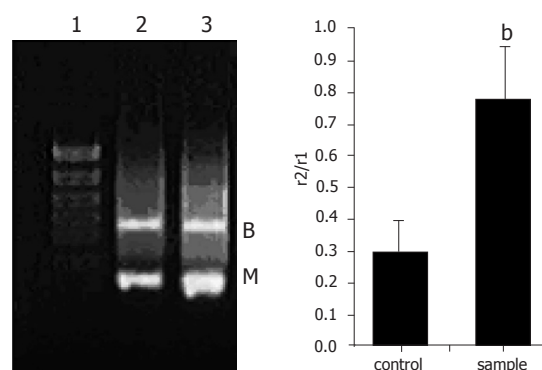


图2 小鼠小肠组织μ阿片受体和actin PCR扩增结果。1: PCR Marker; 2: 对照组; 3: 阿片肽样品组; B: actin; M: μ阿片受体; r1: actin; r2: μ阿片受体; r2/r1即指μ阿片受体mRNA在小鼠小肠组织中相对于actin的表达量。^b $P<0.05$ vs control。

2.2 小鼠的脑组织和小肠δ阿片受体RT-PCR结果 小鼠的脑组织中检测到有δ阿片受体mRNA的表达。饮水中添加阿片肽,小鼠连续饮用2 wk后,与对照组相比,阿片肽组小鼠的脑组织中δ阿片受体mRNA的表达基本没有变化(图3)。小鼠的小肠中检测到δ阿片受体mRNA的表达。与对照组相比,阿片肽组小鼠的小肠中δ阿片受体mRNA的表达显著增强($P<0.05$)(图4)。

2.3 小鼠小肠肽转运载体PepT1 mRNA表达的影响 小鼠的小肠中检测到肽转运载体PepT1 mRNA的表达。饮水中添加阿片肽,小鼠连续饮用2 wk后,与对照组相比,阿片肽组小鼠的小肠中PepT1 mRNA的表达与对照组相比差异不显著($P>0.05$)(图5)。

3 讨论

actin基因是一看家基因(housekeeping gene),在动物体内其表达量相对比较恒定,外界的环境

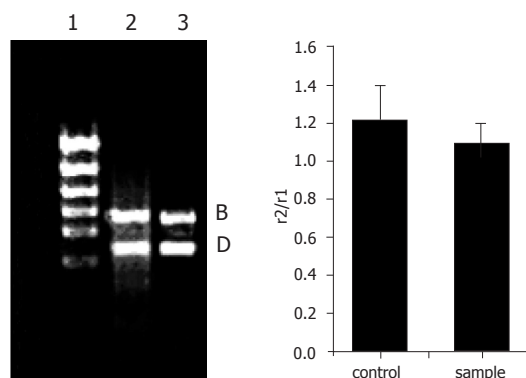


图 3 小鼠脑组织中 δ 阿片受体和actin PCR扩增结果. 1: PCR Marker; 2: 对照组; 3: 阿片肽样品组; B: actin; D: δ 阿片受体; r1: actin; r2: δ 阿片受体; r2/r1即指 δ 阿片受体mRNA在小鼠脑组织中相对于actin的表达量.

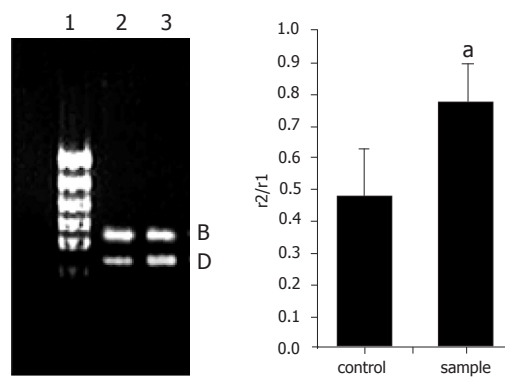


图 4 小鼠小肠组织 δ 阿片受体和actin PCR扩增结果. 1: PCR Marker; 2: 对照组; 3: 阿片肽样品组; B: actin; D: δ 阿片受体; r1: actin; r2: δ 阿片受体; r2/r1即指 δ 阿片受体mRNA在小鼠脑组织中相对于actin的表达量. ^a $P < 0.05$ vs control.

■名词解释

1 阿片受体: 阿片肽在体内存在相应的阿片受体, 阿片受体属于G蛋白耦联受体, 已发现的受体种类可以分为 μ 、 δ 、 κ 三大类型.

2 肽转运载体 PepT1: PepT1是低亲和力/高容量的肽载体, 主要在消化道中表达, 在肾脏中也有微弱的表达^[6].

大多不会改变他的表达水平, 在定量mRNA表达量的试验中常被用作内标, 以消除提取总RNA时所取样品量多少造成的误差. 我们用actin作内标, 对饮水中添加阿片肽样品YPFPGPIRYG, 小鼠连续饮用2 wk后, 小鼠小肠组织阿片受体和肠道肽转运载体进行了半定量RT-PCR试验. 有试验结果表明, 三种主要的阿片受体(μ 、 δ 和 κ 受体)主要在中枢神经系统表达^[10-13]. Wittert *et al*^[14]的研究结果表明, 大鼠的脑组织中三种阿片肽受体均有表达. Gaveriaux *et al*^[15]的研究结果显示, 人和小鼠的脑组织中三种阿片受体也都有表达. 另有研究发现, 用阿片类物质慢性处理神经细胞可以导致 μ 、 δ 或 κ 阿片受体数量下调和脱敏现象的发生(即受体的敏感度下降, 产生耐受现象)^[13,16]. 本实验研究表明, 小鼠的脑组织中同时有 μ 阿片受体和 δ 阿片受体mRNA的表达, 且在饮水中添加阿片肽后, 对照组和阿片肽样品组小鼠脑组织中 μ 阿片受体和 δ 阿片受体mRNA的表达没有差异. 可能是由于阿片肽样品YPFPGPIRYG的分子量太大, 不能透过血脑屏障与脑部的阿片受体发生作用, 因而饮水中添加阿片肽, 小鼠脑组织中 μ 阿片受体和 δ 阿片受体mRNA的表达未见变化. 而我们在试验研究中发现, 当饮水中添加阿片肽样品YPFPGPIRYG, 小鼠连续饮用2 wk后, 小鼠的许多生理指标都发生了明显的变化(结果尚未发表). 以上研究结果表明, 阿片肽YPFPGPIRYG对小鼠的免疫作用不是通过与中枢神经系统上的阿片受体结合发挥作用的.

本实验结果显示, 小鼠的小肠中同时有 μ 阿片受体、 δ 阿片受体和肽转运载体PepT1 mRNA

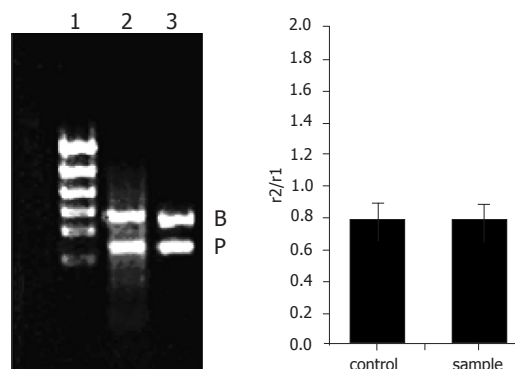


图 5 小鼠小肠肽转运载体PepT1和actin PCR扩增结果. 1: PCR marker; 2: 对照组; 3: 阿片肽样品组; B: actin; P: PepT1; r1: actin; r2: μ 阿片受体; r2/r1即指 μ 阿片受体mRNA在小鼠脑组织中相对于actin的表达量.

的表达. Fei *et al*^[17]的研究结果显示小鼠的小肠中有肽转运载体PepT1的表达. 饮水中添加阿片肽, 小鼠连续饮用2 wk后, 阿片肽组小鼠小肠中的 μ 阿片受体和 δ 阿片受体mRNA的表达与对照组相比明显上调. 且阿片肽组肽转运载体PepT1 mRNA的表达与对照组相比没有差异. 以上研究结果说明, 阿片肽YPFPGPIRYG可能与小肠上的 δ 和 μ 阿片受体结合发挥生理调节作用.

以上研究结果表明, 阿片肽可以在不同组织代谢层次影响阿片受体的基因表达, 包括中枢神经系统和消化道, 进而发挥阿片肽广泛的生理功能.

4 参考文献

- 1 Johnson HM, Smith EM, Torres BA, Blalock JE. Regulation of the *in vitro* antibody response by neuroendocrine hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 4171-4174
- 2 Livnat S, Felten SY, Carlson SL, Bellinger DL, Felten DL. Involvement of peripheral and

- central catecholamine systems in neural-immune interactions. *J Neuroimmunol* 1985; 10: 5-30
- 3 Roy S, Ramakrishnan S, Loh HH, Lee NM. Chronic morphine treatment selectively suppresses macrophage colony formation in bone marrow. *Eur J Pharmacol* 1991; 195: 359-363
- 4 Sibinga NE, Goldstein A. Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. *Annu Rev Immunol* 1988; 6: 219-249
- 5 韩飞, 施用晖, 乐国伟, 王立宽. 肽转运载体的分子特征. *世界华人消化杂志* 2003; 11: 1436-1442
- 6 Adibi SA. The oligopeptide transporter (Pept-1) in human intestine: biology and function. *Gastroenterology* 1997; 113: 332-340
- 7 Hicks ME, Gomez-Flores R, Wang C, Mosberg HI, Weber RJ. Differential effects of the novel non-peptidic opioid 4-tyrosylamido-6-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (CGPM-9) on *in vitro* rat T lymphocyte and macrophage functions. *Life Sci* 2001; 68: 2685-2694
- 8 Martin-Kleiner I, Bidlack JM. Chronic opioid treatment of the mouse thymoma cell lines R1.G1 and R1.EGO leads to down-regulation of the kappa opioid receptor without desensitization of adenylyl cyclase activity. *Int Immunopharmacol* 2001; 1: 13-20
- 9 韩飞, 施用晖, 刘勇, 陈蕴, 乐国伟. 一种新阿片肽的分离纯化. *中国生物工程杂志* 2005; 25: 31-34
- 10 Kieffer BL. Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides. *Cell Mol Neurobiol* 1995; 15: 615-635
- 11 Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI. Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6736-6740
- 12 Satoh M, Minami M. Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol Ther* 1995; 68: 343-364
- 13 Law PY, Hom DS, Loh HH. Opiate receptor down-regulation and desensitization in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells are two separate cellular adaptation processes. *Mol Pharmacol* 1983; 24: 413-424
- 14 Wittert G, Hope P, Pyle D. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 218: 877-881
- 15 Gaveriaux C, Peluso J, Simonin F, Laforet J, Kieffer B. Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. *FEBS Lett* 1995; 369: 272-276
- 16 Puttfarcken PS, Werling LL, Cox BM. Effects of chronic morphine exposure on opioid inhibition of adenylyl cyclase in 7315c cell membranes: a useful model for the study of tolerance at mu opioid receptors. *Mol Pharmacol* 1988; 33: 520-527
- 17 Fei YJ, Sugawara M, Liu JC, Li HW, Ganapathy V, Ganapathy ME, Leibach FH. cDNA structure, genomic organization, and promoter analysis of the mouse intestinal peptide transporter PEPT1. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1492: 145-154

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 •

全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会

本刊讯 全国胃黏膜癌前病变与癌前疾病诊治研讨会将于2006年秋季在重庆将行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文及摘要800字(附软盘), 2006-07-15截稿.

2 联系方式

重庆市第三军医大学西南医院消化科赵晶京收(邮编: 400038); E-mail: zhaojingjing-1@sina.com

孤啡肽对大鼠体内外结肠动力的影响

李海燕, 李得香, 严 祥, 彭淑英, 崔 琳, 曹菊梅

李海燕, 彭淑英, 崔琳, 曹菊梅, 甘肃省金川集团公司医院消化科 甘肃省金昌市 737100

严祥, 甘肃省兰州大学第一医院老年病科 甘肃省兰州市 730000

李得香, 甘肃省金昌市第二人民医院, 甘肃省金昌市 737100
李海燕, 2005年兰州大学硕士, 主治医师, 主要从事胃肠动力的研究。

通讯作者: 李海燕, 737100, 甘肃省金川集团公司医院消化科。
lihaiyan99@tom.com

电话: 0935-3628668 传真: 0935-8811453

收稿日期: 2006-03-12 接受日期: 2006-03-24

Effects of orphanin FQ on colonic motility of rats

Hai-Yan Li, De-Xiang Li, Xiang Yan, Shu-Ying Peng, Lin Cui, Ju-Mei Cao

Hai-Yan Li, Shu-Ying Peng, Lin Cui, Ju-Mei Cao, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jinchuan Corporation Company, Jinchang 737100, Gansu Province, China

De-Xiang Li, Department of Clinic, the First Hospital of Jinchang City, Jinchang 737100, Gansu Province, China.

Xiang Yan, Department of Geriatrics, 1st Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Correspondence to: Dr. Hai-Yan Li, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jinchuan Corporation Company, Jinchang 737100, Gansu Province, China. lihaiyan99@tom.com

Received: 2006-03-12 Accepted: 2006-03-24

Abstract

AIM: To investigate the role of ORL1 (opioid receptor-like 1) receptor in the colon movement.

METHODS: The test for tension of colonic muscle strips *in vitro* and the colonic myoelectrical activity *in vivo* as well as the charcoal suspension pushing test were performed to evaluate the effect of orphanin FQ (OFQ) on the motility of colon.

RESULTS: NOFQ (1-1000 nmol/L) caused an immediate tonic contraction in the isolated colon in a concentration-dependent manner. In anesthetized rats, intravenous administration of OFQ (1 µg/kg) caused phasic contractions in the proximal colon ($t = 2.41$, $P = 0.02$), and this contraction was not inhibited by classical opioid receptor antagonist, naloxone. Subcutaneous administration of OFQ (3 nmol/kg) accelerated the colonic transit of charcoal suspension *in vivo*

(48.0 ± 1.24 vs 43.5 ± 2.63 , $t = -4.5$, $P = 0.008$).

CONCLUSION: OFQ is a brain-gut peptide and plays a role in the modulation of gastrointestinal functions.

Key Words: Nociceptin/Orphanin FQ; Opioid; Tension of muscle; Colonic motility; Enteric nervous system

Li HY, Li DX, Yan X, Peng SY, Cui L, Cao JM. Effects of orphanin FQ on colonic motility of rat. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi.2006;14(14):1377-1381

摘要

目的: 探讨孤啡肽受体在结肠运动中的作用。

方法: 采用大鼠离体结肠肌条张力测定法、在体结肠肌电测定、炭末推进试验等研究了孤啡肽受体的内源性配基——孤啡肽对大鼠结肠动力的影响。

结果: 孤啡肽(1-1000 nmol/L)剂量依赖性地引起离体结肠肌条的强直性收缩; 孤啡肽(1 µg/kg)iv诱导在体近端结肠的相位性收缩和基础张力的增加($t = 2.41$, $P = 0.02$); 孤啡肽(3 nmol/kg)sc加速活性炭悬液通过结肠的转运(48.0 ± 1.24 vs 43.5 ± 2.63 , $t = -4.5$, $P = 0.008$)。

结论: 孤啡肽通过一个神经性的非阿片受体介导的机制加速大鼠结肠的收缩和转运, 孤啡肽在结肠生理功能中起了一定的作用。

关键词: 孤啡肽; 阿片; 肌张力; 结肠动力; 肠神经系统

李海燕, 李得香, 严祥, 彭淑英, 崔琳, 曹菊梅. 孤啡肽对大鼠体内外结肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1377-1381

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1377.asp>

0 引言

孤啡肽(orphanin FQ/nociceptin), 简称OFQ/N, 是阿片受体样(opioid receptor like 1, ORL1)受体的内源性配体^[1]. 原位杂交已经证实ORL1受体

■背景资料

孤啡肽是一种新近发现的内阿片肽, 与经典的阿片肽同样属于脑肠肽. 胃肠道是研究阿片受体药理学特性的重要模型系统, 因此有必要探究孤啡肽对胃肠动力的影响。

■创新盘点

本文结果证实:孤啡肽在结肠的生理功能中起了一定的作用.因此,开发特异性强的孤啡肽受体激动剂或拮抗剂对治疗结肠动力紊乱可能有一定前景.

mRNA广泛分布于中枢神经系统内,且在中枢神经系统中与痛觉调制相关的核团上分布较密集^[2],因此有关孤啡肽的研究大多集中于他在痛觉调制方面的作用.但是,通过激活ORL1受体,孤啡肽也可影响阿片成瘾耐受^[3],焦虑、进食和记忆过程^[4],血管扩张和肾功能^[5],胃肠道的动力和分泌功能等^[6].尽管他与经典的阿片肽-强啡肽A有高度同源性,但孤啡肽及其受体系统代表了一个新的以肽为基础的信号通路,他与阿片系统在药理学上有非常明显的区别^[7].肠动力是由局部神经网络控制的^[8-9].胃肠道是研究阿片受体药理学特性的重要模型系统,因此,如果孤啡肽也像经典的阿片肽一样属于脑肠肽,他在调节胃肠道功能方面应该也有一定的作用.作为一种新的调节胃肠功能的神经肽,目前对其在胃肠道中的分布和功能研究尚少.故本实验拟通过研究孤啡肽对大鼠结肠动力的影响,进一步明确肠道OFQ/N-ORL1系统与结肠动力紊乱的关系.在本实验中,我们研究了孤啡肽在离体中对结肠平滑肌张力的影响和在体时对结肠收缩和转运的效应.

1 材料和方法

1.1 材料 健康Wistar大鼠30只,体质量250-350 g,雌雄各半,由兰州大学实验动物繁育中心提供,饲养环境保持适宜的温度: $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $55\% \pm 5\%$,自由进食、水.受试前均禁食不禁水24 h.孤啡肽OFQ(1-17), OFQ(1-13), OFQ(1-12)和OFQ(1-11)、吗啡、[Nphe¹]NC(1-13)NH₂均由兰州大学生命科学院人体与动物机能实验室提供.纳洛酮、TTX(tetrodotoxin)购自Sigma公司.

1.2 方法

1.2.1 离体结肠反应 大鼠(雌雄各半)8只被木棒击昏.迅速剖腹取出近端结肠,洗净肠内容物.剔除肠壁周围的系膜组织和血管,用眼科剪沿肠管纵轴剪开肠管制备成 $1.5 \text{ cm} \times 1.0 \text{ cm}$ 的纵形肌条.将肌条置于持续通气的浴槽中.浴槽含新鲜配制的Kreb's液: NaCl 119 mmol/L; KCl 4.7 mmol/L; MgSO₄ 1.5 mmol/L; KH₂PO₄ 1.2 mmol/L; CaCl₂ 2.5 mmol/L; NaHCO₃ 25 mmol/L; 糖11.1 mmol/L.浴槽连接恒温器,保持温度在 37°C ,持续通气: 950 ml/L O₂和 50 ml/L CO₂.肌条给予1 g张力的预负荷,在此条件下平衡90 min,前30 min每5 min换液一次,后60 min每15 min换液一次.给药前将肌条重复暴露于 10^{-6} mol/L的碳酰胆碱(carbachol)

中以确定L₀(达到最大收缩时的组织长度).采用BL-420E图像分析与处理系统(成都泰盟科技有限公司)采集、分析数据.观察药物本身对收缩的影响时,提前5 min加入浴管,观察药物对孤啡肽的影响时,药物提前5 min加入,孤啡肽提前10 min加入.受试药物给药后记录10 min,冲洗4次共20 min后再给予另一剂量或另一种药物,拮抗剂需在给予孤啡肽前预孵育10 min.为了探索是否孤啡肽可影响电刺激(electrical field stimulation, EFS)引起的大鼠胃肠道的肌肉收缩,在有或无孤啡肽预处理的情况下比较了EFS引起的肌肉收缩. EFS前用孤啡肽预处理近端结肠肌条10 min.电刺激参数:波宽: 0.5-1 ms,频率5次/min,电压: 60 V.通过电极上、下两铂金环在Krebs溶液中作电场强度刺激.

1.2.2 麻醉大鼠的结肠反应和推进 采用Taniguchi *et al*^[10]先前描述的方法,8只大鼠,禁食24 h,用氯胺酮(87 mg/kg)麻醉,腹正中开腹,在近端结肠的浆膜面植入电极和压力转换器记录环肌的收缩.股静脉注入孤啡肽1 μg/kg后记录在体结肠肌电活动的变化,用一热板维持动物体温在 37°C . OFQ对结肠的动力反应在每只大鼠重复5次,每隔20 min给药一次.拮抗剂需在注入孤啡肽前10 min注入.模型组和对照组各取14只大鼠,分别分为NS组(对照组7只)和OFQ组(实验组7只),用氯胺酮麻醉(剂量: 87 mg/kg),腹正中开腹.孤啡肽3 nmol/kg sc后在紧靠回盲部的近端结肠内注入100 g/L的活性炭悬液1 mL,关腹.1 h后大鼠颈椎脱臼处死,立刻取出全部结肠,测量结肠中炭末推进距离及结肠全长,计算结肠转运率 = 炭末推进距离/结肠全长 $\times 100\%$.

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示,采用SPSS 10.0统计分析软件包中两独立样本的t检验分析模型组与实验组之间的差异,单因素方差分析(ANOVA)比较不同剂量的OFQ对离体结肠肌条张力的不同影响,双侧 $\alpha = 0.05$ 为显著性检验水准.

2 结果

2.1 离体结肠反应 孤啡肽引起离体结肠肌条的立即的强直性的收缩紧接着伴随节律性的收缩波,也就是一个大的起始收缩紧跟着相位反应.收缩波的振幅和频率变化在1-1000 nmol/L的范围内是剂量依赖性的(图1).肠管对孤啡肽(1000 nmol/L)的收缩反应不能被纳洛酮(1×10^{-6} mol/L)所拮抗(图2A),亦不

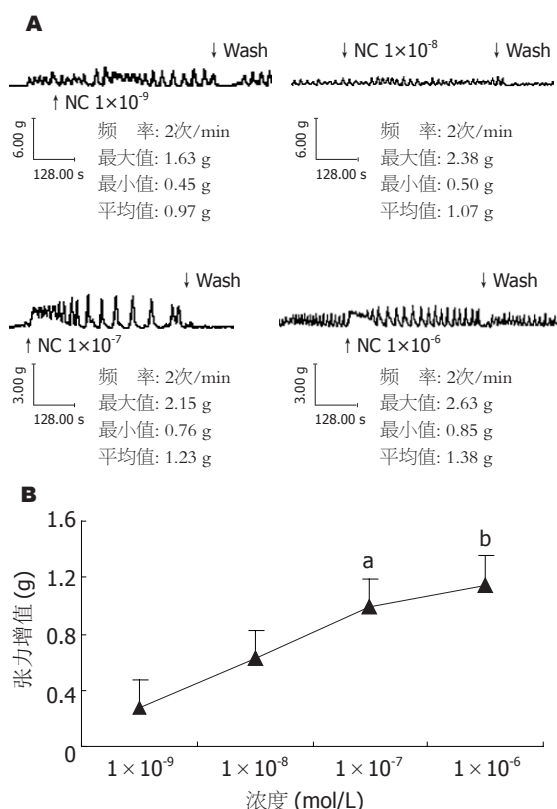


图1 孤啡肽 (1-1000 nmol/L)引起离体结肠肌条张力增加。A: 随着孤啡肽浓度升高离体结肠肌条张力增加; B: 剂量依赖性。* $P < 0.05$, $P < 0.01$ vs 1×10^{-9} mol/L。

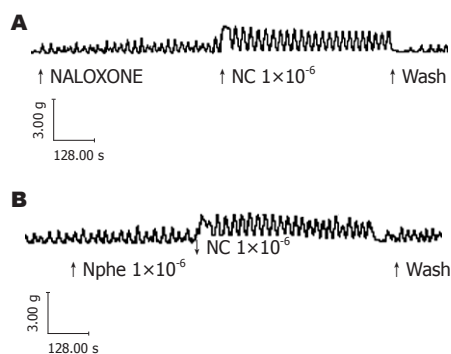


图2 纳洛酮和[Nphe¹]NC(1-13)NH₂ (1×10^{-6} mol/L)不能拮抗孤啡肽 (1×10^{-6} mol/L)引起离体结肠肌条张力的增加。A: 纳洛酮; B: [Nphe¹]NC(1-13)NH₂。

能完全被[Nphe¹]NC(1-13)NH₂所拮抗(图2B)。[Nphe¹]NC(1-13)NH₂被认为是离体豚鼠回肠和小鼠输精管标本中的孤啡肽受体的选择性的拮抗剂^[11]。但在本研究中显示[Nphe¹]NC(1-13)NH₂自身亦能引起明显的结肠收缩而且对孤啡肽诱导的结肠收缩无抑制效应。为了确定是否孤啡肽的活性是通过神经通路介导的或者是否是一个直接的肌源性效应, 在TTX存在的情况下检验了孤啡肽引起的收缩。结果由TTX引起的大鼠结肠肌条的自发收缩被增强, 在TTX存在的

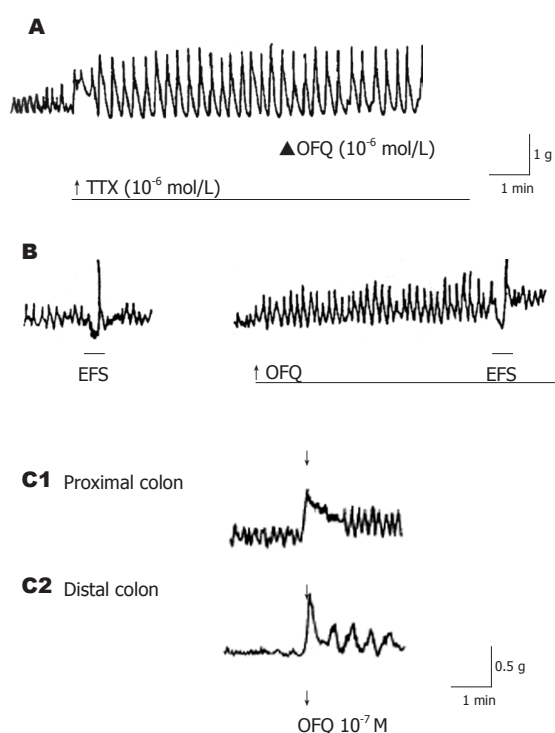


图3 OFQ对离体结肠肌条的作用。A: TTX存在情况下不能引起更进一步的收缩; B: 对电刺激引起的大鼠离体结肠肌条收缩无明显影响; C1: 近端离体结肠肌条显示一个大的起始收缩紧跟着相位反应; C2: 远端离体结肠肌条显示平缓的起始收缩紧跟着延长的相位反应。

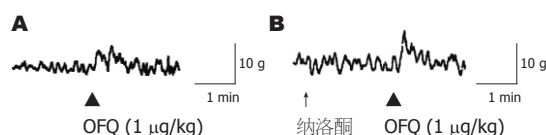


图4 孤啡肽的活体效应。A: 孤啡肽1 μ g/kg, iv诱导大鼠近端结肠的相位性收缩; B: 纳洛酮不能拮抗孤啡肽iv诱导大鼠近端结肠的相位收缩。

情况下OFQ不能引起更进一步的收缩(图3A), 并且OFQ对电刺激引起的大鼠结肠收缩无明显影响(图3B)。OFQ的收缩作用在不同的结肠平滑肌条稍有不同。大部分显示了一个大的起始收缩紧跟着相位反应(图3C1), 偶尔, 一些肌条显示了一个比较平缓的起始收缩紧跟着延长的相位反应(图3C2)。

2.2 麻醉大鼠的结肠反应和转运 吗啡(1 mg/kg), iv诱导了麻醉大鼠近端结肠的相位性收缩和基础张力的增加, 这种作用可被纳洛酮300 μ g/kg完全取消。孤啡肽(1 μ g/kg), iv也可诱导麻醉大鼠近端结肠的相位性收缩(图4A), 与吗啡不同的是, 孤啡肽的效应不能被纳洛酮所拮抗(图4B)。孤啡肽(3 nmol/kg)sc加速了结肠的推进率(%), (48.0 ± 1.24 vs 43.5 ± 2.63 , $t = -4.5$, $P = 0.008$)。

■ 相关报道

- 1 严祥, 李海燕. 孤啡肽与胃肠动力. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2177-2180
- 2 李海燕, 严祥, 刘永铭. 慢传输性便秘发病机制研究进展. 国外医学消化系疾病分册 2004; 24: 366-369
- 3 李海燕, 严祥, 王金洋等. 孤啡肽在大鼠胃肠道的分布及意义. 第四军医大学学报 2005; 26: 318-320
- 4 李海燕, 严祥. 孤啡肽与消化系统. 国外医学消化系疾病分册 2005; 25: 177-180

■同行评价

该文涉及肠道神经一个较新的神经递质,有一定新意,实验设计合理,结果可信,讨论较充分。

3 讨论

阿片生物碱,比如吗啡,也包括合成的阿片复合物,在人类和动物中有严重的致便秘和抗腹泻活性^[12]。这些胃肠道的效应可限制这些复合物作为镇痛剂的使用。阿片生物碱致便秘的效应来自于他对平滑肌活性(比如张力和收缩力)的作用和抑制黏膜流体分泌的作用^[13]。阿片尽管能引起肌肉张力、相位活性增加,但阿片减慢结肠转运。其增加动力但延迟转运是由于增加了肌张力但减少了推进性蠕动波,导致了非迁移性收缩的形成^[14]。肠神经系统控制着胃肠运动,而孤啡肽是一种新的肠神经递质。本研究中孤啡肽引起离体结肠肌条的立即的强直性的收缩紧接着伴随节律性的收缩波。收缩波的振幅和频率变化在1-1000 nmol/L的范围内是剂量依赖性的(图1)。OFQ的收缩作用在不同的结肠平滑肌条稍有不同:大部分显示了一个大的起始收缩紧跟着相位反应(图3C1),偶尔,一些肌条显示了一个比较平缓的起始收缩紧跟着延长的相位反应(图3C2)。其机制有待进一步研究。在小鼠的脑膜上已经显示出了结合位点的异质性^[15]。可以确信的是,不同的OFQ受体亚型可能引起结肠收缩的不同形式。

孤啡肽诱导的离体结肠的收缩在经典的阿片受体拮抗剂纳洛酮存在的情况下不被影响(图2A)。为了确定是否孤啡肽的活性是通过神经通路介导的或者是否是一个直接的肌源性效应,在TTX(河豚毒素,一种神经传导阻断剂)存在的情况下检验了孤啡肽引起的收缩。结果由TTX引起的大鼠结肠肌条的自发收缩被增强,这是由于TTX取消了抑制性神经通路的效应,该抑制性神经通路能够抑制肌肉细胞的肌源性活性。并且在TTX存在的情况下OFQ不能引起更进一步的收缩(图3A)。这些结果说明孤啡肽诱导的收缩是通过位于大鼠结肠的壁内神经丛介导的。这与先前的研究结果一致:孤啡肽高度表达于肌间神经丛而非平滑肌上^[16-17]。孤啡肽受体ORLI1转录物被报道存在于胃肠道,因此,孤啡肽诱导的离体结肠平滑肌的收缩是通过位于肠神经系统中的ORLI1受体介导的。

离体结肠纵行肌条对孤啡肽(1000 nmol/L)的收缩反应不能被纳洛酮(1×10^{-6} mol/L)所拮抗,亦不能完全被[Nphe¹]NC(1-13)NH₂所拮抗(图2B)。[Nphe¹]NC(1-13)NH₂曾被认为是离体的豚鼠回肠和小鼠输精管标本中的孤啡肽受体的选择性的拮抗剂^[18],但在大鼠的脊髓中又是激动剂,在本研究中显示他是大鼠结肠中孤啡肽受

体的激动剂, [Nphe¹]NC(1-13)NH₂自身亦能引起明显的结肠收缩而且对孤啡肽诱导的结肠收缩无抑制效应。这一前体肽不同的作用说明在不同的组织中可表达不同的孤啡肽受体亚型。在MVD和GPI中已报道OFQ对电场刺激引起的肌肉收缩具有抑制效应^[19]。本实验显示, OFQ对电刺激引起的大鼠结肠收缩无明显影响(图3B)。在GPI中, OFQ(1×10^{-7} mol/L)能使EFS引起的豚鼠回肠的收缩减少50%,在大鼠回肠中也有相同的抑制效应。而且进一步研究显示OFQ可抑制EFS引起的大鼠回肠[³H]ACh的释放反应,却不能抑制EFS引起的大鼠结肠的[³H]ACh的释放反应。OFQ可抑制EFS对小鼠输精管(MVD)的收缩效应,但不抑制兔输精管的收缩,这说明物种的不同在确定OFQ的生理作用方面是非常重要的。而且, OFQ对胆碱能神经递质的抑制效应是区域特异性的,因为相对于回肠来讲, OFQ对胃的胆碱能神经递质的抑制效应是非常微弱的^[20]。因此, OFQ的作用机制和作用位点在胃肠道的不同区域可能有所不同。

孤啡肽1 μg/kg, iv可诱导麻醉大鼠近端结肠的相位性收缩(图4A), 孤啡肽的效应不能被纳洛酮所拮抗(图4B)。全身性应用孤啡肽立即刺激大鼠近端结肠的肌肉收缩, 收缩反应的快速出现说明这种新的肽类在周围水平直接施加了他的效应, 尽管中枢的调节机制不能被完全排除。结果提示孤啡肽在活体情况下也能刺激结肠的收缩。通常近端结肠的作用是混合肠内容物和液体, 而远端结肠是推进和排出粪便的。孤啡肽在近端和远端结肠的作用形式是不同的。在近端结肠主要诱导相位性收缩促进往返运动, 而在远端结肠主要引起高振幅收缩, 他可形成推进运动。Takahashi *et al*^[21]在活体中的研究显示: OFQ(1 ng/kg, perminute)诱导的大鼠结肠收缩能被reactive blue 2(P_{2U}嘌呤受体拮抗剂)明显拮抗, 说明OFQ通过抑制内源性ATP从结肠肌间神经丛中的嘌呤能神经中释放出来, 从而引起结肠收缩, 也就是说OFQ作用于位于嘌呤能抑制性运动神经元上的OFQ受体, 抑制ATP的释放, 从而引起大鼠结肠环肌层的收缩。Takahashi *et al*^[22]同样在活体中的研究显示, 孤啡肽(0.01-3 nmol/kg)iv以剂量依赖性的形式诱导大鼠结肠的收缩, 持续iv孤啡肽(1 nmol/kg, perminute)和强啡肽A(100 nmol/kg, perminute)在近端结肠诱导了相同的收缩相, 但在中部和远端结肠, 其收缩活性则完全不同。孤啡肽诱导的巨大收缩从中部向结肠远端迁移。相反, 强啡肽A引起的刺激性

收缩通过整个结肠, 而不是迁移至结肠远端. 孤啡肽(1-3 nmol/kg), sc加速结肠的转运, 但强啡肽A(30-100 nmol/kg)延迟了结肠转运. 故孤啡肽可能通过促进大鼠结肠收缩的迁移来加速结肠转运. NO和VIP参与介导肠管的下行性舒张, 这种下行性舒张降低了远端结肠的张力以便接受和容纳即将由巨大收缩带来的肠内容物. 而阿片可抑制结肠肌间神经丛中NO和VIP的释放, 因此强啡肽A可能抑制了NO和VIP介导的下行性舒张, 导致非迁移性收缩形成, 减慢结肠转运.

OFQ刺激结肠的收缩而且加速结肠的转运率除了显示ORL1受体存在于胃肠道外, 结果还支持这样一个假设: OFQ在结肠动力中起了一定生理学作用. OFQ似乎独立于经典的阿片肽之外而独立地调节结肠转运^[23]. OFQ对结肠动力的特异性的刺激作用对人类治疗结肠动力障碍可能有用^[24]. 作为一个年轻的神经肽系统, 孤啡肽药理学效应的广泛性表明ORL1受体激动剂或拮抗剂潜在的治疗价值^[25-26], 有助于拓宽结肠动力紊乱的治疗思路. 进一步研究胃肠激素的受体亚型、结合位点和传导途径必将突破结肠动力紊乱的难治性.

4 参考文献

- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 1995; 377: 532-535
- Witta J, Palkovits M, Rosenberger J, Cox BM. Distribution of nociceptin/orphanin FQ in adult human brain. *Brain Res* 2004; 997: 24-29
- Ueda H, Inoue M, Mizuno K. New approaches to study the development of morphine tolerance and dependence. *Life Sci* 2003; 74: 313-320
- Mogil JS, Pasternak GW. The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 381-415
- Kapusta DR. Neurohumoral effects of orphanin FQ/nociceptin: relevance to cardiovascular and renal function. *Peptides* 2000; 21: 1081-1099
- Osinski MA, Brown DR. Orphanin FQ/nociceptin: a novel neuromodulator of gastrointestinal function? *Peptides* 2000; 21: 999-1005
- Grond S, Meuser T, Pietruck C, Sablotzki A. Nociceptin and the ORL1 receptor: pharmacology of a new opioid receptor. *Anaesthesist* 2002; 51: 996-1005
- 向荣成, 历有名. 神经胃肠病. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 12-15
- Costa M, Brookes SJ. The enteric nervous system. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: S129-S137
- Taniguchi H, Yomota E, Nogi K, Onoda Y, Ikezawa K. The effect of nociceptin, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, on rat colonic contraction and transit. *Eur J Pharmacol* 1998; 353: 265-271
- Calo' G, Guerrini R, Bigoni R, Rizzi A, Marzola G, Okawa H, Bianchi C, Lambert DG, Salvadori S, Regoli D. Characterization of [Nphe(1)]no-ciceptin(1-13)NH(2), a new selective nociceptin receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 1183-1193
- Wollemann M, Benyhe S. Non-opioid actions of opioid peptides. *Life Sci* 2004; 75: 257-270
- Broccardo M, Guerrini R, Petrella C, Improta G. Gastrointestinal effects of intracerebroventricularly injected nociceptin/orphaninFQ in rats. *Peptides* 2004; 25: 1013-1020
- Fang Q, Guo J, Chang M, Chen LX, Chen Q, Wang R. Neuropeptide FF receptors exert contractile activity via inhibition of nitric oxide release in the mouse distal colon. *Peptides* 2005; 26: 791-797
- Rossi GC, Leventhal L, Bolan E, Pasternak GW. Pharmacological characterization of orphanin FQ/nociceptin and its fragments. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 282: 858-865
- O'Donnell AM, Ellis LM, Riedl MS, Elde RP, Mawe GM. Distribution and chemical coding of orphanin FQ/nociceptin-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of guinea pig intestines and sphincter of Oddi. *J Comp Neurol* 2001; 430: 1-11
- Broccardo M, Linari G, Guerrini R, Agostini S, Petrella C, Improta G. The effects of [Arg14, Lys15] nociceptin/orphanin FQ, a highly potent agonist of the NOP receptor, on *in vitro* and *in vivo* gastrointestinal functions. *Peptides* 2005; 26: 1590-1597
- Chang M, Peng YL, Dong SL, Han RW, Li W, Yang DJ, Chen Q, Wang R. Structure-activity studies on different modifications of nociceptin/orphanin FQ: identification of highly potent agonists and antagonists of its receptor. *Regul Pept* 2005; 130: 116-122
- Zhang G, Murray TF, Grandy DK. Orphanin FQ has an inhibitory effect on the guinea pig ileum and the mouse vas deferens. *Brain Res* 1997; 772: 102-106
- Broccardo M, Guerrini R, Petrella C, Improta G. Gastrointestinal effects of intracerebroventricularly injected nociceptin/orphaninFQ in rats. *Peptides* 2004; 25: 1013-1020
- Takahashi T, Bagnol D, Schneider D, Mizuta Y, Ishiguchi T, LePard K, Galligan JJ, Watson SJ, Owyang C. Orphanin FQ causes contractions via inhibiting purinergic pathway in the rat colon. *Gastroenterology* 2000; 119: 1054-1063
- Takahashi T, Mizuta Y, Owyang C. Orphanin FQ, but not dynorphin A, accelerates colonic transit in rats. *Gastroenterology* 2000; 119: 71-79
- Grond S, Meuser T, Pietruck C, Sablotzki A. Nociceptin and the ORL1 receptor: pharmacology of a new opioid receptor. *Anaesthesist* 2002; 51: 996-1005
- Calo' G, Guerrini R, Rizzi A, Salvadori S, Regoli D. Pharmacology of nociceptin and its receptor: a novel therapeutic target. *Br J Pharmacol* 2000; 129: 1261-1283
- Sun YY, Luo C, Li Z, Chen J. Differential actions of intrathecal nociceptin on persistent spontaneous nociception, hyperalgesia and inflammation produced by subcutaneous bee venom injection in conscious rats. *Shenglixue Bao* 2004; 56: 321-327
- Courteix C, Coudore-Civiale MA, Privat AM, Pelissier T, Eschalier A, Fialip J. Evidence for an exclusive antinociceptive effect of nociceptin/orphanin FQ, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, in two animal models of neuropathic pain. *Pain* 2004; 110: 236-245

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣

环氧合酶-2对人肝癌细胞增殖和凋亡的调节作用

杨震, 秦成勇, 朱菊人, 任万华, 王旻

■背景资料

COX-2参与细胞凋亡和增殖平衡的调节, 对肿瘤的发生、发展有着重要意义, 因此进一步研究COX-2抑制剂对肿瘤的作用已成为肿瘤靶向治疗研究的重点。特异性COX-2抑制剂celecoxib出色的疗效以及安全性和耐受性使得用于临床肿瘤治疗可能性增加。

杨震, 朱菊人, 任万华, 山东省立医院肝病中心 山东省济南市 250021

秦成勇, 山东省立医院消化科 山东省济南市 250021

王旻, 山东省立医院肿瘤中心 山东省济南市 250021

杨震, 2004年山东大学临床医学博士, 主治医师, 主要从事肝病的治疗。

通讯作者: 朱菊人, 250021, 山东省济南市经五路324号, 山东省立医院肝病中心。zhujrchina@hotmail.com

传真: 0531-86025677

收稿日期: 2006-03-03 接受日期: 2006-04-06

Modulatory roles of cyclooxygenase-2 in proliferation and apoptosis of hepatocarcinoma cells

Zhen Yang, Cheng-Yong Qin, Ju-Ren Zhu, Wan-Hua Ren, Min Wang

Zhen Yang, Ju-Ren Zhu, Wan-Hua Ren, Center of Hepatopathy, Shandong Provincial Hospital, Ji'nan 250021, Shandong Province, China

Cheng-Yong Qin, Department of Digestive Diseases, Shandong Provincial Hospital, Ji'nan 250021, Shandong Province, China

Min Wang, Center of Oncology, Shandong Provincial Hospital, Ji'nan 250021, Shandong Province, China

Correspondence to: Dr. Ju-Ren Zhu, Center of Hepatopathy, Shandong Provincial Hospital, 324 Jingwu Road, Ji'nan 250021, Shandong Province, China. zhujrchina@hotmail.com

Received: 2006-03-03 Accepted: 2006-04-06

Abstract

AIM: To observe the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and investigate the effects of COX-2 inhibitor, celecoxib, on the proliferation and apoptosis of hepatocarcinoma cells.

METHODS: The expression of COX-2 was detected by immunohistochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The effect of celecoxib on the growth of hepatocarcinoma cells (HepG₂ and Bel-7402) were evaluated by MTT assay and changes proliferation cell nuclear antigen (PCNA). The apoptosis of hepatocarcinoma cells induced by celecoxib and P-gp expression were detected by electron microscopy and flow cytometry. The expression of Survivin was analyzed by RT-PCR.

RESULTS: Celecoxib inhibited the growth and induced apoptosis of hepatocarcinoma cells in a time- and concentration-dependent manner. The inhibitory rates for HepG₂ cells were 70.98% ± 0.67% and 47.93% ± 1.08% after the cells were exposed to 200 and 100 μmol/L celecoxib, respectively, for 48 h, and 45.51% ± 1.35% and 14.35% ± 1.55% for 24 h; while the rates for Bel-7402 cells were 57.29% ± 0.67% and 43.84% ± 0.86% for 48 h, and 34.35% ± 0.63% and 15.35% ± 0.88% for 24 h (all *P* < 0.01). Substantial apoptosis was revealed by increment of apoptotic body under electron microscopy. After treatment with 100 μmol/L celecoxib for 24, 48, 72 and 96 h, the apoptosis rates of HepG₂ cells were 12.2% ± 2.44%, 4.0% ± 1.67%, 20.4% ± 4.38%, and 57.9% ± 5.74%, respectively, while those of Bel-7402 cells were 3.0% ± 1.05%, 18.5% ± 3.51%, 29.3% ± 3.25%, and 48.4% ± 4.77%, respectively, which were significantly different from those in the controls. The percentage of G₀/G₁ phase cells was markedly increased (HepG₂: 44.17% ± 1.01%, 59.60% ± 0.61%, 62.7% ± 1.22%; Bel-7402: 47.80% ± 0.41%, 58.60% ± 0.46%, 78.40% ± 1.95%; at 24, 48, and 72 h, respectively) in comparison with that of the controls (*P* < 0.01). COX-2 protein expression was obviously lower in HepG₂ cells than that in Bel-7402 cells. PCNA expression was greatly lessened after celecoxib treatment. COX-2 and Survivin were down-regulated by celecoxib, but not linearly correlated. MDR1/P-gp expression was reduced or changed little as time went by after celecoxib treatment.

CONCLUSION: COX-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the proliferation and induces the apoptosis of hepatocarcinoma cells *in vitro* a time- and concentration-dependent manner by down-regulating the expression of COX-2 and Survivin. COX-2 is correlated with MDR/P-gp and Survivin expression.

Key Words: Cyclooxygenase-2; Hepatocarcinoma; celecoxib; Survivin; Multi-drug resistance

Yang Z, Qin CY, Zhu JR, Ren WH, Wang M. Modulatory roles of cyclooxygenase-2 in proliferation and apoptosis of hepatocarcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi*

2006;14(14):1382-1387

摘要

目的: 观察环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)在肝癌细胞中表达, 探讨COX-2抑制剂celecoxib对肝癌细胞增殖和凋亡的作用。

方法: 免疫细胞化学、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法研究COX-2在肝癌细胞株中表达; MTT法观察COX-2抑制剂对肝癌细胞增殖的影响; 透射电镜及流式细胞仪观察celecoxib诱导肝癌细胞凋亡的作用、对细胞周期的影响及MDR1/P-gp表达的变化; 用RT-PCR方法检测Survivin mRNA药物处理后表达的变化。

结果: celecoxib对肝癌细胞抑制增殖、诱导凋亡呈时间和剂量依赖性。celecoxib作用HepG₂ 48 h抑制率为70.98%±0.67% (200 μmol/L)、47.93%±1.08% (100 μmol/L); Bel-7402为57.29%±0.67% (200 μmol/L)、43.84%±0.86% (100 μmol/L); 同样浓度但作用20 h, HepG₂为45.51%±1.35% (200 μmol/L)、14.35%±1.55% (100 μmol/L); Bel-7402则为34.35%±0.63% (200 μmol/L)、15.35%±0.88% (100 μmol/L), 不同浓度以及不同作用时间相比均有显著差异($P<0.01$); 100 μmol/L celecoxib作用24, 48, 72, 96 h的肝癌细胞凋亡率分别为12.2%±2.44%, 4.0%±1.67%, 20.4%±4.38%, 57.9%±5.74% (HepG₂)和3.0%±1.05%, 18.5%±3.51%, 29.3%±3.25%, 48.4%±4.77% (Bel-7402), 与对照组相比有显著差异($P<0.01$); 细胞周期分布改变, G₀/G₁期细胞比例增加, 24, 48, 72 h分别为: 44.17%±1.01%, 59.60%±0.61%, 62.7%±1.22% (HepG₂)和47.80%±0.41%, 58.60%±0.46%, 78.40%±1.95% (Bel-7402), 与对照组比较有显著差异($P<0.01$); 对照组PCNA蛋白表达呈强阳性(+++), 经药物处理后表达减弱, 并随时间延长而显著; HepG₂中COX-2蛋白表达明显弱于Bel-7402, 药物处理后表达也不同。Survivin在肝癌细胞株中呈高表达状态, celecoxib作用48 h mRNA表达降至零, 而72 h后表达水平又有上升; 两株肝癌细胞中经celecoxib处理后, MDR1/P-gp表达有降低的趋势(Bel-7402), 或是基本上不受影响(HepG₂)。

结论: COX-2抑制剂celecoxib体外对肝癌细胞有较强的细胞毒作用且以剂量、时间依赖方式抑制细胞增殖, 并诱导凋亡, 使细胞周期阻滞于G₁/S期。COX-2与P-gp, Survivin表达密

切相关。

关键词: 环氧合酶-2; 肝癌; 塞来昔布; Survivin; 多药耐药

杨震, 秦成勇, 朱菊人, 任万华, 王旻. 环氧合酶-2对人肝癌细胞增殖和凋亡的调节作用. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1382-1387

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1382.asp>

0 引言

环氧合酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸合成前列腺素的限速酶, 分为构成型COX-1和诱导型COX-2两种异构酶, 多数肿瘤组织及体外培养的肿瘤细胞株中COX-2呈高表达状态。实验研究结果显示, COX-2可能参与了细胞增殖和凋亡平衡的调节过程, 而细胞的增殖和分化异常、凋亡调控失常与肝癌的发生、发展关系密切, 因此进一步研究COX-2对肝癌细胞的增殖及凋亡的调节作用有着重要的意义。我们对人肝癌细胞株中COX-2表达以及COX-2抑制剂celecoxib对肝癌细胞增殖和凋亡的调节作用进行了相关的基础研究, 并就其机制进行了初步的探讨。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞株HepG₂和Bel-7402, 细胞在37℃, 50 mL/L CO₂条件下, 于RPMI 1640培养基中(100 mL/L新生牛血清), 以2.5 g/L胰蛋白酶、0.2 g/L EDTA消化, 传代。celecoxib(北京医药研究开发中心合成, 以无水乙醇溶解配至0.2 mol/L, -20℃保存), 顺铂(cisplatin, DDP)(山东齐鲁制药厂生产, 无菌生理盐水稀释至血浆峰值浓度的100倍分装, -20℃保存), MTT(Sigma公司), 兔抗人COX-2抗体、鼠抗人PCNA(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体、SABC试剂盒、DAB显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 鼠源性抗P-gp mAb、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠IgG mAb(Immunotech产品), Trizol、M-MuLase、Taq DNA聚合酶、逆转录反应体系、PCR反应体系、DEPC(上海生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 MTT比色法 肝癌细胞1×10⁴个/孔接种于96孔板中, 1 mL/L乙醇终浓度, 每种浓度设3个复孔, 设阴性对照及含相同浓度无水乙醇的空白对照, 作用不同时间后加入MTT溶液(5 g/L), 全自动酶标仪上以试验波长570 nm(参考波长

■研发前沿

肝癌不仅存在着细胞的过度增殖, 同时细胞的凋亡调控也呈异常状态, 并且细胞对药物的不敏感性和抗药性, 严重影响了疗效和预后, 成为亟待解决的问题。目前研究热点是发现有效的生物治疗靶点, 探讨其机制, 为治疗开辟新途径。

■创新盘点

COX-2, Survivin及P-gp在COX-2抑制剂celecoxib诱导肝癌细胞凋亡过程中表达的变化及相互作用未见有文献报道。

630 nm)测出每孔吸光度值(A 值), 计算细胞生长抑制率: 抑制率(IR) = (对照组 A 值-试验组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值) \times 100%。

1.2.2 免疫组化SABC技术 PCNA蛋白阳性染色为胞核呈棕黄色至棕褐色, COX-2蛋白阳性染色为胞质和核膜呈棕黄色。采用半定量积分法: 根据片上阳性细胞率(以计数10个高倍镜视野为准, $\leq 5\%$ 为0分, 6%-30%为1分, 31%-70%为2分, $\geq 70\%$ 为3分)和阳性细胞着色程度(着色程度0分为阴性, 1分为弱阳性, 2分为阳性, 3分为强阳性)分别记分, 两项指标之和达0-1分为“-”, 2分为“+”, 3-4分为“++”, 5-6分为“+++”; “-”~“+”为低表达, “++”~“+++”为高表达。

1.2.3 流式细胞仪检测 细胞以不同浓度药物分别孵育24, 48, 72, 96 h, 按时收集细胞, PBS代替一抗设立阴性对照。流式细胞仪测定细胞周期各个时相的分布比例、凋亡率以及P-gp蛋白的表达率。

1.2.4 RT-PCR法检测肝癌细胞COX-2和Survivin mRNA表达 收集药物作用前后的肝癌细胞, 提取细胞总RNA。引物: β -actin(产物317 bp): 5'-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3', 5'-CACTCTTGCTCGAAGTCCA-3'; Survivin(产物243 bp): 5'-AAGGCAGTGGCCTAAATCCT-3', 5'-CACCCTGCAGCTCTATGACA-3'; COX-2(产物531 bp): 5'-AAGCCTTCTCTAACCTCTCC-3', 5'-TAAGCACATCGCATACTCTG-3'。按试剂盒说明进行逆转录和扩增。取PCR产物10 μ L电泳, 紫外灯下摄片。采用图像分析仪分析数据, 获得各电泳条带的吸光度值(X), 用 β -actin的吸光度值(A)作为内参照, 计算基因的相对表达量(X/A)。

统计学处理 采用 t 检验。

2 结果

2.1 celecoxib对肝癌细胞生长的影响 celecoxib对细胞抑制率随时间延长及剂量的增大而升高。celecoxib作用HepG₂ 48 h抑制率为70.98% \pm 0.67%(200 μ mol/L)、47.93% \pm 1.08%(100 μ mol/L); Bel-7402为57.29% \pm 0.67%(200 μ mol/L)、43.84% \pm 0.86%(100 μ mol/L); 同样浓度但作用20 h, HepG₂为45.51% \pm 1.35%(200 μ mol/L), 14.35% \pm 1.55%(100 μ mol/L); Bel-7402则为34.35% \pm 0.63%(200 μ mol/L), 15.35% \pm 0.88%(100 μ mol/L)。

表1 人肝癌细胞COX-2, Survivin与 β -actin吸光度(X/A)的比值

	对照	DDP		celecoxib		
		24 h	48 h	24 h	48 h	72 h
COX-2: HepG ₂	0.188	0.580	0.340	0	0.310	0.877
Bel-7402	0.524	0.537	0.493	0	0.555	0
Survivin: HepG ₂	0.500	0.550	0.860	0.570	0	0.298
Bel-7402	0.539	0.907	0.352	0.360	0	0.460

L)。不同细胞株的不同浓度以及不同作用时间相比均有显著差异($P < 0.01$)。对照组(未经药物处理)PCNA蛋白表达呈强阳性(+++), 细胞核深染呈棕褐色; 经药物处理后表达减弱, 并且随时间延长而显著: 24 h为(++), 48 h为(+~++)。

2.2 celecoxib诱导肝癌细胞凋亡作用 透射电镜下发现, 对照组细胞胞核和细胞器亚微结构清晰, 核膜完整, 而经celecoxib处理后, 凋亡细胞增多, 而且同一电镜切片中可以观察到不同时期的凋亡形态学改变, 并可见坏死细胞及细胞碎片。流式细胞仪DNA直方图上出现典型的亚二倍体“凋亡峰”。100 μ mol/L celecoxib作用24, 48, 72, 96 h的肝癌细胞凋亡率分别为12.2% \pm 2.44%, 4.0% \pm 1.67%, 20.4% \pm 4.38%, 57.9% \pm 5.74%(HepG₂)和3.0% \pm 1.05%, 18.5% \pm 3.51%, 29.3% \pm 3.25%, 48.4% \pm 4.77%(Bel-7402)。与对照组相比有显著差异($P < 0.01$)。药物作用后G₀/G₁期细胞比例增加, 24, 48, 72 h分别为: 44.17% \pm 1.01%, 59.60% \pm 0.61%, 62.7% \pm 1.22%(HepG₂)和47.80% \pm 0.41%, 58.60% \pm 0.46%, 78.40% \pm 1.95%(Bel-7402), 与对照组比较有显著差异($P < 0.01$)。

2.3 celecoxib对COX-2表达的影响 两株细胞对照组中COX-2蛋白表达不同, HepG₂表达明显弱于Bel-7402; 药物处理不同时间后, COX-2表达变化亦不同: 0.1 \times PPC DDP组在0, 24, 48 h分别为+, +~++, ++ (HepG₂)和++, ++, +~++ (Bel-7402), 无减弱趋势; celecoxib组在0, 24, 48 h分别为+, -, + (HepG₂)和++, -, +~++ (Bel-7402), 加入药物24 h后表达明显降低, 但48 h反又增强。COX-2 mRNA表达见图1。人肝癌细胞COX-2与 β -actin吸光度(X/A)的比值见表1。

2.4 celecoxib对Survivin表达的影响 Survivin mRNA表达见图2。人肝癌细胞Survivin与 β -actin吸光度(X/A)的比值见表1。

2.5 不同药物对P-gp表达的影响见表2。

表 2 不同药物对细胞HepG₂, Bel-7402中P-gp表达的影响 (mean ± SD)

		24 h	48 h	72 h	96 h
HepG ₂ :	DDP	2.06 ± 0.28 ^a	6.03 ± 0.23 ^b	19.33 ± 0.78 ^b	11.90 ± 1.85 ^b
	DDP+celecoxib	15.40 ± 1.51 ^b	6.65 ± 0.69 ^b	5.65 ± 1.08 ^b	3.86 ± 0.60 ^b
	celecoxib	9.22 ± 1.17 ^b	11.60 ± 1.28 ^b	10.60 ± 1.67 ^b	9.03 ± 1.45 ^b
Bel-7402:	DDP	95.80 ± 0.66 ^a	80.40 ± 1.90 ^b	88.40 ± 1.25 ^b	61.70 ± 1.95 ^b
	DDP+celecoxib	99.30 ± 0.50 ^a	98.40 ± 0.26 ^a	65.50 ± 2.40 ^b	18.70 ± 2.69 ^b
	celecoxib	98.90 ± 0.30 ^a	86.30 ± 1.45 ^b	60.20 ± 2.60 ^b	23.50 ± 3.06 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组.

■应用要点

本文结果表明 celecoxib通过抑制COX-2表达进而引起Survivin、P-gp的下调, 最终达成抑制癌细胞增殖、诱导凋亡、逆转MDR、增强细胞对化疗药物的敏感性的作用, 但本文并非临床研究, 其确切临床作用尚需进一步研究.

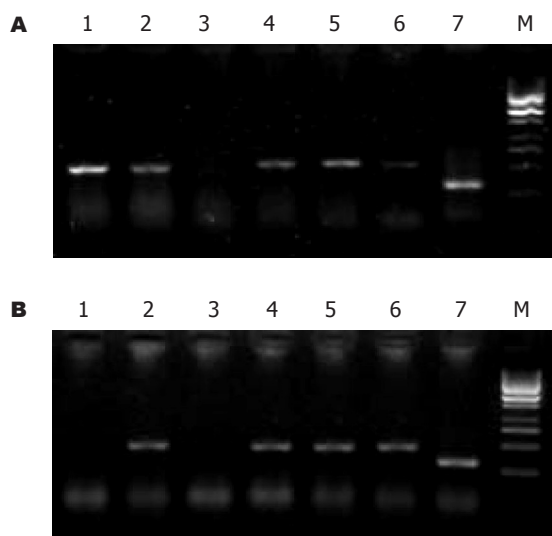


图 1 COX-2 mRNA表达. A: HepG₂中COX-2 mRNA表达; B: Bel-7402中COX-2 mRNA表达; 1, 2, 3: celecoxib作用细胞72, 48, 24 h; 4, 5: 0.3 mg/L DDP作用细胞48, 24 h; 6: 空白对照; 7: β-actin.

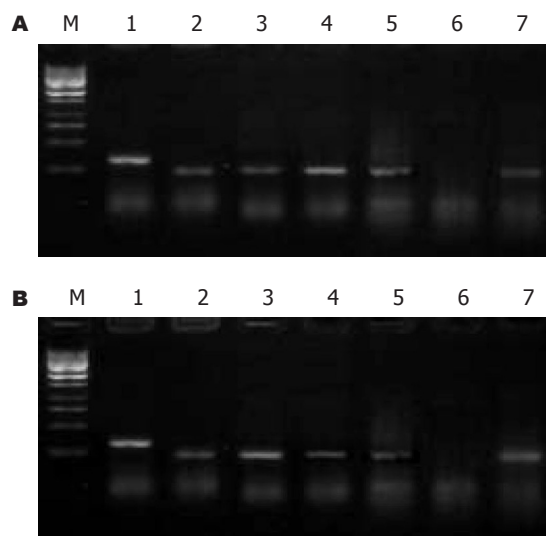


图 2 Survivin mRNA表达. A: HepG₂中Survivin mRNA表达; B: Bel-7402 Survivin mRNA表达; 1: β-actin; 2: 空白对照; 3, 4: 0.3 mg/L DDP作用细胞24, 48 h; 5, 6, 7: celecoxib作用细胞24, 48, 72 h.

3 讨论

环氧合酶-2基因定位于1号染色体, 呈诱导性表达, 在正常生理状态下多数组织不表达, 但在肿瘤中却往往呈过表达状态, 肝癌组织中COX-2表达水平亦显著升高, 并且与癌细胞的分化以及肝癌的转移、预后及术后复发密切相关, 鉴于此进一步研究COX-2抑制剂对肝癌细胞的作用有着重要意义. COX-2抑制剂celecoxib安全性高且疗效同样出色, 对肿瘤细胞的抑制作用明显强于其他COX-2抑制剂^[1-3], 并有可能逆转肿瘤消耗引起的消瘦而对正常细胞的结构、凋亡无明显影响^[4]. 将celecoxib作用于肝癌细胞株HepG₂及Bel-7402, 结果发现, 有显著的抑制增殖和诱导凋亡作用. 电镜下可观察到药物处理后典型的凋亡细胞形态, 流式细胞仪检测细胞凋亡更为敏感, celecoxib处理组细胞凋亡率呈

逐渐增长趋势, 细胞周期分布亦发生改变, G₀/G₁期比率逐渐增高, S期逐渐降低, 而细胞分裂周期中决定细胞生长速度和细胞凋亡的关键即是G₁期, 提示通过阻碍细胞DNA的合成而诱导凋亡. 实验中发现不论是强COX-2表达的Bel-7402还是较弱COX-2表达的HepG₂, celecoxib作用后均呈现COX-2表达的迅速降低, 而细胞凋亡率呈上升趋势, 表明celecoxib依赖COX-2途径诱导凋亡是可能的. 然而诱导细胞凋亡所需浓度远远高于抑制PGE₂所需浓度; 并且有研究发现COX-2抑制剂对某些COX-2超表达和COX-2表达阴性肿瘤细胞抑制增殖和诱导凋亡的作用未见有显著差异^[5-6], 所以近来众多研究倾向于非COX-2依赖性途径解释凋亡机制. 实验中也观察到celecoxib诱导细胞凋亡的作用并非完全与COX-2表达呈正比, 只是程度有差异而无本质的差别, 强COX-2表达的Bel-7402细胞抑制率反而

■同行评价

本文的研究内容已有文献报道,显示COX-2抑制剂celecoxib体外对肝癌细胞有较强的细胞毒作用,并以剂量时间依赖方式抑制增殖,诱导凋亡,使细胞阻滞于G₁/S期,可能使肝癌生物治疗的新靶点。文章选题先进,设计科学,可能为治疗肝癌开辟新途径。

低于HepG₂(包括任何浓度梯度),虽Bel-7402凋亡率稍高,但是电镜下观察到HepG₂细胞碎片明显多于Bel-7402,推测可能是凋亡继发细胞死亡所致,表明低COX-2表达的HepG₂反较Bel-7402敏感,并且celecoxib影响COX-2表达的效用并非线性,随时间延长COX-2表达又有增强,但细胞凋亡率并没有相应变化趋势,这与有关报道是一致的,进而提示我们celecoxib诱导细胞凋亡过程中非COX-2依赖性途径的存在。已知在人类癌症中均存在着较高程度的药物抵抗,尤以肝癌为著。目前研究最多的仍是P-gp介导的MDR,耐药细胞表面大多均有P-gp过度表达。而COX-2与MDR功能及表达有显著相关性^[7-8]: COX-2水平升高有助于MDR表达,能够增加MDR1基因产物产量并增强其功能。Ratnasinghe *et al*^[9]认为,可能是COX-2表达上调引起前列腺素合成增加,诱导PKC、C-Jun的表达,而PKC、C-Jun的表达增加又诱导P-gp的表达所致,并且此作用可被特异性COX-2抑制剂阻断。实验中对HepG₂、Bel-7402细胞研究发现,对照组COX-2表达水平高的细胞株Bel-7402 MDR基因表达产物P-gp总体上表达也较高; celecoxib处理组P-gp表达呈降低倾向(Bel-7402),或是基本上不受影响(HepG₂);而celecoxib联合小剂量(0.1×PPC)顺铂处理组同样不仅不引起P-gp表达增强,还使得细胞凋亡率升高,表明celecoxib可以通过降低P-gp表达、逆转MDR,并提高肝癌细胞对化疗药物顺铂的敏感性、增加其疗效。Hashitani *et al*^[10]观察celecoxib作用于头颈部癌细胞株SCC25和HSG时可以明显增强细胞对抗癌药物的敏感性,并且与诱导凋亡率几乎呈平行状态,也表明了COX-2与MDR功能及表达显著相关。然而随药物作用时间延长,COX-2表达又有增强趋势, P-gp表达水平却持续降低,二者并非线性相关,提示可能有其他影响因素。凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis, IAP)家族中新近克隆的同族体Survivin,可能是迄今发现的最强的凋亡抑制因子,具有肿瘤特异性表达的特点,在肝癌的发生、发展过程中有着重要作用^[11]。其阳性表达率与肿瘤复发及预后等显著相关^[12-14],可作为肝癌患者判断预后以及术后复发的一个独立因素^[15],并且Survivin抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤细胞的增殖以及正常细胞有丝分裂以后基本不表达的特点使其有望成为治疗上一个较为合理的潜在靶点。Ambrosini *et al*研究发现,持续转染反义Survivin的Hela细胞在去生长

因子的情况下出现大量细胞的凋亡,细胞增殖同时也受到抑制。空载体转染3 d后,细胞增殖288%,而反义Survivin转染细胞增殖20%。通过流式细胞仪测定细胞凋亡率:短暂转染与转染空载体相比,反义Survivin cDNA出现二倍体凋亡峰;稳定转染时凋亡峰增加1.4倍。实验中发现HepG₂及Bel-7402细胞中Survivin呈高表达状态,celecoxib诱导肝癌细胞凋亡时表达即显著降低,作用48 h时, Survivin表达几测不到,因而COX-2抑制剂celecoxib可能同时也通过下调Survivin表达而诱导细胞发生凋亡。在顺铂处理组Survivin表达却呈上升趋势,表明Survivin基因可能和肝癌获得性多药耐药性有关,Notarbartolo *et al*^[16]研究结果也表明Survivin参与了化疗药物及其他凋亡诱导剂的抵抗,这种表达的上调可能是肝癌细胞在化疗药物作用下“细胞生存”的一种分子机制,也是肝癌细胞一种获得性的耐药性。

总之, COX-2抑制剂celecoxib诱导细胞凋亡作用系下调COX-2, Survivin及P-gp表达,影响细胞周期分布等多种因素综合作用的结果, COX-2与P-gp, Survivin表达密切相关,因此设想是否能以COX-2为靶点,通过反义技术诱导肿瘤细胞凋亡从而为治疗开辟新的途径尚需进一步研究。

4 参考文献

- 1 Patti R, Gumired K, Reddanna P, Sutton LN, Phillips PC, Reddy CD. Overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human primitive neuroectodermal tumors: effect of celecoxib and rofecoxib. *Cancer Lett* 2002; 180: 13-21
- 2 Waskewich C, Blumenthal RD, Li H, Stein R, Goldenberg DM, Burton J. Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2-negative hematopoietic and epithelial cell lines. *Cancer Res* 2002; 62: 2029-2033
- 3 Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, Kawai S. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors show a differential ability to inhibit proliferation and induce apoptosis of colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 2002; 531: 278-284
- 4 Davis TW, Zweifel BS, O'Neal JM, Heuvelman DM, Abegg AL, Hendrich TO, Masferrer JL. Inhibition of cyclooxygenase-2 by celecoxib reverses tumor-induced wasting. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 929-934
- 5 Grosch S, Tegeder I, Niederberger E, Brautigam L, Geisslinger G. COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J* 2001; 15: 2742-2744
- 6 Agarwal B, Swaroop P, Protiva P, Raj SV, Shirin H, Holt PR. Cox-2 is needed but not sufficient for apoptosis induced by Cox-2 selective inhibitors in colon cancer cells. *Apoptosis* 2003; 8: 649-654
- 7 Sorokin A. Cyclooxygenase-2: potential role in

- regulation of drug efflux and multidrug resistance phenotype. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 647-657
- 8 Patel VA, Dunn MJ, Sorokin A. Regulation of MDR-1 (P-glycoprotein) by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2002; 277: 38915-38920
- 9 Ratnasinghe D, Daschner PJ, Anver MR, Kasprzak BH, Taylor PR, Yeh GC, Tangrea JA. Cyclooxygenase-2, P-glycoprotein-170 and drug resistance; is chemoprevention against multidrug resistance possible? *Anticancer Res* 2001; 21: 2141-2147
- 10 Hashitani S, Urade M, Nishimura N, Maeda T, Takaoka K, Noguchi K, Sakurai K. Apoptosis induction and enhancement of cytotoxicity of anticancer drugs by celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in human head and neck carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 2003; 23: 665-672
- 11 Ito T, Shiraki K, Sugimoto K, Yamanaka T, Fujikawa K, Ito M, Takase K, Moriyama M, Kawano H, Hayashida M, Nakano T, Suzuki A. Survivin promotes cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000; 31: 1080-1085
- 12 Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by Survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5071-5074
- 13 Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J, Martin C, Font A, Barnadas A, Abad A. A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of Survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2100-2104
- 14 Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, Shinoda N, Sato A, Toyama T, Mitsui A, Nishiwaki T, Moriyama S, Kudo J, Fujii Y. Expression of Survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int J Cancer* 2001; 95: 92-95
- 15 Ikeguchi M, Ueda T, Sakatani T, Hirooka Y, Kaibara N. Expression of Survivin messenger RNA correlates with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Diagn Mol Pathol* 2002; 11: 33-40
- 16 Notarbartolo M, Cervello M, Dusonchet L, Cusimano A, D'Alessandro N. Resistance to diverse apoptotic triggers in multidrug resistant HL60 cells and its possible relationship to the expression of P-glycoprotein, Fas and of the novel anti-apoptosis factors IAP (inhibitory of apoptosis proteins). *Cancer Lett* 2002; 180: 91-101

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.

www.wjgnet.com

食管癌组织环氧化酶-2的表达与血管生成的关系

产松苗, 欧希龙, 孙为豪, 陈国胜, 颜芳, 邵耘, 许海尘, 薛绮萍

■背景资料

近年来, COX-2与肿瘤的关系日益受到人们的重视, 肿瘤的血管形成方面的研究也比较热门. COX-2在食管癌发生、发展及预后中的作用方面的研究较多, 本文旨在探讨COX-2表达与食管癌主要临床病理特征和血管生成的关系.

产松苗, 欧希龙, 陈国胜, 颜芳, 东南大学临床医学院附属中大医院消化科 江苏省南京市 210009

孙为豪, 邵耘, 许海尘, 薛绮萍, 南京医科大学第一附属医院老年医学科 江苏省南京市 210029

产松苗, 1996年河北医科大学毕业, 东南大学临床医学院2003级研究生, 主要从事消化系统肿瘤的血管形成及其干预机制方面的研究.

通讯作者: 孙为豪, 210029, 江苏省南京市, 南京医科大学第一附属医院老年医学科. weihaosun@hotmail.com

收稿日期: 2006-04-22 接受日期: 2006-05-08

Expression of cyclooxygenase-2 in esophageal carcinoma and its correlation with angiogenesis

Song-Miao Chan, Xi-Long Ou, Wei-Hao Sun, Guo-Sheng Chen, Fang Yan, Yun Shao, Hai-Chen Xu, Qi-Ping Xue

Song-Miao Chan, Xi-Long Ou, Guo-Sheng Chen, Fang Yan, Department of Gastroenterology, the Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University Clinical Medical College, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China
Wei-Hao Sun, Yun Shao, Hai-Chen Xu, Qi-Ping Xue, Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Wei-Hao Sun, Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China. weihaosun@hotmail.com

Received: 2006-04-22 Accepted: 2006-05-08

Abstract

AIM: To investigate the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and its correlation with the angiogenesis and clinicopathological features in esophageal carcinoma.

METHODS: Ninety tumor specimens resected from patients with squamous cell carcinoma of the esophagus were obtained, and 34 corresponding paracancerous normal tissues were randomly selected as the controls. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of COX-2. Monoclonal antibody against CD34 was used for displaying vascular endothelial cells, and microvascular density (MVD) was determined by counting the CD34-positive cells. The correlations of COX-2 expression with MVD and clinicopathological parameters of the

patients were analyzed.

RESULTS: The positive rates of COX-2 and MVD expression in the cancerous tissue were 84.4% and 29.68 ± 3.81 , respectively, which were significantly higher than those in the normal esophageal mucosa (20.6%, $\chi^2 = 45.47$, $P = 0.00$; 15.12 ± 2.80 , $t = 20.28$, $P = 0.00$). COX-2 expression was closely correlated with clinical TNM classification ($\chi^2 = 7.99$, $P = 0.005$), cellular differentiation ($\chi^2 = 7.99$, $P = 0.005$) and lymph node metastasis ($\chi^2 = 9.61$, $P = 0.002$) in squamous cell carcinoma of the esophagus. The mean values of MVD were associated with clinical TNM classification ($t = -7.09$, $P = 0.00$) and lymph node metastasis ($t = -7.90$, $P = 0.00$). The spearman rank correlation test showed that tumor MVD was positively associated with COX-2 expression ($r = 0.607$, $P = 0.00$).

CONCLUSION: Over-expression of COX-2 is correlated with tumor invasion and lymph node metastasis in esophageal carcinoma, suggesting that COX-2 contributes to the development of esophageal cancer by promoting angiogenesis.

Key Words: Cyclooxygenase-2; Esophageal carcinoma; Angiogenesis; Microvascular density; Immunohistochemistry

Chan SM, Ou XL, Sun WH, Chen GS, Yan F, Shao Y, Xu HC, Xue QP. Expression of cyclooxygenase-2 in esophageal carcinoma and its correlation with angiogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1388-1393

摘要

目的: 探讨环氧化酶-2(COX-2)在食管癌组织的表达及其与肿瘤血管生成的关系.

方法: 免疫组化法检测食管鳞癌手术切除标本90例和癌旁正常黏膜34例中COX-2表达, 采用抗CD34抗体标记微血管内皮细胞, 计算微血管密度(MVD). 分析COX-2表达与MVD及其与食管癌主要临床病理特征的相关性.

结果: 食管癌组织COX-2阳性表达率为84.4%

显著高于癌旁正常黏膜的20.6% ($\chi^2 = 45.47, P = 0.00$). COX-2表达与肿瘤细胞分化程度、临床TNM分期和淋巴结转移密切相关, TNM分期中Ⅲ+Ⅳ期的食管鳞癌组织中COX-2表达率为92.9%, 显著高于Ⅰ+Ⅱ期的70.6% ($\chi^2 = 7.99, P = 0.005$). 高、中分化的食管鳞癌组织中COX-2表达率为92.9%, 显著高于低分化的70.6% ($\chi^2 = 7.99, P = 0.005$). 伴有淋巴结转移的食管鳞癌组织中COX-2表达率为94.3%, 显著高于无淋巴结转移的70.3% ($\chi^2 = 9.61, P = 0.002$). 食管癌组织MVD值为 29.68 ± 3.81 , 显著高于癌旁正常黏膜的 15.12 ± 2.80 ($t = 20.28, P = 0.00$). MVD与肿瘤的TNM分期和淋巴结转移密切相关, TNM分期中Ⅲ+Ⅳ期的食管鳞癌组织中MVD值为 31.46 ± 3.52 , 显著高于Ⅰ+Ⅱ期的 26.74 ± 2.06 ($t = -7.09, P = 0.00$). 伴有淋巴结转移的食管鳞癌组织中MVD为 31.72 ± 3.43 , 显著高于无淋巴结转移的 26.76 ± 2.01 ($t = -7.90, P = 0.00$). Spearman等级相关分析表明, MVD与COX-2表达呈显著正相关($r = 0.607, P = 0.00$).

结论: COX-2异常表达及其诱导的血管生成在食管癌的侵袭和淋巴结转移中起重要作用.

关键词: 环氧化酶-2; 食管肿瘤; 血管生成; 微血管密度; 免疫组织化学

产松苗, 欧希龙, 孙为豪, 陈国胜, 颜芳, 邵耘, 许海尘, 薛绮萍. 食管癌组织环氧化酶-2的表达与血管生成的关系. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1388-1393

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1388.asp>

0 引言

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是前列腺素合成的限速酶, 已知COX至少有2种亚型, 即COX-1和COX-2. 国内外研究表明, COX-2在食管癌的发生、发展和转移中起重要作用^[1-2]. 血管生成是指从已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展而成的新生血管的过程, 恶性肿瘤的生长、浸润和转移必须依赖肿瘤血管生成, 微血管密度(microvascular density, MVD)是反映恶性肿瘤侵袭和转移等生物学行为的一个重要指标^[3-4]. 体外研究结果表明, COX-2刺激癌细胞分泌促血管生成因子而诱导血管形成^[5]. 然而, 食管癌组织中COX-2表达和血管生成的关系尚不清楚. 因此, 我们采用免疫组化方法, 检测食管鳞癌组织和癌旁正常黏膜中COX-2表达, 旨在探讨COX-2表达与食管癌主要临床病理特征和

血管生成的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 收集2001-07/2005-07上海梅山医院(南京)手术切除并经病理证实为食管鳞癌90例, 男76例, 女14例; 年龄40-75(中位62)岁. 食管上段13例, 中下段77例; 溃疡型57例, 覃伞型18例, 髓质型10例, 缩窄型5例; 高分化26例, 中分化30例, 低分化34例. 根据国际抗癌联盟(UICC)美国抗癌联合会(AJCC)的TNM分期标准^[6]分为: Ⅰ+Ⅱ期34例, Ⅲ+Ⅳ期56例. 有淋巴结转移者53例, 无淋巴结转移37例. 所有患者手术前均无非甾体类抗炎药治疗及化、放疗或其他针对肿瘤的治疗, 且有完整的临床和病理资料. 所有标本均经40 g/L中性甲醛固定24 h后取肿瘤中心部分制成蜡块, 另随机选择34例距肿瘤2 cm以上且经病理证实为正常食管黏膜作为对照.

1.2 方法 免疫组化染色: 采用链霉素—生物素—过氧化物酶(SP)染色法, 具体操作步骤按SP免疫组化试剂盒说明书进行. 石蜡包埋的标本层厚4 μm 连续切片, 常规脱蜡至水. 切片置10 mmol/L柠檬酸缓冲液(pH 6.1)中, 微波加热(95℃, 10 min)修复抗原, 3 mL/L过氧化氢甲醇溶液室温孵育30 min阻断内源性过氧化物酶活性. 一抗为山羊抗人COX-2多克隆抗体(Santa Cruz, 美国, 工作浓度为1:200)或鼠抗人CD34mAb(Neo Markers, 美国, 工作浓度为1:100), 4℃过夜孵育; PBS淋洗3次, 每次5 min, 滴加生物素化二抗, 37℃孵育60 min; PBS淋洗3次, 每次5 min, 滴加链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液, 37℃孵育20 min; PBS淋洗3次, 每次5 min, DAB显色. 细胞核用苏木素复染1 min, 中性树脂封片. 用已知COX-2表达强阳性的乳腺癌组织切片作为阳性对照, 以PBS替代一抗作阴性对照. COX-2蛋白阳性染色为细胞质和细胞核出现棕黄色颗粒, 根据阳性染色细胞百分率和阳性细胞着色强度进行半定量分析, 阳性细胞率 $\leq 4\%$ 为0分, 5%-29%为1分, 30%-59%为2分, $\geq 60\%$ 为3分. 未着色或染色强度与背景相似者为0分, 着色浅略高于背景色为1分, 中等着色明显高于背景而呈棕黄色为2分, 强染呈深棕黄色者为3分. 根据两项积分将COX-2表达分为4级: 0-1分为阴性(-), 2分为弱阳性(+), 3-4分为中等强度阳性(++), ≥ 5 分者为强阳性(+++). 阳性表达率以表达阳性的病例(包括弱阳性、中等阳性和强阳性之和)占总病例数的百分比表示. 按Weidner^[7]推荐的方法在低倍镜下

■ 相关报道

已有的研究表明, COX-2表达与食管癌主要临床病理特征的关系的报道不一致, Yu *et al*研究表明, COX-2表达水平与食管鳞癌患者的年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、临床分期和淋巴结转移等均无相关性. 而Nozoe *et al*报道COX-2在食管鳞癌组织的表达与肿瘤的TNM分期和淋巴结转移呈正相关.

■创新盘点

本文发现COX-2表达与肿瘤细胞分化程度、临床TNM分期和淋巴结转移密切相关,并且MVD与COX-2表达呈显著正相关,提示COX-2可能是通过促进肿瘤新生血管形成的机制参与食管癌的发生和发展过程。

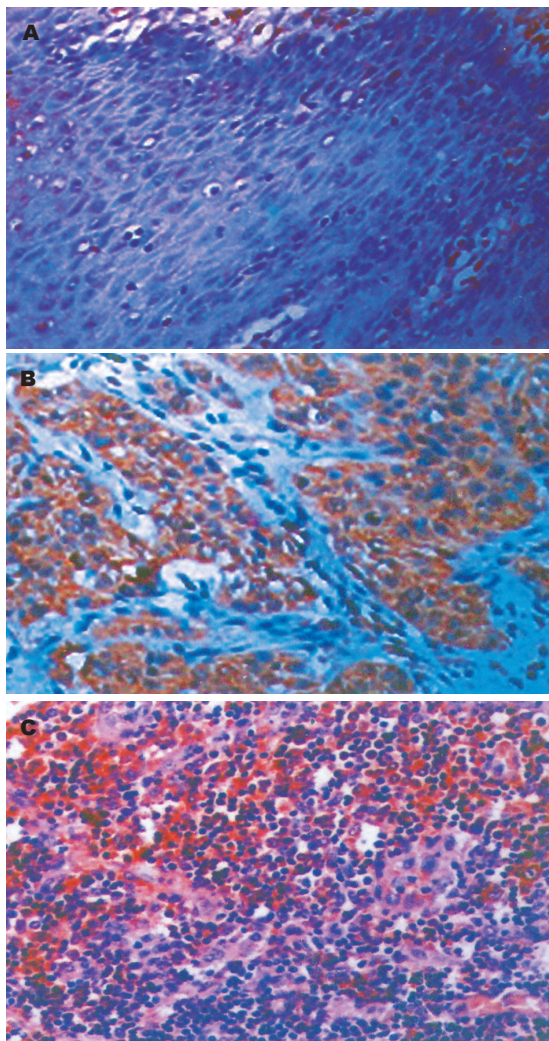


图1 食管组织中COX-2表达(SP×100). A: 正常食管黏膜微弱表达; B: 鳞癌细胞高表达; C: 淋巴结癌细胞COX-2高表达。

(×100)选择癌灶周围间质血管密集区即“热点”(hot spot),然后在高倍镜下(×400),随机计数5个不同视野内微血管数,再求其平均值为MVD.计数时管腔直径小于或等于50 μm者判为微血管,直径大于50 μm或管壁含有肌层者不作为微血管计数,另外单个染色细胞或成群无管腔的染色细胞也作独立微血管计数。

统计学分析 MVD以均数±标准差表示.计数资料采用 χ^2 检验与秩和检验;计量资料采用 t 检验与方差分析;等级相关性采用Spearman等级相关分析.所有数据均采用SPSS 13.0统计软件进行分析, $P<0.05$ 表示差异有显著意义。

2 结果

2.1 COX-2在鳞癌组织中的表达 COX-2在正常食管黏膜中表达微弱(图1A),阳性表达率为20.6%。而食管鳞癌组织中COX-2表达率为

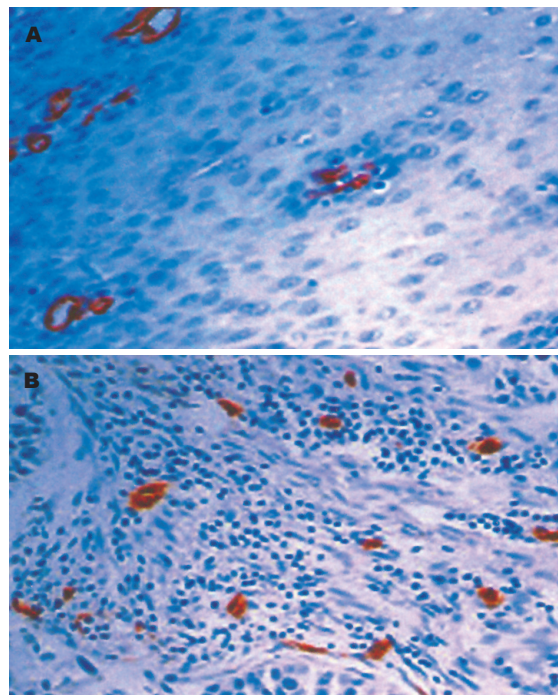


图2 食管组织中CD34表达(SP×100). A: 正常食管黏膜; B: 鳞癌间质“热点”。

表1 食管组织COX-2的表达(n)

食管	n	COX-2表达				表达率
		-	+	++	+++	
正常黏膜	34	27	4	3	0	20.6%
鳞癌组织	90	14	2	20	54	84.4% ^b

^b $P<0.01$ vs 正常黏膜。

84.4%,其表达率和表达强度均显著高于癌旁正常黏膜($\chi^2 = 45.47, P = 0.00<0.01$,表1)。阳性染色主要位于肿瘤细胞的胞质中,棕黄色颗粒状呈弥漫性分布于整个胞质或沿核膜周边呈线状分布(图1B)。此外,癌周的炎性细胞、纤维母细胞和血管内皮细胞可见少量COX-2表达,浸润至淋巴结的癌细胞亦可见阳性染色(图1C)。COX-2表达与食管鳞癌患者的年龄、性别、肿瘤的部位及病理形态无关($P>0.05$),而与肿瘤的TNM分期、细胞分化程度和淋巴结转移密切相关(表2)。TNM分期中III+IV期的食管鳞癌组织中COX-2表达率为92.9%,显著高于I+II期的70.6%($\chi^2 = 7.99, P = 0.005<0.01$)。高、中分化的食管鳞癌组织中COX-2表达率为92.9%,显著高于低分化的70.6%($\chi^2 = 7.99, P = 0.005<0.01$)。伴有淋巴结转移的食管鳞癌组织中COX-2表达率为94.3%,显著高于无淋巴结转移的70.3%($\chi^2 = 9.61, P = 0.002<0.01$)。

表 2 COX-2表达和MVD与食管鳞癌临床病理特征的关系

临床病理特征	n	COX-2表达				表达率(%)	MVD (mean ± SD)
		-	+	++	+++		
年龄(岁)							
<60	33	5	1	10	17	84.8	29.01 ± 2.51
≥60	57	9	1	10	37	84.2	30.06 ± 4.37
男	76	10	2	14	48	86.8	29.68 ± 3.84
女	14	4	0	4	6	71.4	29.67 ± 3.78
肿瘤部位							
上段	13	4	2	2	5	69.2	31.37 ± 4.31
中下段	77	10	0	18	49	87.0	29.39 ± 3.67
TNM分期							
I + II	34	10	1	11	12	70.6	26.74 ± 2.06
III + IV	56	4	1	9	42	92.9 ^b	31.46 ± 3.52 ^b
溃疡型	57	9	1	8	39	84.2	29.44 ± 4.10
蕈伞型	18	2	1	7	8	88.9	29.50 ± 3.83
髓质型	10	2	0	3	5	80.0	31.25 ± 2.75
缩窄型	5	1	0	2	2	80.0	29.90 ± 1.18
分化程度							
高、中	56	4	1	11	40	92.9	29.92 ± 4.27
低	34	10	1	9	14	70.6 ^b	29.28 ± 2.93
淋巴结转移							
有	53	3	0	12	38	94.3 ^b	31.72 ± 3.43 ^b
无	37	11	2	8	16	70.3	26.76 ± 2.01

^bP<0.01.

2.2 CD34、COX-2表达和MVD CD34抗体使大部分毛细微血管和单个内皮细胞染色后, 正常食管黏膜和癌组织中微血管均得到很好的显示(图2A,B). 癌组织中微血管形态不规则, 分布不均, 肿瘤与周围组织交界的浸润缘微血管最密集, 呈棕褐色深染, 逗点状、小管状或条索状, 肌间血管也清晰可辨. 食管癌组织MVD范围在23.1-37.9之间, 均数为29.68±3.81, 与正常食管黏膜15.12±2.80相比, 差异有显著性($t = 20.28, P = 0.00 < 0.01$). MVD与食管鳞癌临床病理特征的关系见表2, MVD与肿瘤的TNM分期和淋巴结转移密切相关, TNM分期中III+IV期的食管鳞癌组织中MVD值为31.46±3.52, 显著高于I+II期的26.74±2.06($t = -7.09, P = 0.00 < 0.01$). 伴有淋巴结转移的食管鳞癌组织中MVD为31.72±3.43, 显著高于无淋巴结转移的26.76±2.01($t = -7.90, P = 0.00 < 0.01$). COX-2表达阴性(-)、弱阳性(+)、中等强度阳性(++)和强阳性(+++)食管癌标本的MVD分别为24.68±0.87、26.45±0.64、29.45±2.95和31.18±3.43. 经方差分析, 组间MVD差异有统计学意义($F = 17.71, P = 0.00 < 0.01$). 经Spearman等级相关分析, COX-2表达与MVD呈显著正相关($r = 0.607, P = 0.00 < 0.01$).

3 讨论

食管癌是一些国家和地区的常见恶性肿瘤, 也是

■应用要点

COX-2异常表达及其诱导的血管生成在食管癌的侵袭和淋巴结转移中起重要作用, 为特异性COX-2抑制剂在食管癌预防和治疗中的作用提供理论依据.

我国高发恶性肿瘤之一, 95%为鳞状细胞癌. 侵袭和转移是恶性肿瘤的主要生物学行为, 也是影响治疗效果和预后的重要因素. 因此, 研究食管癌侵袭和转移的机制并采取有效的措施进行干预, 对防治食管癌降低癌症死亡率具有重要意义. 近年来, 国内外关于COX-2在食管癌发生、发展中的作用方面的研究较多. Zhang *et al*^[8]比较了食管癌高发区河北磁县和低发区黑龙江省两地内镜活检标本的COX-2表达差异性, 结果发现鳞癌的COX-2表达率在高、低发区间有显著性差异(6%对90%), 而腺癌的COX-2表达率无显著性差异(60%对75%). Shamma *et al*^[9]用免疫组化和RT-PCR方法检测COX-2在正常食管黏膜、食管黏膜鳞状上皮异型增生(重度和轻度)、原位癌、早期浸润癌和进展期食管鳞癌中的表达, 结果显示, COX-2在重度异型增生的食管鳞状上皮中表达异常增高; Zhi *et al*^[10]也发现COX-2在正常食管黏膜中表达微弱, 在食管黏膜鳞状上皮异型增生、原位癌和浸润癌中的表达明显升高, 提示COX-2表达上调可能是食管鳞癌发生过程中的早期事件之一. 已知COX-2是前列腺素合成的关键酶, 前列腺素是一类具有多重生物学作用的分子, 在肿瘤的发生上有抑制宿主免疫、刺激细胞增殖、减少细胞凋亡等作用. 我们发现COX-2在食管鳞癌组织的表达显著高于癌旁正常黏膜, 且与肿瘤的TNM分期和淋巴结转移呈正相关, 提

■名词解释

环氧化酶(cyclooxygenase, COX)是花生四烯酸(arachidonic acid, AA)合成前列腺素(prostaglandins, PGs)的限速酶。目前已知COX至少有两种,即COX-1和COX-2。COX-2是一种诱导酶,他参与合成的PGs与炎症、细胞增殖等病理生理作用有关。近年来COX-2与肿瘤的关系日益受到人们的重视。

示COX-2不仅参与肿瘤的发生过程,并与肿瘤的侵袭和转移密切相关。这与Nozoe *et al*^[11]报道一致。我们还发现COX-2表达与食管癌的细胞分化程度有关,在高、中分化食管鳞癌中COX-2表达率为92.9%,显著高于低分化的70.6%, Yang *et al*^[12]认为这可能是由NF-kappaB(核转录因子-κB)调控的。关于COX-2表达与食管鳞癌的关系,有与上文不同的报道, Yu *et al*^[13]研究表明, COX-2表达水平与食管鳞癌患者的年龄、性别、肿瘤大小、分化程度、临床分期和淋巴结转移等均无相关性。Kawabe *et al*^[14]发现食管鳞癌的COX-2表达仅与肿瘤部位有关,即位于食管中、下段癌的COX-2表达明显高于颈部和上段食管癌。Kuo *et al*^[15]研究结果显示, COX-2表达水平与食管鳞癌的远处转移和肿瘤分期呈负相关,但与患者的生存期并无相关性。而Sivula *et al*^[16]认为COX-2的表达与食管癌的组织学类型和外科手术前治疗有关,术前接受化疗患者低COX-2表达组预后差,且与远处转移有关。因此, COX-2表达与食管鳞癌临床病理特性的关系需要进一步探讨。

实体肿瘤的生长分为无血管的缓慢生长阶段和有血管的快速增殖阶段,无血管期内肿瘤细胞的生长主要依靠细胞周围的营养物质和氧气生存,如果没有血管生成,原发肿瘤的生长不会超过1-2 mm³。随着瘤体的增大,肿瘤本身或宿主组织将建立新生血管网以供给瘤体营养。恶性肿瘤的生长、浸润和转移必须依赖肿瘤血管生成,微血管密度(MVD)是反映恶性肿瘤侵袭和转移等生物学行为的一个重要指标。CD34是存在于血管内皮细胞上的一种抗原,其分子已被纯化和克隆,是一种不同于Ⅷ因子相关抗原的蛋白质。用CD34进行免疫组化染色来显示血管内皮细胞比Ⅷ因子相关抗原更加敏感,特异性也更强^[17]。近年来国内外有关MVD与肿瘤浸润、转移及预后关系的研究逐渐增多,内容涉及多系统肿瘤,结果进一步证实MVD与多数实体性肿瘤侵袭、转移有关^[18-21]。本研究结果显示,食管鳞癌组织中MVD显著大于癌旁正常黏膜,食管鳞癌组织中MVD与肿瘤的TNM分期和淋巴结转移密切相关。此外, MVD随COX-2表达增强而增加, Spearman等级相关分析表明, COX-2表达和MVD呈显著正相关。因此, COX-2过度表达不但促进细胞增殖、抑制细胞凋亡,而且可能通过促进肿瘤新生血管形成的机制参与食管癌的发生和发展过程。Kase *et al*^[22]也认为,食管鳞癌组织中COX-2的表达与高微血管密度

及低凋亡指数有关。

近年来,特异性COX-2抑制剂如L-748706^[23]、NS-398^[24]等在食管癌的化学预防作用方面的研究逐渐增多并取得了一定的成果。因此,特异性COX-2抑制剂的开发和应用有望为食管癌预防和治疗开辟新的途径。

4 参考文献

- 1 产松苗,欧希龙,孙为豪.环氧化酶-2与食管癌.国外医学肿瘤学分册 2005; 32: 687-690
- 2 Heeren P, Plukker J, van Dullemen H, Nap R, Hollema H. Prognostic role of cyclooxygenase-2 expression in esophageal carcinoma. *Cancer Lett* 2005; 225: 283-289
- 3 Neri D, Bicknell R. Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 436-446
- 4 Folkman J, Browder T, Palmblad J. Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application. *Thromb Haemost* 2001; 86: 23-33
- 5 Leung WK, To KF, Go MY, Chan KK, Chan FK, Ng EK, Chung SC, Sung JJ. Cyclooxygenase-2 upregulates vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in human gastric carcinoma. *Int J Oncol* 2003; 23: 1317-1322
- 6 Sobin LH, Fleming ID. TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition (1997). Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer* 1997; 80: 1803-1804
- 7 Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995; 36: 169-180
- 8 Zhang W, Wang L, Chang A, Jin Y, Rao J. Immunohistochemical analysis of cyclooxygenase-2 expression in premalignant and malignant esophageal glandular and squamous lesions in Cixian, China. *Cancer Detect Prev* 2003; 27: 243-249
- 9 Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, Yano M, Inoue M, Matsuura N, Shiozaki H, Monden M. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1229-1238
- 10 Zhi H, Wang L, Zhang J, Zhou C, Ding F, Luo A, Wu M, Zhan Q, Liu Z. Significance of COX-2 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2005; 13
- 11 Nozoe T, Ezaki T, Kabashima A, Baba H, Maehara Y. Significance of immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Surg* 2005; 189: 110-115
- 12 Yang GZ, Li L, Ding HY, Zhou JS. Cyclooxygenase-2 is over-expressed in Chinese esophageal squamous cell carcinoma, and correlated with NF-kappaB: an immunohistochemical study. *Exp Mol Pathol* 2005; 79: 214-218
- 13 Yu HP, Xu SQ, Liu L, Shi LY, Cai XK, Lu WH, Lu B, Su YH, Li YY. Cyclooxygenase-2 expression in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Lett* 2003; 198: 193-201
- 14 Kawabe A, Shimada Y, Uchida S, Maeda M, Sato F, Itami A, Imamura M. Expression of cyclooxygenase-2 is associated with carcinogenesis of the lower part of thoracic esophageal squamous

- cell carcinoma and p53 expression. *Oncology* 2002; 62: 46-54
- 15 Kuo KT, Chow KC, Wu YC, Lin CS, Wang HW, Li WY, Wang LS. Clinicopathologic significance of cyclooxygenase-2 overexpression in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2003; 76: 909-914
- 16 Sivula A, Buskens CJ, van Rees BP, Haglund C, Offerhaus GJ, van Lanschot JJ, Ristimäki A. Prognostic role of cyclooxygenase-2 in neoadjuvant-treated patients with squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer* 2005; 116: 903-908
- 17 Anthony PP, Ramani P. Endothelial markers in malignant vascular tumours of the liver: superiority of QB-END/10 over von Willebrand factor and Ulex europaeus agglutinin 1. *J Clin Pathol* 1991; 44: 29-32
- 18 Goddard JC, Sutton CD, Furness PN, O'Byrne KJ, Kockelbergh RC. Microvessel density at presentation predicts subsequent muscle invasion in superficial bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2583-2586
- 19 Karademir S, Sokmen S, Terzi C, Sagol O, Ozer E, Astarcioglu H, Coker A, Astarcioglu I. Tumor angiogenesis as a prognostic predictor in pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 489-495
- 20 Fujioka S, Yoshida K, Yanagisawa S, Kawakami M, Aoki T, Yamazaki Y. Angiogenesis in pancreatic carcinoma: thymidine phosphorylase expression in stromal cells and intratumoral microvessel density as independent predictors of overall and relapse-free survival. *Cancer* 2001; 92: 1788-1797
- 21 Sun WH, Sun YL, Fang RN, Ou XL, Xue QP, Shao Y, Xu HC, Cheng YL. Relationship between cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in patients with gastric cancer. *Zhonghua Weichang Waike Zazhi* 2005; 8: 343-347
- 22 Kase S, Osaki M, Honjo S, Adachi H, Tsujitani S, Kaibara N, Ito H. Expression of cyclo-oxygenase-2 is correlated with high intratumoral microvessel density and low apoptotic index in human esophageal squamous cell carcinomas. *Virchows Arch* 2003; 442: 129-135
- 23 Stoner GD, Qin H, Chen T, Carlton PS, Rose ME, Aziz RM, Dixit R. The effects of L-748706, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1590-1595
- 24 Yu HP, Shi LY, Lu WH, Su YH, Li YY, Xu SQ. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human esophageal cancer and in vitro inhibition by a specific COX-2 inhibitor, NS-398. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 638-642

■同行评价

本文探讨COX-2表达与食管癌主要临床病理特征和血管生成的关系, 具有较重要的价值。

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 •

肠屏障功能障碍的基础与临床会议

本刊讯 肠屏障功能障碍的基础与临床会议将于2006-06-17/18在上海举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文和800字摘要, 2006-05-30截稿。

2 联系方式

上海市北京西路1623号上海市医学会中华消化杂志编辑部候虹鲁主任(邮编: 200032), 封面注明: 肠屏障会议征文

细胞角蛋白20检测在大肠癌微转移中的临床意义

熊兵红, 程勇, 王严庆

■背景资料

大量研究表明, 微转移(micro-metastases)是大肠癌根治术后复发和转移的主要原因之一。近年来随着微转移在肿瘤研究领域中的广泛开展, 人们开始研究大肠癌微转移, 以期获得更准确、更早期的转移信息, 为临床分期及预后判断、辅助治疗提供更多的依据。随着分子生物学、分子免疫学的迅速发展, 使大肠癌的淋巴结、血液、骨髓及各脏器用常规组织学难以诊断的癌细胞微转移灶的检测成为可能。细胞角蛋白20(cytokeratin-20, CK20)是新近发现的一种多肽, 局限在胃肠上皮细胞, 几乎所有大肠癌都明显表达。通过检测大肠癌患者淋巴结、血液、骨髓中CK20 mRNA的表达来诊断微转移, 来指导临床大肠癌的分期、判断预后、指导治疗显示出较高的临床价值。

熊兵红, 程勇, 王严庆, 重庆医科大学附属第一医院普外科 重庆市 400016
重庆市卫生局基金资助课题, NO. 205-2-115
通讯作者: 程勇, 400016, 重庆市, 重庆医科大学附属第一医院 普外科, chengyonghcq@yahoo.com.cn
电话: 023-89011170
收稿日期: 2006-02-22 接受日期: 2006-03-03

摘要

近年来随着微转移在肿瘤研究领域中的广泛开展, 人们开始研究大肠癌微转移, 以期获得更准确、更早期的转移信息, 为临床分期及预后判断、辅助治疗提供更多的依据。随着分子生物学、分子免疫学的迅速发展, 使大肠癌的淋巴结、血液、骨髓及各脏器用常规组织学难以诊断的癌细胞微转移灶的检测成为可能。细胞角蛋白20(cytokeratin-20, CK20)是新近发现的一种多肽, 局限在胃肠上皮细胞, 具有严格的组织特异性, 几乎所有大肠癌都明显表达, 优于其他标志物, 尤其适用于检测大肠癌微转移。通过检测大肠癌患者淋巴结、血液、骨髓中CK20 mRNA的表达来诊断微转移, 对指导临床大肠癌的分期、判断预后复发、指导治疗显示出较高的临床应用价值。微转移是一项独立的预后指标, 其价值优于Dukes分期和肿瘤分级。现综述细胞角蛋白20检测在大肠癌微转移中的临床应用及意义研究进展。

关键词: 大肠癌; 细胞角蛋白20; 微转移

熊兵红, 程勇, 王严庆. 细胞角蛋白20检测在大肠癌微转移中的临床意义. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1394-1402
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1394.asp>

0 引言

大肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。肿瘤的浸润和转移是恶性肿瘤的重要特征, 也是肿瘤患者死亡的主要原因。近年来大肠癌根治术的方法不断改进, 但是患者的预后未明显改善。随着免疫学及分子生物学的发展, 使大肠癌的微转移检测成为可能^[1]。细胞角蛋白20(cytokeratin20, CK20)是新近发现的一种多肽, 局限在胃肠上皮细胞, 具有严格的组

织特异性, 且几乎所有大肠癌都明显表达。通过逆转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)和荧光定量PCR(fluorescence quantitative-polymerase chain reaction, FQ-PCR)技术检测CK-20 mRNA表达来诊断大肠癌转移成为目前研究热点之一。

1 微转移概述

自1869年Asworth首次在外周血中发现癌细胞以来, 肿瘤微转移逐步引起人们的重视。微转移(micrometastases, MM)又称隐性转移(occult metastasis), 一般指非血液系统的恶性肿瘤在发展过程中, 播散并存活于淋巴系统、血循环、骨髓、肝、肺等组织器官中的微小肿瘤细胞灶。他可以是单个瘤细胞或独立的瘤细胞灶, 无特殊血供。直径小于2 mm, 常无任何临床表现。能够逃免疫监视、侵犯血管和发展成为肉眼可见的病变。常规检查方法如CT、MRI、单抗放射显影技术、普通病理检查都很难发现。在不同的组织中这一概念又有具体的含义, 如淋巴结微转移指常规组织学水平淋巴结切片未能检出的转移; 在血液中, 常规方法不能检测出肿瘤细胞, 故任何能检出的血循环中的瘤细胞均属微转移; 骨髓的微转移则指在骨髓抽吸和活检标本中检出了瘤细胞, 而患者无任何临床上和放射影像上远处或骨髓转移的证据^[2]。研究认为, 临床转移一般由微转移发展而来。但仅少数微转移最终能发展为临床转移。微转移的瘤细胞灶常以单个细胞或微小细胞团形式, 通过淋巴系统、血液循环转移至其他组织器官。也可以直接侵袭周围组织或种植于体腔。微转移发展成为临床转移至少经过4个阶段: (1)微量肿瘤细胞自原发灶脱离; (2)适应新宿主代谢环境, 逃避新宿主机体免疫监控; (3)侵袭正常组织在新宿主组织中存活并增殖; (4)在新宿主中新血管形成, 肿瘤生长。微转移的转归取决于癌细胞的细胞生物学特性、机体的免疫状态及宿主器官的微环境。动物实验表明血循环中至少有10 000个肿瘤细胞才可以显性转移, 多数发生凋亡, 少数

进入休眠期, 极少数发生增殖. 微转移灶可长期处于G₀期, 其增殖与死亡处于平衡状态, 只有当机体遭受种种打击或免疫力下降时, 休眠中的肿瘤细胞摆脱抑制状态而持续增殖并发展为临床显性转移.

2 大肠癌微转移检测研究现状

2.1 大肠癌微转移检测方法

2.1.1 连续切片 是最早用于检测淋巴结转移的一种粗略方法, 主要是针对手术切除的淋巴结, 可使阳性率增加20%, 但缺点是敏感性差且工作量大、粗糙, 不适用于血循环、骨髓的微转移检测, 难以推广. 还有应用淋巴结廓清术(clearance technique)(二甲苯-乙醇清除术)和组织培养法、组织微阵列(tissue microarray, TMA)^[3]等技术进行微转移检测的报道.

2.1.2 免疫学技术 大约有免疫组织化学技术(immunohistochemical technique, IHC)、免疫荧光法(immunofluorescence assay, IFA)、放射免疫导向法(radioimmunoguided surgery, RIGS)、流式细胞分析法(flow cytometry, FCM), 这些都具有重要应用价值, 但是由于抗体的标化和选择、单抗的质量、交叉反应、机体产生自身抗体、结果判断缺乏客观统一标准等因素影响其敏感性和特异性.

2.1.3 免疫磁珠分离技术(immunomagnetic separation, IMS)IMS是新近建立的方法, 用以改进循环单个瘤细胞的检测. 经此方法得到的细胞再进行mRNA分离. 富集的样本可以准备作IHC, FCM, IFA, RT-PCR检测. 比传统的采用全血直接用于RT-PCR的方法敏感性提高约10倍, 可有效检出10⁷的全细胞中的一个肿瘤细胞. 另一方面, 通过IMS分离得到的细胞进行RT-PCR研究, 可以有效避免由血液不正常转录而导致的假阳性的产生, 提高RT-PCR检测方法的特异性.

2.1.4 分子生物学方法 有核酸杂交法(如Southern、Northern印迹杂交法)、突变等位基因特异性扩增法(mutant allele-specific amplification, MASA)、聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及近年出现的荧光定量PCR技术(fluorescence quantitative-polymerase chain reaction, FQ-PCR). PCR技术又称体外基因扩增方法, 由美国的Kary Mullis博士在1983年发明, 并于1985年公开报道, 1993年荣获诺贝尔奖. 1991年Smith *et al*首次应用PCR技术检测到血循环中存在转移的肿瘤细

胞. 之后PCR技术被广泛应用于微转移的研究. PCR, RT-PCR检测具有高度敏感性、特异性, 可准确检测1 g组织或1 mL液体中的1个癌细胞^[4], 被认为是目前检测微转移的最有效的方法. RT-PCR具有较高的敏感性和特异性, 检测时间相对较短, 能在24-48 h内得出结果, 同时检测多个标本; 免疫组化法仅能反映标本的局部, 而RT-PCR能反映整个标本的情况; RT-PCR操作方法固定, 相对易标准化和控制, 人为因素干扰少, 且判断结果较形态学方法容易客观且准确. 其缺点是: 技术要求较高, 严格要求新鲜标本及其迅速处理, 易受污染.

还有PCR结合单链DNA构型多肽分析(PCR-SSCP), 异源双链分析法(HA), 等位基因特异性寡核苷酸杂交法(PCR-ASO), PCR产物的限制性片段长度多肽分析法(PCR-restriction-fragment-length-polymorphism assay, PCR-RFLP), DNA直接测序技术(DS).

FQ-PCR技术是由美国Applied Biosystems公司在1996年率先研制成功的荧光定量技术. 该技术是根据荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)原理, 设计相应的荧光标记核酸探针, 通过PCR反应对相应靶DNA进行均相定性定量测定的技术^[5]. 具有技术操作简便、快速、结果判断客观、重复性能好、定量范围宽(可包括0-10¹⁴个拷贝/L)、无需样品梯度稀释、高灵敏性、高特异性、高精确性的特点, 采用完全封闭式的操作系统, 不需PCR后处理, 克服了传统的PCR技术易受污染, 造成假阳性等诸多缺点. 配以相应的荧光PCR仪, 整个PCR过程可实现自动化, 且耗时短, 操作方便, 较之传统的定量方法劳动强度小, 易于标准化和推广应用. 因此, FQ-PCR技术是基因诊断、疗效评价、技术创新和临床研究的高新技术手段, 具有广泛的开发应用前景.

2.2 大肠癌微转移检测的标志物

2.2.1 当今, 分子生物学研究发现肿瘤标志物种类众多, 主要包括: (1)特异性基因: 包括染色体的异常、基因点突变、基因缺失等. 正常组织一般不伴有这些改变, 检测相关特异性基因可诊断微转移. 如p53, ras, DCC, erbB-2等. (2)肿瘤特异性标志物: 指在肿瘤细胞中存在而在正常细胞中不存在, 如CEA、AFP. (3)组织特异性标志物: 指在肿瘤起源组织中存在, 而在其他组织中不存在, 特别是在淋巴细胞和血细胞中不存在, 如角蛋白20(cytokeratin-20, CK20). (4)转移

■研发前沿

利用RT-PCR或者FQ-PCR来检测大肠癌手术前后外周血和术中肠系膜静脉血中的CK20 mRNA来判断手术操作是否促进循环肿瘤细胞微转移, 确定CK20在大肠癌中的临床应用价值, 明确微转移与临床转移、复发、生存期的关系, 是否能为临床恶性肿瘤的病情判断、治疗以及预后评估提供更好的依据, 这是目前大肠癌微转移的研究热点之一.

■名词解释

患者可能在术前其外周血、骨髓或淋巴结就存在少量的肿瘤细胞或者手术期间由于手术操作挤压出现肿瘤细胞的播散。由此提出了许多不同新名词,例如:循环肿瘤细胞,潜伏肿瘤细胞,微小残存灶,播散肿瘤细胞,尽管命名不同,这些名词大都指用常规的临床诊断手段如CT、MRI、普通病理检查都很难发现,而用免疫学方法、分子生物学方法才能发现的少量肿瘤细胞。这些肿瘤细胞既可以是疾病早期或治疗前就存在的,也可以是疾病晚期出现或治疗后残存。广义的循环肿瘤细胞指恶性肿瘤在发展的过程中播散并存活于外周血、骨髓、淋巴管以及各组织器官中的肿瘤细胞,这些细胞尚未形成转移结节,当结节直径 ≤ 2 mm时称微转移。

特异性基因。(5)肿瘤伴随的病毒。利用任何一种标志物虽然都可能建立一种检测微转移的方法,但一个理想的标志物应同时具备敏感性和特异性。目前,大肠癌标志物以k-ras、p53基因、CEA、CD44、CK19研究为多,但他们各有其优缺点。Hayashi *et al* 1995年采用PCR对120例大肠癌患者常规诊断无转移的淋巴结进行了k-ras、p53基因突变检测,发现71例(59%)有淋巴结微转移存在。然而,较多的研究显示,目前大肠癌患者中尚没有一种已知的突变类型一贯地出现,而且大肠癌细胞中k-ras、p53突变率仅为50%左右,该指标敏感性较低,从而限制了该方法的应用。Mori *et al* 1995年曾对65例行根治术的消化道肿瘤(大肠癌20例)及乳腺癌病人的406枚淋巴结分别进行组织学检测和CEA mRNA RT-PCR检测,并随访 24 ± 12 个月,结果163枚组织学检测阴性而RT-PCR检测阳性,微转移检出率为40.1%,82枚二者检测均阳性,其余161枚以及25枚对照组淋巴结二者检测均阴性。有淋巴结转移的15例病人6例复发,29例只有微转移的病人4例复发,21例无转移者无复发,证实了CEA mRNA RT-PCR诊断肿瘤淋巴结微转移的敏感性及其特异性。然而,1996年Jonas *et al*报道各类大肠癌细胞中只有65% CEA表达阳性,健康人群却有23% CEA mRNA表达阳性,肝转移患者中84%表达阳性。Mafune *et al*认为CEA虽被作为肿瘤标志物广泛存在,但在大肠癌的表达水平存在差异,且CEA还受到一些非肿瘤疾病的影响。CD44v mRNA其优点为正常人无表达,但可能存在假阴性或假阳性,报道结果不尽相同,甚至有人提出相反意见。也有人发现某些大肠癌无CD44突变,且CD44v6 mRNA在溃疡性结肠炎组织的隐窝区上皮细胞表达也增高,故特异性不高。CK19是常见的角蛋白之一,对于大肠癌,其RT-PCR的检测明显提高了区域淋巴结的微转移诊断率,但CK19 mRNA低、中度表达见于头颈部肿瘤、肺癌、乳腺癌、泌尿系肿瘤等多种肿瘤,特异性差,且也有假阳性结果,故降低了其诊断血循环、骨髓中微转移的价值。

2.2.2 CK20的理化特性和分布特点 细胞角蛋白(cytokeratin, CK)分布于外胚层起源细胞中的中间纤维丝,为细胞骨架成分之一。至少含有30种不同的蛋白链,大致包括20种上皮细胞角蛋白和10种头发角蛋白,分为I型和II型。I型为酸性蛋白(CK10-20),II型为中性蛋白(CK1-10),两型中各自特异对应,共同表达,与上皮的表达有

对应的特异性。CK20由Moll *et al*于1990年发现含424个氨基酸, M_r 为48553,等电点为5.66,属酸性CK。其编码总长18 kb,含8个外显子,7个内含子。其mRNA长1.75 kb,CK20的合成首先出现于第8周胚胎的肠黏膜上皮,之后分布于杯状细胞和绒毛细胞中。不同于其他CK,CK20具有更为严格的上皮组织特异性。正常组织中,CK20见于肠黏膜细胞、胃黏膜、幽门腺体细胞、十二指肠黏膜、泌尿伞状细胞、表皮Merkel细胞。而其他正常组织如乳腺、平滑肌、血细胞、淋巴细胞、造血细胞等均为阴性。CK20的表达在细胞发生化生、恶变、肿瘤转移、体外培养等改变时持续表达阳性。CK20的分布特点使其成为良好的肿瘤标志物,也被用来鉴别肿瘤组织来源。

3 CK20检测在大肠癌微转移的临床应用

RT-PCR检测肿瘤细胞敏感性高,其基本原理是通过扩增出肿瘤细胞“标志性”靶RNA来证实肿瘤细胞的存在。因此,选择适当的靶RNA是决定检测结果是否准确可靠的重要因素。目前,临床上作为检测大肠癌微转移的靶RNA主要有:(1)癌胚抗原(CEA) mRNA;(2)CD44剪接变异体(CD44v) mRNA;(3)细胞角蛋白(cytokeratin, CK) mRNA。前二者被视为肿瘤特异性RNA,而CK20为组织特异性RNA,仅在上皮来源的组织或细胞中表达。CK20不同于其他角蛋白,他非常局限在胃肠上皮细胞,几乎所有大肠癌都明显表达且在侵袭、转移、扩散到其他组织器官时始终保持稳定。国外学者研究表明采用CK20 mRNA RT-PCR法可以在1 mL全血中检出一个上皮来源的肿瘤细胞。可见CK20 mRNA RT-PCR法具有细胞形态学、免疫细胞化学技术不可比拟的敏感性。此外,Burchill *et al*对包括结肠癌在内的一系列细胞株进行检测还发现,CK18, CK19在正常外周血中均有较高的阳性率(分别为88%, 40%),而CK20仅在结肠癌细胞中表达,正常外周血细胞为阴性。可见,CK20 mRNA具有严格的上皮组织特异性,满足高灵敏的RT-PCR法对靶RNA的特殊要求。因此,通过检测大肠癌患者的淋巴结、血循环、骨髓中的CK20 mRNA的表达,可作为判断大肠癌患者淋巴结、血循环、骨髓中存在癌细胞的标志。故CK20被认为是检测大肠癌微转移的良好标志物。

3.1 CK20检测在大肠癌淋巴结微转移的临床应用 淋巴结转移与否是大肠癌病人重要预后因素之一。常规病理学检查易发生遗漏,直接影响着

临床分期的准确性、预后预测及辅助治疗的选择. 赵旗 *et al*^[6]对80例Dukes B期大肠癌淋巴结行间断连续切片结合细胞角蛋白20抗体免疫组织化学染色方法检测淋巴结微转移, 并对全部患者进行随访. 结果大肠癌淋巴结微转移与性别、年龄、肿瘤部位、大体分型、以及肿瘤最大径长无关, 而与肿瘤的分化程度和肿瘤侵犯肠周径有关; 微转移阳性组5 a生存率为36.7%, 微转移阴性组5 a生存率为72.2%, 经Log-Rank检验差异有统计学意义($P<0.01$), 微转移阳性组与阴性组复发率分别为75%和28.8%, 差异有统计学意义($P<0.01$). 这表明间断切片法结合CK20免疫组织化学方法有助于检出Dukes B期大肠癌淋巴结微转移, 增加每个淋巴结的切片数量有助于提高微转移的检出率; 低分化及癌肿侵犯肠周径 $>3/4$ 者易发生淋巴结微转移: 淋巴结微转移阳性组与阴性组的生存率与复发率有显著差异. 于雁 *et al*^[7]应用抗细胞角蛋白(CK)和癌胚抗原(CEA)mAb, 对82例大肠癌(Dukes B期)根治术后经病理常规检查为转移阴性的667枚淋巴结进行免疫组化(SP法)检测, 结合随访资料进行临床预后分析. 结果是转移阴性的82例667枚淋巴结中, 18例(21.9%, 18/82)42枚(6.3%, 42/667)淋巴结中发现微小转移的癌细胞, 其中13例10 a内因局部复发和远处转移死亡. 64例免疫组化检测阴性的患者仅24例复发死亡. 免疫组化诊断微转移阳性和阴性组10 a生存率分别是27.8%(5/18)和62.5%(40/64). 差异非常显著($P<0.05$). 结论显示应用肿瘤特异性抗体检测常规病理检查阴性的淋巴结有助于发现微小转移的癌细胞, 指导治疗有重要意义. 而RT-PCR法可提高其检出率. Gunn *et al*^[8]对15例大肠癌病人的109枚淋巴结用RT-PCR法同时进行CK19和CK20 mRNA的检测, 结果84枚CK19阳性, 26枚CK20阳性. 对照组的40枚淋巴结中, 34枚CK19阳性, 无CK20阳性. 可见, 作为大肠癌淋巴结转移的标志, CK19 mRNA缺乏特异性, 相反, CK20 mRNA具有较高特异性. 随后类似的一些研究^[9-11]证实了CK20分子检测的方法有着比传统的组织病理方法更高的灵敏度, 提高了淋巴结微转移检出率的临床分期准确性. 以上结果均提示RT-PCR对检测淋巴结微转移有较大实用价值, 对患者分期判断预后、确定手术和术后的治疗方案具有重要的指导作用.

3.2 CK20检测在大肠癌血循环微转移的临床应用 血行转移是大肠癌另一种主要转移途径. 检

测大肠癌血液微转移, 对判断病人预后、指导术后辅助治疗同样具有重要意义. 常规组织学检查难以实现外周血微转移的诊断, 而RT-PCR技术由于其高度敏感性和特异性, 使外周血中癌细胞的检测成为现实. 国外学者研究表明采用CK20 mRNA RT-PCR法可以在1 mL全血中检出一个上皮来源的肿瘤细胞. Funaki *et al*^[12]用RT-PCR法检测大肠癌患者外周血中CK20 mRNA结果显示该法具有高度敏感性, 1 mL健康志愿者血中混合1个肿瘤细胞即能检出. 转移复发者全为阳性, 无远处转移者阳性率为50%, 2例阴性患者经过16 mo术后随访未见复发. Funaki *et al*^[13]又进一步研究了9例分期为Dukes C期的患者, 其中5例可在外周血检出CK20 mRNA阳性, 这5例中有3例在随后1,7和11 mo分别出现了复发, 而其余的6例阴性患者在20 mo的观察期内均未见复发. Xu *et al*^[14]的研究显示随着Dukes分期的进展, CK20 mRNA的表达水平增加, 但没有显著性意义. 结果表明检测大肠癌患者外周血CK20 mRNA有助于鉴别肿瘤细胞的早期脱落, 也可监测疾病的进展和观察临床治疗效果. Koch *et al*^[15]的实验证明检测大肠癌肝切除的血源性肿瘤细胞可预测肿瘤复发, 有助于大肠癌肝转移患者的辅助治疗个体化和运用外科策略来阻止术中血源性肿瘤细胞脱落. 骆成玉 *et al*^[16]应用RT-PCR法检测大肠癌患者术前和术后不同时期外周血中CK20 mRNA表达情况, 结果发现术前外周血中查出42例CK20阳性表达(58.3%), 术后3 d外周血中CK20阳性检出较术前多5例, 术后经早期化疗后22例转阴. 袁正强 *et al*^[17]的研究显示CK20 mRNA阳性检出率与Dukes分期、淋巴结转移和肝转移存在显著性差异, 术后3 d内外周血CK20阳性检出较术前多出2例. 随访发现, 外周血CK20扩增阳性者, 术后发生肝转移的机会增加(33.3%). 这说明检测大肠癌患者外周血液微转移CK20可提高大肠癌临床分期的准确性, 帮助综合判断患者的预后, 且可能有助于早期诊断大肠癌肝脏微小转移. 他们认为, 对外周血中癌细胞检测阳性的大肠癌患者应密切追踪随访, 定期行肝脏B超、CT、MRI等检查, 以尽可能早的发现患者肝内转移灶, 使患者得到及时的治疗; 并积极给予针对性辅助或补救性治疗, 包括全身化疗、门静脉置管、手术切除等措施, 在微转移时就及时给予治疗, 有可能减少大肠癌患者术后复发和肝转移灶的形成. Iinuma *et al*^[18]用实时定量RT-PCR法(quantitative

■名词解释

荧光定量PCR: FQ-PCR基于荧光能量传递技术, 通过受体发色团之间偶极-偶极相互作用, 能量从供体发色团转移到受体发色团, 受体荧光染料发射出的荧光讯号强度与DNA产量呈正比, 检测PCR过程的荧光讯号便可得知靶序列初始浓度. PCR是1995年由美国PE(Perkin Elmer)公司研制出来的一种核酸定量技术. 该技术较常规PCR具有简便、灵敏、准确等优点, 在临床具有广阔的应用前景.

real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay)检测大肠癌患者外周血中CEA和(或)CK20 mRNA及与临床病理和预后之间的关系,结果实时定量RT-PCR能在 3×10^6 个外周血单核细胞中检测出一个肿瘤细胞。CEA/CK20标志物基因的阳性率和肿瘤浸润深度、静脉浸润、淋巴结转移、肝转移和分期有显著相关性。CEA/CK20阳性的患者的无病生存和总体生存期明显短于CEA/CK20表达阴性的患者。肿瘤引流血(tumor drainage blood)标本中的CEA/CK20是无病生存和总体(全面)生存期的独立因子。研究显示用实时定量RT-PCR法测定结直肠癌患者肿瘤引流血中的CEA/CK20有预后价值。但还需要大规模和长期的临床试验来证实外周血游离肿瘤细胞(isolated tumor cells, ITC)基因测定的预后价值。Soeth *et al*^[19]用RT-PCR法检测胃肠癌患者外周血中CK20 mRNA,发现CK20 mRNA阳性患者的生存期明显较阴性患者的生存期短。Zhang *et al*^[20]的研究也发现外周血CK20 mRNA阳性患者1 a生存率(45.0%)较阴性患者的1 a生存率(66.7%)显著降低($P < 0.01$),且肿瘤后期的也比早期的表达高。

癌细胞从原发病灶脱落入肠系膜血管,通过血流经门静脉入肝脏,可以通过术中直接穿刺肠系膜静脉根部或经过胃网膜右静脉置管取门静脉血获得标本。检测发现门静脉血中CK20蛋白阳性表达的结直肠癌病人可能具有肝转移倾向或手术时就已存在早期肝转移,只是尚未形成一定大小的肝转移灶。周广军 *et al*^[21]报道42例大肠癌患者手术后48 h RT-PCR检测外周血中CK20 mRNA阳性率59.5%,高于手术前的50.0%,即有9.5%大肠癌患者手术前外周血中CK20 mRNA阴性表达,手术后转为阳性表达,另外部分术前阳性表达病例术后阳性表达增强。与Weltz *et al*发现大肠癌患者术后外周血中CK20 mRNA阳性表达率较术前高相似。说明手术操作促使肿瘤细胞进入外周血中。因此手术过程中应采取预防措施减少癌细胞的播散,应严格执行“不接触肿瘤的游离技术”,最大限度地减少围手术期医源性癌细胞播散的可能。林国乐 *et al*^[22]的研究结果表明手术操作能明显增加血循环微转移的发生几率。术中单纯靠先结扎肿瘤回流静脉的方法无法完全阻断血循环微转移的发生。可能因为手术开始前对肿瘤回流静脉的结扎并不能阻断肿瘤附近淋巴管内可能已有的癌细胞,由于术中牵拉、挤压等而进

入血循环。动物实验表明,手术操作可引起肿瘤播散入血循环,这增加了术后转移灶的发生。血循环中存在微转移,提示肿瘤有发展为远处转移瘤的可能。他们的研究提示,手术过程中的无瘤接触技术无法彻底阻断术中癌细胞的血行微转移。在目前尚无更有效措施的情况下,术中全身静脉化疗不失为一种针对性强、效果显著的方法。有研究^[23]认为通过增大采样、分析的血样量或从同一个体身上采集多种样本来提高CK20的检出率可能为一种可行的方法。Zhang *et al*^[20]通过RT-PCR测定了58例大肠癌和47例胃癌患者外周血,结果单次实验CK20 mRNA阳性率分别为44.8%(26/58)和42.6%(20/47),重复实验阳性率提高到69.0%和74.5%,而6例正常人外周血未见表达,认为用RT-PCR检测外周血胃肠道肿瘤细胞CK20 mRNA表达是敏感的、特异的、方便和可靠的,具有重要的临床意义。从外周重复采样、联合检测CK20和CEA均可提高其阳性检出率^[20, 24]。因此,CK20 mRNA检测可用于筛选大肠癌血行微转移,可以判断患者的临床治疗效果和判断预后。

3.3 CK20检测在大肠癌骨髓微转移的临床应用
血流丰富的骨髓易发生癌细胞转移。早期大肠癌就有血路播散的可能,因此了解大肠癌患者骨髓微转移的状况,有助于转移的早期诊断,并对判断肿瘤恶性程度和病人预后及指导术后辅助治疗方案的选择都有重要意义。Gunn *et al*^[8]对15例大肠癌患者骨髓进行CK20 mRNA和CK19 mRNA检测,结果CK19阳性者6例,但无一例CK20阳性。而对照组12个骨髓标本中5个CK19阳性,无一例对照标本CK20阳性。因此CK19的特异性值得怀疑。相反,倾向于以CK20 mRNA作为大肠癌骨髓微转移的标志。Soeth *et al*^[25]用巢式RT-PCR(nested RT-PCR)检测了57例大肠癌患者骨髓的CK20 mRNA表达,发现CK20阳性表达率与肿瘤分期密切相关。I期0%,II期为24%,III期为31%,IV期为71%。Soeth *et al*^[19]随后又检测了胃肠癌患者的141份骨髓标本和104份静脉血标本,发现骨髓检测微转移较外周血敏感、稳定,两者吻合率为87%。Lindemann *et al*^[26]报道结直肠癌患者骨髓检测阳性,其无病生存期减少。而且,Cox回归分析表明骨髓转移的出现是复发的一个独立预测指标。Koch *et al*^[15]的研究也表明检测结直肠癌患者术中($P = 0.009$)和骨髓中($P = 0.013$)的肿瘤细胞是肿瘤复发的一个独立预测指标。

4 CK20检测在大肠癌微转移中的临床意义

目前, 我们推断大肠癌患者预后和选择术后治疗方案主要是根据肿瘤的分期, 但这些分期指标仍然存在不足, 已经不能作为唯一指导治疗和判断预后的标准. Hayashi *et al* 研究表明, 37例伴淋巴结微转移的大肠癌患者中有27例5 a内复发, 而34例无微转移的患者, 无1例复发. Dorudi *et al* 研究了18例中期大肠癌患者162枚区域淋巴结, 应用CK20 RT-PCR检测发现, 21% Dukes B期患者已有淋巴结转移, 实属Dukes C期. Funaki *et al*^[12] 认为微转移可能是Dukes B期患者术后复发的主要原因. Soeth *et al*^[25] 报道显示, 骨髓中CK20 mRNA表达阳性的大肠癌患者2 a内死亡率为60%, 表达阴性的患者同期死亡率为11%, 两者差别很明显. 上述研究表明, 大肠癌微转移对大肠癌精确分期、指导治疗、判断预后方面有重要的临床意义, 其价值优于Dukes分期和肿瘤分级.

4.1 确定综合治疗方案、指导辅助化疗、评价化疗疗效 Xu *et al*^[27] 报道CK20表达和结直肠癌的分期和转移有关. 结论认为结直肠癌组织的血管生成和这些患者外周血肿瘤细胞的微转移密切相关. 用RT-PCR测定CK20 mRNA评价结直肠癌患者外周血肿瘤细胞的微转移是一个敏感的方法, 有助于预测预后, 疗效评价和指导综合的治疗. Na *et al*^[28] 的报道与此相似. Huang *et al*^[29] 的报道显示胃肠道肿瘤患者外周血循环肿瘤细胞的分子测定明显和肿瘤的恶性生物学性质相关, 有助于选择临床治疗和判断预后. 此外, 骆成玉 *et al*^[10] 应用CK20 mRNA RT-PCR法检测72例大肠癌术前和术后不同时期外周血中微转移情况, 从临床化疗疗效和分子水平分析术后化疗后微转移消退的相关因素. 结果发现, 术前外周血中CK20阳性表达42例(58.3%), 术后3 d外周血中CK20阳性检出较术前多5例, 故认为术后早期短程化疗对控制大肠癌微转移有一定作用, 有助于指导辅助治疗药物的选择和治疗方案的确定, 可作为临床个体化治疗的重要参考. Zhang *et al*^[20,30] 报道CK20 mRNA阳性的患者1 a复发率高于CK20 mRNA阴性者. RT-PCR测定患者骨髓和门静脉的肿瘤细胞是一个敏感和特异的方法, 诊断胃癌和大肠癌的微转移是可靠和方便的, 可评价预后和治疗方案. 检测外周血微转移有助于大肠癌临床分期的准确性, 并帮助判断患者预后和提高综合治疗效果.

4.2 准确判断预后、监测肿瘤复发、转移 Funaki

et al^[12] 检测了28例大肠癌患者外周血CK20 mRNA, 其中8例复发患者和4例伴远处转移患者均为阳性, 5例CK20 mRNA表达阳性但无复发或转移的Dukes C期患者在随访11 mo时有3例复发, 11例正常人或良性患者外周血CK20 mRNA均为阴性. 上述研究表明, 采用CK20 mRNA RT-PCR法检测大肠癌患者微转移外周血中CK20 mRNA具有较高的敏感性和特异性, 而且可能是大肠癌患者术后复发的主要原因, 是预测大肠癌复发和转移的实用指标. Illert *et al*^[31] 的研究表明CK20的表达是TNM分期的一个独立指标. 多变量分析表明CK20是一个独立的预后标志物. CK20测定对早期肿瘤分期有很大作用. 测定胃癌患者静脉血中的播散肿瘤细胞(disseminated tumor cells, DTC)是预后不良的一个独立预测标志物, 能帮助患者定位实体肿瘤的辅助治疗. Yuan *et al*^[32] 用RT-PCR测定结直肠癌组织淋巴结的微转移, PN0, PN1和PN2期的5 a无病生存率分别是100%, 61.9%, 55.6%, 都有显著性意义. 结论显示RT-PCR测定结直肠癌组织淋巴结的微转移比传统的病理形态学更敏感, RT-PCR能定义TNM分期, 对结直肠癌患者能做出准确的预后判断. 大肠癌淋巴结转移的有无及转移淋巴结数目的多少均与患者预后密切相关. 无淋巴结转移患者多数可获治愈, 5 a生存率可达70%以上; 有淋巴结转移者5 a生存率大大降低, 不足30%. 淋巴结转移数目愈多预后愈差, 1-5个转移者5 a生存率为24%, 而6-10个者则降为9%. 辅助性化学药物治疗(化疗)作为有淋巴结转移者的标准治疗, 可以明显增加其生存率, 但通常对无淋巴结转移者不予辅助治疗, 其5 a复发转移率达30%-40%. 常规组织学检测淋巴结微小转移常有遗漏, 直接影响着临床分期的准确性、预后预测以及辅助治疗的选择. 徐青 *et al*^[33] 报道58例大肠癌患者外周血中32例CK20 mRNA阳性表达(32/58), 术后48 h有35例阳性表达(35/58), 其中根治性切除组有21例阳性表达(21/44), 非根治性手术组12例阳性表达(12/14), 21例根治性切除患者术后7-14 d有11例转为阴性, 12例非根治性切除患者术后7-14 d有11例阳性表达. 结论显示CK20 mRNA阳性表达与大肠癌病理分化程度无关, 但与Dukes分期、区域淋巴结转移及远处转移情况相关($P<0.01$). CK20 mRNA阳性表达患者大肠癌组织中微血管密度(MVD)计数(88.5 ± 15.1)与VEGF阳性表达率(65.6%)明显高于CK20 mRNA阴性表达患

者的MVD计数(31.0 ± 12.9)和VEGF阳性表达率(19.2%)(分别 $P < 0.01$, $P < 0.001$). 这表明大肠癌组织中MVD和VEGF阳性表达与大肠癌的病理分化程度、Dukes分期、淋巴结及远处转移情况相关. 大肠癌组织血管生成与周围静脉血中癌细胞微转移情况密切相关. CK20 mRNA的检测对大肠癌预后判断、疗效评估及指导综合治疗有重要意义. 骆成玉 *et al*^[11]使用CK20的RT-PCR方法, 检测大肠癌淋巴结微转移情况, 并探讨其与预后的关系. 随访中发现, 淋巴结微转移多者预后差. 结论表明CK20 RT-PCR法较常规组织学检查具有更高的敏感性, 提高了淋巴结微转移的检出率和临床分期的准确性. 大肠癌淋巴结微转移的检测方法与临床疾病行为和预后较为符合, 是预测预后、指导治疗的重要指标. 随后, 骆成玉 *et al*^[34]又使用靶向CK20的RT-PCR技术, 对58例大肠癌患者外周血和骨髓微转移癌细胞在术前和术后不同时间进行了动态检测. 结果术后肿瘤无复发转移的大肠癌患者CK20的阳性率(16.3%)显著低于复发转移者(88.9%). 这表明大肠癌血路播散在术后复发转移中起重要作用. 动态追踪检测大肠癌CK20的变化有助于预测肿瘤的复发转移, 术前存在血路播散者预后差. 总之, 通过CK20 RT-PCR方法, 动态追踪大肠癌血路播散的变化, 可作为观察大肠癌术后复发转移和治疗反应及判断预后的一种非侵入性、可测量的客观指标, 他能提请临床对阳性结果患者的注意, 有较大的临床实际应用价值. 因此, 术后定期随访监测大肠癌患者血路播散可早期预测日后复发转移的风险、指导治疗.

5 问题及展望

总之, 尽管近年来对CK20、大肠癌微转移的研究取得了很大进展, 但CK20的分子学行为、基因特征还有待进一步研究, 微转移与预后的确切关系有待观察. 正常人^[20,24,35]、慢性炎症性肠病^[35](chronic inflammatory bowel disease, CID)患者、慢性胰腺炎患者、肝腺瘤患者分别出现外周血、骨髓CK20表达阳性, 从而怀疑CK20的特异性^[36]. 由于肿瘤转移过程机制复杂, 影响因素众多, 不少地方尚存在争议, 微转移的临床意义也有待进一步的研究, 检测的方法有待统一, 检测结果有待标准化. 普通PCR技术本身存在一定的缺点, 如(1)因未直接见到癌细胞, 即使存在突变型基因或基因产物, 也不一定存在活的肿瘤细胞; (2)PCR技术极为敏感, 需要有经验

的人员操作; (3)沾染基因物质可产生假阳性结果; (4)扩增mRNA常需新鲜标本, 库存的石蜡包埋块有时不适用于RT-PCR测定; (5)激素干扰可下调标记基因的表达, 因之产生假阴性结果. 另外, PCR检测费用昂贵, 限制了其广泛的临床研究, 对早期的诊断意义也不大. 且肿瘤的转移、复发是多阶段过程, 故肿瘤微转移的确切意义尚待进一步商讨, 与预后的确切关系有待进一步观察. 这些都是大肠癌微转移检测有待解决的问题. 杜雅菊 *et al*^[37]为探求大肠癌患者早期诊断的外周血分子标记物, 采用RT-PCR检测28例大肠癌、8例腺瘤中重度不典型增生、18例腺瘤轻度不典型增生、11例炎性息肉患者和10例正常对照者的外周血中CK-20、谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-S-transferase, GST), 端粒酶催化活性亚单位(human telomerase reverse transcriptase, hTERT), 生存素(survivin)及细胞S期激酶相关蛋白2(S-phase kinase associated protein 2, skp2)的mRNA表达情况. 实验结果是大肠癌患者外周血CK20 mRNA阳性率为89.3%(25/28), 腺瘤中重度不典型增生阳性率75%(6/8), 腺瘤轻度不典型增生组和炎性息肉组阳性率为61.1%和63.6%, 正常组有2例表达. 大肠癌组CK20 mRNA表达与腺瘤中重度不典型增生、腺瘤轻度不典型增生及炎性息肉组之间没有明显差别, 与正常组间有差别. 他们认为CK20作为大肠癌分子标记物的证据不够充分, 但对大肠癌及增生性疾病的监测尚有一定意义. 但叶敏 *et al*^[38]报道CK20具有较高的敏感性, 可用于膀胱肿瘤的早期诊断. 王保华 *et al*^[39]报道尿脱落细胞(HE染色)联合CK20免疫组化检测方法简单, 敏感度高, 对早期筛查膀胱癌有一定临床价值. Yang *et al*^[40]报道他们已经开发出一种纯化人类大便总RNA的方法, CK19在有转移的结直肠癌患者的大便中高度表达, 在正常人和转移的结直肠癌患者中不表达. 从大便中提取纯化RNA的方法可用来测定不同表达的基因, 这项技术能有助于非侵袭性筛选结直肠癌患者鉴别有意义的大便RNA标志物. 这开辟了一种无侵袭性检测的新途径, 这也为用非侵袭性方法检测粪便中脱落细胞CK20以便为临床筛查及早期诊断大肠癌提供了一条新思路. 利用RT-PCR或者FQ-PCR测定大肠癌患者外周血或粪便中的CK20 mRNA是否能为大肠癌早期诊断提供依据, 是否能为大肠癌临床筛查提供早期、可靠、简便易行的有效方法, 还需大规模的前瞻

性临床研究试验。相信随着分子生物学技术的不断发展以及对大肠癌基因和肿瘤相关抗原研究的深入, 对微转移检测的认识和不断研究, 将建立更科学的检测方法, 揭示微转移的机制, 会逐步确定CK20在大肠癌中的临床应用价值, 明确微转移与临床转移、复发、生存期的关系, 为临床恶性肿瘤的病情判断、治疗以及预后评估提供更好的依据。

6 参考文献

- Chen XM, Chen GY, Wang ZR, Zhu FS, Wang XL, Zhang X. Detection of micrometastasis of gastric carcinoma in peripheral blood circulation. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 804-808
- 龚丽明, 程若川, 李恩全. 大肠癌微转移检测的现状与展望. *大肠肛门病外科杂志* 2003; 9: 137-142
- Hernandez BY, Frierson HF, Moskaluk CA, Li YJ, Clegg L, Cote TR, McCusker ME, Hankey BF, Edwards BK, Goodman MT. CK20 and CK7 protein expression in colorectal cancer: demonstration of the utility of a population-based tissue microarray. *Hum Pathol* 2005; 36: 275-281
- Oberg AN, Lindmark GE, Israelsson AC, Hammarstrom SG, Hammarstrom ML. Detection of occult tumour cells in lymph nodes of colorectal cancer patients using real-time quantitative RT-PCR for CEA and CK20 mRNAs. *Int J Cancer* 2004; 111: 101-110
- 施林祥, 李东辉. 实时荧光PCR研究新进展. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 596-599
- 赵旗, 戴冬秋. Dukes B期大肠癌淋巴结微转移与临床病理关系. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 268-269
- 于雁, 毛银玲, 尚丽华. 大肠癌淋巴结微转移免疫组化检测与预后关系. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 2504-2506
- Gunn J, McCall JL, Yun K, Wright PA. Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by K19 and K20 reverse-transcription polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1996; 75: 611-616
- Okada Y, Fujiwara Y, Yamamoto H, Sugita Y, Yasuda T, Doki Y, Tamura S, Yano M, Shiozaki H, Matsura N, Monden M. Genetic detection of lymph node micrometastases in patients with gastric carcinoma by multiple-marker reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Cancer* 2001; 92: 2056-2064
- Yun K, Merrie AE, Gunn J, Phillips LV, McCall JL. Keratin 20 is a specific marker of submicroscopic lymph node metastases in colorectal cancer: validation by K-RAS mutations. *J Pathol* 2000; 191: 21-26
- 骆成玉, 李世拥, 赵丹宁, 邓永江, 曲军, 祝学光. 大肠癌淋巴结微转移的预后意义. *中华普通外科杂志* 2000; 15: 133
- Funaki NO, Tanaka J, Itami A, Kasamatsu T, Ohshio G, Onodera H, Monden K, Okino T, Imamura M. Detection of colorectal carcinoma cells in circulating peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction targeting cytokeratin-20 mRNA. *Life Sci* 1997; 60: 643-652
- Funaki NO, Tanaka J, Ohshio G, Onodera H, Maetani S, Imamura M. Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* 1998; 77: 1327-1332
- Xu D, Li XF, Jiang WZ, Cao J, Zheng S. Significance of CK20 mRNA expression in peripheral blood of colorectal cancer patients by real-time fluorescent quantitative RT-PCR. *Zhejiang Daxue Yixue Ban* 2004; 33: 403-406
- Koch M, Kienle P, Hinz U, Antolovic D, Schmidt J, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M, Weitz J. Detection of hematogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2005; 241: 199-205
- 骆成玉, 李世拥. 大肠癌患者外周血中微转移化疗疗效的相关因素. *中华外科杂志* 1999; 37: 421-423
- 袁正强, 曹建林, 陈微微, 刘道生, 张历, 温建立, 郑小华, 李良庆, 邓飞. 大肠癌患者外周血癌细胞CK20检测及其意义. *临床肿瘤学杂志* 2005; 10: 74-76
- Iinuma H, Okinaga K, Egami H, Mimori K, Hayashi N, Nishida K, Adachi M, Mori M, Sasako M. Usefulness and clinical significance of quantitative real-time RT-PCR to detect isolated tumor cells in the peripheral blood and tumor drainage blood of patients with colorectal cancer. *Int J Oncol* 2006; 28: 297-306
- Soeth E, Vogel I, Roder C, Juhl H, Marxsen J, Kruger U, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res* 1997; 57: 3106-3110
- Zhang XW, Yang HY, Fan P, Yang L, Chen GY. Detection of micrometastasis in peripheral blood by multi-sampling in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 436-438
- 周广军, 沈洪薰, 王志伟, 陈瑞新, 陈玉泉. CK20 mRNA在大肠癌患者外周血中阳性表达的临床意义. *南通医学院学报* 2002; 22: 24-26
- 林国乐, 邱辉忠, 徐彤, 钱家鸣. 大肠癌患者术前和术中外周血微转移的检测及其临床意义. *中华普通外科杂志* 2002; 17: 605-607
- Wyld DK, Selby P, Perren TJ, Jonas SK, Allen-Mersh TG, Wheeldon J, Burchill SA. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. *Int J Cancer* 1998; 79: 288-293
- Wharton RQ, Jonas SK, Glover C, Khan ZA, Klokouzas A, Quinn H, Henry M, Allen-Mersh TG. Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 4158-4163
- Soeth E, Roder C, Juhl H, Kruger U, Kremer B, Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal-cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer* 1996; 69: 278-282
- Lindemann F, Schlimok G, Dirschedl P, Witte J, Riethmuller G. Prognostic significance of micrometastatic tumour cells in bone marrow of colorectal cancer patients. *Lancet* 1992; 340: 685-689
- Xu Q, Chen RX, Wang ZW, Ni QC, Qian JJ, Sheng HX. Clinical research on angiogenesis in colorectal carcinoma and expression of CK20 mRNA in peripheral blood. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2005; 85: 1205-1208
- Na GW, Li J, He KJ, Li HH, Zhao XN, Li XW, Mi HN. CK20 mRNA expression in peripheral blood of patients with gastrointestinal carcinoma and its

- clinical significance. *Ai Zheng* 2004; 23: 1350-1353
- 29 Huang P, Wang J, Guo Y, Xie W. Molecular detection of disseminated tumor cells in the peripheral blood in patients with gastrointestinal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003; 129: 192-198
- 30 Zhang XW, Fan P, Yang HY, Yang L, Chen GY. Significance of detecting disseminated tumor cells in peripheral blood of gastric and colorectal cancer patients. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2003; 25: 66-69
- 31 Illert B, Fein M, Otto C, Cording F, Stehle D, Thiede A, Timmermann W. Disseminated tumor cells in the blood of patients with gastric cancer are an independent predictive marker of poor prognosis. *Scand J Gastroenterol* 2005; 40: 843-849
- 32 Yuan HY, Cheng FL, Wei ZZ, Yang GL, Chen JK. Clinical significance of detecting lymph node micrometastasis of colorectal cancer by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Aizheng* 2004; 23: 1069-1073
- 33 徐青, 陈瑞新, 王志伟, 倪启超, 钱晶晶, 沈洪薰. 大肠癌组织血管生成与患者外周血CK20 mRNA表达的临床研究. *中华医学杂志* 2005; 85: 1205-1208
- 34 骆成玉, 李世拥, 赵丹宁. 大肠癌术后血路播散的动态追踪监测. *中华普外科杂志* 2001; 16: 118-119
- 35 Dandachi N, Balic M, Stanzer S, Halm M, Resel M, Hinterleitner TA, Samonigg H, Bauernhofer T. Critical evaluation of real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA in colorectal cancer patients. *J Mol Diagn* 2005; 7: 631-637
- 36 Bustin SA, Gyselman VG, Williams NS, Dorudi S. Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 1999; 79: 1813-1820
- 37 杜雅菊, 刘晓琨, 金英敏, 曲波, 李宝杰. RT-PCR寻找大肠癌患者外周血早期分子标记物的研究. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 280-286
- 38 叶敏, 沈海波, 黄云腾, 虞永江, 朱英坚. 几种新瘤标对膀胱癌早期诊断价值的比较. *临床泌尿外科杂志* 2004; 19: 151-153
- 39 王保华, 李颢. 尿脱落细胞及CK20免疫组化检测对膀胱癌的早期诊断价值. *国外医学: 临床生物化学与检验学分册* 2005; 26: 126-127
- 40 Yang SH, Chien CC, Chen CW, Li SY, Huang CJ. Potential of faecal RNA in diagnosing colorectal cancer. *Cancer Lett* 2005; 226: 55-63

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在西部高原城市青海省西宁市举行第十一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。

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. 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 (世界胃肠病学杂志社 2006-05-18)

四氯化碳诱导兔肝硬化模型的动态研究

李 栋, 张乐玲, 侯怀水, 时 庆, 沈柏均

李栋, 侯怀水, 时庆, 沈柏均, 山东大学齐鲁医院低温医学研究室 山东省济南市 250012
张乐玲, 山东大学齐鲁儿童医院内科 山东省济南市 250022
国家自然科学基金项目, No. 30271248
通讯作者: 沈柏均, 250012, 山东省济南市文化西路107号, 山东大学齐鲁医院低温医学研究室. shenbaijun@21cn.com
电话: 0531-82169215 传真: 0531-86900909
收稿日期: 2006-03-10 接受日期: 2006-04-06

Dynamic changes of liver in cirrhosis model of rabbits

Dong Li, Le-Ling Zhang, Huai-Shui Hou, Qing Shi, Bai-Jun Shen

Dong Li, Huai-Shui Hou, Qing Shi, Bai-Jun Shen, Laboratory of Cryomedicine, Qilu Hospital, Shandong University, Ji'nan, 250012, Shandong Province, China
Le-Ling Zhang, Department of Internal Medicine, Qilu Children's Hospital, Shandong University, Ji'nan, 250022, Shandong Province, China
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30271248
Correspondence to: Bai-Jun Shen, Laboratory of Cryomedicine, Qilu Hospital, Shandong University, 107 Wenhua West Road, Ji'nan 250022, Shandong Province, China. Shenbaijun@21cn.com
Received: 2006-03-10 Accepted: 2006-04-06

Abstract

AIM: To establish a relatively simple and feasible rabbit model of liver cirrhosis and analyze the dynamic changes of function and histopathology of cirrhotic liver.

METHODS: Twenty-four New Zealand rabbits were divided into two groups, of which twenty were received subcutaneous injection of carbon tetrachloride (CCl_4) along with gastric infusion of edible ethanol for eight weeks. Animals in control group were fed with regular water and injected subcutaneously with the same quantity of olive oil. The development of hepatic fibrosis was recorded by Masson's trichrome method fortnightly. Blood samples were collected to measure the blood protein and enzymes fortnightly.

RESULTS: After treatment with CCl_4 , hepatic fibrosis was aggravated with time went by. As

compared with those in normal controls, the levels of aspartate transaminase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in the experimental groups were increased significantly (AST: 983.5 ± 116.7 nkat/L vs 650.1 ± 133.4 nkat/L, $P = 0.03$; ALT: 1867.1 ± 200.1 nkat/L vs 883.5 ± 116.7 nkat/L, $P = 0.01$), while the level of gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) was decreased (100.1 ± 33.3 nkat/L vs 366.7 ± 50.1 nkat/L, $P = 0.01$) at the end of 8 wk. Typical features of liver cirrhosis and the formation of false lobe were observed at the end of 8 wk.

CONCLUSION: Rabbit models of liver cirrhosis, with a low mortality and high success rate, can be established by combination of CCl_4 and ethanol in a relatively short time.

Key Words: Carbon tetrachloride; Liver cirrhosis model; Rabbits

Li D, Zhang LL, Hou HS, Shi Q, Shen BJ. Dynamic changes of liver in cirrhosis model of rabbit. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2006;14(14):1403-1407

摘要

目的: 探索简便、经济的兔肝硬化造模方法, 并观察造模过程中的肝脏功能和组织病理学变化。

方法: 兔24只, 随机分为2组, 实验组20只给予乙醇灌服, 并sc CCl_4 , 正常对照组4只给予正常饮水并以等量橄榄油代替 CCl_4 sc。每2 wk采集血样和小块肝组织, 进行生化指标检测和肝脏Masson三色胶原染色病理学观察。

结果: 随着四氯化碳处理时间的延长, 肝纤维化程度逐渐加重。与对照组相比, 实验组8 wk后ALT值和AST值(ALT, 1867.1 ± 200.1 nkat/L vs 883.5 ± 116.7 nkat/L, $P = 0.01$; AST, 983.5 ± 116.7 nkat/L vs 650.1 ± 133.4 nkat/L, $P = 0.03$)均显著升高, 而GGT值(100.1 ± 33.3 nkat/L vs 366.7 ± 50.1 nkat/L, $P = 0.01$)显著降低; 实验8 wk末观察到肝硬化的典型病理表现, 可观察到假小叶的形成。

■背景资料

肝炎、肝硬化和肝癌是严重威胁人类健康的常见疾病, 肝硬化动物模型的制作对肝硬化的防治具有重要意义。由于实验动物不感染人肝炎病毒, 肝硬化动物模型难以复制, 大型动物成功的报道少。对实验造模过程中肝功能和组织病理学的改变进行动态观察并进行量化检测, 是开展后期治疗研究的重要前期工作。

■研发前沿

肝硬化动物模型的制作方法大体可分为单因素造模和多因素造模两类,后者可提高成功率,目前问题是确定最佳造模方案,使其与人肝硬化特征相同,病变过程分期明显,而且简便易行,重点为提高造模成功率,降低死亡率。

结论:联合应用CCl₄和乙醇可成功诱导兔肝硬化,该方法动物死亡率低、造模快、成功率高。

关键词:四氯化碳;肝硬化模型;兔

李栋, 张乐玲, 侯怀水, 时庆, 沈柏均. 四氯化碳诱导兔肝硬化的动态研究. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1403-1407
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1403.asp>

0 引言

肝炎、肝硬化和肝癌是严重威胁人类健康的常见疾病,肝硬化动物模型(liver cirrhosis model, LCM)的制作是开展有关医学药学研究的基础,对人肝硬化的防治具有重要意义. 由于实验动物不感染人肝炎病毒,目前缺乏与人类病因完全一致的肝炎LCM,一般用化学性LCM多为小鼠或大鼠,大型动物成功少,作者尝试用CCl₄和食用乙醇制作兔肝硬化模型,并对实验过程中肝功能和组织病理学的改变进行动态观察,旨在探讨兔肝硬化的病变特点和病理学量化诊断指标,并探索简便、经济的兔肝硬化的造模方法。

1 材料和方法

1.1 材料 体质量 1.8 ± 0.2 kg的健康3月龄♂新西兰大白兔24只及全价营养颗粒兔饲料,由山东省农科院兔场提供. 试验前血清谷丙氨酸转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)及球蛋白(GLB)均正常. 随机分为对照组4只,实验组20只. CCl₄, 橄榄油(上海化学试剂厂,分析纯);食用乙醇(景阳春酒业公司);日本7170生化分析仪。

1.2 方法 实验组和对照组每日均喂养正常兔饲料,实验组第1次按1.5 mL/kg给予双下肢外侧皮下交替多点注射500 mL/L CCl₄橄榄油溶液,每周2次;第3次开始改为按2.5 mL/kg注射,持续2 wk;第5周起再降为1.5 mL/kg,每周2次;同时从第1周开始每日用300 mL/L食用乙醇10 mL灌服. 对照组仅注射同体积橄榄油,正常饮水. 0, 2, 4, 8 wk末保存血液,评价肝功能指标. 根据预实验结果,人为的将实验兔肝硬化病程分为3期:早期变性坏死期;中期纤维增生期;晚期假小叶形成期. 在2, 4, 8 wk末随机取2只实验组兔行右肋缘下小切口取小块肝组织,行HE染色和Masson三色染色,动态观察实验过程中兔肝脏病理学改变,包括肝细胞的变性坏死情况、炎性细胞浸润、纤维间隔及假小叶的形成等病理学变化特点. 以肉眼观察到肝硬化结节形成及镜下假小叶形成为肝硬化模型诱导成功. 另取0,

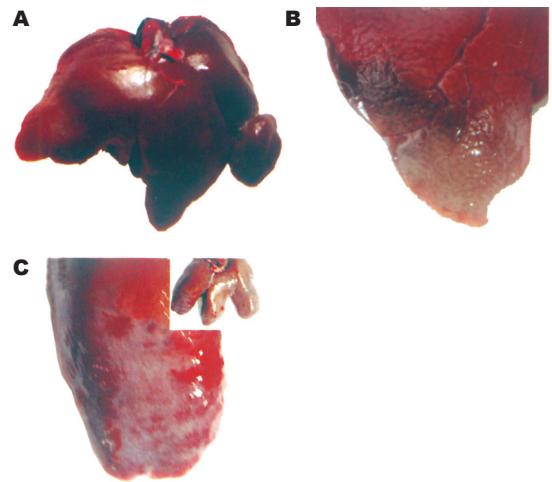


图1 兔肝大体标本. A: Health; B: Abortive; C: Cirrhotic.

2, 4, 8 wk末血液,测定ALT; γ -谷氨酰基转氨酶(GGT); 碱性磷酸酶(AKP); 总蛋白(TP); 白蛋白(ALB); 球蛋白(GLB); 白/球比例(A/G)和AST的动态变化。

统计学处理 实验数据以mean \pm SD表示,组间差异用t检验分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物观察 实验动物在造模过程中活动减少,精神萎靡,食欲不振,对外界刺激反应迟钝,动物毛发蓬乱而无光泽,前期体质量下降明显,后期体质量增长缓慢,多数有溏泻,用手触摸脊柱两侧肌肉层消失,骨感明显;正常组兔则毛发有光泽,体态活泼,食量及大便正常,无嗜睡现象,脊柱两侧肌肉层丰满. 实验组兔20只在实验2 wk死亡2只,死亡率为10%,解剖肝后见显著病理改变(图1B);正常对照组无一例死亡. 其余有17只于实验8-9 wk末成功诱导出肝硬化(观察到肝硬化结节形成及镜下假小叶形成),造模成功率达到94.4%。

2.2 肝组织学观察 正常肝脏质地柔软光滑,肝色泽均匀暗红,大小在正常范围(图1A). 实验组兔8 wk末可见肝脏体积缩小,表面呈小结节或小颗粒状,无弹性,质地硬(图1C). 正常肝脏肝小叶结构完整,肝细胞索排列整齐,汇管区清楚,肝窦轮辐状分布(图2A). 实验2 wk肝充血、水肿、增大,肝小叶中央静脉附近肝细胞肿胀,近圆形,肝窦狭窄,炎症反应加重(图2B),实验4 wk肝色泽暗淡,肿胀稍减轻,中央静脉周围肝细胞呈点、片状坏死(图2C),部分小叶结构塌陷,少量纤维结缔组织增生;6 wk末可见肝内弥漫性纤

■创新盘点

本文与其他方法的不同点在于:采用兔为模型动物,使用CCl₄橄榄油皮下注射和乙醇灌胃结合进行复合因素造模,降低了动物拒饮拒食造成的死亡率;并且在首次小剂量注射后随着动物的耐受性增强而提高剂量,后期再次降低剂量以进一步降低动物死亡率,检测指标较为全面。

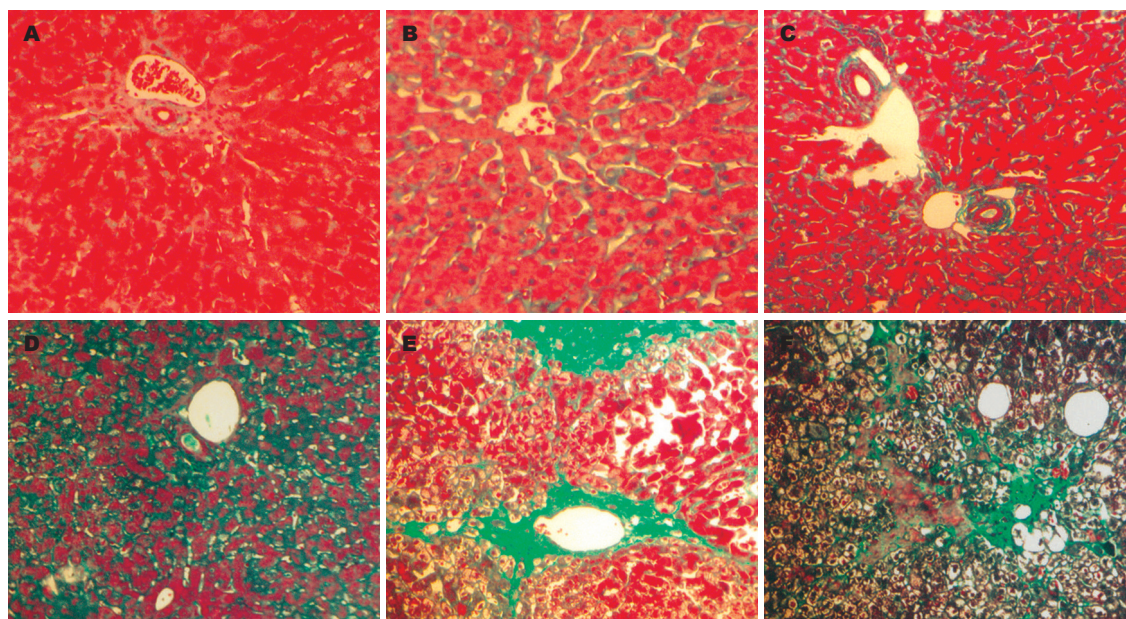


图2 兔肝组织学. A: Health; B: 2 wk after treated with CCl_4 ; C: 4 wk; D: 6 wk; E, F: 8–9 wk; Masson trichrome stains show extensive fibrosis (green staining) and the formation of false lobe, $\times 40$.

■应用要点

常见的肝硬化模型是小鼠或大鼠, 体型小, 不方便进行局部操作, 例如利用MRI进行干细胞示踪; 而兔的体型适中, 性格温顺, 便于操作. 本文提供了方便易行的造模方案, 各项生化指标和病理特征分期明显, 死亡率低, 是理想的肝硬化药物治疗和干细胞治疗的模型.

表1 兔肝硬化建立过程中的肝功能改变

检验项目	I (实验后)/wk (mean \pm SD $n = 20$)			
	0	2	4	8
ALT (nkat/L)	883.5 \pm 116.7	5451.1 \pm 266.7 ^a	3867.4 \pm 266.7 ^a	1867.1 \pm 200.1 ^a
GGT (nkat/L)	366.7 \pm 50.1	350.1 \pm 66.7	166.7 \pm 33.3 ^a	100.1 \pm 33.3 ^a
AKP (nkat/L)	1416.9 \pm 133.4	1233.6 \pm 100.1	1166.9 \pm 116.7	1150.2 \pm 116.7
总蛋白 (g/L)	66.9 \pm 6	68.9 \pm 6.1	62.9 \pm 4.1	57.5 \pm 3.8
白蛋白 (g/L)	36.6 \pm 6.4	36.1 \pm 6.2	29.8 \pm 4.6	26.8 \pm 5 ^a
球蛋白 (g/L)	30.3 \pm 5.5	32.8 \pm 5.9	33.1 \pm 3.7	30.7 \pm 2.4
A/G	1.2	1.1	0.9	0.9
AST (nkat/L)	650.1 \pm 133.4	2300.5 \pm 166.7 ^a	1266.9 \pm 100.1 ^a	983.5 \pm 116.7 ^a

^a $P < 0.05$ vs 0 wk.

维组织增生, 肝小叶结构紊乱, 并形成不典型假小叶(图2D). 实验8-9 wk坏死更广泛而严重, 从中央静脉和汇管区放射出的胶原纤维交织成网(图2E). 肝内假小叶广泛形成, 假小叶内肝细胞胞质极度疏松, 脂变严重, 呈大空泡(图2F).

2.3 肝功能检查 实验前ALT平均883.5 nkat/L, 造模2 wk后升至5451.1 nkat/L, 然后逐渐下降; 0-8 wk: GGT, AKP和A/G值均逐渐下降; AST值也有一过性升高(表1).

3 讨论

LCM建立方法较多, 常见的有血吸虫尾蚴法^[1-2]、 CCl_4 法^[3-6]、硫代乙酰胺法^[7-8]、低剂量长期应用致癌物法^[9-10]、胆总管结扎法^[11-12]和乙醇性^[13-14]肝硬化模型等. 其中 CCl_4 是最能诱导LCM

的化学毒物. CCl_4 经肝微粒体细胞色素P450激活生成 CCl_3 攻击肝细胞膜的磷脂, 引起脂质过氧化破坏膜性结构; CCl_3 还与蛋白质形成共价键, 损害线粒体, 影响三羧酸循环致肝细胞“窒息”死亡. 低浓度 CCl_4 反复应用使肝脏损害-修复-损害, 最终形成肝硬化^[3]. CCl_4 所致动物肝硬化模型的肝再生能力显著降低, 白细胞介素-6、肿瘤坏死因子和肝细胞生长因子受体c-Met的表达水平下调, 而白细胞介素-1 β 和血小板激活因子的表达水平却有增加, 可引起门静脉高压等并发症^[15-17]. 一般多选用小鼠或大鼠造模, 采用300-600 mL/L CCl_4 油剂sc或ip, 按1-3 mL/kg, 每周2次, 肝硬化可在12-13 wk形成^[3-6,18], 但 CCl_4 对脑肾毒性大, 注射位置易发生浸润性脓肿和溃疡, 故死亡率可高达30%-40%, 如降低 CCl_4 浓

■名词解释

1 动物模型: 是指生物医学研究中建立的具有人类疾病模拟表现的动物研究对象, 可加强对人类疾病的发生过程、机制乃至防治的认识。

2 肝硬化: 是指一种或多种病因长期作用, 造成弥漫性肝脏损害, 肝细胞变性、坏死、再生、纤维组织增生及纤维板形成, 最终导致肝小叶结构被破坏及假小叶形成, 肝正常结构紊乱, 质地变硬, 可并发脾肿大、腹水、浮肿、黄疸、食道静脉曲张、出血、肝昏迷等。

3 细胞色素P450: 细胞色素P450由一个超基因家族编码, 目前有约1000个不同的细胞色素P450基因完成了序列测定, 分别属于74个基因家族; 居于肝内质网的细胞色素P450, 是最主要的药物氧化代谢酶。

度则需延长造模时间, 实验可行性降低。乙醇与CCl₄联合应用造模可起到相辅的效果: 乙醇本身即为肝硬化的重要病因, 成人日摄入量多于30 g/d即可诱发肝硬化^[19-20]。乙醇可刺激肝细胞脂肪合成, 并诱导P450活性, 从而增加CCl₄的肝毒性, 加速肝细胞坏死^[21-22], 明显减短造模时间, 同时可减少两者剂量从而降低副作用。最初我们采用300 mL/L乙醇为唯一饮料, 但受注射影响, 兔拒饮现象普遍, 进而影响进食, 体质量下降过快。后直接采用灌服法, 约60 d即形成了典型的兔肝硬化模型, 具有动物死亡率低、肝硬化成功率高和造模时间短等优点。

预实验发现, 实验组兔死亡多发生在前3 wk, 多伴随口鼻出血, 解剖肝后见显著病理改变(图1B), 考虑多由急性CCl₄中毒引起肝坏死, 释放出凝血活酶样物质, 引起血管内皮损害, 导致严重出血有关。我们将首次CCl₄注射剂量降低, 约1 wk后再提高到2.5 mL/kg, 使其产生耐受过程, 有效降低了死亡率。实验中还必须注意密切观察, 因为个体间差异, 当有个别兔出现行动呆滞, 体质量显著减少和拒食拒饮的情况, 可暂停注射1-2次, 避免死亡。

病理学检查仍是确认肝硬化形成与否的指标, 本实验肝硬化造模可以分为3期: 变性坏死、纤维增生和假小叶形成期。造模早期ALT急剧升高, 表明肝细胞中毒明显, 镜下以气泡样变性及坏死为主; 中晚期ALT有所下降, 但仍高于正常值; GGT却持续低值走势。此期间肝细胞脂肪变性与坏死持续存在, 同时出现胶原纤维合成及肝小叶重建。动物染毒后经历肝细胞坏死和纤维增生, 进而肝硬化, 肝功能持续受损, 合成蛋白的能力降低, 以ALB进行性减少最为明显, 导致A/G比例倒置。实验组AKP虽有下降但不明显, 而AST早期明显升高, 可能是由于AST主要存在于线粒体内, 而乙醇和CCl₄直接损害细胞质膜和线粒体膜上胆碱组分^[13], 导致AST渗漏入血。由表1还可见APTT时间延长, 这是肝硬化失代偿期的典型特征。

总之, 我们成功的建立了兔肝硬化模型, 具有动物死亡率低、肝硬化成功率高和造模时间短等优点, 为日后以兔为实验动物进行肝硬化的研究打下了基础。

4 参考文献

- 1 Chatterjee S, Vrolix G, Depoortere I, Peeters T, Van Marck E. The therapeutic effect of the neuropeptide

hormone somatostatin on *Schistosoma mansoni* caused liver fibrosis. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 45

- 2 Silva LM, Oliveira SA, Ribeiro-dos-Santos R, Andrade ZA, Soares MB. Comparison of immune responses of *Schistosoma mansoni*-infected mice with distinct chronic forms of the disease. *Acta Trop* 2004; 91: 189-196
- 3 Sato R, Maesawa C, Fujisawa K, Wada K, Oikawa K, Takikawa Y, Suzuki K, Oikawa H, Ishikawa K, Masuda T. Prevention of critical telomere shortening by oestradiol in human normal hepatic cultured cells and carbon tetrachloride induced rat liver fibrosis. *Gut* 2004; 53: 1001-1009
- 4 Liu QH, Li DG, Huang X, Zong CH, Xu QF, Lu HM. Suppressive effects of 17beta-estradiol on hepatic fibrosis in CCl₄-induced rat model. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1315-1320
- 5 Shi MX, Fang BJ, Liao LM, Yang SG, Liu YH, Zhao CH. Flk1+ mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Shengwu Gongcheng Xuebao* 2005; 21: 396-401
- 6 刘洪艳, 王静艳, 雷薇, 闻颖, 刘沛. 氮对肝硬化大鼠模型脑神经细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 1865-1867
- 7 Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Puatanachokchai R, Salim EI, Hagihara A, Seki S, Fukushima S. Enhancement by estradiol 3-benzoate in thioacetamide-induced liver cirrhosis of rats. *Toxicol Sci* 2005; 85: 720-726
- 8 Bruck R, Schey R, Aeed H, Hochman A, Genina O, Pines M. A protective effect of pyrrolidine dithiocarbamate in a rat model of liver cirrhosis. *Liver Int* 2004; 24: 169-176
- 9 Hata J, Ikeda E, Uno H, Asano S. Expression of hepatocyte growth factor mRNA in rat liver cirrhosis induced by N-nitrosodimethylamine as evidenced by in situ RT-PCR. *J Histochem Cytochem* 2002; 50: 1461-1468
- 10 Sakaida I, Hironaka K, Terai S, Okita K. Gadolinium chloride reverses dimethylnitrosamine (DMN)-induced rat liver fibrosis with increased matrix metalloproteinases (MMPs) of Kupffer cells. *Life Sci* 2003; 72: 943-959
- 11 Brond L, Hadrup N, Salling N, Torp M, Graebe M, Christensen S, Nielsen S, Jonassen TE. Uncoupling of vasopressin signaling in collecting ducts from rats with CBL-induced liver cirrhosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: F806-F815
- 12 Jonassen TE, Brond L, Torp M, Graebe M, Nielsen S, Skott O, Marcussen N, Christensen S. Effects of renal denervation on tubular sodium handling in rats with CBL-induced liver cirrhosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: F555-563
- 13 Li J, Niu JZ, Wang JF, Li Y, Tao XH. Pathological mechanisms of alcohol-induced hepatic portal hypertension in early stage fibrosis rat model. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6483-6488
- 14 Xu GF, Li PT, Wang XY, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes in the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMPs, during hepatic fibrosis induced by alcohol in rats. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3621-3627
- 15 Masson S, Scotte M, Francois A, Coeffier M, Provot F, Hiron M, Teniere P, Fallu J, Salier JP, Daveau M. Changes in growth factor and cytokine mRNA levels after hepatectomy in rat with CCl₄-induced cirrhosis. *Am J Physiol* 1999; 277: G838-846

- 16 Yang Y, Nemoto EM, Harvey SA, Subbotin VM, Gandhi CR. Increased hepatic platelet activating factor (PAF) and PAF receptors in carbon tetrachloride induced liver cirrhosis. *Gut* 2004; 53: 877-883
- 17 Yang Y, Harvey SA, Gandhi CR. Kupffer cells are a major source of increased platelet activating factor in the CCl₄-induced cirrhotic rat liver. *J Hepatol* 2003; 39: 200-207
- 18 Kim SW, Schou UK, Peters CD, de Seigneux S, Kwon TH, Knepper MA, Jonassen TE, Frokiaer J, Nielsen S. Increased apical targeting of renal epithelial sodium channel subunits and decreased expression of type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rats with CCl₄-induced decompensated liver cirrhosis. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 3196-3210
- 19 Bellentani S, Saccoccio G, Costa G, Tiribelli C, Manenti F, Sodde M, Saveria Croce L, Sasso F, Pozzato G, Cristianini G, Brandi G. Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. The Dionysos Study Group. *Gut* 1997; 41: 845-50
- 20 Stickel F, Osterreicher CH. The role of genetic polymorphisms in alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol* 2006; 41: 209-224
- 21 Nanji AA, Jokelainen K, Lau GK, Rahemtulla A, Tipoe GL, Polavarapu R, Lalani EN. Arginine reverses ethanol-induced inflammatory and fibrotic changes in liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 832-839
- 22 Feerman DE, Melinkov Z, Nanji AA. Induction of CYP3A by ethanol in multiple *in vitro* and *in vivo* models. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27: 981-988

■同行评价

该文通过联合应用四氯化碳和酒精成功诱导兔肝硬化模型的实验研究, 得出方便、快捷而且成功率高的兔肝硬化造模方法。该实验针对基础研究中大型动物肝硬化模型成功率低的问题, 为进一步研究肝硬化的发病机制以及药物治疗打下基础。

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 •

欢迎订阅 2006 年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘 (Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘 (EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志 (Abstracts Journals)》收录。

本刊主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

《世界华人消化杂志》2006年由北京报刊发行局发行, 国际标准刊号 ISSN 1009-3079, 国内统一刊号CN 14-1260/R, 邮发代号82-262, 出版日期每月8, 18, 28日, 月价72.00, 年价864元。欢迎广大消化科医务人员及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址: 100023, 北京市2345信箱, 世界胃肠病学杂志社。联系电话: 010-85381901-1020; 传真: 010-85381893; E-mail: wcjd@wjgnet.com; 网址: www.wjgnet.com。

门静脉和尾静脉注入小鼠骨髓干细胞向肝脏迁移的比较

穆丽雅, 韩明子, 祁金锋

■背景资料

随着骨髓干细胞研究的不断深入, 为肝细胞移植提供了新的种子细胞。致力于研究骨髓干细胞移植的众多学者, 多数采用门静脉和外周静脉移植细胞, 这两种途径都可以使移植的细胞定居于肝脏并分化为肝细胞, 但是两种途径迁移到肝脏的细胞数是否有差异, 相关报道较少。

穆丽雅, 韩明子, 祁金锋, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科 黑龙江省哈尔滨市 150086

黑龙江省自然科学基金项目, No. D200536

通讯作者: 穆丽雅, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二医院消化科. lqz321521@163.com

电话: 0451-86605143

收稿日期: 2006-04-06 接受日期: 2006-04-27

Comparison between numbers of bone marrow stem cells migrated to liver after infusion into portal vein and caudal vein

Li-Ya Mu, Ming-Zi Han, Jin-Feng Qi

Li-Ya Mu, Ming-Zi Han, Jin-Feng Qi, Department of Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China

Supported by the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province, No. D200536

Correspondence to: Dr. Li-Ya Mu, Department of Digestive Diseases, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. lqz321521@163.com

Received: 2006-04-06 Accepted: 2006-04-27

Abstract

AIM: To explore the amount of bone marrow mononuclear cells migrating to the liver during allografting in mice.

METHODS: Bone marrow stem cells were isolated from the bone marrow of mice by lymphocyte separation medium and labeled with PKH26. The labeled cells were subsequently infused into the caudal or portal veins of different mice with homogeneity, in which hepatic injury was induced by carbon tetrachloride and 2-acetylaminofluorene. Two weeks after transplantation, the migration status of the cells was studied by fluorescence microscopy.

RESULTS: Liver cells were found at portal region and central veins of hepatic lobules in all the mice. The PKH26 labeled cells appeared at an average frequency of 175.4 per section from the livers of mice received transplantation via

portal veins, and at an average frequency of 172.9 per section from the livers of mice underwent transplantation via caudal veins. There was no significant difference between them ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Bone marrow stem cells are able to migrate to liver, the numbers of which have no correlation with the approach of transplantation.

Key Words: Bone marrow stem cell; Transplantation; Vein

Mu LY, Han MZ, Qi JF. Comparison between numbers of bone marrow stem cells migrated to liver after infusion into portal vein and caudal vein. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1408-1411

摘要

目的: 探索小鼠骨髓干细胞, 在同种异体不同途径移植后向受体肝脏迁移的情况。

方法: 以红色荧光染料PKH26标记从小鼠骨髓中分离出的干细胞, 分别从小鼠的尾静脉和门静脉注入同种异体的CCL4-AAF造成肝损伤的小鼠体内, 移植2 wk后分别取肝组织, 通过荧光显微镜观察两种移植途径对小鼠骨髓干细胞向肝脏迁移的影响。

结果: 两组鼠的肝小叶中央静脉及汇管区均可见新生的肝细胞, PKH26标记阳性的细胞在门静脉移植组20倍镜下每张切片平均为175.4个, 在尾静脉移植组平均172.9个($P > 0.05$)。

结论: 骨髓干细胞向肝脏迁移的细胞数与移植途径无关。

关键词: 骨髓干细胞; 移植; 静脉

穆丽雅, 韩明子, 祁金锋. 门静脉和尾静脉注入小鼠骨髓干细胞向肝脏迁移的比较. *世界华人消化杂志* 2006;14(14):1408-1411

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1408.asp>

0 引言

国内外众多文献报道^[1-7], 存在骨髓中的干细胞

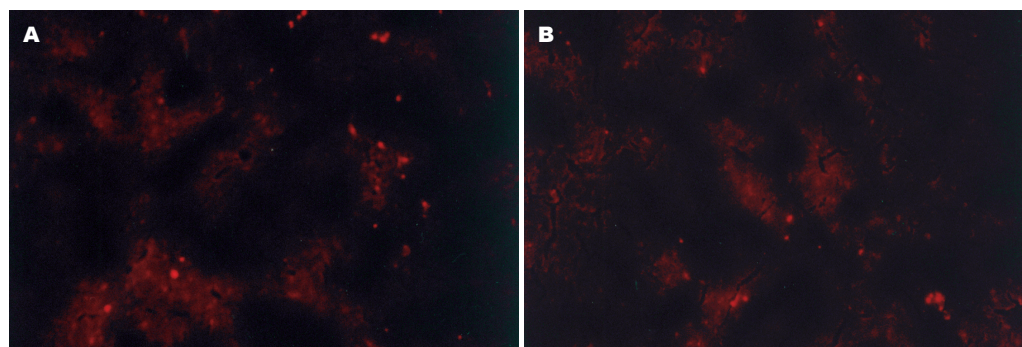


图1 小鼠肝组织中散在的PKH26标记的骨髓干细胞($\times 20$). A: A组; B: B组.

■ 研究前沿

骨髓干细胞可以分化成肝细胞已成定论, 但是其具体的分化机制以及分化率, 各学者观点不一, 而且这种分化在没有肝损伤的条件下是否能够发生, 以及最佳的移植途径, 仍待进一步研究.

在体内外均可以分化为功能完备的肝细胞, 用骨髓干细胞替代成熟肝细胞进行细胞移植治疗肝病, 有望使细胞移植在肝病治疗方面取得重大突破. 目前骨髓移植选择的途径多为门静脉, 但此途径需要导管介入或手术暴露门静脉, 比较复杂. 我们就门静脉和尾静脉两条途径加以对比, 为骨髓干细胞移植临床应用探索简易可行的移植途径.

1 材料和方法

1.1 材料 δ BALB/c小鼠, 体质量18-22 g, 购买和饲养于哈尔滨医科大学动物实验中心. 淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限公司), 四氯化碳(哈尔滨市鑫鹏化学试剂厂), 2-乙酰氨基苄(2-Acetamidofluorene, Fluka Biochemika), 红色荧光染料PKH26(Sigma公司), 聚乙二醇-400(天津天泰精细化学品有限公司), DMEM(Dubecco's modified Eagle's medium, DMEM)培养基及胎牛血清(Invitrogen公司). 将溶于聚乙二醇的2-乙酰氨基苄按20 mg/kg ig共7 d, 8 d ip 1 g/L CCl_4 橄榄油溶液20 mL/kg, 9 d行骨髓移植, 10 d起2-乙酰氨基苄20 mg/kg ig共7 d, 制备肝损伤模型.

1.2 方法 无菌手术取出供体鼠双侧股骨, 用肝素生理盐水冲出骨髓, 再经过7 \rightarrow 5号针头后, 3000 r/min离心5 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)重悬, 然后用淋巴细胞分离液分离, 吸取界面上灰白色细胞, 用PBS洗2遍, 得骨髓单核细胞, 采用4 $\mu\text{mol/L}$ PKH26标记所分离出来的骨髓单核细胞, 骨髓干细胞体外标记方法按说明书操作. 骨髓干细胞移植: (1)台盼蓝拒染试验检验细胞活性, 均达到95%以上, 可用于细胞移植; (2)A组小鼠12只, 用10 g/L戊巴比妥钠以50 mg/kg麻醉后, 取腹部正中切口, 经门静脉穿刺注射骨髓干细胞悬液0.3 mL, 并用11-0无损伤缝合线缝合裂口, 同时ip1万U青霉素, 然后关闭腹腔. B组小

鼠12只, 碘氟消毒尾部皮肤, 经尾静脉注入骨髓干细胞悬液(细胞数均为 3×10^6 /只)0.3 mL. 移植2 wk后处死小鼠, 取所有鼠的最大肝叶组织, 一部分置液氮中速冻, 然后置 -80°C 冰箱中保存, 待制备等面积的肝组织冰冻切片. 另一部分在 4°C 下用40 g/L多聚甲醛固定, HE染色观察其病理变化.

统计学处理 20倍镜下, 将每张冰冻切片上的荧光标记阳性细胞数相加, 计算其平均值 \pm 标准差, t 检验.

2 结果

2.1 荧光染色组织学检查 PKH26吸收551 nm的绿色激发光后, 发出红色荧光, 在荧光显微镜下发现, 各组小鼠肝组织切片中均可见散在的红色荧光标记(表1)(图1), 多数分布在肝细胞索内, 提示体外PKH26标记的骨髓细胞能够移居肝脏. 这种PKH26标记阳性的细胞在A组每张切片20倍镜下总数平均值为175.4个, B组为172.9个, 经统计学分析, A组和B组比较, 无显著差异($P>0.05$).

2.2 常规病理检查 常规石蜡切片HE染色观察, A, B组鼠的肝细胞均呈弥漫性肝细胞疏松化, 但A组要重于B组(图2-3). 此外, A, B两组鼠的肝小叶中央静脉及汇管区均可见新生的肝细胞(图4), 而且A, B两组这种新生的肝细胞数没有明显差异.

3 讨论

骨髓干细胞是具有巨大分化潜能的细胞, 它基本上为单个核细胞, 通常用Ficoll和Percoll分离液分离全骨髓而得, 此方法得到的骨髓单个核细胞不全是干细胞, 但干细胞都包含在骨髓单个核细胞内, 并且用密度梯度离心法分离细胞简单易行, 因而许多研究骨髓干细胞的实验都选择了用Ficoll, Percoll分离液通过密度梯度离

■相关报道

张刚庆, 方驰华, 颜政. 同种异体 MSC 移植在大鼠肝内定居的病理检测. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1198-1201

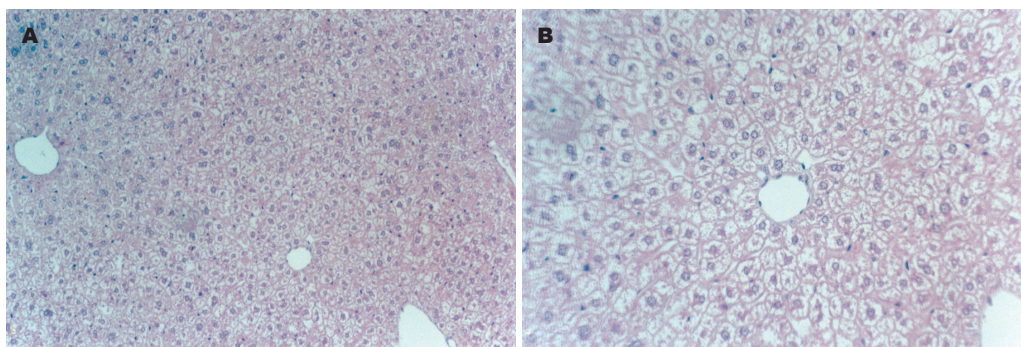


图 2 A组鼠的肝细胞呈弥漫性肝细胞疏松化. A: $\times 20$; B: $\times 40$.

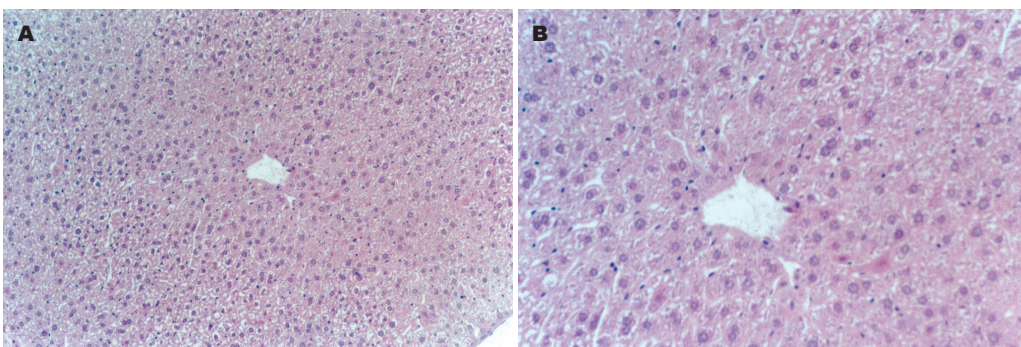


图 3 B组鼠的肝细胞呈弥漫性肝细胞疏松化. A: $\times 20$; B: $\times 40$.

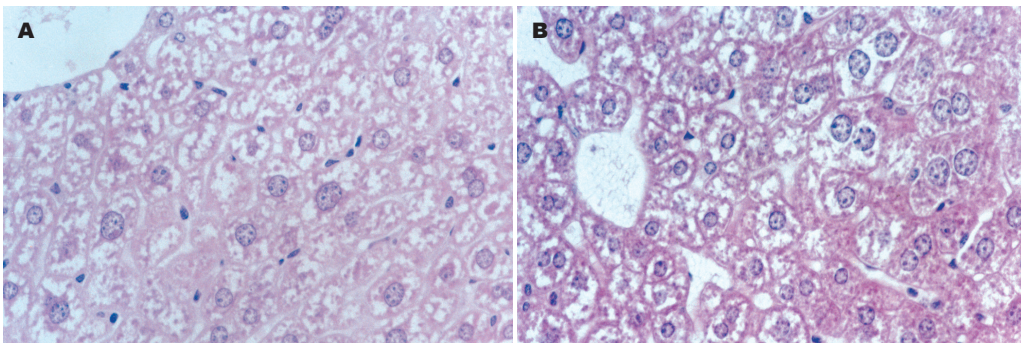


图 4 小鼠肝组织中可见新生肝细胞. A: A组; B: B组.

表 1 A、B两组肝脏冰冻切片红色荧光细胞数 (mean \pm SD)

组别	n	红色荧光细胞数 (个/切片)
A组	12	175.4 \pm 40.42
B组	12	172.9 \pm 30.53

心来分离. PKH26是一种标记细胞膜的带有长脂肪族末端的红色荧光染料, 可以与细胞膜上的脂类区域稳定结合, 染色速度快, 通常仅需 2-5 min即可使活体细胞均匀着色, 其性质稳定, 对活体细胞没有毒性, 而且不从已标记的细胞转移到未标记细胞, 随着细胞的分裂, 标记物也几乎等份地分配给两个子细胞, 其荧光衰减速度慢, 是骨髓干细胞研究中常用的标记物.

我们采用淋巴细胞分离液进行密度梯度法分离出骨髓单个核细胞, 体外PKH26标记后分别经门静脉和尾静脉回输到CCL₄-AAF肝损伤模型受体鼠体内, 在荧光显微镜下观察肝组织的冰冻切片, 均可见发出红色荧光的细胞, 并且两组的细胞数差异无显著性, 说明经过两种途径移植的细胞都迁移到了肝脏并在肝脏定居. 许多研究骨髓干细胞移植的实验都采用门静脉^[8-12]的途径直接将细胞注入肝内, 使更多的细胞定居肝脏. 因为有些学者认为^[13-14], 若细胞从外周血管进入体内, 经过全身循环后可能只有少量进入肝脏定向分化. 但是Lagasse *et al*^[15]经外周静脉移植骨髓造血干细胞治疗 I 型酪氨酸蛋白血症模型小鼠, 结果发现, 正是骨髓中的造

血干细胞在体内转分化为肝细胞, 使受体小鼠肝脏的生化功能得以恢复。本实验正说明了骨髓干细胞迁移并定居于肝脏的细胞数, 与移植途径无关, 可能靶器官受损可导致机体产生某些使干细胞趋化、定植的因素, 具体机制有待进一步研究。此外, 我们还发现, 经门静脉移植后的受体鼠的肝细胞疏松化要重于经尾静脉移植鼠, 这种肝损伤的加重是由于注射速度过快所致, 还是存在其他的未知干扰因素, 还需要实验的进一步证明。

4 参考文献

- 1 Wang X, Ge S, McNamara G, Hao QL, Crooks GM, Nolta JA. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* 2003; 101: 4201-4208
- 2 Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-16
- 3 Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 2000; 31: 235-240
- 4 Danet GH, Luongo JL, Butler G, Lu MM, Tenner AJ, Simon MC, Bonnet DA. C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 10441-10445
- 5 Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Adachi T, Takeda T, Sugahara K, Watanabe H, Saito K, Togashi H, Kawata S. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 691-695
- 6 李文昕, 段芳龄, 马军, 朱武凌, 高天慧, 陈香宇, 颜伏归, 李蔚, 韩娜, 王晓, 孙艳, 孙嫣. 人骨髓单个核细胞向肝细胞诱导分化的体外研究. *胃肠病学和肝病学杂志* 2003; 12: 144-147
- 7 Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2818-2822
- 8 Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 156-164
- 9 王韞芳, 南雪, 尉承泽, 李艳华, 张锐, 管立东, 岳文, 裴雪涛. 丙烯醇致肝损伤微环境定向诱导骨髓干细胞向肝细胞分化. *中华肝病杂志* 2005; 13: 274-277
- 10 展玉涛, 魏来, 陈红松, 丛旭, 费然, 王宇. 骨髓干细胞在大鼠肝纤维化形成环境中的分化. *中华肝病杂志* 2003; 11: 673-675
- 11 Avital I, Ferrareso C, Aoki T, Hui T, Rozga J, Demetriou A, Muraca M. Bone marrow-derived liver stem cell and mature hepatocyte engraftment in livers undergoing rejection. *Surgery* 2002; 132: 384-390
- 12 王平, 王建华, 颜志平, 胡美玉, 王艳红, 李文涛, 林根来. 大鼠骨髓基质细胞分离培养和经门静脉途径移植的初步研究. *中华放射学杂志* 2004; 38: 129-132
- 13 王平, 王建华, 颜志平. 骨髓干细胞移植: 肝功能衰竭治疗的一个新研究方向. *中华放射学杂志* 2004; 38: 202-205
- 14 Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002; 161: 565-574
- 15 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234

■应用要点

本文就门静脉和尾静脉相比较, 结果发现两种途径骨髓干细胞迁移到肝脏的细胞数没有差异; 那么, 尾静脉相对门静脉来说, 就是一条简易可行的移植途径, 可以作为骨髓干细胞移植研究的首选途径。

电编 李琪 编辑 潘伯荣

A型肉毒毒素腹腔注射对大鼠小肠通过速度及胆碱酯酶和P物质表达的影响

韩辉, 刘庆森, 刘文徽

■背景资料

BTA最早用于斜视的治疗, 目前已经广泛用于消化道张力过强性疾病、肌痉挛、多汗症、神经源性膀胱、美容矫形学等多领域, 其抗伤害感受作用(antinociceptive)是近年研究的热点, 在动物实验中已经发现与P物质、降钙素基因相关肽等有关, 在人体的研究尚少。虽然有人尝试用小量静脉给药来治疗帕金森氏病的全身性肌张力障碍, 但目前的应用主要是局部注射, 并且先前的报道多是以骨骼肌为研究对象, 全身应用对消化系统的作用尚属空白。

韩辉, 解放军总医院急诊科 北京市 100853
刘庆森, 刘文徽, 解放军总医院消化科 北京市 100853
通讯作者: 韩辉, 100853, 北京市海淀区复兴路28号, 解放军总医院急诊科. hanh301@163.com
电话: 010-66936224
收稿日期: 2006-03-09 接受日期: 2006-04-06

Effects of intraperitoneal injection of botulinum toxin A on passage velocity in small intestine and expression of acetylcholinesterase and substance P in rats

Hui Han, Qing-Sen Liu, Wen-Hui Liu

Hui Han, Department of Emergency, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Qing-Sen Liu, Wen-Hui Liu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China
Correspondence to: Hui Han, Department of Emergency, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. hanh301@163.com
Received: 2006-03-09 Accepted: 2006-04-06

Abstract

AIM: To investigate the effects on small intestinal passage velocity and expression of acetylcholinesterase (AChE) and substance P in rats by injection of botulinum toxin A (BTA) intraperitoneally.

METHODS: Twenty-four Wistar rats of 8 weeks were randomly and averagely divided into 4 groups. The rats in group A, B and C were intraperitoneally injected with 4, 2, and 1 U BTA containing in 2 mL normal saline, while those in group D were treatment with the same amount of normal saline (2 mL). Charcoal suspension pushing test of small intestine and immunohistochemistry of AChE and Substance P in the end ileum were performed 4 wk after injection.

RESULTS: The propelling rate of charcoal suspension at the end of 4 weeks in small intestine was significantly lower in group A ($53.9\% \pm 4.0\%$)

and B ($53.2\% \pm 3.0\%$) in comparison with that in group D ($66.4\% \pm 5.6\%$) ($P < 0.05$). There was no marked difference between group C ($64.3\% \pm 5.6\%$) and D. The expression of AChE and SP were decreased after injection and the integrated optical density were notably lower in group A and B than those in group D (muscular AChE: 99.3 ± 39.3 , 76.3 ± 36.4 vs 260.1 ± 114.8 , $P < 0.05$; mucosal AChE: 224.6 ± 85.4 , 230.1 ± 120.7 vs 230.1 ± 120.7 , $P < 0.05$; muscular SP: 161.2 ± 90.6 , 200.7 ± 65.5 vs 355.9 ± 70.9 , $P < 0.05$; mucosal SP: 198.6 ± 60.3 , 229.7 ± 71.8 vs 412.5 ± 79.2 , $P < 0.05$). There were no significant differences between group C and D ($P > 0.05$).

CONCLUSION: Intraperitoneal injection of BTA can decrease the passage velocity in small intestine and the expression of AChE and SP in rats.

Key Words: Botulinum Toxin A; Small Intestinal Passage Velocity; Acetylcholinesterase; Substance P; Rats

Han H, Liu QS, Liu WH. Effects of intraperitoneal injection of botulinum toxin A on passage velocity in small intestine and expression of acetylcholinesterase and substance P in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1412-1415

摘要

目的: 研究A型肉毒毒素(botulinum toxin A, BTA)腹腔注射(ip)对大鼠小肠通过速度及胆碱酯酶(AChE)和P物质(substance P, SP)表达的影响。

方法: 8周龄Wistar ♂大鼠24只随机分为A, B, C, D4组, 每组6只; A, B, C组分别ip含BTA 4, 2, 1 U的生理盐水2 mL, D组为对照组, ip生理盐水2 mL。4 wk后行小肠碳沫推进实验, 取回肠末段标本行免疫组织化学染色对比AChE及SP的表达。

结果: A, B组大鼠的小肠碳沫推进百分比(分别为 $53.9\% \pm 4.0\%$ 和 $53.2\% \pm 3.0\%$)小于D组($66.4\% \pm 5.6\%$; $P < 0.05$), 但C组($64.3\% \pm 5.6\%$)

与D组无统计学差异; A, B组AChE和SP在回肠肌层及黏膜层表达减少, 整合光密度与D组相比差异显著(肌层AChE: 99.3 ± 39.3 , 76.3 ± 36.4 vs 260.1 ± 114.8 , $P < 0.05$; 黏膜层AChE: 224.6 ± 85.4 , 230.1 ± 120.7 vs 230.1 ± 120.7 , $P < 0.05$; 肌层SP: 161.2 ± 90.6 , 200.7 ± 65.5 vs 355.9 ± 70.9 , $P < 0.05$; 黏膜层SP: 198.6 ± 60.3 , 229.7 ± 71.8 vs 412.5 ± 79.2 , $P < 0.05$), C组与D组无统计学差别($P > 0.05$).

结论: BTA ip能减慢大鼠的小肠碳沫推进速度, 减少回肠末段AChE和SP的表达.

关键词: A型肉毒毒素; 小肠通过速度; 胆碱酯酶; P物质; 大鼠

韩辉, 刘庆森, 刘文徽. A型肉毒毒素腹腔注射对大鼠小肠通过速度及胆碱酯酶和P物质表达的影响. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1412-1415

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1412.asp>

0 引言

BTA能阻碍神经肌肉接头处乙酰胆碱(ACh)的释放, 导致肌肉瘫痪或张力降低, 目前已经广泛用于肌痉挛^[1]、多汗症^[2]等疾病以及贲门失弛缓症等消化道张力过强性疾病. 随着研究的深入, 还发现BTA能减慢实验动物胃的排空^[3]抑制幽门结扎刺激引起的胃酸分泌^[4], 也能抑制其他内脏的收缩^[5], 但目前的应用主要是局部注射, 为研究全身应用BTA是否影响小肠通过速度及其可能的机制, 我们以大鼠为模型通过ip BTA进行了实验研究.

1 材料和方法

1.1 材料 BTA由兰州生物制品研究所提供, 商品名称: 衡力, 110 U/支; 10 g/L水合氯醛, 解放军总医院制剂室提供; 出生8 wk Wistar δ 大鼠24只, 由解放军总医院实验动物中心提供; 即用型ASBC免疫组化试剂盒、兔抗大鼠乙酰胆碱酯酶、兔抗大鼠P物质(武汉博士德公司); DAB显色剂、PBS磷酸盐缓冲液、枸橼酸盐缓冲液、苏木素溶液(北京中山公司).

1.2 方法 大鼠随机分为4组, 每组6只. A, B, C组分别ip含BTA 4, 2, 1 U的生理盐水2 mL; D组为正常对照, ip生理盐水2 mL. 给药后动物分笼独立饲养, 自由进食、饮水; 饲养4 wk后行小肠碳沫推进实验: 自制100 g/L碳沫按10 mL/kg灌胃后放回饲养笼活动20 min; 给予水合氯醛按

4 mL/kg体质量腹腔注射麻醉, 麻醉至深昏迷后立即解剖, 从幽门分离全小肠至回盲部, 将小肠平直铺于洁净玻璃板上, 测全小肠长度及碳沫推进最远端距离幽门的长度. 取距回盲部10 cm回肠标本常规固定、包埋行AChE及SP免疫组织化学染色. AChE, SP染色的每张切片按肌层及黏膜层分别随机选取2个视野, 照相; 用计算机病理图文分析系统进行分析, 选取整合光密度(integrated optical density, IOD)值、阳性总面积、面积比(阳性面积与视野总面积比)进行半定量分析, IOD值越大表明染色越强, 总面积或面积比越大表明染色阳性神经元越多. 碳沫在小肠内推进的百分比=碳沫推进最远端距离幽门的长度/全小肠长度 $\times 100\%$.

统计学处理 数据结果采用平均数 \pm 标准差(mean \pm SD)描述, 统计方法采用 t 检验、以 $P < 0.05$ 为差异显著, 有统计学意义.

2 结果

2.1 小肠碳沫推进实验结果 在给药后各组动物均耐受良好, 无明显喘息、竖毛、活动减少等BTA中毒的表现, 解剖时见腹腔内清洁, 无积液、肠管狭窄、扩张等. A, B, C组动物小肠长度(分别为 106.66 ± 3.07 cm, 114.50 ± 9.50 cm, 110.66 ± 11.51 cm)与D组(109.83 ± 6.58 cm)相比无统计学差异. A, B组大鼠小肠碳沫推进百分比(分别为 $53.9\% \pm 4.0\%$ 和 $53.2\% \pm 3.0\%$)低于对照组D组($66.4\% \pm 5.6\%$, $P < 0.05$). 但C组($64.3\% \pm 5.6\%$)与D组相比无统计学差别.

2.2 肠道AChE 肠道AChE在肠道肌层及黏膜、黏膜下层均有分布, 但以肠肌间神经丛和黏膜下丛分布最为集中, 染色阳性部位局限于细胞质. 黏膜层AChE阳性部位沿腺体排列. 经计算机病理图文分析系统分析, 回肠黏膜层与肌层AChE染色结果除A, B组黏膜层IOD值与D组相比无统计学差异外, 其余各指标均有统计学差异, 表明A, B组AChE的表达较对照组减少, 但黏膜层仅AChE的表达面积减少, 强度无统计学差别(表1).

2.3 肠道SP细胞 肠道SP阳性细胞分布于在肠道肌层及黏膜层, 黏膜下层亦有分布, 但以肠肌间神经丛分布最为集中, 染色阳性部位局限于细胞质. 黏膜层SP阳性部位主要在上皮层, 沿腺体排列. 肌层阳性表达主要分布于肠肌间神经丛部位(表2).

3 讨论

肉毒毒素是已知最强的生物毒素之一, 是肉毒

■创新盘点

本文以平滑肌为研究对象, 证实了全身应用BTA对小肠通过速度存在影响, 初步探讨了其可能的机制.

■应用要点

本文实验为治疗功能亢进性疾病如腹泻、腹痛等提供了新的思路,随着靶向治疗技术的发展,应用BTA选择性的治疗胃肠疾病将成为可能,由于其作用时间长,将为患者提供更多的便利。

表 1 回肠AChE阳性细胞表达的半定量分析 (mean ± SD)

分组	回肠肌层			回肠黏膜层		
	总面积	面积比	IOD	总面积	面积比	IOD
A	52 209 ± 24 762 ^a	0.099 ± 0.032 ^a	99.3 ± 39.3 ^a	86 410 ± 26 346 ^a	0.119 ± 0.0350 ^a	224.6 ± 85.4
B	21 905 ± 7716 ^a	0.070 ± 0.030 ^a	76.3 ± 36.4 ^a	128 453 ± 36 725 ^a	0.110 ± 0.036 ^a	230.1 ± 120.7
C	99 429 ± 52 824	0.232 ± 0.057	178.1 ± 68.7	232 913 ± 71 522	0.192 ± 0.024	290.5 ± 67.6
D	127 932 ± 35 846	0.184 ± 0.047	260.1 ± 114.8	260 198 ± 110 721	0.231 ± 0.086	375.4 ± 138.4

^aP<0.05 vs 对照组.

表 2 回肠SP阳性细胞表达的半定量分析 (mean ± SD)

分组	回肠肌层			回肠黏膜层		
	总面积	面积比	IOD	总面积	面积比	IOD
A	45 872 ± 10 589 ^b	0.085 ± 0.067 ^b	161.2 ± 90.6 ^b	95 267 ± 15 964 ^b	0.101 ± 0.041 ^b	198.6 ± 60.3 ^b
B	51 687 ± 17 984 ^b	0.104 ± 0.048 ^b	200.7 ± 65.5 ^b	110 689 ± 17 284 ^b	0.129 ± 0.068 ^b	229.7 ± 71.8 ^b
C	77 358 ± 21 059	0.150 ± 0.061	291.1 ± 50.4	154 275 ± 34 469	0.184 ± 0.095	297.6 ± 80.2 ^b
D	90 542 ± 19 265	0.186 ± 0.068	355.9 ± 70.9	185 261 ± 62 359	0.221 ± 0.057	412.5 ± 79.2

^bP<0.05 vs 对照组.

梭菌在生长繁殖过程中产生的一种细菌外毒素,属于一种高分子蛋白的神经毒素,能引起人和动物的肉毒中毒。其引起中毒的机制是作用于神经肌肉接头抑制胆碱能神经释放乙酰胆碱。根据毒素抗原的不同,将其分为A、B、C、D、E、F、G 7型,C型中尚有C1和C2两个亚型、其中A型的结构、功能已较清楚并且已经应用于贲门失弛缓、奥狄括约肌痉挛、肛裂等肌肉张力过高性疾病。胃肠运动受肠神经系统(ENS)、中枢神经系统以及体液因子的调节。内脏敏感性增高、ENS和脑肠互动的变化是胃肠疾病特别是功能性胃肠病中受重视的因素。ENS在调节胃肠运动中起重要作用,含多种神经元。除分泌经典神经递质的乙酰胆碱能神经元和肾上腺素能神经元外,还有分泌SP等多种肽能神经。胆碱能神经释放的ACh可引起小肠运动增强、回盲瓣括约肌松弛,是决定胃肠运动的重要组成部分,其功能日益受到研究者的重视。ACh主要是由AChE水解而失活。AChE是ACh的水解酶,显示AChE是公认显示ACh的方法,AChE活性增强则代表ACh释放增加,胆碱能神经兴奋性增高^[6]。我们的实验发现,BTA能减少回肠肌层ACh的释放;对于黏膜层可减少表达面积,但对强度无统计学影响,这可能是样本数较少的缘故,是否由于BTA促进AChE阳性细胞凋亡引起面积减少尚需进一步研究。因此,理论上可以认为,肉毒毒素可以由于减少肠道ACh的释放而减弱肠道

运动,尽管局部注射已经广泛用于消化道局部张力过强性疾病,但由于肠道长达数米且肠易激综合征(IBS)、功能性腹痛等与肠道动力异常相关性疾病的动力异常并非局限于某一段肠管,局部注射BTA治疗这类疾病并不现实,并且也有学者报道在结、直肠切除、回肠肛管吻合术后狗实验发现,回肠囊内局部注射BTA并不能改变排便频率^[7]。

SP是哺乳类动物重要的脑肠肽之一,广泛分布于中枢、周围神经系统、胃肠道各层及胃肠少量肠内分泌细胞^[8]。分布于胃肠道的SP能神经胞体存在于肠肌间神经丛内,发出的纤维分布至肠壁各层,其末梢释放的SP能抑制胃酸的分泌,刺激胃蛋白酶的分泌、促进小肠水和电解质分泌以及胃肠平滑肌的收缩^[9]。是肠道的兴奋性递质^[10]。SP不仅是生理状态下的神经递质,而且与多种病理状态相关,目前多数学者报道了IBS以及其他胃肠道疾病患者肠道SP表达增加或受体上调^[11-13]。尽管有不同的报道^[14],一般认为,与腹泻有关的疾病中SP含量升高,兴奋纵行和环行平滑肌,加强结肠的集团推进运动,可致排便次数增加,而便秘的病人则主要表现为SP的减低^[10,15]。

我们的实验提示,BTA可以减少肠道SP的表达,其机制可能是由于SP与ACh在囊泡内共存^[16]。SP的降低可能有助于缓解肠源性疼痛,在动物实验已经发现,BTA能减轻福尔马林诱发

的疼痛^[17]。因此, 本实验提示除通过ACh作用外, BTA可能通过减少SP减弱肠道的运动和分泌, 也可能有助于改善内脏高敏性, 增强抗伤害感受能力, 提示BTA对功能亢进性胃肠疾病可能有治疗作用。

总之, BTA对小肠运动具有抑制作用, 我们通过全身应用BTA发现, 腹腔注射确实能减慢大鼠的小肠传输速度。其部分机制是减少ACh和SP的释放。

4 参考文献

- 1 Kelm S, Gerats G, Chalkiadaki A, Hefter H. Reduction of pain and muscle spasms by botulinum toxin A. *Nervenarzt* 2001; 72: 302-306
- 2 Wu JM, Mamelak AJ, Nussbaum R, McElgunn PS. Botulinum toxin a in the treatment of chromhidrosis. *Dermatol Surg* 2005; 31: 963-965
- 3 Coskun H, Duran Y, Dilege E, Mihmanli M, Seymen H, Demirkol MO. Effect on gastric emptying and weight reduction of botulinum toxin-A injection into the gastric antral layer: an experimental study in the obese rat model. *Obes Surg* 2005; 15: 1137-1143
- 4 Runfola M, Rossi S, Panunzi S, Spada PL, Gui D. Botulinum toxin in gastric submucosa reduces stimulated HCl production in rats. *BMC Gastroenterol* 2003; 3: 26
- 5 Khera M, Somogyi GT, Salas NA, Kiss S, Boone TB, Smith CP. In vivo effects of botulinum toxin A on visceral sensory function in chronic spinal cord-injured rats. *Urology* 2005; 66: 208-212
- 6 徐三平, 易粹琼. 西沙必利对胃肠神经递质释放的影响. *临床消化病杂志* 1999; 11: 71-72
- 7 Willis S, von Felbert V, Holz F, Ulmer F, Fackeldey V, Schumpelick V. Does botulinum type-A toxin affect motor activity after proctocolectomy and ileal pouch-anal anastomosis? An experimental study in dogs. *Eur Surg Res* 2004; 36: 165-171
- 8 Wollina U, Karamfilov T. Adjuvant botulinum toxin A in dyshidrotic hand eczema: a controlled prospective pilot study with left-right comparison. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2002; 16: 40-42
- 9 Lordal M, Theodorsson E, Hellstrom PM. Tachykinins influence interdigestive rhythm and contractile strength of human small intestine. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 1940-1949
- 10 Wheatley JM, Hutson JM, Chow CW, Oliver M, Hurley MR. Slow-transit constipation in childhood. *J Pediatr Surg* 1999; 34: 829-32; discussion 832-833
- 11 董文珠, 邹多武, 李兆申, 许国铭, 邹晓平, 朱爱勇, 尹宁, 满晓华. 肠易激综合征患者内脏高敏感性的机制研究. *中华消化杂志* 2004; 24: 18-22
- 12 姚永刚, 余保平, 徐龙, 王玮. 慢性内脏高敏性大鼠结肠内P物质及其NK 1受体表达的改变. *胃肠病学和肝病学杂志* 2004; 13: 363-367
- 13 侯晓华. 功能性胃肠病与内脏感觉过敏. *基础医学与临床* 2003; 23(supple): 6-7
- 14 何俊堂, 刘海峰, 房殿春, 龙庆林, 王国安. 慢传输型便秘大鼠结肠肌间神经丛内VIP能神经、SP能神经的免疫组化研究. *消化外科* 2004; 3: 122-124
- 15 Lysy J, Karmeli F, Sestieri M, Yatzkan Y, Goldin E. Decreased substance P content in the rectal mucosa of diabetics with diarrhea and constipation. *Metabolism* 1997; 46: 730-734
- 16 周吕, 柯美云. *胃肠动力学: 基础与临床*. 北京科学出版社, 1999: 86
- 17 Cui M, Khanijou S, Rubino J, Aoki KR. Subcutaneous administration of botulinum toxin A reduces formalin-induced pain. *Pain* 2004; 107: 125-133

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, E-mail: liubingrong@medmail.com.cn.

多基因甲基化在胰腺癌发病机制中的作用

卜献民, 赵成海, 张宁, 王巍, 李岩, 戴显伟

■背景资料

近年来研究发现, 抑癌基因甲基化及表达沉默是部分胰腺癌发病重要途径之一。

卜献民, 戴显伟, 中国医科大学附属二院普通外科 辽宁省沈阳市 110004

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

李岩, 中国医科大学附属二院消化内科 辽宁省沈阳市 110004

辽宁省教育厅高等学校科学技术研究项目, No. 05L557

通讯作者: 戴显伟, 110004, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属二院普通外科. buxianmin@163.com

电话: 024-83956512

收稿日期: 2006-03-14 接受日期: 2006-04-06

Role of multiple genes methylation in pancreatic carcinogenesis

Xian-Min Bu, Cheng-Hai Zhao, Ning Zhang, Wei Wang, Yan Li, Xian-Wei Dai

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

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

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

Supported by the Fund for University Science and Technology Research from Education Office of Liaoning Province, No. 05L557

Correspondence to: Xian-Wei Dai, Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaoning Province, China. daixw@hotmail.com

Received: 2006-03-14 Accepted: 2006-04-06

Abstract

AIM: To determine methylation status of RASSF1A, p16, SOCS-1 and hMLH1 genes and explore the roles of their concurrent methylation in the carcinogenesis of pancreatic cancer.

METHODS: DNA in pancreatic cancer and cancer-adjacent tissues was extracted by saturated NaCl method. The methylation status of these genes was detected by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP).

RESULTS: The methylation rates of RASSF1A, p16, SOCS-1 and hMLH1 were 36.4%, 13.6%, 13.6% and 4.5% in cancer-adjacent tissues and

59.1%, 40.9%, 31.8% and 18.2% in pancreatic cancer, respectively. The methylation rate of p16 in pancreatic cancer was significantly higher than that in the cancer-adjacent tissues ($\chi^2 = 4.13$, $P < 0.05$). Two or more genes concurrent methylation was found in 45.5% pancreatic cancer, significantly higher than that in the cancer-adjacent tissues (9.1%, $\chi^2 = 7.33$, $P < 0.01$). No methylation of these genes was found in 31.8% pancreatic cancer.

CONCLUSION: Multiple genes concurrent methylation is an early event in some cases of pancreatic cancer, in which it plays an important role.

Key Words: Pancreatic cancer; Methylation; RASSF1A; p16; SOCS-1; hMLH1

Bu XM, Zhao CH, Zhang N, Wang W, Li Y, Dai XW. Role of multiple genes methylation in pancreatic carcinogenesis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1416-1419

摘要

目的: 检测基因RASSF1A, p16, SOCS-1和hMLH1在胰腺癌中甲基化的作用。

方法: 采用饱和氯化钠法提取肿瘤组织($n = 21$)和瘤旁组织($n = 21$)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: 在癌旁组织中, RASSF1A, p16, SOCS-1和hMLH1甲基化频率分别为36.4%, 13.6%, 13.6%和4.5%; 在胰腺癌中分别为59.1%, 40.9%, 31.8%和18.2%。p16甲基化频率在两种组织间具有显著性差异($\chi^2 = 4.13$, $P < 0.05$)。45.5%胰腺癌被检出存在2个或2个以上基因甲基化, 明显高于癌旁组织(9.1%, $\chi^2 = 7.33$, $P < 0.01$)。31.8%胰腺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胰腺癌发展过程中一种早期事件, 在这部分胰腺癌的发病中起重要作用。

关键词: 胰腺癌; 甲基化; RASSF1A; p16; SOCS-1; hMLH1

卜献民, 赵成海, 张宁, 王巍, 李岩, 戴显伟. 多基因甲基化在胰腺癌发病机制中的作用. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1416-1419
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1416.asp>

0 引言

胰腺癌恶性程度较高, 且预后较差, 其发病的分子机制至今仍然不是十分清楚. 研究显示, 遗传表型改变, 特别是抑癌基因由于启动子内CpG岛出现异常甲基化而失活参与了部分胰腺癌的发病过程^[1-4]. 我们曾发现, 部分胃癌中存在多基因同时甲基化现象. 随着更多基因异常甲基化在胰腺癌中不断被发现, 提示胰腺癌中同样也存在多种基因同时甲基化现象. 在此, 我们同时对基因RASSF1A, p16, SOCS-1和hMLH1在胰腺癌中的甲基化状态进行研究, 以探讨多基因甲基化在胰腺癌发病机制中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 胰腺癌及相应的癌旁组织各21例, 来自于中国医科大学附属第二医院. 癌旁组织在切除后的正常胰腺断缘获取. 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, 及确定癌旁组织没有肿瘤细胞浸润.

1.2 方法 采用饱和氯化钠法提取肿瘤组织和癌旁组织DNA. 采用GENMED基因甲基化检测试剂盒对RASSF1A, p16, SOCS-1和hMLH1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分析引物序列见表1.

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

2.1 各基因甲基化频率 在癌旁组织中, RASSF1A, p16, SOCS-1和hMLH1甲基化频率依次为36.4%(8/22), 13.6%(3/22), 13.6%(3/22)和4.5%(1/22); 在胰腺癌中, 上述基因甲基化频率依次为59.1%(13/22), 40.9%(9/22), 31.8%(7/22)和18.2%(4/22). p16甲基化频率在两种组织间具有显著性差异($\chi^2=4.13$, $P<0.05$).

2.2 多个基因同时甲基化频率 45.5%(10/22)胰

表 1 各基因MSP分析引物序列

基因	引物序列
RASSF1A	正义 5'-GTTTTGGTAGTTTAATGAGTTTAGGTTTTT-3' 反义 5'-ACCCTCTTCCTCTAACACAATAAACTAAC-3'
p16	正义 5'-TTATTAGAGGGTGGGCGGATVGC-3' 反义 5'-GACCCCGAACC GCGACCGTAA-3'
SOCS-1	正义 5'-GCGCATCACGCGCGCCAGCGCGCTC-3' 反义 5'-CTCGTGGGTCCAGGCCATCTTCACGCTAA-3'
hMLH1	正义 5'-TATATCGTTCGTAGTATTTCGTGT-3' 反义 5'-TCCGACCCGAATAAACCCAA-3'

表 2 胰腺癌21例多基因甲基化状态

No.	RASSF1A	p16	SOCS-1	hMLH1
1	-	-	-	-
2	+	+	-	-
3	+	+	+	+
4	-	-	+	-
5	-	+	-	-
6	+	+	-	-
7	-	-	-	-
8	+	+	+	+
9	-	-	-	-
10	+	+	+	-
11	+	-	-	-
12	+	-	-	-
13	+	-	+	+
14	-	-	-	-
15	+	+	-	+
16	+	+	-	-
17	+	-	+	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	+	-	-	-
21	+	+	+	-
22	-	-	-	-

腺癌被检出存在2个或2个以上基因甲基化, 明显高于癌旁组织(2/22, 9.1%, $\chi^2=7.33$, $P<0.01$). 31.8%(7/22)胰腺癌没有检出任何一种基因甲基化(表2).

3 讨论

胰腺癌恶性程度高, 预后差, 探讨胰腺癌发病的分子机制, 找到有效的早期诊断及治疗方法成为一个十分迫切的问题. 通过多年的研究, 人们认识到胰腺癌的发病是一个多基因参与、多阶段的发展过程, 其中包括抑癌基因突变及原癌基因激活等^[5-6]. 此外, 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多种肿瘤发病机制一条重要途径^[7]. 作为一种常见的肿瘤, 胰腺癌也被发现存在抑癌基因启动子甲基化现象. 其中比较重要的基因有RASSF1A^[8], p16^[1], SOCS-1^[9]及hMLH1^[10]等.

■创新盘点

本研究首次对多个抑癌基因在胰腺癌中的甲基化状态进行分析, 结果提示胰腺癌发病是多种基因发生改变共同作用的结果.

■同行评价

本文研究的内容比较重要,提示了多基因甲基化在胰腺癌发病中的部分意义;研究对目前国外已经部分提示的基因进行了分析,提供了比较有用的信息。

RASSF1A(RAS association domain family 1A)基因位于染色体3p21.3,是一种新发现的抑癌基因。目前已发现该基因由于启动子甲基化而失活参与了多种肿瘤的发病过程^[11-12]。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。但在胰腺癌中p16表达改变主要由于启动子甲基化导致^[1,13]。SOCS-1(suppressor of cytokine signaling-1)基因表达产物作为细胞因子信号转导途径的负调节因子,参与了IL-6、生长激素、干扰素及肿瘤坏死因子等体液因子对靶细胞的调节活动^[14],其启动子甲基化已被发现存在于胃癌^[15]、肝癌^[16]等肿瘤之中。错配修复基因hMLH1在生殖系中的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,其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^[17]。此外其它一些基因也在胰腺癌中被检测出存在甲基化现象,包括HHIP^[2],TFPI-2^[4],RUNX3^[18]等。这些证据显示,多种基因同时甲基化参与了胰腺癌的发病过程。

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^[19],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,45.5%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亦可能是胰腺癌重要的发病途径之一。我们发现,31.8%患者没有检出甲基化现象,提示CIMP没有参与这部分胰腺癌的发病过程。研究结果显示,胰腺癌组织中多基因甲基化频率显著高于癌旁组织,提示基因甲基化是胰腺癌形成过程中的一个早期事件,其对于胰腺癌的早期诊断具有重要意义。当然,要分析CIMP在胰腺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阳性胰腺癌的临床特征进行分析,以探讨多基因甲基化研究在胰腺癌早期诊断、治疗及预后等方面的作用。

4 参考文献

- Attri J, Srinivasan R, Majumdar S, Radotra BD, Wig J. Alterations of tumor suppressor gene p16INK4a in pancreatic ductal carcinoma. *BMC Gastroenterol* 2005; 5: 22
- Martin ST, Sato N, Dhara S, Chang R, Hustinx SR, Abe T, Maitra A, Goggins M. Aberrant methylation of the Human Hedgehog interacting protein (HHIP) gene in pancreatic neoplasms. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 728-733
- Pizzi S, Azzoni C, Bottarelli L, Campanini N, D'Adda T, Pasquali C, Rossi G, Rindi G, Bordi C.

RASSF1A promoter methylation and 3p21.3 loss of heterozygosity are features of foregut, but not midgut and hindgut, malignant endocrine tumours. *J Pathol* 2005; 206: 409-416

- Sato N, Parker AR, Fukushima N, Miyagi Y, Iacobuzio-Donahue CA, Eshleman JR, Goggins M. Epigenetic inactivation of TFPI-2 as a common mechanism associated with growth and invasion of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2005; 24: 850-858
- Sakorafas GH, Tsiotou AG. Multi-step pancreatic carcinogenesis and its clinical implications. *Eur J Surg Oncol* 1999; 25: 562-565
- Moore PS, Sipos B, Orlandini S, Sorio C, Real FX, Lemoine NR, Gress T, Bassi C, Kloppel G, Kalthoff H, Ungefroren H, Lohr M, Scarpa A. Genetic profile of 22 pancreatic carcinoma cell lines. Analysis of K-ras, p53, p16 and DPC4/Smad4. *Virchows Arch* 2001; 439: 798-802
- Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002; 21: 5427-5440
- Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, Hoang-Vu C. Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* 2003; 22: 3806-3812
- Komazaki T, Nagai H, Emi M, Terada Y, Yabe A, Jin E, Kawanami O, Konishi N, Moriyama Y, Naka T, Kishimoto T. Hypermethylation-associated inactivation of the SOCS-1 gene, a JAK/STAT inhibitor, in human pancreatic cancers. *Jpn J Clin Oncol* 2004; 34: 191-194
- House MG, Herman JG, Guo MZ, Hooker CM, Schulick RD, Cameron JL, Hruban RH, Maitra A, Yeo CJ. Prognostic value of hMLH1 methylation and microsatellite instability in pancreatic endocrine neoplasms. *Surgery* 2003; 134: 902-908; discussion 909
- Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
- Yamaguchi S, Kato H, Miyazaki T, Sohda M, Kimura H, Ide M, Asao T, Kuwano H. RASSF1A gene promoter methylation in esophageal cancer specimens. *Dis Esophagus* 2005; 18: 253-256
- Fukushima N, Sato N, Ueki T, Rosty C, Walter KM, Wilentz RE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. Aberrant methylation of preproenkephalin and p16 genes in pancreatic intraepithelial neoplasia and pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Pathol* 2002; 160: 1573-1581
- Kile BT, Alexander WS. The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 1627-1635
- Oshimo Y, Kuraoka K, Nakayama H, Kitadai Y, Yoshida K, Chayama K, Yasui W. Epigenetic inactivation of SOCS-1 by CpG island hypermethylation in human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 112: 1003-1009
- Nagai H, Naka T, Terada Y, Komazaki T, Yabe A, Jin E, Kawanami O, Kishimoto T, Konishi N, Nakamura M, Kobayashi Y, Emi M. Hypermethylation associated with inactivation of the SOCS-1 gene, a JAK/STAT inhibitor, in human

- hepatoblastomas. *J Hum Genet* 2003; 48: 65-69
- 17 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
- 18 Wada M, Yazumi S, Takaishi S, Hasegawa K, Sawada M, Tanaka H, Ida H, Sakakura C, Ito K, Ito Y, Chiba T. Frequent loss of RUNX3 gene expression in human bile duct and pancreatic cancer cell lines. *Oncogene* 2004; 23: 2401-2407
- 19 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 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 •

2006年第十二届华北区消化学术会议征文通知

本刊讯 为了进一步推动华北地区(北京、天津、河北、山西和内蒙)的消化学术交流与发展、帮助广大消化专业工作者全面了解国内外消化基础和临床研究进展,提高消化疾病诊治和研究水平,第十二届华北地区消化学术会议,将于2006-10-27/29在河北省石家庄举办。会议由北京、天津、河北、山西和内蒙医学会消化病学分会联合主办,河北省医学会消化病学分会承办。本次会议将就近年来国内外消化领域的研究进展、诊断和治疗方面的新技术、新方法进行广泛的学术交流,大会将邀请国内著名消化病学专家作专题学术报告。欢迎消化界各位专家和同仁积极投稿参会,参会者可获得国家级 I 类继续教育学分。会务费: 500元(含餐费及资料费),交通住宿费自理。

1 征文内容

- (1)消化系统疾病流行病学、发病机制、诊断和治疗的研究进展;
- (2)消化系统肿瘤的发病机制、诊断和治疗以及预防的进展;
- (3)消化内镜的应用现状及内镜下诊断和治疗的表演;
- (4)慢性肝病及肝癌近年来的发病情况治疗研究进展;
- (5)当前医源性疾病在消化疾病方面的表现与现状;
- (6)消化疾病在当前临床研究中热点、难点,需要解决的问题。

2 征稿要求

来稿要求是未在国内外刊物上公开发表过的论文,800字摘要一份,摘要应包括:目的、材料和方法、结果和结论4个部分。来稿一律使用A4纸打印、Word格式,并附软盘或发电子邮件至: huabeixiaohua@yahoo.com.cn。截稿日期: 2006-08-30,以当地邮戳为准。请务必在信封右上角注明“华北区消化会议”字样。会议地址: 河北医科大学第二医院图书馆楼三楼会议室。联系人: 河北省医学会学术会务部(邮政编码050011) 徐辉,电话: 0311-85988457; 河北医科大学第二医院(邮政编码: 050000) 蒋树林,电话: 0311-87222301, 0311-87222951。

经颈内静脉肝内门体分流术治疗肝硬化门脉高压症56例

秦建平, 蒋明德, 曾维政, 邓旦, 徐辉, 吴晓玲, 汪庆华, 顾明

■背景资料

经颈内静脉肝内门体分流术(TIPS)是治疗肝硬化并发门脉高压症伴食道胃底静脉曲张破裂所致的上消化道出血的有效方法,该方法安全,并发症少,患者耐受性好,临床疗效肯定。本文重点研究TIPS术治疗门脉高压的临床疗效以及并发症,为进一步开展、推广本手术提供临床参考资料

秦建平, 蒋明德, 曾维政, 徐辉, 吴晓玲, 成都军区总医院消化内科 四川省成都市 610083

邓旦, 成都军区总医院超声科 四川省成都市 610083

汪庆华, 顾明, 成都军区总医院放射科 四川省成都市 610083

通讯作者: 秦建平, 610083, 四川省成都市, 成都军区总医院消化内科. jpqqing@163.com

电话: 028-86570709

收稿日期: 2006-03-29 接受日期: 2006-04-12

Transjugular intrahepatic portosystemic shunt in treatment of 56 patients with cirrhosis and portal hypertension

Jian-Ping Qin, Ming-De Jiang, Wei-Zheng Zeng, Dan Deng, Hui Xu, Xiao-Ling Wu, Qing-Hua Wang, Ming Gu

Jian-Ping Qin, Ming-De Jiang, Wei-Zheng Zeng, Hui Xu, Xiao-Ling Wu, Department of Gastroenterology, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Dan Deng, Department of Ultrasound, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Qing-Hua Wang, Ming Gu, Department of Radiology, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu 610083, Sichuan Province, China

Correspondence to: Jian-Ping Qin, Department of Gastroenterology, General Hospital of Cheng Du Amy Region, Cheng Du 610083, Si Chuan Province, China. jpqqing@163.com

Received: 2006-03-29 Accepted: 2006-04-12

Abstract

AIM: To observe the clinical effect and complications of transjugular intrahepatic portosystemic shunt (TIPS) in the treatment of liver cirrhosis with portal hypertension.

METHODS: Fifty-six patients of liver cirrhosis with portal hypertension were treated with TIPS. Portal pressure, flow rate of portal blood, flow rate in the shunt, internal diameter of portal and splenic veins, blood routine before and after TIPS were measured, respectively.

RESULTS: TIPS was successfully performed in all the 56 patients (100%). The portal pressure (cmH₂O) post-TIPS was 22.5 ± 3.5 ($P < 0.01$

vs pre-TIPS 43.5 ± 4.5). The flow rate of portal blood (cm/s) post-TIPS was 12.5 ± 4.0 ($P < 0.01$ *vs* pre-TIPS 46.0 ± 16.5). The flow rate in the shunt was 158.0 ± 60.0 cm/s. The internal diameter of portal and splenic vein (cm) post-TIPS were 1.13 ± 0.086 and 0.90 ± 0.056 , respectively ($P < 0.01$ *vs* pre-TIPS 1.52 ± 0.082 and 1.26 ± 0.034 , respectively). Hypersplenism was found in 30 patients, and the numbers of leukocytes ($\times 10^9/L$), platelets ($\times 10^9/L$) and the levels of hemoglobin (g/L) post-TIPS were 3.92 ± 0.76 , 80.74 ± 16.82 and 118.20 ± 10.24 ($P < 0.01$ *vs* pre-TIPS 2.65 ± 0.58 , 42.56 ± 12.34 and 86.52 ± 12.68). The clinical symptoms of 56 patients with avrix and ascites were alleviated obviously. Common complications were hepatic encephalopathy, shunt stenosis and occlusion.

CONCLUSION: TIPS is a useful treatment in controlling varceal bleeding, decreasing portal pressure and partially alleviating hypersplenism.

Key Words: Transjugular intrahepatic portosystemic shunt; Cirrhosis; Portal hypertension; Hypersplenism

Qin JP, Jiang MD, Zeng WZ, Deng D, Xu H, Wu XL, Wang QH, Gu M. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt in treatment of 56 patient with cirrhosis and portal hypertension. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1420-1424

摘要

目的: 探讨经颈内静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)治疗肝硬化门脉高压症的临床疗效及并发症。

方法: 肝硬化并发门脉高压症患者56例,行TIPS术,支架置入前后测量门静脉主干压力,测定门静脉、脾静脉内径,测定门静脉、分流道血流速度;检测外周血象。

结果: TIPS术成功率100%,门脉主干压(cmH₂O) 24.5 ± 4.2 ($P < 0.01$ *vs* 术前的 45.8 ± 3.6),门静脉内径及脾静脉内径(cm)分别为

1.28±0.095和0.96±0.064($P<0.01$ vs 术前的1.62±0.074和1.28±0.032), 门脉主干血流速度(cm/s)48.0±17.6($P<0.01$ vs 术前的13.2±3.5), 分流道血流速度(cm/s)164.0±58.8. 脾功能亢进患者30例, WBC($\times 10^9/L$), PLT($\times 10^9/L$), HGB($\times g/L$)分别为3.92±0.76, 80.74±16.82, 118.20±10.24 ($P<0.01$ vs 术前的2.65±0.58, 42.56±12.34, 86.52±12.68). 食道胃底静脉曲张, 腹水等临床症状明显好转. 常见并发症有肝性脑病, 支架狭窄及闭塞.

结论: TIPS是一种治疗肝硬化门脉高压症的有效方法, 他能有效地降低门脉压, 控制食道、胃底静脉曲张破裂出血.

关键词: 经颈内静脉肝内门体分流术; 治疗; 肝硬化; 门脉高压症

秦建平, 蒋明德, 曾维政, 邓旦, 徐辉, 吴晓玲, 汪庆华, 顾明. 经颈内静脉肝内门体分流术治疗肝硬化门脉高压症56例. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1420-1424

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1420.asp>

0 引言

经颈静脉肝内门体分流术(transjugular intra-hepatic portosystemic shunt, TIPS)是治疗肝硬化并发门脉高压症伴食道胃底静脉曲张破裂所致的上消化道出血的有效方法, 该方法安全, 并发症少, 患者耐受性好, 临床疗效肯定. 现报道56例TIPS术患者的临床疗效.

1 材料和方法

1.1 材料 2000/2004共完成了TIPS术56例, 男48例, 女8例; 年龄为33-67(平均46.5)岁. 乙肝后肝硬化50例, 乙肝合并血吸虫肝硬化2例, 乙肝合并酒精肝硬化4例. 56例患者均有门脉高压征, 有明显脾功能亢进者30例, 食道重度曲张46例, 食道重度伴胃底中到重度曲张10例. 23例经内科药物治疗后仍反复出血; 10例经内镜下套扎和/或注射硬化剂治疗仍反复出血; 7例曾作过脾切术及门奇断流术; 6例初次大出血行急诊TIPS; 10例合并肝肾综合症. 16例大量腹水, 20例中量腹水, 其中顽固性腹水10例. Child-Pugh A级20例, B级26例, C级10例.

1.2 方法 TIPS术参照文献^[1-3]主要步骤为: 经皮右侧股动脉穿刺, 造影剂总量30 mL, 8 mL/s, 压力450分别作正、侧位间接门脉造影; 右侧颈内静脉通道的建立, 选右肝静脉或肝段下腔静脉为穿刺点; 穿刺肝内门静脉分支; 正、侧位直

表 1 TIPS术的并发症 (%)

并发症	mo	发生率
狭窄	(6-12)	18/42 (43%)
	(12-24)	5/30 (17%)
闭塞	(6-12)	2/42 (4.7%)
	(12-24)	1/30 (3.3%)
	(24-36)	2/25 (8%)
新发肝性脑病	(1-6)	18/50 (36%)
慢性肝性脑病	(6-12)	4/42 (9.5%)
溶血	(6-12)	3/42 (7.1%)
支架移位	(6-12)	2/42 (4.8%)

接门脉造影, 测压; 用8 mm/60 mm球囊扩张分流道; 置入10 mm/60-80 mm进口金属支架; 再正侧位造影, 测压. 所有病例术后1 a内每3 mo随访1次, 9-12 mo作直接门脉造影检查; 12 mo后每6 mo随访1次. 随访包括肝肾功、血氨、血常规、胃镜及超声检查. 观察患者的症状改善情况及肝内分流通道, 门静脉及脾静脉内径的变化情况.

统计学处理 所有数据用mean±SD表示; 治疗前后比较用 t 检验.

2 结果

2.1 TIPS术情况 根据术中造影判断, 右肝静脉穿刺门静脉右支18例, 穿刺门脉左支30例, 肝段下腔静脉穿刺门脉左支8例. 穿刺成功后直接门脉造影, 均见曲张的胃冠状静脉, 其中30例从门脉主干分出, 14例从脾静脉分出, 2例除从主干发出胃冠状静脉外, 还发出分支到胃底形成静脉曲张. 术中用钢圈、明胶海绵、血管硬化剂栓塞胃冠状静脉及胃底静脉曲张. 再造影未见胃冠状静脉及胃底静脉曲张显影. 6例急诊患者术后当即拔掉三腔二囊管, 出血均得到控制. 无与操作有关的严重并发症发生, 肝性脑病发生: 1-6 mo有18例(18/50), 其中门脉右支分流者12例, 而左支分流者6例; >6-12 mo仍有4例(4/42)反复发作, 3例(3/4)为右支分流者. TIPS术的并发症(表1).

2.2 临床随访结果 TIPS术后临床症状和体征改善(表2). 随访1 mo 2例死于肝功能衰竭, 随访1-6 mo 50例, 彩色多普勒超声复查提示: 患者支架无明显变化. 随访>6-12 mo者42例, 2例死于肝癌, 2例死于肝功能衰竭, 4例发生再出血, 彩色多普勒超声复查提示: 支架狭窄18例, 闭塞2例, 均有不同程度的脾亢, 胃镜提示: 食道胃底重度静脉曲张6例, 中度曲张12例, 造影复查与超声基本吻合, 12例作了修正术, 4例患者重新置入支架. 随访>12-24 mo者30例, 5例有狭窄, 1例闭

■创新盘点

TIPS术在我国1990年开始使用, 由于其操作技术难度较大, 费用较高等原因, 目前我国仅少数大型医院能够开展此手术, 在临床尚属于新技术, 我院在省内率先开展此技术, 并在实践中不断总结经验, 提高了操作成功率, 并减少了并发症的发生.

■应用要点

本手术在临床上具有较广泛的应用前景,随着操作技术以及支架质量的不断提高,其临床应用会为晚期肝硬化患者提高生存质量、延长生存时间。

表 2 TIPS术的临床疗效

症状、体征	有效率
止血	
急症出血	6/6 (100%)
药物、内镜和外科治疗无效	40/40 (100%)
食道静脉曲张	
完全消失	36/56 (64%)
明显减轻	20/56 (36%)
胃底静脉曲张	
完全消失	8/10 (80%)
明显减轻	2/10 (20%)
腹水	
完全消失	26/36 (72%)
明显减少	6/36 (17%)
无效	4/36 (11%)

表 3 TIPS术前后门静脉参数、血象和肝功的变化 (mean ± SD)

	n	分流前	分流后
门脉主干压 (cmH ₂ O)	56	45.8 ± 3.6	24.5 ± 4.2 ^b
门静脉内径 (cm)	56	1.62 ± 0.074	1.28 ± 0.095 ^b
脾静脉内径 (cm)	56	1.28 ± 0.032	0.96 ± 0.064 ^b
门脉主干血流速度 (cm/s)	56	13.2 ± 3.5	48.0 ± 17.6 ^b
分流道血流速度 (cm/s)	56		164.0 ± 58.8
WBC (× 10 ⁹ /L)	30	2.65 ± 0.58	3.92 ± 0.76 ^b
PLT (× 10 ⁹ /L)	30	42.56 ± 12.34	80.74 ± 16.82 ^b
HGB (× g/L)	30	86.52 ± 12.68	118.20 ± 10.24 ^b
血氨 (μmol/L)	54	45.8 ± 9.4	92.7 ± 22.3 ^b
胆红素 (μmol/L)	54	38.0 ± 14.0	31.0 ± 12.0 ^b
白蛋白 (g/L)	54	29.4 ± 4.8	30.2 ± 5.2
转氨酶 (nkat/L)	54	1083.6 ± 300.1	1016.9 ± 333.4

^bP<0.01 vs 分流前。

塞, 2例发生肝癌。随访>24-36 mo 25例, 1例发生肝癌, 2例支架闭塞。

2.3 TIPS术后门脉系统血液动力学及肝功改善
分流前后门脉主干压, 门脾静脉内径, 门脉主干血流速度, WBC, PLT, HGB, 血氨, 胆红素比较, 结果有显著性差异(P<0.01, 表3)。

3 讨论

肝硬化是我国常见的一种慢性疾病, 随着其病程的发展, 到疾病的中晚期患者会出现一系列的并发症, 如上消化道大出血、感染、电解质平衡紊乱、肝性脑病、肝肾综合征、肝肺综合征、门脉血栓形成。而门脉高压所致的食道、胃底曲张静脉破裂出血是最危急的并发症, 居各种上消化道出血原因之首, 初次出血的死亡率为45%-50%; 急症病例的手术死亡率高达50%。患者一旦发生食道曲张静脉破裂出血, 再出血的危险率至少为50%, 并且多数患者将死亡。另经内镜治疗者仍有12%-30%的失败率, 对年龄大, 肝功能差(尤其是C级), 大量

腹水不能耐受手术的急诊出血患者, 若行TIPS术, 均有好疗效^[3-8]。对于能熟练操作TIPS术的医疗中心, 其手术致死并发症(腹腔内出血, 肝动脉或门静脉破口出血, 右心功能衰竭)的发生率为1.2%^[9]。可见TIPS术是一种安全、有效的治疗食道曲张静脉破裂出血的方法, 均取得了满意的临床疗效^[1,6-7,10-14]。TIPS术作为一种治疗门脉高压症及消化道出血的有效方法, 其近期疗效已得到临床肯定, 评价TIPS术的近期疗效主要是看门脉压降低的程度(静脉曲张有无减轻或消失); 急症出血是否得以控制^[10]。TIPS术能有效地控制门脉高压引起的食道、胃底静脉曲张破裂所致出血, 同时降低门静脉压, TIPS术的近期有效率在90%-97.4%, 急症出血控制率在88%-100%^[1,2,6,10-11]。本组资料表明: TIPS术后56例患者的门脉压较术前的均明显降低(P<0.01), 术后门静脉主干及脾静脉内径较术前亦明显缩小(P<0.01), 进一步说明了患者门脉压的降低。

TIPS术中远期疗效的判断, 视其能否长期维持降低的门脉压, 这主要取决于支架是否通畅。文献报道^[10], 术后6 mo内分流道狭窄的发生率为17%-46%, 术后1 a内分流道狭窄的发生率为70%。本组6 mo, 1 a, 2 a支架狭窄发生率分别为0, 43%(18/42), 17%(5/30), 低于文献报道, 可能与技术的改进、病例的选择有关。有资料认为^[10,15-16]: 中远期分流道的狭窄多与分流道过度内皮化有关, 多发生于术后4-12 mo, 导致增生的确切机制尚不清楚。有人推测与局部胆汁漏、高速分流的血流的刺激、机体对置入支架(异物)的反应等有关, 阻塞的支架被产胶原基质的内皮细胞覆盖, 对于假性内膜增生的部位可发生于分流道的肝实质部或发生于肝静脉侧。肝性脑病是TIPS术后主要并发症之一, 其发病机制是因为部分未经肝脏解毒的门静脉血流, 经分流道直接到体循环所致。有文献报道^[4,6-7,17-18]: TIPS术后肝性脑病的发生率为33%-55%, 内镜治疗后的发生率为13%-26%, 一般用药物可控制。本组56例血氨均有不同程度增高(P<0.01 vs 术前), 其中18例(18/50)发生肝性脑病, 其发生率为36%。4例(4/42)出现慢性肝性脑病, 其发生率为9.8%, 与文献报道相似。我们还观察到血氨增高及肝性脑病的发生与建立分流道的血管有关, 随访1-6 mo 50例患者中有18例(18/50)发生肝性脑病, 其中门脉右支分流者12例(12/18), 而左支分流者6例(6/18); 随访>6-12 mo 42例仍有4例(4/42)反复发作, 其中3

例(3/4)为右支分流者. 有作者^[19]认为: 门脉左支分流, 可减少肝性脑病的发生率, 同时极大程度保护了患者的肝功能, 认为门脉左支主要接受来自血氨浓度较低的脾静脉的血, 而门脉右支主要接受来自血氨浓度较高的肠系膜上静脉的血; 门静脉左支主要供应占肝脏体积20%-30%的左叶, 即使是将左支血液完全性分流, 也只有约1/4的肝功损害, 与门静脉右支分流损害75%-80%的肝功能相比, 优势是显而易见. 在美国, 四氟聚烯(PTFE)带膜支架已被批准用于临床, 他的应用明显地减少了支架机械障碍(血栓, 狭窄/闭塞)的发生率和门脉高压的并发症的再发生, 减少了支架监测和再次介入的机会. 但患者肝性脑病的发生率与置入裸支架者无显著差异而生存率一样^[17-18, 20-23]. 另外在缺少更多研究的情况下, 不推荐常规抗凝; 目前, 尚无资料表明乳果糖能减少TIPS术后患者肝性脑病的发生率^[24].

本组胃镜随访发现, 食道静脉曲张完全消失36(36/56)例, 明显减轻20例(20/56); 胃底静脉曲张完全消失8例(8/10), 明显减轻2例(2/10), 术后超声随访6 mo内所有分流道通畅. 6例急症出血得到立刻控制, 近期有效率及急症出血控制率为100%, 与文献报道相似. 术后1 mo肝功能随访, 血氨较术前增高($P<0.01$), 胆红素较术前降低($P<0.01$), 白蛋白和ALT变化不明显($P>0.05$), 说明随着TIPS技术的提高, 手术本身对肝功的影响不大. 有效分流道的建立, 改善了肝脏及全身的血液循环, 对肝功有好的帮助. 随访>6-12 mo 42例有3例(3/42)患者发生溶血, 可能与支架破坏红细胞有关, 肝功提示间接胆红素增高, 余项肝功指标正常, 患者无临床症状, 无需特殊处理. 随访观察, 4例(4/42)再出血, 造影证实2例支架闭塞, 2例支架明显狭窄, 经再次置入支架和修正后分流道再通. 与文献报道^[7, 9]TIPS术后再出血因支架狭窄或闭塞所致相似. 30例合并脾功能亢进症者, TIPS术后外周血象得到明显改善. 但随着时间的推移, 随访6 mo, 其血象基本回复到术前水平, 原因尚不清楚, 有待进一步研究. 随访1 mo 56例有2例(2/56)患者死于肝功能衰竭; 随访>6-12 mo 42例, 2例(2/42)发生肝癌, 2例(2/42)死于肝功能衰竭; 随访>12-24 mo者有30例, 2例(2/30)发生肝癌. 随访>24-36 mo 25例, 1例(1/25)发生肝癌. 发生肝功能衰竭可能与患者本身肝脏储备功能差(Child-Pugh C级), 年龄较大(>60岁)有关. 有

文献报道^[8, 12]TIPS术后死亡原因主要是肝功能衰竭, 并与肝脏储备功能相关. 而肝癌的发生是病程的自然演变和/或与TIPS术有关, 尚有待进一步研究.

TIPS术是治疗肝硬化门脉高压症的有效方法, 尤其是在尚未普及肝移植的情况下, 他的微创性, 安全性, 可重复性, 给他的临床广泛应用带来了的美好前景. 目前随着技术、材料的不断改善, 适应证和禁忌证的规范, 术中及术后并发症的逐步减少, 其中远期疗效有了明显地提高.

4 参考文献

- 1 张金山, 王茂强, 杨立, 邢冲冲, 于森, 崔志鹏, 黄英才, 张正友, 高育敏. 经颈静脉途径肝内门体分流术. 中华医学杂志 1994; 74: 150-152
- 2 褚建国, 孙晓丽, 黄鹤, 徐晓明, 朴龙松, 吕春燕, 孙鹏, 杨淑慧, 刘姝英. 经肝段下腔静脉入路经颈静脉肝内门体分流术的适应证及解剖基础. 介入放射学杂志 2004; 13: 15-18
- 3 李麟荪. 临床介入治疗学. 南京: 江苏科学技术出版社, 1994: 328-340
- 4 Sauer P, Hansmann J, Richter GM, Stremmel W, Stiehl A. Endoscopic variceal ligation plus propranolol vs. transjugular intrahepatic portosystemic stent shunt: a long-term randomized trial. *Endoscopy* 2002; 34: 690-697
- 5 Chalasani N, Kahi C, Francois F, Pinto A, Marathe A, Bini EJ, Pandya P, Sitaraman S, Shen J. Improved patient survival after acute variceal bleeding: a multicenter, cohort study. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 653-659
- 6 Rosch J, Keller FS. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt: present status, comparison with endoscopic therapy and shunt surgery, and future perspectives. *World J Surg* 2001; 25: 337-45; discussion 345-346
- 7 Sahagun G, Benner KG, Saxon R, Barton RE, Rabkin J, Keller FS, Rosch J. Outcome of 100 patients after transjugular intrahepatic portosystemic shunt for variceal hemorrhage. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 1444-1452
- 8 诸葛宇征, 王英德, 刘丽娜, 宫爱霞, 赵钢. TIPSS和EVS治疗食道静脉曲张破裂出血的临床分析. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1659-1660
- 9 Tripathi D, Helmy A, Macbeth K, Balata S, Lui HF, Stanley AJ, Redhead DN, Hayes PC. Ten years' follow-up of 472 patients following transjugular intrahepatic portosystemic stent-shunt insertion at a single centre. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16: 9-18
- 10 张金山, 王茂强, 杨立, 于森, 黄英才, 崔志鹏, 邢冲冲, 程凤歧, 张政友. 经颈静脉途径肝内门体分流术的临床应用. 中华放射学杂志 1994; 28: 800-807
- 11 徐克, 张曦彤, 张汉国, 何芳显, 韩铭钧, 王长龙. TIPSS治疗肝硬化门脉高压的应用研究. 中华放射学杂志 1994; 28: 808-813
- 12 Zhuang ZW, Teng GJ, Jeffery RF, Gemery JM, Janne d'Othee B, Bettmann MA. Long-term results and quality of life in patients treated with transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *AJR Am J Roentgenol* 2002; 179: 1597-1603
- 13 薛挥, 段仲壁, 袁新明, 刘大巍, 刘亚民, 任炜. 经颈静脉

■名词解释

TIPS: 经颈内静脉肝内门体分流术的英文缩写, 即通过放射介入方法在硬化的肝脏内放置一个金属支架, 将门脉血流直接分流一部分到体循环, 达到降低门静脉压力、缓解门脉高压、减少腹水产生等功效.

■同行评价

我国的TIPS术技术尚欠成熟,费用较高,临床医师应根据本地实际情况妥善选用。本文有一定临床借鉴价值。

- 肝内门腔静脉内支架分流术治疗门脉高血压症. 新消化病学杂志 1996; 4: 629-630
- 14 张铁英, 赵金满, 施贵静. 肝硬化患者肝储备功能对 TIPSS术后近期疗效的影响. 世界华人消化杂志 2005; 13: 415-418
- 15 Saxon RR, Mendel-Hartvig J, Corless CL, Rabkin J, Uchida BT, Nishimine K, Keller FS. Bile duct injury as a major cause of stenosis and occlusion in transjugular intrahepatic portosystemic shunts: comparative histopathologic analysis in humans and swine. *J Vasc Interv Radiol* 1996; 7: 487-497
- 16 Ducoin H, El-Khoury J, Rousseau H, Barange K, Peron JM, Pierragi MT, Rumeau JL, Pascal JP, Vinel JP, Joffre F. Histopathologic analysis of transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 1997; 25: 1064-1069
- 17 Rossi P, Salvatori FM, Fanelli F, Bezzi M, Rossi M, Marcelli G, Pepino D, Riggio O, Passariello R. Polytetrafluoroethylene-covered nitinol stent-graft for transjugular intrahepatic portosystemic shunt creation: 3-year experience. *Radiology* 2004; 231: 820-830
- 18 Hausegger KA, Karnel F, Georgieva B, Tauss J, Portugaller H, Deutschmann H, Berghold A. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt creation with the Viatorr expanded polytetrafluoroethylene-covered stent-graft. *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15: 239-248
- 19 褚建国, 孙晓丽, 陈肇一, 朴龙松, 陈学忠, 吕春燕, 徐晓明, 黄鹤, 徐家兴. 经颈静脉肝内门脉左支-体静脉分流术的临床意义. 空军总医院学报 2002; 18: 1-4
- 20 Saxon RR. A new era for transjugular intrahepatic portosystemic shunts? *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15: 217-219
- 21 Bureau C, Garcia-Pagan JC, Otal P, Pomier-Layrargues G, Chabbert V, Cortez C, Perreault P, Peron JM, Abalde JG, Bouchard L, Bilbao JL, Bosch J, Rousseau H, Vinel JP. Improved clinical outcome using polytetrafluoroethylene-coated stents for TIPS: results of a randomized study. *Gastroenterology* 2004; 126: 469-475
- 22 Barrio J, Ripoll C, Banares R, Echenagusia A, Catalina MV, Camunez F, Simo G, Santos L. Comparison of transjugular intrahepatic portosystemic shunt dysfunction in PTFE-covered stent-grafts versus bare stents. *Eur J Radiol* 2005; 55: 120-124
- 23 Charon JP, Alaeddin FH, Pimpalwar SA, Fay DM, Olliff SP, Jackson RW, Edwards RD, Robertson IR, Rose JD, Moss JG. Results of a retrospective multicenter trial of the Viatorr expanded polytetrafluoroethylene-covered stent-graft for transjugular intrahepatic portosystemic shunt creation. *J Vasc Interv Radiol* 2004; 15: 1219-1230
- 24 Thomas D, Boyer and Ziv J. Haskal. The role of transjugular intrahepatic portosystemic shunt in the management of portal hypertension. *Hepatology* 2005; 41: 386-400

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 •

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.

慢性乙型肝炎病毒感染免疫耐受期患者的临床病理特征

邢汉前, 辛绍杰, 张欣, 陈黎明, 赵景民, 游绍莉, 赵军, 王岩

邢汉前, 辛绍杰, 陈黎明, 赵景民, 游绍莉, 赵军, 王岩, 解放军第302医院感染科 北京市 100039

张欣, 首都医科大学附属佑安医院临床检验中心 北京市 100054

通讯作者: 辛绍杰, 100039, 北京市, 解放军第302医院感染科. 电话: 010-66933129-6023

收稿日期: 2006-02-25 接受日期: 2006-03-15

Clinical status and hepatic pathology of patients with chronic hepatitis B virus infection in immune tolerant phase

Han-Qian Xing, Shao-Jie Xin, Xin Zhang, Li-Ming Chen, Jing-Min Zhao, Shao-Li You, Jun Zhao, Yan Wang

Han-Qian Xing, Shao-Jie Xin, Li-Ming Chen, Jing-Min Zhao, Shao-Li You, Jun Zhao, Yan Wang, the Third Department of Infectious Diseases, the 302nd Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

Xin Zhang, Center of Clinical Laboratory, the Affiliated Youan Hospital of Capital Medical University, Beijing 100054, China

Correspondence to: Shao-Jie Xin, the Third Department of Infectious Diseases, the 302nd Hospital of Chinese PLA, Beijing 100039, China

Received: 2006-02-25 Accepted: 2006-03-15

Abstract

AIM: To investigate the characteristics of the clinical status and hepatic pathology of patients with hepatitis B virus (HBV) infection in immune tolerant phase.

METHODS: Three hundred and eighty patients with chronic HBV infection of different phases were involved in this study. The data about the ages of patients, vertical transmission, family history of HBV infection, hepatocytic expression of HBsAg and HBeAg and hepatic pathology were statistically analyzed.

RESULTS: It was found that 61.8% of patients in immune tolerant stage were less than 16 years old, and 46.6% with a family history of HBV infection. Vertical transmission covered a percentage of 55% and in patients of immune tolerant stage. Of 89 patients in immune tolerant stage, the ratio of HBcAg expression was 78.7%. The

ratios above were significantly higher than the corresponding ones in patients of immune active stage or non-active status ($\chi^2 = 38.73, 49.08, 17.2, 31.69$, respectively, all $P < 0.01$). For the patients less than 16 years old, the ratios of hepatocytic expression of HBsAg and HBeAg were 64.3% (45/75) and 72.9% (51/79), respectively, in immune tolerant stage which were obviously higher than those in immune active stage or non-active status ($\chi^2 = 17.51, 31.17$, both $P < 0.001$). For the patients more than 16 years old, the ratios of hepatocytic HBsAg and HBeAg expression were 35.7% (25/75) and 27.1% (19/70), respectively, in immune tolerant stage, which were markedly lower than those in immune active stage or non-active status ($\chi^2 = 17.51, \chi^2 = 31.17$, both $P < 0.001$).

CONCLUSION: Vertical transmission and family history of HBV infection have higher proportions in chronic HBV infection patients less than 16 years old in immune tolerant stage. HBV replicates most in patients of immune tolerant stage, especially in those less than 16 years old.

Key Words: Chronic hepatitis B virus infection; Immune tolerance; Hepatic pathology

Xing HQ, Xin SJ, Zhang X, Chen LM, Zhao JM, You SL, Zhao J, Wang Y. Clinical status and hepatic pathology of patients with chronic hepatitis B virus infection in immune tolerant phase. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1425-1429

摘要

目的: 了解HBV慢性感染免疫耐受期患者的临床及病理学特征。

方法: 分析HBV感染不同时期380例患者的年龄、母婴垂直传播感染途径、乙肝家族史、肝细胞内HBsAg、HBeAg表达状况及肝组织病理学特征。

结果: HBV慢性感染免疫耐受期患者年龄16岁以下占61.8%, 母婴垂直传播感染者占55.0%, 有乙肝家族史患者占46.6%, 免疫耐受期患者89例肝组织内HBcAg阳性表达率

■背景资料

乙型肝炎病毒慢性感染的自然过程分四期, 包括: 免疫耐受期、免疫活动期、非活动HBV携带状态、再活动期。HBV慢性感染免疫耐受发生率较高, 由于患者无明显症状不易发现, 未得到及时诊治, 少部分患者甚至发生肝硬化。

■研究前沿

HBV慢性感染不同时期患者的临床及病理特征不同, 尤其是了解肝组织内免疫细胞应答情况有助于指导HBV感染者的抗病毒治疗, 延缓肝硬化进程, 因此研究不同时期HBV感染患者肝组织的免疫细胞的变化可能成为下一步研究的前沿和热点。

■创新盘点

依据不同时期患者的临床及病理特点,尤其是免疫细胞的变化特点,制订HBV感染不同时期患者的临床治疗策略有重要作用。

78.7%,均明显高于免疫活动期及感染非活动状态患者($\chi^2 = 38.73, 49.08, 17.2, 31.69, P < 0.01$)。免疫耐受期16岁以下的患者肝组织内HBsAg及HBcAg阳性表达率最高,分别占64.3%(45/75)和72.9%(51/79),显著高于免疫活动期和非活动HBV携带状态患者($\chi^2 = 17.51, 31.17, P < 0.001$)。免疫耐受期16岁以上的患者肝组织内HBsAg及HBcAg阳性表达率最低,分别占35.7%(25/75)和27.1%(19/70),显著低于免疫活动期和非活动HBV携带状态患者($\chi^2 = 17.51, \chi^2 = 31.17, P < 0.001$)。

结论: HBV慢性感染免疫耐受期患者中16岁以下者,母婴垂直传播感染者及乙肝家族史者所占比例明显高;HBV在肝组织复制表达以免疫耐受期患者最多,且16岁以下的患者占多数。

关键词: 慢性HBV感染;免疫耐受;肝组织病理

邢汉前, 辛绍杰, 张欣, 陈黎明, 赵景民, 游绍莉, 赵军, 王岩. 慢性乙型肝炎病毒感染免疫耐受期患者的临床病理特征. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1425-1429

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1425.asp>

0 引言

目前HBV感染呈世界流行趋势,我国是高流行地区,HBsAg阳性流行率高达9.75%,有1.2亿人携带HBsAg。慢性HBV感染的自然病程漫长,可持续30-50 a,且多在青壮年时期发病。按其自然病程可划分为免疫耐受期、免疫清除期和HBV感染非活动状态^[1-4]。现将380例慢性HBV感染者不同时期的临床与病理特点进行统计分析,以探讨慢性HBV感染不同时期患者的临床和病理特点,为慢性乙肝的预防及治疗提供指导。

1 材料和方法

1.1 材料 2000-07/2004-07住院并行肝组织活检患者380例,男320例,女60例,年龄2-60岁(平均 22.2 ± 12.3),HBsAg阳性6 mo以上,且甲、丙、丁、戊型肝炎病毒抗体均阴性,抗-HIV阴性,临床诊断均符合2000年西安修订的《病毒性肝炎防治方案》标准^[5]。免疫耐受期(I组)131例,男108例,女23例,平均年龄为 17.3 ± 10.8 岁,其中16岁以下者占61.8%,所有患者病史中均无肝功能异常病史,且无保肝、降酶、免疫调节剂及抗病毒药物应用史,外周血HBsAg, HBeAg和HBcAb均阳性,HBV DNA $>1.0 \times 10^8$ copies/L,肝组织无或

表 1 380例HBV感染不同时期患者年龄分布情况

分期	n	年龄(岁)	
		≤ 16	> 16
免疫耐受组(Ⅰ)	131	81 (61.8%)	50 (38.2%)
免疫清除组(Ⅱ)	214	71 (33.2%)	143 (66.8%)
感染非活动状态(Ⅲ)	35	5 (14.3%)	30 (85.7%)

$\chi^2 = 38.731, P = 0.000$.

仅轻微损伤。免疫活动期(Ⅱ组)214例,男182例,女32例,平均年龄为 24.0 ± 12.3 岁,其中16岁以下者占33.2%,全部病例均有肝功能持续异常半年以上,外周血HBsAg, HBeAg/HBeAb, HBcAb阳性,HBV DNA $>1.0 \times 10^8$ copies/L,肝组织炎症明显。HBV感染非活动状态(Ⅲ组)35例,男30例,女5例,平均年龄为 29.4 ± 11.5 岁,其中16岁以下者占14.3%;所有患者肝功能均一直正常,外周血HBsAg, HBeAb, HBcAb阳性,HBV DNA $<1.0 \times 10^8$ copies/L,肝组织无或仅轻微损伤^[1-6](表1)。

1.2 方法 采用全自动生化分析机器常规检测血生化指标,应用酶联免疫(ELISA)法及PCR法检测乙肝病毒抗原抗体五项及HBV DNA定量,部分患者采外周抗凝血在FACSCalibur型流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司)上监测CD3, CD4, CD8, B细胞, NK细胞百分比。采用1 s肝穿刺活检法,取肝组织,40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,连续4 μ m切片,分别用苏木素-伊红染色,光学显微镜下多视野观察,按2000年西安修订的《病毒性肝炎防治方案》标准进行炎症分级(G0-4)和纤维化分期(S0-4)^[5]。肝组织内HBsAg、HBcAg免疫组化采用S-P法测定,鼠抗-HBs单抗、兔抗-HBc多克隆抗体及免疫组化PV-9000试剂盒购自北京中山生物技术有限公司,按说明书严格操作,免疫组化操作流程参照文献[6]。免疫组化半定量判定标准:无色为阴性,有棕黄色为阳性^[7]。

统计学处理 定量数据采用均数 \pm 标准误差表示,将有关数据录入SPSS数据格式,应用SPSS10.0统计软件对数据进行分析, $P < 0.05$,表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床病理特点 380例患者中母婴垂直传播122例,占32.1%,感染途径不明者258例,占67.9%。HBV感染患者母婴垂直传播以免疫耐受期所占比例最高,为72例(55.0%),免疫清除期46例(21.5%),而HBV感染非活动状

■应用要点

通过分析临床及病理特征,指导HBV感染不同时期患者的临床治疗,延缓疾病的进程。

表 2 HBV感染患者209例外周血淋巴细胞亚群 (mean ± SD, %)

分组	n	CD3	CD4	CD8	CD4/CD8	B细胞	NK细胞
I组	78	67.8±5.6	30.3±6.8	31.8±6.9	1.0±0.4	16.4±5.2	13.8±6.2
II组	109	71.5±7.7	31.6±5.1	34.1±6.2	1.0±0.3	15.5±5.0	12.1±4.2
III组	22	81.0±2.8	38.0±14.1	39.0±8.5	1.0±0.6	8.0±1.4	9.5±2.1

表 3 肝细胞内HBsAg及HBcAg阳性表达状况 n (%)

分期	HBsAg			HBcAg		
	≤16 ^b	>16	合计	≤16 ^b	>16	合计
I组	45 (64.3)	25 (35.7)	70 (79.5)	51 (72.9)	19 (27.1)	70 (78.7)
II组	39 (37.1)	66 (63.9)	105 (71.9)	24 (30.4)	55 (69.6)	79 (53.7)
III组	4 (21.0)	15 (79.0)	19 (79.0)	0 (0.0)	5 (100.0)	5 (20.8)

^bP = 0.000.

态组最低, 为4例(11.4%), 差异有统计学意义($P < 0.01$). 有明确乙肝家族史者139例(36.6%); 有明确乙肝家族史患者中, 免疫耐受期所占比例最高为46.6%(61/131), 其次为免疫清除期为34.5%(74/214), 而感染非活动期最低为11.4%(4/35), 差异有统计学意义($P < 0.01$). HBV慢性感染不同时期患者外周血T、B淋巴细胞亚群及NK细胞百分比均无明显差异($P > 0.05$, 表2).

2.2 肝组织病理特点 免疫耐受期及HBV感染非活动状态患者肝组织汇管区及小叶内均无或仅有轻微炎细胞浸润, 汇管区周围无界面炎, 小叶内无或仅有轻微点灶状坏死, 汇管区无明显扩大, 无明显纤维组织增生. 而免疫活动期患者, 84.1%(180/214)患者肝组织汇管区有中度以上炎细胞浸润, 18.2%(39/214)患者汇管区有中度以上碎屑样坏死, 仅24.3%(52/214)患者肝组织小叶内有中度以上炎细胞浸润, 41.6%患者小叶内有中度以上点灶状坏死, 且汇管区周围有轻至重度界面炎, 汇管区扩大明显, 纤维组织增生明显, 少数有纤维隔形成.

2.3 肝细胞内HBsAg及HBcAg 肝细胞内HBsAg主要以全质型及包涵体型分布, 少数为胞膜型, HBcAg主要分布于肝细胞核内, 极少数为核膜、核周或胞膜型. 免疫耐受期、免疫活动期及非活动HBV携带状态者间肝组织内HBsAg阳性表达率均无显著性差异($\chi^2 = 1.96$, $P > 0.05$), 而免疫耐受期患者肝细胞内HBcAg阳性表达率为70/89(78.7%), 明显高于免疫活动期和非活动HBV携带状态患者($\chi^2 = 31.69$, $P < 0.01$). 免

疫耐受期16岁以下的患者肝组织内HBsAg及HBcAg阳性表达率最高, 分别占45/75(64.3%)和51/79(72.9%), 显著高于免疫活动期和非活动HBV携带状态患者($\chi^2 = 17.51$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 31.17$, $P < 0.001$). 同时发现免疫耐受期16岁以上的患者肝组织内HBsAg及HBcAg阳性表达率最低, 分别占25/75(35.7%)和19/70(27.1%), 显著低于免疫活动期和非活动HBV携带状态患者($\chi^2 = 17.51$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 31.17$, $P < 0.001$, 表3).

3 讨论

慢性HBV感染的自然病史复杂, 受多种因素影响, 如病毒因素、宿主因素(感染时的年龄、性别、免疫状况、感染途径), 一些外在因素(如合并其他嗜肝病毒感染、酗酒), 以及医学干预(抗病毒治疗、免疫调节治疗等)^[1,8]. 在380例慢性HBV感染患者中, 有明确乙肝家族史者占36.58%, 其中免疫耐受期患者占比例最高为46.6%, 免疫清除期次之为34.5%, 感染非活动期最低为11.4%, 差异有统计学意义($P < 0.01$). 全部患者中母婴垂直传播占32.11%, 与文献报道相符^[9-10], 其中免疫耐受期、免疫活动期、感染非活动期患者中母婴垂直传播分别占55.0%、21.5%、11.4%, 差异有统计学意义($P < 0.01$). HBV传播途径与我国乙肝感染者呈高度家庭聚集性, 且以母婴垂直传播为主相符. 以上结果说明在慢性乙型肝炎三个时期中, 通过乙肝家族史或母婴垂直传播途径感染HBV, 免疫耐受期患者所占比例明显升高.

在380例HBV慢性感染患者中, 免疫耐受

■名词解释

免疫耐受(Immune tolerance)是指机体对乙肝病毒抗原不产生免疫应答反应, 患者的免疫系统无法有效识别和清除乙肝病毒, 这时候, 机体没有清除乙肝病毒的免疫能力, 单纯依靠抗病毒药物抑制病毒复制就显得“势单力薄”. HBV感染免疫耐受期患者无临床症状, ALT正常, HBeAg阳性, HBV DNA $> 10^8$ copies/L, 而肝脏无或仅轻微炎症损伤.

■同行评价

本文将380例HBV感染不同时期患者的临床及病理特征进行了分析研究,尤其是免疫耐受期患者的特征,为临床上处于免疫耐受时期患者的治疗提供重要指导。选题意义热门,学术价值较高,文字质量良,有一定的学术价值和新颖性。

期患者中年龄在16岁以下的患者比例为61.8%,明显高于免疫清除期和感染非活动期患者($P<0.01$)。同时发现免疫耐受期16岁以下患者肝组织内HBsAg及HBcAg阳性表达的比例最高,分别占64.3%和72.9%,显著高于免疫活动期和非活动HBV携带状态患者($P<0.01$)。免疫耐受期16岁以上患者肝组织内HBsAg及HBcAg阳性表达的比例最低,分别占35.7%和27.1%,显著低于免疫活动期和非活动HBV携带状态患者($P<0.01$)。这可能是由于16岁以下的患者免疫系统发育不完善,免疫功能不成熟,感染HBV后机体发生免疫耐受,不能有效地清除肝组织的HBV病毒,故耐受期患者年龄在16岁以下所占比例高,且肝组织内HBsAg及HBcAg阳性表达的比例高^[10-15]。380例HBV慢性感染不同时期患者外周血淋巴细胞各亚群均无明显差异,与文献报道基本一致^[16-20]。作者曾报道^[21]免疫耐受期患者肝内浸润的CD³⁺、CD⁴⁺、CD⁸⁺ T淋巴细胞数明显多于正常肝组织($P<0.01$),但明显少于免疫活动期患者($P<0.01$)。以上结果提示检测外周血淋巴细胞亚群可能不能真实反应HBV慢性感染者机体的免疫状态。

免疫耐受期患者外周血HBsAg和HBeAg都呈阳性,肝组织内肝细胞有HBsAg或/和HBcAg表达,尤其是HBcAg的阳性表达比例(78.7%)明显高于免疫清除期和感染非活动期患者($P<0.01$)。HBV-转基因小鼠证实HBV病毒抗原,尤其是HBcAg、HBeAg抗原,诱发机体产生针对病毒抗原的无应答或应答弱的耐受状态^[23-25],因而免疫耐受期患者的免疫活性细胞不能有效攻击被HBV感染的肝细胞,导致HBV病毒能不断复制,HBsAg或/和HBcAg表达于肝细胞,而肝组织未受损伤或轻微损伤。

HBV感染不同时期肝组织病理显示:免疫活动期患者肝组织汇管区有中度以上炎细胞浸润及碎屑样坏死所占比例分别为84.1%和18.2%,肝小叶内有中度以上炎细胞浸润及点灶状坏死所占比例分别为24.3%和41.6%。而免疫耐受期及HBV感染非活动状态患者肝汇管区及小叶内均无或仅有轻微炎细胞浸润,小叶内无或仅有轻微点灶状坏死。可能是因为耐受期患者机体对HBV病毒抗原未产生免疫应答或应答弱未募集炎症细胞至肝组织^[26-28],而在免疫活动期患者HBV病毒抗原诱发机体产生了免疫应答,募集了炎症细胞至肝组织,参与肝组织炎症损伤和发挥清除HBV病毒作用。部分免疫耐受期

患者汇管区有轻度炎细胞浸润及小叶内有轻微点灶状坏死,可能这部分患者正处在将要进入免疫活动期前期,故应严密观察肝功能的变化,及时与相应的治疗。

4 参考文献

- 1 Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000-summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001; 120: 1828-1853
- 2 Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 47-58
- 3 Maddrey WC. Hepatitis B: an important public health issue. *J Med Virol* 2000; 61: 362-366
- 4 McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 17-21
- 5 中华医学会传染病与寄生虫病学分会. 肝病学会. 病毒性肝炎防治方案. 中华肝脏病杂志 2000; 8: 324-329
- 6 纪小龙, 施作霖. 诊断免疫组织化学. 北京: 军事医学科学出版社, 1997: 14-20
- 7 Mochizuki K, Hayashi N, Hiramatsu N, Katayama K, Kawanishi Y, Kasahara A, Fusamoto H, Kamada T. Fas antigen expression in liver tissues of patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 1996; 24: 1-7
- 8 Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 1225-1241
- 9 于华鹏, 刘筱娟. 乙型肝炎母婴传播的途径及预防. 国外医学社会医学分册 2001; 18: 117-121
- 10 Chang MH. Natural history of hepatitis B virus infection in children. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: E16-E19
- 11 Koziel MJ. What once was lost, now is found: restoration of hepatitis B-specific immunity after treatment of chronic hepatitis B. *Hepatology* 1999; 29: 1331-1333
- 12 Chen M, Sallberg M, Hughes J, Jones J, Guidotti LG, Chisari FV, Billaud JN, Milich DR. Immune tolerance split between hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol* 2005; 79: 3016-3027
- 13 Reignat S, Webster GJ, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, Dusheiko G, Williams R, Maini MK, Bertolotti A. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2002; 195: 1089-1101
- 14 Sette AD, Oseroff C, Sidney J, Alexander J, Chesnut RW, Kakimi K, Guidotti LG, Chisari FV. Overcoming T cell tolerance to the hepatitis B virus surface antigen in hepatitis B virus-transgenic mice. *J Immunol* 2001; 166: 1389-1397
- 15 Kakimi K, Isogawa M, Chung J, Sette A, Chisari FV. Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. *J Virol* 2002; 76: 8609-8620
- 16 王敏, 王福生. NK细胞和NK T细胞在病毒性肝炎中的作用. 免疫学杂志 2003; 19: S138-S141
- 17 邢同京, 章廉, 骆抗先, 侯金林, 何海棠, 姜荣龙, 文维群. Th1/Th2类细胞因子在慢性乙型肝炎患者的表达及其临床意义. 解放军医学杂志 2000; 25: 235-237
- 18 张萍, 吴文瀚, 魏来. 乙型病毒性肝炎患者外周血T辅助细胞1、2型细胞因子含量的测定及临床意义. 徐州医学院学报 2001; 21: 304-306
- 19 姜荣龙, 卢桥生, 侯金林, 骆抗先, 章廉, 富宁. 辅助性T细胞极化群体在慢性乙型肝炎病毒感染中的作用. 中

- 华医学杂志 2000; 80: 741-744
- 20 范振平, 王福生, 张玲霞. NK T细胞和慢性乙肝的关系. 中华实用医学杂志 2003; 5: 19-22
- 21 邢汉前, 辛绍杰, 赵景民, 陈黎明, 李保森, 游绍莉, 赵军, 周光德, 潘登. HBV慢性感染患者免疫耐受期肝组织内T、B淋巴细胞的变化. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1529-1534
- 22 Hadziyannis SJ, Vassilopoulos D. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 617-624
- 23 Chan HL, Leung NW, Hussain M, Wong ML, Lok AS. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B in Hong Kong. *Hepatology* 2000; 31: 763-768
- 24 Tang TJ, Kwekkeboom J, Laman JD, Niesters HG, Zondervan PE, de Man RA, Schalm SW, Janssen HL. The role of intrahepatic immune effector cells in inflammatory liver injury and viral control during chronic hepatitis B infection. *J Viral Hepat* 2003; 10: 159-167
- 25 贾一韬, 茅益民, 陆伦根, 范竹萍, 杨文卓, 宋育林, 沈冠凤, 罗鸿仔, 李恩灵, 曾民德. 慢性肝病患者的免疫功能指标与病理学改变关系的初步研究. 胃肠病学杂志 2001; 6: 201-203
- 26 王功遂, 王曼曼, 谢秋里, 明朗, 姜湘宁, 陈乐无, 刘梅华. HBsAg、HBcAg在慢性乙型肝炎肝细胞内的表达及临床意义. 中华肝脏病杂志 2004; 12: 287-289
- 27 徐志强, 张鸿飞, 杨晓晋, 杨斌, 王福生. 小儿慢性乙型肝炎外周血T淋巴细胞亚群和临床病理关系的研究. 中华实验和临床病毒学杂志 2004; 18: 142-144

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、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.

慢性胰腺炎213例的临床特点

吴杰, 贾业贵, 陈时, 李红燕, 余卫中, 张勇, 甘洪颖

■背景资料

慢性胰腺炎是目前消化系统疾病中较常见疾病, 发病率每年有明显上升, 其诊断在临床上还是比较困难, 若要通过病理诊断可能更困难, 因此需要研究更为简便和有效的方法。

吴杰, 贾业贵, 陈时, 李红燕, 余卫中, 张勇, 甘洪颖, 武汉市第六医院(江汉大学附属医院)消化科 湖北省武汉市 430015
通讯作者: 吴杰, 430015, 湖北省武汉市江岸区香港路168号, 湖北省武汉市第六医院(江汉大学附属医院)消化科.
wujie988@sina.com
电话: 027-82432032
收稿日期: 2006-03-06 接受日期: 2006-04-06

Clinical characteristics of 213 patients with chronic pancreatitis

Jie Wu, Ye-Gui Jia, Shi Chen, Hong-Yan Li, Wei-Zhong Yu, Yong Zhang, Hong-Ying Gan

Jie Wu, Ye-Gui Jia, Shi Chen, Hong-Yan Li, Wei-Zhong Yu, Yong Zhang, Hong-Ying Gan, Department of Digestive Diseases, Wuhan Sixth Hospital, Wuhan 430015, Hubei Province, China

Correspondence to: Department of Digestive Diseases, Wuhan Sixth Hospital, 168 Hong Kong Road, Jiang'an District, Wuhan 430015, Hubei Province, China. wujie988@sina.com

Received: 2006-03-06 Accepted: 2006-04-06

Abstract

AIM: To conclude the clinical characteristics of 213 chronic pancreatitis (CP) patients during the past 9 years.

METHODS: The data of pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and missed diagnosis were retrospectively analyzed in 213 CP patients admitted in the past 9 years.

RESULTS: CP patients covered a percentage of 4.38% in department of digestive diseases, and the ratio of male to female was 1 : 0.84. The rate of increment every 3 years in the past 9 years was 38.6%. Of 213 cases, the rates were 36.2%, 42.7%, and 13.6% for biliary pancreatitis, alcoholic pancreatitis, and high levels of blood lipid, respectively, and the pathogenesis for 7.5% of 213 was not clear. 9.9% of 213 patients suffered a continual abdominal pain, 44% with abdominal pain after taking food, and 53.5% had the preceding two symptoms. Besides, chronic diarrhea or steatorrhea appeared in 57% patients, abdominal distension or diarrhea in 81% patients

after intake of high-fat diet (including alcohol), malabsorption in 41% patients, and diabetes in 7.0% patients. Of all the patients, 72.3% were diagnosed with clinical manifestations, fatty stool or pancreatic exocrine function test, computed tomography, and endoscopic ultrasonography, and 27.7% were diagnosed with endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration biopsy. Of 213 patients, 33.8% were misdiagnosed with chronic gastritis or atrophic gastritis, 30.5% with chronic diarrhea, enteritis or chronic colitis, 11.3% with biliary stones or postcholecystectomy syndrome, and 3.8% with pancreatic neoplasm or cancer.

CONCLUSION: The incidence rate of CP is rising, and its manifestation of abdominal pain is not significant, but of variety. Early diagnosis is important.

Key Words: Clinical characteristics; Chronic pancreatitis; Misdiagnosis

Wu J, Jia YG, Chen S, Li HY, Yu WZ, Zhang Y, Gan HY. Clinical characteristics of 213 patients with chronic pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1430-1432

摘要

目的: 回顾性分析9 a间慢性胰腺炎(CP)的临床特点。

方法: 对住院诊断CP 213例, 按发病情况、临床表现、诊断及漏误诊等特点进行统计。

结果: CP 213例, 占消化科住院患者的4.38%, 男女之比1 : 0.84, 9 a间每3 a发病增长为38.6%, 病因: 胆源性36.2%, 酒精性42.7%, 高血脂13.6%, 原因不明7.5%; 临床表现: 持续腹痛仅9.9%, 进食后腹痛44%, 两者相加为53.5%, 而慢性腹泻或脂肪泻占57%, 进高脂餐(包括饮酒)后腹胀或腹泻81%, 吸收不良41%, 糖尿病7.0%; 在诊断方面: 72.3%是以临床表现、大便脂肪定性或胰腺外分泌功能试验及CT、EUS影像学特征诊断, 27.7%超声内镜引导下细针穿刺通过病理诊断, 在漏误诊

方面:33.8%长期诊断为慢性胃炎或萎缩性胃炎,30.5%诊断为慢性腹泻、肠炎或慢性结肠炎,11.3%诊断为胆系结石或胆囊术后综合症,3.8%诊断为胰腺新生物或胰腺癌。

结论:CP发病率在上升,临床表现腹痛不突出,而且多样性,应早期诊断,避免漏诊和误诊

关键词: 临床特点;慢性胰腺炎;误诊

吴杰,贾业贵,陈时,李红燕,余卫中,张勇,甘洪颖.慢性胰腺炎213例的临床特点.世界华人消化杂志2006;14(14):1430-1432

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1430.asp>

0 引言

慢性胰腺炎(CP)的发病在我国有明显上升趋势,虽在我国还未见详细流行病学的报道,但已成消化系统疾病中常见疾病^[1].并且在CP的诊治方面常常易出现漏诊和误诊,为了有利于提高对CP的诊断和治疗水平,我们回顾分析1996-08/2005-12住院的CP213例的特点。

1 材料和方法

按2005年南京CP诊治指南中的诊断标准^[2]收集1996-08/2005-12住院的CP患者213例,根据患者的临床症状进行下列检查:3次大便常规、大便细菌培养阴性及苏丹Ⅲ染色;胰功肽试验(N-苯甲酰-L-酪氨酰对氨苯甲酸, BT-PABA);空腹血糖;胰腺CT或超声内镜检查,对于有临床症状大便苏丹Ⅲ染色或胰腺外分泌功能异常,但影像学检查不典型的患者,行超声内镜(EUS)引导下细针穿刺病理组织学检查.将213例CP患者按发病情况、临床表现、诊断及漏误诊等特点进行统计。

2 结果

2.1 发病情况 CP213例,占消化科住院患者的4.38%(213/4863);男116例,97女例,男女之比1:0.84,年龄15-76岁,1996-1999年收治48例(48/213, 22%),男15例,女33例,男女之比0.46:1;2000-2002年74例(74/213, 35%),男44例,女30例,男女之比1:0.68;2003-2005年91例(91/213, 43%),男57例,女34例,男女之比1:0.37.2000-2002年比1996-1999年增加54.2%(74/48),2003-2005年比2000-2003年增23.0%(91/74),比1996-1999年增加89.6%(91/48)。

2.2 临床表现 病程1/4-35 a,平均2.94 a,临床主

要表现慢性脂肪泻122例(57%),持续腹痛21例(9.9%),进食后腹痛93例(44%),进食后腹胀169例(79%),消瘦、营养不良、贫血、失眠、多梦、记忆减退、注意力不能集中等吸收不良表现87例(41%),精神抑郁5例(2.3%),糖尿病15例(7.0%),饮酒后腹痛或腹泻87例(41%),进高脂肪餐(包括饮酒)后腹胀或腹泻172例(81%),入院前在院外诊断最多的是慢性胃炎或慢性萎缩性胃炎72例(33.8%),慢性腹泻或慢性结肠炎65例(30.5%),诊断为胆系结石或胆囊术后综合症24例(11.3%)等,少数被诊断为胰腺新生物或胰腺癌8例(3.8%)。

2.3 诊断特点 有106例(49.8%)行以下检查:大便苏丹Ⅲ染色3次有2次阳性,胰功肽试验(BT-PABA)<65%,CT或EUS检查胰腺有CP的影像学特征而诊断,有48例(22.5%)大便苏丹Ⅲ染色阳性或胰功肽试验仅一项异常,但CT或EUS检查符合CP的影像学特征而诊断,另有59例(27.7%),他们中有大便苏丹Ⅲ染色或胰功肽试验异常,但CT或EUS检查胰腺不能诊断CP的和疑为胰腺新生物或胰腺癌的最后行EUS引导下细针穿刺通过病理诊断.有72例(33.8%)长期诊断为慢性胃炎或萎缩性胃炎3-11 a,有65例(30.5%)诊断为慢性腹泻、肠炎或慢性结肠炎3-35 a,有24例(11.3%)诊断为胆系结石或胆囊术后综合症等,诊断为胰腺新生物或胰腺癌8例(3.8%)。

2.4 病因特点 胆源性(包括胆系结石、胆囊术后)77例(36.2%),酒精性91例(42.7%),高血脂29例(13.6%),原因不明16例(7.5%).女性97例,胆源性64例(66%),酒精性4例(4.1%),高血脂21例(21.7%),原因不明8例(8.2%);男性116例,胆源性13例(11.2%),酒精性87(75%),高血脂8例(6.9%),原因不明8例(6.9%).1996-1999年48例,胆源性31例(64.5%),酒精性9例(18.8%),高血脂6例(12.5%),原因不明2例(4.2%);2000-2002年74例,胆源性25例(33.8%),酒精性35例(47.3%),高血脂11例(14.9%),原因不明3例(4.0%);2003-2005年91例,胆源性21例(23.1%),酒精性47例(51.6%),高血脂12例(13.2%),原因不明11例(12.1%)。

3 讨论

CP在我国的发病率近年来有明显升高趋势^[3],已成为消化系统疾病中较常见疾病,但由于对CP的认识不够,有些患者的症状并不典型常常被误诊^[4],加上诊断方法有一定困难,因此在我国对于CP的流行病学和发病率没有一个明确统计结果.本组CP213例占消化科住院患者的4.38%,男

■创新盘点

文章的主要目的是想通过总结慢性胰腺炎的不同临床特点来引起同行对该病的重视,尤其要注意的是有部分患者在临床上以胰腺外分泌功能不良的表现为首发症状。

■应用要点

在临床上常常有较多的慢性胰腺炎被误诊,尤其对于多年的慢性胃炎及萎缩性胃炎,多年的慢性小肠性腹泻,和慢性结肠炎的患者,要引起注意。

116例, 97女例, 男女之比1:0.84, 年龄15-76岁, 男性多于女性, 但前1个3 a女性发病多于男性, 后2个3 a男性发病逐年超过女性, 因此总的男女发病男性高于女性, 可能与生活水平提高, 男性饮酒过多有关。1996-2005年平均每3 a发病增长为38.57%。在临床表现方面与有关文献报道的以腹痛为最突出症状并不一致^[4], 真正以腹痛为主要症状的并不多, 持续腹痛仅21例(9.9%), 进食后腹痛93例(44%), 两者相加为53.5%, 而慢性腹泻或脂肪泻占57%, 有文献报道在CP中有的患者仅表现脂肪泻而不表现腹痛^[5-6], 可能与胰腺外分泌功能不全有关, 另外进高脂肪餐(包括饮酒)后腹胀或腹泻172例(81%), 41%的表现为吸收不良, 糖尿病7.0%, 并且按慢性胰腺炎治疗后糖尿病有不同程度好转, 因此提示我们在有些II型糖尿病中要注意是否有CP并存。

本组胆源性36.2%, 酒精性42.7%, 高血脂13.6%, 原因不明7.5%。女性, 胆源性66%, 酒精性4.1%, 高血脂22.7%, 原因不明8.2%; 男性, 胆源性11.2%, 酒精性75%, 高血脂6.9%, 原因不明6.9%。9 a中每3 a病因情况: 1996-1999年, 胆源性64.5%, 酒精性18.8%, 高血脂12.5%, 原因不明4.2%; 2000-2002年, 胆源性33.8%, 酒精性47.3%, 高血脂14.9%原因不明4.0%; 2003-2005年, 胆源性23.1%, 酒精性51.6%, 高血脂13.2%, 原因不明12.1%。将发病情况和病因结合分析发现: (1)发病率是上升的; (2)男性发病逐年上升, 最终男性多于女性; (3)女性以胆原性为主, 男性以酒精性为主, 由于总的发病率男性高于女性, 因此在病因方面酒精性占到总病因的42.7%。CP的诊断标准目前主要有2000年亚太共识会和2005年南京CP诊治指南, 根据其诊断标准, 本组213例除了有临床表现和有大便脂肪定性试验阳性或胰腺外分泌功能试验阳性外, 必须CT或EUS检查

胰腺有CP影像学特征, 若CT或EUS不能诊断, 则采用超声内镜引导下细针穿刺通过病理诊断^[7], 213例中有27.7%(59例)采用此方法最后给予了诊断和鉴别诊断。

由于CP发病率上升, 有些症状并不典型, 若对该病的认识不足, 加上目前在诊断手段方面存在一定困难, 因此会出现对CP的漏诊和误诊, 本组中就有72例(33.8%)长期诊断为慢性胃炎或萎缩性胃炎, 65例(30.5%)期诊断为慢性腹泻、肠炎或慢性结肠炎, 24例(11.3%)诊断为胆系结石或胆囊术后综合症, 还有8例(3.8%)诊断为胰腺新生物或胰腺癌。这些患者明确诊断后给予胰酶制剂(得每通)治疗后都有不同程度的好转。总之通过回顾分析CP213例的临床特点, 我们认为目前CP的发病率在上升, 临床表现并不一定以腹痛症状为最突出, 还有其他表现要引起注意, 尽可能的采用更为有效的诊断方法来早期诊断, 避免漏诊和误诊, 使得CP能够得到早期治疗不至于发展到难治性CP的地步。

4 参考文献

- 1 李兆申. 加强慢性胰腺炎临床流行病学及病因学研究. 中华消化杂志 2004; 24: 705-706
- 2 中华医学会消化病学分会. 慢性胰腺炎诊治指南. 胰腺病学 2005; 5: 104-106
- 3 陈浮, 李兆申, 李淑德, 王洛伟, 许国铭. 慢性胰腺炎294例的病因学及临床诊治. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2829-2832
- 4 张志宏. 努力提高慢性胰腺炎临床处理水平. 中华消化杂志 2005; 25: 257-258
- 5 Grendell JH, McQuaid KR, Friedman SL. 现代胃肠疾病诊断与治疗. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 462-481
- 6 吴杰, 贾业贵, 李红燕, 陈时. 以慢性小肠性腹泻为主的慢性胰腺炎47例临床分析. 临床内科杂志 2004; 21: 706
- 7 吴杰, 贾业贵, 李承红, 李红燕, 陈时, 胡赤丁, 张勇, 甘洪颖. 超声内镜引导下细针穿刺病理诊断慢性胰腺炎的临床研究. 中华消化杂志 2004; 24: 724-727

电编 韩江燕 编辑 张海宁

急性结石性胆囊炎腹腔镜手术252例

钟 华, 张宗明, 宿砚明

钟华, 张宗明, 宿砚明, 清华大学第一附属医院消化医学中心普外科 北京市 100016

通讯作者: 钟华, 100016, 北京市朝阳区酒仙桥一街坊6号, 清华大学第一附属医院消化医学中心普外科.

zhonghuabeijing@yahoo.com.cn

电话: 010-64372362 传真: 010-64361322

收稿日期: 2006-03-03 接受日期: 2006-03-29

Laparoscopic cholecystectomy for acute calculous cholecystitis: an analysis of 252 cases

Hua Zhong, Zong-Ming Zhang, Yan-Ming Su

Hua Zhong, Zong-Ming Zhang, Yan-Ming Su, Department of General Surgery, Center of Digestive Medicine, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing 100016, China

Correspondence to: Hua Zhong, Department of General Surgery, Center of Digestive Medicine, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, 6 Yijiefang Jiuxianqiao, Chaoyang District, Beijing 100016, China. zhonghuabeijing@yahoo.com.cn

Received: 2006-03-03 Accepted: 2006-03-29

Abstract

AIM: To investigate the key points of laparoscopic cholecystectomy (LC) in the treatment of acute calculous cholecystitis.

METHODS: The data of 252 patients with acute calculous cholecystitis admitted in our hospital from October 1995 to October 2005 were retrospectively analyzed.

RESULTS: After carefully dissecting Calot triangle, separating and cutting off the cystic artery near gallbladder, and stopping bleeding using electrocoagulation combined with titanium clamps, 244 patients were successfully cured by LC. Meanwhile, 8 cases were shifted from LC into open cholecystectomy due to gallbladder cancer, immense ulcer on the globe part of duodenum, Mirizzi syndrome, the serious conglutination of bile duct and the ampulla part of gallbladder, the closed conglutination between duodenum and gallbladder, and the formation of inner fistula other than the reasons of haem-

orrhage and bile duct injuries outside the liver. Complications such as biliary leakage or haemorrhage in abdominal cavity were not detected after the operation. No postoperative biliary stricture occurred in the recent following up.

CONCLUSION: Laparoscopic cholecystectomy is safe and feasible in the treatment of acute calculous cholecystitis, and successful surgery should be based on the skilled techniques and the knowledge of key points in the operation.

Key Words: Laparoscopic cholecystectomy; Acute calculous cholecystitis; Complication

Zhong H, Zhang ZM, Su YM. Laparoscopic cholecystectomy for acute calculous cholecystitis: an analysis of 252 cases. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(14):1433-1436

摘要

目的: 探讨急性结石性胆囊炎腹腔镜胆囊切除术(laparoscopic cholecystectomy, LC)的手术操作要点.

方法: 回顾性分析本院1995-10/2005-10收治的252例胆囊结石并急性胆囊炎LC病例.

结果: 应用熟练的镜下操作技术, 仔细解剖Calot三角、近胆囊断离胆囊动脉、恰当处理术中出血、灵活应用电凝止血与钛夹止血相结合, 顺利完成腹腔镜胆囊切除术244例, 中转开腹胆囊切除术8例, 系因合并胆囊癌、十二指肠球部巨大溃疡、Mirizzi综合征、胆囊壶腹部与胆总管粘连严重、胆囊十二指肠致密粘连及内瘘形成等原因而中转开腹, 无术中大出血、肝外胆管损伤而中转开腹的病例. 无术后胆漏、腹腔内出血等严重并发症发生. 近期随访无胆管狭窄并发症发生.

结论: 急性胆囊炎行LC安全可行, 关键是术者必须充分了解LC操作要点和熟练掌握操作技术.

关键词: 腹腔镜胆囊切除术; 胆囊结石并急性胆囊炎

■背景资料

腹腔镜胆囊切除术以来, 已成为治疗胆囊结石和慢性胆囊炎的首选外科手术方法, 但在LC出现的早期, 急性胆囊炎是LC的禁忌证, 因此LC在急性胆囊炎的应用方面经验不多.

■相关报道

有报道急性胆囊炎的LC与OC相比, 并发症包括死亡率无明显增加, 急性胆囊炎不再是LC的禁忌证.

■创新盘点

随着LC经验的积累,急性胆囊炎行LC安全增加,已逐渐被大家接受,关键是术者必须充分了解LC操作要点和熟练掌握操作技术。

炎;并发症

钟华, 张宗明, 宿砚明. 急性结石性胆囊炎腹腔镜手术252例. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1433-1436

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1433.asp>

0 引言

急性结石性胆囊炎是否适宜腹腔镜胆囊切除术仍然存在一定争议,主要是对急性结石性胆囊炎施行LC术中胆囊床易出血、胆道损伤危险性增加^[1]、中转开腹率高等问题存有顾虑^[2]。有关急性结石性胆囊炎行LC的报道尚少。我院1995-10/2005-10对252例实施了LC,取得了满意的效果,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 胆囊结石并急性胆囊炎患者252例,男96例,女156例,年龄27-82(平均55)岁。合并冠心病30例,高血压病35例,糖尿病18例;术前均从病史体征(右上腹痛疼及压痛)、血常规(白细胞升高或中性粒细胞比例升高)、B超(显示胆囊内结石,胆囊增大、壁增厚或双边征)或结合CT检查明确诊断为胆囊结石并急性胆囊炎。本次发病至手术时间为8-86 h,平均42 h。

1.2 方法 全部病例术前置胃管、尿管,全麻下进行手术。采用四孔法或三孔法入腹,患者取仰卧位,先于脐上或脐下缘作1 cm切口,插入Veress针,注入CO₂气体,充气压设定于15 mmHg,然后经该切口穿入1 cm套针置入腹腔镜,于剑突下插入1 cm套针,于锁骨中线和腋前线各插入0.5 cm套针,完成四孔法入腹腹腔镜切除术;三孔法LC则缺少锁骨中线的戳孔。全组均采用顺行胆囊切除方法,手术时间35-160(平均65)min。急性胆囊炎胆囊壁充血水肿明显,术中渗血较多时可用生理盐水适当冲洗,渗血常能明显好转。Calot三角黏连明显时,应紧靠胆囊及胆囊管分离,不可向肝总管及右肝管方向过分解剖。防止胆囊动脉误伤出血的关键是仔细解剖Calot三角,在处理胆囊三角时遇到条索状组织,均应想到胆囊动脉存在的可能,应上钛夹处理。处理胆囊动脉时应确认供给胆囊动脉支近胆囊处离断,以防误伤肝右动脉(部分屈曲的肝右动脉贴近胆囊才分出胆囊动脉)和右肝管或肝总管。术中喷射状的动脉出血,距肝外胆管较远,可直接上钛夹止血,或用分离钳夹闭出血点,再上钛夹。离肝外胆管太近出血点,注意预防肝外胆管的损伤。电凝止血与钛夹止血

相结合,灵活应用,才能达到良好的止血效果。但要避免胆总管电热灼伤,一般认为电凝止血距胆总管2 cm以上就较为安全。

2 结果

顺利完成腹腔镜胆囊切除术244例。中转开腹胆囊切除术8例,其中胆囊癌1例,合并十二指肠球部巨大溃疡1例, Mirizzi综合征2例,胆囊壶腹部与胆总管黏连辨认困难1例,胆囊十二指肠致密黏连及内瘘形成3例。除部分病例术中创面渗血较多外,没有因术中大出血、肝外胆管损伤而中转开腹的病例。术后放置腹腔引流30例,24-72 h拔除。无术后胆漏、腹腔内出血而再次手术病例。术后病理诊断胆囊结石并急性单纯性胆囊炎(包括慢性胆囊炎急性发作)148例,并急性化脓性胆囊炎52例,并急性坏疽性胆囊炎44例。全组患者均治愈,术后3-7 d出院。近期随访188例,无胆管狭窄并发症发生。

3 讨论

普遍认为急性胆囊炎胆囊壁充血水肿明显,易造成术中渗血较多,且胆囊张力较高,夹持困难,故在LC出现的早期,急性胆囊炎是LC的禁忌证^[3]。随着LC经验的积累,急性胆囊炎行LC逐渐被大家接受,有报道急性胆囊炎的LC与OC相比,并发症包括死亡率无明显增加^[4]。对于急性胆囊炎行LC,张维能 *et al*^[5]认为除了坏疽性胆囊炎,所有的胆囊炎均是LC适应证。Johansson *et al*^[6]认为急性胆囊炎行LC与开腹胆囊切除术无任何明显不同的结果。Hawasli *et al*^[7]研究认为在急性胆囊炎发病24-48 h内,胆囊壁只有水肿而无明显充血,急性胆囊炎病情控制后4-6 d胆囊壁与周围组织有一定程度黏连,但此时黏连多较疏松,易于剥离,只要胆囊壁充血水肿轻,Calot三角解剖结构清晰,有一定经验的外科医师仍可顺利完成LC。Kolla *et al*^[8]认为急性胆囊炎行LC的时机以发病72-96 h为宜。有部分反复发作病史的急性胆囊炎患者,经抗生素治疗症状缓解而胆囊壁的炎症仍无改善,多伴有胆囊颈和胆囊管结石嵌顿或胆囊积脓,局部黏连重,给手术增加了难度,手术时机的掌握仍值得商讨。Phillips *et al*^[9]则认为,急性胆囊炎是否行LC应根据B超的影像学检查,尤其是胆囊壁厚度、胆囊大小和结石位置。但这些都为单因素分析,没有考虑到各因素间的相互作用。胡国治 *et al*^[10]提出了急性胆囊炎患者行LC的术前危险因数评分系统(PRFSS),有

一定的实际临床应用价值.我们认为急性胆囊炎LC的时机和指征并无固定准则,要灵活掌握,遵循个体化原则.本组病例均是由有丰富的多年开腹胆囊切除及3 a以上LC操作经验的熟练的医师实施,故没有因大出血、肝外胆管损伤而中转开腹的病例.

急性胆囊炎时,由于炎症原因使胃肠蠕动减弱,导致胃扩张胀气明显,另外麻醉诱导过程也会使部分气体进入胃内,加重胃的膨胀,影响手术操作视野,因此术前放置胃管十分必要.若术中发现胃胀气明显,影响操作,可使用吸引器从胃管抽吸胃内液、气体,使胃塌陷利于手术进行.本组病例术前均留置胃管.(1)正确解剖Calot三角,Calot三角分为以胆囊颈管为中心的安全区和以三管汇合区为中心的危险区,只能在安全区进行解剖,分离出胆囊颈管交界区上夹切断,而不能在危险区解剖Calot三角,这是预防胆道损伤的关键.自Calot三角后叶向胆囊管衍行处作为突破口,用分离钳钝性分离,见细小血管可以电凝止血.分离Calot三角前叶的脂肪淋巴组织后可清楚地暴露胆囊管、胆囊动脉及可能存在的副肝管,此时,钳闭断离胆囊动脉及胆囊管,便不会损伤肝总管和胆总管.在分离胆囊三角区时,尽可能用钝性分离,以避免胆总管电热灼伤,导致后期胆总管狭窄的严重并发症.Calot三角黏连明显时,应紧靠胆囊及胆囊管分离,不可向肝总管及右肝管方向过分解剖,可以逆行切除胆囊.预防迷走胆管和副胆管损伤,对胆囊三角区的异常管道一定要明确方向后才能处理,对进入胆囊的管道可以钳闭切断,可防止迷走胆管切断,引起术后胆漏.胆囊管不应追求骨骼化,确切上夹2枚于胆囊管残端.剥离胆囊床尽量减少肝组织的损伤.(2)预防大出血:急性胆囊炎胆囊壁充血水肿明显,术中渗血较多时可用生理盐水适当冲洗,渗血常能明显好转,术中稍大出血的主要原因是胆囊动脉、胆囊动脉前后支的损伤,防止胆囊动脉误损出血的关键是仔细解剖Calot三角,胆囊动脉变异是导致胆囊动脉出血的主要原因,常因解剖的变异如双胆囊动脉、低位胆囊动脉而引起损伤,因此,在处理胆囊三角时遇到条索状组织,均应想到胆囊动脉存在的可能,应上钛夹处理.处理胆囊动脉时应确认供给胆囊动脉支近胆囊处离断,以防误伤肝右动脉(部分屈曲的肝右动脉贴近胆囊才分出胆囊动脉)和右肝管或肝总管.术中喷射状的动脉出血,距肝外胆管较远,可直接上钛夹

止血,或用分离钳夹闭出血点,再上钛夹.离肝外胆管太近出血点,注意预防肝外胆管的损伤.电凝止血与钛夹止血相结合,灵活应用,才能达到良好的止血效果.但要避免胆总管电热灼伤,一般认为电凝止血距胆总管2 cm以上就较为安全.一旦发生出血,应保持冷静,可用纱条擦拭后用电凝或上钛夹;若出血较多应尽快吸引和冲洗出血部位,保持手术视野清晰,找到出血点后再上钛夹止血,处理困难时,应立即开腹止血,切忌盲目电凝止血,本组无一例因出血而中转开腹或误伤肝外胆管.(3)放置引流:术中胆囊床止血欠佳;术中胆囊剥破,脓性胆汁溢入腹腔,冲洗不充分;胆管或胆囊动脉夹闭不满意;不能完全除外胆漏等因素均需放置腹腔引流,以利术后观察腹腔内有无出血、胆漏.如引流量不多,除外腹腔内出血、胆漏等情况后,24-72 h可以拔除引流管.(4)本组胆道结石1例,占0.8%,文献报道2%-4%,如何预防胆道遗留结石,除术前做B超或CT、MRCP外,术中做超声和术中造影是主要方法,我院开展了术中造影,经胆囊插管造影摄片起到预防胆道遗留结石和胆道损伤的作用,对胆管的变异和术中有无胆管损伤,可以及时发现和处理.ERCP和EST、网篮取石是治疗胆道遗留结石的主要措施.(5)切口疝预防:戳孔疝主要发生于大于1 cm的戳孔,特别是结石较大,采取扩口取石后.故手术完毕时,戳孔伤口的腹膜和腹直肌鞘一定要缝合,以减少切口疝的发生.(6)中转开腹指征主要有:Calot三角解剖不清,重度黏连;无法控制的出血;胆囊管远端结石嵌顿, Mirizzi综合征形成;与肝外胆管或胃及十二指肠形成内瘘;与肝外胆管黏连致密的萎缩性胆囊炎;术毕发现肝门部胆漏,不能除外胆管损伤等.只要在镜下无法精细地解剖,没有充分把握安全地完成手术,就应考虑中转开腹手术.本组病例,对胆囊及周围黏连严重, Mirizzi综合征中结石嵌顿部位胆囊壁与胆总管及周围组织严重黏连,胆囊解剖变异,可疑恶变及术中快速冰冻病理检查提示癌变,及时中转开腹手术,从而避免出现严重的误诊误治.

■应用要点

对早期的急性结石性胆囊炎行LC较为安全,并发症包括死亡率无明显增加,患者恢复快,建议对早期的急性结石性胆囊炎行LC.

4 参考文献

- 1 Soderlund C, Frozanpor F, Linder S. Bile duct injuries at laparoscopic cholecystectomy: a single-institution prospective study. Acute cholecystitis indicates an increased risk. *World J Surg* 2005; 29: 987-993
- 2 Al Salamah SM. Outcome of laparoscopic cholecystectomy in acute cholecystitis. *J Coll*

■同行评价

文章有较好的可读性, 有一定的临床意义.

- 3 Physicians Surg Pak 2005; 15: 400-403
- 4 黄志强. 现代腹腔镜外科学. 北京: 人民军医出版社, 1994: 89-92
- 5 李君达, 洪德飞, 蔡秀军. 急性胆囊炎腹腔镜切除术. 急诊医学 1998; 7: 103-104
- 6 张维能. 急性胆囊炎腹腔镜切除术. 中国内镜杂志 1998; 4: 33-34
- 7 Johansson M, Thune A, Nelvin L, Stiernstam M, Westman B, Lundell L. Randomized clinical trial of open versus laparoscopic cholecystectomy in the treatment of acute cholecystitis. Br J Surg 2005; 92: 44-49
- 8 Hawasli A. Timing of laparoscopic cholecystectomy in acute cholecystitis. J Laparoendosc Surg 1994; 4: 9-16
- 9 Kolla SB, Aggarwal S, Kumar A, Kumar R, Chumber S, Parshad R, Seenu V. Early versus delayed laparoscopic cholecystectomy for acute cholecystitis: a prospective randomized trial. Surg Endosc 2004; 18: 1323-1327
- 10 Phillips EH, Carroll BJ, Bello JM, Fallas MJ, Daykhovsky L. Laparoscopic cholecystectomy in acute cholecystitis. Am Surg 1992; 58: 273-276
- 11 胡国治, 陈作兵, 郭永忠. 急性胆囊炎腹腔镜切除术量化手术指征探讨. 腹腔镜外科杂志 2003; 8: 13-15

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 •

第十届全国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“第十届全国普通外科学术会议”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

征文内容包括: 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

征稿要求包括: (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) 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.

来稿请寄: 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. E-mail地址: www.fzptwk@public.fz.fj.cn, 传真: 0591-83796855, 电话: 0591-24937077, 军线: 0611-97077, 959770.

乙状结肠憩室穿孔误诊1例

丁文生

丁文生, 山西省河曲县第二人民医院外科 山西省忻州市 036503

通讯作者: 丁文生, 036503, 山西省河曲县第二人民医院外科.

qqdws@sina.com.cn

电话: 0350-7255009

收稿日期: 2006-03-13 接受日期: 2006-03-29

摘要

乙状结肠憩室穿孔在临床上并不常见, 其复杂、多变的症状易引起误诊. 合并粪性腹膜炎时死亡率很高, 采用恰当的处理方法非常重要. 笔者认为一次性切除病变部位, 做改良Paul-Mikulicz手术更有利于患者的恢复, 适合基层医院推广. 随着人们生活水平提高, 老年人长期低纤维素饮食会导致该病发生率上升, 值得注意.

关键词: 乙状结肠憩室穿孔; 腹膜炎; Paul-Mikulicz手术

丁文生. 乙状结肠憩室穿孔误诊1例. 世界华人消化杂志 2006;14(14):1437-1438

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1437.asp>

0 引言

乙状结肠憩室在西方老年人中发病率较高, 随着年龄的增加而增加. 70岁以上的发病率高达50%(尸解), 但憩室穿孔致弥漫性、粪性腹膜炎发病率很低, 仅占3%^[1]. 最近笔者遇到1例, 报告如下.

1 病例报告

男, 75岁. 因排便后下腹疼痛伴有恶心、呕吐16 h就诊. 患者平素便秘, 有胃病史及关节炎史, 常服去痛片. 16 h前患者用力排便后, 突感下腹部疼痛, 不剧烈, 伴下坠感, 曾在本村以“痢疾”输液2000 mL, 用药不详, 逐渐发生腹部疼痛、恶心、呕吐, 转诊我院. 查体: T 38.4℃, P 88次/min, R 30次/min, BP 17/12 kPa, 发育良好, 营养中等, 急性病容, 头颅、五官、心肺正常, 板状腹, 压痛(++), 反跳痛(+++), 肠鸣音弱, 移动性浊音(+). 腹部拍片显示膈下游离气体. 左髂

窝腹部穿刺有灰白色液体, 镜检: 大量脓球. 血WBC $8000 \times 10^9/L$, N 0.78, L 0.12. 诊断为消化性溃疡穿孔, 弥漫性腹膜炎. 硬膜外麻醉下行上腹部经左腹直肌切口探查, 灰白色腹腔积液约2000 mL, 其间混有大量食物残渣, 胃正常, 十二指肠与胆囊黏连, 附着较多脓苔. 分离黏连时患者突发心跳、呼吸骤停, 瞳孔散大, 血压降至0, 经过积极插管人工呼吸、肾上腺素2 mg iv, 升压药及呼吸兴奋剂等联合应用, 约10 min后, P 110次/min, BP 15/9.3 kPa, 瞳孔回缩, 自主呼吸恢复. 继续探查发现小肠以及回盲部、阑尾均无异常, 最后联想到患者主诉开始疼痛为下腹部, 是否有结肠穿孔? 于是延长切口至中下腹, 发现乙状结肠中部2 cm×1.5 cm穿孔, 边缘肠壁变薄, 呈囊状. 认定为憩室穿孔. 清洗腹腔后一期切除病变肠管4 cm, 残端于左髂窝穿通腹壁行双腔造瘘术, 即改良Paul-Mikulicz手术, 术后患者平稳, 1 wk后造瘘口开放, 排便正常. 3 mo后在局麻下行乙状结肠吻合置入腹腔. 患者痊愈.

2 讨论

老年人结肠憩室主要与老年人低渣饮食、便秘、缺乏劳动有关, 大便干燥易导致结肠黏膜沿血管穿透至肠壁的薄弱点向外囊样突起, 形成挤压性憩室^[1]. 急性乙状结肠憩室炎典型表现为左下腹疼痛、便秘、恶心、呕吐、发热、白细胞增多, 有时有寒战. 这一组症状称为左侧阑尾炎^[2]. 慢性憩室炎, 表现为左下腹隐痛、左髂窝压痛、矢气过多等. 如引起节段乙状结肠水肿、梗阻, 则发生下腹绞痛和肠梗阻, 很多老年人对结肠憩室所引起的轻微症状如偶尔腹痛、腹胀、矢气过多等下腹部不适常不介意, 不到医院检查, 直到症状加重或出现并发症才去就诊. 穿孔为其最严重的并发症, 引起弥漫性腹膜炎, 死亡率很高, 较结肠癌死亡率高^[1]. 很快发生中毒性和低血容量性休克, 处理以早期手术一期切除病变部位, 作改良Paul-Mikulicz手术为好.

■背景资料

乙状结肠憩室西方国家甚为常见, 据统计, 我国近年来本病发病率呈上升趋势. 一般认为本病发生与经济水平和饮食习惯密切相关. 经济发达的国家和地区明显高于发展中国家和经济欠发达地区; 即使在同一国家内部, 高收入阶层明显多于贫困人群. 此与膳食结构中纤维素成分摄入量多少可能有关. 低渣或无渣饮食者明显高于高渣或多渣饮食者.

■应用要点

一期切除病变部位做改良Paul-Mikulicz手术是憩室炎并发穿孔及急性腹膜炎时的暂时性肠道转流方法, 他去除了引起腹膜炎和中毒的根源, 对于后期关闭瘘口又很容易. 手术中稳妥、细心的操作非常重要, 可避免并发症的发生.

■同行评价

本病例较少见, 有一定临床借鉴价值.

建议老年人使用高渣饮食、避免泻药、减少结肠压力. 可能对减少此病的发生有用.

该例术前误诊主要与太过依赖辅助检查而忽视了患者主诉, 加之就诊时间过晚, 物理检查已较难区分, 另外该病在临床上并不常见, 医者缺乏认识所致. 因此患者的主观叙述很重要, 其疼痛的首发部位, 很可能就是疾病所在. 笔者认为手术中患者发生心跳、呼吸骤停与分离十二指肠韧带与胆囊黏连有关, 可能牵扯Calot三角区诱发“胆心反射”. 曾有报道, 在硬膜外麻醉

行胆囊切除术, 因暴露不佳, 牵引胆囊Hartmann袋拉紧Calot三角区时突发心跳、呼吸骤停的病例^[3]. 所以良好的肌松, 充分的暴露, 仔细、谨慎、稳妥的操作是避免上述问题的关键.

3 参考文献

- 1 刘绍魁 等译. 老年人常见外科问题. 第1版. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1983: 109-111
- 2 [美]A·M·哈维. 临床鉴别诊断学—临床表现的解释. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 117
- 3 张远水, 姜蔚. 肥胖型外科病人临床处理体会. 中国实用外科杂志 1996; 5: 303

电编 韩江燕 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 •

中华消化学会全国第二届炎症性肠病学术会议

本刊讯 中华消化学会全国第二届炎症性肠病学术会议将于2006-06-18/20在广州举行, 现将征文通知如下:

1 稿件要求及截稿日期

结构式摘要800字(附软盘), 2006-06-30截稿

2 联系方式

广州市中山大学一院消化科高翔收(邮编: 510080)

世界华人消化杂志投稿须知

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。

《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。

《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信箱郎辛庄北路58号院怡寿园1066号, 电话: 010-85381901 Email: wcjd@wjgnet.com http://www.wjgnet.com.

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T_{1/2}, 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*-methylaniline(*N*-甲基乙酰胺), *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} , V_d , $T_{1/2}$, *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)或30 kDa; “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应改为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值的文句中, 例如每天不写每d, 但每天8 mg可写8 mg/d. 在一个组合单位符号内不得有1条以上的斜线, 例如不能写成mg/kg/d, 而应写成mg/(kg·d), 且在整篇文章内应统一. 单位符号没有单、复数的区分, 例如, 2 min不是2 mins, 3 h不是3 hs, 4 d不是4 ds, 8 mg不是8 mgs. 半个月, 15 d; 15克, 15 g; 10年, 10 a; 10%福尔马林, 40 g/L甲醛; 95%酒精, 950 mL/L酒精; 5% CO₂, 50 mL/L CO₂; 1:1 000肾上腺素, 1 g/L肾上腺素; 胃黏膜含促胃液素36.8 pg/mg, 改为胃黏膜蛋白含促胃液素36.8 ng/g; 10%葡萄糖改为560 mmol/L或100 g/L葡萄糖; 45 ppm=45×10⁻⁶; 离心的旋转频率(原称转速)用r/min, 超速者用g; 药物剂量若按体质量计算, 一律以“/kg”表示.

2.5 统计学符号 (1)*t*检验用小写*t*; (2)*F*检验用英文大写*F*; (3)卡方检验用希文小写 χ^2 ; (4)样本的相关系数用英文小写*r*; (5)自由度用希文小写*v*; (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^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; 第三套为^e*P* <0.05, ^f*P* <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

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密度,例如6 347意指6 000分之一的精密密度。任何一个数字,只允许最后一位有误差,前面的位数不应有误差。在一组数字中的mean \pm SD应考虑到个体的变差,一般以SD的1/3来定位数,例如 $3\ 614.5 \pm 420.8$ g, SD的1/3达一百多g,平均数波动在百位数,故应写成 3.6 ± 0.4 kg,过多的位数并无意义。又如 8.4 ± 0.27 cm,其SD/3=0.09 cm,达小数点后第2位,故平均数也应补到小数点后第2位。有效位数以后的数字是无效的,应该舍。末尾数字,小于5则舍,大于5则进,如恰等于5,则前一位数逢奇则进,逢偶(包括“0”)且5之后全为0则舍。末尾时只可1次完成,不得多次完成。例如23.48,若不要小数点,则应成23,而不应该 $23.48 \rightarrow 23.5 \rightarrow 24$ 。年月日采用全数字表达法,请按国家标准GB/T 7408-94书写。如1985年4月12日,可写作1985-04-12; 1985年4月,写作1985-04; 从1985年4月12日23时20分50秒起至1985年6月25日10时30分止,写作1985-04-12 T23:20:50/1985-06-25 T10:30:00; 从1985年4月12日起至1985年6月15日止,写作1985-04-12/06-16,上午8时写作08:00,下午4时半写作16:30。百分数的有效位数根据分母来定:分母 ≤ 100 ,百分数到个位; $101 \leq$ 分母 $\leq 1\ 000$,百分数到小数点后1位; 余类推。小数点前后的阿拉伯数字,每3位间空1/4阿拉伯数字距离,如1 486 800.475 65。完整的阿位伯数字不移行!

2.7 标点符号 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末。标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU。外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体。

3 稿件格式

3.1 题名 简明确切地反映论文的特定内容,鲜明而有特色,阿拉伯数字不宜开头,不用副题名,一般20个字左右,最好不超过26个字。避免用“的研究”或“的观察”等非特定词。

3.2 作者 论文署名作者不宜过多,一般不超过8人,主要应限于参加研究工作并能解答文章有关问题、能对文稿内容负责者,对研究工作有贡献的其他人可放入致谢中。作者署名的次序按贡献大小排列,多作者时姓名间用逗号,如是单名,则在姓与名之间空1格(正文和参考文献中不空格)。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。wcjd@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

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。

《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。

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。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角码。

如马连生^[1]报告……, 潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……; PCR方法敏感性高^[6-7]. 文献序号作正文叙述时, 用与正文同号的数字并排, 如本实验方法见文献[8]. 所引参考文献必须以近2-3年核心期刊为准, 引用被PubMed收录的期刊文献用英文表达, 请附引用文献网上摘要打印件, 包括PMID编号(摘要的左下方). 按顺序编号装订, 并考入磁盘内. 在引用参考文献页码末尾注明PMID编号; 无PMID编号的期刊请删除(重要文献必须保留者, 请附首页复印件). 期刊: 序号, 作者(列出全体作者). 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、补充或删节时, 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》、《中国生物医学文摘》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>

World Journal of Gastroenterology创刊于1995-10-01, 原刊名《China National of New Gastroenterology》, 1995-06-27 国科发信字(95)225号批准国内外公开发行. 1998-02-12经国家科学技术部和国家新闻出版总署批准更名为WJG, 国科发信字(1998)027号. 2002-11-14经国家工商行政管理总局商标局核定使用商品(第16类), 获得商标注册证第2001158号.

• 致谢 •

致谢世界华人消化杂志编委

本期文章审稿中(包括退稿), 我刊编委付出了宝贵的时间和大量的精力, 提高了《世界华人消化杂志》的学术质量, 在此表示衷心感谢!

陈海龙 教授
大连医科大学附属第一医院普外科

陈积圣 教授
中山大学孙逸先纪念医院肝胆外科

陈凜 教授
中国人民解放军总医院普通外科

陈卫昌 教授
苏州大学附属第一医院消化内科

高春芳 研究员
第二军医大学附属长征医院实验诊断科

高毅 教授
广州市工业大道中253号珠江医院肝胆外科

韩天权 教授
上海交通大学医学院瑞金医院外科

何振平 教授
第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所肝胆外科学

洪天配 教授
北京大学第三医院内分泌科

黄志勇 副教授
华中科技大学同济医学院附属同济医院肝脏外科中心

匡安仁 教授
四川大学华西医院核医学科

关玉盘 教授
首都医科大学附属北京朝阳医院消化科

李靖 副教授
第三军医大学新桥医院肝胆外科

刘正稳 教授
西安交通大学医学院第一附属医院

聂青和 副教授
第四军医大学唐都医院传染病学

牛建昭 教授
北京中医药大学

潘兴华 副主任医师
成都军区昆明总医院医学实验科

彭曦 副研究员
第三军医大学西南医院烧伤研究所

沈琳 副教授
北京大学临床肿瘤学院

孙学英 教授
哈尔滨医科大学第一临床医学院

王效民 教授
厦门大学附属中山医院肝胆外科

魏经国 教授
西安第四军医大学唐都医院放射科

闻勤生 教授
第四军医大学唐都医院消化科

吴梧桐 教授
中国药科大学生物制药学院

肖恩华 教授
中南大学湘雅二医院放射教研室

许文燮 教授
上海交通大学生命科学与技术学院

杨林 副研究员
中山大学附属第三医院感染病科

姚登福 教授
南通医学院附属医院内科

伊力亚尔·夏合丁 教授
新疆医科大学第一附属医院胸外科

余龙 教授
上海复旦大学遗传工程式国家重点实验室

张锦生 教授
复旦大学上海医学院病理学系

张宗明 教授
清华大学第一附属医院普外科